

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**OVĚŘENÍ MOŽNOSTI TERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ  
POMOCÍ INSTALACE MANANU NA POVRCH NÁDOROVÝCH BUNĚK**

Bakalářská práce

**Pavλίna Bruzlová**

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Bruzlová, P., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk. [Verification of the possibility of cancer therapy by installation of mannan on the surface of tumor cells. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE:

The aim of this thesis was to verify the therapeutic effect of mannan derived from *Saccharomyces cerevisiae* on murine melanoma. We found out that mannan must be anchored with BAM on the surface of tumor cells to reduce the size of tumor. Even better results were obtained using mannan-BAM in combination with LPS and LTA.

PROHLÁŠENÍ:

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 20. 4. 2012

.....  
Bruzlová Pavlína

#### PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za pomoc při zpracování, korigování mé bakalářské práce a za jeho velmi cenné rady a připomínky. Mé velké díky patří také rodině, která mě velice podporovala a vytvořila mi potřebné zázemí pro studium.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Rakovina a její vznik .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Faktory vzniku nádorů.....	2
1.1.2 Klasifikace nádorů.....	2
1.1.3 Výskyt nádorů.....	3
<b>1.2 Melanom .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Klinická diagnóza melanomu.....	5
1.2.2 Typy melanomů .....	5
1.2.3 Zhoubný melanom u myši .....	6
<b>1.3 Způsoby terapie nádorových onemocnění.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Operativní odstranění nádoru.....	7
1.3.2 Radioterapie .....	7
1.3.3 Chemoterapie.....	8
1.3.4 Biologická terapie .....	8
<b>1.4 Imunologie nádorů.....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Způsoby úniku nádorů před imunitou.....	10
1.4.1.1 Produkce imunosupresivních látek.....	10
1.4.1.2 Jiné mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem.....	10
<b>1.5 Vrozená imunita .....</b>	<b>11</b>
1.5.1 Buněční činitelé vrozené imunity.....	11
1.5.1.1 Polymorfonukleáry (granulocyty).....	11
1.5.1.2 Dendritické buňky (DC).....	12
1.5.1.3 Makrofágy.....	12
1.5.1.4 NK buňky.....	13
1.5.2 Komplement.....	13
1.5.3 Jak vrozená imunita rozpoznává přítomnost patogenů?.....	14
1.5.4 Rakovina a vrozená imunita.....	15
<b>1.6 Potenciální využití mananu v terapii nádorů .....</b>	<b>16</b>
1.6.1 Manan a jeho receptory .....	16
1.6.1.1 Manan .....	16
1.6.1.2 MBL.....	17
1.6.1.3 MR.....	18
<b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>19</b>

<b>3. POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>20</b>
3.1 Seznam chemikálií .....	20
3.2 Laboratorní zvířata a buněčné linie .....	20
3.3 Příprava buněk melanomu B16-F10.....	20
3.4 Transplantace melanomových buněk .....	21
3.5 Měření velikosti nádorů.....	21
3.6 Měření teploty nádoru .....	21
3.7 Stanovení počtu metastáz .....	21
3.8 Statistika .....	22
3.9 Příprava látek používaných k léčbě.....	22
3.10 Pokus 1: Melanom B16-F10 a jeho ovlivnění aplikací mananu .....	22
3.11 Pokus 2: Melanom B16-F10 a jeho ovlivnění aplikací manan-BAM .....	23
3.12 Pokus 3: Melanom B16-F10 a jeho ovlivnění aplikací manan-BAM v různých kombinacích.....	23
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>25</b>
4.1 Pokus 1: Melanom B16-F10 a jeho ovlivnění aplikací mananu .....	25
4.2 Pokus 2: Melanom B16-F10 a jeho ovlivnění aplikací manan-BAM .....	27
4.3 Pokus 3: Melanom B16-F10 a jeho ovlivnění aplikací manan-BAM v různých kombinacích.....	30
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>33</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>34</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>35</b>

# 1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejčastějších a nejzávažnějších onemocnění na celém světě vůbec. Počet případů stále roste, což je dáno hlavně tím, že se u lidí prodlužuje délka života. Nezanedbatelným vlivem je i zhoršování životního stylu a životního prostředí. Imunitní systém hraje velmi důležitou roli při léčbě nádorů, tedy při imunoterapii. Snaha vědeckých pracovníků vedla v posledních letech k časnější diagnostice nemoci a lepší terapeutické léčbě, ale bohužel ne k úplnému vyléčení.

## 1.1 RAKOVINA A JEJÍ VZNIK

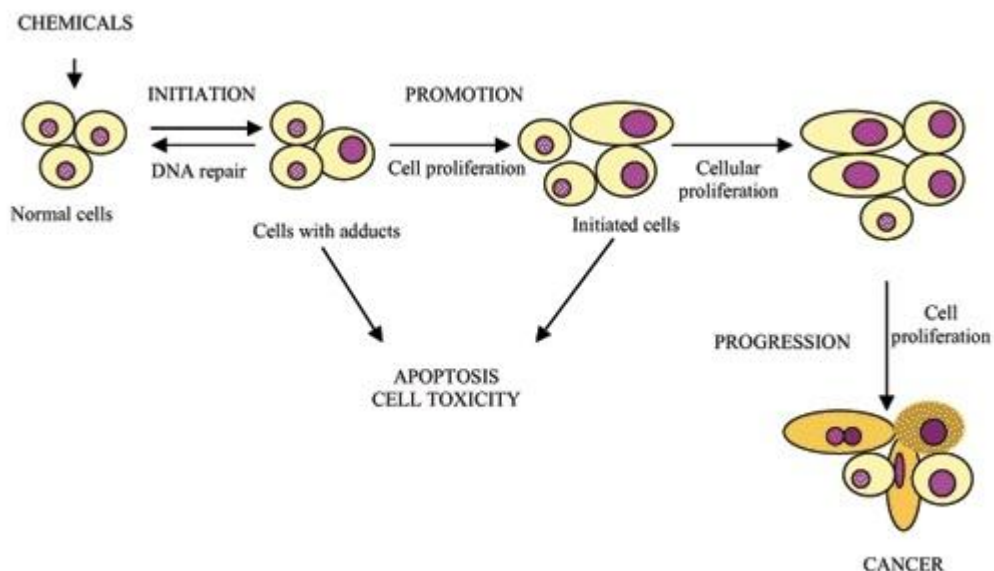
Pro nádorové buňky je charakteristický abnormální růst a obcházení mechanismu regulace růstu, což u normálních buněk nenajdeme. Také se vyhýbají apoptóze, též zvané jako programovaná buněčná smrt (Franks a Teich 1999).

Kancerogeneze je několikastupňový proces, při kterém vznikají nádory (nazývané také jako tumory, novotvary, neoplazma). Obecně dochází ke hromadění poruch určitých genů, které vedou k poškození funkce bílkovin uplatňujících se při regulaci dělení buňky a zachování stability genomu. Znázornění tohoto procesu nám ukazuje Obr. 1.

První fáze je označovaná jako fáze iniciační (vyvolání), což je vcelku rychlé a krátké časové období. Dochází k metabolické aktivaci látek (karcinogenů), které vyvolávají rakovinné bujení, a tedy poškozují nějaký gen. Pokud buňka neopraví tento zmutovaný gen, tak zahyne nebo se stane prekancerogenem.

Druhá fáze se nazývá promoční, je oproti první fázi velmi zdlouhavá, trvá léta až desetiletí. Dochází při ní ke stimulaci postižené buňky a k její proliferaci. Dělení iniciovaných buněk je podporováno promočními faktory, které ovlivňují genovou expresi. Působení těchto faktorů je nevratné. Uplatňují se samozřejmě ještě další látky (podpůrné faktory) v buňce, které mohou proces zpomalit, nebo dokonce i zastavit (Miccozzi 2007, Franks a Teich 1999).

Progrese (růst) je třetí a konečnou fází kancerogeneze. Benigní léze jsou transformovány do maligních. Tato fáze je charakterizována rychlejším růstem, invazivitou a metastazováním. Dochází také k metabolickým, biochemickým a morfologickým změnám buněk (Oliveira a kol. 2007).



Obr. 1: Jednotlivé fáze a procesy kancerogeneze (Oliveira a kol. 2007).

### 1.1.1 FAKTORY VZNIKU NÁDORŮ

Existuje celá řada příčin vzniku nádorů. Jinými slovy lze říci, že známe celou řadu kancerogenních faktorů, které mají fyzikální, chemický nebo biologický charakter (Pacovský 1993). Mezi fyzikální činitele můžeme zahrnout hlavně rentgenové záření, ionizující záření a obzvláště UV záření, které ve značné míře způsobuje hlavně nádory kůže – melanomy. Potom obrovské množství chemikálií, ať už přírodních nebo syntetických, se dají považovat za chemické kancerogeny. Příkladem je dehet, aromatické uhlovodíky (benzen), vinylchlorid (používaný k výrobě umělých hmot), aflatoxin (produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus*), cigaretový kouř nebo například alkohol, který zvyšuje riziko vzniku karcinomu jater. Mezi biologické činitele řadíme hlavně viry. Například EB-virus (virus Epstein-Baar), který způsobuje vznik Burkittova lymfomu v Africe, nebo papilomaviry, u kterých byl prokázán vliv na vznik karcinomu děložního čípku (Mačák a Mačáková 2004, Pacovský 1993).

Dalších příčin vzniku nádoru je nepřeberné množství. Můžeme sem zařadit například věk, dědičnost nebo hormonální vliv. Nádory se vyskytují u všech věkových kategorií, ale se zvyšujícím se věkem se zvyšuje i riziko vzniku nádorů (Mačák a Mačáková 2004).

### 1.1.2 KLASIFIKACE NÁDORŮ

Nádory můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na nádory benigní a maligní (čili nezhoubné a zhoubné). Pro nezhoubné nádory je typický ohraničený růst v jakékoliv tkáni,

nemetastazují a svým růstem omezují a tlačí na okolní tkáň. Mohou se však také maligně zvrhnout. Oproti tomu zhoubné tumory pronikají invazivně do okolních tkání a rozrušují jejich integritu. Dalším velmi charakteristickým rysem je metastazování – neboli vznik druhotných ložisek (v lymfatických uzlinách nebo vzdálených orgánech). Nádory (jejich buňky) produkují bílkoviny, které zajišťují zabudování krevních kapilár do nádoru, a tím tedy i jeho vyživování. (Franks a Teich 1999, Pacovský 1993)

Dalším z typů klasifikace je dělení novotvarů podle toho, z jaké tkáně byly vytvořeny. Z histologického hlediska se dělí na nádory (Šafránková a Nejedlá 2006):

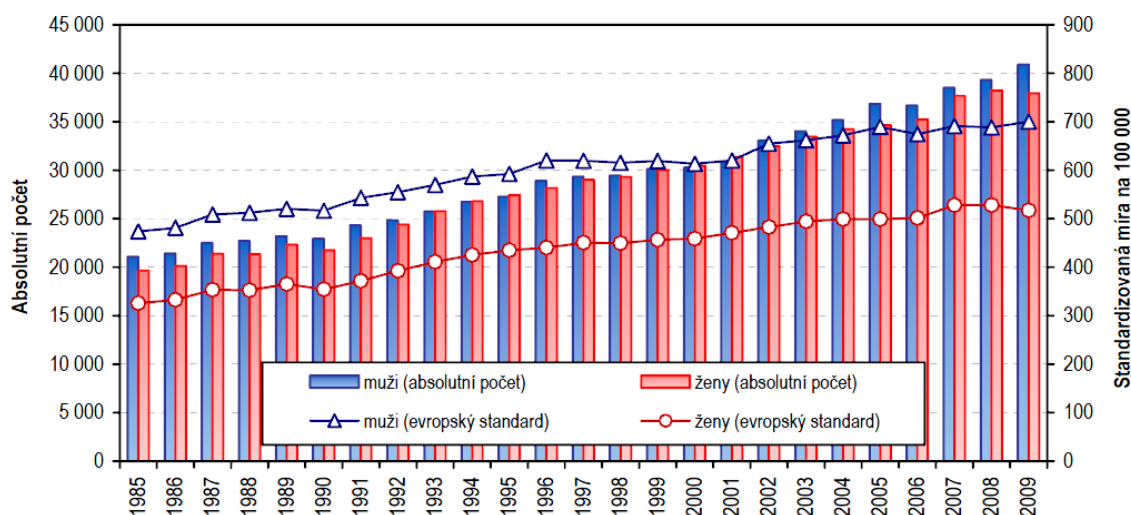
- mezenchymové (neboli pocházející z chrupavky, vaziva, svalů, kostí, tukové tkáně)
  - nezhoubné: fibrom, lipom, chondrom, angiom, myom, osteom
  - zhoubné: sarkomy (fibrosarkom, liposarkom, chondrosarkom, angiosarkom, myosarkom, osteosarkom)
- epitelové (neboli pocházející z krycí nebo výstelkové tkáně a jejich žláz)
  - nezhoubné: papilom, adenom
  - zhoubné: karcinomy (papilokarcinomy, adenokarcinomy)
- neuroektodermové (neboli pocházející z centrální nervové soustavy a kůže)
  - nezhoubné: gliom (CNS), meningeom (CNS), pigmentový névus (kůže)
  - zhoubné: glioblastom (CNS), neuroblastom (CNS), melanom (kůže)
- hematopoetické (neboli pocházející z krvetvorné kostní tkáně)
  - zhoubné – leukemie, lymfom
- smíšené (neboli pocházející ze dvou nebo více různých tkání)
  - nezhoubné: teratomy
- mezoteliomy (nádory zhoubné i nezhoubné pocházející z pleury, peritonea a perikardu)
- choriokarcinomy (zhoubné nádory trofoblastu pocházejí z dělohy)

### 1.1.3 VÝSKYT NÁDORŮ

Nádory se mohou objevit ve všech tkáních těla, jak u mužů, tak u žen, a v podstatě v kterémkoliv věku. Nejčastěji se nádory vyskytují u lidí nad 60 let a častěji (asi o 4 %) jsou nacházeny u mužů. Statistické výsledky v České Republice ukazují, že v roce 2009 bylo zjištěno skoro 79000 nových případů zhoubných nádorů. To, že výskyt nádorů v České Republice má stoupavou tendenci, naznačuje i Obr. 2. Naproti tomu bylo také zjištěno, že



statisticky poklesl počet úmrtí. Mezi nejčastější tumory v roce 2009 patřily nádory močového měchýře, ledvin, pohlavních orgánů a kožní melanom (Srb 2012).



