

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Optimalizace imunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinu na  
povrch nádorových buněk**

Diplomová práce

**Bc. Ivana Švecová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.  
Školitelka specialista: RNDr. Marie Jalovecká

České Budějovice 2013

Švecová I., 2013: Optimalizace imunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk [Optimization of melanoma immunotherapy based on the anchoring of laminarin on the surface of tumor cells. Mgr. Thesis, in Czech] 71 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

The aim of this thesis is to find optimal anticancer regimen of therapy, based on a naturally occurring polysaccharide laminarin. It was studied on the *Mus musculus* skin melanoma B16-F10. There were explored an adjuvant effect of LTA. Mixture of laminarin with LPS was applied with various anchorings and was tried out the possible replacement of LPS. Using the flow cytometry there were determined progress of immune cells during application. This therapy resulted in reduction of tumor volume and the prolongation of overall survival.

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

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

V Českých Budějovicích dne 12. 12. 2013

.....

Bc. Ivana Švecová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení, organizaci, vřelý přístup, trpělivost a ochotu pomoci. Mé poděkování také patří RNDr. Marii Jalovecké za pomoc s metodickým řešením a analýzou dat na průtokovém cytometru. Dále děkuji pracovníkům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za pomoc při experimentech v přátelském pracovním prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Nádorová onemocnění.....	1
1.2 Metabolismus rakovinné buňky .....	1
1.3 Charakteristika nádorového bujení.....	2
1.4 Maligní melanom .....	3
1.4.1 Charakteristika.....	3
1.4.2 Vznik .....	4
1.4.3 Incidence .....	4
1.4.4 Léčba .....	5
1.5 Obranné mechanismy těla .....	6
1.5.1 Vrozená imunita .....	6
1.5.2 Proč vrozená imunita - objevy profesora Cuiho.....	7
1.5.3 Spontánní regrese u lidí .....	9
1.6 Imunomodulační účinky látek na bázi přirozené imunity .....	9
1.7 $\beta$ -glukany.....	9
1.7.1 Struktura $\beta$ -D-glukanů.....	10
1.7.2 Receptory.....	10
1.7.3 Využití $\beta$ -D-glukanů.....	13
1.7.4 Laminarin .....	14
1.8 Látky použité v této práci v kombinaci s laminarinem .....	15
1.8.1 Lipopolysacharid (LPS).....	15
1.8.2 Lipoteichová kyselina (LTA) .....	16
1.8.3 Monofosforyl lipid A (MPL).....	16
1.8.4 Proenzymy .....	17
2. Cíle práce.....	18
3. Materiál a metody.....	19
3.1 Chemikálie.....	19
3.2 Experimentální zvířata .....	20
3.3 Příprava a transplantace melanomových buněk .....	20
3.4 Příprava roztoků .....	21
3.4.1 Aminace laminarinu (pro navázání BAM, SMCC, DOPE-NHS) .....	21
3.4.2 Navázání BAM a DOPE na laminarin.....	21
3.4.3 Navázání SMCC na laminarin.....	21

3.5 Měření velikosti nádorů.....	21
3.6 Počítání metastáz.....	21
3.7 Výsledná analýza dat.....	22
3.8 Postup práce při jednotlivých pokusech.....	22
3.8.1 Pokus č. 1: Optimalizace léčebného harmonogramu terapie založené na kombinaci laminarinu-BAM s LPS.....	22
3.8.2 Pokus č. 2: Zesílení imunitní odpovědi přidáním LTA k terapeutické kombinaci laminarin-BAM + LPS.....	23
3.8.3 Pokus č. 3: Screening optimálních podmínek pro terapii založenou na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. ....	24
3.8.4 Pokus č. 4: Náhrada LPS pomocí MPL.....	26
3.8.5 Pokus č. 5: Studie nádorové infiltrace během nádorové imunoterapie pomocí průtokové cytometrie.....	27
4. Výsledky.....	30
4.1 Pokus č. 1: Optimalizace léčebného harmonogramu terapie založené na kombinaci laminarinu-BAM s LPS. ....	30
4.2 Pokus č. 2: Zesílení imunitní odpovědi přidáním LTA k terapeutické kombinaci laminarin-BAM + LPS.....	33
4.3 Pokus č. 3: Screening optimálních podmínek pro terapii založenou na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. ....	35
4.3.1 Srovnání účinku laminarin – BAM a laminarin-DOPE (vše v synergii s LPS). ....	35
4.3.2 Srovnání účinku kotvení pomocí BAM a SMCC.....	36
4.3.3 Zjištění vlivu proenzymů na terapii pomocí laminarinu-SMCC s LPS.....	38
4.3.4 Srovnání účinku laminarin – BAM + LPS a manan –BAM + LPS samostatně a ve směsi, srovnání s léčbou laminarin-BAM + LPS. ....	39
4.3.5 Srovnání účinku laminarin-SMCC a střídavého podávání laminarin-SMCC a manan-SMCC (vše podpořeno LPS). ....	41
4.4 Pokus č. 4: Náhrada LPS pomocí MPL.....	43
4.5 Pokus č. 5: Studie nádorové infiltrace během nádorové imunoterapie pomocí průtokové cytometrie.....	45
5. Diskuze.....	54
6. Závěr.....	59
7. Seznam použitých zkratk.....	60
8. Literatura .....	62

# 1. Úvod

## 1.1 Nádorová onemocnění

Rakovina je druhou nejčastější příčinou smrti již od druhé poloviny 80. let minulého století. První příčku drží dlouhodobě nemoci oběhové soustavy jako infarkt myokardu, ischemické choroby srdce i cévní nemoci mozku. Ženy na rakovinu umírají nejčastěji mezi 55. - 59. rokem života, muži pak ve věku 65 - 69 let. V roce 2010 zemřelo v České republice na nádorová onemocnění 27 834 lidí, tvořící 26% všech případů úmrtí (ÚZIS, 2013). Společným znakem všech nádorových onemocnění je to, že se populace vlastních buněk organismu vymkne kontrole a začne, relativně autonomně, růst. Zhoubné nádory pak rostou infiltrativně do okolí a rozsévají po těle ložiska, zvaná metastázy. Důvodem, proč se vlastní buňky najednou začnou nekontrolovatelně množit, je vznik série genetických změn (mutací) genomové DNA (deoxyribonukleová kyselina) v cílových buňkách. Ve většině případů vznikají tyto mutace v průběhu života jedince, může ale dojít také k familiárnímu přenosu mutace (dědičná mutace genu), předurčujícím ke zvýšené náchylnosti k danému onemocnění. Rozvoj nádorového onemocnění je spojen zejména s mutacemi tumor supresorových genů a zvýšenou aktivitou protoonkogenů (Povýšil a kol., 2011).

## 1.2 Metabolismus rakovinné buňky

Rakovinné buňky pro dosažení neomezené schopnosti dělení potřebují upravit svůj metabolismus. Dělalí to stejně jako buňky během embryonálního vývoje. Cílem úpravy je zvýšená tvorba stavebních prekurzorů pro dělení buněk. K tomu je však potřeba metabolizovat velké množství glukózy. Ta se rozkládá prostřednictvím tak zvané aerobní glykolýzy a získává se tak potřebné množství ATP (adenosintrifosfát). Tento mechanismus se nazývá Warburgův efekt (Warburg 1924, Warburg 1956). Vzniklý pyruvát, místo toho aby přešel do Krebsova cyklu, se mění na laktát, vlivem enzymu laktát dehydrogenáza (LDH). K tomu dochází i přesto, že má buňka dostatek kyslíku (Deberardinis, 2008). Vzniká snaha vyhnout se akumulaci pyruvátu, která by mohla zpomalovat buněčné dělení. Výhoda tvorby laktátu je, že může být snadno sekretován z buňky ven a tvořit extracelulární kyselé prostředí, čímž může inhibovat cytotoxické T lymfocyty (Fantin a kol., 2006). Jako druhý důležitý zdroj živin používají nádorové buňky také aminokyselinu L- glutamin. Podle nové studie (Huang a kol., 2013) nádorové buňky využívají glutamin také ke zmírnění kyselého stresu, vyvolaného působením laktátu uvnitř buňky. Výsledkem celého metabolismu je energetické vysávání hostitele, který díky tomu chřadne.

### 1.3 Charakteristika nádorového bujení

- Nádorové buňky se dokážou před imunitním systémem účinně ukrýt v podobě klidového stádia buněčného dělení ( $G_0$ ) a ve fázi presyntetické ( $G_1$ ) a postsyntetické ( $G_2$ ) (Hanahan a Weinberg, 2000).
- Nádory jsou imunitním systémem tolerovány, protože buď postrádají antigeny, které by rozeznávala, nebo jsou tyto antigeny slabé. Nevážou se k MHC-I (hlavní histokompatibilní komplex-I) molekule, která je prezentována T lymfocytům jadernými buňkami imunitního systému. Nádorové buňky naopak exprimují HLA-G (lidský leukocytární antigen) molekuly, které mají silnou afinitu k inhibičním receptorům buněk imunitního systému. Největší afinitu mají k receptoru KIR2DL4, který se nachází na CD8+ T buňkách a NK (natural killer) buňkách (Agaugué, 2011). Další způsob navození tolerance nádorových buněk je jejich vylučování TGF- $\beta$ , který vyvolává tvorbu Treg (T regulační lymfocyty) z CD4+ lymfocytů. Treg lymfocyty, exprimující CD25 molekulu, inhibují různými způsoby činnost lymfocytů a brání tak odstranění rakovinných buněk (Beck a kol., 2001).
- Když se nádor rozroste do několika kubických milimetrů, potřebuje nové cévní zásobení. Tomu pomáhá vylučování vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Čím vyšší je jeho hodnota, tím je nemoc agresivnější (Glade-Bender a kol., 2003).
- Chovají se jako buňky zárodečné linie, které také musí bojovat proti ataku imunitního systému. Tlumí imunitní odpovědi pomocí cytokinů TGF- $\beta$  (transforming growth factor) a IL-10. (Chen a kol., 2003).
- Nádorové buňky mají kvalitně fungující systémy k odstraňování léčiva, které vedou k nastolení tzv. multidrug resistance nádorů, tedy že je vše vylučováno bez účinku ven z buňky. Příkladem tohoto systému může být transmembránový protein P-glykoprotein, který využívají i buňky zdravé či buňky zárodečné linie. Pracuje na principu pumpy, která vychytává cizorodé hydrofóbní molekuly a přemění je na jinou konformaci. Takto změněné molekuly jsou vyloučeny ven z buňky. Nádorové buňky tento protein exprimují v průměru (Ponce de León a Barrera-Rodríguez, 2005).
- Další schopností nádorových buněk je eliminovat apoptózu (programovanou buněčnou smrt). Jednou z příčin je mutace tumor supresorového genu pro tvorbu proteinu p53, který u zdravých buněk navozuje apoptózu prostřednictvím uvolnění

mitochondriálního enzymu cytochrom c (Green a Reed, 1998). Nádorové buňky mají naopak schopnost vyvolat smrt infiltrujících lymfocytů navázáním Fas ligandu a cytokinu TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) na receptory imunitních buněk (Ashkenazi a Dixit, 1999).

- K neomezenému dělení nádorových buněk také přispívá schopnost replikace telomer (koncových částí chromozomů) pomocí enzymu telomeráza. Tím se nádorové buňky vyhýbají postupnému zkracování chromozomů a stárnutí buňky (Kim a kol., 1994).

## 1.4 Maligní melanom

### 1.4.1 Charakteristika

Maligní melanom je jedním z nejzákeřnějších nádorových onemocnění vůbec. Vzniká neoplastickou proliferací melanomových buněk v kůži nebo oku, může se vzácně také tvořit ve vnitřních orgánech, jako je močový měchýř, plíce či žlučník. Přestože tvoří jen 4% všech rakovin kůže, má na svědomí 75% úmrtí v případech nádorů kůže (Sladden a kol., 2009). Proto je nezbytné nemoc co nejdříve diagnostikovat. Tuto diagnostiku může zpočátku provést i sám pacient, pomocí pravidla ABCDE:

**A** – Asymmetry (asymetrie)

**B** – Border irregularity (nepravidelnost ohraničení)

**C** – Color variegation (barevná pestrost)

**D** – Diameter (průměr) > 6 mm

Toto pravidlo bylo sestaveno již v roce 1985 a slouží k prvotní diagnostice jak pacientům, tak lékařům (Friedman a kol., 1985). V roce 2004 bylo pravidlo rozšířeno o **E** – Evolution (vývoj) – změna v čase (Abbasi a kol., 2004). Podle číselných vyhodnocení jednotlivých parametrů se počítá hodnota TDS (Total Dermatoscopic Score). Dále se k vyšetření používá dermatoskopie a biopsie kožní léze.

Podle charakteru růstu můžeme melanom rozdělit na 4 hlavní skupiny (Liu a Mihm, 2003):

1. Povrchově se šířící melanom - Je to nejčastější typ melanomu mezi 30 - 50 lety, zahrnuje 70% kožních melanomů. Zprvu nemá sklony metastazovat (carcinoma *in situ*) a může v této podobě zůstat i několik let.



2. Nodulární melanom - zahrnuje 15 - 30% melanomů, postrádá fázi carcinoma in situ, postihuje hlubší struktury kůže a je rychle rostoucí (týdny až měsíce). Může být tmavě hnědý až černý, či s absencí pigmentu. Vypadá jako snadno krvácející nodulární útvar.
3. Lentigo maligna melanom - Typicky se objevuje na hlavě, krku či pažích. Vyznačuje se pomalým růstem 5 - 20 let, objevuje se hlavně u starších lidí kolem 65 let.
4. Akrolentiginózní melanom - vyskytuje se v 2 - 8% případů melanomu. Avšak u Afroameričanů, Asijců a Hispánců se objevuje častěji (29 - 72%) s horší prognózou (Cress a kol., 1997). Nejčastěji se vyskytuje na dlaních, chodidlech a u nehtu.

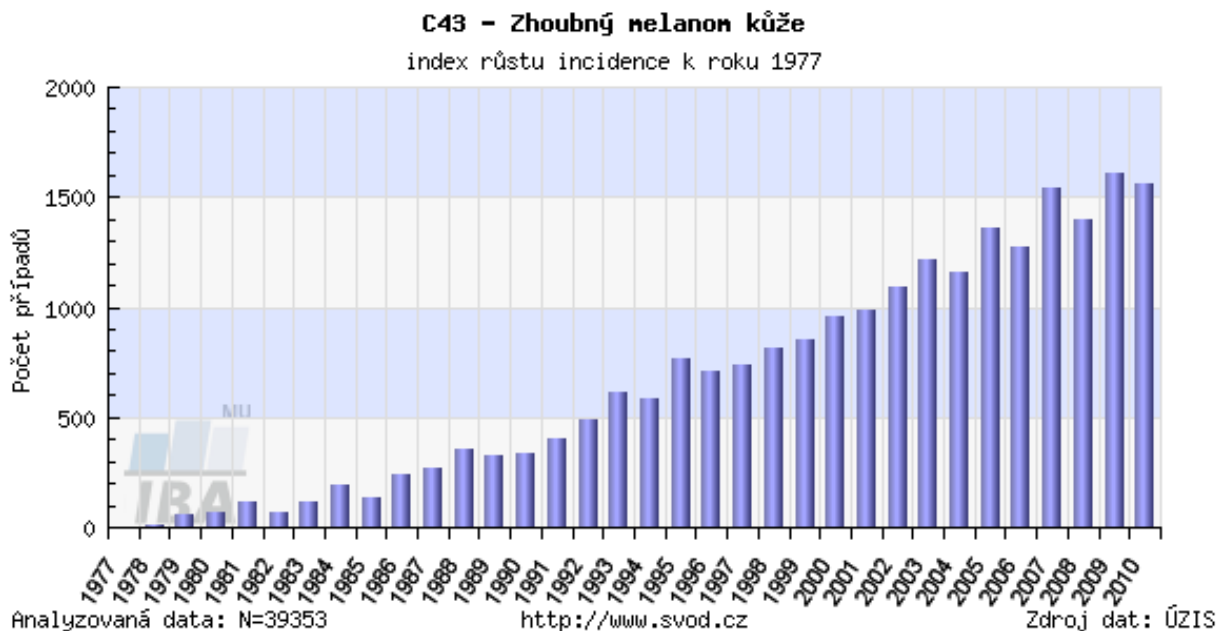
### 1.4.2 Vznik

Zhoubný melanom vzniká maligní transformací melanomových buněk. Melanocyty se nacházejí v horní vrstvě kůže zvané epidermis. Zajišťují hnědou barvu kůže a ochranu před slunečním zářením, prostřednictvím pigmentu melaninu. Maligní transformace melanocytů zahrnuje několikastupňový proces genetické mutace, vyvolaný pravděpodobně účinky dlouhodobého působení UV záření (zejména UVB) na pokožku (Gruijl a kol., 2001). Tyto mutace pak postihují proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk. Melanom může vznikat z již přítomného melanocytárního névu nebo vzniká *de novo*. Mutace se liší podle histologického subtypu. BRAF (gen kódující protoonkogen B-Raf) a NRAS (gen kódující onkogen N-Ras) mutace jsou spojené s účinky slunečního záření, KIT (gen kódující protoonkogen c-kit) mutace naopak nejčastěji postihuje kůži, která není vystavená slunci (Lee a kol., 2010). Vedle opakovaného působení UV záření je rizikovým faktorem pro vznik nemoci přítomnost většího počtu benigních név, lidé se světlou kůží a světlými či rezavými vlasy (10x vyšší riziko než u Afroameričanů), rodinný výskyt či už jednou prodělaná rakovina kůže, slabý imunitní systém, věk a pohlaví (Rhodes a kol., 1987). Také se přišlo v dlouholeté studii na to, že rakovinu kůže může způsobit autosomálně recesivně dědičný defekt v reparaci DNA, zvaný Xeroderma pigmentosum. Díky této degeneraci jsou lidé extrémně citliví k účinkům slunečního záření a musí se mu důsledně vyhýbat (Bradford a kol., 2011).

### 1.4.3 Incidence

Obecně je výskyt melanomu častější u bělochů než u černošské populace. Mezi Kavkazským obyvatelstvem roste počet nemocných dokonce nejrychleji ze všech nádorových onemocnění (Lens a Dawes, 2004). U dětí se maligní melanom téměř nevyskytuje, u osob mladších 20 let jsou jen asi 2% nemocných (Papi a kol., 2003). U žen bylo v USA zjištěno, že je to nejčastější nádorové onemocnění ve věku 25 - 29 let (Geller a kol., 2002). Celosvětově největší výskyt melanomu je již tradičně v Austrálii a Novém Zélandu, na 3. místě je

Švýcarsko. Česká republika se nachází na 11. místě (Dušek a kol., 2008). Počet nemocných stále roste, důkazem toho jsou výsledky celosvětového výzkumu, podle kterého v roce 2002 160 000 lidí onemocnělo a 41 000 jich zemřelo (Parkin a kol., 2005). V posledních dostupných studiích v roce 2008 bylo zaznamenáno 197 000 nových případů, ve stejném roce 46 000 osob zemřelo (Ferlay a kol., 2010). Častěji bývají postiženy ženy (1,97: 1) než muži, v počtu úmrtí ale vedou muži. V České republice je trend mírně odlišný, v roce 2010 bylo zaznamenáno 1058 nově diagnostikovaných případů, z toho 1030 mužů a 1028 žen (ÚZIS, 2013). Postupné zvyšování počtu diagnostikovaných pacientů v ČR v letech 1977 - 2010 je zaznamenáno v grafu na obrázku 1. Také místo výskytu melanomu na těle se u obou pohlaví liší. U mužů nejčastěji na trupu, u žen na nohou nebo zádech.



Obr. 1: Vývoj incidence výskytu melanomu v ČR v letech 1977 - 2010 (ÚZIS, 2013).

#### 1.4.4 Léčba

Léčbou první volby bývá operativní odstranění kožního nádoru. U melanomu je však charakteristické hematogenní či lymfogenní metastazování. Nejběžnějším místem diseminace jsou plíce. Jedinou možností zachránění pacienta je chirurgické odstranění napadené plicní tkáně. Ale pouze 37% osob se dožije 5 let od provedené operace (Maniwa a kol., 2000). U pokročilejších forem nemoci se podává IFN- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ ), který může prodloužit bezpříznakové období a inhibovat angiogenezi (Cascinelli, 2001). V případě vzdálených metastáz se doporučuje léčba cytostatikem Dakarbazin (Nathan a kol., 1998). Problémem

dosud používané chemoterapeutické léčby je necílenost, cytostatika působí i na zdravou tkáň. Obvykle cytostatika zasahují do období mitotického cyklu buněčného dělení všech buněk a využívají vlastnost pomalejší proliferace nádorové masy. Další možností je nezasáhnout do dělení buněk, ale do cévního zásobení nádorové masy. Blokáda VEGF dráhy, například neutralizační protilátkou (bevacizumab) či inhibitory receptorů tyrosin kináz (SU5416), může být řešením. Mohou ale přivodit jiné komplikace, jako je tromboembolie či krvácení (Glade-Bender a kol., 2003).

## **1.5 Obranné mechanismy těla**

Imunita je funkční stav organismu, který se projevuje schopností reagovat na cizorodé antigeny, a odlišovat je tak od struktur tělu vlastních. Reakce může být specifická (adaptivní) či nespecifická (přirozená). Jako první nastupuje mechanismus nespecifický, zvaný přirozená imunita. Tu zastupuje soubor mechanismů buněčných (fagocytující buňky, NK-buňky) a humorálních (komplement, lektiny, interferony, sérové proteiny). Na obraně organismu se v první linii také podílejí povrch kůže, sliznice, a další struktury. V druhé linii pak nastupuje specifická reakce organismu, s hlavními činiteli T a B lymfocyty. Nespecifická a specifická imunita je vzájemně provázaná, protože specifická imunita potřebuje k proliferaci buněk antigen, který je prezentován buňkami z nespecifického sektoru – makrofágy a dendritickými buňkami. Humorální složkou specifické imunity jsou cytokiny a protilátky, produkované B buňkami na popud výskytu antigenu. Následně dochází k proliferaci T buněk určité specifity, které reagují na antigeny prezentované spolu s HLA antigeny I. či II. třídy, podle výskytu CD znaků. T lymfocyty následně produkují různé regulační biologicky aktivní látky a zajišťují cytotoxicitu cílových buněk. V neposlední řadě dochází k uložení antigenu do paměti organismu, tedy vytvoření paměťových buněk, díky nimž je možné navodit rychlejší a účinnější odpověď (Krejsek a Kopecký, 2004).

### **1.5.1 Vrozená imunita**

Vrozená imunita je fylogeneticky nejstarší součást imunity, která se projevuje jako první obranná reakce organismu s časovým účinkem minuty až hodiny. Následuje na ni závislá produkce protilátek, CTL a paměťových buněk, v rámci několika dní až týdnů. Nespecifická imunita začíná pracovat hned po proniknutí patogenu anatomickými bariérami, díky přítomnosti rozpustných molekul v kůži, na sliznicích, či v extracelulární tekutině. Mezi první

činitele patří lysosym, který dokáže rozštěpit bakteriální stěnu, stejně jako další antimikrobiální peptidy. Mezi ně patří například defensiny, magaininy či protegriny, které vytváří póry v cílové buňce. Těmito póry pak vtéká voda a vlivem zvyšujícího se osmotického tlaku praská mikrobiální membrána (Ganz, 2003). Antimikrobiální peptidy patří vůbec k nejpůvodnější formě obrany, objevují se již v hemolymfě u hmyzu při virových infekcích (Boman a kol., 1991). Defensin se také vyskytuje v granulech fagocytů, které fúzí s vakuolami, obsahující pohlcené mikroby (Rice a kol., 1987). Přirozená imunita musí spoléhat na omezené množství receptorů a sekretovaných proteinů, které jsou kódovány již v germinální linii a rozpoznávají pomocí svých PRR (pattern recognition) receptorů znaky podobné znakům patogenů. Vzniká tedy interakce PAMPs (pathogen associated molecular patterns) s PRR receptory buněk vrozené imunity (Janeway a kol., 2002) (Podrobněji v kap. 1.7.2). Aktivace komplementu a fagocytóza jsou hlavním zdrojem počáteční degradace buněk. Nastává klasický zánět s mohutnou infiltrací neutrofilů, monocytů, dendritických buněk a dochází k prezentaci antigenů T lymfocytům.

