

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**



# **Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A**

Bakalářská práce

**Eva Waldmannová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc

České Budějovice 2012

Waldmannová, E., 2012: Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A. [Study of cancer therapy based on the use of Zymosan A. Bc. Thesis, in Czech.] – 48p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation:**

The aim of this thesis was to study the efficacy of Zymosan A derived from *Saccharomyces cerevisiae* in anticancer therapy. For this purpose we tried to increase its anticancer influence by combining it with some other immunomodulators.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na 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, 23. 4. 2012

.....

Eva Waldmannová

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení bakalářské práce, za jeho obrovskou ochotu a trpělivost a za množství cenných rad a připomínek. Dále bych ráda poděkovala všem z Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích a kolegům z týmu, kteří mi byli během této práce jakkoliv nápomocni. Mé velké dík patří také rodině a přátelům, kteří mě velmi podporovali v průběhu celého studia.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| 1. Úvod .....  | 1  |
| 1.1 Rakovina .....   | 1  |
| 1.1.1 Vznik nádorů .....   | 1  |
| 1.1.2 Dělení nádorů .....  | 2  |
| 1.2 Melanom .....  | 3  |
| 1.2.1 Epidemiologické charakteristiky melanomu .....   | 3  |
| 1.2.2 Etiologie melanomu .....   | 4  |
| 1.2.3 Klasifikace melanomu .....   | 4  |
| 1.2.4 Melanom B16 .....  | 5  |
| 1.3 Terapie nádorů .....   | 5  |
| 1.3.1 Genová terapie nádorů .....  | 6  |
| 1.3.2 Imunogenová terapie .....  | 6  |
| 1.3.3 Genová terapie s využitím kmenových buněk .....  | 7  |
| 1.4 Imunologie a imunoterapie nádorů .....   | 7  |
| 1.4.1 Nádorové antigeny .....  | 8  |
| 1.4.2 Buňky imunitního systému podílející se na protinádorové imunitě .....                          | 8  |
| 1.4.3 Interakce nádoru a imunitního systému .....  | 11 |
| 1.4.4 Přirozená imunita .....  | 11 |
| 1.4.5 PRRs – pattern (pathogen) recognition receptors .....  | 12 |
| 1.4.6 Přirozená imunitní odpověď na nádorové bujení .....  | 12 |
| 1.4.7 Terapie nádorů založená na stimulaci vrozené imunity .....                                     | 13 |
| 1.5 Terapie nádorů pomocí Zymosanu A (přípravek získávaný ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) ..... | 14 |
| 1.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 14 |
| 1.5.2 Zymosan .....  | 15 |
| 1.5.3 Beta glukan .....  | 15 |
| 1.5.3.1 Beta glukan a imunitní odpověď .....   | 16 |
| 1.5.3.2 Beta glukan a protinádorová aktivita .....   | 16 |
| 1.5.4 Mannan .....   | 17 |
| 1.5.5 Receptory rozpoznávající komponenty Zymosanu A .....   | 17 |
| 1.5.5.1 TLRs – Toll-like receptory .....   | 17 |
| 1.5.5.2 Dectin-1 .....   | 17 |
| 1.5.5.3 MBL- Mannose binding lectin .....  | 18 |
| 1.5.5.4 Manózový receptor (MR) .....   | 18 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.5.6 Terapeutické využití Zymosanu A v léčbě nádorů .....   | 19        |
| <b>2. Cíle práce.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3. Materiál a metody.....</b>   | <b>21</b> |
| 3.1 Chemikálie.....  | 21        |
| 3.2 Laboratorní zvířata .....  | 21        |
| 3.3 Buněčné linie .....  | 21        |
| 3.4 Příprava melanomových buněk B16-F10 .....  | 21        |
| 3.5 Transplantace melanomu B16-F10.....  | 22        |
| 3.6 Měření velikosti nádorů.....   | 22        |
| 3.7 Měření teploty nádorů .....  | 22        |
| 3.8 Odebírání krve z ocasu .....   | 22        |
| 3.9 Počítání metastáz.....   | 23        |
| 3.10 Izolace makrofágů .....   | 23        |
| 3.11 Izolace neutrofilů.....   | 23        |
| 3.12 Stanovení množství C-reaktivního proteinu .....   | 24        |
| 3.13 Sonikace.....   | 24        |
| 3.14 Statistické zpracování dat .....  | 24        |
| 3.15 Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A na růst melanomu.....                                    | 24        |
| 3.16 Pokus č. 2: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagellinem na růst melanomu .....    | 25        |
| 3.17 Pokus č. 3: Studium vlivu kotveného Zymosanu A s přidáním makrofágů a neutrofilů na růst melanomu ..... | 26        |
| 3.18 Pokus č. 4: Ověření vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s makrofágy na růst melanomu .....            | 27        |
| <b>4. Výsledky .....</b>   | <b>28</b> |
| 4.1 Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A na růst melanomu.....                                     | 28        |
| 4.2 Pokus č. 2: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagellinem na růst melanomu .....     | 32        |
| 4.3 Pokus č. 3: Studium vlivu kotveného Zymosanu A s přidáním makrofágů a neutrofilů na růst melanomu .....  | 35        |
| 4.4 Pokus č. 4: Ověření vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s makrofágy na růst melanomu .....             | 37        |
| <b>5. Diskuze.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>6. Souhrn.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>7. Seznam použité literatury .....</b>  | <b>43</b> |

# 1. Úvod

## 1.1 Rakovina

Rakovina je obecné pojmenování pro skupinu onemocnění, způsobených nekontrolovatelným dělením nádorových buněk, v nejrůznějších orgánech a tkáních těla. Název rakovina byl vytvořen z nepřesného překladu slova „cancer“. Nádory prsu mnohdy svým tvarem připomínají kraba (ne raka), od něhož byl v počátcích medicíny název odvozen. Rakovina je charakterizována vznikem zhoubných (maligních) buněk, které mohou pronikat do okolních tkání, a tam zakládat vzdálené nádory (metastázy) (Altaner 2008).

### 1.1.1 Vznik nádorů

Živočišný organismus je během svého života vystaven řadě vlivů, které mohou vést k mutačním změnám v jeho buňkách. Převážná většina mutací je neustále opravována nebo těžce poškozené buňky zanikají pomocí apoptózy. Pokud tyto mechanismy selžou, může dojít k akumulaci mutací v genech kontrolujících růst buňky, což může vést k její aktivaci. Nahromadění mutací v kmenové nebo progenitorové buňce vede ke vzniku kmenové nádorové buňky. Pokud dojde k mutačním změnám v diferencované buňce, získá schopnost sebeobnovy a stává se tak zárodkem nádoru (Altaner 2008).

Příčin vzniku nádorů je mnoho a řadu z nich stále ještě neznáme. Faktory podílející se na vzniku nádorů jsou označovány jako faktory kancerogenní, a mohou být fyzikální, chemické, biologické nebo genetické povahy (Klener a kol. 2002).

Mezi fyzikální vlivy patří především ionizující záření, které má prokazatelný vliv na vznik nádorových onemocnění, především leukemií (např. u populace, která přežila výbuch atomové bomby). Dále také zvýšené ultrafialové záření (zvláště UV-B) vede ke vzniku kožních nádorů (Mačák a Mačáková 2004).

Mezi chemické faktory s kancerogenním účinkem řadíme například polycyklické aromatické uhlovodíky, které jsou obsaženy v tabákovém kouři, ve výfukových plynech a průmyslových exhalacích. Dále také nitrosaminy obsažené v uzeninách a aflatoxiny, které vznikají v plísních (Klener a kol. 2002).

Z biologických faktorů mají největší význam viry. Mezi nejznámější patří např. virus Epstein-Baarové, spojovaný se vznikem Burkittova lymfomu. K dalším virům podílejícím se na vzniku nádorů řadíme např. papilomaviry a skupinu herpes virů (Mačák a Mačáková 2004).

Neopomenutelné jsou také faktory genetické. Nádorová onemocnění nejsou sice dědičná, ale existují určité dispozice vedoucí ke zvýšenému riziku vzniku nádorových onemocnění v jedné rodině (tzv. karcinomové rodiny). Jsou známa také některá geneticky podmíněná onemocnění a vývojové vady, které mají vztah k vzniku nádorového onemocnění (např. familiární polypóza tlustého střeva a karcinom tlustého střeva) (Klener a kol. 2002).

### 1.1.2 Dělení nádorů

Nádory se dělí podle několika aspektů. Na základě biologických vlastností dělíme nádory na benigní, intermediární a maligní (Mačák a Mačáková 2004).

**Benigní nádory** jsou zpravidla pomalu rostoucí, ohraničené a opouzdržené nádory. Nádor je vzhledem k okolí pohyblivý. Buňky připomínají normální buňky, jsou zralé a diferencované. Růst je expanzivní a nádory nemetastazují (Mačák 2002).

**Intermediární nádory** jsou na rozhraní mezi benigními a maligními nádory. Jejich prognóza je obecně lepší než u maligních nádorů, ale mohou recidivovat a v některých případech vznikají také metastázy (Mačák a Mačáková 2004).

**Maligní nádory** jsou rychle rostoucí, nepřesně ohraničené a často bývají neopouzdržené. Nádor je nepohyblivý proti okolí nebo spodině. Buňky jsou velmi málo diferencované nebo zcela nezralé, jsou nestejně velké, pleomorfní a mají velká jádérka. Jejich růst je infiltrativní a nádory vytvářejí vzdálená ložiska- metastázy (Mačák 2002).

Nádory můžeme dále také dělit podle původu histogeneze na mezenchymové, epitelové, neuroektodermové a smíšené (různé) (Mačák 2002, Vorlíček a kol. 2006).

- **Mezenchymové nádory**

- benigní: fibrom (z kolagenního vaziva), myxom (z hlenového pojiva), lipom (z tukové tkáně), chondrom (z chrupavky), angiom (z cévy), rabdomyom (z příčně pruhovaného svalstva), chordom (z chorda dorsalis),

- maligní: obecně je nazýváme sarkomy, blíže charakterizované např. fibrosarkom, chondrosarkom atd., ale také sem řadíme leukemie a lymfomy

- **Epitelové nádory**
  - benigní: papilom (z povrchového epitelu), adenom (ze žlazového epitelu)
  - maligní: obecně se nazývají karcinomy (vycházejí z epitelů entodermálního, ektodermálního a mezodermálního)
- **Neuroektodermové nádory**

Lze je rozčlenit na nádory CNS, nádory periferní nervové soustavy a na nádory kůže a sliznic (melanocyty).

  - benigní: meningeom (CNS), pigmentový névus (kůže)
  - maligní: neuroblastom (CNS), melanom (kůže)
- **Smíšené nádory** jsou takové nádory, ve kterých se nachází dvě morfologicky odlišné struktury např. osteofibrom. Nebo se může také vyskytnout kombinace ze dvou zárodečných listů např. adenofibrom.

## 1.2 Melanom

Melanom je zhoubný nádor z melanoblastů, tj. nezralých melanocytů, což jsou buňky neuroektodermového původu. Zralé melanocyty se nachází mezi buňkami bazální vrstvy pokožky, nebo se mohou vytvářet hnízda melanocytů (névových buněk) ve škáře jako tzv. mateřská znaménka. Jejich hlavním znakem je, že tvoří melanin (Mačák a Mačáková 2004).

### 1.2.1 Epidemiologické charakteristiky melanomu

Maligní melanom postihuje především bílou rasu, u asiátů a černochoů ho nalezneme jen vzácně. Nejvíce ohroženi jsou lidé s kožním fototypem I, II, a III, tedy ti se světlejší kůží, u kterých hrozí velké riziko spálení na slunci (Petruželka a kol. 2002).

Incidence melanomu v České republice, stejně jako po celém světě, stále stoupá. V roce 1975 byl počet nových onemocnění melanomem 4/100 000 obyvatel, v roce 1998 to bylo již 12/100 000 (Petruželka a kol. 2002) a v současné době se udává 18-21/100 000 obyvatel (Srb 2012).



## 1.2.2 Etiologie melanomu

Hlavní a přesná příčina vzniku melanomu není doposud známá, ale za hlavní faktory vzniku melanomu se považuje působení slunečního záření a to jak UV-A tak UV-B složky. Významnou roli hraje také kožní fototyp. Mezi další rizikové faktory řadíme mnohočetné pigmentové névy, obrovské kongenitální névy a výskyt melanomu v rodině (Petruželka a kol. 2002).

Dědičného původu je 2-5 % melanomů. Největší význam má mutace genu *p16* (*CDKN2*), s menší četností se vyskytuje mutace genu *BRCA2* (Petruželka a kol. 2002).

## 1.2.3 Klasifikace melanomu

Klinicky a histologicky rozlišujeme čtyři základní typy melanomu (Čáp a kol. 2005).

- **Povrchově se šířící melanom** (SSM-Superficial Spreading Melanoma)

Představuje až 2/3 všech melanomů. Vyskytuje se kdekoliv na těle, u žen nejčastěji na bérkách a u mužů na trupu (Čáp a kol. 2005). Obrys melanomu má tendenci vytvářet části kruhu, kompletní kruh je tvořen jen vzácně. U nepravidelného ohraničení se vyskytuje buď zubatý ledvinovitý tvar, nebo vybíhá ve více nepravidelných výčnělků. Léze jsou často snadno zjistitelné hmatem, protože vystupují 2-4 mm nad povrch ostatní kůže. Velmi důležitým aspektem je také barva. Objevují se kombinace světle hnědé, hnědé, šedé, černé, fialovo-růžové, a dokonce také modré a bílé (Clark a kol. 1969).

- **Nodulární melanom** (NM-Nodular Melanoma)

Tvoří asi 10-15% všech melanomů (Čáp a kol. 2005). Pro tento typ melanomu je charakteristická tmavá, modro-černá barva a podle vzhledu rozlišujeme 3 druhy. První typ představuje hladká, jednotná bulka připomínající borůvku, která se nachází těsně pod povrchem kůže. Druhou variantou je modro-černá vyvýšená plocha s nepravidelnými okraji a třetí je zevně rostoucí, často vředovitá léze (Clark a kol. 1969).

- **Lentigo maligna melanom** (LMM-Lentigo Maligna Melanoma)

Lentigo maligna řadíme mezi prekancerózy, netvoří metastázy a má dlouhodobý růst (5-20 let). Vyskytuje se především u starších lidí na hlavě, obličeji a krku. A asi u jedné třetiny pacientů přechází do malignity, pak mluvíme o lentigo maligna melanomu (Čáp a kol. 2005). Tento melanom obvykle pokrývá poměrně velkou plochu a může být zaměňován s povrchově se šířícím melanomem. Většinou nacházíme nahodilé kombinace barev světle

hnědé, hnědé nebo také černé skvrny na hnědém pozadí. Vyskytuje se i modrá a bílá, v pozdějších stádiích nemoci se často objevují samostatné modro-černé uzlíky (Clark a kol. 1969).

- **Akrolentiginózní melanom (ALM- Acral Lentiginous Melanoma)**

Nejčastěji se objevuje u černochů a asiátů, u bělochů je poměrně vzácný (asi 3% melanomů). Je lokalizován v místech bez přítomnosti vlasových folikulů, tedy na dlaních, chodidlech nebo pod nehty. Klinicky je podobný ostatním typům melanomu. Pokud dojde ke vzniku uzlu v nepravidelně pigmentovaném plošném ložisku je patrný již invazivní růst (Fikrle a Pizinger 2010, Ditrichová a Tichý 2006).

### **1.2.4 Melanom B16**

Použití myšího melanomu B16, a to jak solidního tumoru, tak jeho metastáz, se stalo velmi důležitým v onkologickém výzkumu. Tento model se začal používat ke studiu metastáz v roce 1970, samotná buněčná linie byla charakterizována už v roce 1954. Tento tumor spontánně vznikl na myších C57BL/6J v Jackson Laboratories. Bylo pozorováno, že tento melanom může metastazovat do plic, jater a sleziny (Teicher a kol. 2011).