Obr. 2: Vývoj počtu nových případů zhoubných nádorů u žen i mužů v letech 1985 – 2009 (Srb 2012).

## 1.2 MELANOM

Zhoubný nádor melanom patří mezi neuroektodermové nádory. Vzniká maligní transformací z melanocytů (pigmentové buňky), které produkují svými cytoplasmatickými organelami (melanosomy) pigment melanin. Většinou melanom vzniká jako nový útvar na kůži (66%), ale stává se, že se maligně zvrhne již existující pigmentový névus (33 %). Melanocyty se vyskytují po celém povrchu kůže. Avšak melanom nejčastěji vzniká na hlavě, krku a končetinách, kvůli častému vystavování těchto částí těla slunečnímu záření (UV-B 290 – 320nm). Je také známé, že se tento nádor může objevit v oku (v duhovce), v mozku (v měkkých plénách mozkových) a zřídka na sliznici nosu, jícnu, vaginy a rekta (Mačák a Mačáková 2004, Fikrle a Pizinger 2010).

Počet osob postižených tímto nádorem se stále zvyšuje hlavně u bělochů a lidí, kteří pracují venku. Incidence se naopak snižuje s rostoucí zeměpisnou šířkou, kde ve vyšších zeměpisných šířkách je spíše UV-A záření než UV-B záření. UV-A záření (321 – 420nm) nezpůsobuje poškození kůže a je vhodné pro tvorbu vitamínu A a D (Godar 2011).

Mezi činitele způsobující vznik melanomu řadíme 2 hlavní rizikové faktory. Je to především již výše zmíněné ultrafialové záření a genetický vliv. Genetika ovlivňuje zejména typ pleti, vznik mateřských znamének, vznik atypických névů a jejich počet. K vyšší

pravděpodobnosti výskytu melanomu přispívá i přítomnost nádoru v rodině a imunosuprese, neboli porucha funkce imunitního systému (Fikrle a Pizinger 2010, Stockfleth 2010).

U některých lidí postižených melanomem byly také objevené mutace DNA v chromozomech. Nejčastější a nejprozkoumanější abnormalitou je mutace u chromozomu 9 (9p21 delece). Dojde tak k postižení genu, který kóduje regulační proteiny, které se uplatňují při buněčném cyklu (Fikrle a Pizinger 2010).

### 1.2.1 KLINICKÁ DIAGNÓZA MELANOMU

Pokud se ložisko melanomu včas identifikuje a odstraní, pak je největší šance na vyléčení, protože nádor nestihne metastazovat do jiné části těla. Kožní melanom se diagnostikuje podle tzv. „ABCDE“ pravidel – neboli podle 5 kritérií vzhledu ložiska.

- A (asymmetry) – tvar maligního nádoru bývá velmi nesymetrický, a tím jak se ložisko nádoru zvětšuje, tak se zvýrazňuje i jeho nepravidelnost
- B (borders) – ohraničení nádoru je nepravidelné a na ložisku jsou viditelné různé zářezy
- C (color) – nádor má vysokou variabilitu barev, bývá skvrnitý s mnoha odstíny (hnědé, černé, šedé, modré, červené i dokonce bílé - amelanotické)
- D (diameter) – průměr ložiska je větší než u pigmentových névů, měl by mít více než 6 mm alespoň v jednom směru
- E (evolution) – vývoj nádoru v čase, jeho zvětšování a popřípadě i jeho zvyšování

Tato pravidla však nefungují vždy stoprocentně. Někdy se stává, že maligní nádor je možné zaměnit za strup, díky podobné barvě a struktuře, nebo mohou být diagnostikovány i maligní nádory menších rozměrů než je 6 mm. Melanomy jsou vzhledově různorodé nádory, pro které je například dále typické krvácení, hnisání a samozřejmě metastazování. Maligní melanom se šíří krevní i lymfatickou cestou, kdy nejprve metastazuje do nejbližší lymfatické uzliny a potom do jiných tkání v těle, nejčastěji do plic (Fikrle a Pizinger 2010, Stockfleth 2010, Vorlíček a kol. 2006).

### 1.2.2 TYPY MELANOMŮ

Lidskou populaci sužuje hned několik typů melanomů. Mezi ty základní patří čtyři celkem rozdílné typy – povrchově šířící se melanom (SSM), nodulární melanom (NM), lentigo maligní melanom (LMM), akrolentiginózní melanom (ALM) (Stockfleth 2010).

- Povrchově se šířící melanom patří mezi nejběžnější melanomy u lidí (bělochů). Přibližně 70% všech melanomů tvoří právě SSM. Vyskytuje se u všech generací a ve větší míře u žen než u mužů. Klinicky se projevuje jako tmavá, plochá nebo lehce vyvýšená skvrna různých barev a je nepravidelně ohraničený. SSM se objevuje ve dvou různých fázích – radiální (léze je na povrchu a je životu nejméně nebezpečná) a vertikální (léze proniká i hlouběji do kůže) (Stockfleth 2010, Hofmann-Wellenhof a kol. 2012).
- Nodulární melanom je nejagresivnější (brzy metastazuje) a druhý nejčastěji se vyskytující typ melanomu (15%). Objevuje se hlavně u starších jedinců a obecně vzniká z pigmentového uzlíku na pokožce. Je to malý (1-2 cm) ohraničený tumor, pro který je typické krvácení a hnisání. Má různé barvy (nejčastěji načervenalou), ale může být i bez pigmentu (amelanotický) (Hofmann-Wellenhof a kol. 2012, Stockfleth 2010).
- Lentigo maligní melanom začíná jako malá, nepravidelná pigmentová skvrna, a pak se několik let vyvíjí v maligní tumor. První neinvazivní fáze se označuje jako lentigo maligna, a teprve pozdější fáze se označuje jako zhoubný melanom. Vyskytuje se u starších lidí a výhradně na částech těla vystavovaných slunečnímu záření (krku a hlavě). Tumor má nepravidelné ohraničení, bývá plochý a různobarevný (hnědý, tmavě modrý až černý) (Stockfleth 2010, Clark a Mihm 1969).
- Akrolentiginózní melanom je nejvzácnějším typem melanomu, ale statisticky nejčastěji způsobuje úmrtí. Prognóza nebývá příznivá, jakmile se nádor začne šířit invazivně (metastazuje). Běžně se vyskytuje na chodidlech, dlaních nebo pod nehty u starších lidí. V průměru má tento nádor 2-3 cm a zabarvený je do hněda až černa. Charakteristický je pro něj neohraničený růst a proniká hlouběji do kůže (Stockfleth 2010, Krementz a kol. 1982).

### 1.2.3 ZHOUBNÝ MELANOM U MYŠÍ

Spontánně vznikající maligní melanom se u myši vyskytuje velmi zřídka. Mnohem častější je umělá transplantace nádorů. Tato modelová zvířata se obecně využívají k vědeckému výzkumu, aby se porozumělo principu vzniku melanomu, jeho obraně před imunitním systémem a procesu metastazování. Dále se využívají k testování a hodnocení účinnosti nových léčiv (Bosserhoff 2011).

Buněčných melanomových linií, které se používají v praxi, je známo hned několik typů. Jsou to například melanomy B16-F10 (využívaný právě v této bakalářské práci – transplantovaný do myši kmene C57BL/6N), B16-F0, B16-F1 a B16-BL6. Pro tyto typy melanomů je velmi charakteristické vytváření sekundárních ložisek, a to především v plicích (Nakamura a kol. 2002).

### 1.3 ZPŮSOBY TERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Pro léčbu rakoviny je nejdůležitější včasná diagnostika. Nejlépe tak brzká, aby nedošlo k rozvinutí nemoci do pokročilejších stádií. Jelikož nádor může být detekovaný až od určitého počtu buněk, není tedy snadné tuto zákeřnou nemoc odhalit hned v počátcích.

V dnešní medicíně se využívají 4 základní metody při léčbě nádorových onemocnění: operativní odstranění nádoru, ozařování, chemoterapie a biologická terapie, která je považována za nejnovější typ léčby. I přes veškeré tyto léčebné zákroky jsou některé druhy nádorů stále nevléčitelné (Dollinger a kol. 2002).

#### 1.3.1 OPERATIVNÍ ODSTRANĚNÍ NÁDORU

Chirurgická terapie je nejdéle používaným a také nejúčinnějším typem léčby nádorů. Velmi často se provádí profylaktická operace, tj. že se předběžně odstraní podezřelý benigní nádor, který by se časem mohl maligně zvrhnout. Operativní zákrok se hlavně používá, pokud se nádor nachází na jednom místě (vyřízne se primární ložisko nádoru, odstraní se okolní tkáň a postižené lymfatické uzliny). Operace se také uplatňují při jiných způsobech léčby (radioterapie, chemoterapie), které se pak označují jako léčba adjuvantní (doplňková) (Nezu a kol. 2004).

#### 1.3.2 RADIOTERAPIE

Metoda ozařování se využívá ke zmenšování zhoubných nádorů a v nejlepším případě vede k jejich úplnému vymizení. Radiace (částice nebo vlnění s vysokou energií) způsobí poškození molekuly DNA, a tím dojde k usmrcení buněk – jak nádorových, tak i normálních. Nádorové buňky se pak nemohou dělit a nemají ani schopnost obnovy na rozdíl od normálních buněk zdravé tkáně. Radioterapie mívá velmi často za následek nepříznivé vedlejší účinky (Nezu a kol. 2004).

### 1.3.3 CHEMOTERAPIE

Chemoterapie je léčba nádorů pomocí různých chemických látek (cytotoxické léky), které by měly být schopné zničit nádorové buňky. Farmaceutické firmy se stále snaží vyrábět nová, účinnější a méně toxická chemoterapeutika, což znamená, že se tento typ terapie stále vyvíjí (Dollinger a kol. 2002). Aby se dosáhlo lepšího účinku léčby, tak se používá vždy vícero chemických látek najednou (tím se sníží rezistence nádorových buněk na toxicitu). Protože se buňky neustále dělí a nachází se v různých fázích buněčného cyklu, tak je každá použitá látka zaměřená na jinou fázi tohoto cyklu.

Výhodou této terapie je, že nádorové buňky mají asi dvakrát pomalejší mitotický cyklus než buňky normální, které se pak mohou rychleji zotavit. Takovým způsobem může být docíleno snižování počtu nádorových buněk. Chemoterapie má však i celou řadu nevýhod - nežádoucí účinky. Mezi nejčastější patří vypadávání vlasů, nevolnost, zvracení, snížení počtu bílých krvinek a celkové oslabení organismu (Nygren 2001).

### 1.3.4 BIOLOGICKÁ TERAPIE

Obecně se tyto terapie nazývají jako terapie zacílené a patří mezi ně například imunoterapie (viz níže). Důležitou roli v obraně proti nádorovým onemocněním hraje právě i náš imunitní systém, a to jak imunita vrozená, tak i získaná. Aplikují se imunologicky aktivní látky, které se uplatňují při různých fázích vzniku nádoru. Mezi nejčastěji používané látky patří cytokiny (interferony, interleukiny) a monoklonální protilátky. Biologická terapie by měla vést k tomu, že se buňky přestanou dělit nebo zaniknou – tím, že se zvýší účinnost buněk imunitního systému, oslabí se růst tumorových buněk nebo se zamezí šíření buněk nádoru z prvního naleziště (Veselský a kol. 2004, Dollinger a kol. 2002).

## 1.4 IMUNOLOGIE NÁDORŮ

Imunitní systém dohlíží na integritu organismu – rozlišuje vlastní tkáň od cizí, ničí škodlivé patogeny a průběžně likviduje i vlastní pozměněné (zmutované) buňky. Mechanismy imunitního systému můžeme obecně rozdělit na 2 typy – nespecifické a specifické (neboli vrozené a získané), které se navzájem doplňují. Do nespecifické imunity zahrnujeme komplementový systém, granulocyty, makrofágy/monocyty a NK buňky (natural killers). Specifická imunita je založená hlavně na T a B lymfocytech. T lymfocyty působí přímo a B

lymfocyty působí prostřednictvím protilátek (Hořejší a Bartůňková 2009, Veselský a kol. 2004).

Imunitní systém se také podílí na likvidaci nádorových buněk, ale se zvyšujícím se věkem se snižuje výkonnost imunitních mechanismů, a proto pak častěji dochází k propuknutí této nemoci. Imunoterapie nádorových onemocnění je nejnovějším typem léčby a je založená na vrozené i získané imunitě. Před tím, než se tumor rozšíří do okolních tkání a těla, je zapotřebí, aby buňky imunitního systému (T lymfocyty) rozpoznaly nádorové antigeny, čili specifické struktury na povrchu nádorových buněk (Krejsek a Kopecký 2004). Velká většina tumorů je málo imunogenní, proto imunitní reakce velmi často nestačí k jejich likvidaci. Během dlouhodobých výzkumů byly objeveny 2 skupiny nádorových antigenů: TAA – antigeny asociované s nádory a TSA – antigeny specifické pro nádory.

