

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii
melanomu**

Bakalářská práce

Markéta Kovářová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2013

Kovářová, M., 2013: Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu. [Study of the possibility to use anchored Zymosan A for immunotherapy of melanoma. Bc. Thesis, in Czech.] – 52p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The purpose of this study was to examine the effect of covalently anchored Zymosan A on tumor regression. To increase the efficiency, Zymosan A was combined with some other Toll-like receptor agonists.

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, 23. 4. 2013

.....
Markéta Kovářová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za svědomité vedení mé bakalářské práce a za cenné rady, které mi v průběhu naší spolupráce udělil. Mé poděkování patří i celému kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům z oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s., konkrétně panu primáři MUDr. Josefu Kultovi za poskytnuté konzultace. Stejným dílem děkuji i MUDr. Kataríně Lukáčové z Nemocnice České Budějovice a.s.. Velké dík patří i mé rodině a přátelům, kteří mi jsou velkou oporou.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Nádorová onemocnění.....	1
1.2. Teorie vzniku nádorů.....	1
1.2.1. Nádorové hypotézy.....	1
1.2.2. Dnešní vysvětlení vzniku nádorů	2
1.2.3. Onkogeny a antionkogeny	2
1.3. Dědičnost nádorů.....	3
1.4. Karcinogeneze	3
1.5. Dělení nádorů	4
1.6. Melanom.....	4
1.6.1. Klinické příznaky a diagnostika	5
1.6.2. Typy melanomů.....	5
1.6.3. Léčba melanomu.....	6
1.7. Možnosti léčby nádorů	6
1.8. Nádor a imunitní systém.....	7
1.8.1. Buňky vrozené imunity	7
1.8.2. Buňky získané imunity	9
1.8.3. Nádorové antigeny.....	11
1.8.4. Únik nádorů imunitnímu systému	12
1.8.5. Imunita a protinádorový atak.....	12
1.9. Terapie nádorů pomocí stimulace vrozené imunity	13
1.9.1. Pattern Recognition Receptors (PRR)	13
1.9.2. Vývoj způsobu léčby	14
1.10. Zymosan (preparát získaný ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) v roli PAMP	16
1.10.1. β -glukan	16
1.10.2. Mannan	16
1.10.3. Rozpoznání Zymosanu imunitním systémem.....	17
1.10.3.1. TLR2.....	17
1.10.3.2. Dectin-1	17
1.10.3.3. Mannose binding lectin (MBL)	17
1.10.3.4. Manózový receptor (MR)	18
1.10.4. Využití Zymosanu v nádorové imunoterapii.....	18

1.11. Bifunkční činidla	19
1.12. Flagelin	20
2. Cíle práce.....	21
3. Materiály a metody.....	22
3.1. Výčet chemikálií.....	22
3.2. Laboratorní zvířata	22
3.3. Typ melanomu	22
3.4. Příprava melanomových buněk B16-F10 pro transplantaci	22
3.5. Transplantace melanomu B16-F10.....	23
3.6. Měření velikosti nádorů.....	23
3.7. Výpočet redukce nádorového růstu	23
3.8. Příprava látek pro léčbu.....	23
3.9. Příprava a vyhodnocení histologických preparátů.....	24
3.10. Počítání metastáz	24
3.11. Statistické zpracování výsledků.....	25
3.12. Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A v kombinaci s LPS na růst myšího melanomu.	25
3.13. Pokus č. 2: Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu.....	25
3.14. Pokus č. 3: Prověření vlivu kovalentní vazby pomocí SMCC/R na mikroprostředí melanomu.	26
3.15. Pokus č. 4: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s flagelinem na růst a metastazování melanomu.	26
4. Výsledky	28
4.1. Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A v kombinaci s LPS na růst myšího melanomu.	28
4.2. Pokus č. 2: Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu.....	29
4.3. Pokus č. 3: Prověření vlivu kovalentní vazby pomocí SMCC/R na mikroprostředí melanomu.	32
4.4. Pokus č. 4: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s flagelinem na růst a metastazování melanomu.	33
5. Diskuse.....	36

6. Závěr	40
7. Seznam použité literatury	41
8. Přílohy	47
8.1. Příloha 1: Znázornění vlivu léčby na mikroprostředí melanomu–pokus č. 2. (Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu).	47
8.2. Příloha 2: Příklad rozkladu nádorové tkáně granulocyty – pokus č. 2 (Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu.).....	51
8.3. Příloha 3: Další jevy v histologických preparátech – pokus č. 2 (Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu)......	52

1. Úvod

1.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění, laicky rakovina, je všeobecný název pro chorobné stavy vyznačující se nekontrolovaným dělením buněk v tkáních a orgánech těla.

První záznamy o nádorovém onemocnění jako zhoubné chorobě se objevily už ve starověkých egyptských spisech kolem roku 1600 př.n.l.. Již řecký lékař Hippokrates rozpoznal zhoubný a nezhoubný nádor (Trnka, 2008). Velký posun nastal až koncem 18. století, kdy se začala řešit otázka původu nádorů. Japonští výzkumníci vyvolali pomocí kamenouhelného dehtu karcinom u králíků, což odstartovalo další experimenty v oblasti onkologie (Trnka, 2008). Přesto, že v současné době je známo množství karcinogenů, stejně tak možnosti léčby a osvěta v oblasti prevence se zlepšily, úmrtí na nádorová onemocnění přibýlo. Je to dáno tím, že nádory vznikají nahromaděním genetických změn v buněčných genech, z čehož plyne nárůst počtu onemocnění s prodlužováním života lidí (Altaner, 2008). Až do 19. století se rakovina vyskytovala vzácně, protože průměrný věk v evropských zemích byl okolo čtyřiceti let. Mnoho lidí zemřelo např. na infekční choroby dříve, než se u nich rakovina mohla rozvinout (Weinberg, 2003). Nyní jsou nádorová onemocnění příčinou smrti každého pátého člověka na zemi (Altaner, 2008).

1.2. Teorie vzniku nádorů

V současné době existuje několik nádorových hypotéz, které reflektují vývoj názorů na příčiny této choroby. Uvádím zde ty nejznámější, které od 19. století převládaly.

1.2.1. Nádorové hypotézy

Nejstarší, embryonální hypotéza, je založena na podobnosti rychlého růstu zárodku a nádorů. Conheim-Remak ji interpretoval jako hypotézu embryonálních zbytků, podle níž by nádory vznikaly z nevyužitých embryonálních buněk. Příbuzná trofoblastová hypotéza Johna Bearda udává jako původce nádorů primordiální gonocyty (předchůdce spermií nebo vajíček) a je nejbližší nynější kmenové hypotéze (Trnka, 2008).

Následovala iritační Virchowova hypotéza opakovaného dráždění (iritace), zánětu a zraňování, které iniciuje vznik nádoru. U 15% dnes známých malignit se myšlenka zánětlivé předehty potvrdila. Iritační hypotéze v zápětí oponovala hypotéza regenerační, podle které vznik nádoru podněcuje regenerace – obnova tkáně, nikoliv její dráždění (Trnka, 2008).

V současné době dominuje mutační genová hypotéza, která předpokládá vznik nádorů jako důsledek nahromadění 3-7 mutací v buňce. Jedná se o mutace týkající se důležitých procesů řízení buněčné proliferace a diferenciaci (Krejsek a Kopecký, 2004).

Objev pluripotentních kmenových buněk v dospělých tkáních vyústil v kmenovou hypotézu karcinogeneze. Ta říká, že kmenové buňky přítomné v obnovujících se tkáních jsou staré jako organismus sám, tudíž mají dostatek času karcinogenní vlivy nastřádat a projevit. Jako první byly popsány nádorové kmenové buňky u karcinomu prsu v roce 2003 (Trnka, 2008).

1.2.2. Dnešní vysvětlení vzniku nádorů

Samotný výraz nádorové hypotézy svědčí o tom, že původ nádorů není úplně jednoznačný. Nejvíce je uznávána myšlenka, že nádory vznikají následkem akumulace genetických poruch, tedy mutační genová hypotéza (Krejsek a Kopecký, 2004).

V průběhu života je organismus vystavován působení vnějších vlivů, které mohou vyvolat mutační změny. Většina změn v DNA buňky je neustále opravována nebo těžce poškozené buňky zanikají apoptózou. Při selhání opravných mechanismů může dojít k nahromadění mutací v genech, které řídí růst buňky. Pokud se tak stane u kmenové nebo progenitorové buňky, vzniká kmenová nádorová buňka. Diferencovaná buňka získá díky mutačním změnám schopnost sebeobnovy a stává se také zárodkem nádoru (Altaner, 2008). Jedná se především o aktivaci buněčných protoonkogenů a inaktivaci antionkogenů, dále o změny v genech řídících apoptózu a opravu poškozené DNA (Rejthar a kol., 2002). Předpokládá se, že je potřeba mutace alespoň ve třech genech, aby nastala maligní transformace buňky (Altaner, 2008).

1.2.3. Onkogeny a antionkogeny

Hlavním rysem nádorů je deregulovaná, tzv. autonomní buněčná proliferace. Odchytky v rovnováze mezi proliferací a apoptózou jsou způsobeny přeměnou normálních buněčných protoonkogenů na abnormální onkogeny. Druhou nutnou podmínkou maligní transformace je genetická porucha tumor-suprimujících genů, antionkogenů (Krejsek a Kopecký, 2004).

Produkty protoonkogenů dělíme podle lokalizace v buňce na růstové faktory, receptory růstových faktorů, přenašeče signálů v cytoplazmě a na transkripční faktory v jádře. Genetické poruchy v protoonkogenech vedou ke vzniku onkogenů, jejichž produkty se nazývají transformační bílkoviny a spolupodílí se na transformaci normální buňky na

nádorovou. Protoonkogeny mohou být změněny různými způsoby, například bodovou mutací, delecí části genu, amplifikací genu nebo mutací v důsledku inserce viru. (Altaner, 2008).

Nádorově supresorické geny – antionkogeny kódují proteiny podílející se na kontrole buněčného růstu a procesu diferenciaci. Při jejich inaktivaci nebo ztrátě následuje buněčná transformace. Jako první byl objeven retinoblastomový gen (Rb gen), který je lokalizován v jádře, kontroluje transkripci a reguluje buněčné dělení. V nefosforylované formě funguje jako supresor, ale pokud je hyperfosforylován, ztrácí svou antionkogenní funkci (Rejthar a kol., 2002).

„Strážce genomu“ se přezdívá antionkogenu p53, jehož mutovaná forma se vyskytuje u více než poloviny typů lidských nádorů. Hlavní funkcí nemutované formy genu p53 je kontrola průběhu buněčného cyklu regulací transkripce a replikace DNA. Pokud dojde k poškození DNA, zvýší se exprese proteinu p53, ten se naváže na specifické sekvence DNA a tím stimuluje expresi dalších genů, které mu pomohou navodit dva důležité efekty, a sice zastavit buněčný cyklus v pozdní G₁ fázi a spustit apoptózu. Zastavení buněčného cyklu před S fází dává buňkám prostor pro reparaci DNA. V případě rozsáhlého poškození DNA, které je neopravitelné, navodí p53 apoptózu pomocí apoptózu indukujících genů (Rejthar a kol., 2002). Existuje ještě dalších deset antionkogenů, které jsou typické pro určité nádory.

1.3. Dědičnost nádorů

Nádorové onemocnění je choroba genů, a jelikož dědičnost je zprostředkována geny, naskytá se otázka dědičnosti nádorů. Ve skutečnosti rakovina dědičná není, ale existují rodiny, ve kterých se vyskytuje častěji a to kvůli zděděným predispozicím k jejímu vzniku. U somatických mutací je mutovaný gen přítomný jen v nádorových buňkách. Pokud dojde k mutaci v zárodečné buňce, je toto poškození přeneseno do další generace a vzniká predispozice, tj. větší náchylnost k rozvoji nádoru (Altaner, 2008).

1.4. Karcinogeneze

Během života je lidský organismus vystaven řadě vnějších vlivů, z nichž některé jsou schopné vyvolat mutace v příslušných genech a iniciovat vznik nádoru. Tyto zevní mutageny nazýváme karcinogeny a dělíme je na chemické, fyzikální a biologické.

Chemické karcinogeny mají kladný náboj a tudíž velkou afinitu k záporně nabitým buněčným strukturám, především k DNA, RNA a k proteinům (Rejthar a kol., 2002). Nejznámější jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) obsažené v uhelném a

cigaretovém dehtu, výfukových plynech, uzeném mase a přepalovaných tucích (Trnka, 2008).

Mezi fyzikální karcinogeny řadíme ionizující záření, které prokazatelně způsobuje nádorová onemocnění. Příkladem je výskyt velkého množství leukémií, ale také karcinomu plic a prsu po výbuchu atomových bomb v Hirošimě a Nagasaki. Dále ultrafialové záření, které způsobuje nádory kůže u lidí se zvýšenou expozicí slunečnímu záření (Rejthar a kol., 2002).

K biologickým karcinogenům řadíme hlavně viry. Například virus Ebsteina-Barrové (EBV) považovaný za původce Burkittova lymfomu čelisti, dále papilomaviry spojované s karcinomem děložního čípku. Z řad bakterií je prokázaným karcinogenem *Helicobacter pylori* (HP) související s karcinomem žaludku (Trnka, 2008).

1.5. Dělení nádorů

Nádory lze dělit podle několika kritérií. Základní dělení na maligní a benigní charakterizuje biologické chování nádoru k obklopující tkáni.

Benigní (nezhoubné) nádory zůstávají na místě svého vzniku, kde rostou expanzivně bez narušování okolní tkáně. Jedná se o ohraničené útvary, často vazivově opouzdřené, což umožňuje jejich snadné chirurgické odstranění. Organismu tedy nezpůsobují výraznější poškození, ale rizikem může být tlak na sousední struktury, zvláště u benigních nádorů centrální nervové soustavy (Rejthar a kol., 2002).

Maligní nádory rostou agresivně a jsou schopné zakládat vzdálená ložiska – metastázy. Vůči okolní tkáni vykazují infiltrativní nebo invazivní růst. Infiltrativní růst se vyznačuje vrůstáním nádorových buněk mezi buňky okolní. Invazivní růst je více agresivní a navíc má na okolní buňky destruktivní účinky, které způsobují poruchy funkce postižené tkáně. Díky přítomnosti štěpících enzymů (proteáz) je invazivní růst hlavním předpokladem metastatického rozsevu (Rejthar a kol., 2002).

Podle tkáňového původu – histogeneze dělíme nádory na mezenchymové, epitelové, neuroektodermové, leukemie, lymfomy a nádory smíšené (Vorlíček, 2006).

1.6. Melanom

Maligní melanom je nádor neuroektodermálního původu vznikající z pigmentových buněk – melanocytů. Teoreticky se tedy může objevit v kterékoliv tkáni, nejčastěji však postihuje kůži, v menší míře oči a vzácně sliznice. Jeho benigním protějškem je pigmentový névus.

V současnosti incidence kožní formy maligního melanomu celosvětově narůstá. Nejčastěji postihuje bělošskou populaci, zvláště v zemích s intenzivním slunečním svitem, tedy v Austrálii, na Novém Zélandě a na jihu USA (Adam a kol., 2004).

Hlavní příčinou maligní transformace melanocytů je expozice kůže UV záření. Největší nebezpečí obecně hrozí bělošské populaci. Za nejrizikovější skupinu považujeme jedince s fototypem kůže I a II, což jsou špatně se opalující světloucí a zrzaví lidé (Adam a kol., 2004).

1.6.1. Klinické příznaky a diagnostika

Předmětem pozorování u této malignity je pigmentový névus, u kterého sledujeme změnu barvy (zesvětlení, ztmavnutí) a velikosti. Tyto příznaky mohou být doprovázeny svěděním, v pozdějším stádiu zvředovatěním a krvácením. Metastázy se nejčastěji vyskytují v podobě dalších lézí v kůži, v lymfatických uzlinách a plicích, méně pak v játrech a kostech (Novotný a kol., 2005).

Nejprve se stanovuje rozsah nádoru ultrazvukovým vyšetřením léze a spádových mízních uzlin. Diagnostika vzdálenějších metastáz vyžaduje vyšetření hrudníku, břicha a malé pánve. Nejcitlivějším nádorovým markerem je hladina LDH (laktát-dehydrogenáza). V případě familiárního výskytu nádorů se nemocný podrobí genetickému vyšetření (Novotný a kol., 2005).

1.6.2. Typy melanomů

Podle lokalizace dělíme maligní melanomy na kožní, okulární, slizniční a jiné. Okulární a slizniční formy spadají z terapeutického hlediska pod nádory příslušné stejné lokalizace. Kožní maligní melanom je nejrozšířenějším melanomem v bělošské populaci a vyskytuje se v čtyřech hlavních typech (Adam a kol., 2004).

- Superficiálně se šířící maligní melanom (SSM)

Tvoří přes polovinu všech melanomů. Vyskytuje se v podobě pomalu rostoucí ploché skvrny, která se šíří do stran a má nepravidelnou pigmentaci. V radiální fázi netvoří metastázy. Může vzniknout z dysplastického névu i se objevit na čisté kůži.

- Nodulární maligní melanom (NMM)

Od začátku roste vertikálně, může tedy vytvářet metastázy v jakékoliv fázi. Vzniká z névu i samostatně.

- Lentigo maligna melanom (LMM)

Jedná se o tmavé skvrny, vyskytující se hlavně v obličeji, zejména u starších lidí. Tato forma roste pomalu a v pozdějším stádiu tvoří metastázy.

- Akrolentiginózní maligní melanom (ALM)

Tento melanom je zvláštní svou lokalizací, vyskytuje se na koncových člancích prstů, často přímo pod nehtem. Kvůli své lokalizaci bývá mylně diagnostikován jako hematom nebo mykóza (Adam a kol., 2004).