Jsou popsány čtyři odlišné buněčné linie myšího melanomu B16-F0, -F1, F10 a BL6. Model B16-F10 má velmi dobrou schopnost metastazovat do plic (Nakamura a kol. 2001).

## **1.3 Terapie nádorů**

Nádorové onemocnění je velmi rozmanité a k léčbě většinou nestačí jediná léčebná metoda. Větších úspěchů je možno dosáhnout kombinací některých terapeutických metod: chirurgické léčby, radioterapie, chemoterapie a za pomoci účinné podpůrné léčby. Rozvíjející jsou také experimentální metody jako je genová terapie, využití kmenových buněk a imunoterapie.

Léčbu nádorů můžeme rozdělit na kurativní a paliativní. Cílem kurativní léčby je skutečná likvidace nádorového procesu, zatímco paliativní terapie se zaměřuje na alespoň částečný ústup nádoru nebo zabránění jeho dalšího postupu a na zmírnění obtíží nemocného.

Pokud nejsou ještě vytvořeny metastázy, je velmi úspěšnou metodou chirurgická léčba, kdy se odstraní nádor s jeho kmenovými buňkami. V případě, že nádor není odstraněn včas, se mohou kmenové buňky rozšířit do jiných částí těla a tam zakládat sekundární nádory.

V těchto případech se chirurgická léčba kombinuje s radioterapií a chemoterapií (Altaner 2008, Pacovský 1993).

Při radioterapii se využívá především elektromagnetického záření a tok elektronů. Radioterapie se obecně dělí na zevní (externí) radioterapii (teleterapie) a brachyradioterapii (brachyterapie). U zevní radioterapie je zdroj záření umístěn mimo tělo pacienta, zatímco při brachyradioterapii je zdroj záření zaveden do těsné blízkosti ložiska nebo přímo do tkáně či orgánu, ve kterém se nádor nachází (Šlampa a kol. 2007).

Chemoterapie může působit buď cytotoxicky, nebo cytostaticky. Zatímco klasická cytotoxická chemoterapie zabíjí buňky, které se aktivně dělí, cytostatická cílená terapie v buňkách specificky blokuje určitou metabolickou dráhu, a tím znemožňuje nádorovým buňkám se dále množit (Altaner 2008).

### **1.3.1 Genová terapie nádorů**

Rakovina je onemocnění našich genů. Primární příčina rakoviny je nahromadění genetických změn v buňce způsobených mutacemi, a proto se náhrada poškozených genů jeví jako dobrá metoda léčby nádorů. Tato terapie se zabývá příčinou nádorové choroby a na rozdíl od konvenční léčby nemá vedlejší toxické účinky. Rozhodujícím faktorem genové terapie je účinnost vkládání DNA do buněk. Některé mechanismy jsou už známé a stále se vyvíjejí nové (Altaner 2008).

### **1.3.2 Imunogenová terapie**

Principem tohoto typu terapie je upravit nádorovou buňku tak, aby byla snáze rozpoznatelná imunologickým systémem hostitele. Vložením cizích antigenů do nádorové buňky se docílí zvýšené imunogenicity nádoru. Tato imunoterapie je zaměřená na indukci nádor-specifických T-lymfocytů, které mají schopnost účinně odstraňovat stávající nádorové buňky. Její úspěšnost je závislá na identifikaci nádorových genů.

Pomocí nádorové vakcíny je možno dosáhnout zvýšené buněčné a humorální imunologické odpovědi hostitele na nádor. Tyto vakcíny jsou geneticky modifikované nádorové buňky pacienta, které jsou transdukovány *in vitro* geny kódujícími různé cytokiny, TNF-alfa, gama-interferonem anebo heterologními HLA molekulami. Takto upravené nádorové buňky se nitrožilně aplikují zpět do těla pacienta (Altaner 2008).

### 1.3.3 Genová terapie s využitím kmenových buněk

Mezenchymové kmenové buňky (MSC) izolované z kostní dřene nebo tukové tkáně mají velmi dobrou schopnost migrovat směrem k nádorovým buňkám. Pomocí rozpustných faktorů a zánětlivých signálů uvolňovaných z nádoru se MSC začleňují do nádorové masy a tvoří podpůrnou nádorovou tkáň. Velmi slibnou metodou se zdá být modifikace kmenových buněk *ex vivo* s následnou transplantací pozměněných buněk pacientovi. Hlavním cílem je nahradit nefunkční nebo špatně fungující geny v kmenových buňkách pacienta, a to geny, které jsou správně regulovány a produkují normálně fungující bílkoviny. Další možností je využít schopnosti MSC rozeznávat nádor jako poškození tkáně. Směřují k nádoru ve snaze tkáň opravit a stávají se tak spolutvůrcem nádorové hmoty. Geneticky upravené MSC mohou nést cizorodý enzym, který má schopnost přeměnit netoxickou látku na účinné cytostatikum (Altaner 2008).

## 1.4 Imunologie a imunoterapie nádorů

Imunitní odpověď organismu může být buď nespecifická (přirozená) nebo specifická (získaná). K složkám přirozené imunity řadíme systém komplementu, makrofágy/monocyty, granulocyty a trombocyty. Získaná imunita se zabývá funkcí a změnami v lymfocytech T i B. Dále lze dělit imunitu na buněčnou a humorální (Veselský a kol. 2004).

Nádorová imunologie se zabývá vzájemnými souvislostmi mezi nádorem a imunitním systémem. Poukazuje na roli imunitního systému v obraně proti vývoji nebo růstu nádoru a zobrazuje možnosti, jak tuto obranyschopnost zvýšit. Nádorová imunologie hraje také významnou roli v imunodiagnostice nádorů a při objasňování poruch imunitního systému u pacientů s nádorem (Eckschlager a Průša 2002).

Historie nádorové imunologie je velmi dlouhá a za jejího zakladatele můžeme považovat Paula Ehrlicha. Ten jako první přišel s hypotézou, že imunitní systém aktivně monitoruje tkáň a orgány, aby mohl včas rozpoznat a zničit transformované buňky (imunitní dozor). Velmi významně přispěl také William Coley, který přišel s účinnou imunoterapií, založenou na nespecifické aktivaci imunitního systému směsí umrtvených bakterií, konkrétně *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* (Coley 1910). Významnou roli hrála také ve 40. a 50. letech zjištění, že nádory transplantované inbredním kmenům myši indukují specifickou imunitní odpověď (Hatina 2005).

### 1.4.1 Nádorové antigeny

Nádorové antigeny napomáhají imunitnímu systému rozpoznat buňky nádoru a mají význam jak pro pasivní, tak pro aktivní imunoterapii. Existence nádorových antigenů umožňuje imunoterapeutické přístupy, které jsou specifické pro nádorové buňky a nezaměřují se na buňky normální. Antigeny jsou rozpoznávány antigenními receptory, kterými jsou u humorální imunity imunoglobuliny produkované B-lymfocyty, u buněčné imunity antigen rozeznávají T-buněčné receptory (TCR). Co se týče efektorových buněk, hrají u protinádorové imunity zásadní roli cytotoxické T-lymfocyty (CTL) a přirození zabíječi (NK buňky) (Hatina 2005, Marcus a kol. 2007).

Nádorové antigeny můžeme rozdělit do dvou velkých skupin, na antigeny s nádory spojené (TAA- tumor associated antigens) a antigeny nádorově specifické (TSA- tumor specific antigen).

**TAA** se vyskytují na nádorových buňkách a za určitých podmínek i na buňkách normálních. Patří sem tzv. diferenciacní antigeny, kdy například u melanomu najdeme nádorové antigeny v buňkách melanomu, ale také v normálních melanocytech. Obsahují nádorový antigen MART-1/MelanA, proti kterému se rozvíjí cytotoxická aktivita. Mezi diferenciacní antigeny patří také glykoprotein gp100a tyrozináza (Krejsek a Kopecký 2004). Mezi TAA dále řadíme onkospermatogonální antigeny, které jsou fyziologicky exprimovány při spermatogenezi a jsou aktivovány v průběhu nádorové transformace (Hatina 2005).

**TSA** jsou exprimovány pouze na konkrétním typu nádoru, který se vyskytuje u konkrétního jedince, a vznikly z genových mutací v normálních genech. Řadíme sem především mutačně změněné onkogeny a tumor supresorové geny (Krejsek a Kopecký 2004, Hatina 2005).

### 1.4.2 Buňky imunitního systému podílející se na protinádorové imunitě

Buňky, které se významně účastní protinádorové imunitní odpovědi, jsou zejména leukocyty. V průběhu nádorového onemocnění dochází ke změně jejich funkce i struktury, které jsou detekovatelné pomocí průtokové cytometrie. Řadíme sem makrofágy/monocyty, granulocyty, dendritické buňky a lymfocyty (Veselský a kol. 2004).

**Makrofágy** jsou buňky, které vycestovaly do tkáně, a vznikly z monocytů, buněk cirkulujících v periferní krvi. Makrofágy se vyskytují ve všech orgánech těla a mají velký význam při zahájení imunitní odpovědi. Makrofágy jsou významnými fagocytujícími

buňkami vrozené imunity, ale uplatňují se také jako profesionální APC (antigen prezentující buňky) ve specifické imunitě. Plně funkčními se makrofágy stávají až po aktivaci cytokiny (INF  $\gamma$ , TNF) produkovanými T lymfocyty. Aktivované makrofágy sekretují složky komplementu, hydrolytické enzymy a TNF- $\alpha$ , který se zřejmě uplatňuje v protinádorové imunitě. Makrofág má schopnost rozpoznávat mikrobiální vzory asociované s patogenem (PAMP) za pomoci membránových receptorů (PRR- Pattern-Recognition Receptor). (Krejsek a Kopecký 2004, Veselský a kol. 2004).

Makrofágy asociované s nádory (TAM) představují nejpočetnější skupinou leukocytů přítomných v nádoru. TAM mají schopnost podporovat růst nádoru a jeho metastatický potenciál. Stávají se pro něj totiž zdrojem růstových látek a produkují cytokiny, které mají angiogenetický potenciál. Pokud jsou ale TAM aktivovány, vykazují cytotoxickou aktivitu proti nádorovým buňkám. Růst nádoru ovlivní poškozením cévního endotelu (Krejsek a Kopecký 2004, Mantovani a kol. 2006)

**Granulocyty** jsou nejpočetnější skupinou leukocytů a jsou nezastupitelnou složkou imunitního systému. Mají schopnost fagocytózy a jsou významným zdrojem cytokinů. Granulocyty obsahují aktivní látky, které mají za cíl eliminovat infekční agens. Jejich působení je ale nespecifické, a dochází tak k poškozování vlastních struktur. Životnost granulocytů je poměrně krátká, dosahuje několika desítek hodin a za určitých podmínek až sto hodin. Granulocyty můžeme podle typu granul dělit na bazofilní, eozinofilní a neutrofilní. Největší význam mají neutrofile. Úplně diferenciovaný neutrofil nese molekuly CD15,CD33 a částečně také CD13 (Krejsek a Kopecký 2004).

**Dendritické buňky** řadíme mezi tzv. antigen prezentující buňky (APC). Dendritické buňky (DC) jsou rozptýleny ve všech orgánech těla, čímž je zvýšena možnost setkání s invadujícími mikroorganismy. Náhodné setkání mikroorganismů nebo poškození tkáně spustí migraci dendritických buněk do lymfatických orgánů. Dendritické buňky jsou účinnými aktivátory B a T lymfocytů (Banchereau a Steinman 1998).

U myších dendritických buněk můžeme rozlišit několik subtypů. Odlišné subtypy byly u myších dendritických buněk pozorovány dříve než u lidských, a to z důvodu snadné dostupnosti různých myších lymfoidních tkání a za pomoci markerů, vyskytujících se na myších dendritických buňkách. Myší dendritické buňky, které jsou klasifikovány jako zralé, vyjadřují CD11c a kostimulační molekuly CD80, CD86 a CD40. Užitečné pro rozlišování subtypů jsou také markery na T lymfocytech CD4 a CD8, dále pak také markery CD11b a CD205 (Shortman a Liu 2002).

**NK buňky** (Natural Killer) neboli přirození zabíječi, hrají významnou roli v přirozené imunitě. Jsou to velké granulární lymfocyty, tvořící asi 5-10% lymfocytů v periferní krvi. NK buňky jsou schopny i bez předchozí senzibilizace velmi rychlé odpovědi, a cytotoxická reakce není závislá na přítomnosti antigenů MHC. Aktivované NK buňky produkují některé cytokiny jako např. INF- $\gamma$ , GM-CSF a TNF- $\beta$ , dále produkují také chemokiny. NK buňky jsou CD3 negativní, protože nemají vyjádřen receptor pro T lymfocyty (TCR). Pro všechny NK buňky je charakteristická membránová molekula CD7 (Kopecký a Kopecký 2010).

V protinádorové imunitě se uplatňují také buňky specifické imunity, mezi které řadíme T a B lymfocyty.

**Lymfocyty typu T** svoji diferenciaci ukončují v thymu, odkud také nesou svůj název. Antigen rozpoznávají pouze ve spojení s MHC molekulami. Populace T lymfocytů exprimuje molekulu CD3 a dělí se na subpopulaci pomocných induktorových T lymfocytů - Th (helpery), které nesou CD4+ a subpopulaci tlumivých cytotoxických T lymfocytů – Tc, které exprimují CD8+ (Krejsek a Kopecký 2004).

Th lymfocyty můžeme dále dělit na dva subsety odlišující se funkcí a produkovanými cytokiny. Hlavní funkcí subsetu Th1 je spolupráce s makrofágy a jejich stimulace k přeměně v aktivované makrofágy. Produkovanými cytokiny Th1 buněk jsou např. IFN- $\gamma$  a IL-2. Druhý subset Th2 spolupracuje s B lymfocyty, které byly předem stimulovány rozeznáním antigenu. Tato pomoc B lymfocytům je založena na sekreci cytokinů (především IL-4, IL-5 a IL-6) a přímém mezibuněčném kontaktu (Hořejší a Bartůňková 2005).

Další skupinou T lymfocytů jsou regulační (tlumivé) lymfocyty - Treg, které mají schopnost potlačit působení jiných efektorových T lymfocytů. Exprimují molekulu CD4+, CD25 a FoxP3. Treg potlačují autoimunitní reakce, které mohou být vyvolány jinými T lymfocyty (Hořejší a Bartůňková 2005).

**Lymfocyty typu B** jsou součástí specifické humorální imunity. Jejich vývoj probíhá u lidí v kostní dřeni, a k dokončení dojde v sekundárních lymfatických orgánech po setkání s antigenem. Posledním diferenačním stádiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky. Imunitní odpověď vedoucí k tvorbě protilátek, je podmíněna spoluprací s T lymfocytárním systémem. B lymfocyty mohou fungovat i jako antigen prezentující buňky pro T lymfocyty. Pro B lymfocyty je charakteristická schopnost migrovat, jak během svého vývoje, tak při vlastní imunitní odpovědi. Tento pohyb je regulován pomocí chemokinů. B lymfocyty exprimují MHC molekuly II. třídy a kostimulační molekuly (Krejsek a Kopecký 2004, Veselský a kol. 2004).

### 1.4.3 Interakce nádoru a imunitního systému

Protinádorová imunitní odpověď prochází v průběhu karcinogeneze třemi stádii. V prvním stádiu imunitního dozoru (immune surveillance) je imunitní systém schopen rozpoznat a zničit transformovanou buňku dříve, než by z ní mohl vzniknout nádor. Dalším stádiem je fáze rovnováhy (equilibrium), kdy populace nádorových buněk zůstává konstantní, ale není ještě klinicky detekovatelná. Imunitní systém ji však nedokáže eliminovat. V případě klinicky detekovatelných nádorů mluvíme o úniku z imunitního dozoru (escape). Těchto únikových mechanismů je celá řada a nádorové buňky jsou pomocí nich schopny uniknout imunitnímu systému. Na tomto úniku se podílejí jak nádorové buňky, tak některé buňky imunitního systému, především s nádory asociované makrofágy (TAM) a CD4+CD25+ regulační T lymfocyty (Hatina 2005).