### **1.5.2 Proč vrozená imunita - objevy profesora Cuiho**

Základní myšlenka, proč jsem se zaměřovala na terapii nádorových onemocnění na úrovni vrozené imunity, se odvíjí od zajímavých výsledků experimentů pod vedením profesora Cuiho. V roce 1999 při pokusu s myšimi sarkomy profesor Zheng Cui se svým asistentem objevil, že na jedné z bílých BALB/c myší vůbec nevyrostl nádor. Totéž se potvrdilo při opakované, i při zvýšené dávce rakovinných buněk (až na 10% celkové tělesné váhy). Myš zůstala rezistentní a nakonec zemřela na stáří ve věku 26 měsíců. Ukázalo se, že je myš proti jednomu z nejagresivnějších nádorů zcela rezistentní. V následných experimentech pak Cui definoval další vlastnosti rezistentních myší (Cui a kol., 2003):

1. Rezistence spočívá v dominantní mutaci genu SR/CR (spontaneous regression/complete resistance). Jestli myš dosáhne SR nebo CR, závisí na jejím věku při první aplikaci nádorových buněk. Pokud se injikují do mladých myší (6 týdnů), je pozorována kompletní rezistence s absencí vzniku rakoviny. U starších myší (22 týdnů) funguje spontánní regrese a zahubení nádoru.
2. Zjistil, že znak není vázán na pohlaví, ale je spojen s jedním z 19 myších autozomů.

3. Podařilo se mu myš spářit a získat další rezistentní myši. V generaci F1 bylo 38% myší se SR/CR fenotypem, což potvrzuje přítomnost dominantního znaku v jednom lokusu.
4. Prokázal, že SR/CR myši mohou být rezistentní vůči širokému spektru nádorových onemocnění.
5. Zjistil a prokázal pomocí obrázků a videa ze skenovacího elektronového mikroskopu a fázového kontrastu, že nástrojem pro zneškodnění nádorových buněk je tvorba rozet. Ty jsou tvořeny z leukocytů, které obklopují nádorovou buňku a způsobují její cytolýzu.
6. Tato cytolýza je selektivní, nepostihuje buňky imunitního systému.
7. Zároveň prokázal, že v destrukci nádorových buněk u SR/CR myší nejsou zahrnuty T lymfocyty.

Ve studii publikované v roce 2006 (Hicks a kol.) byl sledován imunitní boj s rakovinnými buňkami u SR/CR myší. Docházelo k silné infiltraci buněk přirozené imunity – neutrofilů, makrofágů a NK buněk. Makrofágy se shlukovaly kolem nádorových buněk a vytvářely rozety. Produkci reaktivního kyslíku a sekrecí serinových proteáz pak lyzovaly nádorové buňky, prostřednictvím těsného kontaktu s nimi. Ostatní buňky imunitního systému obsahovaly perforiny a granzymy, díky kterým účinně ničily nežádoucí buňky. Takto dokázaly zlikvidovat až 2 miliony buněk za hodinu. Podobný výsledek byl zjištěn i při přenosu buněk vrozené imunity ze SR/CR myší do myší divokého typu s nádory. SR/CR leukocyty tedy pravděpodobně dokáží rozpoznat povrchové struktury nádorových buněk a navázat se na ně. To, že vymýcení nádorových buněk způsobuje přirozená imunita, potvrdil pokus u linie nu-nu myší. Tyto holé myši mají inhibovanou činnost získané imunity díky absenci T buněk. Přesto se také dokázaly vyléčit. Zajímavé je, že schopnost SR/CR myší vyléčit se z rakoviny klesá s věkem. Tedy že činnost a efektivita přirozené imunity také klesá s věkem, což může být způsobeno akumulací mutací v buňkách. Pokud injikovali rakovinu myším starším 1 rok, zemřely, i když gen na rezistenci proti rakovině byl přítomen. Jaký je to gen, ale stále zjištěno nebylo.

Pro účinnost vrozené imunity vůči nádorovému bujení hovoří i další studie. Na nu-nu myších bylo doloženo, že nedochází ke zvýšenému výskytu nádorových onemocnění, ve srovnání s jedinci, kteří mají funkční adaptivní imunitu (Rygaard a Povlsen, 1974). Naopak potlačení funkce perforinu vedla k větší náchylnosti k rakovině (Engel a kol., 1997).

### 1.5.3 Spontánní regrese u lidí

Objevuje se možnost, zda by obdobně nebylo možné vyléčit i lidskou rakovinu. Existuje ale několik problémů. Stále není znám gen, který u SR/CR myši způsobuje rezistenci k nádorovému bujení. Experimentálních zvířat s tímto fenotypem je stále nedostatek a u lidí bylo popsáno ještě méně případů. Například pacientka s vlasatobuněčnou leukémií se po diagnostikované chorobě odmítla léčit. Po osmi letech byla znovu vyšetřena a zjistilo se, že je naprosto zdravá, bez známek onemocnění (Bouroncle, 1958).

### 1.6 Imunomodulační účinky látek na bázi přirozené imunity

První imunomodulační účinky byly popsány u endotoxinu, tedy lipopolysacharidu (LPS) z gramnegativních bakterií, který způsobil prudké reakce v těle vyšších organismů (Billroth, 1865). V polovině 19. století pak bylo poprvé cíleně použito infekční onemocnění k léčbě maligního bujení. Busch v roce 1868 použil k léčbě sarkomu  $\beta$ -hemolytické streptokoky a dosáhl zmírnění nemoci. Tyto experimenty opakoval Coley, který později začal používat bezpečnější bakteriální kmen, dnes známý jako *Serratia marcescens*. Byl nazván Coleyův toxin, který byl později označen jako interleukin-12 (Tsung a kol., 2006). Ve 40. letech minulého století byly pozorovány imunomodulační účinky polysacharidů opět z kultury *Serratia marcescens*, účinná látka byla nazvaná Shearův polysacharid (Shear a kol., 1943). Jednalo se o směs tří polysacharidů, obsahujících hlavní řetězec z D-glukózových a D-mannózových zbytků vázaných (1,3)-glykosidickými vazbami (Srivastava a Adams, 1962). V 60. a 70. letech začal výzkum dalšího významného imunomodulátoru, zvaného  $\beta$ -glukan.

### 1.7 $\beta$ -glukany

(1,3)- $\beta$ -D-glukany jsou přirozeně se vyskytující vysokomolekulární polysacharidy složené z monomerů D-glukózy, spojených  $\beta$ -glykosidickými vazbami. Jsou produkovány prokaryotickými mikroorganismy, některými rostlinami a houbami. Jejich významem v těchto organismech je plnění zásobní, strukturní a protektivní funkce v buněčné stěně. Biologický účinek  $\beta$ -glukanů ovlivňuje zejména větvení, délka řetězců a terciární struktura (Zhang a kol., 2005). Výzkum jejich biologických vlastností začal již v 60. letech 20. Století (Riggi a DiLuzio, 1961). Naprostá většina studií se zabývá možností použití  $\beta$ -glukanů pro obranu proti infekčním chorobám. Hlavními autory těchto studií byli Williams a DiLuzio, kteří prokázali u myši léčených Zymosanem (směs polysacharidů izolovaná ze stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*), zvýšenou frekvenci fagocytózy neutrofilů.  $\beta$ -glukany dokážou zvýšit obranyschopnost našeho organismu působením na makrofágy, mikrofaýgy, leukocyty a

lymfocyty a mít tak i protinádorový účinek. Stimulací produkce monocytů a makrofágů ovlivňují také hematopoietickou aktivitu (Patchen a Lotzova, 1980).

Známe několik (1,3)- $\beta$ -D-glukanů, nazvaných podle jejich výskytu. Mezi medicínsky nejvýznamnější patří cinerin, lentinan, laminarin, schizophyllan a skleroglukan. Většina je produkována stopkovýtrusnými houbami, může být ale i bakteriálního původu, jako curdlan z *Alcaligenes faecalis* (Harada a kol., 1968). Cinerean je produkován houbou *Botrytis cinerea* (Montant a Thomas, 1977). V Japonsku byla zjištěna nespecifická potenciace imunitního systému u  $\beta$ -glukanu Lentinan, který byl izolovaný ze stopkovýtrusné houby shiitake (*Lentinula edodes*) (Chihara a kol., 1969). Byl popsán i jako možný inhibitor AIDS viru (Wasser, 2002). Schizophyllan je extrahován ze stopkovýtrusné, hojně se vyskytující houby, *Schizophyllum commune* (Split Gill). Skleroglukan, produkován jako extracelulární polysacharid houbou *Sclerotium glaucanicum*, dokázal u psů a kuřat kromě protinádorových účinků snížit i hladinu cholesterolu (Griminger a Fisher, 1966). Houba *Pleurotus sajor-caju* s obsaženým xyloglukanem vykazuje protinádorovou aktivitu proti Sarkomu S-180 (Zhuang a kol. 1993). Přípravky s obsahem  $\beta$ -glukanů jsou komerčně nabízeny jako účinná pomoc při obnově imunitního systému po prodělané radioterapii.

### 1.7.1 Struktura $\beta$ -D-glukanů

Polysacharidy jsou polymery monosacharidových zbytků spojených glykosidickými vazbami, což je ve srovnání s bílkovinami a nukleovými kyselinami zvýhodňuje díky strukturní variabilitě, bohatému větvení a rotace kolem můstků glykosidického spojení. Ve vodním prostředí jsou molekuly (1,3)- $\beta$ -D-glukanu v podobě helikální struktury se třemi řetězci, stabilitu zajišťují meziřetězcové vodíkové můstky (Bluhm a kol., 1982). K udržení trojitě helixové struktury také přispívají hydrofóbní síly (McIntire a Brant, 1998). Glukany se z daných organismů extrahují vařením a mohou být, pomocí enzymatického štěpení, získávány v rozpustné i nerozpustné formě (Bleicher a Mackin, 1995).

### 1.7.2 Receptory

Makrofágy rozpoznávají  $\beta$ -glukan několika receptory (CR3, laktosylceramidový, scavengerový), ale hlavními receptory jsou dectin-1 a TLR-4. Pro následující receptory funguje  $\beta$ -glukan a další mikrobiální struktury jako molekuly PAMPs (pathogen associated molecular patterns). Příkladem dalších mikrobiálních struktur, které rozpoznávají PRR, je LPS či LTA (podrobněji dále).

### **1.7.2.1 PRRs (*pathogen recognition receptors*)**

Imunitní systém je vybavený rozpoznávacími receptory, obecně nazvanými pattern recognition receptors (PRRs), poprvé sledovanými u rostlin (Song a kol., 1995). Dokážou rozpoznávat mikrobiální struktury, které jsou vysoce konzervované a nemutabilní. Jsou to struktury, které se nenachází u Metazoi a nazývají se PAMPs (pathogen associated molecular patterns) (Janeway a Medzhitov, 2002). PRRs zahrnují glykoproteinové Toll like receptory (TLRs) na povrchu buňky, dectin-1, CR3, laktosylceramidové a scavengerové receptory. Fungují jako senzory patogenů, řídí zánětlivou odpověď a hrají klíčovou roli v rozpoznávání PAMPs. Nachází se v membráně monocytů, makrofágů, neutrofilů, NK-buněk a dendritických buněk (Kennedy a kol., 2007).

#### **1.7.2.1.1 TLRs (*Toll-like receptory*)**

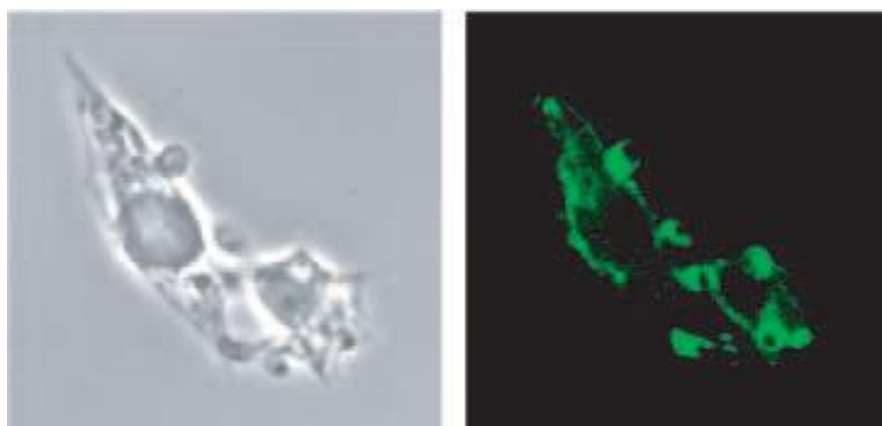
TLRs receptory se nacházejí na antigen prezentujících buňkách (APC), zejména na či v makrofázích a dendritických buňkách, a jsou kódovány v germinální linii (Kawai a kol., 2009). TLR-2, -4, -5, -11 jsou exprimovány na povrchu buněk, TLR-3, -7, -8 a -9 jsou umístěny v endosomálních částech. Rozpoznávají jak PAMPs, tak DAMPs (damage-associated molecular patterns). DAMPs což jsou endogenní ligandy, uvolňující se při rozpadu buňky (Bianchi, 2007). TLR-2 je aktivovaný peptidoglykany, glykolipidy, zymosanem a lipoteichovou kyselinou z grampozitivních bakterií (Takeda a kol., 2003). TLR-4 je aktivován lipopolysacharidy z gramnegativních bakterií, heat shock proteiny a protinádorovým lékem taxol (Akira a Hemmi, 2003). TLR-5 rozpoznává bakteriální protein flagellin (Hayashi a kol., 2001). TLR-9 váže cytosin-guanin dinukleotid (CpG), motivy vyskytující se v DNA virů a bakterií (Bauer a kol., 2001).

Samotný mechanismus detekce patogenních částic molekulami TLRs není přesně znám. TLR mohou interagovat s dalšími TLR nebo interagovat s nonTLR receptory. Například podle studie Ozinskyho a kol. (2000) spolupracují TLR-2 a TLR-6, umístěné ve fagosomu, v rozpoznání peptidoglykanu grampozitivních bakterií. Signalizace pomocí TLRs mezi buňkami vyvolaná lipopolysacharidem, je spojená s aktivací intercelulární adhezní molekuly ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Ta zcela závisí na funkci TLR-2. Tato vyvolaná adheze buněk (polymorfonukleárů) přispívá k jejich migraci a vzniku zánětu (Fan a kol., 2003). Přenos TLR signálu dál je započat prostřednictvím cytoplazmatické Toll/IL-1 receptorové domény (TIR). Tu obsahují i adapterové molekuly nutné k signalizaci. Patří mezi ně protein myeloidní diference MyD88-adaptor like, TIR doménu obsahující protein (TIRAP), TRIF protein aktivující IFN- $\beta$  a TRIF-related adaptor molekula (TRAM) (Barton a



kol., 2009). U každého receptoru je obvykle jeden druh adaptorových proteinů, u některých se vyskytují dva (Marta a kol., 2009). Například bakteriální lipopolysacharidy aktivují TLR-4 na makrofázích prostřednictvím TIRAP a MyD88. Následně dochází k aktivaci transkripčních faktorů: jaderný faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), faktory regulující cytokiny jako TNF- $\alpha$ , interferon, IL-6 a další (Ivashkiv, 2008). Výsledkem je indukce prozánětlivé genové exprese a vznik příslušných efektorových proteinů.

#### 1.7.2.1.2 Dectin – 1



Obr. 2 : Dectin-1 barvený HA na fagosomu (Brown a kol., 2003).

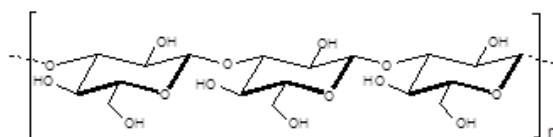
Dectin-1 je hlavním receptorem pro  $\beta$ -glukany. Je to receptor C-lektinového typu rozpoznávající  $\beta$ -glukan (Brown, 2006). Na obrázku 2 je zobrazen zeleně barvením kyselinou hyaluronovou. Vyskytuje se hlavně na makrofázích, dendritických buňkách a neutrofilech (Taylor a kol., 2002). Často funguje v součinnosti s TLR a NOD (nukleotidová oligomerizační doména) receptory. Fagocyty odpovídají na rozpoznání  $\beta$ -glukanu produkcí cytokinů a chemokinů, produkcí reaktivního kyslíku a oxidu dusnatého. Do tohoto procesu jsou výrazně zapojena i TLR. Dlouho nebylo známo, zda je nějaký rozdíl mezi působením TLR signalizace s dektinem a dektinem samotným pro činnost fagocytózy. TLR se zapojuje do procesu fagocytózy, produkce reaktivního kyslíku a produkce cytokinů a chemokinů. TLR signalizace reguluje expresi proteolytických enzymů, komponentů NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) fagocytové oxidázy a molekuly hlavního histokompatibilního komplexu. Aktivace receptoru stimuluje produkci reaktivních radikálů kyslíku makrofágy (Gantner a Simmons, 2005). Radikály kyslíku jsou produkovány enzymem NADPH oxidázou, který se shromažďuje přímo na membráně fagosomu. Bylo zjištěno, že fagocytóza bakterií je ovlivněna tím, že TLR signalizace podporuje maturaci fagocytujících buněk a také

to, že dochází čteněji k prezentaci antigenů MHC II komplexem, ve srovnání s makrofágy bez přítomnosti TLR receptorů (Blander a Medzhitov, 2004). TLR se také dále zapojuje přímo do ovlivňování exprese genů pro proteiny zahrnované do fagocytózy (Hume a kol., 2002). TLR-2 také po předchozí expozici lipopolysacharidu podporuje dectinem-1 stimulovaný respirační cyklus. Indukce produkce TNF- $\alpha$  a IL-12 také vyžaduje působení TLR-2 (Gantner a kol., 2003). Mechanismus stimulace makrofágů  $\beta$ -glukany byl podrobně studován autory Suram a kol. (2006). Působením  $\beta$ -glukanů dochází k uvolnění arachidonové kyseliny prostřednictvím fosfolipázy A. Dochází k enzymatické přeměně na eikosanoidy, důležité pro buněčnou signalizaci. Právě dectin-1 je nezbytný pro činnost enzymu cyklooxygenáza (COX2), který je potřebný pro produkci prostanooidů a leukotrienů (Suram a kol., 2006).  $\beta$ -glukany stimulují prostřednictvím dectinu-1 produkci cytokinů IL-2 a IL-10. Bylo zjištěno, že rozpustný laminarin může bránit produkci IL-10 dendritickými buňkami (Dillon a kol., 2006). ITAM (aktivační motiv založený na tyrosinovém imunoreceptoru) signalizace, kterou zajišťuje sekvence obsažená v dectinu-1, aktivuje Syk kinázy. Tyto enzymy pak způsobují produkci radikálů kyslíku a fagocytózu. U dendritických buněk dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B přes protein CARD9 (Gross a kol., 2006). Indukci zánětu výrazně napomáhá spolupráce dectinu-1 a TLR, dochází k posílení produkce cytokinů, chemokinů a aktivaci transkripčních faktorů.

### 1.7.3 Využití $\beta$ -D-glukanů

$\beta$ -D-glukany mají široké biologické využití. Kromě protinádorového, mají také antibakteriální, antivirové a antikoagulační účinky. Zájem roste z oblasti mlékárenského průmyslu, používat  $\beta$ -D-glukany jako doplňky textury a stabilizátory (Duboc a Mollet, 2001). S pomocí  $\beta$ -D-glukanů by se dal také vyřešit problém poslední doby, rostoucí počet bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika, léčbou kombinací  $\beta$ -glukanů s antibiotiky. Bylo prokázáno, že tato kombinační léčba má větší účinnost než léčba samotnými antibiotiky, u myši dokázala snížit mortalitu u jinak antibioticky rezistentních kmenů bakterií *E. coli* nebo *S. aureus* (Tzianabos a Cisneros, 1996). Bylo zjištěno, že  $\beta$ -glukany mohou chránit před radiačním zářením a omezit poškození buněk. Uvažuje se proto o jeho užívání v případě nenadálého vystavení radiačnímu záření (Pillai a kol., 2008). V jiné studii bylo popsáno využití  $\beta$ -glukanů jako prevence proti infekci u pacientů podstupujících operace či psychické trauma (Browder a kol., 1987).

## 1.7.4 Laminarin



Obr. 3: Vzorec laminarinu (převzato z: elicityl-oligotech.com, 2.9. 2013)

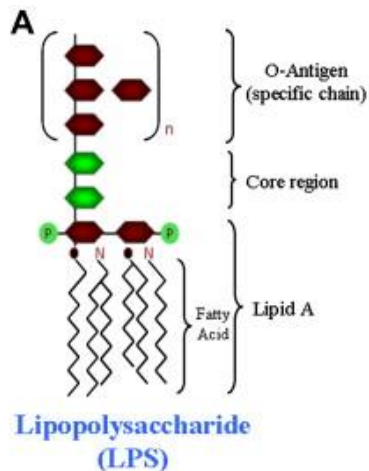
Laminarin (laminaran) je lineární, ve vodě rozpustný polymer, vzniklý  $\beta$ -(1,3) spojením glukózových zbytků. Jeho strukturní vzorec je uveden na obrázku 3. V menší míře obsahuje spojení  $\beta$ -(1,6) mezi zbytky a D-mannitol jako koncové skupiny. Je obsažen v buňkách hnědých řas *Phaeophyceae* skupiny *Laminaria spp.* jako zásobní polysacharid (Zvyagintseva, 2003). Hnědé řasy obsahují ještě další ve vodě rozpustné polysacharidy, a to algináty a fucoidany. Ty jsou obsažené v buněčné stěně řas. Všechny tyto polysacharidy nejsou štěpeny lidskými trávicími enzymy, ale jsou fermentovány na propionové kyseliny a kyseliny máselné prostřednictvím střevní mikrobiální flóry (Kuda a kol., 2009). Bylo zjištěno, že tyto fermentované polysacharidy potlačují účinek nežádoucích produktů metabolismu mikrobiální flóry, jako jsou indol a fenol, možné karcinogeny a toxiny (Kuda a kol., 2005).

### 1.7.4.1 Využití laminarinu

Laminarin byl účinně použit v prevenci a léčbě ischemických cerebrovaskulárních chorob (Han a kol, 1991). Ve studii s orálně podávaným Phycarinem ( $\beta$ -glukan izolovaný ze sporofytů *Laminaria Digitata*) se potvrdil jeho významný podíl na zotavení po prodělané chemoterapii. Také zvýšil účinnost chemoterapeutika o 20% při současném podávání v případě metastazujícího plicního karcinomu (Větvička a kol., 2006).

