

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

# **Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění**

Diplomová práce

**Bc. Veronika Caisová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2013

Caisová V., 2013: Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění. [The use of agonists of formyl peptide receptors for cancer therapy. Mgr. Thesis, in Czech] – 74 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main goal of the thesis was to optimize the use of agonists of the FPR receptors for cancer therapy. The aim was: (1) to find the best anchor of ligands to the cancer cells and the optimal timing of the treatment, (2) to verify the universality of agonists of FPR receptors for different types of cancer, (3) to explain the synergy between ligands of FPR and ligands of TLR by flow cytometry and (4) to verify the applicability of cytotoxic test CD45+/ PI for f-MLF-DOPE ligand.

Prohlášení:

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. 2013

.....  
Bc. Veronika Caisová

**Poděkování:**

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho ochotu a obětavost při vedení této diplomové práce. Velký dík patří i RNDr. Marii Jalovecké za trpělivost a pomoc při metodickém postupu a zpracování výsledků z analýzy infiltrátu a Mgr. Tereze Janotové za cenné rady při provádění cytotoxického testu. Dále děkuji pracovníkům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě si poděkování zaslouží celá má rodina za jejich podporu v průběhu studia.

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Příčiny vzniku nádorových onemocnění.....	2
2.1.2	Základní dělení nádorových onemocnění.....	3
2.1.3	Studované druhy nádorů v této práci .....	3
2.1.4	Základní léčba nádorových onemocnění .....	4
<b>2.2</b>	<b>IMUNITNÍ SYSTÉM A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ</b> .....	<b>5</b>
2.2.1	Imunitní systém.....	5
2.2.2	Nádor a imunita.....	6
2.2.2.1	Nádorově imunitní znaky.....	7
2.2.2.2	Imunitní protinádorová odpověď.....	8
2.2.2.3	Mechanismy úniku nádorových buněk.....	9
<b>2.3</b>	<b>IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ ZALOŽENÁ NA SPECIFICKÉ IMUNITĚ</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ ZALOŽENÁ NA NESPECIFICKÉ IMUNITĚ</b> .....	<b>11</b>
2.4.1	Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) .....	11
2.4.2	Pattern recognition receptors (PRRs) .....	11
2.4.2.1	PRRs cytoplazmatické.....	12
2.4.2.2	PRRs sekretované.....	12
2.4.2.3	PRRs membránové.....	13
2.4.3	Terapeutické využití PAMPs .....	14
<b>2.5</b>	<b>FORMYL PEPTIDOVÉ RECEPTORY (FPR)</b> .....	<b>15</b>
2.5.1	Struktura FPR.....	16
2.5.2	Lidské FPRs a jejich agonisté.....	17
2.5.3	Myší FPRs a jejich agonisté.....	17
2.5.4	FPR signální dráhy.....	18
2.5.5	Výsledek aktivace signálních drah.....	20
2.5.6	Terapeutické využití agonistů FPR receptorů .....	20
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>CHEMIKÁLIE</b> .....	<b>22</b>

<b>4.2</b>	<b>LABORATORNÍ ZVÍŘATA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>PŘÍPRAVA NÁDOROVÝCH BUNĚK PRO TRANSPLANTACI.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>TRANSPLANTACE NÁDOROVÝCH BUNĚK .....</b>	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b>MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6</b>	<b>POČÍTÁNÍ PLICNÍCH METASTÁZ .....</b>	<b>25</b>
<b>4.7</b>	<b>ANALÝZA DAT .....</b>	<b>25</b>
<b>4.8</b>	<b>PŘÍPRAVA TERAPEUTICKÝCH LÁTEK .....</b>	<b>26</b>
<b>4.9</b>	<b>EXPERIMENTY.....</b>	<b>27</b>
4.9.1	Terapie sarkomu pomocí f-MLF-(G)5-(K)10-STE a případná synergie s LPS .....	27
4.9.2	Léčba melanomu pomocí dvou různých režimů aplikace f-MLF KK-SMCC + LPS.....	27
4.9.3	Léčba melanomu pomocí pulzního režimu aplikace f-MLF KK-SMCC v kombinaci s (pro)enzymoterapií .....	28
4.9.4	Léčba melanomu pomocí aplikace f-MLF KK + LPS v intenzivním pulzním režimu za použití dvou různých kotvidel (BAM a DOPE).....	29
4.9.5	Léčba melanomu pomocí aplikace f-MLFG6K-DOPE v kombinaci s LPS, snaha o náhradu MPL za LPS.....	29
4.9.6	Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu ovlivněném aplikací terapeutické látky f- MLFKK- BAM .....	30
4.9.6.1	Odebrání a zpracování nádorů.....	31
4.9.6.2	Analýza na průtokovém cytometru.....	31
4.9.7	Ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy (cytotoxický test CD45+/ PI) na ligandu f-MLF-DOPE.....	33
4.9.7.1	Příprava experimentu.....	33
4.9.7.2	Příprava buněk pro FACS analýzu.....	35
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>TERAPIE SARKOMU POMOCÍ F-MLF-(G)5-(K)10-STE A PŘÍPADNÁ SYNERGIE S LPS .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>LÉČBA MELANOMU POMOCÍ DVOU RŮZNÝCH REŽIMŮ APLIKACE F-MLF KK-SMCC + LPS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>LÉČBA MELANOMU POMOCÍ PULZNÍHO REŽIMU APLIKACE F-MLF KK-SMCC + LPS V KOMBINACI S (PRO)ENZYMOTERAPIÍ.....</b>	<b>42</b>

<b>5.4</b>	<b>LÉČBA MELANOMU POMOCÍ APLIKACE F-MLF KK + LPS V INTENZIVNÍM PULZNÍM REŽIMU ZA POUŽITÍ DVOU RŮZNÝCH KOTVIDEL (BAM A DOPE).....</b>	<b>44</b>
<b>5.5</b>	<b>LÉČBA MELANOMU POMOCÍ APLIKACE F-MLFG6K-DOPE V KOMBINACI S LPS, SNAHA O NÁHRADU MPL ZA LPS.....</b>	<b>46</b>
<b>5.6</b>	<b>VYHODNOCENÍ PŘÍTOMNOSTI JEDNOTLIVÝCH SUBPOPULACÍ LEUKOCYTŮ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V MELANOMU PO APLIKACI TERAPEUTICKÉ LÁTKY F-MLF-BAM .....</b>	<b>49</b>
<b>5.7</b>	<b>OVĚŘENÍ POUŽITELNOSTI METODY CYTOTOXICKÉ ANALÝZY (CYTOTOXICKÝ TEST CD45+/ PI) NA LIGANDU F-MLF-DOPE .....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>63</b>

# 1 ÚVOD

S prodlužováním průměrné délky života a s nárůstem množství negativních vlivů na lidské zdraví se nádorová onemocnění stala významným problémem. Současná nepoužívanější léčba v podobě chemoterapie či radioterapie je nedostačující. Hlavním problémem je nespecifičnost terapie, kde jsou poškozovány nejen buňky nádorové, ale zároveň i ty zdravé. Nelze opomenout ani supresi imunitního systému vznikající jako následek léčby. Jedním z možných řešení je imunoterapie nádorových onemocnění, kterou se zabývá tato diplomová práce. Imunoterapie využívá k boji s nádory imunitní buňky, které jsou tělu vlastní. Další výhodou této léčby je její zacílení, které brání poškození zdravých buněk.

Obsahem práce je použití agonistů formyl peptidových receptorů (ligandů aktivujících FPR) k terapii nádorových onemocnění, a optimalizace této metody. Je zde využívána nejstarší část imunitního systému a to imunita vrozená (nespecifická), chrání tělo před infekčními agens, která je schopna v některých případech nádorové buňky vyhledat a zničit (Cui a kol. 2003). Tento efekt je podporován instalací bakteriálních motivů na povrch nádorových buněk, čímž dochází k jejich zviditelnění pro buňky imunitní. Využití tohoto mechanismu může být stěžejní ať už v přímé terapii nádorových onemocnění nebo jako kombinace s dalším typem léčby (např. zmenšení nádorové masy před chirurgickým vyjmutím).

Má diplomová práce se snaží odpovědět na řadu dílčích otázek: Je zde diskutováno univerzální použití f-MLF (formyl-methionin-leucin-fenylalanin) ligandů u různých typů nádorů, nejefektivnější kotvení f-MLF motivů na povrch nádorových buněk, aplikační režim terapeutických látek, vysvětlení synergistického vztahu ligandů formyl peptidových receptorů a ligandů toll like receptorů na buněčné úrovni pomocí průtokové cytometrie a v závěru ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy na ligandu f-MLF-DOPE.

Výsledky umožní správné nasměrování vývoje tohoto typu léčby a zároveň nastolí nová kritéria pro plánované pokusy.

## 2 PŘEHLED LITERATURY

### 2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou velkou heterogenní skupinou onemocnění, při kterých dochází k nekontrolovatelnému dělení buněk určitého typu tělní tkáně. Incidence většiny druhů těchto onemocnění každým rokem narůstá (Siegel a kol. 2013). Největší problém představují zhoubná nádorová bujení, při kterých se do těla rozšiřují nádorové buňky a zakládají ložiska metastáz (Fidler 1990). Výzkum léčebných preparátů za poslední desetiletí značně pokročil, zatím se však pro řadu typů nádorových onemocnění nepodařilo najít účinný a zároveň šetrný způsob léčby.

#### 2.1.1 Příčiny vzniku nádorových onemocnění

Za příčinu vzniku nádorových onemocnění je považováno nahromadění mutací v DNA buňky (Hemminki 1993). Tyto mutace mohou poškozovat geny důležité pro její správnou funkci (Strong 1949, Hemminki 1993). Mezi tyto geny patří např. **tumorsupresorové geny**, které mají za úkol kódovat proteiny omezující buňku v její proliferaci a proteiny ovlivňující apoptózu (Park a Vogelstein 2003). **Protoonkogeny**, které kódují proteiny (např. cyklin dependentní kinázy, cykliny, růstové faktory) podporující proliferaci buňky ve zdravé míře, v momentě jejich mutace se přemění na onkogeny, které způsobí chorobné množení buňky (Torry a Cooper 1991). Nebo například **reparační geny**, jejichž proteiny slouží k opravám poškozených částí DNA molekuly v buňce (Wood a kol. 2001).

Častou příčinou změn v DNA jsou faktory schopné vyvolat mutace. Tyto faktory se nazývají mutageny. Mutageny dělíme podle jejich vlastností do několika skupin. (1) **Fyzikální** (např. UV záření, ionizační záření), (Brash a kol. 1991, Meinert a kol. 1999). (2) **Chemické** (např. aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky), (Hemminki 1993). (3) **Biologické** (např. virové infekce - lidský papiloma virus, virus Epstein-Barrové), (Carrillo-Infante a kol. 2007). (4) **Hormony** (některé typy nádorů jsou podmíněny působením hormonů, např. nádorová onemocnění prsu či prostaty), (Henderson a kol. 1982, Thomas 1984). Všechny mutageny nejsou prozatím zcela známy, proto je velmi složité určit přesnou příčinu vzniku nádorových onemocnění.



## 2.1.2 Základní dělení nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění můžeme dělit podle několika hledisek. (1) Jako první je základní rozdělení podle invazivity a produkce metastáz. Nádory, které metastázy neprodukují a zůstávají ohraničené jen v podobě primární masy nazýváme **benigní**. Benigní nádory neprorůstají do okolní tkáně, ale utlačují ji. I tento typ nádorů, ač je považován za mírnější, může ohrozit jedince na životě. Horší variantou jsou nádory **maligní**, jejichž buňky se rozšiřují po těle prostřednictvím krevních a lymfatických cest a způsobují vznik metastáz. Metastázy jsou jen velmi těžko léčitelné, protože je nelze jasně lokalizovat a mohou tak uniknout pozornosti lékařů a způsobit recidivu po prodělané léčbě (Chambers a kol. 2002).

(2) Další způsob dělení je dle orgánové lokalizace, tj. místa, kde se nádory v těle u pacienta nacházejí, např. nádory prsu, varlat, plic, žaludku, tlustého střeva, kůže apod.

(3) Důležité je i dělení dle původu, kde rozeznáváme nádory pojivových tkání, nádory epitelální výstelky, nádory krevní a lymfatické tkáně, nádory nervové tkáně a smíšené nádory pocházející z více tkání (Sell 2004).

## 2.1.3 Studované druhy nádorů v této práci

- **Melanom**

Melanom je zhoubný typ nádoru, který se vyskytuje převážně na kůži, vzácně byl pozorován ve střevech a v oku. Příčinou jeho vzniku je nekontrolovatelné množení melanocytů, tzn. kožních pigmentových buněk (Clarc a kol. 1969). Hlavní funkcí melanocytů je tvorba tmavého pigmentu melaninu, který chrání pokožku před UV zářením (Tadokoro a kol. 2005).

V laboratorních pokusech v této práci byly použity myší melanomové buňky B16-F10. Tato melanomová buněčná linie je běžně používaná v laboratořích díky svým vlastnostem, mezi které patří rychlý růst a metastazování do plicní tkáně (Fidler 1975).

- **Sarkom**

Sarkom je nádorové onemocnění pojivové tkáně, které má oproti melanomu méně agresivní průběh a většina typů sarkomů roste v pomalejším tempu. Do této skupiny nádorů patří např. hemangiosarkom vznikající z krevních cév, leiomyosarkom vznikající z hladké svaloviny, liposarkom z tukové tkáně, osteosarkom z kostní tkáně apod. (Lahat a kol. 2008).

V laboratorních pokusech v této práci byly použity myší sarkomové buňky S-180. Sarkom S-180 je buněčná linie rostoucí v řadě druhů inbregních myší (Alfaro a kol. 1992).

#### **2.1.4 Základní léčba nádorových onemocnění**

Za poslední desetiletí byl udělán značný pokrok v léčbě nádorových onemocnění. Řada nádorů je dnes dobře léčitelná a u ostatních dokážou moderní prostředky alespoň zajistit kvalitní prožití zbytku života.

Existuje mnoho typů terapií, ale ty nejzákladnější jsou tyto tři: chirurgická léčba, chemoterapie a radioterapie.

- **Chirurgická léčba**

V počátcích terapie nádorových onemocnění byla chirurgická léčba v podstatě jediným používaným typem. V současnosti se obvykle kombinuje s radioterapií a chemoterapií. K výhodám patří možnost odstranění celého primárního nádoru. Nevýhodou je fakt, že se nádory velmi často nacházejí na místě pro chirurga nedostupném nebo jsou tak velké, že je nelze odstranit (Glass a kol. 1985, Flehinger a kol. 1992).

- **Chemoterapie**

Při chemoterapii se do těla pacienta vpravují cytostatika, tzn. látky bránící dělení buněk. Na cytostatika jsou citlivé zejména rychle se dělící buňky. Výhodou chemoterapie je možnost eliminace metastáz v těle, což není pomocí chirurgické léčby vždy možné. Významnou nevýhodou je však toxicita pro všechny tělní buňky. Tato terapie není většinou cílená, a proto poškozuje jak nádorové tak i buňky kostní dřeně, vlasové buňky a další (Martins a de Oliveira 2009). Současný výzkum se snaží zdokonalit cytostatika a přímo je nasměrovat na nádorové buňky. Existují již tzv. cytostatika nové generace, jako je např. IMATINIB, která toto částečně umožňují (Druker a kol. 2006).

- **Radioterapie**

Při radioterapii je na nádorovou masu namířen proud elektronů či fotonů, který má za úkol destrukci nádorových buněk. I tento typ terapie se často kombinuje s chemoterapií a chirurgickou léčbou. Radioterapie je schopna zmenšit nádor před jeho chirurgickým vyjmutím a také zabránit nádorové recidivě (Sebag-Montefiore a kol. 2009).

Nevýhodou je poškození zdravé okolní tkáně a popálení kůže. Mezi pozdní komplikace ozařování můžeme zařadit i vznik sekundárních zhoubných nádorů, právě z příčiny prodělání radioterapie (Bostrom a Soloway 2007).

## **2.2 Imunitní systém a nádorová onemocnění**

Lidské tělo je vybaveno velmi účinným a komplexním systémem obrany před infekčními, virovými a dalšími agens. Jistý mechanismus funguje i proti nádorovému bujení, ale velmi často se stává, že se nádorové buňky díky svým adaptivním mechanismům vymaní imunitě z podkontroly a onemocnění propukne (např: Sasada a kol. 2003, Bicknell a kol. 1994).

### **2.2.1 Imunitní systém**

Imunitní systém je mechanismus, který dokáže v těle rozpoznat “cizí“ a “vlastní“ a zajišťuje tak ochranu před vznikem celé řady onemocnění.

Imunitu dělíme na dvě hlavní složky: imunitu nespecifickou (vrozenou) a imunitu specifickou (získanou). Obě tyto složky spolu prokazatelně spolupracují (Slack a kol. 2009).

- **Imunita nespecifická (vrozená)**

Imunitu vrozenou řadíme mezi nejstarší součásti imunitního systému. Výhodou je její velmi rychlá reakce, projevuje se okamžitě po rozpoznání cizorodé struktury. Nevýhodou je neschopnost tvoření paměťových buněk (Beutler 2004).

Mezi mechanismy nespecifické imunity řadíme tělní bariéry, jejichž ochranná funkce je podporována jednoduchými chemickými látkami, jako je např. kyselina mléčná, lysozym, properdin. Tyto bariéry slouží jako první linie obrany těla. V momentě překonání těchto prvotních bariér nastupují buňky nespecifické imunity - monocyty/ makrofágy, granulocyty, dendritické buňky a přirození zabíječi (NK buňky). Tyto buňky jsou schopné rozpoznat konzervativní struktury na povrchu patogenů, takzvané pathogen associated molecular patterns (PAMPs) a to za pomoci specifických receptorů na svém povrchu - pattern recognition receptors (PRRs). Výsledkem je fagocytóza patogenů, nastartování komplementu nebo další mechanismy umožňující odstranění škodlivé složky z organismu (Beutler 2004).

- **Imunita specifická (získaná)**

Imunita specifická je vývojově mladší. Mezi základní vlastnosti specifické imunity patří **specifita**, tedy schopnost rozpoznat i drobné niance mezi antigeny, **imunologická paměť**, která při sekundárním setkání s antigenem zajistí rychlejší a silnější imunitní reakci než je tomu u prvního setkání a **diverzita**, kdy jsou imunitní buňky schopné vytvořit obrovské množství struktur rozpoznávajících celou škálu různých antigenů.

Základními efektorovými buňkami této imunity jsou T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky. Propojení mezi imunitou specifickou a nespecifickou je zajištěno makrofágy a dendritickými buňkami díky jejich schopnosti prezentovat antigen. Řadíme je společně s aktivovanými B-lymfocyty mezi tzv. antigen prezentující buňky (APC), (Bonilla a Oettgen 2010).

B-lymfocyty vznikají a dozrávají v kostní dřeni. Po vazbě antigenu na B-lymfocyt dochází k diferenciaci na dvě populace a to na (1) plazmatické buňky (zajišťují produkci protilátek) a (2) paměťové buňky (jsou součástí imunologické paměti), (Jerne 1955).

T-lymfocyty vznikají také v kostní dřeni, ale k jejich dozrávání a selekci dochází v brzlíku. Rozpoznávají antigen v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem I (MHC I), případně v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem II (MHC II). Tyto komplexy jsou prezentovány profesionálními APC (makrofágy, dendritické buňky, B-lymfocyty). Rozpoznání vede k tvorbě paměťových buněk a buněk efektorových. T-lymfocyty dělíme do dvou základních skupin a to cytotoxické (Tc) CD8+ a pomocné (Th) CD4+ (Bonilla a Oettgen 2010).

Odpověď specifické imunity lze rozdělit na odpověď humorální a odpověď buněčnou. Humorální odpověď zajišťují protilátky produkované plazmatickými buňkami. Ty mohou antigen neutralizovat, opsonizovat (zviditelnit pro fagocytózu) nebo zahájit aktivaci komplementové kaskády. Buněčná odpověď je zajištěna T-lymfocyty nebo aktivovanými cytotoxickými T-lymfocyty (Bonilla a Oettgen 2010).

## 2.2.2 Nádor a imunita

Vědci roku 1957 přišli s teorií tzv. “protinádorového imunitního dohledu“, kterou publikoval ve svém článku Thomas Burnet (Burnet 1957). Tato teorie navrhuje, že imunitní efektorové buňky neustále chrání organismus před nádorovými buňkami vznikajícími v průběhu života. Efektorovými buňkami zde mají být T-lymfocyty (později i NK buňky), (Burnet 1957).

Tato teorie je podporována i faktem, že imunosuprimovaní lidé (např. lidé s HIV) mají vyšší procento výskytu nádorových onemocnění, než lidé s plně funkčním imunitním systémem (Grulich a kol. 1999).

Další hypotézu rozvíjející teorii protinádorového imunitního dohledu publikovali Dunn a kolegové: “cancer immune editing“ (Dunn a kol. 2002). V rámci této teorie vyplývá z pokusů, že nádory rostoucí v přítomnosti plně funkčního imunitního systému jsou více odolné a přizpůsobivé, než ty rostoucí u imunosuprimovaných jedinců. Výsledky naznačují, že imunitní systém vytváří tlak na nádorové buňky a ty díky tomu postupem času zdokonalují své únikové schopnosti (Dunn a kol. 2002).

Neméně důležitý je poznatek prof. Cuiho, že nespecifická imunita je schopna rozpoznat a zničit nádorové buňky. Při jednom ze svých pokusů na myších BALB/c se sarkomem S-180 objevil jedinec (myš), který byl imunní proti těmto nádorovým buňkám. Bližším zkoumáním zjistil, že se jedná o určitý typ mutace, kdy jsou buňky nespecifické imunity schopné rozpoznat nádorové buňky a plně nádor zlikvidovat (Cui a kol. 2003).

### **2.2.2.1 Nádorové imunitní znaky**

Aby mohly být nádorové buňky rozpoznávány buňkami imunitního systému, musejí mít na svém povrchu antigenní znaky (nádorové antigeny). Nádorové antigeny jsou proteiny produkované nádorovými buňkami a následně exprimované na jejich povrchu. Jsou rozlišovány dvě skupiny nádorových antigenů podle toho, zda se vyskytují striktně jen na nádorových buňkách (tumor specifické antigeny) nebo na nádorových buňkách i na buňkách zdravých (tumor asociované antigeny).

- **Tumor specifické antigeny (TSA)**

TSA se vyskytují pouze na buňkách nádorových. Jejich produkce je způsobena nejčastěji bodovými mutacemi, jejichž důsledkem dochází k pozměnění proteinů na povrchu nádorových buněk (Philipps a kol. 1985). Nádory vyvolané virovou infekcí nesou na svých buňkách obvykle komplex MHC I + bílkovinné štěpy onkogenních virů. Nádory vyvolané chemikáliemi nesou na povrchu komplex MHC + abnormální fragment proteinu buňky. Některé z nádorových buněk mohou exprimovat atypické povrchové glykoproteiny. U nádorově změněných T- či B-lymfocytů se specifickými nádorovými antigeny stávají T-buněčné receptory (TCR) a B-buněčné receptory (BCR), (Philipps a kol. 1985).

- **Tumor asociované antigeny (TAA)**

TAA se mohou nacházet jak na nádorových buňkách, tak i na buňkách zdravých. Rozdíl mezi expresí na zdravých a nádorových buňkách je v čase, místě a intenzitě výskytu. Tyto antigeny slouží velmi často jako markery, které jsou důležité pro diagnostiku nádorových onemocnění (Old a Chen 1998). Řadíme sem např: **prostatický specifický antigen (PSA)**. PSA je serinová protéza produkovaná buňkami prostaty. Vysoké koncentrace PSA v těle mohou poukazovat na karcinom prostaty (Wang a kol. 1979). Dalšími markery jsou **onkofetální antigeny**, které se přirozeně vyskytují na embryonálních buňkách. Do této skupiny antigenů patří alfa1 fetoprotein, který je exprimován při nádorových onemocněních jater a vaječníků a karcinoembryonální antigen exprimovaný při karcinomech tlustého střeva (Chism a kol. 1978). Nelze opomenout ani **metastázové antigeny** jako např.: EpCAM (Cimino a kol. 2010) nebo **melanomové antigeny** jako je MAGE-1 nebo Melan-A (Hodi 2006).