- TAA – tyto antigeny se vyskytují jak na nádorových buňkách, tak i na buňkách normálních. Na nádorech bývají exprimovány s vyšší frekvencí a mohou tak být rozpoznány imunitním systémem. Příkladem jsou onkofetální antigeny nebo MAGE (melanoma antigen genes). MAGE je rodina antigenů, která byla nalezena na melanomových buňkách. Onkofetální antigeny (AFP  $\alpha$ -fetoprotein, CEA karcinoembryonální antigen) se normálně vyskytují pouze při určité fázi embryonálního vývoje. V dospělosti jsou pak známkou nádorového onemocnění (Igney a Krammer 2002, Klener a Klener 2010).
- TSA – pro tyto antigeny je typické, že se vyskytují pouze na nádorových buňkách, a to na tumorech, které byly vyvolané chemickými, fyzikálními i biologickými kancerogeny. Jsou to abnormální proteiny, které vznikly jako důsledek mutace nějakého genu (Hořejší a Bartůňková 2009, Igney a Krammer 2002).

Normální a nádorové buňky mají velkou většinu povrchových proteinů shodných, proto imunitní systém považuje buňky tumoru za vlastní části těla a neútočí na ně. Aby došlo k imunitní reakci, je zapotřebí, aby byl nádorový antigen zpracován antigen prezentujícími buňkami APC – makrofágy, dendritickými buňkami nebo B- lymfocyty, a pak jeho peptidy prezentovány T lymfocytům (hlavně cytotoxickým lymfocytům CTL). Prezentace antigenů je prováděna za pomoci hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) především 2. třídy (Krejsek a Kopecký 2004, Houghton 1994).

## 1.4.1 ZPŮSOBY ÚNIKU NÁDORŮ PŘED IMUNITOU

Nádorové buňky vyvinuly celou řadu strategií na molekulární i buněčné úrovni, s jejichž pomocí unikají imunitním mechanismům. Mezi takové strategie patří například produkce látek, které potlačují činnost imunitního systému, nebo regulace MHC I při prezentaci antigenu. Dále to je antigenní variabilita a špatné zpracování antigenu. Řada těchto mechanismů je velmi podobná únikovým mechanismům infekčních činitelů (Gilboa 1999).

### 1.4.1.1 PRODUKCE IMUNOSUPRESIVNÍCH LÁTEK

Nádorové buňky produkují faktory (cytokiny, chemokiny, aj.), které snižují výkonnost imunitního systému. Tyto látky inhibují růstové faktory, které za normálních okolností stimulují imunitní odpověď. Nejvýraznějším faktorem je cytokin - transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), který protinádorovou imunitu ovlivňuje svým působením na proliferaci, diferenciaci a aktivaci buněk získané a vrozené imunity (imunoprese). Při patologickém stavu se tedy TGF- $\beta$  vyskytuje ve větší míře, než bývá jeho hladina při normálním stavu. Je známo 5 izoform TGF- $\beta$ , které musejí být nejprve aktivované, a receptory pro TGF- $\beta$  se nacházejí skoro na všech typech buněk (Igney a Krammer 2002).

Dalším významným cytokinem je Interleukin-10 (IL-10), který způsobuje, že APC (antigen prezentující buňky) málo vystavují nádorový antigen, a také potlačuje tvorbu některých jiných cytokinů důležitých k aktivaci buněk imunitního systému. Například potlačuje tvorbu IL-1, IFN $\gamma$ , IL-12 a TNF  $\alpha$  (Whiteside 2006, Hořejší a Bartůňková 2009).

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je také produkovaný nádorovými buňkami. VEGF je angiogenní faktor, to znamená, že se uplatňuje při tvorbě nových cév, které nádory potřebují, aby měly dostatek živin. Dále bylo zjištěno, že negativně působí i na dendritické buňky – inhibuje jejich zrání, a ty potom tolerují nádorové antigeny (Igney a Krammer 2002, Delves a kol. 2011).

### 1.4.1.2 JINÉ MECHANISMY ÚNIKU NÁDOROVÝCH BUNĚK PŘED IMUNITNÍM SYSTÉMEM

Na Fas receptor (FasR), který se nachází skoro na všech buňkách, se naváže Fas ligand (FasL), což je jeden z mnoha transmembránových proteinů. Za normálních podmínek vede tato vazba ke spuštění programované buněčné smrti buněk, včetně buněk imunitního systému (lymfocytů atp.), tedy k regulaci imunitní odpovědi (aby nedošlo k autoimunitním atakům). Některé nádorové buňky právě tento Fas ligand exprimují na svém povrchu, a to

obvykle vede k likvidaci T lymfocytů a neutrofilů. Tyto imunitní buňky mají na svém povrchu nejen FasL namířený proti nádorovým buňkám, ale i FasR, který je činí zranitelnými (Whiteside 2006).

Tumory mají velmi nestabilní genomy, neustále dochází ke změnám jejich antigenních struktur na povrchu buňky (což je označováno jako heterogenita) a mnohé antigeny mají shodné se zdravými buňkami. Tyto mutace jim umožňují dobře se skrývat před imunitou a způsobují jejich toleranci imunitním systémem (Delves a kol. 2011).

Mezi další strategii úniku některých nádorů před imunitou patří i blokace komplementu. Inhibice komplementu je způsobena hlavně expresí molekul CD 46, CD 55 a CD 59, které zabraňují aktivaci této kaskády glykoproteinů (Veselský a kol. 2004).

## 1.5 VROZENÁ IMUNITA

Imunita je obecně definovaná jako proces rozpoznání a eliminace škodlivých a cizích látek v těle. Vrozená imunita (nebo také nespecifická, neadaptivní) je vývojově starší než imunita získaná a je považována za první obranný mechanismus těla při setkání s antigenem.

Nespecifickou imunitu tvoří buněčné složky (různé buňky imunitního systému – přirozeně cytotoxické a fagocytující) i složky humorální (celá řada proteinů – komplement, interferony, proteiny akutní fáze). Důležitým obranným mechanismem, který lze také zařadit do vrozené imunity, je bezpochyby naše neporušená pokožka a sliznice (Hořejší a Bartůňková 2009, Delves a kol. 2011).

### 1.5.1 BUNĚČNÍ ČINITELÉ VROZENÉ IMUNITY

Bílé krvinky (leukocyty) jsou klíčovými buňkami naší imunity, které mezi sebou komunikují přímým kontaktem nebo za pomoci různých uvolňovaných látek (proteinů). Vznikají z jedné pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni, a pak se dále za pomoci rozdílných faktorů diferencují na různé typy leukocytů. Do buněk vrozené imunity řadíme polymorfonukleáry (granulocyty), dendritické buňky, makrofágy/monocyty a NK buňky (Delves a kol. 2011).

#### 1.5.1.1 POLYMORFONUKLEÁRY (GRANULOCYTY)

Mezi polymorfonukleáry, které se tak označují díky své mnohotvárnosti jádra, řadíme neutrofile, eosinofile, bazofile a žírné buňky. Jsou charakteristické svými cytoplasmatickými granuly, jejichž obsah (chemicky aktivní látky) uvolňují při zánětlivé



reakci, aby zneškodnily cizorodou částici. Neutrofilů mají schopnost fagocytózy. Fagocytují patogeny a cizorodé částice, které přilnou k jejich buněčnému povrchu (prostřednictvím receptorů) a následně uvolní svůj obsah granul.

Žírné buňky (mastocyty) jsou tkáňovou formou bazofilů, takže jejich granula také obsahují histamin a heparin. Nacházejí se obecně v oblastech, které čelí vnějšímu prostředí, a to konkrétně ve tkáních orgánů – kůže, plic a zažívacího traktu. Mastocyty se uplatňují hlavně při alergických reakcích, ale také při tvorbě nových cév a opravě tkání. Granulocyty také sekretují i celou řadu cytokinů, důležitých pro aktivaci jiných buněk imunitního systému – jako obranu proti nádorům (Metcalf a kol. 1997, Pathak a Palan 2005).

#### 1.5.1.2 DENDRITICKÉ BUŇKY (DC)

Mezi nejdůležitější antigen prezentující buňky (řazené vedle makrofágů, neutrofilů a B lymfocytů mezi profesionální APC) patří buňky dendritické, čímž dochází k propojení nespecifické imunity se specifickou. DC mohou na svém povrchu exprimovat antigeny, jak ve spojení s molekulami MHC I, tak i s MHC II. Nacházejí se skoro ve všech tkáních a jejich dlouhé membránové výběžky umožňují kontakt s buňkami, které se vyskytují v jejich blízkosti. V posledních letech je snaha zapojit tyto důležité buňky imunitního systému do terapie nádorů. Jejich kultivace s nádorovými antigeny ve vhodném prostředí dokáže indukovat imunitní odpověď (Pathak a Palan 2005).

Dendritické buňky rozdělujeme na nezralé a zralé. Nezralé mohou vzniknout přímo z kostní dřeně nebo z monocytů. Jejich hlavním úkolem je fagocytovat odumřelé buňky vlastních tkání a tyto antigeny vystavit lymfocytům, které se tím neaktivují, ale spíše přispívají k toleranci vlastních tkání (tzv. regulační lymfocyty). Zralými DC se potom stávají při rozpoznání škodlivých antigenů (patogenů) a cytokinovou stimulací. Zralé buňky se přesunou do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen a účinně aktivují i naivní T-lymfocyty (Hořejší a Bartůňková 2009).

#### 1.5.1.3 MAKROFÁGY

Makrofágy jsou tkáňovou formou monocytů a řadí se mezi profesionální antigen prezentující buňky. Jsou významnými fagocyty a produkují výrazné množství proteinů důležitých pro stimulaci imunitní odpovědi. Makrofágy mají na svém povrchu i v endosomech celou řadu receptorů (PRR - Pattern Recognition Receptors), kterými rozpoznávají povrchové a nitrobuněčné molekuly mikrobiálních patogenů (PAMP). Díky těmto receptorům je imunita

schopná rozlišit cizorodé, nebezpečné patogeny od nepatogenních mikroorganismů (Krejsek a Kopecký 2004). Na povrchu mají dále receptory pro složky komplementu, receptory pro různé cytokiny, růstové faktory a chemokiny. Nebo je například jejich povrch obohacen o molekulu CD14 pro vazbu bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). Makrofágy se vyskytují ve všech orgánech těla, kde fagocytují umírající a staré buňky. Největší populace makrofágů byla objevena v játrech, kde se označují jako Kupfferovy buňky (Pathak a Palan 2005).

#### 1.5.1.4 NK BUŇKY

NK buňky, neboli přirození zabíječi, se nacházejí v lidském i zvířecím organismu a právem náleží do vrozené imunity. Mohou bez jakékoliv předchozí stimulace eliminovat některé virem napadené buňky, a dokonce i některé buňky nádorové. Nemají schopnost fagocytózy, takže škodlivé buněčné elementy likvidují cytotoxicky (Hořejší a Bartůňková 2009). NK buňky nesou na svém povrchu znaky podobné lymfocytům, a také obsahují granula s cytotoxickými látkami – granzymy a perforiny. Dále obsahují 2 typy povrchových receptorů. Jeden typ je pro rozpoznání a navázání molekul MHC I. třídy. Zdravé buňky jsou tak ochráněny před NK buňkami a cytotoxická reakce nepropukne. Druhý, lektinový receptor aktivuje v případě chybějícího komplexu MHC I cytotoxickou reakci, vedoucí k likvidaci buňky. Buňky nádorové a infikované virem velmi často postrádají tyto molekulové komplexy MHC I, čehož může být využíváno v protinádorové léčbě (Pathak a Palan 2005, Krejsek a Kopecký 2004).

#### 1.5.2 KOMPLEMENT

Humorální složkou vrozené imunity je soubor přibližně třiceti proteinů a glykoproteinů, který se označuje termínem komplement. Tyto membránové a sérové proteiny se nacházejí v séru a na povrchu buněk u všech obratlovců. Mezi nejdůležitější patří bílkoviny značené C1 - C9. Každá složka komplementu musí být nejprve aktivovaná nějakým podnětem, aby mohla plnit svoji funkci – aktivace probíhá kaskádovitě (Hořejší a Bartůňková 2009).

Významnou složkou je C3, která se může navazovat na mikrobiální povrch. Finálním produktem je potom komplex proteinů MAC (membrane attack complex), který je schopný narušit membránu patogenů. Vytvoří se v ní póry, což postupně vede k lýze bakteriální buňky. Jinou funkcí meziproductů komplementu je například opsonizace (C3b), chemotaxe (C3a, C5a) nebo imunokomplexová eliminace.

Komplement může být aktivovaný třemi dráhami: 1) klasickou – komplement je aktivovaný komplexem antigen-protilátka, 2) lektinovou – je variantou dráhy klasické (avšak aktivátorem je MBL) nebo 3) alternativní – aktivace kontaktem složky C3 s patogenním povrchem (buněčná stěna bakterií) (Pathak a Palan 2005).

### 1.5.3 JAK VROZENÁ IMUNITA ROZPOZNÁVÁ PŘÍTOMNOST PATOGENŮ?

Zkratkou PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) jsou označovány složky většiny buněčných stěn patogenů (tělu škodlivých i neškodlivých), které nepodléhají strukturním změnám (jsou stálé). Příkladem takových složek mohou být například lipopolysacharidy (LPS), kyselina lipoteichová (LTA), lipoproteiny nebo peptidoglykany. Tyto molekuly dovedou upozornit vrozenou imunitu na průnik patogenů do organismu, což potom dále vede k rozvoji adaptivní imunity (Medzhitov a Janeway 2002).