1.6.3. Léčba melanomu

U primárního nádoru je standardním postupem chirurgické odstranění léze i s okrajem zdravé kůže. Nyní se odstraňuje lem široký 1-3cm, dříve byly prováděny rozsáhlé excize s okrajem až 7 cm, ale neprokázala se u nich žádná výhoda. V případě postižení regionálních uzlin, je také nutné jejich odstranění. Pokud nalezneme vzdálené metastázy, které není možné odstranit chirurgicky, přichází na řadu chemoterapie a radioterapie. Obecně je odpověď melanomu na chemoterapii slabá, proto je třeba zvážit její rizika a přínosy pro pacienta. Radioterapie se používá zejména při metastázách v kostech a v CNS (Adam a kol., 2004).

1.7. Možnosti léčby nádorů

K nejběžnějším metodám nádorové terapie patří chirurgická léčba, chemoterapie a radioterapie. V závislosti na stádiu choroby a přítomnosti metastáz se často volí jejich kombinace.

Obecně dělíme léčbu na protinádorovou, podpůrnou a paliativní. Protinádorová léčba zahrnuje léčbu kurativní, jejímž cílem je úplné odstranění nádoru. Naopak nekurativní přístup usiluje o zabíjení nádorových buněk, ale nelpí na jejich úplném vyhubení. Uplatňuje se v případech, kdy stádium nemoci nebo celkový stav pacienta znemožňují úplné vyléčení. Výsledkem je prodloužení života o týdny až roky. Podpůrná léčba se zaměřuje na zmírnění potíží vyvolaných samotným nádorem a terapií – např. bolest, infekce při chemoterapii, anemie. Paliativní léčba je komplexní podpůrná léčba, která pomáhá nemocnému na sklonku života snášet utrpení (Vorlíček, 2006).

Chirurgická léčba se používá nejčastěji u nádorů v ranném stádiu. Cílem je odstranit nádor i s kmenovými nádorovými buňkami předtím, než vycestují do jiných částí těla, kde zakládají metastázy. Pokud jsou přítomna sekundární ložiska, uplatňuje se kombinace s radioterapií a chemoterapií (Altaner, 2008).

Radioterapie využívá dva druhy ionizujícího záření – elektromagnetické (fotonové) a korpuskulární (částicové). K elektromagnetickému záření patří rentgenové a gama záření. Částicové záření pracuje především s elektrony. Podle způsobu ozařování rozlišujeme teleradioterapii, což je ozařování z dálky, kdy k ložisku vychází ze zdroje kužel paprsků. Naopak při brachyradioterapii je zdroj záření zaváděn do těla pacienta, čímž se dosáhne vysoké a přesné dávky přímo v nádoru (Vorlíček, 2006).

Při cytotoxické chemoterapii jsou zabíjeny aktivně se dělící buňky. Celý nádor se vždy nepodaří kompletně zlikvidovat kvůli malému množství nedělících se kmenových nádorových buněk. Naopak cytostatická chemoterapie cíleně blokuje molekulové dráhy (např. přenos růstových signálů) v nádorových buňkách a tím zastavuje jejich množení (Altaner, 2008).

1.8. Nádor a imunitní systém

Imunitní systém zahrnuje dva typy obranných mechanismů, přirozenou (nespecifickou) imunitu a adaptivní (specifickou) imunitu. Obě větve fungují rozdílně, každá má své specifické buňky, ale pro obranu organismu je důležitá jejich spolupráce.

1.8.1. Buňky vrozené imunity

Hlavním pilířem přirozené imunity je schopnost jejích buněk pohlcovat, usmrcovat a rozkládat mikroorganismy – tedy fagocytóza. Fagocyty buňky rozpoznávají „nebezpečné vzory“ patogenních mikroorganismů pomocí membránových receptorů (Krejsek a Kopecký, 2004).

Fagocyty pronikající do poškozených tkání se nejprve zachytí na povrchu endoteliálních buněk cév a poté mezi nimi prostoupí do tkáně (diapedéza). Vlivem zánětlivých cytokinů exprimují endoteliální buňky adhesivní molekuly, ty se nacházejí i na fagocytech a jejich interakcí k sobě buňky přilnou. V tkáni řídí pohyb fagocytů chemotaktické faktory uvolňované z místa zánětu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Neutrofilní granulocyty jsou nejpočetnější populací leukocytů. Pohlcují mikroorganismy a pomocí mikrobicidních látek obsažených v granulích je usmrcují. Produkují prozáněťové cytokiny TNF α (Tumor Necrosis Factor α), IL-1 α , β , IL-12, chemokiny regulující migraci buněk – IL8 a faktory stimulující hematopoézu G-CSF, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor). Působení granulocytů je nespecifické, proto dochází k určitému poškození vlastních struktur. Pokud buňky imunitního systému rozptýlené ve tkáních identifikují infekční částici, produkují cytokiny,

hlavně G-CSF, GM-CSF a IL-3, které stimulují diferenciaci granulocytů v kostní dřeni. Životnost neutrofilů je pouze několik desítek hodin (Krejsek a Kopecký, 2004).

Makrofágy se nacházejí ve všech tělních orgánech a je velká pravděpodobnost, že se invadující patogen s nimi setká, proto jsou označovány jako tzv. předsunutá hlídka imunitního systému. Monocyto-makrofágový systém se začíná diferencovat v kostní dřeni z myeloidních prekurzorů, odtud jsou monocyty vyplaveny do periferní krve, kde určitý čas cirkulují a prodělávají změny v expresi povrchových molekul. Nakonec monocyty migrují do tkání a přeměňují se ve tkáňové makrofágy, které nesou typickou molekulu CD68. Makrofágy mají schopnost prezentovat antigeny pohlcených částic T lymfocytům v komplexu s molekulami HLA I. nebo II. třídy. Jsou tedy mimořádně důležité pro rozvoj specifické imunitní odpovědi zprostředkované T lymfocyty (Krejsek a Kopecký, 2004). Na rozdíl od granulocytů, které pracují ihned, potřebují makrofágy ke své plné funkci aktivační signály od T lymfocytů – interferon- γ , TNF. Další důležitá funkce makrofágů spočívá v produkci cytokinů IL-1 α i β , IL-3, TNF, IL-6, IL-8, IL-12 a GM-CSF (Hořejší a Bartůňková, 2009)

Existují i makrofágy asociované s nádory (TAM, Tumor Associated Macrophages), které poskytují nádorovým buňkám růstové faktory a faktory podporující angiogenezi, např. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Dále pomocí proteáz rozkládají okolní tkáň a tím usnadňují invazi a zakládání metastáz (Wahl a Kleinman, 1998). Tyto buňky jsou také možným cílem nádorové terapie. Joseph a Isaacs (1998) zkoumali vliv čtyř různých chemických sloučenin (Linomidu, thalidomidu, pentoxifylinu a genisteinu), které měly redukovat hustotu cévního zásobení a počet TAM u krys postižených rakovinou prostaty. Linomide způsobil 69% inhibici nádorového růstu a nejúčinněji redukoval angiogenezi.

Dendritické buňky vznikají z myeloidní vývojové linie a společně s makrofágy fungují jako buňky prezentující antigeny T lymfocytům (APC; antigen presenting cells) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Prekurzory nezralých dendritických buněk migrují z krve do tkání působením chemokinů tvořených při zánětové reakci. Následně přestanou na chemokinové signály reagovat a setrvají v daném místě, což jim umožní dostatečně dlouho interagovat s mikrobiálními podněty. Poté chemokiny stimulují jejich migraci do sekundárních lymfatických orgánů, kde ztrácí schopnost pohlcovat antigeny. Kromě kontaktu s mikrobiálními povrchy jsou dendritické buňky aktivovány působením prozáněťových

cytokinů a TNF α . Jejich role tedy spočívá v indukci klonální expanze T lymfocytů, kterým vystavují antigeny v komplexu s MHC I nebo II (Krejsek a Kopecký, 2004). Folikulární dendritické buňky (FDC) slouží jako APC B lymfocytům. V lymfatických uzlinách se na povrchu FDC zachycují komplexy protilátky s antigenem – imunokomplexy. Shromážděné antigeny mohou být rozeznávány B lymfocyty, které se následně transformují v paměťové B lymfocyty (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Basofily, žírné buňky a eosinofily hrají roli v ochraně epiteliálních povrchů, hlavně sliznice trávicího, dýchacího a urogenitálního traktu, před parazity. V cytoplazmě mají granula obsahující zánětlivé a cytotoxické mediátory. Zatímco neutrofilní granulocyty likvidují fagocytované mikroorganismy uvnitř buňky, eozinofily, basofily a žírné buňky uvolňují obsah svých granulí do vnějšího prostředí, kde parazity ničí. Basofily a žírné buňky obsahují mediátor alergické reakce, histamin (DeFranco a kol., 2007).

NK buňky, označované jako přirození zabíječi (Natural Killer), se pravděpodobně oddělují od lymfoidních prekurzorů. S T lymfocyty mají společné např. povrchové molekuly CD2, pro ně samotné je charakteristická molekula CD56. Na rozdíl od T lymfocytů neexprimují receptory pro antigen. Úlohou NK buněk je cytotoxicky likvidovat buňky virem infikované, nádorové nebo infekční agens. Pomocí membránových receptorů se váží na ligandy cílových buněk a prověřují, zda mají být eliminovány. Povrchové molekuly KAR (Killer Activation Receptor) NK buněk nesou aktivační motiv ITAM (Immunoreceptor Thyrosine based Activation Motif). Pokud KAR identifikuje na cílové buňce svůj ligand, poskytne tím NK buňce aktivační signál. Naopak KIR (Killer Inhibition Receptor) nesoucí motiv ITIM (Immunoreceptor Thyrosine based Inhibition Motif) poskytuje inhibiční signál. Po sečtení všech aktivačních a inhibičních signálů zahájí NK buňka buď cytotoxický útok, nebo vyhodnotí buňku jako normální. Cytotoxická aktivita je zesílena IL-2 produkovaným TH₁ lymfocyty, samotné NK buňky produkují INF γ , IL-3, GM-CSF a TNF α (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.8.2 Buňky získané imunity

T lymfocyty se vyvíjejí v thymu, kam putují jejich prekurzory z kostní dřeně. Thymocyty zde získají funkční komplex TcR (T cell Receptor) a molekul komplexu CD3, navíc exprimují současně molekuly CD4 a CD8 a proto jsou označovány jako dvojitě pozitivní. Takto vybavené vyzárající T lymfocyty vstupují do procesu pozitivní a negativní

selekcce. V rámci pozitivní selekcce jsou eliminovány T lymfocyty, které nemají afinitu k vlastním molekulám MHC. Zároveň se z dvojité pozitivních buněk stávají CD8⁺ nebo CD4⁺ T lymfocyty tím, že snižují expresi druhé molekuly. Vznikají tedy TC lymfocyty CD8⁺ (cytotoxické), které rozpoznávají antigeny v komplexu s MHC molekulami I. třídy a TH lymfocyty CD4⁺ (helpery) interagující s MHC II. třídy. Při negativní selekci hynou ty, které s vysokou afinitou rozpoznávají komplexy MHC s vlastními antigeny.

Diferencovaný T lymfocyt migruje z thymu do sekundárních lymfatických orgánů, kde TH subpopulace po setkání s antigenem vyzrává do funkčně odlišných subsetů. Naivní TH lymfocyt, který se nesetkal s antigenem, označujeme jako subset TH0 (Krejsek a Kopecký, 2004).

Subset TH1 T lymfocytů aktivuje makrofágy produkcí cytokinů, zejména IL-2 a INF γ . TH2 buňky interagují s B lymfocyty stimulovanými antigenem a pomáhají jim se namnožit a diferencovat v plazmatické buňky, které produkují protilátky. Tato pomoc spočívá v produkci cytokinů IL-4, IL-5, IL-6 (Hořejší a Bartůňková, 2009).

T lymfocyty, které po antigenní stimulaci produkují TGF β (Transforming growth factor β) a IL-10 spadají do samostatného subsetu TH3, jsou také označovány jako Treg (regulační T lymfocyty). Jejich cytokiny mají protizáněťové účinky a tlumí aktivitu subsetu TH1 (Krejsek a Kopecký, 2004).

Dalším subsetem T lymfocytů jsou buňky TH17, nazvané podle produkce IL-17, který stimuluje aktivitu neutrofilů. Dále produkují IL-21 a tím aktivují NK buňky. Diferenciace TH17 z TH0 T lymfocytů je zprostředkována IL-23 produkovaným buňkami vrozené imunity (Hořejší a Bartůňková, 2009).

B lymfocyty jsou základní buňky specifické humorální imunity. Vyuvíjejí se z progenitorových buněk v kostní dřeni a poté se hromadí v sekundárních lymfatických orgánech. Na svém povrchu exprimují receptory pro antigen BcR (B cell Receptor), které interagují se samotnými antigenními podněty a nepotřebují je předkládat v komplexu s molekulami MHC. BcR se skládá z molekul IgM a IgD. Naivní zralé B lymfocyty s vyjádřeným receptorem recirkulují mezi periferními lymfatickými tkáněmi, dokud se nesetkají s antigenem. K aktivaci B lymfocytů je nutná nejen antigenní stimulace, ale také pomocné signály poskytované subsetem TH2 T lymfocytů. Poté dojde ke klonální expanzi a diferenciaci do konečného stádia plazmatické buňky. Plazmatická buňka produkuje protilátky, imunoglobuliny, které jsou solubilní formou BcR původního B lymfocytu a mají tedy stejnou antigenní specifitu.

B lymfocyty také slouží jako buňky prezentující antigeny. Jsou schopné internalizovat komplexy BcR s vycíhanými antigeny, které zpracují a prezentují ve vazbě s MHC II. třídy pomocným T lymfocytům (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.8.3. Nádorové antigeny

Nádorové buňky jsou tělu vlastní, jen se více či méně odlišují od buněk normálních. Teoreticky by je měly imunitní mechanismy likvidovat jako jiné patogeny. Rozdíly mezi nádorovou a normální buňkou jsou ale tak malé, že je imunitní systém ignoruje (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Už v šedesátých letech 20. století bylo známo, že nádor jako takový se poměrně málo antigenně odlišuje od tkání svého vzniku. Jeho antigeny jsou málo „nové“ nebo „cizí“ na to, aby byly dostatečným podnětem pro imunitní atak. Navíc atak nastupuje s určitým časovým zpožděním, protože vzniklý novotvar je často mechanicky izolován od kontaktu s buňkami imunitního systému, např. vazivovým pouzdrům, které rozrušuje teprve v pokročilejším stádiu (Sekla, 1961). Přesto je existence nádorových antigenů základní podmínkou pro rozpoznání a eliminaci nádoru imunitními mechanismy. Byly identifikovány dvě skupiny nádorových antigenů – antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

TSA se vyskytují výlučně na nádorových buňkách konkrétního nádoru u konkrétního jedince. Jsou výsledkem genových mutací, které způsobí maligní transformaci buňky. Využití TSA pro léčbu je značně komplikované, protože případná terapie by musela být zcela individuální.

Do této kategorie řadíme např.: Komplexy MHC tř. I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů. Abnormální proteiny jsou produkty mutovaných genů. Dále komplexy MHC s fragmenty proteinů onkogenních virů, které najdeme u nádorů vyvolaných viry (EBV). Nádorové buňky myelomů a lymfomů mají na povrchu BcR nebo TcR, které fungují jako antigenní struktury (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009).

TAA se nacházejí jak na nádorových, tak i na normálních buňkách, liší se pouze v míře exprese. Patří mezi ně např. onkofetální antigeny embryonálních buněk, které jsou v postnatálním období exprimovány pouze na nádorových buňkách – α fetoprotein (AFP), karcinoembryonální antigen (CEA). Dále melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A) přítomné na melanomových buňkách, méně pak na normálních melanocytech (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.8.4. Únik nádorů imunitnímu systému

Antigenní specifika nádorových buněk ještě není zárukou, že je imunitní systém rozpozná. Nádorové buňky si pro svou obranu vytvořily mechanismy, které jim umožní uniknout imunitnímu dozoru. Existuje několik způsobů úniku (Rejthar a kol., 2002).

Během růstu nádoru dochází k pozitivní selekci neantigenních nebo slabě antigenních buněk a ty silně imunogenní jsou eliminovány. Zbylé antigeny musí být prezentovány Tc lymfocytům v komplexu s MHC I. třídy a navíc musí být přítomny kostimulační molekuly CD80 a CD86. Obojí je u nádorových buněk redukováno nebo chybí úplně, nefungují tedy jako APC (Rejthar a kol., 2002).

Nízká denzita MHC I. třídy by měla vyvolat cytotoxický útok NK buněk (Krejsek a Kopecký, 2004). Pro tento případ se však nádor brání expresí molekul HLA-G, což potvrdil Paul a kol.(1998), kteří zjistili přítomnost HLA-G u melanomových buněčných linií i v metastáze získané biopsií.

Nádor- protektivně působí i membránové produkty genu Fas. Nádorové buňky exprimují Fas ligand a Tc lymfocyty mají Fas i Fas ligand. Interakce Fas – FasL indukuje u cytotoxických lymfocytů apoptózu (Rejthar a kol., 2002).

V prostředí nádoru je zvýšen výskyt T-regulačních lymfocytů (T_{reg}), které chrání organismus před autoimunitní reakcí. T_{reg} produkují suprimující cytokiny TGF β a IL-10 a inhibují buněčný cyklus $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů, mohou tedy přispět k rozvoji nádoru (Lineham a kol., 2005).

1.8.5. Imunita a protinádorový útok

I přes obtížnou rozlišitelnost je vůči nádoru zahájena imunitní reakce. Jedná se o poslední obranu organismu, protože nastupuje až po opravných mechanismech genetických poruch na úrovni DNA. Donedávna byl prosazován zejména vliv specifické imunity, která by měla rozpoznávat nádorové antigeny. Nyní víme, že T lymfocyty rozpoznávají pouze antigeny zpracované APC, a přikládáme vrozené imunitě rozhodující podíl v boji s nádory (Krejsek a Kopecký, 2004).

