

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii

Diplomová práce

Bc. Markéta Kovářová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Kovářová, M., 2015: Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii. [The use of neutrophils in cancer immunotherapy Mgr. Thesis, in Czech.] – 80 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to investigate the possible role of neutrophil granulocytes in antitumor reactions. Most of our experiments were focused on in vitro studies assessing the cytotoxic effect of mouse neutrophils on B16-F10 melanoma cells labelled with PAMPs. We put an emphasis on activation and generating a prime state of neutrophils. Moreover, a release rate of enzyme myeloperoxidase from azurophil granules was detected as a marker of neutrophil degranulation. We also attempted to attract neutrophils into tumor microenvironment using thioglycolate medium and its main compound casein.

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

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

V Českých Budějovicích 15.4.2015

.....
Bc. Markéta Kovářová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za svědomité vedení mé diplomové práce, za jeho profesionální a zároveň přátelský přístup, ochotu kdykoliv pomoci i za cenné rady a připomínky, které mi v průběhu spolupráce udělil. Rovněž děkuji celému Oddělení medicínské biologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí a svým kolegyním za bezproblémovou spolupráci. Velké díky patří i mé rodině a partnerovi za trpělivost a nepostradatelnou oporu, které se mi po celou dobu studia dostávalo.

1. Úvod.....	1
1.1. Charakteristika nádorového onemocnění	2
1.1.1. Příčiny vzniku nádorů.....	2
1.1.1.1. Protoonkogeny a antionkogeny	2
1.1.1.2. Karcinogenní agens.....	3
1.2. Možnosti terapie.....	3
1.3. Imunoterapie	4
1.3.1. Immunosurveillance a imunoeditace nádorů	4
1.3.2. Imunitní systém a protinádorová odpověď	5
1.3.2.1. Nádorové antigeny	6
1.3.2.2. Protinádorová imunitní odpověď	6
1.3.2.3. Imunosupresivní strategie nádorových buněk	8
1.3.3. Druhy imunoterapie	9
1.4. Imunoterapie založená na aktivaci složek vrozené imunity	10
1.4.1. Vývoj léčebných postupů.....	10
1.4.2. Vrozená imunita a mechanismy rozpoznávání.....	11
1.4.3. Beta glukany v roli PAMP	12
1.4.3.1. Laminarin	14
1.4.3.2. Manan.....	14
2.4.3.3. Zymosan.....	14
1.4.4. Receptory stimulované mikrobiálními komponenty	15
1.4.4.1. Komplement receptor 3.....	15
1.4.4.2. Dectin - 1	15
1.4.4.3. Lactosykeramid.....	16
1.4.4.4. Scavengerové receptory.....	16
1.4.4.5. MBL.....	16
1.4.4.6. Manósový receptor	16
1.5. Neutrofilý.....	17

1.5.1. Antimikrobiální mechanismy neutrofilů.....	17
1.5.1.1. Fagocytóza.....	18
1.5.1.2. Granula a degranulace.....	18
1.5.1.3. Produkce ROS	18
1.5.1.4. Tvorba NETs	19
1.5.2. Neutrofilý a nádory.....	19
2. Cíle práce.....	21
3. Materiály a metody	22
3.1. Výčet chemikálií	22
3.2. Laboratorní zvířata	23
3.3. Nádorová buněčná linie	23
3.4. Příprava nádorových buněk B16-F10 pro použití <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	23
3.5. Transplantace nádorových buněk.....	23
3.6. Izolace buněk z kostní dřeně.....	24
3.7. Magnetická separace	24
3.8. Sonikace.....	24
3.9. Měření a výpočet velikosti nádorů.....	25
3.10. Výpočet redukce nádorového růstu.....	25
3.11. Počítání plicních metastáz	25
3.12. Statistické vyhodnocení výsledků	25
3.13. Příprava terapeutických látek pro <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> experimenty	25
3.13.1. Příprava laminarinu-BAM	25
3.13.2. Příprava mananu-BAM.....	26
3.13.3. Příprava Zymosanu A a Zymosanu-SMCC	26
3.13.4. Příprava lysinu-BAM.....	26
3.13.5. Příprava redukčních činidel.....	26
3.13.6. Příprava thioglykolátového média.....	26
3.13.7. Priming neutrofilů.....	27
3.14. Jednotlivé experimenty	27
3.14.1. Optimalizace izolace neutrofilů z kostní dřeně (KD) a stanovení jejich čistoty.27	

3.14.1.1 Minimalizace ztrát neutrofilů	27
3.14.1.2. Stanovení čistoty neutrofilů na průtokovém cytometru	27
3.14.2. Pokus č. 1: Analýza nádorového infiltrátu pomocí průtokové cytometrie v průběhu terapie melanomu založené na použití Zymosanu-SMCC. <i>In vivo</i> experiment.	28
3.14.2.1. Zpracování nádorů	29
3.14.2.2. Analýza infiltrátu na průtokovém cytometru.	29
3.14.3. Pokus č. 2: <i>In vitro</i> cytotoxické působení naivních neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM/manan-BAM.	30
3.14.4. Pokus č. 3: <i>In vitro</i> cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM.	31
3.14.5. Pokus č. 4: <i>In vitro</i> cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené mannan-BAM.....	32
3.14.6. Pokus č. 5: Optimalizace aktivace neutrofilů pro <i>in vitro</i> cytotoxické působení na nádorové buňky značené mannan-BAM.....	33
3.14.7. Pokus č. 6: <i>In vitro</i> cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené Zymosan-SMCC.	33
3.14.8. Pokus č. 7: Stanovení míry degranulace neutrofilů pomocí MPO.	34
3.14.9. Pokus č.8: Chemoatrakce neutrofilů do mikroprostředí melanomu B16-F10. <i>In vivo</i> experiment.	35
3.14.10. Pokus č. 9: Terapie melanomu B16-F10 založená na použití manan-BAM a R-848. <i>In vivo</i> experiment.	36
4. Výsledky	37
4.1. Pokus č. 1.: Analýza nádorového infiltrátu pomocí průtokové cytometrie v průběhu terapie s použitím Zymosan-SMCC.....	37
4.2. Pokus č. 2: <i>In vitro</i> cytotoxické působení naivních neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM a manan-BAM.	42
4.3. Pokus č. 3: <i>In vitro</i> screening aktivace neutrofilů a jejich cytotoxicita vůči nádorovým buňkám značeným laminarin-BAM.....	43
4.4. Pokus č.4.: <i>In vitro</i> cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené manan-BAM.....	45

4.5. Pokus č. 5.: Optimalizace aktivace neutrofilů pro <i>in vitro</i> cytotoxické působení na nádorové buňky značené manan-BAM.	45
4.6. Pokus č. 6.: <i>In vitro</i> cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené Zymosan-SMCC.	46
4.7. Pokus č. 7: Stanovení míry degranulace neutrofilů pomocí MPO.	48
4.7.1. Stanovení aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostoru při interakci naivních neutrofilů s nádorovými buňkami značenými laminarin-BAM a manan-BAM.	48
4.7.2. Stanovení aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostoru při interakci primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými laminarin-BAM a manan-BAM.	49
4.7.3. Stanovení aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostoru při interakci primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými Zymosan-SMCC.	51
4.7.4. Stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru v nádorové tkáni po aplikaci kotveného Zymosanu, LPS a jejich směsi.	52
4.8. Pokus č. 8: Chemoatrakce neutrofilů do mikroprostředí melanomu B16-F10.	54
4.9. Pokus č. 9: Terapie melanomu B16-F10 založená na použití manan-BAM a R-848.	56
5. Diskuse	58
6. Závěr	66
7. Seznam použité literatury	67

1. Úvod

Vyhněte se kouření, nadměrné konzumaci alkoholu a dlouhému pobytu na slunci. Buďte fyzicky aktivní a jezte zdravě,... jedna z dvanácti doporučení pro prevenci rakoviny zveřejněná IARC (The International Agency for Research on Cancer) pod názvem European code against cancer. Snad každý v životě zaslechl některou z těchto frází. Jejich plný význam si ale mnohdy uvědomíme až ve spojení s následky. Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí v rozvinutých zemích. V roce 2012 bylo celosvětově zaznamenáno 14,1 milionů nových případů a 8,2 milionů nemocných rakovinou podlehl. (Cancer Research UK, 2014). Podle dosavadní vzrůstající tendence by se počet nově diagnostikovaných v roce 2030 blížil 22,5 milionům (Bray a kol., 2012). Riziko postižení se zvyšuje zejména v rozvinutých zemích vlivem stárnutí populace a přijímáním „rakovinu podporujícího“ stylu života zahrnujícího kouření, fyzickou inaktivitu a špatné stravování (Jemal a kol., 2011). Mezi nejčastěji diagnostikované malignity ve světě se řadí karcinom plic a prostaty u mužů a karcinom prsu a tlustého střeva u žen (Cancer Research UK, 2014).

Dnes víme, že 90 – 95% nádorů je způsobeno environmentálními faktory, tedy životním stylem jedince. Na zbývajících 5 – 10% se podílí dědičnost (Anand a kol., 2008). Kromě osvěty a prevence je zásadním krokem v boji s nádorovými onemocněními vyvinutí vhodné terapie. Tradiční způsoby léčby stagnují a pozornost odborníků se soustřeďuje na nové metody, které by zvýšily úspěšnost těch dosavadních, případně je i nahradily. Náš tým se vydal cestou nádorové imunoterapie založené na vrozené imunitě. Hlavní výhodou využití tělu vlastních obranných mechanismů spočívá v šetrnosti léčby, kdy nedochází k poškozování zdravých buněk. Předmětem této diplomové práce je navození ataku vrozené imunity proti myšimu melanomu a studium jejich interakce.

1.1. Charakteristika nádorového onemocnění

Z historického hlediska jsou nádorová onemocnění stará téměř jako lidstvo samo. První záznamy o nádoru jako nemoci se objevily již ve starověkých egyptských papyrech z roku 3000 př. n. l. (Hajdu, 2011). Strouhal (1976) toto potvrdil nálezem nádorů kostí i měkkých tkání v kosterních pozůstatcích.

Dnes definujeme nádorová onemocnění jako heterogenní skupinu chorob, které spojuje nekontrolovaná proliferace buněk. Tyto maligně transformované buňky získají během vícestupňové patogeneze šest základních vlastností. Obecně se jedná o defekty v regulačních mechanismech buněčného růstu a homeostázy, jsou jimi: soběstačnost v tvorbě růstových signálů, necitlivost vůči inhibitorům buněčného růstu, schopnost vyhnout se programované buněčné smrti – apoptóze, neomezený replikační potenciál, trvalá angiogeneze a schopnost invazivity a metastazování (Hanahan a Weinberg, 2000).

1.1.1. Příčiny vzniku nádorů

Rakovina vzniká z normálních buněk vlivem poškození DNA, takové buňky se pak začnou nekontrolovaně dělit a získají nesmrtelnost. Napříč historií narazíme na spoustu hypotéz snažících se mechanismus vzniku nádorového onemocnění přiblížit. Již Hipokrates zformuloval humorální teorii, založenou na nerovnováze tělních tekutin (krve, hlenu a žluči). Následovala teorie chronického dráždění a pourazová teorie, které spočívaly ve vzniku nádorů po poranění tkáně. Do 18. století si vědci dokonce mysleli, že rakovina je nakažlivá a přenášena parazity. Zlom nastal až v polovině dvacátého století, kdy začala být rakovina zkoumána jako komplexní problém i z hlediska chemie a biologie (Sudhakar, 2009). K rozřešení otázky vzniku nádorů zásadně přispěli Watson a Crick objevem helikální struktury DNA a také pokrok v oblasti molekulárně genetických metod. Následně se vědci soustředili na uspořádání genů a v sedmdesátých letech objevili 2 genové rodiny – protoonkogeny a antionkogeny a také prokázali, že k nádorovému bujení vede nahromadění mutace právě v těchto genech (Sudhakar, 2009).

1.1.1.1. Protoonkogeny a antionkogeny

Protoonkogeny za normálních okolností regulují proliferaci a stupeň diferenciace buněk. Kódují například růstové faktory a jejich receptory, transkripční faktory nebo receptory pro thyroïdní hormony. Vlivem změn v expresi a/nebo kódovací sekvenci jsou aktivovány na onkogeny, které dovolí zdravé buňce vymknout se kontrole růstu (Monier,

1990). Prvotní spojení mezi onkogeny a procesem karcinogeneze bylo odhaleno v roce 1982 při studiu dvou virálních onkogenů polyomaviru (Rassoulzadegan a kol., 1982).

Druhou skupinu představují antionkogeny, neboli tumor-supresorové geny, jejichž existence byla objevena fúzí normální buňky s nádorovou. Výsledná hybridní buňka nejevila známky tumorogenicity, jak prokázal Geiser (1986) při spojení buněk karcinomu močového měchýře s fibroblasty. Antionkogeny řídí buněčné dělení, reparaci DNA a vstup buňky do apoptózy, pokud jsou poškozeny, buňka může nekontrolovaně růst (Sudhakar, 2009).

1.1.1.2. Karcinogenní agens

Pro vznik mutací jsou důležité dva faktory: a) samotné léze v DNA, b) změny v mechanismech buněčného dělení, které umožní manifestaci poškozené DNA (Ames a Gold, 1997). Karcinogeny pak dělíme na genotoxické (působící na úrovni DNA) a ne-genotoxické (epigenetické). U genotoxických karcinogenů rozeznáváme 3 typy: Přímě působící karcinogeny interagující s DNA – například ethylen imin. Prokarcinogeny, které se aktivují metabolismem hostitele – vinyl chlorid, benzpyren. Poslední, anorganické karcinogeny, jako nikl nebo chrom, vyvolávají změny v replikaci DNA. Epigenetické karcinogeny, na rozdíl od svých protějšků, postrádají elektrofilní skupinu pro přímou interakci s DNA. Řadíme k nim např. hormony a imunosupresory (Williams, 2001). Jako možné biologické původce nádorů nesmíme opomenout infekční agens, zejména viry, které způsobují okolo 20ti% všech nádorů. Mezi nejznámější patří papilomaviry (karcinom děložního čípku), virus Epsteinova a Barrové (B-buněčné proliferace), viry hepatitidy B a C (hepatocelulární karcinom) a herpesvirus Kaposiho sarkomu. Viry mohou působit v několika rovinách: Buďto se integrují do genomu hostitele blízko protoonkogenů a aktivují jejich expresi, nebo produkty virových genů interagují s produkty tumor-supresorových genů a inaktivují je (Pagano a kol., 2004).

1.2. Možnosti terapie

K nejběžnějším terapeutickým postupům při léčbě nádorů patří chirurgické odstranění, radioterapie a chemoterapie, ať už samostatně nebo v kombinaci. Vedle těchto konvenčních metod narazíme i na nové metody, které je doplňují s cílem maximalizovat léčebné a snížit vedlejší účinky. Nejčastěji se používají ke zmenšení velikosti primárního tumoru před jeho odstraněním nebo ke snížení rizika rekurence.

Relativně netoxická a účinná je **hormonální terapie** založená na odstranění endokrinních žláz, podání inhibitorů syntézy hormonů nebo antagonistů hormonálních receptorů. Používá se při léčbě karcinomu prsu a prostaty, ale i vaječnicků, endometria a

sarkomu (Stokes a Chan, 2006). **Cílená terapie** spočívá v podání protilátek proti růstovým faktorům nebo jejich receptorům (např.: Bevacizumab proti VEGF-Vascular Endothelial Growth Factor), nebo v kompetitivní inhibici pro vyřazení enzymů zodpovědných za dělení buněk (Imatinib, Sunitinib) (Arkenau a kol., 2008). Při **hypertermii** dochází ke zvýšení teploty nádorové masy na 41 – 45°C pomocí radiofrekvence, mikrovln, ultrazvuku nebo nanočástic. Při této teplotě většina nádorových buněk hyne, zatímco ostatní přežívají. Teplo u nádorových buněk inhibuje syntézu DNA a RNA, změny v kristách mitochondrií a podporuje apoptózu (Baronzio a kol., 2014). Během **fotodynamické terapie** je do nádoru vpravena fotosenzitivní látka a posléze aktivována laserem za vzniku cytotoxických singletů kyslíku, které přímo působí na nádorové buňky a nepřímo na nádorovou vaskulaturu (Abulafi a Williams, 1992).

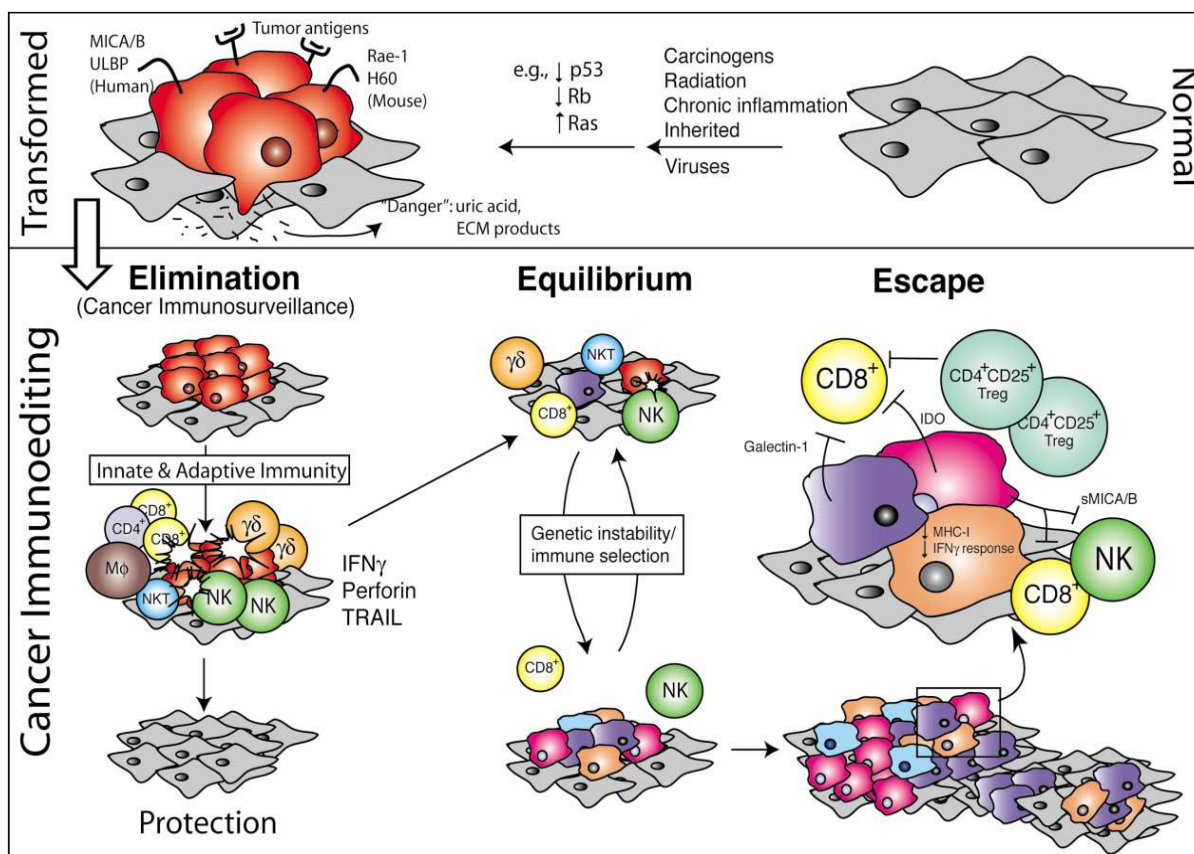
1.3. Imunoterapie

Standardní léčba nádorových onemocnění je sice úspěšná, ale málokdy vede k úplnému vyléčení. Problémem je tvorba metastáz a následný relaps. Stejně důležitá jako léčba samotného primárního ložiska je i prevence diseminace nádorových buněk a právě v tomto ohledu imunoterapie vítězí.