Receptory na buňkách vrozené imunity, které jsou schopné rozpoznat mikroorganismy (PAMPs), jsou označovány jako PRRs (Pattern Recognition Receptors). Nacházejí se na makrofágách, neutrofilech, NK buňkách a dendritických buňkách – tedy především na fagocytech. Konkrétně se mohou vyskytovat extracelulárně (na povrchu buňky), intracelulárně nebo mohou být sekretovány do krve a tkáňových tekutin. Popis lidských PRRs můžeme vidět v tabulce (Tab. I).

Existují tři typy těchto receptorů lišících se strukturou a způsobem indukce imunitní odpovědi. Například jejich funkce spočívá v aktivaci komplementu, opsonizaci, fagocytóze nebo vyvolání apoptózy (Janeway a Medzhitov 2002, Krejsek a Kopecký 2004). Z hlediska funkce tedy rozlišujeme receptory endocytární, sekretované a signální.

- Endocytární (fagocytární) PRR – nacházejí se na povrchu buněk schopných fagocytózy. Jakmile jsou rozpoznány příslušné mikrobiální znaky, tak interakce PAMP - PRR vede právě ke spuštění fagocytózy (pohlčení) mikroorganismu. Mezi endocytární PRR řadíme například manózoový receptor nebo makrofágový scavenger (vychytávací) receptor.
- Sekretované PRR – takovéto molekuly se naváží na mikrobiální buněčnou stěnu a mohou tak být rozpoznány komplementovým systémem a fagocyty. Mají funkci opsoninů a příkladem mohou být MBL (mannose-binding lectin), CRP (C-reactive protein) a SAP (serum amyloid protein) produkované při akutní fázi v prvních etapách infekce.

- Signální PRR – jakmile se cizorodá částice naváže na tento typ receptoru, tak dojde k zahájení komplexní signální kaskády. Výsledkem je potom produkce cytokinů, které stimulují vrozenou a následně získanou imunitu. Příkladem signálních receptorů jsou TLR (toll-like receptory) a NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) (Neth a kol. 2005, Krejsek a Kopecký 2004).

Tab. I: Výčet nejběžnějších lidských PRRs s popsanými funkcemi (Pathak, Palan 2005).

<i>PRR</i>	<i>Type of PRR</i>	<i>PAMPs recognized</i>	<i>Function</i>
C-reactive protein	Secreted	Molecular groups found on the cell walls of a wide variety of bacteria and fungi, including phosphocholine moieties, lipoproteins, monophosphate esters, and histones.	Promotes opsonization and activates the complement cascade
LBP	Secreted	LPS	Binds LPS and transfers the complex to cell surface CD14
Mindin	Secreted	Recognizes sugar moieties	Opsonizes bacteria and promotes their phagocytosis; promotes secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages
Collectins	Secreted	Bind glucose, L-fucose, mannose, N-acetyl mannosamine, and N-acetyl glucosamine residues on microbial cell walls. 1. MBL, and SP-A and SP-D recognize mannose or N-acetylglucosamine residues 2. Ficolins recognize N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactose, and L-fucose	Opsonize bacteria and enhance their clearance; MBL can also activate complement by cleaving C3 Activate complement by the alternative pathway
Mannose receptor	Endocytic	Recognizes carbohydrates with a large number of mannoses or fucoses	Initiates phagocytosis; promotes secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages
Scavenger receptors	Endocytic	Bind micro-organisms and their products including lipoteichoic acids, LPS, CpG DNA and low-density lipoproteins.	Initiate internalization of the bound entity
CD14	Signalling receptor	Binds LPS and other cell wall constituents of Gram-positive and Gram-negative bacteria	Together with TLRs results in activation of a number of genes involved in innate and adaptive immune responses
TLRs	Signalling receptors	Recognize conserved products of microbial metabolism such as LPS, peptidoglycan, and lipoteichoic acids.	Activation induces the expression of a variety of cytokines and costimulatory molecules crucial to the initiation of adaptive immune responses

#### 1.5.4 RAKOVINA A VROZENÁ IMUNITA

Vědci si mysleli, že největší roli v obraně proti nádorům hraje adaptivní imunita, a to konkrétně buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC). V roce 1999 však profesor Zheng Cui zjistil, že nádory mohou být zlikvidovány právě vrozenou imunitou. Se svým týmem prováděl pokusy na myších typu BALB/c a aplikoval jim 200 tisíc buněk sarkomu S180. Jedna myš však nevykazovala žádné příznaky, proto byla dávka nádorových buněk

zdvojnásobena a pak dokonce zvýšena až na 20 milionů buněk. Ani tentokrát nebyl nádor přijat, i přestože se sarkom řadí mezi velmi agresivní nádory (Cui a kol. 2003, Hicks a kol. 2006).

Zázračná myš byla nakonec namnožena a 40% jejích potomků vykazovalo tuto odolnost vůči nádorům. Tím byla objevena dominantní mutace v jednom genu u myši. Kromě nádorové rezistence měla tato mutace i jinou vlastnost – spontánní regresí. Proto vhodné označení pro tuto změnu v genu bylo SR/CR (spontaneous regression / cancer resistant). Bylo zjištěno, že mutace SR/CR je závislá na stáří myši. U myši mladších než 4 měsíce byla viditelná kompletní odolnost vůči transplantaci nádorů, ale u starších myši se nádor objevil, v určité fázi došlo ke stagnaci, a potom k samovolnému vymizení (Hicks a kol. 2006).

Myš s SR/CR mutací byla zkřížena i s jinými myšími kmeny, čímž došlo k přenosu mutace na jejich potomky. V pokusu byly použity například myši z kmene C57BL/6, CAST/Ei nebo bezthymové C57BL/6<sup>foxn1/foxn1</sup> nahé myši (nude mice). Díky myším bez thymu bylo odhaleno, že se při likvidaci nádoru uplatňují buňky vrozené imunity – NK buňky, makrofágy a neutrofilové. Protože T-lymfocyty se u tohoto typu myši vyskytují ve velmi malém množství, tak musel být nádor zničen vrozenou imunitou. Což bylo potvrzeno i *in vitro* pokusem (Cui a kol. 2003, Hicks a kol. 2006).

## 1.6 POTENCIÁLNÍ VYUŽITÍ MANANU V TERAPII NÁDORŮ

Podle profesora Cui lze docílit toho, aby buňky vrozené imunity napadaly buňky nádorové. Je ale potřeba, aby je rozeznaly. V této práci jsme tedy prakticky vyzkoušeli „myšlenku“ umělého navázání PAMPs (konkrétně manan) na povrch nádorových buněk. Dále jsme řešili otázku jeho případné synergie se solubilními signálními ligandy (LPS, LTA).

### 1.6.1 MANAN A JEHO RECEPTORY

#### 1.6.1.1 MANAN

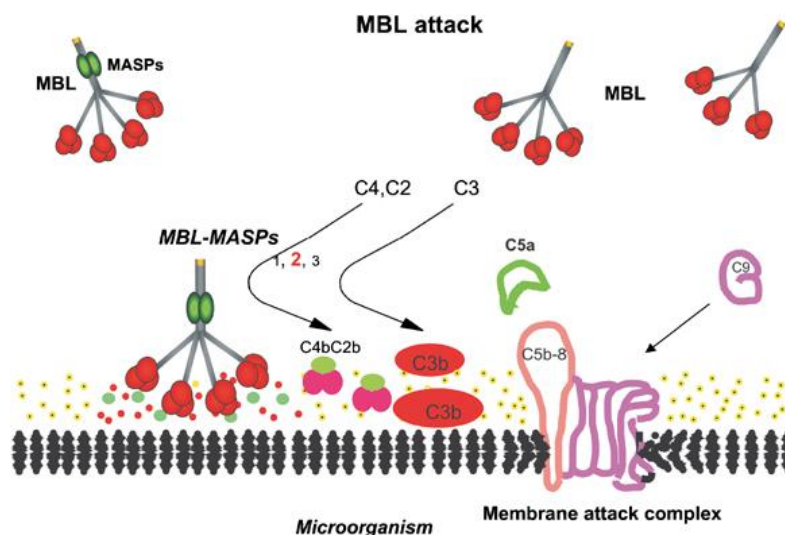
Manan se řadí mezi polysacharidy a je složený z několika podjednotek D- manóz, které jsou spojené glykosidickou vazbou. Podle vazby potom rozlišujeme  $\alpha$  nebo  $\beta$  manan. Manan ve formě manan-proteinových komplexů se nachází v buněčné stěně mikroorganismů, konkrétně na buněčném povrchu kvasinek (hub) a gramnegativních bakterií (Lipke a Ovalle 1998). Manan se řadí mezi PAMPs, protože je považovaný za vysoce antigenní látku, a

imunitní systém ho rozpoznává pomocí receptorů, jako jsou manózu vázající lektin (MBL) nebo manózový receptor (MR). Detekce mananu (manózy) pomocí MBL vede v organismu k aktivaci komplementu lektinovou cestou (Janeway a Medzhitov 2002).

#### 1.6.1.2 MBL

Mannose-binding lectin (také nazývaný jako Mannan-binding lectin) je sérový protein, který se řadí mezi sekretované PRR, je produkovaný v játrech při akutní fázi infekce a vylučován do plasmy. Selektivně rozpoznává manan, N-acetylglukosamin nebo fukózu obsaženou v patogenech a váže se na manan (Opanasopit a kol. 2001, Janeway a Medzhitov 2002). Struktura MBL se občas trochu liší, protože může obsahovat různé oligomerní řetězce (dimery až hexamery spojené disulfidickými můstky). Všechny oligomery obsahují 3 stejné peptidické řetězce (35kDa), kde každý má právě jednu lektinovou oblast (neboli oblast pro rozpoznávání karbohydrátů), hydrofobní oblast, kolagenní oblast a na cystein bohatou N-terminální oblast. Díky kolagenním a lektinovým doménám se MBL řadí mezi kolektiny. Kolagenní oblast je důležitá pro interakci s imunitním systémem a lektinová oblast se naopak navazuje na cukry (karbohydráty) v buněčné stěně mikroorganismů (Turner 2003, Múdry 2009).

Afinita MBL k manóze je celkem nízká ( $10^{-3}$  M), proto struktura receptoru vyžaduje větší počet současných interakcí s manózovými molekulami. Hlavními funkcemi MBL jsou aktivace komplementu lektinovou cestou (viz Obr. 3), která nastává po navázání se na mikroorganismus, nebo také s tím související opsonizace (aktivace makrofágů na úrovni komplementového C3b) (Turner 2003). Nejdříve musí MBL vytvořit komplex se serinovými proteázami MASP1 a 2 (MBL-associated serine proteases), pak se naváže patogenní částice (například manóza na povrchu bakterie) a rozjede se komplementová kaskáda. Výsledkem je pak zničení patogenu (viru, bakterie či kvasinky). Složka C3b je schopná se navázat i na komplementové receptory na fagocytech, a tím je aktivovat k imunitnímu útoku (Gadjeva a kol. 2001, Garred a kol. 2006).



Obr. 3: Útok komplementu zprostředkovaný komplexem MBL-MASPs (Garred a kol. 2006)

### 1.6.1.3 MR

Manózoový receptor (také označovaný jako makrofágový receptor pro manózu) patří mezi fagocytární PRR, které se nacházejí především na fagocytárních buňkách – Kupfferových buňkách, alveolárních, slezinných makrofágách, dendritických buňkách nebo dokonce na buňkách endotelu (Opanasopit 2001). MR můžeme zařadit do lektinové rodiny typu C a je pro něj charakteristická karbohydrátová doména pro rozpoznávání mikroorganismů, které na povrchu buněčné stěny obsahují například D-manózu, N-acetylglukosamin nebo L-fukózu (Opanasopit 2001, Janeway a Medzhitov 2002).

MR má za úkol vybudit vrozenou imunitu k likvidaci například grampozitivních nebo gramnegativních bakterií a hub, a to procesem fagocytózy. Fagocytující buňka musí nejdříve po rozpoznání požit mikrobiální patogen a postupně ho rozložit lysozomálními enzymy v lysozomu. APC pak mohou prezentovat antigen na povrchu s molekulami MHC, a tím do „boje“ zapojit i získanou imunitu (Janeway a Medzhitov 2002). MR je dále zodpovědný za vytváření prozánětlivých signálů, které vedou k produkci cytokinů, jako jsou TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 (Pathak a Palan 2005).

## 2. CÍLE PRÁCE

- *In vivo* studium vlivu mananu na myší melanom B16-F10.
- Ověření možnosti zesílení účinku mananu v kombinaci s některými agonisty signálních receptorů.



### 3. POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY

#### 3.1 SEZNAM CHEMIKÁLIÍ

V pokusech byly použity tyto chemikálie:

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- FCS – Fetal Calf Serum (Sigma-Aldrich)
- Manan *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich)
- LPS – lipopolysacharid *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich)
- LTA – kyselina lipoteichová *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich)
- BAM – Biocompatible Anchor for cell Membrane, Mw 4000 (NOF Corporation)

#### 3.2 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A BUNĚČNÉ LINIE

Při laboratorních pokusech byly použity myši kmene C57BL/6N, které byly pořízeny od společnosti Charles River Laboratories. Všechny myši byly samičího pohlaví, vážily 18-20g a byly 8 týdnů staré. Myši měly neomezený přístup ke sterilní vodě i potravě a byly chovány v místnosti s fotoperiodou 12/12.