### 1.4.4 Přírozená imunita

Přírozená (nespecifická) imunita je evolučně starší než imunita specifická a v určité formě se objevuje u všech mnohobuněčných organismů. Mechanismus přírozené imunity je aktivován ihned po infekci, ale nevytváří se u něj imunologická paměť. Je tvořena především složkami komplementu a fagocyty. Na rozdíl od specifické imunity, je rozpoznání přírozené imunity zprostředkováno receptory kódovanými v zárodečných liniích, čímž je specifická každého receptoru geneticky předurčena (Medzhitov a Janeway 2000).

Receptory přírozené imunity jsou schopny rozpoznávat mikrobiální struktury, které jsou označovány jako s patogenem asociované molekulové vzory (PAMPs). Tyto vzory jsou identifikovány pomocí receptorů PRRs (Pattern-Recognition Receptors). PRRs jsou exprimovány na řadě buněk přírozené imunity, zejména na makrofázích a dendritických buňkách, zjištěny byly také na B lymfocytech. PAMPs můžeme charakterizovat jako mozaiky povrchových a nitrobuněčných molekul mikroorganismů, které se nevyskytují v hostiteli. Mezi tyto molekulové vzory řadíme endotoxiny (lipopolysacharidy), které najdeme u gramnegativních bakterií, peptidoglykany grampozitivních bakterií, glukany a mannany charakteristické pro kvasinky a plísňe. PAMPs představují pro tyto mikroorganismy struktury, které jsou nezbytné pro jejich životní funkce (Krejsek a Kopecký 2004, Hořejší a Bartůňková 2005).



### **1.4.5 PRRs – pattern (pathogen) recognition receptors**

Funkčně můžeme receptory PRR rozčlenit do tří tříd- sekretované, endocytární a signální. Sekretované receptory fungují jako opsoniny, které se váží na mikrobiální stěny. Jejich vazba umožní fagocytyjícím buňkám a komplementovému systému rozpoznat mikrobiální povrchy. Mezi nejznámější PRR tohoto typu patří lektin vázající mannan (Mannan Binding Lectin, MBL). Endocytární PRR se nacházejí na povrchu fagocytyjících buněk. Po rozpoznání mikrobiálních PAMPs zajistí PRR jejich vazbu na povrch fagocytů, které umožní jejich usmrcení a rozkládání v lyzomálních kompartmentech buňky. Touto cestou vznikají antigenní fragmenty, které jsou ve spojení s MHC molekulami II. třídy prezentovány T lymfocytům na povrchu antigen prezentujících buněk. Zástupci této třídy jsou makrofágový receptor pro manózu (MR), receptor  $\beta$ -glukanu (Dectin-1), formylpeptidové receptory (FPR) a scavengerové receptory. Posledním typem jsou signální receptory, které identifikují nebezpečné vzory PAMP a aktivují signální systém NF $\kappa$ B, který indukuje expresi genů, které vedou k regulaci imunitní odpovědi. Obsahují geny pro prozánětové cytokiny a geny pro některé kostimulační molekuly. Mezi nejvýznamnější receptory této skupiny patří receptory TLR (Toll-like receptor) (Krejsek a Kopecký 2004).

### **1.4.6 Přírozená imunitní odpověď na nádorové bujení**

Dříve se za hlavní složku protinádorové imunity považovala specifická imunita, dnes už ale není opomíjen ani zásadní vliv imunity přirozené. Aktivované buňky přirozené imunity, zvláště dendritické buňky a makrofágy, zpracovávají nádorové antigeny, které jsou pak prezentovány ve spojení s molekulami MHC I. nebo II. třídy. Rozpoznáním těchto komplexů dostanou T lymfocyty I. aktivační signál, který musí být nezbytně doplněn o II. signál, což jsou interakce kostimulačních molekul antigen prezentujících buněk a T lymfocytů, v optimálním cytokinovém prostředí (Krejsek a Kopecký 2004).

Dendritické buňky mají pro rozvoj imunitní odpovědi zásadní význam, protože slouží jako antigen prezentující buňky pro T lymfocyty. Dendritické buňky pohlcují nádorové buňky makropinocytózou nebo menší vezikule pak pomocí fagocytózy. K zesílení jejich funkce dochází pomocí Fc fragmentu imunoglobulinů IgG a receptoru pro manózu. Nádorové antigeny jsou zpracovávány v průběhu migrace dendritických buněk do sekundárních lymfatických orgánů, která je regulována pomocí chemokinů (Krejsek a Kopecký 2004).

Polymorfonukleáry (PMNs) jsou obvykle málo reaktivní složkou nádorů. Nicméně nedávné studie naznačují, že se aktivně účastní imunitního dozoru. Tyto zajímavé výsledky pravděpodobně souvisí s vzájemným působením množství a druhu cytokinů a chemotaktických faktorů, které jsou přirozeně uvolňovány nádorovými buňkami, a stupněm přijetí a aktivací PMNs. Zničení nádoru prostřednictvím aktivovaných PMNs je dosaženo uvolněním množství jejich faktorů (cytokiny, enzymy, chlorinové oxidanty, atd.), jejichž účinky vedou k přímému zabití nádorových buněk, extracelulární lýze, potlačení angiogeneze a aktivaci dalších reaktivních buněk. To vede k produkci NK buněk, T lymfocytů a spuštění na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity (ADCC) (Di Carlo a kol. 2001).

Důležitou součástí protinádorové imunity jsou také NK buňky, které rozeznávají nádorové buňky pomocí membránových receptorů. Mohou poskytovat cytotoxické buňce buď aktivační signály, kdy se uplatní lytické mechanismy vedoucí ke smrti nádorové buňky, nebo signály inhibiční, které umožní uniknout cytotoxickému působení (Krejsek a Kopecký 2004).

Významnou roli v přirozené imunitě hraje interferonový systém. Nejen virové infekce, ale také nádorové buňky jsou podnětem pro tvorbu interferonů. Interferony mají antiproliferativní a cytotoxické účinky, dále také modulují protinádorovou imunitu (Krejsek a Kopecký 2004).

#### **1.4.7 Terapie nádorů založená na stimulaci vrozené imunity**

Již v dřívějších dobách si lidé všimli, že bakteriální infekce mohou vést k určitému ústupu nádorů. Průkopníkem této teorie se stal William Coley, který se ve svých pokusech snažil vyléčit pacienty s nádorem pomocí bakterie *Streptococcus pyogenes* (Coley 1891). Později se pro zlepšení výsledků pokusil aplikovat směs bakteriálních kultur *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, která byla více virulentní. Směs těchto dvou teplem usmrcených bakterií byla nazvána Coley toxin. Po aplikaci této směsi docházelo k celkové aktivaci imunitního systému, tudíž i jeho části směřované proti nádorovým buňkám (Coley 1910).

Na počátku 20. století bylo zjištěno, že u pacientů s tuberkulózou se nádorová onemocnění objevují v daleko menší míře. Proti tuberkulóze byla poprvé v roce 1921 použita BCG (bacille Calmette-Guérin) vakcína, která obsahuje bakterie *Mycobacterium bovis* izolované z krav s tuberkulózní mastitidou. O několik let později (1930) byla BCG vakcína použita také k léčbě rakoviny. Přesný mechanismus účinku BCG vakcíny není zcela znám, ale pravděpodobně působí na stimulaci imunitního systému (Meyer a kol. 2002).

Přirozenou imunitou se ve svých pokusech na myších zabýval prof. Cui, který zjistil, že vrozená imunita dokáže zničit i plně rozvinutý nádor. Pozoroval, že myši se SR/CR mutací (spontánní regrese/kompletní rezistence) odolávají vysokým dávkám nádorových buněk, které jsou pro normální myši smrtelné, i v daleko menší dávce. Tato odolnost je způsobená převážně díky tomu, že jejich leukocyty (neutrofilny, makrofágy a NK buňky) mají schopnost rozpoznat nádorové buňky jako cizorodé a nepřátelské a rychle je likvidovat. Co je příčinou této nezvyklé schopnosti je dosud předmětem výzkumu (Cui a kol. 2003, Hicks a kol. 2006).

V současné době probíhá snaha o stimulaci imunitní odpovědi různými, převážně syntetickými analogy agonistů TLR receptorů. Imidazoquinolin, agonista TLR7 a 8, je silným aktivátorem dendritických buněk a má protinádorovou aktivitu. Imidazoquinolin byl testován např. na karcinomu ledvin u myší, kdy už první dávka snížila růst nádoru až o 50%. Bylo zjištěno zvýšení buněčné smrti a apoptózy, posílení infiltrace nádoru T lymfocyty a produkce prozánětlivých cytokinů (Kauffman a kol. 2012). Dalším zkoumaným syntetickým agonistou TLR7 je Loxoribine, který se zdá být účinný proti B buněčné chronické lymfatické leukémii (Goodman a kol. 1994). Známý je také Bropirimin, který byl úspěšně testován proti karcinomu in situ močového měchýře (Sarosdy a kol. 1996).

Málo pozornosti bylo dosud věnováno agonistům fagocytárních receptorů, přestože bylo zjištěno, že pro účinný zásah vrozené imunity je důležitá spolupráce signálních a fagocytárních receptorů (Underhill a Gantner 2004).

## **1.5 Terapie nádorů pomocí Zymosanu A (přípravek získávaný ze *Saccharomyces cerevisiae*)**

### **1.5.1 *Saccharomyces cerevisiae***

Buněčná stěna *S. cerevisiae* tvoří přibližně 30% suché hmotnosti buňky a skládá se převážně z polysacharidů (~ 85%) a proteinů (~ 15%). Polysacharidová složka se skládá z mannanu rozpustného ve vodě, alkalicky rozpustného glukanu, alkalicky nerozpustného glukanu a malého množství chitinu. Většina proteinů je kovalentně vázaná na mannan, ten pak nazýváme mannanoprotein (Nguyen a kol. 1998). Glukózové zbytky jsou spojeny s ostatními glukózovými molekulami pomocí  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,6 vazeb a s N-acetylglukosaminem (GlcNAc) pomocí vazeb  $\beta$ -1,4. Mannanoproteiny mohou být spojeny s  $\beta$ -1,6 glukózovými řetězci pomocí glykosylfosfatidylinositol (GPI) kotvy nebo alkalicky labilní vazbou s  $\beta$ -1,3 glukhanem (Lesage a Bussey 2006).

## 1.5.2 Zymosan

Zymosan je směs proteinkarbohydrátových komplexů připravená z buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* podle upraveného postupu, který poprvé navrhl Pillemer a Ecker (Pillemer a Ecker 1941). Hlavní složkou Zymosanu je  $\beta$ -glukan a mannan, další složky jsou zobrazeny v Tabulce 1. Zymosan je světle šedý až béžový hygroskopický prášek, který není rozpustný ve vodě, organických rozpouštědlech ani ve studených zásadách (Pillemer a Ecker 1941). Můžeme rozlišovat dva typy Zymosanu A a B (Di Carlo a Fiore 1958).

**Tabulka 1:** Složení Zymosanu (Di Carlo a Fiore 1958).

**Table 1. Composition of zymosan.**

| Component            | Percentage by weight, dry basis |       |       |        |
|----------------------|---------------------------------|-------|-------|--------|
|                      | Type A                          |       |       | Type B |
|                      | 7B13                            | 7B152 | 7B340 | 6B506  |
| Total polysaccharide | 75.7                            | 70.7  | 73.0  | 74.7   |
| Glucan               | 57.8                            | 53.8  | 50.7  | 56.7   |
| Mannan               | 17.9                            | 16.9  | 22.3  | 18.0   |
| Total nitrogen       | 2.32                            | 2.79  | 2.19  | 2.27   |
| Protein nitrogen     | 2.26                            | 2.73  | 2.13  | 2.20   |
| Glucosamine nitrogen | 0.06                            | 0.06  | 0.06  | 0.07   |
| Protein              | 14.1                            | 17.1  | 13.3  | 13.8   |
| Glucosamine          | 0.71                            | 0.75  | 0.74  | 0.87   |
| Chitin*              | 0.78                            | 0.83  | 0.82  | 0.95   |
| Fat                  | 6.4                             | 6.9   | 6.9   | 5.5    |
| Ash                  | 3.42                            | 2.98  | 3.42  | 2.94   |
| Phosphorus           | 0.79                            | 0.77  | 0.79  | 0.71   |
| Magnesium            | 0.28                            | 0.28  | 0.28  | 0.51   |

\* Calculated from the glucosamine analysis.

## 1.5.3 Beta glukan

Glukany jsou přírodní polysacharidy složené z D-glukózových jednotek a můžou být nalezeny v obilovinách, rostlinách, řasách, bakteriích, houbách a buněčných stěnách kvasinek. Glukózové jednotky jsou v řetězci spojeny vazbami v pozicích 1,3 a 1,6. Glukany hub a kvasinek mají společnou strukturu. Primární hlavní řetězec 1,3 je spojený s  $\beta$ -D-glukopyranosylovými jednotkami, podél nichž jsou náhodně rozmístěné postranní řetězce připojené vazbami 1,6 (Zeković a kol. 2005).

Beta glukany mají pozitivní vliv na zdraví lidí a zvířat. Byla u nich zjištěna imunitní stimulace, protizánětlivá, antimikrobiální a protinádorová aktivita. Podílí se také na snižování

cholesterolu, antifibrotické, protidiabetické a hypoglykemické aktivitě (Zeković a kol. 2005). Nejlépe prostudovaným účinkem gluknanů jsou imunostimulační vlastnosti, které spočívají ve zvýšení fagocytózy profesionálních fagocytů – granulocytů, monocytů, makrofágů a dendritických buněk (Větvička a Větvičková 2009).

### **1.5.3.1 Beta gluknan a imunitní odpověď**

Mezi hlavní imunologické vlastnosti  $\beta$ -glukanů patří to, že jejich aplikace vede ke zvýšené odolnosti organismu před virovými, bakteriálními a parazitickými infekcemi. Byly zaznamenány také protinádorové účinky a prevence před kancerogenezí, radioprotektivita a adjuvantní účinky (Bohn a BeMiller 1995)

Ochranné účinky 1,3- $\beta$ -glukanů jsou charakterizovány jako nespecifická imunomodulace, ke které dochází mnoha různými imunitními cestami zahrnujícími aktivaci makrofágů, stimulaci T-lymfocytů, stimulaci retikuloendoteliálního systému, aktivaci NK buněk, aktivaci klasické a alternativní cesty komplementu a zvýšenou produkci protilátek. K nejdůležitějším účinkům 1,3- $\beta$ -glukanů patří aktivace makrofágů, které díky tomu zvětšují svoji velikost a počet, stimulují produkci lysozymů a tumor necrosis faktoru (TNF) a zvyšují fagocytózu antigenů. K aktivaci makrofágů dochází prostřednictvím TLR2, který spolupracuje v odpovědi na gluknan s receptorem CD14. Na povrchu savčích makrofágů a neutrofilů byl nalezen fagocytární receptor Dectin-1, který má specifitu pro  $\beta$ -glukany. (Zeković a kol. 2005).

### **1.5.3.2 Beta gluknan a protinádorová aktivita**

Zymosan a další 1,3- $\beta$ -glukany mají významnou protinádorovou aktivitu proti různým druhům spontánních a transplantovaných experimentálních nádorů. U 1,3- $\beta$ -glukanu kvasinek bylo prokázáno potlačení růstu savčích karcinomů a myšího melanomu B16. Peritoneální makrofágy z myší léčených gluknanem vykazovaly oproti normálním makrofágům významnou cytotoxickou odpověď. Ve studiích bylo dále prokázáno, že gluknan použitý k terapeutickým účelům může potlačit buď jaterní metastázy nebo růst primárního nádoru a prodloužit dobu přežití (Zeković a kol. 2005).