Mikroprostředí nádoru, charakterizované hypoxií, aktivuje složky přirozené imunity, které prezentují zpracované antigeny T lymfocytům a poskytují jim I. aktivační signál. Nejúčinnějšími APC jsou dendritické buňky, které zpracovávají nádorové antigeny v průběhu migrace do sekundárních lymfatických orgánů. Pro zajištění optimálního kontextu rozpoznávání jsou nutné II. signály, u dendritických buněk se jedná o interakci kostimulačních molekul CD80 a CD86 s molekulou CD28 na T lymfocytech. Pokud T

lymfocytům chybí II. signál jsou utlumeny nebo hynou apoptózou a vzniká prostředí, kde je navozena tolerance rostoucího nádoru (Krejsek a Kopecký, 2004).

Nádorové buňky postrádají expresi molekul MHC I. třídy, a stávají se tak terčem pro cytotoxický útok NK buněk. Dále stimulují imunitní systém k produkci interferonů (INF), které po navázání na povrchové receptory cílových (nádorových) buněk způsobí rozklad RNA. Imunomodulační $INF\gamma$ zesiluje expresi MHC I. třídy na nádorových buňkách a tím je zcitliví pro cytotoxické $CD8^+$ T lymfocyty (Krejsek a Kopecký, 2004).

Naopak Gastl a kol. (1996) ve své analýze primárních a metastatických buněk renálního karcinomu ukázali, že některé typy nádorů exprimují i MHC II. třídy, čímž iniciují odpověď $CD4^+$ T lymfocytů.

1.9. Terapie nádorů pomocí stimulace vrozené imunity

Z výše uvedených poznatků plyne, že nádorové buňky jsou málo imunogenní a je nutné je imunitnímu systému zviditelnit, např. „označit“ vhodným motivem, který bez problému rozpozná.

Složky přirozené imunity jsou schopné identifikovat nebezpečné vzory invadujících mikroorganismů pomocí receptorů PRR (Pattern Recognition Receptors). Za nebezpečné vzory považujeme buněčné struktury typické pro mikroby – tzv. molekulové vzory asociované s patogeny (Pathogen Associated Molekul Patterns- PAMPs). PAMPs dělíme na motivy fagocytární a na signální motivy, které vyvolají zánět. Tyto konzervované struktury se nacházejí u Gram-pozitivních, Gram-negativních bakterií a mykobakterií. Jedná se například o peptidoglykan, lipoproteiny, lipopolysacharid (LPS), kyselinu lipoteichovou, flagelin nebo N-formylmethionin. U kvasinek nalezneme glukany a manany. Významné imunostimulační účinky mají i úseky bakteriální DNA, které obsahují sekvence purin-pyrimidin-C-G-pyrimidin-pyrimidin - CpG motivy (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.9.1. Pattern Recognition Receptors (PRR)

Z hlediska funkce dělíme PRR na sekretované, endocytární a signální. Sekretované PRR se váží na mikrobiální povrchy, opsonizují je a tím zajistí jejich identifikaci fagocyty a komplementovým systémem. K tomuto typu řadíme lektin vázající manan (Manan Binding Lectin, MBL). Fagocytující buňky exprimují endocytární PRR, které zajistí vazbu, pohlcení a směrování mikrobů do lysozomu. Příkladem je makrofágový receptor pro manosu (MMR) nebo makrofágový vychytávací receptor MSR (Macrophage Scavenger Receptor). Signální receptory po identifikaci PAMPs spustí signální systém $NF\kappa B$, který stimuluje produkci

prozáněťových cytokinů, především TNF α a IL-1. Do této třídy spadají Toll-like receptory (TLR) (Krejsek a Kopecký, 2004).

První člen rodiny Toll genů byl původně identifikován u drozofily, kde kontroluje vývoj dorzoventrální osy embrya (Janeway a Medhizov, 1999). Ukázalo se, že tento gen kóduje transmembránový protein skládající se z extracelulární části bohaté na leucin a z cytoplazmatické domény, která je shodná s cytoplazmatickou doménou savčího receptoru pro IL-1 (Hashimoto a kol., 1988).

V současnosti známe 10 funkčních TLR, které můžeme rozdělit podle buněčné lokalizace. TLR 1,2,4,5,6 a 10 jsou exprimovány na povrchu buněk a po aktivaci migrují do fagosomu, zatímco TLR 3, 7, 8 a 9 jsou na povrchu buněčných kompartmentů, hlavně endosomu a endoplazmatického retikula. Nitrobuněčné TLR identifikují např. nukleové kyseliny virů, které pronikly do buňky. Pokud není přítomen ligand, mají TLR tendenci vytvářet nekovalentní dimery. Např. TLR-2 tvoří heterodimery s TLR-1, případně s TLR-6 (Kanzler a kol., 2007).

Dnes víme, že TLR se vyskytují i u různých typů nádorů. Aktivace nádorových TLR nepodporuje pouze proliferaci, ale také invazi a metastazování. Navíc indukuje tvorbu prozánětlivých a imunosuprimujících cytokinů, které zvyšují rezistenci nádoru vůči ataku Tc lymfocytů (Huang a kol., 2008). Nedávná studie prokázala výrazně vyšší expresi TLR7-TLR10 u karcinomu tlustého střeva v porovnání s normální tkání. Současně byla zjištěna nízká míra přežití spojená s expresí TLR7 a TLR8, které jsou přítomny i u kmenových nádorových buněk a zvyšují jejich rezistenci k apoptóze (Grim a kol., 2010).

1.9.2. Vývoj způsobu léčby

První poznatky o rakovině ve spojení s bakteriální nákazou se objevily v devatenáctém století, kdy byl pozorován pozitivní účinek infekčního onemocnění kůže způsobeného bakterií *Streptococcus pyogenes* na remisi nádoru. Tímto případem se inspiroval přední americký chirurg William Coley, který poté injikoval směs bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Bacillus prodigiosus* pacientům s neoperabilním sarkomem a dosáhl více než 10% vyléčení. Svým preparátem, zvaným Coleyho toxiny, naznačil první pokus o imunoterapii nádorů (Coley, 1910).

Poté se začala používat atenuovaná vakcína bacille Calmette-Guerin, která byla původně vyvinuta proti tuberkulóze a dodnes je považována za nejúčinnější terapeutikum při léčbě karcinomu močového měchýře (Kamat a Lamm, 2001).

V návaznosti na Coleyho experimenty Havas a kol.(1958) srovnávali vliv různých kmenů *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, samostatně i v kombinaci, na regresi myššího sarkomu 37. Posuzována byla i toxicita u zdravých myši, kdy při dávce 1ml směsi toxinů nastala až stoprocentní úmrtnost. Donnelly a kol.(1958) doplnili otázku toxinů histopatologickým rozbořem. Přítomnost nekrózy a granulocytárního infiltrátu a 50-ti až 60-ti procentní regrese nádoru potvrdily, že určitý onkolitický efekt toxinů existuje.

Nejen bakterie, ale i viry se používaly s cílem eliminovat nádor. Virus vakcinie byl aplikován u metastáz maligního melanomu a způsobil vymizení sekundárních intradermálních ložisek u 6 z 10 případů. Účinkoval pouze při přímé inokulaci do léze, na vzdálenější ložiska a ložiska v lymfatických uzlinách neměl žádný vliv. Mechanismus účinku nebyl zcela objasněn, ale nejvíce se usuzovalo na stimulaci nespecifické odpovědi imunitního systému (Hunter a kol., 1970).

Unikátní mechanismus přirozené odolnosti vůči nádorům popsal Cui a kol.(2003). Jediná myš kmene BALB/c zůstala po transplantaci Sarkomu 180 bez nádoru. Pro ověření zázračné regrese byly myši podány další čtyři injekce, z toho dvě se zvýšenou koncentrací nádorových buněk, a ani poté k rozvoji sarkomu nedošlo. Naopak, transplantace vyprovokovala masivní infiltraci leukocytů vrozené imunity, které začaly s nádorovými buňkami vytvářet shluky a rosety. Následná cytolýza probíhala rychlostí až 20 milionů buněk sarkomu za prvních 12 hodin a bez poškozování normálních buněk. Potomci původní myši vykazovaly odolnost až ve 40ti %. Při křížení s myšmi z kmenů C57BL/6, CASE/Ei a CH3 došlo také k přenosu znaku na potomky. Bylo tedy jasné, že se jedná o dominantní mutaci v genu a myši ji nesoucí začaly být označovány jako SR/CR – (spontaneous regression / complete resistance) (Cui a kol., 2003; Hick a kol., 2006).

V současné době se je středem zájmu terapeutické využití agonistů TLR, které stimulují vrozené protinádorové mechanismy, tedy aktivují NK buňky, monocytomakrofágový systém a indukují produkci cytokinů jako je INF α , INF γ a TNF α (Kanzler a kol., 2007). Kauffman a kol.(2012) in vivo pokusem ověřili, že Imidazoquinolin, syntetický agonista TLR 7 a 8, působí protinádorově. Myši s renálním karcinomem léčené Imidazoquinolinem vykazovaly už po prvním podání 50% redukci nádorového růstu. Zároveň byla prokázána indukce apoptózy, zvýšená infiltrace T-ly a produkce prozáněťových cytokinů.

Agonistou TLR9 jsou nemetylované CpG motivy bakteriální DNA, použité např. na modelu myššího karcinomu tlustého střeva. Injikace oligodeoxynukleotidů s CpG motivy

(CpG ODN) do okrajové části nádoru způsobila jeho regressi a vyléčení 17 myší z 20. U myší se dvěma nádory byla navozena systémová odpověď, neboť došlo k odhojení i neléčeného nádoru (Heckelsmiller a kol., 2002).

1.10. Zymosan (preparát získaný ze *Saccharomyces cerevisiae*) v roli PAMP

Saccharomyces cerevisiae je jednobuněčný eukaryotní organismus, řadí se mezi vřeckovýtrusné houby, do čeledi kvasinkovitých. Primitivní houby mají pevnou buněčnou stěnu, která je tvořena chitinem, polymery N-acetyl-D-glukosaminu, glukany, manany a galaktany. Vrozená imunita rozpoznává patogenní kvasinky na základě interakcí s těmito konzervovanými složkami (DeFranco a kol., 2007). Metodou, původně popsanou Pilmerem a Eckerem, lze z buněčné stěny kvasinek získat Zymosan - jemný prášek, nerozpustný ve vodě, v organických ani v zásaditých rozpouštědlech. Zymosan obsahuje zejména β -glukan a manan (Pillemer a Ecker 1941). Existují 2 typy zymosanu A a B, které se mírně liší svým chemickým složením (Di Carlo a Fiore, 1958).

1.10.1. β -glukan

β -glukany (polymery glukózy) jsou nejefektivnější imunomodulátory z řad polysacharidů, které se uplatňují v protinádorové a protiinfekční imunitě. Kromě buněčných stěn hub mohou být izolovány z mořských řas, bakterií a obilovin. Primární řetězec β -glukanů je tvořen z β (1 \rightarrow 3) glykosidicky vázaných D-glukopyranózových jednotek, ke kterým se napojují vedlejší D-glukopyranosy vazbou (1 \rightarrow 6). Počet vedlejších jednotek vyjadřuje stupeň větvení (degree of branching, DB). Imunostimulační efekt β -glukanů spočívá v nárůstu profesionálních fagocytů – monocytů, makrofágů, granulocytů a dendritických buněk (Novak a Vetvicka, 2009).

1.10.2. Mannan

Mannan je složen převážně z D-manosy a může obsahovat i malé množství jiných cukrů, např. N-acetyl-D-glukosaminu. V hlavním řetězci jsou D-mannosové jednotky spojeny vazbou α (1 \rightarrow 6), jednotky postraních řetězců se připojují α (1 \rightarrow 2) a α (1 \rightarrow 3). Buněčná stěna *Saccharomyces cerevisiae* různých kmenů může obsahovat strukturně odlišné mannany (Cawley a Ballou, 1972).

1.10.3. Rozpoznání Zymosanu imunitním systémem

Díky svému složení je Zymosan rozpoznáván hned několika PRR na buňkách vrozené imunity.

1.10.3.1. TLR2

TLR2 rozpoznává celou řadu mikrobiálních komponent. Experiment s TLR-2 deficientními myši, které byly náchylné k infekci *Stafylococcus aureus* ukázal, že tento TLR je zásadní pro rozpoznání peptidolykanů Gram-pozitivních bakterií (Takeuchi a kol., 2000). Underhill a kol.(1999) definovali rozpoznávání kvasinek, za kterými TLR-2 putuje do fagosomu makrofágů. Z toho plyne, že při fagocytóze patogenů mohou spolupracovat obě třídy PRR. Fagocytární receptory zajistí pohlcení částice (zde receptor pro manosu-MR) a signální receptory (zde TLR-2) putují do fagosomu, kde se váží na ligand a spustí zánětlivou odpověď.

1.10.3.2. Dectin-1

Dectin-1 je hojně exprimován na dendritických buňkách, kde jeho C-lektinová doména zprostředkuje rozpoznání glukánů spojených $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow6)$ glykosidickou vazbou. Souběžně je TLR-2 směřován do fagosomu a tyto dva receptory synergicky vyvolají produkci zánětlivých cytokinů (DeFranco a kol., 2007). Experiment s využitím Dectin-1 specifických monoklonálních protilátek ukázal, že Dectin-1 funguje jako hlavní receptor pro Zymosan i na makrofágách (Brown a kol., 2002).

1.10.3.3. Mannose binding lectin (MBL)

MBL se váže na cukerné ligandy v buněčné stěně bakterií, kvasinek a virů. Spadá do rodiny kolektinů, což jsou solubilní proteiny přítomné na sliznicích a v krevním oběhu, které rozpoznávají mikrobiální povrchy. Jednotlivé řetězce kolektinů se skládají z N-terminální oblasti bohaté na cystein, kolagenní oblasti, alfa-helikální oblasti a z domény rozpoznávající karbohydráty (CRD) (DeFranco a kol., 2007).

Důležitou funkcí MBL je aktivace komplementu lektinovou cestou. Aktivace začíná vazbou MBL na příslušné motivy patogenů, poté se vytvoří komplex MBL se serinovou proteázou (MASP-2), která štěpí C4 a C2 za vzniku C3 konvertázy. MBL funguje také jako opsonin – připojí se k infekční částici a stimuluje její pohlcení procesem fagocytózy. (DeFranco a kol., 2007).

1.10.3.4. Manóзовý receptor (MR)

MR je PRR na povrchu makrofágů a dendritických buněk a zprostředkovává fagocytózu patogenů, jejichž buněčná stěna obsahuje karbohydráty (manózu). MR patří do rodiny multilektinových receptorů, které obsahují 8-10 lektinových domén (CTLDs), N-terminální na cystein bohatou doménu a fibronektinovou doménu typu II (FNII) (Stahl a Ezekowitz, 1998).

1.10.4. Využití Zymosanu v nádorové imunoterapii

Pozornost k Zymosanu upoutal objev properdinového systému. Zymosan přidáný k lidskému séru inaktivoval třetí složku komplementu, což bylo způsobeno přítomností sérového proteinu properdinu, který se navázal na Zymosan a vzniklý komplex PZ způsobil za určitých podmínek inaktivaci C'3 (Pillemer a kol. 1954). Následné použití Zymosanu ve spojení s nádory paradoxně zlepšilo růst transplantovaného karcinomu. Myšim byly injikovány buňky lidského karcinomu tlustého střeva a poté různé dávky Zymosanu. Vyhodnocení nádorového růstu ukázalo, že nádor se nejlépe ujal u myší, které dostaly vyšší dávky Zymosanu. Zde se nabízelo vysvětlení, že Zymosan vyvázal sérový properdin, který by jinak odolnost vůči nádoru posílil. Sporné je, že nízké dávky Zymosanu hladinu properdinu zvýšily až třikrát (Hebrut a Kraemer, 1956). Při dalších experimentech musela být tato skutečnost zohledněna.

Způsobem dávkování Zymosanu se zabývali Bradner a kol.(1958) u Sarkomu 180. Testovali různé množství Zymosanu podané v různých časových intervalech. Statisticky významných výsledků dosáhli u nižších dávek do 160 mg/kg, vyšší dávky snižovaly rezistenci hostitele (Bradner a kol., 1958). Byly provedeny i další studie se Sarkomem 180, které dosáhly podobných výsledků. Navíc bylo zjištěno, že vysoké dávky potlačí pozitivní efekt nízkých dávek. Probíhala také léčba Zymosanem v rozmezí dva týdny před i po transplantaci sarkomu. Dále se vědci domnívali, že vysoké dávky Zymosanu (1000mg/kg) podané intraperitoneálně způsobují letální střevní bakteriémie (Bradner a Clarke, 1959).

Zymosan působí pozitivně i jako doplněk standartní terapie. V kombinaci s chirurgickým zákrokem a cyklofosfamidem významně zvýšil efektivitu léčby myšího adenokarcinomu oproti operované skupině léčené jen cyklofosfamidem (Martin a kol., 1964). Stejně tak působil Zymosan podaný ke kombinované chemoterapii STEM (streptonigrin, thioguanin, Endoxan a mitomycin) (Martin a kol., 1970).

Nedávná studie se zaměřila na intratumorální aplikaci Zymosanu, lipopolysacharidu (LPS) a cytokinu GM-CSF u podkožně implantovaného gliomu RG-2. Jak Zymosan, tak

LPS zpomalily růst nádoru oproti kontrolní skupině. Při opakovaném podání byla pozorována 50% regrese u skupiny léčené Zymosanem (Mariani a kol. 2007).

V této práci využíváme kovalentní vazby Zymosanu na nádorové buňky pomocí heterobifunkčního činidla SMCC a navíc prostřednictvím flagelinu stimuluje další TLR.

1.11. Bifunkční činidla

Crosslinking, česky biokonjugace, je proces chemického spojování dvou nebo více molekul kovalentní vazbou. Biokonjugáty obsahují reaktivní konce, které jsou schopné připojit se ke specifickým funkčním skupinám na proteinech a dalších molekulách. Složitá struktura proteinů však poskytuje pouze čtyři funkční skupiny vhodné jako terče pro kovalentní vázání.