Buněčné linie myšního melanomu B16-F10, dar prof. Říhové (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha), byly uloženy v termostatu při teplotě 37°C (v atmosféře nasycené vodními parami s 5 % oxidu uhličitého). Kultivace melanomových buněk probíhala v RPMI 1640 s 10% bovinním fetálním sérem, antibiotiky, glutaminem a merkaptoetanolem.

#### 3.3 PŘÍPRAVA BUNĚK MELANOMU B16-F10

Nádorové buňky byly použity v *in vivo* pokusech. Nejprve bylo z buněk odstraněno médium a po opětovném propláchnutí sterilním roztokem PBS (3x) byla přidána trypsinizační směs (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Trypsinizace probíhala při 37°C po dobu 5 minut a po přidání média RPMI 1640 s 10% FCS byla zastavena. Buňky byly rozvolněny za pomoci Pasteurovy pipety. Následovalo stočení v centrifuze (10 minut, 150g, 4°C) a po vylití média byly buňky znovu promíchány v RPMI 1640 (už bez séra).

Do zkušavky bylo napipetováno 30μl suspenze buněk a 30μl trypanové modři, která slouží k určení životnosti buněk (mrtvé buňky se obarví modře). Vše se promíchalo a pro

počítání buněk v mikroskopu byla využita Bürkerova komůrka. Podle počtu buněk byla suspenze potom naředěna na potřebnou koncentraci.

### 3.4 TRANSPLANTACE MELANOMOVÝCH BUNĚK

Pro lepší viditelnost i měření teploty byly myši nejprve oholeny na pravé i levé dolní části zad. Potom jim pod kůži na pravé straně bylo injikováno 0,1 ml buněčné suspenze, tedy RPMI 1640 s obsahem cca 400 000 melanomových buněk B16-F10.

### 3.5 MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ

Velikost transplantovaných nádorů byla měřena za pomoci kaliperu. Nádory byly během pokusu měřeny obden a po skončení léčby jenom jednou týdně. Z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádoru podle vzorce  $V = \pi/6AB^2$ , kde A je délka nádoru (největší naměřený rozměr) a B je výška nádoru (nejmenší naměřený rozměr).

### 3.6 MĚŘENÍ TEPLoty NÁDORU

Teplota nádoru byla měřena za pomoci speciálního typu myšího teploměru IR RODENT THERMOMETER 153 IRB od firmy BIOSEB. Pro statistické účely byla měřena teplota na vyholeném pravém i levém boku myši, měřila se tedy teplota nádoru i povrchová teplota těla bez nádoru.

### 3.7 STANOVENÍ POČTU METASTÁZ

Myší plíce byly vypitvány a naloženy do 4 % formaldehydu, kde byly ponechány po dobu alespoň jednoho týdne. Pak byly plíce pečlivě prohlédnuty pod binolupou a byla zaznamenána všechna metastatická ložiska. Metastázy se na světle růžových plicích jeví jako černé tečky.

## 3.8 STATISTIKA

Statistické vyhodnocení naměřených hodnot bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel. K vyhodnocení přežívání myši jsme použili test Kaplan-Meier v programu MedCalc.

## 3.9 PŘÍPRAVA LÁTEK POUŽÍVANÝCH K LÉČBĚ

Příprava aminovaného mananu:

Aminovaný manan byl získán redukční aminací mananu (Torosantucci a kol. 2005). Roztok mananu v prostředí octanu amonného byl redukován kyanoborohydridem sodným při pH 7,5 a 50 °C pět dnů. Následovala dialýza ve střevě MWCO 3500 proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání.

Příprava manan-BAM:

Navázání molekuly BAM na aminoskupinu mananu bylo provedeno při pH 7,3 metodou podle Kato a kol. (2004). Následovala dialýza ve střevě MWCO 3500 proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání.

## 3.10 POKUS 1: MELANOM B16-F10 A JEHO OVLIVNĚNÍ APLIKACÍ MANANU

V prvním experimentu bylo použito 21 samic z myšního kmene C57BL/6N. Každé myši bylo pod kůži injikováno 400 000 melanomových buněk B16-F10. Myši byly po 12. dni od transplantace změřeny kaliperem a rozděleny do 3 skupin po 5 (A, B, C) a jedné skupiny po 6 myších (K - Kontrola). Všechny myši byly chovány jednotlivě. Terapie nádorů byla započata tentýž den a schéma pokusu (dávkování a způsob aplikace látky) bylo následující:

- Skupina A – aplikace 50 µl mananu + LPS, 6x obden, intratumorálně
- Skupina B – aplikace 50 µl LPS, 6x obden, intratumorálně
- Skupina C – aplikace 50 µl mananu, 6x obden, intratumorálně
- Skupina K (kontrolní) – aplikace 50 µl PBS, 6x obden, intratumorálně

Teplota (nátoru + referenčního místa na druhém boku) byla změřena před započítím terapie (v čase 0) a pak po 6, 12 a 24 hodinách. Během léčby byla teplota (nátoru + referenčního místa na druhém boku) měřena všem skupinám každý druhý den po dobu 14 dnů. Po změření teploty následovalo vždy měření velikosti nádoru. Poslední den pokusu byly myši zabity.

### 3.11 POKUS 2: MELANOM B16-F10 A JEHO OVLIVNĚNÍ APLIKACÍ MANAN-BAM

Do druhého experimentu bylo zapojeno 30 samic z myšního kmene C57BL/6N. Každé myši bylo pod kůži injikováno 400 000 melanomových buněk B16-F10. Myši byly po 12. dni od transplantace změřeny kaliperem a rozděleny do 5 skupin po 6 myších (A, B, C, D, K - kontrola). Všechny myši byly chovány jednotlivě. Terapie nádorů byla započata tentýž den a schéma pokusu (dávkování a způsob aplikace látky) bylo následující:

- Skupina A – aplikace 50  $\mu$ l manan-BAM + LPS, 6x obden, intratumorálně
- Skupina B – aplikace 50  $\mu$ l LPS, 6x obden, intratumorálně
- Skupina C – aplikace 50  $\mu$ l manan- BAM, 6x obden, intratumorálně
- Skupina D – aplikace 50 $\mu$ l manan-NH<sub>2</sub>, 6x obden, intratumorálně
- Skupina K (kontrolní) – aplikace 50 $\mu$ l PBS, 6x obden, intratumorálně

Teplota (nátoru + referenčního místa na druhém boku) byla změřena před započítím terapie (v čase 0) a pak po 6, 12 a 24 hodinách. Během léčby byla teplota (nátoru + referenčního místa na druhém boku) měřena všem skupinám každý druhý den po dobu 14 dnů. Po změření teploty následovalo vždy měření velikosti nádoru. Poslední den pokusu byly myši zabity a byly jim vyjmuty plíce. Následně byly plíce zakonzervovány 4% roztokem formaldehydu do doby počítání metastáz.

### 3.12 POKUS 3: MELANOM B16-F10 A JEHO OVLIVNĚNÍ APLIKACÍ MANAN-BAM V RŮZNÝCH KOMBINACÍCH

Ve třetím experimentu bylo použito 30 samic z myšního kmene C57BL/6N. Každé myši bylo pod kůži injikováno 400 000 melanomových buněk B16-F10. Myši byly po 12. dni od transplantace změřeny kaliperem a rozděleny do 6 skupin po 5 myších (A, B, C, D, E, K –

kontrola). Všechny myši byly chovány jednotlivě. Terapie nádorů byla započata tentýž den a schéma pokusu (dávkování a způsob aplikace látky) bylo následující:

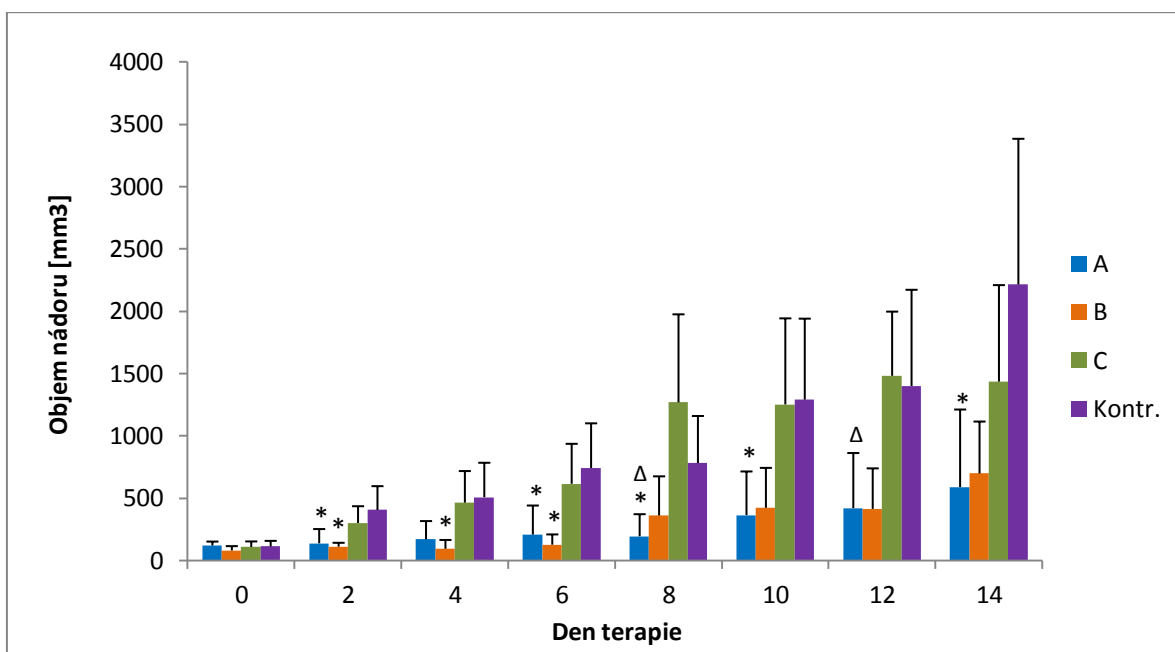
- Skupina A – aplikace 50  $\mu$ l manan-BAM+LPS+LTA, 6x obden, intratumorálně
- Skupina B – aplikace 50  $\mu$ l manan-BAM+LPS, 6x obden, intratumorálně
- Skupina C – aplikace 50  $\mu$ l LPS, 6x obden, intratumorálně
- Skupina D – aplikace 50  $\mu$ l manan-BAM, 6x obden, intratumorálně
- Skupina E – aplikace 50  $\mu$ l LTA, 6x obden, intratumorálně
- Skupina K (kontrolní) – aplikace PBS, 6x obden, intratumorálně

Teplota (nádoru + referenčního místa na druhém boku) byla změřena před započítím terapie (v čase 0) a pak po 6, 12 a 24 hodinách. Během léčby byla teplota (nádoru + referenčního místa na druhém boku) měřena všem skupinám každý druhý den po dobu 14 dnů. Po změření teploty následovalo vždy měření velikosti nádoru. Poslední den pokusu nebyly myši zabity a byla u nich provedena statistická analýza přežití (v programu MedCalc).

## 4. VÝSLEDKY

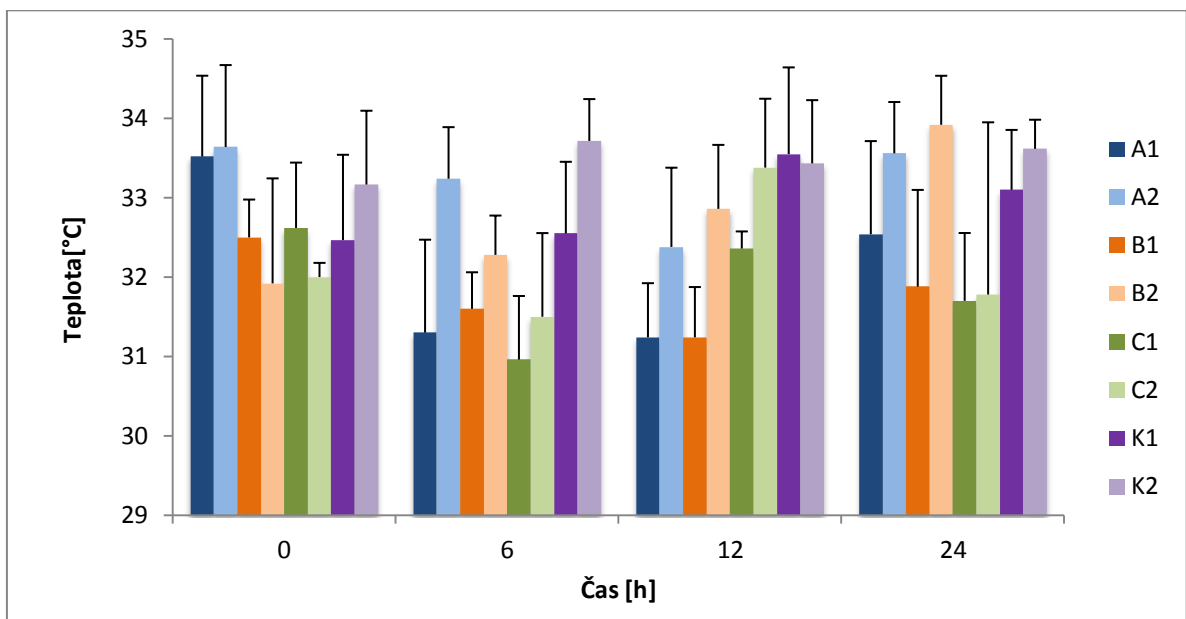
### 4.1 POKUS 1: MELANOM B16-F10 A JEHO OVLIVNĚNÍ APLIKACÍ MANANU

V tomto pokusu jsme se zabývali melanomem B16-F10 a jeho ovlivněním pomocí mananu podávaného intratumorálně. Výsledný vliv terapie na velikost nádorů je uveden na obrázku 4. Z grafu je viditelné, že manan, který byl podáván samostatně, neměl žádný vliv na růst nádorů. Kombinace mananu s LPS nevykazovala žádné známky aktivity či synergie, veškerý tumor inhibiční efekt byl dán LPS.

