

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Elektronově mikroskopická analýza dějů probíhajících při
imunoterapii nádorových onemocnění založené na použití TLR
agonistů a ligandů fagocytárních receptorů**

Bakalářská práce

Pavla Nedbalová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Nedbalová, P., 2015: Elektronově mikroskopická analýza dějů probíhajících při imunoterapii nádorových onemocnění založené na použití TLR agonistů a ligandů fagocytárních receptorů. [Electron microscopic analysis of processes in progress during cancer immunotherapy based on use of TLR agonists and the ligands of phagocytic receptors. Bc. Thesis, in Czech.] - 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The ligands of phagocytic receptors anchored in the membrane of tumour cells in combination with TLR agonists cause strong neutrophils infiltration within the tumour. These neutrophils are able to direct tumour cell lysis. Ultrastructure analysis of tumour with aim to determine mechanisms of tumour cell damage by neutrophils was performed with transmission electron microscope.

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 22. dubna 2015

.....
Pavla Nedbalová

Děkuji svému školiteli, RNDr. Janu Ženkovi, CSc., za vedení této bakalářské práce, cenné rady a diskuze a za jeho neutuchající a nakažlivé nadšení pro věc. Dále pak děkuji celému kolektivu Laboratoře Elektronové Mikroskopie za vytvoření příjemného pracovního prostředí, pomoc a cenné rady, zvláště pak děkuji paní RNDr. Marii Vancové, Ph.D., za konzultace k pořízeným snímkům a další cenné informace týkající se elektronové mikroskopie a buněčné ultrastruktury obecně a paní Mgr. Martině Tesařové za vedení, pomoc a trpělivost během přípravy vzorků pro mikroskopování. Mé díky patří také rodičům, za finanční a morální podporu a mému partnerovi, jehož morální podporu a nekonečnou trpělivost nelze opomenout.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Nádorové bujení	1
1.1.1 Příčiny vzniku nádorového bujení	1
1.1.2 Biologické vlastnosti nádorů	2
1.1.3 Maligní melanom	3
1.1.3.1 Melanom B16-F10	4
1.2 Nádorová terapie	5
1.2.1 Chirurgický zákrok	5
1.2.2 Chemoterapie	5
1.2.3 Radioterapie	5
1.2.4 Imunoterapie	6
1.3 Imunitní systém	7
1.3.1 Nespecifická (vrozená) imunita	7
1.3.1.1 PRRs (Pattern-Recognition Receptors)	8
1.3.1.1.1 Membránové PRRs	8
1.3.1.1.2 Cytoplazmatické PRRs	10
1.3.1.1.3 Sekretované PRRs	10
1.3.1.2 Neutrofily	11
1.3.2 Specifická (získaná) imunita	13
1.4 Imunologický dohled	14
1.4.1 Eliminace nádorových buněk	14
1.4.2 Mechanismy úniku nádorových buněk	15
1.5 Buněčná ultrastruktura	16
1.5.1 Neutrofily	16
1.5.2 Nádorové buňky	18
1.5.3 Buněčná smrt a s ní spojené změny buněčné ultrastruktury	18
1.5.3.1 Nekróza	18
1.5.3.2 Apoptóza	19
2 Cíle práce	21
3 Materiál a metody	22
3.1 Chemikálie	22

3.2	Laboratorní myši	22
3.3	Buněčná linie.....	22
3.4	Příprava buněk B16-F10 pro transplantaci.....	23
3.5	Transplantace buněk B16-F10	23
3.6	Měření velikosti nádorů	23
3.7	Příprava roztoků pro terapii.....	23
3.7.1	Příprava f-MLFKK-BAM	23
3.7.2	Příprava H-MLFKK-BAM.....	24
3.8	Příprava preparátů pro TEM	24
3.8.1	Excize vzorku	24
3.8.2	Fixace, odvodnění a zalití do pryskyřice	24
3.8.3	Krájení polotenkých řezů, barvení a pozorování řezů pod mikroskopem.....	25
3.8.4	Krájení ultratenkých řezů	26
3.8.5	Kontrastování ultratenkých řezů.....	26
3.8.6	Mikroskopování a fotodokumentace	26
3.9	Pokus: Ultrastrukturální analýza melanomu po intratumorální aplikaci f-MLFKK-BAM, LPS a jejich směsi	27
4	Výsledky.....	28
4.1	Vzorky odebrané po 6 hodinách.....	28
4.2	Vzorky odebrané po 12 hodinách.....	29
4.3	Vzorky odebrané po 24 hodinách.....	32
4.4	Shrnutí vlivu použitých roztoků na mikroprostředí melanomu B16-F10	35
4.5	Další jevy pozorované při ultrastrukturální analýze melanomu B16-F10	36
5	Diskuze.....	37
6	Závěr	40
7	Seznam použité literatury	41

1 Úvod

Dosavadní výsledky naší laboratoře, stran použití agonistů TLR receptorů v kombinaci s ligandy fagocytárních receptorů v léčbě maligního melanomu, nejen potvrzují úlohu agonistů TLR receptorů v nádorové terapii, ale zároveň i poukazují na synergii jejich použití v kombinaci právě s ligandy fagocytárních receptorů (Vachelli a kol., 2012; Janotová a kol., 2014).

Cílem práce několika posledních měsíců bylo nalézt vhodnou náhradu za doposud používaný Lipopolysacharid (LPS), jehož aplikace u lidí je, z důvodů vyvolání septického šoku, vyloučená (Ziegler a kol., 1991) a také určit mechanismy působení neutrofilů na nádorové buňky, jelikož během prvních 48 hodin po aplikaci terapeutických látek byl zaznamenán mohutný granulocytární infiltrát spojený s rozsáhlou nekrotizací nádoru (Kovářová, 2013; Sváčková, 2013; Divoká, 2014).

Terapeutickému využití směsi kotveného f-MLF v kombinaci s LPS se ve svých pracích věnovaly Čunátová (2012), Caisová (2013) a Vácová (2013). Tato bakalářská práce se věnuje problematice úlohy neutrofilů v nádoru po i.t. aplikaci směsi f-MLFKK-BAM s LPS.

1.1 Nádorové bujení

Buněčná proliferace je esenciální pro embryogenezi, růst organismu i správnou funkci některých tkání dospělého organismu, problémem je proliferace nekontrolovaná, která následně vyústí v rakovinu. Rakovina je heterogenní skupinou onemocnění, pro která je společným rysem nekontrolovaný růst a šíření nádorových buněk v organismu. Nádorové transformaci buňky předchází sled mutací vedoucích k takové modifikaci genomu, jejímž výsledkem je neoplastická buňka a následná klonální proliferace takové buňky je počátkem nádoru. (Weinberg, 1989)

1.1.1 Příčiny vzniku nádorového bujení

Klíčové pro vznik nádorového bujení jsou mutace tzv. protoonkogenů (Noguchi a kol., 1990; Lu a kol., 2005) a tumorsupresorových genů (Harvey a kol., 1995), jejichž

produkty se uplatňují v průběhu buněčného cyklu, buněčné proliferace a diferenciaci. Mezi protoonkogeny řadíme např. geny pro růstové faktory (např. VEGF) a jejich receptory a geny kódující transkripční faktory (např. *myc*). Mutací protoonkogenu vzniká onkogen, jehož produkt má pozitivní vliv na průběh nádorového bujení. Tumorsupresorové geny (antionkogeny) kódují proteiny mající na buněčný cyklus tlumící účinek (např. *Rb*, *p53*), jsou schopné pozastavit průběh buněčného cyklu a dát tak prostor pro reparaci poškozené DNA, popř. iniciují apoptózu. (Weinberg, 1989) Mutace tumorsupresorových genů mohou také souviset s resistencí nádoru k podávané léčbě (Wattel a kol., 1994).

Kancerogeny jsou mutageny vyvolávající právě takové mutace, které vedou k nádorovému bujení. UV a ionizující záření DNA poškozují přímo, ale i nepřímo tvorbou kyslíkových radikálů. Z chemických látek poškozujících DNA můžeme kromě kyslíkových radikálů jmenovat např. formaldehyd, EMS (etyl metansulfonát), aflatoxin B₁ ad. (Popescu a kol., 1986).

Významným faktorem pro vznik rakoviny je chronický zánět (Lowenfels a kol., 1993; Bernstein a kol., 2001). Dlouhodobá iritace tkáně v důsledku zánětu a její neustálá obnova zvyšují pravděpodobnost vzniku mutací. Podíl na vzniku určitých typů rakoviny mají i některé hormony. Známy je vztah estrogenů a rakoviny prsu (Chlebowski a kol., 2003). Jsou známy i onkogenní viry, např. HCV (*hepatitis C virus*), HBV (*hepatitis B virus*) způsobující hepatocelulární karcinom (Donato a kol., 2002) a HPV (*human papilloma virus*) způsobující cervikální karcinom (Clifford a kol., 2003).

Snadno dosažitelnou prevencí vzniku rakoviny je zdravý životní styl, díky kterému se člověk vyvaruje vystavení mnoha kancerogenům (látky obsažené v cigaretovém kouři, alkohol, nitrosaminy) a zároveň posílí svoji obranyschopnost (Danaei a kol., 2005).

1.1.2 Biologické vlastnosti nádorů

Na základně biologických vlastností rozlišujeme nádory benigní a nádory maligní. Benigní nádory bývají ohraničené od okolí, spíše pravidelného kulovitého či ovoidního tvaru. Rostou relativně pomalu a expanzivně, tj. okolní tkáň vytlačují. Tlak na okolní tkáň ovšem může způsobovat bolest a krvácení. Některé benigní nádory (např. střevní polypy, pigmentové névy) bývají předstupněm nádorů maligních. Maligní nádory je často těžké v celém rozsahu přesně odlišit od napadené tkáně, nejsou tedy ostře ohraničené a rostou invazivně, okolní tkáň pronikají (Coman, 1946). Jejich růst je rychlý a dochází k

metastazování, některé z nádorových buněk jsou schopné se šířit krevní či lymfatickou cestou a jinde v těle založit nová, sekundární nádorová ložiska, metastázy (Greene a Harvey, 1964).

1.1.3 Maligní melanom

Pigment melanin, vytvářený v kůži, je důležitou ochrannou buněk proti UV záření tím, že toto záření pohlcuje. Za tvorbu melaninu jsou zodpovědné melanocyty vyskytující se v bazální vrstvě pokožky. Výběžky melanocytů slouží jako propojení s keratinocyty, do kterých je melanin, nahromaděný v melanosomech, transportován. Melanocyt a s ním propojené keratinocyty tvoří tzv. melaninovou jednotku. Melanocyty mají původ v buňkách neurální trubice a kromě kůže a vlasových folikulů se také vyskytují v živnatce oka, vnitřním uchu a měkkých plenách mozkových (Yaar a Gilchrest, 1991; Bessou-Touya a kol., 1998).

Klíčovým enzymem pro tvorbu melaninu je tyrozináza (tyrozinhydroxyláza) uplatňující se v prvních dvou krocích syntézy, kdy dochází nejprve k přeměně tyrozinu na DOPA (dihydroxyfenylalanin) a jeho následné oxidaci na DOPA-chinon. Poté se proces biosyntézy melaninu rozděluje a po sledu několika dalších reakcí vznikají *eumelaniny*, *feomelaniny* a *trichromy*, 3 typy melaninu vyskytující se v lidské kůži (Hearing a Ekel, 1976).

Odlišná barva kůže mezi lidskými rasami vychází s odlišného množství, velikosti a tvaru melanosomů v keratinocytech. Množství melanocytů se mezi jednotlivými rasami zásadně neliší (Bessou-Touya a kol., 1998).

Neoplastickou transformací a proliferací melanocytů v kůži vzniká maligní melanom, velmi agresivní forma rakoviny s častým metastazováním už v počátcích nádorového růstu. Incidence maligního melanomu stabilně vzrůstá. Výskyt se mezi ženami a muži výrazně neliší, ale v rámci rasového rozlišení postihuje především bělochy. Nejvíce zasažení jsou obyvatelé Austrálie, poté následují Střední Evropa a Severní Amerika (Rigel a Carruci, 2000).

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem vedoucím ke vzniku maligního melanomu je UV záření. Nebezpečí představuje časté, intenzivní spálení kůže od slunce především u jedinců fototypu I, pro ty je charakteristická světlá pleť (často s pihami), světlé blond či rezavé vlasy, modré nebo zelené oči, tito lidé se na slunci vždy spálí. Mezi rizikové faktory vzniku maligního melanomu patří také genetické predispozice. Dědičná může být snižena

odolnost kůže vůči vnějším vlivům a častější výskyt dysplastických névů (Garbe a kol., 1994). S maligním melanomem jsou také spojeny mutace chromozomu 9, delece místa kódujícího významné regulační proteiny buněčného cyklu (Puig a kol., 1995) a dále např. BRAF mutace (Patton a kol., 2005). Zvýšené riziko pro vznik melanomu také představuje imunosuprese (imunosupresiva, chronické onemocnění).

Při klinickém vyšetření se lékař řídí tzv. ABCDE pravidly (*Asymmetry, Border, Colour, Diameter, Elevation*), hlubší vyšetření poskytuje dermatoskopie, umožňující detailnější pohled nejen na povrch podezřelé léze, ale i do jejích hlubších vrstev. Konečná diagnóza je stanovována histopatologickým vyšetřením spojeným s imunohistochemií, přičemž se preferuje totální excize léze před pouze částečnou biopsií, kdy se zvyšuje riziko nežádoucího uvolnění maligních buněk do krevního či lymfatického oběhu. Bývá také prováděno vyšetření spádové uzliny (Rigel a kol., 2000).

Jsou rozlišovány čtyři typy maligního melanomu, které se liší typickými oblastmi výskytu, charakterem a rychlostí růstu, zbarvením, prognózou ad. (McGovern a kol., 1973). Prognózu obecně ovlivňuje plocha a hloubka primárního nádoru a také ulcerace, v případě výskytu metastáz jejich nálezy v regionálních uzlinách či vzdálená sekundární ložiska (Balch a kol., 2009).

Prvním krokem léčby je excize primárního nádoru včetně ochranného lemu (určovaný individuálně podle tloušťky nádoru), popř. i odstranění spádové nebo regionálních uzlin (Rigel a kol., 2000). Po chirurgickém zákroku následuje u rozvinutých forem melanomu adjuvantní léčba. Úspěchy zaznamenává léčba interferonem- α 2b, s ní spojené nežádoucí účinky jsou např. únava, cytopenie a zvýšení jaterních enzymů (Kirkwood a kol., 2001).

1.1.3.1 Melanom B16-F10

Čtyři buněčné linie myšího melanomu B16, a to F0, F1, F10 a BL6 byly získány ze syngenního myšího kmene C57BL/6. Tyto buněčné linie se liší především schopností metastazovat, kdy linie F0 a F1 mají nízký potenciál metastazovat, zatímco linie F10 a BL/6 jsou označovány jako silně metastazující. Melanom B16-F10 je dnes hojně využíván pro studium a vývoj různých typů nádorové terapie (Taniguchi a kol., 1986; Smyth a kol., 2000).

1.2 Nádorová terapie

Zásadním cílem při vývoji a zdokonalování jakéhokoli typu nádorové terapie je co největší zacílení na nádor s co nejvyšší účinností jeho odstranění a vyléčení pacienta a zároveň co nejmenší zásah zdravé tkáně a minimalizace vedlejších účinků.

Různé typy nádorových terapií bývají často kombinovány.

1.2.1 Chirurgický zákrok

Počátkem nádorové terapie je snaha tumor z těla chirurgicky odstranit. Problém nastává v případech, že je nádor příliš velký nebo je pro chirurga těžko přístupný. Dále je třeba nezapomínat na možné metastázy, proto bývá po chirurgickém zákroku zařazena např. radioterapie či chemoterapie, ty mohou být také využity pro zmenšení nádoru před samotným odstraněním. (Brada a kol., 1992)

1.2.2 Chemoterapie

Chemoterapie je založena na podávání (intravenózní, orální) cytotoxických léků (cytostatik) pacientům s cílem nádor zcela zničit, popř. alespoň zmenšit a zmírnit symptomy s nemocí spojené. Cílem těchto léků jsou buněčné složky nezbytné pro proliferaci, růst a přežití buňky. Cytostatika lze rozdělit do skupin na základě jejich působení např. alkylační látky (*cyklofosamid*, *mitomicin C*), antimetabolity (*merkaptopurin*, *fluorouracil*), inhibitory topoizomerázy (*etoposid*, *aktinomycin D*) ad. Účinné látky bývají často podávány kombinovaně, čímž se snižuje pravděpodobnost, že si nádorové buňky vůči těmto látkám vyvinou resistenci (Nygren, 2001).