#### **1.5.4 Mannan**

Mannan patří mezi hlavní složky buněčné stěny kvasinek. Je to polysacharid, který je složen převážně z D-manózy, která je obvykle spojena s různým množstvím proteinů a fosfátů, může také obsahovat malé množství N-acetyl-D-glukosaminů a jiných cukrů. Mannan je vysoce větvený a má hlavní řetězec z  $\alpha$ -1,6 vazeb D-manózových jednotek a připojené postranní řetězce mají vazby  $\alpha$ -1,2 a  $\alpha$ -1,3 (Cawley a Ballou 1972, Jones a Ballou 1968).

#### **1.5.5 Receptory rozpoznávající komponenty Zymosanu A**

##### **1.5.5.1 TLRs – Toll-like receptory**

Rodina TLR receptorů je důležitou skupinou receptorů, pomocí kterých přirozená imunita rozpoznává invazivní mikroorganismy (bakterie, houby, prvoky a viry). TLRs jsou zásadními molekulami pro rozpoznání a následnou eliminaci mikrobů, kdy fagocyty osídlí napadené tkáň a následně mikroby usmrtí. TLR rozpoznávají velké množství chemických struktur charakteristických pro tyto organismy, jako např. lipopolysacharidy, lipoproteiny, prokaryotické a virové nukleové kyseliny. Některé TLR se nachází na buněčném povrchu, jiné (TLR3,7,8,9) na intracelulárních membránách. Aktivací těchto receptorů dojde ke spuštění exprese prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a některých adhezivních a kostimulačních receptorů (CD80 a CD86) na povrchu APC (Bauer a kol. 2008, Hořejší a Bartůňková 2005).

Zymosan A je rozpoznáván díky tomu, že obsahuje  $\beta$ -glukan, který je detekován pomocí TLR2 v heterodimeru s TLR6 (Bauer a kol. 2008).

##### **1.5.5.2 Dectin-1**

Dectin-1 je v nedávné době charakterizovaný lektinový receptor, který je specifický pro  $\beta$ -glukan a vyskytuje se na povrchu makrofágů a neutrofilů. Je to typ II transmembránového glykoproteinu, který rozeznává 1,3- $\beta$ -glukany a 1,6- $\beta$ -glukany vedoucí k množství buněčných odpovědí včetně fagocytózy, endocytózy a oxidativního vzplanutí. Dectin-1 společně s TLR2 vyvolává produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů včetně TNF $\alpha$ , MIP-2 a IL-12 u makrofágů a dendritických buněk (Zeković a kol. 2005).

### 1.5.5.3 MBL- Mannose binding lectin

MBL patří do rodiny kolektinů, protože u nich byla objevena jak lektinová doména tak kolagenní struktury. MBL má oligomerní strukturu složenou z dimerů až hexamerů, které vytváří tři stejné peptidické řetězce o váze asi 32 kDa. Každý řetězec je charakterizován lektinovou (karbohydrát-rozpoznávající) doménou (CRD), hydrofobní oblastí, kolagenní oblastí a na cystein bohatou N-terminální oblastí. Kolagenní oblasti ze všech tří řetězců tvoří trojšroubovici (Turner 2003).

MBL váže velké množství cukrů jako např. N-acetyl-D-glukosamin, manózu, N-acetyl-manosamin, fukózu a glukózu. To mu umožňuje interagovat s některými viry, bakteriemi, kvasinkami, plísněmi a prvoky obsahujícími tyto cukry. Ukazuje se, že MBL má nejméně čtyři různé funkce- aktivuje komplement, podporuje (na komplementu-nezávislou) opsonofagocytózu, moduluje zánět a podporuje apoptózu. Nejdůležitější je aktivace komplementu, která je zprostředkována třetí, tzv. lektinovou cestou odlišnou od klasické i alternativní cesty. Její aktivace je zprostředkována komplexem MBL se serinovou proteázou (MASP-2), který specificky štěpí C4 a C2 a vytváří C3 enzym konvertázu. Kromě toho může MBL komunikovat přímo s receptory na povrchu buněk, čímž podpoří opsonofagocytózu přes dráhu nezávislou na komplementu (Turner 2003).

MBL má zásadní význam hlavně v prvních hodinách/dnech primární přirozené imunitní odpovědi. Poskytuje první linii obrany předtím, než adaptivní imunita začne fungovat, což je důležité zejména u dětí ve věku 6 až 18 měsíců, kdy ještě není adaptivní imunita zcela vyvinuta (Turner 2003).

### 1.5.5.4 Manózový receptor (MR)

Manózový receptor (MR, CD206) je lektin C-typu, a je především vyjádřen na makrofágách a dendritických buňkách. Ve své extracelulární oblasti obsahuje tři typy domén – N-terminální na cystein bohatou oblast (CR), fibronectin typu II (FN II) a osm tandemově uspořádaných CTLDs (C-type lectin-like domains). Tato tři vazebná místa rozpoznávají velké množství jak exogenních tak endogenních ligandů, tudíž se MR účastní homeostatických procesů i rozpoznávání patogenu. Pomocí oblasti CTLD může vázat ligandy mikrobiálního původu, jako například manózu, která se často objevuje na povrchu mikroorganismů (Gazi a Martinez-Pomarez 2008). MR se účastní fagocytózy mikroorganismů prostřednictvím exprese

MR cDNA v buňkách COS-1, které zprostředkovávají jak endocytózu, tak fagocytózu (East a Isacke 2002).

### **1.5.6 Terapeutické využití Zymosanu A v léčbě nádorů**

Vliv Zymosanu A na růst nádorů byl zkoumán již v polovině 20. století na myších se sarkomem (S-180) (Bradner a kol. 1958). Tyto studie byly prováděny na základě výsledků Pillemera a jeho spolupracovníků, kteří poukázali na vztah Zymosanu A s properdinovým systémem (Pillemer a kol. 1954). Byly však prokázány i opačné účinky Zymosanu, kdy docházelo ke snížení obrany proti nádorovému bujení. Tyto účinky byly závislé na množství podaného Zymosanu a na dalších testovacích okolnostech (Bradner a Clarke 1959). Experimenty prokázaly, že vysoké chronické dávky Zymosanu způsobovaly u myší smrtelné bakteriémie střevního původu (Bradner a Clarke 1959).

U myšího adenokarcinomu bylo zaznamenáno pozitivní působení Zymosanu A ve spojení s chirurgickou léčbou a cyklofosfamidem. V tomto složení byl terapeutický účinek mnohem větší než při samotném použití chirurgické a cyklofosfamidové léčby (Martin a kol. 1964).

V novějších studiích bylo zjištěno, že intratumorální aplikace Zymosanu A má výrazný terapeutický účinek na růst gliomu RG-2 podkožně aplikovaného krysám. Tato léčba ve spojení s radioterapií vykazovala synergický efekt v prodloužení doby života a růstu nádoru (Mariani a kol. 2007).

I působení samotného beta glukanu bylo prokázáno v mnoha pracích. Docházelo jak k potlačení růstu primárního nádoru, tak k prodloužení doby života. Tyto studie byly prováděny u myší se sarkomem (Williams a kol. 1985), pozitivní účinek byl prokázán také u agresivnějšího myšího melanomu B16 (Di Luzio a kol. 1979). Významné bylo také zjištění, že beta glukan má značný vliv na snížení tvorby metastáz (Williams a kol. 1985, Větvicka a kol. 2007).



## **2. Cíle práce**

- Studium vlivu Zymosanu A na růst melanomu B16-F10

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Chemikálie

- RPMI 1640
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma Aldrich),
- Zymosan A ze *S. cerevisiae* (Sigma Aldrich),
- BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane, Mw 4000) (NOF Corporation)
- lysin (Sigma Aldrich),
- lipopolysacharid (LPS) z *E. coli* (Sigma Aldrich)
- flagellin z *B. subtilis* (InvivoGen)
- MOUSE C-REACTIVE PROTEIN (CRP) ELISA TEST KIT (Life Diagnostics)
- Proteose Peptone (Difco)
- Fluid Thioglycollate Medium (Difco)

### 3.2 Laboratorní zvířata

Při pokusech byly používány myši samice kmene C57BL/6N od firmy Charles River Laboratories. Myši byly 8 týdnů staré o váze přibližně 18-20g. Byly chovány za standardních podmínek s fotoperiodou 12/12, krmeny granulovanou stravou a vodou *ad libitum*.

### 3.3 Buněčné linie

Byla použita buněčná linie myšího melanomu B16-F10, která byla darem od prof. Říhové z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Praha.

Kultivace buněk probíhala v RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky (Sigma Aldrich). Buněčná linie byla uchovávána v termostatu při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.4 Příprava melanomových buněk B16-F10

Médium z kultivační nádoby bylo slito a buňky byly následně důkladně propláchnuty dostatečným množstvím PBS. Poté byla provedena trypsinizace přidáním 0,5ml směsi složené z 0,02% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS. Směs se ihned slila a znovu bylo přidáno 0,5ml

trypsinizační směsi. Následovala inkubace v termostatu při 37°C po dobu 3-5min, dokud nedošlo k uvolnění buněk. Poté se trypsinizace zastavila přidáním média RPMI 1640 s 10% FCS, ve kterém byly buňky rozvolněny za pomoci Pasteurovy pipety. Buňky byly slity do zkumavky a doplněny médiem RPMI 1640 s 10% FCS a nechaly se 10 min centrifugovat (150g). Po centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra. Pro stanovení počtu buněk se výsledná směs smíchala s trypanovou modří (v poměru 1:1) a v Bürkerově komůrce se buňky spočítaly. Výsledná směs byla upravena tak, aby bylo dosaženo koncentrace 4 mil buněk/ml.

### **3.5 Transplantace melanomu B16-F10**

Myši byly nejprve oholeny ve spodní části zad. Do pravého boku jim poté bylo pod kůži injekčně aplikováno 0,1ml buněčné směsi (B16-F10 s RPMI 1640 bez séra) obsahující přibližně 400 000 buněk.

### **3.6 Měření velikosti nádorů**

Měnicí se velikost nádorů byla měřena pomocí kaliperu. Měření probíhalo každý druhý den. Z naměřených hodnot byl poté vypočítán ze vzorce  $V = \pi/6 AB^2$  objem nádoru (Inaba a kol. 1986). A vyjadřuje největší rozměr nádoru a B nejmenší. Zjištěné objemy byly dále statisticky zpracovávány.

### **3.7 Měření teploty nádorů**

Teplota nádorů byla měřena pomocí speciálního teploměru IR RODENT THERMOMETER 153 IRB od firmy BIOSEB. Pro srovnání byla teplota měřena také na levém boku, kde nebyl nádor transplantovaný. První den terapie byla teplota měřena v časech 0, 6, 12 a 24 hodin. Poté byla teplota měřena každý druhý den po dobu 14 dní. Čidlo teploměru bylo přikládáno vždy na vzdálenost 2 mm od povrchu nádoru.

### **3.8 Odebírání krve z ocasu**

Krev byla odebírána napíchnutím žíly u kořene ocasu a vzniklá kapka odsáta pomocí injekční stříkačky. Krev se odebírala v den zahájení terapie v časech 0, 6, 12 a 24 hodin. Získaná krev se nechala přes noc odstát v lednici při 4°C, poté se 10 min. centrifugovala při

600g. Z každého vzorku se odebralo sérum, které se uchovalo při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Takto připravené sérum bylo později použito pro stanovení CRP.

### **3.9 Počítání metastáz**

Pro zjištění počtu metastáz bylo nutné nejprve vypitvat myším plíce. Ty byly uchovávány ve 4% roztoku formaldehydu. Po určité době od zakonzervování byly plíce prohlédnuty pod binolupou a spočítána metastatická ložiska, která jsou viditelná jako černé tečky různé velikosti (Větvicka a kol. 2007).

### **3.10 Izolace makrofágů**

Pro získání makrofágů z peritoneální dutiny bylo potřeba nejprve připravit 10% proteose-peptonový roztok. Ten byl získán smícháním 1g Proteose Peptone (Difco) s 10ml deionizované vody. Dobře rozpuštěná směs byla přefiltrována přes 0,22 $\mu\text{l}$  filtr. 1 ml takto připraveného roztoku byl intraperitoneálně aplikován myším. Po 3-4 dnech od aplikace byla myš usmrcena cervikální dislokací a proveden peritoneální výplach pomocí vychlazeného media RPMI 1640 bez séra. Buňky získané peritoneálním výplachem bylo nutné uchovávat na ledu. Poté byly centrifugovány po dobu 10 min ve  $4^{\circ}\text{C}$  při 170g. Stočené buňky byly smíchány s 1ml RPMI 1640 s 10% FCS. Následně byly pomocí trypanové modře spočítány v Bürkerově komůrce a naředěny na požadovanou koncentraci. Použitím průtokové cytometrie byla určena kvalita buněčné směsi.

### **3.11 Izolace neutrofilů**

K izolaci neutrofilů z myšího peritonea bylo použito 3% thioglykolátové médium. Médium bylo připraveno smícháním 0,3g Fluid Thioglycollate Medium (Difco) s 10 ml deionizované vody. Vzniklý roztok modré barvy byl po dobu 1-2 min povařen v mikrovlnce. Povařením roztok zružověl. Po vyndání z mikrovlnky byl roztok ihned zchlazen pod tekoucí vodou a přefiltrován přes 0,22  $\mu\text{l}$  filtr do uzavíratelné nádoby obalené alobalem, aby se k médiu nedostal ani vzduch ani světlo. Takto připravenou nádobu s roztokem jsme uložili přes noc do lednice, kde se mezitím vytvořily dvě vrstvy žlutá a růžová. Pro další aplikace se použila spodní žlutá vrstva.

Myším bylo intraperitoneálně injikováno 2ml připraveného média, které se nechalo působit 4,5 – 5 hodin. Po uplynutí inkubační doby byla myš usmrcena cervikální dislokací a poté vychlazeným PBS postupně propláchnuto peritoneum. Získaný peritoneální výplach byl dán do zkumavky doplněné chlazeným PBS. Poté byly buňky 10 min centrifugovány ve 4°C při 250g. Stočené buňky byly přidány do 1 ml RPMI 1640 s 10% FCS a pomocí trypanové modře spočítány v Bürkerově komůrce. Čistota buněk byla stanovena průtokovou cytometrií.

### **3.12 Stanovení množství C-reaktivního proteinu**

Z připraveného séra bylo pomocí komerčně dodaného kitu MOUSE C-REACTIVE PROTEIN (CRP) ELISA TEST KIT (Life Diagnostics) stanoveno množství CRP v séru.

### **3.13 Sonikace**

K sonikaci jsme používali sonikátor HIELSCHER VP200S a to tím způsobem, že daná suspenze byla 10x 10s ozvučována v ledové lázni. Po každém ozvučení proběhlo 20s chlazení.

### **3.14 Statistické zpracování dat**

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel. Přežívání myši bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

### **3.15 Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A na růst melanomu**

V pokusu bylo použito 24 myší, kterým byl transplantován melanom. Dvanáctý den po transplantaci byly myši randomizovány do 4 skupin (A, B, C, K) po 6 myších a byla zahájena terapie. Před aplikací léčiva byla vždy nejprve změřena teplota a velikost nádoru. V den zahájení terapie byla myším v časech 0, 6, 12 a 24 hod odebrána krev z ocasní žíly. Terapeutikum bylo ob den aplikováno *i.t.* v množství 50 $\mu$ l/myš, celkem podáno 6x ve dnech 0, 2, 4, 6, 8 a 10.