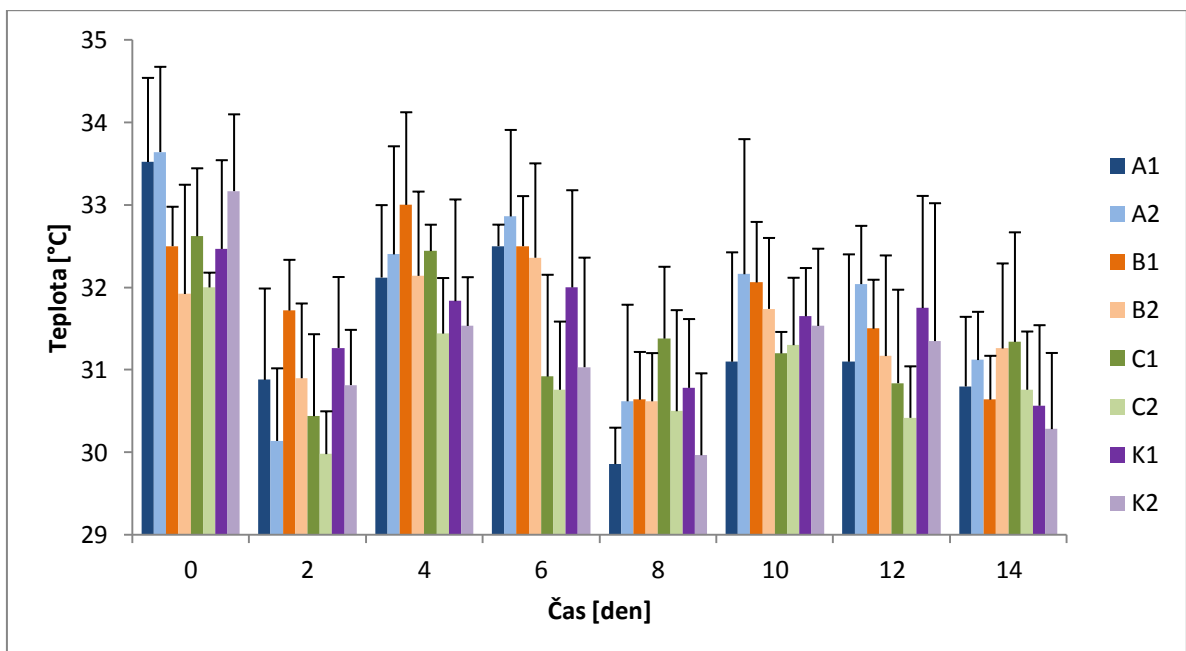


Obr. 4: Vliv terapie na velikost nádoru (skupina A – podáván manan + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan, K kontrolní skupina – podáváno PBS). Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou: \* =  $P \leq 0,05$ . Statistická významnost ve srovnání se skupinou C:  $\Delta = P \leq 0,05$ .

Na obrázku 5 a 6 je graficky znázorněn vliv terapie na teplotu nádorů. Tmavším odstínem je vždy značena průměrná povrchová teplota nádoru a světlejší odstín odpovídá průměrné teplotě kontrolního bodu na druhém boku myši. U nádoru byly ve srovnání s tělem zaznamenány převážně nižší teploty, tento rozdíl však nebyl statisticky významný. Všechny teploty v průběhu experimentu mírně klesaly. Teploty však neodrážely způsob a průběh terapie.



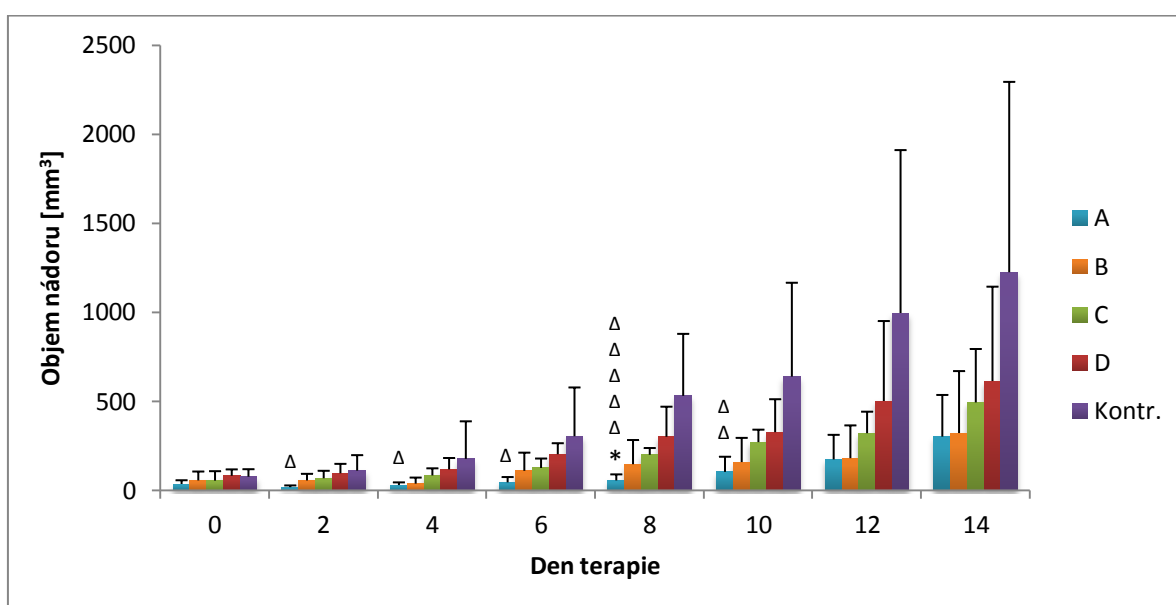
Obr. 5: Vliv léčby na teplotu myši – v průběhu prvního dne terapie. Jedničkou je vždy označena teplota nádoru a dvojkou povrchová teplota těla (skupina A – podáván manan + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan, K kontrolní skupina – podáváno PBS).



Obr. 6: Vliv léčby na teplotu myši – v průběhu celé terapie. Jedničkou je vždy označena teplota nádoru a dvojkou povrchová teplota těla (skupina A – podáván manan + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan, K kontrolní skupina – podáváno PBS).

## 4.2 POKUS 2: MELANOM B16-F10 A JEHO OVLIVNĚNÍ APLIKACÍ MANAN-BAM

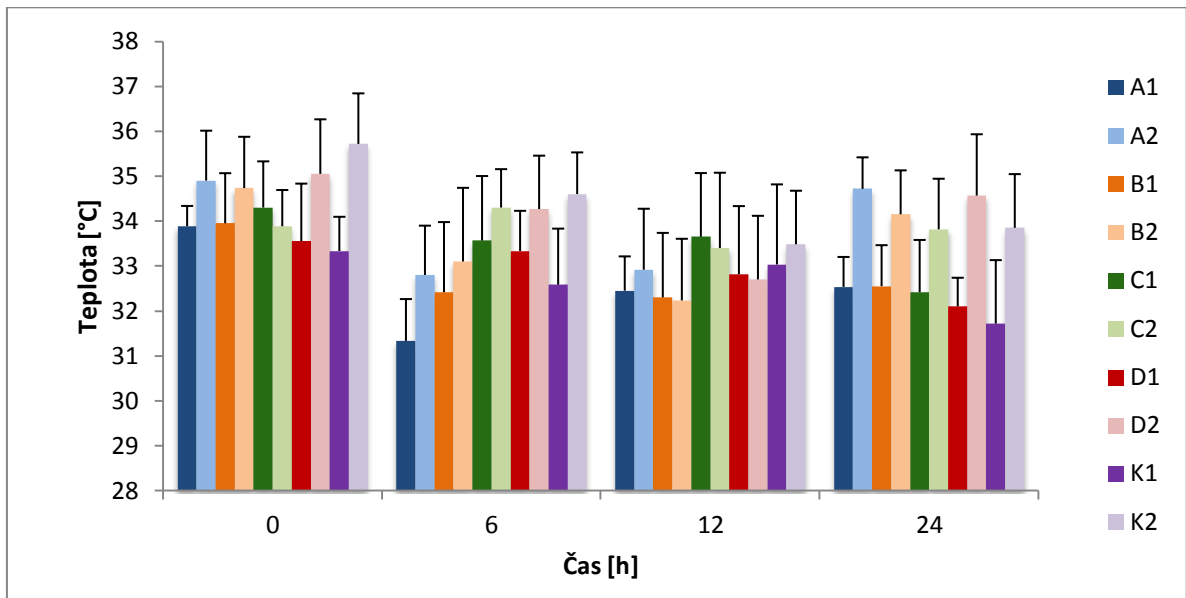
V tomto pokusu jsme se zabývali melanomem B16-F10 a jeho ovlivněním pomocí manan-BAM (samostatně i s LPS) a pomocí aminovaného mananu, vše bylo podáváno intratumorálně. Výsledný vliv terapie na velikost nádorů je uveden na obrázku 7. Z grafu je viditelné, že manan, který byl upravený aminací, měl jen částečný vliv na zmenšení nádorů. Kotvení mananu pomocí BAM již mělo lepší výsledky, které byly statisticky velmi významně podpořeny kombinací s LPS.



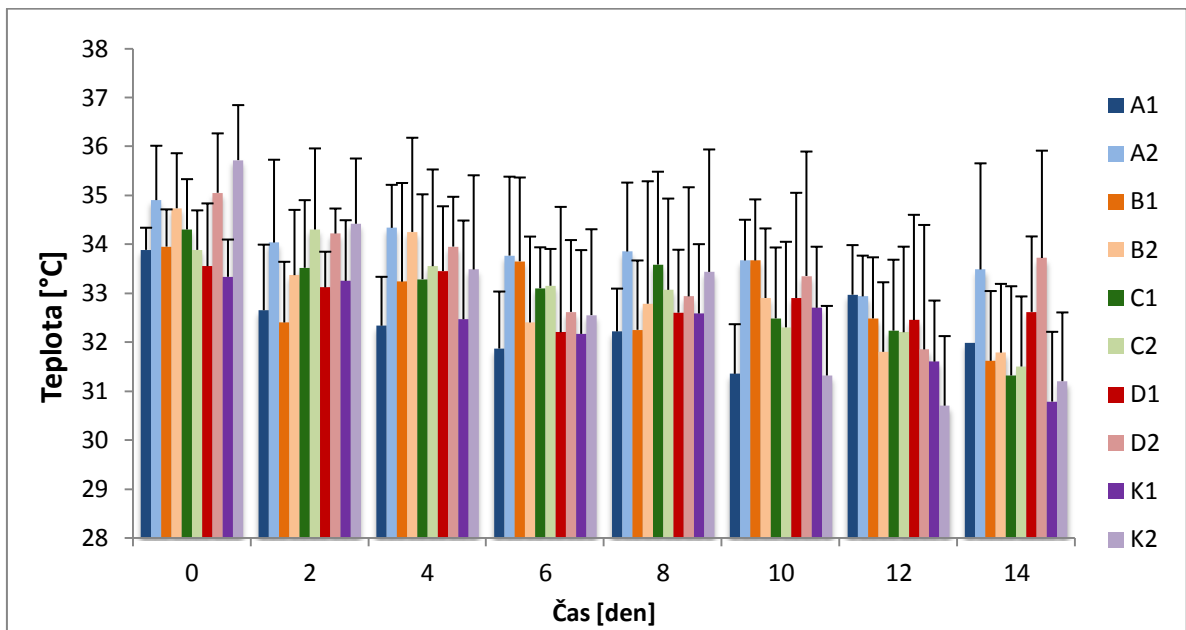
Obr. 7: Vliv terapie na velikost nádoru (skupina A – podáván manan-BAM + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan-BAM, skupina D – podáván manan- NH<sub>2</sub>, K kontrolní skupinou – podáváno PBS). Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou: \* =  $P \leq 0,05$ . Statistická významnost ve srovnání se skupinou C:  $\Delta = P \leq 0,05$ ;  $\Delta\Delta\Delta\Delta = P \leq 0,0005$ .

Na obrázku 8 a 9 je graficky znázorněn vliv terapie na teplotu nádorů. Jako v předchozím experimentu se měření teploty ukazuje jako nevhodné pro monitorování léčby.