1.3.1. Immunosurveillance a imunoeditace nádorů

Za nádorový imunitní dohled (immunosurveillance) považujeme obranné procesy hostitele inhibující karcinogenezi. Od doby, kdy Paul Ehrlich poprvé zmínil hypotézu, že imunitní systém dokáže rozpoznat a eliminovat nádor, se stal immunosurveillance kontroverzním problémem nádorové imunoterapie. V polovině dvacátého století byla myšlenka odhojení nádoru díky imunitním mechanismům podpořena experimenty s transplantovanými a indukovanými nádory, jak tvrdí Thomas (1982). Studie probíhaly také na imunodeficientních SCID a nu-nu myších s výslednou vyšší incidencí chemicky vyvolaného sarkomu (Engel a kol., 1996; Engel a kol 1997). Shankaran s kolegy (2001) objevil, že imunitní systém nekontroluje pouze rozvoj nádoru, ale i jeho imunogenicitu, neboť nádorové buňky z imunodeficientních myší byly více imunogenní než z myší imunokompetentních. Tato skutečnost je základem teorie imunoeditace, jež vysvětluje dvojí charakter interakce nádorových buněk s imunitním systémem hostitele. Imunoeditace probíhá ve třech základních fázích popsaných anglickými výrazy Elimination, Equilibrium a Escape, které se označují jako „tři E“. Pro každou fázi jsou typické odlišné efektorové buňky a sekretované cytokiny (Kim a kol., 2007). Jednotlivé fáze jsou shrnuty na obrázku 1.

Během fáze eliminace probíhá vlastní immunosurveillance, kdy vrozená a získaná imunita spolupracují, aby odhalily a zničily vznikající, dosud klinicky nedetekovatelný nádor. Přeživší nádorové buňky vstupují do fáze rovnováhy - equilibrium, během níž se selektují méně imunogenní, rezistentní buňky. Následuje escape fáze, kdy nádorové buňky uniknou imunitnímu dozoru a začnou progresivně růst ve viditelné lézi (Schreiber a kol, 2011).



Obr. 1.: Průběh imunoeditace. Převzato z Dunn a kol., 2004.

1.3.2. Imunitní systém a protinádorová odpověď

Imunitní systém definujeme jako seskupení buněk a molekul specializovaných k obraně organismu. Rozlišujeme dva základní typy imunity, vrozenou a získanou, které spolu úzce kooperují. Vrozená imunita využívá fagocytující buňky (neutrofilů, dendritické buňky, monocyty a makrofágy), buňky uvolňující zánětlivé mediátory (bazofily, žírné buňky a eosinofily) a NK (Natural Killers) buňky. Z molekulových složek pak komplement, proteiny akutní fáze a cytokiny. Získaná imunita je založena na proliferaci antigenně specifických B a T lymfocytů (Delves a Roit. 2000).

1.3.2.1. Nádorové antigeny

Aby mohl imunitní systém rozpoznat nádorové buňky, musí tyto na svém povrchu exprimovat antigeny. Rozlišujeme dvě skupiny těchto antigenů. Tumor specifické antigeny (TSA) se vyskytují pouze na nádorových buňkách a jedná se buď o produkty mutovaných genů (u nádorů indukovaných karcinogeny) nebo o virální antigeny. Zatímco s tumory asociované antigeny (TAA) nalezneme i na zdravých buňkách (Finn, 2008).

1.3.2.2. Protinádorová imunitní odpověď

Imunitní systém působí proti nádorovým buňkám v několika rovinách zahrnujících mechanismy vrozené i získané, které tvoří tumorsupresivní celek. Nicméně imunitní systém může progresi tumoru i podporovat. Experimenty prováděné mezi léty 1970 – 1990 prokázaly, že v nádorovém imunitním dohledu (immunosurveillance) se jako hlavní efekторы uplatňují NK, NKT (Natural Killer T) buňky, B a T lymfocyty, INF (Interferony) I. a II. typu a perforiny (Dunn a kol., 2002).

NK buňky spadají do lymfoidní vývojové linie a vyznačují se cytolytickým efektem vůči buňkám se sníženou expresí molekul MHC I (Moretta a kol., 2005). Objev NK buněk nastínil možnost jejich protinádorového působení, avšak cytotoxický vliv na nádorové buňky nebyl tehdy plně definován (Herberman a Holden, 1978). V pozdějších pokusech byly použity myši zbavené lymfocytů a potvrdila se role NK a NKT buněk v obraně proti iniciaci nádoru a metastazování (Smyth a kol., 2000). Další studie ukázala, že vyřazení NK a NKT buněk monoklonální protilátkou způsobilo 2x – 3x větší náchylnost ke vzniku methychloantrenem-indukovaného nádoru (Smyth a kol., 2001). Nádorové buňky jsou navíc pro NK buňky atraktivní, protože stahují expresi MHC I molekul v rámci úniku před T lymfocyty (Garcia-Lora a kol., 2003).

Významnou část zánětlivého infiltrátu v nádoru tvoří **makrofágy**, které na místo migrují jakožto monocyty vlivem chemokinů produkovaných nádorem – CSF-1 (Colony Stimulation Factor 1), CC chemokinů, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) - a v tkáni se přemění na makrofágy asociované s nádory (TAM). Makrofágy ze zdravé nebo zánětlivé tkáně jsou schopné lyzovat nádorové buňky, prezentovat TAA T lymfocytům a produkovat imunostimulační cytokiny. Naopak TAM vlivem nádorových cytokinů IL-4, IL-10, TGFβ (Transforming Growth Factor beta) a PGE₂ (Prostaglandin E₂) působí pronádorově (Elgert a kol., 1998). Zvyšují invazivitu nádorových buněk a podporují angiogenezi sekrecí

VEGF, TNF α (Tumor Necrosis Factor alfa) a bFGF (basis Fibroblast Growth Factor) (Lewis a kol., 1995; Hagemann a kol., 2005).

Dendritické buňky (DC) patří spolu s makrofágy k antigen prezentujícím buňkám (APC). Fagocytující DC prezentují antigeny naivním CD8⁺ T-lymfocytům nebo CD4⁺ T-lymfocytům a tím iniciují mechanismy adaptivní imunity (Takahashi a Kobayashi, 2003). Bylo zjištěno, že DC inkubované s apoptotickými melanomovými buňkami a následně injikované myším způsobí rezistenci k transplantovanému melanomu. *In vitro* studie zde potvrdila stimulaci CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytů DC prezentujícími antigen (Goldszmid a kol., 2003).

Antigeny uvolněné z rozpadlých nádorových buněk jsou zpracovány APC a v komplexu s molekulami MHC II prezentovány **CD4⁺ T lymfocytům** (helperům), které podpoří protinádorový atak. CD4⁺ lymfocyty dělíme na Th1 a Th2 subpopulaci v závislosti na sekretovaných cytokinech (Morel a Oriss, 1998). Th1 lymfocyty aktivují APC – nejčastěji dendritickou buňku, ta aktivuje **CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty** (CTL), které pak rozpoznají antigen prezentovaný v komplexu s MHC I na té samé APC (Ridge a kol., 1998). Dále Th1 lymfocyty zajišťují stálou funkci a proliferaci CTL produkcí cytokinů, např. IL-2. Th2 lymfocyty naopak podporují humorální imunitu a aktivují B lymfocyty na plazmatické buňky schopné tvorby protilátek. Plasmocyty sekretují tumor specifické protilátky a přispívají tak k protinádorové obraně (Wang, 2001). CD4⁺ T lymfocyty mohou inhibovat nádorový růst i samostatně, v nepřítomnosti CTL a B lymfocytů. Protinádorový atak CD4⁺ T lymfocytů nevyžaduje přímý kontakt s nádorovými buňkami, protože většina z nich neexprimuje MHC II. třídy. Mumbergova studie prokázala nepřímé působení INF γ (interferonu gama) vylučovaného CD4⁺ buňkami. Nepřímého proto, že i INF rezistentní nádorové buňky byly odhojeny (Mumberg a kol., 1999). Druhým protinádorovým mechanismem CD4⁺ buněk je produkce cytokinů, které aktivují další efektorové buňky – eosinofily a makrofágy (Hung a kol., 1998).

Souhrně probíhá proces eliminace nádoru imunitním systémem ve 4 fázích. **1)** Nádor zvětšený nad 2-3mm vyžaduje k dalšímu růstu přívod krve a remodelaci okolní tkáně, což způsobí vyloučení prozánětlivých faktorů a příliv buněk vrozené imunity jako jsou NK a NKT buňky, makrofágy a dendritické buňky. NK a NKT buňky rozpoznávají struktury na povrchu transformovaných buněk a sekretují INF γ (Smyth a kol., 2001). **2)** Migrace DC a aktivace T lymfocytů: INF γ působí antiproliferativně a antiangiogeneticky na nádorové buňky a indukuje tak apoptózu (Qin a Blankenstein, 2000; Gollob a kol., 2005).

Nekrotizující nádorové buňky jsou pohlceny DC a ty následně migrují do spádových lymfatických uzlin - TDLNs (Tumor Draining Lymph Nodes). **3)** Vznik antigenně specifických T-lymfocytů: Přítomné NK buňky a makrofágy produkují IL-12 a $INF\gamma$, čímž se vzájemně aktivují a spustí své cytotoxické mechanismy - perforiny, TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand) a Fas-L (Fas ligand) vedoucí k dalšímu zabíjení nádorových buněk. (Mori a kol., 1997; Smyth a kol., 2000; Takeda a kol., 2001). DC zároveň ve spádových lymfatických uzlinách prezentují nádorové antigeny CD4+ T lymfocytům a indukují vznik Th1 buněk, které následně stimulují CTL. **4)** V poslední fázi přichází na řadu antigenně specifické CTL, které zničí zbývající nádorové buňky, jejichž imunogenicita je navíc zvýšena působením $INF\gamma$ (Shankaran a kol., 2001).

1.3.2.3. Imunosupresivní strategie nádorových buněk

Vlivem působení imunitního systému se selektují nádorové buňky, které jsou huře „viditelné“ a imunitní systém proti nim nemůže bojovat. U většiny nádorů dochází ke snížení exprese MHC I molekul a chybí kostimulační molekuly CD80 a CD86, nádorové antigeny tak nemohou být prezentovány CD8+ T lymfocytům. Nezávisle na MHC I je snížena i exprese samotných nádorových antigenů (Garrido a kol., 1997).

Dále na svou obranu nádorové buňky exprimují Fas-ligand. Suda a kolektiv (1993) objevili, že Fas-ligand je transmembránová molekula z rodiny TNF a účinkuje v T buněčné cytotoxicitě, protože její vazba na Fas-receptor na cílové buňce spustí apoptózu. T lymfocyty mají na svém povrchu Fas-ligand i Fas-receptor a tím regulují svou proliferaci. Nádorové buňky expresi Fas-ligandu zvyšují a Fas-receptoru snižují, takže mohou likvidovat T lymfocyty a samy jsou chráněny (O'Connell a kol., 1996).

U nádorů se ještě vyvinula schopnost potlačit imunitní atak hostitele prostřednictvím TDSF (Tumor Derived Soluble Factors), které působí na úrovni lokální i systémové (Kim a kol 2007). Maligní buňky produkují rozpustný fosfatidylserin (**sPS**). Rozpustný PS může reagovat s PSR (Phosphatidyl Serine Receptor) na APC a dochází k produkci IL-10, TGF a PGE2, které inhibují funkci APC (Fadok a kol., 2001; Kurosaka a kol., 2002). Kromě inhibice APC chrání IL-10 nádorové buňky před CTL, protože snižuje množství proteinů TAP1 a TAP2 (Transporter associated with Antigen Processing) v nádorových buňkách a tím i množství molekul MHC I a II na povrchu nádorových buněk (Salazar-Onfray a kol., 1997). **TGF- β** je sekretován samotnými nádorovými buňkami a způsobuje vznik Treg (T-regulačních lymfocytů) z CD4+ T lymfocytů, které inhibují CTL. Treg lymfocyty také vylučují TGF- β a podporují tak vznik sebe samých. Posledním příkladem je **VEGF β**

(Vascular Endothelial Growth Factor beta), který brání diferenciaci a maturaci DC blokáci NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) v hematopoetických buňkách a je zodpovědný za přítomnost TAM v mikroprostředí nádoru (Gabrilovich a kol., 1998; Oyama a kol., 1998).

Buňky imunitního systému také vylučují řadu cytokinů a chemokinů, čímž vzniká složitá „sít“ vzájemně se ovlivňujících pochodů. Souhrnně bylo dokázáno, že produkce imunosupresivních cytokinů (IL-10, TGF β , PGE2) je u onkologických pacientů několikanásobně vyšší než produkce imunostimulačních cytokinů (IL-2, IL-12, INF γ) (Barth a kol., 1996).

1.3.3. Druhy imunoterapie

Znalost obranných mechanismů nádorových buněk směřuje k efektivním imunoterapeutickým postupům, které zvyšují kvalitu a kvantitu efektorových buněk, blokují imunosupresivní mechanismy buněk nádorových a odhalují jejich antigeny (Schreiber., 2011).

Imunoterapie s použitím monoklonálních protilátek:

Použití monoklonálních protilátek (MAb) je jednou z nejuspěšnějších metod při léčbě hematologických malignit i solidních tumorů. Vazba MAb na nádorové buňky může ovlivňovat signální dráhy příslušné pro daný antigen, aktivovat buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC) nebo cytotoxicitu závislou na komplementu (CDC). Cílovým antigenem jsou například CD znaky, glykoproteiny, vaskulární a růstové faktory (Scott a kol., 2012). Jako příklad pro melanom uvádím MAb Ipilimumab proti CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Antigen 4), která byla objevena roku 1996. CTLA-4 je intracelulárním homologem CD 28, tedy druhým receptorem pro kostimulační molekuly CD80 a CD86. U aktivovaného T-lymfocyty se CTLA-4 dostává na povrch, váže kostimulační molekuly a aktivaci zpomalí. Aplikace protilátky proti CTLA-4 způsobila odhojení nádoru a rezistenci k další transplantaci (Leach a kol., 1996).

Adoptivní buněčná terapie – ACT (Adoptive Cell Therapy):

ACT využívá pacientovy vlastní T-lymfocyty z prostředí nádoru – TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes), které mají protinádorovou aktivitu. T-lymfocyty jsou *in-vitro* pomnoženy a vráceny zpět do těla pacienta. Jako součást ACT terapie se provádí lymfodeplece, aby byly eliminovány Treg lymfocyty (Rosenberg a kol., 2008). ACT je efektivní léčbou pro pacienty s metastazujícím melanomem, u kterých došlo k 50% -70% redukci po podání transferu TIL a IL-2 (Dudley a kol., 2008).

Dendritické buňky v protinádorové imunoterapii:

Použití dendritickým buněk je, po ACT, dalším způsobem antigen-specifické imunoterapie. Dendritické buňky jakožto APC spojují vrozenou a získanou imunitu a jsou nazývány přírodními adjuvants. Díky tomu byly vybrány pro přenos nádorových antigenů do těla pacienta. Cílem nádorové vakcinace pomocí DC je produkce tumor specifických CD8+ cytotoxických T-lymfocytů. Z monocytů pacienta se pomocí cytokinů připraví nezralé DC a ty pak interagují s nádorovým antigenem. Následuje jejich vyzrání pomocí LPS (lipopolysacharid) a IFN- γ , vedoucí ke zvýšení exprese kostimulačních molekul. Tyto DC, schopné účinné prezentace nádorových antigenů, jsou vpraveny do těla pacienta. Antigeny mohou být také přímo dopraveny k DC *in vivo* pomocí chimerických proteinů, které obsahují protilátky specifické pro DC receptory (Palucka a Banchereau, 2012).

1.4. Imunoterapie založená na aktivaci složek vrozené imunity

Jelikož nádor je jako celek málo imunogenní a navíc uplatňuje imunosupresivní mechanismy, nemůže být imunitním systémem přirozeně zlikvidován. Nádorové buňky je potřeba „označit“ pomocí vhodného motivu, který vyvolá atak na úrovni vrozené a následně získané imunity. Vrozená imunita představuje první linii obrany proti patogenům, nabízí se tedy možnost zvolit motiv infekční – např. bakteriální (Janotová a kol., 2014). Podnětem k tomuto způsobu terapie byl unikátní objev SR/CR (spontaneous regression / complete resistance) myši, u kterých buňky vrozené imunity rozpoznávaly a likvidovaly nádorové bujení (Cui a kol., 2003; Hicks a kol., 2006).

