

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Studium klinicky aplikovatelné nádorové  
imunoterapie a jejich mechanismů**

Diplomová práce

**Bc. Simona Glaserová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Glaserová, S., 2015: Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů. [Study of clinically applicable cancer immunotherapy and their mechanisms. Mgr. Thesis, in Czech.] – 66 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace: The aim of this thesis was study of replacement of LPS in innate immunity based cancer immunotherapy. Application of poly (I:C) with mixture of mannan-SMCC + R-848.HCl leads to synergy, higher reduction of tumor growth and significant prolongation of survival. The significance and mechanism of action of neutrophils have also been studied within this therapy.

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

V Českých Budějovicích, 20.4.2015

.....  
Bc. Simona Glaserová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vedení diplomové práce a také za jeho trpělivost, ochotu, cenné rady a organizaci v rámci experimentální části práce. Poděkování patří také kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za příjemné pracovní zázemí při provádění experimentů. Dále bych ráda poděkovala zúčastněným kolegyním a kolegům za rady a spolupráci. Velké dík patří také mé rodině a příteli za jejich trpělivost, obětavou podporu během celého studia a vytváření potřebného zázemí.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....</b>	<b>2</b>
2.1	CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	2
2.2	ROZDĚLENÍ NÁDORŮ.....	2
2.3	KARCINOGENEZE.....	3
2.3.1	<i>Tumor supresorové geny a onkogeny.....</i>	<i>4</i>
2.3.2	<i>Fáze karcinogeneze.....</i>	<i>5</i>
2.4	MELANOM.....	6
2.4.1	<i>Melanom B16F10.....</i>	<i>6</i>
2.5	IMUNITA.....	7
2.5.1	<i>Adaptivní imunita.....</i>	<i>7</i>
2.5.2	<i>Vrozená imunita.....</i>	<i>7</i>
2.5.2.1	<i>Zánět.....</i>	<i>8</i>
2.5.2.2	<i>Neutrofilý a jejich protinádorová aktivita.....</i>	<i>8</i>
2.5.2.2.1	<i>NETs - neutrophil extracellular traps.....</i>	<i>9</i>
2.5.3	<i>Nádorová imunologie.....</i>	<i>11</i>
2.5.3.1	<i>Imunitní dohled.....</i>	<i>11</i>
2.5.3.2	<i>Nádorové antigeny.....</i>	<i>12</i>
2.5.3.3	<i>Protinádorová imunita.....</i>	<i>12</i>
2.5.3.4	<i>Nádorový imunitní cyklus (cancer-immunity cycle).....</i>	<i>13</i>
2.5.3.5	<i>Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem.....</i>	<i>14</i>
2.6	IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	15
2.6.1	<i>Pattern recognition receptors (PRRs).....</i>	<i>16</i>
2.6.1.1	<i>Rozdělení PRRs.....</i>	<i>17</i>
2.6.1.1.1	<i>Toll-like receptory – TLRs.....</i>	<i>18</i>
2.7	IMUNOTERAPIE NÁDORŮ ZALOŽENÁ NA KOMBINACI TLR A LIGANDŮ FAGOCYTÁRNÍCH RECEPTORŮ.....	20
2.7.1	<i>TLR agonisté -možné náhrady LPS.....</i>	<i>20</i>
2.7.1.1	<i>MPLA –agonista TLR4.....</i>	<i>20</i>
2.7.1.2	<i>R 848 (Resiquimod) – agonista TLR7/8.....</i>	<i>21</i>
2.7.1.3	<i>Poly (I:C).....</i>	<i>23</i>
2.7.2	<i>Agonisté fagocytárních receptorů.....</i>	<i>24</i>
2.7.2.1	<i>Manan , Manan vázající lektin (MBL), manózový receptor.....</i>	<i>24</i>
2.8	MOŽNOST TERAPIE A PODÁVÁNÍ PAMP.....	25
2.8.1	<i>Samomikroemulgující systém SMEDDS.....</i>	<i>25</i>
2.9	INHIBICE OXIDATIVNÍHO VZPLANUTÍ A TVORBY NETS.....	26
2.9.1	<i>ROS - Epikatechin.....</i>	<i>26</i>
2.9.2	<i>NETs - Cl-amidin.....</i>	<i>26</i>
2.10	LY6G.....	27

<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>29</b>
4.1	SEZNAM CHEMIKÁLÍ.....	29
4.2	EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA .....	30
4.3	BUNĚČNÁ LINIE.....	30
4.4	PŘÍPRAVA BUNĚK B16-F10 .....	30
4.5	TRANSPLANTACE BUNĚK MELANOMU B16-F10 .....	30
4.6	MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ .....	30
4.7	POČÍTÁNÍ METASTÁZ V PLICÍCH .....	31
4.8	PRŮMĚRNÁ REDUKCE NÁDOROVÉHO RŮSTU.....	31
4.9	PŘÍPRAVA TERAPEUTICKÝCH LÁTEK .....	31
4.9.1	<i>Příprava mannan-BAM.....</i>	<i>31</i>
4.9.2	<i>Příprava roztoků obsahujících Resiquimod.HCl .....</i>	<i>32</i>
4.9.3	<i>Příprava mannan-SMCC .....</i>	<i>32</i>
4.9.4	<i>Příprava SMEDDS.....</i>	<i>32</i>
4.10	METODICKÝ POSTUP IN VITRO EXPERIMENTŮ.....	33
4.10.1	<i>Inkubace nádorových buněk s ligandem .....</i>	<i>33</i>
4.10.2	<i>Izolace neutrofilů .....</i>	<i>33</i>
4.10.3	<i>Imunomagnetická seprace neutrofilů.....</i>	<i>33</i>
4.10.4	<i>Priming neutrofilů.....</i>	<i>34</i>
4.10.5	<i>Přidání inhibitoru tvorby NETs a počítání buněk.....</i>	<i>34</i>
4.11	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	34
4.12	SCHÉMA JEDNOTLIVÝCH EXPERIMENTŮ .....	35
4.12.1	<i>Pokus č. 1: Terapie melanomu pomocí MPLA, mannan-BAM a jejich směsi.....</i>	<i>35</i>
4.12.2	<i>Pokus č. 2: Terapie melanomu pomocí perorálně podávaných SMEDDS.....</i>	<i>35</i>
4.12.3	<i>Pokus č. 3: Terapie melanomu pomocí R-848.HCl, mannan-BAM a jejich směsi.....</i>	<i>36</i>
4.12.4	<i>Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí aplikace směsi mannan-SMMC+R- 848. HCl, řešení otázky synergie s POLY I:C .....</i>	<i>36</i>
4.12.5	<i>Pokus č. 5: Studium vlivu deplece neutrofilů pomocí protilátky proti Ly6G na růst nádoru. ....</i>	<i>37</i>
4.12.6	<i>In vitro studium inhibice tvorby NETs, vliv Cl-amidinu na cytotoxické působení neutrofilů s použitím různých množství buněk.....</i>	<i>37</i>
4.12.7	<i>In vitro inhibice tvorby NETs s použitím různých koncentrací Cl-amidinu, vliv na cytotoxické působení neutrofilů.....</i>	<i>38</i>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>39</b>
5.1.1	<i>Pokus č. 1: Terapie melanomu pomocí MPLA, mannan-BAM a jejich směsi.....</i>	<i>39</i>
5.1.2	<i>Pokus č. 2: Terapie melanomu pomocí perorálně podávaných SMEDDS.....</i>	<i>41</i>
5.1.3	<i>Pokus č. 3: Terapie melanomu pomocí R-848.HCl, mannan-BAM a jejich směsi.....</i>	<i>42</i>

5.1.4	<i>Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí aplikace směsi manan-SMMC+R- 848.HCl, řešení otázky synergie s POLY I:C .....</i>	44
5.1.5	<i>Pokus č. 5: Studium vlivu deplece neutrofilů pomocí protilátky proti Ly6G .....</i>	47
5.1.6	<i>In vitro studium inhibice tvorby NETs. Vliv Cl-amidinu na cytotoxické působení neutrofilů s použitím různých množství buněk .....</i>	47
5.1.7	<i>In vitro inhibice tvorby NETs s použitím různých koncentrací Cl-amidinu, vliv na cytotoxické působení neutrofilů .....</i>	49
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>57</b>

# 1 Úvod

Česká Republika patří mezi onkologicky nejzatíženější státy v evropském i celosvětovém měřítku a mortalita rakoviny se podílí 25,8% na celkové úmrtnosti populace. Nádorová onemocnění tak patří k druhým nejčastějším příčinám úmrtí hned za kardiovaskulárními chorobami, přičemž podle předpovědi Americké asociace klinické onkologie (ASCO 2013) vzroste počet nových onemocnění v roce 2030 o 45 % a nádorová onemocnění se stanou nejčastější příčinou úmrtí v populaci namísto kardiovaskulárních chorob (Dusek a kol. 2014).

I z těchto důvodů výzkum rakoviny a hledání nových léčebných postupů stále nabývá na důležitosti. Běžně používané radioterapeutické a cytotoxické přístupy jsou hlavně díky své nespecifičnosti, při které jsou poškozovány jak buňky nádorové, tak i buňky zdravé, spojovány často s devastujícími následky pro pacienta. V důsledku toho se nyní velká pozornost zaměřuje na relativně nový přístup, tzv. cílenou imunoterapii, která využívá přirozené imunitní mechanismy k aktivaci protinádorové imunity.

Obsahem této práce je imunoterapie založená na stimulaci vrozené imunity, prostřednictvím molekul vyskytujících se na patogenních organizmech, tzv. Pathogen associated molecular patterns (PAMPs), které jsou rozpoznávány receptory vrozené imunity PRRs (Pattern recognition receptors).

## 2 Nádorová onemocnění

### 2.1 Charakteristické znaky nádorových buněk

Nádory vznikají z normálních buněk následkem genetických změn ovlivňujících přísně kontrolovaný systém buněčného růstu. Bylo popsáno šest znaků nádorových buněk, které získávají na své cestě k jakémukoliv z více než sta různých typů lidských maligních onemocnění (Pietras a Ostman 2010). Mezi ty to znaky patří: soběstačnost růstových signálů, rezistence k růstovým inhibičním signálům, schopnost uniknout apoptóze, neomezený replikační potenciál, nepřetržitá angiogeneze a schopnost invaze a metastázování. Sedmý potenciální znak rakoviny, vyhnutí se imunitnímu dozoru, umožňuje nádorovým buňkám uniknout protinádorové imunitní odpovědi nebo ji aktivně potlačovat. Kromě rakovinových buněk, nádory vykazují další rozměr složitosti: obsahují široký repertoár zdánlivě normálních buněk, které přispívají k získání charakteristických znaků vytvářením „nádorového mikroprostředí“ (Hanahan a Weinberg 2011).

### 2.2 Rozdělení nádorů

Nádory můžeme rozdělit do tří hlavních tříd:

- Benigní nádory: mohou vznikat v jakékoliv tkáni, rostou lokálně a mohou tak způsobovat potíže lokálním tlakem nebo obstrukcí. Společným znakem těchto nádorů je neschopnost šířit se do vzdálených míst.
- In situ nádory: obvykle se vyvíjí v epitelu, obvykle ale ne vždy jsou malých rozměrů. Buňky mají morfologický vzhled nádorových buněk, ale zůstávají v epitelové vrstvě, neinvadují bazální membránu a podpůrný mezenchym. Různé stupně dysplazie mohou předcházet karcinomu in situ.
- Maligní nádory: plně rozvinutý nádor s charakteristickou schopností napadat a ničit přiléhající mezenchym (lokální invaze). Nádorové buňky získávají prostřednictvím krevního řečiště živiny a produkují řadu proteinů, které podporují růst krevních cév do nádoru a nádor tak dále nepřetržitě roste. Nově vzniklé cévy jsou značně nedokonalé a může snadno dojít k jejich poškození a invadující nádorové buňky mohou těmito a lymfatickými cévami pronikat. Nádorové fragmenty mohou být nesený těmito cévami

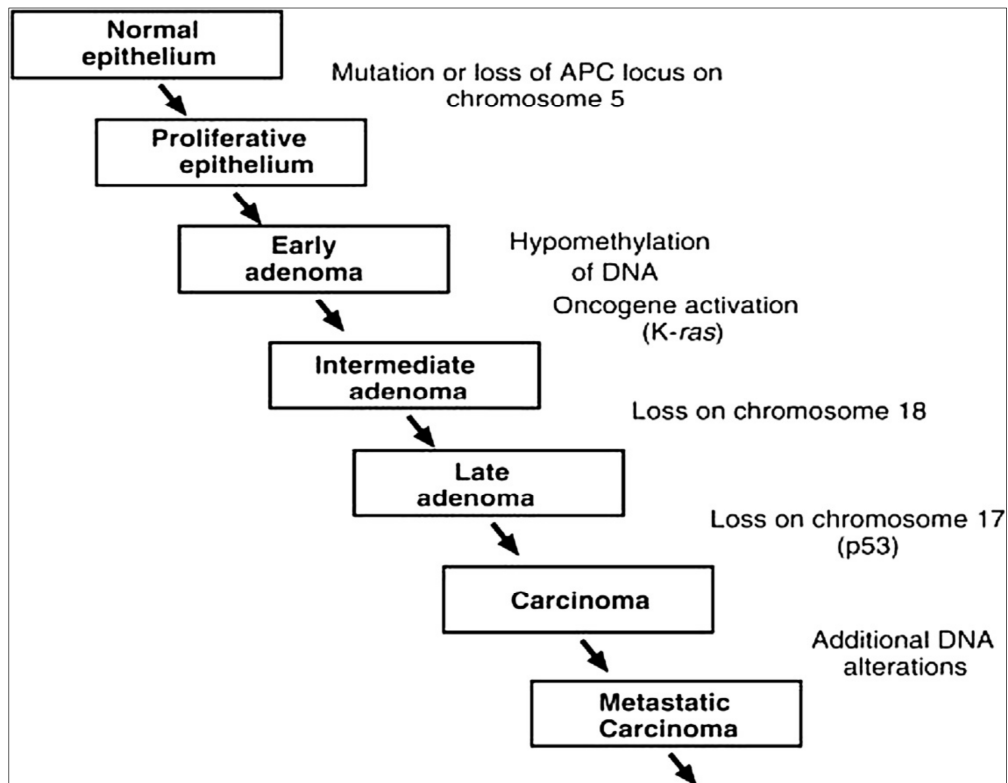


do lokálních lymfatických uzlin nebo do vzdálených orgánů, kde mohou zakládat sekundární nádory (metastázy)(Knowles a Selby 2005).

### **2.3 Karcinogeneze**

Karcinogeneze (proces vývoje rakoviny) je vícestupňový proces. Karcinogen je látka, která způsobuje rakovinu. Karcinogen je také definován jako fyzikální, chemické nebo biologické činidlo nebo kombinace činidel, které vedou k rozvoji rakoviny v organismu. Mezi fyzikální činitele patří ionizující záření (X-paprsky), neionizující záření (UV světlo) a částice (azbest). Mezi chemické látky lze zahrnout chroman vápenatý, benzidin, složité směsi jako je cigaretový kouř a vedlejší uhelné produkty. Za biologické činitele jsou považovány viry a parazité. Pravděpodobnost rakoviny se zvyšuje s potencií karcinogenu, se stupněm a délkou trvání expozice a délkou doby, která uplynula od expozice (Warshawsky a Landolph 2006).

Obecně přijímaný vícestupňový model karcinogeneze navržený Fearonem a Vogelsteinem (Fearon a Vogelstein, 1990) slouží jako rámec pro studium karcinogeneze (Obr. 1). Studium vícenásobných benigních a maligních nádorů tlustého střeva bylo zjištěno, že benigní novotvary obsahují mutace v genech, jako jsou APC, ras a p53 a je popisována častá přítomnost několika mutací na nádor, zejména u maligních nádorů. Model popisuje postupné získávání mutací a věří se, že v procesu karcinogeneze je důležitější celkové nahromadění mutací (nejméně pět až sedm) než pořadí.



Obr. 1: Vícestupňový model rakoviny tlustého střeva (Wexler 2014).

### 2.3.1 Tumor supresorové geny a onkogeny

Geneticky, tento vícestupňový proces zahrnuje aktivaci protoonkogenů, inaktivaci tumor supresorových genů a epigenetické události, které mění genovou expresi a procesy které jsou zapojeny do buněčné smrti, oprav DNA a metylace (Wegler 2014). Jak protoonkogeny, tak tumor supresorové geny jsou normální buněčné geny nezbytné pro přežití (Jakóbisiak a kol. 2003).

Mezi odhadovanými 25000 geny v savčím genomu je kolem 100 genů, které jsou klasifikovány jako onkogeny, protože aktivace těchto genů představuje zásadní událost pro rozvoj mnoha, ne-li všech nádorů. Onkogeny byly poprvé objeveny studiem genetických změn rakoviny. Termín aktivace onkogeny označuje kvantitativní nebo kvalitativní změny v expresi nebo funkci onkogeny. V neaktivovaném stavu se onkogen (nazývaný jako protoonkogen) uplatňuje v řadě základních funkcí v savčím genomu. Vzhledem k tomu, že primární úloha onkogenů spočívá v kontrole buněčného růstu, proliferace a diferenciaci, nepřiměřená exprese těchto genů může mít vliv na abnormální růst a proliferaci tkáně. Aktivace onkogenů je tak důsledkem nevhodné nebo nadměrné expresi protoonkogeny (Wegler 2014).

Na druhou stranu tumor supresorové geny byly obvykle rozpoznány podle jejich zárodečných mutací, které predisponují postižené jedince k dědičným formám rakoviny (Jakóbisiak a kol. 2003). Tumor supresorové geny, původně nazývané antionkogeny, fungují v potlačení rozvoje rakovinového růstu. Zatímco onkogeny k tomu, aby byly účinné, musí být aktivovány, tumor supresorové geny musí být naopak inaktivovány nebo ztraceny pro rozvoj rakoviny. Bylo prokázáno, že ztráta nebo mutace obou otcovských a mateřských kopií, to znamená v obou alelách tumor supresorového genu, musí nastat, aby došlo k odstranění jejich vlivu v potlačení vzniku rakoviny (Wegler 2014). Tumor supresorové geny se podílejí na obraně proti rakovině téměř ve všech fázích procesu karcinogeneze. Jeden z nejdůležitějších tumor supresorových genů je p53, nazývaný „strážce genomu“ pro jeho hlavní roli v opravě DNA. Za normálních fyziologických podmínek je protein p53 exprimován na velmi nízké úrovni, je vysoce nestabilní a má nízkou DNA vazebnou kapacitu. Dědičnost mutantní alely p53 tumor supresorového genu je příčinou Li-Fraumeni syndromu, charakteristickým zvýšeným rizikem celé řady nádorových onemocnění (Jakóbisiak a kol. 2003).

### **2.3.2 Fáze karcinogeneze**

Na základě experimentální studie na hlodavcích, vícestupňový proces karcinogeneze je tradičně rozdělován na iniciaci, promoci a progresi (Jakóbisiak a kol. 2003).

Iniciace začíná poškozením DNA v buněčné populaci vystavené chemickým, fyzikálním nebo mikrobiálním (většinou virovým) karcinogenům. Pokud nedojde k opravě, poškození DNA může vyvolat genetické mutace. Většina těchto změn DNA je bezvýznamných pro život buňky a zcela nevinných z hlediska rizika rakoviny. Poškození rozhodujících genů by však mohlo být letální, ale ani v tomto případě nevyplývá riziko indukce nádoru. Pouze příležitostně mutace vytvářejí růstovou výhodu pro buňku z důvodu zvýšené proliferace nebo snížené buněčné smrti. Nejdůležitější v této souvislosti jsou mutace aktivujících proto-onkogenů a inaktivujících tumor supresorových genů. (Jakóbisiak a kol. 2003) Funkční fáze iniciace je relativně krátká a může nastat během hodin nebo dnů. Naproti tomu progresi iniciované buňky v plně maligní buňku je dlouhotrvající proces vyžadující měsíce u zvířat a roky u lidí (Wegler 2014).

Promoci může být definována jako proces klonální expanze iniciované buňky, který vede k tvorbě pre-neoplastických buněk produkujících noduly, polypy nebo papilomy (Jakóbisiak a kol. 2003)

Fáze progresu je část neoplastického procesu spojená s rozvojem iniciované buňky v biologicky maligní buněčnou populaci. Obecně se progresu často používá k označení stádií, jimiž se benigní proliferace stává maligní, nebo kde se nádor rozvíjí z nízkého do vysokého stupně malignity. Během progresu nádory vykazují zvýšenou invazivitu, rozvíjí schopnost metastazovat a poté dochází ke změnám v biochemických, metabolických a morfologických vlastnostech (Wegler 2014).

## **2.4 Melanom**

Melanom je způsoben transformací melanocytů, ve kterých došlo k nahromadění genetických změn vedoucích k abnormální proliferaci a diseminaci. Predispozice k tomuto onemocnění může být ovlivněna genetickým pozadím jednotlivce, stavem pigmentace a expozicí UV záření. Klinicky může být melanom rozdělen do pěti skupin na základě umístění a progresu: získané a kongenitální névy bez dysplastických změn, dysplastické névy se strukturálními a architektonickými atypii, radiální růstová fáze (RGP), vertikální růstová fáze melanomu (VGP) in situ nebo invazivní přes dermis a metastatický melanom. Na druhé straně klasifikace TNM – tumor, uzliny, metastázy se zaměřuje na tloušťku nádoru a ulceraci (T- kategorie), počet metastatických lymfatických uzlin a nádorová zátěž v každé uzlině (N- kategorie) a viscerální a non-viscerální metastázy (M-kategorie) (Germann a kol. 2014).

### **2.4.1 Melanom B16F10**

Buněčná linie B16 byla odvozena před více než 60 lety z chemicky indukovaného nádoru myši C57BL/6 (Herlyn a Fukunaga-Kalabis 2010). Co se týká melanomu B16 jako modelu pro lidský melanom, jedná se o vhodný model. Jeho rychlý růst, nízká exprese MHC I molekul, necitlivost k adoptivní terapii CTL u podkožních onemocnění jsou horší v porovnání s většinou lidským melanomů, a navrhnout léčbu melanomu B16 představuje těžkou zkoušku pro nádorovou imunoterapii. V roce 1970 bylo izolováno několik variant melanomu B16. Hlavní rozdíly mezi subliniemi spočívají v jejich metastazujícím potenciálu a citlivosti k destrukci imunitním systémem. Nejčastěji používanou variantou je melanom B16F10, který je vysoce agresivní a metastazuje z primárního místa v podkoží do plic (Overwijk a Restifo 2001). Vzhledem k silné pigmentaci je tato linie považována mnohými vědci jako ideální model melanomu. Hlavním problémem však je, že většina jejich adhezivních a růstových faktorů je odlišná od melanomu u lidí, respektive lidských protějšků melanomu. Stejně tak enzymy uplatňující se při invazi do tkání, schopnost buněk překonat imu-

nitní systém, antiapoptotické mechanismy a mnoho dalších charakteristických nádorových znaků neodráží lidské onemocnění (Herlyn a Fukunaga-Kalabis 2010). Rodičovská linie je pojmenována B16F1, další varianty jsou B16F0, s nízkou schopností metastazovat a B16 BL6 s vysokým stupněm metastazování a střední kolonizací plic (Overwijk a Restifo 2001).

## **2.5 Imunita**

Základní pojetí v moderní biologii je klasifikace imunitní odpovědi na vrozenou nebo adaptivní. Tyto dva systémy jsou rozlišovány podle toho, zda jsou receptory pro antigen zakódovány v zárodečné linii (vrozená imunita) nebo vytvářeny somaticky genovým přesmykem nebo hypermutacemi (adaptivní imunita) (Kanzler a kol. 2007).