### 2.2.2.2 Imunitní protinádorová odpověď

Imunitní systém může proti nádorovým buňkám bojovat ve více rovinách. Po rozpadu transformovaných (nádorových) buněk dochází k uvolňování jejich antigenů. Tyto antigeny jsou zachyceny antigen prezentujícími buňkami a prezentovány v komplexu s MHC II molekulou. Takto označené antigeny jsou rozpoznatelné pro CD4+ T-lymfocyty (Wang 2001). Aktivované CD4+ T-lymfocyty produkují řadu cytokinů, které následně podpoří diferenciaci CD8+ T-lymfocytů v cytotoxické T-lymfocyty (CTL), (Janssen a kol. 2003).

Zatímco zdravé buňky na svém povrchu exprimují MHC I molekuly se svými proteiny, nádorové buňky omezují expresi MHC I molekul a tím se stávají atraktivní pro NK buňky (Garcia-Lora a kol. 2003).

Do protinádorové imunity mohou být okrajově zapojeny i makrofágy, které způsobují lýzu nádorových buněk a produkují tumor nekrosis faktor beta (TNF-β). TNF-β se může vázat na receptory na povrchu buněk a způsobovat tak jejich apoptózu (Alleva a kol. 1994).

Důležité je zmínit funkci cytokinů, což jsou signální proteiny produkované buňkami imunitního systému. Můžeme sem zařadit interleukiny (IL) a interferony (INF), (Malik a Waxman 1992).

Z interleukinů jsou nejdůležitější IL-2 a IL-12. IL-2 je produkován Th buňkami (pomocné T-lymfocyty) a uplatňuje se jako hlavní růstový faktor T-lymfocytů. Podporuje i

aktivitu NK buněk (Henney a kol. 1981). IL-12 je produkován dendritickými buňkami, T-lymfocyty, B-lymfocyty a makrofágy (Jewett a Bonavida 1994).

Interferony (INF) jsou glykoproteiny produkované buňkami imunitního systému. Podílejí se na buněčné proliferaci, diferenciaci a angiogenezi. Do protinádorové imunity se významně zapojuje interferon alfa (INF- $\alpha$ ), který je syntetizován leukocyty po antigenní stimulaci. Má antiproliferační účinek, stimuluje NK buňky a indukuje expresi MHC I molekul (Jewett a Bonavida 1994). Dalším významným interferonem je INF gama (INF- $\gamma$ ). INF- $\gamma$  je produkován T-lymfocyty, Th1 buňkami a NK buňkami po rozpoznání atypické buňky či infikované buňky. Dokáže stimulovat expresi MHC I i MHC II molekul. Aktivuje fagocyty, stimuluje NK buňky, neutrofilů a podporuje dozrávání dendritických buněk (Pulaski a kol. 2002).

### **2.2.2.3 Mechanismy úniku nádorových buněk**

U nádorových buněk se díky tlaku imunitního systému vyvinula řada únikových mechanismů. Tyto mechanismy způsobují, že imunitní systém ve většině případů nedokáže nádorové buňky rozpoznat.

Příkladem takového mechanismu je aktivní potlačení exprese MHC I molekul na povrchu nádorových buněk (Bicknell a kol. 1994, Pietra a kol. 2012). Nádorové buňky také dokážou manipulovat se svými antigeny. Jednak snižují jejich expresi (tím se ochrání před T-lymfocyty), mohou je maskovat (maskování epitopů sializací) nebo je v průběhu vývoje ztrácejí. V antigenech může také docházet k mutacím, které způsobí, že je imunitní systém nezaznamená (Kim a kol. 1975).

Dalším příkladem je vylučování transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), který působí tvorbu T-regulačních lymfocytů (Treg) a tak dochází k supresi ataku CTL (Yamagiwa a kol. 2001). Treg lymfocyty jsou typem regulačních lymfocytů vzniklých z CD4+ buněk, které udržují toleranci imunitního systému vůči vlastním tkáním (Sasada a kol. 2003).

Posledním příkladem je exprese velkého množství Fas ligandu na nádorových buňkách. Fas ligand je transmembránový protein, který se běžně objevuje na povrchu T-lymfocytů a interaguje s Fas receptorem na cílových buňkách. Navázáním ligandu na receptor se spustí programovaná buněčná smrt, což hraje důležitou roli v regulaci organismu. Nádorové buňky potlačují expresi Fas receptoru na svém povrchu, zatímco exprese Fas ligandu je zvýšena. T-lymfocyty mají na svém povrchu i Fas receptor, aby byla zaručena

jejich regulace. V momentě kdy se nádorový Fas ligand naváže na T-lymfocytární Fas receptor dojde k apoptóze T-lymfocyty. Tímto mechanismem dokážou nádory cíleně zneškodnit buňky imunitního systému (O'Connell a kol. 1999).

## **2.3 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na specifické imunitě**

Imunoterapie je v současnosti považována za perspektivní metodu léčby nádorových onemocnění. Hlavním důvodem je, že nepoškozuje buňky zdravé a zároveň používá k boji tělu vlastní imunitní systém. Jedním z problémů je ale komplexnost imunitního systému, kdy při jakémkoli zásahu do složité sítě imunitních reakcí můžeme vyvolat nežádoucí efekt nádorové imunotolerance (Osband a Ross 1990).

Imunoterapie často využívá imunitu specifickou, to znamená APC, T-lymfocyty, B-lymfocyty a specifické protilátky (např. monoklonální protilátky).

Monoklonální protilátky jsou protilátky získané klonálními mechanismy z jedné plazmatické buňky. Díky tomu je celá tato klonální skupina protilátek namířena proti jednomu antigenu a může tak vyvolat imunitní odpověď (Weiner a kol. 2009). Typickým příkladem využití monoklonálních protilátek je B-lymfocytární leukemie (McLaughlin a kol. 1998). Monoklonální protilátky mohou být využity i k přesnějšímu namíření běžných chemoterapeutik (DiJoseph a kol. 2004).

Dalším způsobem imunoterapie založené na specifické imunitě je terapie pomocí dendritických buněk (DC). Mechanismus přípravy DC je následující: pacientovi se odeberou monocyty, ze kterých jsou v laboratoři připraveny nezralé dendritické buňky. Zároveň se od pacienta získá nádorová tkáň, ze které je připravena směs nádorových antigenů. Nezralé DC tuto směs antigenů zpracují a začnou prezentovat na svém povrchu v komplexu s MHC II molekulou. Takto připravené DC jsou navráceny zpět do pacientova těla, kde dochází k aktivaci T-lymfocytů a k boji s nádorovými buňkami (Gilboa 2007).



## **2.4 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na nespecifické imunitě**

Další možností je imunoterapie založená na mechanismech imunity nespecifické. Jde zde hlavně o rozpoznání pathogen associated molecular patterns (PAMPs) prostřednictvím pattern recognition receptors (PRRs).

### **2.4.1 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)**

Každý mnohobuněčný organismus musí být schopen rozpoznat “živé“ a “mrtvé“ a přítomnost nežádoucích patogenů, aby mohl udržet integritu a správné fungování organismu. To je zajištěno řadou specifických receptorů PRRs rozpoznávajících PAMPs. PAMPs představují celé nebo části molekul exogenního původu, které se nacházejí na povrchu bakterií, hub, virů a dalších patogenů (Beutler 2004). Mezi PAMPs patří např. lipopolysacharid, flagelin, manan, formyl-methionin a další. Po rozpoznání PAMPs dojde k aktivaci signálních drah a modulaci imunitní odpovědi (Beutler 2004).

Ale PAMPs nejsou jediné molekuly, které spouštějí tento typ reakce. Bylo prokázáno, že i určité endogenní molekuly po navázání na PRRs mohou vyvolat imunitní odpověď (Shi a kol. 2003). Těmito dalšími molekulami jsou damage associated molecular pattern (DAMPs). DAMPs jsou produkovány buňkami při neprogramované buněčné smrti, ale při klasické programované smrti (apoptóze) sekretovány nejsou. Díky tomu tělo rozliší, kdy došlo k přirozené smrti buňky (Bianchi a kol. 2007). Mezi typické zástupce DAMPs molekul patří: (1) high mobility group box1 (HMGB1), (Scaffidi a kol. 2002). (2) S100 proteiny (Roth a kol. 2003), (3) heat shock proteiny (HSPs), (Basu a kol. 2000), (4) kyselina močová (Shi a kol. 2003).

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

PRRs jsou exprimovány na buňkách nespecifické imunity a jsou základem pro detekci průniku patogenů do těla (Takeuchi a Akira 2010). PRRs můžeme členit podle několika aspektů, zda jsou volné či pevně vázané na buňkách a popřípadě v jaké části buňky se nacházejí. Jedno z možných dělení je na cytoplazmatické, sekretované a membránové PRRs (Abouelmaatti a kol. 2013).

### 2.4.2.1 PRRs cytoplazmatické

- **NOD like receptory (NLR)**

Jedná se o cytoplazmatické receptory, které slouží jako druhá vlna obrany proti průniku patogenů (Opitz a kol. 2004). Nejznámějšími zástupci této skupiny jsou NOD 1 a NOD 2 receptory. NOD 1 rozpoznávají peptidoglykan, který je součástí pouze gram negativních bakterií (Girardin a kol. 2003a). NOD 2 rozpoznávají muramyl dipeptid, což je peptidoglykan gram pozitivních i gram negativních bakterií (Girardin a kol. 2003b).

- **RIG-1-like receptory (RLR)**

Tyto receptory jsou zapojeny do rozpoznávání virů. Dokáží identifikovat virovou replikaci přímým kontaktem s dsDNA (Hornung a kol. 2006).

### 2.4.2.2 PRRs sekretované

- **C-reaktivní protein (CRP)**

CRP je protein akutní fáze, váže se na fosforylcholinové motivy na fosfolipidech, které jsou součástí bakteriálního povrchu. Vazba na PAMPs aktivuje fagocytující buňky a klasickou cestu komplementu (Chang a kol. 2002).

- **Lektin vázající manózu (MBL)**

MBL se váží na karbohydráty nacházející se na povrchu a na kapsulích řady bakterií, virů, hub a parazitů (Matsushita a Fujita. 1992). Funkcí MBL je vazba na staré a apoptotické buňky, která je zviditelní a zajistí tak jejich odstranění fagocyty (Ogden a kol. 2001). MBL v krvi tvoří komplexy s proteiny MASP, které rozštěpí C4 na dva fragmenty - C4a, C4b. Fragment C4b se naváže na povrch bakterií a aktivuje C3-konvertázu, která katalizuje komplementovou kaskádu (Ikeda a kol. 1987).

### 2.4.2.3 PRRs membránové

PRRs membránové jsou pevně kotvené v membráně buněk a řadíme sem:

- **Toll like receptory (TLR)**

Jsou jedny z nejvíce prostudovaných PRRs. Jsou exprimovány na imunitních i neimunitních buňkách (B- a T-lymfocyty, monocyty, makrofágy, DC, fibroblasty, epiteliální buňky), (Zarembek a Godowski 2002). U člověka bylo nalezeno 10 TLR (TLR 1 - 10) a u myši 12 TLR (TLR 1 - 9 a TLR 11 - 13), (Medzhitov 2001, Akira a kol. 2006). Lidské TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou exprimovány na buněčném povrchu, primárně rozpoznávají mikrobiální stěnu či nějakou jinou součást buňky patogena. TLR 3, 7, 8 a 9 jsou na endolysozomu a rozpoznávají nukleové kyseliny. Na extracelulární straně receptorů najdeme doménu bohatou na leucin (LRL doménu) zodpovědnou za rozpoznání specifického ligandu (Matsushima a kol. 2007) a na intracelulární straně je vysoce konzervovaná doména (TIR) vázaná na adaptorové proteiny důležité pro přenos signálu (Yamamoto a kol. 2002). TLR 2 - 1, TLR 2 - 6 a TLR 7 - 8 se vyskytují jako heterodimery (Nishiya a DeFranco 2004). Každý z TLR receptorů rozpoznává a váže specifické ligandy např. TLR 2 - rozpozná a váže peptidoglykany a lipoproteiny (Schwandner a kol. 1999), TLR 4 - lipopolysacharid (LPS), (Poltorak a kol. 1998), TLR 5 - flagelin (Hayashi a kol. 2001).

TLR 2 a TLR 4 kromě PAMPs navíc rozeznávají damage associated molecular patterns (DAMPs). V případě TLR 2 to jsou heat shock proteiny 60 a Gp96 (Warger a kol. 2006, Zanin-Zhorov a kol. 2006). V případě TLR 4 je to např. Gp96, HSP 70 a 90 (Triantafilou a kol. 2004). Po navázání specifického ligandu na TLR je zahájena signální dráha vedoucí k indukci genů, které stimulují imunitní systém. Efektorovou molekulou je zde transkripční faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), interferon regulační faktor (IRF 7 a IRF 3) a aktivační protein (AP-1). Výsledkem drah je tvorba zánětlivých cytokinů a maturace dendritických buněk a tedy podpora v prezentaci antigenu. Zároveň dochází k aktivaci CTL a NK buněk a je podpořena schopnost fagocytózy makrofágů a neutrofilů (Barton a Medzhitov 2003).

- **C-tyt lektin receptory (CLR)**

Jedná se o různorodou skupinu rozpustných a transmembránových receptorů, které obsahují jednu nebo více C-tyt lektin-like domén. Primárně se nacházejí na monocytech, makrofázích a dendritických buňkách a rozpoznávají fukózu, manózu a další struktury. Po jejich aktivaci

(navázání PAMPs) se indukují signální dráhy vedoucí ke změně genové exprese (Figdor a kol. 2002).

Do skupiny CLRů řadíme i manózoové receptory poskytující spojení mezi imunitou specifickou a nespecifickou. Navázání PAMPs zde spustí fagocytózu a endocytózu pomocí komplementového systému (Taylor a kol. 1990). Patří sem i Dectin1, který se nachází na povrchu makrofágů a rozpoznává beta glukán (Brown a kol. 2002).

- **Formyl peptidové receptory**

Jedná se opět o transmembránové receptory převážně se vyskytující na leukocytech (FPR 1, FPR 2). Jsou schopné rozpoznávat formyl peptidové molekuly, které mohou být přítomny v organismu při bakteriální či jiné infekci (Fu a kol. 2006).

- **Scavenger receptory**

Jsou exprimovány převážně na buňkách myeloidní řady, včetně makrofágů a dendritických buněk. Jsou schopny vázat celou řadu ligandů a komponent bakteriálních stěn. Dále dokážou rozpoznat apoptotické buňky a endogenní molekuly, jako jsou např. stresové proteiny (Dunne a kol. 1994).

### 2.4.3 Terapeutické využití PAMPs

Léčba nádorových onemocnění nástroji nespecifické imunity je velmi nadějným typem imunoterapie. Nejstarší zmínky pocházejí z 19. století a jsou spojovány se jménem William B. Coley. Coley popsal případy spontánních regresí nádorových onemocnění po nákaze infekčním onemocněním (Coley 1891). Později vyvinul coleyho toxiny (směs bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*), které byly používány k léčbě nádorových onemocnění (Coley 1910).

Dnes je používána BCG vakcína fungující na stejném principu. Jedná se o speciálně upravené živé bakterie *Mycobacterium bovis*. Nejčastěji se používá k léčbě povrchových nádorů močového měchýře. Po aplikaci (prostřednictvím katetru zavedeného do močového měchýře) vyvolá imunitní reakci a tím způsobí zmenšení či úplné vymizení nádoru (Brandau a Suttman 2007).

Postupem času se upustilo od používání celých bakterií a přešlo se k bakteriálním či virovým fragmentům (specifickým agonistům PRRs) nebo k uměle syntetizovaným

ligandům. Praktickým příkladem využití bakteriálních fragmentů je aplikace CpG oligonukleotidu za účelem léčby nádorových onemocnění. CpG je krátký úsek jednořetězcové bakteriální DNA se specifickým pořadím nukleotidů, který dokáže aktivovat TLR 9. V nedávné době byla tato metoda testována v klinických studiích na pacientech s glioblastomem (Carpentier a kol. 2006).

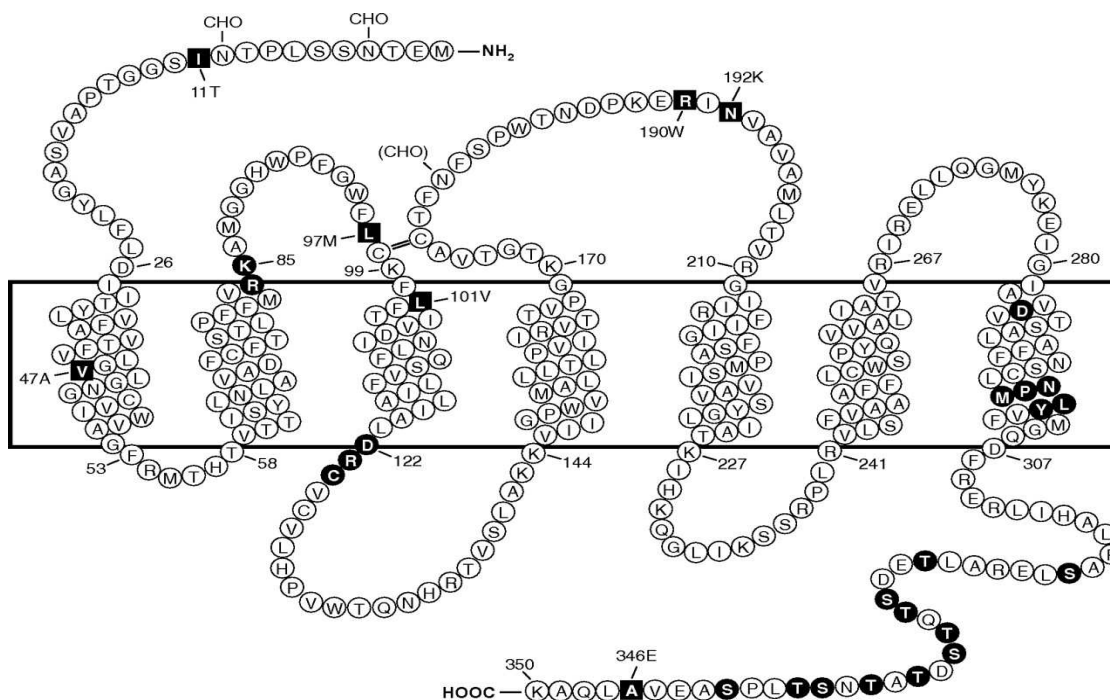
CpG oligonukleotid není jediný bakteriální motiv vyvolávající redukcí nádorového růstu. Bylo zjištěno, že instalací bakteriálních motivů jako je manóza (Maierová 2012) nebo laminarin (Auerová 2012) na povrch nádorových buněk je možné docílit redukcí nádorového růstu u myši. Jednou z možností je i použití bakteriálního motivu f-MLF k aktivaci FPR receptorů, kterou se zabývá tato diplomová práce. Navíc je zde možnost zesílení imunitní odpovědi a tedy i efektu terapie kombinací aktivace různých typů PRRs (Underhill a Gantner 2004), v tomto případě konkrétně formyl peptidových receptorů a toll like receptorů.

## **2.5 Formyl peptidové receptory (FPR)**

FPR hrají důležitou roli v obraně těla proti mikroorganismům. Jsou to chemotaktické receptory původně nalezené na leukocytech (FPR 1, FPR 2), později byly také zjištěny na dalších tělních buňkách (hepatocyty, dendritické buňky, astrocyty, mikrobiální buňky, krevní destičky, sekreční buňky, hepatocyty a neurony), (Becker a kol. 1998). Mají schopnost vázat N-formyl peptidy (i některé neformylové peptidy) produkované při degradaci bakterií a endogenní substance vznikající z mitochondrií poškozených či destruovaných buněk (Le a kol. 2002). Už roku 1966 bylo prokázáno, že prokaryotické organismy začínají syntézu N-formyl methioninem (Adams a Capecchi 1966), jako první chemoatraktanty pro neutrofilu byly popsány molekuly obsahující N-formyl-methionin-leucin a N-formyl-methionin-fenylalanin (Schiffmann a kol. 1975). Po aktivaci receptorů dojde k mobilizaci imunitního systému a k odpovědi na bakteriální infekci (Gao a kol. 1998). Jsou však známy i případy, kdy aktivace FPR receptorů podporuje rozvoj některých onemocnění (např. neurodegenerativní onemocnění jako je Alzheimerova choroba), (Le a kol. 2001).

## 2.5.1 Struktura FPR

Formyl peptidové receptory patří do rodiny transmembránových receptorů spřažených s G-proteiny. Jejich strukturu tvoří 7 hydrofobních transmembránových domén obsahujících 350 aminokyselin. Na vnitřní intracelulární straně nalezneme dvě smyčky a na extracelulární vnější straně smyčky tři. Na extracelulární straně je N-terminální konec a na intracelulární straně C-terminální konec (Fu a kol. 2006). Na Obr. 1 je znázorněna proteinová sekvence FPR 1 receptoru. Černými čtverečky jsou zvýrazněny ty aminokyseliny, které jsou variabilní a prostřednictvím polymorfismu se mohou měnit. Černými kolečkami jsou označeny aminokyseliny, u kterých je známá jejich funkce. Předpokládá se, že arginin v poloze 84, lysin v poloze 85 a aspartát v poloze 284 hrají klíčovou roli v afinitě k f-MLF. Na opačné straně je vazebné místo pro G-protein (aspartát 122, arginin 123, a cystein 124), (Mills a kol. 1998). Po vazbě ligandu (f-MLF) na receptorové vazebné místo dojde ke konformační změně receptoru a aktivaci G-proteinu, který započne signální kaskádu vedoucí k imunitní odpovědi (Le a kol. 2002).



**Obr. 1:** Proteinová sekvence FPR 1 receptoru. Černá kolečka ukazují aminokyseliny se známou funkcí, černé čtverečky variabilní aminokyseliny měnící se následkem polymorfismu (Richard a kol. 2009).

## 2.5.2 Lidské FPRs a jejich agonisté

Lidská FPR rodina obsahuje 3 identifikované typy receptorů: FPR 1, FPR 2 a FPR 3 (Migeotte a kol. 2006).

(1) **FPR 1** jsou jedny z prvních identifikovaných PRRs. K jejich expresi dochází převážně na neutrofilech (Becker a kol. 1998). Umožňují vyhledat bakteriální agens a započít imunitní odpověď. FPR 1 jsou schopny rozpoznat jak exogenní, tak endogenní ligandy. Mezi hlavní exogenní ligandy FPR 1 patří formyl-methionin-leucin-fenylalanin (f-MLF), (Showell a kol. 1976). Mezi endogenní řadíme cathepsin G (enzymatický protein, který se vyskytuje v azurofilních granulích některých leukocytů a účastní se zabíjení a trávení patogenů), (Sun a kol. 2004) a annexin 1 (protein účastnící se apoptózy napadených či jinak poškozených buněk), (Walther a kol. 2000).

(2) **FPR 2** známé jako formyl peptide receptor-like 1 (FPRL 1) nebo FPR2/ALX (Ye a kol. 1992), se také převážně vyskytují na neutrofilech. FPR 2 receptory vážou mnohem různorodější skupinu ligandů nežli FPR 1. Jsou schopné vázat jak proteiny, peptidy tak i syntetické molekuly (Cattaneo a kol. 2013). Mezi hlavní ligandy FPR 2 patří formylové peptidy pocházející z mitochondrií. Afinita k f-MLF je oproti FPR 1 snížena (Ye a kol. 1992). Receptor je dále schopen rozpoznat annexin 1 a příbuzné peptidy, sérum amyloid A (SAA), F peptid, V3 peptid (He a kol. 2003, Nanamori a kol. 2004, Cattaneo a kol. 2013). Jako zástupce syntetických neformylovaných molekul lze uvést WKYMVM (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met), (Baek a kol. 1996).

(3) **FPR 3** jsou receptory primárně se vyskytující na monocytech, makrofázích a dendritických buňkách. Na lidských neutrofilech nejsou exprimovány (Durstin a kol. 1994). FPR 3 rozpoznávají a vážou jen několik málo endogenních ligandů, např. F2L (terminální peptid odvozený z hem vázajícího proteinu), (Migeotte a kol. 2005). Tento receptor se odlišuje od dvou výše zmíněných svou lokalizací v buňce: místo na povrchu monocytů se objevuje uvnitř vezikul v cytoplazmě. Jeho přesná fyziologická funkce není prozatím zcela známa (Rabiet a kol. 2011).

## 2.5.3 Myší FPRs a jejich agonisté

Genová rodina FPR je u myší mnohem rozrostlejší. Obsahuje alespoň 8 příbuzných genů (Gao a kol. 1998, Tiffany a kol. 2011), které kódují 8 typů FPR myších receptorů.