- $-NH_2$ skupina se nachází na N-konci každého polypeptidického řetězce a v postranních řetězcích u lysinu. Za fyziologických podmínek se nachází vně proteinu a tudíž je přístupná pro konjugaci i bez denaturace.
- $-COOH$ skupinu najdeme na C-konci polypeptidu a v postranních řetězcích u kyseliny asparagové a glutamové. Je také na povrchu proteinové struktury.
- v postranním polypeptidickém řetězci existuje u cysteinu SH skupina. V rámci sekundární a terciální struktury proteinu jsou cysteiny spojeny disulfidickými můstky, které musí být redukovány, aby byly SH dostupné pro konjugaci.
- aldehydové a ketonové skupiny vznikají při posttranslační úpravě proteinů procesem glykosylace [1].

Biokonjugáty dělíme na homo- a heterobifunkční činidla. Homobifunkční činidla mají na konci spacerů totožné reaktivní skupiny. Používají se k náhodnému spojování molekul. Pokud např. přidáme biokonjugát amin-amin k buněčnému lyzátu, dojde k náhodnému spojení polypeptidů, jejichž lysiny jsou v roztoku blízko sebe.

Heterobifunkční činidla mají na každém konci jinou reaktivní skupinu, umožňují tedy následné spojování molekul s odpovídajícími funkčními skupinami [1].

Heterobifunkční činidlo SMCC [succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carboxylat], je amin-sulfanyl membránový biokonjugát. Obsahuje *N*-hydroxysuccinimid, který reaguje s primárními aminy a maleimid, který reaguje s thiolovou skupinou cysteinu [1].

1.12. Flagelin

Flagellin je hlavní složkou bičíku bakterií. TLR 5 rozpoznává flagelin z Gram pozitivních i Gram negativních bakterií. Aktivace TLR 5 spustí signální systém NF κ B a stimuluje produkci TNF α (Hayashi a kol., 2001).

V roli imunoterapeutika se flagelin osvědčil při léčbě lidského karcinomu tlustého střeva transplantovaného myším. Rhee dosáhl výrazné redukce pomocí injekce flagelinu do okolí nádoru (Rhee a kol., 2008).

2. Cíle práce

1. Kotvení Zymosanu A na nádorové buňky pomocí SMCC a jeho synergie s flagelinem.
2. Analýza imunoterapie založené na kombinaci Zymosan A/flagelin pomocí histologie.

3. Materiály a metody

3. 1. Výčet chemikálií

V pokusech byly použity tyto chemikálie:

- Zymosan A ze *S. cerevisiae*, (Sigma Aldrich),
- lipopolysacharid (LPS) z *E. coli* (Sigma Aldrich),
- flagelin z *B. subtilis* (InvivoGen),
- lysin (Sigma Aldrich),
- SMCC (Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) (Thermo),
- TCEP (Sigma Aldrich)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich),
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma Aldrich)

3. 2. Laboratorní zvířata

Při pokusech jsme pracovali se samicemi myšího kmene C57BL/6N od firmy Charles River Laboratories, stáří 8 týdnů, váha 18-20g. Myši byly chovány za standardních podmínek s fotoperiodou 12/12 a měly neomezený přístup ke granulované potravě a sterilní vodě.

3. 3. Typ melanomu

Pro pokusy byla použita buněčná linie myšího melanomu B16-F10, dána darem (prof. Říhová, MBU AV ČR, Praha).

Buňky byly umístěny v termostatu s teplotou 37°C, v atmosféře nasycené vodními parami a s obsahem 5% CO₂. Kultivace buněk probíhala v RPMI 1640 s přidavkem 10% FCS, glutaminu, merkaptoethanolu a antibiotik (Sigma Aldrich).

3.4. Příprava melanomových buněk B16-F10 pro transplantaci

Z kultivační nádoby bylo slito médium a buňky byly 2x důkladně propláchnuty dostatečným množstvím sterilního PBS. U propláchnutých buněk byla zahájena trypsinizace přidáním 0,5ml trypsinizační směsi (0,02% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS). Následovala inkubace v termostatu 3-5 minut, dokud se buňky neuvolnily. Trypsinizace byla zastavena přidáním RPMI 1640 + 10% FCS a buňky byly rozvolněny pomocí Pasteurovy pipety, následovala centrifugace (10min, 150g, 4°C). Pelet byl rozsuspendován v RPMI 1640 bez

přídavku séra. Pro stanovení počtu buněk byl odebrán vzorek suspenze, smíchan v poměru 1:1 s trypanovou modří a napipetován do Bürknerovy komůrky. Podle počtu buněk byla suspenze upravena na požadovanou koncentraci.

3.5. Transplantace melanomu B16-F10

Myši byly nejprve oholeny na pravé spodní části zad. Následující den jim bylo subkutánně injekčně aplikováno 0,1ml suspenze B16-F10 v RPMI bez séra, což odpovídalo 4×10^5 melanomových buněk.

3.6. Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů se kontrolovala během léčby obden, poté min. jednou týdně. Pomocí kaliperu byl změřen největší a nejmenší rozměr nádoru (A a B). Pomocí vzorce $V = \pi/6 AB^2$ byly vypočítány objemy nádorů (Inaba a kol., 1986). Objemy byly statisticky vyhodnoceny.

3.7. Výpočet redukce nádorového růstu

Redukce nádorového růstu (v porovnání s kontrolou) ve dnech 4, 6, 8, 10, 12, 14 od započetí terapie byla počítána následovně:

$$\frac{(\text{průměrný objem nádorů v kontrolní skup.} - \text{průměrný objem nádorů v léčené skup.}) \times 100}{\text{průměrný objem nádorů v kontrolní skup.}}$$

Průměr z hodnot naměřených v jednotlivé dny je vyjádřen v procentech a představuje redukci nádorového růstu pro léčené skupiny.

3.8. Příprava látek pro léčbu

- Zymosanu A – příprava suspenze:

104,2 mg Zymosanu A + 6 ml PBS, sonikováno 10x10 vteřin, mezi sonikacemi 20 vteřin chlazení → dialýza x PBS přes noc při 4°C, MWCO 12-14 000 .

- Zymosan A-SMCC:

6 ml Zymosanu sonikovaného v PBS (10x10 vteřin, 20 vteřin chlazení) + 1,5 ml 2 mM SMCC, tedy:

1 mg SMCC rozpustit ve 30 μ l DMSO, přidat 1,5 ml PBS (pH=7,4) pokojové teploty → promíchat a rychle přilít 6 ml sonikovaného Zymosanu → nechat 40 min reagovat při pokojové teplotě.

- Lysin-SMCC

6 ml $5 \cdot 10^{-4}$ M lysinu + 1,5 ml 2 mM SMCC, tedy:

1 mg SMCC rozpustit ve 30 μ l DMSO, přidat 1,5 ml PBS (pH=7,4) pokojové teploty → promíchat a rychle přilít 6 ml roztoku lysinu → nechat 40 min reagovat při pokojové teplotě.

- Roztok „R“

Činidlo, které redukuje disulfidické můstky (cystin), aby byla –SH skupina přístupná pro vazbu SMCC.

129 mg TCEP rozpustit v 9 ml PBS.

- Flagelin

Z flagelinu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 μ g/ml PBS.

3.9. Příprava a vyhodnocení histologických preparátů

- Excize nádorů byly po dobu jednoho týdne fixovány ve 4% roztoku formaldehydu. Poté byly zkrájeny na vhodnou velikost a standardním způsobem upraveny do parafinových bločků. Na sáňkovém mikrotomu (Leica-SM 2000R) byly krájeny řezy o tloušťce 5 μ m a následně barveny hematoxilin - eosinem.
- Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Olympus DX 51, zvětšení objektivu 40x, připojen fotoaparát Olympus Camedia - C 5060.
- Vyhodnocení histologických nálezů bylo provedeno analýzou fází v programu QuickPHOTOMICRO 3.0, zde použity snímky pořízené při zvětšení objektivu 4x.

3.10. Počítání metastáz

Vypitvané plíce byly fixovány ve 4% roztoku formaldehydu po dobu jednoho týdne. Poté byla pod binokulární lupou spočítána metastatická ložiska, která se jeví jako černé tečky (Větvička a kol., 2007).

3.11. Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí oboustranného nepárového t-testu v programu „R“. Pro vyhodnocení přežívání myši byl použit program Statistica 10 – analýza přežívání, graf Kaplan Meier.

3.12. Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A v kombinaci s LPS na růst myšního melanomu.

V pokusu bylo použito 25 myši s transplantovaným melanomem B16-F10. Dvanáctý den od transplantace byly rozděleny do 5 skupin a chovány samostatně. Po změření velikosti nádoru byla myším aplikována terapie podle následujícího schématu, vše *i.t.* (intratumorálně), množství 50 µl, v časovém intervalu 0, 2, 4, 6, 8, 10 dní.:

- Skupina A: Zymosan A – suspenze
- Skupina B: Zymosan A + LPS – (3 ml Zymosan A+1,5 mg LPS)
- Skupina C: LPS – (1 mg LPS rozpuštěn ve 2 ml PBS)
- Skupina D: Zymosan A-SMCC + LPS/R – (2 ml Zymosan A-SMCC + 1 mg LPS)
-nejprve všem myším píchnut roztok „R“ a po 1 hod. terapeutikum
- Skupina K: PBS – kontrolní skupina

Od zahájení terapie byla obden měřena velikost nádorů po dobu 14 dní. 26. den od transplantace nádoru byla terapie ukončena, poté měření probíhalo 1x týdně. U myši bylo sledováno přežití.

3.13. Pokus č. 2: Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu.

Pro pokus bylo použito 36 myši s transplantovaným melanomem B16-F10. 12. den po transplantaci byly myši randomizovány do 6 skupin po 6 jedincích a začala terapie. Myším byla jednorázově *i.t.* podána léčiva v množství 50µl dle uvedeného schématu. Skupinám A, B, C, D a E byl nejprve podán roztok „R“ a po 1 hodině léčivo. Skupině K podáno PBS také 2x s hodinovým rozmezím.

- Skupina A: Zymosan-SMCC/R
- Skupina B: LPS/R – (1 mg LPS rozpuštěn ve 2 ml PBS)
- Skupina C: Zymosan A-SMCC + LPS/R – (2 ml Zymosan A-SMCC + 1 mg LPS)

- Skupina D: flagelin/R – (100µl zásobního roztoku flagelinu smícháno s 1,9 ml PBS, výsledná koncentrace flagelinu 5 µg/ml)
- Skupina E: Zymosan A-SMCC + flagelin/R – (380 µl Zymosanu A-SMCC+ 20 µl zásobního roztoku flagelinu→ výsledná koncentrace 5 µg flagelinu/ ml Zymosanu A-SMCC)
- Skupina K: PBS - kontrolní skupina

Za 8, 24 a 48 hodin byly vždy 2 myši z každé skupiny usmrceny. Nádory jim vypitvané byly dány do formaldehydu a později histologicky zpracovány.

3.14. Pokus č. 3: Prověření vlivu kovalentní vazby pomocí SMCC/R na mikroprostředí melanomu.

Opět jsme použily 36 myši s melanomem B16-F10, které byly 12. den po transplantaci rozděleny do šesti skupin po šesti jedincích. Léčiva byla podána jednorázově dle uvedeného schématu. Vše *i.t.* v množství 50 µl. Každá myš byla injikována 2x, tedy nejdříve roztokem „R“ nebo PBS a po uplynutí 1 hod. příslušným terapeutikem.

- Skupina A: lysin-SMCC/R – (330µl lysin-SMCC v PBS)
- Skupina B: lysin-SMCC + LPS/R - (330 µl lysin-SMCC in LPS 0,5 mg/ml)
- Skupina C: lysin-SMCC + flagelin/R – (380 µl lysin-SMCC + 20 µl zásobního roztoku flagelinu→výsledná koncentrace 5µg flagelinu/ml lysin-SMCC)
- Skupina D: Zymosan A/PBS
- Skupina E: LPS/PBS
- Skupina K: PBS/R

Za 8, 24 a 48 hodin byly vždy 2 myši z každé skupiny usmrceny. Vypitvané nádory byly fixovány ve formaldehydu a poté histologicky zpracovány.

3.15. Pokus č. 4: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s flagelinem na růst a metastazování melanomu.

Pro pokus bylo použito 20 myši s transplantovaným melanomem B16/F10. 12. den po transplantaci byly myši rozděleny do čtyř skupin a byla zahájena terapie. Léčiva byla aplikována *i.t.*, množství 50 µl, v režimu 0, 2, 4, 6, 8, 10 dní podle uvedeného schématu.

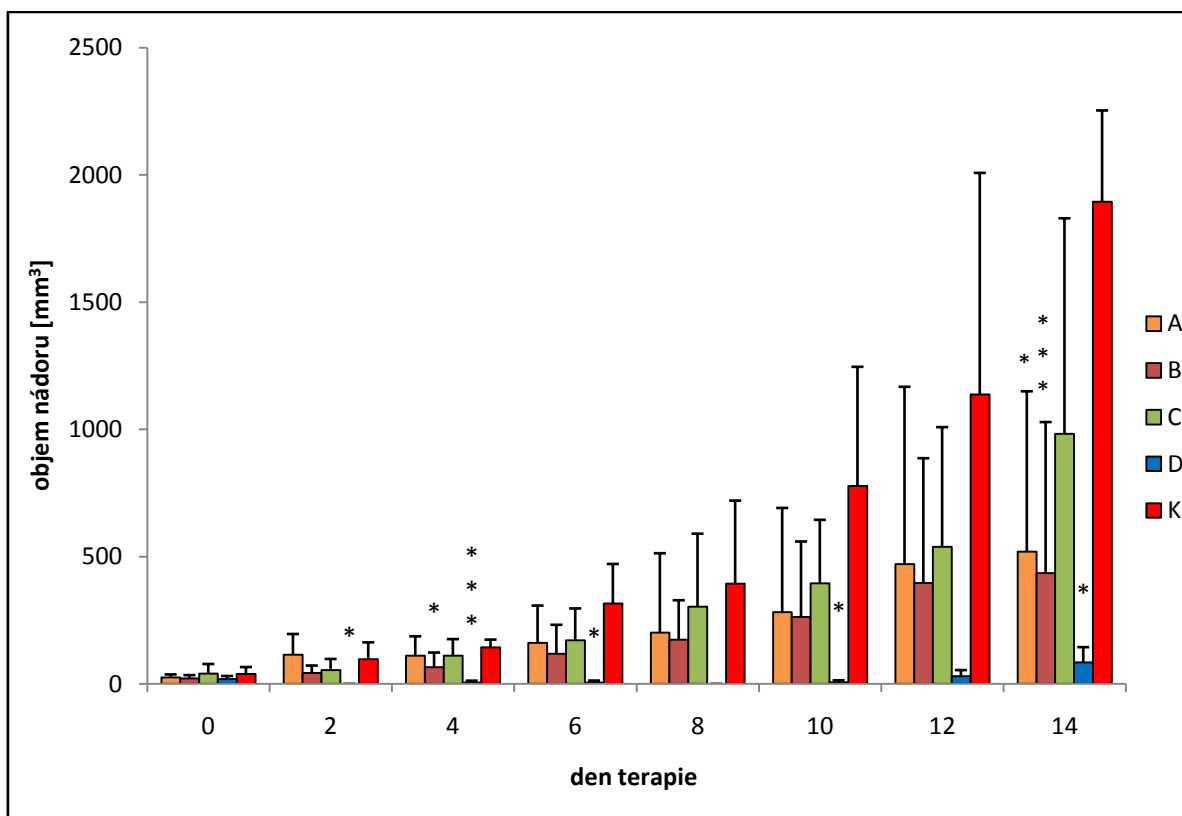
- Skupina A: Zymosan-SMCC + flagelin/R – (viz. pokus č.2, skupina E)
- Skupina B: Zymosan-SMCC/R -
- Skupina C: flagelin - (5 µg flagelinu /ml PBS)
- Skupina K: PBS - kontrolní skupina

Myším byla ve dnech léčby a poté 12. a 14. den měřena velikost nádorů. 26. den od transplantace nádoru byly myším vypitvány plíce a fixovány ve formaldehydu pro pozdější počítání metastatických ložisek.

4. Výsledky

4.1. Pokus č. 1: Studium vlivu kotveného Zymosanu A v kombinaci s LPS na růst myšního melanomu.

Cílem pokusu bylo zjistit, jaký vliv má na růst melanomu Zymosan A kotvený pomocí SMCC oproti volnému Zymosanu A v prostředí, kde je LPS. Jak vyplývá z obrázku 1, působil Zymosan A částečnou, ojediněle statisticky významnou redukcí nádorového růstu srovnatelnou s působením LPS. Zymosan A spolu s LPS vykázaly pouze velmi mírnou aditivitu působení. V případě, kdy byl Zymosan A ukotven na nádorové buňky pomocí kovalentních vazeb, pak spolu s LPS vykázal velice výrazný účinek na redukcí nádorového růstu. V časovém rozmezí od 4. do 14. dne od zahájení terapie vyvolal kotvený Zymosan ve spojení s LPS průměrně 97,8% redukcí nádorového růstu, zatímco volný Zymosan s LPS 63,6%. Význam kotvení Zymosanu byl tedy zásadní.