### **2.5.1 Adaptivní imunita**

Adaptivní rameno imunitního systému se skládá z B a T buněk. Ve srovnání s vrozenou imunitní odpovědí, která rozpoznává patogeny na základě nespecifických molekulárních vzorů, jako například jednořetězcová RNA nebo lipopolysacharid, adaptivní imunitní odpověď je řízena obrovskou řadou nesmírně rozmanitých a vysoce specifických antigenních receptorů na T buňkách (TCR) a B buňkách (BCR). Diverzita a specifita těchto antigen specifických receptorů je výsledkem V(D)J rekombinace, formy genetické rekombinace, která náhodně kombinuje variabilní, diverzifikační a spojovací genové segmenty a umožňuje vytváření milionů různých vysoce specifických receptorů (Raval a kol. 2014). Pokud se tyto molekuly vážou na strukturálně příbuzné proteiny, zvané antigeny a za předpokladu, že jsou přítomné kostimulační signály, dochází k proliferaci antigen-specifických lymfocytů (Adam a kol. 2003). Tento proliferační proces, jako výsledek aktivace, je známý jako klonální selekce a podporuje robustní antigen specifickou imunitní odpověď, stejně jako rozvoj dlouhodobých paměťových buněk (Raval a kol. 2014). Dvě další rodiny molekul hrají významné role v získané imunitě: produkty genů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a cytokiny (Adam a kol. 2003). Cytokiny jsou hlavními mediátory obrany hostitele, v tom, že regulují komunikaci mezi antigen prezentujícími buňkami (APCs), lymfocyty a dalšími hostitelskými buňkami v průběhu imunitní odpovědi (Belardelli a Ferrantini 2002).

### **2.5.2 Vrozená imunita**

Vrozená imunita funguje jako první linie obrany proti cizím patogenům, odpovídá v krátkém časovém úseku během minut, až hodin a má celou řadu efektorových mechanismů.

Existuje velké množství různých složek vrozené imunity zahrnující fyziologické bariéry (epitel kůže a slizniční membrány) efektorové buňky (makrofágy, NK buňky, skupina vrozených lymfocytů, dendritické buňky, žírné buňky, neutrofilů a eozinofilů kromě jiných) mechanismus rozpoznávání (pattern recognition - Toll-like receptory, NOD-like receptory, ...) a humorální mechanismy (proteiny komplementu a cytokiny). Na rozdíl od více specifické, ale pomalejší adaptivní imunitní odpovědi skládající se především z B a T buněk, rychlejší vrozená imunitní odpověď je obvykle charakterizována zánětem tkáně. Zánět tkáně, jako součást vrozené imunitní odpovědi, pomáhá eliminovat invazivní cizí patogeny, zahajuje opravu tkáně a může sloužit ke stimulaci adaptivní imunitní odpovědi prostřednictvím B a T buněk. Nicméně existuje značné množství důkazů, že jak akutní, tak chronický zánět může podporovat genetické abnormality a vývoj rakoviny ( Raval a kol. 2014).

### **2.5.2.1 Zánět**

Hlavním smyslem vrozeného imunitního systému je zprostředkovat zánět, proces, ve kterém jsou krevní buňky a složky plazmy dodávány do místa rozrušené tkáňové homeostázy, jako je tomu v případě infekce nebo poranění. Zánět je spuštěn hlavně rozpoznáním mikrobů nebo jiných signálů "nebezpečí" receptory exprimovanými buňkami vrozené imunity. Při nástupu akutní zánětlivé reakce, tkáňové rezidentní makrofágy, dendritické buňky a žírné buňky produkují řadu chemotaktických molekul, cytokinů a mediátorů zánětu, které přitahují neutrofilů a monocytů do postižené tkáně. Prostřednictvím uvolnění antimikrobiálních látek, rozsáhlé fagocytózy, remodelace extracelulární matrix a možné aktivace adaptivní imunitní odpovědi, buňky vrozené imunity působí tak, že odstraňují škodlivý zdroj a obnovují tkáňovou homeostázu (Nowarski a kol. 2013).

### **2.5.2.2 Neutrofilů a jejich protinádorová aktivita**

V poslední době se setkáváme se stále větším zájmem o studium role neutrofilů v maligních onemocněních. Tento zájem vyplývá ze skutečnosti, že zánět související s rakovinou je nyní uznáván jako centrální mechanismus v mnoha malignitách a může být dokonce považován za nový charakteristický znak rakoviny. Vzhledem k tomu, že neutrofilů jsou klasické zánětlivé buňky, je na místě zabývat se těmito buňkami a jejich rolí v zánětech souvisejících s rakovinou (Brandau a kol. 2013).

Neutrofilů obsahují mnoho škodlivých a potencionálně cytotoxických mediátorů, mnoho z nich uložených v granulech neutrofilů. Předpokládá se, že „původní“ funkce těchto mediátorů je sloužit spíše jako antimikrobiální efektorové molekuly. Nicméně, mnoho studií

ukázalo, že za určitých podmínek tyto typické efektorové molekuly neutrofilů jako jsou defensiny, proteázy, myeloperoxidáza a reaktivní formy kyslíku mohou mít také silnou nádorovou cytotoxickou aktivitu (Brandau a kol. 2013). Cytotoxické mediátory neutrofilů vedou ke smrti nádorových buněk a regresi nádorů. Kromě toho, neutrofilové mohou vyvolat apoptózu a lýzu nádorových buněk a mohou zprostředkovat indukci odmítnutí nádoru a protinádorovou imunitní paměť. Neutrofilní infiltrace, často pozorována v přítomnosti nadprodukce cytokinů modifikovanými nádorovými buňkami, se podílí na nádorovém odmítnutí a protinádorové imunitní paměti prostřednictvím interakce s CD8+ a/nebo CD4+ lymfocyty (Piccard a kol. 2011).

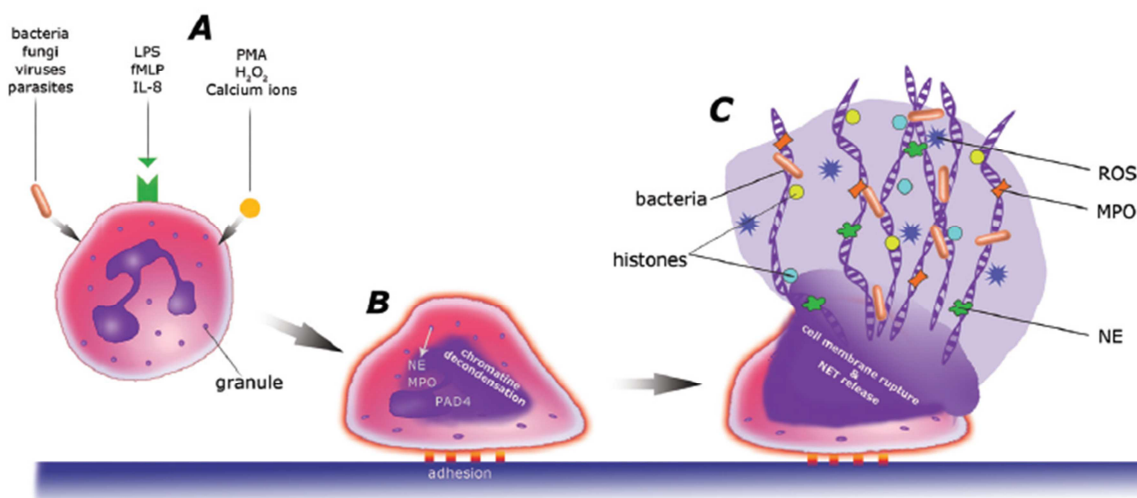
Protinádorová aktivita neutrofilů je dokládána v nejméně čtyřech hlavních systémech a scénářích:

- 1) Během protilátkami zprostředkované nádorové terapie, jsou neutrofilové aktivovány přes Fc receptory a uvolňují mediátory s přímou tumoricidní aktivitou. Neutrofilové mohou také aktivovat další efektorové buňky vrozené a získané imunity.
- 2) Neutrofilové rychle odpovídají na různé látky odvozené od patogenů, které jsou prozkoumané a používány v imunoterapii rakoviny. Tyto biologické látky jsou založeny zejména na strukturách odvozených od virových nebo bakteriálních patogenů a obsahují ligandy pro takzvané pattern recognition receptory. Aktivace neutrofilů může mít za následek přímou a nepřímou protinádorovou odpověď.
- 3) Různé přístupy genové terapie ukázaly, že vedou k neutrofilové zprostředkované protinádorové aktivitě. Zatímco příslušné mechanismy nebyly vždy objasněny, zdá se, že hlavní roli hraje akutní zánětlivá reakce se silnou protinádorovou cytotoxickou a/nebo cytostatickou aktivitou
- 4) Přeměny od pronádorové k protinádorové aktivitě neutrofilů bylo dosaženo farmakologickými a imunomodulačními zásahy. Nedávným příkladem takového přístupu je inhibice TGF- $\beta$  v nádoru hostitele, čímž bylo dosaženo spuštění protinádorové aktivity neutrofilů (Brandau a kol. 2013).

#### **2.5.2.2.1 NETs - neutrophil extracellular traps**

V zánětlivých podmínkách neutrofilové uvolňují intracelulární struktury složené z chromatinové DNA, histonů a granulárních proteinů do extracelulárního prostředí – tato struktura je známa jako Neutrophil extracellular traps (NETs) (Kolaczowska a Kubes 2013).

NETs jsou produkovány neutrofily v kontaktu s patogeny jako jsou bakterie, houby, viry a prvoci s řadou hostitelských faktorů, jako jsou aktivované krevní destičky, zánětlivé stimuly nebo chemické sloučeniny. Bylo navrženo několik faktorů a událostí zapojených v tomto procesu. Během aktivace neutrofily produkují velké množství ROS působením NADPH oxidázy, ROS jsou mimo jiné považovány za iniciátory tvorby NET. Po stimulaci dochází k dekonduzaci chromatinu následované smícháním euchromatinu a heterochromatinu. Tento proces je zprostředkován enzymy uloženými v azurofilních granulích, neutrofil elastázou (NE) a myeloperoxidázou (MPO), které jsou přemístěny do jádra dosud neznámým mechanismem. Kromě toho, během tvorby NET, histon H3 podstoupí modifikaci (“citruinaci”) která převádí argininové zbytky na citrulin. Citruinace histonu je katalyzována enzymem peptidylarginin deiminázou 4 (PAD4), který je lokalizován v jádře neutrofilů. Ukázalo se, že neutrofily izolované z PAD4-knockout myši ztratily svou schopnost uvolňovat NET. Následkem poškození jaderné membrány se chromatin uvolňuje dovnitř buňky a je smíchán s antimikrobiálními faktory. K uvolnění NETs dochází prasknutím buněčné membrány (Zawrotniak a Rapala-Kozik 2013). Probíhající procesy jsou zobrazeny na Obr. 2.



**Obr. 2: Mechanismus uvolnění NETs. Stimulace receptorů (A) spouští (např. bakterie, houby, viry, paraziti, chemické faktory, jako PMA nebo LPS) vede k adhezenci neutrofilů k endotelu a dekonduzaci chromatinu následkem štěpení NE a MPO a citruinace histonů PAD4 (B). V konečné fázi jsou NETs uvolněny a pohlcují bakterie (C) (Zawrotniak a Rapala-Kozik 2013).**

Ukázalo se, že mnohé podněty mají za následek tvorbu NET. Tyto podněty zahrnují vystavení aktivovaných neutrofilů bakteriálním produktům jako jsou lipopolysacharid (LPS), formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (fMLP), forbo estery jako je forbol-myristát-acetát



(PMA) a fyzikální interakce s aktivovanými krevními destičkami (Cools-Lartigue a kol. 2014). Ukazuje se, že extracelulární sítě (NETs) by mohly mít anti-tumorigenní účinky, například opravdovým zabíjením nádorových buněk nebo aktivací imunitního systému. Na druhou stranu NETs by mohly i mít pro-tumorigenní aktivitu spočívající v usnadnění metastazování. Ve skutečnosti, trojrozměrná struktura NETs může sloužit k fyzickému zachycení nádorových buněk a zabránit tak jejich šíření do okolních tkání (Berger-Achituv a kol. 2013). Některé složky NETs se ukázaly být cytotoxické pro nádorové buňky. Bylo prokázáno, že MPO zabíjí buňky melanomu B16 a inhibuje jejich růst po implantaci u myši (Odajima a kol. 1996). NETs modulují spojení mezi vrozenou a získanou imunitní odpovědí aktivací plazmocytoidních dendritických buněk přes Toll-like receptor 9 (TLR9), intracelulární receptor, který rozpoznává DNA. Studie dále předpokládá, že nádorové antigeny zachycené NETs by mohly být vystaveny dendritickým buňkám a způsobit jejich aktivaci. NETs také primují T buňky TCR signalizací, která vyžaduje přímý kontakt (Berger-Achituv a kol. 2013).

### **2.5.3 Nádorová imunologie**

Imunitní systém má tři základní role v prevenci nádorů. Za prvé, může chránit hostitele před nádory indukovanými virem odstraněním nebo potlačením virové infekce. Za druhé, včasné odstranění patogenů a okamžité ukončení zánětu může zabránit vytvoření chronického zánětlivého prostředí vedoucí ke vzniku nádorů. Za třetí, imunitní systém může specificky rozpoznat a odstranit nádorové buňky v určitých tkáních na základě jejich exprese tumor specifických antigenů TSAs (Tumor-specific antigens). Tato třetí role označovaná jako imunitní dohled nastává, když imunitní systém rozpozná transformované buňky, které unikly vnitřním kontrolním tumor supresorovým mechanismům a odstraňuje je před tím, než přejdou do malignity (Veselý a kol. 2011).

#### **2.5.3.1 Imunitní dohled**

Imunitní dohled se ukázal jako zásadní model v imunologii rakoviny. Imunitní dohled má tři časově odlišné fáze nazývané eliminace, rovnováha, únik. Během eliminační fáze imunitní systém detekuje a eliminuje nádorové buňky, které se vyvinuly v důsledku selhání vnitřních tumor supresorových mechanismů. Eliminační fáze může být úplná, kdy dojde k odstranění všech nádorových buněk nebo neúplná, kdy je eliminována pouze část nádorových buněk. V případě částečné nádorové eliminace, imunitní systém hostitele a jakékoli nádorové buněčné varianty, které přežily proces eliminace, vstupují do dynamické rovno-

váhy. Během této doby se předpokládá, že nádorové buňky zůstanou buďto nečinné nebo se dále vyvíjí, dále se akumulují změny (jako například mutace DNA nebo změny v genové expresi), které mohou modulovat tumor specifické antigeny a stresem indukované antigeny, které exprimují. Jak tento proces pokračuje, imunitní systém vyvíjí selektivní tlak eliminací vnímavých nádorových klonů. Tlak vyvíjený imunitním systémem během této fáze je dostačující pro kontrolu nádorové progresse. V případě, že imunitní systém stále nezvládá zcela eliminovat nádor, proces má za následek selekci nádorových buněk, které jsou schopny odolávat, vyhnout se nebo potlačit protinádorovou imunitní odpověď, což vede k fázi úniku. Během této fáze už imunitní systém není schopen zabránit nádorovému růstu (Swann a Smyth 2007).

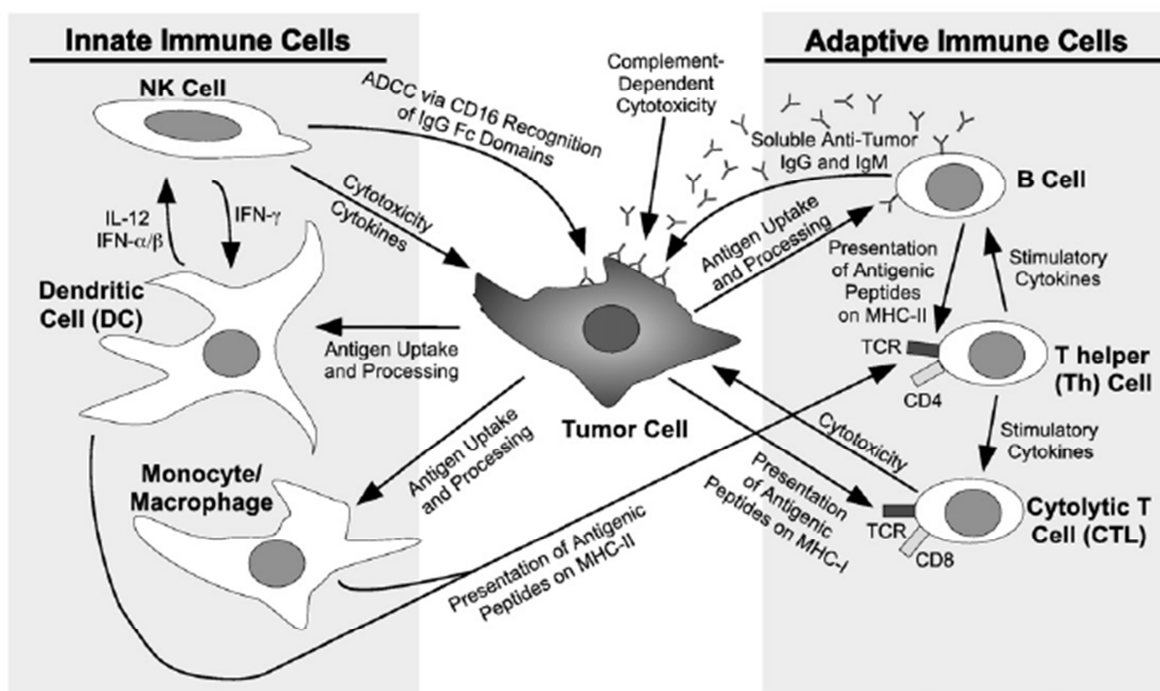
### **2.5.3.2 Nádorové antigeny**

Nádory obvykle exprimují dva typy antigenů: neo-antigeny a vlastní antigeny. Neo-antigeny (tumor specifické antigeny) jsou odvozeny z mutovaných vlastních proteinů nebo onkogenních virů a nejsou exprimovány v normální tkáni. Maligní buňky exprimují mnohé neo-antigeny jako výsledek genomové nestability. Většina z těchto mutací nemá funkční význam pro nádorovou buňku, ale může stále poskytovat potenciál antigenního cíle pro imunitní buňky. Vedle toho mohou nádory exprimovat také normální vlastní proteiny, ale v neobvyklém množství nebo v neobvyklých místech (tumor asociované antigeny). Tumor asociované antigeny zahrnují onkospermatogonální antigeny (cancer/testis antigen), například MAGE a ESO, diferenciační antigeny jako je tyrosináza, které jsou exprimovány také v tkáni původu, onkofetální antigeny jako AFP nebo CEA, nebo nadměrně exprimované proteiny jako Her2 nebo wild type forma p53 (Steer a kol. 2010).

### **2.5.3.3 Protinádorová imunita**

Studie zaměřená na interakci mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému ukázaly, že všechny známé vrozené a získané imunitní efektorové mechanismy se podílejí na rozpoznání a kontrole nádoru. Funkce buněk vrozené a získané imunity v reakci na nádor je znázorněna na Obr. 3. Buňky vrozené imunity poskytují nejčasnější odpověď uvolněním cytokinů, přímo lyzujících abnormální buňky (NK buňky) nebo zachycením fragmentů mrtvých buněk (monocyty, makrofágy a dendritické buňky) a prezentováním peptidových fragmentů cizích antigenů T buňkám v kontextu molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). T a B lymfocyty získané imunity vytvářejí antigen specifickou imunitní odpověď, která jsou zpožděná o několik dní, protože malé subpopulace exprimující antigen-

specifické receptory musí proliferovat a diferencovat a vytvářet velké množství kompetentních a aktivovaných efektorových buněk. Tyto proliferační a diferenciační události jsou podporovány zánětlivými cytokiny [interferon (IFN)  $\gamma$ , interleukin (IL) -12] produkovanými aktivovanými buňkami vrozené imunity nebo T buňkami. Efektorové buňky získané imunity, jako jsou CD8 + cytolytické (CTL) a CD4 + pomocné (Th) buňky, mohou přímo lyzovat nádorové buňky nebo uvolňovat imunomodulační cytokiny, zatímco B-buňky vytvářejí humorální odpověď produkcí antigen-specifických imunoglobulinů (Ig) (Borghaei a kol. 2009).

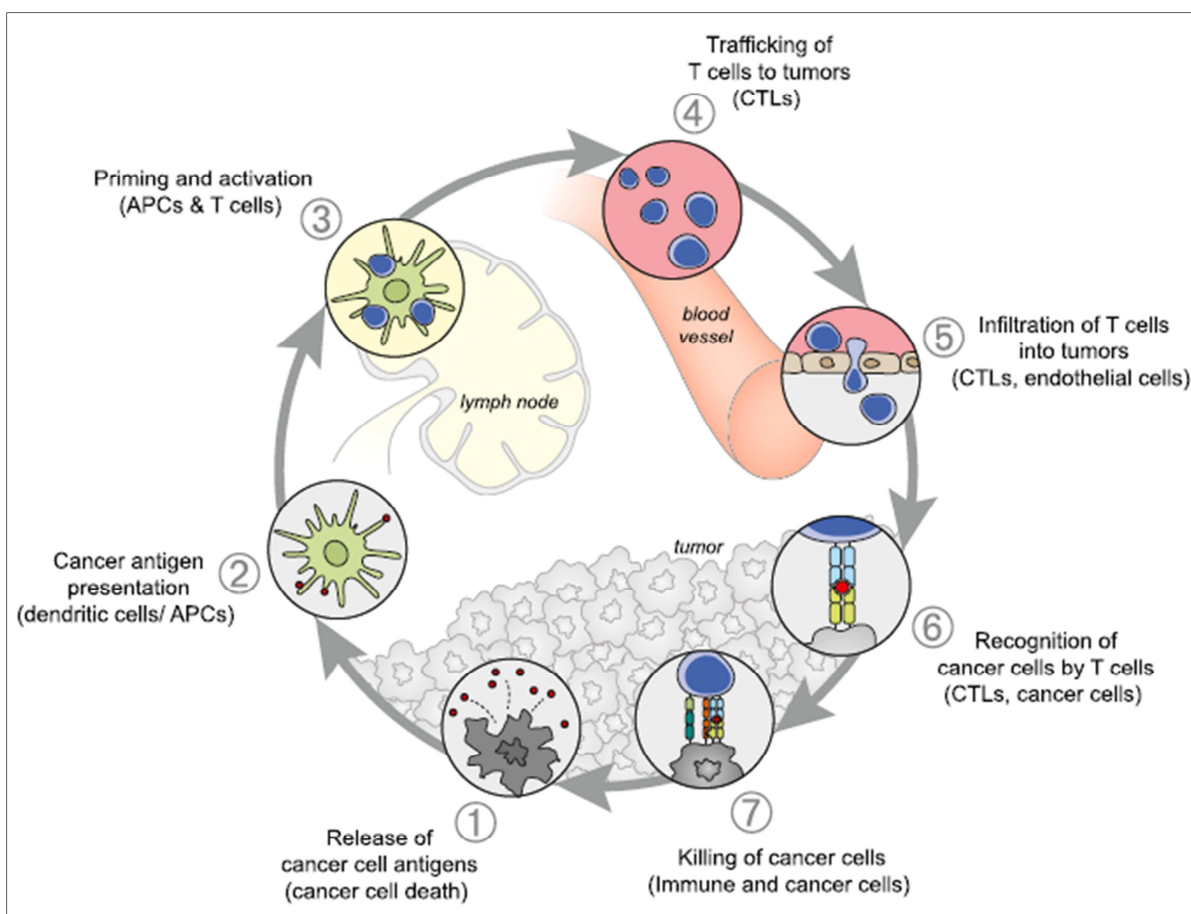


Obr. 3: Hlavní buňky vrozeného a adaptivního imunitního systému a jejich funkce v reakci na nádorové buňky (Borghaei a kol. 2009).