1.4.1. Vývoj léčebných postupů

První zmínky o tom, že imunitní systém by mohl reagovat na rakovinnou tkáň, se objevily už v osmnáctém století, kdy souběžně probíhající horečnatá infekce způsobila vymizení nádoru. V devatenáctém století se začal o tento jev blíže zajímat přední newyorský chirurg William Coley, který byl inspirován remisí nádorů u pacientů s kožním onemocněním způsobeným bakterií *Streptococcus pyogenes* (Wiemann a Starness, 1994). Poté Coley použil kombinaci bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* k léčbě pacientů s inoperabilními sarkomy a dosáhl více než 10% vyléčení (Coley, 1910). Tento preparát, dnes nazývaný jako Coleyho toxin, považujeme za první pokus o imunoterapii nádorů.

V roce 1921 byl atenuovaný původce tuberkulózy – *Mycobacterium bovis*, pod názvem BCG (Bacillus Calmette Guerin) použit u lidí při vakcinaci proti tuberkulóze. V té

době byla také pozorována nižší frekvence výskytu nádorů u pacientů s tuberkulózou. S ohledem na poznatky Coleyho se BCG začala uplatňovat při léčbě různých typů nádorů. Nicméně průběžné studie nepotvrdily očekávaný přínos a od BCG vakcíny se ustoupilo u většiny malignit s výjimkou karcinomu močového měchýře (Lamm a kol., 2000).

Přestože od objevu Coleyho toxinu uplynulo celé století, představují bakterie stále slibnou protinádorovou strategii. Mohou být použity přímo jako protinádorové agens, jako vektory přenášející tumoricidní látky nebo se jen jejich toxiny váží na nádorové antigeny (Patyar a kol., 2010). U melanomu byla například použita atenuovaná *Salmonella typhimurium* a velikost nádorů u léčené skupiny představovala jen 6% velikosti kontrolních nádorů (Low a kol., 1999).

1.4.2. Vrozená imunita a mechanismy rozpoznávání

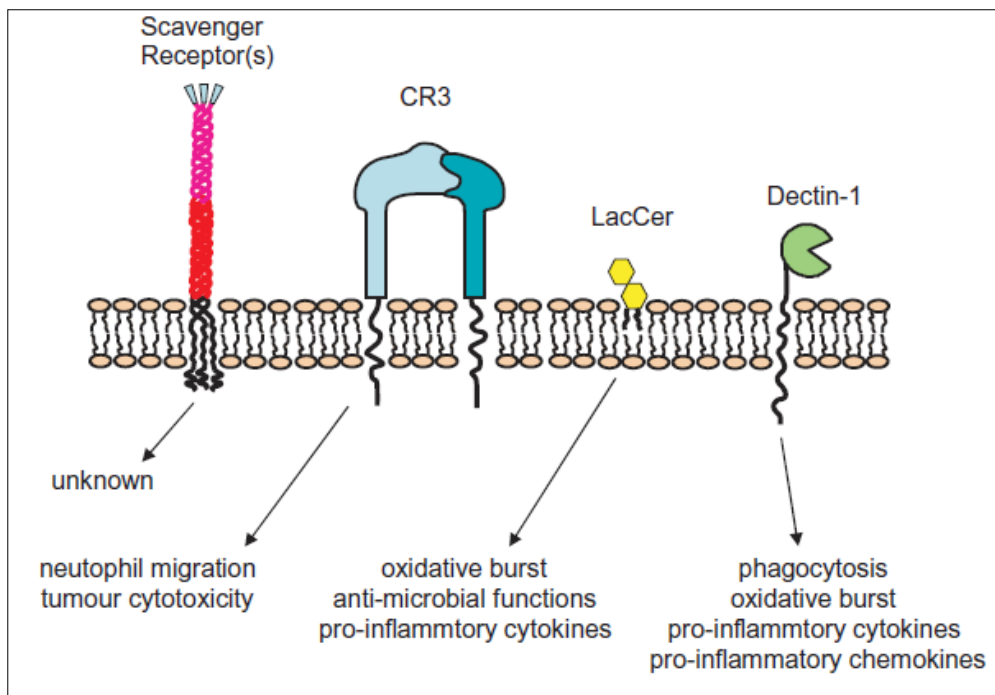
Buňky vrozené imunity exprimují na svém povrchu PRR (Pattern Recognition Receptors), vysoce evolučně konzervované receptory zakódované v zárodečné linii, které rozpoznávají molekulové vzory asociované s patogeny nebo s poškozením tkáně - PAMPs a DAMPs. K nejznámějším PRR patří TLR (Toll like receptory), dále do této skupiny řadíme Nod-like receptory a C-type lectin receptory. Díky existenci PRR není vrozená imunita zcela nespecifická a dokáže rozeznávat vlastní a patogenní struktury (Kumagai a kol., 2010).

TLR najdeme u buněk první linie obrany hostitele, tedy u neutrofilů, makrofágů, dendritických buněk, endoteliálních buněk pokožky a epiteliálních buněk. TLR2 a TLR4 nalezneme také na povrchu B a T lymfocytů (Imler a Hoffmann, 2001). Základní člen rodiny TLR byl původně objeven u *Drosophily* jako genový produkt Toll nezbytný pro dorzoventrální souměrnost embrya. Později se ukázalo, že hraje klíčovou roli v obraně mušek proti houbovým plísním stimulací produkce antifungálního peptidu Dorsomycinu (Lemaitre a kol., 1996). První zjištění, že TLR mohou fungovat jako PRR i u savců vycházelo z myší fenotypu *lps*, které nevykazovaly zánětlivou odpověď na LPS (lipopolysacharid) kvůli mutaci v TLR4 genu (Poltorak a kol., 1998). U savců je dnes známo celkem 11 TLR (11 u myši a 10 u lidí) lokalizovaných převážně na povrchu buněk s výjimkou intracelulárních TLR 3,7,8 a 9. Strukturně se jedná o transmembránové glykoproteiny s extracelulární doménou bohatou na leucin (LRR – leucine rich repeat) a cytoplasmatickou signální doménou homologní k receptoru pro IL-1 (Akira a kol., 2006). Podle své buněčné lokalizace váží typické ligandy – pro TLR 1,2,4,6 jsou to komponenty buněčné stěny bakterií – např. LPS, peptidoglykany, lipopeptidy a lipoteichová kyselina. Oproti tomu intracelulární TLR váží virovou dsRNA (TLR-3), ssRNA (TLR 7,8) nebo

nemetylované CpG úseky DNA bakterií a virů (TLR9). (Akira a Takeda, 2004). Vazba ligandu na TLR spustí signální kaskádu vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů, např. nukleárního faktoru NF- κ B, a tím nastartuje produkci prozánětlivých cytokinů (Akira a kol., 2006).

1.4.3. Beta glukany v roli PAMP

Beta glukany jsou hlavní stukturní komponentou buněčné stěny bakterií a hub, ale nalezneme je i u kvasinek, řas, mechů a obilovin (Morshed a kol., 2013). Jedná se o heterogenní skupinu glukózových polymerů, jejichž kostra je tvořena D-glukózovými jednotkami spojenými β 1 \rightarrow 3 glykosidickou vazbou, na které jsou připojeny další postranní řetězce D-glukózy. Typ vazby postranních řetězců je druhově specifický, β 1 \rightarrow 4 glykosidické vazby se vyskytují u bakterií a β 1 \rightarrow 6 u hub (Chan a kol., 2009). Obecně vykazují beta glukany různé biologické a imuno-farmakologické účinky závislé na jejich chemicko-fyzikálních vlastnostech – rozpustnosti, molekulové váze a stupni větvení (Yadomae, 2000). Díky absenci u zvířat jsou považovány za klasické PAMPs rozpoznávané buňkami imunitního systému obratlovců i bezobratlých (Janeway, 1992). Reakce organismu na přítomnost beta glukánů je zprostředkována specifickými receptory na povrchu především imunitních buněk - monocytů, makrofágů, neutrofilů, Langenharsových buněk, NK buněk a eosinofilů, ale nalezneme je i na endoteliálních, alveolárních epiteliálních buňkách a fibroblastech (Brown a Gordon, 2003). Jedná se o CR3 receptor, lactosylceramid, scavengerové receptory a Dectin-1, jejichž stimulací jsou nastartovány mechanismy shrnuté na obrázku 2.



Obr. 2.: Obranné mechanismy buněk vrozené imunity spuštěné stimulací beta glukanových receptorů. Převzato z Brown a Gordon, 2005.

Imunomodulační vlastnosti vysokomolekulárních beta glukanů vychází z jejich přímého působení na leukocyty, u kterých stimulují fagocytární a cytotoxickou aktivitu, produkci prozánětlivých mediátorů a cytokinů, zejména IL-8, IL-1 β , IL-6 a TNF α . (Ladányi a kol., 1992; Garcia-Lora a kol., 2003). Posilují i rozpoznání a likvidaci apoptotických buněk (Fadok a kol., 2000). Oproti tomu malé beta glukany, s molekulovou váhou do 10 000, nevykazují biologickou aktivitu a ovlivňují imunitní systém nepřímou, pravděpodobně antagonistickou vazbou na beta glukanové receptory (Brown a Gordon, 2001). *In vitro* studie zabývající se vlivem nízkomolekulárního PGG glukanu na myší monocyty uvádí, že PGG sice aktivuje nukleární transkripční faktory NF- κ B a NF-IL-6, ale nestimuluje transkripci cytokinové mRNA (Adams a kol., 1997). Tyto výsledky potvrdil i Battle (1998) s použitím skleroglukanu a glukan fořátu. Pozdější studie ukázala, že inkubace plné krve s 20kD β -1,3-glukanem a následně s LPS zvýšila produkci IL-6, 8, 10 a TNF α (Engstad a kol., 2002). Z toho vyplývá, že beta glukany tzv.primují, tedy aktivují, leukocyty pro sekundární kontakt se stimulujícím podnětem. Množství a typ produkovaných cytokinů je také ovlivněno strukturou beta glukanů. Například β -1,3-glukan lineární stimuluje u splenocytů produkci jiných cytokinů než 6krát větvený (Hida a kol., 2009). Podobně beta glukany ve formě částic stimulují produkci cytokinů více než rozpustné (Ishibashi a kol., 2002).

O pozitivních účincích beta glukánů svědčí řada *in vitro* i *in vivo* experimentů. V Japonsku a Číně se některé používají i ke klinickým účelům. Jsou efektivní při léčbě nádorů, infekčních chorob, hypercholesterolemii a diabetu. Per orálně podané beta glukany jsou v tenkém střevě zachyceny makrofágy a prostřednictvím Dectinu-1 internalizovány, zpracovány na kratší fragmenty a transportovány do kostní dřeně, kde se uvolní. Tyto fragmenty jsou následně vychytány granulocyty, monocyty a dendritickými buňkami vazbou na CR3 receptor. Injekčně podané rozpustné betaglukany se váží na CR3 přímo (Chen a Seviour, 2007).

1.4.3.1. Laminarin

Laminariny jsou β -1,3 glukany s jednoduchou, malou molekulou tvořenou přibližně 50 glukosylovými zbytky. Vyskytují se u mořských řas čeledi *Laminaria*, převážně v nerozpustné formě, která se skládá z lineárně spojených jednotek. Rozpustný laminarin s větvením s β -1,6 najdeme a nejčastěji získáváme z druhu *Laminaria digitata*. U makrofágů zvyšuje laminarin produkci NO, H₂O₂, monocyty chemoatraktujícího proteinu (MCP-1) a faktoru stimulujícího granulocyty a makrofágy (GM-CSF) (Lee a kol., 2012). Byl také izolován nový typ laminarinu, Phycarin (Mw 5000), který stimuluje fagocytózu a produkci cytokinů IL-1, IL-6 a TNF α . Navíc podporuje protinádorové působení NK buněk (Větvíčka a Yvin, 2004). Xie a kolegové (2010) zjistili, že laminarin konjugovaný s antigenem se váže na Dectin-1 na APC, dojde k internalizaci proteinu a stimulaci specifické odpovědi CD4+ T lymfocytů. Tím naznačili možné terapeutické využití laminarinu.

1.4.3.2. Manan

Manany se vyskytují v buněčné stěně vyšších rostlin a kvasinek a rozlišujeme u nich 4 typy: lineární manan, glukomanan, galaktomanan a galaktoglukomanan (Petkowicz a kol., 2001). Každý z polysacharidů obsahuje kostru z β -1,4-manosových nebo glukózových a manosových zbytků, některé se ještě větví do postranních řetězců β -1,6- spojených galaktózových zbytků (Liepman a kol., 2007).

2.4.3.3. Zymosan

Zymosan je první preparát získaný z buněčné stěny kvasinek pekařského droždí rodu *Saccharomyces cerevisiae* metodu popsanou Pillemerem a Eckerem (Hassid a kol., 1941). Skládá se z 55% z β -D-glukanu, 19% mananu, 15% proteinů a 7% lipidů (Di Carlo a Fiore, 1958). Díky svému složení se Zymosan často využívá v experimentech ke studiu

rozpoznávání, fagocytózy a produkce cytokinů buňkami vrozené imunity. Fagocytóza zymosanových partikulí je zprostředkována TLR2 a Dectinem-1. Naopak produkce zánětlivých cytokinů je způsobena vazbou na heterodimer skládající se z TLR2 a TLR6 (Underhill, 2003).

1.4.4. Receptory stimulované mikrobiálními komponenty

1.4.4.1. Komplement receptor 3

CR3 receptor je integrinový heterodimer z α (CD11b) a β (CD18) řetězců, vyskytující se u myeloidních buněk, NK buněk a lymfocytů. Funguje jako buněčná adhezní molekula díky vazbě na endoteliální ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) a jako fagocytární receptor pro částice opsonizované iC3b, včetně částic gluknanů. Vazba beta gluknanů nebo lipopolysacharidů na CR3 aktivuje receptor a umožní fagocytům a NK buňkám likvidovat opsonizované částice (Ross a Větvička, 1993). Později bylo prokázáno, že beta glukany se váží na lektinovou doménu na C-terminálním konci CD11b (Thornton a kol., 1996; Xia a Ross, 1999). Cytotoxické působení NK buněk a neutrofilů s primovaným CR3 receptorem demonstroval Větvička s kolektivem (1996) na lýze erytrocytů opsonizovaných iC3b. Opsonizovanou částicí může být právě nádorová buňka označená iC3b např. pomocí monoklonální protilátky (Chan a kol., 2009). Yan a kol. (1999) takto dosáhli 57%-90% redukce *in vivo* léčeného prsního karcinomu u myší.

1.4.4.2. Dectin - 1

Dectin-1 je transmembránový receptor skládající se z extracelulární lektinové domény typu C (CLTD) a cytoplasmatického motivu imunoreceptoru aktivovaného tyrosinem (ITAM) (Reid a kol., 2009). Hojně se vyskytuje na monocytech, makrofázích a neutrofilech, méně pak na dendritických buňkách a lymfocytech, jak bylo zjištěno pomocí monoklonální protilátky (Taylor a kol., 2002). Původně byl identifikován jako receptor pro různé ligandy na T lymfocytech, čímž podporoval jejich proliferaci (Ariizumi a kol., 2000). Nové výzkumy ukazují, že je pro něj charakteristická vazba beta gluknanů, která spustí fagocytózu, uvolnění reaktivních druhů kyslíku (ROS) a produkci prozánětlivých cytokinů – TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2 a CCL3 (Brown a kol., 2003). Blokace CR3 a Dectinu -1 a vazba Zymosanu u myších makrofágů ukázala, že Dectin-1 je hlavním beta gluknanovým receptorem těchto buněk. Naopak u lidských makrofágů není role Dectinu-1 úplně

jednoznačná. Stejně tak lidské neutrofilny interagují s beta glukany především prostřednictvím CR3, nikoliv Dectin-1 (vanBruggen a kol., 2009).

1.4.4.3. Lactosykeramid

Lactosykeramid (LacCer, CDw17), glykosfingolipid mnoha typů buněk, rozpoznává různé mikroby a jako receptor pro beta glukany byl identifikován pomocí radioaktivně značeného vysokomolekulárního beta glukanu - PGG glukanu (Zimmerman a kol., 1998). Interakce s receptorem potencuje oxidativní vzplanutí u neutrofilů a aktivaci NFκB (Wakshull a kol., 1999).

1.4.4.4. Scavenerové receptory

Scavenerové receptory představují heterogenní skupinu molekul na myeloidních a některých endoteliálních buňkách. Rozpoznávají lipoproteiny o nízké i vysoké hustotě a polyanionické ligandy. Ačkoliv tato třída receptorů beta glukany váže, nebyl v rámci ní zatím identifikován žádný pro ně specifický (Rice a kol., 2002).

1.4.4.5. MBL

Lektin vázající manózu (MBL) je plasmatický protein a vyskytuje se v komplexu se serinovými proteázami asociovanými s MBL (MASPs) – MASP-1, MASP-2 a MASP-3. Pokud se MBL naváže na příslušný polysacharid, serinové proteázy se rozštěpí na 2 řetězce a tím se aktivují (Jack a Turner, 2003). Aktivované MASP štěpí složky komplementu – C2, C3, C4, dojde k aktivaci kaskády komplementového systému, která vede ke zničení mikroorganismů tvorbou komplexu atakujícího membrány (MAC) (Gadjeva a kol., 2004).

1.4.4.6. Manosový receptor

Manosový receptor (MR) patří mezi PRR makrofágů (Rouleux-Bonnin a kol., 1995) a dendritických buněk (Sallusto a kol., 1995). Tento transmembránový 180kDa protein obsahuje sérii 8-10 lektinových domén rozpoznávajících karbohydráty (CRD) (Taylor a kol., 1990). MR vykazuje velkou afinitu k monosacharidům manóse a fukóse, méně ochotně váže glukósu a N-acetylglukosaminy. Vazba ligandu na MR zprostředkuje fagocytózu částic s ligandem konjugovaných, takže i patogenních mikroorganismů, jako jsou bakterie a kvasinky, které mají manosu na povrchu (Largent a kol., 1984). Exprese MR může být ovlivněna cytokiny, např. INFγ při aktivaci makrofágů blokuje transkripci příslušné mRNA. Počet receptorů se tak snižuje, ale afinita zůstává nezměněna (Maródi a kol., 1993).

1.5. Neutrofilly

Jelikož se náš přístup k nádorové imunoterapii soustředí na vrozenou imunitu, nesmíme opomenout její klíčovou složku, tedy neutrofilní granulocyty, které efektivně zabíjejí patogeny bez poškození hostitele. Neutrofilly jsou nejabundantnější buňky bílé krevní řady, u myši tvoří 30 a u člověka 70 procent krevních buněk. Cirkulují 6-8 hodin a řadí se k buňkám s nejkratší životností. Společně s eozinofily a bazofily patří mezi polymorfonukleární granulocyty, které se vyznačují členitým jádrem a přítomností granul (Summers a kol., 2010).

