

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Analýza protinádorového účinku ligandu fagocytárních
receptorů fMLF, *in vitro***

Bakalářská práce

Veronika Bumbová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2015

Bumbová, V., (2015) : Analýza protinádorového účinku ligandu fagocytárních receptorů fMLF, *in vitro*[Analysis of antitumor effect of phagocytic receptor's ligand fMLF, *in vitro*. Bc. Thesis, in Czech] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to demonstrate the antitumor effect of phagocytic receptor's ligand - fMLF, *in vitro*, and to find a suitable assay for determining cytotoxic anticancer activity of neutrophils.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích dne 21. 4. 2015

.....

Podpis

Poděkování:

Nejdříve bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc, za jeho pozitivní přístup, ochotu a trpělivost, kterou měl při vedení mé bakalářské práce. Mé dík patří také panu RNDr. Janu Ženkovi, CSc., paní Evě Výletové a pracovníkům ústavu Medicínské biologie, za jejich cenné rady, ochotu poradit a pomoci. Děkuji také své kolegyni Tereze Štajnerové, která byla po dobu mého studia velkou oporou a spolupráce s ní byla vždy radost. Dále ze srdce děkuji své rodině, Tomášovi Kutlákovi a Michaelle Pocové, za jejich podporu během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.2	Rakovina obecně	1
1.2.1	Vznik rakoviny	1
1.2.2	Funkce telomerázy v nádorových buňkách	2
1.2.3	Metabolismus nádorové buňky	2
1.2.4	Pentózový cyklus nádorových buněk	4
1.2.5	Vznik laktátu a jeho vliv na buněčné pochody	4
1.2.6	Volné radikály kyslíku (ROS)	5
1.3	Imunoediting	5
1.4	Imunita	6
1.4.1	Přírozená imunita	6
1.4.2	Adaptivní imunita	18
1.5	Reakce imunitního systému na nádory	19
1.5.1	Nádorové antigeny	19
1.6	Mechanismy úniku nádorových buněk útoku imunitního systému	20
1.7	N-formyl peptidy	21
1.8	Formyl peptidové receptory (FPR) a jejich dělení	21
1.8.1	Lidské FPRs	22
1.8.2	Myší FPRs	24
1.9	Terapie nádorů	25
2	Cíl práce	26
3	Materiál a metody	27
3.1	Chemikálie	27
3.2	Laboratorní zvířata	28
3.3	Nádorové buňky	28
3.4	Příprava buněk a cytotoxický test Ziva TM TOX	28

3.5	Příprava buněk a cytotoxický test s použitím ^{51}Cr	31
3.6	Princip testu Ziva TM Tox.....	32
3.7	Princip cytotoxické analýzy s použitím ^{51}Cr	33
3.8	Analýza dat	33
3.9	Pokusy.....	33
3.9.1	Pokus č. 1.....	33
3.9.2	Pokus č. 2.....	34
3.9.3	Pokus č. 3.....	34
4	Výsledky.....	35
4.1	Pokus č. 1.....	35
4.2	Pokus č. 2.....	36
4.3	Pokus č. 3.....	37
5	Diskuze	39
6	Závěr.....	42
7	Seznam použité literatury	43

1 Úvod

V dnešním světě je rakovina velice rozšířenou civilizační nemocí. Ačkoli se po světě udělalo již tolik výzkumů, nikdo ještě nenalezl léčbu, která by 100% fungovala na všechny typy nádorů. Vyspělou technologií v lékařství jsme však schopni detekovat nádorové buňky, zaměřovat je (targeting) a zpomalit jejich růst. Účinnou léčbou by však mohl být náš imunitní systém, na kterém je v podstatě založena tato práce.

1.2 Rakovina obecně

1.2.1 Vznik rakoviny

V našem těle se nachází přes sto milionů buněk s různými funkcemi, rakovina však začíná různými změnami uvnitř buněk. Díky signálům, které buňky produkují, dochází ke kontrole buněčného dělení. Pokud však nějaký signál chybí nebo je poškozen, buňky se mohou začít přehnaně a nekontrolovatelně množit, růst a následně vytvářet novotvary zvané nádory. Některé typy rakoviny např. leukémie vznikají z krevních buněk, které se neformují v novotvary. Tyto poškozené buňky se hromadí v krvi a někdy také v kostní dřeni. Riziko vzniku rakoviny se zvyšuje se vzrůstajícím věkem a to díky akumulaci genetických změn v buněčných genech.

Různé typy buněk zajišťují v těle různé funkce, avšak jedno mají společné, mají řídicí středisko nazývané jádro. Uvnitř jádra se nacházejí chromozomy tvořené dlouhými řetězci DNA. Sama DNA je pak složená z tisíce genů, které ovlivňují chování buněk. Za normálních podmínek geny uvnitř buňky nebo náš imunitní systém zajišťují potřebné množství těchto buněk, které naše tělo potřebuje, aby zůstalo zdravé. Avšak při buněčném dělení může docházet k různým změnám v buňce. Genové změny uvnitř buněk se nazývají mutace.

Obvykle jsou buňky schopné tyto změny korigovat, pokud je však poškození nevratné, jsou schopné se samy zničit, a to apoptózou nebo jsou rozpoznány imunitním systémem jako chybné a jsou jím zabity. Tyto buněčné pochody chrání naše tělo před vznikem rakoviny. Obvykle však mutace na důležitých genech znamenají, že buňky neposlouchají pokyny a začnou se nekontrolovatelně množit. Nejsou schopny opravit defekty a nepodléhají apoptóze. Ačkoli přeměnu zdravé buňky v mutovanou může způsobit mnoho aspektů, jednotlivé nádory se ve své genetické výbavě značně liší. Jediné, co je však spojuje je, že rakovinné buňky mění úroveň svého metabolismu dle své potřeby, což jim umožňuje rychlý růst a nadměrnou proliferaci.

Jak už jsem se zmínila, vznik mutace v buňkách je způsobený změnami DNA v buněčném jádře. Trvalé poškození DNA může vyvolat mutagenéze, jako je například substituce bází, inserce/delece nebo jakékoliv chromozomální přestavby. Jakákoliv takováto genová nestabilita je základním krokem v rozvoji rakoviny.

1.2.2 Funkce telomerázy v nádorových buňkách

Stáří somatických buněk můžeme detekovat dle délky telomer. Pokaždé, když buňka projde dělicí fází, dochází ke zkracování těchto telomer, což ovlivňuje životnost buňky. Díky opakujícím se nukleotidovým sekvencím nedochází ke ztrátě genetického materiálu. Počty buněčných dělení tedy mají vliv na délku telomer. Čím víc se buňka bude dělit, tím budou telomery kratší a tím pádem i kratší životnost dané buňky. Telomeráza je ribonukleoprotein, který má schopnost prodloužit telomery chromozomů. Ve zdravém organismu se však telomeráza vyskytuje pouze v proliferačních zárodečných buňkách, v běžných tělních buňkách je její aktivita blokována. Nádorové buňky mají schopnost aktivovat funkci telomerázy, což znamená, že nedochází ke zkracování telomer a buňka se stává nesmrtelnou (Altaner, 2008).

1.2.3 Metabolismus nádorové buňky

Na vzniku rakoviny má zásadní vliv genetická predispozice, onkogeny, ale i náš životní styl. Je již známo, že nadměrné slunění může přecházet v rakovinu kůže (melanom), kouření zas způsobovat změny v plicích a nakonec i špatná výživa může mít vliv na vznik rakoviny v gastrointestinálním traktu.

Všechny tyto aspekty mohou nakonec způsobit mutaci buněk a vznik rakovinného bujení. Aby mohla nádorová buňka neomezeně proliferovat či invazovat do tkáně, musí zcela změnit svůj metabolismus (Slaninová a Krejčí, 2013).

Nádorové buňky začnou akumulovat velké množství glukózy a glutaminu za jejich velké spotřeby. Ve většině rakovinných buněk tedy můžeme najít výrazně zvýšený metabolismus glukózy, bez ohledu na zásobování kyslíkem. Toho si již v roce 1920 všiml německý biochemik Otto Warburg. Předpokládal, že zvýšená glykolýza je vyvolána narušením aktivity oxidativní fosforylace a nádorové buňky získávají ATP pouze z glykolýzy (Chen et al., 2014). I když je Warburgův efekt specificky popsán pro metabolické změny v nádorových buňkách, můžeme ho naléznout i u rychle se množících buněk, včetně buněk embryonálních. Je známo, že u rakovinných buněk se můžeme setkat s vyšším podílem mitochondriálních mutací, což může mít vliv na jejich funkčnost. Avšak nevratné defekty mitochondrie jsou i u těchto buněk velice vzácné. Je dokázáno, že pokud by nějakým způsobem byla potlačena glykolýza nádorové buňky, je buňka schopna obnovit funkci mitochondriálního metabolismu (Slaninová a Krejčí, 2013).

Nicméně v posledních letech byla hypotéza, která tvrdila, že dochází k nevratnému poškození mitochondrií u rakovinných buněk, vyvrácena. A to v důsledku zjištění, že zvýšená glykolýza u mnoha druhů rakoviny není doprovázena mitochondriálními defekty ani narušením oxidativní fosforylace (Chen et al., 2014). Je tedy pravděpodobné, že ve většině případů nemá poškození mitochondrie vliv na potlačení její funkce. Funkce mitochondriálního metabolismu je regulována na úrovni exprese, nebo aktivity proteinů zapojených do Krebsova cyklu či dýchacího řetězce. Nikdy však nemůže být úplně zastavena, protože vytváří membránový potenciál potřebný pro dělení mitochondrií a celé buňky (Slaninová a Krejčí, 2013).

Kromě toho bylo zjištěno, že zvýšení glykolýzy má vliv nejen na syntézu ATP, ale také na syntézu ribonukleotidů a aminokyselin nutných pro růst, následné dělení, ale také působí na vznik redukovaného nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADPH) (Chen et al., 2014). Rakovinné buňky tedy získávají až 60 % ATP pomocí glykolýzy, zatímco tvorbu ATP v mitochondrii potlačí. Buňky tedy přechází na anaerobní glykolýzu a to i za dostatečného přísunu kyslíku. Buňka je sice schopna pomocí respiračního řetězce získat více molekul ATP ve srovnání s anaerobní glykolýzou, avšak důvodem, proč rakovinné buňky získávají ATP právě anaerobní glykolýzou, je, že glykolýza oddělená od mitochondriálního metabolismu je až 100x rychlejší a v konečném důsledku za dostatečného množství glukózy je buňka schopna vyprodukovat větší množství ATP.

1.2.4 Pentózový cyklus nádorových buněk

Pentózový cyklus je děj, který poskytuje redukované kofaktory NADPH a pětiuhlíkaté sacharidy a je napojený na proces glykolýzy. Buňka potřebuje replikovat svůj genom, vytvořit dostatečné množství MK pro výstavbu membrán a AK pro syntézu proteinů. Aby mohla buňka tvořit nové nukleotidy, musí z pentózového cyklu získat ribozu-5-fosfát, který je prekurzorem pro jejich tvorbu. NADPH vzniklý v pentózovém cyklu buňka používá k syntéze MK, lipidů a pro ochranu buňky před volnými radikály. Vzhledem ke zvýšenému metabolismu rakovinných buněk, dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů, které by mohly buňkám ublížit. Glutathion je tripeptid, který slouží jako ochránce před oxidačním stresem v buňce. Avšak aby mohl glutathion správně fungovat, potřebuje ke své činnosti NADPH, který získá právě z pentózového cyklu. Proto je pentózový cyklus pro rakovinné buňky velice důležitý.

1.2.5 Vznik laktátu a jeho vliv na buněčné pochody

Rychlost glykolýzy je ovlivněna množstvím NAD^+ , který je v procesu glykolýzy redukován na NADH (sloužící ke vzniku ATP). Za běžných podmínek se NADH vrací do mitochondriální respirace, kde je opět přeměněn na oxidat. formu NAD^+ . Avšak díky tomu, že rakovinné buňky mají utlumený respirační cyklus, začnou buňky zvyšovat produkci laktátdehydrogenázy a přeměňovat pyruvát na laktát a to v cytosolu buňky. Během této reakce dochází k regeneraci NADH zpět na NAD^+ . Vysoké množství laktátu, které v buňce vzniklo, může ohrozit rychlost glykolýzy, která by se důsledkem okyselení mohla úplně zastavit, proto buňka expanduje laktát z cytosolu do vnějšího prostředí. Sekrecí laktátu dochází k vnějšímu okyselení prostředí, díky němuž jsou schopny nádorové buňky působit na cytotoxické T lymfocyty a tím zabránit ataku imunitního systému. Laktát také snižuje adhezi buněk a tím napomáhá vniknutí druhotných ložisek (Slaninová a Krejčí, 2013).

1.2.6 Volné radikály kyslíku (ROS)

Volné radikály kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku hrají dvojí roli. Působí jak škodlivě, tak příznivě na buňky našeho těla. ROS působí v buňkách jako sekundární poslove intracelulárních signálních kaskád, které vyvolávají a udržují onkogenní fenotyp rakovinných buněk, ale také jsou schopny vyvolat buněčné stárnutí a apoptózu a tím účinně působit proti rakovinným buňkám. Oxidační stres vyvolá v buňce redoxní dysbalanci, která je přítomna ve většině rakovinných buněk v porovnání s buňkami zdravými. Redoxní dysbalance je spojována s onkogenní stimulací (Valko et al., 2006). Volné radikály se také používají k terapii rozvinutých zhoubných nádorů (RTG ozařování a některá cytostatika); (Holeček, 2010).

1.3 Imunoediting

Je proces, který se skládá z imunitního dohledu a progresu nádoru. Je rozdělen do tří fází: eliminace, rovnováha, únik.

- I. Eliminace – tato fáze zahrnuje vrozené a adaptivní imunitní odpovědi na nádorové buňky. Vrozená imunitní reakce zahrnuje několik efektorových buněk jako NK, NKT, a $\gamma\delta$ T, které jsou aktivovány zánětlivými cytokiny, uvolňovanými při nádorovém růstu. Do fáze eliminace se také zapojují makrofágy a stromální buňky, které obklopují nádorové buňky. Tato sekrece cytokinů přiláká další buňky imunitního systému, které následně produkují další prozánětlivé cytokiny jako IL-12, IFN- γ . Adaptivní imunitní odpověď je zprostředkována sekrecí perforinu, FasL a TRAIL, díky níž dochází k ataku NK buněk na nádorové buňky (Mori et al., 1997; Smyth et al., 2000; Takeda et al., 2001).
- II. Rovnovážná fáze – během této fáze jsou nádorové buňky (s neimunogenním fenotypem), které unikly ataku imunitního systému v eliminační fázi, selektovány pro růst.
- III. Fáze úniku – během této fáze unikají nádorové buňky imunitním mechanismům, rostou a expandují do okolí (Kim et al., 2007).