Geny FPR 1, FPR 2 a FPR-rs 1 kodují receptory nacházející se v membráně leukocytů, tyto tři receptory vykazují vysokou podobnost s lidskými FPR (Gao a kol. 1998).

(1) **FPR 1** receptory mají vyšší afinitu k delším ligandům, což naznačuje, že přidání aminokyselin na C-terminální konec formyl peptidu zvyšuje afinitu k receptoru (He a kol. 2013).

(2) **FPR 2** receptor vykazuje také nižší afinitu ke kratším formylovým peptidům např: f-MLF. Zatím co delší formylové peptidy vykazují vyšší afinitu k FPR 2 (He a kol. 2013). Receptor se významně uplatňuje při zánětech dýchacích cest (Chen a kol. 2010).

(3) **FPR-rs 1** má podobnou strukturu jako předcházející dva receptory (FPR 1, FPR 2) ale liší se svou lokalizací v buňce. Zatímco dva předcházející receptory jsou transmembránové a vazebné místo pro ligand vyčnívá z buňky ven, FPR-rs1 receptor je uvnitř buněk (stejně tak je tomu i u lidského FPR 3). Otázkou je, zda receptor váže potencionální intracelulární ligandy nebo zda je pro vazbu přesunut k povrchu buňky (He a kol. 2013).

#### 2.5.4 FPR signální dráhy

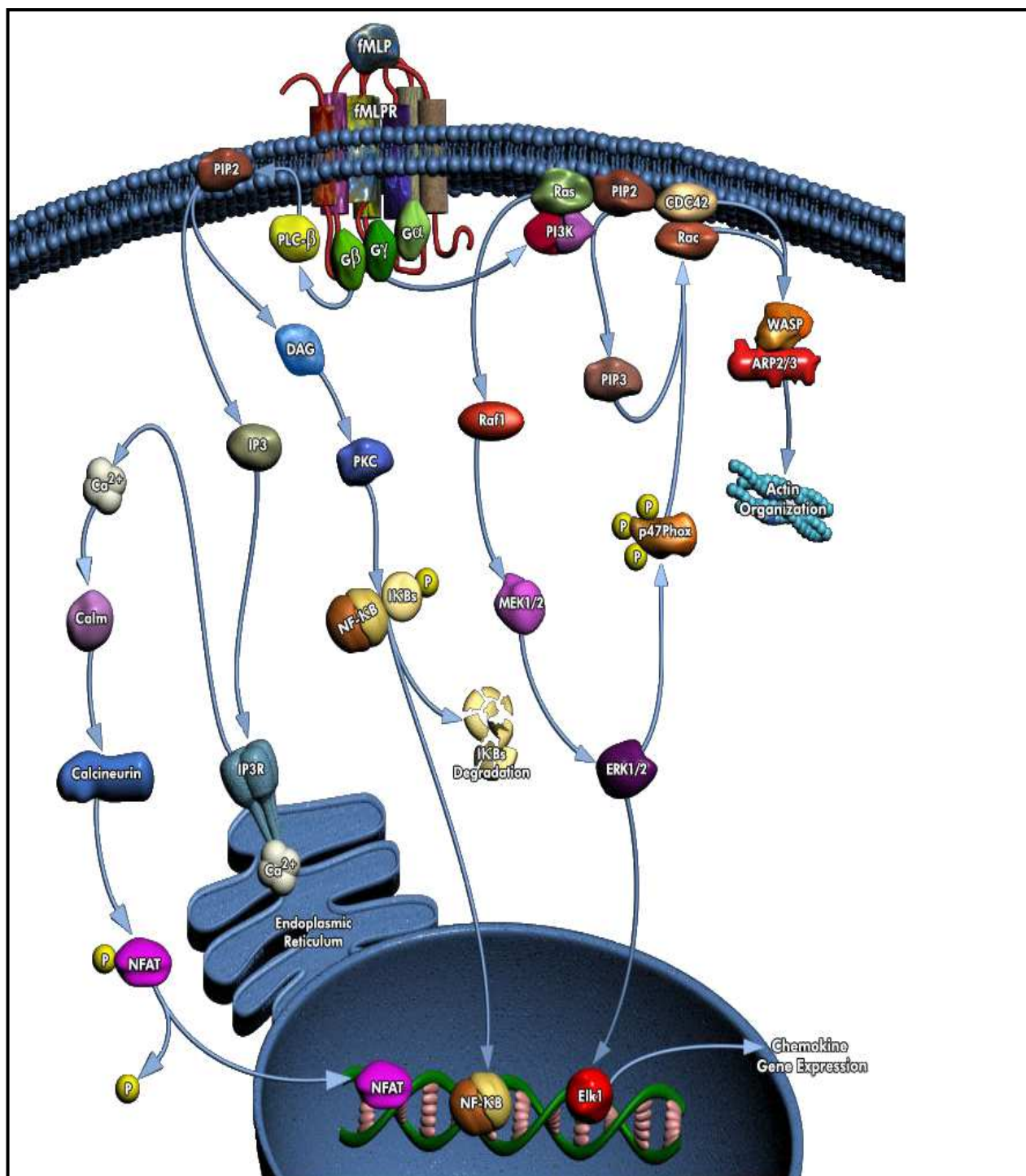
Signální dráha je uvedena do pohybu navázáním příslušného ligandu do vazebného místa receptoru. Navázáním dojde ke změně konformace receptoru, která aktivuje G-proteiny (viz Obr. 2  $G\alpha$ ,  $G\beta$ ,  $G\gamma$  ukázané v horní části obrázku). Následně G-proteiny aktivují několik typů drah. Jednotlivé dráhy jsou vyobrazené na Obr. 2.

První typ dráhy: G-protein aktivuje phospholipázy C beta (PLC- $\beta$ ) což vede k produkci intracelulárních sekundárních posílů inositol trifosfátu (IP3) a diacylglycerolu (DAG). IP3 způsobí mobilizaci  $Ca^{2+}$  z endoplazmatického retikula. Vápník moduluje kalmmodulin (Calm) a kalcineurin (Calcineurin), dojde k aktivaci transkripčního faktoru - Jaderného Faktoru Aktivujícího T-lymfocyty (NFAT). Ten nakonec způsobí aktivaci genů kódujících cytokiny. Druhý sekundární posel DAG aktivuje protein kinázu C (PKC). V konečné fázi dochází k aktivaci jaderného faktoru-KappaB (NF- $\kappa$ B), (Rabiet a kol. 2007).

Druhý typ dráhy: G-protein spustí dráhu začínající serin/ threonin protein kinázou (Raf1), tato reakce dále zmobilizuje kinázu (Erk1/2) a výsledkem je funkční transkripční faktor (Elk1), (Pillinger a kol. 1996). Zároveň dochází i k aktivaci p47Phox (NADPH oxidázová podjednotka), ta následně podporuje aktivitu Rac (GTPáza). Tato dráha ovlivňuje filamenta zodpovědná za pohyb buňky (Dewas a kol. 2000).



Třetí typ dráhy: G-proteiny u granulocytů aktivují aktin polymerázu, což způsobuje buněčnou migraci po koncentračním gradientu. Dochází k aktivaci proteinů důležitých pro reorganizaci aktinu jako je například fosfatidylinositol-3-kináza (PI3k), (Belisle a Abo 2000).



Obr. 2: Signální dráhy po aktivaci FPR receptorů (Qiagen 2013).

### **2.5.5 Výsledek aktivace signálních drah**

Aktivace buněk působením formylových peptidů vede obecně k zvýšení buněčné migrace do místa infekce, zvýšení fagocytózy aktivovaných buněk a uvolnění prozánětlivých mediátorů. Dále prostřednictvím transkripčních faktorů dochází k produkci cytokinů, jejichž hlavní funkcí je regulace migrace buněk (McDonald a kol. 1997).

Podle studií se FPR receptory díky svojí schopnosti aktivovat zánětlivé cytokiny podílejí na podpoře a vzniku řady neurodegenerativních onemocnění, ve kterých je právě zánět hlavním zdrojem poškození tkání (mezi takovéto nemoci patří například Alzheimerovo onemocnění), (Le a kol. 2001). Aktivace FPR na povrchu neutrofilů agonistou f-MLF vede ke zvýšení produkce superoxidů. Ty se podílejí na podpoře oxidativního stresu a zánětlivých procesů (Manhart a kol. 1998). f-MLF ve vyšších koncentracích stimuluje uvolnění granulocytů z neutrofilů (degranulaci), (Borregaard a kol. 1993).

FPR receptory exprimované na buňkách gliomu mohou podporovat jeho růst a invazivitu. Jejich aktivace zde ovlivňuje buněčnou chemotaxi, proliferaci a angiogenezi (Huang a kol. 2010).

### **2.5.6 Terapeutické využití agonistů FPR receptorů**

Celá diplomová práce je založena na využití agonistů (ligandů) FPR v léčbě nádorových onemocnění. Schopnost ligandů FPR (např. f-MLF nebo jiné formylové peptidy) stimulovat fagocytární procesy je využita k redukci nádorových buněk. Výběrem vhodného agonisty FPR a jeho instalací na povrch nádorových buněk je možné tyto nádory označit pro imunitní systém jako něco nežádoucího, co je potřeba z těla odstranit. Navíc vznik zánětlivých cytokinů, který doprovází aktivaci FPR, podpoří imunitní reakci. Kombinací aktivace FPR receptorů a TLR receptorů je možné tento mechanismus ještě posílit (Underhill a Gantner 2004).

Kromě toho bylo ukázáno, že správnou optimalizací terapie lze docílit významné redukce růstu melanomů u myši (Čunátová 2012, Vácová 2013).

### 3 CÍLE PRÁCE

- Zhodnocení terapeutického využití agonistů formyl peptidových receptorů u melanomu a jiných typů nádorů.
- Optimalizace aplikačního schéma terapeutických látek.
- Možnost zvýšení efektu imunoterapie nádorových onemocnění spojením terapie působící na úrovni vrozené imunity (agonisté FPR) s terapií na úrovni imunity získané ((pro)enzymoterapie).
- Nalezení nejefektivnějšího způsobu kotvení f-MLF na nádorové buňky z hlediska redukce nádorového růstu a délky přežití myši.
- Možnost náhrady monofosforylu lipidu A (MPL) za lipopolysacharid (LPS) pro budoucí použití dané terapie u člověka.
- Analýza migrace jednotlivých subpopulací leukocytů do nádoru v průběhu léčby pomocí průtokové cytometrie. A vysvětlení synergie f-MLF-BAM s LPS na buněčné úrovni.
- Ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy (cytotoxický test CD45+/ PI) na ligandu f-MLF-DOPE.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Chemikálie

- **Alfa-amyláza** (*Bacillus sp.*), (Sigma- Aldrich, USA)
- **Alfa-chymotrypsinogen A** (bovinní), (Sigma- Aldrich, USA)
- **Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD45 APC; clone 30-F11** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse F4/80 PE-Cy7; clone BM8** (eBioscience, USA)
- **BAM** -biokompatibilní kotva pro membrány, Mw 4000 (NOF Corporation, Japonsko)
- **DMSO** - dimetyl sulfoxid (Sigma- Aldrich, USA)
- **DNáza I** (Roche Diagnostics, Německo)
- **DOPE** - N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl (NOF Corporation, Japonsko)
- **EDTA** - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma- Aldrich, USA)
- **f-MLF** - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (Sigma- Aldrich, USA)

- **f-MLF KK** - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin + lysin (Schafer-N, Dánsko)
- **FCS** - fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- **Fluorescenčně značené kalibrační kuličky** - count bright absolute counting beads, (Invitrogen, USA)
- **L-glutamin** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostics, Německo)
- **LPS** - lipopolysacharid z *Escherichia coli* (Sigma- Aldrich, USA)
- **Merkaptoetanol** - (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **MPL** - monofosforyl lipid A (Sigma- Aldrich, USA)
- **PBS** - fosfátový pufr s chloridem sodným (pH 7,3-7,4), (Sigma-Aldrich, USA)
- **Penicilin/streptomycin antibiotika** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **PI** - propidium jodid (Invitrogen, USA)
- **RPMI 1640** (Sigma- Aldrich, USA)
- **SMCC** - 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylicacid N-hydroxysuccinimid ester (Thermo Scientific, USA)
- **TCEP** - tris(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (Sigma- Aldrich, USA)
- **Trypanová modř** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsinogen** (bovinní), (Sigma-Aldrich, USA)

## 4.2 Laboratorní zvířata

V pokusech byly použity dva typy myší C57BL/6N a BALB/c z chovu Charles River Laboratories.

Samice myší C57BL/6 přišly do laboratoře jako 4 týdenní a po dosažení 8 týdnů (váha 18-20 g) byly použity k pokusům. Myši byly chovány za stejných podmínek ve zvěřinci parazitologického ústavu, BC AVČR jednotlivě ve sterilních boxech za neomezeného přístupu ke sterilní pitné vodě a krmivu ve formě suchých pelet. V místnosti byla zajištěna konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65% a fotoperioda 12/12 hodin.

Samice myší BALB/c přišly do zvěřince jako 6 týdenní a po dosažení 9 týdnů byly použity k pokusu. Podmínky k chovu byly totožné jako u myší C57BL/6N.

## 4.3 Příprava nádorových buněk pro transplantaci

Kultivace buněk B16-F10 probíhala v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % fetálního bovinního séra (FCS) s přidavkem 1% antibiotik, 1% glutaminu a 0,1% merkaptoetanolu při 37 °C v termostatu v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Narostlá buněčná linie nádorových buněk B16-F10 byla zbavena kultivačního média, následně třikrát promyta sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). K adherovaným nádorovým buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS) nezbytná pro jejich uvolnění. Samotná trypsinizace probíhala po dobu pěti minut v termostatu při 37 °C. Pro zastavení trypsinizačního procesu bylo k buňkám přidáno médium RPMI 1640 s 10% FCS. Rozvolněné buňky byly centrifugovány 10 min/4 °C /150g a naředěny na požadovaný objem přidáním RPMI 1640 bez séra. Následně byla počítána koncentrace buněk v 1 ml za pomoci Bürkerovi komůrky. Aby bylo možné spočítat živé buňky byla část suspenze smíchaná s trypanovou modří (0,5%) v poměru 1:1 (trypanová modř obarví mrtvé buňky, které nejsou do koncentrace započteny). Po zjištění aktuální koncentrace byla buňková suspenze naředěna na požadovanou koncentraci  $4 \times 10^6$  buněk/ml RPMI 1640 bez séra.

Kultivace i zpracování nádorových buněk S-180 probíhalo za stejných podmínek jako kultivace melanomových buněk B16-F10 s výjimkou: buňky sarkomu S-180 neadherovaly ke stěně kultivační nádoby, proto nebylo potřeba je trypsinizovat.

## 4.4 Transplantace nádorových buněk

Melanomové buňky B16-F10 byly transplantovány myším ve stáří 8 týdnů v množství  $4 \times 10^5$  buněk v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš. Buňky byly aplikovány podkožně na předem vyholený pravý bok.

Sarkomové buňky S-180 byly transplantovány myším ve stáří 9 týdnů v množství  $5 \times 10^5$  buněk v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš. Aplikace buněk byla provedena stejně jako u buněk B16-F10.

## 4.5 Měření velikosti nádorů

Velikost nádoru byla měřena pomocí kaliperu. Následně byl spočítán objem nádorové masy vzorcem  $V = \pi/6AB^2$ , kde A představuje délku nádoru (největší rozměr) a B představuje výšku nádoru (nejmenší rozměr), (Inaba a kol. 1986).

## 4.6 Počítání plicních metastáz

Myši byly umrtveny stržením vazů a následně jim byly plíce vyjmuty. Plíce byly fixovány ve 4% formaldehydu, kde plicní tkáň zesvětlá a metastázy jsou lépe viditelné. Poté se přešlo k samotnému vyhodnocení pod binokulární lupou, kde byly spočteny metastázy na všech plicních lalocích. Tato metodika následuje postup podle Větvičky a Větvičková (2007).

## 4.7 Analýza dat

Výsledná data byla zpracována do grafů pomocí programu Sigma plot 12.5. Grafy přežívání vytvořené na základě testu Kaplan-Meier byly vypracovány také v programu Sigma plot 12.5. Statistická významnost byla vypočtena pomocí dvouvýběrového studentova t-testu v programu Microsoft Excel.

## 4.8 Příprava terapeutických látek

### Příprava f-MLF KK-SMCC

1 mM SMCC v DMSO bylo smícháno s 1 mM f-MLF KK v PBS a společně inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě a tento roztok byl poté sterilizován filtrací.

Hodinu před samotnou aplikací f-MLF KK-SMCC se myším aplikovalo redukční činidlo – 50 mM roztok TCEP v PBS z důvodů redukce cystinu na povrchu nádorových buněk na cystein, čímž byla zajištěna vazba f-MLF KK-SMCC na nádorové buňky.

V případě kombinace f-MLF KK-SMCC s LPS bylo přidáno LPS na koncentraci 0,5 mg/ml.

### Příprava f-MLF KK-BAM

Bylo smícháno 6 ml 0,53 mM f-MLF KK s 0,353 ml 9 mM BAM<sub>4000</sub> v DMSO a následovala společná inkubace jednu hodinu při pokojové teplotě. Tento roztok byl poté sterilizován filtrací.

V případě kombinace f-MLF KK-BAM s LPS bylo přidáno LPS na koncentraci 0,5 mg/ml.

### Příprava f-MLF KK-DOPE

Bylo smícháno 6 ml 0,53 mM f-MLF KK s 0,353 ml 9 mM DOPE-NHS v DMSO a následovala společná inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě. Roztok byl nakonec sterilizován filtrací.

V případě kombinace f-MLF KK-BAM s LPS bylo přidáno LPS na koncentraci 0,5 mg/ml.

### Příprava f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE

Nejprve bylo připraveno 6 ml 1 mM DOPE-NHS v PBS rozpuštěním DOPE-NHS v 50 µl DMSO a doplněním PBS o pokojové teplotě. Takto vytvořený roztok byl smíchán s 6 ml 1 mM f-MLFG<sub>6</sub>K v PBS. Následovala hodinová inkubace a sterilizace filtrací.

V případě kombinace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s LPS bylo přidáno LPS na koncentraci 0,2 mg/ml.

V případě kombinace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s MPL bylo přidáno MPL na koncentraci 0,2 mg/ml.



## **Příprava směsi pro (pro)enzymoterapii**

Tři proenzymy (bovine trypsinogen, bovine alfa-chymotrypsinogen A, alfa-amyláza z *Bacillus sp.*) byly v poměru 0.56 mg trypsinogenu + 0.56 mg alfa-chymotrypsinogenu A + 0.4 mg amylázy na 1 ml fyziologického roztoku smíchány a sterilizovány filtrací.

## **4.9 Experimenty**

### **4.9.1 Terapie sarkomu pomocí f-MLF-(G)5-(K)10-STE a případná synergie s LPS**

V tomto experimentu bylo použito 20 myší linie BALB/c. Třináctý den od transplantace sarkomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin (I. - IV. viz níže) po pěti myších dle použité terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- I.** 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- II.** PBS (kontrola)
- III.** 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE v PBS
- IV.** LPS (0,5 mg/ml PBS)

Látky byly myším aplikovány u všech skupin celkem šestkrát každý druhý den do nádoru v množství 50  $\mu$ l na myš. Terapie byla zahájena v čase 0 (tedy 13. den od transplantace S-180), kdy všem myším byla změřena velikost nádoru. Další měření probíhalo vždy těsně před aplikací léčebné látky, tj. každý druhý den. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

### **4.9.2 Léčba melanomu pomocí dvou různých režimů aplikace f-MLF KK-SMCC + LPS**

V tomto pokusu bylo použito 10 myší linie C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do dvou skupin (I. a II. viz níže) po pěti myších dle režimu aplikace látek. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle režimu aplikace látek:

- I. 0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5 mg/ml) v PBS v režimu: den 0,1,2, -pauza- den 8,9,10, -pauza- den 16, 17, 18 -pauza- den 24, 25, 26
- II. 0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5 mg/ml) v PBS v režimu: den 0, poté jen při opětovném objevení nádoru

Terapeutická látka byla myším aplikována do nádoru v množství 50 µl na myš. Léčba byla u obou skupin započata v den 0 (tedy 12. den od transplantace B16-F10), kdy všem myším byla změřena velikost nádoru. Další měření probíhalo vždy každý druhý den. V tomto pokusu bylo potřeba aplikovat myším redukční roztok (50 mM roztok TCEP v PBS) hodinu před vlastní aplikací terapeutických látek. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

#### **4.9.3 Léčba melanomu pomocí pulzního režimu aplikace**

##### **f-MLF KK-SMCC v kombinaci s (pro)enzymoterapií**

V tomto experimentu bylo použito 8 myší linie C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do dvou skupin (I. a II. viz níže) po čtyřech myších, kdy jedna ze skupin byla léčena pouze samotným podáváním 0,5 mM f-MLF KK-SMCC v PBS a u druhé ze skupin bylo podávání léčebné látky kombinováno se směsí pro (pro)enzymoterapii (alfa-chymotrypsinogen A, trypsinogen a alfa-amyláza). Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- I. 0,5 mM f-MLF KK-SMCC v PBS v režimu: den 0,1,2, -pauza- den 8,9,11, -pauza- den 16, 17, 18, -pauza- den 24, 25, 26
- II. 0,5 mM f-MLF KK-SMCC v PBS v režimu: den 0,1,2, -pauza- den 8,9,11,- pauza- den 16, 17, 18, -pauza- den 24, 25, 26 + (pro)enzymoterapie v režimu: den 4, 5, 6, -pauza- den 12, 13, 14, -pauza- den 20, 21, 22, -pauza- den 28, 29, 30

Terapeutická látka byla myším aplikována do nádoru v množství 50 µl na myš, proenzymy do svalu (musculus semitendinosus) v množství 100 µl na myš. Léčba byla u obou skupin započata v den 0 (tedy 12. den od transplantace B16-F10), kdy se všem myším

změřila velikost nádorů. Další měření probíhalo vždy každý druhý den. V tomto experimentu bylo potřeba aplikovat myším redukční roztok (50 mM roztok TCEP v PBS) hodinu před vlastní aplikací f-MLF KK-SMCC. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

#### **4.9.4 Léčba melanomu pomocí aplikace f-MLF KK + LPS v intenzivním pulzním režimu za použití dvou různých kotvidel (BAM a DOPE)**

V tomto pokusu bylo použito 15 myší linie C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do tří skupin (I. - III. viz níže) po pěti myších dle způsobu kotvení f-MLF KK. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle použitého kotvidla:

- I.** 0,5 mM f-MLF KK-BAM + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- II.** 0,5 mM f-MLF KK-DOPE + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- III.** PBS (kontrola)

Látky byly myším aplikovány u všech skupin do nádoru v množství 50  $\mu$ l na myš ve stejném režimu a to: nultý den v 0, 1, 2 hodin, první den v 0,1 hodin, druhý den v 0 hodin.

Léčba byla u obou skupin započata v den 0 (tedy 12. den od transplantace B16-F10), kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Další měření probíhalo každý druhý den. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

#### **4.9.5 Léčba melanomu pomocí aplikace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v kombinaci s LPS, snaha o náhradu MPL za LPS**

V tomto pokusu bylo použito 30 myší linie C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do šesti skupin (I. - VI. viz níže) po pěti myších dle použité terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- I.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v PBS
- II.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + LPS (0,2 mg/ml) v PBS

- III. 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + MPL (0,2 mg/ml) v PBS
- IV. LPS (0,2 mg/ml PBS)
- V. MPL (0,2 mg/ml PBS)
- VI. PBS (kontrola)

Látky byly myším aplikovány do nádoru v množství 50 µl na myš u všech skupin ve stejném režimu a to: den 0, 1, 2, -pauza- den 8, 9, 10.

Léčba byla u obou skupin započata v den 0 (tedy 12. den od transplantace B16-F10), kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Další měření probíhalo každý druhý den. Čtrnáctý den byly myši po změření velikosti nádorů usmrceny stržením vazy a byly jim vyjmuty plíce za účelem počítání plicních metastáz.