## 1.8 Látky použité v této práci v kombinaci s laminarinem

### 1.8.1 Lipopolysacharid (LPS)



Obr. 4: Struktura lipopolysacharidu (Laugerette a kol., 2011)

Lipopolysacharid je endotoxin, který se nachází v buněčné stěně gramnegativních bakterií. První zmínka o LPS byla již před téměř 150 lety (Billroth, 1865). Slouží jako ochrana bakteriální membrány a napomáhá ke strukturní stabilitě. Skládá se ze tří základních částí: lipidu A, oligosacharidového jádra a O-antigenu (obr. 4). Lipid A je hlavní činitel zodpovědný za toxicitu LPS. Obsahuje C12 a C14 mastné kyseliny, které jsou glykosidickými vazbami navázané na centrální polysacharid, který je spojen s imunogenním O-antigenem proměnlivého složení. Lipid A slouží jako hydrofobní kotva, vytvářející vnější vrstvu membrány bakterií. Imunitní systém je proti němu namířen aktivací monocytů a makrofágů, a to již ve velmi malém množství v krvi, řádově v pikogramech (Raetz a Whitfield, 2002). Ve vysokých koncentracích je pro člověka nebezpečný, s hrozbou smrti. Pro antigenní specifitu určující sérotyp bakterií slouží O-antigen, který se nachází na vnější části. Je tvořen opakujícími se oligosacharidovými jednotkami (Schnaitman a Kléna, 1993). Ve výzkumu se LPS používá právě díky schopnosti aktivovat imunitní systém a zesílit tak imunitní odpověď. Lipid A rozpoznávají TLR-4 receptory umístěné na makrofázích, které jsou vzdáleně příbuzné interleukinu 1 (Triantafílovou, 2004). LPS stimuluje makrofágy k produkci prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 a INF- $\gamma$  (Cuesta a kol., 2003). Právě množství TNF- $\alpha$  má pravděpodobně zásadní roli při vzniku endotoxického šokového stavu (Sauter a Wolfensberger, 1980). Ten se projevuje zánětem, abnormální koagulací, výrazně nízkým krevním tlakem a selháváním orgánů (Villa a Ghezzi, 2004). Ačkoliv je LPS velmi

účinným adjuvanciem, jeho tenká hranice mezi bezpečným užíváním a toxicitou, předurčuje k hledání podobně účinné alternativy.

### **1.8.2 Lipoteichová kyselina (LTA)**

LTA je složka buněčné stěny gram pozitivních bakterií, spolu s peptidoglykanem. Je rozpoznávána receptorem TLR-2, stejně jako  $\beta$ -glukan (Takeda a kol., 2003). LTA je složena z polyglycerolfosfátového řetězce s 23 opakujícími se jednotkami. K buněčné stěně je připojena glykolipidem, zvaným diglukosyldiacylglycerol. LTA po vazbě na receptor dokáže interagovat s přítomnými protilátkami a aktivovat komplementovou kaskádu. Navozuje také uvolnění reaktivního kyslíku a cytotoxických cytokinů z neutrofilů a makrofágů (Ginsburg, 2002). V některých studiích jsou lipoteichové kyseliny přisuzovány imunostimulující účinky díky stimulaci fagocytární aktivity, podobně jako u LPS (Miller a kol., 1976).

### **1.8.3 Monofosforyl lipid A (MPL)**

MPL je odvozený z LPS, jako jeho možná náhrada ve farmakologickém užívání u lidí. Je to nejnovější adjuvancium, používané v současné době na poli imunologie, které dokáže zesílit imunitní odpověď. Používá se hlavně při vakcinaci, za účelem zesílení odpovědi na podávané vakcíny s obsaženými TAA (tumor-associated antigens), které jsou samy o sobě málo imunogenní. Stejně jako u LPS je i u MPL ligandem TLR-4, díky lipidu A. Kvůli toxicitě LPS začala být testována analoga této látky. Podle klinických studií se ukázalo být nejvhodnější právě monofosforyl lipid A (Takayama a kol., 1981). Přípravuje se z LPS bakterie *Salmonella minnesota*, z kterého je pomocí kyselé a alkalické hydrolyzy odstraněna (R)-3-hydroxytetradová kanoylová skupina a 1-fosfát (Qureshi a kol., 1985). LPS a MPL mají podobné účinky, navozují i produkci podobných cytokinů (Wolff, 1973). Ukázalo se, že MPL navíc navozuje zvýšenou produkci oxidu dusnatého (Yao a kol., 1994), peroxid vodíku a volné radikály kyslíku (Astiz a kol., 1995). Zásadní rozdíl je ale v toxicitě. Ve srovnávací studii na zvířatech bylo zjištěno, že MPL může být 100 až 10 000 krát méně toxický než LPS. Hodnota LD50 při testech na kuřecích embryích byla pro LPS 0.0064  $\mu$ g, pro MPL byla stanovena na více než 10  $\mu$ g (Takayama a kol., 1984). Od roku 1985 bylo MPL používáno v klinických testech spolu s homogenáty melanomových linií jako vakcína proti melanomu, zvaná Detox (Mitchell a kol., 1988). Výsledkem bylo 15% pacientů s částečnou remisí a 5% s kompletní remisí. Také další vakcína Melacine zaznamenala pozitivní výsledky u osob s

pokročilým stádiem onemocnění (Elliot, 1993). Ačkoliv byly výsledky přežití pacientů podobné jako u obvyklé chemoterapie, kvalita života byla nesrovnatelně vyšší (Mitchell a Von Eschen, 1997). Melacine byl v dalších studiích použit ve vyšší dávce 20  $\mu\text{g}$  (podávané 4 krát, každé 3 týdny (Schulz a kol., 1995)). Následně byl použit i v dávce 100  $\mu\text{g}$  (1krát za měsíc po dobu 6 měsíců a poté 2 krát po třech měsících) bez závažnějších toxických účinků (chřipkové symptomy). 2 ze 3 pacientů v době vydání studie zůstali v remisi (25 a 34 měsíců) (Wong a kol., 2004). MPL se také využívá jako adjuvancium v HPV vakcíně Cervarix (Schwarz a kol., 2009).

#### **1.8.4 Proenzymy**

Jejich použití v protinádorové terapii bylo poprvé popsáno Trnkou a kol. (1999) a Novákem a Trnkou (2005). Bylo zjištěno, že způsobují redukci nádorového růstu a snížení výskytu metastáz jinak rychle rostoucího melanomu B16-F10. Celý účinek proenzymů funguje na principech získané imunity, jak bylo zjištěno v experimentech na SCID myších (Kaiserová a kol., 2012). Proenzymy jsou neaktivní formy enzymů (trypsinogen, chymotrypsinogen), které se aktivují proteolytickým štěpením v nádorovém infiltrátu. Podávání doprovodné amylázy dokázalo na dosud neznámém mechanismu omezovat letargii a sníženou pohyblivost postižených myší (Novák a Trnka, 2005). Do nádoru se enzymy z krve dostávají díky charakteristické permeabilitě cév, které zásobují nádor. Proenzymy mají kladný náboj, způsobený vysokým izoelektrickým bodem. Díky tomu mohou adherovat na negativně nabitě nádorové buňky. Trypsin a chymotrypsin vytváří komplex s  $\alpha$ -2 makroglobulinem. Bylo zjištěno, že tento komplex získává zvýšenou schopnost navázání cytokinů, včetně částečně preferenčního vázání TGF- $\beta$  a jejich likvidaci (Desser a kol., 2001). Cytokin TGF- $\beta$  je v organismu produkován převážně Treg lymfocyty a Th3 lymfocyty. Nádorové buňky využívají imunosupresivních účinků TGF- $\beta$  proti buňkám imunitního systému. Pomáhá také k rozvoji angiogeneze a tvorbě metastáz (Blobe a kol., 2000).

## 2. Cíle práce

- Optimalizovat schéma aplikace léčebné látky laminarin-BAM + LPS.
- Využít synergie laminarinu, LPS a LTA k navýšení imunitní odpovědi vůči nádorovým buňkám.
- Srovnat účinky směsi laminarin-BAM+LPS s různým způsobem kotvení: BAM, DOPE a SMCC.
- Zvýšit účinek léčby aplikací proenzymů.
- Zjistit účinnost léčebné látky se současným či střídavým podáváním se směsí manan-BAM s LPS.
- Vyzkoušet účinky MPL se směsí laminarin-BAM za účelem náhrady LPS.
- Provést analýzu buněčných subpopulací nádorového infiltrátu v prvních dvou dnech léčby laminarinem-BAM v kombinaci s LPS i jednotlivých látek pomocí průtokového cytometru.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Chemikálie

Alpha- amyláza - *Bacillus sp.* (Sigma- Aldrich, USA)

Alpha- chymotrypsinogen A - (bovinní) (Sigma- Aldrich, USA)

BAM - Mw 4000 (NOF EUROPE, Belgium).

DMSO - dimetyl sulfid (Sigma-Aldrich, USA)

DNaseI - c=10 mg/ml (Roche Diagnostics, USA)

DOPE - N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine, Dioleoyl (NOF EUROPE, Belgium)

FCS - fetální bovinní sérum, (Sigma-Aldrich, USA)

Fluorescenčně značené kalibrační kuličky (CountBright Absolute Counting Beads, 0,52 x 10<sup>5</sup> /50  $\mu$ l, Invitrogen, USA)

Fluorescenčně značené MoAbs proti specifickým receptorům leukocytárních

Kultivační médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)

Kyanoborohydrid sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Laminarin - *Laminaria digitata*, Mw 6007 (Sigma Aldrich, USA)

LiberaseDL - c=5 mg/ml (Roche Diagnostics, USA)

LPS - lipopolysacharid z *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, USA)

LTA - lipoteichová kyselina z *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, USA)

Manan - *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)

MPL - Monofosforyl lipid A (Sigma-Aldrich, USA)

Octan amonný (Sigma-Aldrich, USA)

PBS - fosfátem pufovaný fyziologický roztok

SMCC - 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylicacid N-hydroxysuccinimide ester (Thermo Scientific, Belgium)

subpopulací (eBioscience, USA)

TCEP - Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)

Trypanová modř

Trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS)

Trypsinogen - (bovinní) (Sigma-Aldrich, USA)



### **3.2 Experimentální zvířata**

Při pokusech byly používány inbrední samice černých myší kmene C57BL/6N z chovu německé pobočky firmy Charles River Laboratories v Sulzfeldu. Myši měly při zahájení pokusu váhu 18-20 g a žily v pravidelné 12 hodinové fotoperiodě. Chov byl zajištěn ve standardních stejnocenných podmínkách s podestýlkou z pilin, pravidelným přísunem granulované potravy a vody. Chov a všechna měření probíhala ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Byly chovány v umělohmotných akváriích s kovovou odnímatelnou mřížkou na vrchní straně, v místnosti s konstantní teplotou 22°C a vlhkostí 65%. V každém akváriu byla umístěna vždy jedna myš.

### **3.3 Příprava a transplantace melanomových buněk**

Při pokusech byly používány melanomové linie B16F10, původně darované od prof. Blanky Říhové z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze. Nádorové buňky se uchovávaly v kultivačním médiu RPMI 1640, které bylo obohaceno o 10% FCS (fetální bovinní sérum), antibiotika, glutamin a merkaptoetanol. Kultivace byla zajištěna v prostředí s teplotou 37°C, 100% vlhkostí a při 5% nasycením oxidem uhličitým. Kultivační médium bylo ze zásobní lahve odstraněno a buňky byly třikrát promyty fyziologickým roztokem. Po třetím promytí bylo přilito 500 µl roztoku trypsinu (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Poté se buňky nechaly inkubovat při 37°C 3 minuty. Po uvolnění buněk ze stěn byl proces trypsinizace zastaven pomocí 5 ml 10% RPMI. Poté se roztok s nádorovými buňkami slil do zkumavky a nechal zcentrifugovat 10 minut při 150 g/4°C. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn tak, aby zůstalo 3 ml roztoku. Poté se pelet důkladně rozsuspendoval pipetou. V mikrozkušavce pak byl odebraný vzorek smíchan s trypanovou modří v poměru 1:1. Po důkladném promíchání bylo provedeno počítání živých buněk pod mikroskopem v Bürkerově komůrce a úprava jejich koncentrace na 4 miliony buněk/1 ml.

Vytvořená suspenze s danou koncentrací byla transplantována myším v 8. týdnu života. Injikaci nádorových buněk předcházelo vyholení myší strojčkem na pravém boku pro snadnější detekci rostoucího nádoru. Každé myši se podkožně aplikovalo vždy 100 µl suspenze nádorových buněk B16F10 (400 000 buněk v RPMI bez séra).

### **3.4 Příprava roztoků**

#### **3.4.1 Aminace laminarinu (pro navázání BAM, SMCC, DOPE-NHS)**

Aminovaný laminarin byl získán metodou prováděnou dle Torosantucciové a kol. (2005). K laminarinu se přidal octan amonný rozpuštěný ve vodě (pH 7,5), následně byl přidán kyanoborohydrid sodný a po dobu 5 dní se směs nechala redukovat v 50°C. Poté proběhla dialýza pomocí střeva o MWCO 3500 (Serva; Heidelberg, Germany) proti PBS 4°C přes noc. Takto byl získán roztok laminarin-NH<sub>2</sub>.

#### **3.4.2 Navázání BAM a DOPE na laminarin**

Navazování kotvících látek na aminovaný laminarin proběhlo podle metody Kata a kol. (2004). Obě látky se od sebe liší počtem alifatických řetězců, BAM má jeden, DOPE dva řetězce. Po přidání BAM (Mw 4000) k dialyzovanému roztoku laminarin-NH<sub>2</sub> (pH pro reakci musí být 7,2 - 8,5) byl roztok důkladně promíchán a ponechán 2 hodiny v pokojové teplotě reagovat. Během této doby došlo k navázání aminoskupiny laminarin-NH<sub>2</sub> na NHS skupinu BAM, resp. DOPE. Reakce se zastavila 250 mikrolitry 1 M TRIS/HCl, pH 8. Následovala opět dialýza pomocí střeva o MWCO 3500 (Serva) proti PBS 4°C přes noc. Vzniklý roztok se uchovával ve zmraženém stavu (-20°C).

#### **3.4.3 Navázání SMCC na laminarin**

Příprava byla podobná jako v předchozím bodě, tedy reakce NH<sub>2</sub> skupiny aminovaného laminarinu s NHS skupinou SMCC. Klíčové pro navázání laminarin-SMCC na nádorové buňky bylo zajistit přítomnost -SH skupin. To bylo provedeno redukcí cystinů podle Christiaansena a kol. (1984).

### **3.5 Měření velikosti nádorů**

K měření velikosti nádorů se používal kaliper, měřilo se jednou za dva dny. Výsledný objem nádorové masy byl vypočítán podle vzorce  $V = \pi/6 AB^2$  (Li a kol., 2009), kde A je délka nádoru a B jeho tloušťka, měřeno od středu myši ven.

### **3.6 Počítání metastáz**

Po usmrcení byly myšim vyjmuty plíce, které byly naloženy přes noc do 4% neutrálního formaldehydu. Metastáze byly pod binolupou patrné jako černé tečky či skvrny.

### **3.7 Výsledná analýza dat**

K analýze se používal statistický dvoustranný dvouvýběrový Studentův t-test v programu MS Excel. K vyhodnocení přežívání myši byl použit Kaplan-Meierův test v programu MedCalc.

### **3.8 Postup práce při jednotlivých pokusech**

Každý pokus měl společný počáteční postup práce. 12 dní po injekci melanomových buněk byly myším změřeny původní objemy nádorů (před zahájením léčby). Poté byly rozděleny do skupin systémem postupného naplňování (distribuce myši podle velikosti nádoru – v každé skupině myši s podobně velkými nádory). Tyto velikosti byly v pracovním listě nazvány jako „den 0“, ten samý den byla zahájena léčba. Měření velikosti nádorů pomocí kaliperu pak probíhalo každé dva dny, vždy před aplikací léčebné látky. Počet skupin i myši v nich obsažených, aplikační harmonogram i složení léčebné látky, se v jednotlivých pokusech liší. Myši byly buď sledovány pro analýzu přežití (počítáno od dne započetí terapie) nebo usmrceny (cervikální dislokace) za účelem zjištění počtu metastáz. Aplikace léčebných látek ve formě roztoku probíhala vždy intratumorálně (i.t.), pomocí injekční stříkačky. Každá myš byla léčena dávkou v objemu 50  $\mu$ l.

#### **3.8.1 Pokus č. 1: Optimalizace léčebného harmonogramu terapie založené na kombinaci laminarinu-BAM s LPS.**

V tomto pokusu bylo šest skupin myši, v každé skupině bylo pět jedinců. Schéma léčby, založené na době aplikace léčby, je znázorněno v tabulce 1. Kromě měření nádorů (obden) probíhalo v tomto pokusu také měření teploty myši. Zjišťovaly se dvě hodnoty, tedy teplota nádoru (pravý bok) a povrchová teplota myši (levý bok). K tomuto účelu byl použit IR Rodent Termometr 153 IRB od firmy Bioseb. Začalo se měřit 0. den 6, 12 a 24 hodin od počátku léčby a poté každé dva dny po dobu 14 dní.

Tab. 1: Schéma léčby úvodního pokusu optimalizace doby aplikace.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace
A	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	1 aplikace 0. den
B	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	3 aplikace po sobě (den 0,1,2)
C	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	6 aplikací obden (den 0,2,4,6,8,10)
D	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	den 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
E	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	aplikace 0. den a pak jen dle potřeby (viz. výsledky, tab. 13)
K	PBS	6 aplikací obden (den 0,2,4,6,8,10)

### 3.8.2 Pokus č. 2: Zesílení imunitní odpovědi přidáním LTA k terapeutické kombinaci laminarin-BAM + LPS.

Byly použity tři skupiny myši, v každé bylo pět jedinců. Léčebné dávky byly aplikovány v intenzivním režimu první tři dny. První den po rozdělení myši do skupin a změření objemů byly i.t. aplikovány 3 dávky, druhý den 2 dávky a třetí den 1 dávka. Shrnutí aplikačního režimu je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace - společné pro všechny skupiny
A	0,2 mM laminarin - BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0. den: 13:00, 14:00, 15:00 hod. 1. den: 13:00, 14:00 hod. 2. den: 13:00 hod.
B	0,2 mM laminarin - BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) + LTA (3 mg/ml roztoku) v PBS	
K	PBS	

### 3.8.3 Pokus č. 3: Screening optimálních podmínek pro terapii založenou na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk.

#### 3.8.3.1 Srovnání účinku laminarin – BAM a laminarin-DOPE (vše v synergii s LPS).

V pokusu byly použity dvě skupiny myší, v každé skupině bylo pět jedinců. Léčebný 4 pulzní režim ve dnech 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26 byl zachován pro obě skupiny. Schéma léčby je uvedeno v tabulce 3.

Tab. 3: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace (dny)
A	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
B	0,2 mM laminarin-DOPE-NHS + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26

#### 3.8.3.2 Srovnání účinku kotvení pomocí BAM a SMCC.

V tomto pokusu byl srovnán účinek laminarinu-BAM s účinkem laminarinu-SMCC (oboje ve směsi s LPS). Obě skupiny byly tvořeny čtyřmi jedinci. V případě použití preparátu obsahujícího laminarin-SMCC, byl nejprve do nádoru i.t. aplikován roztok TCEP (50  $\mu$ l s 50 mM koncentrací) pro zajištění redukce cystinů a vytvoření -SH skupin na nádorových buňkách. Po hodině byl aplikován léčebný roztok dle schématu uvedeného v tabulce 4.

Tab. 4: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace (dny) - společně pro obě skupiny
A	0,2 mM laminarin - BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
B	0,2 mM laminarin-SMCC/R + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	

#### 3.8.3.3 Zjištění vlivu proenzymů na terapii pomocí laminarinu-SMCC s LPS.

Srovnával se účinek látek ve dvou skupinách po čtyřech myších: laminarin-SMCC + LPS (v aplikačním režimu 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26) a proenzymů. Byly použity proenzymy trypsinogen (koncentrace 7500 BAEE jednotek po aktivaci),  $\alpha$ -chymotrypsinogen

A (koncentrace 31 BTEE jednotek po aktivaci) a  $\alpha$ -amyláza (820 maltózových jednotek), na 1 ml PBS. Roztok s proenzymy se aplikoval intramuskulárně (musculus semitendinosus), v objemu 100  $\mu$ l/myš. Redukční činidlo (TCEP) se aplikovalo stejně jako v předchozím pokusu. Schéma aplikace je uvedeno v tabulce 5.

Tab. 5: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace (dny)
A	0,2 mM laminarin-SMCC + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
B	0,2 mM laminarin-SMCC + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
	proenzymy	4,5,6...12,13,14...20,21,22...28,29,30

#### 3.8.3.4 Srovnání účinku laminarin – BAM + LPS a manan –BAM + LPS samostatně a ve směsi, srovnání s léčbou laminarin-BAM + LPS.

Celkem byly použity tři skupiny, v každé byly 4 myši. Laminarin-BAM byl injikován i.t. v pulzním režimu s pětidenními pauzami, ve dnech 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26. V kontrastu s ním byl použit střídavý režim i.t. podání látek laminarin-BAM (0,1,2.....16,17,18) a manan-BAM (.....8,9,10.....24,25,26). Ve třetí skupině byla použita směs laminarin-BAM a manan-BAM v poměru 1:1, ve stejném režimu jako laminarin-BAM. Všechny zkoumané látky byly testovány ve směsi s LPS. Schéma pokusu je uvedeno v tabulce 6.

Tab. 6: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace (dny)
A	0,2 mM laminarin –BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
B	0,2 mM laminarin – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2.....16,17,18
	0,2 mM manan – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	8,9,10.....24,25,26
C	0,2 mM laminarin – BAM + 0,2 mM manan – BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26

### 3.8.4.5 Srovnání účinku laminarinu-SMCC a střídavého podávání laminarin-SMCC a manan-SMCC (vše podpořeno LPS).

K pokusu byly použity tři terapeutické roztoky ve dvou skupinách, po čtyřech myších. Srovnával se účinek laminarinu a mananu podávaného střídavě, s laminarinem samotným. Všechny látky byly vázány na buňky pomocí SMCC (+ aplikace redukčního činidla) a všude byl použit rovněž LPS. Přehled látek a aplikačních režimů je uveden v tabulce 7.

Tab. 7: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace (dny)
A	0,2 mM laminarin –SMCC/R + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26
B	0,2 mM laminarin – SMCC/R + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	0,1,2.....16,17,18
	0,2 mM manan – SMCC/R + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS	8,9,10.....24,25,26

### 3.8.4 Pokus č. 4: Náhrada LPS pomocí MPL.

V tomto pokusu bylo použito 30 myší v šesti skupinách. V každé skupině bylo pět myší. Všechny léčebné látky byly aplikovány v dvou pulzní terapii, s pětidenní přestávkou. Schéma léčby je uvedeno v tabulce 8.

Čtrnáctý den od započetí léčby bylo ukončeno měření nádorů a myši byly humánně usmrceny (cervikální dislokace). Z odebraných plic se poté zjišťovala přítomnost a počet metastáz pod binolupou.

Tab. 8: Schéma léčby.

Skupina	Druh léčby	Schéma aplikace (dny) - společné pro všechny skupiny
A	0,2 mM laminarin - BAM v PBS	0,1,2.....8,9,10
B	0,2 mM laminarin - BAM + LPS (0,2 mg/ml roztoku) v PBS	
C	0,2 mM laminarin - BAM + MPL (0,2 mg/ml roztoku) v PBS	
D	LPS (0,2 mg/ml PBS)	
E	MPL (0,2 mg/ml PBS)	
K	PBS	

### 3.8.5 Pokus č. 5: Studie nádorové infiltrace během nádorové imunoterapie pomocí průtokové cytometrie.

#### 3.8.5.1 Aplikační harmonogram léčby.

V tomto pokusu byla analyzována infiltrace leukocytů do nádoru v prvních dvou dnech léčby. Byly vytvořeny 4 skupiny, každá obsahovala 9 myší. 3 myši byly použity jako negativní kontrola, tedy stav infiltrace u neléčených (netknutých jehlou) myší. Celkem bylo použito 39 myší. Seznam aplikovaných látek je uveden v tabulce 9. Všechny skupiny byly léčeny příslušnou látkou pouze v čase 0. Měření a odebírání nádorů probíhalo v intervalu 12, 24 a 48 hodin po aplikované terapii. Myši byly usmrceny, nádory vyjmuty a připravena buněčná suspenze, která byla měřena na průtokovém cytometru. Výsledná hodnota je vždy průměrem ze tří myší dané skupiny.