1.4 Imunita

1.4.1 Přírozená imunita

Přírozená imunita zajišťuje první linii obrany proti cizorodým látkám. Jejím hlavním úkolem je rozpoznat struktury pro tělo cizí a tělu vlastní a poté zahájit obranou reakci. Aby mohly buňky přírozené imunity rozpoznávat struktury mikroorganismů, jsou vybaveny skupinou receptorů. Tyto receptory se značně liší od receptorů adaptivní imunity. Zatímco receptory adaptivní imunity jsou pro každého jedince individuální, tudíž nemůžou být děděny; receptory přírozené imunity jsou kódovány v zárodečné DNA. Přírozená imunita je velmi důležitou složkou protinádorové obrany a to díky schopnosti rozeznat antigen bez předchozí prezentace pomocí MHC komplexu, jako je to u imunity adaptivní.

Nespecifická imunita má schopnost rozeznávat:

- I. Vysoce konzervované bakteriální struktury zvané PAMPs díky PRR receptorům nacházejícím se především na makrofázích, dendritických buňkách a B lymfocytech. Rozpoznání PAMP struktur, buňkami přírozené imunity zprostředkuje okamžitou obranou reakci a to bez předchozí buněčné proliferace, jako je tomu u imunity adaptivní.

- II. Vzory endogenního původu, které vznikají v těle např. během apoptózy nebo při nekróze. Tyto buňky jsou schopny rozeznávat ACAMP (Apoptotic Cell Associated Molecular Pattern), které jsou rozpoznávány ACR receptory nacházejícími se na povrchu buněk vrozené imunity (Krejsek a Kopecký, 2004).

Alarminy (PAMPs, DAMPs)

PAMPs tvoří různorodý soubor mikrobiálních molekul, které sdílejí řadu různých biochemických znaků (Janeway et al., 2007). Skládají se z látek tvořících bakteriální stěnu např. peptidoglykan (gram-pozitivní bakterie), lipopolysacharid (gram-negativní bakterie), bakteriální DNA, glukany (Krejsek a Kopecký, 2004). PAMPs jsou jedinečné pro mikroby a nejsou produkovány hostitelskými buňkami (Medzhitov et al., 2002). V porovnání s nimi, DAMPs (damage-associated molecular patterns) jsou molekuly, které iniciují imunitní odpověď v reakci na poranění, ischemii, poškození tkáně a to buď v nepřítomnosti, nebo přítomnosti patogenní infekce. Většina PAMPs a DAMPs jsou rozpoznávány PRR receptory (Tang et al., 2012).

Tyto receptory jsou schopny rozlišovat znaky typické pro patogenní mikroorganismy. Tímto mechanismem reaguje vrozená imunita výhradně na poškozující faktory vnějšího prostředí.

Dle funkčnosti rozeznáváme 3 třídy receptorů: sekretované, endocytární a signální.

- I. Sekretované receptory se váží na povrch antigenů a tím iniciují fagocytující buňky a komplement k rozpoznání daného antigenu. Mezi nejznámější PRR receptor tohoto typu patří MBL (Mannan Binding Lectin); (Krejsek a Kopecký, 2004). Vylučované PRR receptory se vážou na mikrobiální buňky a označují je k destrukci komplementem nebo fagocytózou (Medzhitov et al., 2002).

- II. Endocytární receptory jsou exprimovány na povrchu fagocytujících buněk a zprostředkovávají vazbu fagocytů s mikroorganismy. Endocytární receptory iniciují usmrcování a rozklad mikroorganismů. Fragmenty antigenů jsou následně navázány na molekuly HLA II. třídy a prezentovány T lymfocytům na povrchu buněk prezentující antigen. Tato třída receptorů zahrnuje makrofágový receptor pro manózu (MMR, CD206) a Macrophage Scavenger Receptor (MSR, CD204).

III. Signální receptory aktivují NFkB signální systém, který působí na expresi genů. Produkty těchto genů regulují imunitní odpověď (Krejsek a Kopecký, 2004). Mezi signální receptory řadíme receptory zvané Toll, které byly poprvé identifikovány u Drozofily (Hashimoto et al., 1988). Tyto typy receptorů byly objeveny i u savců a byly pojmenovány jako Toll-like receptors (TLRs). Toll receptor je transmembránový protein s extracelulární doménou, který je složen z opakujících se domén bohatých na leucin (LRR) a z cytoplazmatické domény, která vykazuje homologie s cytoplazmatickou doménou lidského receptoru pro IL-1. Dokázalo se, že aktivní mutant lidského Toll transfektovaný do lidských buněčných linií může indukovat aktivaci NFkB a expresi NFkB regulačních genů pro zánětlivé cytokiny IL-1, IL-6 a IL-8 a stejně tak expresi kostimulační molekuly B7.1, která je nutná pro aktivaci naivních T buněk. (Medzhitov et al., 1997).

Apoptotic Cell Receptor (ACR)

ACR jsou receptory vyznačující se strukturální heterogenitou. Mezi ACR receptory patří skupina tzv. vychytávacích receptorů, která je exprimována na buňkách vrozené imunity. V závislosti na typu buňky, která pomocí těchto receptorů identifikuje ACAMP dochází k rozvoji imunitní odpovědi. Pokud dochází k identifikaci prostřednictvím makrofágů, dochází ke tvorbě cytokinů, které obecně snižují schopnost imunitního systému reagovat. Rozeznávání prostřednictvím dendritických buněk může vést k rozvoji imunitní reaktivity (Krejsek a Kopecký, 2004).

Kompartmenty vrozené imunity - jejich funkce v imunitním systému a protinádorové účinky.

Mikroprostředí nádoru, vyznačující se chronickým zánětem obsahujícím stromální buňky, velké množství cév a zánětlivý infiltrát hraje důležitou roli při vývoji rakoviny (Coussens and Werb, 2002; Allavena et al., 2008; Hanahan and Weinberg, 2011). Široké spektrum leukocytů v mikroprostředí nádoru může vykonávat dvojí roli v rozvoji a progresi nádoru. Ve skutečnosti buňky imunitního systému můžou přímo potlačovat rozvoj a růst nádorových buněk, podílet se na indukci protinádorové imunitní odpovědi nebo mohou být přijaty nádorovými buňkami, které je ovlivňují v jejich prospěch a příznivě působit na růst nádorových buněk. Do tohoto buněčného infiltrátu spadají mnohé buňky imunitního systému, včetně makrofágů a neutrofilních granulocytů (Galdiero et al., 2013).

Vrozenou imunitu můžeme rozdělit do dvou kategorií:

- I. Buněčná složka vrozené imunity, do které řadíme – dendritické buňky, makrofágy, eosinofilní granulocyty, žírné buňky, NK buňky, trombocyty, erytrocyty a neutrofilní granulocyty.
- II. Humorální složka vrozené imunity, do které spadá komplementový systém a interferonový systém.

I. Dendritické buňky (DC)

DC se nachází ve většině tkání a jejich úkolem je zachycovat a zpracovávat antigeny a prezentovat je spolu s MHC antigeny na jejich povrchu. DC zvyšují po aktivaci antigenem expresi genů kostimulačních molekul a migrují do lymfoidních orgánů (slezina a lymfatické uzliny), kde prezentují antigen T lymfocytům. Tyto reakce DC můžou být navozeny infekčními agens a zánětlivými produkty. DC jsou vlastně mobilní hlídky, které prezentují antigeny T lymfocytům a působí na expresi kostimulačních molekul, čímž indukují imunitní reakce. Další důležitou funkcí, je schopnost vyvolávat toleranci T buněk vůči antigenům, které jsou tělu vlastní (tzv. self-antigens), čímž minimalizují vznik autoimunitních nemocí. Po aktivaci T lymfocytů prostřednictvím zralých dendritických buněk mohou T buňky dokončit imunitní odpověď.

Tyto buňky prostřednictvím interakce s B lymfocyty zajišťují tvorbu protilátek a skrz makrofágy jsou schopny regulovat uvolňování cytokinů. Nezralé dendritické buňky jsou méně účinnými iniciátory imunitního systému, nejsou schopny aktivovat T lymfocyty. Avšak jsou velmi dobře vybaveny pro zachycení antigenů, což hraje klíčovou roli v indukci imunity, protože tyto antigeny mají schopnost navodit zrání a mobilizaci dendritických buněk (Banchereau a Steinman, 1998).

II. Eozinofilní granulocyty

Eozinofily jsou multifunkční leukocyty účastníci se zánětlivých procesů, alergických onemocnění a parazitární invaze (Gleich a Loegering, 1984; Weller, 1994; Rothenberg a Hogan, 2006). V reakci na různé podněty dochází k pronikání eozinofilů z cirkulace do zánětlivého ohniska, kde aktivují imunitní reakci prostřednictvím celé řady mechanismů. Aktivace eozinofilů probíhá za účasti receptorů pro cytokiny, imunoglobulinů a komplementu, může vést k vylučování prozánětlivých cytokinů IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 a TGF (transforming growth factor), chemokinů a lipidových mediátorů (Kita, 1996). Tyto molekuly mají prozánětlivý efekt, který zahrnuje zvýšenou funkci adhezních systémů, aktivaci a regulaci cévní propustnosti, sekreci hlenu a kontrakci hladkých svalů.

Eozinofily mohou sloužit jako hlavní efektorové buňky, které způsobují poškození a dysfunkci tkáně a to uvolněním toxických granulí a lipidových mediátorů (Gleich a Adolphson, 1986). Bylo také prokázáno, že eozinofily jsou schopny provádět četné imunitní reakce, včetně prezentace antigenu (Shi et al., 2000; MacKenzie et al., 2001). Mohou zpracovávat a prezentovat různé mikrobiální, virové a parazitární antigeny (Shi, 2004) a sekretují celou řadu cytokinů, kterými jsou schopné podporovat T buněčnou proliferaci a polarizaci Th1, Th2 (Kita, 1996; Shi et al., 2000; MacKenzie et al., 2001; Marone, 2000). IL-5 dokonce reguluje růst, diferenciaci, aktivaci a životnost eozinofilů a dává signál pro expanzi a mobilizaci eozinofilů (Collins et al., 1995).

U těchto buněk je také důležité zmínit jejich protinádorovou aktivitu. Ačkoliv jejich tumoricidní účinky nejsou dobře známy, četné studie prokázaly lepší prognózu spojenou s migrací eozinofilů do nádorových tkání. Degranulované eozinofilní buňky byly nalezeny u nádorů tlustého střeva (Pretlow, et al., 1983; Fernández-Aceñero et al., 2000), spinocelulárního karcinomu (SCC); (Dorta et al., 2002), u rakoviny prostaty (Luna-Moré et al., 1997) a močového měchýře (Costello et al., 2005) atd.

V okolí nádoru byla pozorována lipidová zrna, pocházející právě z degranulovaných eozinofilů, pomocí nichž byla spuštěna protinádorová cytotoxická odpověď (Caruso et al., 2011). U lidí jsou eozinofily často využívány pro imunoterapii pomocí IL-2 (Huland, 1992; Simon, et al., 2003), IL-4 (Tepper et al., 1992; Sosman et al., 1995), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); (Bristol et al., 2003) nebo jsou využívány k výrobě vakcín (Schaefer et al., 2010).

III. Žírné buňky (*mastocyty*)

Žírné buňky jsou známé jako základní efektorové buňky, účastníci se alergických reakcí. Tyto buňky obsahují receptory pro IgE. Při styku s konkrétním antigenem, který je rozeznán buněčným receptorem vázajícím IgE, dochází k sekreci bioaktivních mediátorů. Tyto mediátory vyvolají počáteční iniciační fázi, která zahrnuje vaskulární reakce a exsudaci a přispívá k pozdní fázi zahrnující akumulaci leukocytů a hojení ran. Prekurzory těchto buněk cirkulují v krvi a lymfatických cévách a následně migrují do tkáně, kde dozrávají a získávají zde morfologické a funkční vlastnosti pod vlivem mikroenvironmentálních faktorů (Kirshenbaum et al., 1991; Mekori et al., 1993; Rodewald et al., 1996; Metcalfe et al., 1997; Galli, 1997; Kirshenbaum et al., 1999). Ačkoli tyto buňky sdílejí mnoho vlastností, nejsou homogenní populací. Obsahují totiž rozdílná cytoplazmatická granula. Tyto buňky se mohou lišit velikostí, strukturou cytoplazmatických granulí, obsahem mediátorů, citlivostí na stimulaci růstovými faktory a citlivostí na různé farmakologické agens (Mekori a Metcalfe, 200).

Aktivace žírných buněk je zahájena po interakci antigenu (alergenu) s IgE protilátkou, která je připojena k buněčné membráně prostřednictvím FcεRI receptoru. Tato vazba způsobuje aktivaci buněk a spouští produkci mediátorů a jejich uvolnění (Alber et al., 1992; Metcalfe et al., 1997; Galli, 1997; Galli a Lantz, 1999).

Aktivace má za následek 3 typy biologických účinků:

- A. Buňky začnou řízeně regulovat sekreci předem připraveného obsahu uvnitř granulí a následně ho uvolní pomocí exocytózy do okolí. Během této aktivace jsou uvolňovány mediátory jako je histamin, proteoglykany, proteázy a cytokiny (např. TNF α a IL-16).

- B. Mastocyty enzymaticky syntetizují lipidové mediátory z prekurzorů uložených v buněčných membránách. Mezi tyto mediátory patří PGD₂ (prostaglandin D₂), leukotrien C₄ (LT) a faktor aktivující destičky (PAF).
- C. Žírné buňky zahájí transkripci, translaci a sekreci různých typů cytokinů jako jsou TNF- α , GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), SCF (stem cell factor), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14 a IL-16 a expresi určitých chemokinů, např. macrophage inflammatory proteins (MIP) – MIP-1 α a MIP-1 β , T-cell activation gene 3, lymphotactin, monocyte chemotactic protein-1. Opět v závislosti na typu žírných buněk a jejich stimulu (Galli et al., 1991; Metcalfe et al., 1997; Galli, 1997; Galli a Lantz, 1999).

Vliv IL-3 na žírné buňky:

Ukázalo se, že IL-3 a c-kit ligand (který se váže na SCF faktor kmenových buněk), podporují proliferaci a zrání žírných buněk u hlodavců, zatímco IL-3 má minimální přímý účinek na proliferaci těchto buněk u lidí, SCF po interakci s tyrosine kinázovým receptorem (c-kit receptor) indukuje u lidí růst žírných buněk a jejich diferenciaci (Kirshenbaum et al., 1992; Galli et al., 1993).

IV. NK buňky (*natural killers*)

NK buňky patří mezi cytotoxické lymfocyty. Po jejich aktivaci dochází k uvolňování cytotoxických granulí obsahující perforin a granzymy, které způsobí perforaci cílových buněk a následnou apoptickou smrt (Lieberman, 2003; Voskoboinik et al., 2006). NK buňky jsou schopny produkovat celou řadu cytokinů a chemokinů např. IFN- γ , TNF, GM-CSF, MIP-1 α a RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) (Biron et al., 1999; Dorner et al., 2004). Téměř všechny lidské NK buňky exprimují CD16 marker (Perussia et al., 1984; West et al., 1977), který je receptorem pro Fc fragment IgG. Za pomoci tohoto receptoru mohou NK rozpoznávat buňky potažené protilátkou (Ojo a Wigzell, 1978).