#### **4.9.6 Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu ovlivněném aplikací terapeutické látky f-MLF KK-BAM**

V tomto experimentu bylo použito 36 myší linie C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin (I. - IV. viz níže) po devíti myších dle použité terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- I. LPS (0,5 mg/ml PBS)
- II. 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS
- III. 0,5 mM f-MLF-BAM + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- IV. PBS (kontrola)

V čase 0 (tedy 12. den od transplantace B16-F10) byly všem myším aplikovány do nádoru terapeutické látky v závislosti na skupině v množství 50 µl na myš. Vždy v časech 12, 24 a 48 hodin byly z každé skupiny odebrány tři myši, kterým byla změřena velikost nádoru, následně byly tyto myši usmrceny a jejich nádory byly odebrány k dalšímu zpracování. Jako negativní kontrola sloužily tři myši, odebrané v čase 0, kterým nebyla žádná terapeutická látka aplikována.

#### **4.9.6.1 Odebírání a zpracování nádorů**

Nádor byl vypitván a zbaven veškerých nečistot opláchnutím v RPMI 1640 bez séra. Následně byl roztříhán na menší kousky a přenesen do 1 ml sterilního RPMI 1640 bez séra s Liberázou DL (0,33 mg/ml) a DNázou I (0,2 mg/ml). Následovala hodinová inkubace při 37 °C s mírným třepáním. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky centrifugovány 10min/4 °C/160g. Vzniklý pelet byl naředěn v PBS a homogenizován přes sterilní sítko s póry o velikosti 70 µm (BD Bioscience). Suspenze byla dále převedena do 50 ml zkumavky a centrifugována ve větším objemu PBS 10min/4 °C/160g. Vzniklý pelet byl následně naředěn PBS na 0,5 ml a v objemu 10 µl na jamku přenesen do 96 jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem a použit pro analýzu na průtokovém cytometru.

#### **4.9.6.2 Analýza na průtokovém cytometru**

K buněčné nádorové suspenzi byly přidány fluorescenčně značené monoklonální protilátky (MoAbs). Tyto protilátky byly předem naředěné v PBS a rozdělené do dvou typů značení (značení I. a II.), viz Tab. I a II. Od každého nádoru byly zhotoveny vždy tři jamky, kdy první jamka byla značena I. typem značení, druhá jamka II. typem značení a třetí jamka zůstávala bez značení a sloužila jako kontrola pro vyloučení možnosti nespecifického navázání MoAbs na povrch buněk. Takto se postupovalo u všech nádorů stejně. Jako kontrola správné funkce MoAbs sloužily splenocyty získané ze sleziny myši ze skupiny IV. (kontrola).

Vzorky byly s MoAbs inkubovány 20 min ve 4 °C a poté promyty 150 µl PBS centrifugací 2 min/4 °C/424g. K peletě bylo doplněno 140 µl PBS a 10 µl kalibračních kuliček (kalibrační kuličky sloužily pro přepočítání absolutního množství buněk ve vzorku). Vzorek byl měřen na průtokovém cytometru (BD FACSCantoII flow cytometer, BD Biosciences, USA). Po správném nastavení cytometru viz Tab. III, byla mikrotitrační destička vložena do přístroje a za pomoci automatického podavače vzorků (HTS) změřena. Bylo zaznamenáno 20 000 událostí a vzorky byly měřeny v triplikátech.

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3. Celkové množství buněk bylo přepočteno na 1 mm<sup>3</sup> nádorové tkáně.

**Tab. I:** Fluorescenčně značené monoklonální protilátky použité jako I. typ značení.

<b>ZNAČENÍ I.</b>		
<b>Název protilátky</b>	<b>Typ buněk, které značí</b>	<b>ředění</b>
anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	<i>Leukocyty</i>	200x
anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	<i>T-lymfocyty</i>	100x
anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5; 0,2 mg/ml	<i>CD4+ T-lymfocyty</i>	100x
anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7; 0,2 mg/ml	<i>CD8+ T-lymfocyty</i>	100x
anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136; 0,2 mg/ml	<i>NK buňky</i>	100x

**Tab. II:** Fluorescenčně značené monoklonální protilátky použité jako II. typ značení.

<b>ZNAČENÍ II.</b>		
<b>Název protilátky</b>	<b>Typ buněk, které značí</b>	<b>ředění</b>
anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/m	<i>Leukocyty</i>	200x
anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	<i>T-lymfocyty</i>	100x
anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0,2 mg/ml	<i>Granulocyty</i>	100x
anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3; 0,2 mg/ml	<i>B-lymfocyty</i>	100x
anti-Mouse F4/80 PE-Cy7; clone BM8; 0,2 mg/ml	<i>Monocyty/makrofágy</i>	100x

**Tab. III:** Nastavení průtokového cytometru.

Nastavení laserů		Nastavení HTS	
Window Extension	2,0	Sample Flow Rate	1,0
FSC Area Scaling	0,8	Sample Volume (μl)	30,0
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

#### **4.9.7 Ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy (cytotoxický test CD45+/ PI) na ligandu f-MLF-DOPE**

K analýze protinádorového efektu f-MLF-DOPE byl použit cytotoxický test CD45+/ PI, kde vhodným označením efektorových a cílových buněk byla stanovena cytotoxická aktivita efektorových buněk imunitního systému vůči buňkám nádorovým. Efektorovými buňkami byly v tomto případě makrofágy PMJ2R značené anti-CD45-APC. Všechny buňky byly zároveň značené PI (proprium jodid). Výsledkem byla dvoubarevná FACS analýza s absolutními počty mrtvých i živých nádorových (B16-F10) a PMJ2R buněk.

##### **4.9.7.1 Příprava experimentu**

###### Den 1. - aktivace PMJ2R

Dostatečně narostlá makrofágová linie PMJ2R byla sklizena (pasterovou pipetou byl opláchnut povlak usazených buněk ze stěn kultivační zkumavky, buňky byly přeneseny do centrifugační zkumavky a centrifugovány 10 min/4 °C/150g, supernatant slit) a rozdělena na polovinu do dvou menších kultivačních zkumavek. Do jedné ze zkumavek byly přidány 2 ml LPS v koncentraci 1 μl/ml za účelem aktivace PMJ2R. Obě zkumavky byly doplněny do 20 ml RPMI 1640 s 10% FCS a ponechány 24 hodin v termostatu při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

## Den 2.

Melanomové buňky B16-F10 byly sklizeny (stejný postup viz příprava nádorových buněk pro transplantaci s výjimkou: požadovaná koncentrace buněk je zde podle počtu nasazovaných jamek) a nasazeny do 96-U jamkového panelu do 30 jamek v počtu 50 000 buněk na jamku v celkovém objemu 200 µl RPMI 1640 s 10% FCS na jamku.

Následovalo promytí buněk centrifugací (2 min/4 °C/424g) a slití supernatantu. Na pelety buněk byl do 15 jamek přidán ligand f-MLF-DOPE v koncentraci 0,05 mmol/l do celkového objemu 200 µl RPMI 1640 s 10% FCS na jamku (tzn. na peletu v jamkách bez ligandu bylo přidáno 200 µl RPMI 1640 s 10% FCS, na pelety v jamkách s ligandem bylo přidáno 180 µl RPMI 1640 s 10% FCS a doplněno 20 µl ligandu f-MLF-DOPE o koncentraci 0,5 mmol/l).

Po inkubaci buněk s ligandem (30 min při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře) byly buňky opět promyty (2 min/4 °C/424g) a supernatant slit.

K buňkám byly do 10 jamek přidány sklizené efektorové aktivované PMJ2R (aktPMJ2R) a do dalších 10 jamek sklizené efektorové neaktivované PMJ2R (způsob sklizení viz den 1. – aktivace PMJ2R) v celkovém objemu 200 µl na jamku v poměru s nádorovými buňkami 1:2 (tedy na 50 000 B16-F10 /100 000 PMJ2R), zbylé jamky bez PMJ2R byly doplněny na 200 µl RPMI 1640 s 10% FCS. Směsi buněk byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Pro lepší představu je na Obr. 3 znázorněn 96-U jamkový panel s přidávanými buňkami.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B											
C											
D		B16-F10				B16-F10+ f-MLF-DOPE					
E		B16-F10+ PMJ2R				B16-F10+ f-MLF-DOPE+PMJ2R					
F		B16-F10+ aktPMJ2R				B16-F10+ f-MLF-DOPE+ aktPMJ2R					
G											
H											

**Obr. 3:** 96-U jamkový panel s přidávanými buňkami. Buňky nádorové (B16-F10), neaktivované makrofágy (PMJ2R), aktivované makrofágy (aktPMJ2R) a ligand (f-MLF-DOPE).



#### 4.9.7.2 Příprava buněk pro FACS analýzu

Po uplynutí dvou hodin inkubace byla směs buněk 2x promyta RPMI 1640 bez séra centrifugací (2 min/4 °C/424g). Z důvodů možné adheze buněk B16-F10 ke stěnám jamek v době inkubace byl obsah jamek ztrypsinizován 5 minut při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře (trypsinizační směs - 0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS byla přidána v množství 50 µl do každé jamky). Trypsinizace byla zastavena přidáním 150 µl RPMI 1640 s 10% FCS na jamku, směs byla důkladně promíchána a promyta centrifugací (2 min/4 °C/424g). Suché pelety v jamkách s PMJ2R (tzn. jamky E2 - E9 a F2 - F9 viz Obr. 3) byly barveny 20 minut při 4 °C ve tmě anti-CD45-APC v koncentraci 2 µg/ml RPMI 1640 s 10% FCS v celkovém objemu 10 µl na jamku. Do zbývajících jamek bez PMJ2R (tzn. jamky D2 - D9 viz Obr. 3) bylo přidáno 10 µl RPMI 1640 s 10% FCS pro zachování stejných podmínek. Po obarvení následovalo 2x promytí 150 µl RPMI 1640 na jamku centrifugací (2 min/4 °C/424g). Buňky byly dále obarveny PI (propidium jodid) ve výsledné koncentraci 5 µl/ml RPMI 1640 bez séra v celkovém objemu 150 µl na jamku. Zde nebylo PI přidáno do jamek D1, D6, E1, E6, F1, F6 (tedy vždy prvních jamek ze skupiny různých směsí buněk), tyto jamky sloužily jako kontrola pro vyloučení cytotoxického vlivu samotného PI. Barvení probíhalo 5 minut při 4 °C ve tmě. Následovalo promytí buněk centrifugací (2 min/4 °C/424g) a doplnění jamek 150 µl RPMI 1640 s 10% FCS.

Vzorek byl připraven pro měření na průtokovém cytometru (BD FACSCantoII flow cytometer, BD Biosciences, USA). Po správném nastavení přístroje viz Tab. IV, byla mikrotitrační destička vložena do přístroje a za pomoci automatického podavače vzorků (HTS) změřena. Přístroj byl nastaven na zaznamenání 10 milionů událostí, což zajistilo zaznamenání všech buněk v požadovaném objemu vzorku (Sample volume) 30 µl. Pro získání počtu všech buněk v jamce (150 µl) bylo množství v 30 µl znásobeno 5x. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3.

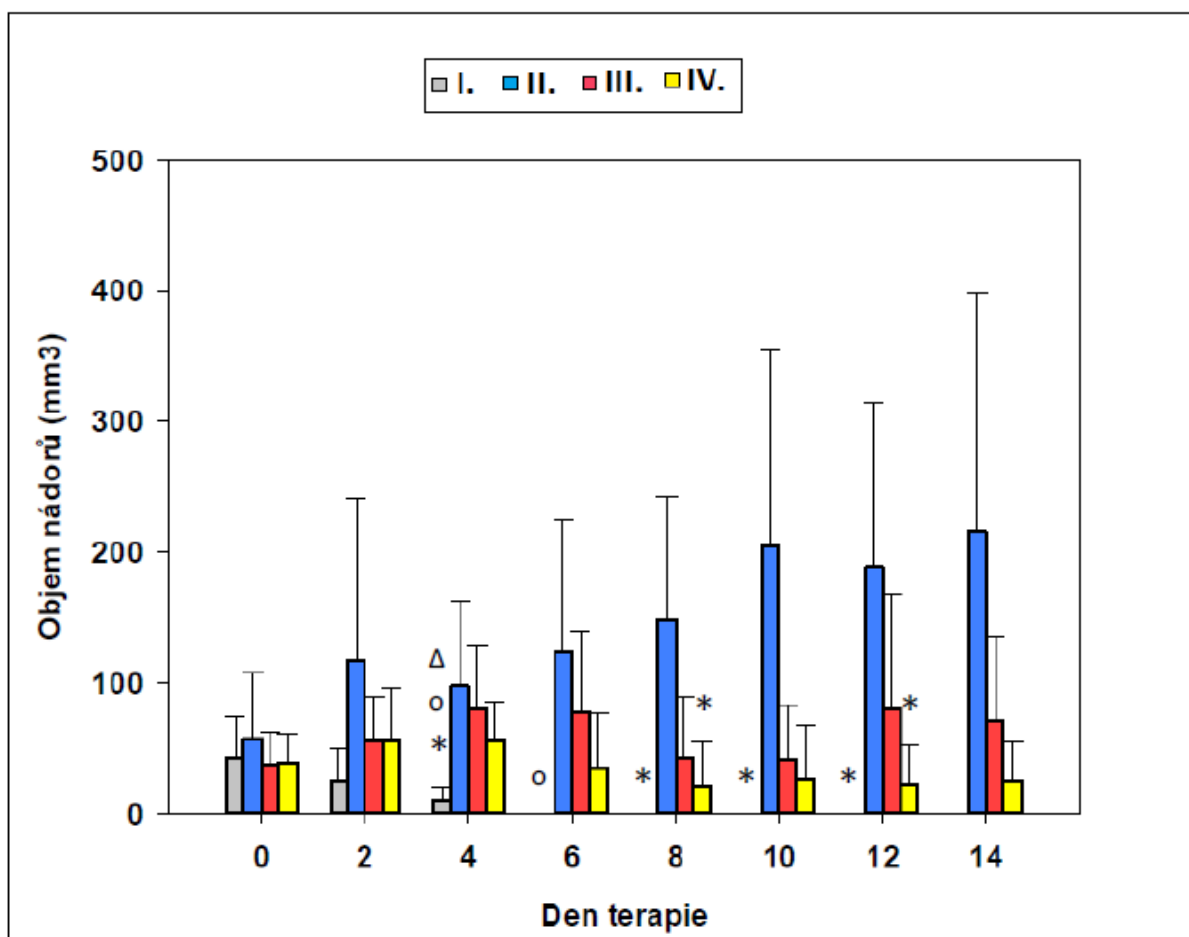
**Tab. IV:** Nastavení průtokového cytometru

Nastavení laserů		Nastavení HTS	
Window Extension	2,0	Sample Flow Rate	1,0
FSC Area Scaling	0,3	Sample Volume (μl)	30,0
Laser Delay Blue	0,0	Mixing Volume (μl)	100,0
Laser Delay Red	30,0	Mixing Speed	100,0
Area Scaling Blue	0,7	Number of Mixes	5,0
Area Scaling Red	1,3	Wash Volume (μl)	400,0
<b>Kompenzace APC k PE Texas Red</b>			10,0

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Terapie sarkomu pomocí f-MLF-(G)5-(K)10-STE a případná synergie s LPS

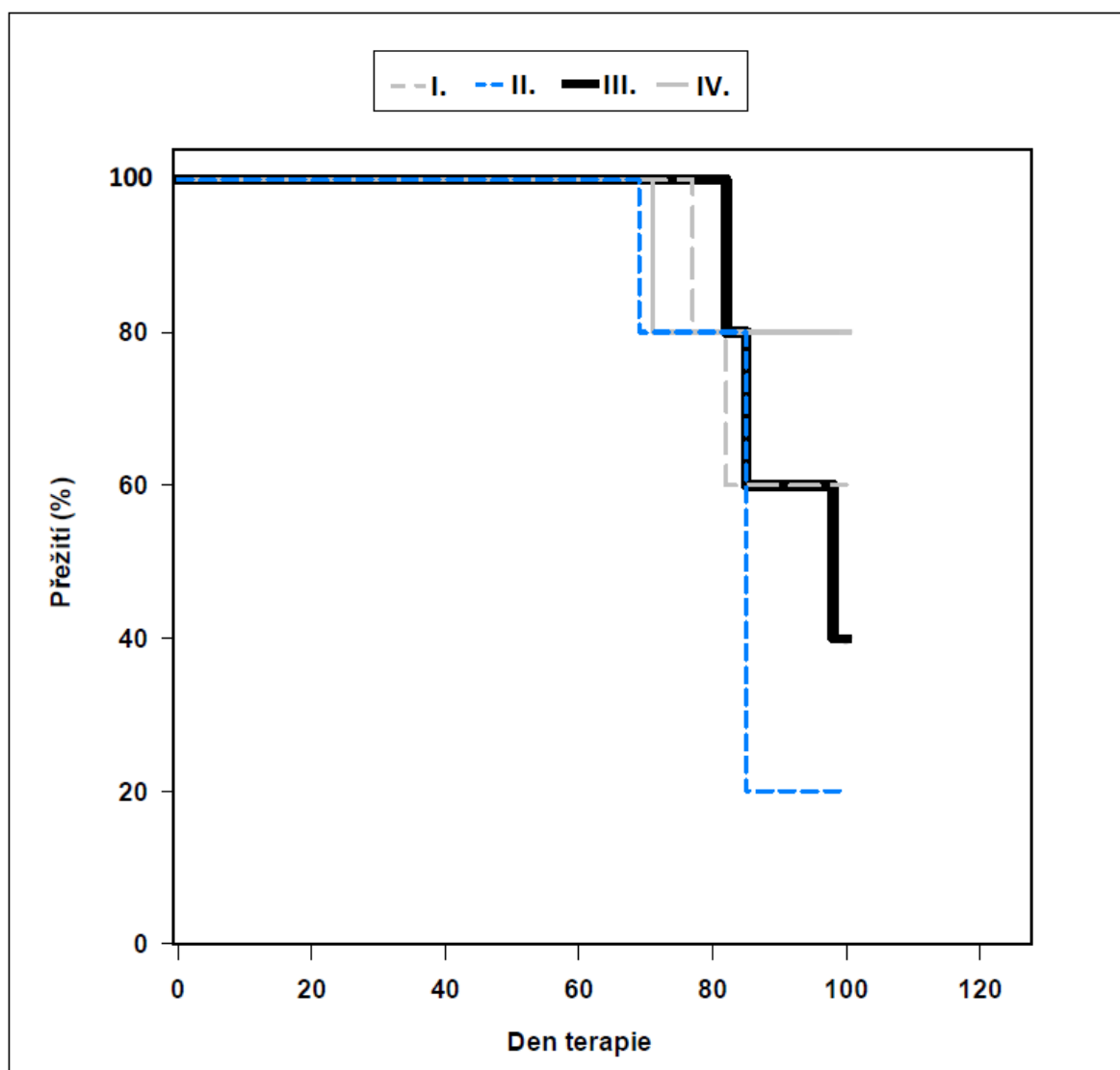
Na Obr. 4 je znázorněn vliv léčby na redukci růstu sarkomů. U skupiny, které bylo podáváno samotné f-MLF-(G)5-(K)10-STE (skupina III., červená barva viz Obr. 4) nebo samotné LPS (skupina IV., žlutá barva viz Obr. 4) byla zaznamenána jistá redukce nádorového růstu oproti kontrole (PBS), (skupina II., modrá barva viz Obr. 4), (v případě LPS přechodně statisticky významná), avšak jejich kombinace (skupina I., šedá barva viz Obr. 4) způsobila již 6. den terapie úplné vymizení sarkomů u všech myší ze skupiny a tento efekt přetrval i ve dnech následujících.



**Obr. 4:** Vliv léčby na redukci růstu sarkomů. **I.** 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE + LPS (0,5 mg/ml), **II.** PBS (kontrola), **III.** 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, **IV.** LPS (0,5 mg/ml).

\*  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině II. (kontrola), o  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině III. (3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE), Δ  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině IV. (LPS).

U myší byla sledována délka přežití. Z Obr. 5 je zřejmé, že zde neměla synergie f-MLF-(G)5-(K)10-STE s LPS žádný významný efekt na délku přežití myší. U skupiny se samotným LPS (skupina IV., šedá plná čára viz Obr 5) přežili pozorovanou hranici 100 dní čtyři jedinci, u kombinace f-MLF-(G)5-(K)10-STE + LPS (skupina I., šedá přerušovaná čára viz Obr 5) pouze tři jedinci. V tomto pokusu se hranici 100 dní podařilo přežít i jedné myši z kontrolní skupiny (skupina II., modrá přerušovaná čára viz Obr 5), u které 10. den terapie nádor zcela vymizel.



**Obr. 5:** Vliv terapie na délku přežití myší. **I.** 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE+ LPS (0,5 mg/ml), **II.** PBS, **III.** 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, **IV.** LPS (0,5 mg/ml).

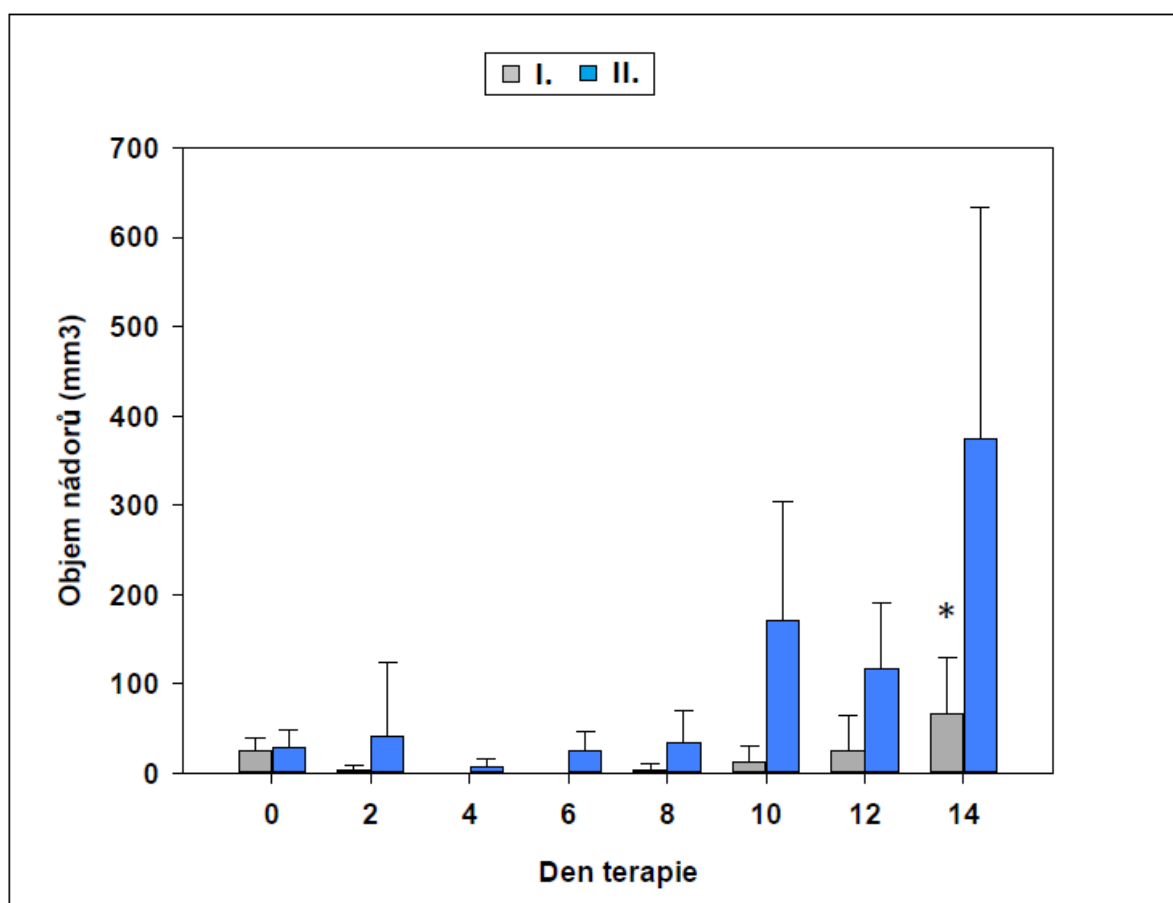
## 5.2 Léčba melanomu pomocí dvou různých režimů aplikace f-MLF KK-SMCC + LPS

V tomto experimentu byla k terapii melanomu použita látka f-MLF KK-SMMC v kombinaci LPS. Terapeutická látka byla u každé skupiny použita v jiném časovém režimu. V případě skupiny I. se jednalo o pulzní typ režimu. V případě skupiny II. byla látka aplikována v den 0 a pak pouze v těch dnech, kdy se znovu objevil nádor (viz. Tab. V).

**Tab. V:** Aplikace terapeutické látky pěti myším ze skupiny II. dle aplikačního režimu den 0, pak jen při znovuobjevení nádoru. Označení **T** pro aplikaci terapeutické látky v daný den u dané myši.