Tab. 9: Schéma léčby.

Skupina	Aplikované roztoky
A	LPS (0,5 mg/ml PBS)
B	0,2 mM laminarin-BAM v PBS
C	0,2 mM laminarin-BAM + LPS (0,5 mg/ml roztoku) v PBS
K	PBS



### 3.8.5.2 Postup práce při zpracování nádoru a analýze.

V daném intervalu byly nádory odebrány vždy třem myším z každé skupiny. Po očištění se nádor rozstříhal na malé kousky a vložil do mikrozkušavky s 1 ml roztokem 67  $\mu$ l LiberaseDL a 20  $\mu$ l DNaseI v RPMI 1640 (bez séra), pak se uložil na led. Poté se nechaly vzorky třepat na třepačce 1 hodinu při 37°C. Vzorky byly dále centrifugovány 10 minut při 150 g/4°C. Supernatant byl odebrán a pelet se naředil v PBS. Dále byl pelet manuálně zhomogenizován přes BD sítko do 50 ml falcony, doplněn PBS a centrifugován 10 minut při 150 g/4°C. Vzniklý pelet se již přesně naředil fyziologickým roztokem na 500  $\mu$ l. Poté se vzorky rozpipetovávaly do 96 jamkové mikrotitrační destičky po 10  $\mu$ l na jamku. K vzorkům se přidalo 10  $\mu$ l předředěných fluorescenčně značených protilátek (viz. tabulka 11, 12) specificky se vázajících k povrchovým markerům buněk imunitního systému. Protilátky se nechaly s buňkami inkubovat 20 minut při 4°C. Následně byly vzorky v jamkách promyty pomocí 150  $\mu$ l PBS a centrifugovány 2 minuty při 270 g/4°C. Po odstranění supernatantu se k peletu přidalo 140  $\mu$ l PBS a 10  $\mu$ l kalibračních kuliček (eBioscience, USA) ke kvantifikaci absolutního množství buněk. V této podobě byly vzorky připraveny na analýzu na průtokovém cytometru (BD FACSCantoII flow cytometer, BD Biosciences, USA). Během analýzy vzorku byla detekována emise fluorescence jednotlivých buněk během působení excitačních laserů o vlnové délce 488 nm (modrý) a 633 nm (červený). Analýza proběhla pomocí programu BD FACSDiva verze 6.1.3. Nastavení laserů a HTS loaderu, který prováděl měření vzorků z 96 jamkové destičky, je uveden v tabulce 10. V každém vzorku bylo zaznamenáno 20 000 událostí, byla nastavena kompenzace. Výsledné hodnoty se poté přepočítaly na 1 mm<sup>3</sup> nádorové tkáně.

Tab. 10: Nastavení laserů a podmínek měření na průtokovém cytometru.

Nastavení laserů		Nastavení HTS	
Window Extension	2,0	Sample Flow Rate	1,0
FSC Area Scalling	0,8	Sample Volume ( $\mu$ l)	20
Laser Delay Blue	0,0	Mixing Volume ( $\mu$ l)	100,0
Laser Delay Red	30,0	Mixing Speed	100,0
Area Scalling Blue	0,8	Number of Mixes	2,0
Area Scalling Red	1,3	Wash Volume ( $\mu$ l)	200,0

Tab. 11: Fluorescenčně značené protilátky pro přípravu master mixu - značení I.

<b>Buněčná (sub)populace</b>	<b>Specifikace MoAb</b>	<b>Ředění</b>
leukocyty	anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	200x
T-lymfocyty	anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	100x
Th lymfocyty	anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5; 0,2 mg/ml	100x
Tc lymfocyty	anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7; 0,2 mg/ml	100x
NK buňky	anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136; 0,2 mg/ml	100x

Tab. 12: Fluorescenčně značené protilátky pro přípravu master mixu - značení II.

<b>Buněčná (sub)populace</b>	<b>Specifikace MoAb</b>	<b>Ředění</b>
leukocyty	anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	200x
T-lymfocyty	anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	100x
granulocyty	anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0,2 mg/ml	100x
B lymfocyty	anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3; 0,2 mg/ml	100x
monocyty/makrofágy	anti-Mouse F4/80 PE-Cy7; clone BM8; 0,2 mg/ml	100x

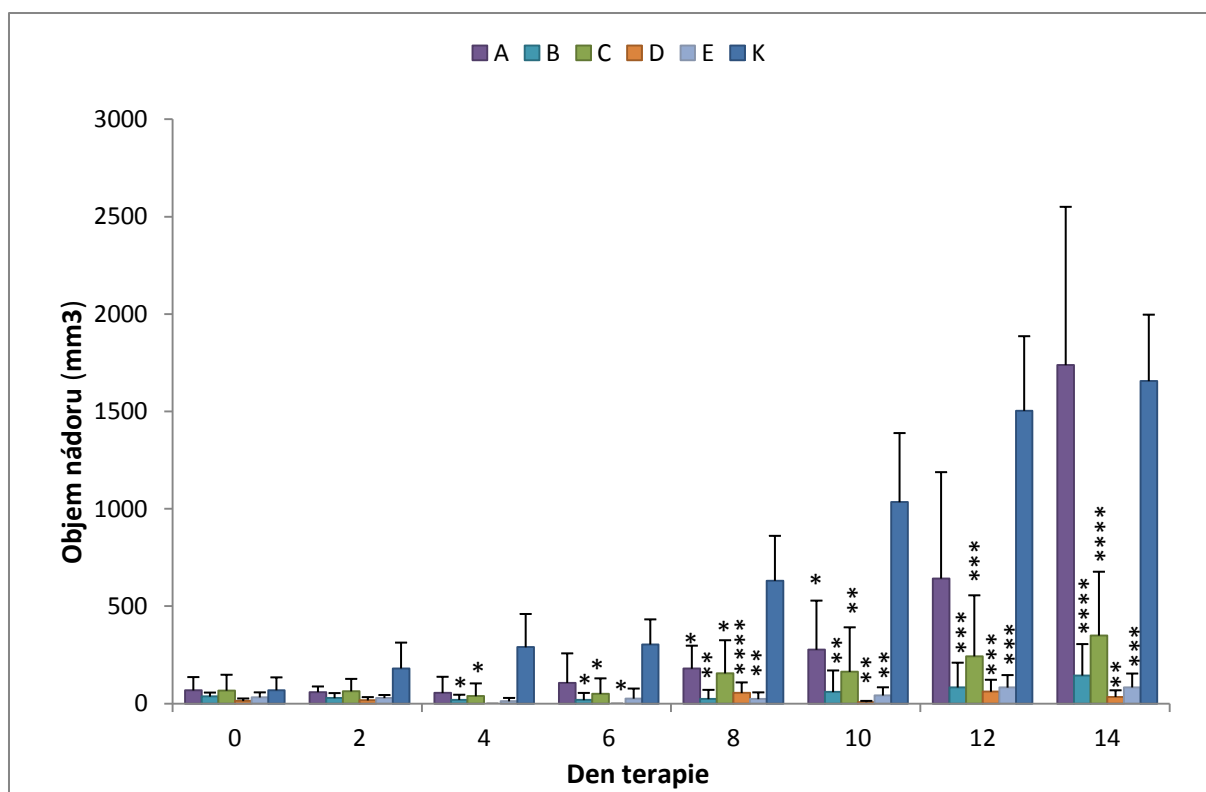
## 4. Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1: Optimalizace léčebného harmonogramu terapie založené na kombinaci laminarinu-BAM s LPS.

V tomto pokusu jsem se zaměřila na zjištění, které schéma aplikace laminarinu-BAM + LPS je nejefektivnější. Samotné složení látky bylo již v protinádorové léčbě ověřeno (Auerová, 2012). Vliv léčebné směsi laminarin-BAM s lipopolysacharidem na redukci nádorů v různých aplikačních režimech, je uveden v grafu na obrázku 6. Z něj je patrné, že ze všech léčebných režimů je nejvíce účinná 4 pulzní aplikace ve dnech 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26. Dosáhla statistické významnosti, vztažené ke kontrole 6. - 14. den a byla zde spolu se skupinou B zaznamenána nejdelší doba přežití (tab. 14). 4 pulzní terapie dokonce vyvolala úplné vymýcení nádoru u všech myší 4. - 6. den, u poloviny z nich až do 18. dne (místo nádoru však léze bez kůže). Aplikační režim skupiny E byl také úspěšný v redukci nádoru, zvláště díky flexibilitě léčby podle výskytu nádoru (dny aplikace uvedeny v tabulce 13), ale v dlouhodobém výhledu efekt neměl (obr. 7). U skupiny B (aplikace v den 0,1,2) a u skupiny C (aplikace 6x obden) bylo ve dnech 4. - 14. rovněž dosaženo statisticky významné redukce nádorového růstu. Nejhůře naopak dopadla léčba aplikovaná pouze jednou, ve 14. dni terapie dokonce průměrná velikost nádorů přesáhla velikost nádorů kontroly.

Tab. 13: Aplikační režim skupiny E.

Myš	Dny aplikace
1	0 až 26
2	0,1,2,3,4,5,8,9,10,11,12 až 26
3	0,1,2,8,9,10,12, až 26
4	0,1,2,5,7,9,10,11,12, až 26
5	0,1,2,3,4,10,11,12, až 26

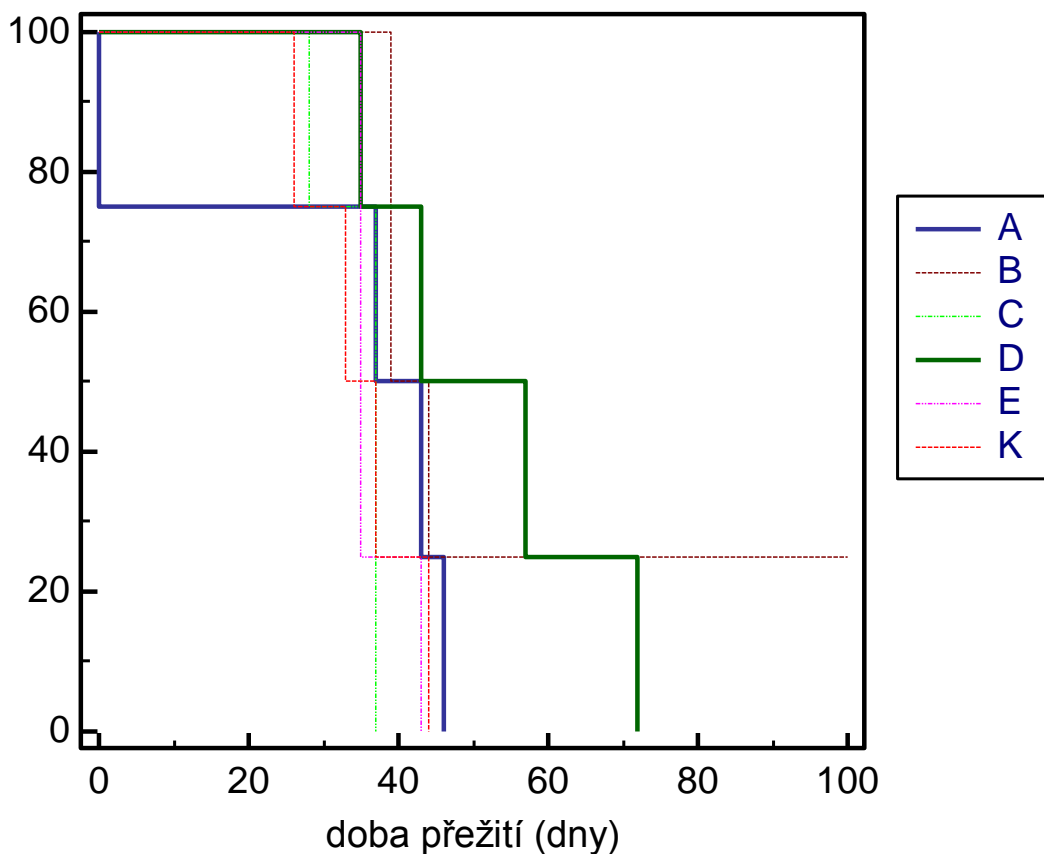


Obr. 6: Graf vlivu léčby laminarin-BAM+LPS na velikost nádorů v různých aplikačních režimech. A - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0), B - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0,1,2), C - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0,2,4,6,8,10), D - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26), E - laminarin-BAM+LPS (aplikace 1x, a pak dle potřeby), K - PBS (kontrola).

\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,005$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,001$  vztaženo ke kontrole (skupina K)

Měření teplot myší nevykázalo žádné změny, které by odrážely způsob a průběh terapie (data neuvedena).

Na obrázku 7 je zaznamenána analýza přežití myší léčených roztokem laminarin-BAM+LPS v jednotlivých skupinách. U žádné skupiny nedošlo ke statisticky významnému prodloužení vůči kontrole. Jedna myš ze skupiny C (aplikace den 0,1,2) přežila hranici 100 dní a žije dodnes.



Obr. 7: Analýza přežití po aplikované léčbě laminarin-BAM+LPS v různých aplikačních režimech A - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0), B - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0,1,2), C - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0,2,4,6,8,10), D - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26), E - laminarin-BAM+LPS (aplikace den 0, a pak dle potřeby), K - PBS (kontrola).

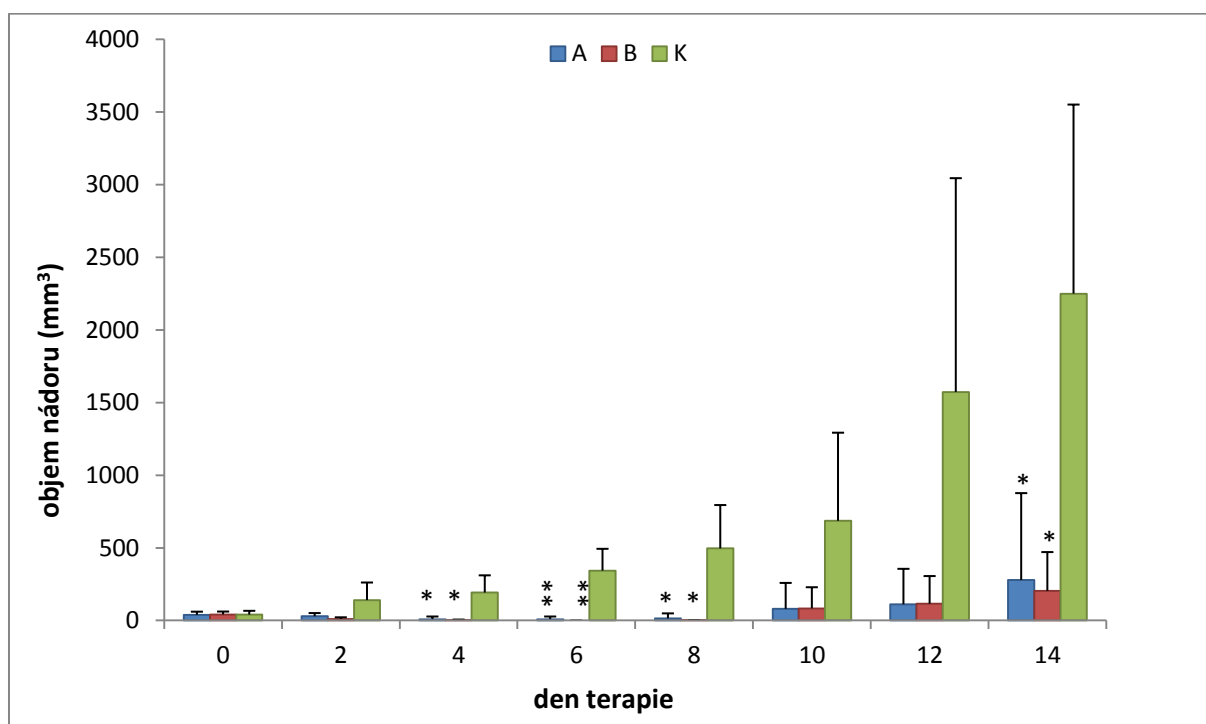
Shrnutí léčebného působení aplikačních režimů je uvedeno v tabulce 14. Efektivita v rámci redukce nádorového růstu je zřejmá, ale z dlouhodobějšího hlediska přežití myši se jeví jako neúčinná.

Tab. 14: Vliv terapie 0,2 mM laminarin-BAM+LPS (0,5 mg/ml) na redukci nádorového růstu a přežití myši.

Aplikační režim směsi 0,2 mM laminarin-BAM+LPS (0,5 mg/ml)	Redukce nádorového růstu vůči kontrole	Průměrná doba přežití (dny)	Statistická významnost doby přežití vůči kontrole	Počet myši přeživších 100 dní od počátku léčby
den 0	45%	31,5	ne	0
dny 0,1,2	94%	55,5	ne	1 (25%)
dny 0,2,4,6,8,10	82%	35	ne	0
dny 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26	97%	52	ne	0
den 0, a pak dle potřeby - viz. tab. 13	95%	37	ne	0

#### 4.2 Pokus č. 2: Zesílení imunitní odpovědi přidáním LTA k terapeutické kombinaci laminarin-BAM + LPS.

Výsledek pokusu je uveden v grafu na obrázku 8. Je zřejmé, že přidání LTA nemá zásadní vliv na redukci nádorového růstu vyvolanou směsí laminarin-BAM s LPS.

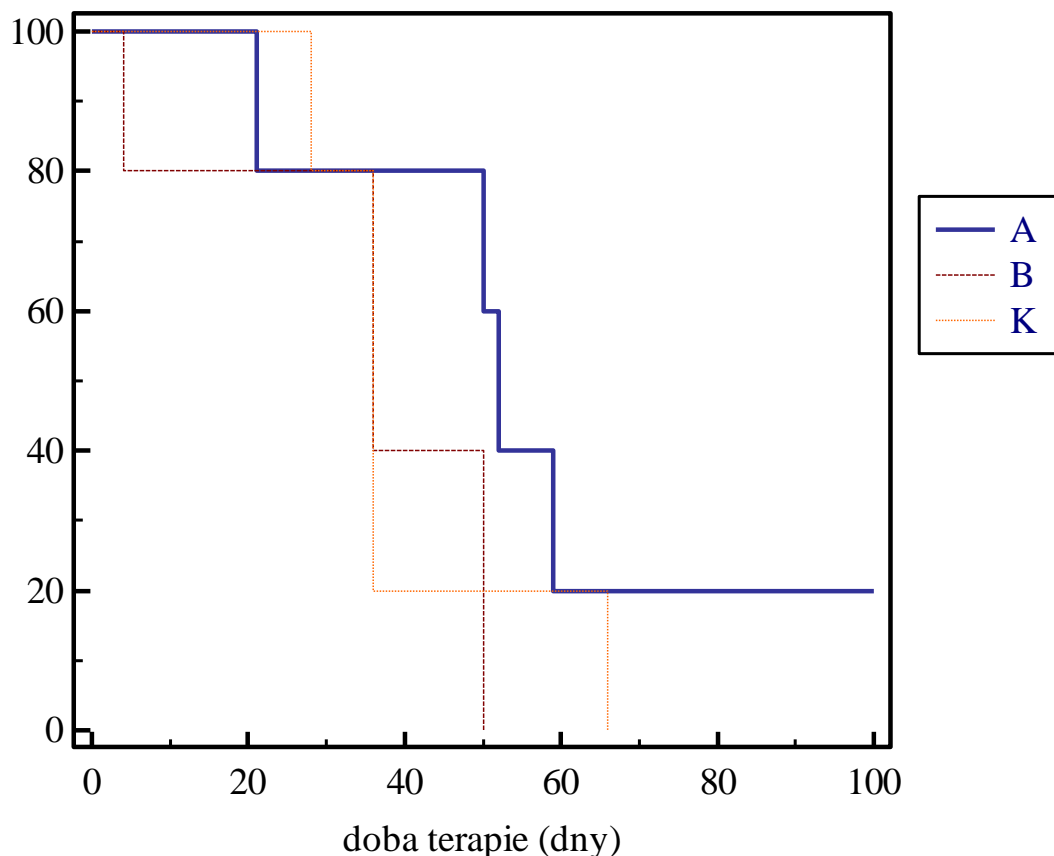


Obr. 8: Graf vlivu léčby roztokem laminarin-BAM+LPS a s přidavkem LTA na velikost nádorů. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-BAM+LPS+LTA, K - kontrola (PBS)

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

Obrázek 9 znázorňuje analýzu přežití. Terapie bez i s LTA nevykázaly statisticky významné prodloužení přežití. Jak však vyplývá z tabulky 16, skupina A (bez LTA) vykázala delší průměrnou dobu přežití a jedna myš v této skupině přežila hranici 100 dní.

Celkově tedy nelze konstatovat, že by přídavek LTA zlepšil terapeutické vlastnosti směsi laminarin-BAM s LPS v použitém aplikačním režimu.



Obr. 9: Analýza přežití myši léčených roztokem laminarin-BAM+LPS a s přídavkem LTA po aplikované léčbě. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-BAM+LPS+LTA, K - kontrola (PBS)

V tabulce 15 je uvedeno shrnutí účinku terapií. Obě byly vysoce účinné v redukci nádorového růstu, ale z dlouhodobého hlediska neefektivní, zejména skupina s přidaným LTA.

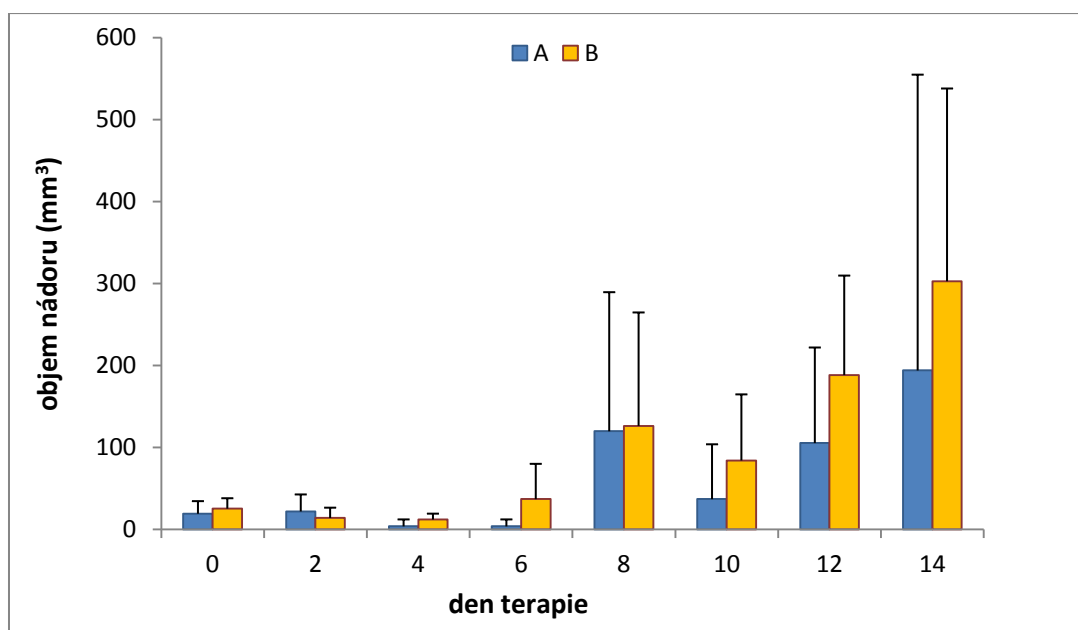
Tab. 15: Vliv terapií na redukci nádorového růstu a přežití myši.