Lidské NK buňky rovněž exprimují CD56 znak, který je označován jako neural cell adhesion molecule (Lanier et al., 1991). Téměř všechny lidské i myší NK buňky exprimují 2B4 receptor. Tento receptor je vázán na CD48 buněčnou molekulu, která je obecně exprimována na hematopoetických buňkách (Brown et al., 1998).

Prostřednictvím alternativní vazby může 2B4 fungovat jako aktivační nebo inhibiční receptor (Schatzle et al., 1999). Na NK však slouží jako aktivační receptor a může přispívat k lýze hematopoetické buňky exprimující CD48 (Nakajima et al., 1999). Dalšími aktivátory NK buněk jsou NKp46, NKp44, a NKp30 receptory. NKp46, NKp30 jsou výhradně exprimovány NK buňkami a jakákoliv blokáce těchto receptorů zhoršuje lýzu cílových buněk NK buňkami (Sivori et al., 1997; Pende et al., 1999). NK buňky mohou být také nespecificky aktivovány pomocí cytokinů IL-2, IL-15, and IL-18 (Perussia et al., 1996). IL-2 stimuluje NK buňky k proliferaci, sekreci cytokinů, k efektivnější lýze cílových buněk a pomáhá rozšiřovat škálu nádorů, které mohou lyzovat (Kehri et al., 1988)

Rozdělení NK buněk

Lidské NK buňky jsou charakterizovány $CD3^- CD56^+$ znaky a tvoří 5 – 20 % lymfocytů periferní krve. Lze je rozdělit do dvou skupin $CD56^{bright}$ a $CD56^{dim}$. Skupina $CD56^{dim}$ převládá v krvi (přibližně 95 % NK buněk), v místě zánětu vykazuje vysoký cytotoxický potenciál a exprimuje MHC 1 receptory. Zatímco skupina $CD56^{bright}$ převládá v lymfatických uzlinách (75 % NK buněk) a jejím hlavním úkolem je produkce cytokinu. V porovnání s předchozí skupinou je jejich cytotoxicita rapidně nižší a jsou považovány za prekurzory terminálně diferenciovaných $CD56^{dim}$ (Lanier et al., 1983; Ferlazzo and Munz, 2004; Freud and Caligiuri, 2006; Chan et al., 2007).

Schopnost NK buněk působit na nádorové a virem napadené buňky

NK buňky patří mezi lymfocyty, u kterých byla poprvé identifikována schopnost zabíjet nádorové buňky a to bez záměrné imunizace či aktivace. Mají schopnost zabíjet virem napadené buňky a přednostně napadají buňky, které neexprimují antigeny pomocí MHC1 komplexu. Díky aktivaci NK buněčných receptorů a kostimulačních molekul jsou NK buňky schopny rozpoznávat nádorové a virem napadené buňky. Aktivované NK buňky jsou schopny působit na další buňky imunitního systému a tím ovlivňovat imunitní odpověď (Wu a Lanier, 2003). Vazba TNF receptorů jako jsou Fas/CD95, TRAIL receptor a TNFR1 na nádorových buňkách s požadovanými ligandy FasL, TRAIL and TNF, které jsou exprimovány nebo sekretovány NK buňkami, přispívá za jistých okolností k cytotoxicitě NK buněk (Zamai et al., 1998, 2007; Voskoboinik et al., 2006).

NKT buňky

NKT buňky jsou populací T lymfocytů, které sdílí některé charakteristické vlastnosti s NK buňkami. Tyto buňky nesou receptor NKR-P1A (CD161), který exprimují NK buňky (Lanier et al., 1994). Avšak složení TcR receptoru je odlišuje od klasických T lymfocytů. Díky tomuto receptoru jsou NKT buňky schopny rozeznat glykolipidové antigeny v prezentaci CD1d molekuly (Kawano et al., 1997; Joyce et al., 1998). Nedávné studie ukázaly, že CD1d váže glykosylphosphatidylinositol (GPI). Tento glykolipid se nachází na povrchu mnoha buněk a slouží jako kotva povrchových molekul nacházejících se na buněčné membráně, které např. regulují funkce komplementového systému (Schofield et al., 1999). Tyto molekuly se u různých organismů vyskytují v různých modifikacích. Tyto GPI by mohly zvyšovat schopnost NKT buněk rozpoznávat patogeny (Gumperz et al., 2000). NKT buňky vylučují $IFN\gamma$, který stimuluje imunitní odpověď Th1 buněk (Arase et al., 1996). Jsou však také schopny produkovat značné množství IL-4, které stimuluje Th2 buňky (Yoshimoto et al., 1994).

NKT buňky mohou buď potlačit protinádorovou odpověď prostřednictvím IL-13 nebo ji zprostředkovat pomocí $IFN\gamma$. $IFN\gamma$ může podporovat funkci CTL (cytotoxických lymfocytů) a aktivovat NK buňky pravděpodobně přes Th1 buněčnou indukci. Na druhou stranu, po odstranění Th1 buněk, za předpokladu zvýšené imunitní odpovědi prostřednictvím Th2 buněk, docházelo k inhibici CTL a potlačení protinádorové imunity (Smyth a Godfrey, 2000). Další protinádorová činnost NK buněk byla prokázána na pokusu s myši pomocí α -GalCer ligandu. Tento ligand patří mezi glykosfingolipidy a inhibuje růst nádoru prostřednictvím aktivace NKT buněk (Giaccone et al., 2002).

V. Makrofágy

Makrofágy jsou široce distribuované buňky imunitního systému, které hrají nezastupitelnou roli v udržování homeostázy a v obraně proti patogenům. V případě vrozené imunity zajišťují makrofágy okamžitou ochranu proti patogenům a koordinují infiltraci leukocytů. Makrofágy způsobují fagocytózu a následnou degranulaci apoptických buněk, mikrobů, případně neoplastických buněk (Gordon, 2003). Tyto procesy probíhají nezávisle na imunitní buněčné signalizaci. Odstranění zastaralých nebo apoptických buněk vede k minimální nebo nulové produkci imunitních mediátorů nestimulovanými lymfocyty (Kono a Rock, 2008).

Mezi receptory, které zprostředkovávají fagocytózu a tím zajišťují homeostatický stav patří scavenger receptors, fosfatidylserinové receptory, thrombospondin receptor, integriny a komplementové receptory (Erwig a Henson, 2007).

Aktivace makrofágů může mít buď prozánětlivé nebo protizánětlivé účinky, přispívá k destrukci nebo regeneraci tkáně a k hojení ran (Mantovani et al., 2005). Makrofágy vykazují značnou plasticitu a mohou změnit svou fyziologii v reakci na signály z mikroprostředí. Tyto změny mohou vést ke vzniku různých populací těchto buněk a to s odlišnými funkcemi (Mosser a Edwards, 2009). U myši mohou být monocyty (= makrofágy v krevním řečišti) rozlišeny na základě exprese markerů na buněčném povrchu:

- I. zánětlivé myší monocyty jsou definovány jako CCR2⁺ (CC-chemokinový receptor 2), CX₃CR1^{low} (CX3C- chemokinový receptor1) a GR1⁺
- II. rezidentní monocyty CCR2⁻, CX3CR1^{hi}, GR1⁻ (Geissmann et al., 2003).

Lidské monocyty, které se svou fyziologií značně odlišují od myších monocytů, můžeme také rozdělit na základě exprese markerů na buněčném povrchu (Strauss-Ayali et al., 2007). Klasické monocyty CD14^{hi}, CD16⁻ nebo neklasické monocyty CD14⁺, CD16⁺. Přibližně 90 % lidských monocytů exprimuje na svém povrchu klasické markery, zatímco u myši populace jsou tyto markery zastoupeny rovnoměrně (Passlick et al., 1989). Makrofágy můžeme rozdělit do dvou skupin a to na M1 – klasicky aktivované makrofágy a M2 – alternativně aktivované makrofágy (Gordon, 2003).

Klasicky aktivované makrofágy (M1)

Kombinace dvou signálů IFN γ (interferon- γ) a TNF (tumor-necrosis factor) aktivuje makrofágovou populaci, která zvýší sekreci prozánětlivých cytokinů a mediátorů (Mackanes, 1977; O'Shea a Murray, 2008). Důležitým zdrojem IFN γ jsou NK buňky (natural killers). NK buňky reagují na stres a infekci produkcí IFN γ , který může iniciovat makrofágy k sekreci prozánětlivých cytokinů, produkci zvýšeného množství superoxidových aniontů a kyslíkových a dusíkatých radikálů, čímž zvyšuje jejich schopnost zabíjet (Dale et al., 2008). Avšak produkce IFN γ NK buňkami je obvykle přechodná, a proto je důležité udržet populaci aktivní a to za pomoci produkce IFN γ Th1 buňkami (T helper); (Nathan, 2008; Mackaness, 1997; Gordon a Taylor, 2005; Gordon, 2007; O'Shea a Murray, 2008).

Pro klasicky aktivované makrofágy je typická produkce IL-1, IL-2 a IL-3, která má vliv na vývoj Th17 (Langrish et al., 2005; Veldhoen et al., 2006; Bettelli et al., 2006).

Alternativně aktivované makrofágy (M2)

M2 podskupina byla nadále rozdělena díky obrovským rozdílům v biochemii a fyziologii těchto buněk (Edward et al., 2006). Dělíme je tedy na makrofágy účastníci se hojení, regulační makrofágy a tumor asociované makrofágy (TAMs); (Mosser a Edwards, 2009).

TAMs (tumor asociované makrofágy)

Tyto buňky se vyznačují svými imunopresivními vlastnostmi a infiltrací do nádorové tkáně. Produkce IL-10, TGF- β a PGE rakovinnými buňkami a TAMs buňkami přispívá k potlačení protinádorové aktivity (Sica et al., 2002). TAMs jsou známé svou nízkou produkcí NO a nízkými cytotoxickými vlastnostmi (Dinapoli et al., 1996). Exprimují nízké hladiny prozánětlivých cytokinů IL-12, IL-1 β , TNF- α , aIL-6 a mají nízkou aktivitu jako antigen prezentující buňky (Mantovani et al., 2002). Avšak byla u nich objevena i protinádorová aktivita, viz. níže.

VI. Neutrofilny

Dnes je známo, že neutrofilny jsou klíčovými buňkami vrozené imunity a hrají důležitou roli v zamezení vlivu a odstranění počátečních škodlivých podnětů (Jaillon et al., 2013). Neutrofilní granulocyty tvoří 50 – 70 % leukocytů cirkulující krve. Tyto polymorfonukleární granulocyty migrují do tkání na popud chemotaktických signálů (Nourshargh et al., 2010). Po příchodu neutrofilů do místa signalizace zastávají neutrofilny celou řadu antibakteriálních funkcí, jako jsou výroba ROS, fagocytóza patogenů, mrtvých a umírajících tkání, degranulace s uvolněním různých druhů toxických látek a parakrinní signalizace dalším buněčným typům (Kolaczkowska et al., 2013).

Aktivované neutrofilní granulocyty produkují růstové faktory, různé cytokiny s protizánětlivým i prozánětlivým účinkem. Pokud však porovnáme tvorbu cytokinů s jejich tvorbou u mononukleárních fagocytů, je u neutrofilních granulocytů značně menší. Avšak tuto nevýhodu předčí počet neutrofilních granulocytů, který značně přesahuje množství mononukleárních fagocytů a navíc v místech obranného i poškozujícího zánětu dochází k jejich akumulaci.

Bakteriální produkty jako jsou LPS, N-formylované oligopeptidy nebo biologicky aktivní komponenty hub, indukují tvorbu cytokinů u neutrofilních buněk (Krejsek a Kopecký, 2004). Neutrofilové vímají zánětlivé podněty a okolní prostředí prostřednictvím buněčných povrchových receptorů, a to zejména receptorů spřažených s G proteinem (GPCR rodina).

Regulace angiogeneze

Neutrofilové také exprimují širokou škálu angiogenních faktorů, které jsou schopné způsobovat nádorové angiogeneze. Za účasti chemoatraktantu CXCL1 / MIP-2, který způsobí příliv neutrofilů, uvolňují biologicky aktivní látku VEGF-A (vascular endothelial growth factor A), což vede k angiogenezi *in vivo* (Scapini et al., 2004). Avšak mohou působit i protichůdně a to prostřednictvím anti-angiogenních mediátorů např. elastázy, která způsobí degradaci biologicky aktivních látek (VEGF-A, bFGF - basic fibroblast growth factor, α -defenzin) přispívajících k angiogenezi (Scapini et al., 2002; Chavakis et al., 2004; Ai et al., 2007). Neutrofilové jsou také schopny exprimovat TRAIL ligand (TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand), který je známý svou protinádorovou aktivitou (Cassatella, 2006; Tecchio et al., 2013).

TAN (tumor-associated neutrophils)

V analogii s makrofágy, TAN (tumor-associated neutrophils) mohou uplatňovat protinádorové i pronádorové funkce. Výzkumy také naznačují, že neutrofilové mohou být polarizovány na odlišný fenotyp v reakci na odlišné nádorové signály (Fridlender et al., 2009, Mantovani, 2009 and Mantovani et al., 2011).

Pronádorová aktivita TAN se vyznačuje mechanismy, jako jsou – přestavba extracelulární matrix, posílení invazivní a metastázujícího růstu nádorových buněk, angiogeneze, buněčná proliferace nádorových buněk, lymfangiogeneze a inhibice protinádorového imunitního dohledu (Mantovani et al., 2008; Qian and Pollard, 2010; Mantovani et al., 2011).

Protinádorová aktivita TAN a TAM – tyto buňky mohou vyvíjet protinádorovou aktivitu prostřednictvím přímé cytotoxické aktivity proti nádorovým buňkám a také skrze produkci velkého množství mediátorů (např. cytokinů, chemokinů a růstových faktorů), které způsobí infiltraci a aktivaci buněk adaptivní a přirozené imunity. (Mantovani et al., 2002; Tecchio et al., 2013).

1.4.2 Adaptivní imunita

Mezi hlavní složky adaptivní imunity patří T a B-lymfocyty, které prostřednictvím receptorů pro antigeny aktivují imunitní reakce. Tyto lymfocyty jsou schopné rozeznávat značné množství antigenních struktur díky rekombinanci genových segmentů kódujících jejich receptory. Dalším hlavním znakem specifické imunity je imunologická paměť. Díky imunologické paměti jsou schopny zvyšovat imunitní reaktivitu po opakovaném setkání s antigenem. K jejímu rozvoji dochází až během života.

T lymfocyty

Tyto buňky vznikají v kostní dřeni a poté migrují do brzlíku, kde probíhá jejich maturace. Rozpoznání antigenu probíhá výhradně ve spojení s MHC molekulami.