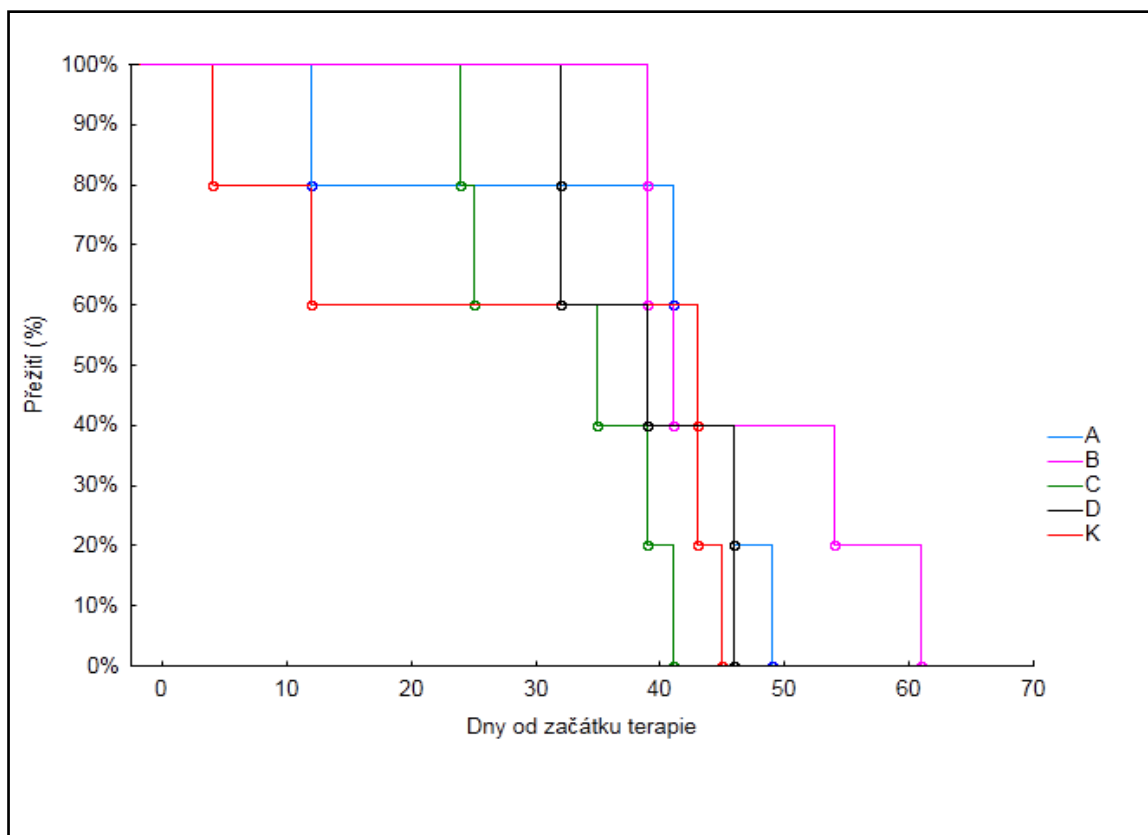
Obr. 1: Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na velikost nádorů.

A- Zymosan A, **B-** Zymosan A + LPS, **C-** LPS, **D-** Zymosan A-SMCC + LPS/R,

K- PBS kontrola

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

Výsledky následné analýzy přežití uvádí obrázek 2. Ve srovnání s kontrolou dosáhla nejvyššího přežití skupina B (Zymosan A + LPS), tento rozdíl však nebyl statisticky významný.



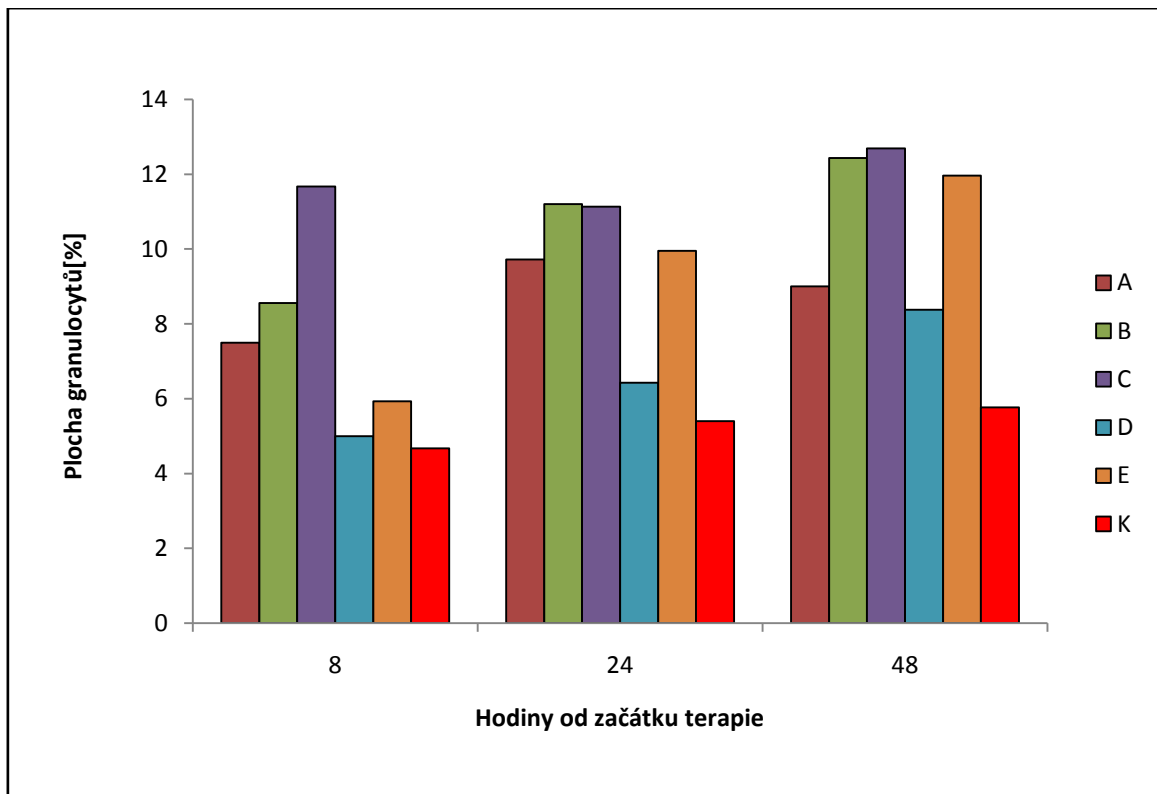
Obr. 2: Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na přežívání myši.

A- Zymosan A, **B-** Zymosan A + LPS, **C-** LPS, **D-** Zymosan A-SMCC + LPS/R,

K- PBS kontrola

4.2. Pokus č. 2: Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu.

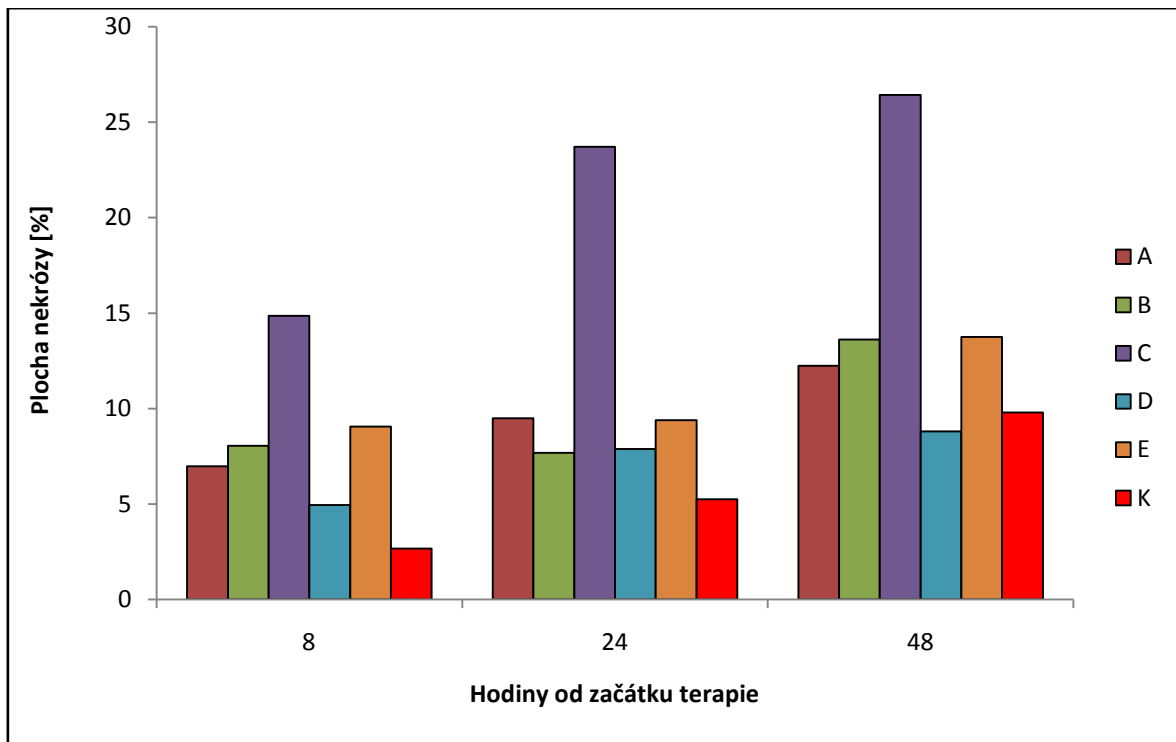
V tomto pokusu jsme zjišťovali, do jaké míry vyvolají námi používané ligandy histologické změny u melanomu. Jako hlavní kritérium jsme zvolili přítomnost granulocytárního infiltrátu a nekrózy. Obrázek 3 demonstruje granulocytární infiltraci. Ukázalo se, že výrazným signálním ligandem je LPS, který vyvolá stejnou infiltraci sám, jako ve spojení se Zymosanem A. U všech ligandů lze pozorovat určitou schopnost vyvolávat granulocytární infiltraci. Nemůžeme zde ale mluvit o jejich synergii.



Obr. 3: Vliv kotveného Zymosan A ve spojení s LPS a flagelinem na přítomnost granulocytární infiltrace v melanomu.

A- Zymosan-SMCC/R, **B-** LPS/R, **C-** Zymosan-SMCC+LPS/R, **D-** flagelin/R, **E-** Zymosan-SMCC+flagelin/R, **K-** PBS/PBS kontrola

Na obrázku 4 je vyhodnocena nekrotizace nádoru. U všech skupin vidíme nárůst nekrotických ploch v čase. U skupiny Zymosan+LPS je patrný aditivní efekt. Flagelin účinkoval hůře, jak samotný, tak v kombinaci.



Obr. 4: Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na nekrotizaci melanomu.

A- Zymosan-SMCC/R, **B-** LPS/R, **C-** Zymosan-SMCC+LPS/R, **D-** flagelin/R, **E-** Zymosan-SMCC+flagelin/R, **K-** PBS/PBS kontrola

V příloze 1 ukazují obrázky 10-21 typické vzorky nádorové tkáně odebrané po 8 a po 48 hodinách. Z celé sady obrázků je patrná vzrůstající nekrotizace tkáně, která koreluje s grafickým znázorněním na obrázku 4. Na obrázku 10 a 11 je zachycena kontrolní skupina, u které se na okrajích nádoru vyskytují granulocyty, ale nepronikají hlouběji do tkáně, aby ji rozkládaly. Při porovnání obrázků znázorňujících změny po 8 hodinách vidíme, že Zymosan a LPS (samostatně i v kombinaci) nejlépe směřují granulocyty do tkáně. Následné zakládání mnoha malých nekrotických ložisek likviduje nádor zevnitř.

V příloze 2 (obrázky 22-24) můžeme vidět likvidaci nádorových buněk ve větším detailu. Přestože skupina Zymosan + flagelin působí méně, dá se na ní tento jev dobře demonstrovat. Snímky jsou pořízené z okraje preparátu. Při tomto zvětšení vidíme i zbytky melaninu z rozpadlých nádorových buněk.

V příloze 3 jsou uvedeny příklady dalších dvou jevů, které se v histologických preparátech běžně vyskytovaly. Jejich přítomnost však mohla být ovlivněna způsobem zpracování vzorku, proto nejsou procentuálně vyjádřeny. Na obrázku 25 a 26 je znázorněn zánětlivý lem, který se vytváří kolem nádoru. Při excizi byl patrný jako nažloutlý hlen

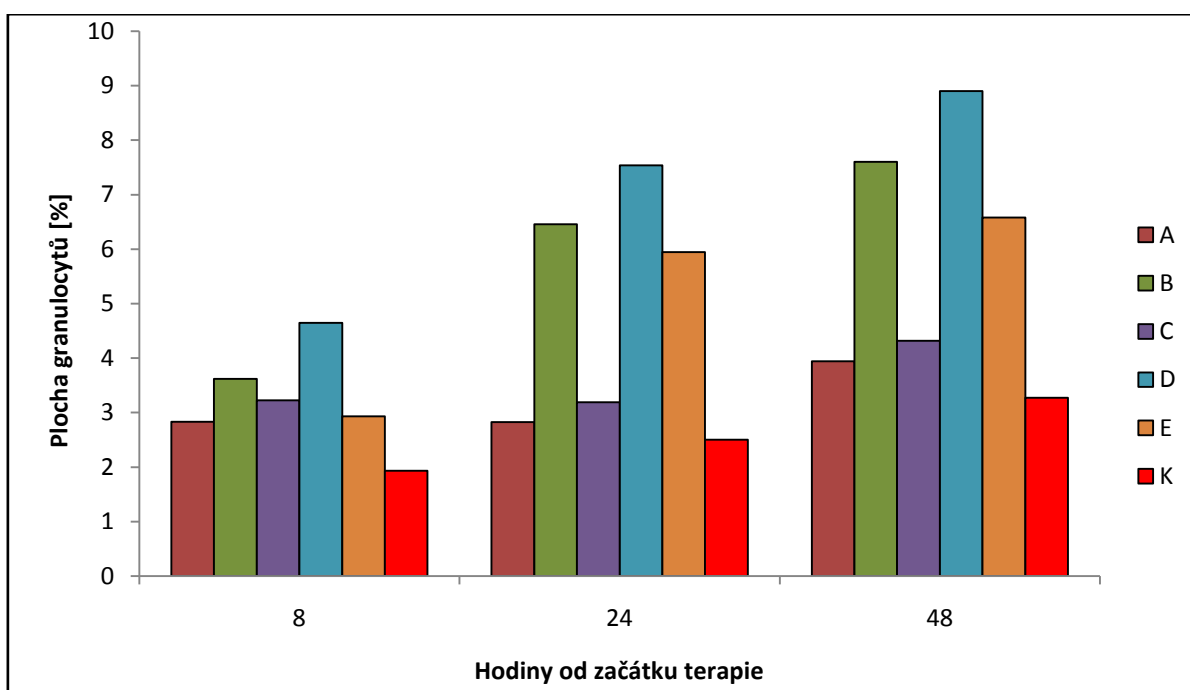
opouzdřující ložisko. Po 48 hodinách můžeme pozorovat zřetelný úbytek granulocytů, které migrovaly do nádorové tkáně.

Obrázek 27 znázorňuje příklad dilatované cévy poškozené zánětem. Je zde vidět, jak granulocyty začínají prostupovat stěnou cévy a infiltrují okolní tkáň.

4.3. Pokus č. 3: Prověření vlivu kovalentní vazby pomocí SMCC/R na mikroprostředí melanomu.

Vzhledem k použití heterobifunkčního činidla SMCC ve všech našich pokusech jsme museli prověřit jeho vliv na vývoj nádoru. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda kotvení ovlivňuje proces léčby tím, že by samo o sobě působilo pro- nebo protinádorově.

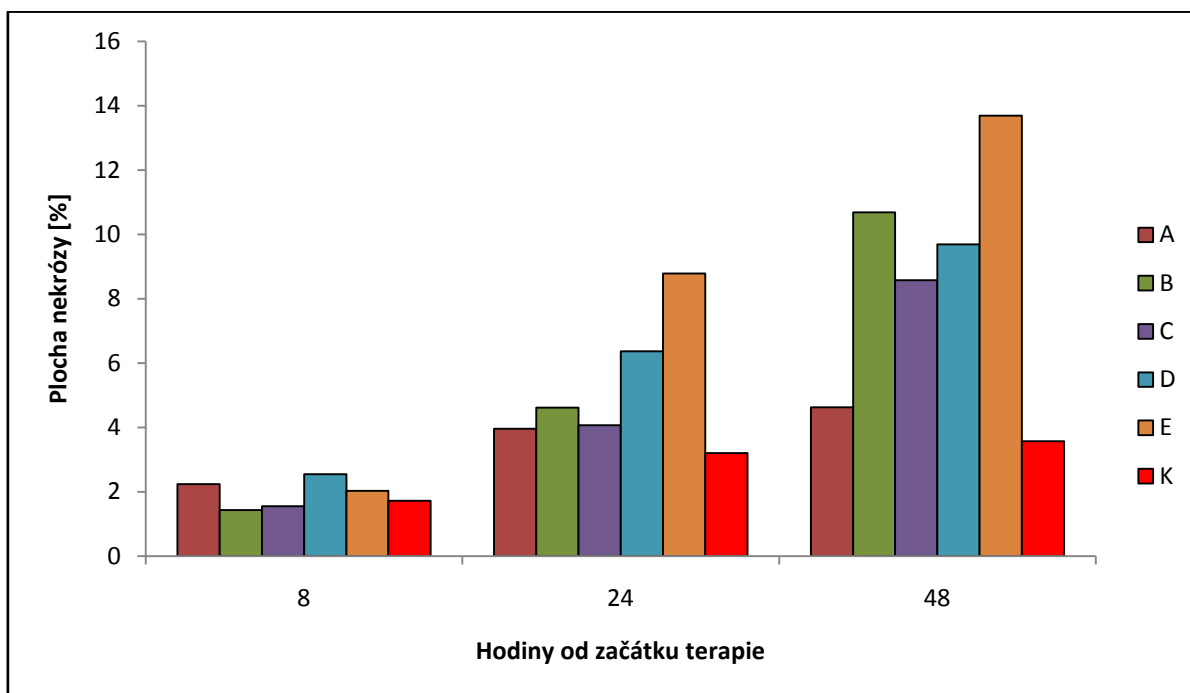
Z obrázku 5 (granulocytární infiltrace) je zřejmé, že neléčená skupina, které byl podán lysin-SMCC/R je velmi blízká kontrole. Stejně tak u směsi LPS s lysin-SMCC/R byly změny dány přítomností LPS. Můžeme říci, že heterobifunkční činidlo, jakožto chemická sloučenina, vyvolá jen nepatrně silnější odpověď imunitního systému než fyziologický roztok, ale nejedná se o žádné specifické interakce typu receptor-ligand. Dále je zde ukázáno slabé působení flagelinu, které se spíše blíží kontrolní skupině než LPS. Naopak volný Zymosan vyvolal výraznou invazi granulocytů.