Terapie	Redukce nádorového růstu vůči kontrole	Průměrná doba přežití (dny)	Statistická významnost doby přežití vůči kontrole	Počet myši přeživších 100 dní od počátku léčby
0,2 mM laminarin - BAM + LPS (0,5 mg/ml)	91%	56,4	ne	1 (25%)
0,2 mM laminarin - BAM + LPS (0,5 mg/ml) + LTA (3 mg/ml)	93%	35,2	ne	0

### 4.3 Pokus č. 3: Screening optimálních podmínek pro terapii založenou na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk.

#### 4.4.1 Srovnání účinku laminarin – BAM a laminarin-DOPE (vše v synergii s LPS).

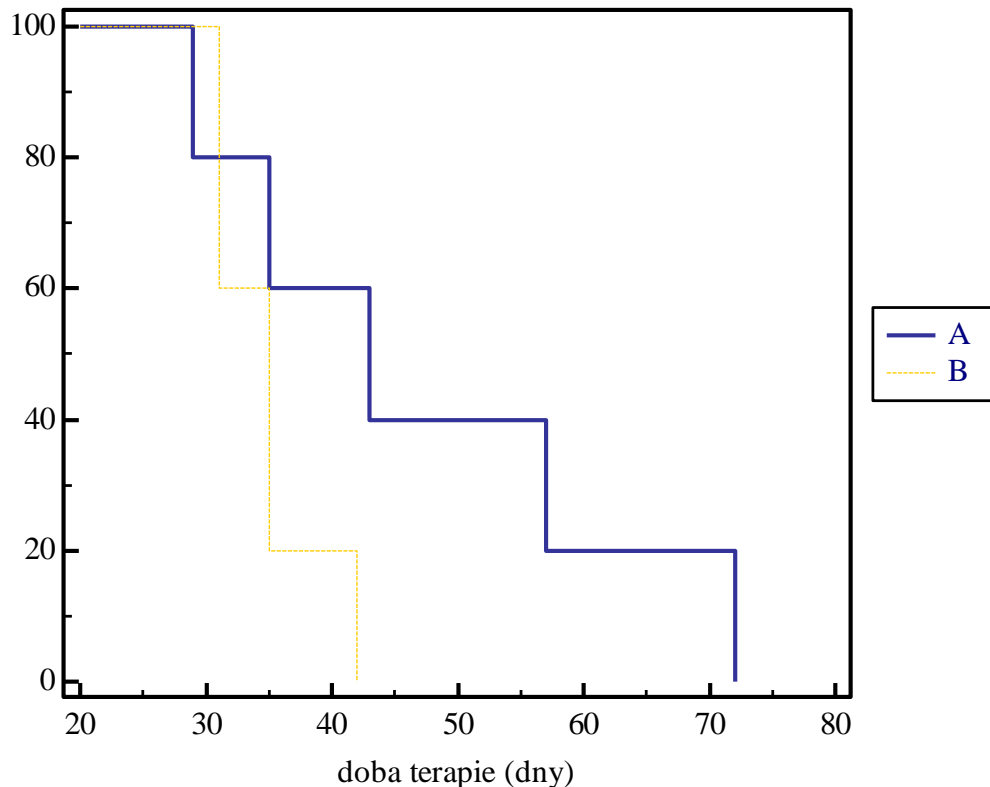
Podle grafu na obrázku 10 je zřejmé, že DOPE kotva nemá lepší účinek na redukci nádorového růstu než kotva BAM. U skupiny léčené laminarinem-BAM+LPS byl u čtyř myši mezi 4. a 8. dnem léčby zaznamenán beznádorový stav. Skupina s DOPE kotvou měla 2 myši bez nádoru mezi 6. - 8. dnem terapie.



Obr. 10: Graf vlivu léčby laminarin – BAM a laminarin-DOPE na velikost nádorů. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-DOPE + LPS.



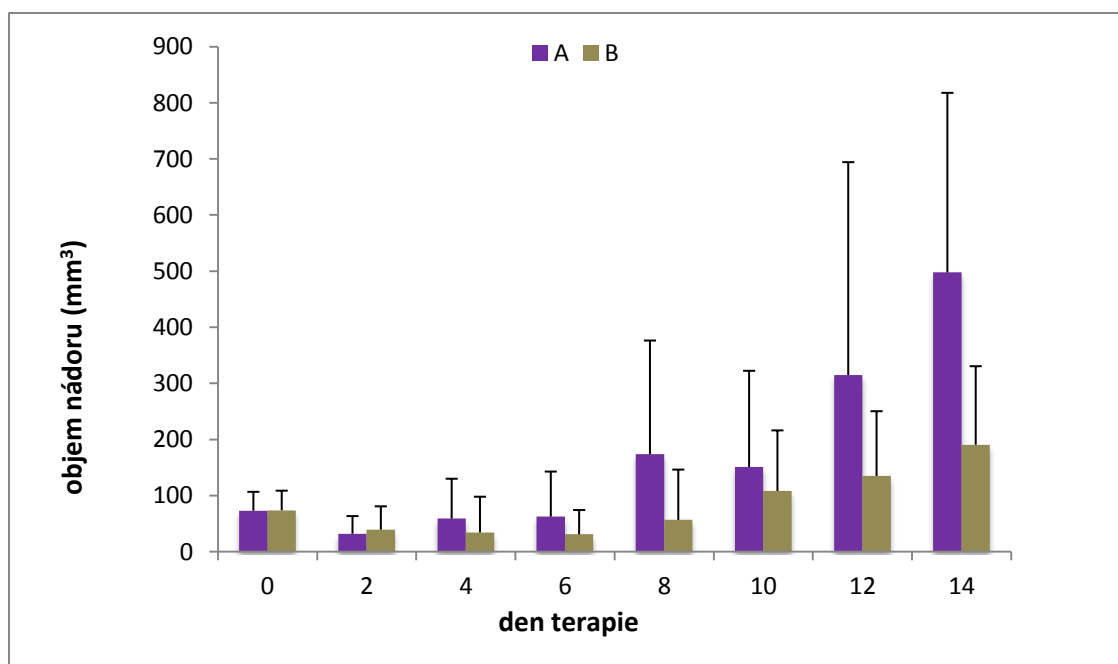
Z hlediska přežití existuje mezi oběma skupinami rozdíl, statisticky nevýznamný (obrázek 11). Průměrná doba přežití u skupiny s kotvou BAM je 47 dní, u skupiny s DOPE pak 35 dní.



Obr. 11: Analýza přežití myši po aplikované léčbě laminarin – BAM a laminarin-DOPE. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-DOPE + LPS.

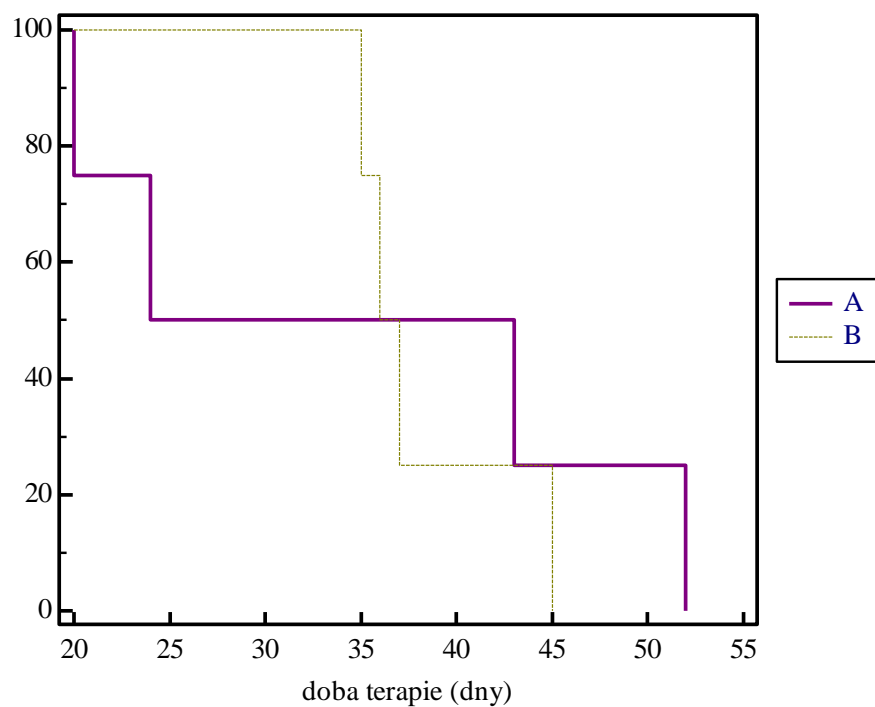
#### 4.3.2 Srovnání účinku kotvení pomocí BAM a SMCC.

Kotvy BAM nebo SMCC navázané na laminarin měly v prvním týdnu léčby velmi podobný účinek, 4. - 6. den bylo dokonce 50% myši bez nádoru. Jak vyplývá z obrázku 12, později vyvolával ligand s kotvením SMCC vyšší účinek, nicméně rozdíl nebyl statisticky významný. Změna nastala v 8. dni, kdy se nádory u skupiny s BAM kotvou obnovily a jejich růst už nebyl zastaven, ač byla terapie 4 pulzní. U SMCC kotvy došlo k relapsu myši 16. den, ale průměrné velikosti nádorů zůstaly nižší než u druhé skupiny (data neuvedena).



Obr. 12: Graf vlivu kotvení pomocí BAM a SMCC na velikost nádorů. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-SMCC/R+LPS.

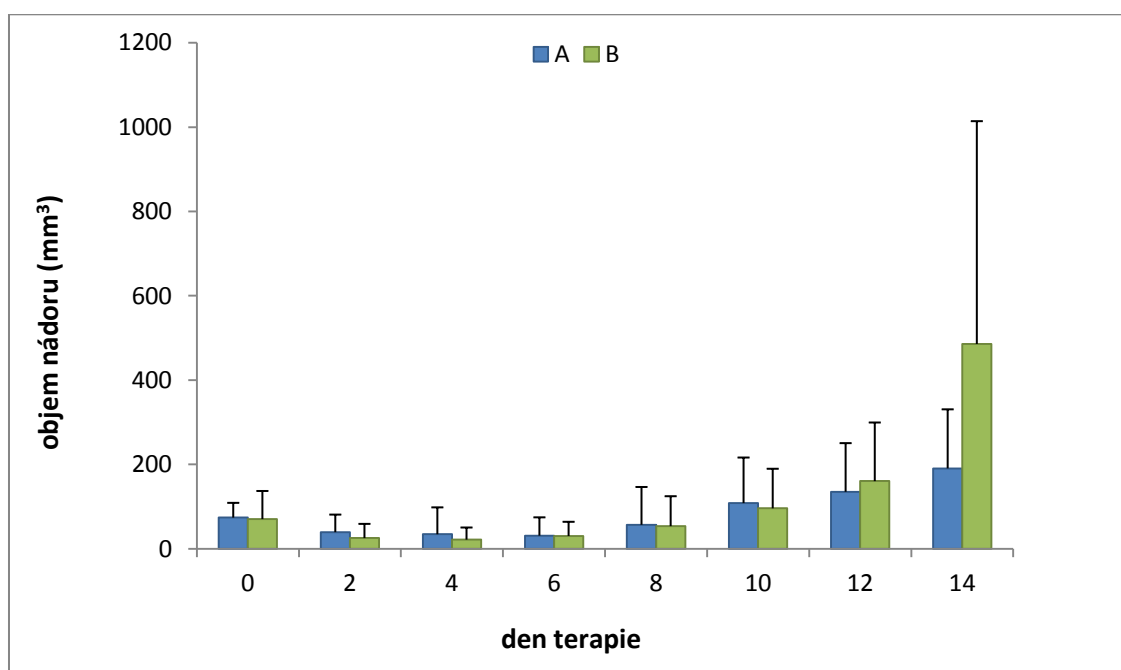
Z hlediska přežití graficky zobrazeného na obrázku 13, není mezi srovnávanými skupinami statisticky významný rozdíl. Myši léčené laminarinem-BAM žily o něco déle (průměrně 43 dny, kdežto ve skupině laminarin-SMCC 38 dny).



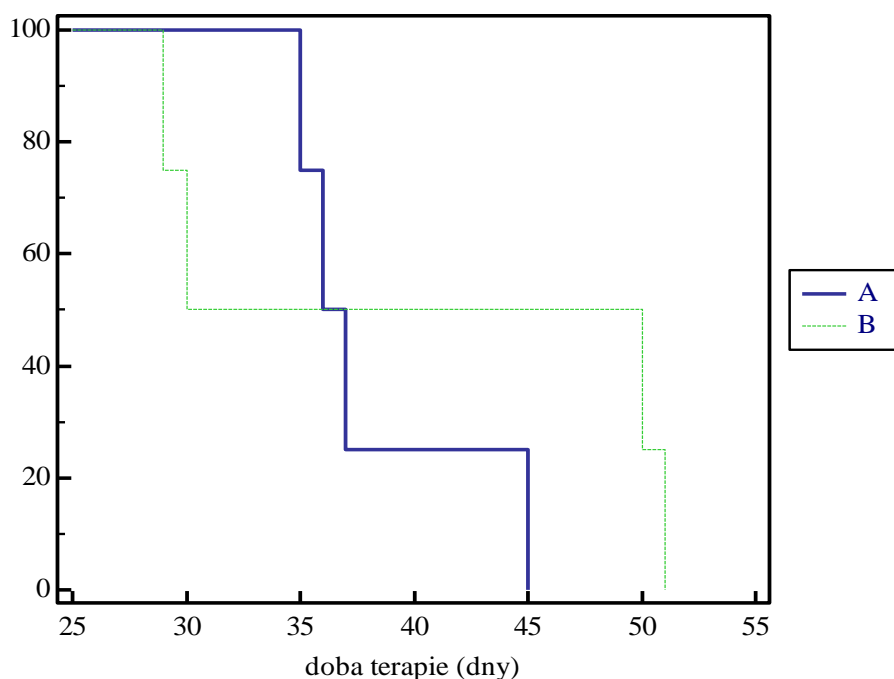
Obr. 13: Analýza přežití myši po aplikaci léčby s kotvami BAM a SMCC. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-SMCC/R+LPS.

### 4.3.3 Zjištění vlivu proenzymů na terapii pomocí laminarinu-SMCC s LPS.

Jak vyplývá z obrázku 14, kombinace terapie směsí laminarin-SMCC/LPS s proenzymoterapií neměla, co se týče redukce nádorového růstu, žádný vliv na původní terapii (laminarin-SMCC/LPS). Proenzymoterapie mírně zvýšila dobu přežití (průměrná doba přežití 40 dní, kdežto ve skupině bez proenzymů 38 dní). Tento rozdíl nebyl statisticky významný (obr. 15).



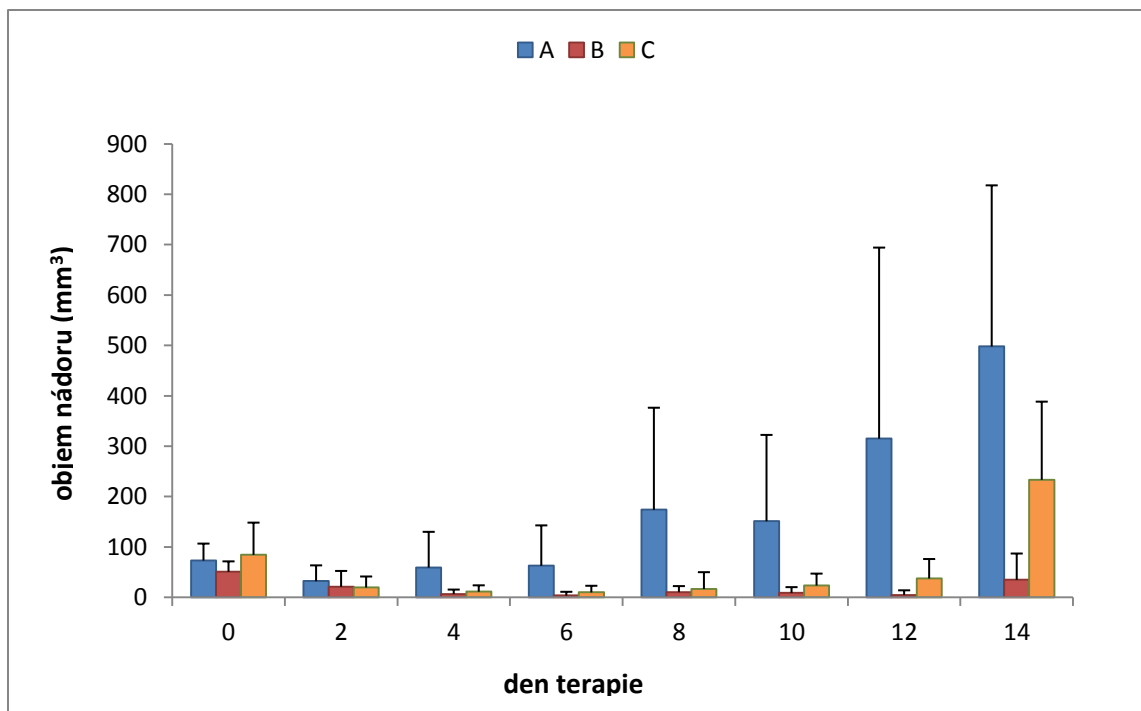
Obr. 14: Graf vlivu proenzymů na účinek laminarin-SMCC+LPS. A - laminarin-SMCC+LPS, B - laminarin-SMCC+LPS+proenzymy.



Obr. 15: Analýza přežití myší po aplikované léčbě s obsahem proenzymů. A - laminarin-SMCC+LPS, B - laminarin-SMCC+LPS+proenzymy.

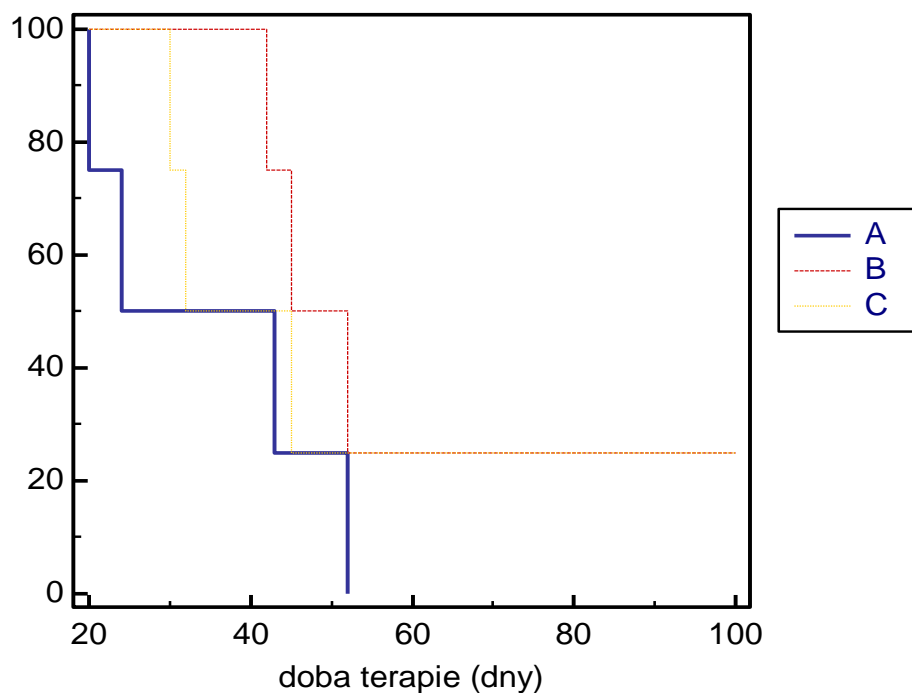
#### 4.3.4 Srovnání účinku laminarin – BAM + LPS a manan –BAM + LPS samostatně a ve směsi, srovnání s léčbou laminarin-BAM + LPS.

Z obrázku 16 je zřejmé, že velmi dobře zafungovala střídavá léčba laminarin-BAM a manan-BAM ve skupině B. Ač nebyla zjištěna žádná statistická významnost, nejbližší tomu byla tato skupina ve 12. dni ( $P=0,06$  ve srovnání s terapií A bez mananu). Tři čtvrtiny myší zůstaly při této střídavé terapii bez nádoru až do 14. dne od počátku léčby.



Obr. 16: Graf vlivu terapie pomocí laminarin-BAM a manan-BAM+LPS na velikost nádorů. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-BAM+LPS, manan-BAM+LPS (střídavě), C - laminarin-BAM+LPS, manan-BAM+LPS (směs 1:1).

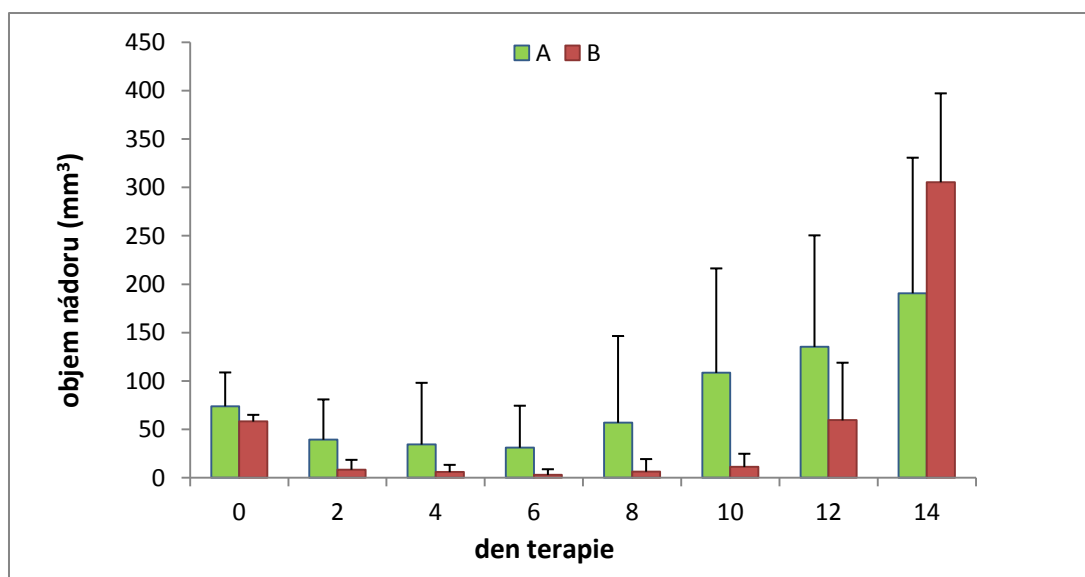
Podle obrázku 17 měly obě terapie s použitým mananem vliv na prodloužení přežití. Průměrná doba přežití pro laminarin-BAM+LPS a manan-BAM+LPS ve střídavém režimu je 60 dní, ve směsi pak 52 dní. Ve skupině laminarin-BAM+LPS bez mananu je průměrná doba přežití 35 dní. Mezi srovnávanými skupinami není statisticky významný rozdíl.



Obr. 17: Analýza přežití myši po aplikované léčbě laminarin-BAM a manan-BAM+LPS. A - laminarin-BAM+LPS, B - laminarin-BAM+LPS, manan-BAM+LPS (střídavě), C - laminarin-BAM+LPS, manan-BAM+LPS (směs 1:1).