		Myši ze skupiny II.				
		Myš 1	Myš 2	Myš 3	Myš 4	Myš 5
Den terapie	0. den	T	T	T	T	T
	1. den	T	T	T	T	T
	2. den			T	T	T
	3. den			T	T	T
	4. den			T	T	T
	5. den				T	T
	6. den		T		T	T
	7. den				T	
	8. den			T	T	T
	9. den		T	T	T	T
	10. den		T	T	T	T
	11. den		T	T	T	T
	12. den		T	T	T	T
	13. den		T	T	T	T
	14. den		T	T	T	T

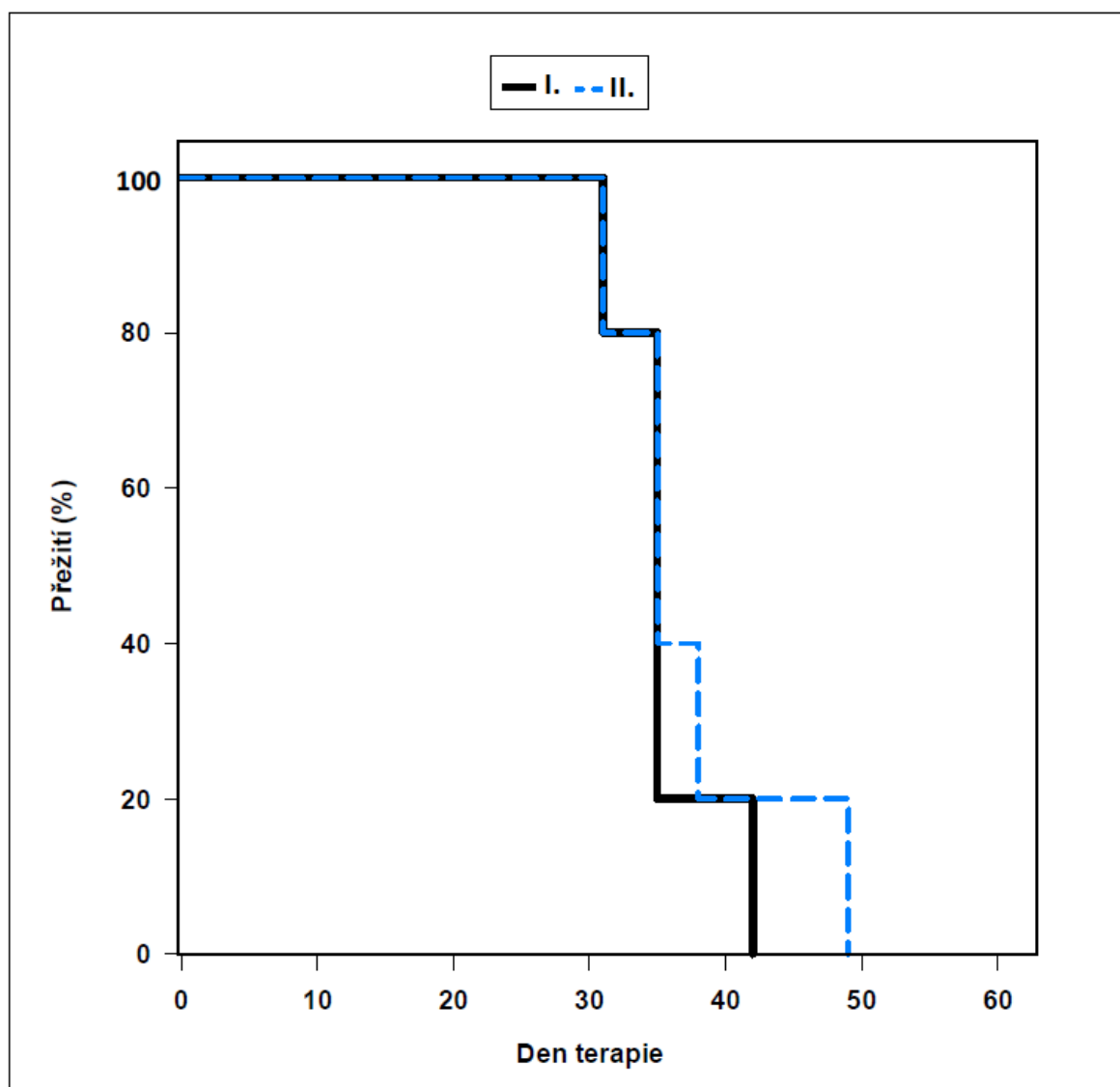
Z Obr. 6 vyplývá, že skupina, které byla látka podávána v pulzním režimu (skupina I., šedá barva viz Obr. 6) vykazovala pomalejší růst nádorů nežli skupina druhá s režimem aplikace 0 a pak jen při znovuobjevení nádoru (skupina II., modrá barva viz Obr. 6). Čtrnáctý den terapie byla zaznamenána statistická významnost redukce nádorového růstu oproti skupině II.



**Obr. 6:** Vliv režimu terapie na redukci růstu melanomu. **I.** 0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5 mg/ml), režim terapie: dne 0,1,2, -pauza- den 8,9,10, -pauza- den 16,17,18, -pauza- den 24,25,26, **II.** 0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5mg/ml), režim terapie: den 0, pak jen při znovuobjevení nádoru.

\*  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině II. (0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5mg/ml), režim terapie: den 0, pak jen dle potřeby při znovuobjevení nádoru).

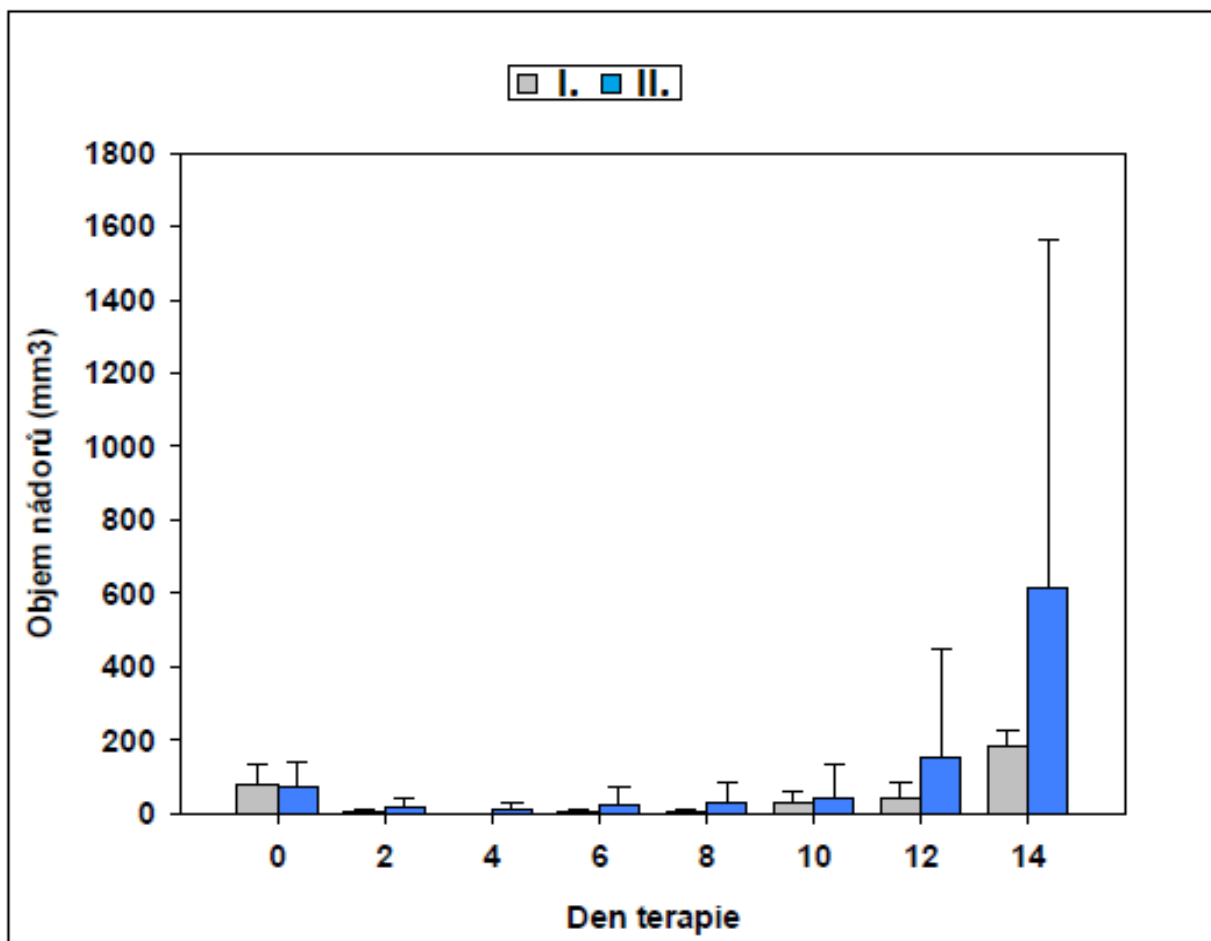
U myší byla sledována délka přežití. Z Obr. 7 vyplývá, že zde nedošlo k žádnému významnému prodloužení přežití ani u jedné ze skupin, žádná z myší se nedožila sledované hranice 100 dní. Režim terapie u skupiny I. a II. nemá tedy vliv na délku přežití myší.



**Obr. 7:** Vliv režimu terapie na délku přežití myší. **I.** 0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5 mg/ml), režim terapie: dne 0,1,2, -pauza- den 8,9,10, -pauza- den 16,17,18, -pauza- den 24,25,26, **II.** 0,5 mM f-MLF KK-SMCC + LPS (0,5mg/ml), režim terapie: den 0, pak jen při znovuobjevení nádoru.

### 5.3 Léčba melanomu pomocí pulzního režimu aplikace f-MLF KK-SMCC + LPS v kombinaci s (pro)enzymoterapií

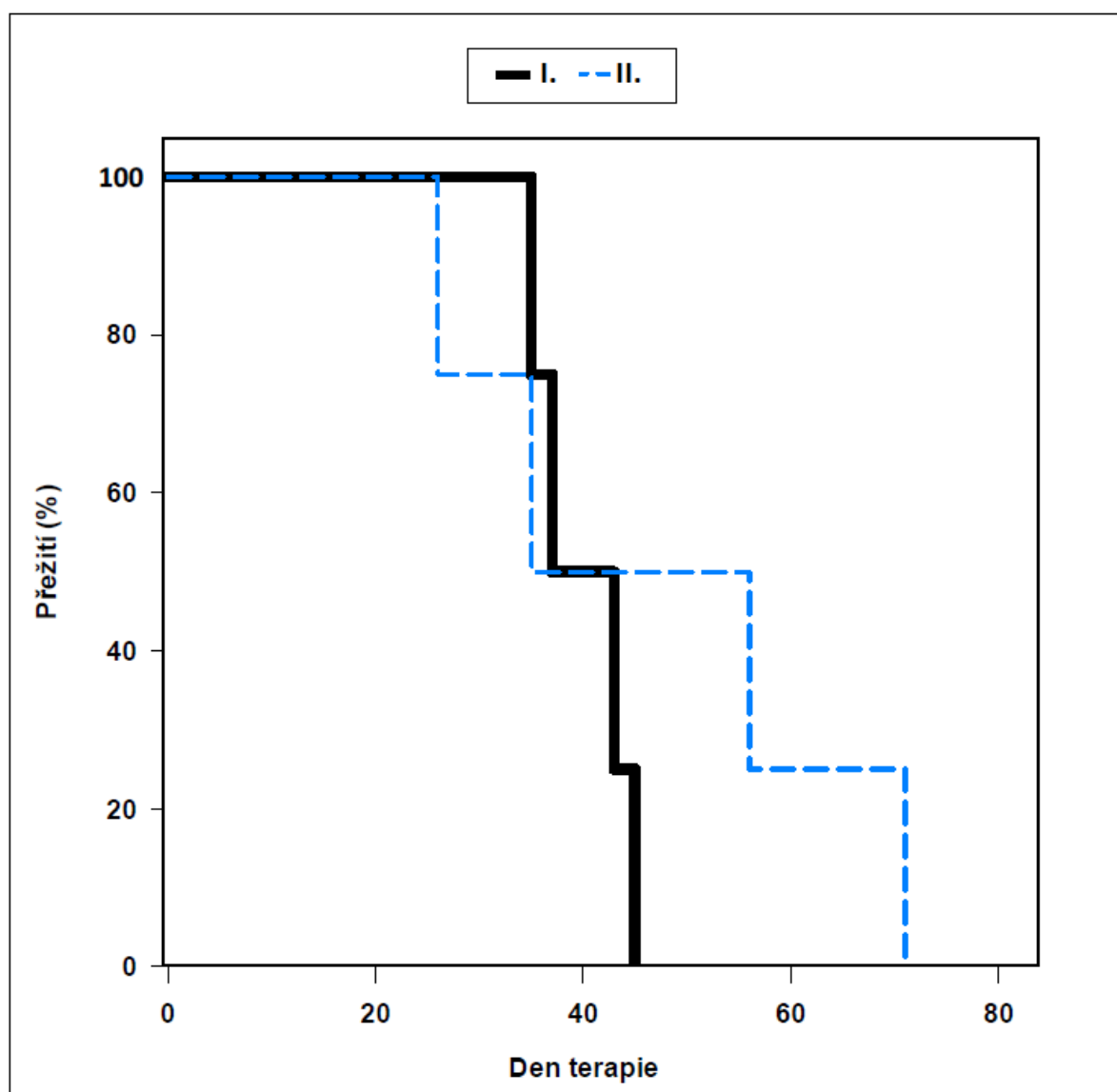
V tomto pokusu byla použita stejná terapeutická látka jako v pokusu předchozím a to f-MLF KK-SMCC + LPS. Režim aplikace byl vybrán dle výsledků předcházejícího pokusu (tzn. den 0,1,2, -pauza- den 8,9,10, -pauza- den 16,17,18, -pauza- den 24,25,26). Z Obr. 8 vyplývá, že skupina I. (šedá barva viz Obr. 8), u které nebyla léčba kombinována s (pro)enzymoterapií, vykazuje výraznější zpomalení nádorového růstu, ale rozdíly oproti skupině II. (modrá barva viz Obr. 8) nejsou statisticky významné.



**Obr. 8:** Vliv kombinace terapeutické látky s (pro)enzymoterapií. **I.** f-MLF KK-SMCC+ LPS, **II.** f-MLF KK-SMCC+ LPS kombinované s (pro)enzymoterapií.



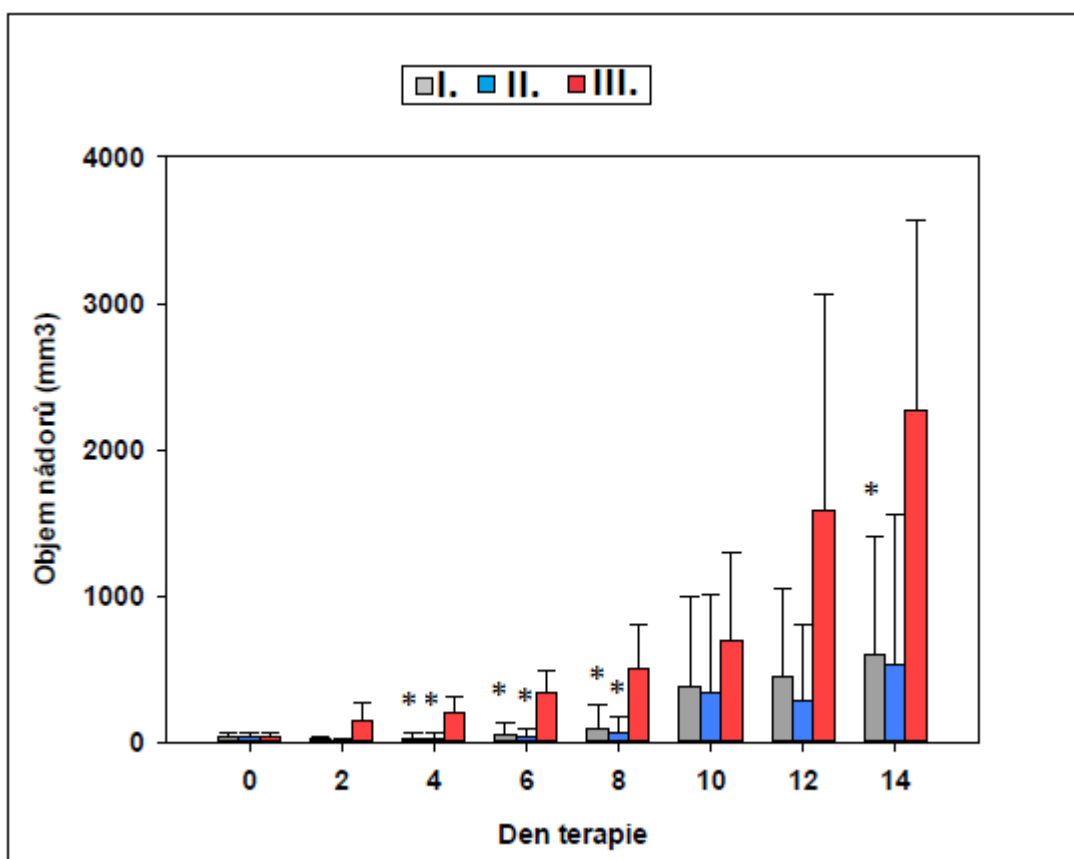
U myší byla sledována délka přežití. Z Obr. 9 vyplývá, že kombinace s (pro)enzymoterapií (skupina II., modrá přerušovaná čára viz Obr. 9) sice o trochu prodloužila přežití myší oproti skupině bez kombinace s (pro)enzymoterapií (skupina I., černá plná čára viz Obr. 9), ale žádná myš se nedožila sledované hranice 100 dní. Toto prodloužení přežití ve skupině nebylo navíc statisticky významné.



**Obr. 9:** Vliv kombinace terapeutické látky s (pro)enzymoterapií na délku přežití myší. **I.** f-MLF KK-SMCC + LPS, **II.** f-MLF KK-SMCC + LPS kombinované s (pro)enzymoterapií.

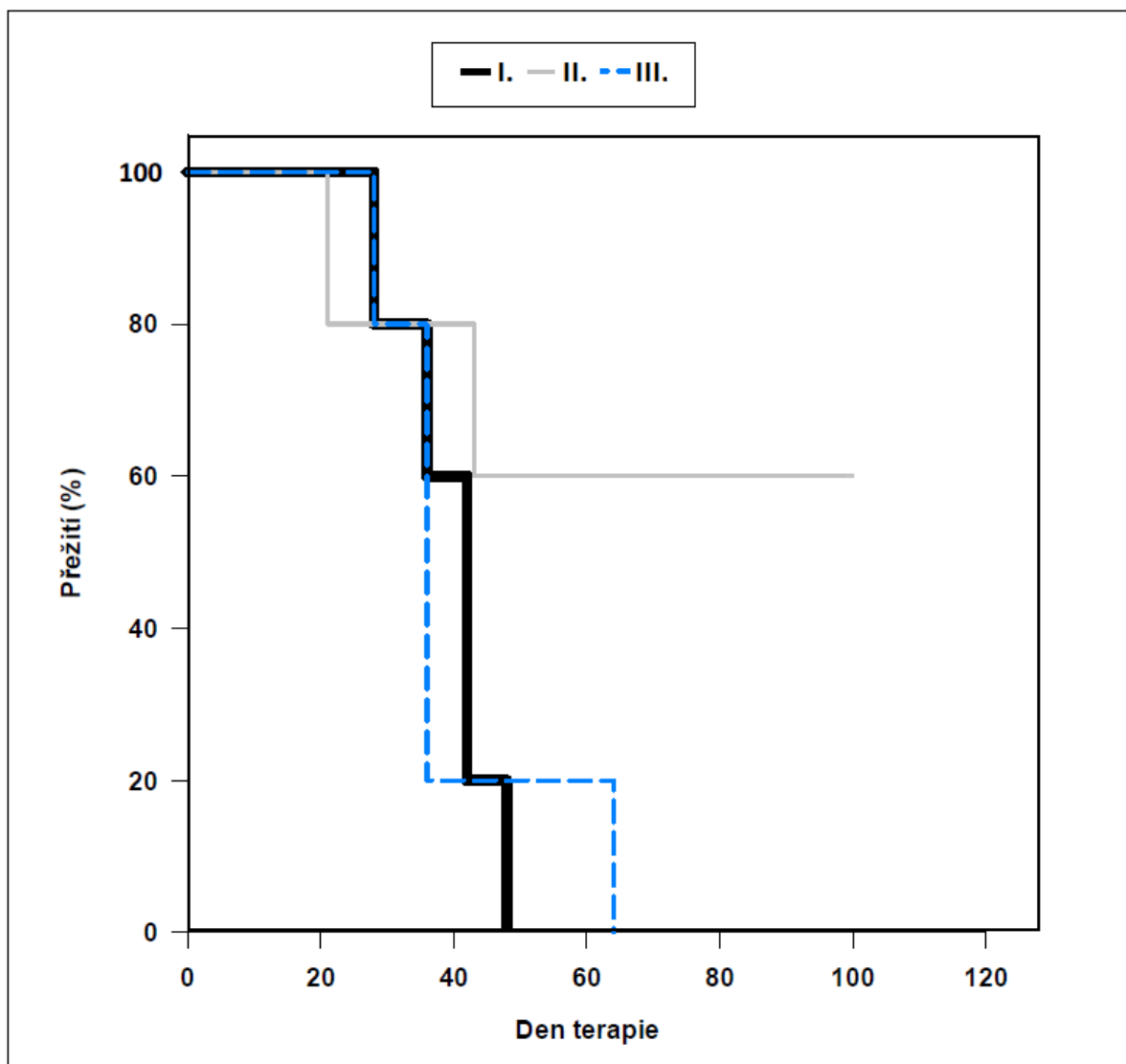
## 5.4 Léčba melanomu pomocí aplikace f-MLF KK + LPS v intenzivním pulzním režimu za použití dvou různých kotvidel (BAM a DOPE)

V tomto experimentu byla použita k léčbě melanomu terapeutická látka f-MLF KK + LPS v intenzivním pulzním režimu za použití dvou různých kotev (BAM, DOPE). Z obr. 10 je zřejmé, že podávání f-MLF KK + LPS s obojím kotvením (BAM či DOPE) vykazovalo ve dnech 4, 6 a 8 statisticky významnou redukci nádorového růstu oproti kontrole PBS (skupina III., červená barva viz Obr. 10). Ve dnech následujících se rychlost růstu melanomu zvýšila ale ještě 14. den terapie byla zaznamenána statistická významnost redukce růstu u skupiny s kotvením BAM oproti kontrole. Porovnáme-li mezi sebou účinnost kotvení BAM (skupina I., šedá barva viz Obr. 10) a DOPE (skupina II., modrá barva viz Obr. 10) zjistíme, že nevykazovala v redukci růstu melanomu žádné významné rozdíly.



**Obr. 10:** Vliv použití různého typu kotvení f-MLF KK k nádorovým buňkám (BAM a DOPE) na redukci růstu melanomu. **I.** f-MLF KK-BAM + LPS, **II.** f-MLF KK-DOPE + LPS **III.** PBS.  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině III. (kontrola, PBS).