- **Skupina A:** Zymosan A - BAM (příprava suspenze: 17,36 mg Zymosanu A/ml PBS – celkem 2 ml → sonikováno a poté přidáno 100 µl 15 mM BAM<sub>4000</sub> v DMSO (Kato a kol. 2004) → vše promícháno a necháno 1 hod při pokojové teplotě → přidáno 100 µl 1M TRIS/HCl pH 8,0 → dialýza MWCO 12-14000 x PBS, při 4 °C přes noc)
- **Skupina B:** Zymosan A (příprava suspenze: 17,36 mg Zymosanu A/ ml PBS – celkem 4 ml → sonikováno → dialýza při 4°C přes noc x PBS, MWCO 12-14000)
- **Skupina C:** lysin - BAM (příprava roztoku: 0,45ml 30 mM lysinu v DMSO + 0,45 ml 10 mM BAM<sub>4000</sub> v DMSO (Kato a kol. 2004) → promícháno a ponecháno 1 hod při pokojové teplotě → přidáno 75µl TRIS/HCl pH 8,0 → + 5,625 ml PBS)
- **Skupina K:** kontrolní skupina - PBS

Po ukončení terapie, tj. 26. den od transplantace nádoru, byly myši uspány diethyletherem a usmrceny cervikální dislokací. Poté jim byly vypitvány plíce, které byly později použity k zjištění počtu metastáz.

### 3.16 Pokus č. 2: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagellinem na růst melanomu

Do 2. pokusu bylo zahrnuto 30 myší, které byly podle velikosti nádorů rovnoměrně rozděleny do 6 skupin (A, B, C, D, E, K) po 5 myších. Terapie byla zahájena 12. den od transplantace nádoru. U nádorů byla měřena teplota i velikost. Všechny látky byly do nádorů injikovány celkem 6x ve dnech 0, 2, 4, 6, 8 a 10 v množství 50µl/myš podle tohoto schématu:

- **Skupina A:** Zymosan A - BAM (příprava suspenze: viz Pokus č. 1 – skupina B)
- **Skupina B:** Zymosan A - BAM + LPS (příprava suspenze: 1 mg LPS smícháno s 2 ml Zymosan A – BAM, výsledná koncentrace LPS 0,5 mg/ml)
- **Skupina C:** LPS (příprava roztoku: 1 mg LPS smícháno s 2 ml PBS, výsledná koncentrace 0,5 mg/ml)
- **Skupina D:** Zymosan A – BAM + flagellin (příprava suspenze: 100µl zásobního roztoku flagellinu (100 µg/ml) smícháno s 1,9 ml Zymosan A – BAM, výsledná koncentrace flagellinu 5 µg/ml)
- **Skupina E:** flagellin (příprava roztoku: 100µl zásobního roztoku flagellinu (100 µg/ml) smícháno s 1,9 ml PBS, výsledná koncentrace flagellinu 5 µg/ml)
- **Skupina K:** kontrolní skupina - PBS

Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

### 3.17 Pokus č. 3: Studium vlivu kotveného Zymosanu A s přidáním makrofágů a neutrofilů na růst melanomu

V pokusu bylo použito 15 myší s transplantovaným nádorem, které byly rozděleny do 5 skupin (I, II, III, IV, V) po 3 myších. Léčba byla zahájena 12. den od transplantace nádoru. V den zahájení léčby (den 0) bylo podáno *i.t.* 100 $\mu$ l směsi jednotlivých látek s makrofágy nebo neutrofily. Poté byly jednotlivé látky injikovány každý druhý den (2, 4, 6, 8 a 10) v množství 50  $\mu$ l/myš bez přidání makrofágů nebo neutrofilů. Před podáním léčiva byla vždy změřena teplota a velikost nádoru.

- **Skupina I:** Zymosan A – BAM + 1. den terapie makrofágy (příprava suspenze pro 1. den terapie: 200 $\mu$ l Zymosanu A – BAM smícháno s 200 $\mu$ l makrofágů), následně obden Zymosan A-BAM
- **Skupina II:** Zymosan A – BAM + 1. den terapie neutrofily (příprava suspenze pro 1. den terapie: 200 $\mu$ l Zymosanu A-BAM smícháno s 200 $\mu$ l neutrofilů ), následně obden Zymosan A-BAM
- **Skupina III:** PBS + 1. den terapie makrofágy (příprava suspenze pro 1.den terapie : 200 $\mu$ l PBS smícháno s 200 $\mu$ l makrofágů), následně obden PBS
- **Skupina IV:** PBS + 1. den terapie neutrofily (příprava suspenze pro 1.den terapie : 200 $\mu$ l PBS smícháno s 200 $\mu$ l neutrofilů), ), následně obden PBS
- **Skupina V:** kontrolní skupina - PBS, obden 50 $\mu$ l (0, 2, 4, 6, 8, 10)

#### Použité suspenze buněk:

50 milionů makrofágů / ml PBS, čistota 71,5 %

80 milionů neutrofilů / ml PBS, čistota 67,7 %

### **3.18 Pokus č. 4: Ověření vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s makrofágy na růst melanomu**

Pokus č. 4 sloužil k ověření výsledků z předešlého pokusu. Bylo použito 24 myší, které byly podle velikosti nádoru rovnoměrně rozděleny do 4 skupin (I, II, III, IV) po 6 myších. Terapie byla započata 12. den od transplantace nádoru. Před aplikací léčiva byla změřena teplota a velikost nádoru. Poprvé (den 0) bylo terapeutikum pro skupiny I a III podáváno *i. t.* v množství 100  $\mu$ l/myš. Ostatní dny (2, 4, 6, 8 a 10) byla léčba injikována obden v množství 50  $\mu$ l/myš.

- **Skupina I:** Zymosan A – BAM + 1. den terapie makrofágy (příprava suspenze pro 1.den terapie: viz Pokus č. 3- skupina I), následně obden Zymosan A-BAM, 50  $\mu$ l
- **Skupina II:** Zymosan A – BAM (příprava suspenze: viz Pokus č. 1 – skupina B), obden 50  $\mu$ l (0, 2, 4, 6, 8, 10)
- **Skupina III:** PBS + 1. den terapie makrofágy (příprava suspenze pro 1. den terapie: viz Pokus č. 3- skupina III), následně obden 50  $\mu$ l PBS
- **Skupina IV:** PBS, obden 50  $\mu$ l (0, 2, 4, 6, 8, 10)

#### **Použitá suspenze buněk:**

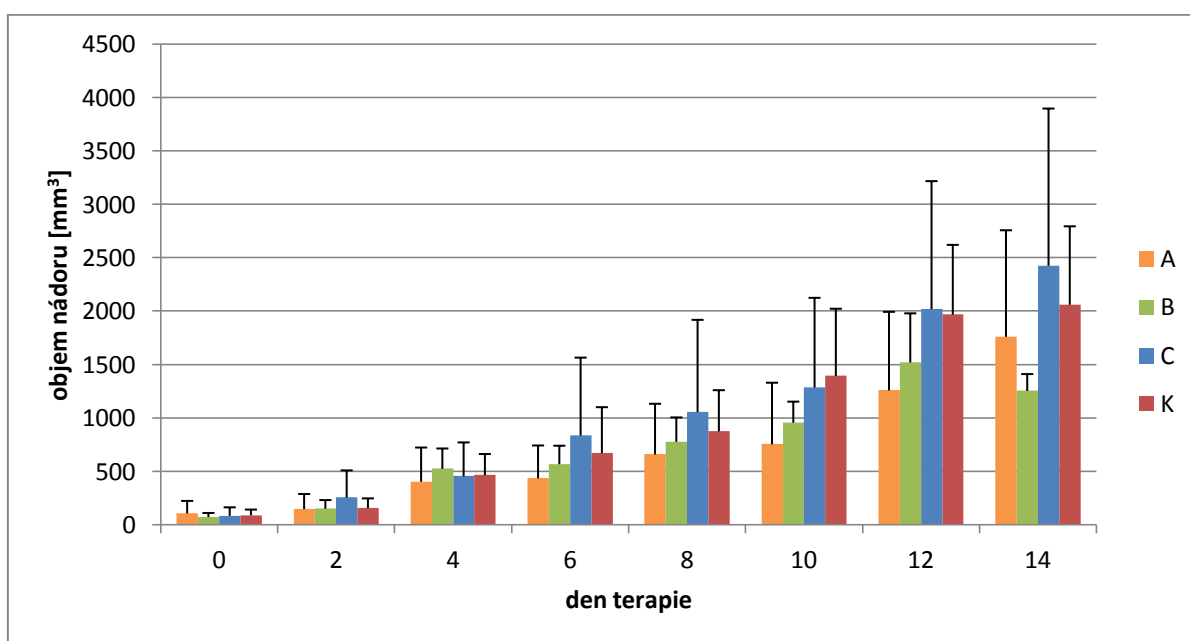
50 milionů makrofágů / ml PBS, čistota 80,1%



## 4. Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A na růst melanomu

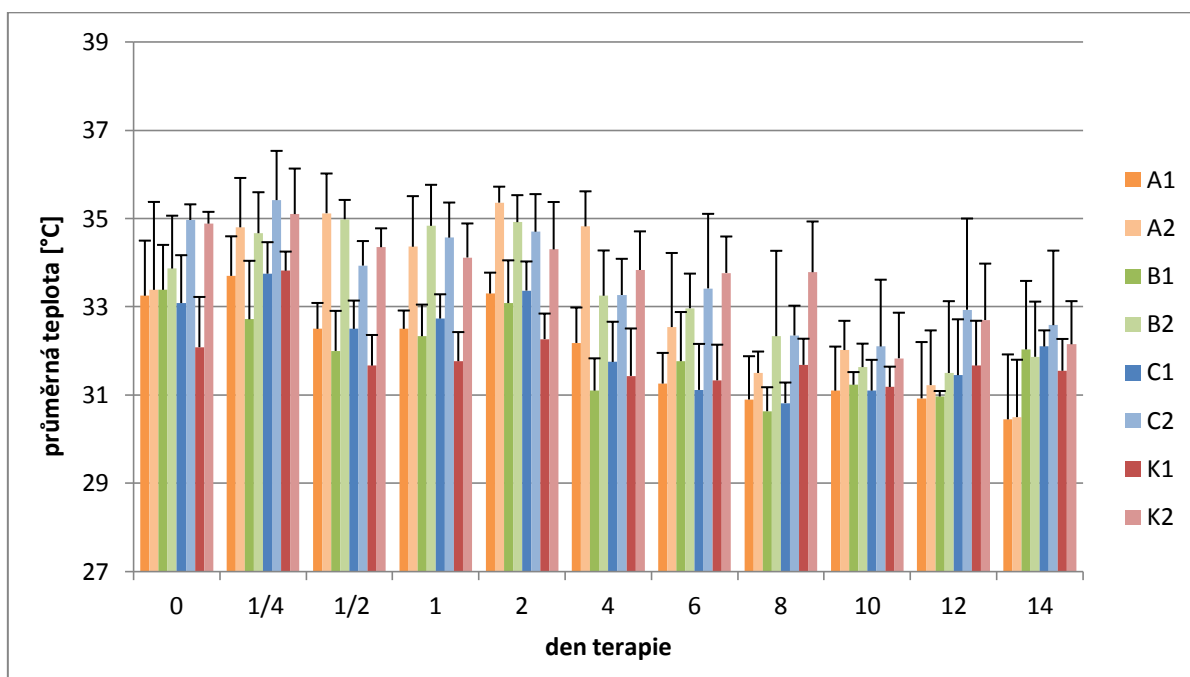
Cílem pokusu bylo zjistit, zda má na růst nádorů vliv Zymosan A kotvený na nádor pomocí BAM, nebo zda je tento vliv zanedbatelný oproti Zymosanu samotnému. Z grafu (Obr. 1) je patrné, že kotvený Zymosan A měl na růst nádoru vliv větší, ten však nebyl statisticky významný. V intervalu měření od 4. do 14. dne vyvolal Zymosan A-BAM průměrně 28% redukci nádorového růstu, zatím co Zymosan A samotný jen 16,1%. Kontrolní lysin-BAM nepůsobil žádnou redukci nádorového růstu.



**Obr. 1:** Vliv Zymosanu A kotveného pomocí BAM na velikost nádorů.

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A, **C-** lysin - BAM, **K-** kontrola PBS

Následující graf (Obr. 2) znázorňuje naměřené teploty nádoru v porovnání s teplotou těla myši. Z grafu je zřejmé, že teplota těla byla vyšší než teplota nádoru, a že se teplota v průběhu terapie mírně snižovala.

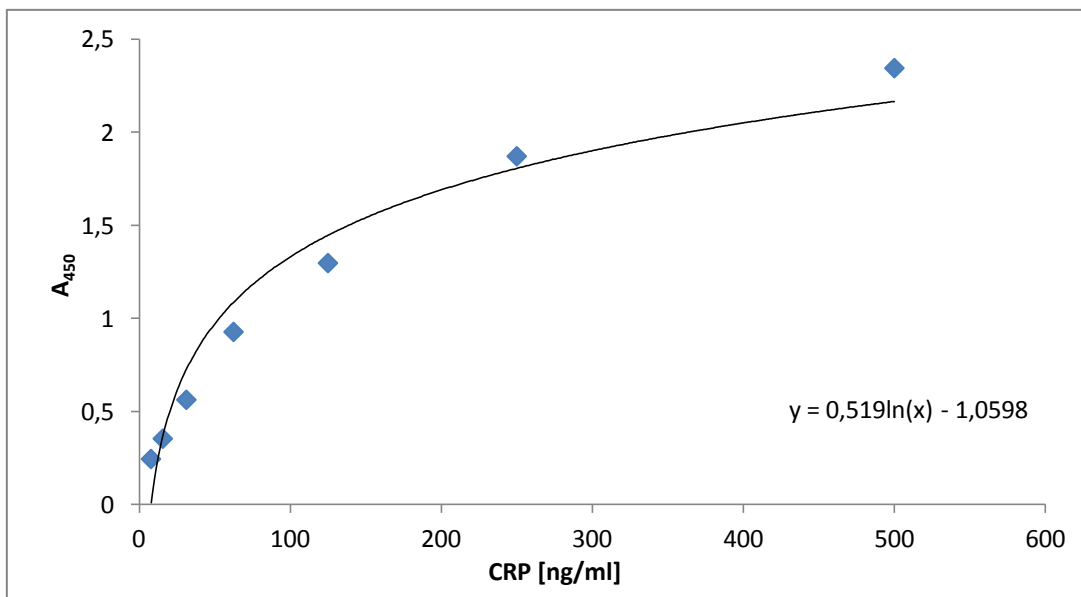


**Obr. 2:** Teplota nádoru v porovnání s teplotou těla v průběhu terapie pomocí volného a kotveného Zymosanu A.

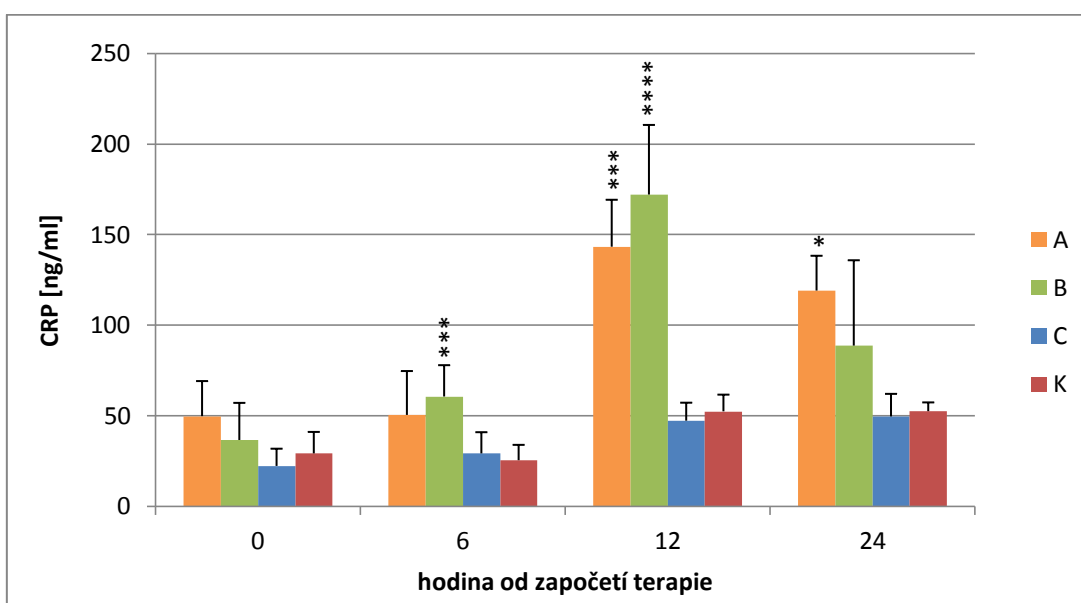
**1** - teplota nádoru, **2** – teplota těla

**A**- Zymosan A – BAM, **B**- Zymosan A, **C**- lysin - BAM, **K**- kontrola PBS

Pro stanovení CRP byla nejprve sestrojena kalibrační křivka (Obr. 3) a z její rovnice regrese vypočtena koncentrace C-reaktivního proteinu v jednotlivých skupinách (Obr. 4). Největší množství CRP bylo naměřeno u skupin A a B, tedy u skupin obsahujících Zymosan A. Jeho statisticky významný nárůst vrcholil 12 hod. po zahájení terapie.