1.5.1. Antimikrobiální mechanismy neutrofilů

Neutrofilly jsou první linií obrany proti patogenům. Klíčovým procesem neutrofilního ataku je jejich migrace do místa poškození a aktivace. Migrační kaskáda začíná na úrovni kostní dřeně (KD) a je regulována chemokinovými receptory na povrchu neutrofilů – CXCR2 a CXCR4 (C-X-C chemokinové receptory 2 a 4). Ligace těchto receptorů působí na neutrofilly antagonisticky. SDF-1 (Stromal cell Derived Factor-1) je ligandem CXCR4 a zadržuje neutrofilly v KD, zatímco ligandy pro CXCR2 – Gro beta (Growth regulated protein beta) a MIP-2 (Macrophage Inflammatory protein 2) neutrofilly z KD uvolňují (Eash a kol., 2010). V případě zánětu jsou neutrofilly z KD mobilizovány působením G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), který redukuje počet osteoblastů (hlavního zdroje SDF-1) a zvyšuje expresi MIP-2 na endoteliálních buňkách KD (Semerad a kol., 2002). Přechod neutrofilů z cirkulace do místa zánětu iniciují látky produkované původcem zánětu (např. bakteriální LPS, fMLF) i cytokiny hostitele (TNF α , IL-1 β , IL-17), které podněcují u endoteliálních buněk produkci adhezních molekul: P-selektinů, E-selektinů a molekul z rodiny integrinů ICAMs (Intracellular Adhesion Molecules) (Borregaard, 2010). Neutrofilly exprimují na svém povrchu PSGL-1 (P-selektin glykoprotein ligand 1) a L selektin, jimiž se na endoteliální molekuly váží a nastává charakteristický „rolling“ neutrofilů podél cévního endotelu. Rolování přejde do fáze pevné adheze zprostředkované vazbou β 2 integrinů LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen-1) a Mac-1 (Macrophage 1 antigen) neutrofilů na ICAM-1. Adherované neutrofilly se „plazí“ podél cévní stěny a spoji endoteliálních buněk prostoupí do intersticia, odkud vlivem chemotaktického gradientu putují do místa zánětu. Chemoatraktanty se váží na neutrofilní receptory během celého procesu extravazace a spouští tak signální dráhu MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) vedoucí k aktivaci neutrofilů (Wright a kol. 2010). Stupeň aktivace je přímo

úměrný koncentraci chemoatraktantů, např. nízká koncentrace IL-8 zvyšuje expresi L selektinů a $\beta 2$ integrinů, vyšší spustí oxidativní vzplanutí a nejvyšší koncentrace indukuje degranulaci neutrofilů. Naopak neutofily, které nedosáhnou aktivačního prahu, se z endotelu uvolní a vrátí se zpět do cirkulace (Ley, 2002).

1.5.1.1. Fagocytóza

Význam fagocytózy v obranných mechanismech popsal poprvé Metchnikoff koncem 19. století, kdy pozoroval specializované buňky pohlcující bakterie (Tan a Dee, 2009). Neutrofilů patří k profesionálním fagocytům, pohlcují mikroby do intracelulárních kompartmentů zvaných fagosomy a ničí je – buďto působením antimikrobiálních proteinů nebo produkcí toxických forem kyslíku (Nathan, 2006).

1.5.1.2. Granula a degranulace

U neutrofilů rozlišujeme 3 hlavní typy granul a sekreční vezikuly vzniklé endocytózou. Primární azurofilní granula se vytváří již ve stádiu myeloblastu a obsahují enzym myeloperoxidázu (MPO) nezbytnou pro oxidativní vzplanutí. Sekundární a terciální granula vznikají později a jsou MPO negativní. V průběhu aktivace neutrofilů fúzí granula s fagozomální nebo cytoplazmatickou membránou a uvolňují svůj obsah do fagozomu, respektive do okolní tkáně (Faurichou a Borregaard, 2003). Antimikrobiální složky granul zahrnují 3 skupiny látek, které přímo či nepřímo zabíjejí patogeny. Defenziny ze skupiny kationických peptidů permeabilizují cytoplazmatickou membránu a inhibují syntézu DNA a RNA. Proteolytické enzymy jako lysozym degradují buněčnou stěnu bakterií. Dále k enzymům patří serinové proteázy – neutrofilní elastáza a katepsin G, které štěpí bakteriální membránové proteiny. Poslední skupinu zastupují cheláty – např. laktoferin, který váže železo z prostředí a inhibuje tak růst bakterií (Borregaard a kol., 2007). Granulární proteiny navíc slouží i jako signální molekuly, jelikož stimulují extravazaci u monocytů (Soehnlein a kol., 2009).

1.5.1.3. Produkce ROS

Fagocytující neutrofilů projdou procesem oxidativního vzplanutí způsobeným činností komplexu NADPH oxidázy, který se nachází na fagozomální a cytoplazmatické straně membrány. Během oxidativního vzplanutí jsou elektrony přenášeny z NADPH přes membránu na kyslík za vzniku reaktivních forem kyslíku – ROS (Reactive Oxygen Species) uvnitř fagosomu nebo v extracelulárním prostoru (Hampton a kol., 1998). První produkt,

superoxid, bakterie přímo nezabíjí a většina se ho přemění na peroxid vodíku (H_2O_2). Do fagosómu se zároveň z primárních granul uvolní MPO, která katalyzuje přeměnu H_2O_2 a chloru na silně mikrobicidní kyselinu chlornou-HClO (Klebanoff, 1968). Jako další ROS vznikají hydroxylové radikály a singlety kyslíku (Steinbeck a kol., 1992; Candeias a kol., 1993). Pacienti s mutací v NADPH oxidáze trpí chronickou granulomatózní chorobou (CGD) vyznačující se imunodeficiencí s opakovanými infekcemi oportunními patogeny (Heyworth a kol., 2003).

1.5.1.4. Tvorba NETs

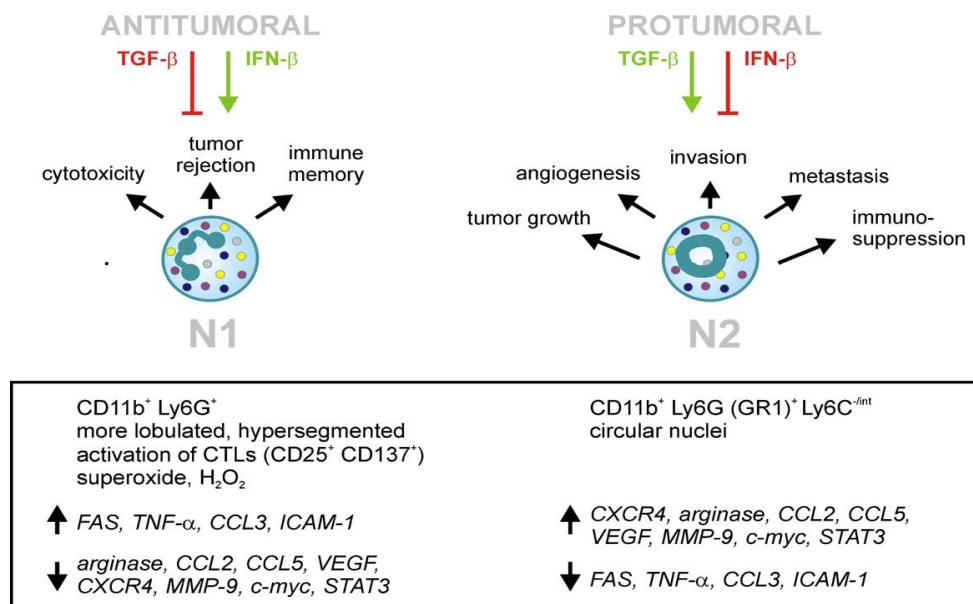
Kromě výše zmíněných intracelulárních antimikrobiálních strategií byla u neutrofilů nedávno objevena produkce tzv. extracelulárních sítí – NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Wheeler a Underhill (2014) prokázali, že k tvorbě NETs dochází při vážné sepsi či frustrované fagocytóze (fagocytóza nepohltitelného objektu). Jedná se o aktivní typ buněčné smrti, kdy umírající neutrofil vyloučí do extracelulárního prostoru dekonzenzovaný chromatin a toxický obsah granul, které váží a ničí okolní buňky (Urban a kol., 2006). Tento proces závisí na tvorbě ROS, což bylo dokázáno použitím inhibitoru NADPH oxidázy i u pacientů s CGD, jejichž neutrofilové netózy nevykazovaly (Fuchs a kol., 2007). Netózy nevykazují ani neutrofilové od dárců s deficiencí MPO, tudíž je nutná i její přítomnost (Metzler a kol., 2011). Zároveň Fuchs tvrdí, že zabíjení netózou je stejně efektivní jako fagocytóza. Tato myšlenka byla však vyvrácena o 5 let později přítomností živých bakterií po rozvolnění NETs DNazou (Menegazzi a kol., 2012).

1.5.2. Neutrofilové a nádory

Ačkoliv hlavní role neutrofilů spočívá v obraně proti infekci, mohou obrátit svou pozornost také na nádorové buňky a plejádou cytotoxických mediátorů je zlikvidovat. Napříč literaturou narazíme na mnohé případy protinádorového působení neutrofilů na experimentální i terapeutické úrovni, ze kterých vyplývá, že neutrofilové indukují lýzu a apoptózu nádorových buněk a jsou zodpovědné za rejekci nádoru i imunitní paměť (Piccard a kol., 2012).

Přítomnost neutrofilů byla zjištěna u různých typů nádorů, včetně primárního i metastazujícího maligního melanomu, kde tvořily neutrofilové, spolu s makrofágy a NK buňkami, více než 80% infiltrujících buněk (Bodey a kol., 1999). Později Fridlender a kol. (2009) prokázal existenci dvou typů TAN (Tumor Associated Neutrophils) – protinádorových N1 a pronádorových N2 neutrofilů, přičemž imunosupresivní TGF β

způsobil změnu N1 na N2. Při blokádě TGFβ se projeví protinádorové účinky N1 zahrnující zvýšené zabíjení nádorových buněk, expresi cytokinů a aktivaci cytotoxických T lymfocytů. Účinky N1 a N2 populace jsou shrnuty na obrázku 3.



Obr. 3.: Pro- a protinádorové mechanismy působení N1 a N2 subpopulace neutrofilů. Převzato z Piccard a kol., 2012.

Mechanismy zabíjení nádorových buněk a mikrobu jsou, vyjma fagocytózy, podobné. Cytotoxicita a cytostatická aktivita neutrofilů byla prokázána u různých typů nádorů v *in vitro* experimentech s maximem po 72 hodinové inkubaci, přičemž nedošlo k poškození zdravých buněk a inhibitory proteáz aktivitu nijak neovlivnily (Gerrard a kol., 1981). Pozornost se proto obrátila k oxidativnímu vzplanutí a ROS, jak dokazuje lýza explantovaných buněk ovariálního karcinomu, která nenastala při přidání neutrofilů od pacientů s CGD (Lichtenstein a kol., 1989). In vivo působení neutrofilů sledoval Zivkovic se svým týmem (2007) a dosáhl redukce růstu myšičího melanomu B16-F10 oproti kontrolní skupině, kde byly neutrofilové z prostředí nádoru odlákány subkutánní aplikací Sephadexu. Neopomenutelná je i účast neutrofilů na ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity), kdy způsobují rupturu membrány nádorových buněk (Kindzelskii a Petty, 1999). Souhrně lze říci, že aktivita neutrofilů v prostředí nádoru závisí na stupni jejich aktivace. ROS produkované mírně aktivovanými neutrofilů v nízké koncentraci působí genotoxicky, tedy pronádorově. Naopak vysoké koncentrace ROS ze silně aktivovaných neutrofilů poškozují nádorové buňky (Houghton, 2010).

2. Cíle práce

- Zvládnout techniky izolace neutrofilů, jejich čištění a charakterizace.
- Studovat *in vitro* cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s kotvenými ligandy fagocytárních receptorů.
- Zaměřit se na stanovení míry degranulace neutrofilů pomocí enzymu myeloperoxidázy.
- Kombinovat imunoterapii melanomu s chemoatrakcí neutrofilů do nádoru.

3. Materiály a metody

3.1. Výčet chemikálií

- **Antibiotic-Antimycotic** (Sigma Aldrich)
- **Anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3** (eBioscience)
- **Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11** (eBioscience)
- **Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5** (eBioscience)
- **Anti-Mouse CD45 APC; clone 30-F11** (eBioscience)
- **Anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7** (eBioscience)
- **Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5** (eBioscience)
- **Anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136** (eBioscience)
- **BAM** (Biocompatible Anchor for Membrane), Mw 4000 (NOF Europe)
- **DMSO** (Sigma Aldrich)
- **DNAza I** (Roche Diagnostic)
- **DTT** (dithiothreitol) (Sigma Aldrich)
- **FCS** (Fetal Calf Serum) (Sigma Aldrich)
- **Fluid Thioglycollate medium** (Difco)
- **Fluorescenčně značené kalibrační kuličky** - count bright absolute counting beads, (Invitrogen)
- **GM-CSF** (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) (Sigma Aldrich)
- **Kasein hydrolyzát** (Serva)
- **Laminarin** z *L. digitata* (Sigma Aldrich)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostic)
- **Lipopolysacharid (LPS)** z *E. coli* (Sigma Aldrich)
- **Lysin** (Sigma Aldrich)
- **Manan** – z *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich)
- **Myeloperoxidase (MPO) Fluorimetric Activity Assay Kit** (Sigma Aldrich)
- **Neutrophil Isolation Kit** – mouse (Myltenyi Biotec)
- **PMA** – (Phorbol-12-Myristate-13- Acetate)
- **Reziquimod (R-848)** (ENZO)
- **RPMI 1640** (Sigma Aldrich),
- **SMCC** (Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) (Thermo)

- **TCEP** (Sigma Aldrich)
- **TNF α** (Tumor Necrosis Factor alfa) (Sigma Aldrich)
- **Trypanová modř** (Sigma Aldrich)
- **Trypsin** (Sigma Aldrich)
- **Zymosan A** ze *S. cerevisiae*, (Sigma Aldrich)

3.2. Laboratorní zvířata

Ve všech *in vivo* i *in vitro* pokusech byly použity samice myšního kmene C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Myši přišly do laboratoře jako čtyřtýdenní a byly chovány za standardních podmínek v místnosti s konstantní teplotou 22°C, fotoperiodou 12/12, relativní vlhkostí vzduchu 65% a přístupem k vodě a granulované potravě *ad libitum*. Po dosažení osmi týdnů (váha 18 – 20g) byly myši použity k pokusům.

3.3. Nádorová buněčná linie

V experimentech byla použita buněčná linie myšního melanomu B16-F10, kterou nám věnovala prof. Říhová, MBU AV ČR, Praha. Buňky byly umístěny v termostatu s teplotou 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a 5% CO₂. Kultivace probíhala v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10% FCS, 1% antibiotik, 1% glutaminu a 0,1% merkaptoethanolu.

3.4. Příprava nádorových buněk B16-F10 pro použití *in vivo* i *in vitro*

Narostlé nádorové buňky byly zbaveny kultivačního média, následně 3x promyty sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). K promytým adherovaným buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS), trypsinizace probíhala v termostatu při teplotě 37°C po dobu 5 minut za účelem uvolnění adherovaných buněk. Po uplynulé době byla trypsinizace zastavena přidavkem 15ml média RPMI 1640 s 10% FCS a suspenze uvolněných buněk přelita do centrifugační zkumavky. Následovalo počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky a trypanové modři, centrifugace buněk (10min, 4°C, 160g) a upravení na požadovanou koncentraci.

3.5. Transplantace nádorových buněk

Myši ve stáří 8 týdnů byly nejprve oholeny na pravém boku. Do této oblasti jim bylo subkutánně transplantováno 4×10^5 nádorových buněk v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš.

3.6. Izolace buněk z kostní dřeně

Pro *in vitro* pokusy byly použity neutrofilly izolované z kostní dřeně myši dle metody (Stassen a kol., 2006). Myši usmrcené cervikální dislokací byly odebrány obě dolní končetiny, zbaveny kůže, svaloviny a vloženy do Petriho misky s médiem RPMI 1640 bez séra. Ze stehenní a holenní kosti byly odstříhány obě kloubní hlavice. Pomocí sterilní 5ml injekční stříkačky a sterilní jehly (velikost 26G) byly kosti propláchnuty médiem RPMI 1640 bez séra, čímž došlo k uvolnění kostní dřeně - KD (sytě červený váleček). KD byla rozsuspendována 1ml pipetou a přefiltrována (filtr BD, 50 μ m) do centrifugační zkumavky. Následovala centrifugace (10min, 4°C, 160g) a k peletu byly přidány 2 ml 0,84% NH₄Cl za účelem lýzy erytrocytů. Po 1 minutě byla lýza zastavena přidáním 10ml média RPMI 1640 bez séra. Získaná suspenze buněk byla spočítána pomocí trypanové modři a Bürkerovy komůrky a podrobena magnetické separaci, aby byly vytěženy neutrofilly o co nejvyšší čistotě.

3.7. Magnetická separace

Vyizolované neutrofilly jsme z média převedli do pufru (PBS + 2%FCS + 2mM EDTA), ve kterém byly dále zpracovány magnetickou separací. Metoda magnetické separace je založena na principu negativní sorpce. Suspenze buněk je označena směsí primárních biotinizovaných monoklonálních protilátek proti antigenům neexprimovaným na neutrofilech. Následné značení sekundární protilátkou s feromagnetickými částicemi zajistí, že v separační kolonce zůstanou zachyceny všechny buňky mimo neutrofilů. Při samotné separaci byla použita komerční souprava protilátek Neutrophil Isolation Kit – mouse (Myltenyi Biotec, USA), dále magnetické separační kolonky-LS column a podstavec s magnetickým separátorem-Midi MACS separator (Myltenyi Biotec, USA). Suspenze vytekla z kolonky obsahovala neutrofilly, které byly opět spočítány a převedeny do média dle potřeby.