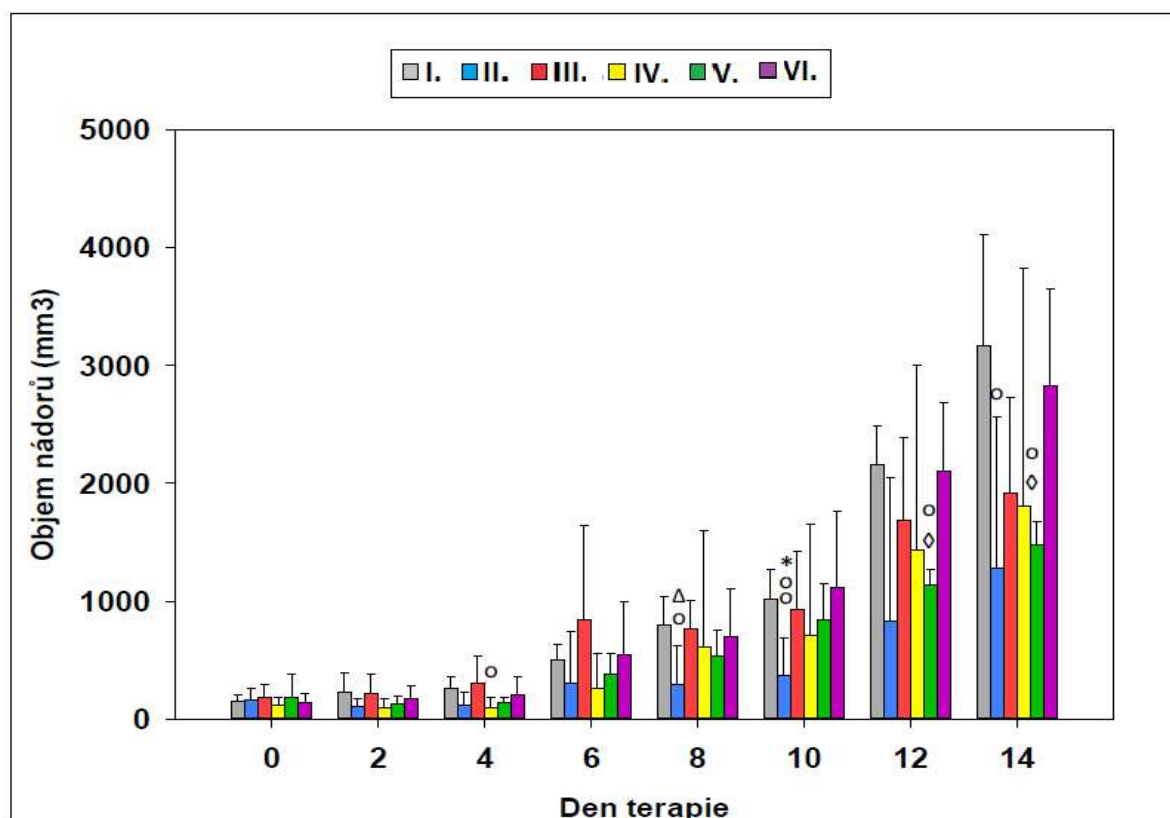
U myši byla sledována délka přežití, která je zaznamenána na Obr. 11. Ačkoli redukce nádorového růstu nebyla na způsobu kotvení (BAM či DOPE) závislá, bylo zde zaznamenáno prodloužení přežití myši u skupiny s kotvením DOPE (skupina II., šedá plná čára viz Obr. 11), kde přežily 3 myši hranici 100 dní.



**Obr. 11:** Vliv použití různého typu kotvení f-MLF KK k nádorovým buňkám (BAM a DOPE) v intenzivním pulzním režimu na délku přežití myši. **I.** f-MLF KK-BAM + LPS, **II.** f-MLF KK-DOPE + LPS, **III.** PBS.

## 5.5 Léčba melanomu pomocí aplikace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v kombinaci s LPS, snaha o náhradu MPL za LPS

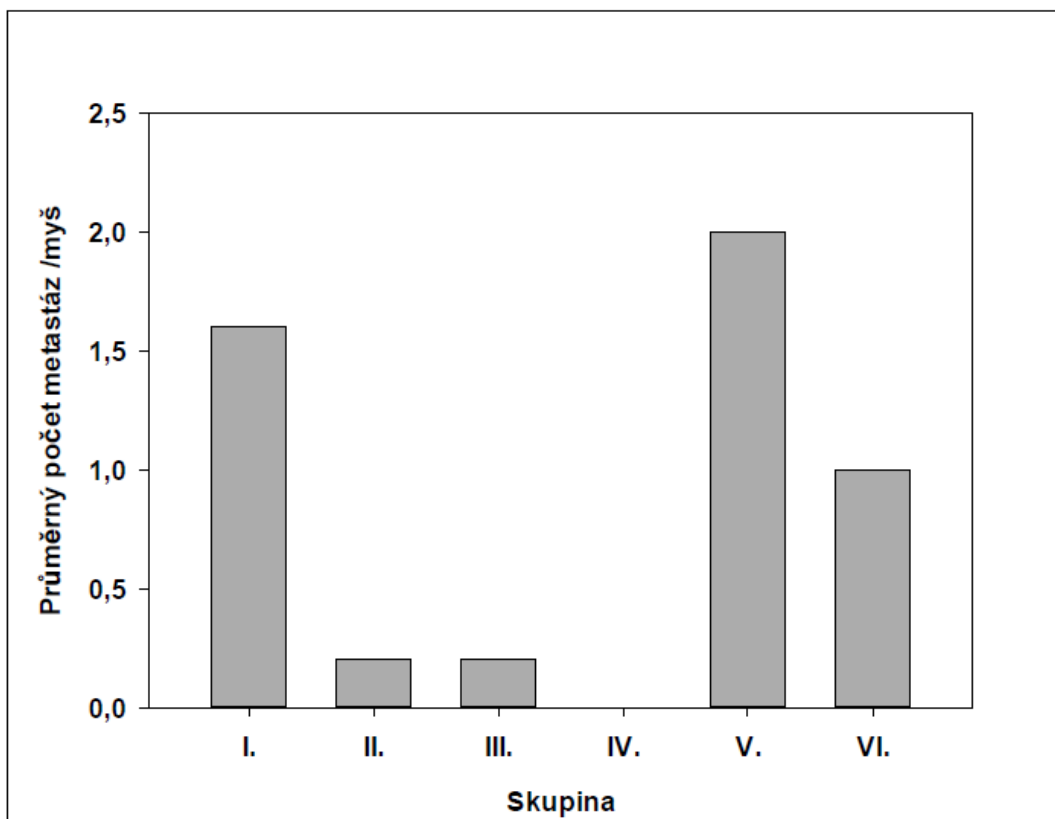
V tomto pokusu byla k léčbě melanomu použita terapeutická látka f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v kombinaci s LPS nebo s MPL. Na Obr. 12 je vidět, že kombinace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s LPS (skupina II., modrá barva viz Obr. 12) vykazovala ve dnech 8, 10 a 14 statisticky významnou redukci nádorového růstu oproti samotnému f-MLFG<sub>6</sub>K (skupina I., šedá barva viz Obr. 12). Jeho kombinace s MPL (skupina III., červená barva viz Obr. 12) nezpůsobila statisticky významnou redukci nádorového růstu. Podávání samotného MPL (skupina V., zelená barva viz Obr. 12) vykazovalo 12. a 14. den léčby statisticky významnou redukci nádorového růstu oproti kontrole PBS (skupina VI, fialová barva viz Obr. 12).



**Obr. 12:** Vliv použití f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v kombinaci s LPS nebo MPL na redukci nádorového růstu. **I.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE, **II.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + LPS (0,2 mg/ml), **III.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + MPL (0,2 mg/ml), **IV.** LPS (0,2 mg/ml), **V.** MPL (0,2 mg/ml), **VI.** PBS.

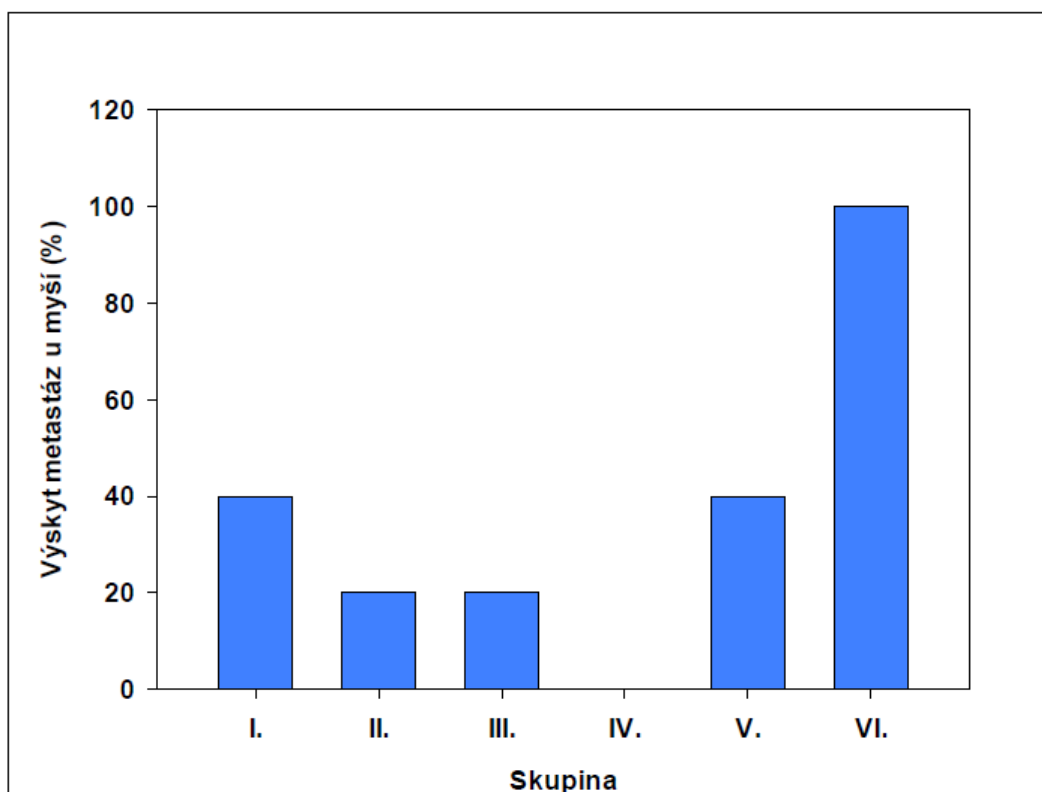
o  $P \leq 0,05$ , oo  $P \leq 0,01$  vztaženo ke skupině I. (f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE) ◇  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině VI. (PBS), Δ  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině III. (f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE+MPL), \*  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině V. (MPL).

Na Obr. 13 je uvedena intenzita metastázování, vyjádřená jako průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. Metastázy byly nejvíce potlačeny samotným LPS (skupina IV. viz Obr. 13), dále pak jeho kombinací s f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s LPS (skupina II. viz Obr. 13) a kombinací f- MLFG<sub>6</sub>K- DOPE s MPL (skupina III. viz Obr. 13).



**Obr. 13:** Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. **I.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE, **II.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + LPS (0,2 mg/ml), **III.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + MPL (0,2 mg/ml), **IV.** LPS (0,2 mg/ml), **V.** MPL (0,2 mg/ml), **VI.** PBS.

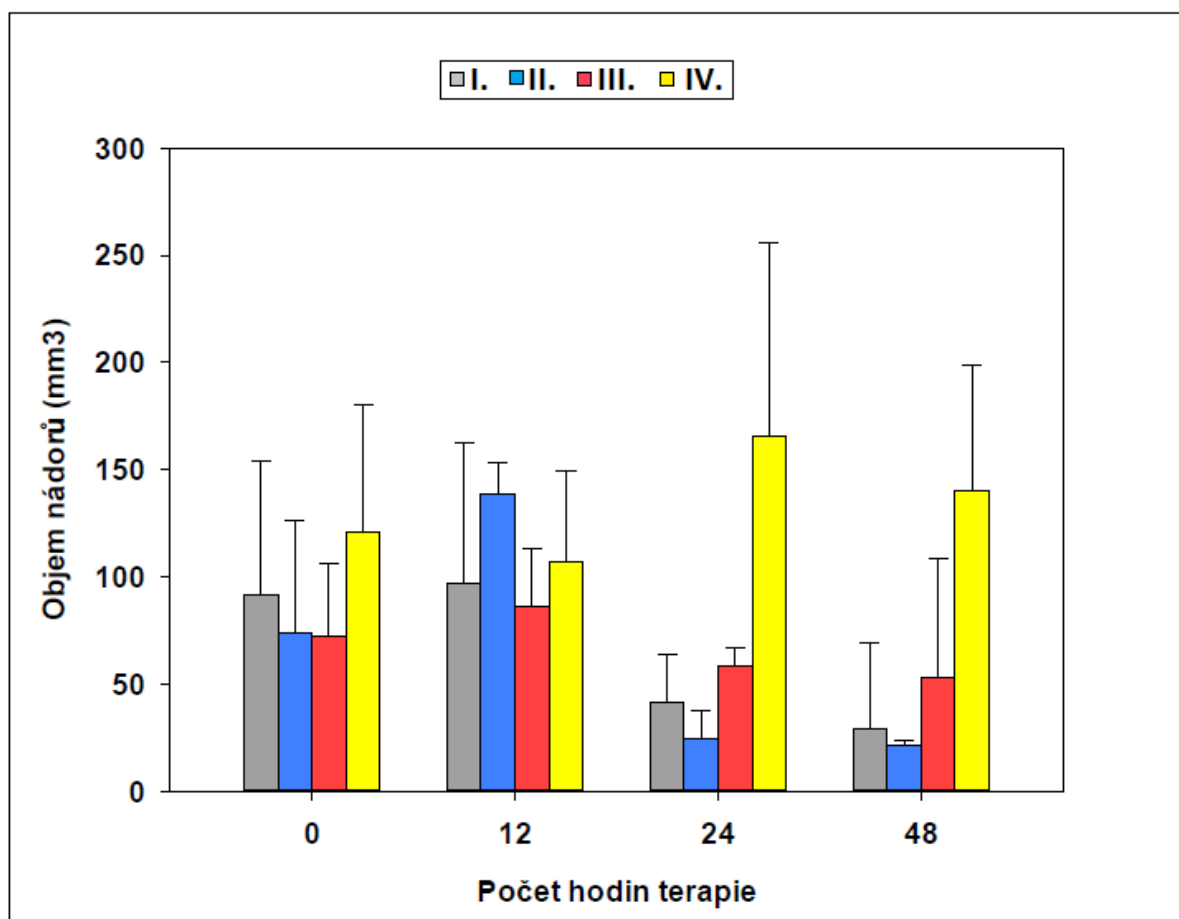
Na Obr. 14 je znázorněna prevalence metastáz u myší v jednotlivých skupinách. Zde je vidět, že kontrolní skupina (skupina VI. viz Obr. 14) dosahovala nejvyšších hodnot, metastázy se vyskytovaly u všech myší. Použití f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v kombinaci s LPS (skupina II. viz Obr. 14) nebo MPL (skupina III. viz Obr. 14) vykazovalo lepší výsledky než f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE samotné (skupina I. viz Obr. 14). Ve skupině léčené samotným LPS (skupina IV. viz Obr. 14) se metastázy nevyskytly vůbec.



**Obr. 14:** Výskyt metastáz u myší v jednotlivých skupinách. **I.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE, **II.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + LPS (0,2 mg/ml), **III.** 0,5 mM f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE + MPL (0,2 mg/ml), **IV.** LPS (0,2 mg/ml), **V.** MPL (0,2 mg/ml), **VI.** PBS.

## 5.6 Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu po aplikaci terapeutické látky f-MLF-BAM

V následujícím pokusu byla sledována infiltrace leukocytů a jejich subpopulací do nádorové tkáně v závislosti na typu léčby. Na Obr. 15 je zaznamenán vliv jednotlivých terapeutických látek na redukci nádorového růstu. Je patrné, že u skupiny, které bylo podáváno LPS (skupina I., šedá barva viz Obr. 15) a f-MLF-BAM samotné (skupina II., modrá barva viz Obr. 15) i jejich kombinace (skupina III., červená barva viz Obr. 15) došlo ve 48 hodinách k zmenšení nádorové masy.



**Obr. 15:** Vliv léčby na redukci nádorového růstu. **I.** LPS, **II.** f-MLF-BAM, **III.** f-MLF-BAM + LPS, **IV.** PBS.

Na Obr. 16 byla sledována infiltrace **CD45+** buněk (leukocytů), **GR1+** buněk (granulocytů), **NK1.1+** buněk (NK buněk), **F4/80+** buněk (monocytů/ makrofágů), **CD3+** buněk (lymfocytů), **CD4+** buněk (Th-lymfocytů), **CD8+** buněk (Tc-lymfocytů) a **CD19+** buněk (B-lymfocytů) do nádoru v závislosti na typu léčby.

Ve 24 hodinách bylo zaznamenáno zvýšení infiltrace leukocytů (**CD45+**) u všech pozorovaných skupin. U skupiny se samotným LPS (skupina I., šedá barva viz Obr. 16) došlo ke kulminaci infiltrace **CD45+** buněk ve 48 hodinách, zatím co u skupiny, kde bylo LPS kombinováno s f-MLF-BAM (skupina III., červená barva viz Obr. 16) byl vrchol infiltrace již ve 24 hodinách. Žádná synergie f-MLF-BAM s LPS zde není pozorovatelná, nárůst infiltrace u skupiny f-MLF-BAM + LPS (skupina III., červená barva viz Obr. 16) oproti skupině f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16) byl po 48 hodinách zřejmě způsoben složkou LPS.

Následuje zhodnocení zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů.

**GR1+** buňky (granulocyty) tvořily hlavní složku leukocytárního infiltrátu. Ve 24 a 48 hodinách dochází k vzestupu infiltrace u skupin LPS (skupina I., šedá barva viz Obr. 16) a f-MLF-BAM + LPS (skupina III., červená barva viz Obr. 16). I zde můžeme pozorovat ten samý trend jako v případě **CD45+** buněk, kdy kombinace f-MLF-BAM s LPS zapříčinila dřívější vrchol infiltrace nežli samotné LPS. Celkové množství infiltrátu je však u obou skupin v průběhu 48 hodin téměř shodné. Mírný vzestup množství **GR1+** buněk u kontrolní skupiny (skupina IV., žlutá barva viz Obr. 16) ve 12 hodinách byl pravděpodobně následek vpichu PBS do nádoru (trauma).

**NK1.1+** buňky (NK buňky) migrovaly do nádoru nejvíce ve 24 hodinách u skupiny se samotným f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16) a u skupiny s PBS (skupina IV., žlutá barva viz Obr. 16). Příčinou tohoto jevu u kontrolní skupiny bylo pravděpodobně opět trauma po vpichu. Zajímavé je, že zde kombinace f-MLF-BAM s LPS (skupina III., červená barva viz Obr. 16) nevyvolala takové množství infiltrace jako f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16) samotné. Celkové množství buněk je zde relativně malé oproti granulocytům.

U **F4/80+** buněk (monocyty/ makrofágy) došlo v prvních 12 hodinách k mírnému poklesu počtu u všech skupin. Nejvyšších hodnot dosahovala infiltrace ve 48 hodinách u skupiny kontrolní (skupina IV., žlutá barva viz Obr. 16). I zde jako u **NK1.1+** buněk



vykazovala skupina se samotným f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16) o něco vyšší hodnoty nežli skupina s kombinací f-MLF-BAM a LPS (skupina III., červená barva viz Obr. 16). U skupiny f-MLF-BAM + LPS (skupina III., červená barva viz Obr. 16) dosahovala infiltrace svého maxima již ve 24 hodinách na rozdíl od skupiny LPS (skupina I., šedá barva viz Obr. 16) a samotného f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16), které svého maxima dosáhly později.

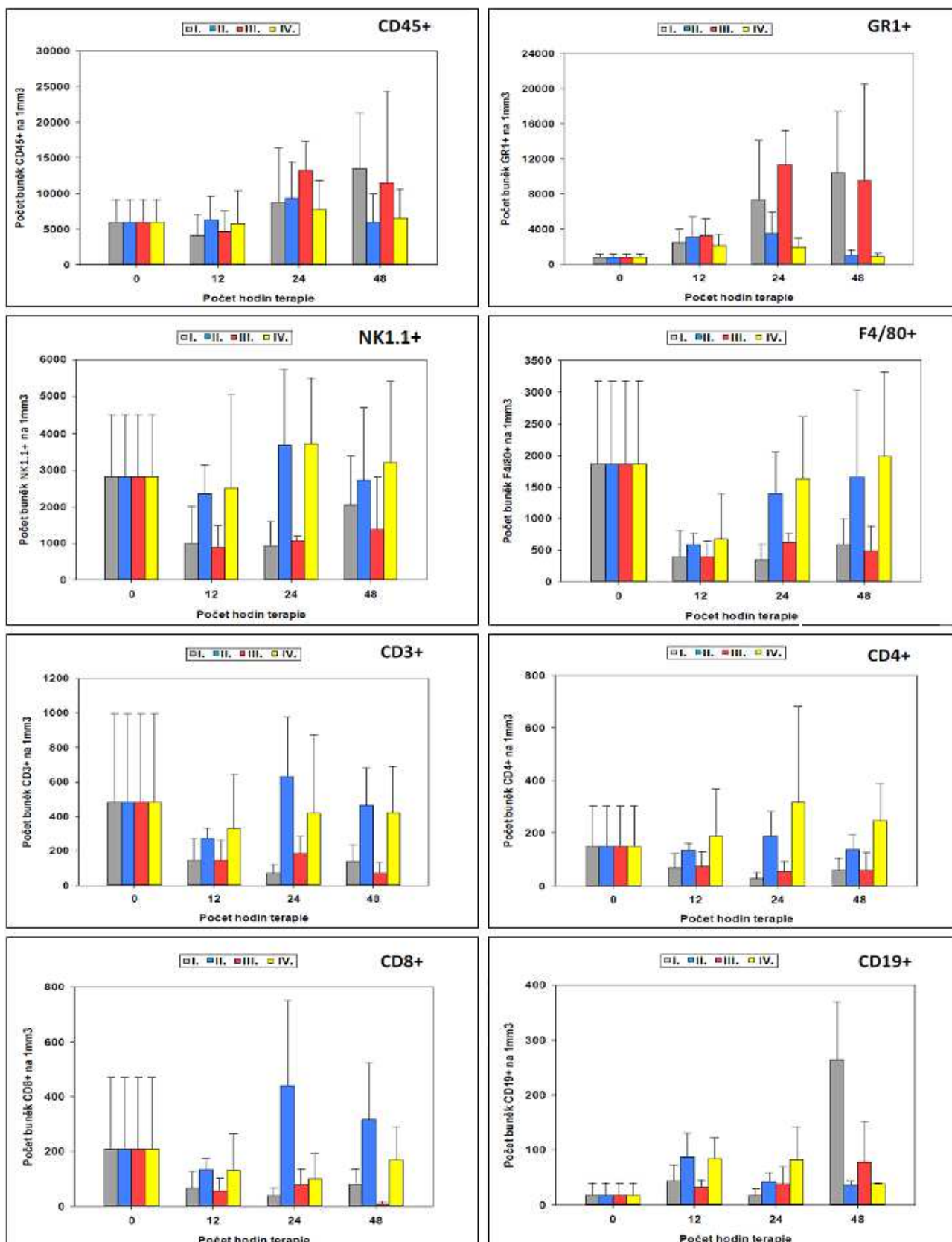
**CD3+** buňky představují lymfocyty. V prvních 12 hodinách došlo k mírnému úbytku lymfocytů u všech skupin. Ve 24 hod hodnoty u skupiny s LPS (skupina I., šedá barva viz Obr. 16) ještě o něco klesly, naopak u skupiny se samotným f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16) dosahoval infiltrát nejvyšších hodnot. Celkově se však jednalo o velmi malé počty lymfocytů.

Dále je ukázáno zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů:

U **CD4+** buněk (Th lymfocyty) se pohybujeme ve velmi nízkých hodnotách (v řádech stovek). K významnějším změnám v infiltraci došlo po 24 hodinách u skupiny kontrolní (skupina IV., žlutá barva viz Obr. 16) a svého maxima zde dosahuje i skupina se samotným f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16).

**CD8+** buňky (Tc lymfocyty) jsou hodnoty infiltrace také v řádech stovek, proto nemají výsledky velkou výpovědní hodnotu. Maxima infiltrace bylo dosaženo po 24 hodinách u skupiny se samotným f-MLF-BAM (skupina II., modrá barva viz Obr. 16), kde se hodnota oproti času 0 zdvojnásobila. Po 48 hodinách došlo k výraznějšímu poklesu infiltrace u skupiny f-MLF-BAM + LPS (skupina III., červená barva viz Obr. 16).