1.2.3 Radioterapie

Následkem rozvoje zobrazovacích technologií i techniky využívané pro samotné ozařování dochází k prudkému rozvoji radioterapie. Ta využívá degradace DNA rakovinných buněk vysokými dávkami energie v důsledku ozáření. Původní radioterapie využívá ionizující záření (proud fotonů, elektronů, neutronů). Dnes existuje i tzv. hadronová

terapie využívající ozáření protony nebo lehkými ionty. Ozáření poškozuje DNA buď přímo, nebo nepřímo iniciací tvorby volných radikálů. Mezi moderní typy radioterapie patří např. FSRT (*Fractionated Stereotactic Radiation Therapy*) a IMRT (*Intensity-modulated Radiation Therapy*), ty mohou být kombinovány i s hadronovou terapií (např. uhlíkové ionty) (Schulz-Ertner a kol., 2005; Baskar a kol., 2012).

1.2.4 Imunoterapie

Základní myšlenkou imunoterapie je taková stimulace imunitního systému organismu postiženého nádorovým onemocněním, aby byly efektorové složky imunity schopné nádor eliminovat s následným kompletním vyléčením.

Vývoji imunoterapie nádorových onemocnění napomáhá hlubší pronikání do mechanismů působení buněčných i humorálních složek vrozené i získané imunity. Přirozená reakce imunitního systému organismu na neoplastické buňky v těle je dnes popisována hypotézou imunologického dohledu (Kim a kol., 2007).

Jednou ze složek imunity využívané v imunoterapii jsou dendritické buňky (DCs). Řadí se do skupiny antigen-prezentujících buněk a právě prezentací antigenu CD8⁺ T-lymfocytům vedou ke vzniku CTL (*cytotoxic T-lymphocytes*), které následně infiltrují nádor a jsou schopné nádorové buňky rozpoznat a eliminovat. Z kultur monocytů či CD34⁺ HPCs (*hematopoietic progenitor cells*) odebraných pacientovi jsou ve velkém množství získávány DCs, jež jsou následně inkubovány společně s daným nádorovým antigenem. Konečným produktem je DCs vakcína, která je podána pacientovi (Banchereau a kol., 2001).

Vývoj hybridomové technologie umožnil tvorbu monoklonálních protilátek (MAbs) proti specifickým antigenům v takovém množství, že bylo možné uvažovat jejich využití v klinické praxi (Nadler a kol., 1980). Po aplikaci myších MAbs však docházelo v těle pacienta k tvorbě protilátek proti podaným MAbs a ty byly rychle eliminovány. Pokroky v molekulární biologii a genetickém inženýrství vedly k řešení toho problému tvorbou chimérických, humanizovaných i lidských MAbs. Rituximab, chimérická MAbs proti CD20 markeru B-lymfocytů, je využíván v léčbě hematologických malignit (např. B-lymfomy, NHL, B-CLL) (Coiffier a kol., 1998). Trastuzumab, humanizovaná MAbs proti HER2 (*human epidermal receptor 2*), je využíván v léčbě karcinomu prsu (Slamon a kol., 2011).

Uplatnění v imunoterapii nádorových onemocnění našly i cytokiny. Interleukin-2 je aplikován převážně v léčbě maligního melanomu a karcinomu ledvin, dalším využívaným

cytokinem je interferon- α . Podávání cytokinů je však spojeno s řadou nežádoucích účinků (Rosenberg a kol., 1989; Negrier a kol., 1998).

1.3 Imunitní systém

Imunitní systém se podílí na udržování homeostázy organismu jeho schopností rozpoznat a eliminovat cizorodá agens a poškozené, popř. jinak pozměněné buňky. Imunitu rozdělujeme do dvou základních složek, imunitu vrozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou), přičemž jsou obě tyto složky vzájemně propojené mnoha různými mechanismy, jako jsou cytokiny nebo různé buněčné receptory a spolupracují (Cella a kol., 1996; Pooley a kol., 2001; Akira a kol., 2006).

1.3.1 Nespecifická (vrozená) imunita

Vrozená imunita je první obrannou linií organismu proti patogenům. Mechanismy obrany jsou anatomické a fyziologické bariéry, např. kůže a mukóza, které nefungují jen jako pasivní bariéry, ale v reakci na poškození produkují antimikrobiální polypeptidy (AMPs), a to i v případě sterilního poškození, jako prevenci před možným zanesením infekce (Sørensen a kol., 2006).

Komplement, další obranný mechanismus, lze popsat jako enzymatickou kaskádu vedoucí k eliminaci patogenů vytvořením pórů v jejich membráně, dojde tak k narušení osmotické rovnováhy a cytolýze (Ramm a kol., 1982). Některé složky komplementu také fungují jako opsoniny a usnadňují tak fagocytózu.

Fagocytóza, pohlcení patogenů (Brekke a kol., 2007), popř. apoptotických buněk (Mevorach a kol., 1998), je zajišťována tzv. profesionálními fagocyty, makrofágy a mikrofágy (neutrofily).

Makrofágy fungují i jako antigen prezentující buňky. Po zpracování antigenu jej ve spojení s MHC molekulami prezentují T-lymfocytům, což vede k jejich aktivaci (Kovacsovics-Bankowski a kol., 1993). Dalšími antigen-prezentujícími buňkami jsou dendritické buňky (Pooley a kol., 2001). V poslední době byly popsány schopnosti antigenní prezentace i u neutrofilů (Abdallah a kol., 2011).

Efektorovou složkou vrozené imunity jsou také lymfoidní NK (*Natural Killer*) buňky, u nichž byla prokázána cytotoxicita vůči nádorovým a viry-infikovaným buňkám (Trinchieri a Santoli, 1978).

Invadující patogeny nebo poškození tkáně vyvolají zánět, komplexní, regulovanou reakci, která začíná aktivací tkáňových makrofágů a produkcí cytokinů v místě podráždění, následuje infiltrace aktivovanými neutrofily a nakonec eventuálně dochází k zapojení složek získané imunity. Celý proces, vedoucí k degradaci patogenu nebo obnovení poškozené tkáně a obnovení homeostázy, by měl proběhnout co nejrychleji, bez většího podráždění tkáně (Xing a kol., 1998; Barton, 2008).

1.3.1.1 PRRs (Pattern-Recognition Receptors)

Buňky vrozené imunity nesou na svém povrchu PRRs (*pattern-recognitionreceptors*) receptory rozpoznávající tzv. PAMPs (*pathogen-associatedmolecularpatterns*) a DAMPs (*damage-associatedmolecularpatterns*), což následně vede k aktivaci imunitního systému a iniciaci odpovídající imunitní reakce (Akira a kol., 2006). DAMPs jsou molekuly uvolňované nebo exprimované vlastními buňkami organismu jako reakce na jejich poškození (Foell a kol., 2007; Romero a kol., 2011; Ahrens a kol., 2012) naopak PAMPs jsou komponenty mikrobiální, často významné pro přežití mikroorganismu a tudíž vysoce konzervované (Akira a kol., 2006).

Dále uvádím pro příklad několik typů PRRs s jejich stručnou charakteristikou.

1.3.1.1.1 Membránové PRRs

Toll-like receptory (TLRs)

Jejich název je odvozen od *Toll* receptoru *Drosophily*, pomocí něhož je vyvolána imunitní odpověď *Drosophily* na kvasinkové infekce (Lemaitre a kol., 1996). Na základě studií lidského genomu bylo u člověka identifikováno 10 různých TLRs, přičemž určité receptory jsou exprimovány buňkami myeloidní i lymfoidní řady (Muzio a kol., 2000; Hornung a kol., 2002).

TLRs jsou membránové glykoproteiny typu I, jejichž extracelulární a cytoplasmatická část jsou spojeny jednoduchou α -šroubovicí. Extracelulární část, rozpoznávající patogenní struktury, je tvořena LRRs (*leucine-richrepeats*) doménou a má

charakteristickou strukturu "koňské podkovy" (Bell a kol., 2005). Cytoplasmatickou část tvoří TIR (*Toll/IL-1 receptor*) doména, která tvoří také cytoplasmatickou část IL-1 receptoru (Ohnishi a kol., 2009).

Jako první byl u člověka identifikován TLR4, který je znám především jako receptor pro lipopolysacharid (LPS) (Takeuchi a kol., 1999; Takeda a Akira, 2005), komponentu buněčné stěny gram-negativních bakterií, který vyvolává masivní imunitní reakci, která může vést až k septickému šoku (Lamping a kol., 1998).

Manosový receptor

Manosový receptor je součástí membrány makrofágů (Taylor a kol., 1992), dendritických buněk (Tan a kol., 1997) a některých endoteliálních buněk (Magnusson a Berg, 1989). Rozpoznává řadu patogenů vazbou glykoproteinů zakončených manosovými, N-acetylglukosaminovými a fukosovými zbytky (Lennartz a kol., 1987).

Je členem rodiny C-lektinových receptorů. Jde o transmembránový glykoprotein typu I. Jeho extracelulární část je tvořena několika doménami - CR doménou (*cystein-rich domain*), FNII doménou (*fibronectin type II repeats*) a sekvencí osmi po sobě jdoucích Ca²⁺-dependentních (*C-type*) CRDs (*carbohydrate-recognition domains*) (Ezekowitz a kol., 1990), z nichž význam v rozpoznání patogenů, resp. vazebnou aktivitu pro glykoproteiny mají CRD4 - 8 (Taylor a kol., 1992).

Dectin 1

Dectin 1, rozpoznávající β-glukan, je znám především jako fagocytární receptor exprimovaný makrofágy, byl ovšem pozorován i u dendritických buněk, neutrofilů a některých splenocytů (Taylor a kol., 2002).

Jde o další receptor řadící se mezi C-lektiny, transmembránový protein typu II, který je tvořen třemi doménami: extracelulární CRD doménou "stonkem" (*stalk region*) spojenou s transmembránovou doménou a zakončený ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation ITAM-like motif*) doménou (Ariizumi a kol., 2000).

Formyl peptidové receptory (FPRs)

FPRs jsou exprimovány na povrchu fagocytů a jsou zapojené v procesu chemotaxe a fagocytózy. Tyto receptory se uplatňují především při bakteriálních infekcích, jelikož bakterie jsou zdrojem formyl-peptidů (např. fMLF; *formyl-methionyl-leucyl phenylalanine*), které FPRs vážou (Schiffmann a kol., 1975; Fu a kol., 2006).

FPRs patří do třídy s G-proteinem spřažených receptorů (GPCR; *G-protein coupled receptors*). Jejich extracelulární a cytoplasmatická část jsou propojeny sedmi transmembránovými doménami (Quehenberger a kol., 1993).

Komplementový receptor 3 (CR3)

CR3 je membránový receptor makrofágů, neutrofilů a NK buněk. Kromě toho, že funguje jako adhezivní molekula, tak rozpoznává řadu povrchových patogenních molekul a takto primovaný (např. β -glukany) po rozpoznání iC3b opsonizovaných cílových buněk vede u efektorových buněk k iniciaci fagocytózy, resp. cytotoxické reakce (Xia a kol., 1999).

CR3 je heterodimer, tvořený podjednotkou α (CD11) a β_2 (CD18), kde α podjednotka obsahuje A doménu rozpoznávající iC3b a β_2 podjednotka LLD (*lectin-like domain*) doménu rozpoznávající β -glukan (Arnaout, 1990; Xia a kol., 1999).

1.3.1.1.2 Cytoplazmatické PRRs

NOD-like receptory (NLR)

Vazba ligandu u NLRs je zprostředkována LRRs (*leucin-rich repeat*) doménou stejně jako u TLRs, následuje NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) doména a poté efektorová doména, kterou podle typu NLR tvoří jedna nebo více CARD domén (*caspase recruitment domain*), BIR domén (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) nebo PYRIN domén, které vážou signální molekuly po aktivaci receptoru (Proell a kol., 2008).

Příkladem NLRs mohou být NOD1 a NOD2 rozpoznávající peptidoglykany, NOD1 váže meso-DAP (*meso-diaminopimelic acid*), jež je součástí peptidoglykanů pouze gram-negativních bakterií, NOD2 rozpoznává i bakterie gram-pozitivní (Girardin a kol., 2003).

1.3.1.1.3 Sekretované PRRs

Lektin vázající mannan (MBL)

MBL se řadí mezi kolektiny, jež jsou součástí rodiny C-lektinů. Jako rozpustný PRRs cirkuluje v krevním oběhu a je produkován převážně v játrech (Wetering a kol., 2004).

Základem struktury MBL jsou čtyři domény - CR doména (*cystein-rich domain*), kolagenní doména (*collagen-like domain*), α -helikální doména (*α -helical neck domain*) a CRD doména (*Carbohydrate Recognition Domain*) (Ezekowitz a kol., 1988).

Pomocí CRD se MBL váže na sacharidové struktury povrchu patogenních mikroorganismů, tato vazba může vést k aktivaci komplementu (Dahl a kol., 2001), případně vázaný MBL funguje jako opsonin a podporuje tak fagocytózu daného patogenu (Bonar a kol., 2005; Jack a kol., 2005).

C-reaktivní protein (CRP)

CRP patří do vysoce konzervované rodiny pentraxinů, jde o pentamer tvořící strukturu prstence. Je (stejně jako MBL) produkován primárně hepatocyty a následně uvolňován do krevního řečiště. CRP je znám především jako protein akutní fáze. Jeho ligandem je fosforylcholin, jež je součástí struktury kapsulárních polysacharidů řady mikroorganismů (Castell a kol., 1989; Thompson a kol., 1999). CRP jako opsonin stimuluje fagocytózu (Bodmann-Smith a kol., 2002) a je rovněž aktivátorem komplementu (Osmand a kol., 1975).

1.3.1.2 Neutrofilly

Neutrofilly, také nazývané (spolu s eosinofily a bazofily) polymorfonukleáry podle charakteristicky segmentovaného jádra, u lidí tvoří 50 až 70% všech cirkulujících leukocytů. V cirkulaci přežívají zhruba 5 až 6 dnů. Z buněčných složek vrozené imunity se neutrofilly jako první objevují v místě infekce či poranění, po aktivaci přežívají řádově hodiny. Řadí se (spolu s eosinofily a bazofily) do skupiny granulocytů (Pillay a kol., 2010; Kolaczowska a Kubes, 2013).

Granula neutrofilů lze rozdělit na základě jejich obsahu na primární (azurofilní) obsahující převážně myeloperoxidázu (MPO), sekundární (specifická) obsahující laktoferin a terciární (želatinázová), pro která je charakteristická želatináza (Bretz a Baggiolini, 1974; Kjeldsen a kol., 1994). Další zajímavou složkou cytoplasmy neutrofilů jsou sekreční váčky, někdy označované jako čtvrtý typ neutrofilních granul, které jsou významné, ne svým obsahem, ale množstvím receptorů na membráně, které se uplatňují (po splynutí membrány sekrečních váček s cytoplasmatickou membránou buňky) v průběhu přesunu neutrofilů z krevního řečiště do místa zánětu. Fúze sekrečních váček s cytoplasmatickou membránou neutrofilu je iniciována selektiny, membránovými glykoproteiny endotelií, a dále také zánětlivými cytokiny (Borregaard a kol., 1994; Jethwaney a kol., 2007). Pro překonání bazální membrány a následnou migraci tkání jsou mobilizována terciární granula, do

extracelulárního prostředí je uvolňována želatináza štěpící kolagen, který je součástí struktury právě bazální membrány a intersticia (Hibbs a kol., 1985). Přehled látek obsažených v neutrofilních granulech a jejich membránových molekul je uveden na obrázku 1.

Základní efektorovou funkcí neutrofilů je fagocytóza, založena na ingesci cizorodého agens. Pohlcení spočívá v invaginaci cytoplasmatické membrány neutrofilu a vytvoření fagosomu, do toho je následně uvolněn obsah azurofilních granul a ROS (*reactive oxygen species*) formované NADPH oxidázou, která je zakomponována v membráně fagosomu, vzniká fagolyzozom a dochází k degradaci pohlceného materiálu (DeLeo a kol., 1999; Esman a kol., 2010). Hlavní složka azurofilních granul neutrofilů, myeloperoxidáza, katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na kyselinu chlornou. Mezi další složky těchto granul patří elastáza, štěpící proteoglykany a dále defensiny, antimikrobiální peptidy, které mají i imunomodulační účinek (Welling a kol., 1998). Obsah sekundárních granul je převážně exocytován do okolní tkáně, a jde o další ze zánětlivých stimulů (Gallin a kol., 1982).