3.8. Sonikace

Daná suspenze byla sonikována za použití přístroje HIELSCHER VP200S. Ozvučování probíhalo vždy 10x10 vteřin s 20-ti vteřinovými intervaly chlazení po každém ozvučení.

3.9. Měření a výpočet velikosti nádorů

Velikost nádorů byla kontrolována během léčby obden, poté min 1x týdně. Pomocí kaliperu změřený největší a nejmenší rozměr nádoru (A a B) posloužily k výpočtu objemů nádorů podle vzorce $V = \pi/6 AB^2$ (Inaba a kol., 1986). Objemy byly statisticky vyhodnoceny.

3.10. Výpočet redukce nádorového růstu

Redukce nádorového růstu, v porovnání s kontrolní skupinou, ve dnech 4, 6, 8, 10, 12, 14 od započetí terapie byla počítána následovně:

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

Průměr z hodnot naměřených v jednotlivé dny je vyjádřen v procentech a představuje průměrnou redukci nádorového růstu dané skupiny.

3.11. Počítání plicních metastáz

Vypitvané plíce byly fixovány ve 4 % roztoku formaldehydu. Poté byla pod binokulární lupou spočítána metastatická ložiska, která se jeví jako černé tečky (Větvicka a kol., 2007).

3.12. Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledná data byla vyhodnocena v programu Statistika 12. Statistická významnost byla zjišťována pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) doplněné post-hoc Tukeyovým testem. Analýza přežívání byla provedena v programu Statistika 12 pomocí Kaplan-Meierova testu.

3.13. Příprava terapeutických látek pro *in vivo* a *in vitro* experimenty

3.13.1. Příprava laminarinu-BAM

Pro připojení biokompatibilní membránové kotvy (BAM) bylo nejprve nutné provést redukční aminaci laminarinu. Roztok laminarinu byl podroben pětidenní redukci kyanoborohydridem sodným v prostředí octanu amonného (pH 7,5, 50°C). Následovala dialýza roztoku přes dialyzační membránu MWCO 3500 (Serva) proti PBS (4°C, stálé míchání) (Torosantucci a kol., 2005). Na aminoskupinu laminarinu byla navázána molekula BAM dle metody Kata a kolektivu (2004). K 6ml 0,25mM laminarinu o pH v rozmezí 7,2-

8,3 bylo přidáno 300 μ l 7,3 mM BAM₄₀₀₀ (23,36 mg BAM₄₀₀₀ rozpuštěno v 800 μ l DMSO). Roztok byl promíchán a 2 hodiny inkubován při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena 250 μ l 1 M TRIS/HCl o pH 8,0. Roztok byl opět dialyzován za stejných podmínek jako po aminaci. Konečným produktem byl 0,2mM laminarin-BAM₄₀₀₀ v PBS.

3.13.2. Příprava mananu-BAM

Syntéza manan-BAM probíhala dle metodiky shodné s laminarin-BAM (bod 3.11.1). Nejprve redukční aminace, dialýza a navázání BAM na aminoskupinu mananu, poté opět dialýza a konečná úprava na 0,2mM roztok manan-BAM₄₀₀₀ v PBS.

3.13.3. Příprava Zymosanu A a Zymosanu-SMCC

Pro přípravu suspenze volného Zymosanu bylo smíšeno 104,2 mg Zymosanu A s 6 ml PBS, sonikováno a dialyzováno přes noc proti PBS (4°C, MWCO 12-14 000). Pro navázání kovalentní kotvy SMCC bylo k 6 ml sonikované suspenze Zymosanu A přidáno 1,5 ml 2 mM SMCC. Vazba SMCC probíhala 40 min při pokojové teplotě.

3.13.4. Příprava lysinu-BAM

K 6 ml roztoku 0,21mM lysinu v PBS bylo přidáno 200 μ l 9mM BAM₄₀₀₀ v DMSO. Vazba BAM₄₀₀₀ probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Takto byl získán 0,2mM roztok lysinu-BAM.

3.13.5. Příprava redukčních činidel

Činidla, která redukují disulfidické můstky (cystin), aby byla –SH skupina přístupná pro vazbu SMCC.

50 mM roztok TCEP v PBS - pro *in vivo* použití.

5 mM roztok DTT v PBS - pro *in vitro* použití.

3.13.6. Příprava thioglykolátového média

Z lyofilizovaného Fluid Thioglycollate medium a deionizované vody byl připraven 3% roztok, který po převaření v mikrovlnné troubě zčervenal (1-2min, 440W). Zchladlý roztok byl v uzavíratelné nádobě obalené alobalem umístěn přes noc do lednice, kde došlo k oddělení dvou fází – spodní žlutá vrstva byla injekční stříkačkou odebrána pro použití.

3.13.7. Priming neutrofilů

Neutrofilly byly primovány dle zavedené metody směsí cytokinů TNF α a GM-CSF (12,5 ng, respektive 2,5 ng/ml média) (Dewas a kol., 2003). Priming probíhal po dobu 20 minut (37°C, 5% CO₂). V experimentech vyžadujících kostimulaci CR3 receptoru, tedy v experimentech s použitím kotveného Zymosanu A a mananu, byl primovací roztok obohacen ještě o 2 μ M roztok rozpustného beta glukanu (laminarinu). Pro tyto experimenty muselo být zároveň použito médium obsahující složky komplementu – RPMI 1640 s 10% FCS bez tepelné inaktivace.

3.14. Jednotlivé experimenty

3.14.1. Optimalizace izolace neutrofilů z kostní dřeně (KD) a stanovení jejich čistoty.

3.14.1.1 Minimalizace ztrát neutrofilů

Ačkoliv jsme při magnetické separaci postupovali přesně dle návodu přiloženého ke kitu, získané počty neutrofilů byly velmi nízké (z původního množství 400 milionů buněk pouze 2 miliony). Po několika dalších neúspěšných pokusech byla kontaktována technická podpora výrobce, kde nám sdělili, že z celkového počtu buněk v KD myši je přibližně 25% neutrofilů a výtěžnost magnetické separace je okolo 35%. Pro minimalizaci ztrát nám bylo doporučeno vynechat lýzu erytrocytů po izolaci buněk z kostní dřeně, jelikož části lyzovaných erytrocytů mohou tvořit shluky s ostatními buňkami a zneprůchodnit tak separační kolonku. Dále nám bylo navrženo použití pre-separačního filtru s 30 μ m póry pro lepší oddělení buněk před nanesením do separační kolonky (Mgr. Andreas Nicodemou, produktový manažer Myltenyi Biotec, Biohem Slovensko, psané sdělení).

Takto modifikovaný postup nám zajistil dostatečné množství neutrofilů, které odpovídalo udávané výtěžnosti.

3.14.1.2. Stanovení čistoty neutrofilů na průtokovém cytometru

Pro zjištění efektivity magnetické separace byl použit 1 milion neutrofilů, které byly centrifugovány (10min, 4°C, 160g) a rozsuspendovány v 0,5ml PBS. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem bylo naneseno 10 μ l dané suspenze na jamku. K suspenzi neutrofilů byla přidána směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek (MoAbs) předem naředěných PBS. Použité protilátky a jejich ředění je uvedeno v tabulce I. Vzorky byly s MoAbs inkubovány (20 min, 4°C) a následovalo centrifugační promytí nenavázaných MoAbs 150 μ l PBS (2min, 4°C, 424g). K peletu bylo doplněno 140 μ l PBS a

10 μ l kalibračních kuliček, které sloužily pro zjištění absolutního počtu buněk ve vzorku. Vzorky neutrofilů byly měřeny na průtokovém cytometru (BD FACSCantoII flow cytometer, BD Biosciences, USA) při nastavení laserů uvedeném v tabulce II. Bylo naměřeno 20 000 událostí. Získané hodnoty byly vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3. Průměrná čistota neutrofilů používaných pro *in vitro* pokusy byla 90%.

Tabulka I.: Druhy použitých protilátek

název protilátky	typ buněk	ředění
anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	leukocyty	200x
anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0,2 mg/ml	granulocyty	100x

Tabulka II.: Nastavení průtokového cytometru:

Nastavení laserů	
Window Extension	2,0
FSC Area Scaling	0,8
Laser Delay Blue	0,0
Laser Delay Red	30,0
Area Scaling Blue	0,8
Area Scaling Red	1,3

3.14.2. Pokus č. 1: Analýza nádorového infiltrátu pomocí průtokové cytometrie v průběhu terapie melanomu založené na použití Zymosanu-SMCC. *In vivo* experiment.

Pro tento pokus bylo použito 40 myši C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk („0“ hod) byly myši randomizovány do skupin po 9. Nejdříve bylo všem skupinám podáno *i.t.* (intratumorálně) redukční činidlo TCEP, které připravilo nádorové buňky pro ukotvení Zymosanu-SMCC. Po 1 hodině byla podána terapeutická látka v množství 50 μ l na myš, též *i.t.*. Jednotlivé skupiny a jim aplikované terapeutické látky jsou shrnuty v tabulce III. V 12, 24 a 48 hodinách byly z každé skupiny odebrány 3 myši (v čase „0“ 1 myš) a po změření velikosti nádorů usmrceny cervikální dislokací.

Tabulka III. Terapeutické látky použité u jednotlivých skupin z pokusu č. 1.

Skupina	Terapeutikum	Příprava
K	PBS	-
A	LPS	0,5mg LPS/ml PBS
B	Zymosan-SMCC	14mg Zymosan-SMCC/ml PBS
C	Zymosan-SMCC+LPS	0,5mg LPS/ ml suspenze Zymosan-SMCC v PBS

3.14.2.1. Zpracování nádorů

Myším byly odebrány nádory, očištěny, opláchnuty v RPMI 1640 bez séra a zváženy. Následovalo rozstříhání nádorů na co nejmenší kousky a přenesení do 1ml RPMI 1640 bez séra s Liberázou DL (0,33 mg/ml) a DNázou I (0,2 mg/ml). V tomto roztoku byly nádory ponechány 1 hodinu na vertikální třepačce (37°C). Poté byly vzorky centrifugovány (10min, 4°C, 160g) a poté z nich odebrány supernatanty pro stanovení uvolněné MPO. Vzniklý pelet byl naředěn PBS. Takto byla rozvolněná nádorová tkáň homogenizována přes filtr s póry o velikosti 70µm (BD Biosciences). Homogenát byl dále centrifugován ve větším objemu PBS –cca 15ml (10min, 4°C, 160g). Pelet byl rozvolněn v 0,5ml PBS a přenesen do 96 jamkové mikrotitrační destičky s U dnem v množství 10µl na jamku. Každý nádor byl nanesen do 3 jamek pro následné značení MoAbs.

3.14.2.2. Analýza infiltrátu na průtokovém cytometru.

Fluorescenčně značené MoAbs proti CD znakům exprimovaným na leukocytech byly předem naředěny v PBS a rozděleny do dvou typů značení I a II. Typy značení a ředění protilátek jsou uvedeny v tabulce IV. Poté byly MoAbs nanесeny k nádorové suspenzi v mikrotitrační destičce. Každý nádor byl značen I i II značením a jako kontrola pozadí sloužila jamka bez značení. Pro kontrolu správné funkce MoAbs byly použity splenocyty myši ze skupiny I. Inkubace vzorků s MoAbs probíhala 20 minut (4°C) s následným promytím centrifugací (2min, 4°C, 424g). K peletu bylo přidáno 140µl PBS a 10µl kalibračních kuliček (pro přepočet absolutního počtu buněk ve vzorku). Jednotlivé vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD FACS CantoII flow cytometer, (BD Biosciences, USA) při nastavení laserů uvedeném v tabulce II (viz výše). Bylo naměřeno 20 000 událostí. Získané hodnoty byly vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3.

Tabulka IV.: Typy a ředění MoAbs použitých v pokusu č. 1.

Název protilátky	Značení	Typ buněk	Ředění
anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	I., II.	leukocyty	200x
anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5; 0,2 mg/ml	I.	CD4+ T-lymfocyty	100x
anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53- 6.7; 0,2 mg/ml	I.	CD8+ T-lymfocyty	100x
anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136; 0,2 mg/ml	I.	NK buňky	100x
anti-Mouse CD3e FITC; clone 145- 2C11; 0,5 mg/ml	I., II	T-Lymfocyty	100x
anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3; 0,2 mg/ml	II.	B-Lymfocyty	100x
anti-Mouse F4/80 PE-Cy7; clone BM8; 0,2 mg/ml	II.	Monocyty/ makrofágy	100x

3.14.3. Pokus č. 2: *In vitro* cytotoxické působení naivních neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM/manan-BAM.

V případě, že na nádorové buňky byl kotven laminarin (laminarin-BAM), bylo v celém pokusu použito RPMI 1640 s 10% deaktivovaného FCS, pro práci s kotveným mananem (manan-BAM) pak RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS (kvůli zachování složek komplementu). Takto bylo rozdělení médií dodržováno při každé příležitosti jejich potřeby, tedy pro přípravu ligandu, nádorových buněk i neutrofilů. Všechny vzorky byly připraveny v triplikacích. Melanomové buňky B16-F10 byly ošetřeny dle kapitoly 3.4. Suspenze nádorových buněk o koncentraci 500 000/ml byla nanášena do mikrotitrační destičky s V dnem v množství 100 μ l (50 000 buněk na jamku). Následovala centrifugace destičky (2 min, 4°C, 424g). K peletu v odpovídajících jamkách bylo přidáno 100 μ l ligandů (laminarin-BAM/manan-BAM), případně média, pipetováním promícháno a destička byla uložena do termostatu k inkubaci (37°C, 5% CO₂, 30min), za účelem navázání ligandů. Poté byla destička centrifugována (2 min, 4°C, 424g) a supernatanty ocáknuty. Následovalo

přidání neutrofilů připravených dle metodiky v kapitole 3.6. a 3.7. Suspenze neutrofilů o koncentraci 1,25 mil/ml byla nanášena k peletu nádorových buněk v množství 200μl na jamku (250 000 buněk) a promíchána pipetou. Směs byla inkubována v termostatu (37°C, 5%CO₂, 2hod). Kombinace ligandů, nádorových buněk a neutrofilů jsou shrnuty v tabulce V.

Po ukončení inkubace bylo opatrně z povrchu jamek odebráno 60μl média a zamrazeno pro pozdější stanovení MPO. Ke zbylým buňkám bylo přidáno 60μl PBS a pomocí trypanové modři byly spočítány živé nádorové buňky. Výsledek byl vyjádřen v počtech živých nádorových buněk na jamku.

Tabulka V.: Obsah jamek u skupin porovnávaných v pokusu č.2.

Skupina	Nádorové buňky [abs. počet]	Ligand	Neutrofilly [abs. počet]
A	50 000	laminarin-BAM	250 000
B	50 000	manan-BAM	250 000
C	50 000	-	250 000
D	50 000	-	-

3.14.4. Pokus č. 3: *In vitro* cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM.

V tomto pokusu byly použity neutrofilly aktivované TNF-α a GM-CSF. Melanomové buňky B16-F10 byly ošetřeny dle kapitoly 3.4. Suspenze nádorových buněk o koncentraci 1mil/ml byla nanášena do mikrotitrační destičky s U dnem. Pro minimalizaci poškození nádorových buněk byla vynechána centrifugace a ligandy byly nanášeny v dvojnásobné koncentraci přímo k buněčné suspenzi. Jako kontrola kotvení pomocí BAM molekuly byl použit intaktní lysin-BAM. Následovala inkubace pro navázání ligandů (30min, 37°C, 5% CO₂). Poté byla destička centrifugována (2 min, 4°C, 424g) a supernatanty ocákny. Neutrofilly o koncentraci 2.5mil/ml byly připraveny dle metodiky v kapitole 3.6. a 3.7. Část suspenze byla aktivována přidáním TNFα a GM-CSF a na výsledné koncentrace 12 a 2,5 ng/ml suspenze. Aktivace neutrofilů probíhala v termostatu (20min, 37°C, 5% CO₂). Aktivované neutrofilly byly napipetovány v množství 200μl na jamku do odpovídajících jamek. K vybraným jamkám byl přidán volný laminarin na výslednou koncentraci 0,02 mM

(kontrola působení nenávaného ligandu) a PMA na výslednou koncentraci 10ng/ml suspenze (kontrola aktivace neutrofilů). Destička byla inkubována v termostatu (37°C, 5%CO₂, 2hod). Složení buněk a ligandů v jednotlivých jamkách je shrnuto v tabulce VI. Po ukončení inkubace bylo postupováno stejně jako v bodě 3.14.3.

Tabulka VI.: Obsah jamek u skupin porovnávaných v pokusu č. 3.

Skupina	Nádorové buňky [abs.počet]	Ligand	Neutrofilly [abs. počet/ aktivace]
A	100 000	laminarin-BAM	500 000/-
B	100 000	laminarin-BAM	500 000/GM-CSF+TNF α
C	100 000	laminarin-BAM	500 000/PMA
D	100 000	lysin-BAM	500 000/-
E	100 000	volný laminarin	500 000/-
F	100 000	-	-

3.14.5. Pokus č. 4: *In vitro* cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené mannan-BAM.

Pokus probíhal podle metodiky totožné s pokusem 3.14.4 s tím, že místo laminarinu byl pomocí BAM kotven manan. Ke všem účelům bylo používáno médium RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Složení buněk a ligandů v jednotlivých jamkách je shrnuto v tabulce V.

Tabulka VII.: Skupiny porovnávané v pokusu č. 4.

Skupina	Nádorové buňky [abs.počet]	Ligand	Neutrofilly [abs. počet/ aktivace]
A	100 000	manan-BAM	500 000/GM-CSF+TNF α
B	100 000		500 000/ GM-CSF+TNF α
C	100 000	manan-BAM	500 000/PMA
D	100 000	-	500 000/PMA
E	100 000	-	-

3.14.6. Pokus č. 5: Optimalizace aktivace neutrofilů pro *in vitro* cytotoxické působení na nádorové buňky značené mannan-BAM.

V tomto pokusu byla optimalizována aktivace neutrofilů, která spočívala v přidání GM-CSF, TNF α (12,5ng a 2ng/ml suspenze) a roztoku 2 μ M volného laminarinu. Volný laminarin byl do aktivační směsi zařazen, aby došlo k aktivaci CR3 receptoru neutrofilů. Ostatní kroky pokusu probíhaly shodně s pokusem 3.14.4. Ke všem účelům bylo používáno médium RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Složení buněk a ligandů v jednotlivých jamkách je shrnuto v tabulce VIII.