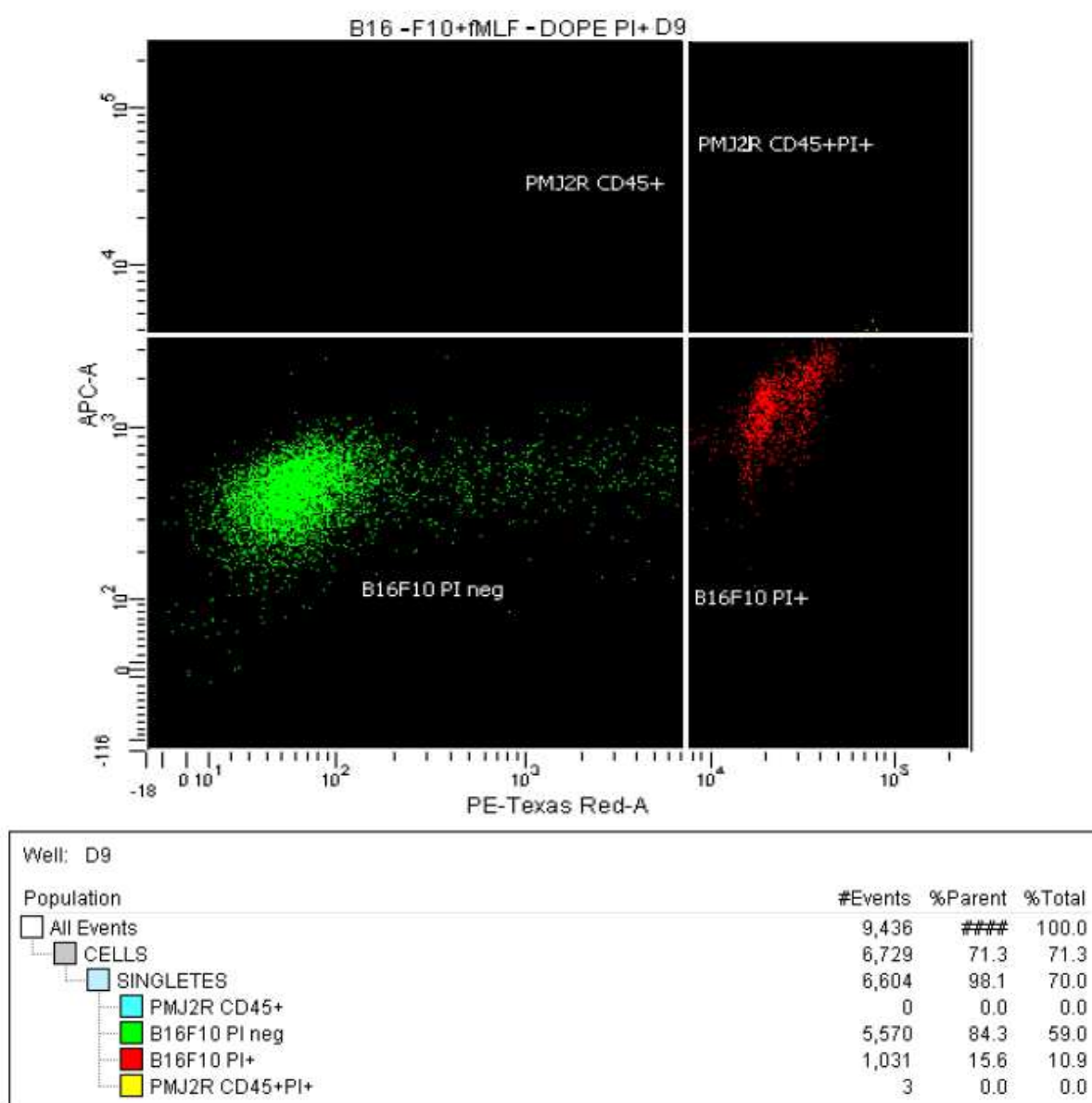
**CD19+** buňky (B-lymfocyty) jsou buňky významné pro tvorbu specifických protilátek. Z Obr. 16 je zřejmé, že se boje s nádorovými buňkami prvních 24 hodin moc neúčastní. Celkové zaznamenané hodnoty byly velmi nízké a nelišily se nijak výrazně u žádné ze skupin. Jediná výraznější změna ve velikosti infiltrace nastala po 48 hodinách u skupiny LPS (skupina I., šedá barva viz Obr. 16), kde množství buněk vzrostlo 15x oproti času 0. Z důvodu nízkého počtu buněk, nelze vyvozovat žádné závěry.



**Obr. 16:** Infiltrace **CD45+** buněk, **GR1+** buněk, **NK1.1+** buněk, **F4/80+** buněk, **CD3+** buněk **CD4+** buněk, **CD8+** buněk a **CD19+** buněk do nádoru v závislosti na typu léčby: **I.** LPS, **II.** f-MLF-BAM, **III.** f-MLF-BAM + LPS, **IV.** PBS.

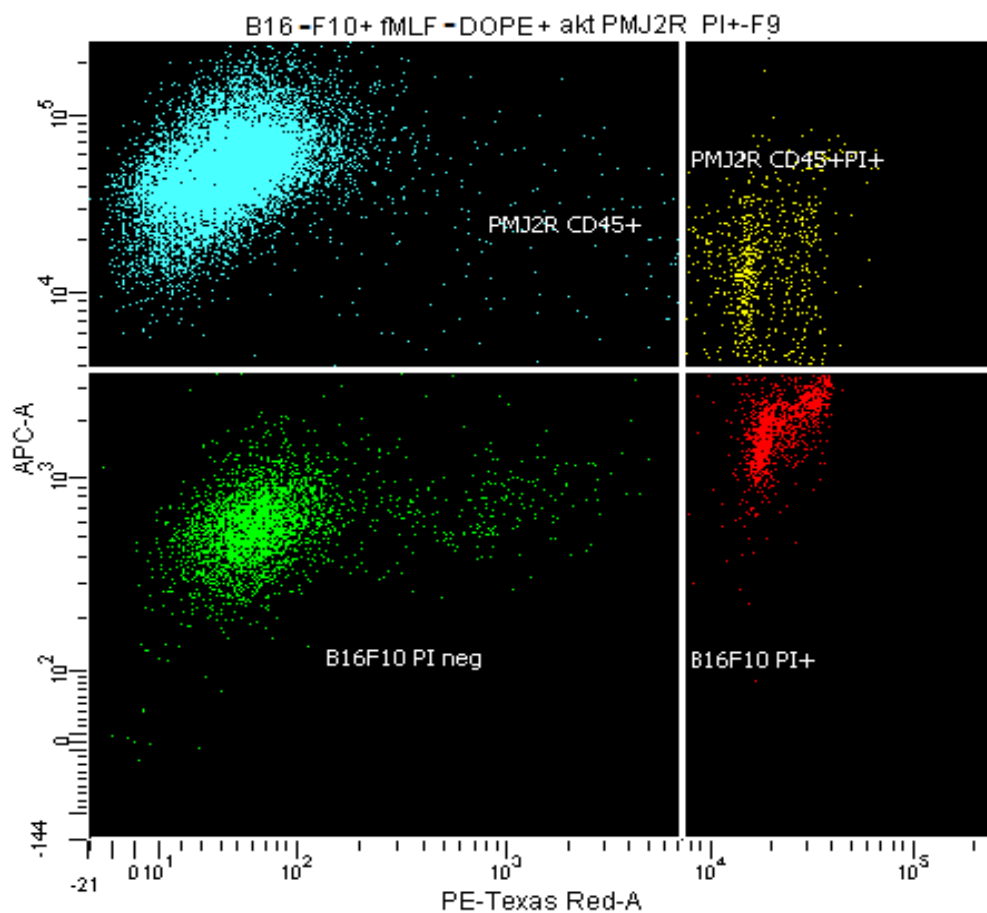
## 5.7 Ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy (cytotoxický test CD45+/ PI) na ligandu f-MLF-DOPE

Výstupem analýzy protinádorového efektu f-MLF-DOPE byla dvoubarevná FACS analýza (analýza na průtokovém cytometru), kdy PMJ2R byly barveny anti-CD45-APC a pomocí PI byly buňky dále rozděleny na živé a mrtvé PMJ2R a živé a mrtvé B16-F10. Klíčovou hodnotou pro výsledky analýzy byly živé buňky B16-F10 (B16F10 PI neg, zeleně označená populace buněk viz Obr. 17 a Obr. 18). Na Obr. 17 je jako příklad uveden výstup z FASC analýzy vzorku B16-F10 + f-MLF-DOPE (jamka D9 viz Obr. 3).



**Obr. 17:** Obrázek FACS analýzy B16-F10 + f-MLF-DOPE (filtrovaný).

Na Obr. 18 je jako příklad uveden výstup z FACS analýzy vzorku B16-F10 + f-MLF-DOPE + aktPMJ2R (aktivované PMJ2R), (jamka F9 viz Obr. 3).



Well: F9

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	33,432	####	100.0
CELLS	24,286	72.6	72.6
SINGLETES	23,683	97.5	70.8
PMJ2R CD45+	18,740	79.1	56.1
B16F10 PI neg	3,038	12.8	9.1
B16F10 PI+	1,234	5.2	3.7
PMJ2R CD45+PI+	670	2.8	2.0

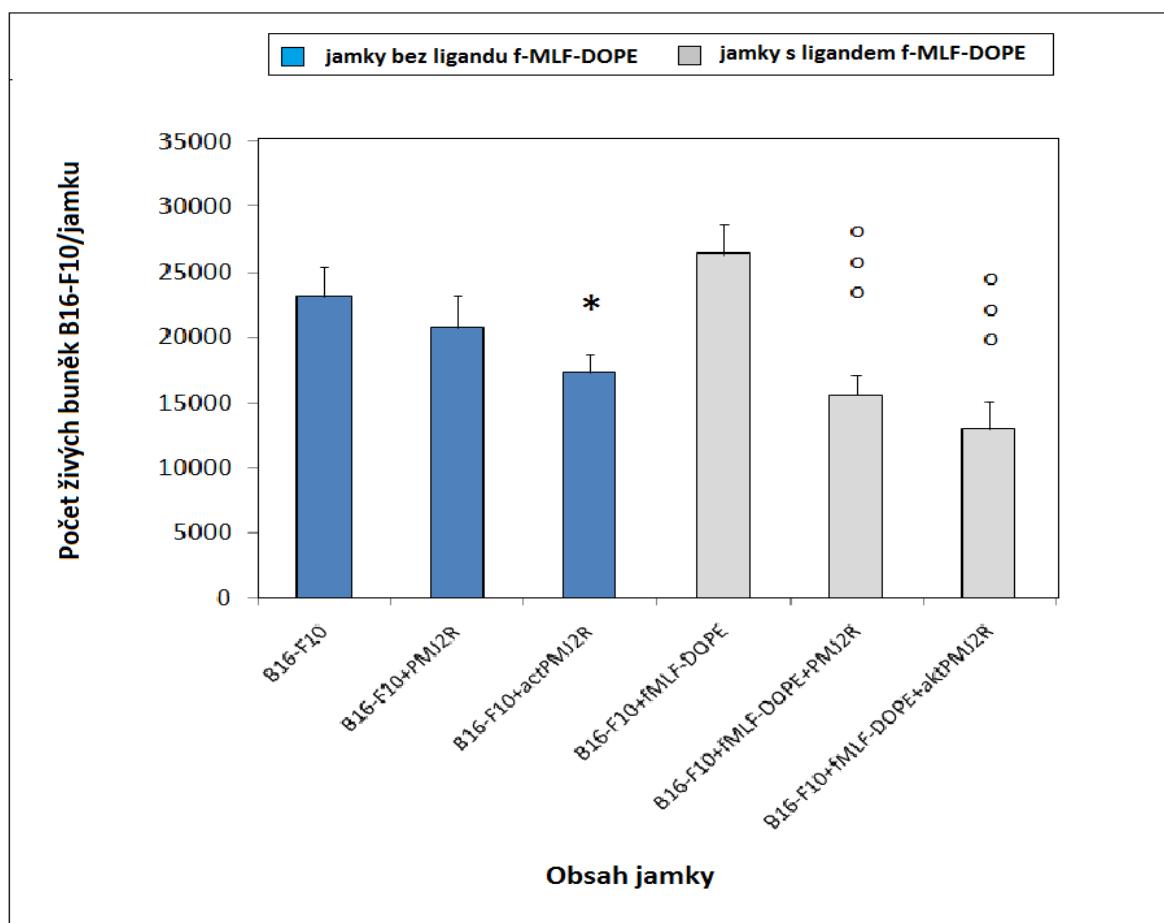
**Obr. 18:** Obrázek FACS analýzy B16-F10 + f-MLF-DOPE + aktPMJ2R (filtrovaný).

Získané hodnoty živých nádorových buněk v 30  $\mu$ l vzorku byly přepočteny na množství živých nádorových buněk v jamce (ve 150  $\mu$ l vzorku) a byly zprůměrovány ty jamky, ve kterých byl ten samý vzorek, jak je uvedeno v Tab. VI. Modrá barva znázorňuje jamky bez ligandu f-MLF-DOPE a průměrný počet živých nádorových buněk ze tří jamek se stejným vzorkem bez ligandu, šedá barva naopak jamky s ligandem f-MLF-DOPE a průměrný počet živých nádorových buněk ze tří jamek se stejným vzorkem s ligandem.

**Tab. VI:** Počet živých nádorových buněk ve 30  $\mu$ l a 150  $\mu$ l vzorku. Průměr ze tří hodnot počtu živých nádorových buněk v závislosti na přítomnosti PMJ2R (aktivovaných - akt., neaktivovaných) a na přítomnosti ligandu f-MLF-DOPE.

	Počet buněk ve 30 $\mu$ l	Počet buněk ve 150 $\mu$ l	Průměr
<b>B16-F10</b>	4 109	20 545	<b>23 105</b>
	4 910	24 550	
	4 844	24 220	
<b>B16-F10+ PMJ2R</b>	3 781	18 905	<b>20 701</b>
	4 696	23 480	
	3 944	19 720	
<b>B16-F10+ aktPMJ2R</b>	3 184	15 920	<b>17 321</b>
	3 738	18 690	
	3 471	17 355	
<b>B16-F10+ f-MLF-DOPE</b>	5 517	27 585	<b>26 390</b>
	4 747	23 735	
	5 570	27 850	
<b>B16-F10+ f-MLF-DOPE+ PMJ2R</b>	3 344	16 720	<b>15 643</b>
	2 180	14 050	
	3 232	16 160	
<b>B16-F10+ f-MLF-DOPE+ aktPMJ2R</b>	2 557	12 785	<b>12 981</b>
	2 194	10 940	
	3 038	15 190	

Na Obr. 19 je graficky znázorněno průměrné množství živých nádorových buněk B16-F10 v jednotlivých jamkách v závislosti na přítomnosti PMJ2R (aktivovaných - akt, neaktivovaných) a na přítomnosti ligandu f-MLF-DOPE. Modrá barva znázorňuje průměrný počet živých nádorových buněk v jamkách bez ligandu f-MLF-DOPE, šedá barva naopak průměrný počet živých nádorových buněk v jamkách s ligandem f-MLF-DOPE. Z grafu je patrné, že přidání PMJ2R buněk k buňkám nádorovým (B16-F10) mělo jen malý vliv na počet živých nádorových buněk (redukce počtu 10,5%), avšak při přidání aktivovaných PMJ2R byla zaznamenána statisticky významná redukce počtu živých nádorových buněk o 25,1% oproti B16-F10 bez (aktivovaných i neaktivovaných) PMJ2R. V přítomnosti samotného ligandu f-MLF-DOPE nebyla zaznamenána žádná cytotoxicita vůči buňkám B16-F10. Přidáním neaktivovaných PMJ2R k B16-F10 + f-MLF-DOPE bylo docíleno významné redukce počtu živých nádorových buněk o 40,7% oproti B16-F10 + f-MLF-DOPE. A posílením efektu přidáním aktivovaných PMJ2R (aktPMJ2R) bylo dosaženo redukce počtu živých nádorových buněk o 50,8% oproti B16-F10+ f-MLF-DOPE+ PMJ2R.



**Obr. 19:** Průměrné množství živých nádorových buněk B16-F10 v jednotlivých jamkách v závislosti na přítomnosti PMJ2R, aktPMJ2R a na přítomnosti ligandu f-MLF-DOPE.

\*  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině B16-F10, ooo  $P \leq 0,05$  vztaženo ke skupině B16-F10+fMLF-DOPE.

## 6 DISKUZE

Imunoterapie je považována za budoucnost léčby nádorových onemocnění. Nepoškozuje zdravé buňky a její zbraní v boji proti nádorům jsou buňky imunitní. V této diplomové práci s názvem "Použití agonistů FPR receptorů k terapii nádorových onemocnění" je k redukci nádorů využíván mechanismus rozpoznávání infekčních agens nespecifickou imunitou. Instalací bakteriálních motivů (v tomto případě f-MLF motivů) na nádorové buňky docílíme jejich rozpoznání pro buňky nespecifické imunity. Tato diplomová práce navazuje na dva předchozí projekty. V prvním projektu (Čunátová 2012) bylo zjištěno, že imunitní odpověď vyvolají pouze motivy f-MLF vázané na nádorové buňky, zatímco nenavázané motivy f-MLF nemají žádný efekt, to potvrzují i závěry Underhilla a Gantnera (2004). Významné bylo i zjištění synergistického působení f-MLF a LPS. To koresponduje s názorem o spolupůsobení PRRs ligandů (Underhill a Gantner 2004). Druhý projekt (Vácová 2013) se snažil o optimalizaci metody použití FPR receptorů k terapii nádorových onemocnění.

Účelem mé diplomové práce bylo doplnit stávající znalosti a pomoci nasměrovat budoucí pokusy co nejefektivnějším směrem. V prvním pokusu (terapie sarkomu pomocí f-MLF-(G)5-(K)10-STE a případná synergie s LPS) bylo cílem dokázat univerzálnost použití agonistů FPR receptorů k léčbě různých typů nádorů. Dosud byly pro tyto pokusy používány melanomové buňky (Čunátová 2012, Vácová 2013), které jsou považovány za jedny z nejagresivnějších nádorových buněk. V mém pokusu byly myším aplikovány sarkomové buňky S-180. Sarkomy jsou nádory s pomalejším růstem a nižší agresivitou než bylo pozorováno u melanomů. Běžně se hodnoty objemu nádorů u melanomu kolem 14. dne terapie u neléčené (kontrolní) skupiny pohybují v řádech tisíců  $\text{mm}^3$ , zatímco u sarkomu byly naměřeny hodnoty v řádech stovek  $\text{mm}^3$  (viz Obr. 4, skupina II., 14. den u sarkomu 215  $\text{mm}^3$ ; Obr. 10, skupina III., 14. den u melanomu 2265  $\text{mm}^3$ ). Nabízí se tedy otázka, zda bude mít na takto pomaleji rostoucí nádor terapie prostřednictvím agonistů FPR receptorů stejné účinky, jako tomu bylo u agresivnějšího melanomu. Pokus na melanomech byl již v minulosti proveden (Čunátová 2012) a výsledky tohoto experimentu jsou tedy možné porovnávat s výsledky z pokusu na sarkomech v mé práci. U obou pokusů měla nejvýraznější efekt na redukci nádorového růstu kombinace f-MLF-(G)5-(K)10-STE s LPS. Nicméně zatímco u sarkomu bylo již 6. den terapie dosaženo úplné redukce nádorového růstu, u melanomu bylo zaznamenáno jen zpomalení růstu a k úplné redukci nedošlo. Podobný trend byl zaznamenán i v délce přežití jednotlivých skupin myší. Zatímco u

experimentu Čunátové (2012) se ani jedna myš nedožila pozorované hranice 100 dní, u pokusu se sarkomy bylo zaznamenáno celkem 10 myší (z 20 myší), které přežily hranici 100 dní a ani u jedné z nich nádor nepřetrvával. Tyto výsledky potvrdily domněnku, že pokud terapie účinně funguje na agresivních (melanomových) buňkách měla by být účinná i u ostatních méně agresivních typů (sarkom). Hranici 100 dní přežila i jedna kontrolní myš. U této myši došlo 10. den terapie ke spontánní regresi nádoru. Po ukončení pokusu byla snaha zjistit, zda tento efekt nastane i při čtyřnásobném zvýšení množství aplikovaných nádorových buněk. Této myši byly aplikovány dva miliony sarkomových buněk, nicméně transplantát se neujal. Pravděpodobným vysvětlením je, že myš patří do skupiny jedinců s unikátní mutací, která umožní imunitním buňkám rozpoznat nádor a zlikvidovat ho, podobně jak je popisováno v práci profesora Cuiho (2003). Snažili jsme se tuto myš rozmnožit a tak přenést tento unikátní znak na potomstvo a dále s ním pracovat, ale to se bohužel do dnešního dne nepodařilo.

Druhý pokus (léčba melanomu pomocí dvou různých režimů aplikace f-MLF KK-SMCC + LPS) byl prováděn ve formě screeningu (dvě skupiny myší bez kontroly), úkolem bylo zjistit nejefektivnější aplikační režim terapeutických látek. První skupině myší bylo podáváno f-MLF KK-SMCC + LPS v terapeutickém režimu den 0,1,2, -pauza- den 8,9,10, -pauza- den 16,17,18, -pauza- den 24,25,26. U druhé skupiny byl zvolen terapeutický režim den 0, a další aplikace jen v případě opakovaného objevení nádoru. Z výsledků vyplývá, že pravidelná pulzní aplikace má lepší výsledky v redukci nádorového růstu. Tento výsledek odpovídá zjištěním, že stálá aplikace LPS vede k jeho toleranci (Greisman a kol. 1975). Je tedy doporučováno pravidelné vysazování LPS na dobu pěti dnů (Bourquin a kol. 2011). U skupiny II., kdy se terapeutická látka aplikovala pouze při prezenci nádoru, nádory většinou perzistovaly (viz Tab. V). To v konečném důsledku zmenšovalo účinnost terapie. Přesto můžeme říci, že obě terapie byly velmi účinné. U pulzního režimu bylo dosaženo přechodného vymizení nádorů. To je jev typický pro použití kovalentního kotvení (SMCC) a byl pozorován i u laminarinu a mananu (Ženka, ústní sdělení). Bohužel tento typ kotvení zpravidla neprodlužuje přežití, ale jeho perspektivou by mohla být předoperační redukce nádorové masy.

Úkolem třetího (také screeningového) pokusu (léčba melanomu pomocí pulzního režimu aplikace f-MLF KK-SMCC + LPS v kombinaci s (pro)enzymoterapií) bylo zjistit, zda terapie založená na kovalentním vázání f-MLF motivu může být kombinována s (pro)enzymoterapií. (Pro)enzymoterapie za použití proenzymů, trypsinogenu a chymotrypsinogenu, působí mnohem efektivněji, než dosud studovaná



enzymoterapie (Wald a kol. 1998, Wald a kol. 2001). Důležitým pozitivem je, že použité proenzymy se aktivují až v místě nádoru (Novák a Trnka 2004). (Pro)enzymoterapie tedy působí na úrovni získané imunity (Kaiserová 2008). Jak bylo prokázáno (Kaiserová 2008, Kalferstová 2008), proteázy vytváří s alfa-2 makroglobulinem komplex, který účinně odstraňuje TGF-beta, jeden z důležitých nástrojů protiimunitní nádorové obrany. V této práci jsem se pokusila spojit terapii působící na úrovni vrozené imunity s terapií na úrovni imunity získané. Tato kombinace se však ukázala jako neúčinná. Jedním z možných vysvětlení je, že (pro)enzymy při svém působení zároveň likvidují prozánětlivé cytokiny a tím jdou proti terapii za pomoci nespecifické imunity. Vzájemný vztah vrozené a získané imunity je však natolik složitý, že je obtížné pokusit se podat nějaké přesnější vysvětlení tohoto neúspěchu.

Ve čtvrtém pokusu (léčba melanomu pomocí aplikace f-MLF KK + LPS v intenzivním pulzním režimu za použití dvou různých kotvidel (BAM a DOPE)) byla optimalizována terapie na úrovni kotvení ligandu f-MLF. Byly studovány dvě varianty kotvení f-MLF (BAM a DOPE) do membrány nádorových buněk. BAM jako kotvu využívá jeden alifatický řetězec, DOPE dva alifatické řetězce. Oba typy kotvení vykazovaly významnou redukci růstu nádorů oproti kontrole, ale ani jeden z nich nebyl výrazně lepší (tzn. druh kotvení nemá žádný výrazný vliv na redukci nádorového růstu). Opačná situace však nastala u pozorované délky přežití, kde kotvení DOPE fungovalo lépe než kotvení BAM. Zatímco u skupiny f-MLF-BAM se ani jedna z myší nedožila pozorované hranice 100 dní a délka přežití byla srovnatelná s kontrolní skupinou, u skupiny f-MLF-DOPE přežily hranici 100 dní tři myši ze skupiny. Je nutno podotknout, že u tohoto pokusu byl použit velmi intenzivní pulzní režim aplikace terapeutických látek. Je tedy zřejmé, že kombinací efektivního typu kotvení ligandů a intenzivního pulzního režimu aplikace látek lze dosáhnout zlepšení přežití myší.

