

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na
povrch nádorových buněk**

Diplomová práce

Bc. Veronika Maierová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

Školitelka specialista: RNDr. Marie Jalovecká

České Budějovice 2012

Maierová V., 2012: Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. [Anticancer immunotherapy based on the installation of mannose on the surface of tumor cells. Mgr. Thesis, in Czech] – 71 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to find optimal therapy based on combination of membrane-anchored phagocytic ligands (mannose-(G)₅-(K)₁₀-STE, mannan-BAM, mannan-SMCC) with LPS (ligand of signal receptor) for treatment of murine melanoma B16-F10. Mixture of mannan-BAM with LPS applied in pulse regime proved to be the most effective, resulting in high reduction of tumor growth and significant prolongation of survival.

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

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

V Českých Budějovicích dne 11. 12. 2012

.....
Bc. Veronika Maierová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vřelý přístup, ochotu a odbornou pomoc při vedení mé diplomové práce. Ráda bych také poděkovala své školitelce specialistce RNDr. Marii Jalovecké za pomoc s analýzou dat z průtokového cytometru a také za pomoc s metodickým postupem. Dále děkuji pracovníkům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za pomoc při experimentech v příjemném pracovním prostředí. Velké díky patří také mé rodině a přáteli, za jejich podporu, pomoc a zázemí.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Historie nádorového onemocnění	1
1.2	Společné znaky nádorů	3
1.2.1	Obecná charakteristika nádorového bujení	3
1.2.2	Dělení nádorů podle biologické povahy	5
1.2.3	Schopnost invazivity a metastazování u malignit	6
1.2.4	Nádorová terminologie	8
1.2.5	Nádorové kmenové buňky	9
1.3	Melanom	10
1.3.1	Melanocyty	10
1.3.2	Epidemiologie	11
1.3.3	Rizikové faktory	13
1.3.4	Klinický obraz a klasifikace	14
1.3.5	Myší melanom B16-F10	14
1.4	Imunitní systém	15
1.4.1	Nespecifická imunita	15
1.4.1.1	Mechanismy rozpoznávání patogenů	16
1.4.2	Specifická imunita	21
1.4.3	Nádorová imunoterapie	22
1.4.3.1	Nádorové antigeny	24
1.4.3.2	Navození nádorové imunotolerance	25
1.4.4	Charakterizace látek použitých v této práci k protinádorovému ataku	26
1.4.5	Strategie v nádorové terapii	28
1.5	Charakteristika průtokové cytometrie	29

2	Cíle práce	30
3	Materiál a metody	31
3.1	Chemikálie použité v experimentech.....	31
3.2	Laboratorní zvířata.....	31
3.3	Kultivace a transplantace melanomu B16-F10.....	31
3.4	Měření velikosti nádorů.....	32
3.5	Redukce nádorového růstu vůči kontrole.....	32
3.6	Měření teploty nádorů.....	33
3.7	Počítání plicních metastáz.....	33
3.8	Výsledná analýza dat.....	33
3.9	Příprava roztoků a následná syntéza látek používaných pro terapie.....	33
3.10	Schéma jednotlivých terapií	34
3.10.1	Použití molekul s terminálně vázanou manózou, za využití spaceru a kotvení v membráně, pro terapii melanomu B16-F10.....	34
3.10.2	Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi manan-BAM s LPS.....	35
3.10.3	Terapie melanomu pomocí mananu kovalentně vázaného prostřednictvím SMCC, řešení otázky synergie s LPS.....	35
3.10.4	Využití beta glukanu k podpoření terapie založené na kombinaci manan-BAM/ LPS, pokus o náhradu LPS flagelinem.....	36
3.10.5	Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu ovlivněném terapií.....	36
3.10.5.1	Metodický postup experimentu.....	37
3.10.5.1.1	Odebírání nádorů.....	37
3.10.5.1.2	Analýza pomocí průtokového cytometru.....	37
4	Výsledky	41
4.1	Použití molekul s terminálně vázanou manózou, za využití spaceru a kotvení v membráně, pro terapii melanomu B16-F10.....	41

4.2	Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi manan-BAM s LPS	45
4.3	Terapie melanomu pomocí mananu kovalentně vázaného prostřednictvím SMCC, řešení otázky synergie s LPS	47
4.4	Využití beta glukanu k podpoření terapie založené na kombinaci manan-BAM/ LPS, pokus o náhradu LPS flagelinem	49
4.5	Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu ovlivněném terapií	51
5	Diskuse	60
6	Závěr	63
7	Seznam použité literatury	64

1 Úvod

1.1 Historie nádorového onemocnění

První písemné záznamy o nádorovém onemocnění pocházejí ze starověkého Egypta. Nalezené papyry: The Edwin Smith Papyrus (obsahuje nejstarší popis karcinomu prsu se závěrem, že na tuto nemoc neexistuje žádná léčba) a The Ebers Papyrus (mimo jiné popisuje nádory kůže) shrnují veškeré tehdy známé poznatky týkající se chirurgie a medicíny a mapují období mezi lety 3000 až 1500 př. n. l. Přestože nádorová onemocnění nebyla ve starověku rozšířená (většina lidí se nedoživala vysokého věku), je zajímavé, že ve spisech z té doby je karcinom prsu uváděn mnohem častěji, než jakékoli jiné malignity. Touto problematikou se později zabýval řecký lékař a učenec Hippokrates (460-375 př. n. l.), který věřil, že každé onemocnění vzniká z přirozených příčin. Všiml si, že nádory se vyskytují převážně u dospělých osob, a protože mu jejich vzhled připomínal kraba (řecky *carcinus*) nazval je pojmem *carcinoma* (zhoubný nádor). Aulus Celsus (25 př. n. l. – 50 n. l.) zavedl oficiálním jazykem medicíny latinu a v tomto duchu přeložil do té doby používaný termín *carcinoma* jako *cancer* (nevléčitelný zhoubný vřed). Pro léčbu nádorů doporučoval chirurgický zásah a to v časném stádiu této nemoci. Claudius Galén (130-200 n. l.) byl však opačného názoru, chirurgický zásah odmítal a byl presvědčen, že nejlepší léčbou je podávání projímadel, která mají tělo vyčistit. Galén byl ve své době velice uznávaným lékařem a tak byly jeho práce všeobecně přijímány v celém tehdy známém světě. Bohužel se tím opozdil pokrok v chápání vzniku a průběhu této nemoci a nahlížení na její léčbu na několik století (Hajdu, 2011a).

Světlejším obdobím pro medicínu byl teprve příchod 15. století a století následujících, kdy se stalo pro lékaře více přijatelným provádět pitvy těl zemřelých a tím odhalit příčinu smrti. Německý chirurg Johannes Scultetus (1595-1645) v práci *Armamentarium Chirurgicum*, která byla publikována po jeho smrti v roce 1655, popisuje chirurgickou léčbu nádorů pomocí excize a amputace. Už tehdy léčil karcinom prsu mastektomií s následným vypalováním, aby bylo zabráněno krvácení a eliminovány potenciální zbylé nádorové buňky (Hajdu, 2011b). V 18. století se velice rozšířilo používání mikroskopu, s čímž souviselo také množství nových objevů. V roce 1761 lékař John Hill popsal nádory nosů u mužů šňupajících tabák (Hajdu, 2011b). V roce 1775 londýnský chirurg Percivall Pott zaznamenal,

že mezi kominíky se velice často objevuje nádorové onemocnění šourku (Porter, 1998). Přisuzoval ho chronickému dráždivému účinku sazí (Stone et al., 2003) a byl tak prvním, kdo vlastně nevědomky popsal účinek karcinogenů - mutagenních látek schopných pronikat do buněk tkání a poškozovat je (Stone et al., 2003). V roce 1789 byly popsány karcinomy plic u 75% horníků těžících uranovou rudu v Krušných horách. Délka přežití horníků od vstupu do dolu činila pouhých 20 let (Proctor, 1995). Protože takovýchto pozorování stále přibývalo, začaly se hledat konkrétní spojitosti mezi těmito pozorováními a vznikem nádorového onemocnění. Mezi léty 1871 a 1874 vznikla série publikací, jejichž autorem byl Anglický chirurg Campbell De Morgan (Hajdu, 2011b). Mimo jiné se v nich píše, že primární nádor vzniká nejdříve lokálně a poté se z něj šíří „nádorový jed“ (v dnešní terminologii metastázy) nejprve do lymfatických uzlin a poté mimo ně na jiná místa v těle. Jeho teorii podpořil Jonathan Hutchinson, který byl rovněž názoru, že nádor nejprve vzniká na jediném místě v těle a nádorové buňky přirovnal k rebelům, kteří se vymkli kontrole „státu“ ve kterém žijí a chtějí se osamostatnit. De Morgan si také všiml, že někdy dochází ke spontánním regresím, kdy se nádor sám začne zmenšovat nebo se ztratí docela. Ale jak dodává, odumírání nádoru neprobíhá vždy bez komplikací, protože nádor je silně vaskularizován a nekrotizující masa buněk ucpává cévy, jež do něj vedou. Dalším jeho poznatkem bylo, že spontánní regrese byly někdy důsledkem infekce a obzvláště pak při propuknutí tuberkulózy. S těmito závěry pracoval posléze americký chirurg William Coley, který v roce 1891 nakazil pacienta s pokročilým sarkomem krku streptokokovou infekcí a tumor jako zázrakem zmizel. Byl po něm pojmenován Coleyův toxin, směs extraktů z *Streptococcus pyogenes* a *Bacillus prodigiosus* (jeho používání v USA v roce 1953 zakázali) (Grange et al., 2002).

V roce 1911 Payton Rous objevil, že vznik nádoru může být vyvolán virem (prováděl experimenty s kuřecím sarkomem). Tento virus byl po něm posléze pojmenován a v roce 1966 dostal za tento objev Nobelovu cenu (Stone et al., 2003). Po první světové válce došlo k objevení prvních cytostatik odvozených od yperitu a pracujících na alkylačním principu. Ve 30. letech 20. století byly za příčinu vzniku nádorového onemocnění označeny polycyklické uhlovodíky, jež byly jen první karcinogenní látkou v dlouhém seznamu. Mutagenitu karcinogenních látek prokázal Bruce Ames v 70. letech 20. století (Stone et al., 2003). V 80. letech přišla éra terapií pomocí tumor specifických antigenů, které se však ukázaly jako neúčinné. Zářátkem roku 1990 se začalo s cílenou imunoterapií autologními

cytotoxickými T lymfocyty specifickými pro nádorové antigeny pacienta. Doufalo se, že se podaří vyvinout vakcínu proti melanomu a ostatním nádorovým onemocněním (Grange et al., 2002), ale dnes už je zřejmé, že tudy cesta také nepovede.

Vzhledem k tomu, že nádorová onemocnění jsou rozsáhlou skupinou chorob, je nepravděpodobné, že bude někdy objeven jediný lék na všechny jednotlivé typy. Otevírá se nám tak široké spektrum možností, na co se můžeme dále zaměřit a stále toho zbývá spousta k vyzkoušení a ověření, zda se jedná o účinnou terapii či nikoli. Že je téma stále aktuálnější dokazuje i to, že zatímco ještě před pár lety platilo, že nádorová onemocnění u dospělých osob jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou smrti (Povýšil et al., 2011), dnes už se staly její příčinou hlavní v ekonomicky vyspělých zemích a druhou nejčastější v zemích rozvojových (Jemal et al., 2011).

1.2 Společné znaky nádorů

1.2.1 Obecná charakteristika nádorového bujení

Vyjádřit jednoduše a výstižně tak složitý proces, jako je nádorové bujení s jeho neuvěřitelně rozmanitými projevy i složitými a dosud neobjasněnými patogenetickými cestami vzniku, je velice obtížné. Přesto lze nádor stručně definovat takto: Nádor, novotvar – *neoplazma*, je *de novo* vytvořená masa tkáně, jejíž růst přesahuje anatomické i funkční potřeby tkáně normální a pokračuje i poté, co jsou příčiny vyvolávající nádorové bujení odstraněny. Takto nově vzniklá nádorová tkáň postrádá jakékoli uspořádání normální tkáně a nijak se nepodílí na kontrole činnosti nově vznikajících buněk (Povýšil et al., 2011).

Nádory získávají určitý stupeň nezávislosti-autonomie na tkáni nebo orgánu v místě svého vzniku, popř. v místech metastatického rozsevu nádoru. Zvětšují svou velikost bez ohledu na lokální prostředí a celkový stav hostitele. Autonomie nádoru však nikdy není úplná, protože organismus mu poskytuje krevní zásobení a tím ho vyživuje (Povýšil et al., 2011).

Společným rysem většiny nádorů je vznik z jediné progenitorové buňky, ve které došlo ke změnám umožňujícím její deregulovanou proliferaci do buněk dceřiných (jejích klonů) a následně do dalších generací nádorových buněk. Proto také většinu nádorů považujeme za

monoklonální choroby (Stone et al., 2003). Při takovéto rozsáhlé klonální expanzi vzniká obrovské množství buněk, které se v průběhu času mění a zdokonalují ve schopnostech jak uniknout imunitnímu systému hostitele, aby nebyly zničeny.

Základem vzniku nádorových onemocnění jsou neletální změny genomu. Ty mohou být způsobeny a) faktory prostředí (radiční záření, chemické látky, virové infekce), b) faktory vnitřními (působení toxických radikálů na DNA, ztráta schopnosti reparace DNA, nestabilita genomu, genové přestavby), c) zděděny jako mutace v zárodečné linii (Povýšil et al., 2011).

V patofyziologii nádorových buněk lze vymezit sedm základních změn, které charakterizují růst nádorů:

- defektní DNA reparace se vznikem genomické nestability
- nezávislost na růstových signálech
- ztráta schopnosti regulace buněk inhibičními signály
- blok apoptózy
- neomezený replikační potenciál – překonání buněčného stárnutí
- rozvoj angiogeneze
- schopnost invazivity a metastazování

Mutace genů, které regulují některé nebo všechny tyto znaky, jsou přítomny u každého zhoubného nádoru (Povýšil et al., 2011).

Klíčovou roli v tomto ohledu zastávají čtyři základní skupiny regulatorních genů. Jsou to protoonkogeny, podporující proliferaci buněk, supresorové geny inhibující růst, geny regulující apoptózu a geny řídící reparaci DNA.

V poslední době se otevírá dosud méně prozkoumané pole onkogenních mikro RNA a genů, které je kódují. Genetické změny v nádorových buňkách směřují k jejich zvýhodnění oproti buňkám normálním (zvýšená prorůstová aktivita, obejití buněčného stárnutí, odolnost vůči apoptóze). Mutantní alely protoonkogenů se označují jako onkogeny, jejich funkce je dominantní (k buněčné transformaci stačí mutace jen jedné alely). Supresorové geny jsou považovány za nádorově recesivní (svou funkci ztrácejí až při poškození obou alel) (Povýšil et al., 2011).

Alespoň část buněk nádorové populace má schopnost dělit se do nekonečna (Kim et al., 1994; Shay et al., 2001). Využívají k tomu enzym – telomerázu. Tento enzym je schopný replikace koncových částí chromozomů - telomer, které jinak podléhají progresivnímu zkracování v každém mitotickém cyklu, protože telomerické konce DNA se během buněčného cyklu nemohou replikovat. Jinak by při kritickém zkrácení došlo k selhání ochranné funkce proteinové čepičky na koncích chromosomů a následovala by apoptóza. Většina nádorů obsahuje krátké telomery a produkuje vysoké množství telomerázy, zatímco ve většině normálních somatických buněk telomeráza chybí (Shay et al., 2001). U většiny buněk je replikační potenciál omezen na 60-70 dělení, poté buňky přecházejí do stavu senescence - buněčné stárnutí, který vyústí apoptózou (Shay a Wright, 2000). Telomeráza je fyziologicky aktivní jen v embryonálních, zárodečných a některých somatických a progenitorových kmenových buňkách (Povýšil et al., 2011). Aktivita telomerázy ať už reaktivované nebo syntetizované ve zvýšené míře je spojena prakticky se všemy typy malignit (Shay et al., 2001).

1.2.2 Dělení nádorů podle biologické povahy

Podle biologické povahy a potenciálního vývoje se nádory dělí na benigní a maligní.

Za benigní se považuje nádor, který roste v místě svého vzniku ohraničeně, někdy bývá i opouzdřen, a nemá tendenci k zakládání dceřiných ložisek v těle (metastazování). Díky tomu jej lze zpravidla dobře chirurgicky odstranit. Roste obvykle pomalu po dobu měsíců až let a svému nositeli většinou nezpůsobuje závažnější poruchy. Protože je jeho růst expanzivní, na okolní tkáň působí „pouze“ tlakovou atrofii, což však např. v oblasti mozku může způsobit výrazné komplikace i smrt. Je tvořen pouze diferencovanými nádorovými buňkami (Povýšil et al., 2011).

Maligní nádory jsou charakterizovány neohraničeným růstem v místě svého vzniku s tendencí infiltrovat okolní tkáň a progresivně se šířit do okolí a to blízkého i vzdáleného (metastázy). Jejich léčba je proto velice obtížná. Rostou rychle a invazivně - prorůstají do svého okolí a destruuji okolní tkáň. Jsou charakteristické širokým spektrem diferenciací buněk od buněk zcela nediferencovaných po buňky cytologicky i funkčně zralé (Povýšil et al., 2011).

1.2.3 Schopnost invazivity a metastazování u malignit

Jak nádor roste, zvyšuje se jeho agresivita a dochází k progresi (získává potenciál vyššího stupně malignity). Progrese nespočívá jen ve zvětšování objemu, je způsobena vznikem heterogenity buněčných populací vyvíjejících se z původního nádorového klonu. Dochází k postupné kumulaci dalších mutací, vznikají subklony s rozdílnými charakteristikami, které se mohou lišit ve schopnosti udržovat dělení buněk, invadovat tkáň a metastazovat, reagovat na růstové faktory a na léčiva používaná při nádorové terapii (Povýšil et al., 2011).

Nádorová angiogeneze – schopnost novotvorby cév z přirozeného krevního řečiště v okolí nádoru je nepostradatelná pro růst a další zvětšování objemu nádoru (Povýšil et al., 2011). Je to proces nekontrolovatelný, deregulovaný a nově vytvářené cévy tumoru jsou nevyzrálé, chaotické, strukturálně deficitní a téměř bez vnější vrstvy podpůrných buněk (pericyty, hladké svalové buňky). To vede k vysokému průniku plazmy do intersticia, častému krvácení nebo naopak trombózám, což působí zvyšování intratumorálního tlaku. Dochází ke špatnému průtoku krve nádorem, k častým zánětům či hypoxickým nekrotickým, jež vedou k další stimulaci chaotické angiogeneze. Vlivem zvýšeného tlaku v intersticiální tekutině klesá také průnik chemoterapeutik do nádorové tkáně (Klener a Klener jr., 2010).

Hlavním spouštěčem nádorové angiogeneze je hypoxie jejímž důsledkem je exprese růstového faktoru pro endotelové buňky (VEGF, vascular endothelial growth factor), angiogeninu, tumor necrosis factoru (TNF)- α aj. (Nishida et al., 2006; Klener a Klener jr., 2010). Angiogenní faktory jsou rovněž uvolňovány zánětlivými buňkami, které se v nádorech běžně vyskytují (Povýšil et al., 2011). Jelikož jsou angiogenní faktory (stejně jako jejich receptory) exprimovány také v okolním stromatu a endoteliích dochází k patologickým autokrinním a parakrinním stimulačním smyčkám (Klener a Klener jr., 2010). Nádorová tkáň nemůže zvětšit svou velikost nad průměr 1-2 mm³ bez neovaskularizace, protože by ustal přísun živin k buňkám a její růst by se zastavil (Ausprunk a Folkman, 1977; Nishida et al., 2006). Do této milimetrové velikosti probíhá v nádorové populaci látková výměna difúzí (Klener a Klener jr., 2010). Nádorové buňky jsou také schopny stimulovat novotvorbu lymfatických cév – lymfangiogeneze. Při metastazování do nich pronikají snadněji než do cév krevních, díky množství otvorů v kapilárních stěnách, které jsou prakticky bez podpůrných buněk (Klener a Klener jr., 2010).

Nádorové buňky vstupují do cévního řečiště buď jednotlivě, nebo ve shlucích - v tomto případě mohou vytvářet mikroemboly. V krevním toku se pohybují pasivně (Povýšil et al., 2011). Odhaduje se, že na 1 gram (= 1cm³) nádoru se do cirkulace dostává několik milionů buněk denně. Během oběhu však přežije jen nepatrný zlomek tohoto počtu (< 0,1%) (Klener a Klener jr., 2010). Za eliminaci cirkulujících nádorových buněk jsou odpovědné jednak mechanické faktory krevního proudění (vyšší hydrostatický tlak, destrukce na srdečních chlopních), jednak imunitními mechanismy (NK-buňky - natural killers, monocyty) (Klener a Klener jr., 2010; Povýšil et al., 2011) a dále také tzv. kyslíkový efekt (vysoká tenze kyslíku v arteriální krvi a plicních kapilárách) (Klener a Klener jr., 2010). Dalším významným faktorem podílejícím se na destrukci nádorových buněk je účinek oxidu dusnatého (NO) uvolňovaného z aktivovaných makrofágů. Na jedné straně NO sice usnadňuje přichycení nádorových buněk k endotelu (přednostně v místech mezibuněčných spojů), na druhé straně však vykazuje signifikantní cytotoxický účinek a indukuje apoptózu nádorových buněk (Klener a Klener jr., 2010; Povýšil et al., 2011). Maligní elementy jsou též charakterizovány změnou nebo zvýšenou glykosylací řady membránových proteinů a lipidů, které regulují mezibuněčnou adhezi, invazivitu, metastazování či angiogenezi (Klener a Klener jr., 2010). Tyto nádorové glykoproteiny a glykolipidy mohou být rozpoznány imunitním systémem, který je schopen rozeznávat nádorové buňky a ničit je, ve většině případů však tento mechanismus selhává. Přestože se proti nádorovým buňkám mohou tvořit protilátky, nemají prokazatelný protektivní účinek. Proto převažující protinádorový mechanismus spočívá na buňkami zprostředkované imunitě (Povýšil et al., 2011).

Ne všechny maligní nádory mají stejnou schopnost metastazovat, a to i nádory stejného orgánu a stejného histologického typu. Metastazování může probíhat třemi způsoby, které se mohou kombinovat: implantace nádoru v tělních dutinách (porogenní cesta), lymfatická a krevní cesta (Povýšil et al., 2011).