Tabulka VIII.: Obsah jamek u skupin porovnávaných v pokusu č. 5.

Skupina	Nádorové buňky [abs.počet]	Ligand	Neutrofilly [abs. počet/ aktivace]
A	100 000	manan-BAM	500 000/GM-CSF+TNF α +2 μ M laminarin
B	100 000	manan-BAM	-
C	100 000	-	500 000/GM-CSF+TNF α +2 μ M laminarin
D	100 000	-	-

3.14.7. Pokus č. 6: *In vitro* cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené Zymosan-SMCC.

V celém pokusu bylo používáno médium RPMI s 10% nedeaktivovaného FCS. Byly připraveny 3ml suspenze nádorových buněk o koncentraci 1mil/ml dle metodiky v kapitole 3.4. Tato suspenze byla rozdělena do dvou 15ml centrifugačních zkumavek na 1ml (zkumavka I) a 2 ml (zkumavka II), doplněna PBS a stočena (5min, 4°C, 160g). K sedimentu nádorových buněk ve zkumavce I byl přidán 1ml 5mM DTT v PBS, k sedimentu ve zkumavce II 2ml PBS. Směs byla lehce poklepem rozvolněna a umístěna na 1 hodinu na led za účelem redukce cysteinových můstků pro navázání SMCC kotevní molekuly. Po skončení redukce byly nádorové buňky 2x centrifugačně promyty 15ml PBS (5min, 4°C, 160g). K sedimentu ve zkumavce I byl přidán 1ml PBS, ve zkumavce II 2 ml PBS. Buňky

rozvolněné pastérkou byly nanесeny do mikrotitrační destičky po 100 μ l, destička stočena (2min, 4°C, 424g) a ocáknuta. K sedimentu nádorových buněk byly přidány ligandy, jak je shrnuto v tabulce IX. Inkubace probíhala 30min při pokojové teplotě. Následovalo přidání 200 μ l neutrofilů aktivovaných GM-CSF, TNF α i volným 2 μ M laminarinem (viz tabulka IX). Dále probíhala inkubace a vyhodnocení pomocí trypanové modři shodně s pokusem 3.14.4.

Tabulka IX.: Obsah jamek u skupin porovnávaných v pokusu č. 6.

Skupina	Nádorové buňky [abs. počet]	Ligand	Neutrofilly [abs. počet/ aktivace]
A	100 000	Zymosan-SMCC	-
B	100 000	Zymosan-SMCC	500 000/GM-CSF+TNF α +2 μ M laminarin
C	100 000	Zymosan volný	-
D	100 000	Zymosan volný	500 000/GM-CSF+TNF α +2 μ M laminarin
E	100 000	-	500 000/GM-CSF+TNF α +2 μ M laminarin
F	100 000	-	-

3.14.8. Pokus č. 7: Stanovení míry degranulace neutrofilů pomocí MPO.

Fluorimetrické stanovení aktivity MPO:

Pro stanovení myeloperoxidázy (MPO) byly použity supernatanty odebrané v pokusech 3.14.2. – 3.14.7.

K detekci aktivity enzymu byla použita komerční souprava Myeloperoxidase (MPO) Fluorimetric Activity Assay Kit (Sigma Aldrich, USA). Test je založen na schopnosti MPO katalyzovat tvorbu HClO, která poté reaguje s aminofenyl fluoresceinem za vzniku fluoresceinu. Stanovení MPO bylo provedeno dle přiloženého návodu bez jakýchkoliv modifikací. Fluorescence byla měřena na přístroji Synergy H1 microplate reader, software Gen5 (BioTek).

Množství uvolněného fluoresceinu bylo vypočteno podle vzorce:

$$\text{MPO aktivita} = \frac{B \times \text{diluční faktor vzorku}}{\text{reakční čas} \times V}$$

B= množství (pmol) fluoresceinu uvolněného mezi časem $T_{\text{na začátku}}$ a $T_{\text{na konci}}$

reakční čas= $T_{\text{na začátku}} - T_{\text{na konci}}$ (min)

V= objem vzorku (ml)

Aktivita MPO je udávána v pmol/min/ml, tedy v $\mu\text{U/ml}$. Jedna jednotka U tak vyjadřuje množství MPO, které je při pokojové teplotě potřebné k vytvoření 1 μmol fluoresceinu za 1 minutu.

3.14.9. Pokus č.8: Chemoatrakce neutrofilů do mikroprostředí melanomu B16-F10. *In vivo* experiment.

V tomto pokusu bylo použito 36 myší C57BL/6N s transplantovaným melanomem B16-F10. Dvanáctý den od transplantace byly myši randomizovány do 6 skupin a chovány samostatně. Po změření velikosti nádoru byla myším aplikována terapie, vše *i.t.* (intratumorálně) v množství 50 μl ve dnech 0,1,2, 8,9,10. Látky a jejich směsi aplikované jednotlivým skupinám myší jsou uvedeny v tabulce X. Po dobu 14 dní od zahájení terapie byla obden měřena velikost nádorů. 26. den od transplantace nádorů byl pokus ukončen a u jednotlivých skupin stanoven průměrný počet metastatických ložisek v plicích.

Tabulka X.: Jednotlivé skupiny a terapeutické látky z pokusu č. 8.

Skupina	Terapeutikum	Příprava
K	PBS	-
A	thioglykolátové médium	viz bod 3.11.6
B	kasein hydrolyzát	10mg kaseinu/ml PBS
C	manan-BAM	0,2 mM manan-BAM v PBS
D	thioglykolátové médium+manan-BAM	lyofilizát 0,2mM manan-BAM v PBS + thioglykolátové médium (1:1)
E	kasein hydrolyzát+manan-BAM	10mg kasein hydrolyzátu + 2ml 0,2mM manan-BAM v PBS

3.14.10. Pokus č. 9: Terapie melanomu B16-F10 založená na použití manan-BAM a R-848. *In vivo* experiment.

Pro pokus bylo použito 24 myši C57BL/6N s transplantovaným melanomem B16-F10. Dvanáctý den od transplantace nádorů byly myši rozděleny do skupin po šesti a chovány jednotlivě. Po změření velikosti nádorů byly myšim injikovány terapeutické látky *i.t.* i *s.c.* (subkutánně) ve dnech 0,1,2, 8,9,10. Schéma aplikace je uvedeno v tabulce XI. Od zahájení terapie byla obden měřena velikost nádorů po dobu 14 dní, poté 1x za týden. U myši bylo sledováno přežití.

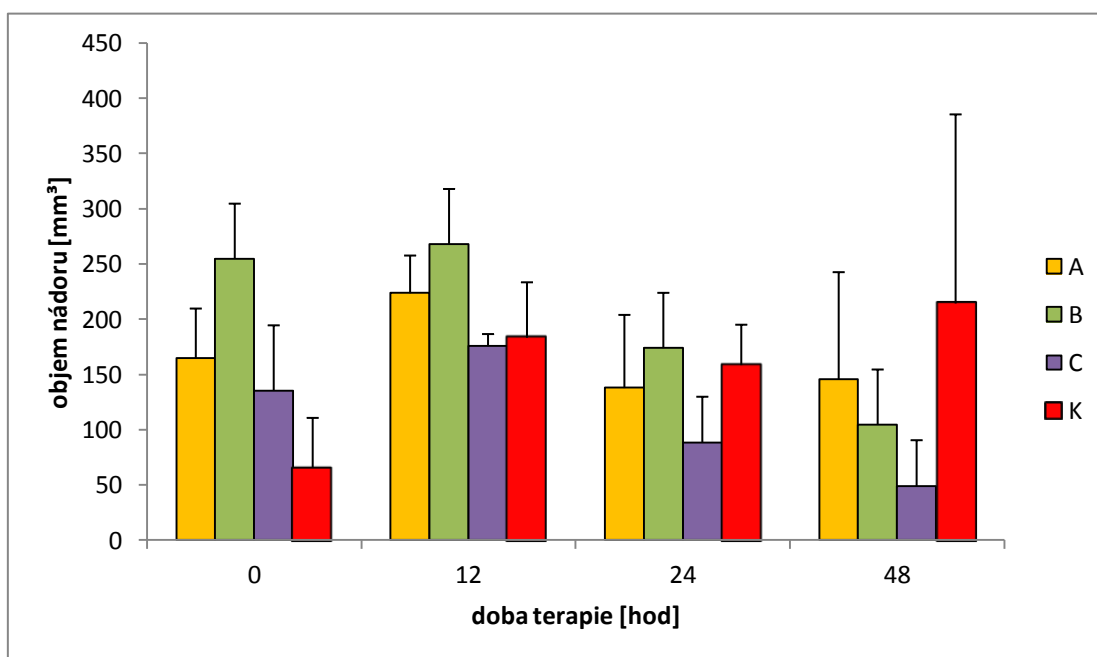
Tabulka XI.: Jednotlivé skupiny a terapeutické látky z pokusu č. 9.

Skupina	Terapeutikum	Příprava
K	PBS <i>s.c.</i>	-
A	R-848 <i>s.c.</i>	0,5mg R-848/ml PBS
B	manan-BAM <i>i.t.</i>	0,2 mM manan-BAM v PBS
C	manan-BAM <i>i.t.</i> + R-848 <i>s.c.</i>	-

4. Výsledky

4.1. Pokus č. 1.: Analýza nádorového infiltrátu pomocí průtokové cytometrie v průběhu terapie s použitím Zymosan-SMCC.

Cílem tohoto pokusu bylo stanovit zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů v nádorové tkáni v závislosti na typu léčby. Obrázek 4 demonstruje vliv použitých terapeutických látek na redukci nádorového růstu. Jak vyplývá z grafu, vliv kovalentně kotveného Zymosanu ve směsi s LPS byl znatelný již po 24 hodinách od aplikace. Nejvýraznější, 77%, redukce nastala 48 hodin po aplikaci této kombinace. Jak samotný Zymosan, tak LPS, působily jen mírně, jejich současná aplikace je tedy pro terapii zásadní.



Obr.4.: Vliv kotveného Zymosanu ve spojení s LPS na redukci nádorového růstu.

A – LPS, **B** – Zymosan-SMCC, **C** – Zymosan-SMCC+LPS, **K** – PBS

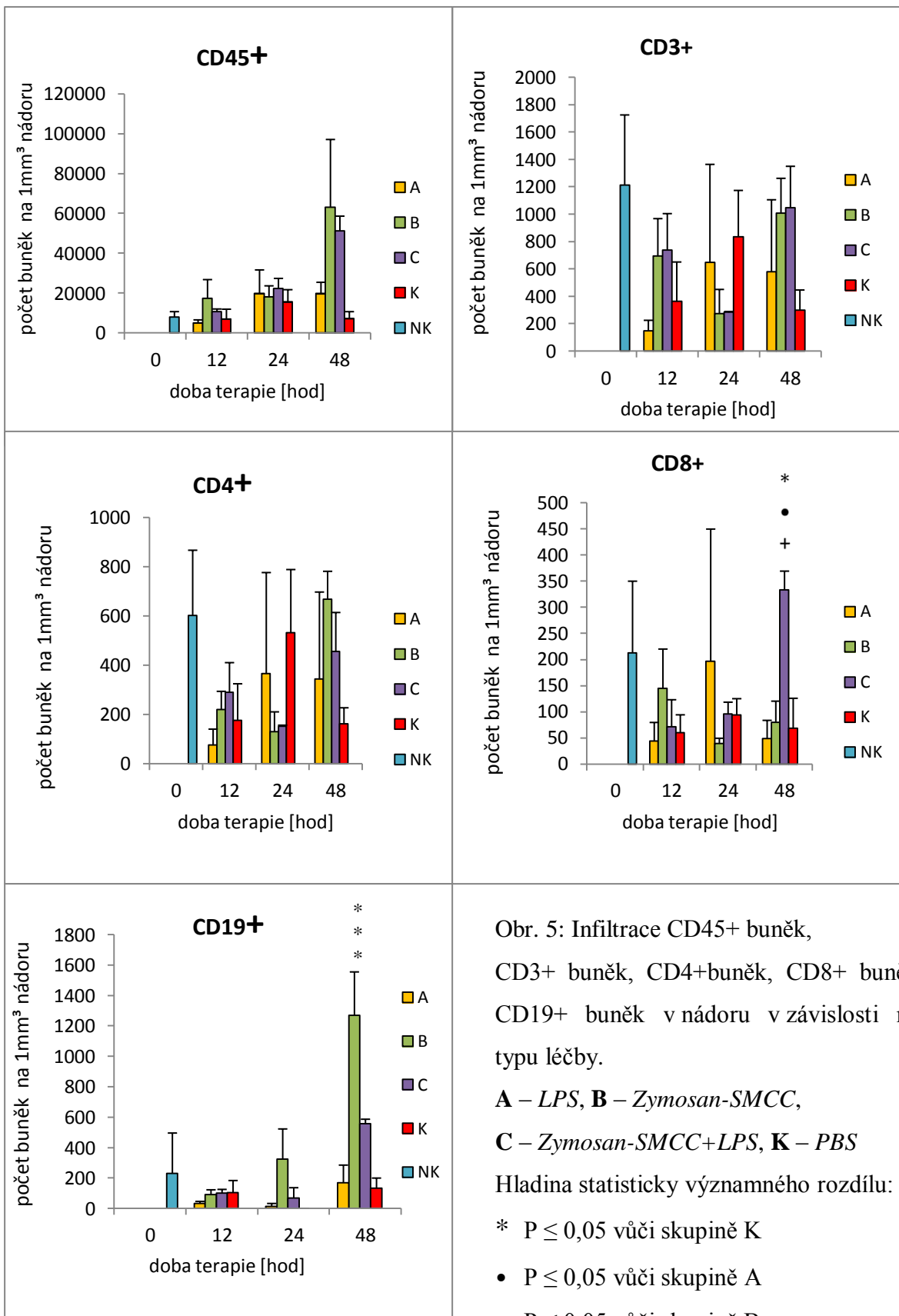
Sada grafů následující na obrázku 5 ukazuje, jak celkový leukocytární infiltrát, tak podíl buněk adaptivní imunity migrujících do prostředí nádoru v průběhu terapie. Buňky CD45+ představují leukocyty, u nichž je patrný nárůst v čase u všech léčených skupin. Po 48 hodinách došlo k markantnímu navýšení leukocytárního infiltrátu u skupiny B léčené

Zymosanem-SMCC. V porovnání s LPS vidíme, že Zymosan byl hlavní příčinou navýšení celkového počtu leukocytů i u kombinované terapie.

Následuje zhodnocení jednotlivých subpopulací buněk adaptivní imunity. U počtu CD3+ buněk – T lymfocytů opět došlo k nárůstu vlivem samotného Zymosanu a nebyl patrný žádný aditivní efekt v kombinaci s LPS. U skupin léčených LPS nastala po 24 hodinách vyšší infiltrace než u Zymosanu či kombinace Zymosanu s LPS, přesto po 48 hodinách LPS ve spojení se Zymosanem nevykazuje aditivní účinek. Pokud porovnáme počty buněk na ose y, je zřejmé, že více než polovinu tvoří CD4+ buňky (Th lymfocty – helpery) a menší část pak CD8+ buňky (cytotoxické T lymfocyty), u kterých se ve 48 hodinách projevuje statisticky významné synergické působení Zymosanu s LPS. Statistické významnosti dosáhl po 48 hodinách od aplikace Zymosanu i počet CD19+ B lymfocytů odpovědných za tvorbu protilátek.

Přestože počty buněk adaptivní imunity narůstaly, ve dvou případech i statisticky významně, nemůžeme z tohoto zjištění vyvozovat žádné závěry. Jak je patrné z prvního grafu, maximální počet leukocytů přítomných v 1 mm³ byl během terapie 60 tisíc, přičemž jednotlivé populace adaptivní imunity byly přítomny pouze v řádu stovek. Navíc u skupiny NK (negativní kontrola) byl zaznamenán vysoký počet všech 4 subpopulací, můžeme tedy říci, že určité procento se jich v nádoru vyskytuje přirozeně.

Na nádorové infiltraci se v průběhu terapie nejvíce podílely buňky vrozené imunity, jejichž rozpočty jsou zachyceny na sérii grafů v obrázku 6.



Obr. 5: Infiltrace CD45+ buněk, CD3+ buněk, CD4+buněk, CD8+ buněk CD19+ buněk v nádoru v závislosti na typu léčby.