V pátém pokusu (léčba melanomu pomocí aplikace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE v kombinaci s LPS, snaha o náhradu MPL za LPS) byla testována možnost náhrady LPS za (pro člověka bezpečnější) MPL. Většina pokusů s TLR a FPR agonisty v léčbě nádorových onemocnění byla prováděna v kombinaci s LPS, tento druh terapie byl relativně úspěšný (Čunátová 2012, Vácová 2013). Pro budoucí použití u lidí je však nutné nahradit LPS (LPS je vysoce toxické). Zatímco je u myši LD<sub>50</sub> (dávka kdy 50% jedinců uhyne) odhadována na 6,9-10,8 mg/kg (v závislosti na pohlaví a druhu myši), (von Drygalsky a kol. 2013), u člověka vyvolá i 1000 - 10000 krát nižší dávka příznaky šoku (Warren a kol. 2010). Jednou z možných náhrad je právě MPL - monofosforyl lipid A získaný z LPS kmene *Salmonella minnesota*. MPL má podobné účinky na imunitní systém jako LPS, ale má výrazně nižší toxicitu. Jak vyplývá z výsledků (viz Obr. 12), kombinace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s MPL není

tak úspěšná v redukci nádorového růstu jako kombinace s LPS. U MPL je však možnost navýšení použitého množství (u lidí je velmi dobře tolerován), proto je zde ještě předpoklad zlepšení efektu redukce nádorového růstu. Použití vyšších koncentrací MPL bude předmětem dalšího zkoumání. Vliv kombinace f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s MPL na průměrný počet metastáz ve skupině nevykazuje rozdíly ve srovnání s kombinací f-MLFG<sub>6</sub>K-DOPE s LPS.

Cílem šestého pokusu (vyhodnocení přítomnosti jednotlivých subpopulací leukocytů pomocí průtokové cytometrie v melanomu po aplikaci terapeutické látky f-MLF-BAM) bylo zjistit zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů v nádoru v závislosti na druhu použité terapie a zároveň vysvětlit synergistický vztah f-MLF-BAM a LPS na buněčné úrovni, který byl pozorován v *in vivo* pokusech (Čunátová 2012, Vácová 2013). V pokusu byla zaznamenána výrazná migrace buněk nespecifické imunity, zejména granulocytů, během 48 hodin po aplikaci léčivé látky f-MLF-BAM či jeho kombinace s LPS. Buňky specifické imunity (lymfocyty a jejich subpopulace) se v infiltrátu vyskytly jen ve velmi malém množství. To svědčí o tom, že hlavní funkci u tohoto typu terapie zastává imunita nespecifická. Synergistický vztah f-MLF-BAM a LPS nebyl bohužel na buněčné úrovni viditelný. Kombinace f-MLF-BAM s LPS nepřinesla žádné výrazné zvýšení infiltrace buněk. Jediné co lze připisovat synergistickému vztahu je fakt, že u kombinace f-MLF-BAM s LPS dosáhl infiltrát svého maxima dříve nežli u samotného LPS. Tento trend lze pozorovat u granulocytů i CD3<sup>+</sup> buněk (viz Obr. 16). Podobné výsledky byly zaznamenány v ekvivalentním pokusu u mananu (Maierová 2012). Nezaznamenaný synergistický účinek f-MLF-BAM a LPS na buněčné úrovni naznačuje, že zacílení infiltrovaných imunitních buněk je klíčovým faktorem a množství infiltrátu zde nemá výraznou úlohu (jeho množství určuje především LPS). Použitím samotného f-MLF-BAM se získá pouze informace o zacílení účinku (f-MLF motiv navázaný na nádorových buňkách je označí), ale není zde dostatečná infiltrace imunitních buněk. Naopak, samotné LPS inicializuje migraci imunitních buněk do místa aplikace, nicméně určení specifického zacílení chybí. Až v momentě spojení těchto dvou složek dojde k infiltraci místa aplikace imunitními buňkami a zároveň k cílené eliminaci nádorových buněk. Synergie zde tedy není závislá na velikosti infiltrátu, ale spíše na dostatku informací, které imunitnímu systému poskytneme, tedy určení místa migrace a přesné zacílení účinku.

Sedmý (poslední) pokus (ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy (cytotoxický test CD45<sup>+</sup>/PI) na ligandu f-MLF-DOPE) byl zaměřen na ověření použitelnosti metody cytotoxické analýzy na ligandu f-MLF-DOPE s použitím průtokové cytometrie. Cytotoxické testy jsou nepostradatelnou součástí protinádorové terapie, umožní

hodnotit efektivitu dané léčby. Pomocí anti-CD45+ byly značeny efektorové buňky imunitního systému, v tomto případě makrofágy, tedy buňky nespecifické imunity. Jako ligand byl použit f-MLF-DOPE. I zde byla zjišťována synergie v působení f-MLF-DOPE ligandu a LPS (ligandu TLR). Přítomnost LPS byla nasimulována předchozí aktivací PMJ2R. Při samotném vyhodnocení byly klíčové živé nádorové buňky, které byly odlišeny od mrtvých nádorových buněk propidium jodidem. Mrtvé buňky nelze brát jako ukazatel cytotoxicity ligandu. Při použití trypsinu během metodického postupu dochází totiž k rozkladu části mrtvých buněk. Celkové množství buněk v jamkách bylo v konečné fázi nižší, než jejich počty na začátku. Důvodem byly malé ztráty v průběhu metodického zpracování, všechny jamky byly však zatíženy stejnou chybou, proto tento fakt neměl zásadní vliv na výslednou analýzu. Výsledky opět potvrdily efektivitu kombinace f-MLF-DOPE s LPS (ligand TLR), kdy tato kombinace vyvolala zvýšení cytotoxického efektu na buňky B16-F10, což plně podporuje výsledky dosažené v ostatních pracech (Underhill a Gantner 2004, Čunátová 2012, Vácová 2013). Zároveň byl prokázán nulový cytotoxický efekt samotného f-MLF-DOPE ligandu na buňky B16-F10 a jen nízký cytotoxický efekt u skupiny B16-F10+PMJ2R, avšak kombinace f-MLF-DOPE a PMJ2R vyvolala významnou cytotoxicitu na buňky B16-F10.

Tato diplomová práce potvrdila, že f-MLF představuje silný nástroj k léčbě nádorových onemocnění a ve správné kombinaci s dalšími ligandy PRRs může být i velmi efektivním způsobem terapie. Nicméně je zapotřebí další optimalizace metodiky. Následujícím krokem bude zmíněná náhrada LPS za méně toxickou látku, ať už jí bude MPL ve vyšších koncentracích nebo další hledané alternativy. To otevře možnost použití terapie i v lidské oblasti medicíny.

## 7 ZÁVĚR

- Léčbu agonisty FPR lze použít i u jiných typů nádorů než jen u melanomu. Kombinace f-MLF s LPS vykazovala synergii a vedla u sarkomu k přechodné eliminaci nádorů.
- Pravidelná pulzní aplikace terapeutických látek (kombinace TLR4 agonisty a ligandu FPR) byla účinnější nežli aplikace terapeutických látek pouze při přítomnosti nádoru.
- Kombinace terapie agonisty FPR (na úrovni nespecifické imunity) s (pro)enzymoterapií (na úrovni specifické imunity) za účelem zvýšení efektu nádorové terapie byla neúčinná.
- Z hlediska redukce nádorového růstu byly oba typy kotvení (BAM, DOPE) stejně účinné, avšak kotvení DOPE mělo oproti kotvení BAM pozitivní vliv na prodloužení délky přežití myší.
- Při náhradě LPS za MPL nebylo dosaženo tak významné redukce nádorového růstu. Co se týče intenzity metastazování a prevalence metastáz je MPL v kombinaci s ligandem FPR stejně účinné jako LPS ve stejné kombinaci.
- Nejvíce zastoupenou populací při migraci buněk do nádoru ovlivněného aplikací f-MLF-BAM či jeho kombinací s LPS byly granulocyty (buňky nespecifické imunity). Prokázat synergii f-MLF-BAM s LPS na buněčné úrovni nelze. Za jediný projev synergie lze považovat rychlejší nástup infiltrace u kombinaci f-MLF-BAM a LPS.
- f-MLF-DOPE v kombinaci s aktivovanými i neaktivovanými makrofágy (PMJ2R) vykazovalo in vitro významnou cytotoxickou aktivitu proti nádorovým buňkám B16-F10.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

Abouelmaatti, R. R., Elfeil, W., Wang, Y. & Liu, S. (2013). Pattern Recognition Receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, 1, 1118-1127.

Adams, J. M. & Capecchi, M. R. (1966). N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55, 147-155.

Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.

Alfaro, G., Lomeli, C., Ocadiz, R., Ortega, V., Barrera, R., Ramirez, M. & Nava, G. (1992). Immunologic and genetic characterization of S180, a cell line of murine origin capable of growing in different inbred strains of mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30, 385-398.

Alleva, D. G., Burger, C. J. & Elgert, K. D. (1994). Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*, 153, 1674-1686.

Auerová, M. (2012). Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Baek, S. H., Seo, J. K., Chae, C. B., Suh, P. G. & Ryu, S. H. (1996). Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide hydrolysis in lymphocyte cell lines from peptide libraries. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 8170-8175.

Barton, G. M. & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300, 1524-1525.

Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. & Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunology*, 12, 1539-1546.

Becker, E., Forouhar, F. A., Grunnet, M. L., Boulay, F., Tardif, M., Bormann, B. J., Sodja, D., Richard, D. Y., Woska Jr, J. R. & Murphy, P. M. (1998). Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell and Tissue Research*, 292, 129-135.

Belisle, B. & Abo, A. (2000). N-formyl peptide receptor ligation induces rac-dependent actin reorganization through G $\beta\gamma$  subunits and class Ia phosphoinositide 3-kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 26225-26232.

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40, 845-859.

Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I. & Donato, R. (2007). S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 108-118.

- Bicknell, D., Rowan, A. & Bodmer, W. (1994). Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*, 4751-4755.
- Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*, S33-S40.
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H. & Bainton, D. F. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *European Journal of Haematology*, *51*, 187-198.
- Bostrom, P. J. & Soloway, M. S. (2007). Secondary cancer after radiotherapy for prostate cancer: should we be more aware of the risk? *European Urology*, *52*, 973-982.
- Bourquin, C., Hotz, C., Noerenberg, D., Voelkl, A., Heidegger, S., Roetzer, L. C., Storch, B., Sandholzer, N., Wurzenberger, C. & Anz, D. (2011). Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of Toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer Research*, *71*, 5123-5133.
- Brandau, S. & Suttman, H. (2007). Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *61*, 299-305.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. & Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*, 10124-10128.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine*, *196*, 407-412.
- Burnet, M. (1957). Cancer: A Biological Approach. *The British Medical Journal*, *1*, 779-786.
- Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., Capelle, L., Behin, A., Tibi, A., Martin-Duverneuil, N., Sanson, M., Lacomblez, L. & Taillibert, S. (2006). Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Journal of Neuro-oncology*, *8*, 60-66.
- Carrillo-Infante, C., Abbadessa, G., Bagella, L. & Giordano, A. (2007). Viral infections as a cause of cancer (Review). *International Journal of Oncology*, *30*, 1521-1528.
- Cattaneo, F., Parisi, M. & Ammendola, R. (2013). Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 7193-7230.
- Cimino, A., Halushka, M., Illei, P., Wu, X., Sukumar, S. & Argani, P. (2010). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*, *123*, 701-708.

- Clark, W. H., From, L., Bernardino, E. A. & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research*, 29, 705-727.
- Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of Surgery*, 14, 199-220.
- Coley, W. B. (1910). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3, 1-48.
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, T. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 6682-6687.
- Čunátová, Š. (2012). Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M. A. & El-Benna, J. (2000). The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 165, 5238-5244.
- DiJoseph, J. F., Armellino, D. C., Boghaert, E. R., Khandke, K., Dougher, M. M., Sridharan, L., Kunz, A., Hamann, P. R., Gorovits, B. & Udata, C. (2004). Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood*, 103, 1807-1814.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M. & Stone, R. M. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 355, 2408-2417.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3, 991-998.
- Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. & Joiner, K. A. (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 1863-1867.
- Durstin, M., Gao, J., Tiffany, H., McDermott, D. & Murphy, P. (1994). Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, 174-179.
- Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35, 218-224.

- Fidler, I. J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Research*, *50*, 6130-6138.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, *2*, 77-84.
- Flehinger, B. J., Kimmel, M., & Melamed, M. R. (1992). The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening. *CHEST Journal*, *101*, 1013-1018.
- Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A. & Dahlgren, C. (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, *79*, 247-256.
- Gao, J. L., Chen, H., Filie, J. D., Kozak, C. A. & Murphy, P. M. (1998). Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics*, *51*, 270-276.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of Cellular Physiology*, *195*, 346-355.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*, *117*, 1195-1203.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.-K., Labigne, A. & Zähringer, U. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, *300*, 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. & Sansonetti, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 8869-8872.
- Glass, R. E., Ritchie, J. K., Thompson, H. R., & Mann, C. V. (1985). The results of surgical treatment of cancer of the rectum by radical resection and extended abdomino-iliac lymphadenectomy. *British Journal of Surgery*, *72*, 599-601.
- Greisman, S., Young, E., Workman, J., Ollodart, R. & Hornick, R. (1975). Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen. *The Journal of Clinical Investigation*, *56*, 1597-1607.
- Grulich, A. E., Wan, X., Law, M. G., Coates, M. & Kaldor, J. M. (1999). Risk of cancer in people with AIDS. *Aids*, *13*, 839-843.
- 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*, 1099-1103.
- He, H. Q., Liao, D., Wang, Z. G., Wang, Z. L., Zhou, H. C., Wang, M. W. & Richard, D. Y. (2013). Functional characterization of three mouse formyl peptide receptors. *Molecular Pharmacology*, *83*, 389-398.



- He, R., Sang, H. & Richard, D. Y. (2003). Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood*, *101*, 1572-1581.
- Hemminki, K. (1993). DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis*, *14*, 2007-2012.
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C. & Casagrande, J. T. (1982). Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Research*, *42*, 3232-3239.
- Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. & Gillis, S. (1981). Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, *291*, 335-338.
- Hodi, F. S. (2006). Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *Clinical Cancer Research*, *12*, 673-678.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K. & Schlee, M. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, *314*, 994-997.
- Huang, J., Chen, K., Chen, J., Gong, W., Dunlop, N., Howard, O., Gao, Y., Bian, X. & Wang, J. (2010). The G-protein-coupled formylpeptide receptor FPR confers a more invasive phenotype on human glioblastoma cells. *British Journal of Cancer*, *102*, 1052-1060.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, *2*, 563-572.
- Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M. & Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 13043-13048.
- Chen, K., Le, Y., Liu, Y., Gong, W., Ying, G., Huang, J., Yoshimura, T., Tessarollo, L. & Wang, J. M. (2010). Cutting edge: a critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. *The Journal of Immunology*, *184*, 3331-3335.
- Chism, S. E., Burton, R. C. & Warner, N. L. (1978). Immunogenicity of oncofetal antigens: a review. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *11*, 346-373.
- Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T. & Yamashina, I. (1987). Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *262*, 7451-7454.
- 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 tumors implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, *77*, 190.

Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. & Schoenberger, S. P. (2003). CD4<sup>+</sup> T cells are required for secondary expansion and memory in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Nature*, 421, 852-856.

Jerne, N. K. (1955). The natural-selection theory of antibody formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41, 849.

Jewett, A. & Bonavida, B. (1994). Activation of the human immature natural killer cell subset by IL-12 and its regulation by endogenous TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  secretion. *Cellular Immunology*, 154, 273-286.

Kaiserová, P. (2008). Proenzymová terapie sarkomu S-180. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Kalferstová, L. (2008). Proenzymoterapie melanomu B16-F10. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Kim, U., Baumler, A., Carruthers, C. & Bielat, K. (1975). Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 1012-1016.

Lahat, G., Lazar, A. & Lev, D. (2008). Sarcoma epidemiology and etiology: potential environmental and genetic factors. *Surgical Clinics of North America*, 88, 451-481.

Le, Y., Gong, W., Tiffany, H. L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N. M., Gao, J. L., Murphy, P. M. & Oppenheim, J. J. (2001). Amyloid (beta) 42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21, RC123.

Le, Y., Murphy, P. M. & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, 23, 541-548.

Maierová, V. (2012). Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Malik, S. & Waxman, J. (1992). Cytokines and cancer. *BMJ: British Medical Journal*, 305, 265-267.

Manhart, N., Oismüller, C., Lassnig, A., Spittler, A., Sautner, T., Götzinger, P., Függer, R. & Roth, E. (1998). Receptor and non-receptor mediated formation of superoxide anion and hydrogen peroxide in neutrophils of intensive care patients. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 110, 796-801.

Martins, F. & de Oliveira, C. (2009). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 30, 5-8.

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K. & Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, 8, 124-144.

- Matsushita, M. & Fujita, T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *The Journal of Experimental Medicine*, *176*, 1497-1502.
- McDonald, P. P., Bald, A. & Cassatella, M. A. (1997). Activation of the NF- $\kappa$ B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*, *89*, 3421-3433.
- McLaughlin, P., Grillo-López, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A. & Cabanillas, F. (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *Journal of Clinical Oncology*, *16*, 2825-2833.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, *1*, 135-145.
- Meinert, R., Kaletsch, U., Kaatsch, P., Schüz, J. & Michaelis, J. (1999). Associations between childhood cancer and ionizing radiation: results of a population-based case-control study in Germany. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *8*, 793-799.
- Migeotte, I., Communi, D. & Parmentier, M. (2006). Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *17*, 501-519.
- Migeotte, I., Riboldi, E., Franssen, J. D., Grégoire, F., Loison, C., Wittamer, V., Dethoux, M., Robberecht, P., Costagliola, S. & Vassart, G. (2005). Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*, 83-93.
- Mills, J. S., Miettinen, H. M., Barnidge, D., Vlases, M. J., Wimer-Mackin, S., Dratz, E. A., Sunner, J. & Jesaitis, A. J. (1998). Identification of a ligand binding site in the human neutrophil formyl peptide receptor using a site-specific fluorescent photoaffinity label and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 10428-10435.
- Nanamori, M., Cheng, X., Mei, J., Sang, H., Xuan, Y., Zhou, C., Wang, M. W. & Richard, D. Y. (2004). A novel nonpeptide ligand for formyl peptide receptor-like 1. *Molecular Pharmacology*, *66*, 1213-1222.
- Nishiya, T. & DeFranco, A. L. (2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 19008-19017.
- Novák, J. F., & Trnka, F. (2005). Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer research*, *25*, 1157-1177.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K. & Shanahan, F. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *6*, 457-463.

Ogden, C. A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A. & Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194, 781-796.

Old, L. J. & Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 1163-1167.

Opitz, B., Püschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N. & Hippenstiel, S. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 36426-36432.

Osband, M. E. & Ross, S. (1990). Problems in the investigational study and clinical use of cancer immunotherapy. *Immunology Today*, 11, 193-195.

Park, B. H. & Vogelstein, B. (2003). Tumor-suppressor genes. *Cancer Medicine*, 6, 87-102.

Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., Womack, J. E., Goodenow, R. S. & Schreiber, H. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 5140-5144.

Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R. & Minghelli, S. (2012). Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Research*, 72, 1407-1415.

Pillinger, M. H., Feoktistov, A. S., Capodici, C., Solitar, B., Levy, J., Oei, T. T. & Philips, M. R. (1996). Mitogen-activated protein kinase in neutrophils and enucleate neutrophil cytoplasts evidence for regulation of cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12049-12056.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M. & Galanos, C. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.

Pulaski, B. A., Smyth, M. J. & Ostrand-Rosenberg, S. (2002). Interferon- $\gamma$ -dependent phagocytic cells are a critical component of innate immunity against metastatic mammary carcinoma. *Cancer Research*, 62, 4406-4412.

Qiagen. 2013. f-MLF pathway [online]. [citováno 1. 12. 2013]. Dostupné z WWW:<<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details?pwid=186>>.

Rabiet, M. J., Macari, L., Dahlgren, C. & Boulay, F. (2011). N-formyl peptide receptor 3 (FPR3) departs from the homologous FPR2/ALX receptor with regard to the major processes governing chemoattractant receptor regulation, expression at the cell surface, and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 26718-26731.

- Rabiet, M., Huet, E. & Boulay, F. (2007). The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie*, *89*, 1089-1106.
- Richard, D. Y., Boulay, F., Wang, J. M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C. N. & Murphy, P. M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological Reviews*, *61*, 119-161.
- Roth, J., Vogl, T., Sorg, C. & Sunderkötter, C. (2003). Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends in Immunology*, *24*, 155-158.
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M. & Takabayashi, A. (2003). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer*, *98*, 1089-1099.
- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, *418*, 191-195.
- Sebag-Montefiore, D., Stephens, R. J., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., Quirke, P., Couture, J., de Metz, C. & Myint, A. S. (2009). Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *The Lancet*, *373*, 811-820.
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *51*, 1-28.
- Shi, Y., Evans, J. E. & Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, *425*, 516-521.
- Showell, H., Freer, R., Zigmond, S., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B. & Becker, E. (1976). The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, *143*, 1154-1169.
- Schiffmann, E., Showell, H. V., Corcoran, B. A., Ward, P. A., Smith, E. & Becker, E. L. (1975). The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *The Journal of Immunology*, *114*, 1831-1837.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, *274*, 17406-17409.
- Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, *63*, 11-30.
- Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M. A., Geuking, M. B., Beutler, B., Tedder, T. F. & Hardt, W. D. (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*, *325*, 617-620.

- Strong, L. C. (1949). A new theory of mutation and the origin of cancer. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 21, 293-299.
- Sun, R., Iribarren, P., Zhang, N., Zhou, Y., Gong, W., Cho, E. H., Lockett, S., Chertov, O., Bednar, F. & Rogers, T. J. (2004). Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor. *The Journal of Immunology*, 173, 428-436.
- 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. *Journal of Investigative Dermatology*, 124, 1326-1332.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- Taylor, M. E., Conary, J., Lennartz, M., Stahl, P. D. & Drickamer, K. (1990). Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 12156-12162.
- Thomas, D. B. (1984). Do hormones cause breast cancer? *Cancer*, 53, 595-604.
- Tiffany, H. L., Gao, J. L., Roffe, E., Sechler, J. M. & Murphy, P. M. (2011). Characterization of Fpr-rs8, an atypical member of the mouse formyl peptide receptor gene family. *Journal of Innate Immunity*, 3, 519-529.
- Torry, D. S. & Cooper, G. M. (1991). Proto-Oncogenes in Development and Cancer. *American Journal of Reproductive Immunology*, 25, 129-132.
- Triantafilou, M. & Triantafilou, K. (2004). Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical Society Transactions*, 32, 636-639.
- Underhill, D. M. & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 6, 1368-1373.
- Vácová, N. (2013). Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Větvička, V. & Větvičková, J. (2007). An evaluation of the immunological activities of commercially available  $\beta$ 1, 3-glucans. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 10, 25-31.
- von Drygalski, A., Furlan-Freguia, C., Ruf, W., Griffin, J. H. & Mosnier, L. O. (2013). Organ-Specific Protection Against Lipopolysaccharide-Induced Vascular Leak Is Dependent on the Endothelial Protein C Receptor Significance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33, 769-776.

- Wald, M., Olejar, T., Pouckova, P. & Zadinova, M. (1998). Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sciences*, *63*, 237-243
- Wald, M., Olejár, T., Šebková, V., Zadinová, M., Boubelík, M. & Poučková, P. (2001). Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *47*, S16-S22.
- Walther, A., Riehemann, K. & Gerke, V. (2000). A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Molecular Cell*, *5*, 831-840.
- Wang, M., Valenzuela, L., Murphy, G. & Chu, T. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, *17*, 159-163.
- Wang, R. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in Immunology*, *22*, 269-276.
- Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D. M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H. G., Nicchitta, C. V. & Radsak, M. P. (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 22545-22553.
- Warren, H. 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. *Journal of Infectious Diseases*, *201*, 223-232.
- Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, *10*, 317-327.
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, *291*, 1284-1289.
- Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S. & Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF- $\beta$  in the generation and expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, *166*, 7282-7289.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology*, *169*, 6668-6672.
- Ye, R. D., Cavanagh, S. L., Quehenberger, O., Prossnitz, E. R. & Cochrane, C. G. (1992). Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte N-formyl peptide receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *184*, 582-589.

Zanin-Zhorov, A., Cahalon, L., Tal, G., Margalit, R., Lider, O. & Cohen, I. R. (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *Journal of Clinical Investigation*, *116*, 2022-2032.

Zarembek, K. A. & Godowski, P. J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *The Journal of Immunology*, *168*, 554-561.