Metastáza obvykle nepředstavuje soubor nádorových buněk identických s primárním tumorem (odlišné mikroprostředí, selekční tlak). Buňky mohou v metastáze přežívat dlouhou dobu v tzv. „spícím“ stavu (neproliferují). Spouštěcím mechanismem opětovného růstu může být např. chirurgické odstranění primární nádorové masy, která růst dceřiných metastáz humorálně inhibovala (Klener a Klener jr., 2010). Nově vzniklé metastázy se mohou dále šířit a vytvářet tzv. metastázy metastáz (Klener a Klener jr., 2010; Povýšil et al., 2011).

Maligní melanom je schopný metastazovat i do neobvyklých lokalizací, ve kterých jiné nádory metastázy schopny založit nejsou např. slezina a myokard (Povýšil et al., 2011).

Anatomická lokalizace nádoru a přirozené cesty krevního a lymfatického řečiště ne vždy vysvětlují distribuci metastáz v těle. Je pozoruhodné, že v kosterní svalovině se metastázy téměř nevyskytují, a to ani u nádorů s nejvyšším stupněm malignity (Povýšil et al., 2011).

1.2.4 Nádorová terminologie

Všechny nádory mají dvě základní složky: nádorový parenchym a stroma nádoru. Parenchym představuje vlastní nádorovou tkáň, která by ovšem nemohla existovat bez podpory stromatu. Stroma tvoří pojivová tkáň, cévy, popř. zánětlivé buňky hostitele. Stroma nepředstavuje jen pasivní podporu, jakousi kostru, na které nádor roste, nýbrž přináší výživu a růstově regulační prvky ovlivňující nádorový parenchym. Mezi buňkami stromatu a parenchymu probíhá molekulární komunikace brzdící nebo podporující růst nádoru a jeho další vývoj. Parenchym nádoru zásadně určuje biologické chování nádoru. Podle povahy parenchymu jsou také nádory terminologicky označovány (Povýšil et al., 2011).

- **epiteliální** (nádory krycí a výstelkové tkáně)
 - benigní: epiteliom, papilom
 - maligní: karcinom
- **germinomy** (nádory ze zárodečných tkání)
 - benigní: teratom
 - maligní: seminom, embryonální karcinom
- **hematopoetické** (nádory z krvevorných tkání)
 - maligní: leukemie a lymfomy
- **neuroektodermální** (nádory mozku a pigmentových buněk kůže)
 - mozek
 - benigní: gliom, meningeom
 - maligní: glioblastom, neuroblastom
 - kůže
 - benigní: pigmentový névus
 - maligní: melanom

- **stromální** (nádory pojivové tkáně)
 - benigní: fibrom (vazivo), myom (hladké svalstvo), chondrom (chrupavka)
 - maligní: sarkom
- **nádory ze žlazových tkání**
 - benigní: adenom
 - maligní: adenokarcinom
- **nádory z ostatních tkání** (vzácné) (Vorlíček et al., 2006)

U obou pohlaví zcela převažují zhoubné nádory epitelového původu – karcinomy. U mužů jsou nejčastější karcinomy dýchacích cest, následované karcinomem prostaty a tlustého střeva. U žen je nejčastější karcinom mléčné žlázy, na druhém místě je pohlavní ústrojí a na třetím tlusté střevo (Povýšil et al., 2011). Incidence melanomu je u obou pohlaví téměř stejná, v rámci bílé populace má vzestupný trend (Bandarchi et al., 2010).

1.2.5 Nádorové kmenové buňky

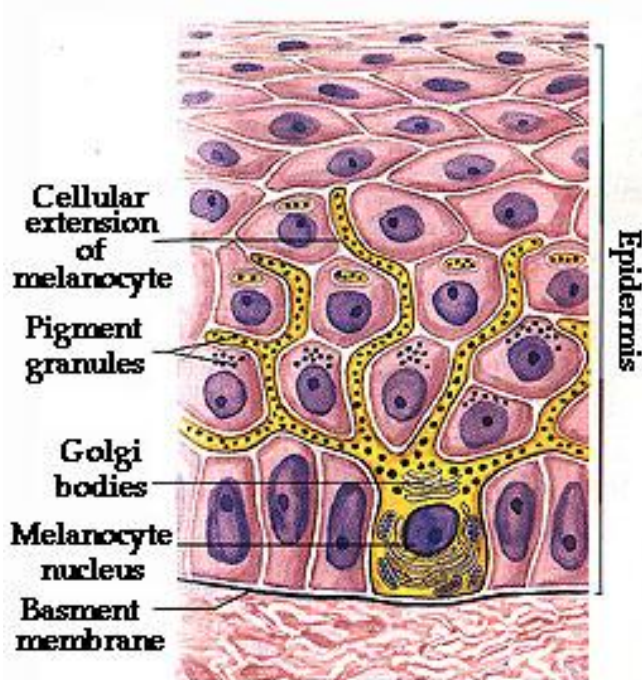
Termín kmenová buňka (stem cell) byl poprvé použit v roce 1868. Dnes rozeznáváme čtyři typy těchto buněk, které spolu sdílí základní charakteristiky, ale liší se v několika významných ohledech: zárodečné, somatické, uměle vytvořené (geneticky upravené a používané při experimentálních studiích) a nádorové. Nádorová populace obsahuje kmenové buňky, které mají schopnost zahájit proces nádorového růstu a udržovat jej, podobně jako je tomu u kmenových buněk za fyziologických podmínek. Z celkového objemu nádorových buněk tvoří však nádorové kmenové buňky (CSCs, Cancer Stem Cells) pravděpodobně jen nízké procento populace. Původ těchto buněk zůstává neznámý, ačkoli některé studie tvrdí, že vznikly mutací buněk somatických (Reya et al., 2001). Existence CSCs byla poprvé prokázána v hematopoetickém systému při studiu akutní myeloidní leukemie a mnohočetného myelomu, v 90. letech 20. století byly tyto buňky izolovány. Od té doby byla jejich přítomnost prokázána rovněž u maligních nádorů prsu, mozku, tlustého střeva a kůže (Girouard a Murphy, 2011). Přítomnost populace CSCs v lidském melanomu byla prokázána v roce 2005 a to *in vitro* (ve stabilizované buněčné linii) i *in vivo* (vzorek odebraný pacientovi při operaci). Studie zjistila, že melanomové CSCs jsou schopné proliferace, diferenciaci a sebeobnovy a kromě toho mají i vyšší tumorogenitu (Fang et al., 2005).

1.3 Melanom

1.3.1 Melanocyty

Předpokládá se, že melanocyty pocházejí z melanoblastů nebo z pluripotentních buněk neurální lišty a migrují přes paraspinální ganglia a jejich periferní nervy až do epidermis, dermis a vlasových folikulů kde jsou uloženy v nejvyšší míře. Vyskytují se však též ve sliznicích, očním bulbu a v plenách mozkových (Bandarchi et al., 2010; Povýšil et al., 2011). Melanocyty a Langerhansovy buňky jsou dva typy dendritických buněk nacházejících se v pokožce – epidermis, která je z 95% tvořena keratinocyty, hlavními epidermálními buňkami (Carneiro et al., 2011). Melanocyty jsou pigmentové buňky nacházející se zejména v bazální vrstvě epidermis, které mají jedinečnou schopnost syntetizovat pigment melanin. Melanin je produkován v melanosomech, specializovaných cytoplazmatických organelách podobných lysozomům, které vznikají odštěpováním z Golgiho aparátu (Costin a Hearing, 2007; Bandarchi et al., 2010). Melanosomy s hotovým pigmentem putují z buněčného těla melanocytu do jeho dlouhých větvících se výběžků, které jsou v přímém kontaktu se sousedními keratinocyty a jsou jim předávány cytokrinní sekrecí (viz. Obr. 1). V keratinocytech se granula s melaninem kumulují nad buněčnými jádry mitoticky aktivních bazálních buněk ve formě pigmentových čepiček a absorbují škodlivé ultrafialové (UV-ultraviolet) záření dříve, než může proniknout do jádra a poškodit DNA (Costin a Hearing, 2007; Bandarchi et al., 2010).

Odhaduje se, že každý melanocyt je v kontaktu s přibližně 36 keranocyty (Santiago-Walker et al., 2009; Bandarchi et al., 2010) a vytváří spolu tzv. epidermální melaninovou jednotku (Costin a Hearing, 2007). V bazální vrstvě, kde dochází k melanogenezi a proliferaci ostatních buněk kůže, jsou v poměru 1:5, přičemž na sluncem exponovaných místech se jejich poměr zvyšuje (Santiago-Walker et al., 2009).



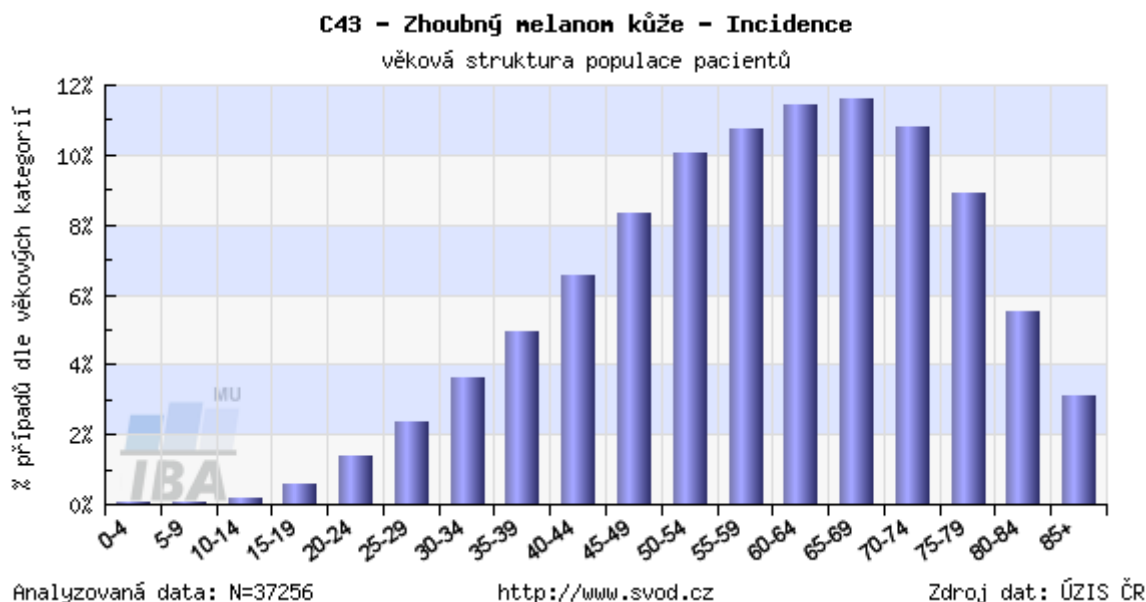
Obr. 1: Schéma epidermis – melanocyt (žlutě) obklopený keratinocyty (Topham, 2012).

Rozdíly v barvě pleti mezi různými rasami jsou dány především množstvím melanosomů a obsahem melaninu v keratinocytech, které melanocyty obklopují. Albíni mají běžné množství melanocytů, ale nedochází u nich k tvorbě melaninu. U lidí existují dva typy melaninu: hnědo-černý eumelanin a červeno-žlutý pheomelanin. Oba jsou přítomny ve vlasech i epidermis a ovlivňují jejich barvu (Thody et al., 1991). Melanocyty nejsou rozmístěny rovnoměrně a husté shluky těchto buněk mají za následek vznik pih a skvrn. Po vystavení se UV záření dojde k vyloučení melanocyty stimulujícího hormonu (MSH, Melanocyte Stimulating Hormone) z hypofýzy a tento hormon následně stimuluje melanocyty ke zvýšení jejich aktivity a k produkci zvýšeného množství melaninu následkem čehož kůže ztmavne. Opálením se tak kůže chrání před poškozením UV zářením (Tadokoro et al., 2005).

1.3.2 Epidemiologie

Maligní melanom je zhoubný novotvar odvozený od melanocytů s nejrychleji vzrůstající incidencí na celém světě. Poprvé byl posán v 18. století René Laenneckem (1781-1826) (Hajdu, 2012). I přes mnohaleté úsilí se u metastatického melanomu medián přežití

dosahující 6-8 měsíců (Garbe et al., 2011) po dobu posledních dvaceti let nezměnil. Příčina této nemoci není stále zcela objasněna (Bandarchi et al., 2010). Incidence i mortalita jsou nejvyšší mezi 60 – 70 lety. Incidenci zhoubného melanomu kůže ukazuje Obr. 2, u dětí je nízká, ačkoli u mladých žen začíná stoupat (Moyer, 2012).

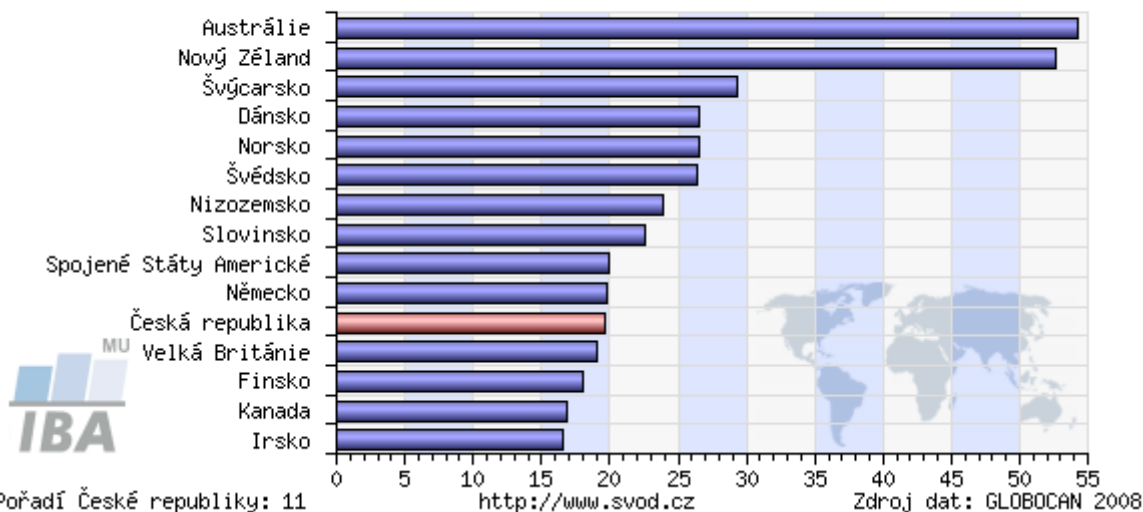


Obr. 2: Graf zobrazuje aktuální věkovou strukturu pacientů s danou diagnózou v ČR s přepočtem na 100 000 osob (Svod, 2012).

Melanom je mimořádně obtížně léčitelný kvůli jeho rezistenci ke konvenčním terapiím jako je radioterapie a chemoterapie (Bandarchi et al., 2010; Girouard a Murphy, 2011), nejúčinnějším způsobem léčby tak zůstává jeho chirurgické odstranění v počátečním stádiu vývoje. V České republice byla incidence melanomu v roce 2008 u mužů 19,5/ 100 000 obyvatel a u žen 16,4/ 100 000 obyvatel (Kocák, 2012). Jednu z nejvyšších incidencí na světě má Queensland v Austrálii a také Nový Zéland, což je dáno přílivem imigrantů se světlou pletí (viz. Obr. 3). Naopak nižší a stálejší se zdá být výskyt u osob s černou a tmavou pletí (Afričané, Indiáni, Asiaté a Hispánci). Melanom se nejčastěji vyskytuje na trupu (43,5%), končetinách (33,9%), na dlaních, ploskách nohou a pod nehty (11,9%), na hlavě a krku (10,7%) (Bandarchi et al., 2010).

C43 - Melanom kůže

srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa, přepočteno na 100 000 osob



Obr. 3: Graf zobrazuje incidenci melanomu kůže na celém světě s přepočtem na 100 000 osob (Svod, 2012).

1.3.3 Rizikové faktory

Hlavním rizikovým faktorem pro vznik maligního melanomu je chronická expozice slunečnímu záření, ale také návštěvy solárií spolu s nedostatečným používáním opalovacích krémů (Bandarchi et al., 2010; Moyer, 2012). Pokud syntéza a distribuce melaninu v kůži funguje správně, dělicí se buňky jsou chráněny před mutacemi, které UV záření může způsobit. Škodlivé je zejména UVB záření (280–320 nm) (Costin a Hearing, 2007). Ohroženi jsou zejména lidé s fototypem kůže 1-3, kteří mají světlou pokožku, množství pih, více než 50 běžných melanocytárních névů (mateřská znaménka) s různě intenzivní pigmentací a lidé s více než 5 dysplastickými névy (névy větší než 6 mm). Melanocytární névy mohou být vrozeného nebo častěji získaného původu a jejich vznik je spojován s vlivem UV záření a s působením zánětlivých cytokinů (Povýšil et al., 2011). Významnou roli hraje také imunoprese, expozice chemickým látkám a v neposlední řadě genetické faktory, které jsou příčinou 12% maligních melanomů vyskytujících se v rámci rodiny (Bandarchi et al., 2010).

1.3.4 Klinický obraz a klasifikace

Klinický obraz maligního melanomu se typicky určuje podle pravidla ABCD: Asymmetry, Border irregularity, Color variegation, Diameter <6 mm (Bandarchi et al., 2010).

Maligní melanom klasifikoval Wallace Clark se svými spolupracovníky do tří kategorií a později Dr. Richard Reed přidal ještě čtvrtou, jejíž výskyt není až tak běžný. Další možnou klasifikací je klasifikace podle Breslowa, kdy se určuje tloušťka a šířka nádoru v mm.

Rozlišujeme 4 základní formy maligního melanomu:

- **Povrchově se šířící melanom (50-75%)**

Nejběžnější typ melanomu, může se objevit na jakémkoli místě v kterémkoli věku. Jedná se o méně zhoubnou variantu, roste pouze v horizontální rovině, většinou vzniká *de novo*.

- **Nodulární melanom (15-35%)**

Zhoubnější, šíří se vertikálně do hlubších vrstev koria a podkožní tukové tkáně.

- **Lentigo maligna melanom (5-15%)**

Tato varianta se objevuje na kůži poškozené slunečním zářením především na obličeji a rukou starších pacientů. Jedná se o melanom *in situ* charakteristický plošnými ložisky, na nichž se střídají světlejší a tmavší odstíny hnědé barvy.

- **Akrální lentiginózní melanom (5-10%)**

Vyskytuje se na dlaních, ploskách nohou a pod nehty. Z počátku může vypadat jako bradavice, modřina či mozol. Ojedinele byly popsány i v oblasti prostaty nebo vnitřního genitálu u ženy a na některých sliznicích, především dutiny ústní, nosní a v distální části rekta.

(Bandarchi et al., 2010; Povýšil et al., 2011)

1.3.5 Myší melanom B16-F10

Při našich experimentálních studiích prováděných na myších jsme používali myší melanom B16-F10, používaný pro onkologický výzkum od roku 1970 (Fidler, 1970). Vyznačuje se schopností zvýšené invazivity a metastazování, při kterém jsou zasaženy hlavně plíce.

Kromě tohoto typu existují dále myší melanomové buněčné linie: B16-F0, B16-F1 a B16-BL6 (Nakamura et al., 2002). B16-F0 je mateřskou buněčnou linií, od které byly odvozeny linie ostatní. B16-F1 byla získána jednou selekční procedurou a B16-F10 deseti selekčními procedurami za použití metody podle Fiedlera (Fidler, 1973). Od linie B16-F10 byla odvozena linie B16-BL6, jejíž invazivní schopnost je ještě vyšší (Nakamura et al., 2002).

1.4 Imunitní systém

Základní funkcí imunitního systému je zachovávat integritu organismu. Ta spočívá v rozpoznávání cizorodých makromolekulárních látek, zabránění jejich vniknutí do organismu a jejich eliminaci v organismu, nastolení imunotolerance u vlastní tkáně a imunitního dohledu nad průběžnou likvidací vlastních degradačních produktů, starých a poškozených buněk a také buněk nádorových (Krejsek a Kopecký, 2004).

Rozlišujeme imunitu nespecifickou (také vrozená či přirozená) a specifickou (také získaná či adaptivní). Obě tyto složky imunitního systému spolu vzájemně komunikují a spolupracují.

1.4.1 Nespecifická imunita

Nespecifická imunita je z evolučního hlediska/ fylogeneticky velice starou větví imunity. Původně její funkci zabezpečovaly buňky schopné fagocytózy a pro její vývoj bylo rovněž zásadní, že dokáže rozlišit vlastní struktury od patogenních (Fujita et al., 2004). Mají ji jak obratlovci tak bezobratlí (Dumitru et al., 2000). Vrozená imunita má zásadní význam pro obranu při prvním styku s infekcí, než dojde k nastartování imunity specifické, protože se aktivuje velice rychle. Nevýhodou je, že si nevytváří paměť, a tak při opětovném setkání s tímtéž patogenním antigenem je rychlost odpovědi stále stejná. Jako ochranné bariéry vrozené imunity před patogeny slouží: kůže, povrch sliznic s mukózními sekrety, nízké pH, teplota, řasinkový epitel, interferony, komplement, zánětlivá reakce a dále buňky: monocyty/ makrofágy, granulocyty, dendritické buňky a NK-buňky (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.4.1.1 Mechanismy rozpoznávání patogenů

Rozpoznání patogenů je umožněno speciálními receptory (PRRs, Pattern Recognition Receptors) na povrchu buněk vrozené imunity, které interagují se specifickými molekulovými vzory na povrchu patogenů (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns), které jsou společné pro rozsáhlé skupiny nepříbuzných mikroorganismů a jsou zachovávány jako neměnné, vysoce konzervované membránové molekuly (Fujita et al., 2004; Krejsek a Kopecký, 2004). PRRs umožňují nespecifické imunitě rozpoznávat rovněž látky, které jsou spojeny s buněčnými komponenty uvolňovanými při poškození, infekci nebo stresovém stavu buněk tkání (DAMPs, Damage-Associated molecular Patterns) i v případě neinfekčního poškození a tím odhalit i poškození způsobená patogeny bez jejich přímé detekce. Typickými DAMPs jsou proteiny tepelného šoku a pozměněné membránové fosfolipidy (Foell et al., 2007).

Rozpoznáním PAMPs a DAMPs dochází k aktivaci PRRs, která spouští celou kaskádu imunitních reakcí vedoucích k zánětlivé odpovědi a vývoji antigen specifické adaptivní imunity.