Mikrobicidní složky neutrofilních granul mohou být formou exocytózy uvolňovány i do extracelulárního prostředí. Tento jev je označován jako "frustrovaná fagocytóza" a nastává v momentu, kdy velikost původce zánětu již nedovoluje jeho pohlcení neutrofilem. V tuto chvíli je třeba mít na paměti, že uvolněné látky také narušují lokální tkáň a organismus je nucen vyvinout další mechanismy, jejichž úkolem je obnova poškozené tkáně (Weismann a kol., 1972; Dallegri a kol., 1987).

Posledním známým efektorovým mechanismem neutrofilů je tvorba tzv. NETs (*neutrophil extracellular traps*), vláknitých sítí, které tvoří rozvolněný jaderný chromatin, v němž jsou roztroušené globulární domény tvořené především elastázou (Brinkmann a kol., 2004). Netóza, proces předcházející NETs, je považována za specifický mechanismus buněčné smrti (vedle nekrózy a apoptózy) (Fuchs a kol., 2007). NETs byly zaznamenány u infekcí způsobených bakteriemi (McDonald a kol., 2012), kvasinkami (Urban a kol., 2006) i prvoky (Guimarães-Costa a kol., 2009), a také v procesu imunologického dohledu, kde je jim zatím přisuzován pro-nádorový charakter (Berger-Achituv a kol., 2013).

Azurophil Granules	Specific Granules	Gelatinase Granules	Secretory Vesicles
Membrane CD63 ^{59,289} CD68 ⁹⁰ V-type H ⁺ -ATPase ²⁹¹	Membrane CD11b ^{64,104} CD15 antigens ³⁰⁵ CD66 ³⁰⁶ CD67 ³⁰⁶ Cytochrome b ₅₅₈ ^{17,52,106} fMLP-R ^{131,307,308} Fibronectin-R ³⁰⁹ G-protein _γ -subunit ^{310,311} Laminin-R ³⁰⁹ NB 1 antigen ³¹² 19-kD protein ³¹³ 155-kD protein ³¹⁴ Rap1, Rap2 ^{315,316} SCAMP ¹⁷⁰ Thrombospondin-R ³¹⁷ TNF-R ³¹⁸ Urokinase-type plasminogen activator-R ³¹⁹ VAMP-2 ¹⁷⁰ Vitronectin-R ³⁰⁹	Membrane CD11b ^{64,109,327-330} Cytochrome b ₅₅₈ ²⁰ Diacylglycerol-deacylating enzyme ³³¹ fMLP-R ^{109,131} SCAMP ¹⁷⁰ Urokinase-type plasminogen activator-R ³¹⁹ VAMP-2 ¹⁷⁰ V-type H ⁺ -ATPase ²⁹¹	Membrane Alkaline phosphatase ^{23-26,66} CR1 ⁶⁵ Cytochrome b ₅₅₈ ^{62,333} CD11b ^{62,64} CD14 ³³⁴ CD16 ^{63,334} * fMLP-R ¹³¹ SCAMP ¹⁷⁰ Urokinase-type plasminogen activator-R ³¹⁹ V-type H ⁺ -ATPase ²⁹¹ VAMP-2 ¹⁷⁰ CD10, CD13, CD45 ³³⁵ * C1q-receptor ³³⁶ * DAF ⁶⁰ *
Matrix Acid β-glycerophosphatase ¹¹ Acid mucopolysaccharide ²⁹² α ₁ -Antitrypsin ²⁹³ α-Mannosidase ¹¹ Azurocidin/CAP37/heparin binding protein ²⁹⁴⁻²⁹⁶ Bactericidal permeability increasing protein ²⁹⁷ β-Glycerophosphatase ⁷ β-Glucuronidase ^{7,298} Cathepsins ¹¹ Defensins ^{43,299} Elastase ³⁰⁰ Lysozyme ^{7,8,298} Myeloperoxidase ³⁰¹ N-Acetyl-β-glucosaminidase ⁷	Matrix β ₂ -Microglobulin ³²⁰ Collagenase ³²¹ Gelatinase ^{21,322} hCAP-18 ¹¹⁷ Histaminase ³²³ Heparanase ³²⁴ Lactoferrin ³⁰¹ Lysozyme ^{7,8,298} NGAL ¹²⁶ Urokinase-type plasminogen activator ^{319,325} Sialidase ³⁰³ SGP28 ⁴⁰ Vitamin B ₁₂ -binding protein ³²⁶	Matrix Acetyltransferase ³²² β ₂ -Microglobulin ²⁰ Gelatinase ^{16,21,107} Lysozyme ⁴⁵	Matrix Plasma proteins ^{24,25} (including tetranectin)
Proteinase-3 ³⁰² Sialidase ³⁰³ Ubiquitin-protein ³⁰⁴			

* This localization is based on kinetics of upregulation in response to stimulation with inflammatory mediators, but has not yet been demonstrated by subcellular localization by immunocytochemistry.

Obr.1: Obsah a membránové znaky granul a sekrečních váček lidských neutrofilů (Borregaard a Cowland, 1997).

1.3.2 Specifická (získaná) imunita

Specifická imunitní reakce je, na rozdíl od reakce nespecifické, namířena proti konkrétnímu, specifickému antigenu. Tuto reakci zprostředkují aktivní formy B a T-lymfocytů, jejichž aktivaci předchází kontakt s daným antigenem, a dále stimulace různými cytokiny. Po aktivaci a proliferaci B-lymfocytu vznikají plazmatické buňky, které produkují specifické protilátky a paměťové buňky zajišťující dlouhodobou ochranu a rychlejší a mohutnější reakci při budoucím kontaktu s antigenem. Produkci protilátek B-lymfocyty

zprostředkují tzv. humorální imunitu. $CD4^+$ T-lymfocyty mají během specifické imunitní odpovědi funkci regulační, zatímco $CD8^+$ T-lymfocyty ve formě CTL (*cytotoxic T-lymphocytes*), které jsou cytotoxické, způsobují lýzu cílových buněk. T-lymfocyty tak zprostředkují tzv. buněčnou imunitu (Rousset a kol., 1992; Ohminami a kol., 2000).

1.4 Imunologický dohled

Již na počátku dvacátého století se objevila myšlenka, že imunitní systém organismu je schopen rozpoznat počínající nádorovou transformaci buněk a tyto buňky následně odstranit. Vznikla tak hypotéza *immunosurveillance* (imunologického dohledu), která byla diskutovaná desítky let (Kim a kol., 2007). Dnes je tato hypotéza již experimentálně potvrzena a existují i důkazy klinické (Naito a kol., 1998).

Imunitní reakce organismu na počínající nádorové bujení je velmi komplexní. Zahrnuje efektorové složky vrozené i získané imunity.

1.4.1 Eliminace nádorových buněk

Rostoucí nádor vyvíjí tlak na okolní tkáň a od určité velikosti také dochází k angiogenezi, to vede k produkci zánětlivých cytokinů jak samotnými rostoucími nádorovými buňkami, tak tkáňovými makrofágy a stromálními buňkami (Chen a kol., 1999).

Následně dochází k aktivaci NK buněk, $\gamma\delta$ T-lymfocytů, neutrofilů, makrofágů a dendritických buněk a jejich migraci do místa vznikajícího nádoru.

NK buňky rozpoznávají nádorové antigeny nerestringované MHC molekulami. Rozpoznání nádorových buněk umožňuje NKG2D receptor patřící do rodiny C-lektinových receptorů, jehož ligandem u lidí je např. MICA (*MHC class I chain-related A*), antigen exprimovaný jako reakce na stres a hojně se vyskytující na povrchu nádorových buněk (Pende a kol., 2001).

NKG2D receptor je také exprimován $\gamma\delta$ T-lymfocyty, subpopulací $CD4^+$ lymfocytů, jejichž TCR receptor je tvořen řetězci γ a δ . $\gamma\delta$ T-lymfocyty tvoří jen malé procento T-lymfocytů v lymfoidních orgánech, ale hojně se vyskytují v epitelu kůže, střeva a plic a pravděpodobně se tak podílejí na imunologickém dohledu převážně epiteliálních malignit (Groh a kol., 1989; Girardi a kol., 2001).

Neutrofilů a makrofágů v místě nádoru produkují řadu cytokinů, kterými stimulují aktivitu dalších imunitních buněk nebo se přímo podílejí na lýze nádorových buněk fagocytózou (Munn a Cheung, 1990), eventuálně exocytózou granul/lyzozomů, kdy uvolňují do okolní tkáně řadu lytických enzymů a ROS (Dallegrí a kol., 1987).

Dendritické buňky fagocytují poškozené nádorové buňky a jako antigen prezentující buňky migrují do spádových lymfatických uzlin, kde prezentují nádorové antigeny CD4⁺ T-lymfocytům, což vede k vývoji antigenně specifických CD8⁺ T-lymfocytů a vzniká populace CTL (*cytotoxic T-lymphocytes*) migrujících do místa rostoucího nádoru (Marzo a kol., 1999).

NK buňky a T-lymfocyty ($\gamma\delta$ i CTL) mají přímý cytotoxický efekt na nádorové buňky. Významná je produkce IFN γ (interferonu γ) a perforinu. IFN γ potlačuje u nádorových buněk proliferaci a indukuje apoptózu (Wall a kol., 2003; Gollob a kol., 2005), byl také pozorován jeho anti-angiogenní efekt (Qin a kol., 2003). Dále zvyšuje expresi MHC I molekul na povrchu nádorových buněk (Propper a kol., 2003) čímž usnadňuje jejich rozpoznání, podílí se na aktivaci endoteliálních buněk a podporuje tak migraci leukocytů do místa nádoru (Munro a kol., 1989), kde stimuluje jejich aktivitu (Kowanko a Ferrante, 1987). Perforiny tvorbou pórů v membráně cílové buňky naruší její osmotickou rovnováhu a buňka podléhá cytolýze (Young a kol., 1987), popř. ve spojení s granzymy iniciují u nádorových buněk apoptózu (MacDonald a kol., 1999), ta může být také vyvolána vazbou Fas ligandu na povrchu lymfocytů a Fas receptoru na povrchu nádorových buněk (Sayers a kol., 2000).

1.4.2 Mechanismy úniku nádorových buněk

Imunitní systém organismu je tedy schopen rozpoznat počínající nádorové bujení a uplatnit efektorové mechanismy, které vedou k eliminaci neoplastických buněk. Zároveň však nátlak ze strany imunity může iniciovat vznik takové populace nádorových buněk, u nichž je následkem mutací snížena imunogenicita do takové míry, že je již imunitní systém dále není schopen rozpoznat a dochází pak k progresivnímu růstu nádoru.

Stav, kdy nádor exprimuje tak nízkou hladinu antigenů, že již není rozpoznáván imunitním systémem, se nazývá imunologická tolerance (Singh a Paterson, 2007). U mnoha nádorů také dochází k snížené expresi MHC I molekul (Watson a kol., 2006).

Nádorové buňky jsou také schopné aktivně suprimovat imunitní efektorové buňky produkcí tzv. TDSFs (*tumour-derived soluble factors*), mezi které patří např. VEGF

(*vascular endothelial growth factor*), protizánětlivé IL-10 (Interleukin 10) a TGF β (*transforming growth factor β*), rozpustný FasL (Fas ligand) a MICA (*MHC class I chain-related A*) (Song a kol., 2001; Doubrovina a kol., 2003).

Produkce VEGF vede k nahromadění nezralých myeloidních buněk v okolní tkáni (Bellamy a kol., 2001), ty produkují např. arginázu, která vede k inhibici proliferace T-lymfocytů, produkce cytokinů a exprese CD3 ζ řetězce, který je součástí TCR (*T-cell Receptor*) a významný v procesu aktivace T-lymfocytů (Rodriguez a kol., 2004). VEGF také blokuje aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) a brání tak zrání a diferenciaci hematopoetických buněk (Oyama a kol., 1998). A jak název napovídá, VEGF také stimuluje angiogenezi v rostoucím nádoru a podporuje tak jeho růst (Ferrara, 2005).

Velký význam v úniku nádoru imunitnímu systému mají nezralé dendritické buňky. Jsou stimulatory CD4⁺ CD25⁺ regulačních T-lymfocytů a společně s nimi inhibují zrání dalších dendritických buněk a aktivaci nádorově specifických T-lymfocytů a brání tak eliminaci nádoru i v případě, že nádorové buňky exprimují větší množství antigenů. Tento stav byl pojmenován jako imunologická tolerance (Mahnke a kol., 2002; Ghiringhelli a kol., 2005).

1.5 Buněčná ultrastruktura

1.5.1 Neutrofilly

Neutrofilly mají velmi typickou ultrastrukturu, což do velké míry usnadňuje jejich identifikaci. Nejvýraznějším znakem neutrofilů je jejich segmentované jádro (odtud také název polymorfonukleáry) s velkým množstvím heterochromatinu po obvodu a menší částí euchromatinu uprostřed. Množství heterochromatinu svědčí o nízké transkripční aktivitě zralých neutrofilů. Cytoplasma se díky roztroušeným částicám glykogenu jeví tmavší a obsahuje řadu granul, z nichž jsou definovány čtyři základní typy (Bainton a kol., 1971). Sekreční váčky a terciární (želatinázová) granula jsou, vzhledem k svému obsahu a molekulám na membráně, exocytována v průběhu kontaktu neutrofilu s cévními endoteliemi, během diapedézy a pohybu tkáni (Hibbs a kol., 1985; Jethwaney a kol., 2007). Specifická (sekundární) granula, typická obsahem laktoferinu jsou exocytována v tkáni především jako stimulace zánětu (Gallin a kol., 1982). A nakonec azurofilní (primární) granula, známá obsahem myeloperoxidázy, jsou exocytována do fagosomu nebo do

extracelulárního prostředí za účelem přímého zničení cílové buňky (Dallegrí a kol., 1987; Esman a kol., 2010). Azurofilní granula jsou elektrodenzní a lze je tak snadno rozpoznat, typický je pro ně sféroidní tvar. Specifická granula jsou menší než granula azurofilní a také mnohem světlejší a jejich určení je komplikovanější (Bainton a kol., 1971).

Neutrofilů jsou označovány jako první obranná linie organismu proti patogenům a jsou schopné vůči nim uplatnit různé efektorové mechanismy. Nejznámějším a nejdéle sledovaným mechanismem je fagocytóza, kterou můžeme sledovat zachycenou TEM např. v práci Rydell-Törmänen a kol. (2006), kde je popsán tzv. kanibalismus neutrofilů, kdy aktivované neutrofilů fagocytují neutrofilů apoptotické.

Dalším velmi zajímavým procesem vedoucím k degradaci sledovaného cíle je degranulace (exocytóza) azurofilních granul do extracelulárního prostředí, známá také jako "frustrovaná fagocytóza", která je spojena s kontaktem neutrofilu s většími "částicemi", které již neutrofil není schopen zcela pohltnout. Herant a kol. (2006), zabývající se mechanikou fagocytózy ve své práci mj. uvádí snímky zachycující neutrofilů fagocytující protilátkami pokryté polystyrenové partikule různé velikosti pod světelným mikroskopem, přičemž partikule o průměru 11,2 μm již neutrofilů nejsou schopné fagocytovat. Uměle je možné exocytózu azurofilních granul vyvolat pomocí cytochalasinu B, mykotoxinu ovlivňujícího chování aktinových filament, jejichž remodeling přímo k exocytóze vede. Zurier a kol. (1974) takto uměle vyvolanou degranulaci zaznamenal pomocí TEM.

Posledním známým efektorovým mechanismem neutrofilů je tzv. netóza. Výsledkem tohoto procesu jsou NETs (*neutrophil extracellular traps*), síť tvořená rozvolněným jaderným chromatinem a shluky obsahujícími především elastázu, ve kterých je patogen zachycen a postupně rozkládán. Netózu provází charakteristické ultrastrukturální změny odlišné od nekrózy i apoptózy, což nasvědčuje teorii, že jde o jedinečný mechanismus buněčné smrti. Jaderný chromatin je zcela homogenní a dochází k úplnému rozpadu jaderné membrány i organel v cytoplasmě, kde dojde k promíchání uvolněného jaderného a cytoplazmatického materiálu. Výslednou strukturou je shluk jemných vláken, po jejichž délce jsou nahodile rozmístěné globulární domény, které mohou agregovat do větších struktur (Brinkmann a kol., 2004; Fuchs a kol., 2007).

1.5.2 Nádorové buňky

Ultrastruktura nádorových buněk je velmi rozmanitá a odráží tak míru malignity dané buňky. Nádorové buňky bývají velmi pleomorfní s velkým a spíše nepravidelným jádrem, popř. s různým počtem a velikostí jádérka. Nápadné jsou také abnormality mitochondrií a endoplasmatického retikula (Cheville, 2009).