Obr. 5: Vliv způsobu kotvení na přítomnost granulocytárního infiltrátu.

A- lysin-SMCC/R, **B-** lysin-SMCC+LPS/R, **C-** lysin-SMCC+flagelin/R, **D-** Zymosan/PBS, **E-** LPS/PBS, **K-** PBS/R kontrola

Z obrázku 6 vidíme, že i v případě nekrózy nemá lysin SMCC/R žádný vliv oproti kontrolní skupině a po přidání k LPS jsou změny dány pouze tímto přídatkem.

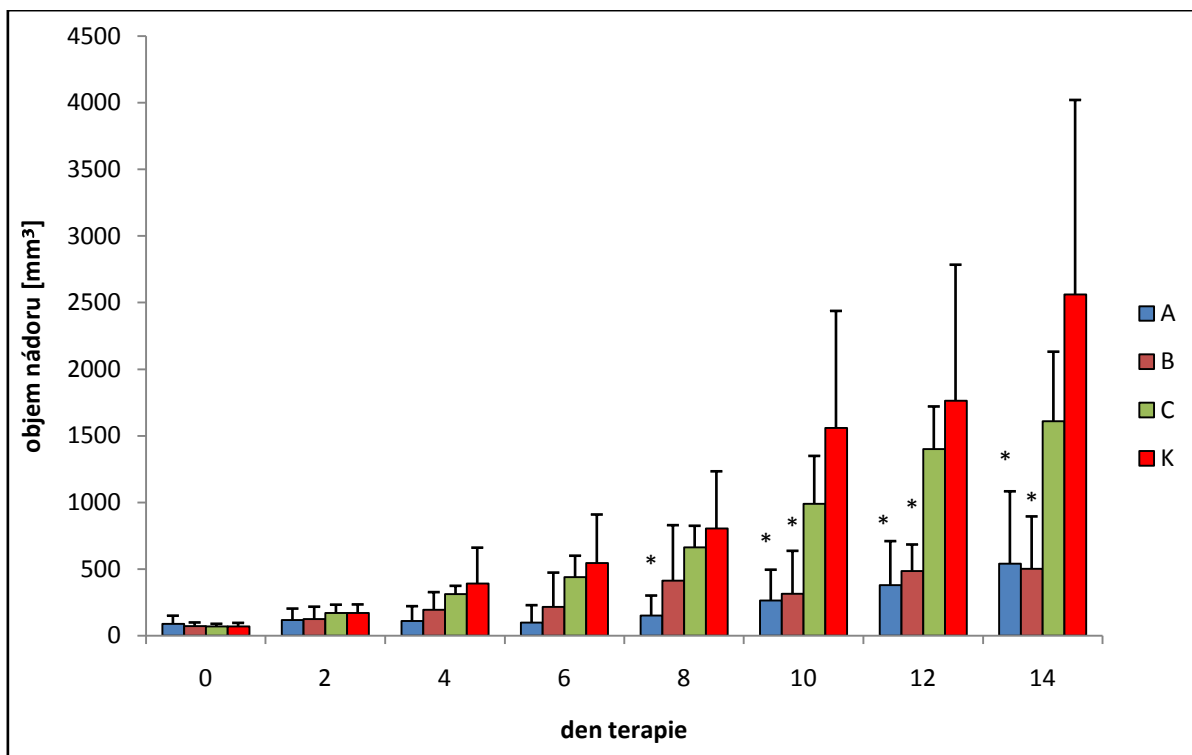


Obr. 6: Vliv způsobu kotvení na přítomnost nekrózy.

A- lysin-SMCC/R, **B-** lysin-SMCC+LPS/R, **C-** lysin-SMCC+flagelin/R, **D-** Zymosan/PBS, **E-** LPS/PBS, **K-** PBS/R kontrola

4.4. Pokus č. 4: Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s flagelinem na růst a metastazování melanomu.

V tomto pokusu jsme zjišťovali, zda přidání flagelinu ke kotvenému Zymosanu A povede k synergii, podobně jako tomu bylo u LPS v pokusu č. 1. Na obrázku 7 jsou uvedeny objemy nádorů u jednotlivých skupin. Z grafu je patrné, že Zymosan samotný i Zymosan v kombinaci s flagelinem způsobil téměř shodné snížení velikosti nádorů, které bylo statisticky významné. Vliv flagelinu tedy nebyl příliš výrazný, což dokazuje i redukce nádorového růstu mezi 4. a 14. dnem terapie. Zymosan v kombinaci s flagelinem způsobil průměrně 79,2% redukci nádorového růstu, Zymosan 65,4% a flagelin jen 25,3%. Jedná se tedy o aditivní, nikoli synergický účinek.



Obr. 7: Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s flagelinem na velikost nádorů.

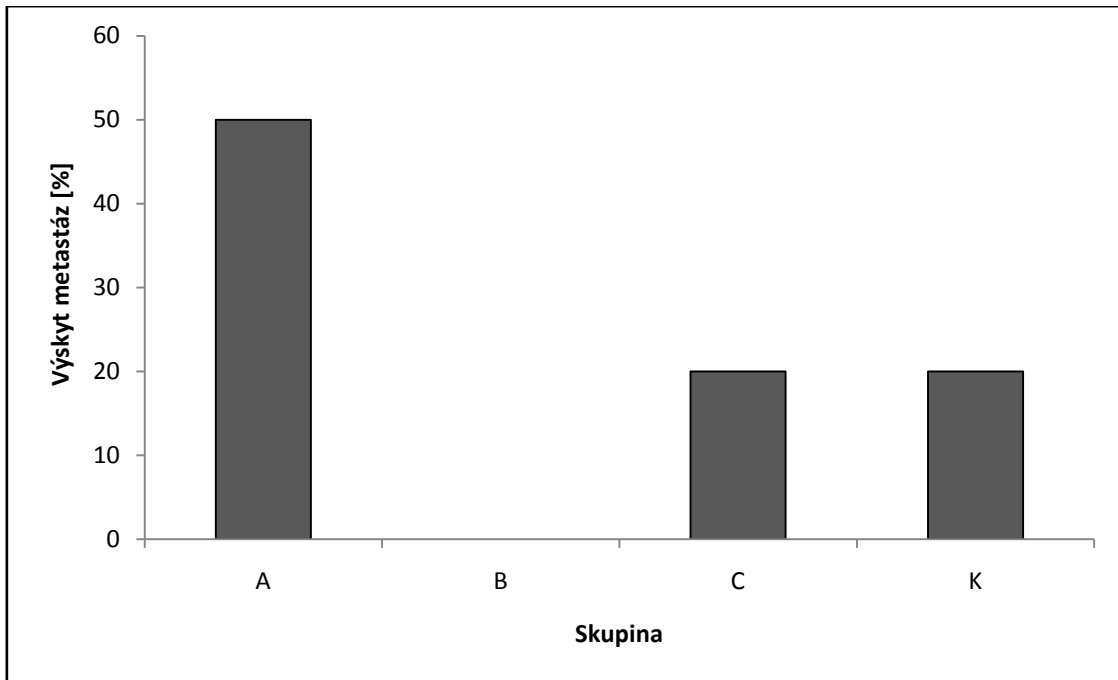
A- Zymosan A-SMCC/R + flagelin, **B-** Zymosan A-SMCC/R, **C-** flagelin, **K-** PBS kontrola

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

Na obrázku 8 je uveden procentuální výskyt plicních metastáz u myší v jednotlivých skupinách. U skupiny A bylo metastáz více než u skupiny kontrolní, naopak ve skupině B se neobjevila žádná metastatická ložiska.

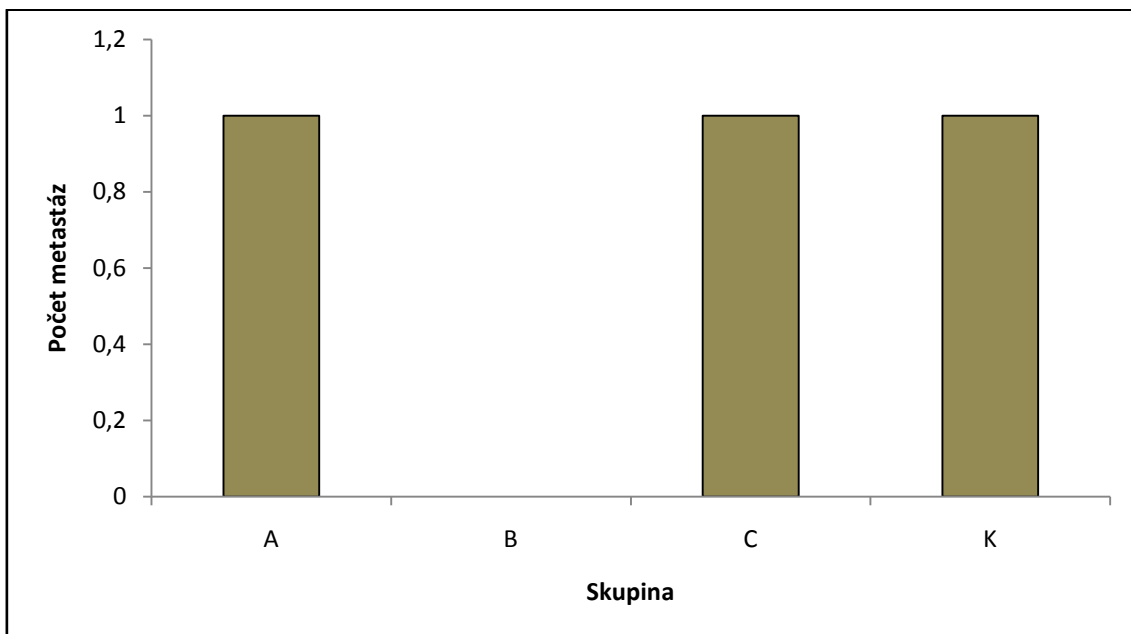
Na obrázku 9 je uvedena intenzita metastazování, tedy celkový počet metastáz ve skupině, dělený počtem myší ve skupině, u kterých byly metastázy nalezeny.

Ve skupině A byly metastázy hodnoceny pouze u čtyř myší, neboť jedna uhynula první den terapie.



Obr. 8: Procentuální výskyt metastáz u jednotlivých skupin.

A- Zymosan A-SMCC/R + flagelin, **B-** Zymosan A-SMCC/R, **C-** flagelin, **K-** PBS kontrola



Obr. 9: Intenzita metastazování pro jednotlivé skupiny.

A- Zymosan A-SMCC/R + flagelin, **B-** Zymosan A-SMCC/R, **C-** flagelin, **K-** PBS kontrola

5. Diskuse

Na základě předchozích experimentů, které dokazují, že Zymosan, LPS i flagelin jsou účinnými agonisty TLR a působí protinádorově (Mariani a kol., 2007; Rhee a kol., 2008) jsme se pokusili zvýšit jejich účinek simultánní aplikací a ukotvením Zymosanu na nádorové buňky. Zároveň jsme řešili možnost náhrady LPS flagelinem.

V prvním pokusu byl prokázán výrazný efekt kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS, kdy během terapie došlo opakovaně k vymizení nádorů, a vytvořily se strupy. Velký rozdíl mezi kotveným a nekotveným Zymosanem ukazuje na zásadní význam ukotvení na nádorové buňky. Zymosan A je díky svým složkám schopen stimulovat jak signální TLR receptory (TLR2), tak díky své korpuskulární povaze dokáže přímo stimulovat i fagocytární receptory (dectin-1 a manosový receptor), vyžadující kotvené ligandy (Underhill a Gantner, 2004). Když však tyto procesy probíhají s nekotveným Zymosanem a jsou podporovány LPS, vyvolávajícím, jak jsme zjistili, silnou leukocytární infiltraci, není jejich účinek zdaleka tak velký, jako když se ukotvením Zymosanu všechny procesy nasměrují na nádorové buňky. Stejně významný vliv kotvení byl pozorován i u předešlých experimentů, kde jsme použili BAM (Waldmannová, 2012).

Zároveň jsme pozorovali pozitivní protinádorový účinek samotného Zymosanu. Tento výsledek nebyl příliš výrazný a nebyl, s výjimkou jednoho dne, statisticky významný. Podpořil dřívější poznatky o použití Zymosanu, kdy bylo dosaženo 50% regrese u Swiss myši se Sarkomem 180 (Bradner a Clarke, 1959). Přežití myši se v našem případě výrazně nelišilo od kontrolní skupiny, což je v rozporu s experimenty Bradnera a kol. (1958), kteří podávali intraperitoneálně Zymosan a dosáhli významného přežití oproti kontrole, jak u jednorázové, tak u opakované aplikace. Výsledky však není možné plnohodnotně porovnávat. Nejen, že se jednalo o odlišný způsob aplikace, ale především Bradnerův tým pracoval se Sarkomem 180. Oproti tomu naše experimenty byly postaveny na použití melanomu B16-F10, který je vysoce agresivní a metastazuje do plic (Nakamura a kol., 2002). Navíc byla léčba Sarkomu zahájena 24 hodin po transplantaci, kdy nemohl být rozvinut. Naopak ve všech našich experimentech je terapie započata 12. den po transplantaci, aby se blížila klinické praxi, kde je nutné počítat s určitou prodlevou. Rozdíl mohly způsobit i použité myši kmeny, podobně jako Ha/ICR a DBA/2 myši odpovídaly odlišně na Zymosan (Bradner a Pindell, 1965). Bylo také zjištěno, že myši méně než 100 dní staré reagují na Zymosan slabě (Bradner a kol., 1958). Námi použité myši byly mladší, možná i díky tomu jsme nedosáhli v oblasti přežití tak dobrých výsledků. Obecně můžeme

konstatovat, že kovalentní kotvení ligandů fagocytárních receptorů vede k velmi výrazné redukci nádorového růstu, ale vliv na přežití není tak výrazný. Méně pevné způsoby vazby (BAM) nemají sice tak dramatický účinek na redukci nádorového růstu, častěji však vedou k úplnému vyléčení myši. Vysvětlujeme si to tak, že na rozdíl od kovalentní vazby jsou ostatní interakce reversibilní a umožňují další ataky na nádorové buňky až do jejich likvidace (Ženka, ústní sdělení).

Cílem druhého pokusu bylo prokázat, že léčiva indukují migraci granulocytů a způsobují nekrózu nádorového ložiska. LPS byl vyhodnocen jako významný TLR ligand způsobující nejvýraznější granulocytární infiltraci. Dosáhl stejných hodnot samostatně i v kombinaci se Zymosanem, tím ale nemůžeme zpochybnit působení Zymosanu, protože i u něj nastala výrazná migrace granulocytů. Kombinace Zymosan/LPS nicméně žádné rysy aditivity či synergie nevykazovala. Hodnoty po 8 hodinách nelze brát jako směrodatné, protože v tuto dobu je většina granulocytů přítomna v zánětlivém lemu na okraji nádoru a ten mohl při přípravě preparátu odpadnout.

Naopak u nekrózy se projevila aditivita až synergické působení LPS s kotveným Zymosanem. Aktivované granulocyty produkují prozánětlivé cytokiny (zejména TNF α a IL-1), které indukují u nádorových buněk proces apoptózy a zbytky apoptotických buněk fagocytují. Předpokládáme, že zároveň se přes dectin-1 na beta glukonové složky Zymosanu váží makrofágy a dendritické buňky a fagocytují je. Pokus potvrdil naše představy o tom, že LPS vyvolává především zánětlivou infiltraci, ale že pro zajištění výrazné likvidace nádorů je nutná přítomnost ligandů fagocytárních receptorů navázaných na nádorové buňky. Co se týče účinků flagelinu, jeho schopnost vyvolat dostatečnou infiltraci je slabá a tudíž ve spojení s kotveným Zymosanem nedošlo k výraznější nekrotizaci nádorové tkáně. To odpovídá výsledkům našeho posledního pokusu.

Ve třetím pokusu jsme vyvrátili možný vliv samotného SMCC na růst nádoru. Plocha granulocytárního infiltrátu i nekrózy způsobená SMCC se blížila kontrole. Po 24 hod. byla zaznamenána menší plocha nekrózy způsobená SMCC+LPS ve srovnání s LPS+PBS. Nemůžeme tvrdit, že by SMCC inhiboval aktivaci imunitního systému, protože v dalších 2 odběrech i u granulocytů si byly tyto skupiny blízké. Navíc při krájení preparátu mohlo dojít k vydrolení části nekrotické plochy.

V tomto pokusu byl zařazen také Zymosan a ukázalo se, že v nekotvené formě mírně převyšuje svými signálními složkami schopnost LPS vyvolávat infiltraci a rovněž je schopen výrazné indukce nekrotizace. Toto zjištění koreluje s pokusem č. 1, kde volný Zymosan způsobil 52,6 %ní redukci nádorového růstu.

Obecně není pro vyhodnocování experimentů tohoto typu základní histologická technika dostačující. Získáme sice obraz mikroprostředí nádoru, kde vidíme v čase postupující degradaci tkáně, ale nejsme schopni detekovat všechny typy buněk (makrofágy, NK buňky, DC, případně Tc lymfocyty). Předmětem další práce by mohlo být imunohistochemické zpracování.

Poté, co jsme v histologii vyzorovali slabý efekt flagelinu, prověřovali jsme jeho vliv na růst nádoru v samostatném pokusu.

Čtvrtý pokus potvrdil slabou odpověď imunitního systému na flagelin, který způsobil pouze 25%ní redukci nádorového růstu oproti kontrole. Působení kotveného Zymosanu na nádorový růst bylo výraznější, statisticky významné. Směs flagelin / kotvený Zymosan pak vykazovala nevýraznou aditivitu, což odpovídalo i výše uvedeným histologickým pozorováním.