#### 2.5.3.4 Nádorový imunitní cyklus (cancer-immunity cycle)

Sled událostí vedoucí k odstranění nádoru byl uspořádán do koncepčního rámce nazvaného „nádorový imunitní cyklus“ (Obr. 4). Odstranění nádoru zprostředkované cytotoxickými T-lymfocty (CTL) je antigen dependentní proces (Springett 2014). V prvním kroku, neoantigeny vytvořené karcinogenezí jsou uvolněny a zachyceny dendritickými buňkami pro zpracování (krok 1). V dalším kroku dendritické buňky prezentují zachycený antigen na MHC I a MHC II molekulách T-buňkám (krok 2), což vede k primingu a aktivaci efektorové T- buněčné odpovědi proti specifickým nádorovým antigenům (krok 3), které jsou vnímány jako cizí nebo proti kterým centrální tolerance byla neúplná. Povaha imunitní odpovědi je

určována v tomto okamžiku s kritickou rovnováhou představující poměr T-efektorových buněk proti T-regulačním buňkám, jež je klíčem konečného výsledku. Nakonec se aktivované efektorové T buňky dostávají k nádorovému ložisku, které infiltrují, specificky rozpoznávají a vážou se k rakovinovým buňkám prostřednictvím interakce mezi T-buněčným receptorem a jeho příbuzným antigenem vázaným na MHC I (krok 6) a zabíjí nádorovou buňku (krok 7). Zabitím nádorové buňky se uvolňují další antigeny asociované s nádory (TAA) (opět krok 1), zvyšuje se rozsah a hloubka odpovědi v následném cyklu (Chen a Mellman 2013).



Obr. 4: Cyklický sled událostí v nádorovém imunitním cyklu (Chen a Mellman 2013).

### 2.5.3.5 Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Navzdory nádorovému imunitnímu cyklu, nádory mohou unikat imunitní detekci a odstranění prostřednictvím různých hostitelských, nádorových a imunitních mechanismů. (Tab. 1). Nádorové buňky mohou například ztratit expresi nádorových antigenů nebo MHC molekul a/nebo uvolňovat inhibiční rozpustné faktory, jako je interleukin-10, transformující

růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) nebo vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (Kaufman 2015). TGF-  $\beta$  inhibuje funkci T a NK buněk omezením proliferace a produkce cytokinů. TGF-  $\beta$  také podporuje expanzi regulačních T lymfocytů (Treg) a myeloidních supresorových buněk (MDSC), které se podílejí na inhibici protinádorové imunity (Saied a kol. 2014). Nádorové buňky mohou také exprimovat inhibiční receptory jako je Fas ligand nebo ligand programované buněčné smrti-PDL1, které fungují v inhibici infiltrujících T-lymfocytů. Kromě toho, v nádorovém mikroprostředí se hromadí mnoho inhibičních imunitních buněk, včetně regulačních T lymfocytů, makrofágů asociovaných s nádorem, myeloidních supresorových buněk, které inhibují aktivované efektorové T-buňky (Kaufman 2015). Treg zprostředkovávají toleranci potlačením antigen specifických T-buněk a tím i imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Byly navrženy mnohé mechanismy pro vysvětlení imunoprese Treg buňkami v nádorovém mikroprostředí. Suprese Treg je zprostředkována aktivací CTLA-4 přímým zabíjením T-lymfocytů, indukci indoleaminu 2,3-dioxygenázy, produkcí IL-10 a sekrecí TGF  $\beta$  (Saied a kol. 2014).

**Tab. 1: Mechanismy úniku nádorových buněk (Saied a kol. 2014).**

Table 1 – Immune evasion and escape mechanisms.	
	Mechanism
<b>Secreted factors</b>	
TGF $\beta$	Inhibits T cell and NK function, promotes expansion of Treg and MDSC [21–25].
IL-10	Inhibition of NK, TNF, suppression of T and B cells. [26–29].
PGs	Promotion of anti-apoptotic Bcl-2 in tumor cells [30]. Secreted by suppressive immune cells to inhibit T cell activity. Promotes IL-10 production [31].
<b>Suppressive cells</b>	
Treg	Suppress antigen-specific T cells by activation of CTLA-4, secretion of IL-10 and TGF $\beta$ , induction of IDO, and promotion of effector T cell apoptosis [32–37].
MDSC	Suppression of T cell responses through multiple mechanisms, including nitric oxide production, IL-10 secretion, and PD-L1 engagement of PD-1 on activated T cells [22,23,38].
<b>Suppressive pathways</b>	
Fas-FasL	FasL-to-Fas interaction induces T cell apoptosis and suppression [39].
CTLA-4	Immuno-inhibitory receptor. Increases the threshold for T cell activation. Limits T cell division and cytokine production.[40,41].
PD-1/PD-L1	Immuno-inhibitory receptor. Limits T cell division and cytokine production. [42,43]
Bcl-2 = B cell lymphoma gene; IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase; TNF = tumor necrosis factor.}	

## 2.6 Imunoterapie nádorových onemocnění

Cílem imunoterapie nádorových onemocnění je posílit nebo obnovit schopnost imunitního systému odhalit a zničit nádorové buňky překonáním mechanismů, kterými nádory obcházejí a potlačují imunitní odpověď, v podstatě posunout rovnováhu zpět ve prospěch imunitní ochrany (Disis 2014).

Optimalizace účinnosti terapie vyžaduje targeting (cílení) protinádorové imunitní odpovědi na více úrovních. Imunoterapie může být obecně rozdělena do tří tříd:

- 1) Třída, která zvyšuje frekvenci tumor specifických T-buněk (např. nádorové vakcíny, interleukin IL-2, cytotoxický s T-lymfocyty asociovaný antigen 4 [CTLA4]).
- 2) Třída, která překonává imunosupresivní mechanismy v nádorovém mikroprostředí (např. inhibitory programované buněčné smrti 1[PD-1], indolamin-2,3-dioxygenáza [IDO], lymfocyty aktivující gen 3 [LAG 3], a deplece T-regulačních [Treg]buněk),
- 3) Třída, která vyvolává aktivaci vrozené imunitní odpovědi a zánět v nádorovém mikroprostředí (agonisté Toll-like [TLR] receptorů, interferony typu I, inhibitory myeloidních supresorových buněk [MDSCs]) (Rini 2014).

Myšlenka využít imunitní systém k léčbě rakoviny byla oficiálně představena Williemem Coley v roce 1893, i když buněčné a molekulární mechanismy byly neznámé. Coley využíval náhodného objevu u pacienta se sarkomem, u kterého došlo po infekci *Streptococcus pyogenes* k vyvinutí spontánní remise. Po několika operacích se u pacienta nádor znovu objevil, dokud u otevřené operační rány nedošlo k infekci *S. pyogenes*. V průběhu několika měsíců se nádor zmenšil, pacient byl považován za vyléčeného a byl propuštěn. Coley se domníval, že infekce byla zodpovědná za pozoruhodné uzdravení pacienta a provedl řadu experimentů využívající úmyslnou infekci *S. pyogenes* pacientů s nádorovým onemocněním, které vyústily při neúspěšné infekci ve smrt a regresi rakoviny. Poté vyvinul verzi jeho léčby obsahující směs usmrcených bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*. Tento přístup se stal známý jako „Coleyův toxin“ vedl k několika pozoruhodným uzdravením u pacientů s pokročilým onemocněním (Snook a Waldman 2013).

Coleyův toxin aktivoval vrozenou větev imunitního systému prostřednictvím stimulace pattern recognition receptors (Saied a kol. 2014). Mechanismus terapeutického účinku je připisován aktivaci TLR (Toll-like receptorů) endotoxiny a nemetylovanými fragmenty DNA z bakterií (Hollack 2014).

### **2.6.1 Pattern recognition receptors (PRRs)**

Vrozený imunitní systém využívá omezený počet zárodečně kódovaných pattern recognition receptors (PRRs) k rozpoznávání evolučně konzervovaných struktur na patogenech nazývaných pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PRRs jsou také schopny nepřímo snímat přítomnost patogenů. Stává se tak v případě, když infekce, zánět nebo jiný buněčný stres způsobí přítomnost hostitelských faktorů v neobvyklých místech nebo tvorbu abnormálních molekulárních komplexů, takzvaných danger associated molecular patterns

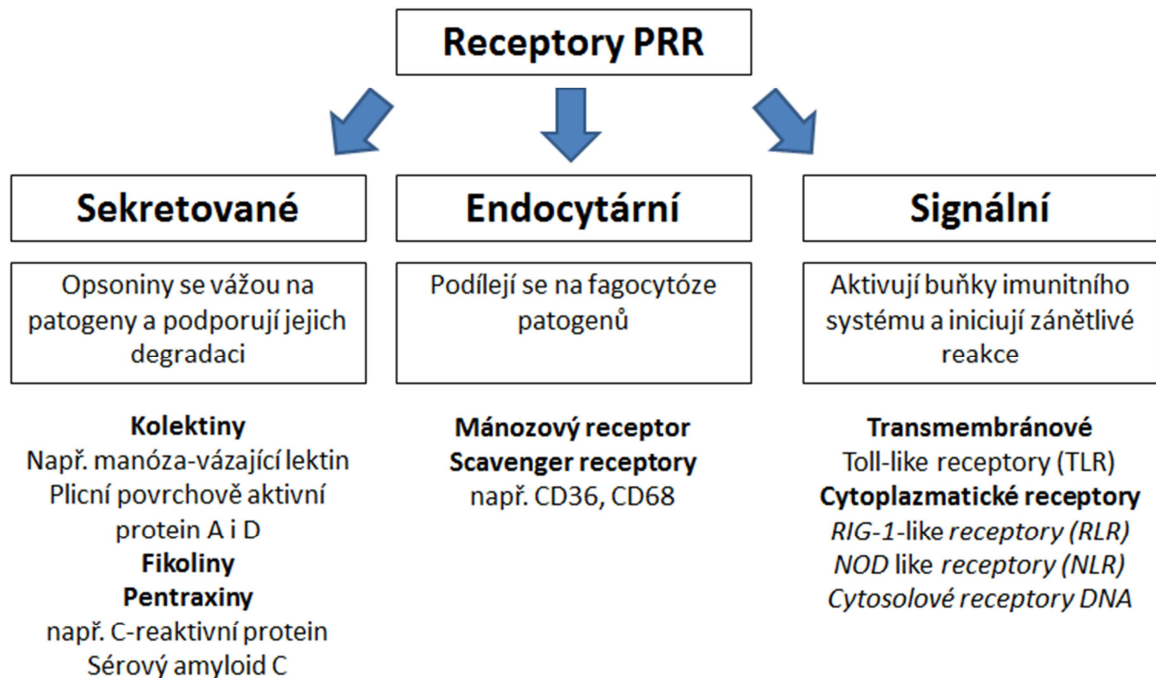
(DAMPs) (Van der Vaart 2012). PRRs jsou přítomny na buňkách vrozené imunity, zahrnujících dendritické buňky, monocyty, makrofágy, neutrofile, cytotoxické NK buňky a epiteliální buňky. PRRs mohou být exprimovány na povrchu buněk, v cytoplasmě nebo v endosomech a mají specificitu pro PAMPs z řady zdrojů. Když jsou PAMPs rozpoznány PRRs, dojde k aktivaci intracelulárních signálních kaskád vedoucích k expresi genů kódujících různé elementy zánětlivé odpovědi včetně cytokinů, chemokinů, interferonů typu 1 (IFN), včetně IFN $\alpha$  a FN $\beta$  (Doughty 2011). Genetické defekty PRR vedou ke zvýšenému riziku různých typů infekcí a nádorových onemocnění. Agonisti PRRs jsou proto atraktivní cíle pro stimulaci obou ramen imunitní odpovědi u infekčních a nádorových onemocnění (Romagne 2007).

### **2.6.1.1 Rozdělení PRRs**

V závislosti na způsobu jejich fungování jsou PRRS rozděleny do tří tříd: sekretované receptory, receptory, které zprostředkovávají fagocytózu a signální receptory (Obr. 5). První jmenované tvoří rozpustné molekuly opsoninové typu, které se váží na povrch patogenů, což usnadňuje jejich internalizaci a spouští klasickou a lektinovou cestu aktivace komplementu. PRRs účastnící se fagocytózy jsou transmembránové proteiny, které zprostředkovávají internalizaci patogenů, vedoucí k degradaci internalizovaných částic a prezentaci antigenů z nich uvolněných. Třetí třída PRRs se skládá z několika rodin receptorů se signalizačními doménami, které jsou schopny aktivovat transkripci genů kódujících prozánětlivých proteiny. Zahrnují:

- Toll-like receptory (TLR) - nejdůkladněji charakterizovaná rodina PRRs.
- RIG-I-like receptory (RLRs) - rodina tří cytoplazmatických helikáz, které detekují dvouřetězcovou virovou DNA
- NOD-like receptory - velká rodina receptorů, které rozpoznávají PAMPs v cytoplasmě. Mnohé ligandy rozpoznávané receptory zahrnují peptidoglykan, muramyldipeptid z buněčné stěny grampozitivních bakterií, flagelin, sloučeniny uvolněné v důsledku poškození buňky a některé bakteriální toxiny. Aktivace těchto receptorů může vést k tvorbě multimolekulárního komplexu nazvaného inflamazom, zodpovědného za podporu zánětlivých procesů a schopnost iniciace specifické formy apoptózy, pyroptózy (Czerkies a Kwiatkowska 2014). Pokud mikroby proklouznou přes extracelulární a buněčnou povrchovou ochranu, cytosolické PRRs tvoří druhou řadu obrany a dále tak chrání hostitele (Doughty 2011).

- Cytosolické receptory DNA - skupina většinou neidentifikovaných bílkovin, zodpovědných za iniciaci produkce interferonů typu I jako odpověď v reakci na plasmidovou, virovou nebo bakteriální DNA v cytoplasmě (Czerkies a Kwiatkowska 2014).



Obr. 5: Klasifikace PRRs v závislosti na jejich funkci. (Czerkies a Kwiatkowska 2014).

#### 2.6.1.1.1 Toll-like receptory – TLRs

TLRs jsou vysoce konzervovanou skupinou transmembránových receptorů, které byly rozsáhle studovány a dobře charakterizovány. Jako zástupci transmembránových proteinů, každý z nich se vyznačuje přítomností extracelulární a cytoplazmatické domény. Extracelulární doména obsahuje repetice bohaté na leucin (LRR) motivy, které jsou zodpovědné za rozpoznání PAMP. Cytoplazmatická doména je homologní k cytoplazmatické doméně IL-1 receptoru a jako taková je nazývána Toll / IL-1 receptor (TIR) homologní doména. Tento aspekt TLR je nezbytný pro downstream signalizaci. TLRs mohou být exprimovány na povrchu buněk nebo intracelulárně v endosomech (Doughty 2011). Tabulka 2. poskytuje přehled o TLR, buněčné lokalizaci, a využití v léčbě rakoviny (Kaczanowska a kol. 2013). TLR mohou být charakterizovány na základě druhu molekuly, kterou rozpoznávají. Lipidické funkční skupiny jsou rozpoznávány TLRs exprimovanými na povrchu buněk, včetně TLR1, TLR2, TLR4, TLR6. Nukleové kyseliny jsou rozpoznávány TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9,



které jsou exprimovány v endosomech. Některé proteinové ligandy mohou být rozpoznávány TLR 5 (flagellin), TLR11 a TLR 10 jsou méně dobře charakterizovány (Doughty 2011).

Když se TLR agonisté navážou na své receptory, velká část downstream signalizace je obvykle prováděna prostřednictvím jedné ze dvou odlišných cest, myeloidní diferenciací faktor 88 (MyD88)-dependentní a MyD88 independentní. První jmenovaná vede k časně aktivaci NF- $\kappa$ B, MAPK, a transkripci pro-zánětlivých cytokinů, chemokinů, a cytosolických enzymů, zatímco druhá vede k aktivaci pozdní fáze NF- $\kappa$ B a interferonu (IFN), regulačních faktorů zodpovědných za expresi IFN typu I. (Deng a kol. 2014).

TLR agonisté zprostředkovávají protinádorovou aktivitu několika mechanismy. TLR agonisté přímo zabíjejí jak nádorové buňky, tak doplňkové buňky nádorového mikroprostředí, jako je vaskulární endotel (Maruyama a kol. 2011). Konkrétně TLR3 agonista kyselina polyinosinová:polycytidylová (poly I:C) vede k apoptoze nádorových buněk, zatímco TLR4 agonista LPS je schopný vyvolat apoptózu endoteliálních buněk se ztrátou integrity cévní stěny (Nogueras a kol. 2008, Galli a kol. 2010). Aktivace TLR může také vést k regresi nádoru přímo nebo nepřímo (TNF zprostředkovaně) zvýšením vaskulární permeability, přilákáním leukocytů, aktivací tumor lytické aktivity NK buněk a cytotoxických T-lymfocytů (CTL) a zvýšené citlivosti nádorových buněk k eliminaci efektorovými molekulami (Maruyama a kol. 2011).

V současné době jsou pouze tři TLR agonisté schváleny FDA pro použití u pacientů s nádorovým onemocněním: Bacillus Calmette Guérin (BCG), monofosforyl lipid A (MPLA) a Imiquimod.

Nedávnými pokroky v preklinických studiích byly objeveny důkazy TLR synergie. Zhu a kol. (2010) zjistili, že zapojení specifické dvojice TLRs vedlo k synergické odpovědi v jejich schopnosti aktivovat DCs a podporovat antigen-specifickou T buněčnou odpověď a proliferaci ve srovnání s injikováním jediného TLR agonisty (Kaczanowska a kol. 2013). Underhill a Gantner (2004) popsali, že TLRs mohou regulovat tvorbu a zrání fagosomu stejně jako modulovat transkripci některých fagocytárních receptorů, zatímco signalizace přes fagocytární receptory může také ovlivnit TLR signalizaci, a tak odhalili existenci vzájemného receptorového ovlivnění „cross talk“ mezi TLRs a fagocytárními PRRs (Underhill a Gantner 2004). Synergický efekt byl potvrzen u terapie melanomu založené na kotvení agonistů fagocytárních receptorů na nádorové buňky v kombinaci se signálními receptory jako je TLR4. Jako TLR4 agonista byl v pokusech používán LPS. Vzhledem k tomu, že lidé jsou 1000-10000 krát citlivější k LPS než myši, tak by v případě použití kombinace LPS

s fagocytárními receptory bylo nutné pracovat s velmi nízkými, bezpečnými koncentracemi LPS nebo LPS nahradit jiným TLR agonistou (Janotová a kol. 2014). Z tohoto důvodu hlavním cílem této práce bylo nalézt vhodné náhrady LPS, které by byly bezpečné v případě použití u lidí.

**Tab. 2: TLRs jsou charakterizovány jejich buněčnou lokalizací, adaptorovými proteiny a PAMPs a DAMPs, které rozpoznávají (Kaczanowska a kol. 2013).**

TLR	Cellular localization	Adaptor molecule	Ligand/agonist	Source of ligand	Clinical
TLR1-TLR2	Surface	MyD88	Triacylated lipoproteins, lipoteichoic acid, peptidoglycans	Bacteria	BCG <sup>a</sup>
TLR2-TLR6	Surface	MyD88	Zymosan	Fungi	–
			Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Synthetic	–
TLR3	Endosome	TRIF	Diacylated lipopeptides	Bacteria	BCG <sup>a</sup>
			HSPs, HMGB1, uric acid, fibronectin, ECM proteins	Endogenous	–
TLR4	Surface (or endosome)	MyD88 or TRIF	Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> , dsRNA, Poly I:C	Synthetic	–
TLR5	Surface	MyD88	LPS, lipoteichoic acid	Bacteria	Poly A:U
			β-defensin 2, fibronectin, EDA, HMGB1, snapin, tenascin C	Endogenous	BCG <sup>a</sup>
TLR7-TLR8	Endosome	MyD88	Flagellin	Synthetic	MPL <sup>a</sup>
TLR9	Endosome	MyD88	ssRNA	Bacteria	–
			CpG-A, Poly G10, Poly G3	Synthetic	–
TLR10	Surface	MyD88	Unmethylated CpG DNA	Bacteria and virus	Imiquimod (Aldara) <sup>a</sup>
			Unknown natural ligand	Bacteria	852A (Phase II)
			Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> , PamCysPamSK <sub>4</sub>	Synthetic	–
TLR11 <sup>b</sup>	–	–	<i>Toxoplasma gondii</i> profilin	Protozoa	–
TLR12 <sup>b</sup>	–	–	Unknown	–	–
TLR13 <sup>b</sup>	Endosome	MyD88	VSV	Virus	–

## 2.7 Imunoterapie nádorů založená na kombinaci TLR a ligandů fagocytárních receptorů

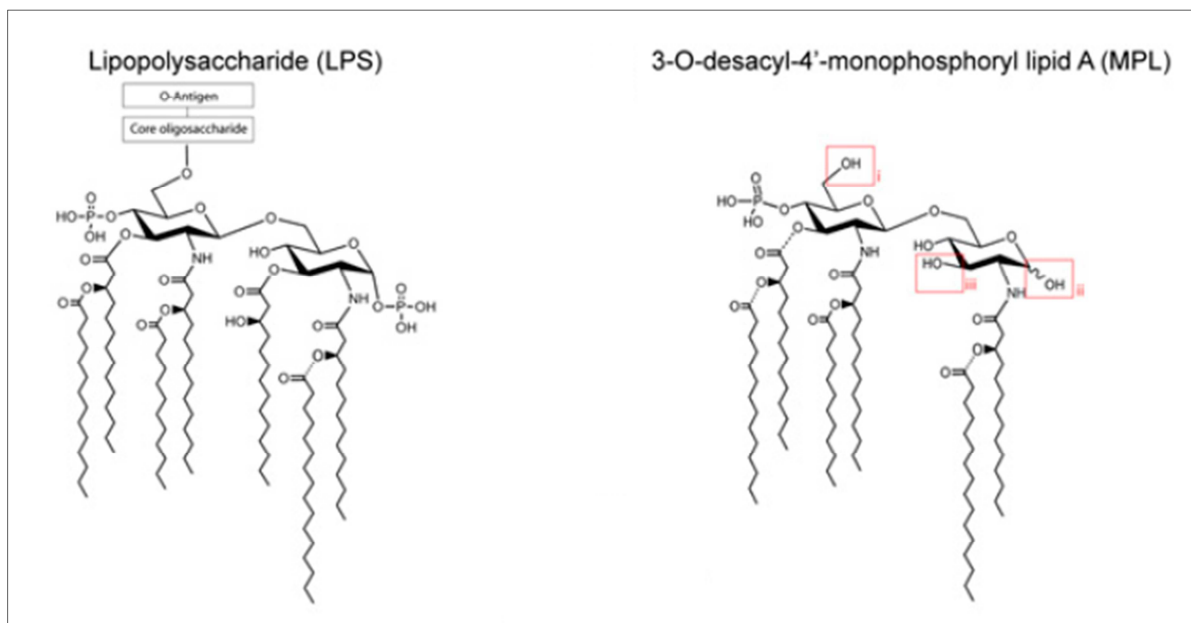
### 2.7.1 TLR agonisté -možné náhrady LPS

#### 2.7.1.1 MPLA –agonista TLR4

Monofosforyl lipid A je z LPS-odvozený TLR4 agonista, který je nejméně 100krát méně pyrogenní než LPS a přesto zachovává mnoho imunomodulačních vlastností LPS. Co je však důležité, MPLA je bezpečný u lidí a byl podáván milionům pacientů jako součást několika vakcinačních přípravků, jako je například vakcína Cervarix (Michaud a kol. 2013).

MPLA je odvozen z LPS gram-negativní bakterie *Salmonella minnesota* R595 třemi hlavními chemickými modifikacemi: a) vyřazení oligosacharidového jádra, b) hydrolyza 1-fosfátu z redukujícího konce glukosaminu a c) odstranění acylového řetězce z polohy 3 disacharidu (Obr. 6). Nepřítomnost 1-fosfátu na molekule MPL oslabuje dimerizace TLR4 / MD2. To pravděpodobně vyvolává strukturální změny v receptorovém komplexu TLR4, který mění nábor adaptorových proteinů na intracelulární domény. Taková strukturální změna může odpovídat za odlišné signalizační vlastnosti MPLA, který aktivuje převážně TLR4-TRAM (TRIF-related adaptor molecule) TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ) dráhu oproti více prozánětlivého TLR4- MAL (MyD88-adaptor-like protein) -MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) signální dráze (Michaud a kol. 2013).

Aktivace TLR4 přes MyD88-závislou dráhu vede nakonec k NF- $\kappa$ B aktivaci a uvolnění prozánětlivých cytokinů, zatímco TRIF dráha má za následek aktivaci IFN regulačních faktorů 3 a 7 a produkci IFN typu I, stejně jako opožděnou aktivaci NF- $\kappa$ B (Kaczorowski a kol. 2010).