PAMPs - název pochází od Medzhitova a Janewaye (Medzhitov a Janeway, 1997), představují buněčné struktury patogenních mikrobů (gram-negativních, gram-positivních, mykobakterií a spirochet), které jsou pro ně klíčové pro přežití a zároveň se jimi odlišují od buněk eukaryotních. Buňky nespecifické imunity je navíc dokáží rozlišit od molekulových motivů, které na svém povrchu nesou mikroby, kteří nepředstavují pro člověka nebezpečí - přirozená mikroflóra (Krejsek a Kopecký, 2004). Typickými představiteli PAMPs jsou lipopolysacharid (LPS) složka gram-negativních bakterií (Dumitru et al., 2000), lipoproteiny, peptidoglykany a N-formyl-methionin nacházející se v buněčné stěně všech bakterií, kyselina lipoteichoová nacházející se u gram-positivních bakterií, manany, glukany typické pro kvasinky a jiná fungální agens (Krejsek a Kopecký), bakteriální CpG DNA (Häcker et al., 2002), flagelin (Hayashi et al., 2001), terminálně vázaná manóza (Yeeprae et al., 2006) a další.

PRRs byly poprvé objeveny u rostlin (Song et al., 1995) a první z těchto receptorů, který byl později nazván TLR-1 (Toll-like receptor), byl objeven v roce 1994 u *Drosophily*

melanogaster (Beutler, 2009). Toll byl původně název pro jeden z dvanácti genů zodpovědných za diferenciaci embrya u *Drosophily*. V tomto organismu mají molekuly Toll rodiny význam jak ve vývoji, tak v obraně proti infekci, u savců hrají TLRs roli v přirozené imunitě.

PRRs se nacházejí v membráně především fagocytujících buněk. Jsou součástí monocytů, makrofágů, neutrofilů (Kennedy et al., 2007), NK-buněk (Brown, 2006), dendritických buněk, ale také epitelů střeva a dýchacích cest (Krejsek a Kopecký, 2004).

PRRs mohou být membránově vázané, cytoplazmatické, sekretované nebo jsou součástí endosomálních váčků (Beutler, 2009). Jsou klasifikovány podle ligandů, které vážou, specifčnosti, funkce a lokalizace do tří skupin: sekretované, signální a fagocytární (Krejsek a Kopecký, 2004).

▪ Sekretované PRRs

– **CRP** (C-reactive protein) je bílkovinou akutní fáze. Váže se na polysacharidy, nekrotické buňky a mnohé další ligandy na površích PAMPs i buněk hostitele. Aktivuje komplement klasickou cestou a hraje roli i v dráze alternativní, výsledkem je opsonizace a urychlení fagocytózy (Krejsek a Kopecký, 2004).

– **MBL** (Mannose-binding lectin) také známý jako (Mannan-binding lectin) (Jack a Turner, 2003) byl poprvé izolován v roce 1978 z králičích jater, v 80. letech byl izolován z jater lidských a byla objevena jeho funkce v aktivaci komplementu, v 90. letech byly popsány dva typy MBL vyskytující se u myši (Dommett et al., 2006). Lidský MBL je kódován genem MBL2 nacházejícím se na chromozómu 10 (Matsushita et al., 2000).

MBL je sérový protein jaterního původu patřící do rodiny na Ca^{2+} závislých kolagenních lektinů – kolektinů (Arora et al., 2001). Kolektiny dostaly své jméno podle collagen-like regionu a lektinového regionu. Lektiny jsou proteiny, které váží cukerné molekuly vyskytující se obvykle na povrchu bakterií. Kolagenová doména interaguje s efektorovými buňkami nespecifické imunity (Matsushita et al., 2000).

Jedná se o mnohařetězcovou molekulu složenou až z 6 podjednotek. Každá podjednotka obsahuje tři identické polypeptidické řetězce (32 kDa), které obsahují na cystein bohatou NH_2 terminální doménu, která je stabilizována kolagenním alfa helixem druhé domény a

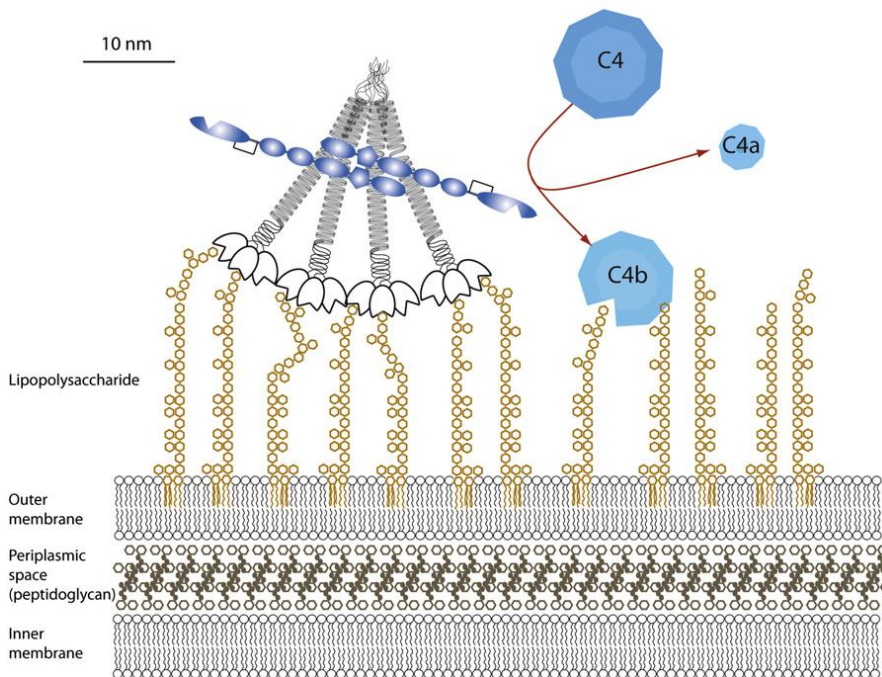
třetí globulární karboxylovou doménu, která obsahuje rozpoznávací karbohydrátovou doménu (CRD, Carbohydrate-Recognition Domain), kterou se MBL váže na opakující se cukerné zbytky na povrchu patogenů - PAMPs (Arora et al., 2001). Znázornění takové vazby ukazuje Obr. 4.

MBL se váže na 3- a 4- hydroxylové skupiny různých cukrů, nejčastějšími ligandy jsou D-manóza, manan, N-acetyl-D-glukosamin a L-fukóza (Xu et al., 2010). Toto sterické uspořádání dovoluje MBL specifické rozpoznávání cukrů na povrchu široké škály patogenů včetně bakterií, hub, parazitických protozoí a virů, ale nedochází k rozpoznávání vlastních struktur (Fujita et al., 2004). MBL má také schopnost identifikovat apoptotická tělíska a nekrotické buňky a kromě toho se může vázat na nádorové buňky, které se vyznačují alterovanou glykosylací membránových struktur (Endo et al., 2006).

MBL má dvě funkce – aktivuje lektinovou dráhu komplementového systému nebo působí přímo jako opsonin (Koch et al., 2001). Lidský MBL se nachází v krvi jako oligomer složený z různého množství podjednotek. Komplementový systém aktivuje prostřednictvím dvou sérových proteáz MASP-1 and MASP-2 (MBL-Associated Serine Protease). Aktivace lektinové dráhy vede ke komplementem zprostředkované lýze buněk v procesu, který vyžaduje přítomnost C4, C2, C3 složek a makromolekulárního komplexu poškozujícího membránu (Arora et al., 2001).

Množství klinických studií uvádí spojitost mezi infekčními chorobami a deficitem MBL (Martin et al., 2003; Larsen et al., 2004; Fujita et al., 2004; Thiel et al., 2006; Bouwman et al., 2006; Eisen et al., 2008) přičemž právě deficit MBL se zdá být jednou z nejběžnějších imunodeficiencí. Frekvence MBL deficiencie se pohybuje v evropské populaci mezi 5 – 10%. Deficit vede ke zvýšené vnímavosti k virovým, bakteriálním, plísňovým a protozoálním infekcím. Imunologicky je deficit MBL nejvíce patrný u dětí. MBL může hrát roli v regulaci uvolňování zánětlivých cytokinů monocyty (Jack et al., 2001).

U lidí se vyskytuje pouze jedna forma MBL zatímco u hlodavců a jiných zvířat dvě: MBL-A a MBL-C. Lidské MBL sdílí strukturální i funkční vlastnosti obou hlodavčích forem MBL. U myši byl izolován jak MBL- A tak C a obě formy byly schopné aktivovat lektinovou dráhu komplementu (Fujita et al., 2004).



Obr. 4: Znárodnění vazby MBL v komplexu s MASP-2 na molekulový vzor na povrchu gram-negativní bakterie spolu s navázáním složky C4b komplementu (Degn et al., 2011).

▪ Signální PRRs

– **TLRs** (Toll-like receptors) jsou transmembránové homo nebo heterodimerické bílkovinné receptory s extracelulárními na leucin bohatými repetitivními sekvencemi, které slouží pro rozpoznání PAMPs. Přibližně 80% jejich polypeptidického řetězce vyčnívá nad cytoplazmatickou membránu buňky (TLR-1, 2, 4, 5, 6, 10) nebo endosomu (TLR-3, 7, 8, 9). TLR-10, který nejvíce souvisí s TLR-1, 2 a 6 byl spolu s TLR-8 ztracen z myšího genomu, stejně tak jako TLR-11, 12 a 13 už se nevyskytují u člověka. Vazba PAMPs na TLR vyvolá signál, který je přenesen do jádra a vede k syntéze cytokinů spojených se zánětem (IL-1, 6, 8, 12 a TNF- α) (Beutler, 2009).

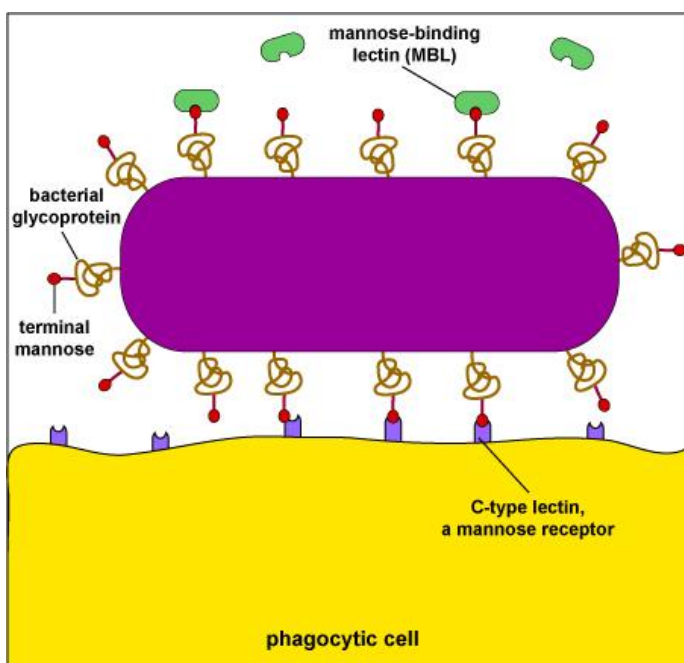
– **NLRs** (NOD-like receptors, nucleotide-binding oligomerization domain) se nacházejí v cytoplazmě, mají různé funkce v regulaci zánětlivých a apoptotických reakcí. Existují dva typy receptorů. NLRC-1 (NOD1) rozpoznávají peptidoglykan gram-negativních bakterií a NLRC-2 (NOD2) rozpoznávají peptidoglykan gram-positivních i negativních bakterií. Po rozpoznání endogenních PAMPs, které se odehrává stejným způsobem jako u TLRs, dojde

k vytvoření oligomerů a aktivaci kaspázy-1, která vede k aktivaci zánětlivých cytokinů jako IL-1, 6, 8 a dalších (Inohara et al., 2005; Strober et al., 2006).

▪ Fagocytární PRRs

Nacházejí se na povrchu makrofágů, neutrofilů, dendritických buněk a interakce s PAMPs vede k fagocytóze příslušného patogenu.

– **Manózový receptor** je transmembránový protein patřící do lektinové rodiny obsahující několik lektinových domén typu C a mající karbohydrátovou doménu pro rozpoznání PAMPs. Nacházejí se zejména na povrchu makrofágů a váží se na ligandy s terminální neredukující D-manózou, mananem, L-fukózou a N-acetylglukosaminem za přítomnosti Ca^{2+} . Terminálně vázané cukry se běžně vyskytují v mikrobiálních glykoproteinech a glykolipidech, ale na savčích buňkách se normálně nevyskytují (Opanasopit et al., 2001). Čím více cukerných zbytků je prezentováno na membráně mikroba, tím větší je afinita pro makrofágy (Yeeprae et al., 2006). Vazba na manózový receptor je znázorněna na Obr. 5. Manózové receptory mohou potlačit uvolňování některých prozánětlivých cytokinů jako $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 a tím regulovat odpověď nespecifické imunity (Xu et al., 2010).



Obr. 5: Rozpoznání manózy vázané na povrchu bakterie manózovými receptory (Kaiser, 2012).

- **Scavenger receptor.** Nachází se na makrofázích a jaterním endotelu, rozpoznává stěny bakterií a kvasinek. Váže LPS a teichoové kyseliny (Aderem a Ulevitch, 2000).
- **N-formyl Met receptor.** N-formyl-methionin je první aminokyselinou, kterou začíná proteosyntéza u prokaryot. U eukaryot začíná methioninem. Receptory se nacházejí na makrofázích a neutrofilech. Vyvolávají chemotaxi a fagocytózu (Aderem a Ulevitch, 2000).
- **Dectin 1** slouží jako fagocytární receptor beta glukanu. Nachází se na povrchu makrofágů (Brown et al., 2002), NK-buněk (Brown, 2006) a neutrofilů (Kennedy et al., 2007).

1.4.2 Specifická imunita

Specifická imunita se v evoluci objevila s obratlovci, ovšem geny kódující stěžejní molekuly jako jsou např. imunoglobulin G (IgG), T buněčný receptor nebo hlavní histokompatibilní komplex (MHC) třídy I. a II. byly objeveny pouze u žraloků a vyšších obratlovců (Fujita et al., 2004). Získaná imunita se vyznačuje vysokou specifičtí, diverzitou a pamětí a je rovněž schopná rozpoznání cizího a vlastního. Řadí se sem B a T lymfocyty.

B lymfocyty mají úlohu v produkci protilátek, které se váží na antigenní determinanty cizorodých buněk. Každý B lymfocyt nese na svém povrchu molekulu protilátky jako receptor. Po styku s antigenem proliferují a diferencují do buněk plazmatických (dochází ke ztrátě imunoglobulinových receptorů) a paměťových (uchovávají si buněčnou paměť a při opětovném styku se stejnou antigenní determinantou je protilátková odpověď mnohanásobně rychlejší) a dochází k produkci imunoglobulinových molekul (dělí se do pěti tříd: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, přičemž každá třída je charakteristická určitými vlastnostmi) (Krejsek a Kopecký, 2004).

T lymfocyty, poté co rozpoznají antigenní determinantu, která musí být ve spojení s molekulou MHC, proliferují a diferencují na efektorové a paměťové buňky. Základní dělení T lymfocytů je na cytotoxické CD8+ lymfocyty (Tc), které rozpoznávají antigenní epitopy ve spojení s MHC I. a mají vliv na nádorové buňky a pomocné CD4+ lymfocyty (Th), které rozpoznávají antigenní epitopy ve spojení s MHC II. a produkcí interleukinů ovlivňují mnohé imunitní buňky a stimulují Tc lymfocyty k přeměně na CTL, které likvidují

nádorové a virem napadené buňky. MHC I. se vyskytují na všech jaderných buňkách, MHC II. na antigen prezentujících buňkách (APC, antigen-presenting cells) – dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty (Krejsek a Kopecký, 2004). Z CD4+ lymfocytů mohou za určitých okolností vznikat regulační T lymfocyty (Treg), které za normálních okolností zabraňují vzniku autoimunitních chorob tím, že blokují atak CTL. K jejich tvorbě však dochází také v nádorové tkáni, a protože suprimují atak CTL brání tak imunitnímu ataku nádoru (Nishikawa et al., 2010).

1.4.3 Nádorová imunoterapie

Imunitní systém hraje v boji proti nádorovým onemocněním důležitou roli. Imunitní dohled, který poskytuje, dokáže eliminovat transformované buňky předtím, než jsou schopny vytvořit nádorovou masu. Cílem imunoterapie je vyvolat či posílit složky protinádorové imunity a zaktivovat je v boji proti zhoubnému onemocnění. Proti záření a chemoterapii má imunoterapie tu přednost, že je schopna ničit nádorové buňky vysoce selektivně a obvykle nezávisle na jejich generačním cyklu. Imunoterapie by tak mohla přispívat zejména k likvidaci tzv. zbytkových nádorových buněk a zaručit trvalé vyléčení.

Eliminace nádorových buněk je zprostředkována zejména CD8+ cytotoxickými T lymfocyty (CTL), jež mohou být izolovány z nádorového stromatu různých typů tumorů. CTL rozpoznávají nádorové antigenní epitopy pouze ve formě peptidů vystavených na povrchu nádorových buněk v komplexu s vlastními MHC molekulami I. třídy. Aktivace CTL vyžaduje ovšem kostimulaci pomocnými CD4+ T lymfocyty (Th). Th lymfocyty se zase nejprve musí s nádorovým antigenem setkat na povrchu antigen prezentujících buněk např. dendritické buňky, B lymfocyty, Langerhansovy buňky kůže, makrofágy aj.. Tato zkřížená prezentace antigenů zajišťuje za normálních okolností vysokou specifitu imunitních reakcí. Předpokládá se, že APC získají nádorový antigen tím, že fagocytují apoptotické a nekrotické nádorové buňky. Soubor nádorových antigenů je degradován v lysosomech APC a následně vystaven na buněčné membráně v komplexu MHC molekul II. třídy a kostimulačních molekul. Dochází tak k aktivaci Th lymfocytů, které následně aktivují cytotoxické T lymfocyty a produkují řadu cytokinů (IL-2, TNF, IFN γ), které mají přímý protinádorový účinek, zvyšují expresi MHC molekul I. třídy na nádorových buňkách a stimulují složky nespecifické imunity (makrofágy, NK-buňky). Vzhledem k tomu, že už jednou vytvořené

CTL rozpoznávají nádorové buňky bez nutnosti další kostimulace, je klíčovou událostí protinádorové adaptivní imunity jednoznačně vznik a expanze tumor specifického klonu CTL. Absence exprese nádorových antigenů, nízká exprese MHC molekul či aberantní produkce imunosupresivních cytokinů (TGF β) může blokovat imunitní odpověď organismu proti rostoucímu tumoru.

Další významnou složku protinádorové imunity představují NK-buňky. NK-buňky mohou cíleně likvidovat nádorové elementy se sníženou expresí MHC molekul I. třídy, tedy takové buňky, které unikají mechanismům adaptivní imunity zprostředkované TCL. Kromě toho díky expresi receptorů pro Fc fragment IgG mohou být NK-buňky soustředěny do nádorové masy pomocí terapeutických monoklonálních protilátek. Některé cytokiny (IL-2, IL-12) vyvolávají přeměnu NK-buněk v LAK (lymphokine-activated killers), které se využívají v adoptivní imunoterapii. Určitá role při eliminaci tumoru přísluší též aktivovaným makrofágům. Na rozdíl od buněčné imunity hraje humorální složka specifické imunity (protilátky produkované B lymfocyty) při eliminaci nádorů patrně jen okrajovou roli (Klener a Klener jr., 2010).

Mezi cytokiny působící jako regulátory vrozené a adaptivní imunity patří zejména interferony (IFNs) a interleukiny (ILs). V nádorové terapii se z IFNs nejvíce uplatňuje IFN α a IFN γ . IFN α má výrazné antiproliferační a protinádorové účinky. Ty se vysvětlují především zásahem do buněčného cyklu. IFN α indukuje expresi inhibitorů cyklin dependentních kináz, které blokují G₁ – S přechod. Dále stimuluje diferenciaci a potlačuje angiogenezi. Zvyšuje aktivitu CTL, makrofágů a NK-buněk a jeho účinkem dochází ke zvýšené expresi antigenů MHC I. a II. typu. Uplatňuje se v léčbě mnohých malignit včetně maligního melanomu (Klener a Klener jr., 2010). IFN γ stimuluje fagocytární schopnosti makrofágů a má synergický cytotoxický účinek s TNF. Zvyšuje expresi Fc receptoru a tím ovlivňuje protilátkami zprostředkovanou imunitu.

Z ILs je největší pozornost věnována IL-2 a IL-12. IL-2 vzniká v Th lymfocytech po setkání s antigenem. Autokrinně a parakrinně stimuluje proliferaci antigen specifických T lymfocytů, B lymfocytů a NK-buněk a podporuje sekreci dalších cytokinů T buňkami (IL-4, IFN γ). Kombinace IL-2 s IFN α jeví účinnost v léčbě maligního melanomu (Klener a Klener jr., 2010). IL-12 představuje důležitý spojovací článek mezi nespecifickou a specifickou imunitou. Jeho hlavním zdrojem jsou aktivované makrofágy a dendritické buňky. IL-12

indukuje vznik subsetu Th1, stimuluje aktivaci NK-buněk a podporuje produkci IFN γ aktivovanými T lymfocyty a NK-buňkami. Vyvolává expresi dalších cytokinů a je zodpovědný za angiogenní účinek. IL-12 představuje ideální imunomodulátor pro různé formy nádorové imunoterapie, jednak v podobě přímé systémové aplikace rekombinantně připraveného proteinu, jednak formou nádorových DNA vakcín kódujících jako kostimulátor gen pro IL-12, nebo v podobě adoptivní buněčné imunoterapie využívající geneticky modifikovaných dendritických buněk zvýšeně produkujících IL-12. V posledních letech byly zahájeny klinické studie testující IL-12 v terapii maligního melanomu, adenokarcinomu ledviny a T buněčných lymfomů (Klener a Klener jr., 2010).

1.4.3.1 Nádorové antigeny

Ačkoliv jsou nádorové buňky výsledkem maligní transformace normálních buněk organismu, exprimují na svém povrchu antigeny, které mohou být rozpoznány imunitním systémem jako cizí. Schopnost prezentovat cizí antigeny koreluje se schopností imunokompetentních buněk eliminovat nádorové buňky. Většina tumorů je však jen slabě imunogenní, takže míra imunitní odpovědi nestačí k jejich eradikaci. Navíc v průběhu růstu tumoru dochází k selekci klonů s nižší imunogenitou.