Rozeznáváme dva druhy:

- I. Th lymfocyty ($CD4^+$, helper cells) – jsou typické pro svou sekreci cytokinů prostřednictvím nichž stimulují imunitní reakce. Můžeme je rozlišit na Th1, jejichž cytokiny aktivují mononukleární fagocyty, NK buňky a cytotoxické T lymfocyty k usmrcování mikrobů.
Th2 jsou lymfocyty účastníci se boje proti parazitům a jsou schopny stimulovat B lymfocyty a další buňky imunitního systému (Bonilla a Oettgen, 2010).
- II. Tc lymfocyty (cytotoxic T cells, $CD8^+$) – jejich úloha je monitorovat a zabíjet buňky, které jsou potenciální hrozbou pro hostitele. Např. buňky napadené virem a nádorové buňky (Andersen et al., 2006).

B lymfocyty

Vznikají z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. V jejich membráně je zakotvena protilátka, která slouží jako receptor pro antigen. Po rozpoznání antigenu, jsou B lymfocyty schopny se za pomoci T lymfocytární stimulace diferencovat na plazmatické buňky, které produkují protilátky proti specifickému antigenu (Bonilla a Oettgen, 2010).

1.5 Reakce imunitního systému na nádory

Díky komplexnímu systému imunitní obrany (produkce cytokinů, chemokinů atd.) je naše tělo schopno rozeznávat různé cizorodé látky a následně aktivovat imunitní systém, který vede k destrukci daného antigenu. Díky molekulovým strukturám, které se nacházejí na nádorových buňkách by mělo docházet k indukci imunitní odpovědi. Tyto struktury by měly mít antigenní charakter, to znamená iniciovat imunitní systém k obraně a aktivovat složky imunitního systému. Přítomnost nádorových buněk vede opravdu k aktivaci imunitního systému, ale ten vždy nemusí mít protektivní charakter. Nádorové buňky jsou schopny působit na buňky imunitního systému a stimulovat je k onkogenezi. To, že imunitní systém nereaguje na nádorové antigeny, může být způsobeno díky slabé imunogenitě těchto antigenů nebo abnormální regulací imunitní odpovědi.

1.5.1 Nádorové antigeny

Jsou látky, které jsou produkovány nádorovými buňkami a spouští imunitní odpověď organismu. Tyto antigeny jsou užitečnými markery pro identifikaci nádorových buněk. Dělíme je na nádorově specifické (TSA) a tumor asociované antigeny (TAA).

TSA nádorově specifické antigeny jsou látky, které se vyskytují výhradně na nádorových buňkách (Philipps et al., 1985). Byly prokázány u nádorů vyvolaných chemickými a fyzikálními vlivy. Protinádorové odpovědi na tyto antigeny se účastní $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty, které jsou aktivovány vazbou antigenu na MHC complex (Toes et al., 1999).

TAA (antigeny spojené s nádory) lze lokalizovat nejen na buňkách nádorových, ale můžeme je pozorovat i na normálních tělních buňkách. Přítomnost v tělních buňkách je specifická svou nízkou koncentrací (Old a Chen 1998). Patří mezi ně např. MAGE (melanom asociovaný antigen), který je sice typický pro melanomové buňky, může být však exprimován i na běžných zdravých buňkách (Chomez et al., 2001).

1.6 Mechanismy úniku nádorových buněk útoku imunitního systému

- I. Nízká imunogenicita - vzhledem k tomu, že nádorové buňky vznikají mutací vlastní buněčné tkáně, mohou být pro rozvinutí imunitní odpovědi nedostatečně imunogenní.
- II. Porucha prezentace antigenu – mutace nebo snížená regulace nádorových antigenů; mutace nebo nepřítomnost MHC genů potřebných pro prezenci antigenu imunitnímu systému; chybné zpracování antigenu (například nedostatek TAP = transporter associated with antigen processing).
- III. Exprese imunosupresivních faktorů a molekul – cytokinů (TGF- β , IL-10, VEGF), prostaglandinů. Pomocí TGF- β dochází k potlačení ataku cytotoxických lymfocytů.
- IV. Apoptická rezistence – exprese anti-apoptických molekul nebo mutace apoptických molekul (Igney a Krammer, 2002).

1.7 N-formyl peptidy

Mezi první chemotaktické faktory, které byly strukturálně definovány, patří N-formyl peptidy. Na rozdíl od jiných leukocytových chemoatraktantů, by mohly N-formylové peptidy původně pocházet z endogenních zdrojů, jako jsou mitochondriální proteiny prasklých hostitelských buněk nebo z exogenních zdrojů, jako jsou například proteiny napadajících patogenů.

Studie naznačují, že N-formylová skupina byla rozhodující determinantou vazby ligandu na FPR a protože bakteriální a mitochondriální proteiny jsou jediné zdroje N-formyl peptidů v přírodě. Má se všeobecně za to, že tyto receptory byly vyvinuty, aby zprostředkovaly migraci fagocytů do míst bakteriální invaze nebo poškozené tkáně (Le et al., 2002).

1.8 Formyl peptidové receptory (FPR) a jejich dělení

Tyto transmembránové receptory jsou schopné vázat formylové peptidy, které se vyskytují v organismu při vzniku infekce. Jsou umístěny především na leukocytech (Fu et al., 2006). Migrace leukocytů do místa bakteriální infekce a následná realizace imunitní kaskády se uskutečňuje tak, aby došlo k zabránění šíření patogenní invaze (Dorward et al., 2015).

První GPCR (receptor spřažený s G proteinem), který byl popsán u lidských neutrofilů, byl formyl peptidový receptor (FPR), který při aktivaci spouští celou řadu kaskád, jako jsou chemotaxe, degranulace, produkce ROS a fagocytóza (Boulay et al., 1990; Ye RD, 2009). První specifický agonista, který byl popsán pro tento receptor je eicosanoid. (Fu et al., 2006). Eicosanoidy hrají důležitou roli v regulacích imunitní odpovědi a zánětlivém procesu (Krejsek a Kopecký, 2004). V dnešní době je známo mnoho agonistů pro tyto receptory. Funkční odpověď neutrofilů je spouštěna ligací těchto receptorů (Le et al., 2002).

Obecně platí, že chemoatraktantní receptory se skládají z jednoho řetězce složeného z 350-370 aminokyselin, který prostupuje 7x skrz buněčnou membránu. Tento aminokyselinový řetězec obsahuje N-konec se třemi smyčkami, které jsou nezbytné pro interakci s ligandem a jsou umístěny na extracelulární straně membrány a C-konec, který obsahuje další tři smyčky, je důležitý pro intracelulární signalizaci a je umístěný na intracelulární straně membrány (Murphy, 1994 a 1997).

1.8.1 Lidské FPRs

Lidské formyl peptidové receptory představují tři typy receptorů a to FPR1, FPR2/ALX a FPR3. Tyto receptory vykonávají různé role v iniciaci, propagaci a rozlišení zánětu. Pomocí low-stringency hybridizace s FPR, kde cDNA byla použita jako hybridizační sonda, byly klonovány z mRNA knihovny neutrofilů, receptory původně nazývané FPR-like 1 (FPRL1) a FPR-like 2 (FPRL2). Díky odlišným biochemickým a fyziologickým rolím, byly tyto receptory přejmenovány na FPR2/ALX a FPR3. Všechny tyto receptory jsou seskupeny na chromozomu 19q13.3 a sdílejí významné sekvenční homologie (Bao et al., 1992). Dříve se myslelo, že tyto receptory se vyskytují pouze na fagocytujících buňkách, tento pohled byl však přehodnocen z důvodu výskytu těchto receptorů i na jiných buňkách (Fu et al., 2006). Formyl peptidové receptory jsou přítomny na některých epitelových buňkách, zvláště těch, které mají sekreční funkce a na některých buňkách endokrinních jako jsou např. folikulární buňky štítné žlázy a buňky kůry nadledvin, neurony a hepatocyty (Becker et al., 1998).

I. FPR1

Tento receptor je exprimován na povrchu klidových neutrofilů. Exprese FPR1 je rapidně zvyšována v reakci na zánětlivé podněty. V *in vitro* pokusech tyto podněty zahrnují lipopolysacharid (LPS), faktor aktivující destičky, tumor necrosis faktor alfa a CpG oligonukleotid (O'Flaherty et al., 1991; Sengelov et al., 1994; Kitchen et al., 1996; Hayashi et al., 2003). Zvýšená exprese FPR1 receptoru byla také popsána u cirkulujících neutrofilů u pacientů s emfyzémem, Cronovou chorobou a sepsí (Tennenberg a Solomkin, 1988; Anton et al., 1989; Stockley et al., 1994). Tato rychlá exprese FPR1 ukazuje, že dochází k syntéze FPR1 během neutrofilní maturace. V reakci na agonisty pak dochází k samotné mobilizaci těchto receptorů (Sengelov et al., 1994; Cowland a Borregaard, 1999).

Mezi endogenní ligandy FPR1 patří cathepsin G, annexin A1 a za hlavní exogenní ligand FPR1 je považován fMLF (formyl-methionyl-leucyl fenylalanin); (Cooray et al., 2013; Wang et al., 2014).

II. FPR2

FPR2 v porovnání s FPR1 váže fMLF s nízkou afinitou (He et al., 2014). Tento typ receptorů je schopný vázat proteiny, peptidy a proteiny s ligandy včetně sérového amyloidu A, lipoxinu A₄ a Annexinu A1(Ann A1) (Dufton a Perretti, 2010; Bozinovski et al., 2013; Yang et al., 2013). Důležitým rysem těchto ligand-specifických interakcí, je schopnost vyvolat prozánětlivý nebo protizánětlivý efekt. Vazba amyloidu A nebo leucinu-37 s FPR2/ALX vyvolá zánětlivou reakci, dochází k aktivaci neutrofilů, uvolnění cytokinů a dojde ke zvýšenému toku neutrofilů do místa zánětu (El Kebir et al., 2007; Wan et al., 2011). Na rozdíl od vazby s AnnA1, která inhibuje migraci neutrofilů, podporuje jejich apoptózu a nabádá makrofágy ke sníženému prozánětlivému fenotypu (Li et al., 2011). Lipoxin A₄, opět skrz vazbu s FPR2/ALX vyvolá inhibici neutrofilní migrace za doprovodu zvyšujícího se náboru monocytů (Cooray et al., 2013).

III. FPR3

Na rozdíl od ostatních členů FPR rodiny, patří FPR3 k nejméně probádaným receptorům. Tento typ receptorů se nevyskytuje na neutrofilech, avšak byl nalezen na eozinofilních buňkách, monocytech, makrofázích a dendritických buňkách (Devosse et al., 2009). Mezi ligandy FPR3 patří F2L, což je vysoce konzervativní acetylovaný peptid odvozený z aminoterminálního rozpadu hem vázajícího proteinu (Gao et al., 2007). Aktivace FPR3 je vyvolána nízkou nanomolární koncentrací F2L. F2L indukuje intracelulární tok vápníku, fosforylaci ERK 1,2 (ERK = Extracellular signal-regulated kinase). Fosforylace těchto kináz způsobí jejich dimerizaci a vstup do buněčného jádra. Internukleární ERK fosforyluje řadu transkripčních faktorů, které v konečné fázi působí na expresi cyklinu D1, který interaguje s Rb (retinoblastoma protein). Rb je tumor supresorový protein, který je nefunkční u několika hlavních druhů rakoviny. Jeho funkcí je zabránění nadměrnému buněčnému růstu inhibicí buněčného cyklu do té doby, než je buňka připravena se rozdělit. Vzájemná interakce mezi FPR3 a F2L ligandem indukuje chemotaxi a má vliv na produkci IL-12 v dendritických buňkách, čímž brání v jejich maturaci (Cibula a Petružka, 2009).

1.8.2 Myší FPRs

FPR1 byly pospány u několika druhů (koně, králíci, hlodavci) s výraznými rozdíly ve funkční odpovědi na formyl peptidy (Richard et al., 2009). V porovnání se třemi FPR lidskými receptory jsou v myším genomu kódované mnohonásobné FPR příbuzné receptory (Fpr1, Fpr 1-8 příbuzných sekvencí) z chromozomu 17A3.2. (Tiffany et al., 2011). Fpr1 má s lidským FPR1 77 % homologií, je exprimován na podobných buněčných typech a stejným efektem indukuje chemotaxi neutrofilů, degranulaci, produkci cytosinů a fagocytózu (Gao et al., 1998). Geny Fpr2 a Fpr3 společně kódují receptory, které napodobují lidské FPR2/ALX (Richard et al., 2009). Fpr příbuzné sekvence 3, 4, 6 a 7 mají zřejmě úlohu jako chemoreceptory ve vomeronazálních neuronech (Jacobsonův orgán) navazující na čichový lalok (Rivière et al., 2009). Ačkoli lidský FPR1 vykazuje relativně velkou homologii s myší Fpr1, hlavním rozdílem je jejich afinita k fMLF, která je přibližně 100x menší u myši než u člověka (He et al., 2013). Tento rozdíl v afinitě je přičítán změnám v konformaci transmembránových a extracelulárních domén (Gao a Murphy, 1993). Je ale třeba podotknout, že i když se liší afinita receptoru pro fMLF, odvozeného od *E.coli*, afinita myšího Fpr1 zůstává pro ostatní bakteriální formylové peptidy (např. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, a mitochondriálně odvozené formyl peptidy) vysoká (He et al., 2013).

1.9 Terapie nádorů

- I. Chirurgické odstranění – problém však nastane, je-li tumor lokalizován v místech, kde odstranění nelze provést.
- II. Radioterapie – k léčbě je využíváno γ -záření, rentgenové paprsky, protony, neutrony.
- III. Chemoterapie – léčba pomocí cytostatik, které zabijí především dělící se buňky, nevýhodou je, že nepůsobí pouze na nádorové buňky, ale působí i na buňky zdravé.
- IV. Hormonální terapie – některé hormony ovlivňují růst nádorů zejména prsu a prostaty, zablokováním funkce těchto hormonů může dojít ke zpomalení či zástavě růstu.
- V. Imunoterapie – tento druh terapie je založen na stimulaci imunitního systému. Imunoterapie zahrnuje aktivaci lymfocytů, podávání hotových protilátek, použití cytokinů (IL-2, IFN- γ), blokace TGF- β , výroba vakcín z nádorových buněk.

Byla prováděna studie zkoumající biologickou aktivitu vakcíny, která obsahovala ozářené autologní buňky melanomu upravené tak, aby sekretovaly Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) u pacientů s metastatickým melanomem. Byla prováděna resekce metastatických lézí před a po vakcinaci. Zatímco u metastatických lézí, u kterých byla prováděna resekce před vakcinací, byla infiltrace buněk imunitního systému minimální u všech pacientů, metastatické léze resektované po vakcinaci byly hustě infiltrovány

T lymfocyty a plazmatickými buňkami a ukazovaly značnou destrukci nádoru (alespoň 80 %), fibrózu a otok u většiny pacientů. Tyto výsledky ukazují, že vakcinace za pomoci ozářených autologních melanomových buněk iniciovaných k produkci GM-CSF aktivuje protinádorovou imunitu u lidí s metastázujícím melanomem (Soiffer et al., 1998).