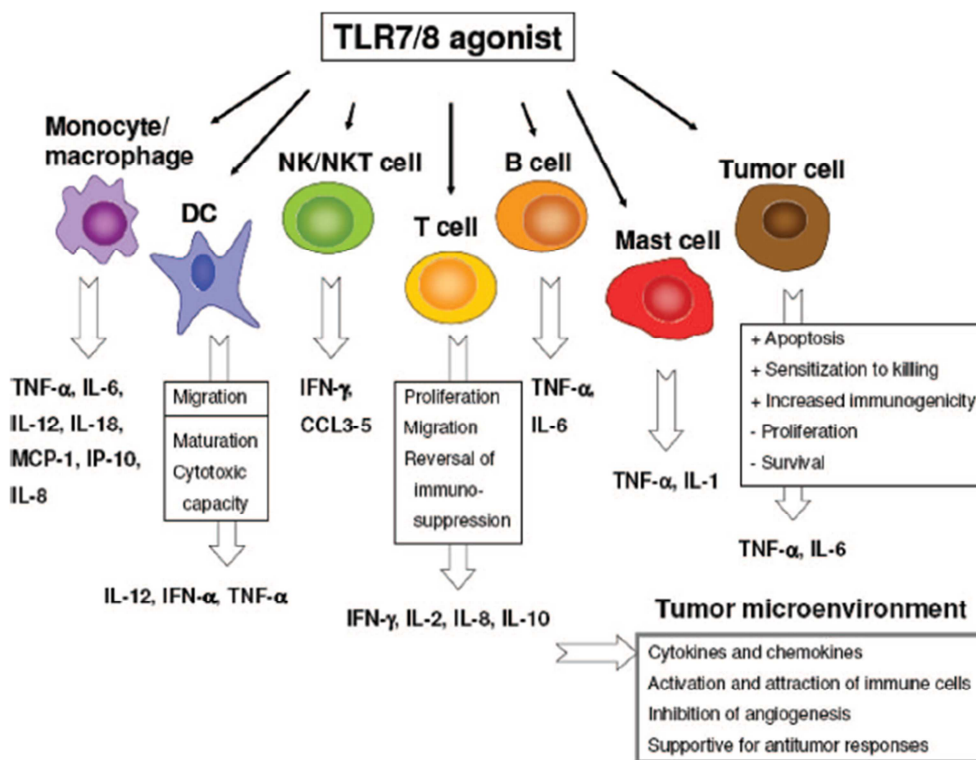


Obr. 6: Porovnání LPS a MPLA . MPLA je charakterizováno třemi hlavními modifikacemi (Michaud a kol. 2013).

### 2.7.1.2 R 848 (Resiquimod) – agonista TLR7/8

Jedná se o nízkomolekulární syntetickou molekulu, která byla hodnocena v klinických studiích pro léčbu infekcí způsobených viry, jako je herpes simplex virus a virus hepa-

titidy C. R848 je selektivní ligand pro TLR 7 u myší a pro TLR7 a TLR8 u lidí a bylo prokázáno, že aktivuje pouze TLR7 a TLR8. TLR7 a TLR8 mají stejný přirozený ligand, tj. virovou jednořetězcovou RNA. Po navázání na myší TLR7 nebo lidský TLR7 / 8 exprimovaným na dendritických buňkách (DCS), makrofázích, B -lymfocytech a NK buňkách (NK), R848 aktivuje MyD88 dependentní signální dráhu, vedoucí k aktivaci transkripčního nukleárního faktoru-kB (NF-kB), která vede k indukci prozánětlivých cytokinů a dalších mediátorů, zejména interferonu  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) (Zhou a Sun 2015). Indukce těchto prozánětlivých chemokinů, zejména IL-12, stejně jako výsledná aktivace NK buněčné cytotoxicity, jsou vysoce žádoucím znakem pro nádorová imunoterapeutika, protože mohou být využity k indukci apoptózy nádorových buněk (Holldack 2014). Účinky TLR 7/8 agonisty na různé imunitní a nádorové buňky jsou shrnuty a znázorněny na Obr. 7. Zatímco TLR7 nebo TLR8 agonisté nejsou schváleny jako adjuvans ve vakcínách, Imiquimod a Resiquimod prošly rozsáhlými klinickými zkouškami ve formě krému 5% (Aldara<sup>TM</sup>) pro lokální léčbu bradavic indukovaných HPV, Aktinické keratózy, Bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu, lentigo maligna melanomu a molluscum contagiosum. Obě sloučeniny indukují silnou lokální sekreci IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-12, stejně jako cytotoxickou T-buněčnou odpověď (Toussi a Massari 2014).



Obr. 7: Pleiotropní účinky TLR7 / 8 agonisty na různé složky protinádorové odpovědi (Smits a kol. 2008).

### 2.7.1.3 Poly (I:C)

Jako analog dsRNA je poly (I: C) ligandem endosomálního Toll-like receptoru (TLR) 3. Mezi přímé účinky poly (I: C) na nádorové buňky patří inhibice nádorového růstu a indukce apoptózy. Indukcí apoptózy u různých typů nádorových buněk, může poly (I: C) také nepřímo přispívat k protinádorové odpovědi, protože dostupné TAA jsou vychytávány buňkami prezentujícími antigen (APC) (Ammi a kol. 2015). Poly (I:C) je nejúčinnější induktor interferonu typu I (IFN) rozpoznávaný TLR3. Subcelulární lokalizace TLR3 se zdá být specifická pro daný typ buněk. Exprese TLR3 byla prokázána na buněčném povrchu fibroblastů, ale je primárně lokalizována v intracelulárních kompartmentech, jako je časný endozom nebo endoplazmatické retikulum v makrofázích, myeloidních dendritických buňkách (DCs), T-buňkách, NK buňkách a dalších neimunitních buňkách, jako jsou alveolární epiteliální buňky, intestinální epiteliální buňky, jaterní buňky a melanomové buňky. V imunitních buňkách Poly (I: C) vázající se na TLR3 iniciuje signální dráhu, která rekrutuje TIR doménu obsahující adaptor indukující IFN- $\beta$  (TRIF) a aktivuje transkripční faktory, interferon regulační faktor 3 (IRF3), nukleární faktor kappa B (NF $\kappa$ B) a aktivátorový protein-1 vedoucí

k indukci interferonu typu I a produkci zánětlivých cytokinů. Interferon typu I může aktivovat NK buňky, zvyšovat antigen-specifickou CD8 + T-buněčnou odpověď a podněcovat zrání dendritických buněk (Cheng a Xu 2010).

## 2.7.2 Agonisté fagocytárních receptorů

### 2.7.2.1 *Manan*, *Manan vázající lektin (MBL)*, *manózový receptor*

**Manan** je zásobní polysacharid produkovaný kvasinkami, bakteriemi a rostlinami, který je polymerem cukru manózy spojenými vazbou (1,4). Rozpoznání mananu lektinem vazajícím mannan (MBL) a dalšími lektiny C-typu z rodiny manosových receptorů vede k aktivaci komplementu, opsonizaci a fagocytóze (Petrovsky a Cooper 2011).

**Manan vázající lektin (MBL)** patří do rodiny proteinů zvané kolektiny, které se skládá jí z kolagenové a lektinové domény. MBL je schopen iniciovat lektinovou dráhu aktivace komplementu. Po navázání na cílové molekuly tvoří MBL komplexy se serinovými proteázami MASP-1 a MASP-2 (proteázy asociované s MBL) které štěpí C4 a C2 za vzniku C3 konvertázy (C4b2a). Následná aktivace komplementové kaskády vede k opsonizaci, fagocytóze a lýze cílových mikroorganismů prostřednictvím tvorby membránu atakujícího komplexu. Kromě toho, aktivace komplementu může vyvolat řadu zánětlivých účinků, jako je exprese adhezivních molekul, chemotaxe a aktivace leukocytů, uvolnění reaktivních forem kyslíku a sekreci cytokinů a chemokinů (Beltrame a kol. 2015). MBL představuje nejdůležitější příklad sekretovaných PRRs. MBL může usnadnit vychytávání částic a to jak prostřednictvím přímé opsonizace, tak na základě schopnosti vyvolat aktivaci komplementu na povrchu částic. Následná depozice iC3b a jiných C3 štěpných produktů vede k rozpoznávání komplementovými receptory, které jsou vysoce exprimovány profesionálními fagocyty (Ip a kol. 2009).

**Manózový receptor (MR)**, důležitý pattern-recognition receptor (PRR) v makrofázích a dendritických buňkách, hraje zásadní roli jak ve vrozené, tak získané imunitě (Zhao a kol. 2015).

MR je schopen vázat širokou řadu patogenů, jako jsou bakterie a viry, rozpoznáním manosových zbytků na povrchu těchto mikroorganismů a podílet se na fagocytóze a endocytóze, zprostředkování zpracování a prezentace antigenu, migraci buněk, intracelulární signalizaci, a produkci prozánětlivých a antizánětlivých cytokinů (Crespo a kol. 2011).

Janotová a kol. (2014) zjistila, že vazbou ligandů fagocytárních receptorů, v tomto případě mananu, na nádorové buňky lze stimulovat fagocytární atak, vedoucí k likvidaci

těchto nádorových buněk. Vazba fagocytárních receptorů na nádorové buňky byla zprostředkována pomocí biokompatibilní kotvy pro membrány BAM a bifunkčního crosslinkeru SMCC.

BAM je ve vodě rozpustný jednoduchý derivát kyseliny olejové, který je spojen s hydrofilním polyethylenglykolem (PEG). Bylo prokázáno, že rychle a snadno kotví targetované ligandy na buněčnou membránu bez cytotoxicity (He a kol. 2012).

SMCC je heterobifunkční crosslinker, který reaguje s primárními aminy a sulfhydrylovými skupinami za vzniku stabilních amidových a thioeterových vazeb (O'Brien a kol. 2009).

## **2.8 Možnost terapie a podávání PAMP**

### **2.8.1 Samomikroemulgující systém SMEDDS**

Obecně byly protinádorové léky dodávány intravenózní (i.v.) cestou, která představuje nejjednodušší způsob, jak dosáhnout okamžité a úplné biologické dostupnosti léků. Nicméně tento způsob podání by mohl vést k různým nežádoucím účinkům. Z tohoto důvodu je více zvažováno perorální podávání léků (Yadav a Srivastava 2014).

Nano přípravky jsou slibnými nástroji pro řešení různých otázek podávání léčiv manipulací fyzikálními vlastnostmi léku. Snížená velikost poskytuje větší povrchovou plochu pro částice léčiva pro lepší rozpuštění stejně jako možnost přímo pronikat přes různé biologické bariéry. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) je jedním z nejuspěšnějších nano systémů podávání léčiva (Negi a kol. 2013). SMEDDS je izotropní směs oleje, povrchově aktivní látky (surfaktantu), kosurfaktantu a léčivé látky. Nejpodstatnější pomocnou látkou pro formulaci SMEDDS jsou oleje, které ulehčují samotnou emulgaci a zvyšují následně i absorpci v těle. Surfaktanty se používají ke snížení povrchového napětí směsi. Mohou rozpustit nebo zlepšit rozpustnost vysokého množství hydrofobní sloučeniny. Díky jejich použití je účinná látka chráněna při průchodu trávicím traktem. Kosolventy neboli kosurfaktanty dále prohlubují účinnost surfaktantů a napomáhají vytvoření mikroemulze. (Seilerová a kol. 2014).

Jak název napovídá, tyto systémy mají schopnost emulgovat díky tomu, že vedle olejové fáze, obsahují ještě jednu nebo více povrchově aktivních látek (surfaktantů). Lipofilní léčivo je rozpuštěno v olejovém nosiči. Povrchově aktivní látka pomáhá v rozptýlení olejového nosiče v gastrointestinální tekutinách, což vede k vytvoření mikroemulze. Výsledná

mikroemulze s velikostí částic menší než 100 nm, a zvýšená rozpustnost hydrofobního léčiva může zvýšit absorpci v gastrointestinálním traktu (Kalepu a kol. 2013).

Na trhu jsou dostupné různé SMEDDS přípravky využívané u nádorových onemocnění. SMEDDS například zlepšuje protinádorový účinek perorálně podávaného 9-nitrokamptotecinu na lidské nádorové xenotransplantáty u nu-nu myši. 9-NC je perorálně aktivní látka vyvíjena pro léčbu rakoviny slinivky břišní a dalších solidních nádorů (Yadav a Srivastava 2014).

## **2.9 Inhibice oxidativního vzplanutí a tvorby NETs**

### **2.9.1 ROS - Epikatechin**

Neutrofilů mohou vytvářet reaktivní formy kyslíku (ROS), prostřednictvím činnosti NADPH oxidázového komplexu a indukovat buněčnou smrt oxidativním vzplanutím. Po aktivaci neutrofilů transmembránové a cytosolické podjednotky velkého NADPH oxidázového komplexu shromažďují na fagozomální membráně a přenášejí elektrony na molekulární kyslík k produkci superoxidu ( $O_2^-$ ). Superoxid spontánně nebo za katalýzy superoxid dismutázy reaguje na  $H_2O_2$ , který je substrátem pro myeloperoxidázu (MPO), katalyzující tvorbu kyseliny chlorné (HOCl). HOCl je neutrofilů využívána k útoku proti mikrobům a nádorovým buňkám (Urban a kol. 2006).

Epikatechin je flavonoid běžně se vyskytující ve stravě, zvláště bohaté na kakao. Mnohé studie ukázaly, že epikatechin vykazuje in vitro antioxidační aktivitu, může účinně vychytávat volné radikály a může hrát roli při modulaci oxidačního stresu zamezením tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) (Granado-Serrano a kol. 2010).

### **2.9.2 NETs - Cl-amidin**

PAD4 inhibitor Cl-amidin inhibuje aktivitu PAD4. Cl-amidin je strukturálně podobný PAD4 substrátu peptidylargininu a inhibuje PAD4 kovalentní modifikací cysteinového zbytku (Cys645) v aktivním místě enzymu (Li a kol. 2008).

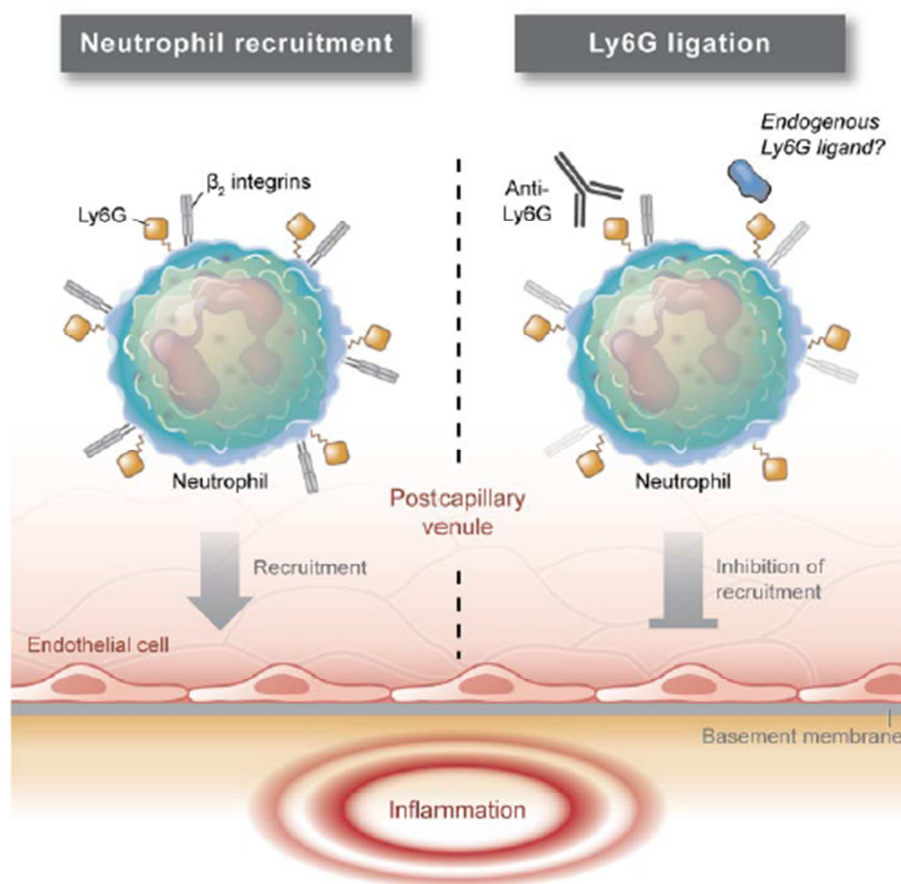
Peptidylarginin deimináza, nebo PAD, konvertuje argininové zbytky na citrulin v různých proteinových substrátech. PAD4 je exprimován v granulocytech a je zásadní pro tvorbu NETs prostřednictvím PAD4 zprostředkované citrulinace histonů (histonove citrulinace). Toto potvrzuje fakt, že PAD 4 knockout myši nemohou tvořit NET po stimulaci chemokiny nebo inkubaci s bakteriemi a nejsou schopny usmrcovat bakterie prostřednictvím



NETs. Cl-amidin zamezuje citrulinaci histonů, dekonenzaci chromatinu, a následnou tvorby NETs (Bicker a kol. 2012).

## 2.10 Ly6G

Ly6G je malý protein na povrchu myších neutrofilů, který je ukotven v buněčné membráně pomocí GPI kotvy. Protilátky zaměřené proti Ly6G (RB6-8C5 nebo 1A8) jsou obvykle využívány ve studiích zaměřených na určování role neutrofilů u myších modelů onemocnění. Základní mechanismus deplece neutrofilů není zcela pochopen, ale opsonizace komplementem hraje pravděpodobně klíčovou roli (Lee a kol. 2013). Studie také ukazují na souvislost mezi Ly6G a  $\beta_2$  integriny na povrchu neutrofilů a naznačují, že Ly6G snižují povrchovou hladinu a funkci těchto důležitých adhezivních molekul a tím i schopnost migrace neutrofilů (Obr. 8) (Hickey 2012).



Obr. 8: Ly6G je kolokalizován s  $\beta_2$  integriny, protilátková ligace Ly6G redukuje expresi  $\beta_2$  a inhibuje nábor neutrofilů ( Hickey, 2012).

### **3 Cíle práce**

- Studium možnosti náhrady LPS monofosforyl-lipidem A, R-848 a Poly (I:C) v rámci nádorové imunoterapie
- In vitro studium role NETs v nádorovém zabíjení
- Ověření role neutrofilů v nádorové imunoterapii použitím protilátky Ly6G

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Seznam chemikálií

- BAM<sub>4000</sub> - biokompatibilní kotva membrány, Mw 4000 (NOF EUROPE)
- Mannan - - z *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)
- Resiquimod - (R-848.HCl) –Invivogen,
- Resiquimod (R-848) TocrisRPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)
- MPLA – monofosforyl lipid A (Avanti Polar Lipids, USA)
- Cl-amidin –Calbiochem
- Monoclonal antibody to Ly6G, Clone R36-8C5, ositype Rat IgG2b- EXBIO
- Trypsin ( Sigma Aldrich)
- GM-CSF ( Sigma Aldrich)
- TNF $\alpha$  (Sigma Aldrich)
- Laminarin z *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich)
- FCS – fetální bovinní sérum ( HyClone)
- Lipopolysacharid (LPS) z *Escherichia coli* (Sigma Aldrich)
- SMCC -N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylicacid N-hydroxysuccinimidester (Thermo Scientific, USA)
- DMSO - dimetyl sulfoxid (Sigma- Aldrich, USA)
- DOPE - N-(Succinimidyl-oxy-glutaryl)-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl (NOF EUROPE)TCEP - tris (2-Carboxyethyl) phosphine hydrochlorid (Sigma- Aldrich, USA)
- MACS Neutrophil Isolation Kit mouse (Miltenyi Biotec)
- f-MLF KK - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin + lysin (Schafer-N, Dánsko)
- Poly I:C –sodná sůl (Sigma Aldrich)

## **4.2 Experimentální zvířata**

Ve všech pokusech byly použity samice myši C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories staré 8 týdnů, s váhou v rozmezí 18-20g. Myši byly chovány za standardních podmínek s fotoperiodou 12/12 a volným přístupem k potravě a vodě ve zvěřinci Parazitologického ústavu, BC AVČR a ve zvěřinci Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

## **4.3 Buněčná linie**

K pokusům byla využívána buněčná linie melanomu B16-F10. Kultivace buněk probíhala v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10% fetálního bovinního séra (FCS) s přídatkem 1% antibiotik, 1% glutaminu a 0,1% merkaptetanolu při 37°C v termostatu v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

## **4.4 Příprava buněk B16-F10**

Z narostlé buněčné linie nádorových buněk B16-F10 bylo slito kultivační médium a buňky byly třikrát promyty sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). Pro uvolnění adherovaných nádorových buněk následovalo promytí trypsinizační směsí (0,02% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS). Trypsinizace probíhala v termostatu nastaveného na 37°C po dobu pěti minut. Pro zastavení trypsinizace bylo přidáno RPMI 1640 medium s 10% FCS, ve kterém byly buňky s použitím Pasteurovy pipety rozvolněny. V dalším kroku následovala centrifugace buněk (10 min, 4°C, 150g) a naředění buněk na požadovaný objem přidáním RPMI 1640 bez séra. Buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky přidáním trypanové modři ke směsi buněk v poměru 1:1. Výsledná koncentrace buněk byla upravena na 4 miliony/ ml RPMI 1640.

## **4.5 Transplantace buněk melanomu B16-F10**

Transplantace buněk melanomu byla myším prováděna vždy po dosažení osmi týdnů. Před samotnou aplikací byly myši oholeny na pravé zadní části zad. Do oholeného místa jim poté bylo injikováno s.c. (pod kůži) 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

## **4.6 Měření velikosti nádorů**

Velikost nádorů byla v průběhu terapie měřena pomocí speciálního kaliperu. Ze získaných hodnot byly následně vypočítány objemy jednotlivých nádorů (Inaba a kol. 1986).

K výpočtu byl používán vzorec  $V = \pi/6 AB^2$ , kde A představuje největší rozměr nádoru (jeho délka) a B odpovídá nejmenšímu rozměru nádoru (výška).

## 4.7 Počítání metastáz v plicích

Plicní metastázy byly ve dvou experimentech. Myši byly umrtveny stržením vazy a následně jim byly plíce vyjmuty. Plíce byly prohlíženy s použitím binolupy, u plic obsahující metastatická ložiska (černé tečky) bylo spočítáno jejich celkové množství (Větvička a kol. 2007)

## 4.8 Průměrná redukce nádorového růstu

Redukce nádorového růstu (ve srovnání s kontrolou) byla stanovena dle následujícího vzorce:

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

Průměrná redukce (%) byla měřena ve dnech 4, 6, 8, 10, 12 a 14 od zahájení terapie. Ze všech šesti hodnot byla vypočtena průměrná hodnota, jejímž vyjádřením v procentech byla získána hodnota „průměrné redukce nádorového růstu“.

## 4.9 Příprava terapeutických látek

### 4.9.1 Příprava mannan-BAM

Manan byl připraven redukční aminací metodou dle Torosantucci (Torosantucci a kol. 2005). Roztok mananu v prostředí octanu amonného byl redukován kyanoborohydridem sodným při pH 7,5 a 50 °C po dobu pěti dnů. Roztok byl dále dialyzován za použití dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva - Heidelberg, Německo) proti PBS při 4°C přes noc.

Navázání molekuly BAM na aminoskupinu mananu bylo provedeno při pH 7,3 metodou podle Kato (Kato et al., 2004). Během jedné hodiny při pokojové teplotě došlo k reakci N-hydroxysukcinimidové skupiny (NHS), vázané na BAM s aminoskupinou aminovaného mananu. Nakonec byla provedena dialýza ve střeově MWCO proti PBS při 4°C přes noc za stálého míchání. Byl získán manan-BAM, jehož koncentrace byla upravena na 0,2 mM roztok manan-BAM v PBS .

### **Manan –BAM + MPLA**

Pro přípravu manan-BAM +MPLA byl v roztoku 0,2 mM mananu-BAM při mírném ohřevu rozpuštěn MPLA na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku.