Nádorové antigeny lze rozdělit do dvou skupin: na antigeny, které se na normálních buňkách nevyskytují a jsou tudíž specifické pro nádorové buňky (TSA, tumor-specific antigens), a na antigeny, které se nacházejí i na normálních buňkách (TAA, tumor-associated antigens). Mezi TSA patří imunogenní peptidy mutacemi pozměněných onkoproteinů a tumor supresorových genů (např. BCR-ABL, RAS, p 53 aj.). Nejčastěji se však jedná o proteiny mutovaných genů, které v procesu maligní transformace nehrají žádnou úlohu a které vznikají zcela náhodně jako vedlejší produkty genomické nestability nádorových buněk. K dalším nádorovým antigenům mohou patřit virové proteiny onkogenních DNA virů (např. EBV, HPV), jejichž infekce je spojována s rizikem rozvoje některých malignit (lymfom, karcinom děložního hrdla).

TAA jsou obvykle u nádorové populace výrazně zvýšeně exprimovány, což může vyvolat imunitní odpověď (např. vysoká exprese genu pro tyrozinázu u maligního melanomu). V nádoru může také docházet k nepřirozené reexpresi proteinů, které jsou exprimovány pouze v určitých orgánech. Příkladem jsou MAGE (Melanoma Antigen Genes), které se za

normálních okolností nalézají pouze ve tkáních varlat, u melanomu však dochází k jejich abnormální masivní expresi. Dalším příkladem jsou onkofetální antigeny, které jsou exprimovány pouze v určitém stádiu embryonálního vývoje (AFP, α -fetoprotein aj.). Onkofetální antigeny slouží zejména v diagnostice jako nádorové markery. Maligní elementy jsou také charakterizovány změnou nebo zvýšenou glykosylací řady membránových proteinů a lipidů, které regulují mezibuněčnou adhezi, invazivitu, metastazování či angiogenezi. Tyto nádorové glykoproteiny a glykolipidy (muciny, gangliosidy aj.) mohou být rozpoznány imunitním systémem např. prostřednictvím MBL. Tkáňově specifické antigeny slouží k určení původu tumoru a mohou být rovněž předmětem imunoterapie např. monoklonálními protilátkami. Vytvářejí se nádorové vakcíny a zkouší se adoptivní imunoterapie geneticky modifikovanými T lymfocyty (Klener a Klener jr., 2010).

1.4.3.2 Navození nádorové imunotolerance

Jak bylo řečeno výše, většina nádorů je jen slabě imunogenní, takže nemůže dojít k dostatečné stimulaci imunitních mechanismů a k jejich zničení. Na svém povrchu nádorové buňky exprimují MHC I. molekuly jen slabě, což brání v jejich rozpoznání CTL, umožňuje to rozpoznání NK-buňkami, které rozpoznávají cíle bez MHC I. dobře, ale jejich působení je nedostačující. Nádorové buňky navíc produkují řadu cytokinů, kterými se snaží zabránit imunitnímu ataku. Mezi hlavní patří TGF- β a IL-10. TGF- β je schopný inhibovat cytotoxickou aktivitu NK-buněk a makrofágů, spolu s VEGF podporuje angiogenezi a tím i metastazování a stimuluje tvorbu Treg lymfocytů z Th lymfocytů. K jejich tvorbě dochází v nádorové tkáni, vlivem produkce TGF- β . Přeměněné Treg ho vylučují rovněž, čímž dochází k autokrinní stimulaci a vzniku dalších a dalších Treg, a protože suprimují atak CTL brání tak imunitnímu ataku nádoru (Nishikawa et al., 2010). Existují dva fenotypy Th lymfocytů: Th1 a Th2. Th1 produkují cytokiny (INF γ , TNF a IL-2) namířené proti intracelulárním patogenům. Tvoří se při zánětlivé odpovědi a uplatňují se v ataku vůči nádorové tkáni. INF γ ovlivňuje prezentaci MHC I. molekul a expresi nádor-specifických antigenů na povrchu nádorových buněk a ty se tak stávají viditelnější pro cytotoxické T lymfocyty (Krejsek a Kopecký, 2004). Th2 produkují cytokiny (IL-4, 5, 10, 13) namířené proti extracelulárním patogenům. Tento typ však také převládá v nádoru a jeho okolí, takže dochází k tlumení zánětlivé odpovědi a blokace zásahu imunitního systému (vznik Treg lymfocytů) (Zitvogel et al., 2008). Obě formy se navzájem inhibují. IL-10, který je

produkován u myši Th1, ale u lidí Th1 i Th2, snižuje tvorbu cytokinů důležitých pro aktivaci imunitního systému INF γ , IL-12 aj. (Mestas a Hughes, 2004).

1.4.4 Charakterizace látek použitých v této práci k protinádorovému ataku

Agonisté fagocytárních receptorů

Manan

Manan je polymerem složeným z D-manóz pospojovaných vazbou (1,4). Dle spojení rozlišujeme, alfa a beta manan. Vyskytuje se na površích gram-negativních bakterií a hub kde slouží jako PAMPs pro vazbu PRRs, která je zprostředkována sekretovaným MBL a manózovým receptorem na povrchu makrofágů. MBL se váže také na D-manózy přítomné na povrchu bakterií. Jelikož vazba MBL vyžaduje, aby molekuly manózy byly přítomny ve větším množství, aby došlo k co největšímu počtu interakcí s manózovými molekulami (Yeeprae et al., 2006) a důležitým faktorem pro rozpoznání je rovněž velikost ligandu (Opanasopit et al., 2001), domnívám se na tomto základě, že manan se z tohoto hlediska jeví jako mnohem lepší kandidát pro terapii. Jeho polymerní struktura (obsahuje 30-60 D-manózových podjednotek) zajišťuje adekvátní vazbu MBL a vysokou afinitu pro makrofágy (Jack a Turner, 2003).

Rozpoznání cukerné struktury mananu na povrchu mikroorganismu spouští lektinovou dráhu komplementu. Komplementový systém je za fyziologických podmínek udržován v neaktivní formě. Aktivován je třemi hlavními cestami: klasickou, alternativní a lektinovou. Klasická cesta je nejčastěji aktivována imunokomplexem (komplex antigenu a protilátky), alternativní především kontaktem s bakteriálními a arteficiálními povrchy. Poslední objevená, avšak fylogeneticky nejstarší, je cesta lektinová. Klíčovým spouštěčem lektinové dráhy je vazba MBL na cukerné struktury nacházející se na řadě patogenních mikrobů a hub. Po vazbě dochází k řadě reakcí vedoucí k opsonizaci, fagocytóze a lýze cílové buňky (Endo et al., 2006).

Molekuly s terminální manózou

Molekuly s terminálně vázanou D-manózou jsou rozpoznávány manózovým receptorem (MR) makrofágů (Yeeprae et al., 2006) a rovněž manózu vázajícím lektinem (MBL) (Fujita et al., 2004). Terminálně vázané cukry se běžně vyskytují v mikrobiálních glykoproteinech a glykolipidech, ale na savčích buňkách se normálně nevyskytují (Opanasopit et al., 2001). Protože manóza je poměrně malá molekula a velikost ligandu hraje v rozpoznávání MBL významnou roli (Opanasopit et al., 2001) je nutné, aby na membráně mikroba bylo prezentováno co nejvíce cukerných zbytků, aby bylo dosaženo adekvátní afinity pro MR makrofágů (Yeeprae et al., 2006) a sekretovaného MBL.

Beta Glukan

Glukany patří mezi přírodní polysacharidy, jedná se o polymery glukózy. Jednotlivé typy se od sebe odlišují různou mírou aktivity. Nejaktivnější z glukanů je beta-1,3-D-glukan nacházející se v buněčných stěnách některých hub a kvasinek (Větvička et al., 2007).

První zprávy o biologických účincích polysacharidů jsou více než 60 let staré. Beta glukany specificky aktivují receptor CR3 (Complement Receptor 3). Tento receptor se nachází na povrchu neutrofilů, makrofágů a NK-buněk a patří mezi PRRs (Větvička et al., 2007). Fagocytárním receptorem pro beta glukan je Dectin-1 přítomný na všech zmíněných buňkách. Signálním receptorem je TLR-2 (Beutler, 2009). Aktivace vede ke stimulaci buněk, spuštění komplementové kaskády, tvorbě protilátek a produkci cytokinů IL-1, 6 a TNF- α .

Vliv glukanů na léčbu nádorových onemocnění prokázaly mnohé studie. Obecně platí, že glukany zvyšují odolnost organismu proti virovým, bakteriálním, plísňovým a parazitárním onemocněním, zvyšují obranyschopnost proti chemickým karcinogenům, stimulují produkci buněk kostní dřeně a prodlužují dobu přežití při vysokých dávkách ozáření. Beta glukan tak jednoznačně představuje jeden z nejúčinnějších imunostimulátorů. Aby beta glukan působil na makrofágy dostatečně aktivačně, musí být přípravek očištěn od lipidů a proteinů. Beta glukan nemá žádné vedlejší účinky ani není toxický.

Agonisté signálních receptorů

LPS

Lipopolysacharid (LPS) tvoří hlavní složku cytoplazmatické membrány gram-negativních bakterií a představuje významný endotoxin, na nějž organismus reaguje silnou imunitní reakcí. Jedná se o velkou molekulu složenou z lipidů a polysacharidů, které jsou navzájem spojeny kovalentní vazbou. LPS váže rozpustný protein LBP (LPS binding protein) a tento komplex se dále váže na CD14 – receptor monocytů a makrofágů. LBP je vyjádřen jak v rozpustných tak membránově vázaných formách. Receptorem pro LPS je TLR-4, který váže LPS i bez přítomnosti CD14. Úloha CD14 spočívá ve vytváření vysoce afinního receptoru. Po navázání na TLR-4 dojde k aktivaci signální dráhy vedoucí k výrazné stimulaci makrofágů a aktivaci B lymfocytů (Dumitru et al., 2000).

Zatímco myši jsou vůči tomuto endotoxinu vysoce odolné, lidé jsou vůči jeho účinkům velice citliví (Copeland, 2005). Uvádí se, že myši dokáží snést až 10 000 krát vyšší dávku LPS než člověk (Warren et al., 2010). Důvodem, proč myši snášejí vysoké koncentrace LPS je, že u myši je funkce proteinu TLR-4 vysoce potlačena (Beutler, 2009).

Flagelin

Flagelin je protein tvaru dutého válce, který je hlavní složkou bakteriálního bičíku, kde tvoří šroubovicová vlákna. Patří mezi PAMPs a jako takový je rozpoznáván nespecifickou imunitou pomocí TLR-5. Rozpoznáván je bakteriální flagelin z gram-pozitivních i gram-negativních bakterií a aktivace receptoru stimuluje produkci TNF- α (Hayashi et al., 2001).

1.4.5 Strategie v nádorové terapii

Při našem výzkumu jsme vycházeli z prací prof. Cui, z nichž vyplývá, že nespecifická imunita je schopná buď úplně zabránit vzniku nádoru a nebo i pokročilý nádor sama zničit a to bez účasti T lymfocytů (Cui et al., 2003; Hicks et al., 2006). Nádorové buňky byly zabíjeny především neutrofily, makrofágy a NK-buňkami přičemž likvidace nádorových buněk byla rychlá, efektivní a nedocházelo k poškozování buněk normálních.

Při pokusech se sarkomem S180 na myších kmene BALB/c si prof. Cui a jeho tým všimli, že u jedné z myší se nádor nerozvinul, byla vůči němu rezistentní. K ověření tohoto pozorování byly myši aplikovány další dvě dávky (2×10^6 buněk S180) a když se nádor nerozvinul ani tentokrát, byla dávka ještě zvýšena (2×10^7 buněk S180). Myš však zůstala zdravá a bez nádoru. Bylo tedy zkoumáno, zda se tato vlastnost přenesla i na potomky této myši, případně i na jiné myši kmeny a výsledek byl pozitivní. Mutace v genu, která byla za rezistenci zodpovědná, byla nazvána SR/CR (spontaneous regression/cancer resistant). Fenotyp této mutace byl dominantní a frekvence SR/CR fenotypu činila 38%. Dále bylo zjištěno, že manifestace tohoto fenotypu závisí na věku myši ve chvíli první aplikace nádorových buněk. Ve stáří 6 týdnů všechny myši vykazovali CR fenotyp, u žádné se nádor nerozvinul, naopak ve stáří 22 týdnů vykazovaly myši fenotyp SR, k rozvinutí nádoru došlo, ovšem následovala jeho spontánní regrese. Vysvětlením může být pokles obranyschopnosti spojený se zvyšujícím se věkem. Mutace SR/CR dává myším odolnost i vůči jiným typům nádorů. Buňky vrozené imunity u SR/CR myši byly schopny nalézt nádorové buňky a zničit je. Buňky normálních myši tuto schopnost nemají. Zkusili jsme proto prostřednictvím vazby PAMPs na povrch nádorových buněk iniciovat odpověď zprostředkovanou buňkami nespecifické imunity nesoucím na svém povrchu PRRs.

1.5 Charakteristika průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní analytická metoda schopná rychlého simultánního měření více parametrů jednotlivých částic v suspenzi a analýzy jejich fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností během průchodu laserovým paprskem. Získané informace jsou tedy jak kvalitativního tak kvantitativního charakteru (Roubalová, 2012). Používání průtokové cytometrie v klinických laboratořích v posledních deseti letech značně vzrostlo a v dnešní době tato metoda poskytuje velice důležité údaje. Nalézá uplatnění ve vědě a výzkumu (imunofenotypizace, DNA/RNA analýza aj.) stejně jako v medicíně a to zejména v klinické imunologii, laboratorní hematologii a klinické onkologii. V poslední době je využívána také pro odhalení a screening genetických chorob (Rahman, 2006; Virgo et al., 2012). My jsme využili schopnosti multiparametrického měření pro analýzu jednotlivých subpopulací leukocytů metodou imunofenotypizace - rozlišení jednotlivých subpopulací v suspenzi buněk a jejich vizualizace pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek (MoAbs).

2 Cíle práce:

- Optimalizovat použití manózy kotvené na nádorové buňky pro dosažení maximálního terapeutického účinku. K tomu studovat:
 - různé způsoby kotvení
 - synergii s agonisty signálních receptorů
 - různé aplikační režimy
 - možnost dalšího zesílení účinku aplikací beta glukanu
 - možnost náhrady LPS flagelinem

- Pomocí průtokové cytometrie z analyzovat zánětlivý infiltrát a změny na buněčné úrovni v průběhu nádorové terapie.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie použité v experimentech

- **RPMI 1640** (Sigma-Aldrich)
- **Fetal calf serum (FCS)** (Sigma-Aldrich)
- **Antibiotic/ Antimycotic Mixture** (PLL)
- **Manóza** (Sigma-Aldrich)
- **Manóza (G)₅-(K)₁₀-STE** (Schafer-N)
- **Manan - *Saccharomyces cerevisiae*** (Sigma-Aldrich)
- **LPS** - lipopolysacharid z *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich)
- **SMCC** - 4-(*N*-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylicacid *N*-hydroxysuccinimide ester (Thermo Scientific)
- **BAM** - Biocompatible Anchor for cell Membrane, Mw 4000 (NOF Corporation)
- **DOPE** - *N*-(Succinimidylxy-glutaryl)-*L*- α -phosphatidylethanolamine, Dioleoyl (NOF Corporation)
- **TCEP** - Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (Sigma-Aldrich)
- **Beta glukán** - Beta-1,3-D glucan (Transfer Point)
- **Flagelin** (Invitrogen)

3.2 Laboratorní zvířata

Jako experimentální zvířata byly použity samice inbredních myši kmene C57BL/6N, SPF (special pathogen free), chov (Charles River Laboratories). V době zahájení terapie byly myši osm týdnů staré a vážily 18-20g. Byly chovány ve sterilních boxech, za standardních podmínek ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. K vodě i potravě (standartní komerční granulovaná směs) měly přístup 24h denně, byly chovány při fotoperiodě 12/12.

3.3 Kultivace a transplantace melanomu B16-F10

Ve všech pokusech byly použity nádorové buňky z buněčné linie melanomu B16-F10 obdržené darem od prof. Říhové z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze. Jejich

kultivace probíhala v RPMI 1640, dále jen RPMI, s 10% fetálního bovinního séra (FCS), antibiotiky, glutaminem a merkaptoetanolem, v termostatu při 37°C, v atmosféře nasycené vodními parami s obsahem 5% oxidu uhličitého.

Poté co buňky melanomu narostly v dostatečném množství, bylo slito kultivační médium a buňky byly třikrát propláchnuty sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS, Phosphate Buffered Saline). Následovalo krátké promytí trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,02% EDTA v PBS) a jejímu přidání v objemu 0,5 ml k buňkám. Po několika minutové inkubaci v termostatu při 37°C došlo k odpoutání adherovaných buněk, načež k nim bylo přidáno 5 ml RPMI s 10% FCS čímž se zainhiboval trypsin. Následovala centrifugace 10min/150G/4°C, promytí buněk v RPMI bez séra, rozsuspendování v 5 ml RPMI, smíchání s trypanonovou modří (1:1) a spočítání buněk v Bürkerově komůrce. Výsledná koncentrace buněk byla upravena na 4 miliony/ ml RPMI.

Transplantace melanomu myším byla prováděna vždy po dosažení osmi týdnů. Před samotnou transplantací byly myši oholeny na zádech v pravo a v případě experimentů, kdy byly měřeny teploty také v levo. Do oholeného místa v pravé části zad bylo aplikováno s. c. (podkožně) 400 000 buněk melanomu v 0,1 ml RPMI bez séra.

3.4 Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů byla měřena kaliperem každý druhý den. Objem nádorové masy byl vypočítán pomocí vzorce: $V = \frac{\pi}{6} \times A \times B^2$ kde A je největší rozměr nádoru (jeho délka) a B nejmenší (výška) (Inaba et al., 1986).

3.5 Redukce nádorového růstu vůči kontrole

Nejprve se vypočtou aktuální redukce nádorového růstu (v %) ve dnech 4,6,8,10,12 a 14 po zahájení terapie dle vzorce:

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

Ze všech šesti hodnot se vypočte průměrná hodnota a vyjádří se opět v procentech, získá se tak hodnota „redukce nádorového růstu vůči kontrole“.

3.6 Měření teploty nádorů

Měření teploty bylo prováděno obden pouze u prvního experimentu. U každé myši byly zaznamenávány teploty dvě. Teplota nádoru na pravé straně zad a teplota levého boku. Hodnota naměřené teploty nádoru byla následně porovnávána s povrchovou teplotou těla myši. K měření byl použit bezdotykový teploměr určený pro hlodavce (IR Rodent Thermometer 153 IRB, Bioseb). Teploměr se přikládal na vzdálenost 2 mm od měřeného místa.

3.7 Počítání plicních metastáz

Plicní metastázy byly vyhodnocovány pouze v prvním experimentu. Odebrané plíce byly vloženy do 4 % formaldehydu, kde byly ponechány, aby zesvětlaly a detekce metastáz byla snadnější. Následné prohlížení plic a počítání metastáz (vypadají jako černé tečky) bylo prováděno pod binolupou metodou podle Větvičky (Větvička et al., 2007).

3.8 Výsledná analýza dat

Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí oboustranného dvouvýběrového Studentova t-testu pro výběry s různým rozptylem v programu Microsoft Excel. V tomto programu byly také vytvořeny grafy. Pro vyhodnocení přežívání myši byl použit program MedCalc a test Kaplan-Meier.

3.9 Příprava roztoků a následná syntéza látek používaných pro terapii

- **Aminace mananu**

Aminovaný manan byl získán redukční aminací mananu metodou dle Torosantucci (Torosantucci et al., 2005). Roztok mananu v prostředí octanu amonného byl redukován kyanoborohydridem sodným po dobu pěti dnů při pH 7,5 a 50 °C. Následovala dialýza ve střeově MWCO 3500 proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání.

- **Příprava manan-BAM a manan-DOPE**

Navázání molekuly BAM (DOPE) na aminoskupinu mananu bylo provedeno při pH 7,3 metodou podle Kato (Kato et al., 2004). Během jedné hodiny při pokojové teplotě došlo k reakci skupiny NHS, vázané na BAM (DOPE) s aminoskupinou aminovaného mananu. Získané roztoky látek v PBS byly uchovávány při - 20°C až do doby použití.

- **Příprava manan-SMCC**

Podle firemních návodů (Thermo Scientific, Pierce Protein Biology Products) podobným způsobem jako v předchozí metodě zreagovala v prostředí PBS NHS skupina SMCC s aminoskupinou aminovaného mananu. Pro navázání ligandů s SMCC na nádorové buňky bylo nejprve třeba zajistit existenci vazebných –SH skupin. Toho bylo dosaženo obdobně jako u in vitro experimentů (Christiaansen et al., 1984) redukcí cystinů a to pomocí TCEP, jehož roztok v PBS o 50 mM koncentraci (50 µl) byl aplikován intratumorálně (i. t.) 1 h před aplikací roztoku manan-SMCC.

3.10 Schéma jednotlivých terapií

Pro všechny prováděné experimenty bylo společné: použití samic myši kmene C57BL/6N, kterým bylo ve stáří 8 týdnů s.c. aplikováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. Dvanáctý den po transplantaci melanomu byly změřeny objemy nádorů a myši byly randomizovány do skupin. V tento den byla započata terapie, přičemž od jejího počátku byly myši chovány jednotlivě v boxech. Příslušné terapeutické roztoky byly podávány i.t. v objemu 50µl.

3.10.1 Použití molekul s terminálně vázanou manózou, za využití spaceru a kotvení v membráně, pro terapii melanomu B16-F10

V tomto pokusu bylo použito 24 myší, které byly randomizovány po 6 do 4 skupin. Veškeré informace o typu myší, aplikovaných buňkách, způsobu randomizace atd. viz podkapitola 3.10. Terapie byla zahájena v čase 0, kdy byla myším změřena nejprve teplota nádoru a poté povrchová teplota těla. Poté byla změřena velikost nádorů a následně aplikovány roztoky, které jsou uvedeny níže. Teplota byla měřena po celou dobu terapie od jejího počátku nejdříve v intervalech po 6,12 a 24 hodinách a následně pak obden tedy v intervalu 2,4,6,8,

10,12,14. Terapeutické roztoky byly aplikovány obden (celkem 6x) do 10 dne. Dvanáctý a čtrnáctý den byly měřeny pouze teploty a velikosti nádorů. Po skončení terapie byly analyzovaným myším odebrány plíce, na kterých byly spočítány metastázy.