Pokud dojde k rozpoznání nádorové buňky neutrofilem, popř. jiným leukocytem měla by být tato buňka zničena. Mechanismy buněčné smrti a ultrastrukturálními změnami s nimi spojenými jsou uvedeny v následující části.

1.5.3 Buněčná smrt a s ní spojené změny buněčné ultrastruktury

Cytonekróza (nekróza) a programovaná buněčná smrt (apoptóza) jsou dva hlavní mechanismy buněčné smrti. Nekróza je výsledkem rozsáhlého poškození buněčné membrány a na jejím konci je zcela rozpadlá buňka, jejíž obsah je uvolňován do okolní tkáně a dochází k iniciaci zánětu. Apoptóza je aktivována a řízena geneticky a signálními drahami a jejím výsledkem je membránou pevně ohraničená struktura, která je následně fagocytována, a buňka zanikne, aniž by vyvolala zánětlivou reakci (Berninghausen a Leippe, 1997; Cheville, 2009).

V poškozené tkáni lze často současně sledovat nekrózu i apoptózu. Oba děje se zároveň vzájemně nevylučují a mohou přispět k smrti jedné buňky (Cheville, 2009).

1.5.3.1 Nekróza

Nekróza je výsledkem poškození buňky, resp. buněčné membrány, které může být způsobeno lyziny, poriny, různými toxiny ad. Výsledkem nekrózy je uvolnění veškerého buněčného obsahu, včetně řady cytokinů, což vede k vyvolání zánětu, aktivaci imunitního systému a celkové změně okolního prostředí (Cheville, 2009).

V důsledku poškození buněčné membrány dochází k nekontrolovanému proudění vody do buňky a narušení iontové rovnováhy. Významná je narůstající hladina Ca^{2+} iontů. Buňka reaguje na vzrůstající množství vápníku jeho izolací v mitochondriích, endoplasmatickém retikulu a tzv. kalcizomech. Dochází k rozpínání endoplasmatického retikula, Golgiho komplexu a jaderného povrchu ve kterých se hromadí přitékající voda.

Následně se membrány těchto organel rozpadají a tvoří se množství menších váčků. Ca^{2+} v cytoplazmě aktivuje řadu enzymů. Mitochondrie přestávají fungovat, a jakmile je spotřebováno veškeré ATP, buňka se začíná zcela rozpadat (Kruman a Mattson, 1999; Cheville, 2009).

Během nekrózy se tedy nejprve určité organely a poté celá buňka rozpínají a dochází k postupnému rozpadu membrán. Přerušují se spojení s okolními buňkami. Celá buňka se vzhledem k ředění vodou a rozpínání jeví světlejší. Buněčný i jaderný povrch jsou nepravidelné. Změny na jádře mohou být různé, především ve smyslu míry kondenzace jaderného chromatinu (karyorhexe vs. karyolýza), nakonec se však jádro rozpadá (Li a kol., 1995; Berninghausen a Leippe, 1997).

1.5.3.2 Apoptóza

Apoptóza je zcela běžný, regulovaný mechanismus, kterým je udržována tkáňová homeostáza organismu. Tělo se tímto způsobem zbavuje buněk, které již nepotřebuje nebo které jsou potenciálně škodlivé (buňky infikované viry, neoplastické buňky). Apoptóza je tak uplatňována v řadě biologických procesů, jako jsou např. vývoj imunitního systému a embryogeneze (Cheville, 2009).

Apoptóza, resp. buněčné změny s ní spojené, je v podstatě vykonána enzymatickou kaskádou složenou z cysteinových proteáz, tzv. kaspáz. Na počátku jsou změny permeability mitochondriální membrány, které vedou k zastavení základních funkcí a uvolnění řady proteinů podílejících se na aktivaci kaspázové kaskády. Struktura aktivující tuto kaskádu se nazývá apoptosom, proteinový komplex, jehož kostru tvoří cytoplasmatický Apaf-1 (*apoptotic protease activating protein 1*), na ten se váže cytochrom C uvolňovaný z mitochondrií a vzniklá struktura váže a aktivuje kaspázu 9, ta aktivuje kaspázu 3 a celá kaskáda je tak započata (Cheville, 2009).

Apoptóza může být iniciována intracelulárně expresí určitého genu (např. p53) nebo extracelulárně, navázáním vnějšího signálu (Fas ligand, TNF; *tumour necrosis factor*) na membránový receptor buňky (TNFRs; *tumour necrosis factor receptors*) (Tewari a Dixit, 1995).

Morfologicky se apoptóza projevuje postupným smršťováním buňky a v důsledku depolymerizace aktinových filament dochází k jejímu zakulacení. Charakteristické jsou změny na jádře, především kondenzace jaderného chromatinu. Pyknóza, typický projev

apoptózy, je agregace jaderného chromatinu podél vnitřní jaderné membrány a vytvoření elektrodenzní masy mající srpkovitý vzhled. V cytoplasmě se tvoří množství vakuol, popř. autofagozomů. Z buněčné membrány se tvoří a odděluje do okolního prostředí množství menších váčků. V důsledku smršťování a zahušťování buněčného obsahu (hromadění odpadu, resp. produktů proteolýzy) dochází k postupnému tmavnutí buňky. Výsledkem apoptózy jsou tzv. apoptotická tělíska, elektrodenzní homogenní struktury kulovitého tvaru, které jsou fagocytovány (makrofágy, endoteliální buňky aj.) a definitivně rozloženy (Aoshiba a kol., 1995; Pitrak a kol., 1996; Cheville, 2009).

2 Cíle práce

- seznámení se s ultrastrukturou nádorových buněk a neutrofilů.
- sledování ultrastrukturálních změn nádorových buněk souvisejících s aplikací terapeutických látek.
- sledování mechanismů působení neutrofilů na nádorové buňky.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

BAM (*Biocompatible Anchor for cell Membrane*, Mw 4000, NOF EUROPE)

Citrát olova (EMS)

Epon (EMbed 812 Kit, EMS)

FCS (*Fetal Calf Serum*, Sigma-Aldrich)

f-MLF (*N-formyl-methioninyl-leucyl-phenylalanin*, Sigma-Aldrich)

f-MLFKK (Schafer-N)

GA (*Glutaraldehyde*, EMS)

H-MLFKK (Schafer-N)

LPS (Lipopolysacharid z *E. coli*, Sigma-Aldrich)

OsO₄ (*Osmium tetroxide*, EMS)

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

Uranyl acetát (EMS)

3.2 Laboratorní myši

Pro práci byly použity SPF samice kmene C57BL/6 (*Charles River Laboratories*) o hmotnosti 18-20 g. Byly chovány v prostředí při konstantní teplotě 22°C a relativní vzdušné vlhkosti 65% s nastavenou 12/12 fotoperiodou. Uloženy byly v plastických klecích s podestýlkou z dřevěných hoblin a měly volný přístup ke sterilní vodě a krmným peletám.

3.3 Buněčná linie

Buňky myšního melanomu B16-F10 (*American Type Culture Collection - ATCC*) byly kultivovány v RPMI 1640 obohaceném o 10% FCS a antibiotika v termostatu při konstantní teplotě 37°C, v atmosféře nasycené vodními parami s 5% podílem CO₂.

3.4 Příprava buněk B16-F10 pro transplantaci

Po slítí kultivačního média byly buňky 3× promyty sterilním PBS. Následně bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,02% trypsin, 0,02% EDTA v PBS), ve které byly buňky 5 min inkubovány v termostatu při 37°C. Proces trypsinizace byl ukončen přidáním RPMI 1640 s FCS. Pomocí Pasteurovy pipety byly buňky rozsuspendovány a poté centrifugovány (10min/150g/4°C). Byl slit supernatant, přidáno RPMI 1640 bez FCS a buněčný pelet byl rozsuspendován. Vzorek suspenze byl naředěn v poměru 1 : 1 trypanovou modří (pro rozpoznání mrtvých a živých buněk). Pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena aktuální koncentrace buněk v 1 ml média a ta byla upravena na koncentraci 4×10^6 buněk v 1 ml média.

3.5 Transplantace buněk B16-F10

Suspenze o objemu 0,1 ml RPMI 1640 bez FCS obsahující 4×10^5 buněk B16-F10 byla myším subkutánně (s.c.) injikována do slabiny na pravém boku. Transplantace byla provedena u myší starých 8 týdnů.

3.6 Měření velikosti nádorů

Měření nádorů bylo provedeno pomocí kaliperu. Objem nádoru byl vypočten dosazením naměřených hodnot do vzorce:

$$V = \frac{\pi}{6} AB^2$$

Kde A je delší naměřený rozměr a B kratší naměřený rozměr, obojí v milimetrech.

3.7 Příprava roztoků pro terapii

3.7.1 Příprava f-MLFKK-BAM

Vazba BAM na aminoskupinu f-MLFKK proběhla při pH 7,3 (Kato a kol. 2004), kdy NHS (N-hydroxysukcinimid) skupina BAM reagovala s ϵ -aminoskupinou lysinu. Celý

proces trval hodinu při pokojové teplotě. Získaný roztok v PBS byl uchován zamrazením na -20°C .

3.7.2 Příprava H-MLFKK-BAM

Příprava H-MLFKK-BAM proběhla stejným způsobem jako v bodě 3.7.1.

3.8 Příprava preparátů pro TEM

3.8.1 Excize vzorku

Po usmrcení myši byl nádor odebrán a uložen do Petriho misky z důvodu lepší manipulace. Následně byla pomocí pinzety a žiletky provedena excize vzorku (cca 1 mm^3) z oblasti středu nádoru, ten byl okamžitě uložen do zkumavky s fixačním roztokem (2,5% GA, 0,1M fosfátový pufr).

3.8.2 Fixace, odvodnění a zalití do pryskyřice

Vzorky byly přes noc uchovány ve fixačním roztoku při pokojové teplotě. Následně byly v digestoři 3× promyty vy vypíracím roztoku (4% glukóza, 0,1M fosfátový pufr; pH = 7,2), byla provedena postfixace OsO_4 (4% OsO_4 + fosfátový pufr v poměru 1 : 1) a opět 3× promytí, dále odvodnění vzestupnou acetonovou řadou a prosycení pryskyřicí (Epon). Poté byly vzorky přeneseny do zalévacích formiček a po přidání pryskyřice uloženy do termostatu (60°C), aby došlo k polymeraci pryskyřice a zatvrdnutí bločků.

Pro větší názornost uvádím tabulku s výše popsáním postupem včetně doby trvání jednotlivých kroků.

Tab. I: Fixace, odvodnění a zalití vzorku do pryskyřice.

Fixace a postfixace

Chemikálie	Čas
Fixační roztok	přes noc (minimálně 4 hod)
Vypírací roztok	3 × 15 min
Roztok OsO ₄ + fosfátový pufr (1 : 1)	2 hod
Vypírací roztok	3 × 15 min

Odvodnění

Chemikálie	Čas
30% aceton	15 min
50% aceton	15 min
70% aceton (uložení vzorků do lednice)	přes noc
80% aceton	15 min
90% aceton	15 min
95% aceton	15 min
100% aceton	15 min

Prosycení pryskyřicí

Chemikálie	Čas
Epon + 100% aceton (1 : 2)	1 hod
Epon + 100% aceton (1 : 1)	1 hod
Epon + 100% aceton (2 : 1)	1 hod
Epon (uložení vzorků do exsikátoru)	přes noc

Zalití do formiček a uložení do termostatu 48 hod

3.8.3 Krájení polotenkých řezů, barvení a pozorování řezů pod mikroskopem

Polotenské řezy tloušťky 400 nm byly nakrájeny na ultramikrotomu (EM UC6, Leica). Pro krájení byly použity skleněné nože vyrobené přímo v laboratoři pomocí knifemakeru (7801A, LKB). Vanička nože byla naplněna 10% acetonem pro splavení řezů, které byly následně přeneseny do kapky acetonu na podložním sklíčku. Podložní sklíčka s řezy byla

přenesena na termoblok (65°C), kde byla ponechána po dobu několika hodin, aby došlo k odpaření acetonu a dostatečnému upevnění řezů ke sklíčku.

Řezy byly barveny toluidinovou modří. Na řezy byla Pasteurovou pipetou aplikována toluidinová modř a sklíčka byla 1 min položena termobloku (65°C). Nakonec byla sklíčka omyta destilovanou vodou a nechala se oschnout.

Polotenské řezy byly při různých zvětšeních pozorovány pod světelným mikroskopem (CX41, Olympus) a byly vybrány oblasti pro krájení ultratenkých řezů.

3.8.4 Krájení ultratenkých řezů

Ultratenké řezy tloušťky 90 nm byly krájeny na ultramikrotomu (EM UC6, Leica). Pro krájení byl použit diamantový nůž (Ultra 45°, DiATOME). Vanička nože byla naplněna destilovanou vodou. Řezy z vodní hladiny byly nanášeny pomocí řasy zasazené do špejle a pinzety přímo na měděné síťky. Síťky s řezy byly uloženy do Petriho misek na filtrační papír.

3.8.5 Kontrastování ultratenkých řezů

Kontrastování probíhalo v uzavřené nádobě bez přístupu světla. Nejprve byly síťky položeny, řezy směrem dolů, na kapku alkoholového roztoku octanu uranylu, kde byly ponechány, v alkoholové atmosféře, 30 minut. Následovalo 3× promytí 30% ethanolem.

V druhém kroku byly síťky položeny, řezy dolů, na kapku vodného roztoku citrátu olova, kde byly ponechány, v atmosféře tvořené NaOH (NaOH + destilovaná voda), 20 min. Následovalo 3× promytí destilovanou vodou.

Síťky s řezy byly přeneseny na filtrační papír a po oschnutí připraveny pro pozorování v TEM.

3.8.6 Mikroskopování a fotodokumentace

Řezy byly při různých zvětšeních pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem (JEM-1010, JOEL, 80 kV). Fotografický záznam byl pořízen pomocí CCD kamery (Sis MegaView III).

3.9 Pokus: Ultrastrukturální analýza melanomu po intratumorální aplikaci f-MLFKK-BAM, LPS a jejich směsi

V pokusu bylo použito 19 myši s transplantovaným melanomem B16-F10. Dvanáctý den po transplantaci, po změření velikosti nádorů, byly myši randomizovány jednotlivě do 19 akvárií a v různých časech jim byly i.t. aplikovány roztoky o objemu 50 μ l. Nejprve byl však odebrán kontrolní vzorek "bez zásahu jehlou". Typy aplikovaných roztoků a časové schéma experimentu jsou uvedeny v tabulce II.

Tab. II: Typy aplikovaných roztoků a časové schéma nádorových excizí.

Roztok	Interval mezi aplikací roztoku a provedením excize [hod]
PBS	6
0,5 mM f-MLFKK-BAM v PBS + LPS (0,5 mg/ml PBS)	6
LPS (0,5 mg/ml PBS)	6
0,5 mM f-MLFKK-BAM v PBS	6
0,5 mM H-MLFKK-BAM v PBS	6
0,5 mM H-MLFKK-BAM v PBS+ LPS (0,5 mg/ml v PBS)	6
0,5 mM f-MLF v PBS	6
0,5 mM f-MLF v PBS + LPS (0,5 mg/ml v PBS)	6
PBS	12
0,5 mM f-MLFKK-BAM v PBS + LPS (0,5 mg/ml PBS)	12
LPS (0,5 mg/ml PBS)	12
0,5 mM f-MLFKK-BAM v PBS	12
0,5 mM H-MLFKK-BAM v PBS	12
0,5 mM H-MLFKK-BAM v PBS+ LPS (0,5 mg/ml v PBS)	12
0,5 mM f-MLF v PBS	12
0,5 mM f-MLF v PBS + LPS (0,5 mg/ml v PBS)	12
PBS	24
0,5 mM f-MLFKK-BAM v PBS + LPS (0,5 mg/ml PBS)	24

Další práce probíhala podle části 3.8.

4 Výsledky

Nález pozorovaný u jednotlivých vzorků odebraných v daných časech od aplikace roztoků je vždy prezentován formou tabulky (Tab.III až V).

Během ultrastrukturální analýzy byla pozornost zaměřena především na přítomnost neutrofilního infiltrátu ve vzorku a na efektorové mechanismy neutrofilů: fagocytózu (ingesci menších struktur), frustrovanou fagocytózu (FF; adherenci neutrofilu k větší struktuře spojenou s exocytózou azurofilních granul) a NETs (*neutrophil extracellular traps*). Dále nás zajímalo, jakému mechanismu buněčné smrti nádorové buňky podléhají: apoptóze nebo nekróze. Pozitivní nález je označen znaménkem "+", přičemž počet znamének svědčí o rozsahu pozorovaného jevu. Negativní nález je označen znaménkem "-". Vzorky jsou v tabulkách popsány na základě aplikovaných roztoků.