### **4.9.2 Příprava roztoků obsahujících Resiquimod.HCl**

V pokusu 3 byl použit dobře rozpustný Resiquimod.HCl (R-848.HCl) dodaný firmou Invivogen. Vzhledem k jeho vysoké ceně byla v následujících experimentech používána báze R-848 od firmy Tocris, z které byl hydrochlorid připravován přidávkem ekvimolárního množství HCl. Příslušné roztoky byly pak získávány rozpuštěním R-848.HCl v PBS, 0,2 mM roztoku mananu-BAM v PBS, případně v 0,2 mM roztoku mananu v PBS s přidávkem protilátky Ly6G (0,5 mg/ml).

### **4.9.3 Příprava mannan-SMCC**

Podle návodu výrobce (Thermo Scientific, Pierce Protein Biology Products), podobně jako v předchozím případě, NHS skupina SMCC reaguje s aminoskupinou aminovaného mananu. Aby se molekuly mannan-SMCC vázaly následně pomocí maleinimidové skupiny SMCC (SMCC je heterobifunkční činidlo se skupinou NHS na jednom a maleinimidovou skupinou na druhém konci molekuly) na nádorové buňky, bylo třeba na nich zajistit výskyt –SH skupin. Toho bylo dosaženo dle (Christiaansen et al., 1984) redukcí cystinů. Pro tento účel byl v in vivo experimentech použit 50 mM roztok TCEP v PBS, který byl aplikován intratumorálně (i. t.) jednu hodinu před aplikací roztoku mannan-SMCC.

Kromě 0,2 mM roztoku mannan-SMCC v PBS byly připraveny roztoky obsahující rovněž R-848.HCl na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml, případně navíc ještě POLY I:C na výslednou koncentraci rovněž 0,5 mg/ml roztoku.

### **4.9.4 Příprava SMEDDS**

Pro přípravu SMEDDS byla nejprve vytvořena směs obsahující 4 g etyl oleátu, 4,8 g PEG-400 (polyetylen glykolu), 5,52 g Tween-80 (detergentu) + 1,6 g ethanolu. K 4 ml této směsi bylo poté dle použitých látek při terapii přidáno 20 mg LPS nebo 33,4 mg f-MLF KK-DOPE nebo 20 mg LPS + 33,4 mg f-MLFKK-DOPE. Všechny směsi byly důkladně vortexovány.

### **Příprava f-MLF KK-DOPE**

Byly smíchány 4 ml 10 mM f-MLFKK v DMSO s 4 ml 10 mM DOPE-NHS v DMSO, vše bylo společně inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Vzniklý f-MLFKK-DOPE byl vysušen lyofilizací.

## **4.10 Metodický postup in vitro experimentů**

### **4.10.1 Inkubace nádorových buněk s ligandem**

V prvním kroku byly sklizeny nádorové buňky B16-F10 (postup viz příprava buněk B16-F10 pro transplantaci, místo RPMI 1640 s 10% FCS bylo používáno RPMI +10% nedeaktivovaného FCS) a naředěny podle potřeby. Následně byla na 96 jamkovou desku napipetována suspenze melanomových buněk B16-F10, poté byly přidány příslušné ligandy. Následovala inkubace buněk s ligandy, která probíhala 30 min při 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Poté byla destička stočena (2 min, 4°C, 424g) a supernatanty byly odstraněny. Všechny jamky byly poté promyty 200 µl RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS, destička stočena stejným způsobem a supernatanty odstraněny.

### **4.10.2 Izolace neutrofilů**

Neutrofilů byly získávány z kostní dřevě. K tomuto účelu byly myši usmrceny stržením vazů. Následně ve flow boxu byla srst dezinfikována ethanolem, kůže odstříhnutá doko- la kolem zadních končetin a pomocí pinzety stažena. Aby nedošlo k porušení stehenní kosti, byla noha odstříhnutá co nejbližší k pánvi a opláchnuta ve sterilním PBS. Po odstranění šlach a svaloviny byly kosti opláchnuty v izopropanolu a vloženy do Petriho misky s RPMI 1640 s 10% FCS. Kostní dřevě byla získána odstřížením kloubních hlavic a následným propláchnu- tím kostí injekční stříkačkou s RPMI 1640 s 10% FCS do druhé Petriho misky. Vyizolovaná kostní dřevě byla rozsuspendována, přefiltrována přes BD filtr (Falcon, 70µm). Buňky byly poté spočítány v Bürkerově komůrce přičemž jejich životnost byla zjištěna pomocí trypano- vy modři, centrifugovány (10 min, 4°C, 300g) a převedeny do kultivačního média dle potřeby.

### **4.10.3 Imunomagnetická separace neutrofilů**

Separace byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu (Neutrophil isolation kit mouse, MACS, Miltenyi Biotec). Ke stočeným buňkám (viz. Izolace neutrofilů) byl přidán MACS pufr v množství 200 µl na 50 milionů buněk, který byl připraven smícháním 48,8PBS s 1 ml FCS a s 200 µl 2mM EDTA. Následovalo přidání primární protilátky v množství 50 µl na 50 milionů buněk, promíchání a inkubace v lednici po dobu 10 minut.

Směs byla promyta 5-10 ml MACS pufru na 50 milionů buněk a stočena při 1250RPM po dobu 10 minut. Supernatant byl kompletně odsát a pelet rozsuspendován v MACS pufru v množství 400  $\mu$ l na 50 milionů buněk. V dalším kroku byla přidána sekundární protilátka v množství 100  $\mu$ l na 50 milionů buněk, vše bylo promícháno a inkubováno 10 minut v lednici. Směs byla opět promyta 5-10 ml MACS pufru a stočena (10 min, 4°C, 300g). Supernatant byl následně odsán a pelet rozsuspendován v 500  $\mu$ l MACS pufru (v případě většího množství než  $10^8$  je potřeba upravit množství pufru)

K vlastní magnetické separaci byl použit MidiMACS separátor se separační kolonkou LS Column dodávaných společně s kitem pro izolaci neutrofilů (Netrophil isolation kit mouse, MACS, Miltenyi Biotec). Separace byla provedena dle pokynů v návodu výrobce. Negativní separací byly odstraněny všechny kontaminující buňky a získány neutrofily. Čistota neutrofilů byla stanovena na 91%.

#### **4.10.4 Priming neutrofilů**

U neutrofilů byl prováděn trojitý priming pomocí GM-CSF, TNF-alfa a volného laminarinu. K neutrofilům byl přidáván GM-CSF (výsledná koncentrace 12 ng/ml) TNF $\alpha$  (výsledná koncentrace 2,5 ng/ml) a volný laminarin (výsledná 2 mikromolární koncentrace). Směs byla inkubována při 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře po dobu 20 minut.

#### **4.10.5 Přidání inhibitoru tvorby NETs a počítání buněk**

Jako inhibitor tvorby neutrofilních extracelulárních sítí (NETs) byl používán Cl-amidin o výsledné koncentraci 0,1 mM. Obsah všech jamek byl poté rozsuspendován a desička byla vložena do termostatu s 5% CO<sub>2</sub> při 37°C na 2 hodiny.

Po uplynutí doby kultivace byly buňky rozsuspendovány pipetou, poté byl celý obsah jamky (200  $\mu$ l) vyjmut a smíchán se stejným množstvím trypanové modři. V posledním kroku byly nádorové buňky a neutrofily spočítány pomocí Bürkerovy komůrky.

### **4.11 Statistické zpracování dat**

Získaná data byla vyhodnocena a graficky zpracována v programu Microsoft Excel. Statistická významnost byla zjišťována pomocí programu STATISTICA 12 s použitím testů ANOVA s Tukey *post hoc* testem. Data sledující přežití byla vyhodnocena statisticky pomocí Analýzy přežití Log-rank testem v programu STATISTICA 12.



## 4.12 Schéma jednotlivých experimentů

### 4.12.1 Pokus č. 1: Terapie melanomu pomocí MPLA, manan-BAM a jejich směsí

K tomuto pokusu bylo použito 24 samic kmene C57BL/6, které byly dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk rozděleny do 4 skupin, kde v každé skupině bylo 6 myší, zároveň byl změřen původní objem nádorů („den 0“). Léčivo bylo podáváno v pulzech tzn. ve dnech 0,1,2...8,9,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů.

Schéma pokusu bylo následující:

- A) i.t. aplikace 50  $\mu$ l PBS
- B) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,5 mg MPLA/ml PBS
- C) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,2 mM manan-BAM
- D) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,2 mM manan-BAM in MPLA 0,5 mg/ml

Čtrnáctý den po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů, byly jim vyjmuty plíce a spočítány metastázy.

### 4.12.2 Pokus č. 2: Terapie melanomu pomocí perorálně podávaných SMEDDS

V tomto pokusu byla zkoumána možnost perorálně podávat směs signálních a fagocytárních ligandů ve formě „samomikroemulgujících“ systémů (SMEDDS). V pokusu bylo použito 20 samic kmene C57BL/6. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin po pěti myších. V den započetí terapie („den 0“) a poté každý druhý den byla změřena velikost nádorů. Terapeutické látky byly podávány ráno a večer v pulzech tzn. ve dnech 0,1,2...8,9,10 a to následujícím způsobem:

- A) Ráno p.o. aplikace 50  $\mu$ l + večer p.o. aplikace 50  $\mu$ l směsi ethyl oleátu s detergenty
- B) Ráno p.o. aplikace 50  $\mu$ l + večer p.o. aplikace 50  $\mu$ l směsi ethyl oleátu s detergenty + LPS
- C) Ráno p.o. aplikace 50  $\mu$ l + večer p.o. aplikace 50  $\mu$ l směsi ethyl oleátu s detergenty + f-MLF-KK-DOPE
- D) Ráno p.o. aplikace 50  $\mu$ l + večer p.o. aplikace 50  $\mu$ l směsi ethyl oleátu s detergenty + LPS + f-MLF-KK –DOPE

Čtrnáctý den po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů, byly jim vyjmuty plíce a spočítány metastázy.

#### **4.12.3 Pokus č. 3: Terapie melanomu pomocí R-848.HCl, manan-BAM a jejich směsi**

Do následujícího pokusu bylo zahrnuto 24 samic kmene C57BL/6N. Dvanáct dní od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin po šesti myších. Myším byl současně změřen původní objem nádorů („den 0“). Léčivo bylo podáváno v pulzech, tzn. ve dnech 0,1,2...8,9,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů.

Pokus probíhal podle následujícího schématu:

- A) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,5 mg R-848/ml PBS
- B) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,5 mg R-848/ml 0,2 mM manan-BAM
- C) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,2 mM mannan-BAM
- D) i.t. aplikace 50  $\mu$ l PBS

Po ukončení terapie byla u všech myší dále sledována doba přežití.

#### **4.12.4 Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí aplikace směsi manan-SMMC+R- 848. HCl, řešení otázky synergie s POLY I:C**

V tomto experimentu bylo použito 18 samic kmene C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do tří skupin po šesti myších, zároveň byl změřen původní objem nádorů („den 0“). Všem skupinám byl nejdříve aplikován redukční roztok (50 mM roztok TCEP v PBS) hodinu před vlastní aplikací terapeutických látek. Myším bylo podáváno léčivo pulzní terapií ve dnech 0,1,2...8,9,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů.

Schéma pokusu bylo následující:

- A) i. t aplikace 50 mikrolitrů roztoku TCEP, po hodině i.t. 50  $\mu$ l roztoku manan-SMCC + R-848.HCL
- B) i.t aplikace 50 mikrolitrů roztoku TCEP, po hodině i.t. 50  $\mu$ l roztoku manan-SMCC + R-848.HCl + POLY I:C
- C) i.t aplikace 50 mikrolitrů roztoku TCEP, po hodině i.t. 50  $\mu$ l PBS

Po ukončení terapie byla u všech myší dále sledována doba přežití.

#### **4.12.5 Pokus č. 5: Studium vlivu deplece neutrofilů pomocí protilátky proti Ly6G na růst nádoru.**

Cílem tohoto pokusu bylo prokázat roli neutrofilů v terapii melanomu jejich blokací protilátkou proti Ly6G. K pokusu bylo použito 30 samic kmene C57BL/6N, které byly dvanáctý den od transplantace melanomových buněk rozděleny do pěti skupin po šesti myších. V den započetí terapie („den 0“) a poté každý druhý den byla změřena velikost nádorů. Terapeutické látky byly podávány v pulzech tzn. ve dnech 0,1,2....8,9,10 a to následujícím způsobem:

- A) i.t aplikace 50 mikrolitrů roztoku R-848/ manan-BAM + 0,5 mg Ly6G
- B) i.t aplikace 50 mikrolitrů roztoku R-848/manan- BAM
- C) i.t aplikace 50 mikrolitrů roztoku 0,2 mM manan-BAM
- D) i.t. aplikace 50  $\mu$ l PBS
- E) i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku R-848.HCl v PBS

#### **4.12.6 In vitro studium inhibice tvorby NETs, vliv Cl-amidinu na cytotoxické působení neutrofilů s použitím různých množství buněk**

Izolace neutrofilů z kostní dřeně, následná imunomagnetická separace neutrofilů, sklizení nádorových buněk a jejich inkubace s ligandem byla provedena dle postupu (viz. metodický postup in vitro experimentu). Melanomové buňky B16-F10 byly naředěny tak, aby výsledná koncentrace byla 1 milion buněk na 1 ml. Neutrofilů byly naředěny tak, aby byla získána koncentrace 2,5 milionů buněk na 1ml. V případě použití dvojnásobného množství buněk byla koncentrace buněk B16-F10 upravena na 2 miliony buněk na 1 ml, koncentrace neutrofilů na 5 milionů buněk na 1 ml. Priming neutrofilů byl proveden stejně jako uvedeno výše.

Na 96 -U jamkovou desku bylo napipetováno do 21 jamek po 100  $\mu$ l suspenze melanomových buněk B16-F10. Do příslušných jamek byl poté napipetován manan-BAM na výslednou 0,04 mM koncentraci v RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaným FCS. K jamkám bez ligandu bylo přidáno 100  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS v PBS v poměru 4:1. Po centrifugačním promytí navázaného ligandu bylo do odpovídajících jamek napipetováno 200  $\mu$ l primovaných neutrofilů. Do zbývajících jamek bylo přidáno 200  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. V posledním kroku byl do příslušných jamek přidán 0,004 mM Cl-

amidinu na 0,1 mM výslednou koncentrací, v kontrole byl použit PBS. Po dvouhodinové inkubaci byly buňky počítány v Burkerově komůrce (viz. Metodický postup experimentu).

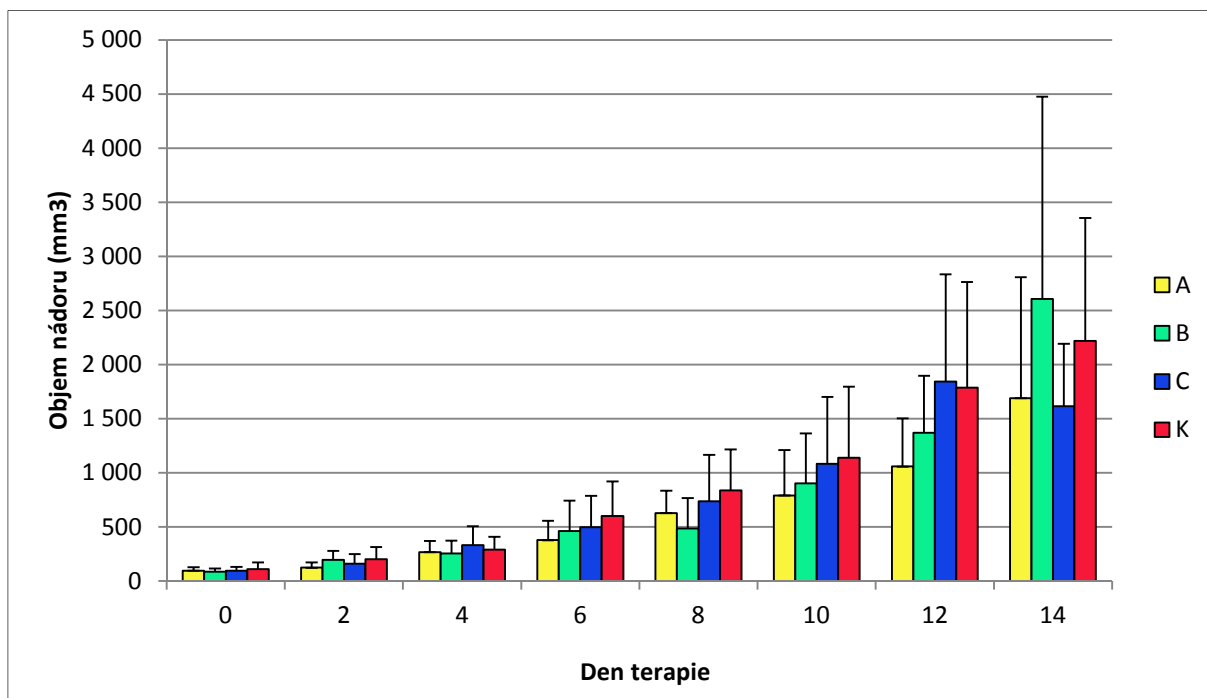
#### **4.12.7 In vitro inhibice tvorby NETs s použitím různých koncentrací Cl-amidinu, vliv na cytotoxické působení neutrofilů**

Celý postup byl identický s výše uvedeným s tím, že byly použity nižší počty buněk, tedy 100 000 buněk B16-F10 a 500 000 primovaných neutrofil/jamku. Cl-amidin byl testován v poloviční (0,05 mM) a dvojnásobné (0,2 mM) koncentraci v porovnání s předchozím pokusem.

## 5 Výsledky

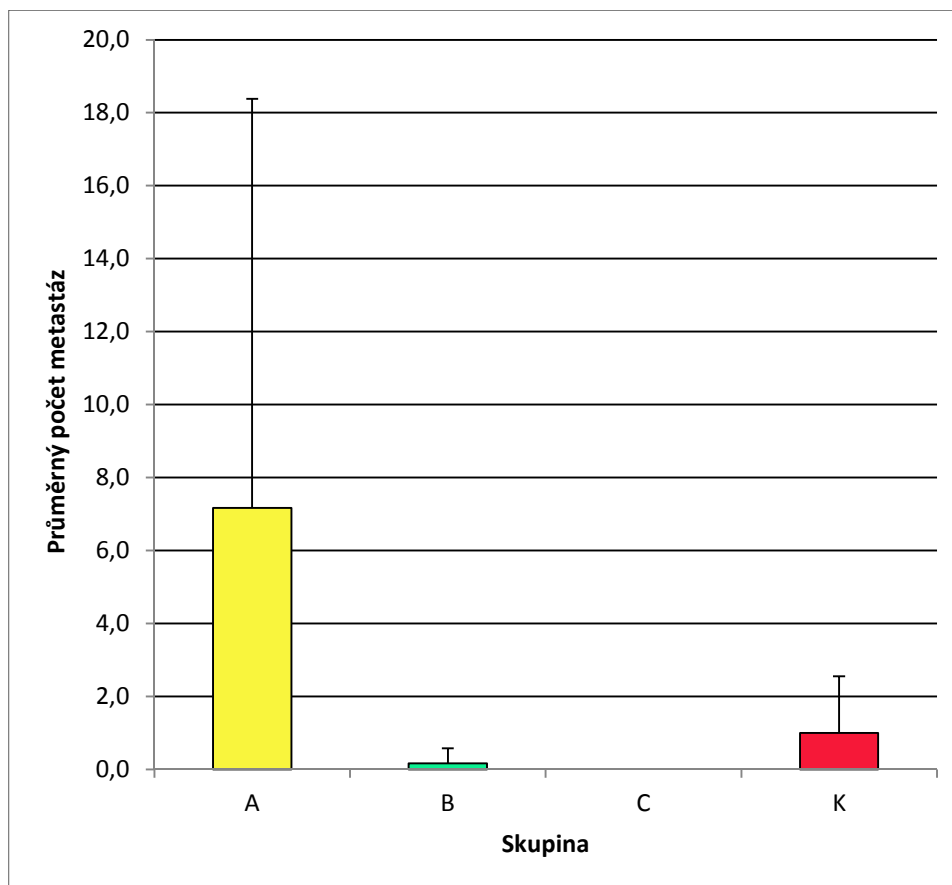
### 5.1.1 Pokus č. 1: Terapie melanomu pomocí MPLA, manan-BAM a jejich směsi

Tímto pokusem byl zjišťován vliv MPLA, případně manan-BAM s MPLA na redukci nádorového růstu. Hlavním smyslem bylo zjistit účinnost MPLA jako náhrady LPS. Jak ukazuje Obr. 9, žádný výrazný terapeutický efekt zde nebyl pozorován.

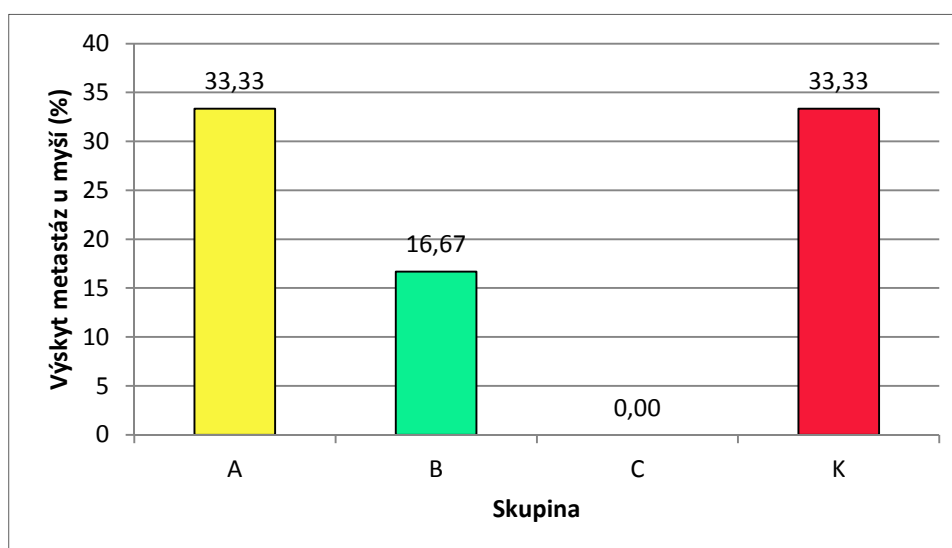


Obr. 9: Vliv terapie pomocí MPLA na redukci nádorového růstu. (A – MPLA (0,5mg/ml), B – manan-BAM, C – manan-BAM in MPLA (0,5 mg/ml), K – kontrola (PBS))

Na následujících grafech je znázorněn vliv terapie na výskyt metastáz u myší. Na Obr. 10 je zaznamenán průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly metastázy zjištěny. Na Obr. 11 je uvedeno procento výskytu metastáz v jednotlivých skupinách.