Skupiny:

- I. LPS (0,5 mg/ml PBS) (6 myší)
- II. 3 mM manosa (G)₅-(K)₁₀-STE v PBS (6 myší)
- III. 3 mM manosa (G)₅-(K)₁₀-STE in LPS (0,5 mg/ml) v PBS (6 myší)
- IV. PBS: (6 myší)

3.10.2 Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi manan-BAM s LPS

V tomto pokusu bylo použito 10 myší, které byly randomizovány po 5 do 2 skupin. Pulzní terapie spočívala v i.t. aplikaci terapeutické směsi resp. PBS ve dnech 0,1,2,...8,9,10, ...16,17,18,...24,25,26.

Skupiny:

- I. 0,2 mM manan-BAM in LPS (0,5 mg/ml PBS) (5 myší)
- II. PBS (5 myší)

3.10.3 Terapie melanomu pomocí mananu kovalentně vázaného prostřednictvím SMCC, řešení otázky synergie s LPS

V tomto pokusu bylo použito 24 myší, které byly randomizovány po 6 do 4 skupin. Terapie byla zahájena v čase 0, kdy byl všem skupinám kromě kontrolní nejprve aplikován i. t. roztok R (50 mikrolitrů 50 mM roztoku TCEP v PBS). Po uplynutí 1 hodiny byly podány roztoky terapeutické. Skupiny byly léčeny pulzní terapií v intervalu 0,1,2. Po skončení terapie byly myším dále měřeny pouze nádory a bylo zaznamenáváno přežití.

Skupiny:

- I. LPS (0,5 mg/ml PBS)/ R (6 myší)
- II. 0,2 mM manan-SMCC/ R (6 myší)
- III. 0,2 mM manan-SMCC in LPS (0,5 mg/ml PBS)/ R (6 myší)
- IV. PBS (6 myší)

3.10.4 Využití beta glukanu k podpoření terapie založené na kombinaci manan-BAM/ LPS, pokus o náhradu LPS flagelinem

V tomto pokusu bylo použito 20 myší, které byly randomizovány po 5 do 4 skupin. Terapie byla zahájena v čase (0). Všem skupinám byly i.t. aplikovány terapeutické roztoky v intervalu 0,1,2 hodiny, následující den (1) byl interval 0,1 hodiny a den poté (2) byly roztoky aplikovány pouze v čase 0 hodin. Skupina II. navíc dostávala 1x denně perorálně suspenzi beta glukanu od počátku terapie po dobu 6 dní (3 mg beta-glukanu v 50 mikrolitrech vody).

Skupiny:

- I. 0,2 mM manan-BAM in LPS (0,5 mg/ml PBS) (5 myší)
- II. 0,2 mM manan-BAM in LPS (0,5 mg/ml PBS) / beta glukan (5 myší)
- III. 0,2 mM manan-BAM/ in flagelin (5 μ g/ml PBS) (5 myší)
- IV. PBS (5 myší)

3.10.5 Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu ovlivněném terapií

V tomto pokusu bylo použito 39 myší, které byly randomizovány po 9 do 4 skupin. V čase 0h byly myším i.t. aplikovány terapeutické roztoky, které jsou uvedeny níže a poté v intervalech po 12,24 a 48h byly vždy z každé skupiny odebrány 3 myši, byly jim změřeny a poté vypitvány nádory. Jako negativní kontrola sloužily 3 myši, které byly analyzovány v čase 0h a kterým nebylo aplikováno nic.

Skupiny:

- I. LPS (0,5 mg/ml PBS) (9 myší)
- II. 0,2 mM manan-BAM v PBS (9 myší)
- III. 0,2 mM Manan-BAM in LPS (0,5 mg/ml PBS) (9 myší)
- IV. PBS (9 myší)

3.10.5.1 Metodický postup experimentu

3.10.5.1.1 Odebírání nádorů

Vždy v příslušném časovém intervalu (0h, 12h, 24h, 48h) byl usmrčen daný počet myší, kterým byly odebrány nádory. Nádory byly dále zpracovány podle následujícího metodického postupu.

Použité zásobní/ pracovní roztoky:

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- PBS (pH = 7,3 – 7,4)
- LiberaseDL (c=5 mg/ml)/ (0,33 mg/ml) (Roche Diagnostics)
- DNaseI (c=10 mg/ml)/ (0,2 mg/ml) (Roche Diagnostics)

Zpracování nádoru:

Odebraný nádor byl rozstříhán a vložen do 1 ml sterilního RPMI s Liberase DL (0,33 mg/ml) a DNase I (0,2 mg/ml). Poté byl uložen na led a následně inkubován 1 hod při 37 °C za mírného třepání. Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány 10min/160g/4°C, pelet byl naředěn v PBS a homogenizován přes sterilní sítko (70µm, BD Bioscience). Homogenát byl poté promyt ve velkém objemu PBS centrifugací 10min/160g/4°C. Pelet byl následně naředěn PBS na 0,5 ml. Tento postup byl společný pro všechny odebrané nádory. Vzorky byly poté přeneseny do 96 jamkového mikrotitračního panelu s kulatým dnem (Corning Incorporated) v objemu 10µl/jamka a použity k analýze pomocí průtokového cytometru.

3.10.5.1.2 Analýza pomocí průtokového cytometru

K suspenzi buněk přítomných v nádoru (viz předchozí bod) byly přidány fluorescenčně značené MoAbs specificky reagující s definovanými membránovými receptory jednotlivých leukocytárních subpopulací (viz. Tab. I a II). Postup zpracování vzorků byl následující.

Použité zásobní, pracovní roztoky a chemikálie:

- PBS
- fluorescenčně značené MoAbs proti specifickým receptorům leukocytárních subpopulací (eBioscience)
- fluorescenčně značené kalibrační kuličky (CountBright Absolute Counting Beads, $0,52 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$, Invitrogen)

Metodika:

Ke vzorkům bylo přidáno 10 μl v PBS předředěných MoAbs (10 μl / jamka) a bylo provedeno srovnání s negativní kontrolou a to pro každý vzorek nádoru, aby byla vyloučena možnost nespecifického navázání MoAbs na povrch buněk. Vzorky byly inkubovány po dobu 20 min při 4°C a poté promyty v PBS (150 μl) centrifugací 2min/160g/4°C. K peletu bylo doplněno 140 μl PBS a 10 μl kalibračních kuliček a to ke všem vzorkům. Mikrotitrační panel byl vložen do automatického podavače vzorků (HTS) a jednotlivé subpopulace leukocytů byly měřeny průtokovým cytometrem (BD FACSCantoII flow cytometer, BD Biosciences, USA) pomocí dvou laserů, modrého a červeného, jejichž záření vyvolávalo excitaci fluorochromu na značených MoAbs navázaných na specifické molekuly na povrchu buněk. Kontrola fluorescenčně značených MoAbs byla provedena při každé analýze na vzorku splenocytů získaných ze sleziny experimentální myši ze skupiny IV, již bylo aplikováno PBS.

Excitační a emisní vlnové délky použitých fluorescenčně značených MoAbs a nastavení průtokového cytometru je uvedeno v tabulkách (Tab. III a IV). Naměřená data byla analyzována v softwaru BD FACSDiva verze 6.1.3. Analýza vzorků byla nastavena tak, aby bylo zaznamenáváno vždy 20 000 událostí. Absolutní množství buněk bylo určeno pomocí fluorescenčně značených kalibračních kuliček. Absolutní počty buněk v původním vzorku byly poté přepočítány na 1mm^3 nádorové tkáně a s těmito hodnotami bylo dále pracováno při tvorbě grafů.

Tab. I: MoAbs použité při značení č. I leukocytárních subpopulací.

značení č. I	ředění
specifická fluorescenčně značená MoAb	
leukocyty	
anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	200x
T-lymfocyty	
anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	100x
CD4+ T-lymfocyty	
anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5; 0,2 mg/ml	100x
CD8+ T-lymfocyty	
anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7; 0,2 mg/ml	100x
NK buňky	
anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136; 0,2 mg/ml	100x

Tab. II: MoAbs použité při značení č. II leukocytárních subpopulací.

značení č. II	ředění
specifická fluorescenčně značená MoAb	
leukocyty	
anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	200x
T-lymfocyty	
anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	100x
granulocyty	
anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0,2 mg/ml	100x
B-lymfocyty	
anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3; 0,2 mg/ml	100x
monocyty/makrofágy	
anti-Mouse F4/80 PE-Cy7; clone BM8; 0,2 mg/ml	100x

Tab. III: Vlnové délky excitace a emise fluorescenčně značených MoAbs.

fluorescenční značení	excitace (nm)	emise (nm)	laser
PerCP-Cy5.5	488	690	modrý
FITC	488	518	modrý
PE	488	575	modrý
PE-Cy7	488	760	modrý
APC	633	660	červený
Alexa Fluor 700	633	723	červený

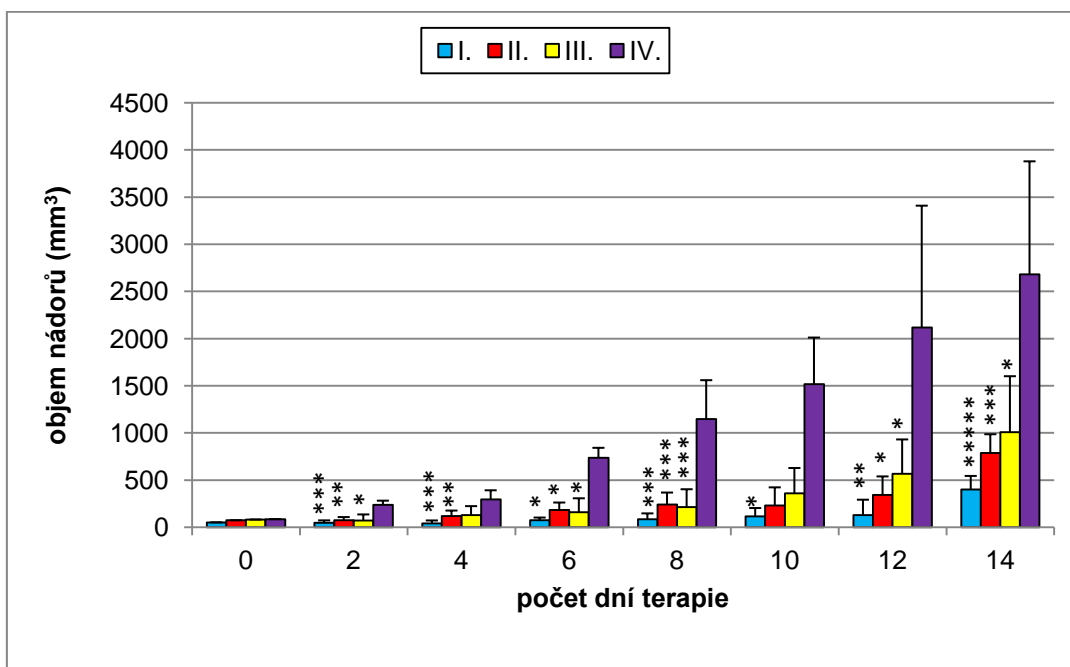
Tab. IV: Nastavení průtokového cytometru použité pro měření vzorků.

nastavení laserů		nastavení HTS	
Window Extension	2,0	Sample Flow Rate	1,0
FSC Area Scaling	0,8	Sample Volume (μl)	50,0
Laser Delay Blue	0,0	Mixing Volume (μl)	100,0
Laser Delay Red	30,0	Mixing Speed	100,0
Area Scaling Blue	0,8	Number of Mixes	3,0
Area Scaling Red	1,3	Wash Volume (μl)	400,0

4 Výsledky

4.1 Použití molekul s terminálně vázanou manózou, za využití spaceru a kotvení v membráně, pro terapii melanomu B16-F10

V tomto experimentu byl sledován vliv LPS, roztoku manóza (G)₅-(K)₁₀-STE v PBS a jejich současného působení na inhibici růstu melanomu. Vliv léčby na redukci nádorového růstu udává Obr. 6. Samotné LPS působilo velmi výrazné snížení nádorového růstu, které bylo statisticky významné po celou dobu terapie. Molekula manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE využívá 5 molekul glycinu jako spacer, 10 lysinů pro nábojovou interakci se záporně nabitými nádorovými buňkami a kyselinu stearovou pro ukotvení se v membráně nádorové buňky. Efekt byl opět velmi výrazný, avšak redukující účinek byl nižší než u LPS. Bylo dosaženo statisticky významných hodnot v celé délce terapie vyjma 10. dne. Kombinace obou látek už takové výsledky nepřinesla, nedošlo ani k aditivitě ani synergii a od 10. dne terapie začal slábnout vliv na inhibici nádorového růstu. Nicméně i tady bylo dosaženo statistických významností v redukci růstu nádorů oproti kontrole.

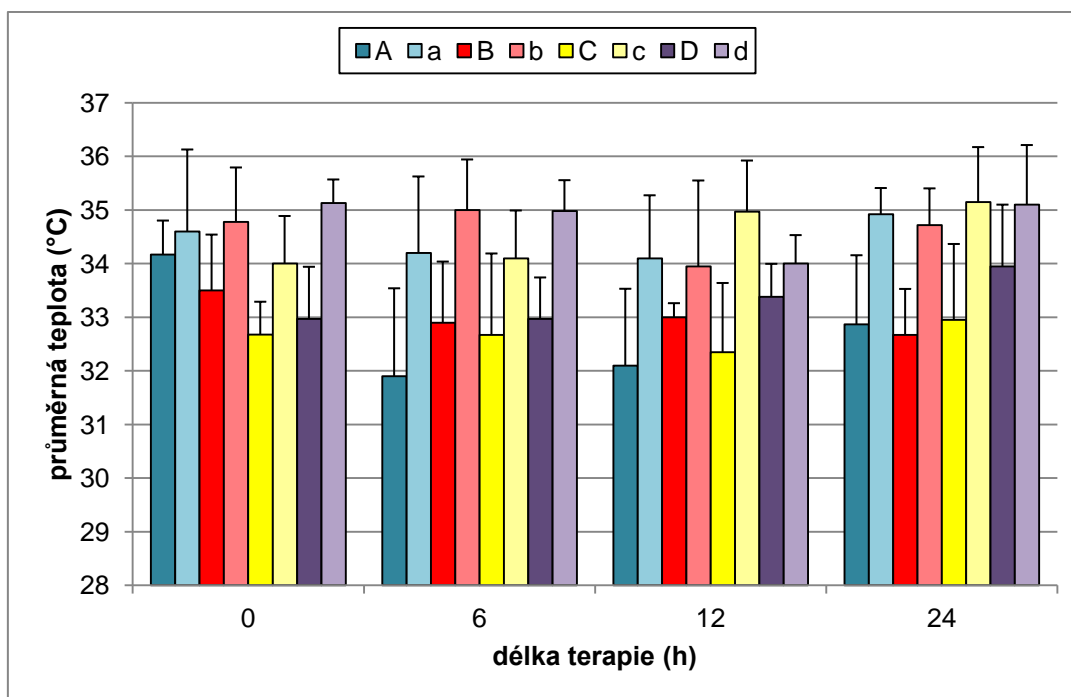


Obr. 6: Vliv léčby na redukci nádorového růstu. I - LPS, II - manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, III - LPS v kombinaci s manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, IV – kontrola (PBS).

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (IV), ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (IV)

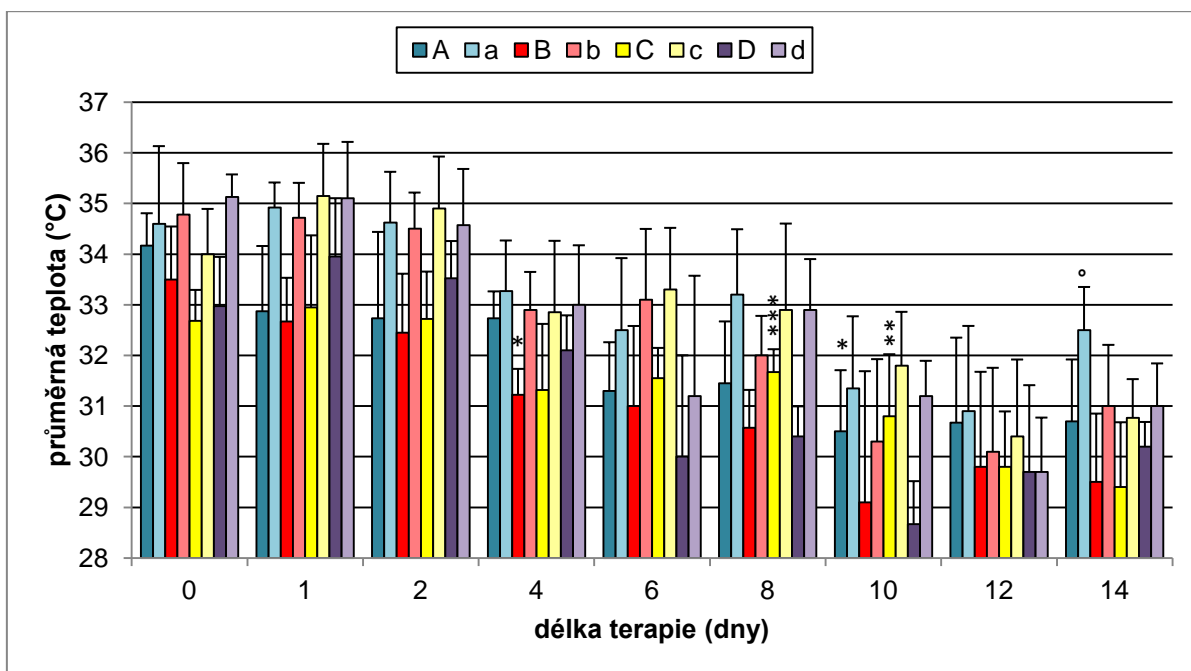
*** $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (IV), ***** $P \leq 0,0005$ vztaženo ke kontrole (IV)

Grafy na Obr. 7 a 8 ukazují vývoj teplot u myši v průběhu terapie. Tmavší barvou (velkým písmenem) je označena teplota nádoru zatímco světlejší barva (malé písmeno) udává povrchovou (kontrolní) teplotu těla myši. Skupina (A,a) odpovídá skupině I., (B,b) skupině II., (C,c) skupině III., (D,d) skupině IV.



Obr. 7: Vliv léčby na průměrnou teplotu myši v prvních 24 hodinách. Skupina (A, a) - LPS, (B, b) - manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, (C, c) - LPS v kombinaci s manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, (D, d) – kontrola (PBS).

Teplota nádorů byla vždy nižší, než jakou měla kontrolní místa. Ze srovnání teplot nádoru a těla myši vůči měření u kontrolních myši vyplývá, že existují tyto statisticky významné rozdíly: ve 4. dni terapie u skupiny B, 8. den u skupiny C, 10. den u skupin A, C a 14. den u skupiny a. Celkový trend teplot byl klesající. Je zřejmé, že teploty neodrážejí žádným způsobem ani způsob, ani průběh terapie.

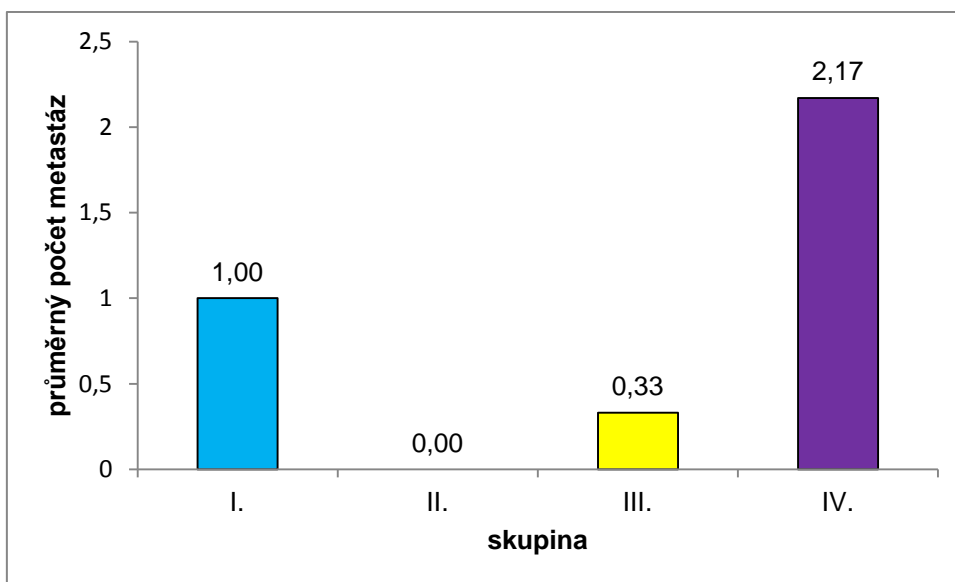


Obr. 8: Vliv léčby na průměrnou teplotu myši v průběhu celé terapie. Skupina (A, a) - LPS, (B, b) - manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, (C, c) - LPS v kombinaci s manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, (D, d) – kontrola (PBS).

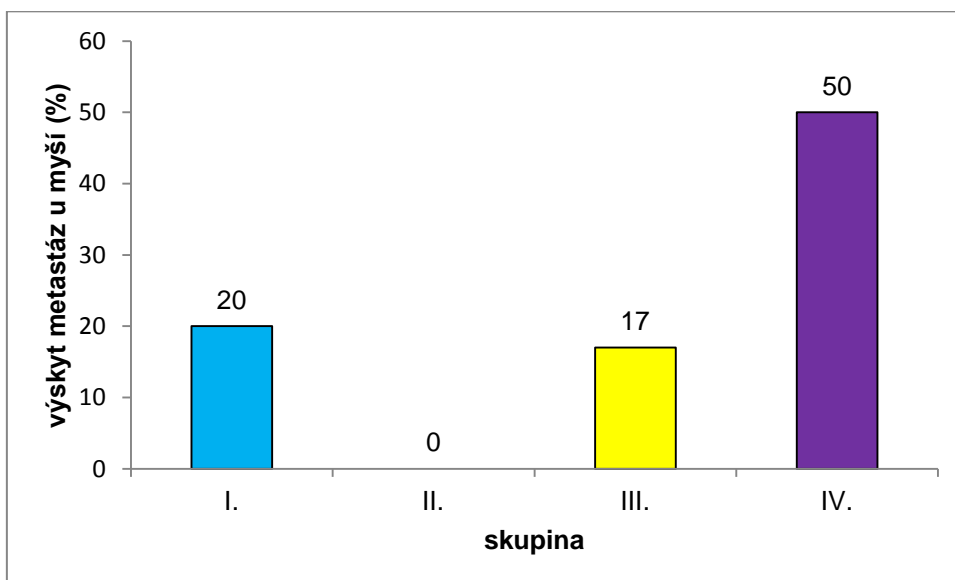
* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (D), ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (D)

*** $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (D), ° $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (d)

Následující dva grafy demonstrují schopnost roztoku manóza (G)₅-(K)₁₀-STE v PBS úplně potlačit metastazování maligního melanomu. Graf na Obr. 9 zobrazuje průměrný výskyt plicních metastáz u jednotlivých skupin myši. Graf na Obr. 10 zobrazuje, u kolika procent myši v jednotlivých skupinách se objevily plicní metastázy.