A – LPS, **B** – Zymosan-SMCC,

C – Zymosan-SMCC+LPS, **K** – PBS

Hladina statisticky významného rozdílu:

* $P \leq 0,05$ vůči skupině K

• $P \leq 0,05$ vůči skupině A

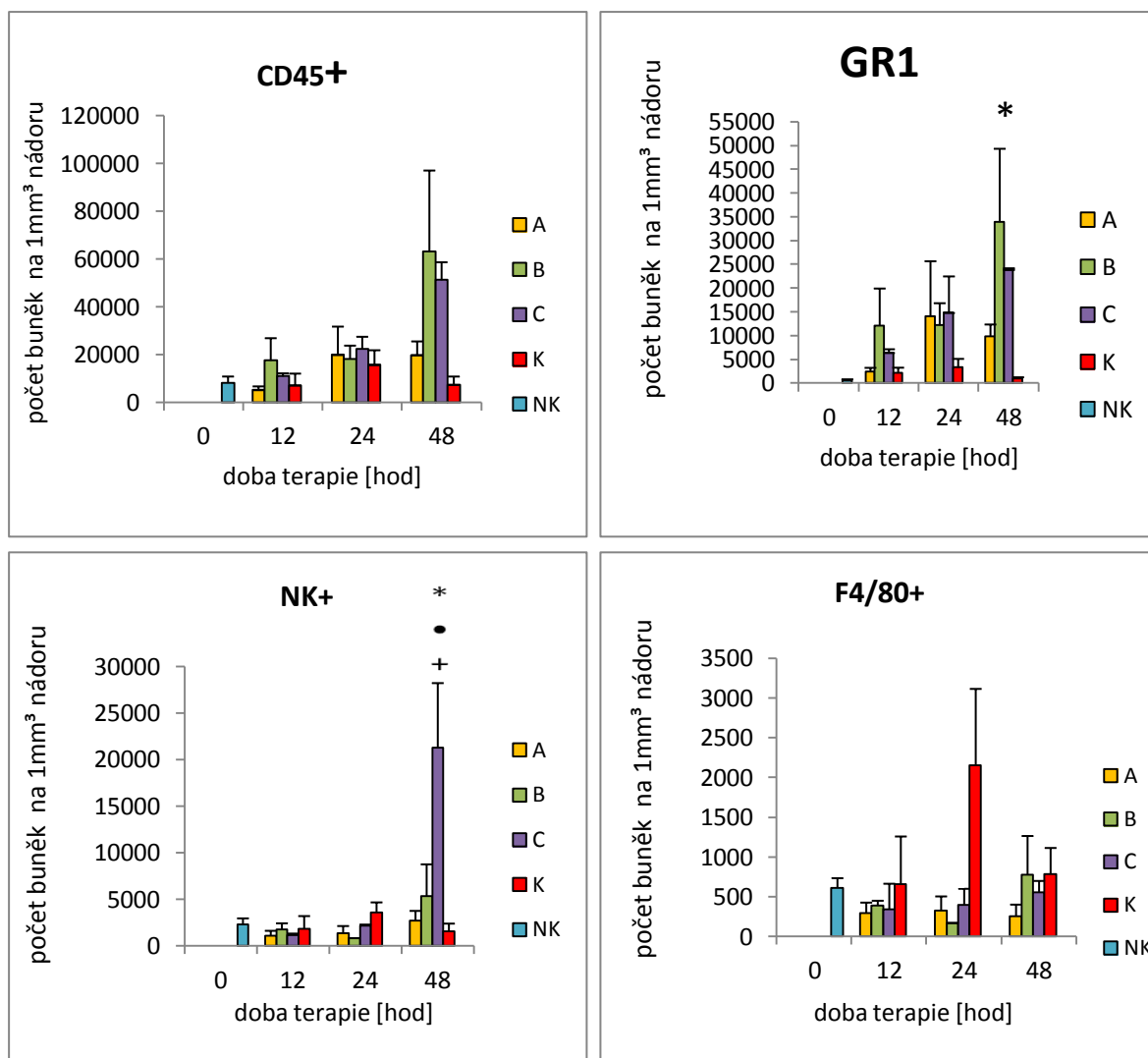
+ $P \leq 0,05$ vůči skupině B

*** $P \leq 0,005$ vůči skupině K

Z obrázku 6 je zřejmé, že hlavní složkou nádorového infiltrátu byly GR1+ buňky (granulocyty), které dosáhly maximální a statisticky významné hodnoty 48 hodin od aplikace Zymosanu. Můžeme zde pozorovat stejný vzestupný trend jako u leukocytů (CD45+) které jsou pro srovnání do této série rovněž zařazeny. U negativní kontroly byly granulocyty přítomny jen v řádu stovek, což dokazuje, že Zymosan je účinným agonistou a způsobí příliv těchto profesionálních fagocytů do prostředí nádoru.

U NK+ buněk nastal statisticky významný, výrazný nárůst po 48 hodinách od aplikace Zymosanu s LPS a projevil se zde synergický efekt obou terapeutik. U ostatních látek se počty NK buněk po celou dobu pohybovaly na úrovni kontroly.

Na posledním grafu (obrázek 6) jsou zobrazeny hodnoty pro F4/80+ (monocyty/makrofágy), které se boje s nádorovými buňkami příliš neúčastní. Zaznamenán byl jen mírný vzestup po 48 hodinách.



Obr. 6.: Infiltrace CD45+ buněk, GR1+ buněk, NK+buněk a F4/80+ buněk v nádoru v závislosti na typu léčby.

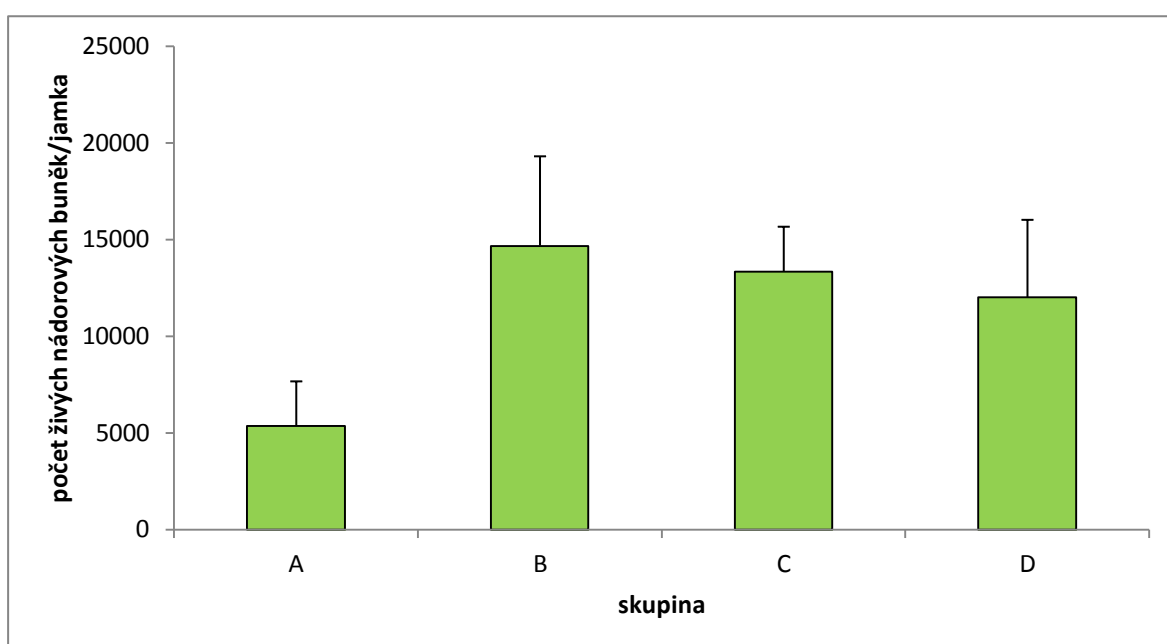
A – LPS, **B** – Zymosan-SMCC, **C** – Zymosan-SMCC+LPS, **K** – PBS

Hladina statisticky významného rozdílu:

- * $P \leq 0,05$ vůči skupině K
- $P \leq 0,05$ vůči skupině A
- + $P \leq 0,05$ vůči skupině B

4.2. Pokus č. 2: *In vitro* cytotoxické působení naivních neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM a manan-BAM.

Po zjištění přítomnosti neutrofilních granulocytů v nádorovém infiltrátu jsme se zabývali otázkou jejich cytotoxického působení na nádorové buňky. V tomto pokusu, jehož výsledky jsou shrnuty na obrázku 7, byl sledován vliv neutrofilů na nádorové buňky v závislosti na přítomnosti ligandů fagocytárních receptorů. Neutrofilily způsobily u nádorových buněk značených laminarin-BAM 60% a 55% redukci počtu v porovnání s neznačenými nádorovými buňkami (C) a nádorovými buňkami samotnými (D). V případě značení manan-BAM (skupina B) neutrofilily na nádorové buňky nereagovaly a jejich počet zůstal oproti kontrolním skupinám nezměněn.



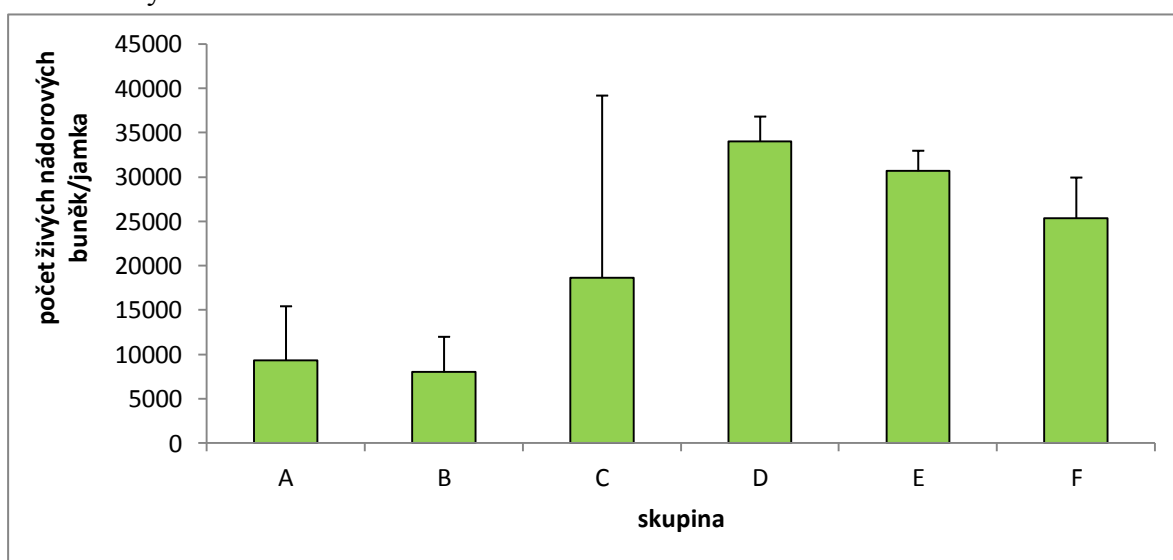
Obr. 7.: Cytotoxické působení naivních neutrofilů na nádorové buňky v závislosti na přítomnosti ligandu.

A – nádorové buňky značené laminarin-BAM+neutrofilily, **B** – nádorové buňky značené manan-BAM+neutrofilily, **C** – nádorové buňky+neutrofilily, **D** – nádorové buňky

4.3. Pokus č. 3: *In vitro* screening aktivace neutrofilů a jejich cytotoxicita vůči nádorovým buňkám značeným laminarin-BAM.

Hlavním předmětem uvedeného srovnávacího pokusu bylo nalézt vhodný způsob aktivace, který by napodobil aktivaci neutrofilů během migrace z kostní dřeně do místa poškození. Za druhé bylo nutné vyloučit efekt kotvy BAM na nádorové buňky použitím intaktního lysinu. Tento i všechny další pokusy byly prováděny s vyšším počtem nádorových buněk i neutrofilů za účelem přesnějšího počítání.

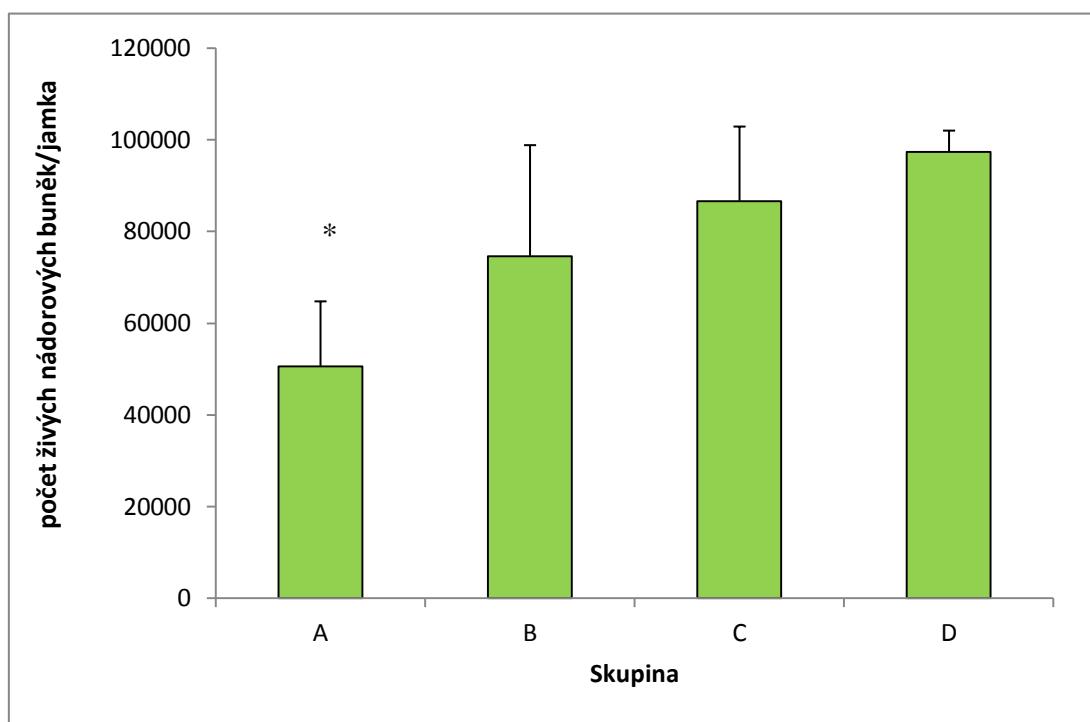
Pro priming byla zvolena kombinace cytokinů TNF α a GM-CSF. Takto stimulované neutrofilily byly porovnávány s naivními. Jako kontrola aktivace neutrofilů byla zvolena PMA. Cytotoxický efekt neutrofilů preinkubovaných se směsí cytokinů je uveden na obrázku 8. U skupiny A, kde naivní neutrofilily působily na nádorové buňky značené laminarin-BAM opět pozorujeme výraznou redukci oproti kontrolní skupině I (63%) shodnou s pokusem č. 2. Redukce se příliš nezměnila ani při použití primovaných neutrofilů (68% vůči I). Efekt PMA nedosáhl ani na úroveň naivních neutrofilů. V tomto kontrolním experimentu bylo dále ověřeno, že volný laminarin ani vazba lysin-BAM nemá vliv na působení neutrofilů na nádorové buňky. Naopak, význam kotvení byl zásadní pro neutrofilní atak, neboť u skupiny C s volným laminarinem nebyly nádorové buňky eliminovány.



Obr. 8.: Porovnání efektu primovaných a naivních neutrofilů u nádorových buněk značených laminarin-BAM.

A - NB značené laminarin-BAM+neutrofilily, **B** - NB značené laminarin-BAM+primované neutrofilily, **C** - NB značené laminarin-BAM+PMA+neutrofilily, **D** - NB značené lysin-BAM+neutrofilily, **E** - NB, volný laminarin+neutrofilily, **F** – nádorové buňky

Následující experiment, jehož výsledky vidíme na obrázku 9, potvrdil vliv $TNF\alpha+GM-CSF$ primovaných neutrofilů na nádorové buňky s navázaným laminarin-BAM. Byla získána statisticky významná, 48%ní, redukce počtu nádorových buněk. Podstatné je, že nádorové buňky značené laminarin-BAM jsou stejnou měrou zabíjeny jak neutrofilů primovaných s průměrnou redukcí 58%, tak naivními s průměrnou redukcí 59% (průměr výsledků tohoto a předchozího experimentu).



Obr. 9: Vliv primovaných neutrofilů na nádorové buňky značené laminarin-BAM.

A – nádorové buňky značené laminarin-BAM+neutrofilů, **B** – nádorové buňky značené laminarin-BAM

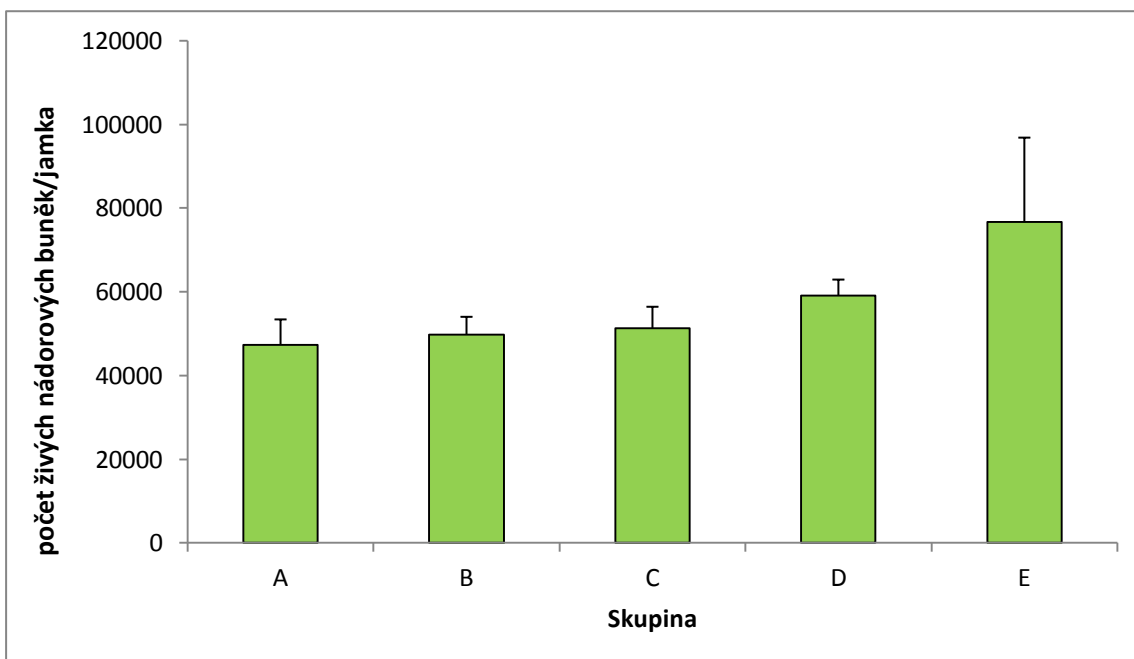
C – nádorové buňky+neutrofilů, **D** – nádorové buňky

Hladina statisticky významného rozdílu:

* $P \leq 0,05$ vůči skupině D

4.4. Pokus č.4.: *In vitro* cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené manan-BAM.

Po neúspěšném výsledku s použitím mananu v pokusu č. 3 byl i u tohoto ligandu zkoušen priming neutrofilů pro navození cytotoxického efektu. Výsledky zaznamenané na obrázku 10 ukazují, že neutrofilů primovaných směsí TNF α a GM-CSF nemají na nádorové buňky značené manan-BAM žádný vliv. K redukci opět nedošlo ani v případě neutrofilů aktivovaných PMA. Tento pokus byl opakován 3x se stejnými výsledky.