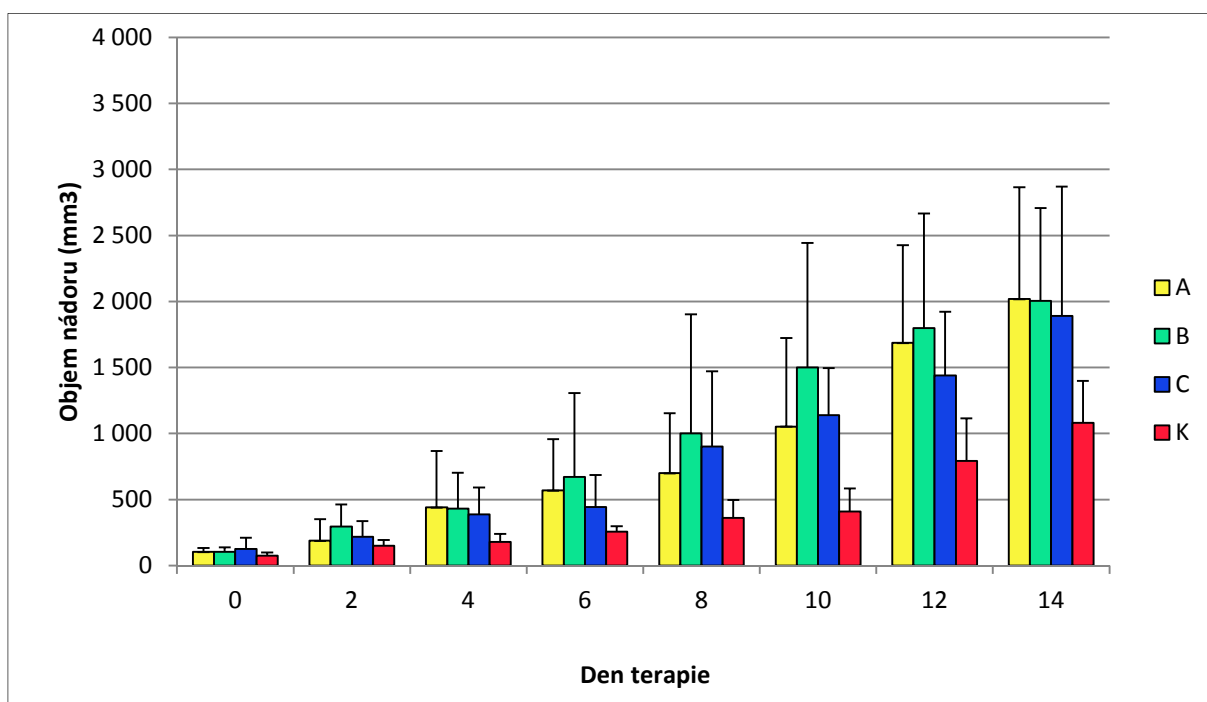
Obr. 10: Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. (A – MPLA (0,5mg/ml), B – manan-BAM, skupina C – manan-BAM in MPLA (0,5mg/ml), K – kontrola (PBS))



Obr. 11: Procento výskytu metastáz v jednotlivých skupinách. (skupina A – MPLA (0,5mg/ml), skupina B – manan-BAM, skupina C – manan-BAM in MPLA (0,5mg/ml), skupina K – kontrola (PBS))

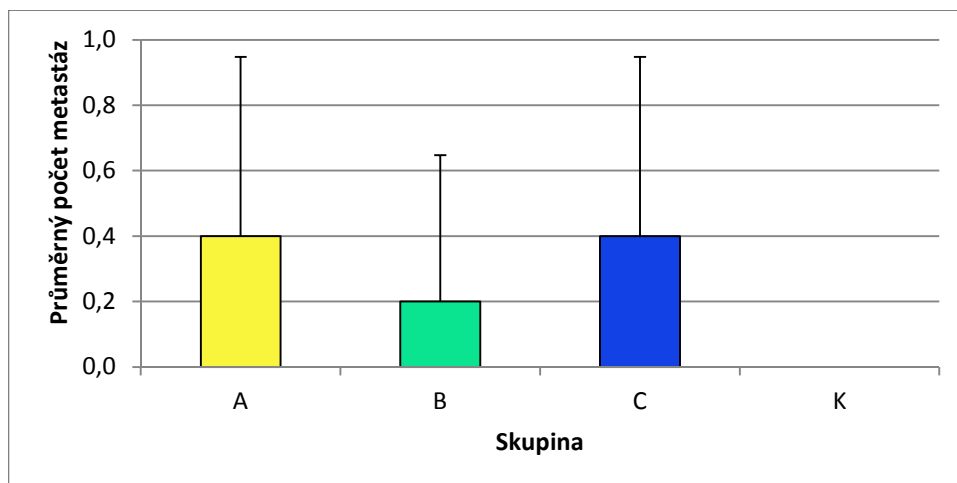
### 5.1.2 Pokus č. 2: Terapie melanomu pomocí perorálně podávaných SMEDDS

Tímto pokusem byla zkoušena možnost perorální aplikace pomocí různé kombinace terapeutických látek ve formě SMEDDS. Z Obr. 12 je zřejmé, že použitá forma perorální aplikace nevykazovala žádný inhibiční vliv na růst nádorů, který byl paradoxně nejnižší v kontrolní skupině.



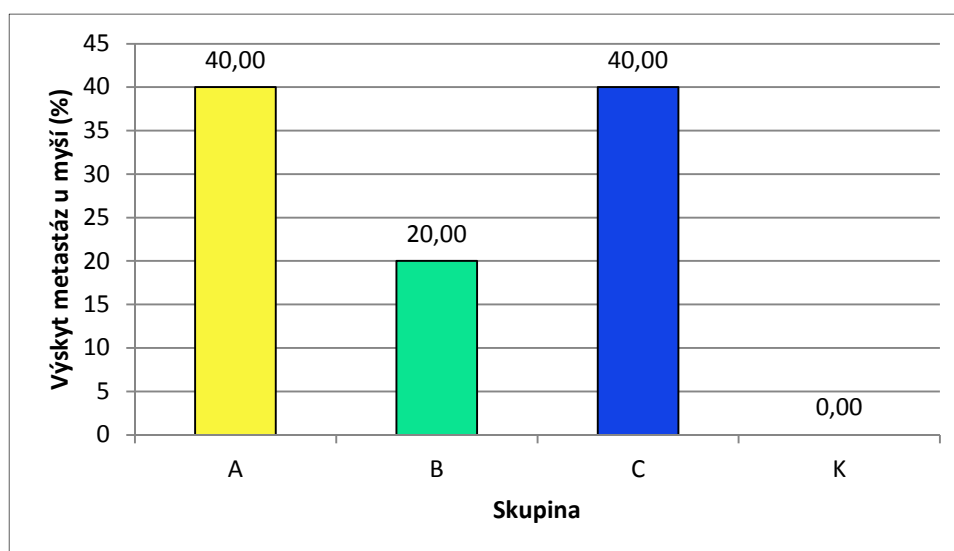
Obr. 12: Vliv terapie pomocí perorálně podávaných terapeutických látek formou SMEDDS. (A – ethyl oleát s detergenty + LPS, B – ethyl oleát s detergenty + f-MLF-KK-DOPE, C –ethyl oleát s detergenty + LPS + f-MLF-KK-DOPE, K – kontrola (ethyl oleát s detergenty)).

Na Obr. 13 můžeme vidět vliv terapie na intenzitu metastázování, tedy průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly metastázy zjištěny.



Obr. 13: Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. (A –ethyl oleát s detergenty + LPS, Skupina B – ethyl oleát s detergenty + f- MLF-KK-DOP, C –ethyl oleát s detergenty + LPS + f- MLF-KK-DOPE, Skupina K – kontrola (ethyl oleát s detergenty))

Následující Obr. 14 znázorňuje procento výskytu metastáz v jednotlivých skupinách.



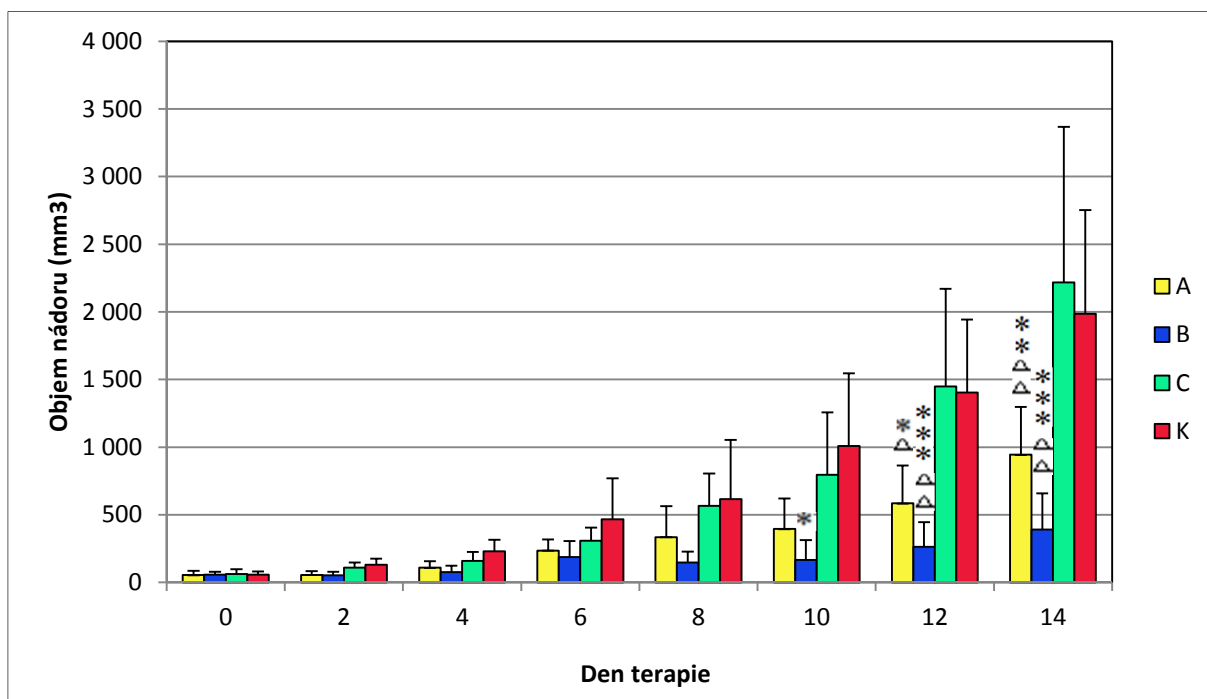
Obr. 14: Procento výskytu metastáz v jednotlivých skupinách. (A –ethyl oleát s detergenty + LPS, B – ethyl oleát s detergenty + f- MLF-KK-DOP, C –ethyl oleát s detergenty + LPS + f-MLF-KK-DOPE, K – kontrola (ethyl oleát, detergenty)).

### 5.1.3 Pokus č. 3: Terapie melanomu pomocí R-848.HCl, manan-BAM a jejich směsí.

Cílem pokusu bylo zjistit, jak R-848 jako náhrada LPS a jeho kombinace s manan-BAM ovlivňuje růst nádoru. Z Obr. 15 je patrné, že nejvýraznější redukce nádorové hmotnosti nastala za použití R-848 s manan-BAM, kdy došlo k 74,7% průměrné redukci nádorového růstu, která byla 10,12, 14 den statisticky významná oproti samotnému manan-BAM a PBS



kontrole. Terapie samotným R-848 vedla k 53,2% inhibici nádorového růstu, i v tomto případě bylo dosaženo statisticky významné redukce.

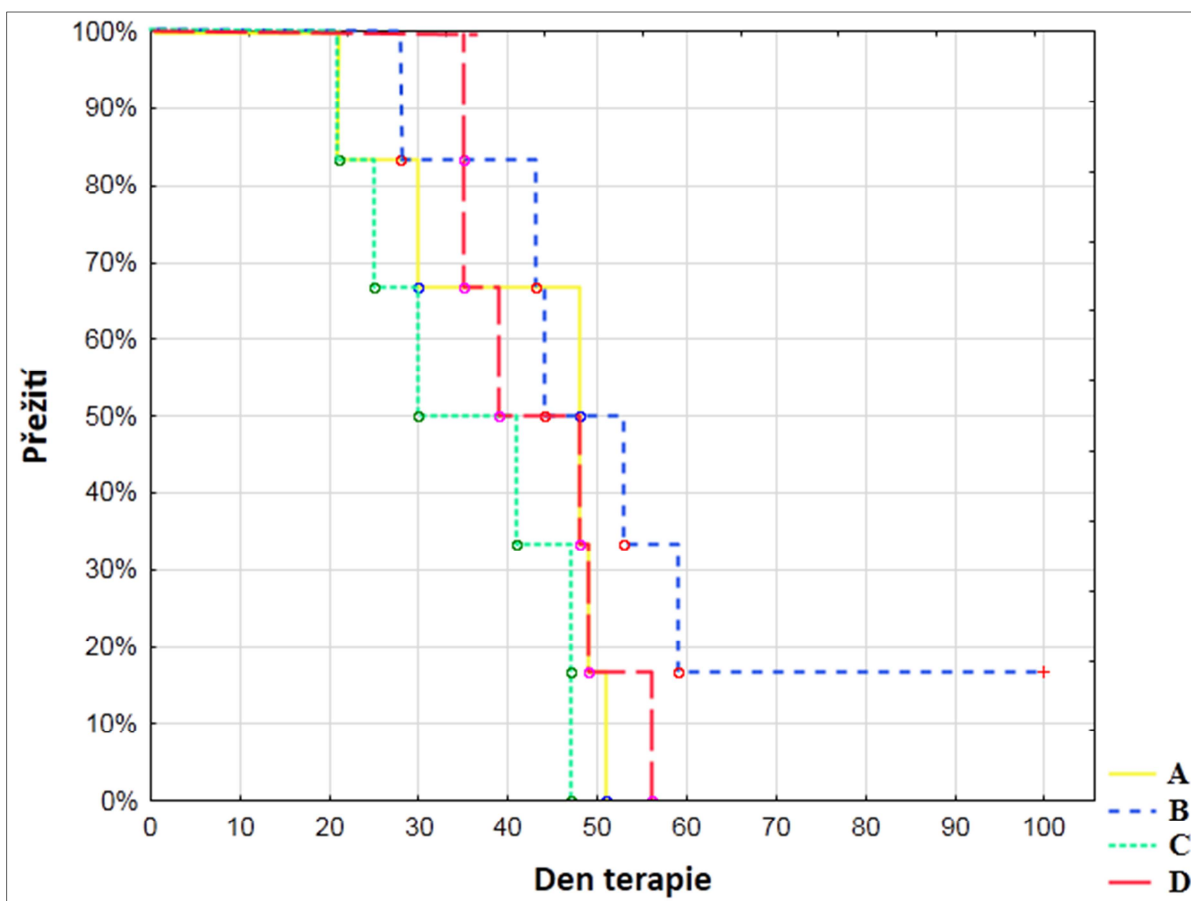


Obr. 15: Vliv terapie na redukci nádorového růstu. (A – R-848.HCl (0,5mg/ml), B – manan - BAM + R-848 (0,5 mg R-848.HCl/ml 0,2 mM manan-BAM), C – 0,2 mM manan-BAM, K – kontrola (PBS)

△  $P \leq 0,05$ ; △△  $P \leq 0,0005$  vůči C (manan-BAM)

\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,005$ ; \*\*\* $P \leq 0,0005$  vůči K (PBS)

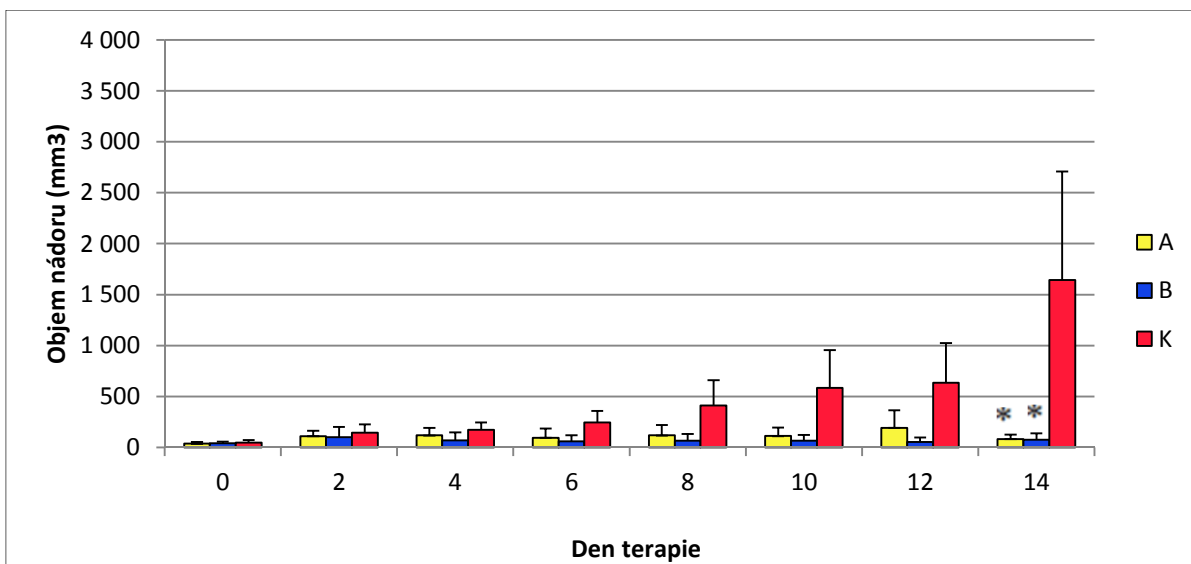
U myší byla sledována délka přežití, která je znázorněna na Obr. 16. Ve skupině, které byla aplikována směs manan-BAM s R-848 (skupina B) přežila jedna myš pozorovanou hranici 100 dnů, nicméně prodloužení přežití v této skupině nebylo statisticky významné.



Obr. 16: Vliv terapie na délku přežití myši. (A – R-848.HCl (0,5mg/ml), B – manan-BAM + R-848 (0,5 mgR-848.HCl/ml 0,2 mM manan-BAM), C – 0,2 mM manan-BAM, K – kontrola (PBS))

#### 5.1.4 Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí aplikace směsi manan-SMMC+R-848.HCl, řešení otázky synergie s POLY I:C

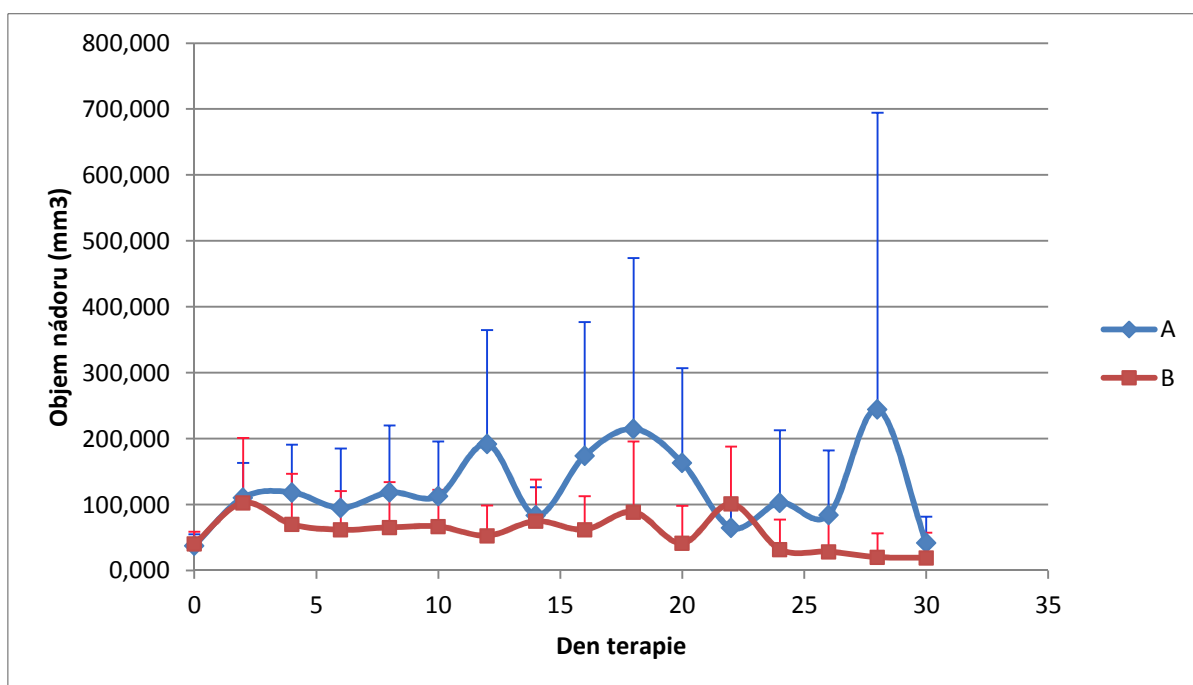
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jaký vliv má kovalentní kotvení ligandu pomocí SMCC na redukcí nádorového růstu. Mimo jiné byla sledována i případná synergie s POLY I:C. Jak vyplývá z Obr. 17, obě terapie byly velice účinné, přičemž skupina A měla za následek 68,2% redukcí nádorového růstu a synergie s POLY I:C (skupina B) vedla až k 82,3% průměrné redukcí nádorového růstu. Obě skupiny vykazovaly 14. den léčby statisticky významné snížení nádorového růstu.



**Obr. 17: Vliv terapie na redukci nádorového růstu (Skupina A – manan - SMCC + R 848.HCl, Skupina B –manan-SMCC + R-848.HCl + POLY I:C, K – kontrola (PBS))**

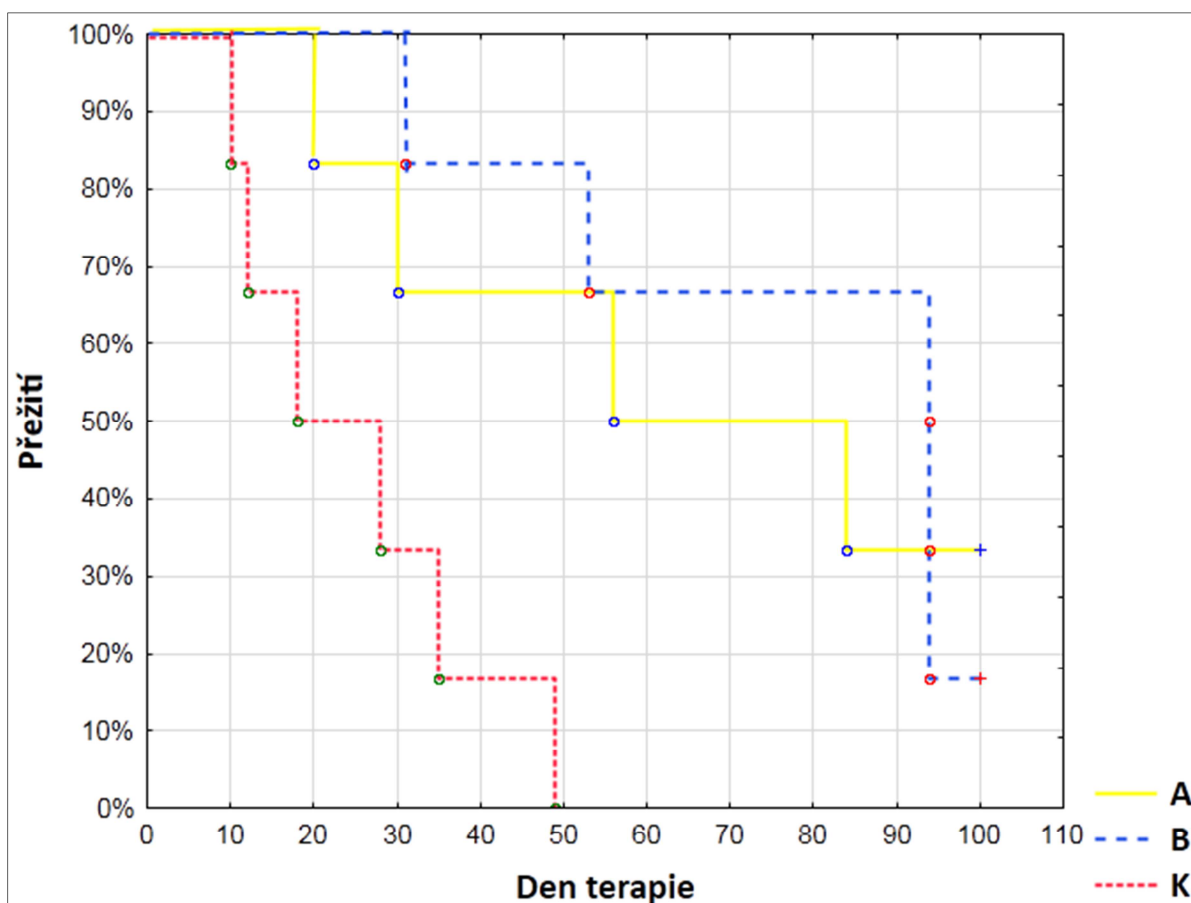
\* $P \leq 0,0005$  vůči K (PBS)

Z Obr. 18 je patrné, že terapie byla úspěšná i v dalších dnech a stále vede k výrazné redukci až vymizení nádorů.



**Obr. 18: Vliv terapie na redukci nádorového růstu v rámci sledování přežití ( A – manan - SMCC + R 848.HCl, B –manan-SMCC + R-848.HCl + POLY I:C)**

Vliv léčby na délku přežití je demonstrován na Obr. 19. Jak skupina A (manan - SMCC + R 848.HCl), tak skupina B (manan-SMCC + R-848.HCl + POLY I:C ) dosáhla delší doby přežití ve srovnání s kontrolní skupinou K (PBS). U skupiny B navíc došlo ke statisticky významnému prodloužení přežití.