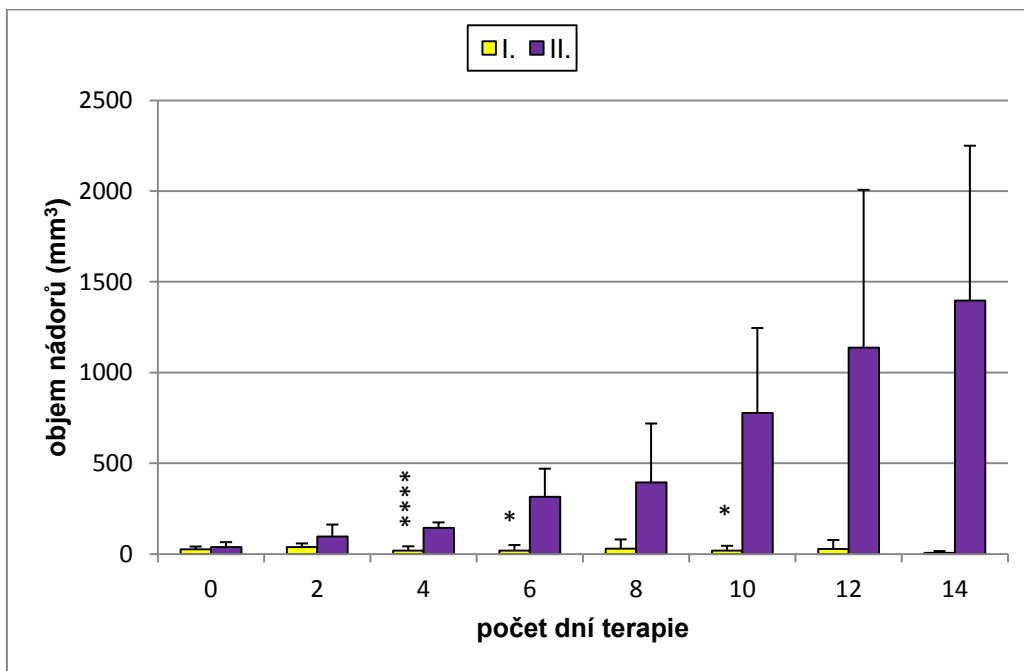
Obr. 9: Průměrný počet plicních metastáz zjištěný u myši. I - LPS, II - manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, III - LPS v kombinaci s manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, IV – kontrola (PBS).



Obr. 10: Procentuální zastoupení myši s plicními metastázami. I - LPS, II - manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, III - LPS v kombinaci s manóza-(G)₅-(K)₁₀-STE, IV – kontrola (PBS).

4.2 Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi manan-BAM s LPS

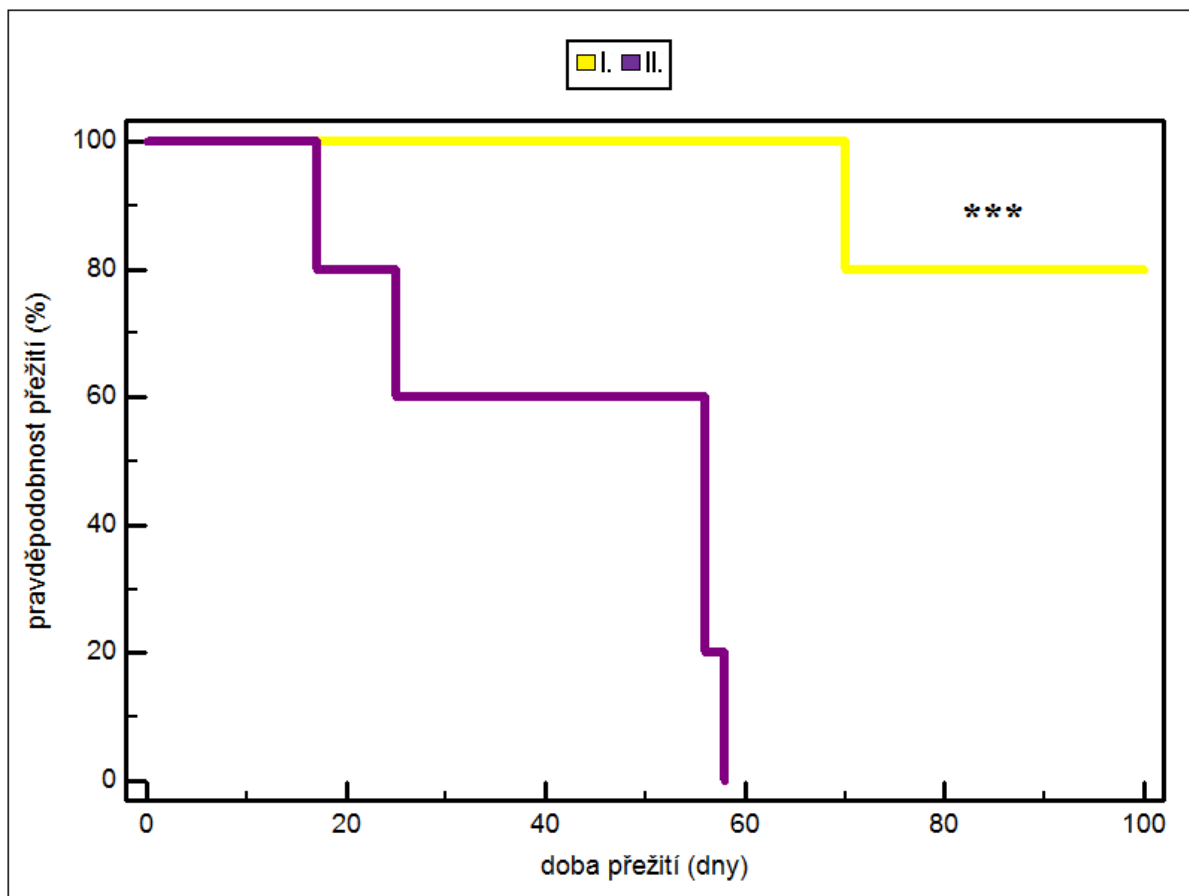
Jak vyplývá z Obr. 11, pulzní terapie směsí mananu a LPS vyvolala velmi výraznou redukci nádorového růstu. V léčené skupině bylo dosaženo statisticky významného prodloužení života (viz. Obr. 12).



Obr. 11: Vliv léčby na redukci nádorového růstu. I - manan-BAM in LPS, II – kontrola (PBS).

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (II), **** $P \leq 0,001$ vztaženo ke kontrole (II)

Z hlediska přežití bylo dosaženo statisticky významného prodloužení a 4 myši z 5 navíc přežily hranici 100 dní. Přežití bylo zaznamenáváno od aplikace buněk melanomu.

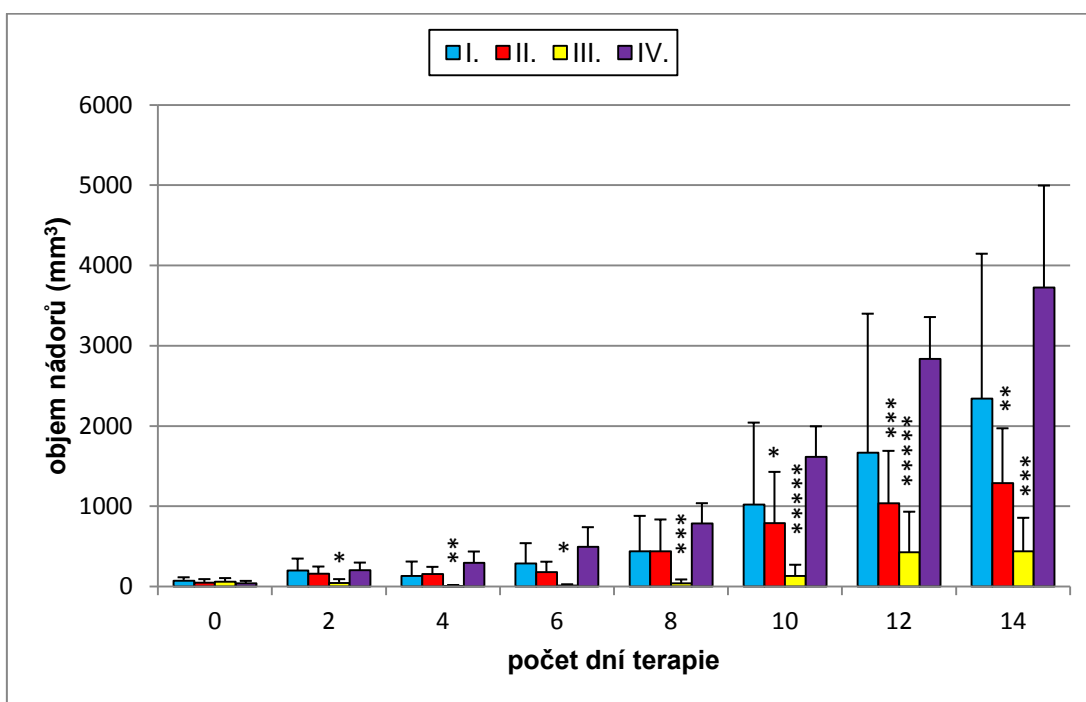


Obr. 12: Vliv léčby na prodloužení přežití. I - manan-BAM in LPS, II – kontrola (PBS).

*** $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (II)

4.3 Terapie melanomu pomocí mananu kovalentně vázaného prostřednictvím SMCC, řešení otázky synergie s LPS

Jak vyplývá z Obr. 13, samotné LPS aplikované do melanomů předredukovaných roztokem R vyvolalo nevýraznou redukci nádorového růstu. Manan-SMCC rovněž aplikovaný do nádorových buněk předredukovaných roztokem R působil až do 8. dne terapie srovnatelně s LPS/ R, poté však začal nádorový růst redukovat do té míry, že až do konce terapie byl jeho účinek statisticky významný. Velmi výrazně se projevila synergie při kombinaci obou látek, která způsobila statisticky významnou inhibici nádorového růstu v průběhu celé terapie.

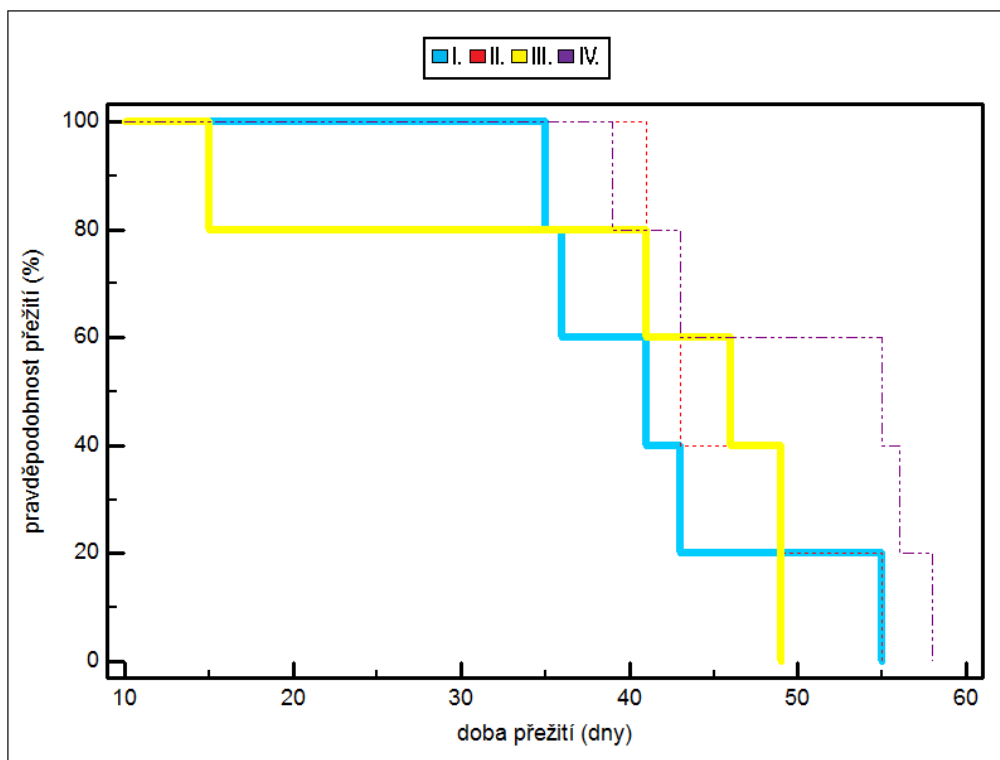


Obr. 13: Vliv léčby na redukci nádorového růstu. I - LPS/ R, II - manan-SMCC/ R, III - manan-SMCC in LPS/ R, IV – kontrola (PBS).

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (IV), ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (IV)

*** $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (IV), ***** $P \leq 0,0005$ vztaženo ke kontrole (IV)

Z hlediska prodloužení přežití se terapie ukázala jako neúčinná (Obr. 14).



Obr. 14: Vliv léčby na prodloužení přežití. I - LPS/ R, II - manan-SMCC/ R, III - manan-SMCC in LPS/ R, IV – kontrola (PBS).

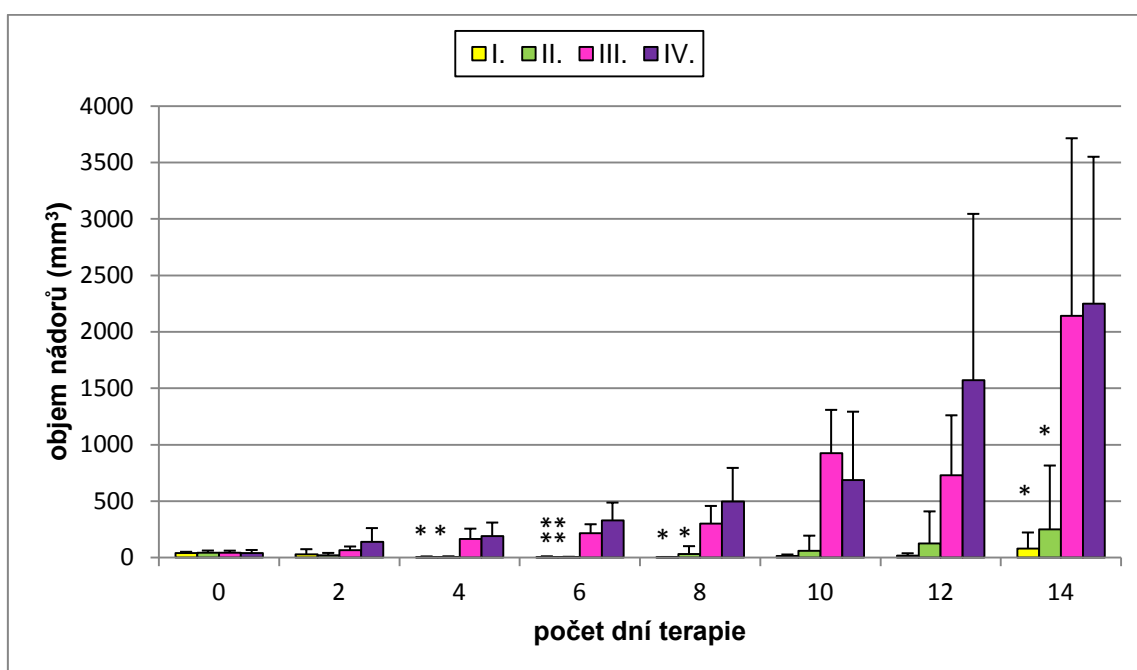
Tento experiment jsme opakovali s tím, že byly měněny režimy aplikace terapeutické směsi. Výsledek je uveden v tabulce Tab. V. Její první řádek obsahuje pro srovnání data z výše uvedeného experimentu.

Tab. V: Terapie melanomů pomocí mananu kovalentně vázaného na nádorové buňky.

Způsob terapie	Redukce nádorového růstu vůči kontrole	Statistická významnost prodloužení přežití vůči kontrole	Počet myši, u kterých došlo k přechodnému vymizení melanomu	Přežití 100 dní od aplikace buněk
0,2 mM manan-SMCC in LPS (0,5 mg/ml) (předredukování), aplikace v den 0,1,2	92,6 %	ne	3 (60 %)	0 (0 %)
0,2 mM manan-SMCC in LPS (0,5 mg/ml) (předredukování), aplikace v den 0,1,2,8,9,10	98,3 %	ne	5 (100 %)	0 (0 %)
0,2 mM manan-SMCC in LPS (0,5 mg/ml) (předredukování), aplikace v den 0,1,2,8,9,10,16,17,18,24,25,26	97,6 %	blízké, P=0,051	5 (100 %)	1 (20 %)
0,2 mM manan-SMCC + LPS (0,5 mg/ml) (předredukování), aplikace v den 0,2,4,6,8,10	98,3 %	ne	4 (80 %)	0 (0 %)

4.4 Využití beta glukanu k podpoření terapie založené na kombinaci manan-BAM/ LPS, pokus o náhradu LPS flagelinem

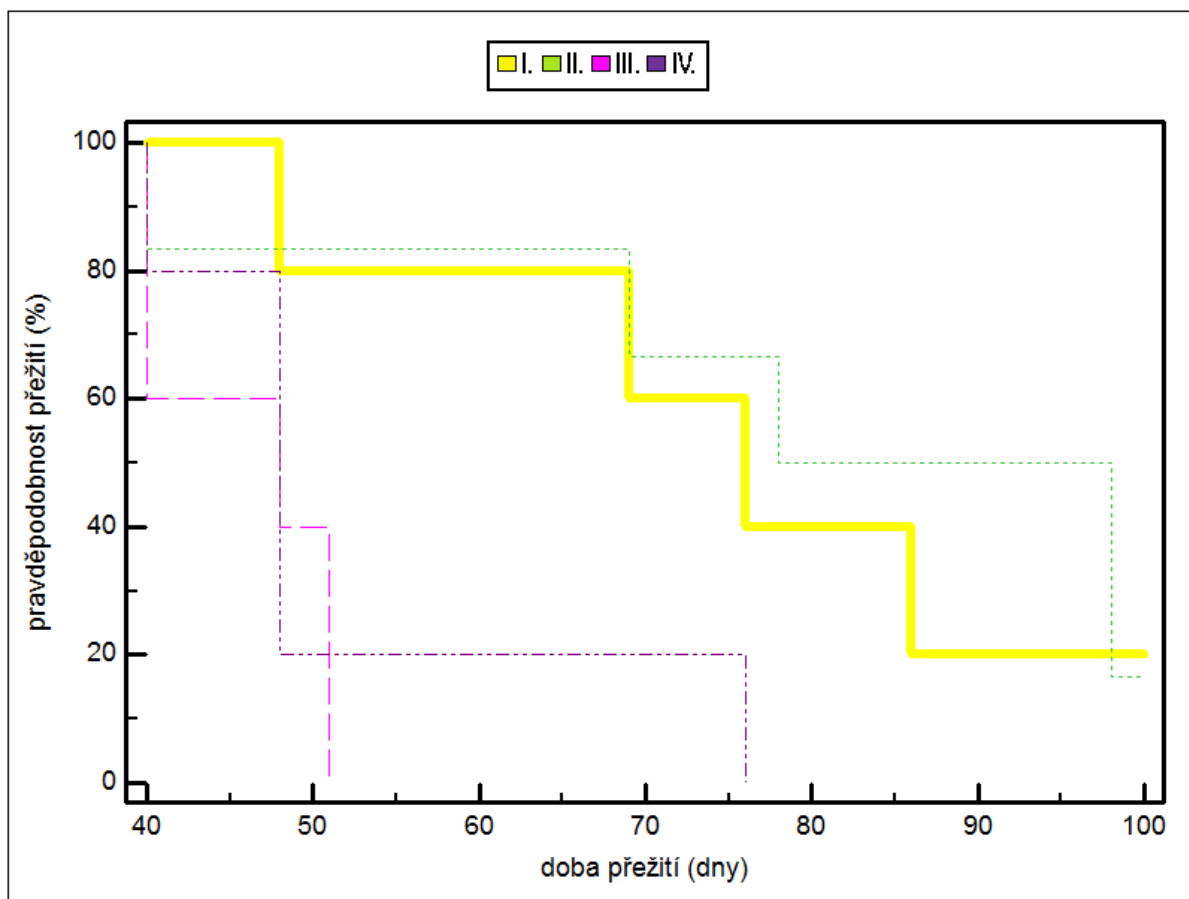
Jak vyplývá z Obr. 15, beta glukanem se nepodařilo zvýšit účinnost terapie, která byla i bez jeho použití velmi vysoká. Rovněž se ukázalo, že flagelin není možno použít jako náhradu za LPS, alespoň ne v tomto uspořádání experimentu.



Obr. 15: Vliv léčby na redukci nádorového růstu. I - manan-BAM in LPS, II - manan-BAM in LPS/ beta glukan, III - manan-BAM/ flagelin, IV – kontrola (PBS).