**Obr. 3:** Kalibrační křivka stanovení myšího CRP.

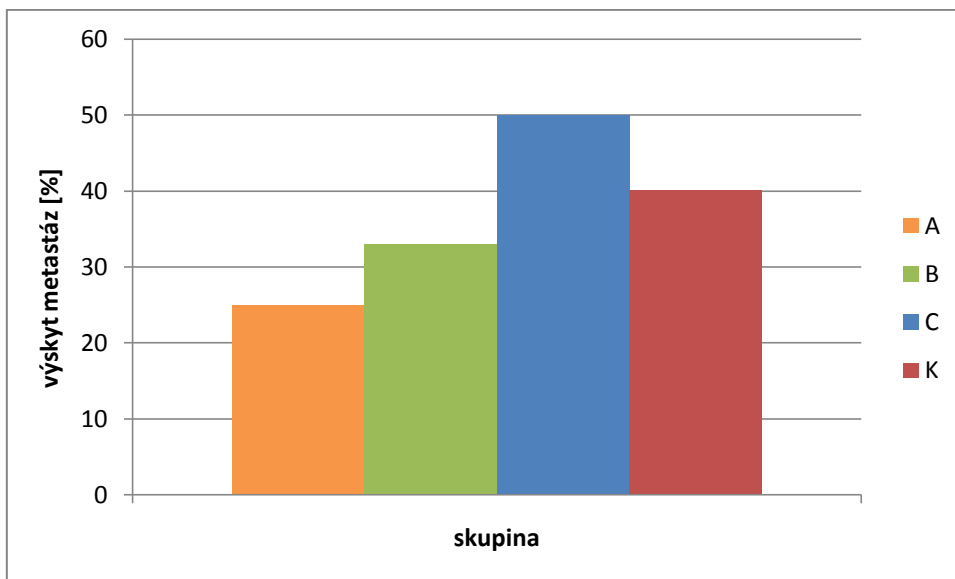


**Obr. 4:** Množství CRP naměřené v průběhu 24 hodin od započetí terapie pomocí volného a vázaného Zymosanu A.

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A, **C-** lysin - BAM, **K-** kontrola PBS

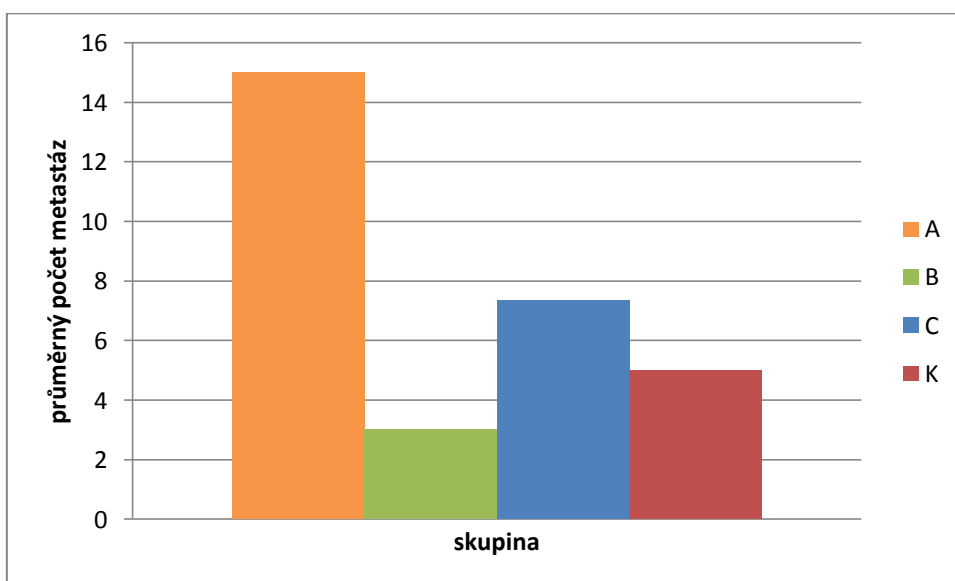
Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,005$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,001$

Po ukončení terapie byl stanoven počet metastáz u jednotlivých skupin. Procentuální zastoupení metastáz v jednotlivých skupinách je znázorněno v grafu (Obr. 5). Na Obr. 6 je zaznamenána intenzita metastazování u myši, u kterých byly metastázy zjištěny. Vliv terapie na výskyt metastáz se zdá být nejednoznačný.



**Obr. 5:** Procentuální výskyt metastáz v jednotlivých skupinách při terapii s použitím kotveného a volného Zymosanu A

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A, **C-** lysin - BAM, **K-** kontrola PBS

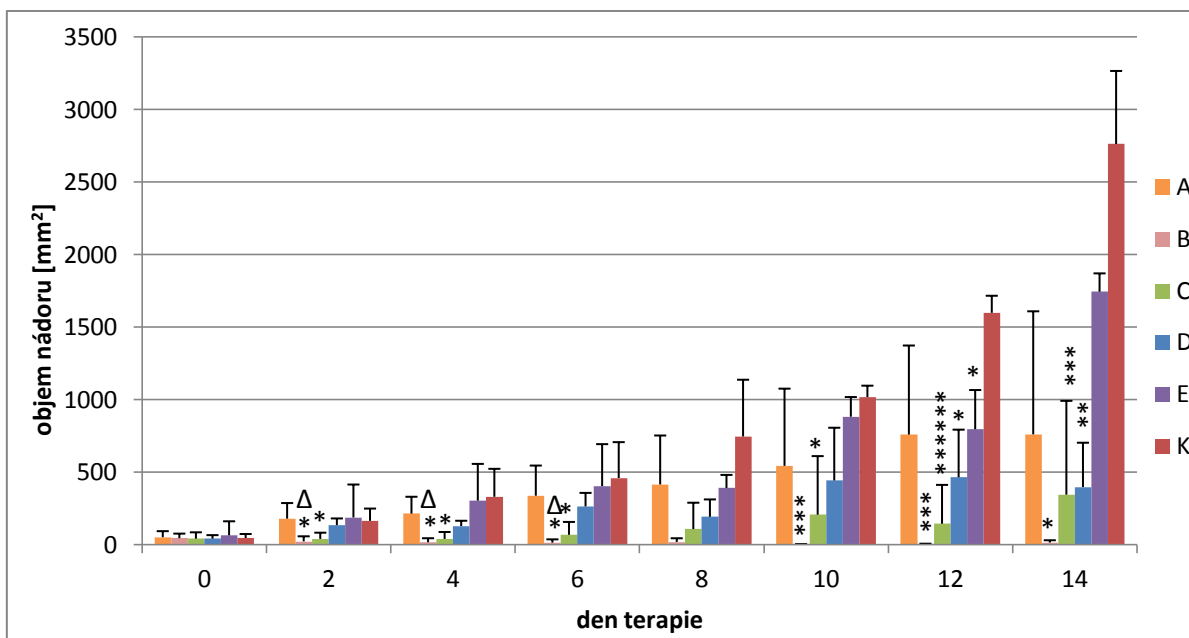


**Obr. 6:** Průměrný počet metastáz u myši, u kterých byly zjištěny. Terapie s použitím volného a kotveného Zymosanu A.

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A, **C-** lysin - BAM, **K-** kontrola PBS

## 4.2 Pokus č. 2: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na růst melanomu

Cílem pokusu bylo zjistit, zda kotvený Zymosan A (Zymosan A-BAM) má na růst nádorů větší vliv ve spojení s dalšími PAMPs (LPS, flagellin). Na Obr. 7 jsou znázorněny objemy nádorů jednotlivých skupin. Velikost nádoru nejvíce snižoval kotvený Zymosan A ve spojení s LPS, kde došlo k výrazné synergii, statisticky významné byly i některé další skupiny. Osvědčila se kombinace Zymosan A–BAM s flagelinem, vedoucí rovněž k synergii.



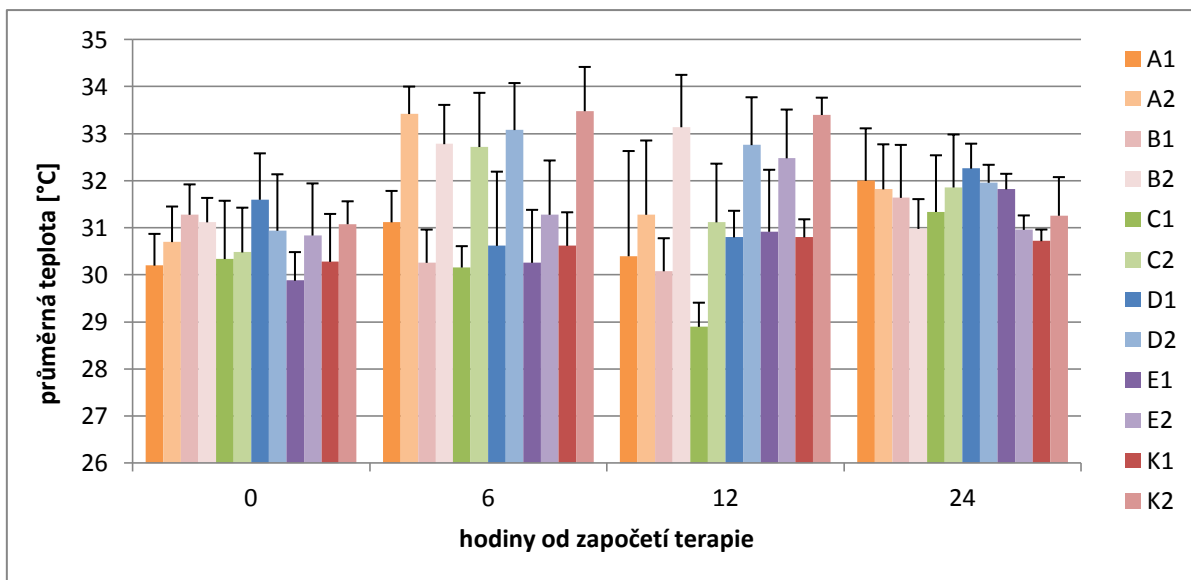
**Obr. 7:** Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na velikost nádoru.

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A – BAM + LPS, **C** – LPS, **D** - Zymosan A – BAM + flagellin, **E** – flagellin, **K-** kontrola PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,005$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,001$ , \*\*\*\*\*  $P \leq 0,0005$ , \*\*\*\*\*  $P \leq 0,0001$

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině A:  $\Delta P \leq 0,05$

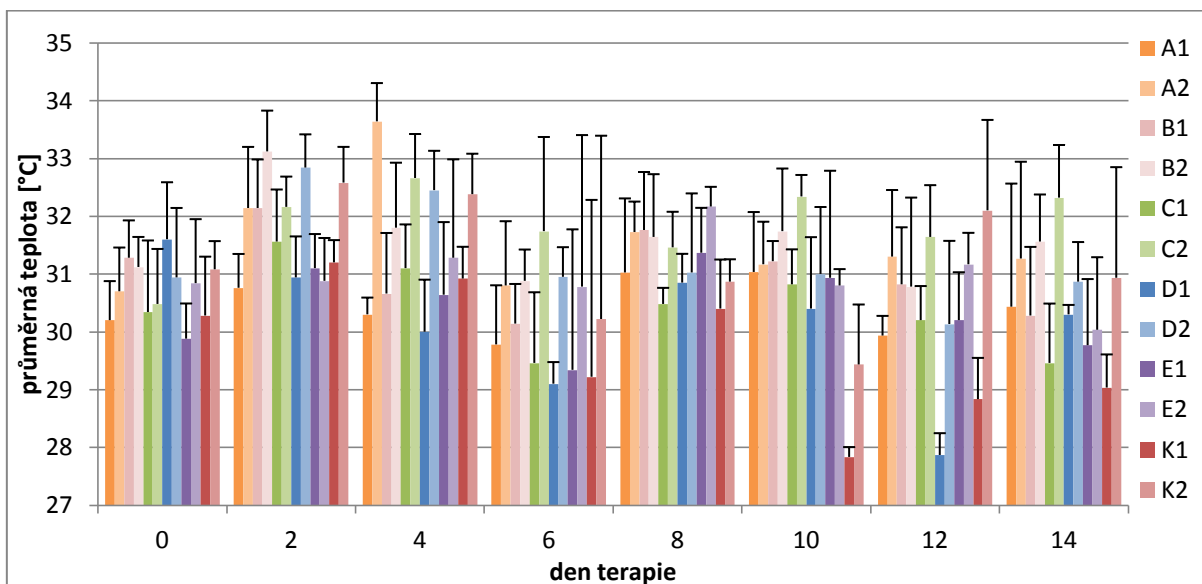
V následujících grafech (Obr. 8 a Obr. 9) jsou zaznamenány teploty nádoru a těla, naměřené v průběhu terapie. Teploty během léčby kolísaly, teplota těla byla většinou větší než teplota nádoru. Teploty neodrážely průběh a účinnost terapie.