Nedávná studie naopak prokázala, že flagelin inhiboval proliferaci buněčné linie karcinomu prsu in vitro. In vivo zpomalil růst nádoru a významně zvýšil infiltraci granulocytů (Cai a kol., 2011). Stejných výsledků bylo dosaženo u karcinomu tlustého střeva (Rhee a kol., 2008). Oproti tomu přidání flagelinu k buněčné linii karcinomu žaludku zesílilo proliferaci nádorových buněk (Song a kol., 2011). Zde je potřeba zdůraznit, že flagelin se vázal na TLR 5, který exprimovaly buňky použitých karcinomů na svém povrchu. V těchto našich pokusech se flagelin neosvědčil a není vhodný jako náhrada za LPS. Abychom mohli učinit závěr o působení flagelinu, bylo by dobré provést in vitro pokus, který by ukázal, zda také nepodporuje proliferaci linie B16-F10. V každém případě se ukazuje, že u protinádorové terapie kovalentně kotveným Zymosanem není kombinace s flagelinem příliš účinná. Lepších výsledků dosáhla Waldmannová (2012), ta však použila Zymosan kotvený pomocí BAM.

Ve spojení s expresí TLR na nádorových buňkách je potřeba zmínit, že lidské melanocyty exprimují také TLR 2,3,4,7 a 9, jejichž stimulace peptidoglykanem a LPS vyvolala produkci prozánětlivých cytokinů (Yu a kol., 2009). V potenciální klinické aplikaci u melanomu by mohl být účinek agonistů těchto TLR zesílen.

Ve skupině léčené Zymosan+flagelin zemřela jedna myš první den terapie, ostatní byly apatické a nepřijímaly potravu. Tento stav můžeme přisuzovat toxicitě Zymosanu popsané Bradnerem a kol. (1958), kde vysoké dávky Zymosanu (1000mg/kg/den) způsobily smrt 9 z 10 myší, úmrtnost klesala se snižující se dávkou. U myší byla zjištěna bakteriémie střevního původu. Novější vysvětlení toxicity Zymosanu spočívá v nadprodukci oxidu dusnatého (NO), který způsobil u krys akutní peritonitidu s následným selháním orgánů.

Známky zánětu (tvorba exudátu a nárůst leukocytů) byly detekovatelné již po 3 hodinách a dosáhly maxima po 18 hodinách od aplikace Zymosanu. Pokud byl před injikací Zymosanu podán inhibitor NO syntázy, došlo ke snížení zánětlivých parametrů (Cuzzocrea, 1997). V pokusu č. 4 i v dalším (Sváčková, in prep) uhynuly myši během 6 hodin od podání Zymosanu, který mohl vyvolat podobnou reakci. I v předchozí práci došlo k úhynu myší léčených Zymosanem (Waldmannová, 2012). Vzhledem k tomu, že používáme relativně malé dávky Zymosanu a vzhledem k tomu, že pozorujeme často úhyny již během jedné až dvou minut po aplikaci, domníváme se, že vysvětlením úhynů může být to, že dojde k aplikaci Zymosanu částečně do nádorové cévy, což vzhledem k jeho korpuskulárnímu charakteru může být velmi nebezpečné.

Vliv léčby na tvorbu metastáz není zcela jasný. Procentuální výskyt metastáz byl nejvyšší u léčené skupiny A, kde byla aplikována směs kotveného Zymosanu A s flagellinem, naopak byl nulový u samotného kotveného Zymosanu A. Pro vyvození jakýchkoliv závěrů by musely být provedeny další pokusy.

6. Závěr

- Byl zjištěn částečný vliv nekotveného Zymosanu A a LPS na potlačení růstu melanomu, společně vykazovaly mírnou aditivitu působení.
- Protinádorové působení Zymosanu A ve směsi s LPS se velmi dramaticky zvýšilo kovalentním ukotvením Zymosanu A na nádorové buňky.
- Bylo prokázáno, že účinek kotveného Zymosanu A je specificky závislý na Zymosanu A, kovalentní kotvení samo o sobě nádorové buňky neovlivňuje.
- Kovalentně kotvený Zymosan A ve spojení s LPS vyvolal výraznou granulocytární infiltraci a nekrotizaci tkáně a zároveň nejúčinněji redukoval růst melanomu.
- Flagelin se jako účinný agonista TLR a jako ekvivalent k LPS neosvědčil.
- Vliv léčby na tvorbu metastáz byl neprůkazný.

7. Seznam použité literatury

Adam Z, Vorlíček J, Vaníček J a kol. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Grada 2004; 696s.

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

Bradner WT, Clarke DA, Stock CC. Stimulation of host defense against experimental cancer: I. Zymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Research* 1958; 18: 347-351.

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, Pindell MH. Strain specificity of stimulated regression of sarcoma 180. *Cancer Research* 1965; 25: 859-864.

Brown DG, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong Simon YC, Gordon S. Dectin-1 is a major glucan receptor on macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 2002; 196(3): 407-412.

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.

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 Science of the United States of America* 2003; 100(11): 6682-6687.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Sautebin L, Rizzo A, Crisafulli C, Campo GM, Costantino G, Calapai G, Nava F, Di Rosa M, Caputi AP. Multiple organ failure following Zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. *Shock* 1997; 8(4):268-275.

DeFranco AL, Locksley RM, Robertson M. Immunity: The immune response in infectious and inflammatory disease. *Primers in Biology* 2007; 387s.

Di Carlo FJ, Fiore JV. On the composition of Zymosan. *Science* 1958; 127(3301): 756-757.

Donnelly AJ, Havas HF, Groesbeck ME. Mixed bacterial toxins in the treatment of tumors: II. Gross and microscopic changes produced in Sarkoma 37 and in mouse tissues. *Cancer Research* 1958; 18: 149-154.

Gastl G, Ebert T, Finstad CL, Sheinfeld J, Gomahr A, Aulitzky W, Brander NH. Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *The Journal of Urology* 1996; 155(1): 361-367.

Grimm M, Kim M, Rosenwald A, Heemann U, Germer ChT, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumorigenesis and tumor progression. *European Journal of Cancer* 2010; 46: 2849-2857.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appear to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52(2): 269-279.

Havas HF, Groesbeck ME, Donnelly AJ. Mixed bacterial toxins in the treatment of tumors I. Methods of preparation and effect on normal and sarcoma 37-bearing mice. *Cancer Research* 1958; 18: 141-148.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103.

Hebrut PA, Kraemer WH. The possible role of the properdin system in transplantable cancer: The effect of zymosan on transplantable human carcinoma. *Cancer Research* 1956; 16: 1048-1052.

Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Schlamp A, Jahrsdörfer B, Krug A, Rothenfusser S, Enders S, Hartmann G. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *The Journal of Immunology* 2002; 169(7): 3892-3899.

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

Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie.* Triton 2009; 316s.

Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 2008; 27: 218-224.

Hunter-Craig I, Newton KA, Westbury G, Lacey BW. Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma. *British Medical Journal* 1970; 2: 512-515.

Inaba M, Tashiro T, Kobayashi T, Fujimoto S, Sakurai Y, Maruo K, 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.

Janeway ChA, Medhizov R. Innate immunity: Lipoproteins take their Toll on the host. *Current Biology* 1999; 9(23): 879-882.

Joseph Ingrid BJK, Isaacs JT. Macrophage role in the anti-prostate cancer response to one class of antiangiogenic agents. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90(21): 1648-1653.

Kamat AM, Lamm DL. Immunotherapy for bladder cancer. *Current Urology Reports* 2001; 2: 62-69.

Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine* 2007; 13(5): 552-559.

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; 2012: Article ID 103298: 11 pages.

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

Lineham DC, Goedegebuure PS. CD25⁺CD4⁺ Regulatory T-cells in cancer. *Immunologic Research* 2005; 32(1-3): 155-168.

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

Martin DS, Hayworth PE, Fugmann RA, English R, McNeill HW. Combination therapy with cyclophosphamide and zymosan on a spontaneous mammary cancer in mice. *Cancer Research* 1964; 24: 652-654.

Martin DS, Hayworth PE, Fugmann RA. Enhanced cures of spontaneous murine mammary tumors with surgery, combination of chemotherapy, and immunotherapy. *Cancer Research* 1970; 30: 709-716.

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.

Novak M, Vetvicka V. Glucans as biological response Modifiers. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2009; 9(1): 67-75.

Novotný J, Vitek P, Petruželka L. *Klinická a radiační onkologie pro praxi.* Triton 2005; 280s.

Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, Avril MF, Daussed J, Guillet JG. HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape

from immunosurveillance. Proceedings of the National Academy of Sciences 1998; 95: 4510-4515.

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

Rejthar A, Vojtěšek B. Obecná patologie nádorového růstu. Grada 2002; 208s.

Rhee SH, Im E, Pothoulakis C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. Gastroenterology 2008; 135(2): 518-528.

Sekla B. Experimentální předpoklady imunoterapie nádorů. Státní zdravotnické nakladatelství 1961; 121s.

Song EJ, Kang MJ, Kim YS, Kim SM, Lee SE, Kim CH, Kim DJ, Park JH. Flagellin promotes the proliferation of gastric cancer cells via Toll-like receptor 5. International Journal of Molecular Medicine 2011; 28: 115-119.

Stahl PD, Ezekovitz R Alan B. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. Current Opinion in Immunology 1998; 10(1): 50-55.

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting Edge: TLR2 deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. The Journal of Immunology 2000; 165: 5392-5396.

Trnka F. O nádorech pro zdravě zvědavé. Inpress a.s. 2008; 83s.

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

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson ChB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 1999; 401: 811-815.

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.

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

Wahl LM, Kleinman HK. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90(21): 1583- 1584.

Waldmannová E. Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce 2012; 48 s.

Weinberg RA. Jediná odrodilá buňka: Jak vzniká rakovina. *Academia* 2003; 156s.

Yu N, Zhang s, Zuo F, Kang K, Guan M, Xiang L. Cultured human melanocytes express functional Toll-like receptors 2–4, 7 and 9. *Journal of Dermatological Science* 2009; 56: 113-120.

Internet:

[1] Thermo Scientific. <http://www.piercenet.com/> [cit. 2013-03-30].

8. Přílohy

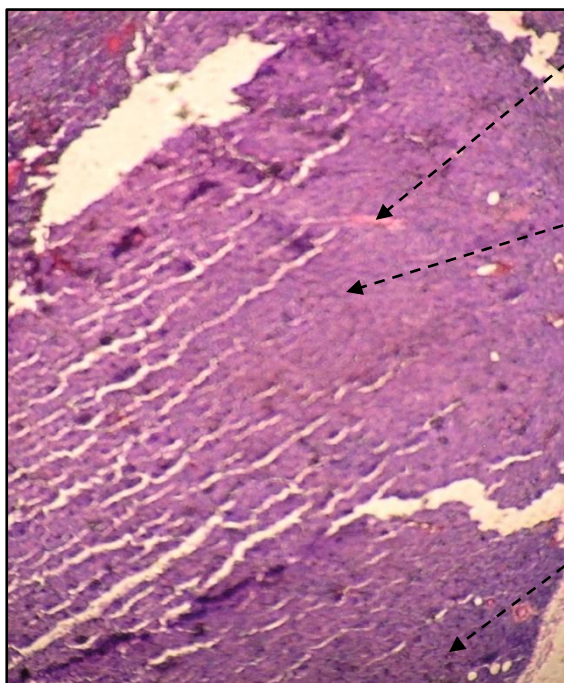
8.1. Příloha 1: Znázornění vlivu léčby na mikroprostředí melanomu–pokus č. 2. (Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu).

Použité zkratky:

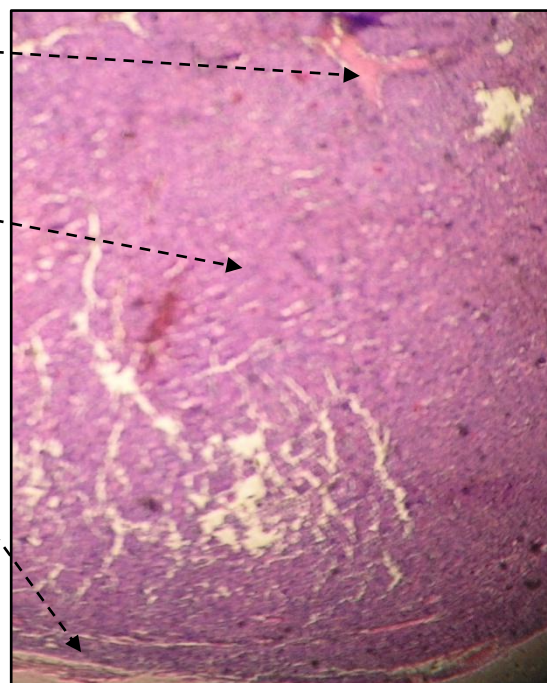
A – nádorové buňky

B – nekróza

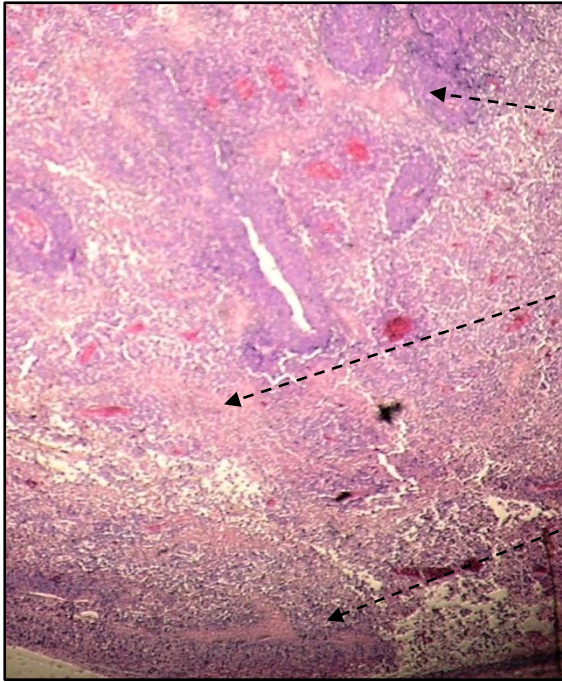
C – granulocyty



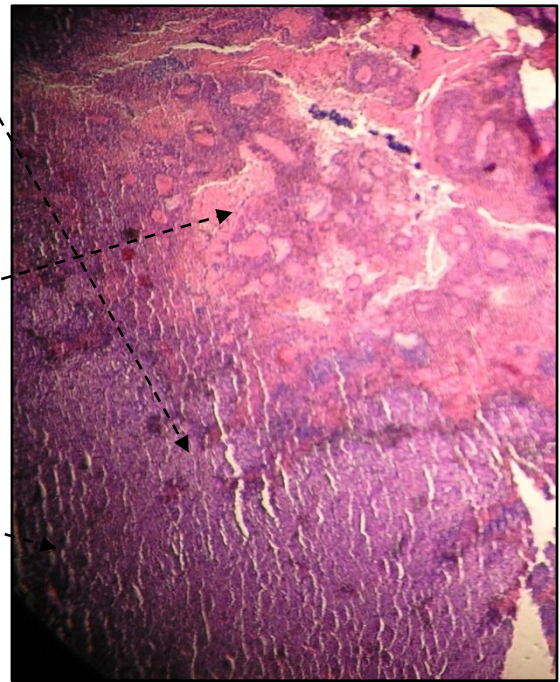
Obr. 10: PBS po 8 hod.



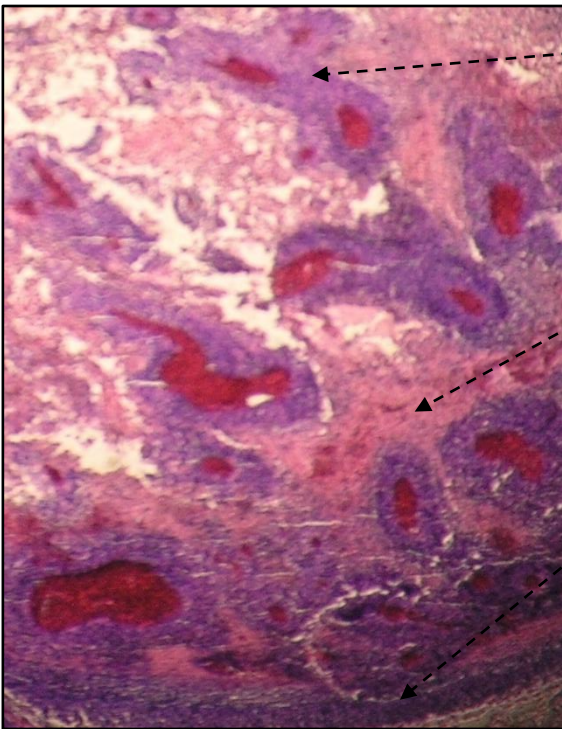
Obr. 11: PBS po 48 hod.



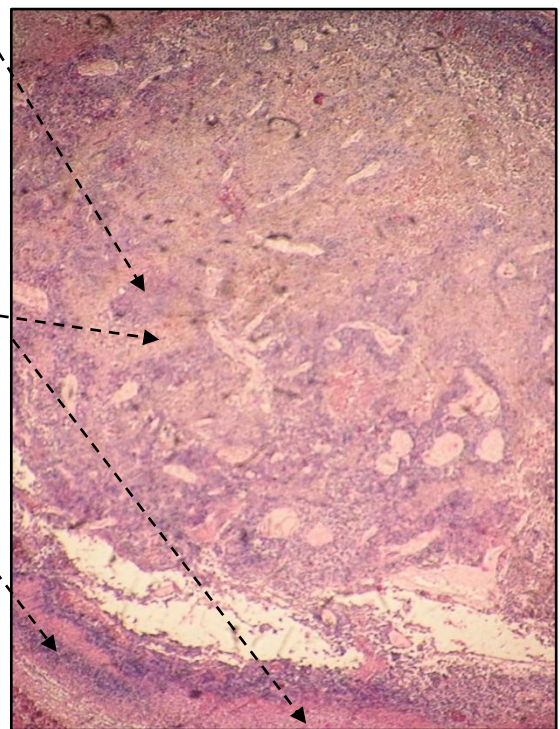
Obr. 12: Zymosan-SMCC/R po 8 hod.