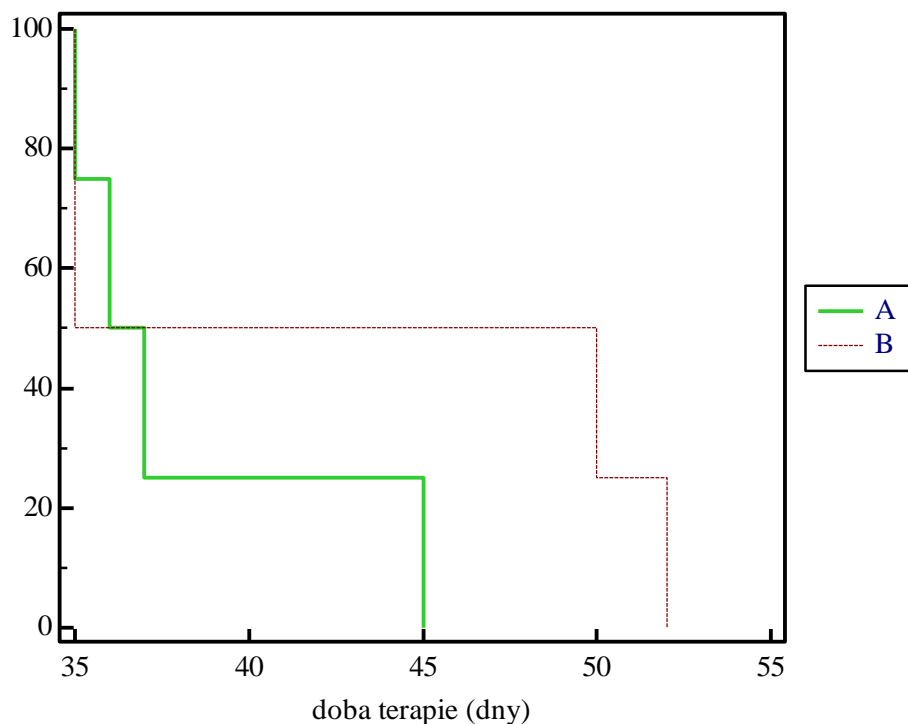
#### 4.3.5 Srovnání účinku laminarin-SMCC a střídavého podávání laminarin-SMCC a manan-SMCC (vše podpořeno LPS).

Podle obrázku 18 byla redukce nádorového růstu u střídavého podávání laminarin-SMCC a manan-SMCC statisticky nevýznamně vyšší, kolem 12. dne však velikost nádorů stoupala.



Obr. 18: Graf vlivu léčby laminarin-SMCC a střídavého podávání laminarin-SMCC a manan-SMCC na velikost nádorů. A - laminarin-SMCC/R+LPS, B - laminarin-SMCC/R+LPS, manan-SMCC/R+LPS.

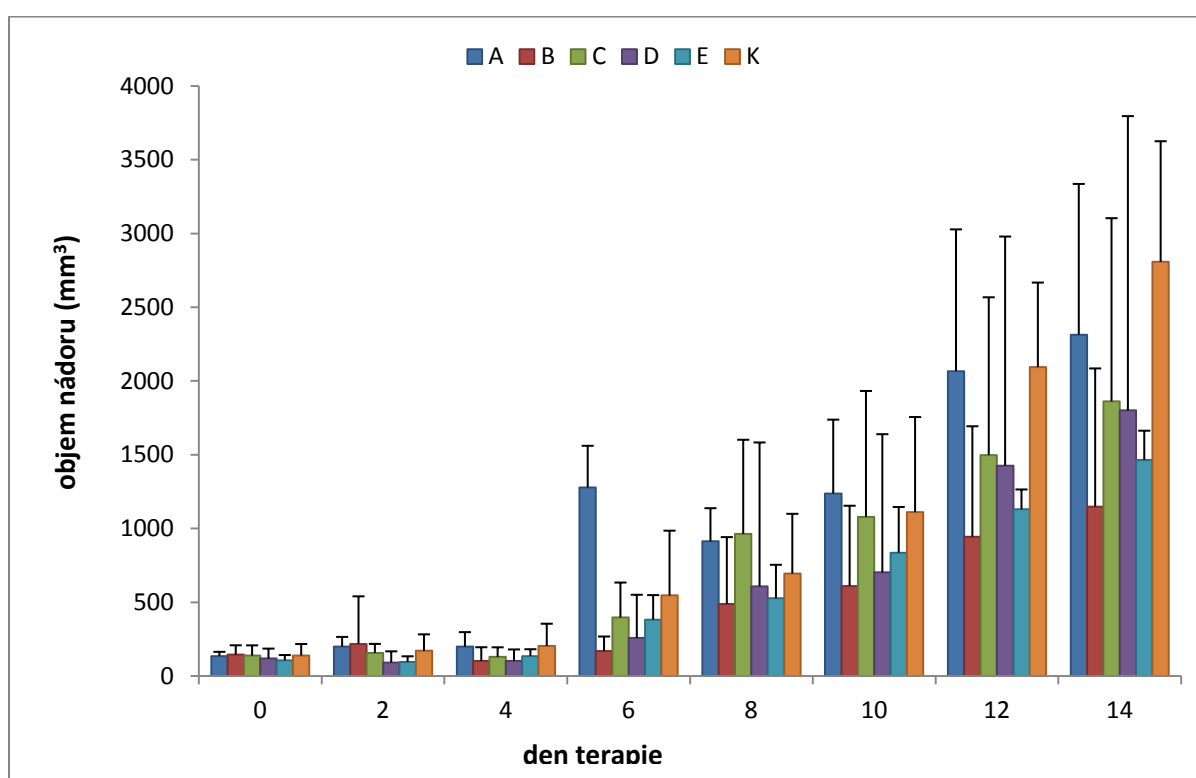
Léčba s obsahem mananu má vliv na prodloužení života myši, avšak statisticky nevýznamný (obr. 19). Průměrná doba přežití pro laminarin-SMCC/R+LPS je 38 dní, ve skupině se střídavým podáváním laminarin-SMCC a manan-SMCC pak 43 dní.



Obr. 19: Analýza přežití myši po aplikované léčbě laminarin-SMCC a střídavého podávání laminarin-SMCC a manan-SMCC. A - laminarin-SMCC/R+LPS, B - laminarin-SMCC/R+LPS, manan-SMCC/R+LPS

#### 4.4 Pokus č. 4: Náhrada LPS pomocí MPL.

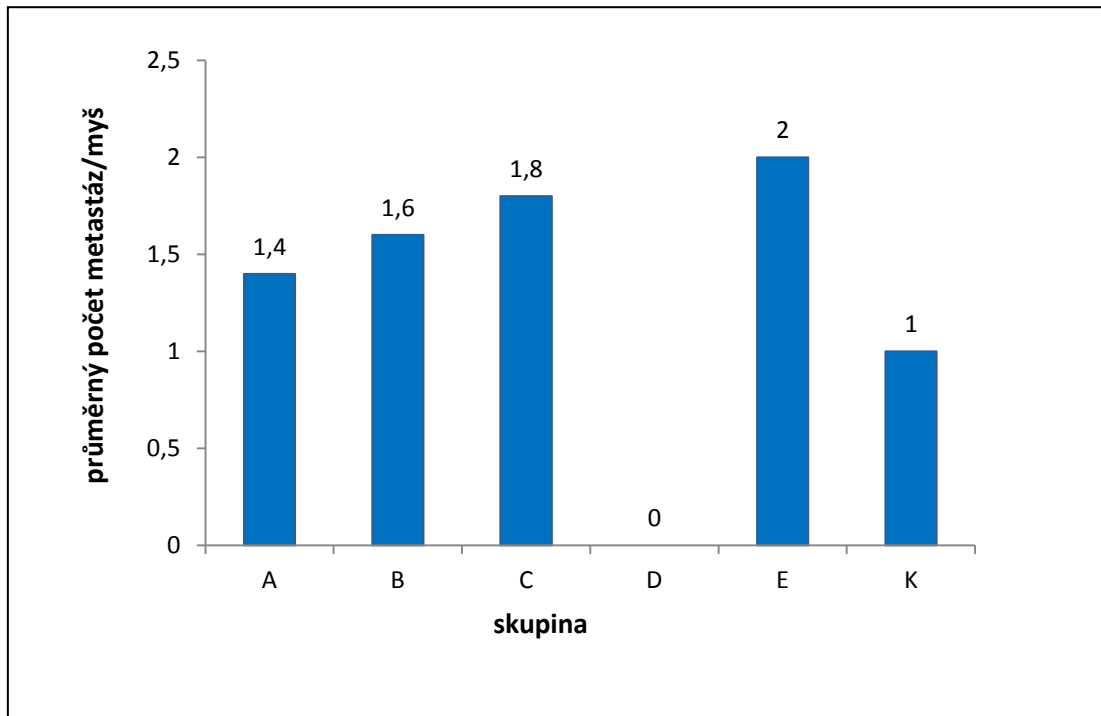
V tomto pokusu byla sledována jak synergie LPS a MPL s laminarinem-BAM dohromady, tak jejich jednotlivých složek. Na obrázku 20 je graf velikostí nádorů po dobu 14 dní od počátku léčby. MPL a LPS sami o sobě vykazovali srovnatelnou, nicméně slabou redukci nádorového růstu. U směsi laminarin-BAM s LPS došlo k určité synergii, u směsi laminarin-BAM s MPL nic takového pozorováno nebylo. Zároveň je zjevné, že samotná látka laminarin-BAM bez účinku LPS ztrácí na své efektivitě. V žádné skupině se neobjevila statistická významnost vůči kontrole K.



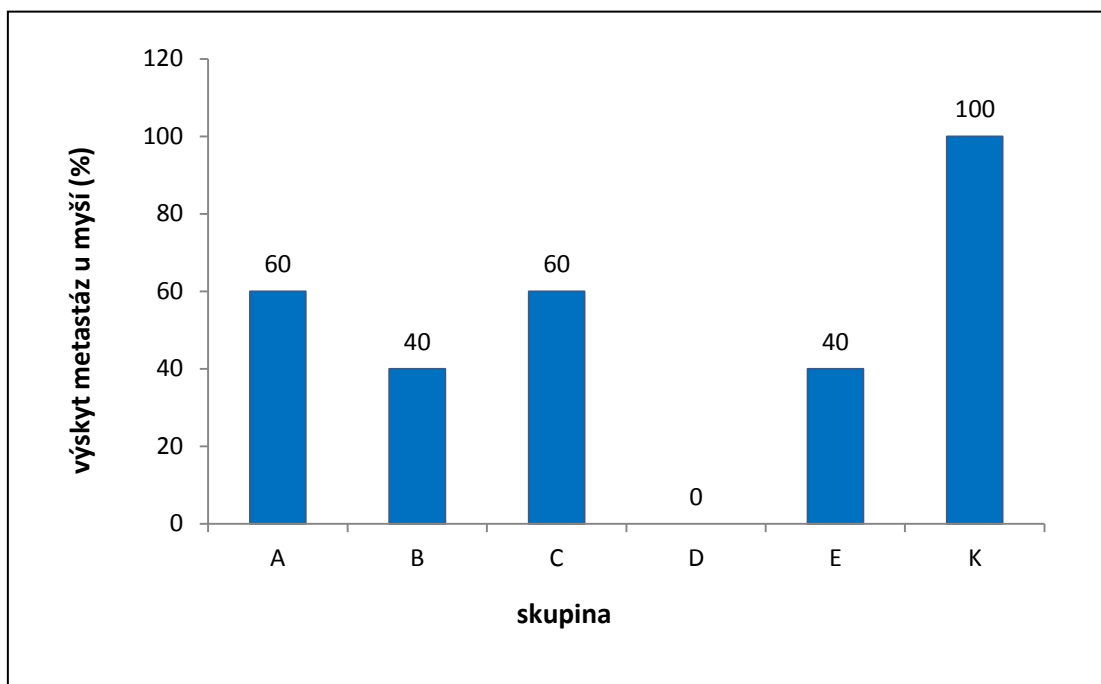
Obr. 20: Graf účinku LPS a MPL na velikost nádorů ve směsi s laminarin-BAM. A - laminarin-BAM, B - laminarin-BAM+LPS, C - laminarin-BAM+MPL, D - LPS, E - MPL, K - kontrola (PBS)

Průměrný počet metastáz u každé skupiny (intenzita metastazování) po 14 dnech léčby je uveden na obrázku 21. Vyšší výskyt metastáz oproti kontrole byl patrný u všech skupin kromě skupiny D, tedy léčby pomocí samotného LPS. Co se týče prevalence metastazování, byla snížena u všech léčených skupin (obr. 22).





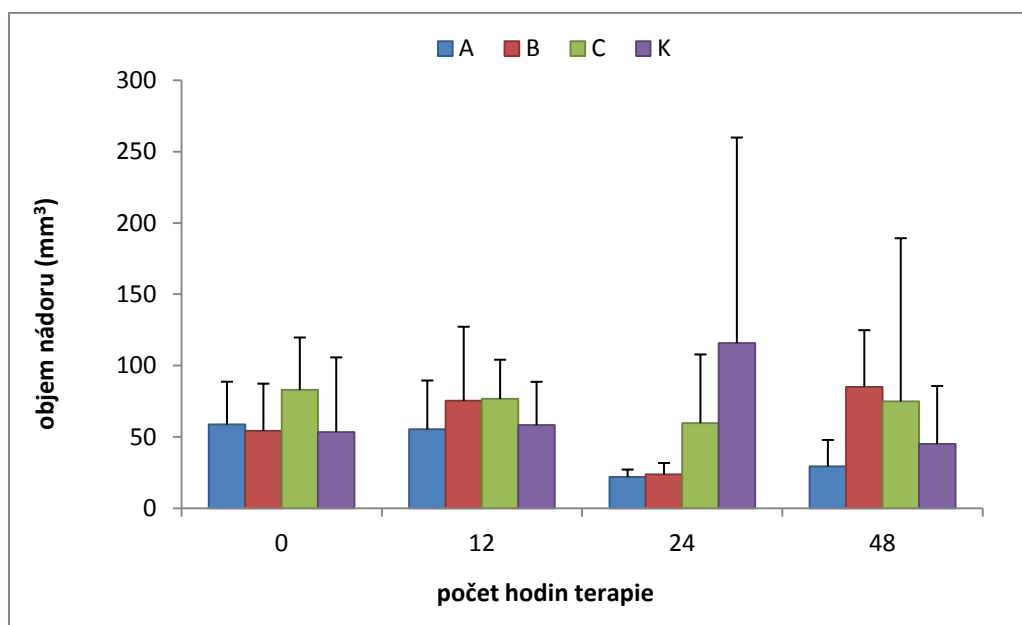
Obr. 21: Intenzita metastazování. A - laminarin-BAM, B - laminarin-BAM+LPS, C - laminarin-BAM+MPL, D - LPS, E - MPL, K - kontrola (PBS)



Obr. 22: Výskyt metastáz u myší. A - laminarin-BAM, B - laminarin-BAM+LPS, C - laminarin-BAM+MPL, D - LPS, E - MPL, K - kontrola (PBS).

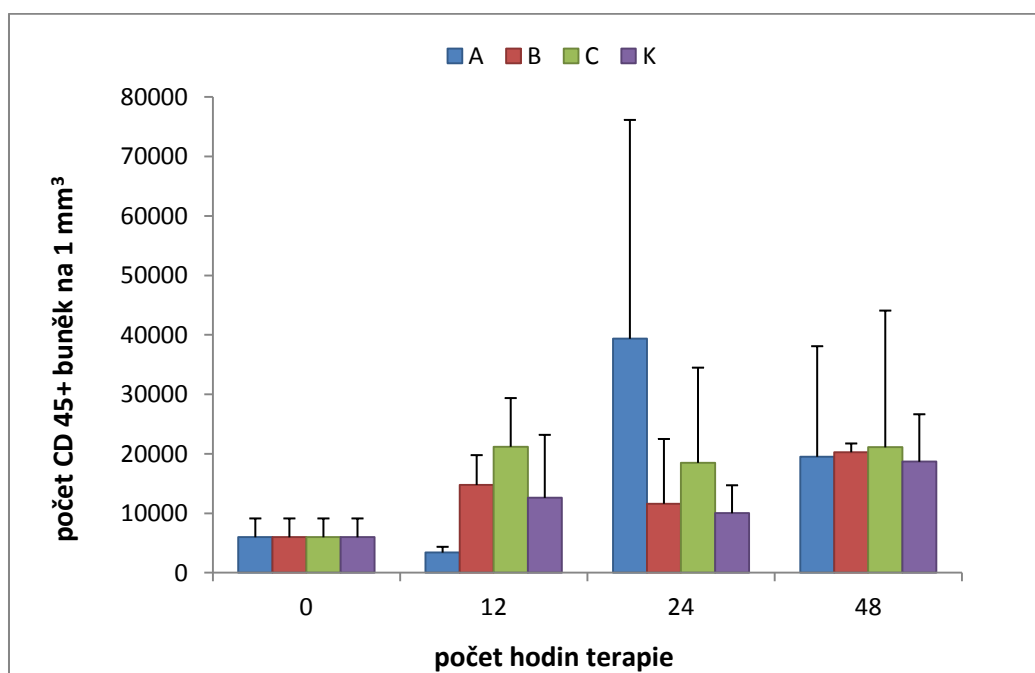
#### 4.5 Pokus č. 5: Studie nádorové infiltrace během nádorové imunoterapie pomocí průtokové cytometrie.

V následujícím experimentu byl zjišťován počet imunitních buněk v nádoru. Před každým vynětím nádoru z myši byl nádor nejprve změřen (obr. 23). Ve 48. hodině došlo ke zvětšení objemů nádorů léčených skupin (kromě skupiny A), převyšující objem kontrolní skupiny. Nádor je při zánětlivé reakci v prvních dvou dnech naplněn zánětlivým infiltrátem. Které buňky a v jakém množství, je uvedeno dále.



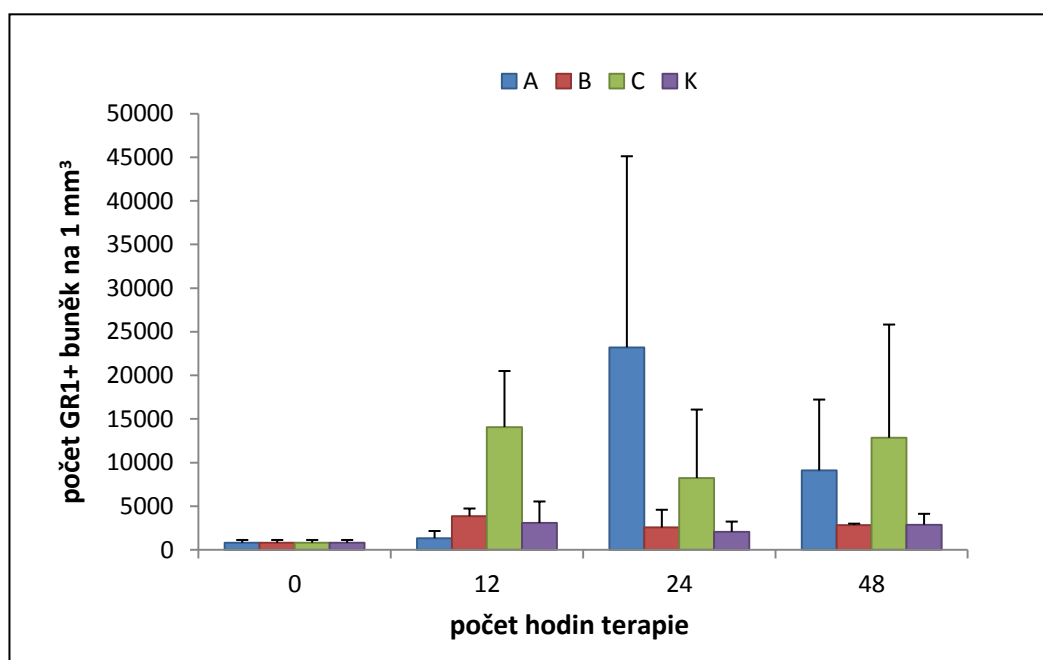
Obr. 23: Graf vlivu léčby na velikost nádorů měřený in vivo. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

Na obrázku 24 je vidět množství všech CD 45+ buněk, tento leukocytární antigen mají na sobě všechny hemopoetické buňky kromě erytrocytů a megakaryocytů. Počet leukocytů v nádorové tkáni byl nejvyšší 24 hodin po podání LPS, po 48 hodinách se snížil na úroveň kontroly. U skupiny laminarin-BAM+LPS byla naměřena nejvyšší hodnota ve 12. dni, v průměru 21 203 buněk na skupinu. U ostatních léčených skupin došlo k mírnému vzestupu, statisticky nevýznamnému.



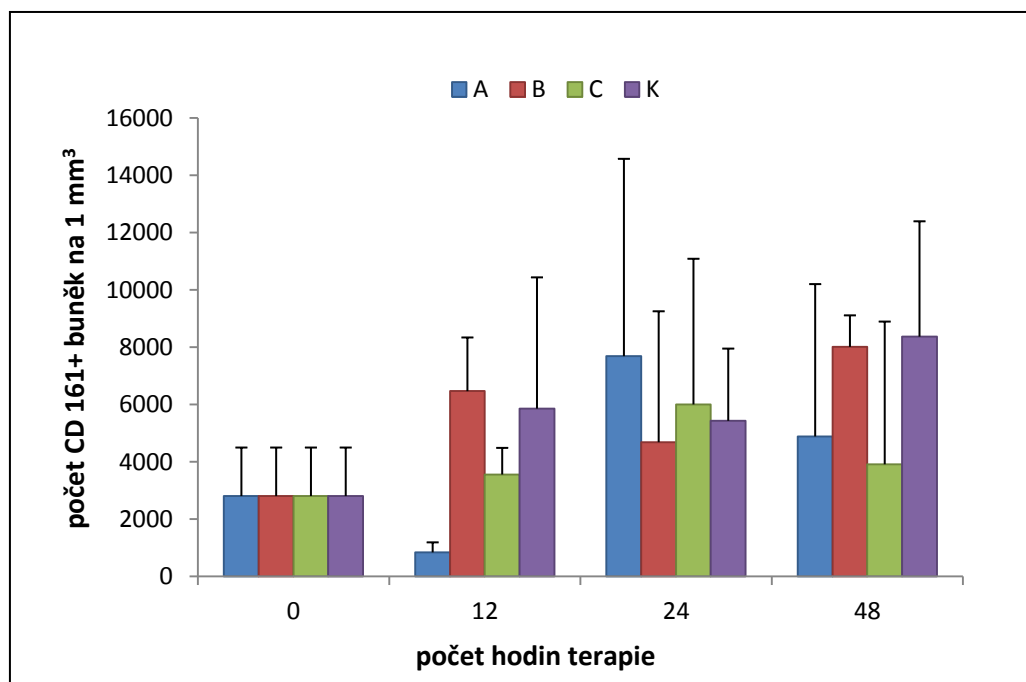
Obr. 24: Graf množství CD 45+ buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

Mohutný nástup granulocytárních buněk (obr. 25) jako fagocytujících činitelů byl patrný po stimulačním působení LPS po 24 hodinách. Vysoké a stabilnější hodnoty jsou také po působení laminarinu-BAM spolu s LPS, jejich působení nastupuje dříve než u samotného LPS, již ve 12. hodině (průměrná hodnota 14 069 buněk). Výrazná úloha LPS je vidět u skupiny s jeho absencí (samotný laminarin-BAM), která se pohybuje na úrovni kontrolní skupiny.