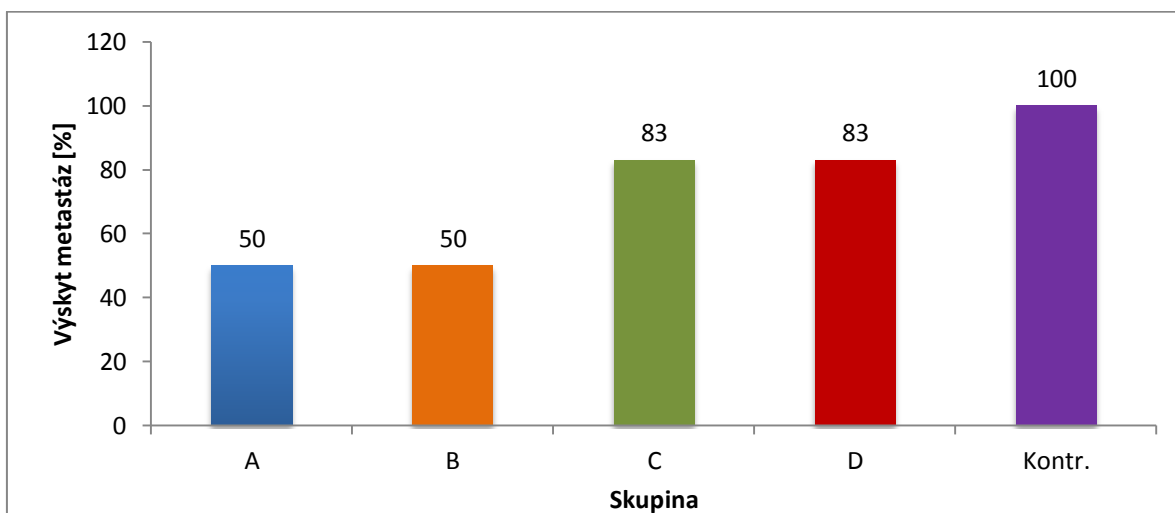


Obr. 8: Vliv léčby na teplotu myši – v průběhu prvního dne terapie. Jedničkou je vždy označena teplota nádoru a dvojkou povrchová teplota těla (skupina A – podáván manan-BAM + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan-BAM, skupina D – podáván manan- NH<sub>2</sub>, K kontrolní skupina – podáváno PBS).



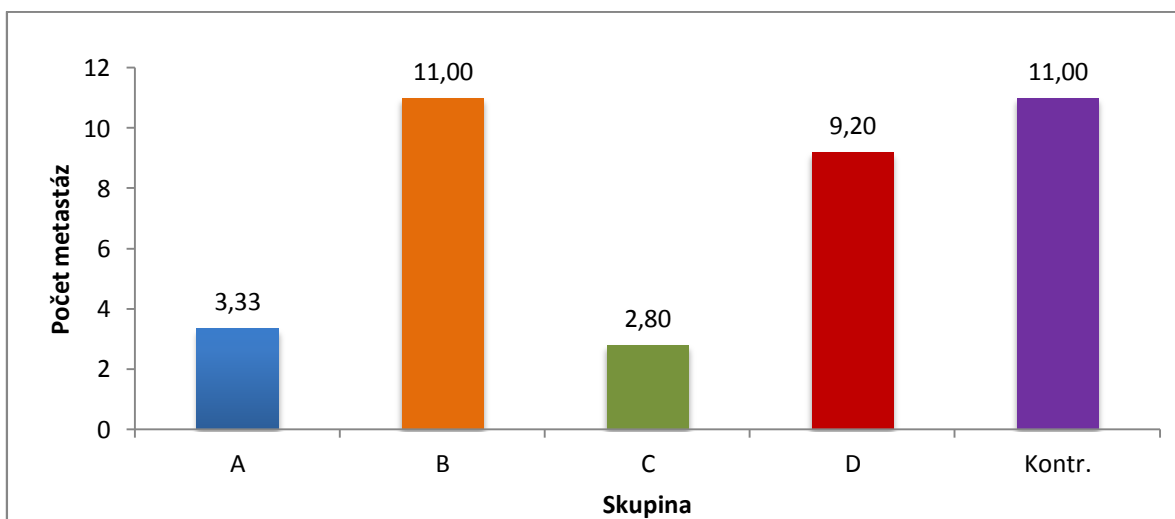
Obr. 9: Vliv léčby na teplotu myši – v průběhu celé terapie. Jedničkou je vždy označena teplota nádoru a dvojkou povrchová teplota těla (skupina A – podáván manan-BAM + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan-BAM, skupina D – podáván manan- NH<sub>2</sub>, K kontrolní skupina – podáváno PBS).

Na Obrázku 10 vidíme, že výskyt metastáz v jednotlivých skupinách je menší než u kontroly, kde se metastázy objevily u všech myší. Léčba tedy ovlivnila výskyt metastáz u léčených skupin.



Obr. 10: Vliv nádorové terapie na výskyt metastáz u testovaných myší (skupina A – podáván manan-BAM + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan-BAM, skupina D – podáván manan- NH<sub>2</sub>, K kontrolní skupina – podáváno PBS).

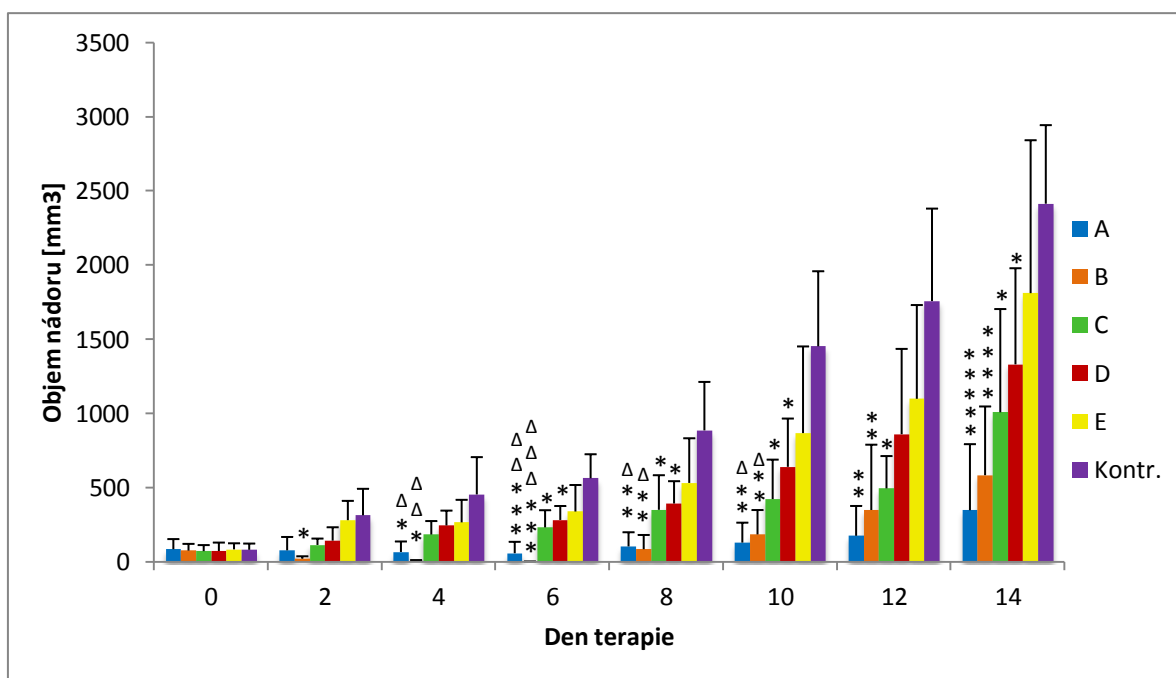
Na dalším obrázku (Obr. 11) je vidět vliv léčby na intenzitu metastazování, tedy na průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly prokázány. Skupina B vykazuje stejný počet metastáz jako skupina kontrolní. Zatímco ve skupinách A a C je počet metastáz přibližně 3,5x menší než v kontrole.



Obr. 11: Průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly zjištěny (skupina A – podáván manan-BAM + LPS, skupina B – podáván LPS, skupina C – podáván manan-BAM, skupina D – podáván manan- NH<sub>2</sub>, K kontrolní skupina – podáváno PBS).

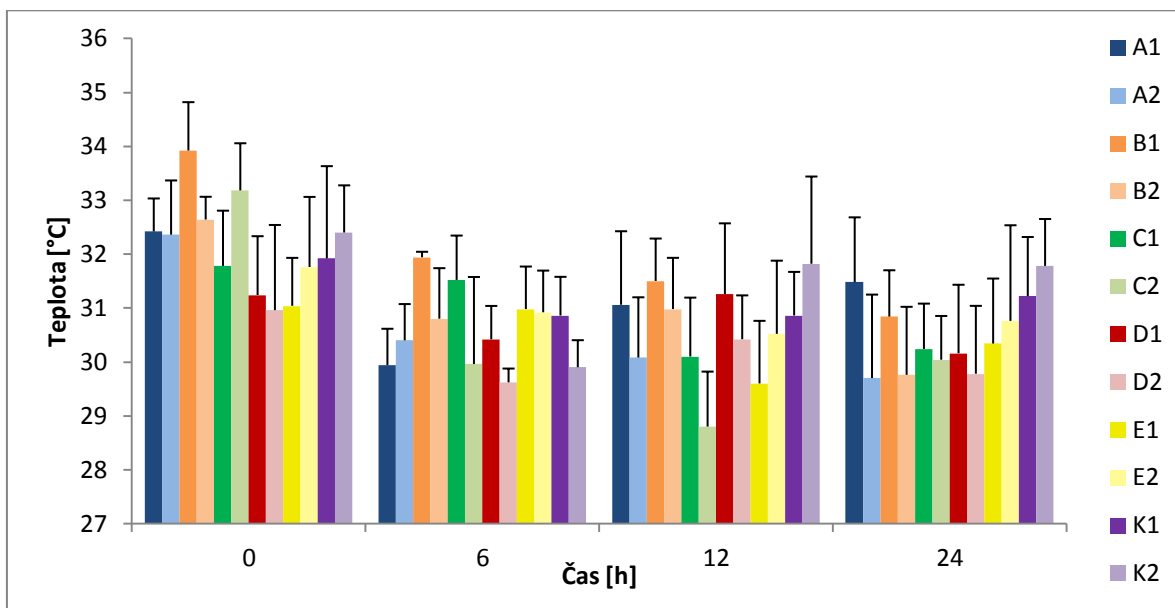
### 4.3 POKUS 3: MELANOM B16-F10 A JEHO OVLIVNĚNÍ APLIKACÍ MANAN-BAM V RŮZNÝCH KOMBINACÍCH

Třetí pokus byl zaměřený na léčbu melanomu B16-F10 pomocí roztoku manan-BAM v různých kombinacích s agonisty signálních receptorů. Výsledný vliv terapie na velikost nádorů je uveden na obrázku 12. Z grafu je viditelné, že statisticky nejvýznamnější jsou skupiny A a B, tedy kombinace manan-BAM s LPS a LTA manan-BAM v kombinaci s LPS.

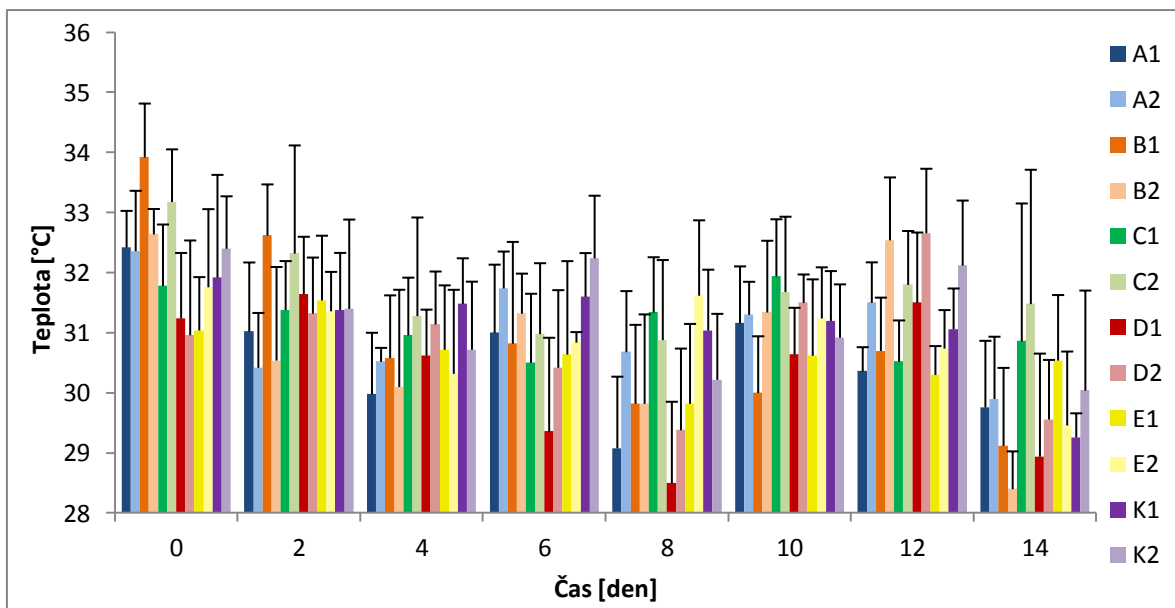


Obr. 12: Vliv terapie na velikost nádoru (skupina A – podáván manan-BAM+LPS+LTA, skupina B – podáván manan-BAM+LPS, skupina C – podáván LPS, skupina D – podáván manan-BAM, skupina E – podáván LTA, K kontrolní skupina – podáváno PBS). Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou: \* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,005$ ; \*\*\*\* =  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*\* =  $P \leq 0,05$ . Statistická významnost vztahovaná ke skupině D:  $\Delta$  =  $P \leq 0,05$ ;  $\Delta\Delta$  =  $P \leq 0,01$ ;  $\Delta\Delta\Delta$  =  $P \leq 0,005$ .

Obrázky 13 a 14 graficky znázorňují vliv terapie na teplotu nádorů. Tato měření nikterak neodrážejí výrazný vliv některých směsí na redukci nádorového růstu.