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (IV), ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (IV)

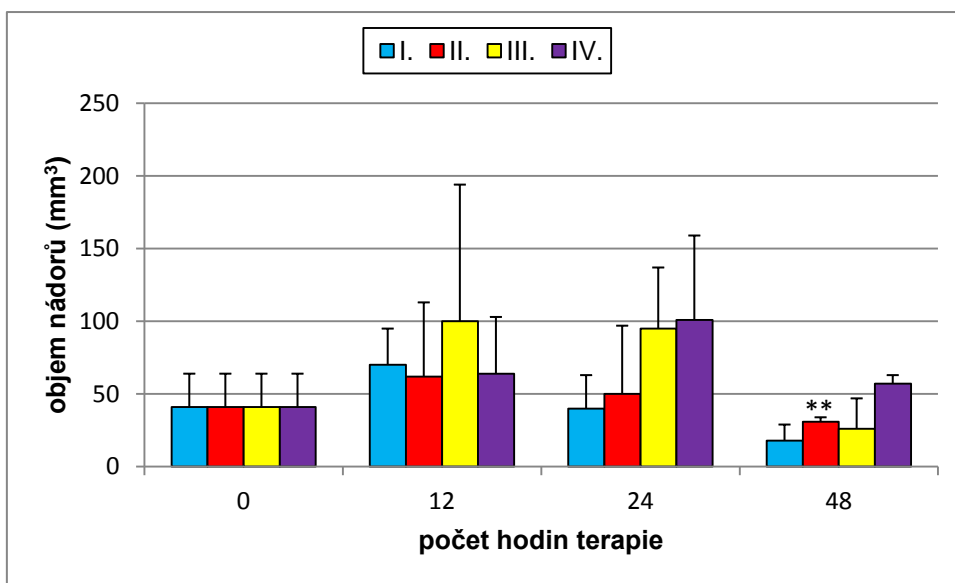
Manan-BAM in LPS a manan-BAM in LPS/ beta glukan působily srovnatelně i z hlediska dlouhodobého prodloužení přežití (viz Obr. 16). Z každé ze skupin vždy jedna myš přežila hranici 100 dní. Terapie manan-BAM/ flagelin se i na úrovni vlivu na přežití ukázala jako neúčinná.



Obr. 16: Vliv léčby na prodloužení přežití. I - manan-BAM in LPS, II - manan-BAM in LPS/ beta glukan, III - manan-BAM/ flagelin, IV – kontrola (PBS).

4.5 Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu ovlivněném terapií

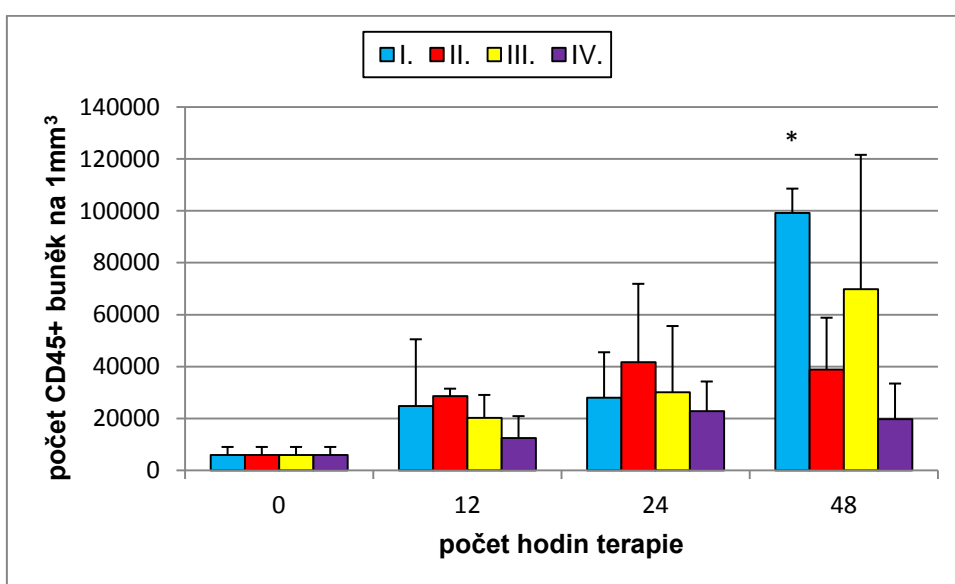
V tomto experimentu byl sledován objem nádorů a míra infiltrace melanomu leukocyty. Vliv léčby na redukcí nádorového růstu udává Obr. 17. Obr. 18-25 znázorňují množství infiltrovaných buněk. Zkoumány byly granulocyty, monocyty/ makrofágy, NK-buňky, T lymfocyty – Tc a Th a B lymfocyty.



Obr. 17: Vliv léčby na redukcí nádorového růstu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (IV)

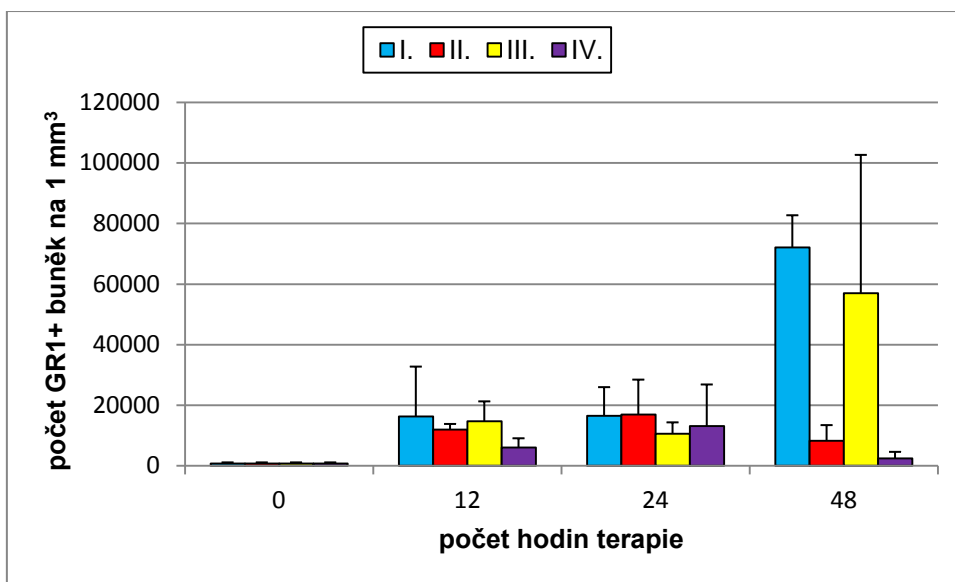
Obr. 18 ukazuje množství leukocytů (CD45+ buněk) přítomných v nádorové tkáni. Z obrázku je jasně vidět, že leukocyty migrovaly do nádorů kontrolní skupiny pouze v prvních 24h díky zánětlivé odpovědi, kterou vyvolalo i.t. podání PBS (traumatizace vpichem). Po jejím odeznění, množství leukocytů začalo klesat. Naopak u léčených skupin, zejména těch, které obsahovaly LPS, podání terapeutických roztoků vedlo k infiltraci leukocytárních buněk, které je nejvíce patrné ve 48h, kdy skupina, již bylo podáváno LPS, dosáhla statistické významnosti rozdílu oproti kontrole. Mezi skupinou, kde bylo podáváno LPS a LPS s manan-BAM nebyly zaznamenány zásadnější rozdíly.



Obr. 18: Vliv léčby na infiltraci CD45+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

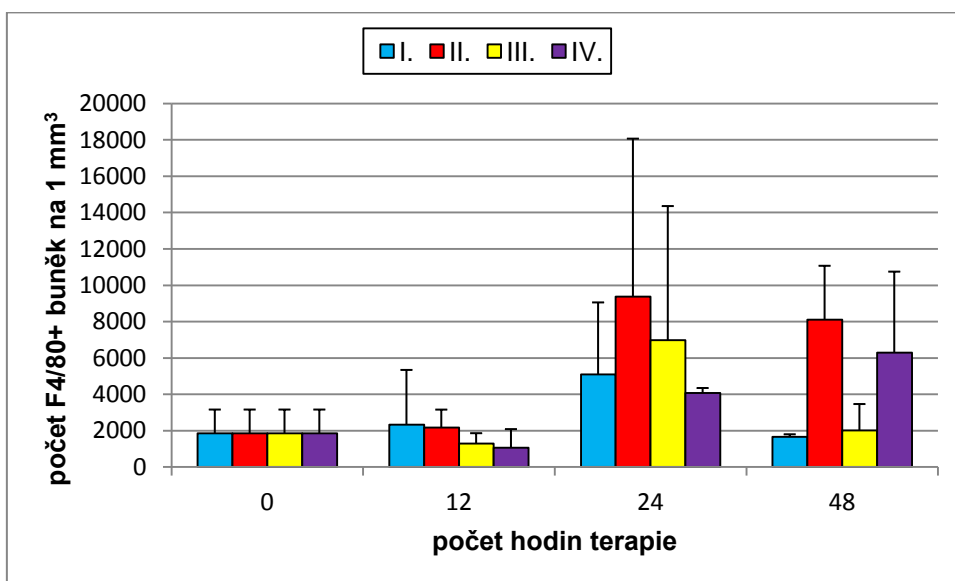
* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (IV)

Na Obr. 19 je znázorněno množství granulocytů (GR1+ buněk nesoucím na svém povrchu receptor GR1 a leukocytární CD45) přítomných v nádorové tkáni. V prvních 24h byla migrace buněk jako odpověď na terapie u všech skupin téměř stejná. Výrazný rozdíl je ale patrný po uplynutí 48h. LPS a jeho kombinace s manan-BAM působily jako výrazný stimul pro migraci granulocytů do nádorů. U samotného manan-BAM došlo po přechodné infiltraci k poklesu. Co se týče kontrolní skupiny, došlo rovněž k přechodné infiltraci. Rozdíly mezi oběma skupinami s LPS nebyly výrazné. Ze srovnání Obr. 18 a 19 vyplývá, že mohutná leukocytární infiltrace vyvolaná především přítomností LPS byla z velké míry dána granulocytární infiltrací.



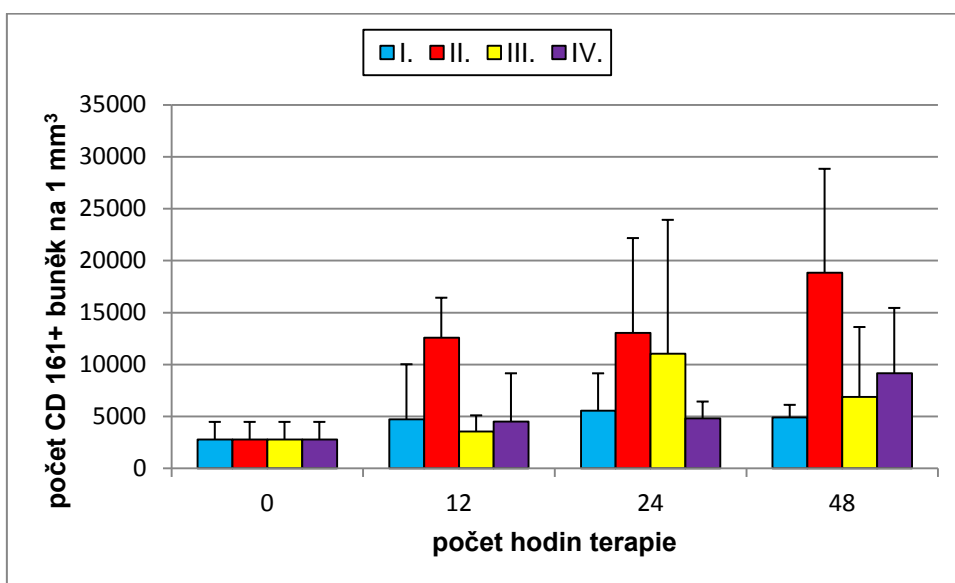
Obr. 19: Vliv léčby na infiltraci GR1+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

Z Obr. 20 vyplývá, že monocyty/makrofágy (F4/80+ buňky nesoucí na svém povrchu receptor F4/80 a leukocytární CD45) začaly do nádorů výrazně migrovat po uplynutí 24h. Jejich infiltrace nebyla tak početně výrazná, jako tomu bylo u granulocytů (5-9000 oproti 10 – 19000). Po 48h je ale vidět pokles, který je nejvíce patrný u LPS a jeho kombinace s manan-BAM. Naopak u kontrolní skupiny měla jejich přítomnost stoupající trend. Tento infiltrát měl u obou skupin s LPS srovnatelnou dynamiku.



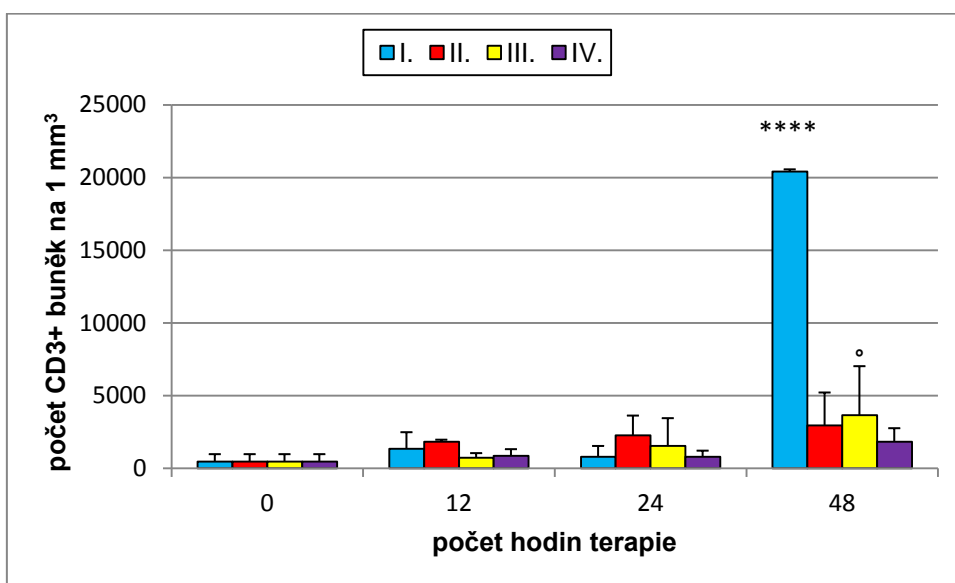
Obr. 20: Vliv léčby na infiltraci F4/80+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

Na Obr. 21 je znázorněna infiltrace nádoru NK-buňkami (CD161+ buňky nesoucí na svém povrchu receptor CD161 a leukocytární CD45). Nejvýrazněji NK-buňky do nádorů migrovaly při terapii manan-BAM. U jeho kombinace s LPS došlo k přechodnému zvýšení ve 24h. Při podání samotného LPS k žádné výrazné infiltraci nádoru nedošlo. U kontrolní skupiny měla jejich přítomnost stoupající trend, který byl vyšší než u makrofágů. Celkový nárůst infiltrace NK-buňkami během 48 hodin svědčí o jejich roli v protinádorovém působení.



Obr. 21: Vliv léčby na infiltraci CD161+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

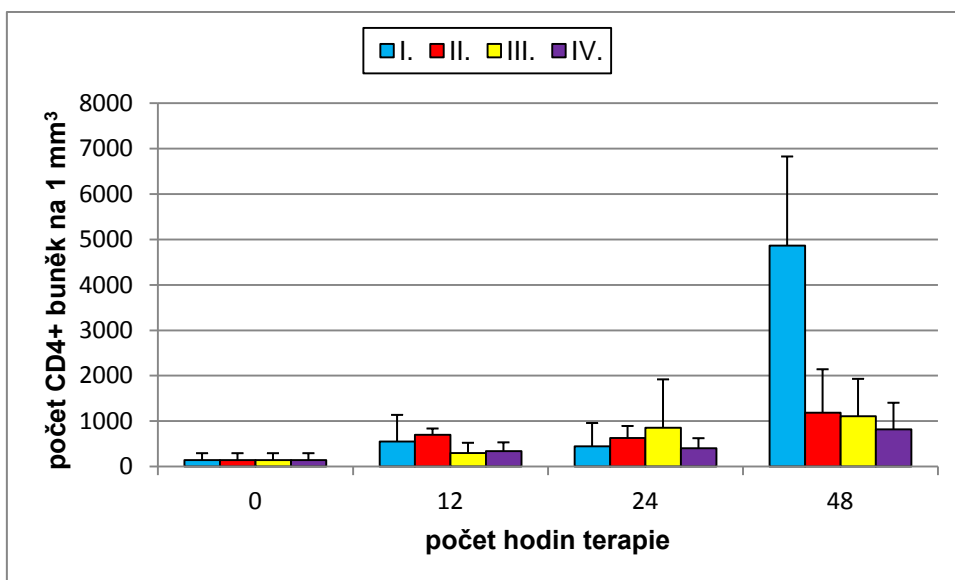
Obr. 22 ukazuje infiltraci nádorů lymfocyty (CD3+ buňky nesoucí na svém povrchu receptor CD3 a leukocytární CD45). Jejich přítomnost v nádorové tkáni ve srovnání s buňkami nespecifické imunity je zvláště v prvních 24h výrazně nižší. Svědčí to o nutnosti nejprve se z aktivovat, tedy rozpoznat antigeny prezentované antigen prezentujícími buňkami. Ve 48h jejich množství stoupá a naprosto zásadní vzestup je patrný u LPS, kde se jejich počet během 24h zdvacetinásobil a dosáhl statistické významnosti. Té bylo také dosaženo při srovnání LPS a mannan-BAM/ LPS. U kontrolní skupiny je patrný mírný vzestup až ve 48h.



Obr. 22: Vliv léčby na infiltraci CD3+ buněk do melanomu. I - LPS, II - mannan-BAM, III - mannan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

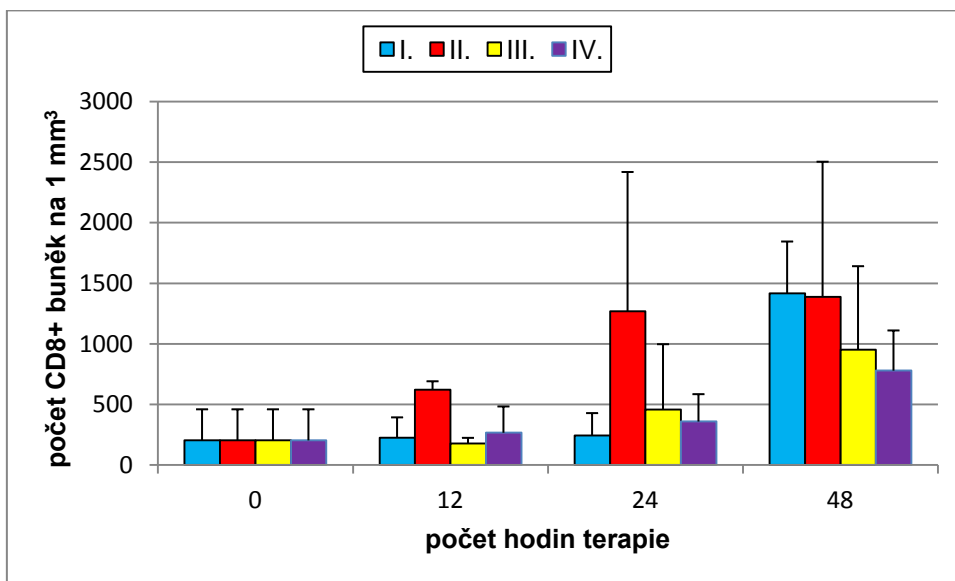
**** $P \leq 0,001$ vztaženo ke kontrole (IV), ° $P \leq 0,05$ vztaženo k LPS (I)

Na Obr. 23 je znázorněna infiltrace nádorů Th lymfocyty (CD4+ buňkami nesoucími na svém povrchu receptor CD4, lymfocytární CD3 a leukocytární CD45). Jejich migrace do nádorové tkáně začíná výrazněji stoupat až po 48h, přičemž zdaleka nejvýraznější je u LPS, kde došlo během 24h k desetinásobnému zvýšení.



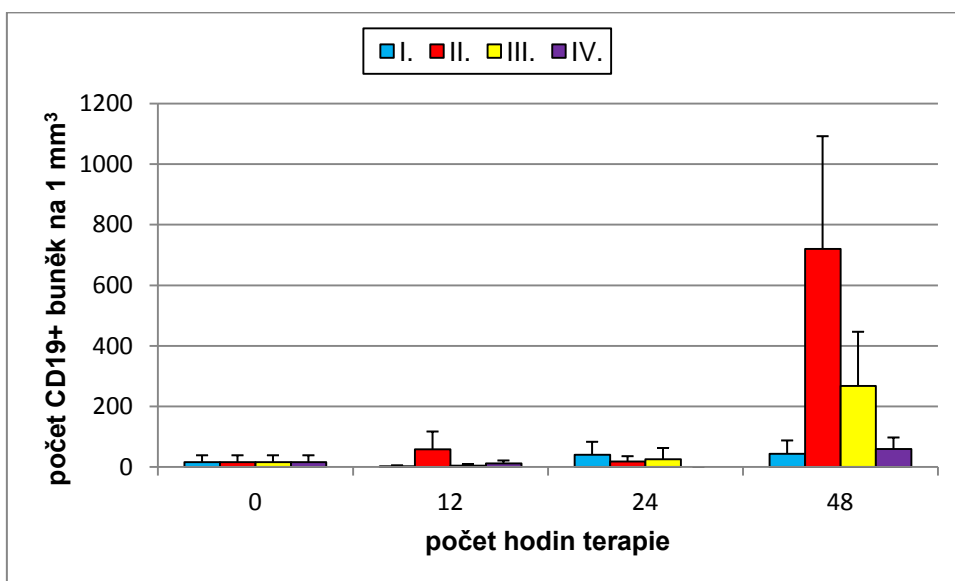
Obr. 23: Vliv léčby na infiltraci CD4+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

Na Obr. 24 je znázorněna infiltrace nádorů Tc lymfocyty (CD8+ buňkami nesoucími na svém povrchu receptor CD8, lymfocytární CD3 a leukocytární CD45). Nejdříve začíná jejich množství stoupat v nádorech léčených manan-BAM. Vzestup ve 12 i 24h převyšuje množství přítomné při ostatních terapiích. Ke konci terapie jsou hodnoty vyrovnanější. Jejich množství stoupá i v kontrolní skupině, což může vypovídat o cíleném útoku na nádorové buňky. Je však třeba mít na zřeteli, že se jedná o velmi malé počty buněk.



Obr. 24: Vliv léčby na infiltraci CD8+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

Obr. 25 ukazuje množství B lymfocytů (CD19+ buněk nesoucích na svém povrchu receptor CD19, lymfocytární CD3 a leukocytární CD45). Jejich množství výrazně stoupá ve 48h u nádorů léčených manan-BAM. U kombinace s LPS je efekt méně výrazný, u ostatních skupin téměř žádný. Svědčí to o tom, že B lymfocyty nehrají v nádorovém ataku v podstatě žádnou roli. I při nejvyšší infiltraci ve 48h u manan-BAM jejich množství dosáhlo pouze 700 buněk na 1mm³ nádorové tkáně.