2 Cíl práce

- I. Podrobná literární rešerše.
- II. Cytotoxický efekt neutrofilů na nádorové buňky s navázaným ligandem (fMLF-DOPE).
- III. Porovnání dvou cytotoxických testů (ZivaTM TOX Ultrasensitive Cytotoxicity Assay a ⁵¹Cr release assay) pro hodnocení protinádorové aktivity neutrofilů *in vitro*.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

- **Azid sodný**
- **DOPE** - N-(Succinimidyl-oxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl (NOF Corporation, Japonsko)
- **Chroman sodný** – roztok ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$); (PerkinElmer, USA)
- **EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, USA)
- **FCS** – fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- **f-MLF** - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (Sigma- Aldrich, USA)
- **L-glutamin** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **Merkaptoetanol** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **PBS** - fosfátový pufr s chloridem sodným (pH 7,3-7,4), (Sigma-Aldrich, USA)
- **Penicilin/streptomycin antibiotika** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **PMA** – phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich)
- **RPMI 1640** (Sigma- Aldrich, USA)
- **Scintilační roztok** – Ultima Gold TM (PerkinElmer, USA)
- **Thioglykolát** (Becton Dickinson, USA)
- **Triton X-100** (Serva, Německo)
- **Trypanová modř** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Ziva TM TOX Ultrasensitive Cytotoxicity Assay** (Jaden BioScience, USA)

3.2 Laboratorní zvířata

V laboratorních pokusech byly použity myši kmene C57BL/6, samice z chovu Charles River Laboratories. Myši byly umístěny v jednotlivých sterilních boxech, v místnosti s teplotou 22 °C. K jídlu jim byly podávány granule a k pití měly k dispozici pitnou vodu ve sterilních lahvích. Váha myši byla okolo 20 g.

3.3 Nádorové buňky

V pokusech byly používány melanomové buňky B16-F10, které byly kultivovány v médiu RPMI 1640, které obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra, 1 % antibiotik, 1 % glutaminu, 0,1 % merkaptoetanolu. Buněčná kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

3.4 Příprava buněk a cytotoxický test ZivaTM TOX

(Ultrasensitive Cytotoxicity Assay)

Jako efektorové buňky, byly používány neutrofilní granulocyty získané z peritonea myši. Myši byl intraperitoneálně podán thioglykolát (1 ml 3% roztoku ve vodě), který způsobil zmnožení a migraci neutrofilů do peritonea. Po 4 hodinové inkubaci byla myš vypláchnuta 4 ml vychlazeného PBS a veškerý peritoneální exudát byl odebrán injekční stříkačkou.

Postup:

A) Nádorové buňky B16-F10 byly nejříve několikrát promyty sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). K promytným buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS), která způsobila uvolnění buněk. Po dobu trypsinizace byly buňky umístěny v termostatu - 10 minut. Pak byly buňky resuspendovány v kultivačním mediu. Poté byly buňky obarveny trypanovou modří (5%) a spočteny. Spočtené buňky byly centrifugovány 5 minut při teplotě 4 °C a následně naředěny na koncentraci 5×10^4 /ml. Po naředění bylo k 1 ml nádorových buněk přidáno 100 μ l ligandu fMLF-DOPE ($c = 0,5$ mM) a směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Pak byly buňky 2x promyty mediem.

B) Připravené buňky byly rozplněny do jamek 96 jamkového panelu s kulatým dnem (Nunc, Dánsko) v poměru 20:1 (E:C), v koncentraci - B16-F10 – 5×10^4 /ml, neutrofilů – 10^5 /ml po 100 μ l na jamku. Schéma destičky je znázorněno níže (Tab. I). Do sloupce č. 2 (Tab. I), bylo k nádorovým buňkám přidáno 20 μ l azidu (0,1%), který způsobil totální inhibici replikace DNA. Do sloupce č. 5 a 8 bylo k melanomovým buňkám přidáno 20 μ l volného ligandu fMLF ($c = 0,5$ mM) a nakonec do sloupce č. 9 bylo přidáno 20 μ l PMA ($c = 1$ mg/ml, ředěno 10 000x) jako pozitivní kontrola. Do všech jamek byl přidán BrdU Labeling Solution ředěný v poměru 1:100 (20 μ l na jamku) a destička byla inkubována 4 hodiny při teplotě 37 °C, v atmosféře s 5% CO₂.

C) Po uplynutí inkubační doby byla destička zcentrifugována a supernatant vylit. Do každé jamky (kromě kontroly) bylo přidáno 50 μ l Fix Solution (způsobuje rozvolnění DNA a jeho fixaci k destičce). Obsah jamek byl promíchán a přenesen do 96 jamkového bílého panelu s plochým dnem (Corning, USA) a do destičky byla přidána pozitivní kontrola od výrobce (50 μ l). Destička byla ve tmě inkubována 10 minut. Dále bylo přidáno 200 μ l Strigency Solution, opět inkubováno ve tmě po dobu 10 minut. Poté bylo přidáno 350 μ l Preparation Solution (ředěno 2:1 destilovanou vodou), inkubace 2 minuty ve tmě. Po 2 minutách bylo přidáno 50 μ l anti-BrdU Antibody Conjugate Solution (ředěno 1:100 s Antibody Conjugate Diluent) a inkubováno ve tmě 20 minut. Mezi jednotlivými kroky byla destička 3-4x promyta promývacím pufrem (jamky musí být naplněny po okraj). Po promytí bylo přidáno 2x Preparation Solution, 350 μ l, opět byl vylit obsah, destička byla osušena a na závěr bylo přidáno 50 μ l CDP Star. Po přidání CDP Star byla destička přemístěna do tmy a inkubována 30 minut.

Výsledná cytotoxicita efektorových buněk byla měřena luminometrem (Synergy H1, BioTek Instruments, USA) a vypočítána dle následujícího vzorce.

$$\% \text{ specifické cytotoxicity} = 1 - \left(\frac{\text{RLU}_{\text{exp.}} - \text{RLU}_{\text{spont.}} - \text{RLU}_{\text{eff.}}}{\text{RLU}_{\text{max}} - \text{RLU}_{\text{spont.}} - \text{RLU}_{\text{eff.}}} \right) \times 100$$

RLU exp = signál cytotoxických buněk + cílových buněk + BrdU

RLU spont = signál cílových buněk + azid+ BrdU (nejmenší množství BrdU, které může být inkorporováno)

RLU max = signál cílových buněk + BrdU (maximální množství BrdU, které může být inkorporováno)

RLU eff = signál ze samotných efektorových buněk + BrdU

V následující tabulce je znázorněno schéma destičky s použitými buňkami a chemikáliemi.

Tab. I: Schéma destičky

1	2	3	4	5	6	7	8	9
B16+ azid	N	B16	B16 + fMLF	B16 + fMLF volný	B16+N	B16 + fMLF+N	B16 + fMLF volný+N	B16+ N+ PMA

Jednotlivé složky byly pipetovány v pěti opakováních.

3.5 Příprava buněk a cytotoxický test s použitím ^{51}Cr

Buňky byly připraveny stejným způsobem jako pro Ziva TM TOX Ultrasensitive Cytotoxicity Assay s tím rozdílem, že před tím než byl na buňky navázán ligand, byly nádorové buňky v objemu 50 μl inkubovány s 50 μl ^{51}Cr po dobu 30 minut. Po návázání ligandu a ^{51}Cr byly buňky 3x promyty médiem a potřebné koncentrace (B16-F10 – $5 \times 10^4/\text{ml}$, neutrofilů – $5 \times 10^5/\text{ml}$ na jamku, poměr C:E = 1:10) byly rozděleny po 100 μl do 96 jamkového panelu s kulatým dnem (Nunc, Dánsko). Destička byla inkubována po dobu 4 hodin a následně stočena (5 minut). Do jedné triplikace byl k B16-F10 přidán Triton X-100 30 $\mu\text{l}/\text{jamku}$ (celkové uvolnění ^{51}Cr). Jednotlivý obsah jamek byl promíchán a 30 μl z každé jamky bylo přeneseno do mikrozkušavek s 250 μl scintilačního roztoku (k přeměně β záření na záření světelné). Vzorky byly měřeny na scintilačním počítači Tri-Carb 2900TR Liquid Scintillation Counter; Packard (PerkinElmer, USA) a výsledná cytotoxicita byla spočtena dle následujícího vzorce:

$$\text{Cytotoxicita (\%)} = \left(\frac{\text{Eu} - \text{Su}}{\text{Mu} - \text{Su}} \right) \times 100$$

Eu = experimentální uvolnění ^{51}Cr

Su = spontální uvolnění ^{51}Cr

Mu = maximální uvolnění ^{51}Cr

3.6 Princip testu ZivaTM Tox

Cytotoxické testy se využívají v celé řadě důležitých lékařských výzkumů. Cytotoxicita odkazuje na schopnost určitého agens (buněčného nebo nebuněčného) cytotoxicky působit na cílovou buňku a tím jí zabít. Metody, které se používají pro detekci cytotoxicity nebo buněčné smrti jsou např.: příjem barviv (trypanová modř), uvolnění endogenních molekul (např. LDH a DNA fragmenty). Každá z těchto metod je závislá na narušení buněčné membrány nebo na rozpadu buňky jako výsledek cytotoxických účinků. Události, které vedou k poškození buněčné membrány, jsou závislé na druhu buněčné smrti.

ZivaTM Tox je ultrasenzitivní cytotoxický test, založený na bázi ELISY, který používá chemiluminiscenční substrát pro detekci BrdU (značící látka), začleněné do DNA aktivně proliferujících buněk. Tento test stanovuje procento cytotoxického účinku na targetované buňky stanovením rozsahu inhibice DNA syntézy cílových buněk. To je prováděno měřením rozsahu začleněného BrdU, inkorporovaného do cílových buněk ovlivněných cytotoxickými buňkami, během nebo po cytotoxickém účinku. Za normálních podmínek dochází k rapidní proliferaci nádorových buněk, které při každém dělení začlení BrdU místo thyminu. Avšak působením efektorových buněk (v tomto případě neutrofilních granulocytů) dochází k narušení dělení nebo membrány cílových buněk, tudíž dojde ke zpomalení nebo zastavení dělení bez další inkorporace BrdU do DNA. Fixační roztok způsobí uvolnění DNA z buněk a navázání na destičku. Inkorporovaný BrdU je detekován specifickou protilátkou značenou alkalickou fosfatázou. Pak je do jamek přidán chemiluminiscenční substrát, jehož signál je poté měřen luminometrem.

3.7 Princip cytotoxické analýzy s použitím ^{51}Cr

Test je založený na uvolňování radioaktivního chromu z nádorových buněk. Během inkubace proniká radioaktivní chrom do cytoplazmy nádorových buněk, kde se váže na proteiny intracelulárního prostoru. Díky cytotoxické aktivitě neutrofilů dochází k uvolnění ^{51}Cr z cílových buněk. Následné přidání scintilačního roztoku způsobí přeměnu β -záření na záření světelné, které je měřeno za pomoci scintilačního počítače.

3.8 Analýza dat

K analýze dat byl použit program STATISTICA, konkrétně dvouvýběrový studentův T-test.

3.9 Pokusy

3.9.1 Pokus č. 1

Cytotixický účinek neutrofilů na melanomové buňky B16-F10 s navázaným ligandem (fMLF-DOPE).

V tomto experimentu byl porovnán cytotoxický účinek neutrofilů na melanomové buňky v závislosti na navázaném ligandu fMLF – DOPE.

Buňky melanomu B16-F10 a neutrofilů byly připraveny způsobem, který byl popsán v kapitole Materiál a metody. Do 96 jamkového panelu s kulatým dnem pak byly přidány buňky v různých směsích, jejichž rozložení na destičce ukazuje Tab. I. Do všech jamek bylo přidáno 20 μl *BrdU labeling solution* z cytotoxického testu Ziva-Tox, poté probíhala čtyřhodinová inkubace v termostatu (37 °C, 5% CO_2) a dále se postupovalo podle návodu pro vyhodnocení cytotoxického testu, který je popsán výše. Pokus ve stejném schématu byl opakován 5x, ve výsledcích je zahrnut pouze reprezentativní výsledek.

3.9.2 Pokus č. 2

Cytotoxický účinek na melanomové buňky B16-F10 založený na uvolnění radioaktivního chromu.

Buňky byly na tento pokus připraveny stejným způsobem jako pro **ZivaTM Tox** s výjimkou jamek s azidem (Tab. 1). Melanomové buňky byly označeny ⁵¹Cr a inkubovány s neutrofilí 4 hodiny. Maximální uvolnění ⁵¹Cr bylo získáno přidáním Tritonu X-100 k cílovým buňkám. Cytotoxicita způsobená efektorovými buňkami byla poté měřena podle β -záření uvolněného ⁵¹Cr pomocí scintilačního počítáče.

3.9.3 Pokus č. 3

Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky s navázaným a volným ligandem.

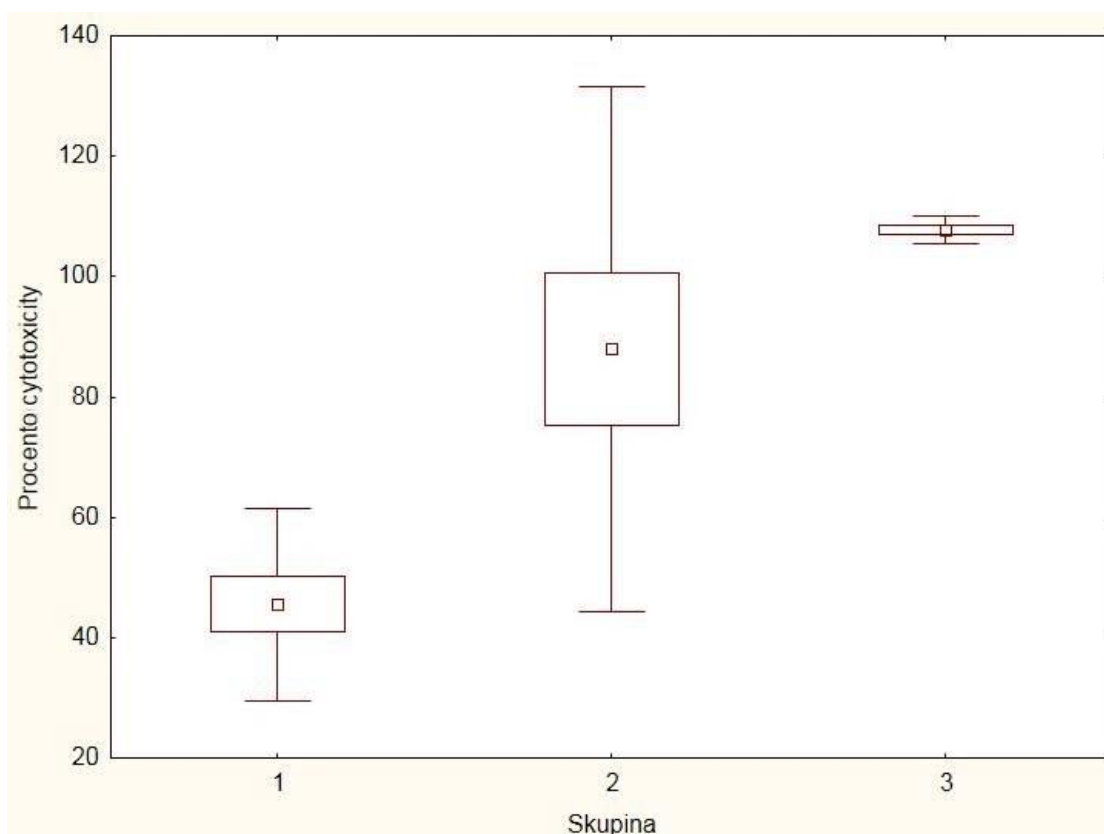
Buňky pro tento pokus byly připraveny stejným způsobem jako v pokusu č. 1. Byl zde porovnáván cytotoxický efekt neutrofilních granulocytů na nádorové buňky B16-F10, které na svém povrchu měly zakotvený ligand fMLF přes kotvu DOPE s cytotoxickým efektem na nádorové buňky, ke kterým byl přidán volný ligand bez ukotvení.