Nálezy byly srovnávány mezi jednotlivými vzorky odebranými v různých časech i vůči kontrole bez injekce.

4.1 Vzorky odebrané po 6 hodinách

Jevy pozorované během ultrastrukturální analýzy vzorků odebraných po 6 hodinách od aplikace roztoků jsou shrnuty v tabulce III.

Tab.III: Nález v ultrastruktuře vzorků odebraných po 6 hodinách.

Vzorek	Infiltrát	Efektorový mechanismus neutrofilů			Mechanismus buněčné smrti	
		fagocytóza	FF	NETs	nekróza	apoptóza
PBS	-	-	-	-	-	-
f-MLFKK-BAM+LPS	+	-	-	-	+	-
LPS	+	-	-	-	+	-
f-MLFKK-BAM	-	-	-	-	-	-
H-MLFKK-BAM	-	-	-	-	-	-
H-MLFKK-BAM+LPS	+	-	-	-	+	-
f-MLF	-	-	-	-	-	-
f-MLF+LPS	+	-	-	-	+	-

Z tabulky lze vyčíst, že u vzorků PBS, f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM (6 hod) nedošlo k žádné neutrofilní infiltraci a vyznačovaly se tedy neporušenou ultrastrukturou nádorových buněk. Tyto vzorky odpovídaly svojí ultrastrukturou kontrolnímu vzorku bez injekce. U vzorků f-MLFKK-BAM+LPS, LPS, H-MLFKK-BAM+LPS, f-MLF a f-MLF-LPS (6 hod) byla pak zaznamenána minimální infiltrace neutrofilů, které byly sledovány především v lumenu cév, a jen několik málo nádorových buněk se známkami nekrózy.

4.2 Vzorky odebrané po 12 hodinách

Jevy pozorované během ultrastrukturální analýzy vzorků odebraných po 12 hodinách od aplikace roztoků jsou shrnuty v tabulce IV.

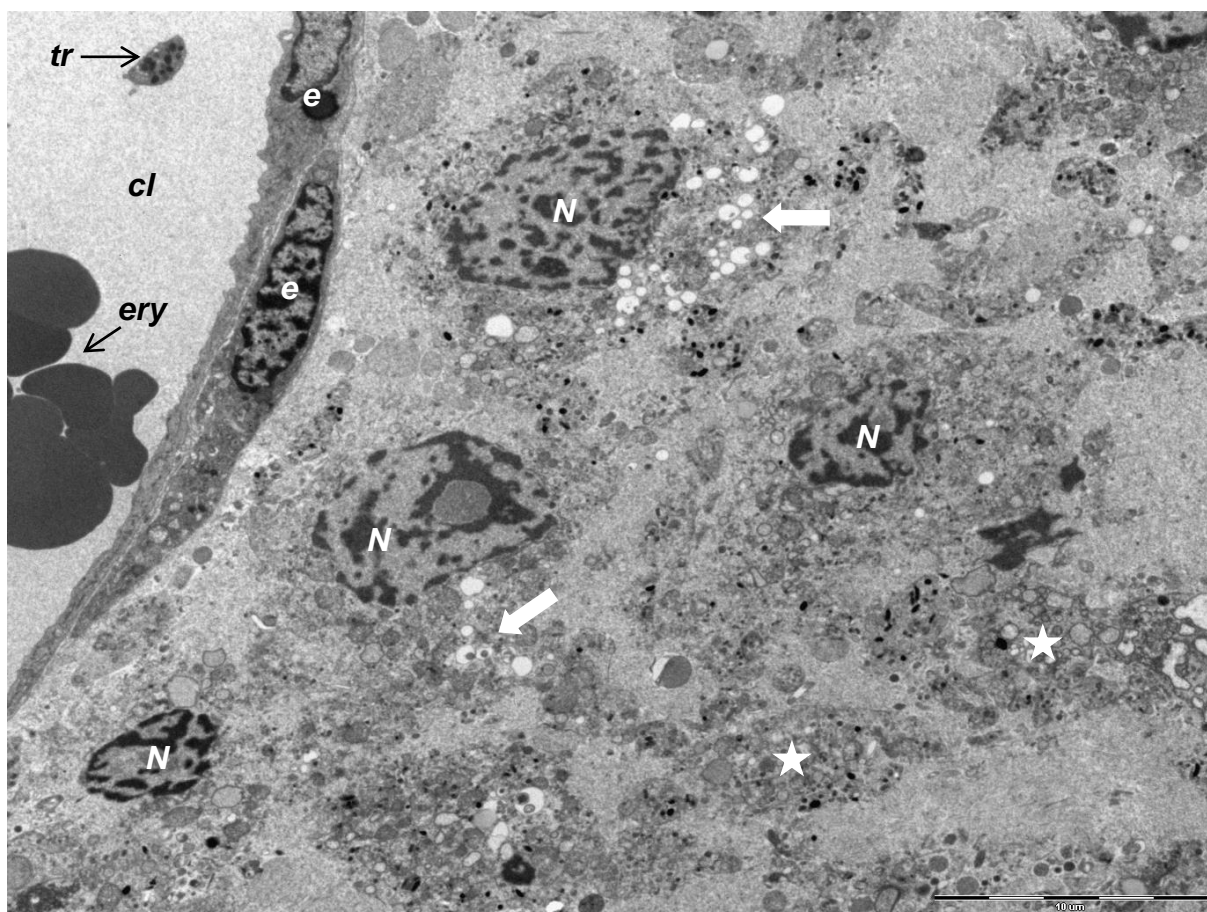
Tab.IV: Nález v ultrastruktuře vzorků odebraných po 12 hodinách.

Vzorek	Infiltrát	Efektorový mechanismus neutrofilů			Mechanismus buněčné smrti	
		fagocytóza	FF	NETs	nekróza	apoptóza
PBS	-	-	-	-	-	-
f-MLFKK-BAM+LPS	++	+	-	-	+++	-
LPS	++	+	-	-	+++	+
f-MLFKK-BAM	-	-	-	-	-	-
H-MLFKK-BAM	-	-	-	-	-	-
H-MLFKK-BAM+LPS	++	+	-	-	+++	-
f-MLF	+	-	-	-	-	+
f-MLF+LPS	++	++	-	-	+++	+

Z tabulky lze vyčíst, že u vzorků PBS, f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM (12 hod), byla pozorována stejná ultrastruktura, a to neporušená, "zdravá" nádorová tkáň bez neutrofilní infiltrace jako v případě vzorků PBS, f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM (6 hod) a kontrolního vzorku bez injekce.

Vzorky f-MLFKK-BAM+LPS, LPS, f-MLF a f-MLF+LPS (12 hod), se vyznačovaly přítomností neutrofilů v nádoru a velkým množstvím nekrotických nádorových buněk. V těchto vzorcích byly pozorovány neutrofilové fagocytující větší, či menší shluky buněčného odpadu vyplňujícího extracelulární prostor mezi nekrotizujícími buňkami.

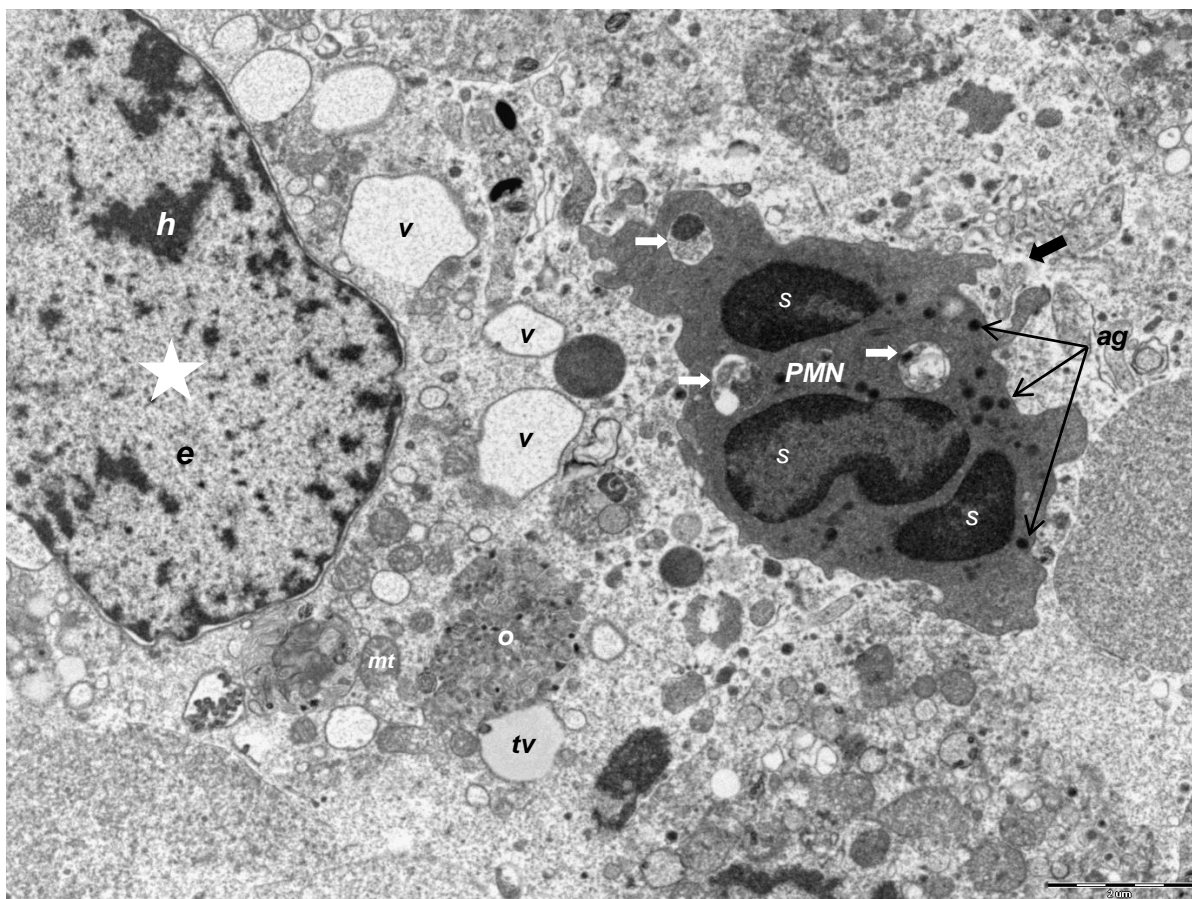
U vzorku LPS (12 hod), můžeme vidět několik nádorových buněk v pokročilém stádiu nekrózy v blízkosti cévy zachycených na obrázku 2. Obsah cytoplasmy nekrotických buněk je uvolňován do okolního prostředí díky rozpadu buněčné membrány, v jádrech těchto buněk dochází k agregaci chromatinu. V levé části snímku vidíme část cévy s erytrocyty a trombocytem.



Obr.2: 12 hodin po aplikaci LPS. Nádorové buňky v pokročilém stádiu nekrózy s degradovanou buněčnou membránou, obsah cytoplasmy, vakuoly (bílé šipky) a shluky buněčného odpadu (bílé hvězdy), je uvolňován do extracelulárního prostředí. V jádrech (N) dochází k agregaci chromatinu. Část cévního lumenu (cl) s endoteliálními buňkami (e) po obvodu, erytrocyty (ery) a trombocytem (tr) (měřítko 10 µm)

U vzorku f-MLFKK-BAM+LPS (12 hod), můžeme vidět fagocytózu zachycenou na obrázku 3. Vidíme neutrofil obsahující v cytoplasmě několik menších fagozomů a pseudopodia lapající po dalším materiálu k pohlcení. Dále lze poukázat na typické segmentované jádro a množství elektrodenzních azurofilních granul v cytoplasmě. V levé části snímku se nachází nekrotická nádorová buňka. Tato buňka má zcela rozpadlou

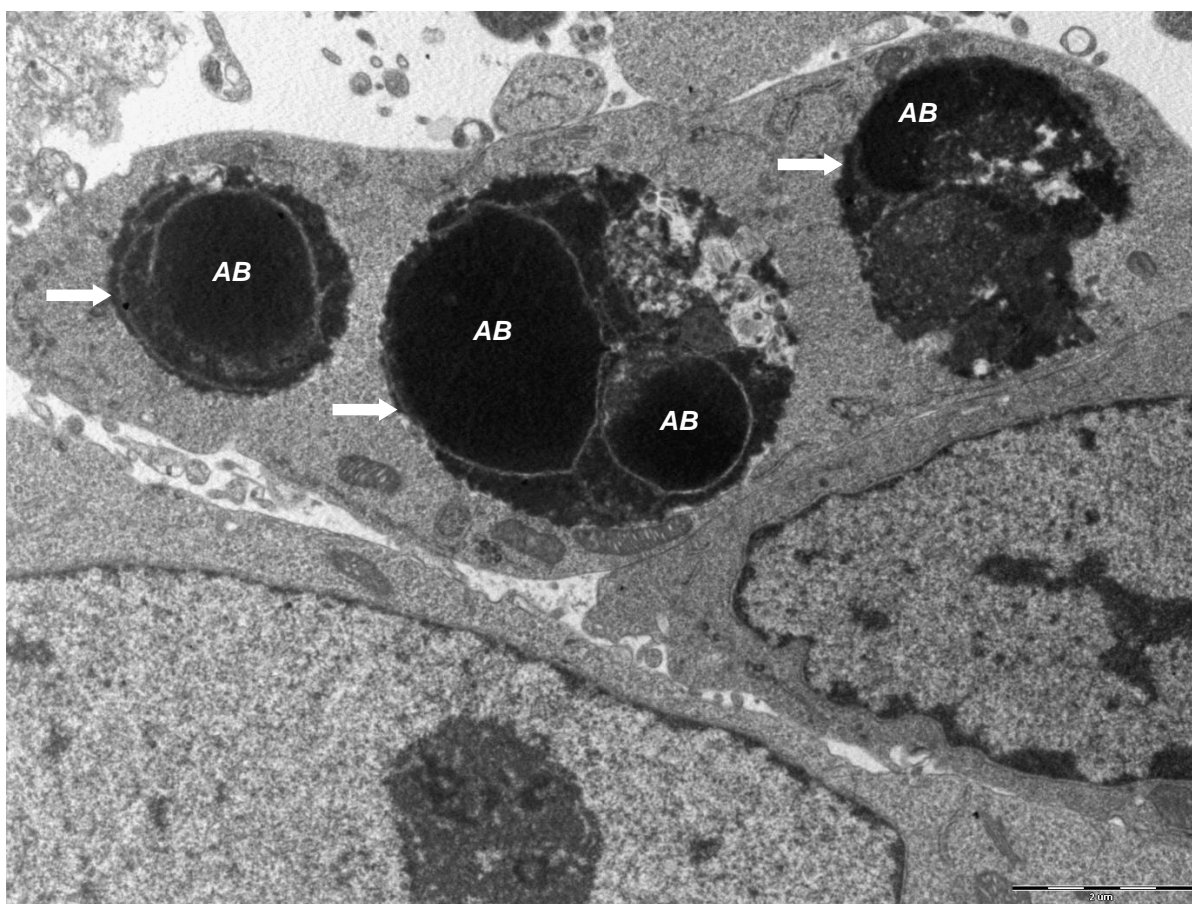
cytoplazmatickou membránu a obsah cytoplasmy, především vakuoly a shluky zbytků rozpadlých buněčných organel a melanosomů, ale i několik mitochondrií, se uvolňuje do okolí. Buněčné jádro je relativně zachovalé s převažujícím množstvím euchromatinu.



Obr.3: 12 hodin po aplikaci f-MLFKK-BAM+LPS. Neutrofil (*PMN*), s typicky segmentovaným jádrem (*s*) a množstvím azurofilních granul v cytoplasmě (*ag*), obsahující fagozomy (*bílé šipky*) a fagocytující další materiál (*černá šipka*). Nádorová buňka (*vlevo*) s velkým množstvím vakuol v cytoplasmě (*v*) mezi nimiž je i vakuola tuková (*tv*), dále vidíme shluky buněčného odpadu (*o*) a degradující mitochondrie (*mt*). Zachovalé buněčné jádro (*hvězda*) s velkým množstvím euchromatinu (*e*) a menším množstvím heterochromatinu (*h*) (měřítko 2 μ m).

U vzorků LPS, f-MLF a f-MLF+LPS (12 hod) bylo pozorováno také několik buněk vykazujících terminální fázi apoptózy. Sledovaný melanom B16-F10 je tvořen výhradně jedním typem buněk. V závislosti na aplikovaném roztoku se v nádoru dále vyskytovaly ve větší míře pouze neutrofilů. Na základě této skutečnosti a toho, že u nádorových buněk byla pozorována výhradně nekróza, lze usuzovat, že apoptotické buňky budou neutrofilů.