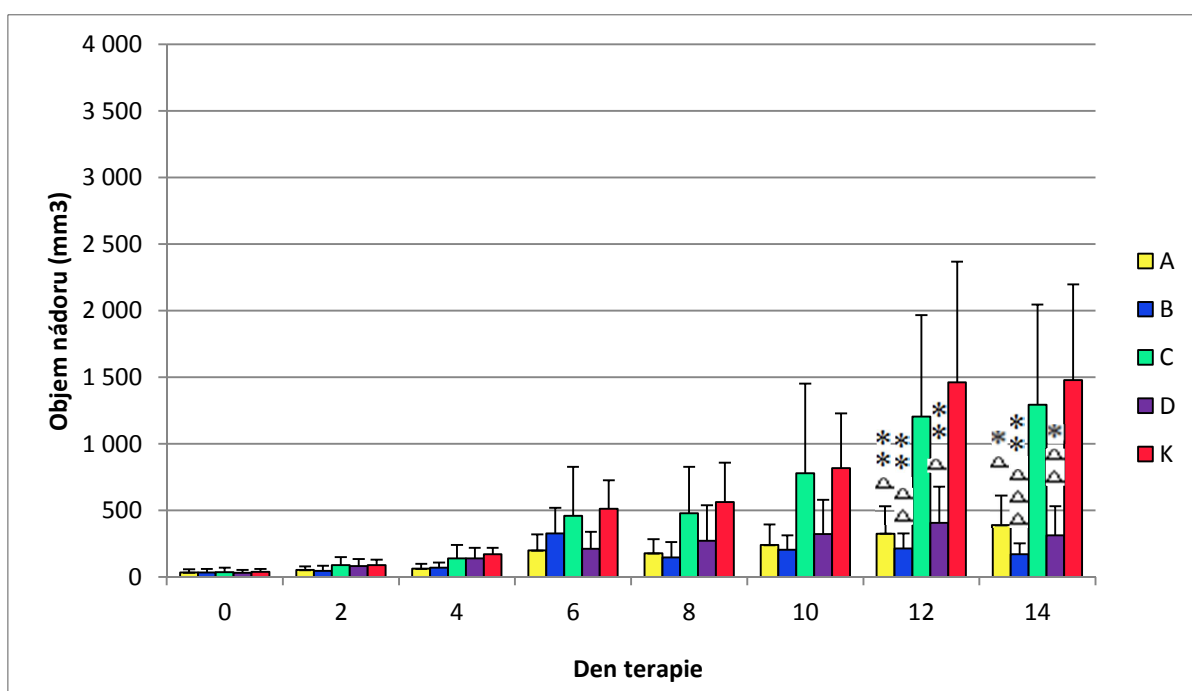
**Obr. 19: Vliv terapie na délku přežití myši (A – manan - SMCC + R 848.HCl, B –manan-SMCC + R-848.HCl + POLY I:C, K – kontrola (PBS))**

\*  $P \leq 0,05$  vůči K (PBS)

U myši, u kterých přesáhla délka přežití 120 dnů, byla provedena nová transplantace melanomových buněk. Tato transplantace se týkala 2 myši ze skupiny A a jedné myši ze skupiny B. Po uplynutí 35 dnů od retransplantace došlo k úhynu jedné myši ze skupiny A, u další myši z této skupiny došlo k nádorovému růstu, zatímco u myši ze skupiny B se nádor znovu neuchytil.

### 5.1.5 Pokus č. 5: Studium vlivu deplece neutrofilů pomocí protilátky proti Ly6G

Smyslem tohoto pokusu bylo prokázat, zda blokáce neutrofilů s využitím protilátky proti Ly6G se projeví zvýšeným nádorovým růstem. Kromě toho byl sledován vliv R-848 a jeho kombinace s manan-BAM na redukci nádorového růstu. Jak ukazuje Obr. 20, podávání protilátky proti Ly6G vedlo od osmého dne ke zvýšení růstu nádorů ve srovnání s účinným efektem směsi R-848/manan-BAM (A proti B). Tento rozdíl však nebyl statisticky významný.



Obr. 20: Vliv protilátky proti Ly6G na nádorový růst. (A – R-848 / manan-BAM + Ly6G, B – R-848 / manan-BAM, C – manan- BAM, D – R-848, K – kontrola (PBS))

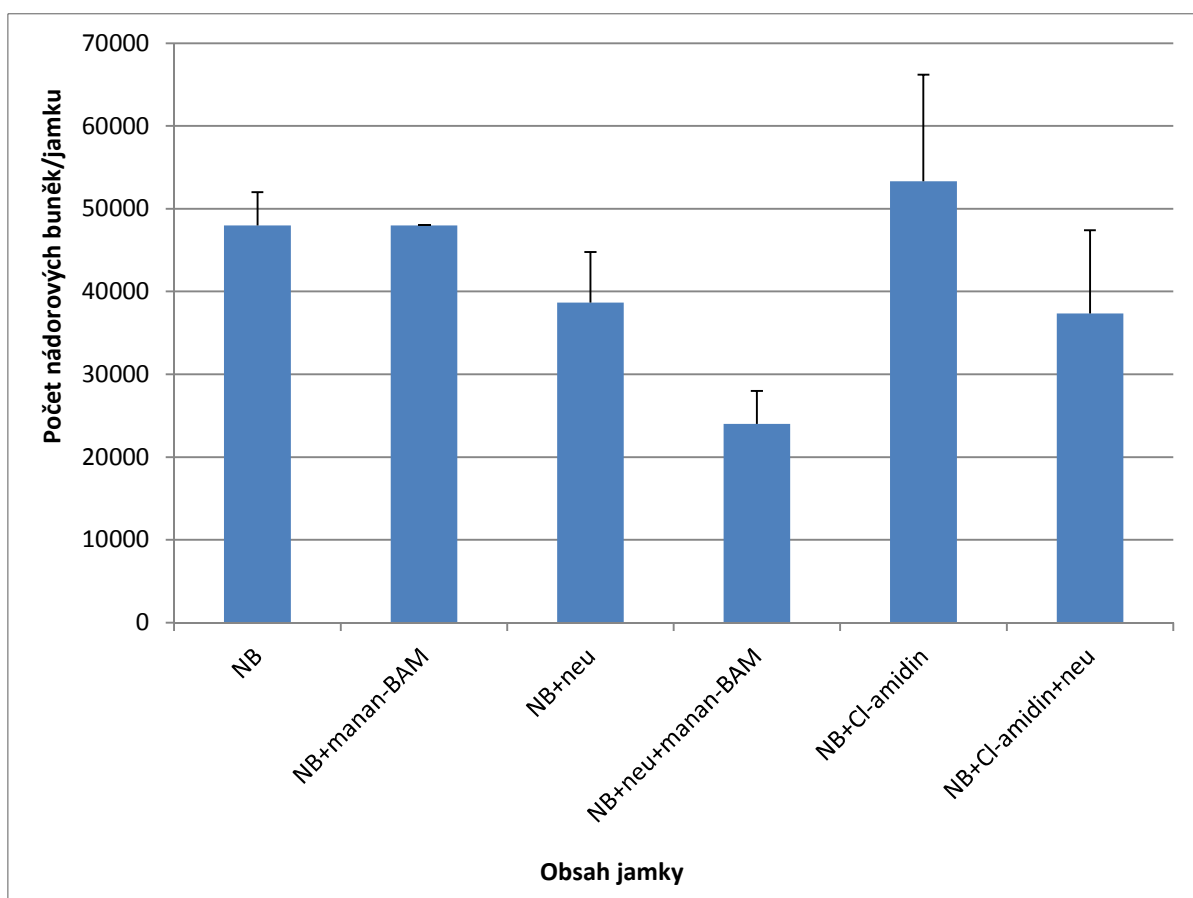
△  $P \leq 0,05$ , △△  $P \leq 0,005$ , △△△  $P \leq 0,0005$  vůči C (manan-BAM)

\*  $P \leq 0,005$ , \*\*  $P \leq 0,0005$  vůči K (PBS)

### 5.1.6 In vitro studium inhibice tvorby NETs. Vliv Cl-amidinu na cytotoxické působení neutrofilů s použitím různých množství buněk

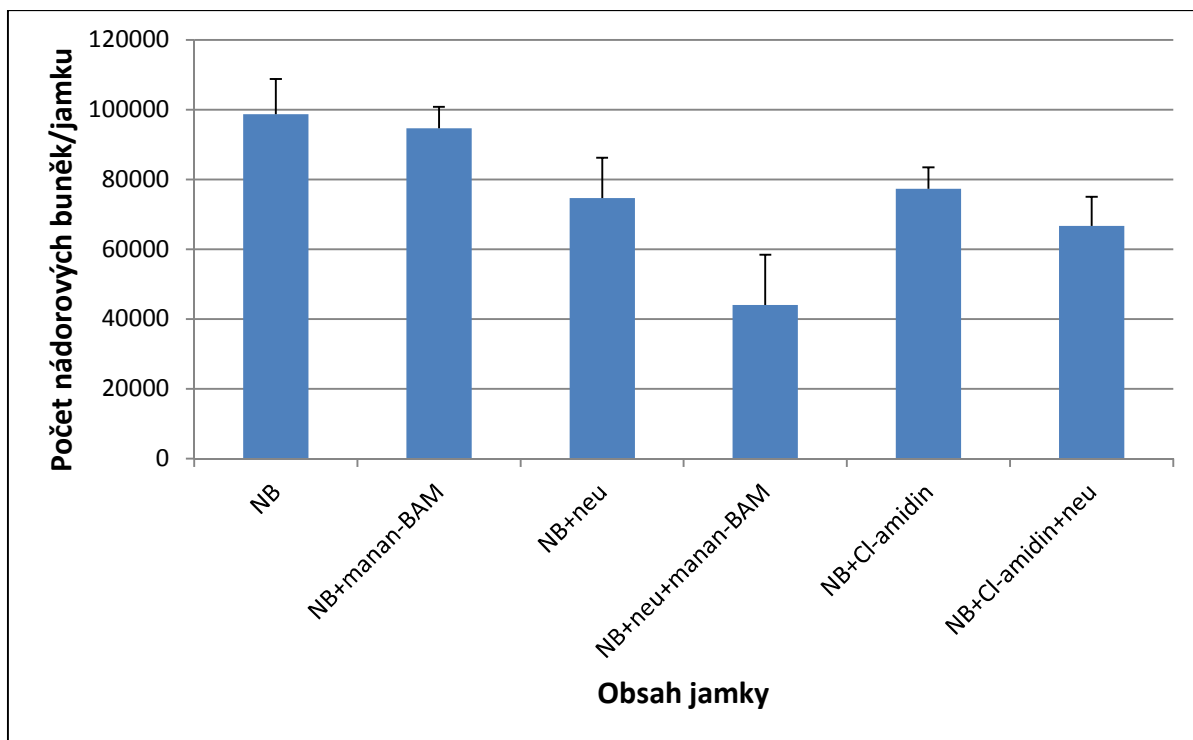
V následujících pokusech byla sledována role NETs v degradaci nádorových buněk. Ke zjištění vlivu NETs v nádorovém zabíjení byl použit inhibitor jejich tvorby Cl-amidin.

Na Obr. 21 je znázorněn průměrný počet nádorových buněk v jednotlivých jamkách v závislosti na obsahu jamky. Z grafu je patrné, že kotvení mananu na nádorové buňky se neprojeví cytotoxicky. Samotné neutrofilie vykazovaly jen malý vliv na počet nádorových buněk. V případě přítomnosti neutrofilů v kombinaci s ligandem manan-BAM došlo k 50% redukci počtu nádorových buněk. Samotný inhibitor Cl-amidin na nádorové buňky nepůsobil. Přidáním inhibitoru Cl-amidinu došlo k 55,5% redukci cytotoxicity, kterou vykazovaly neutrofilie vůči nádorovým buňkám nesoucím manan.



**Obr. 21: Průměrné množství nádorových buněk v jednotlivých jamkách v závislosti na experimentálních podmínkách.**

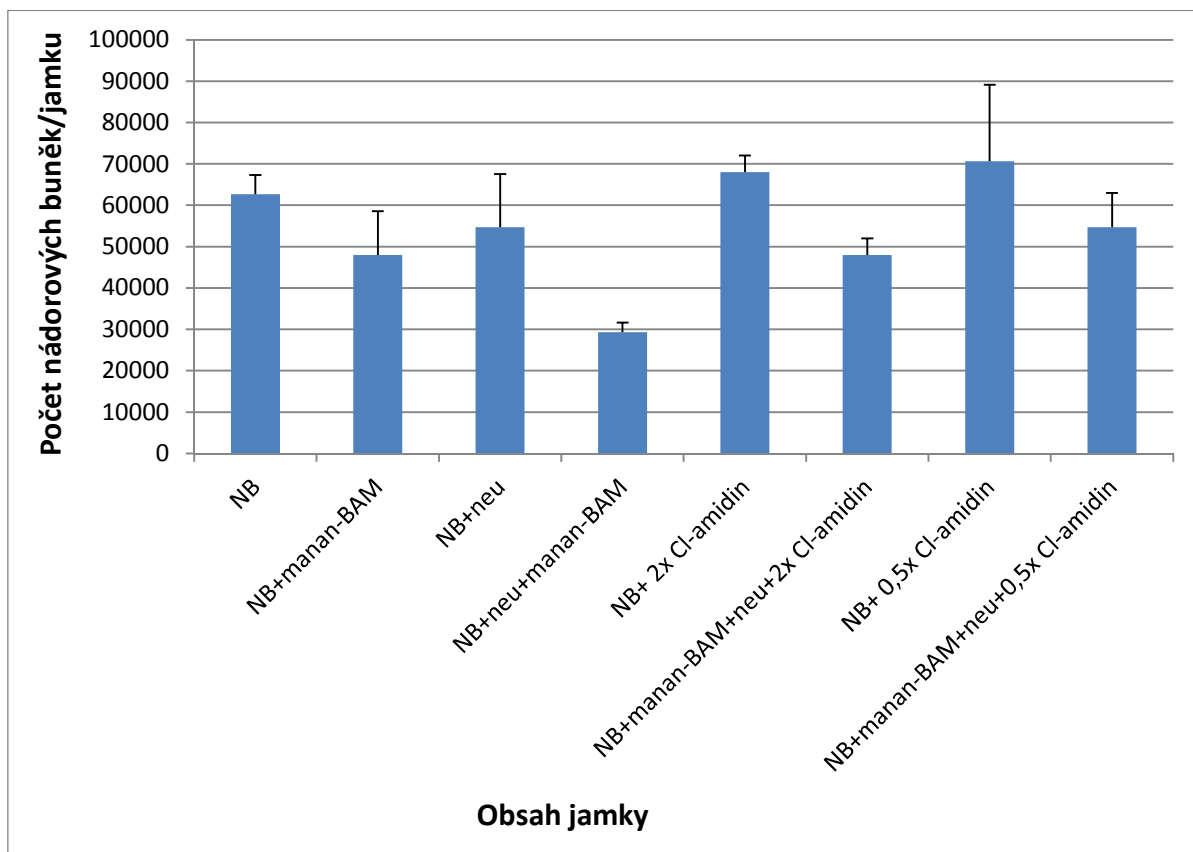
Na následujícím Obr. 22 je znázorněn vliv inhibitoru Cl-amidinu při dvojnásobném počtu nádorových buněk B16-F10 a neutrofilů. Byly dosaženy obdobné výsledky jako v předchozím experimentu. Neutrofilie způsobily při působení na nádorové buňky s mananem jejich 67,57 % redukci a Cl-amidin zmenšil tento cytotoxický efekt o 41,5 %.



Obr. 22: Průměrné množství nádorových buněk v jednotlivých jamkách v závislosti na experimentálních podmínkách. Dvojnásobné množství nádorových buněk a neutrofilů ve srovnání s Obr. 21.

### 5.1.7 In vitro inhibice tvorby NETs s použitím různých koncentrací Cl-amidinu, vliv na cytotoxické působení neutrofilů

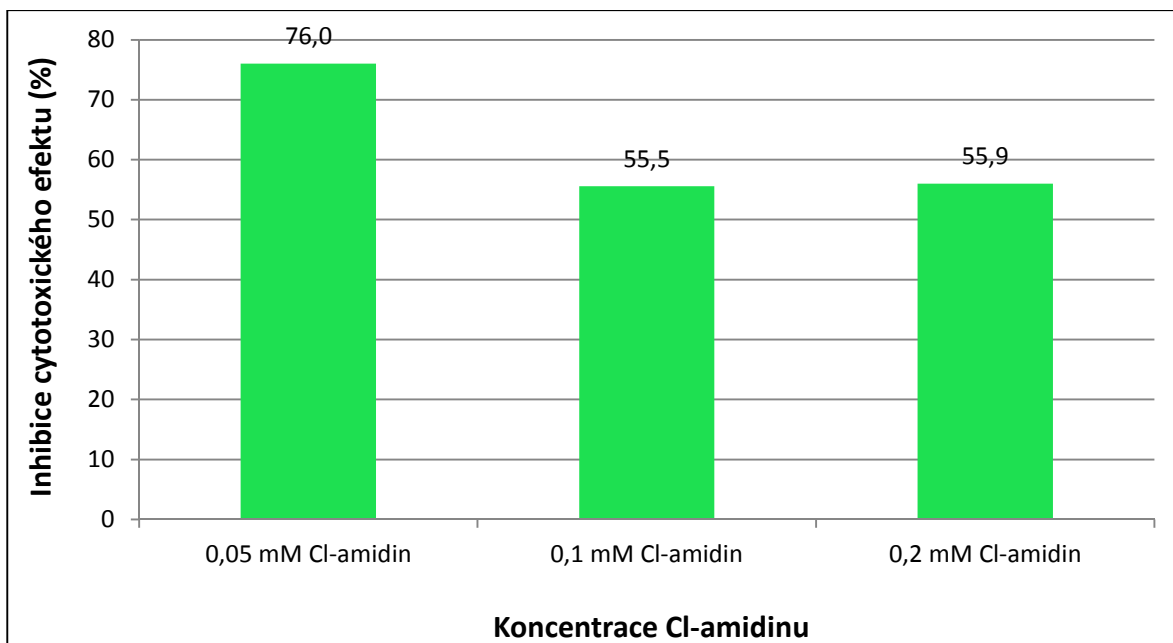
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda blokáce tvorby NET s pomocí různých koncentrací inhibitoru Cl-amidinu vede ke změně cytotoxické aktivity neutrofilů. Jak ukazuje Obr. 23, neutrofilové měly za následek 46,8% redukci počtu nádorových buněk, kdy poloviční koncentrace Cl-amidinu vyvolává 76% snížení cytotoxického efektu, zatímco při dvojnásobné koncentraci bylo dosaženo 56% inhibice cytotoxického efektu neutrofilů. Z těchto výsledků je zřejmé, že pro inhibici tvorby NETs jsou poloviční koncentrace dostačující.



**Obr. 23: Průměrné množství nádorových buněk v jednotlivých jamkách v závislosti obsahu jamky při dvojnásobné a poloviční koncentraci inhibitoru Cl-amidinu.**

Redukce cytotoxického efektu neutrofilů pro jednotlivé koncentrace Cl-amidinu je znázorněna na Obr. 24, který shrnuje výsledky tohoto experimentu a experimentu předchozího v základním provedení bez navýšení počtu buněk. Z grafu vyplývá, že nejvýraznější inhibice cytotoxického efektu neutrofilů nastala při použití poloviční koncentrace Cl-amidinu, kdy došlo ke zmenšení cytotoxického efektu neutrofilů o 76%. Můžeme tedy říci, že v tomto případě je tvorba NETs je zodpovědná, za 76% cytotoxicity neutrofilů.





**Obr. 24: Inhibice cytotoxického efektu neutrofilů v závislosti na použité koncentraci Cl-amidinu.**

## 6 Diskuze

V této práci byla řešena otázka náhrady LPS adekvátními agonisty TLR receptorů a jejich kombinace s fagocytárními motivy. Tento systém založený na TLR signalizaci ve formě rozpustných ligandů spojený s aktivací fagocytárních receptorů ve formě vázaných ligandů vychází z práce Underhill a Gantner (2004). Účinnost tohoto systému byla potvrzena v mnoha předchozích experimentech, vše bylo potvrzeno v práci Janotové a kol. (2014), kdy kombinace TLR a ligandů fagocytárních receptorů vedla k synergii, při které bylo dosaženo až 80% úplného vyléčení během 100 dnů v případě použití LPS a manan-BAM. Limitací účinné terapie pomocí LPS je použitelnost této molekuly z buněčné stěny gram negativních bakterií v případě terapie u lidí. Bylo prokázáno, že citlivost k LPS, konkrétně k zánětlivým cytokinům produkovaným makrofágy, je rozdílná u různých obratlovců. Za tuto toleranci jsou zodpovědné sérové proteiny přítomné u hlodavců, lidé jsou tak bez přítomnosti těchto proteinů 1000–10000 krát citlivější k LPS než myši (Warren a kol. 2010). Tato vysoká citlivost může u lidí vyvolat septický šok a smrt, letální dávka LPS se pohybuje mezi 1 až 2  $\mu\text{g}$  (Sauter a kol. 1980)

Z tohoto důvodu vzniká snaha nahradit LPS. V prvním pokusu byl pro tento účel využit chemicky příbuzný MPLA. MPLA se liší od LPS v nepřítomnosti oligosacharidového jádra, fosfátové skupiny a acylového řetězce. Udává se, že tato náhrada LPS je alespoň 100 krát méně toxická než LPS (Michaud a kol. 2013). Jeho bezpečnost při použití u lidí potvrzuje fakt, že byl FDA schválen jako součást několika vakcinačních přípravků, jako například vakcína Cervarix. V našem experimentu však nízká toxicita znamenala zřejmě i slabé hlavní účinky a MPLA zde nevykazoval téměř žádný vliv na inhibici nádorového růstu. Neuspokojivé výsledky přisuzujeme možné nedostatečné stimulaci prozánětlivých cytokinů potřebných mimo jiné k aktivaci endotelových buněk k produkci adhezivních molekul, umožňujících zánětlivou infiltraci. Tato domněnka se zdá být v souladu s Okemoto a kol. (2006), kdy nízká toxicita MPLA je připisována nedostatečné prozánětlivé aktivitě způsobené neefektivní aktivací kaspázy 1, která se podílí na maturaci několika prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1 $\beta$  a IL-18. Jeden z problémů jinak úspěšné terapie, náhrada LPS se tak tímto způsobem nepodařilo vyřešit.

Další problém představuje podání léčiva, místo injekční aplikace se hledají cesty cíleného směřování léčiva do místa terapeutického působení, tzv. targeting. Tato snaha tak byla cílem druhého pokusu, kdy bylo léčivo aplikováno perorální cestou ve formě SMEDDS.

Principem tohoto způsobu aplikace je za pomoci dalších pomocných látek vytvoření mikroemulze, obsahující léčivou látku. Z výsledku je však zřejmé, že tento způsob aplikace nesplnil naši představu o cílené aplikaci léčiva přímo do nádoru. Jelikož se jedná o zcela nový způsob podávání terapeutické látky, je těžké hledat příčiny neúspěchu. Dle naší hypotézy by měly být vzniklé mikročástice o velikosti 100 nm vstřebatelné přes Peyerovy pláty, odkud by se následně měly dostávat přes lymfu do krve. Vzhledem k tomu, že nádory se vyznačují přítomností děr, umožňující tak vstup částicím do velikost 600nm, vzniklé mikročástice s velikostí 100 nm by se tak bez problému dostaly do nádoru. Jako terapeutická látka byl použit vysoce funkční systém f-MLFKK-DOPE v kombinaci s LPS, kde ke kotvení fagocytárního motivu f-MLF je použito kotvidlo DOPE. Tento systém aplikovaný intratumorálně vykazoval výraznou redukci nádorového růstu (Caisová 2013). Podobných výsledků bylo dosaženo i za použití kotvení BAM v práci Vácové (2013). K přihlídnutí k těmto výsledkům lze usuzovat, že tímto transportním lékovým systémem zřejmě nebylo léčivo doručeno do místa působení. Vysvětlením by mohlo být, že tento systém je buďto nestabilní sám o sobě, nebo námi zvolené terapeutické látky byly s tímto systémem neslučitelné a mikročástice se rozpadaly.