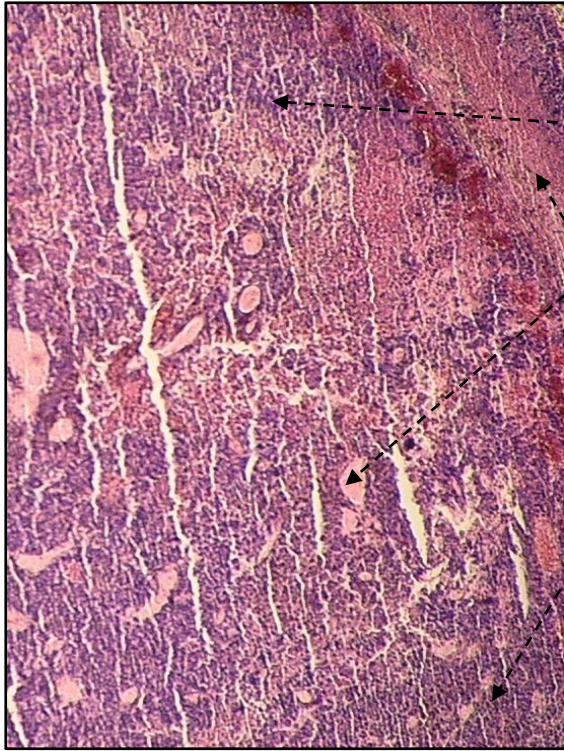
Obr. 13: Zymosan-SMCC/R po 48 hod.



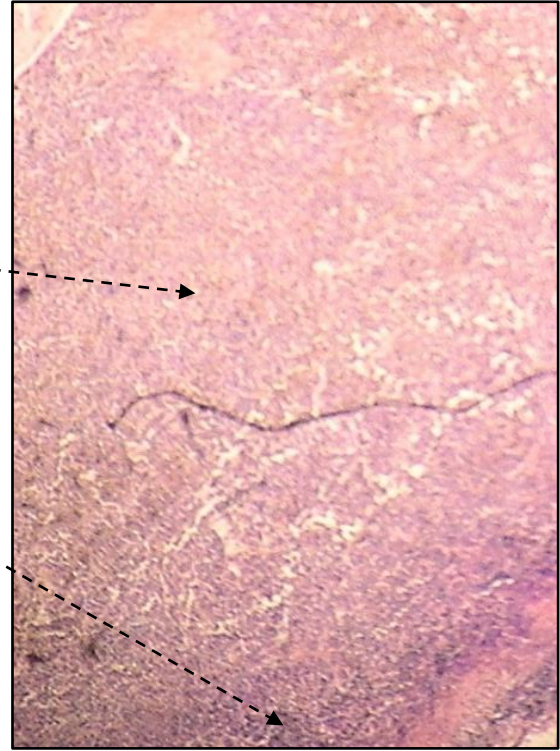
Obr. 14: LPS/R po 8 hod.



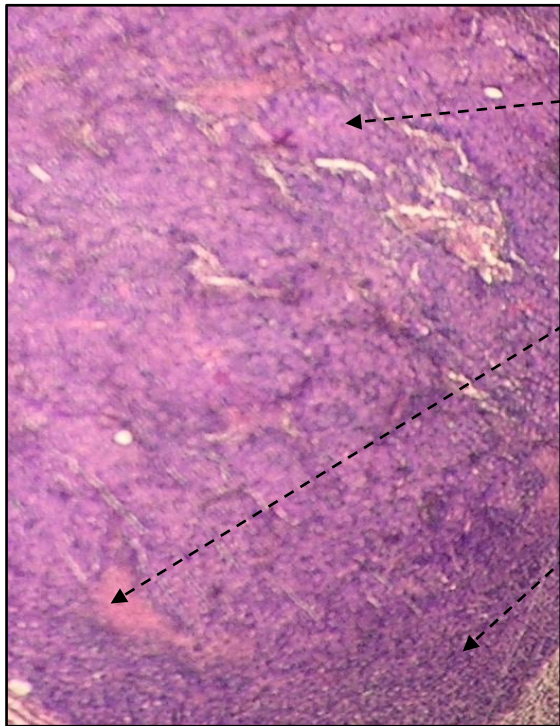
Obr. 15: LPS/R po 48 hod.



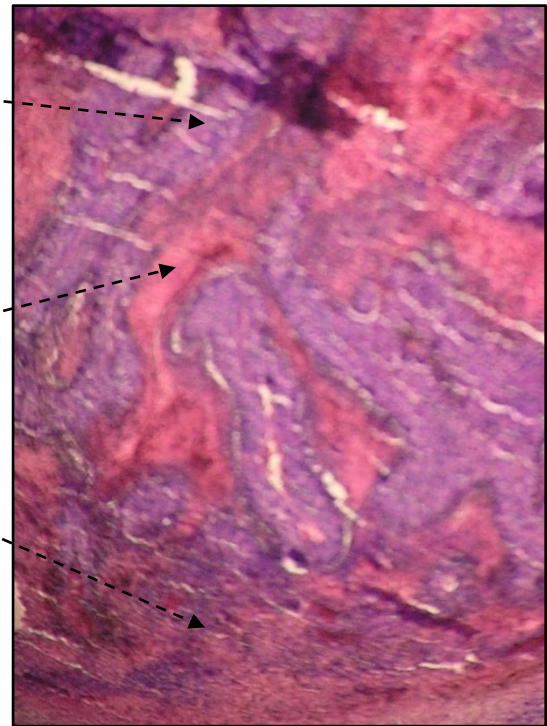
Obr. 16: Zymosan-SMCC+LPS/R po 8 hod.



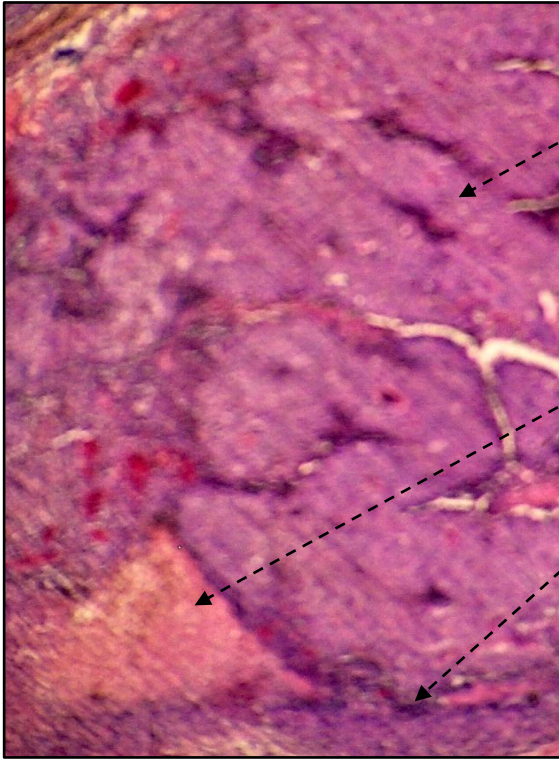
Obr. 17: Zymosan-SMCC + LPS
po 48 hod.



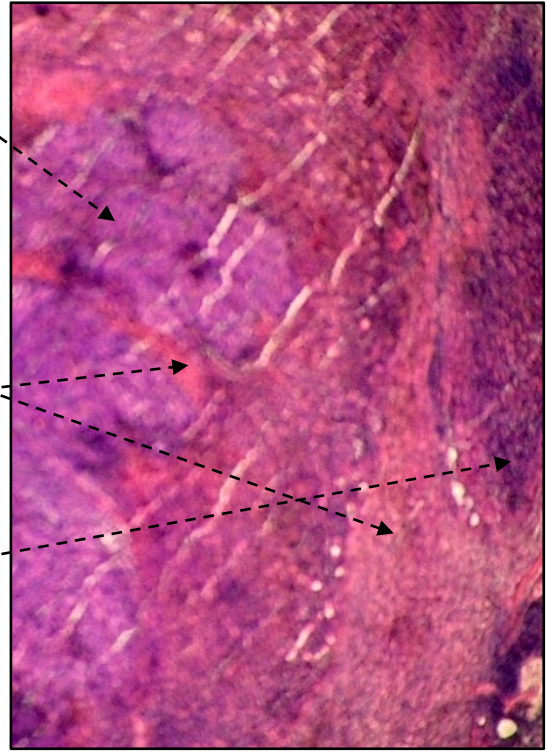
Obr. 18: flagelin/R po 8 hod.



Obr. 19: flagelin/R po 48 hod.



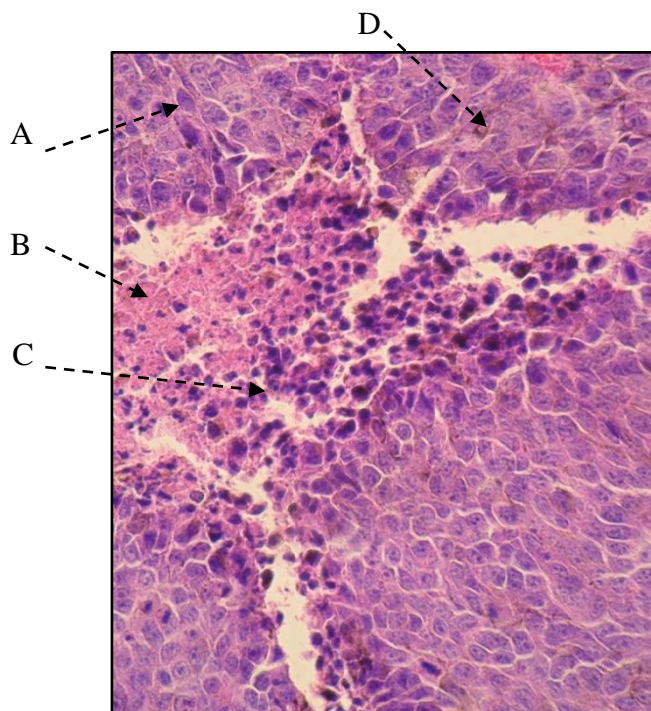
Obr. 20: Zymosan-SMCC + flagelin/R
po 8 hod.



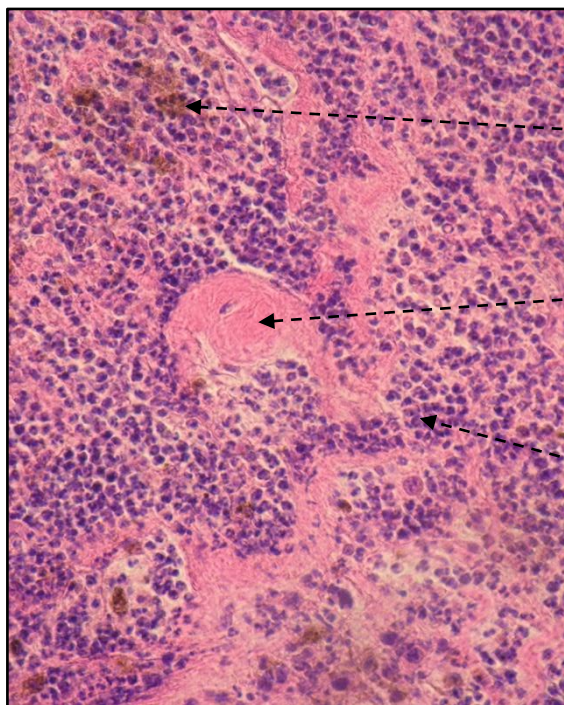
Obr. 21: Zymosan-SMCC + flagelin/R
po 48 hod.

8.2. Příloha 2: Příklad rozkladu nádorové tkáně granulocyty – pokus č. 2 (Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu.)

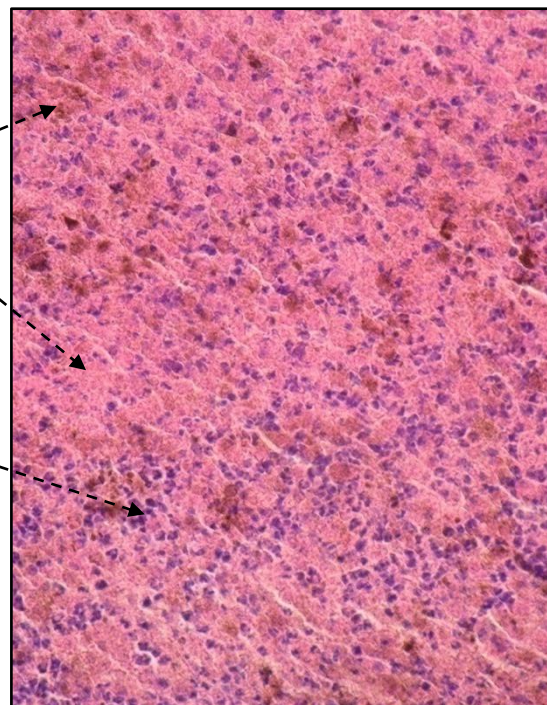
- A – nádorové buňky
- B - nekróza
- C - granulocyty
- D – zbytky melaninu



Obr. 22: Zymosan-SMCC + flagelin
po 8 hod.

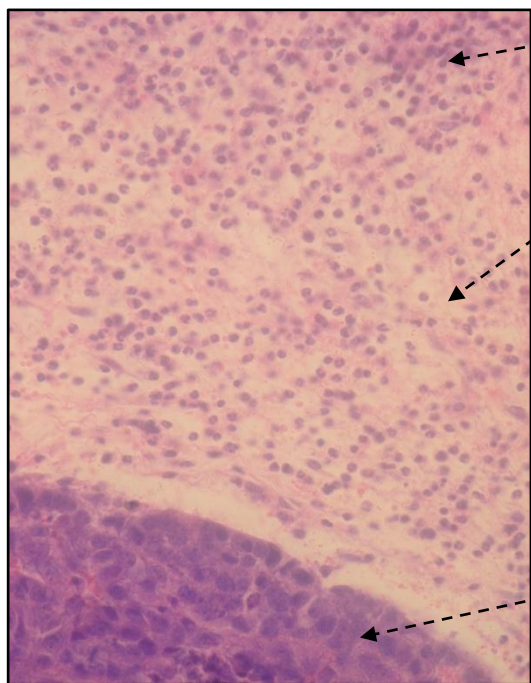


Obr. 23: Zymosan-SMCC + flagelin
Po 24 hod.

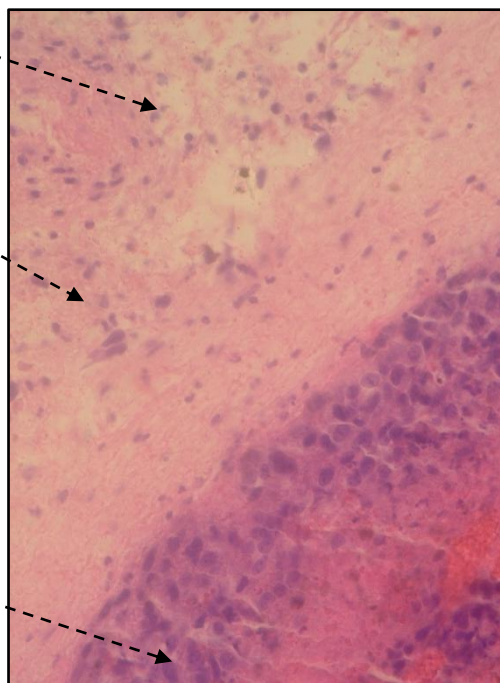


Obr. 24: Zymosan-SMCC + flagelin
po 48 hod.

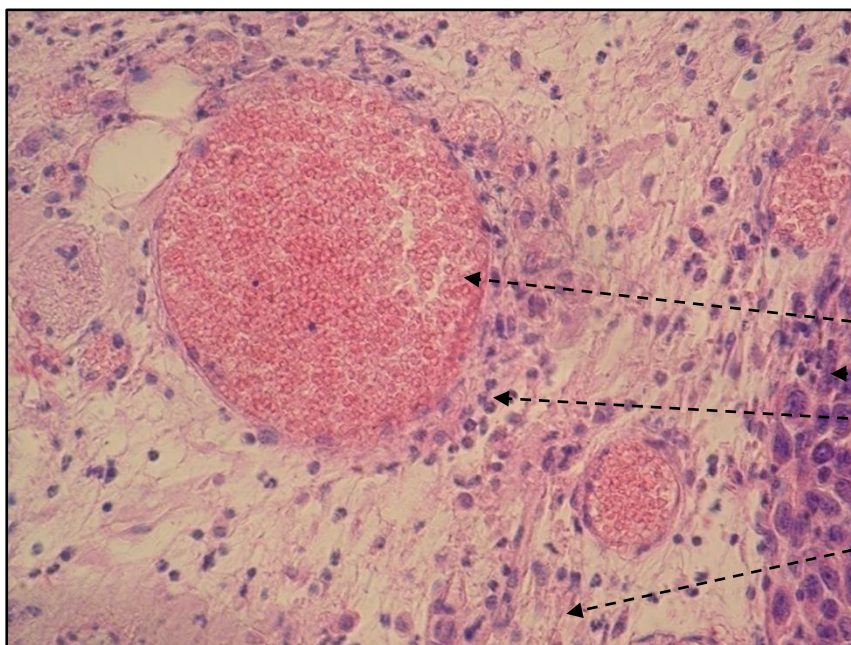
8.3. Příloha 3: Další jevy v histologických preparátech – pokus č. 2 (Histologické vyhodnocení vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS a flagelinem na mikroprostředí melanomu).



Obr. 25: flagelin/R po 8 hod.



Obr. 26: flagelin/R po 48 hod.



- A – nádorové buňky
- B - záněť
- C - granulocyty
- D - céva

Obr. 27: Zymosan-SMCC + flagelin po 8 hod., dilatovaná céva.