Tento nález je zajímavý především u vzorku f-MLF (12 hod), kde se apoptotické buňky nacházely ve fagozomech v cytoplasmě nádorových buněk, přičemž celková ultrastruktura nádoru byla neporušená, bez známek nekrózy. Vysvětlením může být to, že f-MLF nevede k nijak masivní infiltraci nádoru granulocyty (Janotová a kol, 2014) a menší množství neutrofilů jsou schopné nádorové buňky sami eliminovat. U tohoto byly zachyceny buňky vykazující terminální fázi apoptózy, které můžeme vidět na obrázku 4. Vidíme řez nádorovou buňkou, v jejíž cytoplasmě jsou tři fagozomy obsahující buňky v terminální fázi apoptózy, kterou dokazují tzv. apoptotická tělíska.



Obr.4: 12 hodin od aplikace f-MLF. Řez nádorovou buňkou, v níž se nachází fagozomy obsahující apoptotické buňky (*bílé šipky*), jejich jádra tvoří tzv. apoptotická tělíska (*AB*) (měřítko 2 μ m).

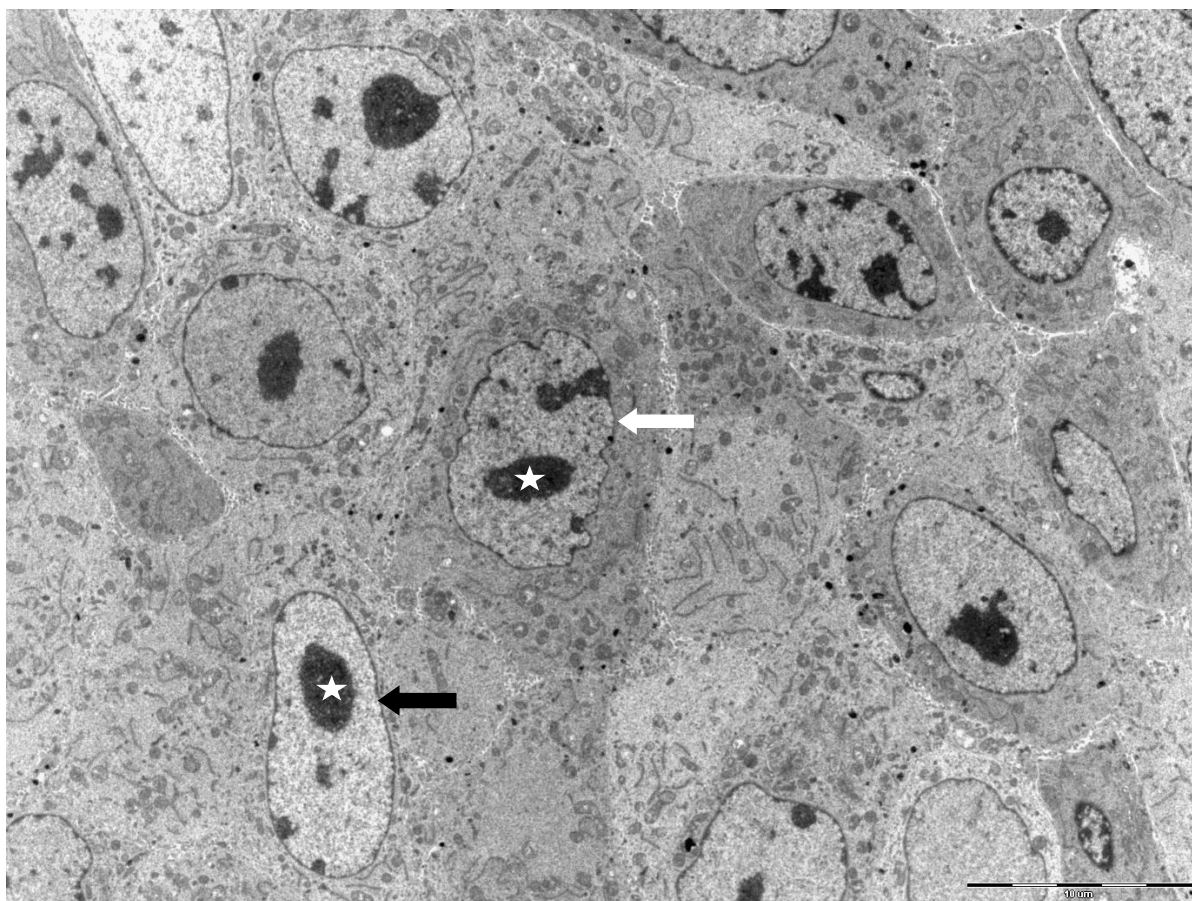
4.3 Vzorky odebrané po 24 hodinách

Jevy pozorované během ultrastrukturální analýzy vzorků odebraných po 24 hodinách od aplikace roztoků jsou shrnuty v tabulce V.

Tab.V: Nález v ultrastruktuře vzorků odebraných po 24 hodinách.

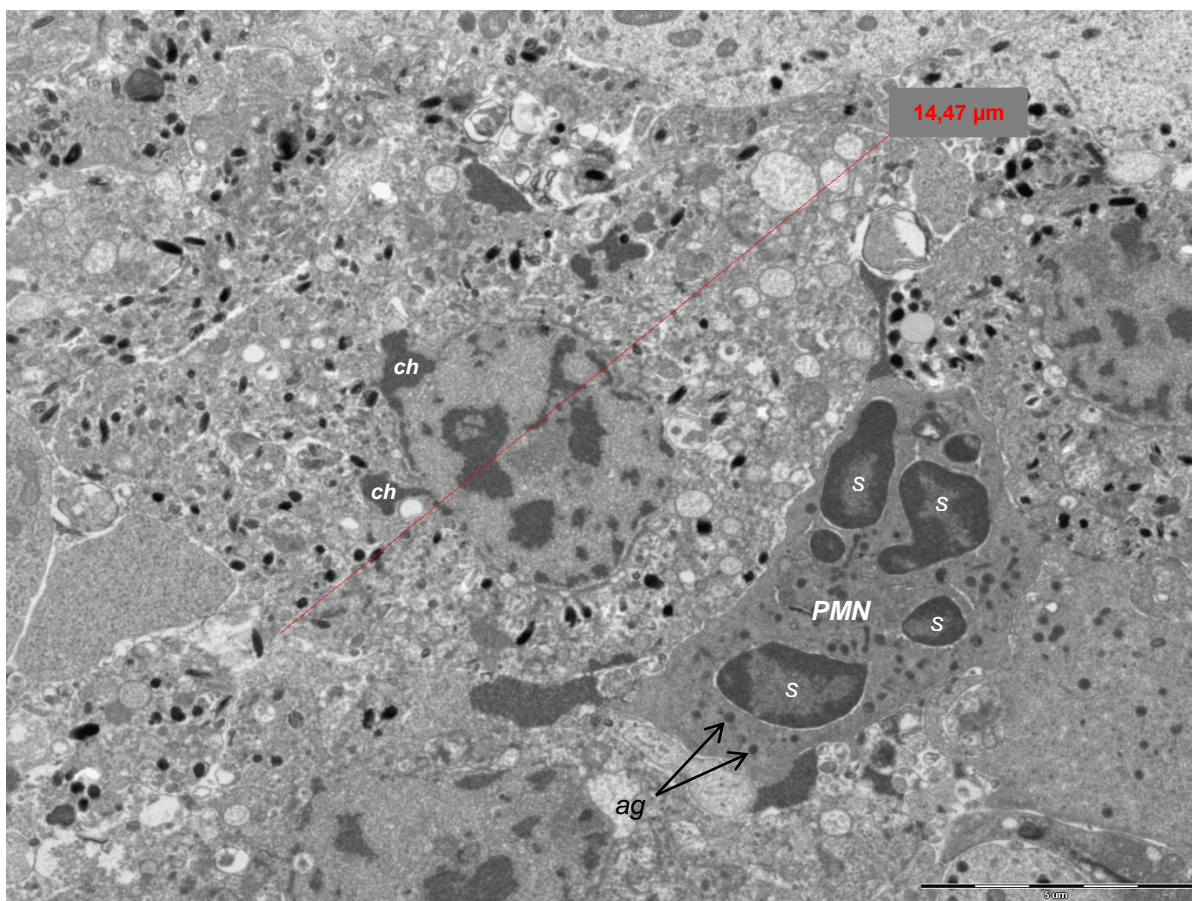
Vzorek	Infiltrát	Efektorový mechanismus neutrofilů			Mechanismus buněčné smrti	
		fagocytóza	FF	NETs	nekróza	apoptóza
PBS	-	-	-	-	-	-
f-MLFKK-BAM+LPS	++++	+++	++	-	+++++	-

Z tabulky lze vyčíst, že u vzorku PBS (24 hod) nedošlo k žádné neutrofilní infiltraci a nádorové buňky tak nejevily jakékoli známky poškození. Vzorek je tedy srovnatelný se vzorky PBS, f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM (12 hod) a PBS, f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM (6 hod) a kontrolním vzorkem bez injikace. V tomto vzorku byly pozorovány melanocyty vyznačující se výrazným pleomorfismem typickým pro nádorové buňky, které se neliší pouze celkovým tvarem a velikostí, ale i různým vzhledem a velikostí jádra. Výrazná jsou také velká jádérka. Tyto melanocyty můžeme vidět na obrázku 5.



Obr.5: 24 hodin po aplikaci PBS. Pleomorfní nádorové buňky s velkými jádry, která mohou být zaoblená s plynulými liniemi (černá šipka) nebo s různě zakřiveným povrchem (bílá šipka), v jádrech jsou i výrazná, velká jádérka (hvězdy). (měřítko 10 µm).

U vzorku f-MLFKK-BAM+LPS (24 hod) došlo k nejvýraznějšímu pozorování frustrované fagocytózy nádorových buněk a fagocytózy větších, či menších shluků buněčného odpadu vyplňujícího extracelulární prostor mezi nekrotizujícími buňkami. U tohoto vzorku můžeme vidět frustrovanou fagocytózu zachycenou na obrázku 6. Vidíme neutrofil přichycený k nekrotické nádorové buňce, který vykazuje tvar pro exocytózu granul a "frustrovanou fagocytózu" typický. Bohužel nelze pozorovat granula v blízkosti buněčné membrány přiléhající k nádorové buňce, což by umožnilo specifitější určení. Potvrzení "frustrované fagocytózy" však podporuje velikost nádorové buňky, orientační přímka protínající buňku je délky 14, 47 μm . Na neutrofilu si také můžeme všimnout charakteristicky segmentovaného jádra a velkého množství elektrodenzních azurofilních granul v cytoplazmě. Nekróze nádorové buňky nasvědčuje cytoplazma vyplněná množstvím menších vakuol a pokročilé změny na jádře s kondenzovaným chromatinem uvolňujícím se díky porušené jaderné membráně do cytoplazmy.



Obr.6: 24 hodin po aplikaci f-MLFKK-BAM+LPS. Neutrofil (*PMN*), s typicky segmentovaným jádrem (*s*) a množstvím azurofilních granul v cytoplasmě (*ag*), vykazující znaky "frustrované fagocytózy" nádorové buňky. Nádorová buňka (*černá šipka*) podléhající nekróze s velkým množstvím vakuol v cytoplasmě a značně degradovaným jádrem, jehož obsah vytéká do cytoplasmy buňky (*ch*) (měřítko 5 μm).

4.4 Shrnutí vlivu použitých roztoků na mikroprostředí melanomu B16-F10

PBS, f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM nevedly v žádném čase k infiltraci nádoru neutrofilů a tedy ani žádným změnám na nádorových buňkách. Ultrastruktura těchto vzorků odpovídala vzorku kontrolnímu, bez zásahu jehlou.

U f-MLF byla teprve po 12 hodinách sledována slabší infiltrace neutrofilů, která však nevedla k nijak výrazným změnám v ultrastruktuře nádoru.

LPS se osvědčil jako vhodný chemoatraktant. Samostatně a ve spojení s H-MLFKK-BAM a f-MLF indukoval infiltraci nádoru neutrofilů a byla pozorována nekróza nádorových buněk, ovšem z mechanismů působení neutrofilů byla zjištěna pouze fagocytóza.

Kombinace f-MLFKK-BAM ve spojení s LPS vedla k nejmohutnější infiltraci nádoru neutrofily a umožnila sledování fagocytózy i frustrované fagocytózy ve spojení s pokročilou nekrózou nádorových buněk.

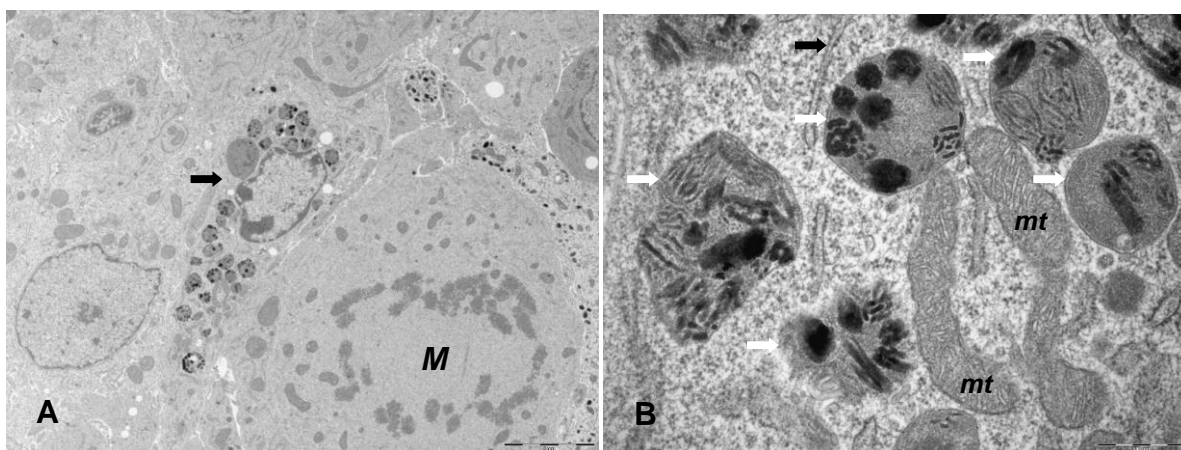
NETs nebyly u žádného z použitých roztoků v žádném čase pozorovány.

4.5 Další jevy pozorované při ultrastrukturální analýze melanomu B16-F10

V průběhu ultrastrukturální analýzy melanomu B16-F10 byly často pozorovaným jevem melanomové buňky v mitóze.

Zajímavými pozorovanými strukturami byly ovšem tzv. složené melanozomy (z. angl. *compound melanosomes*). Tyto váčky, obsahující více či méně melanosomů, jsou výsledkem procesu autofagie.

Buňku v mitóze (anafáze) a složené melanozomy můžeme vidět na obrázku 7.



Obr.7: 6 hodin od aplikace H-MLFKK-BAM. (A) Nádorová buňka obsahující velké množství složených melanozomů v cytoplazmě (černá šipka). Mitotická nádorová buňka v anafázi (M) (měřítko 5 μm). (B) Složené melanozomy (bílá šipka), mitochondrie (mt) a hrubé endoplazmatické retikulum (černá šipka) (měřítko 0,5 μm)

5 Diskuze

Využití agonistů TLR receptorů v nádorové terapii je již několik let předmětem řady výzkumů. Uvažuje se jejich využití jak samostatně, tak jako adjuvantů. V současnosti probíhají výzkumy např. s BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), MPL (*monophosphoryl lipid A*) a imiquimod (Vacchelli a kol, 2012). Tato bakalářská práce je založena na využití agonistů TLR receptorů ve spojení s ligandy fagocytárních receptorů, dosavadní výsledky této studie byly publikovány v práci Janotové a kol. (2014). Využití směsi kotveného f-MLF v kombinaci s LPS jako terapeutika se ve svých pracích zabývaly Čunátová (2012), Caisová (2013) a Vácová (2013).

Ultrastrukturální analýza melanomu B16-F10 byla provedena v návaznosti na histologické studie Kovářové (2013), Sváčkové (2013) a Divoké (2014). Tyto práce ukazují, že v případě aplikace terapeutických roztoků (kotvený ligand fagocytárních receptorů + agonista TLR receptorů) dochází k významné granulocytární infiltraci v nádorové tkáni a úbytku nádorové masy v důsledku rozsáhlé nekrózy.