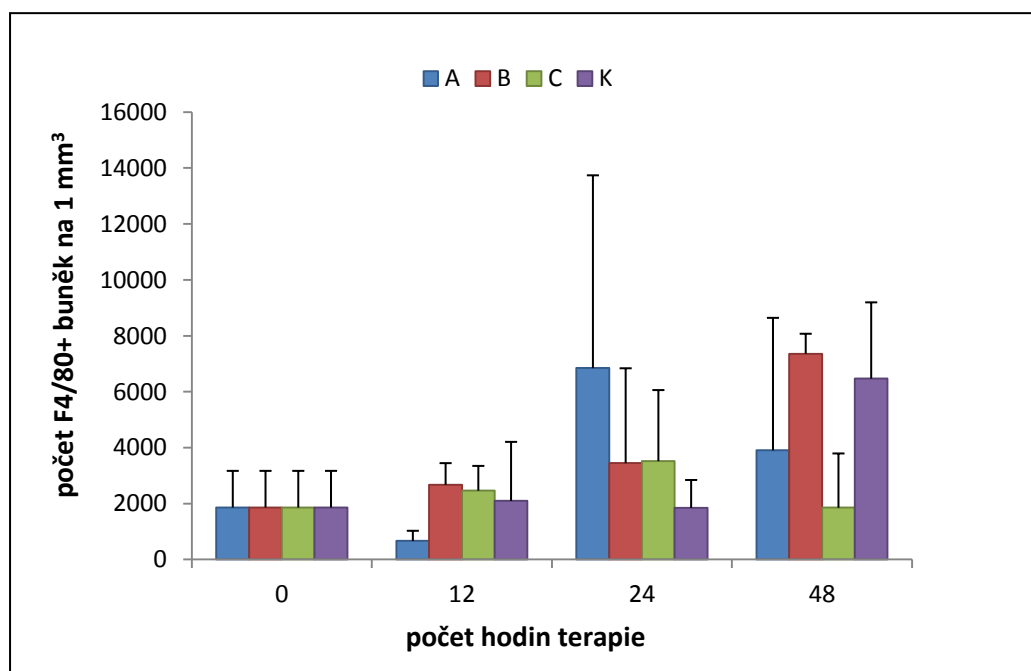
Obr. 25: Graf množství granulocytárních buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

Počet NK buněk uvedený na obrázku 26 má v průběhu experimentu ve všech skupinách nevýrazně stoupavý a nepravidelný charakter, neodrážející způsob terapie.



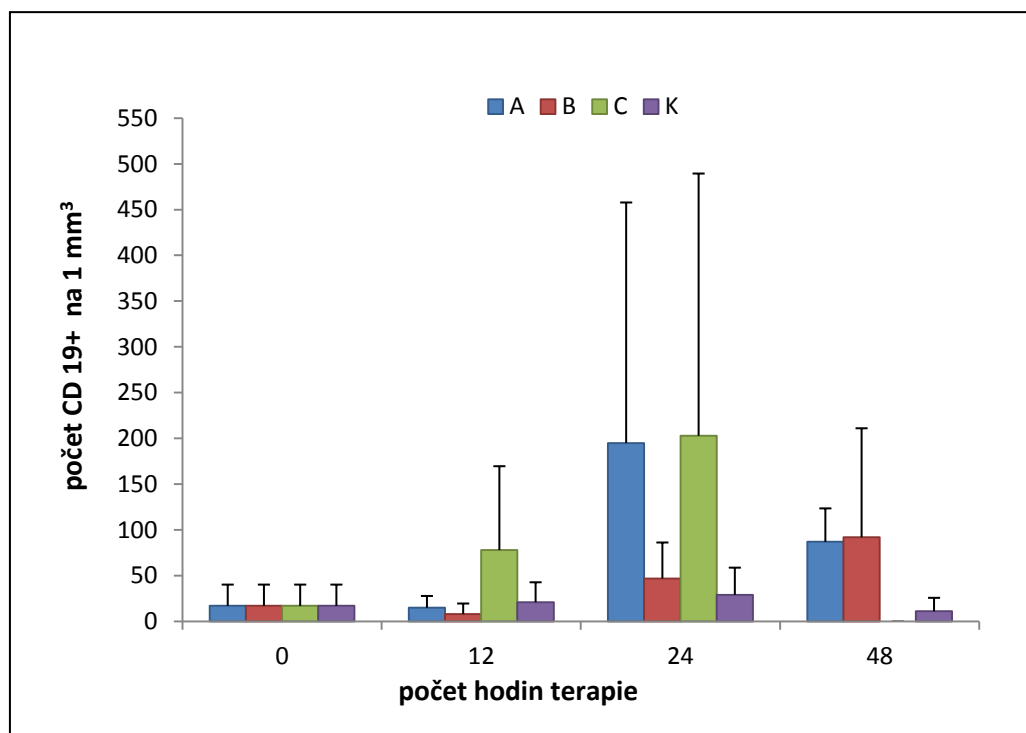
Obr. 26: Graf množství NK buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

Počet F4/80+ buněk je znázorněn na obrázku 27. Tento marker se nachází na myších monocytech a makrofázích. Nejvíce těchto buněk bylo zjištěno po léčbě laminarin-BAM, s rostoucí tendencí, ve 48. hodině s průměrným množstvím 7 358 buněk. Přechodně byla hodnota tohoto markeru zvýšena i u samotného LPS, mezi 24. a 48. dnem.



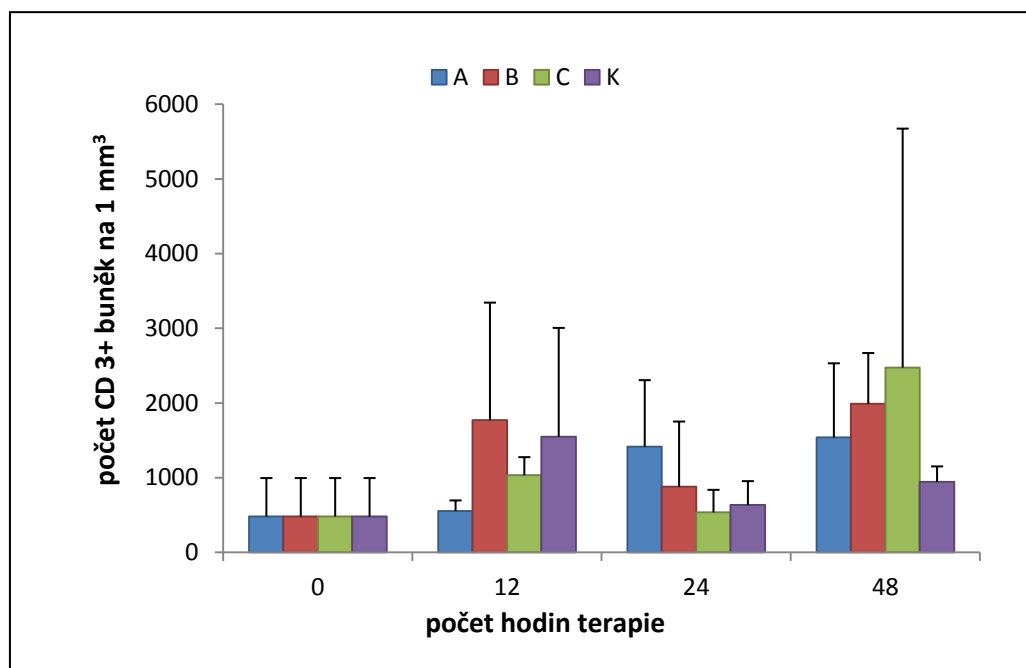
Obr. 27: Graf množství F4/80+ buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

CD19+ marker se nachází na B lymfocytech. Analýza nádorového infiltrátu prokázala přítomnost těchto buněk pouze ve velmi malém množství do 200 buněk na  $1\text{mm}^3$  (obr. 28). Byly patrné výkyvy v hodnotách a jejich rapidní snížení ve 48. hodině zejména u skupiny léčené látkou laminarin-BAM+LPS.



Obr. 28: Graf množství CD 19+ buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

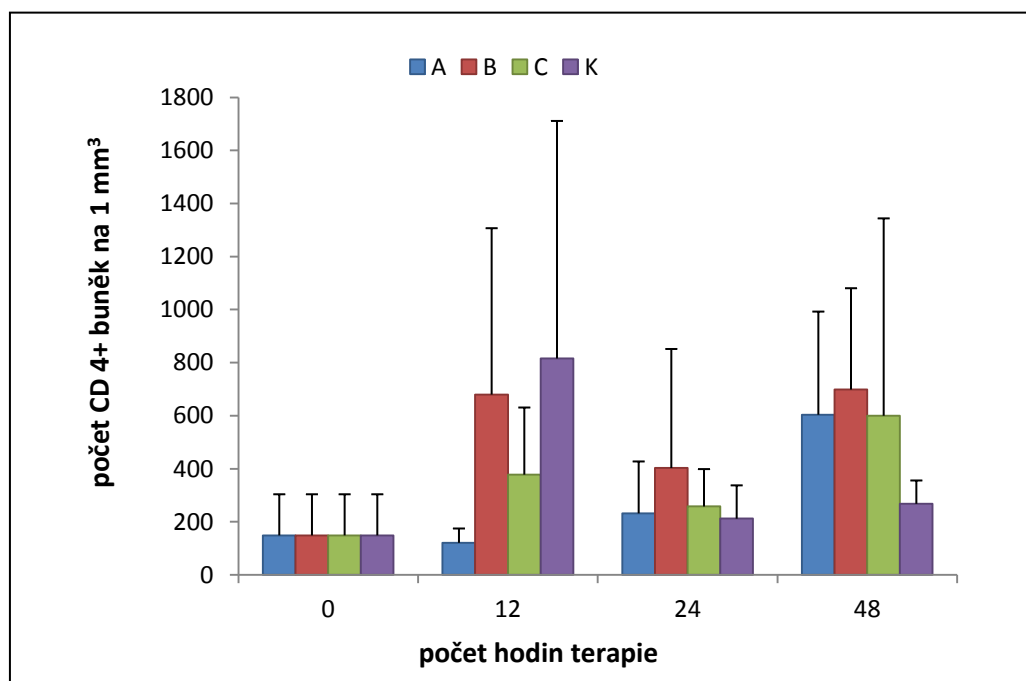
Množství buněk s CD3+ markerem je znázorněn na obrázku 29. Marker CD3+ udává celkový počet T lymfocytů. Byl naměřen nízký počet těchto buněk s rostoucí tendencí v léčených skupinách. U skupiny laminarin-BAM+LPS byla jejich průměrná hodnota ve 48. hodině 2 475 buněk.



Obr. 29: Graf množství CD 3+ buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

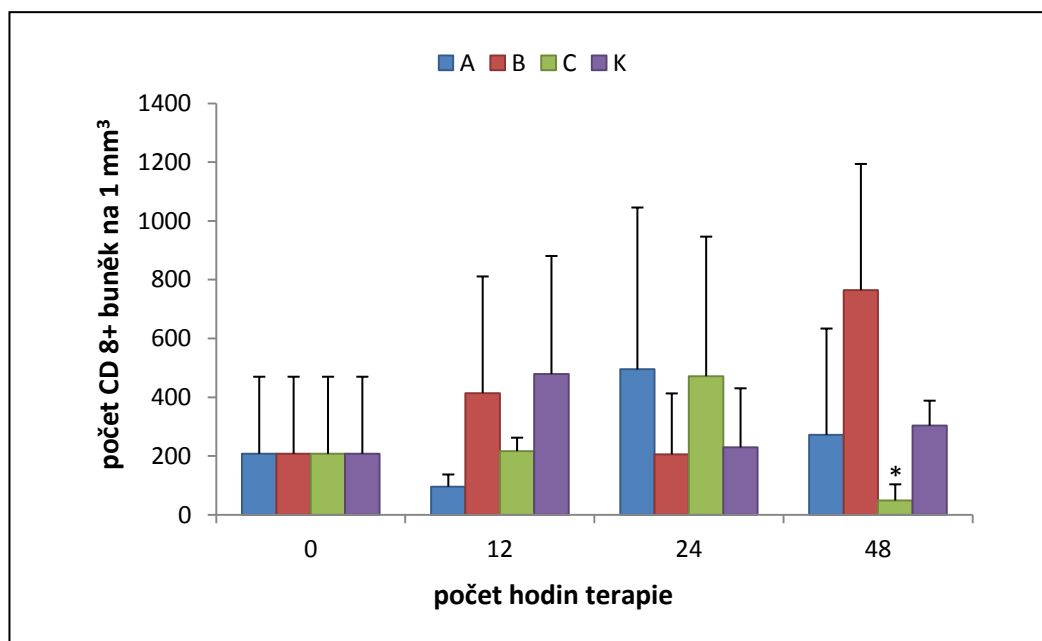


Dále byl analyzován počet Th lymfocytů s antigenní determinantou CD4+. Množství těchto buněk bylo mírně vyšší než počet B lymfocytů, k výrazné infiltraci však nedošlo. S postupujícím časem se jejich množství zvětšuje (obrázek 30).



Obr. 30: Graf množství CD 4+ buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

Infiltrace cytotoxickými T lymfocyty nesoucích CD 8+ znak je nízká, s maximálním počtem 765 buněk u skupiny laminarin-BAM (obrázek 31). Ve 48. hodině dokonce došlo ke statisticky významnému snížení počtu Tc lymfocytů ve skupině léčené směsí laminarin-BAM s LPS.



Obr. 31: Graf množství CD 8+ buněk u jednotlivých skupin. A - LPS, B - laminarin-BAM, C - laminarin-BAM+LPS, K - kontrola (PBS).

\*  $P \leq 0,05$  vůči kontrole (K)

## 5. Diskuze

Tato práce navazuje na předchozí poznatky protinádorové léčby mých kolegyně a zapojuje tak další střípky do složité mozaiky. Cílem experimentů bylo sestavit co nejúčinnější mechanismus protinádorového působení spojením činností fagocytárního (laminarin) a signálního motivu (LPS, MPL), s co nejstabilnějším kotvením (BAM, DOPE, SMCC). Účinnost této kombinace signálně a fagocytárně fungujících látek v imunitním systému prověřili Underhill a Gantner (2004). Jako signální motiv, který dokáže nalákat buňky imunitního systému k místu potřebného účinku, zde byl použit bakteriální LPS. V pokusu 4 byly jeho účinky patrné v podobě mírné redukce nádoru a absence výskytu metastáz. Schopnost LPS vyvolat jistou redukci nádoru i.t. aplikací prokázali ve své studii již Chicoine a kol. (2001). Glaserová (2012) ve své práci určila vhodné rozmezí použitelné koncentrace LPS, která nepůsobí toxicky na myší imunitní systém. Ověření synergie laminarinu (ve formě kotvící se na buněčné membrány a stimulující tak fagocytární receptory) a LPS (fungující jako ligand TLR4 receptoru), provedla kolegyně Auerová (2012). Synergie spočívá v tom, že LPS vyvolá mohutnou nádorovou zánětlivou infiltraci, a na nádorových buňkách ukotvený laminarin stimuluje cílený fagocytární atak (ten vyžaduje přítomnost kotvených ligandů v dostatečné hustotě). K instalaci laminarinu na nádorové buňky bylo použito kotvení na základě zanoření řetězce mastné kyseliny do membrány nádorových buněk pomocí kotvy BAM (s jedním alifatickým řetězcem kyseliny olejové) a DOPE (2 řetězce). SMCC kotva se instalovala na základě kovalentního mechanismu. Na jejím konci je SH skupina, která se váže na cysteinovou skupinu, vyskytující se na povrchu nádorových buněk.

V prvním pokusu jsem se věnovala návržení nejúčinnějšího aplikačního schématu léčebné směsi laminarin-BAM s LPS. Největší redukci nádorového růstu zaznamenala skupina s dlouhodobým 4 pulzním režimem (den 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26). Zdá se, že klíčovým faktorem pro aplikaci LPS jsou pravidelné přestávky. Opakovaná aktivace TLR-4 a dalších TLR receptorů nízkými dávkami LPS totiž vede k tzv. „endotoxinové toleranci“ (Greisman a kol., 1975). Například v případě TLR-7 byl již navrhnout aplikační režim s 5 denními přestávkami v aplikaci ligandu (Bourquin a kol., 2011). Toto potvrzují i výsledky experimentů obsažených v této práci. Aplikace v prvních třech dnech po sobě dosáhla podobného efektu jako aplikace 4 pulzní. Lze tedy usoudit, že pro optimální účinek směsi jsou klíčové právě první 3 dny a pak je nutná přestávka. Je také potřeba se vyhnout příliš dlouhé aplikaci směsi laminarin-BAM s LPS, protože dochází ke tkáňovým poškozením

a vzniku zánětlivých lézí. K tomu pravděpodobně dochází vlivem patologického zánětu, který se tvoří po dlouhodobém působení laminarinu. Výsledné hodnoty měření teplot (data neuvedena) v průběhu terapie neodrážely způsob a průběh terapie, což se ukázalo i u řady předchozích experimentů (Auerová, 2012; Kumžáková 2012, Maierová, 2012).

Působení LTA (ligand TLR2 receptoru) na redukci nádorového růstu a větší účinek v kombinaci s LPS ověřila ve svých experimentech kolegyně Svobodová (2012). Cílem bylo zvýšit množství aktivovaných TLR receptorů a zesílit tak fagocytární účinek makrofágů produkcí zánětlivých cytokinů a infiltraci do nádoru. Výsledné hodnoty obou skupin byly téměř shodné, ale od 14. dne docházelo u skupiny s LTA k výraznému nárůstu počtu úmrtí. Jedna myš dokonce uhynula již 4. den od počátku léčby. Příčina brzkého uhynutí a krátké průměrné doby přežití všech myši může být ve spojení toxických účinků LPS a LTA. Bylo dokumentováno, že LTA i LPS indukují tvorbu cytokinů TNF, IL-1 a IL-8, které jsou mediátory způsobující septický šok (Wakabayashi a kol., 1991). V práci Auerové (2012) je uveden pokus s podáním směsi laminarin-BAM+LPS+LTA v méně intenzivním režimu (léčba 6x, aplikace obden). Lépe působila na redukci nádorů i přežití směs obsahující LPS i LTA než směs bez LTA. Možností dalšího výzkumu by bylo zkusit aplikovat látku vždy tři dny po sobě s pětidenními přestávkami. Zde zvolený velmi intenzivní terapeutický režim byl zřejmě příliš drastický, proto se LTA nepodařilo využít ke zvýšenému účinku směsi laminarin-BAM s LPS.

Navázání fagocytárních agonistů na buňku je základním předpokladem pro správnou interakci s fagocytárními receptory a v kombinaci s LPS vede k úspěšné léčbě. V následujících experimentech jsem se zaměřila na ověření účinnosti laminarinu s různými možnostmi kotvení na buňky. Byl použit nespecifický mechanismus pomocí kotev BAM, DOPE a SMCC. Specifita je zajištěna místní aplikací terapeutické směsi přímo do nádoru, kde se předpokládá převaha nádorových buněk.

DOPE je kotva s dvěma alifatickými řetězci kyseliny olejové, které se zanořují do membrány buňky. Vzniká tak předpoklad, že se bude dvouřetězcová kotva k buňce vázat pevněji a s delším poločasem než jednořetězcová (BAM). Tento předpoklad se jeví jako správný podle studie Kata a kol., 2004. Udává zde experimentálně zjištěnou retenční dobu v séru 8 hodin pro DOPE kotvu, zatímco pro BAM jen 1-2 hodiny. Přesto v mém srovnávacím experimentu fungoval lépe laminarin-BAM.

Kotva SMCC naopak dokázala pomoci zvýšit redukci nádorového růstu ve srovnání s BAM kotvou. SMCC se váže na buňky kovalentně, pomocí vazby maleinimidu na -SH skupiny proteinů vyskytujících se na povrchu buněk. Tento mechanismus napojení na buňku se zdá být účinnější než kotvení pomocí mastné kyseliny. Z hlediska přežití myši ale působí lépe laminarin-BAM. Hypotézou proč tomu tak je může být schopnost laminarin-BAM se „recyklovat“, tedy schopnost navázat se po rozpadu nádorové buňky na buňku jinou. Kotva SMCC sice váže fagocytární agonisty spolehlivěji, ale po rozpadu buňky pravděpodobně neexistuje možnost dalšího navázání.

K posílení účinku směsi laminarin-SMCC s LPS byla vyzkoušena aplikace proenzymů. Jejich účinek v protinádorové terapii dříve prokázali Trnka a kol. (1999) a Novák a Trnka (2005). Účelem tohoto experimentu bylo pomocí uvedeného mechanismu zlikvidovat cytokin TGF- $\beta$ , který je vylučován nádorovými buňkami, aby tlumil vyvolanou imunitní reakci a působení cytotoxických lymfocytů. Kombinace této terapie s terapií laminarin-SMCC s LPS však nevedla k žádané aditivě či synergii. Vysvětlením je zřejmě to, že proenzymoterapie sice redukcí TGF- $\beta$  usnadní atak na úrovni získané imunity, ale vzhledem k tomu, že komplex  $\alpha$ -2 makroglobulinu s enzymy není zcela specifický a váže i prozánětlivé cytokiny, je tím omezeno působení druhé terapie.

Na základě mohutného protinádorového účinku, který zaznamenala ve svých experimentech kolegyně Maierová (2012) podáváním směsi manan-BAM+LPS, jsem vyzkoušela kombinaci látek laminarin-BAM+LPS a manan-BAM+LPS ve střídavém podávání a ve formě směsi (1:1). Pozitivní účinek mananu na léčbu byl zřejmý. Střídavé podávání vykazovalo nejvyšší efektivitu vůbec. V kombinaci se SMCC kotvou došlo jen k přechodné redukci nádorového růstu. Opět se ukázalo, že pro účel kotvení fagocytárních agonistů je nejefektivnější BAM kotva.

Nicméně obsah LPS v léčebné látce není výhledově možné použít pro lidskou terapii. Myší organismus je schopen lépe se vypořádat s toxickými účinky LPS a snese i 1 000 - 10 000 krát větší koncentraci než lidský organismus (Warren a kol., 2010). Proto jsem se v dalším pokusu zaměřila na zjištění účinnosti směsi laminarin-BAM+MPL. MPL je monofosforyl lipid A, hojně používané adjuvancium, odvozené z LPS. MPL je netoxický i ve vysokých koncentracích. Příčinou nižší toxicity je úprava molekuly alkalickou hydrolyzou. Výsledná účinnost MPL v pokusu 4 ale nebyla tak efektivní jako u LPS. Příčinou může být snížená aktivace receptoru TLR4. Bylo dokumentováno, že cytokiny TNF, IL-6 a IL-8 jsou

po aplikaci MPL zastoupené v nižší koncentraci než po injikaci endotoxinu LPS, ač byl injikován v 5000x menší dávce (Martich a kol., 1991). Navíc je možné, že dochází postupně k inhibici TNF a IL-1 po aplikaci MPL a k rozvoji již zmíněné „endotoxinové tolerance“ (Granowitz a kol., 1991; Madonna a kol., 1986). MPL byl překvapivě účinnější při samostatné aplikaci než ve směsi s laminarin-BAM. Určitý vliv na redukci tvorby metastáz je také patrný, u poloviny léčených myší se metastázy nevyskytly. Příslibem pro budoucí experimenty je ale možnost zkoušet vysoké koncentrace MPL. Je možné tak nalézt vhodné dávkování za účelem efektivnější protinádorové léčby, netoxické pro člověka. Je otázkou, zda se podaří docílit žádané synergie s ligandy fagocytárních receptorů.