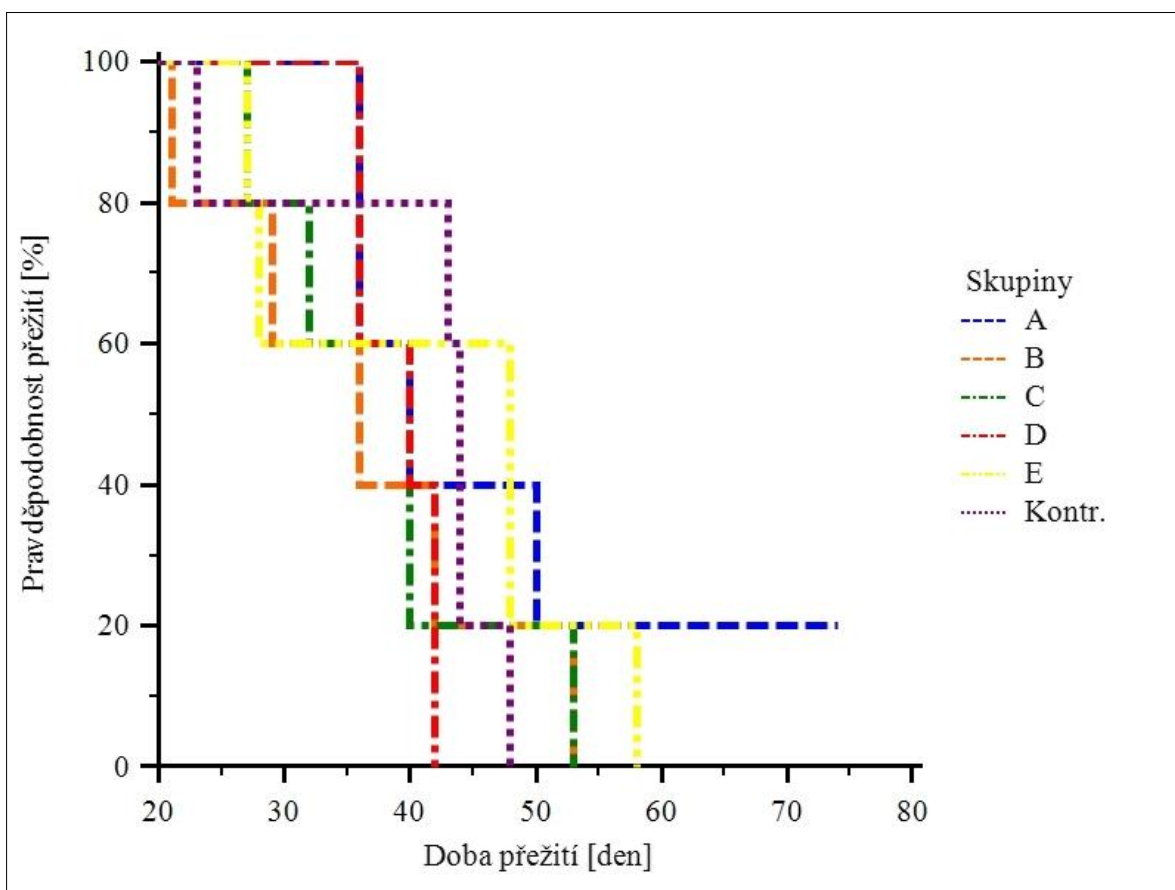


Obr. 13: Vliv léčby na teplotu myši – v průběhu prvního dne terapie. Jedničkou je vždy označena teplota nádoru a dvojkou povrchová teplota těla (skupina A – podáván manan-BAM+LPS+LTA, skupina B – podáván manan-BAM+LPS, skupina C – podáván LPS, skupina D – podáván manan- BAM, skupina E – podáván LTA, K kontrolní skupina – podáváno PBS).



Obr. 14: Vliv léčby na teplotu myši – v průběhu celé terapie. Jedničkou je vždy označena teplota nádoru a dvojkou povrchová teplota těla (skupina A – podáván manan-BAM+LPS+LTA, skupina B – podáván manan-BAM+LPS, skupina C – podáván LPS, skupina D – podáván manan- BAM, skupina E – podáván LTA, K kontrolní skupina – podáváno PBS).

Ve třetím pokusu byla provedena analýza přežívání (Obr. 15), aby se zjistilo, jaký má léčba vliv na prodloužení života myši. Ze zaznamenaných dat bylo patrné, že daná léčba neměla velký vliv na přežití myši (i když jedna myš zůstala naživu), protože myši v kontrolní skupině zůstaly skoro stejně dlouho naživu jako myši z ostatních skupin. Myš ve skupině A, tedy terapie pomocí kombinace manan-BAM + LPS + LTA, nicméně nejeví žádné známky nádorového onemocnění a žije již 95 dní ode dne transplantace melanomových buněk (k 15.4.).



Obr. 15: Analýza přežívání provedená v programu MedCalc za použití Kaplan-Meier testu (skupina A – podáván manan-BAM+LPS+LTA, skupina B – podáván manan-BAM+LPS, skupina C – podáván LPS, skupina D – podáván manan- BAM, skupina E – podáván LTA, K kontrolní skupina – podáváno PBS).

## 5. DISKUZE

Volný manan nezpůsobil žádnou redukci nádorového růstu. To odpovídá poznatkům o jeho receptorech. Manózový receptor (MR) je schopen zajistit pohlcení jeho molekul bez dalších následků (Napper a kol. 2001). Určitá hustota výskytu imobilizovaných molekul manózy (mananu) je nutná pro atak MBL (Opanasopit a kol. 2001). Pro fagocytózu obecně platí, že je nutno zajistit aktivaci fagocytárních receptorů ligandy vázanými na povrch mikroorganismů apod. (Underhill a Gantner 2004). Samotný manan nic takového zabezpečit nemohl, ale bylo třeba potvrdit, že povrch nádorových buněk opravdu nebude tyto molekuly žádným způsobem vázat. Underhill a Gantner (2004) zdůrazňují, že pro účinnou imunitní odpověď je třeba, aby došlo k synergii aktivace signálních receptorů s aktivací fagocytárních receptorů. Proto jsme zkoušeli přidat agonistu TLR4, LPS. K synergii nedošlo, manan svoji roli agonisty hrát nedokáže ani za podmínek kostimulace.

V druhém pokusu bylo překvapivé, že pouhá aminace mananu vedla k určitému protinádorovému efektu. Záporně nabitý povrch nádorových buněk zřejmě dokázal správně molekuly mananu orientovat a určitá hustota molekul mohla aktivovat MR nebo MBL, nebo oba receptory s příslušným lytickým či fagocytárním důsledkem.

Manan-BAM byl opatřen kromě PEG spaceru alifatickým řetězcem olejové kyseliny, umožňující kotvení do buněčné stěny, v tomto případě převažujících nádorových buněk. Protinádorový účinek se zvýšil a především jeho kombinace s LPS a LPS/LTA vykazovala velmi silný protinádorový účinek, podporující názory Underhilla a Gantnera (2004). Kombinace mananu s LPS a LTA dokonce vedla sice k ojedinělé, ale jinak velmi pozoruhodné úplné likvidaci nádoru, která se zdá být trvalá.

Vzhledem k tomu, že LPS potlačuje účinně expresi manózových receptorů (Shepherd a kol. 1990), domníváme se, že mechanismus působení manan-BAM vede přes MBL aktivaci tvorby komplementu. Pak LPS i LTA aktivací příslušných TLR mohou stimulovat zánětlivou infiltraci a posílit atak neutrofilů a makrofágů, vážících se prostřednictvím C3R na iC3b ozonizovaný povrch nádorových buněk. LPS může též přímo aktivovat C3R (Hořejší a Bartůňová 2009). Náš názor podporuje i pozorování, že když použijeme manózu kotvenou přes spacer k membráně a interagující zřejmě jen s MR, tak k žádné aditivitě či synergii s LPS nedochází (Kumžáková, *in prep.*).

## 6. ZÁVĚR

- Byla zjištěna nutnost kotvení mananu na buňky nádoru pro dosažení protinádorového efektu.
- Kotvený manan (manan-BAM) v kombinaci s LPS, případně se směsí LPS a LTA, vykázal velmi výrazný synergický efekt projevující se výraznou redukcí nádorového růstu. Kombinace se směsí LPS a LTA vedla v ojedinělém případě k úplnému odstranění nádoru a zřejmě k úplnému vyléčení myši.
- Manan-BAM ve směsi s LPS způsobil redukcí výskytu a intenzity metastáz.
- Bylo zjištěno, že výpovědní hodnota teplot v místě nádoru a mimo nádor je malá a neodráží způsob ani výsledky nádorové terapie.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Bosserhoff A, 2011:** Melanoma Development. *Springer*: 376 pp.

**Clark WH, Mihm MC, 1969:** Lentigo maligna and lentigo-magna melanoma. *American Journal of Pathology* 55(1): 39-67.

**Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard D, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ, 2003:** Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Science* 100(11): 6682-6687.

**Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM, 2011:** Roitt's Essential Immunology, *Blackwell Publishing*: 546 pp.

**Dollinger M, Rosenbaum E, Tempero M, Mulvihill S, 2002:** Everyone's Guide to Cancer Therapy. *Andrews Mc Meel Publishing*: 925 pp.

**Fikrle T, Pizinger K, 2010:** Maligní melanom. *Onkologie* 4(4): 225-228.

**Franks LM, Teich NM, 1999:** Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. *Oxford University Press*: 458 pp.

**Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC, 2001:** The mannan binding lectin pathway of the innate immune response. *Current Opinion in Immunology* 13: 74-78.

**Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO, 2006:** Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes and Immunity* 7: 85-94.

**Gilboa E, 1999:** How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 47(7): 382-385.

**Godar DE, 2011:** Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. *Journal of Skin Cancer* 20(11): 1-6.

**Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, Simpson AJG, Old LJ, Cui Z, 2006:** Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Science* 103(20): 7753-7758.



**Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Malveyh J, Soyer HP, 2012:** Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. *Springer*: 395 pp.

**Hořejší V, Bartůňková J, 2009:** Základy imunologie. *Triton*: 316 pp.

**Houghton AN, 1994:** Cancer antigens: Immune recognition of self and altered self. *The Journal of Experimental Medicine* 180(1): 1-4.

**Igney FH, Krammer PH, 2002:** Immune escape of tumors: Apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology* 71(6): 907-920.

**Janeway CA, Medzhitov R, 2002:** Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.

**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.

**Klener P, Klener P, 2010:** Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. *Grada Publishing*: 232 pp.

**Krejsek J, Kopecký O, 2004:** Klinická imunologie. *Nucleus*: 941 pp.

**Krementz ET, Feed RJ, Coleman WP, Sutherland CM, Carter RD, Campbell M, 1982:** Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic entity. *Annals of Surgery* 195(5): 632-645.

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

**Mačák J, Mačáková J, 2004:** Patologie. *Grada Publishing*: 347 pp.

**Medzhitov R, Janeway CA, 2002:** Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300.

**Metcalf DD, Baram D, Mekori YA, 1997:** Mast cells. *Physiological Reviews* 77(4): 1033-1079.

**Miccozzi MS, 2007:** Complementary and integrative medicine in cancer care and prevention. *Springer Publishing Company*: 478 pp.

**Múdry P, Kýr M, Freiburger T, Jarkovský J, Štěrbá J, Chumchalová J, 2009:** Manózu vázající lektin u dětských onkologických pacientů. *Onkologie* 3(4): 214-218.

**Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M, 2002:** Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences* 70(7): 791-798.

**Napper C, Dyson MH, Taylor ME, 2001:** An extended conformation of the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry* 276(18): 14759-14766.

**Neth OW, Bajaj-Elliott M, Turner MW, Klein NJ, 2005:** Susceptibility to infection in patients with neutropenia: The role of innate immune system. *British Journal of Haematology* 129(6): 713-722.

**Nezu AM, Nezuová CM, Friedmannová SH, Faddisová S, Houts PS, 2004:** Pomoc pacientům při zvládnání rakoviny. *Společnost pro odbornou literaturu*: 311 pp.

**Nygren P, 2001:** What is cancer chemotherapy? *Acta oncologica* 40(2): 166-174.

**Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La Cruz LF, Lopes C, 2007:** Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 79(4): 593-616.

**Opanasopit P, Shirashi K, Nishikawa M, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M, 2001:** In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 280(5): 879-889.

**Pacovský V, 1993:** Vnitřní lékařství. *Osveta-Avicenum*: 344 pp.

**Pathak S, Palan U, 2005:** Immunology: Essential and Fundamental. *Science Publishers*: 411 pp.

**Shepherd VL, Abdolrasulnia R, Garrett M, Cowan HB, 1990:** Down-regulation of mannose receptor activity in macrophages after treatment with lipopolysaccharide and phorbol esters. *The Journal of Immunology* 145(5): 1530-1536.

**Srb T, 2012:** Zhoubné nádory v roce 2009. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* 2: 1-10.

**Stockfleth E, 2010:** Managing skin cancer. *Springer*: 226 pp.

**Šafránková A, Nejedlá M, 2006:** Interní ošetřovatelství II. *Grada Publishing*: 211 pp.

**Torosantucci A, Bromuro C, Chiani C, De Bernardis F, Berti F, Galli CH, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Constantino P, Rappuoli R, Cassone A, 2005:** A novel glyco-

conjugate valine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine* 202(5): 597-606.

**Turner MW, 2003:** The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology* 40: 423-429.

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

**Veselský Z, Macek P, Morávek P, Mat'ha V, Förstl M, Višňovský P, Odrážka K, Vaculíková M, Holub L, 2004:** Základy imunologie nádorových onemocnění. *Urologie pro praxi* 1: 17-19.

**Vorlíček J, Abrahámová J, Vorlíčková H, 2006:** Klinická onkologie pro sestry. *Grada Publishing*: 328 pp.

**Whiteside TL, 2006:** Immune suppression in cancer: Effects on immune cells mechanisms and future therapeutic intervention. *Seminars in Cancer Biology* 16: 3-15.