Hlavním cílem ultrastrukturální analýzy bylo sledování mechanismů působení neutrofilů na nádorové buňky po i.t. aplikaci směsi f-MLFKK-BAM s LPS. To podmiňovalo nastudování základní ultrastruktury nádorových buněk a neutrofilů a seznámení se se změnami na buňkách, které provázejí nekrózu a apoptózu. Tyto ultrastrukturální změny byly porovnávány např. s prací Berningausena a Leippe (1997), která současně uvádí změny buněčné ultrastrukturyprovázející nekrózu a apoptózu, s pracemi Pitiraka a kol. (1996) a Rydell-Törmannen a kol. (2006) sledující neutrofile podléhající apoptóze a s pracemi Brinkmanna a kol. (2004) a Fuchse a kol. (2007), zabývajícími se NETs (*neutrophil extracellular traps*). Cenným rádcem při popisu pozorované ultrastruktury bylo rozsáhlé dílo *Ultrastructural Pathology* (Chevill, 2009).

Výsledky analýzy jednotlivých vzorků prostřednictvím TEM odpovídají z hlediska infiltrace neutrofilů a sledované nekrózy výsledkům již zmíněných histologických studií (Sváčková, 2013; Kovářová, 2013; Divoká, 2014).

U vzorků odebraných po 6 hodinách od aplikace roztoků bylo pozorováno jen několik málo neutrofilů, a to pouze v případě f-MLFKK-BAM s LPS, H-MLFKK-BAM s LPS, f-MLF s LPS a samotného LPS. Naprostá většina nádorových buněk nejevila známky poškození.

Vzorky odebrané po 12hodinách od aplikace roztoků, a to f-MLFKK-BAM s LPS, H-MLFKK-BAM, f-MLF s LPS a LPS, byly již z hlediska ultrastrukturálních změn atraktivnější. U jmenovaných vzorků bylo sledováno větší množství neutrofilů, nekrotické nádorové buňky a fagocytóza.

Největší množství neutrofilů společně s pokročilými nekrotickými změnami nádorových buněk bylo sledováno u vzorku obsahujícího směs f-MLFKK-BAM + LPS, odebraného po 24 hodinách od injekce. Během analýzy tohoto vzorku byla zaznamenána frustrovaná fagocytóza nádorové buňky. Skutečnost, že jde o frustrovanou fagocytózu, podporuje velikost nádorové buňky. Na základě pozorování Heranta a kol. (2006) neutrofil již není schopen fagocytovat struktury o průměru 11,2 μm . Rozložení granul v těsné blízkosti cytoplazmatické membrány neutrofilu nebylo v tomto případě pozorováno (Mitchell a kol., 2008).

Stran mechanismů buněčné smrti lze říct, že nádorové buňky po kontaktu s neutrofilly jednoznačně podléhají nekróze (Berningausena a Leippe, 1997; Cheville 2009). U neutrofilů se jako pravděpodobnější jeví apoptóza (Pitrak a kol., 1996; Rydell-Törmannen a kol., 2006). U vzorku odebraného 12 hod od aplikace f-MLF byl pořízen fotografický záznam řezu nádorovou buňkou obsahující v cytoplazmě fagozomy s buňkami v terminální fázi apoptózy. Jako chemoatraktant f-MLF vede jen ke slabé infiltraci nádoru neutrofilly (Janotová a kol., 2014). Malé množství neutrofilů evidentně není schopné nádor nějak významně poškodit a pravděpodobně dochází k fagocytóze neutrofilů nádorovými buňkami, označované jako "kanibalismus" (Caruso a kol., 2012).

Výsledky práce Fáberové (*in prep.*) a Berger-Achituva (2013) poukazují na přítomnost tzv. NETs v nádorové tkáni. Tyto struktury nebyly během této ultrastrukturální analýzy pozorovány.

Zajímavým jevem v ultrastruktuře melanomu byly tzv. složené melanozomy, jež jsou výsledkem autofagie (Nakagawa a kol., 1984; Cheville, 2009)

V případě vzorků pro odběr po 24 hodinách od aplikace byly na základně dřívějších výsledků (neuveďeno) použity pouze čisté PBS pro jeden vzorek a směs f-MLFKK-BAM s LPS pro druhý vzorek s úmyslem dodatečného potvrzení předešlých výsledků. Během dřívějšího pozorování byla totiž u vzorku s f-MLFKK-BAM v kombinaci s LPS sledována natolik rozsáhlá a pokročilá nekróza, že téměř nebylo možné rozlišit jednotlivé buňky. V tomto pokusu se ovšem právě vzorek s f-MLFKK-BAM s LPS odebraný po 24 hodinách

osvědčil jako nejvhodnější pro sledování mechanismů působení neutrofilů a je proto třeba nutně zvážit jeho stálé začlenění do pokusu se současným zařazením všech kontrol.

Vzhledem k velikosti odebraných vzorků ve srovnání s celým nádorem nebylo provedeno žádné statistické vyhodnocení dat jako v případě histologických hodnocení (Sváčková, 2013; Kovářová, 2013; Divoká, 2014). Bylo pouze sledováno, zda pozorovaná ultrastruktura je či není v souladu s histologickými výsledky.

Pro další provedení ultrastrukturální analýzy nádoru je nutné nalézt vhodnější postup pro počáteční odběr vzorků. V tomto pokusu byl proveden zkušební odběr pomocí žiletky, skalpelu a veterinární jehly určené pro kožní biopsii (*Kruuse*, 3 mm). Z těchto tří nástrojů se paradoxně nejlépe osvědčila obyčejná žiletka. Odběr vzorku byl ovšem i tak velmi zdoluhavý a dosti těžkopádný. Tímto způsobem bylo možné odebrat pouze jediný vzorek, jelikož se během práce zbytek nádoru znehodnotil. Výsledky histologických studií (Sváčková, 2013; Kovářová, 2013; Divoká, 2014) jasně ukazují, že infiltrace nádoru neutrofilů není rovnoměrná, a tudíž by bylo vhodné z jednoho nádoru odebrat vzorků více. Dalším důvodem pro nalezení vhodnější metody odběru vzorku je i skutečnost, že doba uplynulá od usmrcení myši po vložení vzorku nádoru do fixačního roztoku by měla být co nejkratší, aby se zamezilo vzniku artefaktů a zkreslení výsledků.

Jako vhodnější pro sledování mechanismů působení neutrofilů na nádorové buňky bych zvolila *in vitro* experimenty, kdy je možnost si uměle stanovit podmínky, především ve smyslu množství neutrofilů k množství nádorových buněk. Tuto suspenzi bych následně nechala zafixovat zmrazením metodou *High Pressure Freezing*, která podstatně lépe zachová buněčnou ultrastrukturu (Lonsdale a kol., 1999). Ultrastrukturální analýzou samotného nádoru bych pak takto získané výsledky doplnila.

6 Závěr

- největší protinádorový účinek byl zjištěn v případě terapie pomocí f-MLFKK-BAM s LPS, kde byly zaznamenány nádorové buňky v pokročilém stádiu nekrózy, fagocytóza nekrotických zbytků nádorových buněk neutrofilů a také "frustrovaná fagocytóza" nádorových buněk.
- aplikace volného f-MLF vyvolá slabou infiltraci nádoru neutrofilů, která však na nádorové mikroprostředí nemá zásadní dopad a apoptotické neutrofilů jsou nádorovými buňkami fagocytovány.
- NETs (*neutrophil extracellular traps*) nebyly zaznamenány.
- byl dokumentován výrazný pleomorfismus nádorových buněk.
- pro další práci je třeba modifikovat metodu excize vzorku.

7 Seznam použité literatury

- Abdallah D. S. A., Egan Ch. E., Butcher B. A., Denkers E. Y., 2011. Mouse neutrophils are professional antigenpresentingcells programmed to instruct T_h1 and T_h17 T-cell differentiation. *International Immunology*, 23: 317-326.
- Ahrens S., Zelenay S., Sancho D., Hanč P., Kjær S., Feest Ch., Fletcher G., Durkin Ch., Postigo A., Skehel M., Batista F., Thompson B., Way M., Sousa C. R., Schulz O., 2012. F-Actin is an evolutionarily conserveddamage-associated molecular pattern recognizedby DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, 36: 635-645.
- Aoshiha K., Nagal A., Konno K., 1995. Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 872-877.
- Arnaout M. A., 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 75: 1037-1050.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801.
- Ariizumi K., Shen G-L., Shikano S., Xu S., Ritter R., Kumamoto T., Edelbaum D., Morita A., Bergstresser P. R., Takashima A., 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 20157-20167.
- Bainton D. F., Ullyot J. L., Farquhar M. G., 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and apecific granules. *The Journal of Experimental Medicine*, 134: 907-933.
- Balch Ch. M., Gershenwald J. E., Soong S-J., Thompson J. F., Atkins M. B., Byrd D. R., Buzaid A. C., Cochran A. J., Coit D. G., Ding S., Eggermont A. M., Flaherty K. T., Gimotty P. A., Kirkwood J. M., McMasters K. M., Mihm M. C., Morton D. L., Ross

- M. I., Sober A. J., Sondak V. K., 2009. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*, 27: 6199-6206.
- Banchereau J., Palucka A. K., Dhodapkar M., Burkeholder S., Taquet N., Rolland A., Taquet S., Coquery S., Wittkowski K. M., Bhardwaj N., Pineiro L., Steinman R., Fay J., 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Research*, 61: 6451-6458.
- Barton G. M., 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 413-420.
- Baskar R., Lee K. A., Yeo R., Yeoh K-W., 2012. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9: 193-199.
- Bell J. K., Botos I, Hall P. R., Askins J., Shiloach J., Segal D. M., Davies D. R., 2005. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *PNAS*, 102: 10976-10980.
- Bellamy W. T., Richter L., Sirjani D., Roxas C., Glinsmann-Gibson B., Frutiger Y., Grogan T. M., List A. F., 2001. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 97: 1427-1434.
- Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U. A., Kühn L. I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A., 2013. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in Immunology*, 4: 1-5.
- Berninghausen O., Leippe M., 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 65: 3615-3621.
- Bernstein Ch. N., Blanchard J. F., Kliewer E., Wajda A., 2001. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Cancer*, 91: 854-862.

- Bessou-Touya S., Picardo M., Maresca V., Surlève-Bazeille J-E., Pain C., Taïeb A., 1998. Chimeric human epidermal reconstruct to study the role of melanocytes and keratinocytes in pigmentation and photoprotection. *Journal of Investigative Dermatology*, 111: 1103-1108.
- Bodman-Smith K. B., Melendez A. J., Campbell I., Harrison P. T., Allen J. M., Rayens J. G., 2002. C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc γ RI). *Immunology*, 107: 252-260.
- Bonar A., Chmiela M., Rudnicka W., Rózsalska B., 2005. Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 53: 437-441.
- Borregaard N., Cowland J. B., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89: 3503-3521.
- Borregaard N., Kjeldsen L., Sengel H., Diamond M. S., Springer T. A., Anderson H. C., Kishimoto T. K., Bainton D. F., 1994. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology*, 56: 80-87.
- Brada M., Ford D., Ashley S., Bliss J. M., Crowley S., Mason M., Rajan B., Traish D., 1992. Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *BMJ*, 304:1343-1346.
- Brekke O-L., Christiansen D., Fure H., Fung M., Mollnes T. E., 2007. The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in *E. coli*-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. *Journal of Leukocyte Biology*, 81: 1404-1413.

- Bretz U., Baggiolini M., 1974. Biological and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Cell Biology*, 63: 251-269.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann Ch., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-1535.
- Caisová V., 2013. Použití agonistů FPR receptorů proterapii nádorových onemocnění. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Castell J. V., Gómez-Lechón M. J., David M., Andus T., Geiger T., Trullenque R., Fabra R., Heinrich P. C., 1989. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Letters*, 242: 237-239.
- Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A., Alber G., 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 184: 747-752.
- Clifford G. M., Smith J. S., Plummer M., Muñoz N., Franceschi S., 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88: 63-73.
- Coiffier B., Haioun C., Ketterer N., Engert A., Tilly H., Ma D., Johnson P., Lister A., Feuring-Buske M., Radford J. A., Capdeville R., Diehl V., Reyes F., 1998. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*, 92: 1927-1932.
- Coman D. L., 1946. The invasive character of cancer growth. *The American Journal of the Medical Sciences*, 211: 257-260.

- Čunátová Š., 2012. Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Dahl M. R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A. C., Christensen T., Vorup-Jensen T., Jensenius J. C., 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, 15: 127-135.
- Dallegri F., Frumento G., Ballestrero A., Goretti R., Patrone F., 1987. Relationship between antibody-dependent tumour cell lysis and primary granule exocytosis by human neutrophils. *Clinical and Experimental Immunology*, 70: 479-483.
- Danaei G., Vander Hoorn S., Lopez A. D., Murray Ch. J. L., Ezzati M., 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366: 1784-1793.
- DeLeo F. R., Allen L-A. H., Apicella M., Nauseef W. M., 1999. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 163: 6732-6740.
- Divoká P., 2014. Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Donato F., Tagger A., Gelatti U., Parrinello G., Boffetta P., Albertini A., Decarli A., Trevisi P., Ribero M. L., Martelli C., Porru S., Nardi G., 2002. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *American Journal of Epidemiology*, 155: 323-331.
- Dobrovina E. S., Dobrovin M. M., Vider E., Sisson R. B., O'Reilly R. J., Dupont B., Vyas Y. M., 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *The Journal of Immunology*, 171: 6891-6899.

- Esmann L, Idel Ch., Sarkar A., Hellberg L., Behnen M., Möller S., Zandbergen G., Klinger M., Köhl J., Bussmeyer U., Solbach W., Laskay T., 2010. Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *The Journal of Immunology*, 184: 391-400.
- Ezekowitz R. A. B., Day L. E., Herman G. A., 1988. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *The Journal of Experimental Medicine*, 167: 1034-1046.
- Ezekowitz R. A. B., Sastry K., Bailly P., Warner A., 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 172: 1785-1794.
- Ferrara N., 2005. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*, 69: 11-16.
- Foell D., Wittkowski H., Vogl T., Roth T., 2007. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of Leukocyte Biology*, 81: 28-37.
- Fu H., Karlsson J., Bylund J., Movitz Ch., Karlsson A., Dahlgren C., 2006. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 79: 247-256.
- Fuchs T. A., Abed U., Goosmann Ch., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch I., Brinkmann V., Zychlinsky A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176: 231-241.
- Gallin J. I., Fletcher M. P., Seligmann B. E., Hoffstein S., Cehrs K., Mounessa N., 1982. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response *Blood*, 59: 1317-1329.

- Garbe C., Büttner P., Weiß J., Soyer H. P., Stocker U., Krüger S., Roser M., Weckbecker J., Panizzon R., Bahmer F., Tilgen W., Guggenmoos-Holzmann I., Orfanos C. E., 1994. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *Journal of Investigative Dermatology*, 102: 695-699.
- Ghiringhelli F., Puig P. E., Roux S., Parcellier A., Schmitt E., Solary E., Kroemer G., Martin F., Chauffert B., Zitvogel L., 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*, 202: 919-929.
- Girardi M., Oppenheim D. E., Steel C. R., Lewis J. M., Glusac E., Filler R., Hobby P., Sutton B., Tigelaar R. E., Hayday A. C., 2001. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science*, 294: 605-609.
- Girardin S. E., Travassos L. H., Herve M., Blanot D., Boneca I. G., Philpott D. J., Sansonetti P. J., Mengin-Lecreulx D., 2003. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 41702-41708.
- Gollob J. A., Sciambi C. J., Huang Z., Dressman H. K., 2005. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN- γ . *Cancer Research*, 65: 8869-8877.
- Greene H. S. N., Harvey E. K., 1964. The relationship between the dissemination of tumor cells and the distribution of metastases. *Cancer Research*, 24: 799-811.
- Groh V., Porcelli S., Fabbi M., Lanier L. L., Picker L. J., Anderson T., Warnke R. A., Bhan A. K., Strominger J. L., Brenner M. B., 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor $\gamma\delta$ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *The Journal of Experimental Medicine*, 169: 1277-1294.

- Guimarães-Costa A. B., Nascimento M. T. C., Fromenta G. S., Soares R. P. P., Morgado F. N., Conceição-Silva F., Saraiva E. M., 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induced are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS*, 106: 6748-6753.
- Harvey M., Vogel H., Lee E. Y-H. P., Bradley A., Donehower L. A., 1995. Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Research*, 55: 1146-1151.
- Hearing V. J., Ekel T. M., 1976. Mammalian tyrosinase: a comparison of tyrosinase hydroxylation and melanin formation. *Biochemical Journal*, 157: 549-557.
- Herant M., Heinrich V., Dembo M., 2006. Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *Journal of Cell Science*, 119: 1903-1913.
- Hibbs M. S., Hasty K. A., Seyer J. M., Kang A. H., Mainardin C. L., 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 2493-2500.
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdörfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G., 2002. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168: 4531-4537.
- Chen Z., Malhotra P. S., Thomas G. R., Ondrey F. G., Duffey D. C., Smith C. W., Enamorado I., Yeh N. T., Kroog G. S., Rudy S., McCullagh L., Mousa S., Quezado M., Herscher L. L., Waes C. V., 1999. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck Cancer. *Clinical Cancer Research*, 5: 1369-1379.
- Cheville N. F., 2009. Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease. *Second edition. Wiley-Blackwell*, 1000 s.