Obr. 25: Vliv léčby na infiltraci CD19+ buněk do melanomu. I - LPS, II - manan-BAM, III - manan-BAM in LPS, IV – kontrola (PBS).

5 Diskuse

Zabývali jsme se otázkou významu kotvení manózy na povrch nádorových buněk pro aktivaci protinádorového ataku fagocytů, významem společného podávání agonistů signálních receptorů a možnostmi optimalizace protinádorového ataku. Práce je součástí širšího výzkumu, proto v návaznosti na jiné práce řešila určité specifické otázky, určitý výzkum uzavírala, jiný otevírala.

V předpokusech jsme zjistili, že volná manóza nevyvolává žádný protinádorový účín. Navázali jsme na pokusy Kumžákové (2012), která se zabývala otázkou použitelnosti kotvené manózy v protinádorové terapii. Zajímala nás rovněž otázka možnosti kombinace manózy ukotvené v membráně nádorových buněk s LPS. V pracích Auerové (2012) a Čunátové (2012) byla popsána silná synergie působení LPS, tedy ligandu signálního receptoru, s aktivací fagocytárních receptorů (pomocí laminarinu a f-MLF motivů). Manóza ukotvená pomocí lipofilního řetězce kyseliny stearové sice vyvolala silnou redukci nádorového růstu, k synergii s LPS však nedošlo. Vysvětlujeme si to inhibicí manózového receptoru, který se nachází na povrchu makrofágů a dendritických buněk, působením LPS (Shepherd et al., 1990; Xu et al., 2010). Manózový receptor zřejmě v tomto experimentu hrál klíčovou roli, a proto se jeho inhibice LPS projevila v úhrnné bilanci negativně.

V tomto experimentu jsme rovněž vyhodnocovali změny teploty. Zjistili jsme, že některak terapii neodrážejí a vzhledem k tomu, že tento závěr nebyl osamocený (Bruzlová, 2012; Kumžáková, 2012; Waldmannová, 2012) od tohoto měření jsme nadále upustili.

V následujícím experimentu jsme navázali na to, co zjistila Bruzlová (2012). Našla způsob, jak dosáhnout synergie mezi manózovými motivy a LPS. K tomu je však třeba, aby terminální manóza byla součástí oligomeru, mananu. Ten je pak víc než ligandem manózových receptorů ligandem manan binding lektinu (MBL). To vede k aktivaci komplementu lektinovou cestou a tento proces již není LPS inhibován, naopak leukocyty stimulované LPS se mohou díky opsonizaci na úrovni C3b plně zapojit do protinádorového ataku. Experimenty Bruzlové sice demonstrovaly mohutnou synergii kotveného mananu a solubilního LPS (odpovídá představám Underhilla a Gartnera (2004) o spolupůsobení signální a fagocytární signalizace), nebylo však dosaženo statisticky významného prodloužení přežití a žádná myš nepřekonala 100 denní hranici přežití. Začali jsme se proto

zabývat studiem možnosti zvýšení účinnosti terapie. Nejprve jsme vyzkoušeli možnost kotvení mananu pomocí dvou alifatických řetězců (manan-DOPE). To se neosvědčilo, k žádnému zlepšení nedošlo (data neukázány). Na základě řady předpokusů jsme dospěli k názoru, že účinnější terapií než je aplikace terapeutické směsi manan-BAM s LPS v den 0, 2,4,6,8,10, je terapie pulzní. Ta se nám též v uvedeném experimentu plně osvědčila. Kromě jedné myši, uhynulé krátce po překonání 100 denní hranice, ostatní tři myši žijí dosud (více než 200 dní).

Další cesta vedla ke kovalentnímu kotvení ligandu pomocí SMCC. K terapii jsme používali manan kovalentně vázaný prostřednictvím SMCC v kombinaci s LPS. Jelikož se osvědčuje pulzní terapie, zkoušeli jsme nejprve jeden terapeutický pulz 0,1,2. Terapie působila velice dobře a u tří myší došlo k přechodnému vymizení nádorů. Redukce nádorového růstu vůči kontrole dosáhla 92,6%, statisticky to však život neprodloužilo a žádná myš nepřežila. Pokusili jsme se tedy o modifikaci terapeutických režimů. Jinými principy aplikace (obden, dva, čtyři pulzy) jsme potvrdili vysokou účinnost a dosáhli ještě vyšších hodnot. Rovněž bylo dosaženo přechodného vymizení melanomů, ale co se týká úplného přežití 100 dní, toho bylo dosaženo pouze v jednom případě. Možným vysvětlením je, že kovalentní vazba sice umožňuje intenzivní působení, ale neumožňuje, aby po rozpadu nádorové buňky došlo k opětovnému navázání interagující molekuly.

Dosavadní výsledky mé i jiných (Auerová, 2012; Bruzlová, 2012; Čunátová, 2012; Kumžáková, 2012; Waldmannová, 2012) ukázaly, že rozhodující je počáteční silný pulz. V posledním experimentu jsme se proto pokusili o intenzivní režim a zároveň o současnou stimulaci beta glukánem, jehož protinádorový účín je znám a podařilo se nám ho rovněž prokázat (Kalferstová, 2008). Také jsme se pokusili o náhradu LPS flagelinem a to z toho důvodu, že u lidí vyvolává toxické účinky (Copeland, 2005). My jsme používali LPS v koncentraci (0,5 mg LPS/ml PBS) a vždy aplikovali i.t. 50 μ l ~ 25 μ g LPS. Takto upravená dávka adekvátně stimulovala TLR-4, avšak nebyla toxická (Glaserová, 2012).

Co se týče aplikace beta glukánu, v účinnosti redukce nádorového růstu a přežití působila směs manan-BAM/ LPS srovnatelně se směsí, ke které byl přidán beta glukán. Ukázalo se, že v tomto uspořádání, kdy samotná směs manan-BAM/ LPS působí velmi účinnou redukcí až potlačení nádorů, není beta glukán vhodné přidávat.

Náhrada LPS flagelinem se nezdařila a je tak třeba hledat další možnosti náhrady tohoto ligandu agonisty signálních receptorů bezpečnými pro člověka.

Analýza buněčné suspenze získané z melanomu pomocí průtokové cytometrie jasně ukázala naprostou převahu buněk nespecifické imunity v nádorové tkáni. Největší zastoupení měly granulocyty (pravděpodobně zejména neutrofilů). Makrofágy a NK-buňky se v melanomu vyskytovaly přibližně stejnou měrou. Th lymfocyty byly přítomny ve velmi malém množství, Tc lymfocytů bylo ještě dvakrát méně a B lymfocyty se nádorové tkáni téměř nevyskytovaly.

Výsledky svědčí o hlavní roli granulocytů a makrofágů v zánětlivé odpovědi. Přítomnost NK-buněk svědčí o jejich cílené infiltraci do nádoru a protinádorovém působení. Velice pomalé zvyšování počtu T lymfocytů svědčí o nutnosti nejprve se z aktivovat, tedy rozpoznat antigeny prezentované antigen prezentujícími buňkami. Migrace Th buněk do nádoru je rychlejší než u Tc buněk přičemž to, že Tc lymfocyty stoupají i v kontrolní skupině může vypovídat o cíleném útoku na nádorové buňky. Téměř úplná absence B lymfocytů svědčí o tom, že v nádorovém ataku nehrají v podstatě žádnou roli.

Zjistili jsme, že na rozdíl od pokusů *in vivo*, při kterých směs manan-BAM s LPS vyvolává na rozdíl od samotného LPS mohutný protinádorový účinek, na základě analýzy buněčného infiltrátu nic podobného pozorovat nelze. To je však logické. LPS vyvolá mohutnou infiltraci, zpočátku jak jsme viděli, zejména granulocytů. Na ni přítomnost ligandu fagocytárních receptorů vliv nemá, samotné působí jen nepatrně. Rozdíl je v tom, že u LPS samotného tento infiltrát nikterak cíleně nepůsobí. V případě přítomného ligandu fagocytárních receptorů je však účinek fagocytů namířen na buňky, na které jsou navázány. V našem případě tedy kotvený manan-BAM vázal MBL. Došlo ke spuštění komplementové kaskády kdy na úrovni C3b, tedy na úrovni opsonizační, se do reakce zapojily početné namigrované fagocytární buňky.

6. Závěr

- Manóza vázaná na peptidický řetězec a kotvená pomocí alifatického řetězce vyvolala sice silnou redukci nádorového růstu, ale její kombinace s LPS se ukázala jako kontraproduktivní. Úloha manózového receptoru a jeho inhibice LPS je diskutována.
- Ze všech látek používaných v nádorové imunoterapii se nejvíce osvědčila směs manan-BAM/ LPS (BAM - kotvení pomocí řetězce olejové kyseliny) při aplikaci ve 4 pulzech. Bylo tak dosaženo výrazné redukce nádorového růstu a nejlepšího výsledku přežití. Celkově se tato terapie ukázala jako vůbec nejlepší.
- Ve srovnání s manan-BAM se manan-DOPE využívající ke kotvení dva řetězce neosvědčil a vykazoval horší výsledky.
- Kovalentní kotvení mananu pomocí SMCC mělo velmi výrazný vliv na redukci nádorového růstu a vedlo k častému přechodnému vymizení nádorů, avšak ne k prodloužení přežití.
- Terapie založená na směsi manan-BAM/ LPS je natolik účinná, že nelze dosáhnout zvýšení jejího účinku pomocí perorální aplikace beta glukanu.
- Pokus o náhradu LPS flagelinem za účelem náhrady tohoto ligandu netoxickým agonistou signálních receptorů se nezdařil.
- Monitoring teplot nádorů a povrchové teploty těla myší ukázal, že teploty neodrážejí žádným způsobem způsob, ani průběh terapie.
- Analýza buněčného infiltrátu ukázala, že v období prvních dvou dnů po aplikaci samotného LPS a jeho směsi s manan-BAM není mezi těmito skupinami žádný podstatný rozdíl. Dochází k mohutné, ale srovnatelné granulocytární infiltraci. Rozdíly v dopadu obou terapeutických přístupů jsou diskutovány.

7 Seznam použité literatury

Aderem A., Ulevitch R.J., 2000: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406(6797): 728-787.

Arora M., Munoz E., Tenner A.J., 2001: Identification of a site on mannan-binding lectin critical for enhancement of phagocytosis. *J Biol Chem*. 276(46): 43087–43094.

Auerová M., 2012: Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Ausprunk D.H., Folkman J., 1977: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*. 14(1): 53-65.

Bandarchi B., Ma L., Navab R., Seth A., Rasty G., 2010: From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*. 2010: 1-8.

Beutler B.A., 2009: TLRs and innate immunity. *Blood*. 113(7): 1399-1407.

Brown G.D., 2006: Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 6(1): 33-43.

Brown G.D., Taylor P.R., Reid D.M., Willment J.A., Williams D.L., Martinez-Pomares L., Wong S.Y., Gordon S., 2002: Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*. 196(3): 407-412.

Bouwman L.H., Roep B.O., Roos A., 2006: Mannose-binding lectin: Clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol*. 67(4-5): 247-256.

Bruzlová P., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Carneiro J.R.M, Fuzii H.T., Kayser C., Alberto F.L., Soares F.A., Sato E.I., Andrade L.E., 2011: IL-2, IL-5, TNF- α and IFN- γ mRNA expression in epidermal keratinocytes of systemic lupus erythematosus skin lesions. *Clinics (Sao Paulo)*. 66(1): 77-82.

Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F., Calvano S.E., Remick D., and the inflammation and the host response to injury investigators, 2005: Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 12(1): 60-67.

- Costin G.E., Hearing V.J., 2007:** Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21(4): 976-994.
- Cui Z., Willingham M.C., Hicks A.M., Alexander-Miller M.A., Howard D., Hawkins G.A., Miller M.S., Weir H.M., Du W., DeLong C.J., 2003:** Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(11): 6682-6687.
- Čunátová Š., 2012:** Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninu na povrch nádorových buněk. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Degn S.E., Jensenius J.C., Thiel S., 2011:** Disease-causing mutations in genes of the complement systém. *Am J Hum Genet.* 88(6): 689–705.
- Dommett R.M., Klein N., Turner M.W., 2006:** Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens.* 68(3): 193–209.
- Dumitru C.D., Ceci J.D., Tsatsanis Ch., Kontoyiannis D., Stamatakis K., Lin J.H., Patriotis CH., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kollias G., Tschlis P.N., 2000:** TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell.* 103(7): 1071–1083.
- Eisen D.P., Dean M.M., Boermeester M.A., Fidler K.J., Gordon A.C., Kronborg G., Kun J.F.J., Lau Y.L., Payeras A., Valdimarsson H., Brett S.J., Ip W.K.E., Mila J., Peters M.J., Saevarsdottir S., Till J.W.O., Hinds Ch.J., McBryde E.S., 2008:** Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin Infect Dis.* 47(4): 510–516.
- Endo Y., Takahashi M., Fujita T., 2006:** Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology.* 211(4): 283-293.
- Foell D., Wittkowski H., Roth J., 2007:** Mechanisms of Disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 3(7): 382-390.
- Fujita T., Matsushita M., Endo Y., 2004:** The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev.* 198: 185-202.
- Häcker G., Redecke V., Häcker H., 2002:** Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology.* 105(3): 245–251.
- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A., 2001:** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 410(6832): 1099-1103.

- Hicks A.M., Riedlinger G., Willingham M.C., Alexander-Miller M.A., Von Kap-Herr C., Pettenati M.J., Sanders A.M., Weir H.M., Du W., Kim J., Simpson A.J.G., Old L.J., Cui Z., 2006:** Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(20): 7753-7758.
- Inohara, Chamailard, McDonald C., Nuñez G., 2005:** NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74: 355-383.
- Jack D.L., Klein N.J., Turner M.W., 2001:** Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev.* 180: 86-99.
- Jack D.L., Turner M.W., 2003:** Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem Soc Trans.* 31(Pt 4): 753-757.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., 2011:** Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 61(2): 69–90.
- Fang D., Nguyen T.K., Leishear K., Finko R., Kulp A.N., Hotz S., Van Belle P.A., Xu X., Elder D.E., Herlyn M., 2005:** A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65(20): 9328-9337.
- Fidler I., 1970:** Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst.* 45(4): 773-782.
- Fidler I., 1973:** Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol.* 242(118): 148-149.
- Garbe C., Eigentler T.K., Keiholz U., Hauschild A., Kirkwood J.M., 2011:** Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist.* 16(1): 5–24.
- Girouard S.D., Murphy G.F., 2011:** Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest.* 91(5): 647-664.
- Glaserová S., 2012:** Studium terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LPS. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Grange J.M., Stanford J.L., Stanford C.A., 2002:** Campbell De Morgan's 'Observations on cancer', and their relevance today. *J R Soc Med.* 95(6): 296–299.
- Hajdu S.I., 2011a:** A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer.* 117(5): 1097–1102.
- Hajdu S.I., 2011b:** A note from history: Landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer.* 117(12): 2811–2820.

Hajdu S.I., 2012: A note from history: Landmarks in history of cancer, part 3. *Cancer*. 118(4): 1155–1168.

Christiaansen J.F., Gallardo D., Burnside S.S., Nelson A.A., Sears D.W., 1984: Rapid covalent coupling of proteins to cell surfaces: Immunological characterization of viable protein-cell conjugates. *J Immunol Methods*. 74(2): 229-239.

Inaba M., Tashiro T., Kobayashi T., Fujimoto S., Sakurai Y., Maruo K., Ohnishi Y., Ueyama Y., Nomura T., 1986: Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn J Cancer Res*. 77(2): 190-196.

Kaiser G.E. Doc Kaiser's Microbiology Website [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: <<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguides/unit4/innate/mannose.html>>.

Kalferstová L., 2008: Proenzymoterapie melanomu B16-F10. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Kato K., Itoh C., Yasukouchi T., Nagamune T., 2004: Rapid protein anchoring into the membranes of Mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glykol) derivatives. *Biotechnol Prog*. 20(3): 897-904.

Kennedy A.D., Willment J.A., Dorward D.W., Williams D.L., Brown G.D., DeLeo F.R., 2007: Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol*. 37(2): 467–478.

Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W., 1994: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266(5193): 2011– 2015.

Klener P., Klener P. jr., 2010: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada publishing. 232 s.

Kocák I., 2012: Cílená léčba metastatického melanomu vemurafenibem. In *Edukační sborník*. XXXVI. Brněnské onkologické dny a XXVI. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno: Masarykův onkologický ústav v Brně. Část VII. Nádory kůže a maligní melanomy. 104 s.

Koch A., Melbye M., Sørensen P., Homøe P., Madsen H.O., Mølbak K., Hansen Ch.H., Andersen L.H., Hahn G.W., Garred P., 2001: Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA*. 285(10): 1316-1321.

Krejsek J., Kopecký O., 2004: Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK. 941 s.

- Kumžáková Z., 2012:** Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí sloučenin s terminální manosou. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Larsen F., Madsen H.O., Sim R.B., Koch C., Garred P., 2004:** Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *J Biol Chem.* 279(20): 21302–21311.
- Martin P., Lerner A., Johnson L., Lerner D.L., Haraguchi S., Good R.A., Day N.K., 2003:** Inherited mannose-binding lectin deficiency as evidenced by genetic and immunologic analyses: association with severe recurrent infections. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 91(4): 386-392.
- Matsushita M., Thiel S., Jensenius J.C., Terai I., Fujita T., 2000:** Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol.* 165(5): 2637-2642.
- Medzhitov R., Janeway C. A. jr., 1997:** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 9(1): 4-9.
- Mestas J., Hughes C.C., 2004:** Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172(5): 2731-2738.
- Moyer Ch.S.** Melanoma rates keep rising, especially among young women [online]. Publikováno 9.4.2012 [cit. 2012-12-11]. Dostupné z: <<http://www.ama-assn.org/amednews/hlsa0409.htm>>.
- Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M., 2002:** Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 70(7): 791-798.
- Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M., 2006:** Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2(3): 213–219.
- Nishikawa H., Sakaguchi S., 2010:** Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 127(4): 759–767.
- Opanasopit P., Shirashi K., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., 2001:** In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280(5): G879-889.
- Porter R., 1998:** The greatest benefit to mankind: A medical history of humanity. New York: W.W. Norton & Company. 831 s.

- Povýšil C., Šteiner I., Horáček J., Kodet R., Kolář Z., Ludvíková M., Lukáš Z., Mrhalová M., Povýšilová V., Tichý M., 2011:** *Obecná patologie*. Praha: Galén. 290 s.
- Proctor R.N., 1995:** *Cancer wars: How politics shapes what we know and what we don't know about cancer*. New York: Basic Books. 368 s.
- Rahman M., 2006:** *Introduction to flow cytometry*. Oxford: AbD Serotec Ltd. 33 s.
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L., 2001:** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414(6859): 105-111.
- Roubalová L., 2012:** Průtoková cytometrie. In *FONS*. Informační Bulletin. Česká společnost klinické biochemie. Pardubice: STAPRO, s.r.o. Laboratorní technologie. 5-9 s.
- Santiago-Walker A., Li L., Haass N.K., Herlyn M., 2009:** Melanocytes: from morphology to application. *Skin Pharmacol Physiol*. 22(2): 114–121.
- Shay J.W., Wright W.E., 2000:** Haylick, his limit, and cellular aging. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1(1): 72–76.
- Shay J.W., Zou Y., Hiyama E., Wright W.E., 2001:** Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet*. 10(7): 677-685.
- Shepherd V.L., Abdolrasulnia R., Garrett M., Cowan H.B., 1990:** Down-regulation of mannose receptor activity in macrophages after treatment with lipopolysaccharide and phorbol esters. *J Immunol*. 145(5): 1530-1536.
- Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C., Ronald P., 1995:** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*. 270(5243): 1804-1806.
- Strober W., Murray P.J., Kitani A., Watanabe T., 2006:** Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 6(1): 9-20.
- Stone M.J., Aronoff B.E., Evans W.P., Fay J.W., Lieberman Z.H., Matthews C.M., Race G.J., Scruggs R.P., Stringer C.A., 2003:** History of the Baylor Charles A. Sammons Cancer Center. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 16(1): 30–58.
- Svod.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. [cit. 2012-11-25]. Dostupné z: <www.svod.cz>.
- Tadokoro T., Yamaguchi Y., Batzer J., Coelho S.G., Zmudzka B.Z., Miller S.A., Wolber R., Beer J.Z., Hearing V.J., 2005:** Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol*. 124(6): 1326 – 1332.

- Thiel S., Frederiksen P.D., Jensenius J.C., 2006:** Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol.* 43(1–2): 86–96.
- Thody A.J., Higgins E.M, Wakamatsu K., Ito S., Burchill S.A., Marks J.M., 1991:** Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 97(2): 340–344.
- Topham M.** PhysioWeb [online]. Publikováno 2.5.2007 [cit. 2012-11-23]. Dostupné z: <<http://www.physioweb.org/IMAGES/melanocyte.jpg>>.
- Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., De Bernardis F., Berti F., Galli C., Norelli F., Bellucci C., Polonelli L., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A., 2005:** A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med.* 202(5): 597-606.
- Underhill D.M., Gantner B., 2004:** Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect.* 6(15): 1368-1373.
- Větvička V., Dvořák B., Větvičková J., Richter J., Křížan J., Šíma P., Yvin J.C., 2007:** Orally administered marine (1→3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *Int J Biol Macromol.* 40(4): 291–298.
- Virgo P.F., Gibbs G.J., 2012:** Flow cytometry in clinical pathology. *Ann Clin Biochem.* 49(Pt 1): 17-28.
- Vorlíček J., Abrahámová J., Vorlíčková H., 2006:** Klinická onkologie pro sestry. Praha: Grada publishing. 328 s.
- Waldmannová E., 2012:** Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Warren T.S., Fitting C., Hoff E., Adib-Conquy M., Beasley-Topliffe L., Tesini B., Liang X., Valentine C., Hellman J., Hayden D., Cavaillon J.M., 2010:** Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *J Infect Dis.* 201(2): 223-232.
- Xu X., Xie Q., Shen Y., Lu G., Yao H., Chen Y., Zhou J., 2010:** Involvement of mannose receptor in the preventive effects of mannose in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Eur J Pharmacol.* 641(2-3): 229-237.
- Yeeprae W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., 2006:** Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages. *J Control Release.* 114(2): 193-201.

Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., André F., Tesniere A., Kroemer G., 2008: The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest.* 118(6): 1991–2001.