**Obr. 8:** Teploty naměřené v den zahájení terapie pomocí Zymosan A-BAM v kombinaci s LPS a flagellinem.

**1-** teplota nádoru, **2** – teplota těla

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A – BAM + LPS, **C** – LPS, **D** - Zymosan A – BAM + flagellin, **E** – flagellin, **K-** kontrola PBS

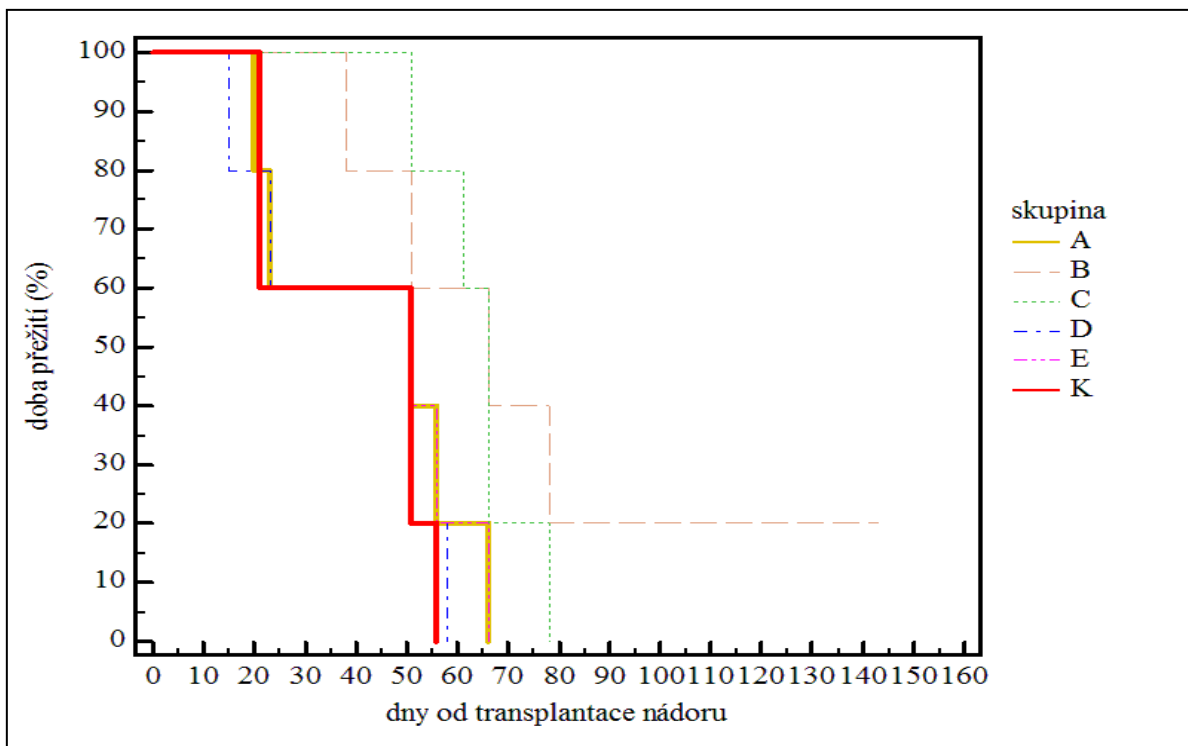


**Obr. 9:** Teploty naměřené v průběhu terapie pomocí Zymosan A-BAM v kombinaci s LPS a flagellinem.

**1-** teplota nádoru, **2** – teplota těla

**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A – BAM + LPS, **C** – LPS, **D** - Zymosan A – BAM + flagellin, **E** – flagellin, **K-** kontrola PBS

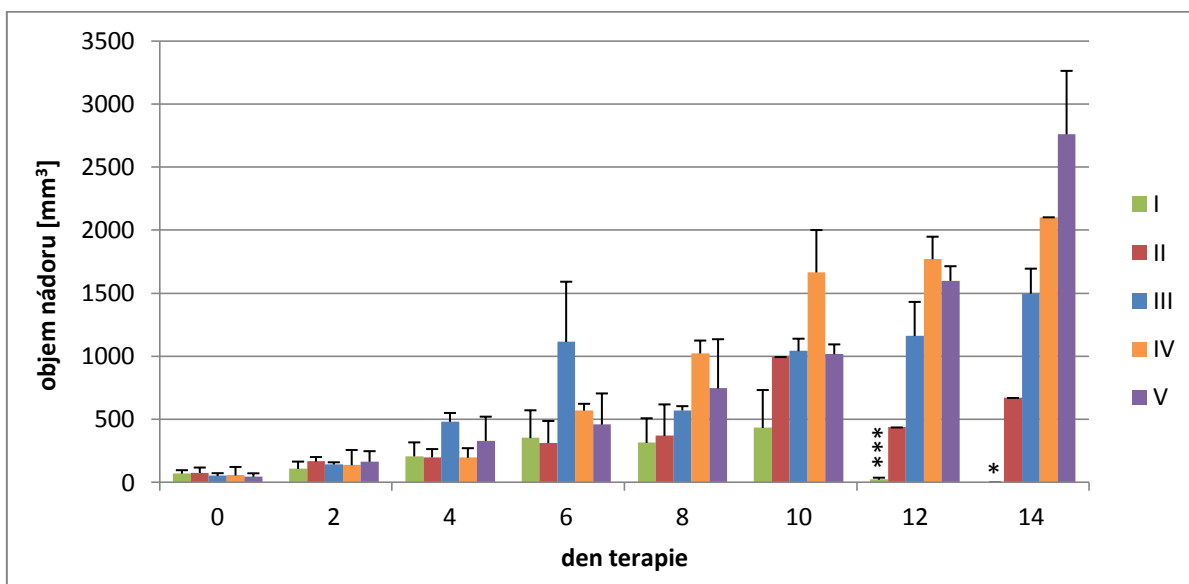
Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši (Obr. 10). Statisticky významně delšího přežití oproti kontrole dosáhla pouze skupina C ( $P \leq 0,05$ ), ačkoliv ve skupině B jedna myš přežila více než sto dní a do doby sepisování bakalářské práce bez jakýchkoli známek nádoru stále žije.



**Obr. 10:** Vliv Zymosan A-BAM v kombinaci s LPS a flagelinem na přežívání myši.  
**A-** Zymosan A – BAM, **B-** Zymosan A – BAM + LPS, **C** – LPS, **D** - Zymosan A – BAM + flagelin, **E** – flagelin, **K-** kontrola PBS

### 4.3 Pokus č. 3: Studium vlivu kotveného Zymosanu A s přidáním makrofágů a neutrofilů na růst melanomu

V pokusu byl zjišťován vliv Zymosanu A – BAM s přidáním makrofágů nebo neutrofilů na velikost nádorů. Velikosti nádorů jsou znázorněny v grafu (Obr. 11). Z grafu je patrné, že 12. den terapie došlo k zásadnímu zmenšení velikosti nádorů u skupiny I (Zymosan A – BAM + makrofágy), tento pokles byl statisticky významný.



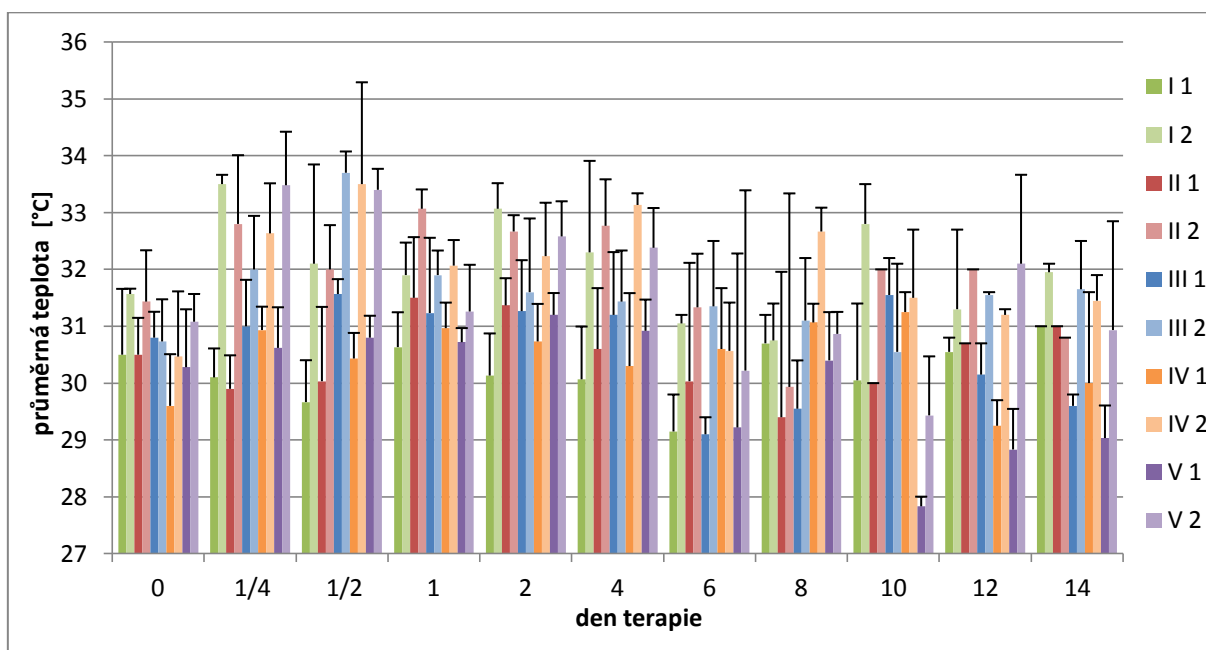
**Obr. 11:** Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s makrofágy nebo neutrofilů na velikost nádoru.

**I** – Zymosan A – BAM + 1. den makrofágy, **II** - Zymosan A – BAM + 1. den neutrofilů, **III** - PBS + 1. den makrofágy, **IV** - PBS + 1. den neutrofilů, **V** – kontrola PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,005$



Během pokusu byly měřeny teploty nádoru a těla myši. Na Obr. 12 jsou zaznamenány teploty naměřené v průběhu terapie. Z grafu je patrné, že teplota těla byla vyšší než teplota nádoru a během léčby kolísala.



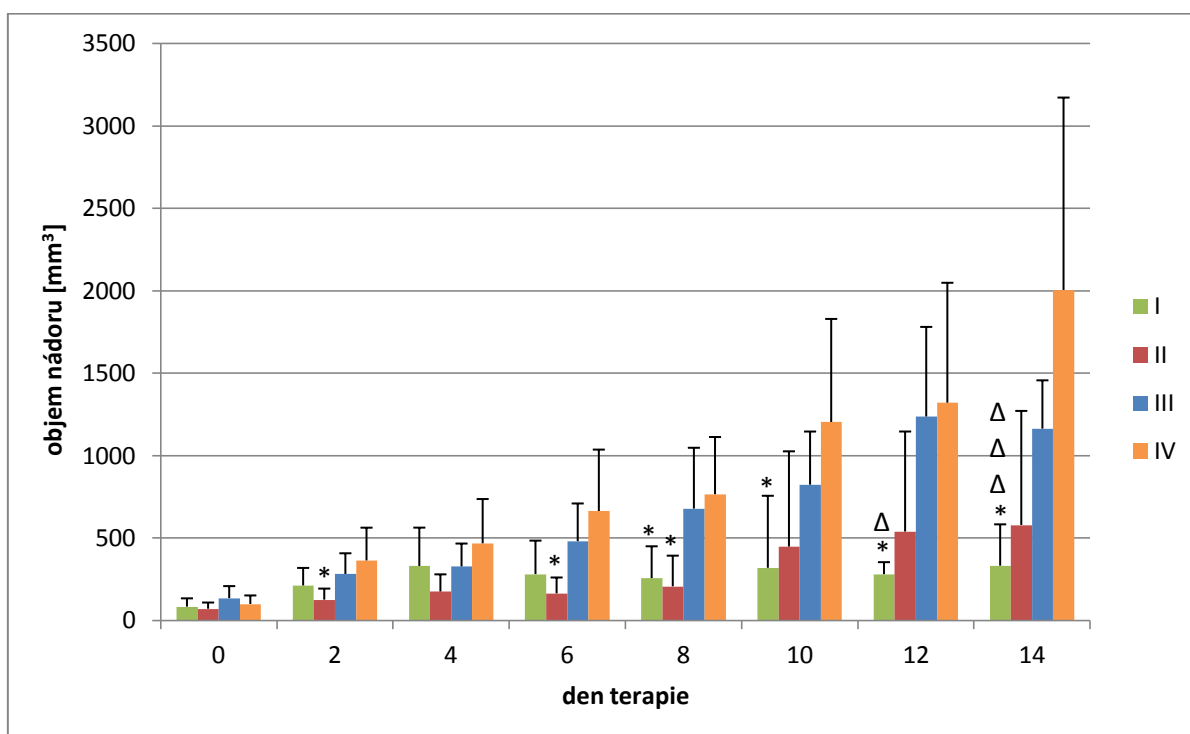
**Obr. 12:** Teploty nádorů v porovnání s teplotami těla v průběhu terapie pomocí Zymosan A ve spojení s makrofágy nebo neutrofily.

**1** - teplota nádoru, **2** – teplota těla

**I** – Zymosan A – BAM + 1. den makrofágy, **II**- Zymosan A – BAM +1. den neutrofily, **III**- PBS + 1. den makrofágy, **IV** - PBS + 1. den neutrofily, **V** – kontrola PBS

#### 4.4 Pokus č. 4: Ověření vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s makrofágy na růst melanomu

Cílem pokusu bylo ověřit výsledky získané v pokusu č. 3. Naměřené velikosti nádorů jsou zaznamenány v grafu (Obr. 13). Opět jako v předešlém pokusu došlo u jeho konce k synergii Zymosan A-BAM s makrofágy a to statisticky významné. Pokles objemu nádorů však nebyl tak dramatický, jak v předešlém pokuse.



**Obr. 13:** Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s makrofágy na velikost nádoru.

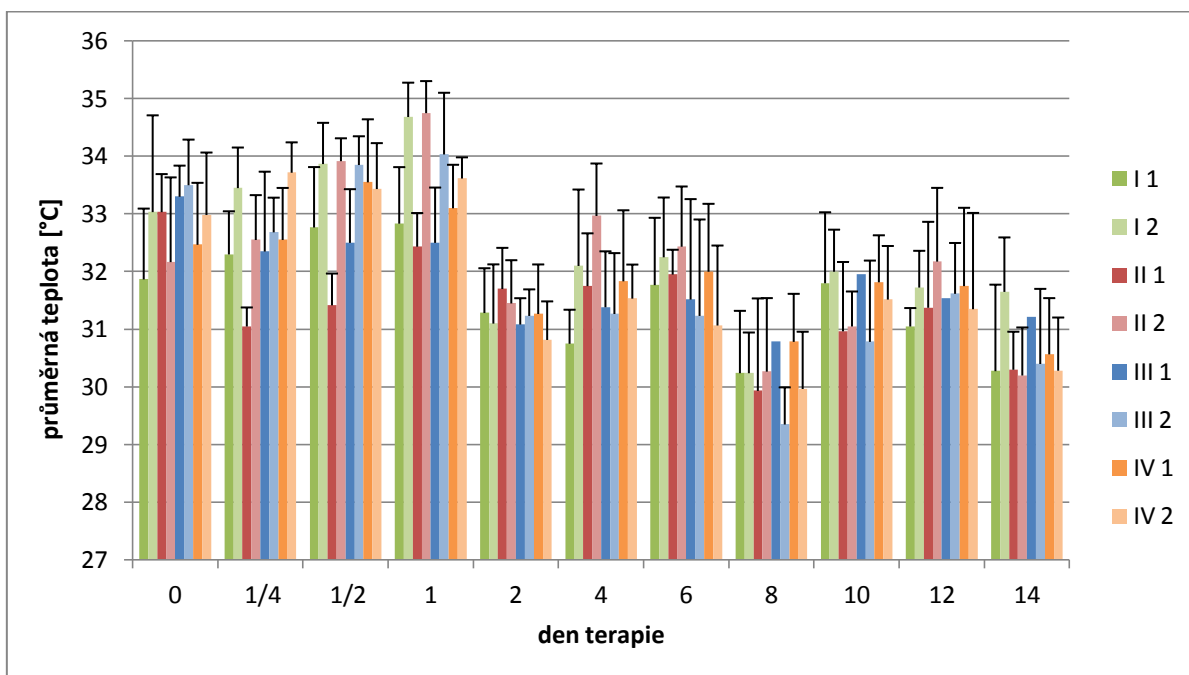
**I** – Zymosan A – BAM + 1. den makrofágy, **II**– Zymosan A – BAM, **III**- PBS + 1. den makrofágy, **IV** – PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině IV: \*  $P \leq 0,05$

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině III:  $\Delta P \leq 0,05$ ,  $\Delta\Delta P \leq 0,01$ ,

$\Delta\Delta\Delta P \leq 0,005$

Teploty naměřené v průběhu terapie jsou zaznamenány na Obr. 14. V průběhu prvního dne byly teploty o něco vyšší než ve zbývajících dnech.