Třetím pokusem pokračovalo hledání vhodné náhrady LPS. V tomto případě se jednalo o Resiquimod (R-848) agonistu TLR7/8 a jeho kombinaci s manan-BAM. Při použití této kombinace byla pozorována synergie, při které bylo dosaženo 74,7% průměrné redukce nádorového růstu, která byla navíc statisticky významná ( $P \leq 0,0005$ ). Aplikace R-848 bez kotveného mananu vykazovala 53,2% inhibici nádorového růstu, která se také ukázala být statisticky významná ( $P \leq 0,005$ ). Pozitivní účinek směsi manan-BAM+R-848 se projevil i v prodloužení přežití, kdy jedna myš přežila pozorovanou hranici 100 dnů.

Čtvrtý pokus sledoval vliv R-848 jako vhodné terapeutické látky v případě kotvení ligandu pomocí SMCC. Přidáním poly (I:C) agonisty TLR3 byl zjišťován jeho případný synergický efekt. Ukázalo se, že kovalentní kotvení mananu pomocí SMCC vykazuje rovněž terapeutický účinek, kdy byla zaznamenána 68,2% průměrná redukce nádorového růstu. Tento efekt byl zesílen synergickým působením poly (I:C) s průměrnou redukcí 82,3%. Stejně jako v předchozím případě bylo tyto redukce 14. den terapie statisticky významné ( $P \leq 0,0005$ ). Vzhledem k tomu, že TLR7/8 jsou primárně exprimovány na makrofázích stejně jako TLR3 v případě poly (I:C), lze předpokládat, že hlavní roli v místě nádoru sehrály právě makrofágy. Makrofágy pak produkcí cytokinů podporují aktivaci a migraci dalších buněk, především pak neutrofilů, do nádorového ložiska. Z hlediska délky přežití byla jak u skupiny

manan-SMCC + R-848.HCl, tak u skupiny s poly (I:C) prokázána delší doba přežití oproti kontrolní skupině, což v případě použití poly (I:C) bylo statisticky významné ( $P \leq 0,05$ ). V rámci sledování efektu terapie z dlouhodobého hlediska byla u myší, u kterých přesáhla délka přežití 120 dnů provedena retransplantace melanomových buněk. Toto se týkalo dvou myší z terapeutické skupiny manan-SMCC + R-848.HCl a jedné myši ze skupiny léčené směsí manan-SMCC + R-848.HCl + POLY (I:C). Nádory se znovu objevily pouze u skupiny, které byl aplikován manan-SMCC + R-848.HCl. Z těchto pozorování je patrné, že v retransplantaci se pozitivně projevila přítomnost právě POLY (I:C). Na základě jedné myši se nedá usuzovat, do jaké míry zde tato látka sehrála svou roli, nicméně stejné výsledky byly získány ve dvou dalších experimentálních skupinách s celkovým počtem 12 myší. I přes tyto závěry je však třeba se dále zabývat studiem poly (I:C) a provést řadu dalších experimentů.

V terapii dendritickými buňkami je využívána schopnost poly (I:C) indukovat zrání těchto buněk. Tato funkce byla zřejmě důvodem odolnosti před retransplantací v našem experimentu, kdy bylo podpořeno vyžívání klasických dendritických buněk (mDC) a antigenní prezentace získané imunitě vedoucí k aktivaci imunitní paměti. Z výsledků na obr. 18 je patrné, že obě tyto terapie vykazují progresivní pozitivní charakter, kdy nástup účinků terapie není tak rychlý ale s postupem terapie dochází k redukci a vyléčení nádorů, které je dlouhodobé. Naproti tomu terapie pomocí LPS vykazovala největší efekt v počátcích terapie a v případě neúspěšné léčby byly nádory v pokročilé fázi terapie neléčitelné. U všech TLR agonistů je popisována rezistence, kdy podávání terapeutické látky po delší dobu vyvolává neodpovídavost (Greisman a kol. 1975). Co se týká R-848, je dokonce popisována pětidenní pauza jako doba nutná k tomu, aby došlo ke znovuobnovení citlivosti (Bourquin a kol. 2011). Tomuto trendu jsme čelili aplikací terapeutické dávky v pulzním režimu ve dnech 0,1,2...8,9,10 a dosáhli jsme tak terapeutického efektu po celou dobu terapie. Kromě toho je známo (Bhardwaj a kol. 2011), že R-848 působí pozitivně na vyžívání plazmocytárních dendritických buněk (pDC), což se mohlo projevit vyšším zapojením získané imunity a delší dobou přežití.

V posledním in vivo pokusu jsme se pokoušeli zjistit jaká je role neutrofilů v nádorovém zabíjení. Pro tento účel byla použita protilátka proti Ly6G nacházejícím se na povrchu neutrofilů. Deplece Ly6G vede k depleci neutrofilů. Bylo však dosaženo pouze částečné inhibice. Důvodem mohla být velká molekulová váha protilátky, kdy protilátka o váze 150 000 neprodifundovala nádorem a nedošlo tak k úplné depleci. Další možností je, že neutrofilové nehrají v místě nádoru hlavní roli, jako v případě terapie pomocí LPS. V případě

LPS můžeme téměř s jistotou říct, že neutrofilů exprimují TLR4 receptor pro LPS (Gomes a kol. 2010), kdy vedle zánětlivé odpovědi dochází ke kostimulaci neutrofilů s produkcí prozánětlivých cytokinů a tak je zajištěna amplifikace imunitní odpovědi. R-848 je TLR7/8 agonistou, u myši však působí jen přes TLR7 receptor. Otázka exprese TLR 7 u neutrofilů se ukazuje jako sporná, zatímco někteří autoři jeho přítomnost popírají úplně (Janke a kol. 2009), někteří uvažují o jeho expresi na lidských neutrofilech (Hayashi a kol. 2003) případně myších neutrofilech (Wang a kol. 2008). Je tedy možné, že tato skutečnost se projevila i ve výsledném efektu a že tak neutrofilů nejsou hlavními a jedinými buňkami podílejícími se na výsledné cytotoxicitě.

V in vitro pokusech pak bylo dále studováno cytotoxické působení neutrofilů, konkrétně bylo sledováno, jakou roli v tomto procesu hraje tvorba neutrofilních extracelulárních sítí (NETs). Ke zjištění míry podílu tohoto způsobu zabíjení byl použit Cl- amidin, který působil inhibicí tvorby NETs. Jeden ze způsobů, jakým neutrofilů zabíjejí objekty větší, než jsou ony samy, je tvorba kapes, tzv. frustrovaná fagocytóza, při níž dochází k vyloučení obsahu neutrofilních granul do těchto kapes. Tento mechanismus byl pozorován (Vácová, ústní sdělení). Další z možností je již zmiňované uvolnění NETs. Tyto in vitro pokusy ukázaly na účast těchto struktur v rámci cytotoxického působení neutrofilů. Cl- amidin totiž způsobil inhibicí cytotoxického efektu neutrofilů, kdy s použitím inhibitoru o koncentraci 0,05 mM bylo dosaženo 76% inhibice cytotoxického efektu neutrofilů. Samotný Cl- amidin přitom nepůsobí cytotoxicky na nádorové buňky a neutrofilů, ale cytotoxický efekt snižuje, závěry jsou v korelaci s výsledky pozorovanými in vivo (Fáberová, ústní sdělení).

## 7 Závěr

- Pokus o náhradu LPS MPLA za účelem získání pro lidi netoxické a přitom stejně účinné alternativy se nezdařil.
- Perorální aplikace terapeutické látky pomocí SMEDDS se neosvědčila
- Byla prokázána účinnost léčby pomocí Resiquimodu (R-848) a směsi manan-BAM + R-848. Terapie vykazovala redukci nádorového růstu. R-848 se svými účinky přiblížil LPS a byl tak dále použit jako jeho náhrada
- Kotvení pomocí SMCC ve směsi s mananem a R-848 vedlo rovněž k redukci nádorového růstu a prodloužení přežití vůči kontrolní skupině. Při kombinaci této směsi s poly (I:C) byl pozorován synergický efekt vedoucí k výraznější redukci nádorového růstu se statisticky významným prodloužením délky přežití
- Vliv poly (I:C) se pozitivně projevil při retransplantaci nádorových buněk, kdy nedošlo k znovuobjevení nádorů.
- Protilátka proti Ly6G vedla pouze k částečné inhibici nádorové terapie založené na kombinaci R-848 a kotveného mananu, což ukazuje na omezený podíl neutrofilů
- V intro experimentech byla prokázána role NETs při cytotoxickém působení neutrofilů na nádorové buňky.

## 8 Seznam použité literatury

**Adam, J. K., Odhav, B., Bhoola, K. D.** 2003 *Immune responses in cancer*. Pharmacology & Therapeutics. 99: 113– 132

**Ammi, R., De Waele, J., Willemen, Y., Van Brussel, I., Schrijvers, D. M., Lion, E., Smits, E. L.** 2015 *Poly (I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs*. Pharmacology & Therapeutics.146: 120-31

**Belardelli, F., Ferrantini, M.** 2002 *Cytokines as a link between innate and adaptive anti-tumor immunity*. Trends in Immunology. 23: 201-8

**Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Bold, A. B., de Messias-Reason, I. J** 2015 *The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease*. Frontiers in Pediatric. 2:1-14

**Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abed, U. A., Kühn, L. I., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., Zychlinsky, A.** 2013 *A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoeediting*. Frontiers in Immunology 4: 1-5

**Bhardwaj, N., Gnjatic, S., Sawhney, N., B.** 2011 *Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants?* Cancer Journal. 16: 382-391

**Bicker, K. L., Anguish, L., Chumanevich, A. A., Cameron, M. D., Cui, X., Witalison, E., Subramanian, V., Zhang, X., Chumanevich, A. P., Hofseth, L. J., Coonrod, S. A., Thompson, P. R.** 2012 *D-amino acid based protein arginine deiminase inhibitors: Synthesis, pharmacokinetics, and in cellulo efficacy*. ACS Medicinal Chemistry Letters. 26: 1081-1085

**Borghaei, H., Smith, M. R., Campbell, K. S.** 2009 *Immunotherapy of cancer*. European Journal of Pharmacology. 625: 41-54

**Bourquin, C., Hotz, C., Noerenberg, D., Voelkl, A., Heidegger, S., Roetzer, L., Storch, B., Sandholzer, N., Wurzenberger, C., Anz, D., Endres, S.** 2011 *Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of Toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance.* Cancer Research. 71: 5123–33.

**Brandau, S., Dumitru, C. A., Lang, S.** 2013 *Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes.* Seminars in Immunopathology.35: 163-76

**Caisová, V.** 2013 *Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění.* České Budějovice, diplomová práce PřF JU. 74 s.

**Cools-Lartigue, J., Spicer, J., Najmeh, S., Ferri, L.** 2014 *Neutrophil extracellular traps in cancer progression.* Cellular and Molecular Life Sciences .71: 4179-94

**Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomares, L., Amorena, B., de Andrés, D. F.** 2011 *Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection.* Veterinary Research. 42:1-10

**Czerkies, M., Kwiatkowska, K.** 2014 *Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide.* Advances in Cell Biology. 4: 1–24.

**Deng, S., Zhu, S., Qiao, Y., Liu, Y. J., Chen, W., Zhao, G., Chen, J.** 2014 *Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma.* Protein & Cell 5: 899-911

**Disis, M. L.** 2014 *Mechanism of Action of Immunotherapy.* Seminars in Oncology. 41: S3-13

**Doughty, L.** 2011 *Pathogen Associated Molecular Patterns, Pattern Recognition Receptors and Pediatric Sepsis.* The Open Inflammation Journal. 4: 31-48



**Dusek, L., Muzik, J., Maluskova, D., Májek, O., Pavlík, T., Koptíková, J., Melichar, B., Büchler, T., Fínek, J., Cibula, D., Babjuk, M., Svoboda, M., Vyzula, R., Ryska, A., Ryska, M., Petera, J., Abrahámová, J.** 2014 *Cancer incidence and mortality in the Czech Republic*. *Klinická onkologie*. 27: 406-23.

**Fearon, E. R., Vogelstein, B.** 1990 *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*. 61:759-67.

**Galli, R., Starace, D., Busà, R., Angelini, D. F., Paone, A., De Cesaris, P., Filippini, A., Sette, C., Battistini, L., Ziparo, E., Riccioli, A.** 2010 *TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types*. *The Journal of Immunology*. 184: 6658-69

**Gelmann, E. P., Sawyers, C. L., Rauscher, F. J.** 2014 *Molecular oncology: causes of cancer and targets for treatment*. United Kingdom: Cambridge University Press. 979 s.

**Gomes, N. E., Brunialti, M. K., Mendes, M.E., Freudenberg, M., Galanos, C., Salomão, R.** 2010 *Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43: 853-8.

**Granado-Serrano, A. B., Martin, M. A., Haegeman, G., Goya, L., Bravo, L., Ramos, S.** 2010 *Epicatechin induces NF- $\kappa$ B, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells*. *British Journal of Nutrition*. 103: 168-179

**Greisman, S., Young, E., Workman, J., Ollodart, R. & Hornick, R.** 1975 *Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen*. *The Journal of Clinical Investigation*, 56, 1597-1607

**Hanahan, D., Weinberg, R. A.** 2011 *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. 144: 646-74.

**Hayashi, F., Means, T. K., Luster, A. D.** 2003 *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function.* Blood.102: 2660-9

**He, X., Bonaparte, N., Kim, S., Acharya, B., Lee, J. Y., Chi, L., Lee, H. J., Paik, Y. K., Moon, P. G., Baek, M. C., Lee, E. K., Kim, J. H., Kim, I. S., Lee, B. H.** 2012 *Enhanced delivery of T cells to tumor after chemotherapy using membrane-anchored, apoptosis-targeted peptide.* Journal of Controlled Release. 162: 521-8

**Herlyn, M., Fukunaga-Kalabis, M.** 2010 *What Is a Good Model for Melanoma?* Journal of Investigative Dermatology. 130: 911–912.

**Hickey, M. J.** 2012 *Has Ly6G finally found a job?* Blood. 120: 1352-3

**Holldack, J.** 2014 *Toll-like receptors as therapeutic targets for cancer.* Drug Discovery Today. 19: 379-82.

**Chen, D. S., Mellman, I.** 2013 *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle.* Immunity. 39:1-10

**Cheng, Y. S., Xu, F.** 2010 *Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid.* Cancer Biology & Therapy.10: 1219-23

**Christiaansen, J. F., Gallardo, D., Burnside, S. S., Nelson, A. A., Sears, D. W.** 1984 *Rapid covalent coupling of proteins to cell surfaces: Immunological characterization of viable protein-cell conjugates.* Journal of Immunological Methods. 74: 229-39.

**Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T., Fujimoto, S., Sakurai, Y., Maruo, K., Ohnishi, Y., Ueyama, Y., Nomura, T.** 1986 *Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse.* Japanese Journal of Cancer Research. 77: 190-6.

**Ip ,W. K., Takahashi, K., Ezekowitz, R. A., Stuart, L. M. 2009** *Mannose-binding lectin and innate immunity*. Immunological Reviews. 230: 9-21

**Jakóbišiak, M., Lasek,W., Gołab, J. 2003** *Natural mechanisms protecting against cancer*. Immunology Letters. 90: 103-22.

**Janke, M., Poth, J., Wimmenauer, V., Giese, T., Coch, C., Barchet, W., Schlee, M., Hartmann, G. 2009** *Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 123: 1026-33

**Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., Ženka, J. 2014.** *The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model*. PLoS ONE, 9:1-14

**Kaczanowska, S., Joseph, A. M., Davila, E. 2013** *TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy*. Journal of Leukocyte Biology. 93: 847-63

**Kaczorowski, D. J., Afrazi, A., Scott, M. J., Kwak, J. H., Gill,R., Edmonds, R. D., Liu,Y., Fan, J., Billiar, T.R. 2010** *Pivotal Advance: The pattern recognition receptor ligands lipopolysaccharide and polyinosine-polycytidylic acid stimulate factor B synthesis by the macrophage through distinct but overlapping mechanisms*. Journal of Leukocyte Biology. 88:609-618.

**Kalepu, S., Manthina, M., Padavala, V. 2013** *Oral lipid-based drug delivery systems – an overview*. Acta Pharmaceutica Sinica B. 3: 361-372

**Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., Coffman, R. L. 2007** *Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists*. 13: 552-9

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

**Kaufman, H. L.** 2015 *Precision Immunology: The Promise of Immunotherapy for the Treatment of Cancer.* Journal of Clinical Oncology. 33: 1- 5

**Knowles, M. A., Selby, P. J.** 2005 *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer.* Fourth Edition. New York: Oxford University Press. 532 s.

**Kolaczkowska, E., Kubes, P.** 2013 *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.* Nature Reviews Immunology. 13: 159-75

**Lee, P. Y., Wang, J. X., Parisini, E., Dascher, C. C., Nigrovic, P. A.** 2013 *Ly6 family proteins in neutrophil biology.* Journal of Leukocyte Biology. 94: :585-94

**Li, P., Yao, H., Zhang, Z., Li, M., Luo, Y., Thompson, P. R., Gilmou,r D. S., Wang, Y.** 2008 *Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4.* Molecular and Cellular Biology. 28: 4745–4758

**Maruyama, K., Selmani, Z., Ishii, H., Yamaguchi, K.** 2011 *Innate immunity and cancer therapy.* International Immunopharmacology. 11: 350-7

**Michaud, J. P., Hallé, M., Lampron, A., Thériault, P., Préfontaine, P., Filali, M., Tribout-Jover, P., Lanteigne, A. M., Jodoin, R., Cluff, C., Brichard, V., Palmantier, R., Pilorget, A., Larocque, D., Rivest, S.** 2013 *Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.110: 1941-6

**Negi, L. M., Tariq, M., Talegaonkar, S.** 2013 *Nano scale self-emulsifying oil based carrier system for improved oral bioavailability of camptothecin derivative by P-Glycoprotein modulation.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 111: 346– 353

**Nogueras, S., Merino, A., Ojeda, R., Carracedo, J., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., Ramírez, R., Aljama, P.** 2008 *Coupling of endothelial injury and repair: an analysis using an in vivo experimental model.* American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology. 294: :H708-13

**Nowarski, R., Gagliani, N., Huber, S., Flavell, R. A.** 2013 *Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer.* Cancer Immunology Research. 2: 77-84

**O'Brien, N., Jones, S. T., Williams, D. G., Cunningham, H. B., Moreno, K., Visentin, B., Gentile A, Vekich J, Shestowsky W, Hiraiwa, M., Matteo, R., Cavalli, A., Grotjahn, D., Grant, M., Hansen, G., Campbell, M. A., Sabbadini, R.** 2009 *Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies.* Journal of Lipid Research. 50: 2245-57

**Odajima, T., Onishi, M., Hayama, E., Motoji, N., Momose, Y., Shigematsu, A.** 1996 *Cytolysis of B-16 melanoma tumor cells mediated by the myeloperoxidase and lactoperoxidase systems.* Biological chemistry. 377: 689-93.

**Okemoto, K., Kawasaki, K., Hanada, K., Miura, M., Nishijima, M.** 2006 *A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1.* Journal of Immunology.176:1203-8

**Overwijk, W. W., Restifo, N. P.** 2001 *B16 as a mouse model for human melanoma.* Current protocols in immunology. 39: 20.1.1–20.1.29

**Petrovsky, N., Cooper, P. D.** 2011 *Carbohydrate-based immune adjuvants.* Expert Review of Vaccines.10: 523-37

**Piccard, H., Muschel, R. J., Opdenakker, G.** 2012 *On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression.* Critical Reviews in Oncology/Hematology. 82: 296-309

**Pietras, K., Ostman, A.** 2010 *Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma.* Experimental Cell Research. 316: 1324-31.

**Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., Sharma, P.** 2014 *Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2014 SITC primer.* Journal for Immunotherapy of Cancer. 2: 1-14

**Rini, B.** 2014 *Future approaches in immunotherapy.* Seminars in Oncology. 41: S30-40

**Romagne, F.** 2007 *Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors.* Drug Discovery Today. 12: 80-7

**Saied, A., Pillarisetty, V. G., Katz, S. C.** 2014 *Immunotherapy for solid tumors - a review for surgeons.* The Journal of Surgical Research. 187: 525-35

**Sauter, C., Wolfensberger, C.** 1980 *Interferon in human serum after injection of endotoxin.* The Lancet. 2: 852-3.

**Seilerová, L., Sieberová, V., Kratochvíl, B., Vetchý, D.** 2014 *Využití Samoemulgujících systémů pro zlepšení rozpustnosti a biodostupnosti léčiv.* Chemické listy. 108: 956-960

**Smits, E. L., Ponsaerts, P., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F.** 2008 *The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy.* The Oncologist.13: 859-75

**Snook, A. E., Waldman, S. A.** 2013 *Advances in cancer immunotherapy.* Discovery Medicine.15: 120-5

**Springett, G. M.** 2014 *Novel pancreatic cancer vaccines could unleash the army within.* Cancer control: Journal of the Moffitt Cancer Center. 21: 242-6.

**Steer, H. J., Lake, R. A., Nowak, A. K., Robinson, B. W.** 2010 *Harnessing the immune response to treat cancer.* Oncogene. 29: 6301-13

**Swann, J. B., Smyth, M. J.** 2007 *Immune surveillance of tumors*. The Journal of Clinical Investigation.117: 1137-46

**Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., Norelli, F., Bellucci, C., Polonelli, L., Costantino, P., Rappuoli, R., Cassone, A.** 2005 *A novel glyco- conjugate vaccine against fungal pathogens*. The Journal of Experimental Medicine. 202: 597-606.

**Toussi, D. N., Massari, P.** 2014 *Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands*. Vaccines.2: 323-353

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

**Urban, C. F., Lourido, S., Zychlinsky, A.** 2006 *How do microbes evade neutrophil killing?* Cellular Microbiology.8: 1687-96

**Van der Vaart, M., Spalink, H. P., Meijer, A. H.** 2012 *Pathogen Recognition and Activation of the Innate Immune Response in Zebrafish*. Advances in Hematology. 2012, 1-19

**Vácová, N.** 2013 *Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii*. České Budějovice, bakalářská práce PřF JU. 54 s.

**Veselý, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., Smyth, M. J.** 2011 *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annual Review of Immunology.29: 235-71.

**Větvička, V., Dvořák, B., Větvičková, J., Richter, J., Křížan, J., Šíma, P., Yvin, J. C.** 2007: *Orally administered marine (1 →3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity*. International Journal of Biological Macromolecules. 40: 291–8.

**Wang, J.P., Bowen, G.N., Padden, C., Cerny, A., Finberg, R.W., Newburger, P.E., Kurt-Jones, E.A.** 2008 *Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus*. *Blood*. 112: 2028-34

**Warshawsky, D., Landolph, J. R.** 2006 *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer*. Boca Raton: Taylor & Francis Inc. 592 s.

**Wexler, P.** 2014 *Encyclopedia of Toxicology*. 3rd edition. New York: Academic Press. 5220 s.

**Yadav, S. K., Srivastava, S.** 2014 *Recent Advancement in Cancer Treatment*. *European Journal of Applied Sciences*. 6: 37-44

**Zawrotniak, M., Rapala-Kozik, M.** 2013 *Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications*. *Acta Biochimica Polonica*. 60: 277-84

**Zhao, X., Liu, L., Hegazy, A. M., Wang, H., Li, J., Zheng, F., Zhou, Y., Wang, W., Li, J., Liu, X., Lin, L.** 2015 *Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca (2+)-dependent manner*. *Fish & Shellfish Immunology*. 43: 357-63

**Zhou, Z. X., Sun, L.** 2015 *Immune effects of R848: evidences that suggest an essential role of TLR7/8-induced, Myd88- and NF- $\kappa$ B-dependent signaling in the antiviral immunity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)*. *Developmental and Comparative Immunology*. 49:113-20

**Zhu, Q., Egelston, C., Gagnon, S., Sui, Y., Belyakov, I. M., Klinman, D. M., Berzofsky, J. A.** 2010 *Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice*. *The Journal of Clinical Investigation*. 120: 607-16