4 Výsledky

4.1 Pokus č. 1

Cytotoxický účinek neutrofilů na melanomové buňky B16-F10 s navázaným ligandem (fMLF-DOPE)

Z grafu (obr. 1) je patrné, že cytotoxický efekt, neutrofilních granulocytů byl vyšší na nádorové buňky, které na svém povrchu nesly ligand. Rozdíl cytotoxického účinku mezi těmito skupinami (B16-F10+N / B16-F10+N+fMLF-DOPE) dosáhl statistické významnosti ($p = 0,03$). Obrázek (obr. 1) také znázorňuje působení PMA, který aktivoval neutrofilní granulocyty k cytotoxickému efektu na nádorové buňky a je důkazem, že cytotoxický test ZivaTM Tox opravdu funguje. PMA slouží totiž jako pozitivní kontrola testu.

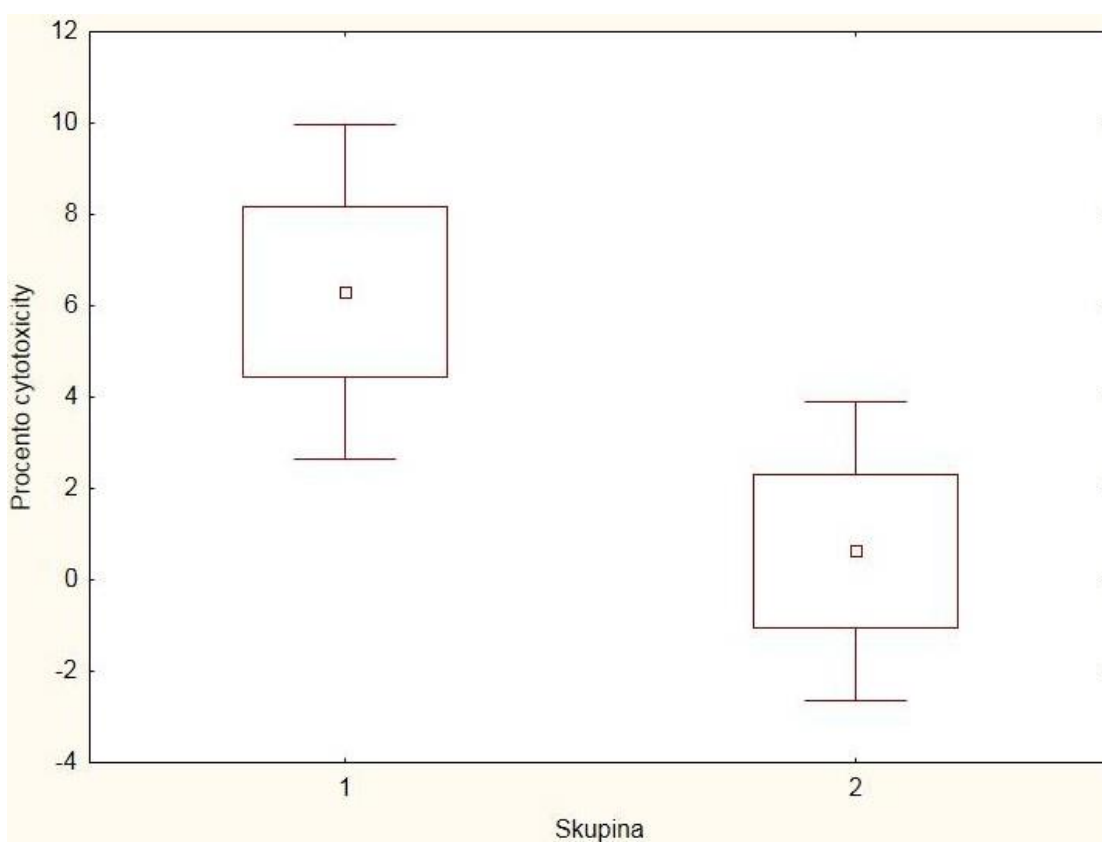


Obr. 1: Cytotoxický efekt neutrofilů na nádorové buňky (skupina 1), na nádorové buňky s navázaným fMLF-DOPE (skupina 2) a na nádorové buňky s PMA (skupina 3 – pozitivní kontrola).

4.2 Pokus č. 2

Cytotoxický účinek neutrofilů na melanomové buňky B16-F10 měřený pomocí uvolnění radioaktivního chromu

Výsledky tohoto pokusu nepotvrdily výsledky získané testem **Ziva™ TOX**. Cytotoxický efekt neutrofilních granulocytů byl větší na buňky, které na svém povrchu nenesly žádný ligand ve srovnání s buňkami, které na své membráně nesly fMLF-DOPE. Rozdíl v cytotoxicitě mezi oběma skupinami se blížil hladině významnosti (Obr. 2).



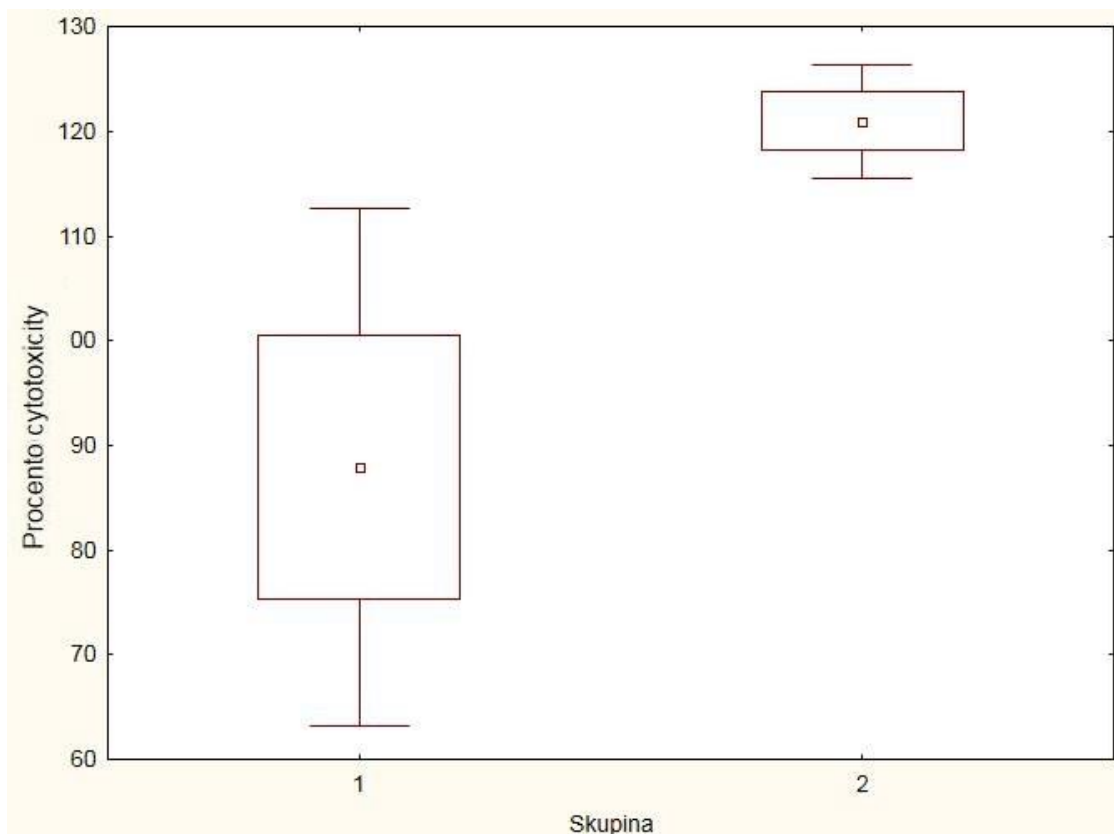
Obr. 2: Cytotoxický efekt neutrofilních granulocytů na buňky B16-F10 (skupina 1) a na B16-F10 + fMLF-DOPE (skupina 2) založený na uvolnění ^{51}Cr .

P= 0,08

4.3 Pokus č. 3

Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky s navázaných a volným ligandem

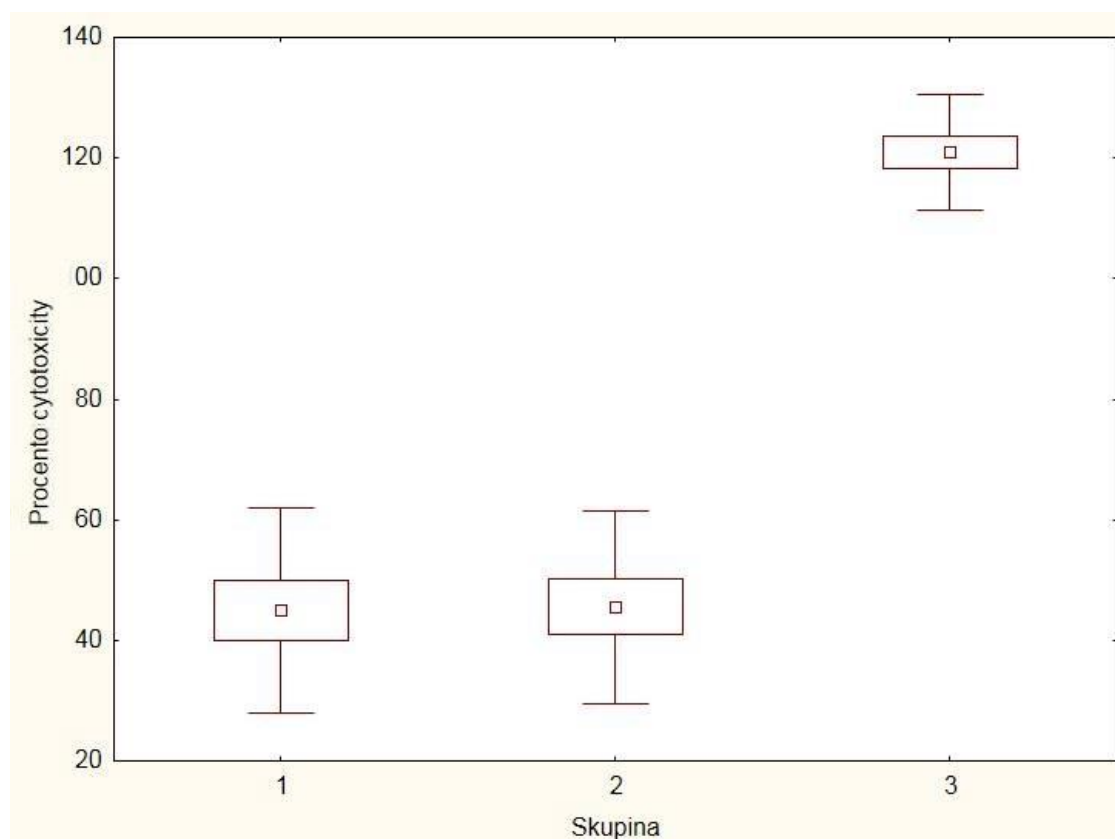
Po srovnání těchto dvou skupin je patrné, že volný ligand (fMLF-volný) stimuloval neutrofilní granulocyty k větší cytotoxicitě, v porovnání s ligandem vázaným (fMLF-DOPE) ; (Obr. 3).



Obr. 3: Cytotoxický efekt neutrofilních granulocytů na buňky B16-F10 s vázaným ligandem fMLF-DOPE (skupina 1) a za přítomnosti volného ligandu fMLF (skupina 2). Měřeno testem Ziva™ Tox.

P= 0,061

Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na samotné nádorové buňky a buňky inkubované s volným fMLF ligandem ukázalo výrazně vyšší cytotoxicitu ve skupině s ligandem (Obr. 4). Ve skupině s volným ligandem bez neutrofilů byla naměřena cytotoxicita srovnatelná s cytotoxickým účinkem samotných neutrofilů.



Obr. 4: Cytotoxický efekt neutrofilů na buňky B16-F10 (skupina 2) v porovnání s cytotoxickým efektem neutrofilů na stejné buňky za přítomnosti volného ligandu (skupina 3) a kontrola v podobě cytotoxického efektu samotného volného fMLF na melanomové buňky bez efektorů (skupina 1).

5 Diskuze

Imunoterapie se stala v poslední době důležitou složkou protinádorové léčby. Poslední výzkumy ukazují, že pasivní imunoterapie pomocí monoklonálních protilátek (mAbs) překonala aktivní imunituterapii, která ke své léčbě používá protinádorové vakcíny. Příkladem nejnovější pasivní terapie je terapie pomocí CTLA-4 a PD-1 (Rowdo et al., 2015). CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen) je transmembránový glykoprotein, který hraje důležitou roli v homeostáze T lymfocytů a snižuje T buněčnou aktivaci (Linsley et al., 1996). Byly vyvinuté různé humanizované monoklonální protilátky zaměřené na CTLA-4 (např. Ipilimumab, IgG1 mAb, Tremelimumab, IgG2 mAb). Preklinické studie B1/BL6 na myším melanomu dokazují, že Gvax plus anti-CTLA-4 blokáda zvýšila příliv lymfocytů do nádorové tkáně (Quezada et al., 2006). Curran et al. (2010) na stejném experimentálním modelu prokázal, že léčba s anti CTLA-4 nebo anti PD-1 zvýšila poměr $CD8^+$ T_H1 (efektorové T lymfocyty)/Treg (regulační lymfocyty) asi 10x, že poměr efektorů k nádorovým buňkám byl okolo 1-2/1000, ale pouze pokud obě mAbs byly kombinovány s buněčnými vakcínami (Curran et al., 2010). Waitz et al. také pozorovali, že kryoablace nádorů spojená s anti- CTLA-4 terapií zvýšila $CD8^+$ a $CD4^+$ infiltraci do nádorů u rakoviny prostaty na myším modelu (Waitz et al., 2012). Byly pozorovány různé protinádorové účinky u anti-CLTA-4 protilátek na myších modelech, nejúčinnější byl IgG2 subtyp (Selby et al., 2013).