- Chlebowski R. T., Hendrix S. L., Langer R. D., Stefanick M. L., Gass M., Lane D., Rodabough R. J., Gilligan M. A., Cyr M. G., Thompson C. A., Khandekar J., Petrowitch H., McTiernan A., 2003. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women. *The Journal of the American Medical Association*, 289: 3243-3253.
- Jack D. L., Lee M. E., Turner M. W., Klein N. J., Read R. C., 2004. Mannose-binding lectin enhances phagocytosis and killing of *Neisseria meningitidis* by human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 77: 328-336.
- Janotová T., Jalovecká M., Auerová M., Švecová I., Bruzlová P., Maierová V., Kumžáková Z., Čunátová Š., Vlčková Z., Caisová V., Rozsypalová P., Lukáčová K., Vácová N., Wachtlová M., Salát J., Lieskovská J., Kopecký J., Ženka J., 2014. The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PLOS ONE*, 9: 1-14.
- Jethwaney D., Islam M. R., Leidal K. G., Bernabe D. B-V., Campbell K. P., Nauseef W. M., Gibson B. W., 2007. Proteomic analysis of plasma membrane and secretory vesicles from human neutrophils. *Proteome Science*, 5: 1-15.
- Kato K., Itoh C., Yasukouchi T., Nagamune T., 2004. Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethyleneglycol) derivatives. *Biotechnology Progress*. 20: 897-904.
- Kim R., Emi M., Tanabe K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121: 1-14.
- Kirkwood J. M., Ibrahim J. G., Sosman J. A., Sondak V. A., Agarwala S. S., Ernstoff M. S., Rao U., 2001. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 2370-2380.

- Kjeldsen L., Sengelsv H., Lollike K., Nielsen M. H., Borregaard N., 1994. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood*, 83: 1640-1649.
- Kolaczowska E., Kubes P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13: 159-175.
- Kovacsovic-Bankowski M., Clark K., Benacerraf B., Rock K. L., 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Immunology*, 90: 4942-4946.
- Kovářová M., 2013. Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Kowanko I. C., Ferrante A., 1987. Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon-gamma. *Immunology*, 62: 149-151.
- Kruman I. I., Mattson M. P., 1999. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *Journal of Neurochemistry*, 72: 529-540.
- Lamping N., Dettmer R., Schröder N. W. J., Pfeil D., Hallatschek W., Burger R., Schumann R. R., 1998. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 101: 2065-2071.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J-M., Hoffmann J. A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973-983.
- Lennartz M. R., Wileman T. E., Stahl P. D., 1987. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages. *Biochemical Journal*, 245: 705-711.

- Li Y., Sharov V. G., Jiang N., Zaloga C., Sabbah H. N., Chopp M., 1995. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *The American Journal of Pathology*, 146: 1045-1051.
- Lonsdale J. E., McDonald K. L., Jones R. L., 1999. High pressure freezing and freeze substitution reveal new aspects of fine structure and maintain protein antigenicity in barley aleurone cells. *The Plant Journal*, 17: 221-229.
- Lowenfels A. B., Maisonneuve P., Cavallini G., Ammann R. W., Lankisch P. G., Andersen J. R., Dimagno E. P., Andr n-Sandberg  ., Domell f L., 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 328: 1433-1437.
- Lu H., Shu X., Cui Y., Kataoka N., Wen W., Cai Q., Ruan Z., Gao Y., Zheng W., 2005. Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Research*, 65: 5015-5019.
- MacDonald G., Shi L., Velde Ch. V., Lieberman J., Greenberg A. H., 1999. Mitochondria-dependent and -independent regulation of granzyme B-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 189: 131-143.
- Magnusson S., Berg T., 1989. Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. *Biochemical Journal*, 257: 651-656.
- Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A. H., Jonuleit H., 2002. Special feature: immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*, 80: 477-483.
- Marzo A. L., Lake R. A., Lo D., Sherman L., McWilliam A., Nelson D., Robinson B. W. S., Scott B., 1999. Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 162: 5838-5845.
- McDonald B., Urrutia R., Yipp B. G., Jenne C. N., Kubes P., 2012. Intravascular neutrophil extracellular trap capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host and Microbe*, 12: 324-333.

- McGowern V. J., Mihm M. C., Bailly Ch., Booth J. C., Clark W. H., Cochran A. J., Hardy E. G., Hicks J. D., Levene A., Lewis M. G., Little J. H., Milton G. W., 1973. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer*, 32: 1446-1457.
- Mevorach D., Mascarenhas J. O., Gershov D., Elkon K. B., 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 188: 2313-2320.
- Mitchell T., Lo A., Logan M. R., Lacy P., Eitzen G., 2008. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. *American Journal of Physiology*, 295: 1354-1365.
- Munn D. H., Cheung N-K. V., 1990. Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 172: 231-237.
- Munro J. M., Pober J. S., Cotran R. S., 1989. Tumor necrosis factor and interferon- γ induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *The American Journal of Pathology*, 135: 121-133.
- Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., Veer C., Penton-Rol G., Ruco L. P., Allavena P., Mantovani A., 2000. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 164: 5998-6004.
- Nadler L. M., Stashenko P., Hardy R., Kaplan W. D., Button L. N., Kufe D. W., Antman K. H., Schlossman S. F., 1980. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Research*, 40: 3147-3154.
- Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A., Saigenji K., Nagura H., Ontani H., 1998. CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research*, 58: 3491-3494.

- Nakagawa H., Hori Y., Sato S., Fitzpatrick T. B., Martuza R. L., 1984. The nature and origin of the melanin macroglobule. *Journal of Investigative Dermatology*, 83: 134-139.
- Negrier S., Escudier B., Lasset Ch., Douillard J-Y., Savary J., Chevreau Ch., Ravaud A., Meractello A., Peny J., Mousseau M., Philip T., Tursz T., 1998. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 338: 1272-1278.
- Noguchi M., Hirohashi S., Hara F., Kojima A., Shimosato Y., Shinkai T., Tsuchiya R., 1990. Heterogenous amplification of *myc* family oncogenes in small cell lung carcinoma. *Cancer*, 66: 2053-2058.
- Nygren P., 2001. What is cancer chemotherapy?. *Acta Oncologica*, 40: 166-171.
- Ohminami H., Yasukawa M., Fujita S., 2000. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*, 95: 286-293.
- Ohnishia H., Tochiob H., Katoa Z., Oriia K. E., Lia A., Kimuraa T., Hiroakie H., Kondoa N., Shirakawab M., 2009. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *PNAS*, 106: 10260-10265.
- Osmand A. P., Mortensen R. F., Siegel J., Gewurz H., 1975. Interactions od C-reactive protein with the complement system. III. Complement-dependent passive hemolysis initiated by CRP. *The Journal of Experimental Medicine*, 142: 1065-1077.
- Oyama T., Ran S., Ishida T., Nadaf S., Kerr L., Carbone D. P., Gabrilovich D. I., 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cellmaturation through the inhibition of nuclear factor-κB activation in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of Immunology*, 160: 1224-1232.
- Patton E. E., Widlund H. R., Kutok J. L., Kopani K. R., Amatruda J. F., Murphey R. D., Berghmans S., Mayhall E. A., Traver D., Fletcher Ch. D. M., Aster J. C., Granter S.

- C., Look A., Lee Ch., Fisher D. E., Zon L. I., 2005. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current Biology*, 15: 249-254.
- Pende D., Cantoni C., Rivera P., Vitale M., Castriconi R., Marcenaro S., Nanni M., Biassoni R., Bottino C., Moretta A., Moretta L., 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of non epithelial origin. *European Journal of Immunology*, 31: 1076-1086.
- Pillay J., Braber I., Vrisekoop N., Kwast L. M., Boer R. J., Borghans J. A. M., Tesselaar K., Koenderman L., 2010. In vivo labeling with H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116: 625-627.
- Pitrak D. L., Tsai H. Ch., Mullane K. M., Sutton S. H., Stevens P., 1996. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 98: 2714-2719.
- Pooley J. L., Heath W. R., Shortman K., 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 166: 5327-5330.
- Popescu N. C., Amsbaugh S. C., Milo G., DiPaolo J. A., 1986. Chromosome alterations associated with in vitro exposure of human fibroblasts to chemical or physical carcinogens. *Cancer Research*, 46: 4720-4725.
- Proell M., Riedl S. J., Fritz J. H., Rojas A. M., Schwarzenbacher R., 2008. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLOS ONE*, 3: 1-11.
- Propper D. J., Chao D., Braybrooke J. P., Bahl P., Thavasu P., Balkwill F., Turley H., Dobbs N., Gatter K., Talbot D. C., Harris A. L., Ganesan T. S., 2003. Low-dose IFN- γ induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 9: 84-92.

- Puig S., Ruiz A., Lazaro C., Castel T., Lynch M., Palou J., Vilalta A., Weissenbach J., Mascaro J-M., Estivill X., 1995. Chromosome 9p deletions in cutaneous malignant melanomatumors: the minimal deleted region involves markers outside the p16 (CDKN2) gene. *The American Journal of Human Genetics*, 57: 395-402.
- Qin Z., Schwartzkopff J., Pradera F., Kammertoens T., Seliger B., Pircher H., Blankenstein T., 2003. A critical requirement of Interferon γ -mediated angiostasis for tumor rejection by CD8⁺ T cells. *Cancer Research*, 63: 4095-4100.
- Quehenberger O., Prossnitz E. R., Cavanagh S. L., Cochrane Ch. G., Ye R. D., 1993. Multiple domains of the N-formyl peptide receptor are required for high-affinity ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 18167-18175.
- Ramm L. E., Whitlow M. B., Mayer M. M., 1982. Transmembrane channel formation by complement: functional analysis of the number of C5b6, C7, C8, and C9 molecules required for a single channel. *Immunology*, 79: 4751-4755.
- Rigel D. S., Carruci J. A., 2000. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 50: 215-236.
- Rodriguez P. C., Quiceno D. G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A. H., Piazuelo M. B., Delgado A., Correa P., Brayer J., Sotomayor E. M., Antonia S., Ochoa J. B., Ochoa A. C., 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research*, 64: 5839-5849.
- Romero R., Chaiworapongsa T., Savasan Z. A., Xu Y., Hussein Y., Dong Z., Kusanovic J. P., Kim Ch. J., Hassan S. S., 2011. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: a study of the alarmin HMGB1. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 24: 1444-1455
- Rosenberg S. A., Lotze M. T., Yang J. C., Aebersold P. M., Linehan W. M., Seipp C. A., White D. E., 1989. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Annals of Surgery*, 210: 474-485.

- Rousset F., Garcia E., Defrance T., Pérrone C., Vezzio N., Hsu D-H., Kastelein R., Mooreo K. W., Banchereau J., 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *PNAS*, 89: 1890-1893.
- Rydell-Törmänen K., Uller L., Erjefält J. S., 2006. Neutrophil cannibalism - a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Respiratory Research*, 7: 1-7.
- Sayers T. J., Brooks A. D., Seki N., Smyth M. J., Yagita H., Blazar B. R., Malyguine A. M., 2000. T cell lysis of murine renal cancer: multiple signaling pathways for cell death via Fas. *Journal of Leukocyte Biology*, 68: 81-86.
- Schiffmann E., Corcoran B. A., Wahl S. M., 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *PNAS*, 72: 1059-1062.
- Schulz-Ertner D., Nikoghosyan A., Diding B., Münter M., Jäkel O., Karger Ch. P., Debus J., 2005. Therapy strategies for locally advanced adenoid cystic carcinomas using modern radiation therapy techniques. *Cancer*, 104: 338-344.
- Singh R., Paterson Y., 2007. Immunoediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy. *Cancer Research*, 67: 1887-1892.
- Slamon D., Eiermann W., Robert N., Pienkowski T., Martin M., Press M., Mackey J., Glaspy J., Chan A., Pawlicki M., Pinter T., Valero V., Liu M-Ch., Sauter G., Minckwitz G., Visco F., Bee V., Buyse M., Bendahmane B., Tabah-Fisch I., Lindsay M-A., Riva A., Crown J., 2011. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 365: 1273-1283.
- Smyth M. J., Taniguchi M., Street S. E. A., 2000. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *The Journal of Immunology*, 165: 2665-2670.
- Song E., Chen J., Ouyang N., Su F., Wang M., Heemann U., 2001. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *British Journal of Cancer*, 85: 1047-1054.

- Sørensen O. E., Thapa D. R., Roupé K. M., Valore E. V., Sjöbring U., Roberts A. A., Schmidtchen A., Ganz T., 2006. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by trans activation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 116: 1878-1885.
- Sváčková D., 2013. Nádorová imunoterapie založená na kombinaci LPS a vázaného Zymosanu A. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Takeda K., Akira S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17: 1-14.
- Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11: 443-451.
- Tan M. C. A. A., Mommaas A. M., Drijfhout J. W., Jordens R., Onderwater J. J. M., Verwoerd D., Mulder A. A., Heiden A. N., Scheidegger D., Oomen L. C. J. M., Ottenhoff T. H. M., Tulp A., Neefjes J. J., Koning F., 1997. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 27: 2426-2435.
- Taniguchi S., Kawano T., Kakunaga T., Baba T., 1986. Differences in expression of a variant actin between low and high metastatic B16 melanoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 6100-6106.
- Taylor M. E., Bezouška K., Drickam K., 1992. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 1719-1726.
- Taylor P. R., Brown G. D., Reid D. M., Willment J. A., Martinez-Pomares L., Gordon S., Wong S. Y. C., 2002. The β -Glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed

- on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *The Journal of Immunology*, 169: 3876-3882.
- Tewari M., Dixit V. M., 1995. Fas- and tumour necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus *crmA* gene product. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 3255-3260.
- Thompson D., Pepys M. B., Wood S. P., 1999. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7: 169-177.
- Trinchieri G., Santoli D., 1978. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumour-derived or virus-transformed cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 147: 1314-1333.
- Urban C. F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A., 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8: 668-676.
- Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Fridman W. H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G., 2012. Trial watch FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *OncoImmunology*, 1: 894-907.
- Vácová N., 2013. Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Wall L., Burke F., Barton C., Smyth J., Balkwill F., 2003. IFN- γ induces apoptosis in ovarian cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Clinical Cancer Research*, 9: 2487-2496.
- Watson N. F. S., Ramage J. M., Madjd Z., Spendlove I., Ellis I. O., Scholefield J. H., Durrant L. G., 2006. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *International Journal of Cancer*, 118: 6-10.

- Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P., Fenaux P., 1994. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84: 3148-3157.
- Weinberg R. A., 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*, 49: 3713-3721.
- Weissmann G., Zurier R. B., Hoffstein S., 1972. Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. *The American Journal of Pathology*, 68: 539-564.
- Welling M. W., Hiemstra P. S., Barselaar M., Paulusma-Annema A., Nibbering P. H., Pauwels E. K. J., Calame W., 1998. Antibacterial activity of human neutrophil defensins in experimental infections in mice is accompanied by increased leukocyte accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 102: 1583-1590.
- Wetering J. K., Golde L. M. G., Batenburg J. J., 2004. Collectins: players of the innate immune system. *European Journal of Immunology*, 271: 1229-1249.
- Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X-F., Achong M. K., 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 101: 311-320.
- Yaar M., Gilchrist B. A., 1991. Human melanocyte growth and differentiation: a decade of new data. *Journal of Investigative Dermatology*. 97: 611-617.
- Young J. D-E., Damiano A., Dinome M. A., Leong L. G., Cohn Z. A., 1987. Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin). *The Journal of Experimental Medicine*, 165: 1371-1382.
- Xia Y., Ross G. D., 1999. Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional β -glucan-binding lectin site of CR3 (CD11b/CD18). *The Journal of Immunology*, 162: 7285-7293.

Xia Y., Větvička V., Yan J., Hanikýřová M., Mayadas T., Ross G. D., 1999. The β -glucan-binding lectin site of mouse CR3(CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *The Journal of Immunology*, 162: 2281-2290.

Zurier R. B., Weissmann G., Hoffstein S., Kammerman S., Tai H. H., 1974. Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes II. Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists, and agents which affect microtubule function. *The Journal of Clinical Investigation*, 53: 297-309.