V dalším experimentu bylo analyzováno množství leukocytárního infiltrátu průběžně v prvních dvou dnech léčby směsí laminarin-BAM s LPS a jejími jednotlivými složkami. Velikost nádorů se v léčených skupinách přechodně zvětšovala. Tento jev byl pravděpodobně způsoben vznikem otoku jako důsledek mohutné infiltrace granulocytů, která byla ve srovnání s kontrolní skupinou jasně vyvolána léčebnou terapií. Počet granulocytárních buněk stoupal nejvýrazněji u skupin s obsaženým LPS, který byl použit právě za účelem signalizace a „nalákání“ neutrofilů do nádorového infiltrátu. Vzrůst NK buněk nebyl výrazný, jejich počet stoupal i v kontrolní skupině, což může být způsobeno traumatem v důsledku injekce PBS. Makrofágová infiltrace do nádoru probíhala pomalu, počet těchto buněk obvykle roste až po delší době terapie. Celkové množství lymfocytů bylo výrazně nižší než množství granulocytů. Množství B lymfocytů bylo velice nízké, tvořilo méně než pětinu počtu NK buněk a makrofágů. Největší počet lymfocytárních buněk je zaznamenán u Th lymfocytů. Pravděpodobně tedy již došlo k počáteční sekreci cytokinů makrofágy a aktivaci lymfocytů. Tc lymfocyty se ale téměř nevyskytují. U skupiny laminarin-BAM+LPS došlo dokonce ke statisticky významnému snížení množství Tc lymfocytů oproti kontrole po 48 hodinách. Lze tedy usoudit, že cytotoxicita způsobená T buňkami je minimální. Pro granulocytární infiltraci do nádoru byla rozhodující přítomnost LPS. Co se týče synergie laminarin-BAM a LPS, projevila se pouze dřívějším nástupem nádorové infiltrace, nikoliv ale větší infiltrací buněk. Synergii lze tedy vysvětlit jen na úrovni účinku, tedy kombinací mohutné infiltrace dané působením LPS a jejího zacílení pomocí vázaných ligandů fagocytárních receptorů.

Terapie založená na nespecifické léčbě nádorového onemocnění má svá rizika. Protože není zacílená jen na nádorové buňky, postupně ničí i buňky imunitního systému. Pokud není léčba hned na počátku úspěšná a ponechá v organismu dostatek nádorových buněk, onemocnění se obnoví s ještě větší razancí a už nelze znovu účinně zasáhnout. Proto je

důležité navrhnout zpočátku co nejvíce intenzivní léčbu, aby se co nejvíce oddálil relaps onemocnění. Laminarin připojený pomocí kotvy BAM a v součinnosti s LPS dokázal v optimalizovaném režimu snížit velikost nádorů a prodloužit tak život experimentálním myším. Dokonce se povedlo z uvedených pokusů získat 2 myši, které se zcela uzdravily a žijí dodnes. Další vývoj je třeba spojit jak s náhradou LPS látkou bezpečnou pro lidi, tak s hledáním cest tumor specifického vázání ligandů fagocytárních receptorů.

## 6. Závěr

- Největší redukci nádorového růstu zaznamenala léčba laminarin-BAM+LPS v aplikaci 4 pulzů (0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26), spolu s aplikací 0,1,2 dosáhly nejdelšího prodloužení života pokusných myší.
- Teploty nádorů neodrážejí způsob ani průběh terapie.
- Léčba s přídatkem LTA nevykazovala posilující účinek na již zavedenou terapii laminarin-BAM+LPS.
- Kotva DOPE nebyla, navzdory dvěma alifatickým řetězcům kyseliny olejové a delší retenční době, účinnější než kotva BAM.
- Kotvení pomocí SMCC bylo díky pevnosti vazby na buňku účinnější v redukci nádorového růstu, avšak z hlediska prodloužení přežití myší se ukázalo jako neúčinné.
- Nejúčinnější způsob kotvení laminarinu je pomocí jednořetězcové kotvy BAM. Terapie vykazovala redukci nádorového růstu a zároveň prodloužení přežití myší vůči kontrolní skupině.
- Aplikace proenzymů se díky likvidaci prozánětlivých cytokinů neosvědčila.
- Podávání mananu-BAM+LPS a laminarinu-BAM+LPS ve střídavém režimu se ukázalo jako velmi účinné.
- MPL se v pilotním experimentu nepodařilo přiblížit účinnosti LPS ve směsi s laminarinem-BAM, je však zřejmý potenciál v dalších experimentech se zvyšováním dávky.
- Analýza buněčného infiltrátu v nádoru ukázala převahu počtu buněk granulocytární řady, naopak lymfocytů je přítomno výrazně méně. To svědčí o účasti buněk přirozené imunity. Intenzita granulocytární infiltrace byla určována přítomností LPS, synergie s laminarin-BAM se projevila pouze časnějším nástupem této infiltrace.



## 7. Seznam použitých zkratek

AIDS - acquired immune deficiency syndrome (syndrom získaného selhání imunity)

APC -antigen prezentující buňka

ATP - adenosintrifosfát

BAM - biokompatibilní kotva pro buněčné membrány

BRAF - gen kódující protoonkogen B-Raf

CARD9 - protein caspase recruitment domain family member 9

CD - znaky cluster differeciations

COX2 - cyklooxygenáza 2

CTL - cytotoxické T lymfocyty

DAMPs - damage-asociated molecular patterns (s poškozením asociované molekulární vzory)

DNA - deoxyribonukleová kyselina

HLA-G - lidský leukocytární antigen

ICAM-1 - intercellular adhesion molecule-1 (intercellulární adhezní molekula-1)

INF - interferon

ITAM - aktivační motiv založený na tyrosinovém imunoreceptoru

KIT - gen kódující protoonkogen c-kit

LDH - laktát dehydrogenáza

LPS - lipopolysacharid

LTA - lipoteichová kyselina

MHC - hlavní histokompatibilní komplex

MoAB - monoklonální protilátka

MPL - monofosforyl lipid A

MYD88 - myeloid differentiation primary response gene (88)

NADPH - nikotinamid adenin dinucleotid fosfát

NF- $\kappa$ B - jaderný faktor  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NK - buňky natural killers (přirození zabíječi)

NOD - nukleotidová oligomerizační doména

NRAS - gen kódující onkogen N-Ras

PAMPs - pathogen-associated molecular patterns(s patogenem asociované molekulové vzory)

PRR - pathogen recognition receptor (receptory rozpoznávající motivy patogenu)

SR/CR - spontánní regrese/kompletní rezistence

TAA - tumor-associated antigens

Tc - cytotoxické T-lymfocyty

TDS - total dermatoscopic score

TGF-beta - transforming growth factor (transformující růstový faktor)

Th - pomocné T-lymfocyty

TIR - Toll/IL-1 receptorové domény

TIRAP - TIR doménu obsahující protein

TLR - Toll like receptor

TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$  (faktor nádorové nekrózy)

TRAM - TRIF-příbuzná adapterová molekula

Treg - regulační T-lymfocyty

TRIF - TIR-doménu-obsahující adapter-indukující interferon- $\beta$

ÚZIS - Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

## 8. Literatura

Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, et al. (2004) Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Journal of the American Medical Association* 292(22):2771-6.

Adams DS, Pero SC, Petro JB, Nathans R, Mackin WM, Wakshull E (1997) PGG-glucan activates NF-kappaB-like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line. *Journal of Leukocyte Biology* 62: 865–873.

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

Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N (2011) Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood* 117:26, 7021-7031.

Akira S, Hemmi H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 85:85–95.

Ashkenazi A, and Dixit VM (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 11 255–260.

Astiz ME, Rackow EC, Still JG, Howell ST, Cato A, Voneschen KB, Ulrich JT, Rudbach JA, McMahon G, Vargas R, Stern W (1995) Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: a prospective, double-blind, randomized, controlled trial. *Critical Care Medicine* 23: 9-17.

Barton GM, Kagan JC (2009) A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology* 9:535–42.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9237–9242.

Beck C, Schreiber H, Rowley D (2001) Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microscopy Research and Technique* 52: 387-395.

Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 81:1–5.

Billroth T (1865) "Beobachtungs-Studien über Wundfieber und accidentelle Wundkrankheiten. *Archiv für klinische Chirurgie* 6, 372 (1864-1865).

Blander JM, Medzhitov R (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, 304: 1014–1018.

Bleicher P and Mackin W (1995) Betafectin PGG-glucan: a novel carbohydrate immunomodulator with anti-infective properties. *Journal of Biotechnology Healthcare* 2:207–222.

Bluhm TL, Deslandes Y, Marchessault RM, Perez S, Rinaudo M (1982) Solid-state and solution conformation of scleroglucan. *Carbohydrate Research*, 100: 117–130.

Boman HG, Faye I, Gudmundsson GH, Lee JY, Lidholm DA (1991) Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry*, 201: 23–31.

Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA (1958): Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*, 13: 609-63.

Bourquin C, Hotz Ch, Noerenberg D, Voelkl A, Heidegger S, Roetzer L, Storch B, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D, Endres S (2011) Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of Toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance *Cancer Research*, 71:5123–33.

Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh KS, Imoto K, Inui H, Moriwaki S, Emmert S, Pike KM, Raziuddin A, Plona TM, DiGiovanna JJ, Tucker MA, Kraemer KH (2011) Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *Journal of Medical Genetics*, 48, 3: 168-176.

Browder LW, Sherwood E, Williams D, Jones E, McNamee R, DiLuzio N (1987) Synergistic effect of non specific immune stimulation and antibiotics in experimental peritonitis. *Surgery* 102:206-214.

Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of Experimental Medicine*, 197:1119–24.

Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology*, 6:33–43.

Busch W (1868) Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867. *Berliner Klinische Wochenschrift* 5, 137.

Cascinelli N, Belli F, MacKie RM, Santinami M, Bufalino R, Morabito A (2001) Effect of long-term adjuvant therapy with interferon alpha-2a in patients with regional node metastases from cutaneous melanoma: a randomised trial. *Lancet*, 358, 9285: 866-869.

Cress RD, Holly EA. Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of california cancer registry data, 1988-93 (1997) *Cancer Causes and Control*, 8(2):246-52.

Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ (2003) Spontaneous regression of advanced cancer:

Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11): 6682-6687.

Cuesta N, Salkowski CA, Thomas KE, Vogel SN (2003) Regulation of lipopolysaccharide sensitivity by IFN regulatory factor-2. *The Journal of Immunology* 170: 5739-5747.

Deberardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, 7:11-20.

Desser L, Holomanova D, Zavadova E (2001) Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF- $\beta$  levels in human blood. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47: S10-S15.

Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasproicz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B (2006) Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *Journal of Clinical Investigation* 116:916–928.

Duboc P, Mollet B (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11:759-768.

Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R (2008) *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*. Masarykova univerzita.

Elliot GT, McLeod RA, Perez J, Von Eschen KB (1993) Interim results of a phase II multicenter clinical trial evaluating the activity of a therapeutic allogeneic melanoma valine (theraccine) in the treatment of disseminated malignant melanoma. *Seminars in Surgical Oncology* 9(3): 264-272.

Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O (1997) MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic, than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 45: 463.

Fan J, Frey RS, Malik AB (2003) TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1234–43.

Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9: 425–434.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 127(12):2893-917.

Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT (2004) Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes and Infection* 6:1361–1367.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW (1985) Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 35(3):130–151.

- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine* 197:1107–1117.
- Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO Journal* 24:1277–1286.
- Ganz T (2003) The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. *Integrative and Comparative Biology* 43:300–304.
- Geller AC, Miller DR, Annas GD, Demierre MF, Gilchrest BA, Koh HK (2002) Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969–1999. *Journal of the American Medical Association* 288(14):1719–1720.
- Ginsburg I (2002) Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet infectious diseases* 2(3):171-9.
- Glade-Bender J, Kandel JJ, Yamashiro DJ. (2003) VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 3(2):263-76.
- Glaserová S., (2012) Studium terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LPS. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Gold LI (1999) The role for transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in human cancer. *Critical Reviews in Oncogenes*, 10: 303.
- Granowitz E, Santos A, Poutsika D, Cannon J, Wilmore D, Wolff S, Dinarello C. (1991) Production of interleukin-1 receptor antagonist during experimental endotoxemia. *Lancet* 358: 1423-1424.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309–1312.
- Greisman SE, Young EJ, Workman JB, Ollodart RM, Hornick RB (1975) Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen. *Journal of Clinical Investigation* 56: 1597-607.
- Griminger P, Fisher H (1966) Anti-hypercholesterolemic action of scleroglucan and pectin in chickens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 122: 551–553.
- Gruijl FR, Kranen HJ, Mullenders LHF (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Phytochemistry and Photobiology* 63:1-3 (19-27).
- Gross O, Gewies A, Finger K, et al. (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442:651–656.
- Han ZY, Wang QA, Zeng GJ (1991) Clinical and laboratory observations on polysaccharide sulfate in 282 cases of ischemic cerebrovascular disease. *Chinese Medical Journal*, 104: 562 – 566.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 1: 57–70.

- Harada T, Misaki A, Saito H. Curdlan (1968) a bacterial gel-forming beta-1,3-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 124(1):292–298.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.
- Hicks AM, Willingham MC, Du W, Pang CS, Old LJ, Cui Z (2006) Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice. *Cancer Immunity* 6: 11.
- Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T (2002) The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology* 72:621–627.
- Chen Z, O’Shaughnessy MJ, Gramaglia I, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Narula S, Roncarolo MG, Blaza BR (2003) IL-10 and TGF- $\beta$  induce alloreactive CD4 +CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* 101:12, 5076-5083.
- Chan WK, Lam DT, Law HK, Wong WT, Koo MW, Lau AS, Lau YL, Chan GC (2005) *Ganoderma lucidum* mycelium and spore extracts as natural adjuvants for immunotherapy. *Journal of Alternative Complementary Medicine* 11:1047–1057.
- Chicoine MR, Won EK, Zahner MC (2001) Intratumoral injection of lipopolysaccharide causes regression of subcutaneously implanted mouse glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 48: 607-615.
- Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. (1969) *Nature* 222(5194):687–688.
- Christiaansen JF, Gallardo D, Burnside SS, Nelson AA, Sears DW (1984) Rapid covalent coupling of proteins to cell surfaces: Immunological characterization of viable protein-cell conjugates. *Journal of Immunological Methods* 74: 229-239.
- Ivashkiv LB (2008) A signal-switch hypothesis for cross-regulation of cytokine and TLR signalling pathways. *Nature Reviews Immunology* 8:816–22.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20:197–216
- Kaiserová P, Kalferstová L, Maršíková H, Bartoňová I, Koník P, Kopecký J, Ženka J (2012) Proenzyme therapy of sarcoma S-180 and melanoma B16-F10. *Journal of Applied Biomedicine* (v tisku).
- Kato K, Itoh C, Yasukouchi T, Nagamune T (2004) Rapid protein anchoring into the membranes of Mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glykol) derivatives. *Biotechnology Progress* 20(3): 897-904.
- Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR (2007) Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *European Journal of Immunology* 37(2): 467–478.

Kawai T, Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology* 21:317–37.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266(5193): 2011–2015.

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

Kuda T, Enomoto T, Yano T (2009) Effects of two storage  $\beta$ -1,3-glucans, laminaran from *Eicenia bicyclis* and paramylon from *Euglena gracili*, on cecal environment and plasma lipid levels in rats. *Journal of Functional Food* 1:399-404.

Kuda T, Yano T, Matsuda N, Nishizawa M (2005) Inhibitory effects of laminaran and low molecular alginate against the putrefactive compounds produced by intestinal microbiota in vitro and in rats. *Food Chemistry*. 91:745-749.

Kumžáková Z., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí sloučenin s terminální manosou. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Laugerette F, Vors C, Peretti N, Michalski MC (2011) Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. *Biochimie* 93(1): 39-45.

Lee JH, Choi JW, Kim YS (2010) Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histologic types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *British Journal of Dermatology* 164(4):776-84.

Lens MB, Dawes M (2004) Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *British Journal of Dermatology* 150:179-185.

Liu V, Mihm MC (2003) Pathology of malignant melanoma. *Surgical Clinics of North America* 83(1):31-60.

Madonna GS, Peterson JE, Ribí EE, Vogel SN (1986) Early-phase endotoxin tolerance: Induction by a detoxified lipid A derivate, monophosphoryl lipid A. *Infection and Immunity* 52: 6-11.

Maierová V., (2012) Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Maniwa Y, Kanki M, Okita Y (2000) Importance of the control of lung recurrence soon after surgery of pulmonary metastases. *The American Journal of Surgery*, 179: 122–5.

Marta M, Meier UC, Lobell A (2009) Regulation of autoimmune encephalomyelitis by Toll-like receptors. *Autoimmunity Reviews* 8: 506–9.



- Martich D, Danner R, Ceska M, Suffredini AF (1991) Detection of interleukin-8 and Tumor Necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: The effect of antiinflammatory agents. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 1021-1024.
- McIntire TM, Brant DA. Observations of the (1→3) β D (1998) glucan linear triple helix to macrocycle interconversion using noncontact atomic force microscopy . *Journal of the American Chemical Society* 120: 6909-6919.
- Miller GA, Urban J, Jackson RW (1976) Effects of a streptococcal lipoteichoic acid on host responses in mice. *Infection and Immunity* 13: 1408.
- Mitchell MS, Kan-Mitchell J, Kempf RA, et al. (1988) Active specific immunotherapy for melanoma: Phase I trial of allogeneic lysates and a novel adjuvant. *Cancer Research* 48(20): 5883-5893.
- Mitchell MS, Von Eschen KB (1997) Phase III trial of Melacine melanoma theraccine versus combination chemotherapy in the treatment of stage IV melanoma. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*. 16: 494a.
- Montant, PC, Thomas L (1977) Structure d'un glucane exo-cellulaire produit par le *Botrytis cinerea* (Pers.). *Annales des Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetale* 12:185-192.
- Nathan FE, Mastrangelo MJ (1998) Systemic therapy in melanoma. *Seminars in Surgical Oncology* 14: 319-327.
- Novak JF, Trnka F (2005) Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Research*. 25: 1157-1178.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 97:13766–71.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 55(2):74-108.
- Papi AS (2003) Melanom in children and adolescents. *European Journal of Cancer* 39(18):2651–2661.
- Patchen ML, Lotzova E (1980) Modulation of murine hemopoiesis by glucan. *Experimental Hematology* 8:409–422.
- Pillai TG, Nair CK, Janardhanan KK (2008) Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(1): 80-5.
- Ponce de León V, Barrera-Rodríguez R (2005) Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids. *Cancer Cell International*, 5:20.

- Povýšil C, Šteiner I, Horáček J, Kodet R, Kolář Z, Ludvíková M, Lukáš Z, Mrhalová M, Povýšilová V, Tichý M (2011) *Obecná patologie*. Praha: Galén 290 s.
- Qureshi N, Mascagni P, Ribi E, Takayama K (1985) Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595: Purification of the dimethyl derivat by high performance liquid chromatography and complete structural determination. *Journal of Biological Chemistry* 260, 5271-5278.
- Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71: 635–700.
- Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr, Sober AJ. Risk factors for cutaneous melanoma (1987) A practical method of recognizing predisposed individuals. *Journal of the American Medical Association*. 258(21):3146-54.
- Rice WG, Ganz T, Kinkade JM, Jr., Selsted ME Jr, Lehrer RI, Parmley RT (1987) Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70:757–765.
- Riggi, SJ, DiLuzio NR (1961) Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *American Journal of Physiology* 200:297–300.
- Rygaard J, Povlsen CO (1974) The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours: an argument against immunological surveillance. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica [B] Microbiology and Immunology* 82:99.
- Sauter C, Wolfensberger C (1980) Interferon in human serum after injection of endotoxin. *Lancet* 852–853.
- Shear MJ, Turner FC, Perrault A, Shovelton T (1943) Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrates. *Journal of the National Cancer Institute* 4:81-97.
- Schulz N, Oratz R, Chen D, Zeleniuch-Jacquotte A, Abeles G, Bystryn JC (1995) Effect of DETOX as an adjuvant for melanoma vaccine. *Vaccine* 13(5): 503-508.
- Schwarz T (2009) Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, Cervarix. *Advances in Therapy* 26(11), 983–998.
- Schnaitman CA, Klena JD (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological Reviews*. 57: 655–82.
- Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, Berg D, Freiman A, Handiside T, Hollis S, Lens MB, Thompson JF (2009) Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database of Systematic Review* 7(4):CD004835.
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 270(5243): 1804-1806.

Srivastava HC, Adams, GA (1962) Preparation and properties of polysaccharide-lipid complexes from *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Chemistry* 40:905-918.

Suram S, Brown GD, Ghosh M, Gordon S, Loper R, Taylor PR, Akira S, Uematsu S, Williams DL, Leslie CC (2006) Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *Journal of Biological Chemistry* 281:5506–5514.

Svobodová B, (2012) Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Takayama K, Ribi E, Cantrell JL (1981) Isolation of a nontoxic lipid A fraction containing tumor regression activity. *Cancer Research* 41: 2654-2657.

Takayama K, Qureshi N, Ribi E, Cantrell JL. (1984) Separation and characterization of toxic and nontoxic forms of lipid A. *Reviews of infectious diseases* 6(4):439-43.

Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21: 335–376.

Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *The Journal of Immunology* 169: 3876–3882.

Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A (2005) A novel glyco- conjugate vaccine against fungal pathogens. *The Journal of Experimental Medicine* 202(5): 597-606.

Triantafilou M, Brandenburg K, Kusumoto S, Fukase K, Mackie A, Seydel U, Triantafilou K. (2004) Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochemical Journal* 381:527-36.

Trnka F, Rybak M, Marek R, Vavra L (1999) Pharmaceutical composition containing an isolated protease proenzyme, amylase, and aprotinin. United States Patent # 5,858,357.

Tsung K, Norton JA (2006) Lessons from Coley's Toxin. *Surgical Oncology*, 15, 1: 25-28.

Tzianabos AO, and Cisneros RL (1996) Prophylaxis with the immunomodulator PGG glucan enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 797: 285–287.

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

Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2013) Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010.

Vetvicka V, Dvorak B, Vetvickova J, Richter J, Krizan J, Sima P, Yvin JC (2006) Orally administered marine (1->3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 291-298.

Villa P and Ghezzi P (2004) Animal model of endotoxin shock. *Methods in Molecular Medicine*, 98: 199-206.

Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA (1991) *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia: comparison to *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 87: 1925–1935.

Warburg O, Posener K, Negelein E (1924) Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemistry Zeitschrift*, 152:319-344.

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123:309-314.

Warren TS, Fitting C, Hoff E, Adib-Conquy M, Beasley-Topliffe L, et al. (2010) Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *The Journal of Infectious Diseases*, 201: 223-232.

Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258–274.

Williams DL, Sherwood ER, Browder IW, McNamee RB, Jones EL, Rakinic J, DiLuzio NR (1988). Effect of glucan on neutrophil dynamics and immune function in *Escherichia coli* peritonitis. *Journal of Surgical Research*, 44: 54–61.

Wolff S (1973) Biological effects of bacterial endotoxins in humans. *The Journal of Infectious Diseases* 128: 5259-5264.

Wong R, Lau R, Chang J, et al. (2004) Immune responses to a class II helper peptide epitope in patients with stage III/IV resected melanoma. *Clinical Cancer Research* 10(15): 5004-5013.

Yao Z, Foster PA, Gross, GJ (1994) Monophosphoryl lipid A protects against endotoxic shock via inhibiting neutrophil infiltration and preventing disseminated intravascular coagulation *Circulatory Shock* 43: 107-114.

Zhang L, Li X, Xu X, Zeng F (2005) Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research*, 340(8): 1515-1521.

Zhuang C, Mizuno T, Shimada A, Ito H, Suzuki C, Mayuzumi Y, Okamoto H, MaY, Li J (1993) Antitumor Protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57: 901-906.

Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Chizhou AO, Krupnova TN, Sundukova EV, Isakov VV (2003) Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the development conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 294(1): 1-13.

[www.elicity1-oligotech.com](http://www.elicity1-oligotech.com)