PD-1 (programed cell death protein-1) je inhibiční receptor T-lymfocytů, který po vazbě s PD-L1 zabraňuje aktivaci T lymfocytů a jejich efektorových funkcí (Yokosuka et al., 2012). PD-L1 je vysoce exprimován u několika lidských tumorů, především u melanomu (Zou a Chen, 2008). U myši je PD-1 vysoce exprimováno na Treg buňkách, které brání likvidaci nádorových buněk (Francisco et al., 2009). Většina nádorů je oblopená právě těmito buňkami. Blokace PD-1 může tedy zvýšit protinádorovou imunitní odpověď a to snížením počtu Treg lymfocytů uvnitř nádorů (Pardoll, 2012).

Anti CTLA-4 a anti PD-1 monoklonální protilátky prokázaly významnou protinádorovou aktivitu (40-50 %) u pacientů s pokročilým CM (cutaneous melanoma); (Rowdo et al., 2015).

Dalšími atraktivními cíli pro protinádorovou terapii se staly NK buňky, které hrají klíčovou roli ve vytváření protinádorové imunity prostřednictvím dendritických buněk. NK buňky jsou v těsném spojení s buňkami dendritickými a podporují rozvoj protinádorové imunitní odpovědi. Nedávné studie (Lion et al., 2012) ukázaly, že vakcinace dendritickými buňkami způsobí aktivaci NK buněk, které stimulují očkované DC i DC pacienta aby zvyšovaly protinádorovou aktivitu T lymfocytů. Dále stymulují NK buňky k přímému zabíjení nádorových buněk a redukci nádorové hmoty.

To, že je přirozená imunita významným přínosem v boji proti nádorům, je dokázáno i ve studii Hicks et al., (2006) kde byla prokázána rezistence na nádorové buňky S180 u SR/CR (spontaneous regression/complete resistance) myši, zprostředkovaná rapidní infiltrací leukocytů, především přirozené imunity. To, že rezistence vůči rakovině je zprostředkovaná vrozenou imunitou a to konkrétně NK buňkami, makrofágy a polymorfonukleárními leukocyty (PMN) bylo podloženo několika fakty. Bylo zjištěno, že složky přirozené imunity mají protinádorový efekt, který nevyžadoval předchozí vystavení antigenu. Během opakovaného testování byly buňky vrozené imunity hlavní efektorové buňky působící na redukci nádoru. Leukocyty z SR/CR myši účinně zabíjely nádorové buňky *in vitro* bez předchozího setkání s nádorovými buňkami *in vivo*. Tvoření rozet s infiltrovanými NK buňkami, neutrofilů a makrofágy, bylo nutné pro následnou destrukci nádorových buněk pomocí cytolyzy. I přes nedostatek důkazů, že komponenty adaptivní imunity přispěly k rezistenci nádoru, nelze zcela vyloučit její pozitivní přínos v protinádorové odpovědi (Hicks et al., 2006).

Dávné studie již prokázaly účinnost IL-2 v protinádorové terapii. Vysoké dávky rekombinantního IL-2, které byly podávány pacientům s rakovinou, způsobily zvýšení hladiny TNF α , který byl u pacientů detekován v plazmě (Mier et al., 1988).

To, že buňky přirozené imunity opravdu napomáhají protinádorovému boji, můžeme demonstrovat na další studii (Costello et al., 2005), která prokázala lepší prognózu u rakoviny močového mechýře, spojenou s migrací eozinofilů do nádorové tkáně. NK buňky, makrofágy a PMN jsou zas schopny zabít nádorové buňky bez předchozí stimulace (Hicks et al., 2006), TAN a TAM mohou přispívat k růstu nádoru, ale mohou vyvíjet i protinádorovou aktivitu prostřednictvím přímé cytotoxické aktivity a skrze produkci cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Mantovani et al., 2002; Tecchio et al., 2013).

Díky tomu, že jsme dnes už schopni objasnit dostatečné množství mechanismů, kterými imunitní systém bojuje proti nádorovému růstu, nebo přispívá k jeho rozvoji, dochází k pokroku v imunologické léčbě nádorů. Myslím si, že imunoterapie je nejlepší cestou protinádorové léčby. Ačkoliv je i chemoterapie účinnou a stále dosti využívanou léčbou, její účinky jsou agresivní a její efekt není přímo zaměřen na nádorové buňky. Podle mého názoru je nejučinnější metodou podávání uměle připravených monoklonálních protilátek, které jsou cílené proti určitým antigenům. Tato metoda přímo působí na nádorové buňky, tím, že umožňuje lymfocytům nádorovou buňku rozpoznat nebo protilátky zablokují receptor, který nádorová buňka potřebuje pro svůj život. Aktivní imunizace je další, avšak podle mne méně účinná metoda protinádorové obrany. Díky odlišné antigenní výbavě nádorů a specifitě imunity, je totiž složité vyrobit univerzální vakcíny.

Cílem mé práce bylo prokázat protinádorový účinek neutrofilů na nádorové buňky s navázaným fMLF-DOPE a *in vitro* pokusy přispět k experimentu Janotové et al. (2014), ve kterém je rozebírána funkce tohoto ligandu na myších modelech. Z výsledků vyplývá, že vazba fMLF-DOPE na nádorové buňky, zvýšila cytotoxickou aktivitu neutrofilních granulocytů a tím snížila počet nádorových buněk. Funkčnost agonistů fagocytárních receptorů byla prokázána i ve studii Janotové et al. (Janotová et al., 2014). V tomto pokusu byly agonisté testováni s LPS *in vivo*. Díky tomu, že LPS je agonistou TLR receptorů, docházelo k masivní zánětlivé reakci u nádorů. Efekt tohoto buněčného infiltrátu byl veden přímo k buňkám nesoucím agonisty fagocytárních receptorů na svém povrchu. V této sérii experimentů, působil ukotvený fMLF spolu s LPS silnou redukci nádorového růstu, zatímco fMLF, který nebyl ukotven neměl v tomto experimentu žádný efekt. Důvodem, proč v mém experimentu měly neutrofilové vyšší cytotoxický efekt po přidání volného ligandu, by mohlo být to, že pokusy *in vitro* mohou pouze částečně simulovat prostředí *in vivo*. Jednotlivé složky imunity spolu reagují a vzájemně se ovlivňují a tím vytvářejí účinný obranný efekt. Avšak dosažení těchto buněčných synergií je v pokusech *in vitro* téměř nemožné. Navíc jsme při testování *in vitro* zjistili, že samotný fMLF ligand zřejmě působil toxicky na nádorové buňky. Došli jsme k závěru, že vyhodnocení cytotoxického efektu neutrofilů pomocí uvolnění radioaktivního chromu, není vhodná metoda, zatímco cytotoxický test ZivaTM Tox byl vhodným testem pro detekci cytotoxicity. Je to způsobeno tím, že tyto dvě metody pracují absolutně odlišně. Zatímco ZivaTM Tox stanovuje inhibici replikace buněčné DNA, test pomocí ⁵¹Cr měří uvolnění chromu navázaného na proteinech cytoplazmy. Kromě toho se procento cytotoxicity pohybovalo výrazně pod 10 % a někdy dosahovalo i záporných hodnot. Tyto velmi nízké hodnoty jsou zatíženy velkou chybou.

6 Závěr

- Fagocytární ligand fMLF-DOPE, který byl navázán na povrch nádorových buněk stimuloval neutrofilní granulocyty k cytotoxickému efektu na nádorové buňky.
- Samotný ligand měl zřejmě toxické účinky na nádorové buňky, vzhledem k tomu, že snižoval replikaci jejich DNA i bez přítomnosti neutrofilních granulocytů.
- Vhodný test pro stanovení cytotoxické aktivity v *in vitro* pokusech se zdá být ZivaTM TOX Ultrasensitive Cytotoxicity Assay, zatímco cytotoxický test založený na uvolňování radioaktivního chromu z cílových buněk se je pro měření cytotoxicity neutrofilů nevhodný.

7 Seznam použité literatury

- Ai, S., Cheng, X. W., Inoue, A., Nakamura, K., Okumura, K., Iguchi, A., & Kuzuya, M. (2007). Angiogenic activity of bFGF and VEGF suppressed by proteolytic cleavage by neutrophil elastase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 395-401.
- Alber, G., Kent, U. M., & Metzger, H. (1992). Functional comparison of Fc epsilon RI, Fc gamma RII, and Fc gamma RIII in mast cells. *The Journal of Immunology*, 149, 2428-2436.
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., & Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66, 1-9.
- Altaner, Č. Jak vznikají nádory. *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*, 1.st ed.; Radix, spol. s.r.o: Praha, 2008; Chapter 2., pp 11–15.
- Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 32-41.
- Anton, P. A., Targan, S. R., & Shanahan, F. (1989). Increased neutrophil receptors for and response to the proinflammatory bacterial peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 97, 20-28.
- Arase, H., Arase, N., & Saito, T. (1996). Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1. 1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 2391-2396.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
- Bao, L., Gerard, N. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., & Gerard, C. (1992). Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. *Genomics*, 13, 437-440.
- Becker, E. L., Forouhar, F. A., Grunnet, M. L., Boulay, F., Tardif, M., Bormann, B. J., & Murphy, P. M. (1998). Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell and Tissue Research*, 292, 129-135.

- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*, 235-238.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, *17*, 189-220.
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*, S33-S40.
- Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., & Vignais, P. (1990). Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *168*, 1103-1109.
- Bozinovski, S., Anthony, D., Anderson, G. P., Irving, L. B., Levy, B. D., & Vlahos, R. (2013). Treating neutrophilic inflammation in COPD by targeting ALX/FPR2 resolution pathways. *Pharmacology & Therapeutics*, *140*, 280-289.
- Bristol, J. A., Zhu, M., Ji, H., Mina, M., Xie, Y., Clarke, L., & Ennist, D. L. (2003). In vitro and in vivo activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF. *Molecular Therapy*, *7*, 755-764.
- Brown, M. H., Boles, K., Van der Merwe, P. A., Kumar, V., Mathew, P. A., & Barclay, A. N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*, 2083-2090.
- Caruso, R. A., Parisi, A., Quattrocchi, E., Scardigno, M., Branca, G., Parisi, C., & Fedele, F. (2011). Ultrastructural descriptions of heterotypic aggregation between eosinophils and tumor cells in human gastric carcinomas. *Ultrastructural Pathology*, *35*, 145-149.
- Cassatella, M. A. (2006). On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, *79*, 1140-1149.
- Cibula, D.; Petruželka, L. *Onkogynekologie*, 1st ed.; Grada: Praha, 2009.
- Collins, P. D., Marleau, S., Griffiths-Johnson, D. A., Jose, P. J., & Williams, T. J. (1995). Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*, 1169-1174.

- Cooray, S. N., Gobbetti, T., Montero-Melendez, T., McArthur, S., Thompson, D., Clark, A. J. & Perretti, M. (2013). Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 18232-18237.
- Costello, R., O'Callaghan, T., & Sebahoun, G. (2005). [Eosinophils and antitumour response]. *La Revue de Medecine Interne/fondee. par la Societe Nationale Francaise de Medecine Interne*, *26*, 479-484.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*, 860-867.
- Cowland, J. B., & Borregaard, N. (1999). The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *Journal of Leukocyte Biology*, *66*, 989-995.
- Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H., & Allison, J. P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 4275-4280.
- Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, *112*, 935-945.
- Devosse, T., Guillabert, A., D'Haene, N., Berton, A., De Nadai, P., Noel, S., & Parmentier, M. (2009). Formyl peptide receptor-like 2 is expressed and functional in plasmacytoid dendritic cells, tissue-specific macrophage subpopulations, and eosinophils. *The Journal of Immunology*, *182*, 4974-4984.
- Dinapoli, M. R., Calderon, C. L., & Lopez, D. M. (1996). The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*, 1323-1329.
- Dorta, R. G., Landman, G., Kowalski, L. P., Lauris, J. R. P., Latorre, M. R. D. O., & Oliveira, D. T. (2002). Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology*, *41*, 152-157.
- Dorward, D. A., Lucas, C. D., Chapman, G. B., Haslett, C., Dhaliwal, K., & Rossi, A. G. (2015). The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *The American Journal of Pathology*, *185*, 1172-1184

- Dufton, N., & Perretti, M. (2010). Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacology & Therapeutics*, 127, 175-188.
- Dorner, B. G., Smith, H. R., French, A. R., Kim, S., Poursine-Laurent, J., Beckman, D. L., & Yokoyama, W. M. (2004). Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *The Journal of Immunology*, 172, 3119-3131.
- Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A., & Mosser, D. M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 1298-1307.
- El Kebir, D., József, L., Khreiss, T., Pan, W., Petasis, N. A., Serhan, C. N., & Filep, J. G. (2007). Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation. *The Journal of Immunology*, 179, 616-622.
- Erwig, L. P., & Henson, P. M. (2007). Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *The American Journal of Pathology*, 171, 2-8.
- Ferlazzo, G., & Münz, C. (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 172, 1333-1339.
- Fernández-Aceñero, M. J., Galindo-Gallego, M., Sanz, J., & Aljama, A. (2000). Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer*, 88, 1544-1548.
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 3015-3029.
- Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunological Reviews*, 214, 56-72.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16, 183-194.
- Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 79, 247-256.

- Galdiero, M. R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218, 1402-1410.
- Galli, S. J., Zsebo, K. M., & Geissler, E. N. (1993). The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology*, 55, 1-96.
- Galli, S. J., & Lantz, C. S. (1999). Allergy. WE Paul, ed. *Fundamental Immunology*, 1137–1184.
- Galli, S. J., Gordon, J. R., & Wershil, B. K. (1991). Cytokine production by mast cells and basophils. *Current Opinion in Immunology*, 3, 865-873.
- Galli, S. J. (1997). Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 343-347.
- Gao, J. L., Guillabert, A., Hu, J., Le, Y., Urizar, E., Seligman, E., & Migeotte, I. (2007). F2L, a peptide derived from heme-binding protein, chemoattracts mouse neutrophils by specifically activating Fpr2, the low-affinity N-formylpeptide receptor. *The Journal of Immunology*, 178, 1450-1456.
- Gao, J. L., & Murphy, P. M. (1993). Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25395-25401.
- Gao, J. L., Chen, H., Filie, J. D., Kozak, C. A., & Murphy, P. M. (1998). Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics*, 51, 270-276.
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 71-82.
- Giaccone, G., Punt, C. J., Ando, Y., Ruijter, R., Nishi, N., Peters, M., & Pinedo, H. M. (2002). A phase I study of the natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 8, 3702-3709.
- Gleich, G. J., & Loegering, D. A. (1984). Immunobiology of eosinophils. *Annual Review of Immunology*, 2, 429-459.
- Gleich, G. J., & Adolphson, C. R. (1986). The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Advances in Immunology*, 39, 177-253.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3, 23-35.

- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5, 953-964.
- Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *European Journal of Immunology*, 37, S9-S17.
- Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., & Behar, S. M. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity*, 12, 211-221.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 269-279.
- Hayashi, F., Means, T. K., & Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102, 2660-2669.
- He, H. Q., Troksa, E. L., Caltabiano, G., Pardo, L., & Richard, D. Y. (2014). Structural determinants for the interaction of formyl peptide receptor 2 with peptide ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 2295-2306.
- He, H. Q., Liao, D., Wang, Z. G., Wang, Z. L., Zhou, H. C., Wang, M. W., & Richard, D. Y. (2013). Functional characterization of three mouse formyl peptide receptors. *Molecular Pharmacology*, 83, 389-398.
- Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Miller, M. A., Von Kap-Herr, C., Pettenati, M. J. & Cui, Z. (2006). Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 7753-7758.
- Holeček, V. (2010). Oxidační stres u nádorových onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus*, 18, 225-230.
- Huland, E., & Huland, H. (1992). Tumor-associated eosinophilia in interleukin-2-treated patients: evidence of toxic eosinophil degranulation on bladder cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118, 463-467.
- Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., & Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 179, 89-94.

- Chavakis, T., Cines, D. B., Rhee, J. S., Liang, O. D., Schubert, U., Hammes, H. P., & Bdeir, K. (2004). Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (α -defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *The FASEB Journal*, *18*, 1306-1308.
- Chen, X., Qian, Y., & Wu, S. (2014). The warburg effect: Evolving interpretations of an established concept. *Free Radical Biology and Medicine*, *79*, 253-263
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., & Lucas, S. (2001). An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Research*, *61*, 5544-5551.
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology*, *71*, 907-920.
- Jaillon, S., Galdiero, M. R., Del Prete, D., Cassatella, M. A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2013). Neutrophils in innate and adaptive immunity. In *Seminars in Immunopathology*, *35*, 377-394.
- Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review Immunology*. *20*, 197–216.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., & Ženka, J. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PloS One*, *9*, e85222.
- Joyce, S., Woods, A. S., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., De Silva, A. D., Boesteanu, A., & Brutkiewicz, R. R. (1998). Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science*, *279*, 1541-1544.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., & Taniguchi, M. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, *278*, 1626-1629.
- Kehri, J. H., Dukovich, M., Whalen, G., Katz, P., Fauci, A. S., & Greene, W. C. (1988). Novel interleukin 2 (IL-2) receptor appears to mediate IL-2-induced activation of natural killer cells. *Journal of Clinical Investigation*, *81*, 200.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*, 1-14.
- Kirshenbaum, A. S., Goff, J. P., Kessler, S. W., Mican, J. M., Zsebo, K. M., & Metcalfe, D. D. (1992). Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of

- human basophils and mast cells from CD34⁺ pluripotent progenitor cells. *The Journal of Immunology*, *148*, 772-777.
- Kirshenbaum, A. S., Kessler, S. W., Goff, J. P., & Metcalfe, D. D. (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *The Journal of Immunology*, *146*, 1410-1415.
 - Kirshenbaum, A. S., Goff, J. P., Semere, T., Foster, B., Scott, L. M., & Metcalfe, D. D. (1999). Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34⁺, c-kit⁺, and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*, *94*, 2333-2342.
 - Kita, H. (1996). The eosinophil: a cytokine-producing cell?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *97*, 889-892.
 - Kitchen, E., Rossi, A. G., Condliffe, A. M., Haslett, C., & Chilvers, E. R. (1996). Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood*, *88*, 4330-4337.
 - Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *13*, 159-175.
 - Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, *8*, 279-289.
 - Krejsek, J.; Kopecký, O. *Klinická imunologie*, 1st ed.; Nucleus: Praha, 2004.
 - Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., & Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*, 233-240.
 - Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L., & Babcock, G. F. (1983). Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *The Journal of Immunology*, *131*, 1789-1796.
 - Lanier, L. L., Chang, C., & Phillips, J. H. (1994). Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *153*, 2417-2428.
 - Lanier, L., Chang, Ch., Azuma, M., Ruitenberg, J. J., Hemperly, J. J., & Phillips, J. H. (1991). Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated

- neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *The Journal of Immunology*, *146*, 4421-4426.
- Le, Y., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, *23*, 541-548.
 - Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*, *3*, 361-370.
 - Li, Y., Cai, L., Wang, H., Wu, P., Gu, W., Chen, Y., & Ye, D. (2011). Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*, *30*, 3887-3899.
 - Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L., & Mittler, R. S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, *4*, 535-543.
 - Lion, E., Smits, E. L., Berneman, Z. N., & Van Tendeloo, V. F. (2012). NK cells: key to success of DC-based cancer vaccines?. *The oncologist*, *17*, 1256-1270.
 - Luna-Moré, S., Florez, P., Ayala, A., Diaz, F., & Santos, A. (1997). Neutral and acid mucins and eosinophil and argyrophil crystalloids in carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. *Pathology-Research and Practice*, *193*, 291-298.
 - MacKenzie, J. R., Mattes, J., Dent, L. A., & Foster, P. S. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4+ Th2 lymphocyte function. *The Journal of Immunology*, *167*, 3146-3155.
 - Mackaness, G. B. (1977). Cellular immunity and the parasite. In *Immunity to Blood Parasites of Animals and Man*, *93*, 65-73.
 - MacKenzie, J. R., Mattes, J., Dent, L. A., & Foster, P. S. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4+ Th2 lymphocyte function. *The Journal of Immunology*, *167*, 3146-3155.
 - Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, *23*, 344-346.
 - Mantovani, A. (2009). The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*, *16*, 173-174.
 - Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, *11*, 519-531.

- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*, 436-444.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, *23*, 549-555.
- Marone G. (2000). Human Eosinophils: Biological and clinical aspects. *Chemical Immunology*, *76*, 134-155.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, *388*, 394-397.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, *296*, 298-300.
- Mekori, Y. A., Oh, C. K., & Metcalfe, D. D. (1993). IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. *The Journal of Immunology*, *151*, 3775-3784.
- Mekori, Y. A., & Metcalfe, D. D. (2000). Mast cells in innate immunity. *Immunological Reviews*, *173*, 131-140.
- Metcalfe, D. D., Baram, D., & Mekori, Y. A. (1997). Mast cells. *Physiological Reviews*, *77*, 1033-1079.
- Mier, J. W., Vachino, G., van der Meer, J. W., Numerof, R. P., Adams, S., Cannon, J. G., & Dinarello, C. A. (1988). Induction of circulating tumor necrosis factor (TNF α) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Journal of clinical immunology*, *8*, 426-436.
- Mori, S., Jewett, A., Murakami-Mori, K., Cavalcanti, M., & Bonavida, B. (1997). The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *44*, 282-290.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*, 958-969.
- Murphy, P. M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annual Review of Immunology*, *12*, 593-633.
- Murphy, P. M. (1997, October). Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Seminars in Hematology*, *34*, 311-318.

- Nakajima, H., Cella, M., Langen, H., Friedlein, A., & Colonna, M. (1999). Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *European Journal of Immunology*, *29*, 1676-1683.
- Nathan C. Metchnikoff's legacy in 2008. *Nature Immunology*, *9*, 695–698.
- Nourshargh, S., Hordijk, P. L., & Sixt, M. (2010). Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*, 366-378.
- O'Flaherty, J. T., Rossi, A. G., Redman, J. F., & Jacobson, D. P. (1991). Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of receptors for formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B4, and platelet-activating factor. Dissociation from priming in human polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of Immunology*, *147*, 3842-3847.
- Ojo, E., & Wigzell, H. (1978). Natural Killer Cells may be the Only Cells in Normal Mouse Lymphoid Cell Populations Endowed with Cytolytic Ability for Antibody-Coated Tumour Target Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, *7*, 297-306.
- Old, L. J., & Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *The Journal of Experimental Medicine*, *187*, 1163-1167.
- O'Shea, J. J., & Murray, P. J. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, *28*, 477-487.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*, 252-264.
- Passlick, B., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, *74*, 2527-2534.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., & Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *190*, 1505-1516.
- Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N. L., Faust, J., Rumpold, H. & Lanier, L. L. (1984). The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology*, *133*, 180-189.

- Perussia, B. (1996). The cytokine profile of resting and activated NK cells. *Methods*, 9, 370-378.
- Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., & Schreiber, H. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 5140-5144.
- Pretlow, T. P., Keith, E. F., Cryar, A. K., Bartolucci, A. A., Pitts, A. M., Pretlow, T. G., & Boohaker, E. A. (1983). Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer Research*, 43, 2997-3000.
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141, 39-51.
- Quezada, S. A., Peggs, K. S., Curran, M. A., & Allison, J. P. (2006). CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 1935.
- Richard, D. Y., Boulay, F., Wang, J. M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., & Murphy, P. M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological Reviews*, 61, 119-161.
- Rivière, S., Challet, L., Fluegge, D., Spehr, M., & Rodriguez, I. (2009). Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature*, 459, 574-577.
- Rodewald, H. R., Dessing, M., Dvorak, A. M., & Galli, S. J. (1996). Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*, 271, 818-822.
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. *Immunology*, 24, 147.
- Rowdo, F. P. M., Baron, A., Urrutia, M., & Mordoh, J. (2015). Immunotherapy in Cancer: A Combat between Tumors and the Immune System; You Win Some, You Lose Some. *Frontiers in Immunology*, 6.
- Scapini, P., Nesi, L., Morini, M., Tanghetti, E., Belleri, M., Noonan, D., & Cassatella, M. A. (2002). Generation of biologically active angiostatin kringle 1–3 by activated human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 168, 5798-5804.
- Scapini, P., Morini, M., Tecchio, C., Minghelli, S., Di Carlo, E., Tanghetti, E., & Cassatella, M. A. (2004). CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced

angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *The Journal of Immunology*, 172, 5034-5040.

- Selby, M. J., Engelhardt, J. J., Quigley, M., Henning, K. A., Chen, T., Srinivasan, M., & Korman, A. J. (2013). Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunology Research*, 1, 32-42.
- Sengelov, H., Boulay, F., Kjeldsen, L., & Borregaard, N. (1994). Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochemical Journal*, 299, 473-479.
- Shi, H. Z. (2004). Eosinophils function as antigen-presenting cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 76, 520-527.
- Shi, H. Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z., & Weller, P. F. (2000). Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 945.
- Schaefer, J. T., Patterson, J. W., Deacon, D. H., Smolkin, M. E., Petroni, G. R., Jackson, E. M., & Slingsluff Jr, C. L. (2010). Dynamic changes in cellular infiltrates with repeated cutaneous vaccination: a histologic and immunophenotypic analysis. *J Transl Med*, 8, 79.
- Schatzle, J. D., Sheu, S., Stepp, S. E., Mathew, P. A., Bennett, M., & Kumar, V. (1999). Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 3870-3875.
- Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J., & Tachado, S. D. (1999). CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science*, 283, 225-229.
- Sica, A., Saccani, A., & Mantovani, A. (2002). Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *International Immunopharmacology*, 2, 1045-1054.
- Simon, H. U., Plötz, S., Simon, D., Seitzer, U., Braathen, L. R., Menz, G., & Levi-Schaffer, F. (2003). Interleukin-2 primes eosinophil degranulation in hypereosinophilia and Wells' syndrome. *European Journal of Immunology*, 33, 834-839.

- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C & Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 1129-1136.
- Slaninová, V.; Krejčí, A. (2013), Cancer cells and changes in their metabolism: a way to survive and a tool for destruction. *Živa*, 5, 202–205.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 192, 755-760.
- Smyth, M. J., & Godfrey, D. I. (2000). NKT cells and tumor immunity - a double-edged sword. *Natural Immunology*, 1, 459-460.
- Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., & Dranoff, G. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 13141-13146.
- Sosman, J. A., Bartemes, K., Offord, K. P., Kita, H., Fisher, S. G., Kefer, C., & Gleich, G. J. (1995). Evidence for eosinophil activation in cancer patients receiving recombinant interleukin-4: effects of interleukin-4 alone and following interleukin-2 administration. *Clinical Cancer Research*, 1, 805-812.
- Stockley, R. A., Grant, R. A., Llewellyn-Jones, C. G., Hill, S. L., & Burnett, D. (1994). Neutrophil formyl-peptide receptors. Relationship to peptide-induced responses and emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149, 464-468.
- Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M., & Mosser, D. M. (2007). Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 82, 244-252.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., & Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7, 94-100.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249, 158-175

- Tecchio, C., Scapini, P., Pizzolo, G., & Cassatella, M. A. (2013). On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. In *Seminars in Cancer Biology*, 23,159-170.
- Tennenberg, S. D., & Solomkin, J. S. (1988). Neutrophil activation in sepsis: the relationship between fmet-leu-phe receptor mobilization and oxidative activity. *Archives of Surgery*, 123, 171-175.
- Tepper, R. I., Coffman, R. L., & Leder, P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*, 257, 548-551.
- Tiffany, H. L., Gao, J. L., Roffe, E., Sechler, J. M., & Murphy, P. M. (2011). Characterization of Fpr-rs8, an atypical member of the mouse formyl peptide receptor gene family. *Journal of Innate Immunity*, 3, 519.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R., & Melief, C. J. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 189, 753-756.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, 160, 1-40.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24, 179-189.
- Voskoboinik, I., Smyth, M. J., & Trapani, J. A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 6, 940-952.
- Waitz, R., Solomon, S. B., Petre, E. N., Trumble, A. E., Fassò, M., Norton, L., & Allison, J. P. (2012). Potent Induction of Tumor Immunity by Combining Tumor Cryoablation with Anti-CTLA-4 Therapy. *Cancer research*, 72, 430-439.
- Wang, W., Li, T., Wang, X., Yuan, W., Cheng, Y., Zhang, H., & Han, W. (2014). FAM19A4 is a novel cytokine ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) and is able to promote the migration and phagocytosis of macrophages. *Cellular & Molecular Immunology*.
- Wan, M., Godson, C., Guiry, P. J., Agerberth, B., & Haeggström, J. Z. (2011). Leukotriene B4/antimicrobial peptide LL-37 proinflammatory circuits are mediated by BLT1 and FPR2/ALX and are counterregulated by lipoxin A4 and resolvin E1. *The FASEB Journal*, 25, 1697-1705.

- Weller, P. F. (1994). Eosinophils: structure and functions. *Current Opinion in Immunology*, 6, 85-90.
- West, W. H., Cannon, G. B., Kay, H. D., Bonnard, G. D., & Herberman, R. B. (1977). Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *The Journal of Immunology*, 118, 355-361.
- Wu, J., & Lanier, L. L. (2003). Natural killer cells and cancer. *Advances in Cancer Research*, 90, 127-156.
- Yang, Y. H., Morand, E., & Leech, M. (2013). Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA. *Nature Reviews Rheumatology*, 9, 595-603.
- Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., & Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *The Journal of Experimental Medicine*, 209, 1201-1217.
- Yoshimoto, T., & Paul, W. E. (1994). CD4pos, NK1. 1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *The Journal of Experimental Medicine*, 179, 1285-1295.
- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 2375–2380.
- Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L *et al.* (2007). NK cells and cancer. *Journal of Immunology*, 178, 4011–4016.
- Zou, W., & Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 8, 467-477.