**Obr. 14:** Teploty naměřené v průběhu terapie - vliv kotveného Zymosany A ve spojení s makrofágy.

**1** – teplota nádoru, **2** – teplota těla

**I** – Zymosan A – BAM + 1. den makrofágy, **II**- Zymosan A – BAM, **III**- PBS + 1. den makrofágy, **IV** – PBS

## 5. Diskuze

Cílem prvního pokusu bylo zjistit, zda Zymosan A kotvený na nádor pomocí BAM (účinnou kotvící složkou je hydrofobní řetězec kyseliny olejové, kotvící se do hydrofobní vrstvy membrán), bude mít větší terapeutický účinek než Zymosan A samotný. Náš předpoklad, že kotvený Zymosan A má větší účinek byl v pokusu prokázán. Možnost pozitivního vlivu samotného BAM byla vyvrácena v kontrolní skupině (BAM- lysin), ve které k žádnému terapeutickému účinku nedošlo. Zymosan A samotný sice určitý terapeutický účinek také vykazoval, ale nebyl příliš významný, což odpovídá i výsledkům dřívějších pokusů (Maršíková 2010). V pokusech prováděných už v polovině 20. století, byl zaznamenán léčebný efekt i u Zymosanu samotného, ten však byl testován na sarkomu S-180, který je méně agresivní než námi použitý melanom. K pokusům používali myši, které byly více než 100 dní staré, protože bylo zjištěno, že mladé myši špatně reagují na léčbu Zymosanem (Bradner a Clarke 1959). V našem pokusu byly použity myši mladší, možná i proto nebylo dosaženo tak dobrých výsledků. Problémem při terapii Zymosanem byla poměrně velká úmrtnost myši. Toxicita Zymosanu byla prokázána i v dřívějších studiích, kdy při dávce 1000mg/kg/den byla zaznamenána až 90% úmrtnost, se snižující se dávkou úmrtnost klesala (Bradner a kol. 1958).

Součástí pokusu bylo také stanovení množství CRP v séru, které bylo měřeno v 0, 6, 12 a 24 hodinách od započetí terapie. Výsledky ukazují, že ve skupinách léčených Zymosanem A, došlo ke zvýšené hladině CRP v porovnání s ostatními skupinami. To potvrzuje náš předpoklad, že Zymosan je schopen vyvolat zánět a tím vede k celkové aktivaci imunitního systému, tedy i boji vůči nádorovým buňkám. Zvýšení hladiny CRP bylo statisticky významné a je vhodné ke sledování počáteční fáze experimentu. Pro dlouhodobé sledování je tato metoda méně vhodná, protože následné odběry krve z myšního ocasu jsou velmi stresující a je zde i nebezpečí ovlivnění výsledků na základě uvolnění DAMPs.

Vliv terapie na tvorbu metastáz je sporná, v procentuálním zastoupení sice vykazoval Zymosan A-BAM nejmenší četnost výskytu metastáz, průměrný počet metastáz byl ale naopak nejvyšší. Čím to bylo způsobeno, není zcela jasné. Prokázaný pozitivní vliv beta glukanu na redukci tvorby metastáz (Williams a kol. 1985, Větvička a kol. 2007) mohl být potlačen působením BAM, který sám o sobě ve srovnání s kontrolou vykazoval určitý, byť velmi malý vliv ve smyslu zvýšení výskytu a intenzity metastázování. Pro to, aby byly učiněny jakékoli závěry, je však třeba rozsáhlejších studií.

Z naměřených teplot můžeme vyvodit pouze to, že teplota těla byla téměř vždy vyšší než teplota nádoru. Toto je zřejmě dáno nižší vaskularizací tkáně a možná i tím, že nádor vystupuje nad povrch těla. Překvapivé bylo, že ani aplikace vysoce účinných látek, jako je LPS a flagellin, signálních PAMPs výrazně stimulujících zánět, nevedlo ke zvýšení teploty ani nádoru, ani těla. Měření teploty se ukázalo jako neefektivní pro monitorování experimentů tohoto typu.

Kotvení Zymosanu A pomocí BAM sice příliš nezvýšilo jeho protinádorový účinek, přesto jsme se rozhodli s tímto preparátem pokračovat. Důvodem bylo i to, že paralelní výsledky s kotvením mannanu (Bruzlová, *in prep.*) a laminarinu (Auerová, *in prep.*), tedy látek blízkých složkám Zymosanu, ukázaly na velký význam kotvení, které se sice projevuje při použití těchto fagocytárních ligandů samotných jen nevýrazně, ale v kombinaci se signálními PAMPs poskytuje velice výraznou redukci nádorového růstu, vedoucí až k úplnému vyléčení. Výzkum použitelnosti Zymosanu A nekotveného v kombinaci se signálními ligandy se stal náplní další diplomové práce (Ženka, *ústní sdělení*)

Ve druhém pokusu jsme se snažili podpořit účinek kotveného Zymosanu A (Zymosan-BAM) pomocí LPS a flagellinu. Nejvýraznější terapeutický účinek měl kotvený Zymosan A ve spojení s LPS. Samotný LPS vykazoval také velmi dobré terapeutické účinky. To potvrzuje výsledky předchozích pokusů, kdy byl prokázán supresivní účinek LPS u gliomů (Mariani a kol. 2007). Velmi významné je zjištění, že Zymosan ve spojení s LPS působí synergicky.

Potlačení růstu melanomu bylo patrné také v případě použití Zymosanu A ve spojení s flagellinem. I samotný flagellin vykazuje protinádorovou aktivitu (Sfondrini a kol. 2006, Cai a kol. 2011), důležitá je však doba podání flagellinu, protože bylo zjištěno, že pokud se podá v době transplantace nádoru, vede naopak k zvýšenému růstu nádoru (Sfondrini a kol. 2006). Flagellin podaný společně s kotveným Zymosanem A vykazoval synergii, došlo k zmenšení nádoru jak vůči flagellinu samotnému, tak i vůči Zymosanu.

Nalezená výrazná synergie Zymosan A – BAM s LPS i flagellinem plně podporuje názor Underhilla a Gantnera (2004), kteří zdůrazňují nutnost spolupráce rozpustných signálních PAMPs s aktivací fagocytárních receptorů pomocí fagocytárních ligandů vázaných na povrch mikroorganismů.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší. Ačkoli se ve skupině léčené Zymosanem ve spojení s LPS jedna myš vyléčila a přežila více než sto dní, nebylo toto přežití statisticky významné oproti kontrole. Statistické významnosti bylo dosaženo pouze u skupiny se samotným LPS. Úplné vyléčení není náhoda, ve skupinách, kde jsou používány kombinace

rozpustných signálních ligandů s kotvenými fagocytárními, k tomuto jevu pravidelně dochází (Ženka, *ústní sdělení*).

Ve třetím a čtvrtém pokuse byla snaha zesílit imunitní odpověď na kotvený Zymosan A přidáním makrofágů nebo neutrofilů přímo do nádoru, provést tedy umělou infiltraci nádorů bez použití signálních PAMPs. Použití makrofágů se pozitivně projevilo ke konci obou pokusů, což je vzhledem k dlouhé životnosti makrofágů možné. Zda je tato cesta reálnou, ukážou další experimenty s opakovaným podáváním makrofágů.

## 6. Souhrn

- Byl zjištěn slabý terapeutický vliv intratumorálně podávaného Zymosanu A kotveného na nádor pomocí BAM.
- Bylo prokázáno synergické působení Zymosanu A – BAM v kombinaci s LPS a flagelinem, vedoucí k výrazné redukci nádorového růstu.
- Bylo zjištěno, že statisticky významná hladina sérového CRP odráží zánět indukovaný volným i vázaným Zymosanem A.
- Bylo zjištěno, že měření teplot nádoru a myši nereflektuje způsob a výsledky nádorové terapie a není tedy pro monitorování obdobných pokusů vhodné.
- Vliv Zymosanu A – BAM na výskyt metastáz je neprůkazný.
- Zymosan A – BAM ve spojení s LPS je schopen ojedinele vyvolat úplnou eradikaci melanomu vedoucí k úplnému vyléčení myši.

## 7. Seznam použité literatury

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

**Banchereau J, Steinman RM.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.

**Bauer S, Hartmann G, Akira S.** Toll-like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Springer 2008; 240s.

**Bohn JA, BeMiller JN.** (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 1995; 28: 3-14.

**Bradner WT, Clarke DA.** Stimulation of Host Defense against Experimental Cancer II. Temporal and Reversal Studies of the Zymosan Effect. *Cancer Research* 1959; 19: 673-678.

**Bradner WT, Clarke DA, Stock CCh.** Stimulation of Host Defense against Experimental Cancer : I. Zymosan and Sarcoma 180 in Mice. *Cancer Research* 1958; 18: 347-351.

**Cai Z, Sanchez A, Shi Z, Zhang T, Liu M, Zhang D.** Activation of Toll-like Receptor 5 on Breast Cancer Cells by Flagellin Suppresses Cell Proliferation and Tumor Growth. *Cancer Research* 2011; 71: 2466-2475.

**Cawley TN, Ballou CE.** Identification of Two *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Mannan Chemotypes. *Journal of Bacteriology* 1972; 111(3): 690-695.

**Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC.** The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Research* 1969; 29: 705-726.

**Coley WB.** Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of Surgery* 1891; 14: 199- 220.

**Coley WB.** The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1910; 3: 1-48.

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



**Čáp R, Dobeš D, Hošek F, Hyža P.** Maligní melanom. *Vojenské zdravotnické listy* 2005; 74(1): 4-8.

**Di Carlo E, Forni G, Lollini PL, Colombo MP, Modesti A, Musiani P.** The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001; 97(2): 339-345.

**Di Carlo FJ, Fiore JV.** On the Composition of Zymosan. *Science* 1958; 127: 756-757.

**Di Luzio NR, Williams DL, McNamee RB, Edwards BF, Kitahama A.** Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *International Journal of Cancer* 1979; 24(6): 773-779.

**Ditrichová D, Tichý M.** Maligní melanom – nejzhubnější kožní nádor. *Interní medicína pro praxi* 2006; 7 a 8: 352–354.

**East L, Isacke CM.** The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572: 364– 386.

**Eckschlager T, Průša R.** Laboratorní vyšetření v onkologii. Triton 2002; 254s.

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

**Gazi U, Martinez-Pomares L.** Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 2009; 214(7): 554-561.

**Goodman MG, Wormsley SB, Spinosa JC, Piro LD.** Loxoribine induces chronic lymphocytic leukemia B cells to traverse the cell cycle. *Blood* 1994; 84(10): 3457-3464.

**Hatina J.** Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část I – interakce nádoru a imunitního systému. *Klinická onkologie* 2005; 18(4): 119-125.

**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.** Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(20): 7753-7758.

**Hořejší V, Bartůňková J.** *Základy imunologie*. 3. vydání. Triton s.r.o. 2005; 279s.

**Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakuraiy MK, Ohnishi Y, Ueyama Y, Nomura T.** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research* 1986; 77: 190-196.

**Jones GH, Ballou CE.** Studies on the Structure of Yeast Mannan. *The Journal of Biological Chemistry* 1969; 244(4): 1043-1051.

**Kato K, Itoh Ch, Yasukouchi T, Nagamune T.** Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly(ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnology Progress* 2004; 20(3): 897-904.

**Kauffman EC, Liu H, Schwartz MJ, Scherr DS.** Toll-Like Receptor 7 Agonist Therapy with Imidazoquinoline Enhances Cancer Cell Death and Increases Lymphocytic Infiltration and Proinflammatory Cytokine Production in Established Tumors of a Renal Cell Carcinoma Mouse Model. *Journal of Oncology* 2012; 1-11.

**Klener P, Beneš J, Brodanová M, a kol.** Vnitřní lékařství III. Informatorium, spol. s.r.o. 2002; 195s.

**Kopecký J, Kopecký O.** NK buňky, chemokiny a chemokinové receptory. *Klinická onkologie* 2010; 23(1): 5-9.

**Krejsek J, Kopecký O.** Klinická imunologie. Nucleus HK 2004; 941s.

**Lesage G, Bussey H.** Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2006; 70(2): 317-343.

**Mačák J.** Obecná patologie. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta 2002; 191s.

**Mačák J, Mačáková J.** Patologie. Grada 2004; 347s.

**Mantovani A, Porta Ch, Rubino L, Allavena P, Sica A.** Tumor-associated macrophages (TAMs) as new target in anticancer therapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2006; 3(3): 361-366.

**Marcus R, Sweetenham JW, Williams ME, a kol.** Lymphoma: Pathology, Diagnosis and Treatment. Cambridge University Press 2007; 277s.

**Mariani CL, Rajon D, Bova FJ, Streit WJ.** Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective antitumor response in subcutaneous RG-2 gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2007; 85: 231-240.

**Maršíková H.** Optimalizace proenzymoterapie nádorových onemocnění a studium jejího mechanismu. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Magisterská diplomová práce 2010; 58 s.

**Martin DS, Hayworth P, Fugmann RA, English R, McNeill W.** Combination Therapy with Cyclophosphamide and Zymosan on a Spontaneous Mammary Cancer in Mice. *Cancer Research* 1964; 24: 652-654.

**Medzhitov R, Janeway Ch.** Innate immunity. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(5): 338-344.

**Meyer JP, Persad R, Gillatt DA.** Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder Cancer. *Postgraduate Medical Journal* 2002; 78: 449–454.

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

**Nguyen TH, Fleet GH, Rogers PL.** Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 50: 206-212.

**Pacovský V.** Vnitřní lékařství. Osveta ve spolupráci s Avicenum 1993; 343s.

**Petruželka L, Novotný J, Krajsová I.** Maligní melanom. Doporučené postupy. Projekt MZ ČR zpracovaný ČLS JEP za podpory grantu IGA MZ 2002; 1-8.

**Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC.** The Properdin System and Immunity: I. Demonstration and Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and Its Role in Immune Phenomena. *Science* 1954; 120: 279-285.

**Pillemer L, Ecker EE.** Anticomplementary factor in fresh yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 1941; 137: 139-142.

**Sarosdy MF, Lowe BA, Schellhammer PF, Lamm DL, Graham SD, Grossman HB, See WA, Peabody JO, Moon TD, Flanigan RC, Crawford ED, Morganroth J.** Oral bropirimine immunotherapy of carcinoma in situ of the bladder: results of a phase II trial. *Urology* 1996; 48(1): 21-27.

**Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, Merlo A, Tagliabue E, Ménard S, Balsari A.** Antitumor Activity of the TLR-5 Ligand Flagellin in Mouse Models of Cancer. *The Journal of Immunology* 2006; 176: 6624-6630.

**Shortman K, Liu YJ.** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews* 2002; 2: 151-161.

**Srb T.** Zhoubné nádory v roce 2009. *ÚZIS ČR* 2012; 2: 1-10.

**Šlampa P, Petera J, Abrahámová J, a kol.** *Radiační onkologie.* Galén 2007; 457s.

**Teicher BA, Alvarez E, Ang KK a kol.** *Tumor Models in Cancer Research.* Second edition. Humana Press 2011; 693s

**Turner MW.** The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology* 2003; 40(7): 423-429.

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

**Veselský Z, Macek P, Morávek P, Mařha V, Fröstl M, Višňovský P, Prošvic P, Odrátka K, Vaculíková M, Holub L.** *Základy imunologie nádorových onemocnění.* *Urologie pro praxi* 2004; 1: 17-19.

**Vetvicka V, Dvorak B, Vetvickova J, Richter J, Krizan J.** Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; 40: 291-298.

**Vetvicka V, Vetvickova J.** β-glucan-indomethacin combination produces no lethal effects. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic* 2009; 153(2): 111–116.

**Vorlíček J, Abrahámová J, Vorlíčková H, a kol.** *Klinická onkologie pro sestry.* Grada 2006; 328 str.

**Williams DL, Sherwood ER, McNamee RB, Jones EL, Di Luzio NR.** Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. *Hepatology* 1985; 5(2): 198-206.

**Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljevic D, Moran CA.** Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* 2005; 25(4): 205-230.