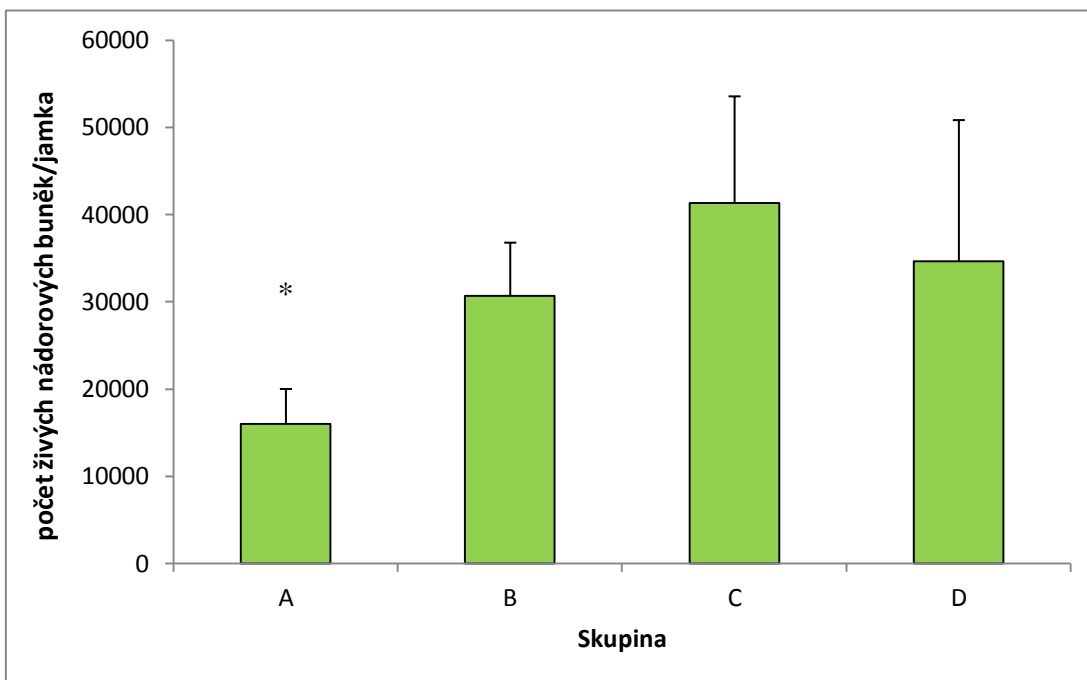
Obr. 10.: Vliv primovaných neutrofilů na nádorové buňky značené manan-BAM.

- A – nádorové buňky značené manan-BAM + primované neutrofilů,
- B – nádorové buňky + primované neutrofilů,
- C – nádorové buňky značené manan-BAM + neutrofilů + PMA
- D – nádorové buňky + neutrofilů + PMA, E – nádorové buňky

4.5. Pokus č. 5.: Optimalizace aktivace neutrofilů pro *in vitro* cytotoxické působení na nádorové buňky značené manan-BAM.

Cílem tohoto pokusu bylo nalézt vhodnou kombinaci látek, která by zajistila dostatečný priming neutrofilů tak, aby reagovaly na nádorové buňky s manan-BAM na povrchu. Ke směsi cytokinů byl navíc přidán volný laminarin, na 2 mikromolární výslednou koncentraci, jehož zásadní vliv plyne z obrázku 11, kde u skupiny A pozorujeme více než

50% redukci nádorových buněk. Můžeme odvodit, že laminarin aktivoval CR3 receptor neutrofilů (vazbou na lektinovou doménu) a ty se poté navázaly na iC3b opsonizované nádorové buňky.



Obr. 11.: Cytotoxický efekt primovaných neutrofilů vůči nádorovým buňkám s manan-BAM na povrchu.

A – nádorové buňky značené manan-BAM + primované neutrofily,

B – nádorové buňky značené manan-BAM, **C** – nádorové buňky + primované neutrofily

D – nádorové buňky

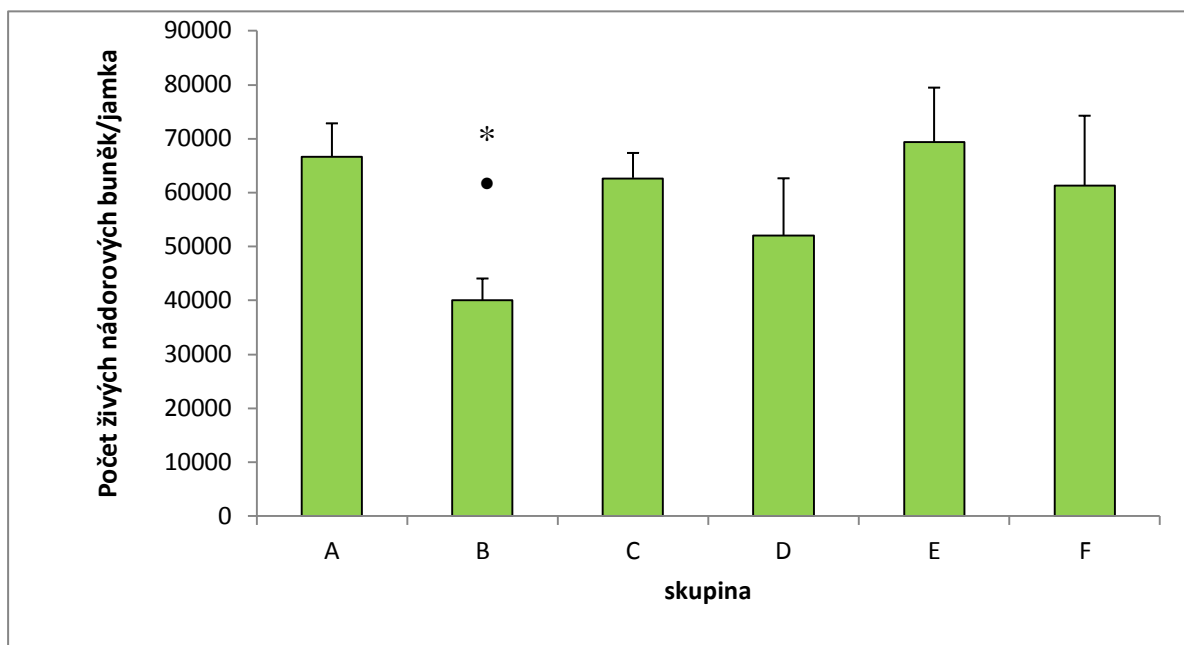
Hladina statisticky významného rozdílu:

* $P \leq 0,05$ vůči skupině C

4.6. Pokus č. 6.: *In vitro* cytotoxické působení aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky značené Zymosan-SMCC.

V posledním *in vitro* pokusu jsme k označení nádorových buněk použili Zymosan kovalentně kotvený pomocí heterobifunkčního činidla SMCC [succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carboxylat]. Jelikož se Zymosan skládá z mananu a betaglukanu, byly neutrofily primovány opět směsí s přídavkem volného laminarinu o 2 mikromolární výsledné koncentraci. Pokus byl proveden dvakrát se srovnatelnými výsledky

a v obou případech nastala statisticky významná redukce počtu nádorových buněk značených Zymosan-SMCC, jak vidíme v grafu na obrázku 12. Zároveň byl potvrzen význam kovalentního kotvení ligandu, neboť volný Zymosan cytotoxicitu neutrofilů nenavodil (viz skupina D). Během počítání buněk v Bürkerově komůrce byly opakovaně pozorovány neutrofilů adherující na povrch melanomových buněk.



Obr. 12.: Působení neutrofilů na nádorové buňky značené Zymosan-SMCC.

A – nádorové buňky značené Zymosan-SMCC,

B – nádorové buňky značené Zymosan-SMCC + primované neutrofilů,

C – nádorové buňky+volný Zymosan, **D** – nádorové buňky+volný Zymosan+ primované neutrofilů, **E** – nádorové buňky + primované neutrofilů, **F** – nádorové buňky

Hladina statisticky významného rozdílu:

* $P \leq 0,05$ vůči skupině A

• $P \leq 0,05$ vůči skupině E

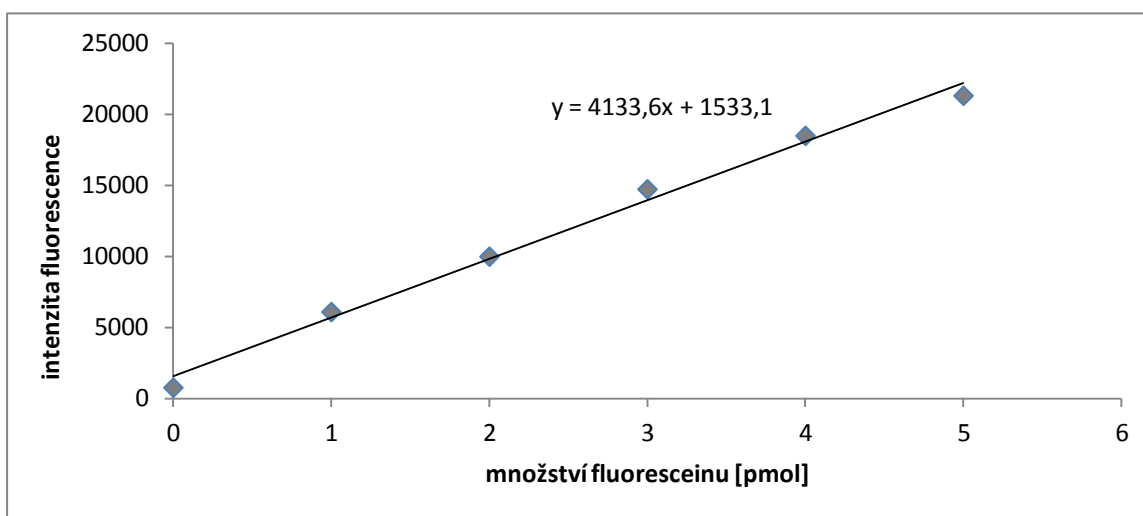
4.7. Pokus č. 7: Stanovení míry degranulace neutrofilů pomocí MPO.

Záměrem následujících experimentů bylo určit, zda při interakci neutrofilů s nádorovými buňkami dochází k exocytóze granul a uvolnění jejich obsahu za účelem likvidace nádorových buněk. Jako indikátor byl použit enzym myeloperoxidáza, jehož množství uvolněné do extracelulárního prostoru se v každém pokusu stanovovalo.

4.7.1. Stanovení aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostoru při interakci naivních neutrofilů s nádorovými buňkami značenými laminarin-BAM a manan-BAM.

Zde bylo sledováno, zda ligandy kotvené na povrchu nádorových buněk podnítí naivní neutrofilu k degranulaci a dojde k uvolnění MPO *in vitro*. Jednalo se tedy o analýzu aktivity supernatantů po interakcích naivních neutrofilů se značenými nádorovými buňkami, která byla provedena v pokuse 2.

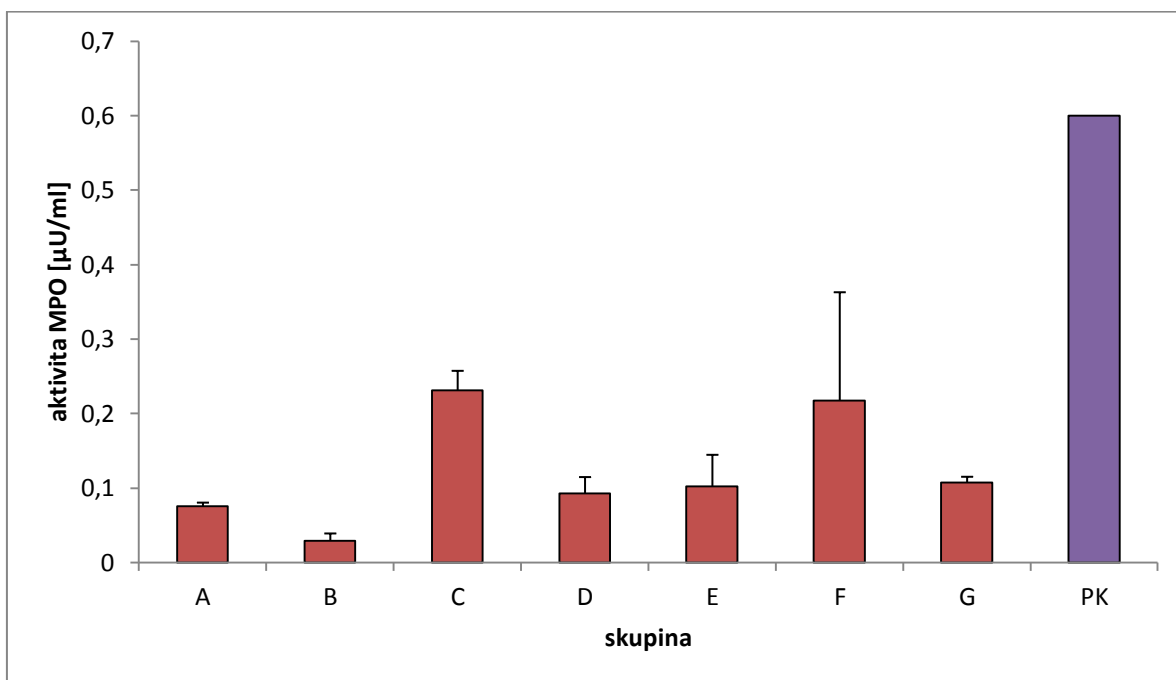
Kalibrační křivka s regresní rovnicí, podle níž byly prováděny další výpočty je uvedena na obrázku 13.



Obr. 13: Kalibrační křivka pro stanovení množství uvolněné MPO .

Graf na obrázku 14 porovnává interakci naivních neutrofilů s nádorovými buňkami značenými laminarin-BAM a manan-BAM. Bylo sledováno také množství enzymu uvolněné ze sonikovaných neutrofilů a nádorových buněk. V případě nádorových buněk značených laminarin-BAM i manan-BAM byla detekována velmi nízká aktivita, podobně jako u samotných nádorových buněk a neutrofilů. Výraznější aktivita byla zaznamenána u sonikovaných neutrofilů. Vyšší množství MPO uvolnily také neutrofilu s nádorovými

buňkami, kde však díky velkému rozptylu nemůžeme brát hodnoty jako směrodatné a navíc se daná aktivita rovná součtu aktivit buněk samotných.



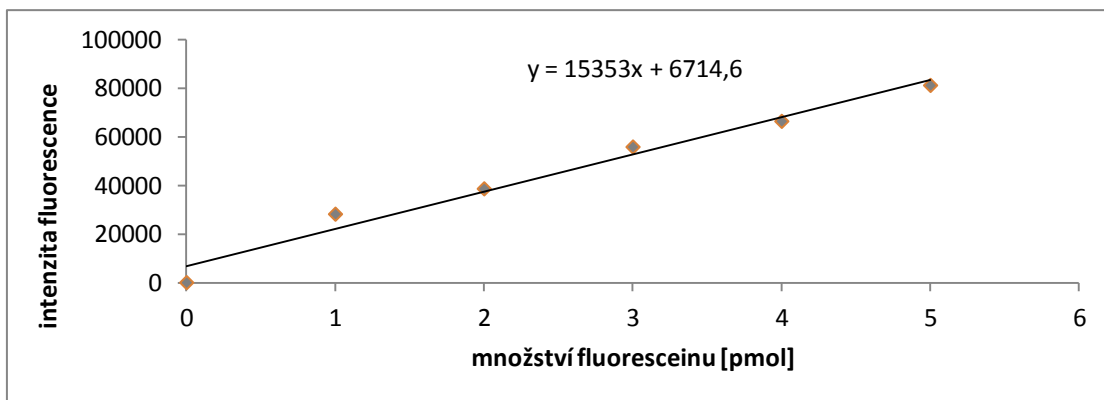
Obr. 14.: Aktivita MPO stanovená při interakci naivních neutrofilů s nádorovými buňkami a ligandy.

A – nádorové buňky značené laminarin-BAM+neutrofily, **B** – nádorové buňky značené manan-BAM+neutrofily, **C** – nádorové buňky +neutrofily, **D** – nádorové buňky, **E** – neutrofily, **F** – sonikované neutrofily, **G** – sonikované nádorové buňky,

PK – pozitivní kontrola

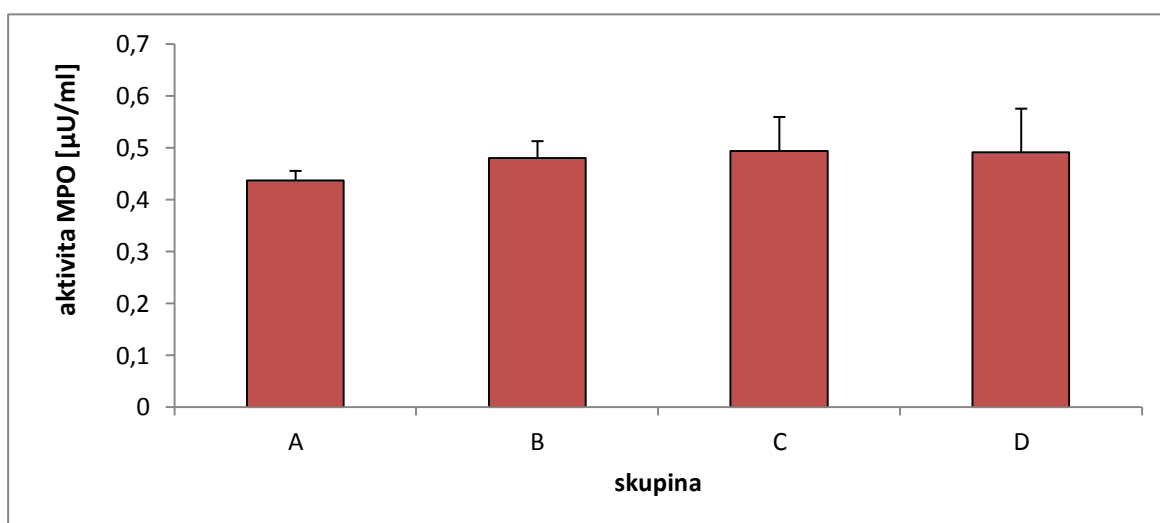
4.7.2. Stanovení aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostoru při interakci primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými laminarin-BAM a manan-BAM.

Dále byla pomocí MPO stanovována míra degranulace u primovaných neutrofilů, které dle předchozích výsledků (Obr. 9 a 11) vykazovaly zvýšený cytotoxický efekt vůči nádorovým buňkám značeným laminarin-BAM/manan-BAM. K analýze byly použity supernatanty odebrané v pokusech č.3 a č.5. Kalibrační křivka pro tato měření je znázorněna na obrázku 15.



Obr. 15.: Kalibrační křivka pro stanovení MPO u ligandů laminarin-BAM a manan-BAM.

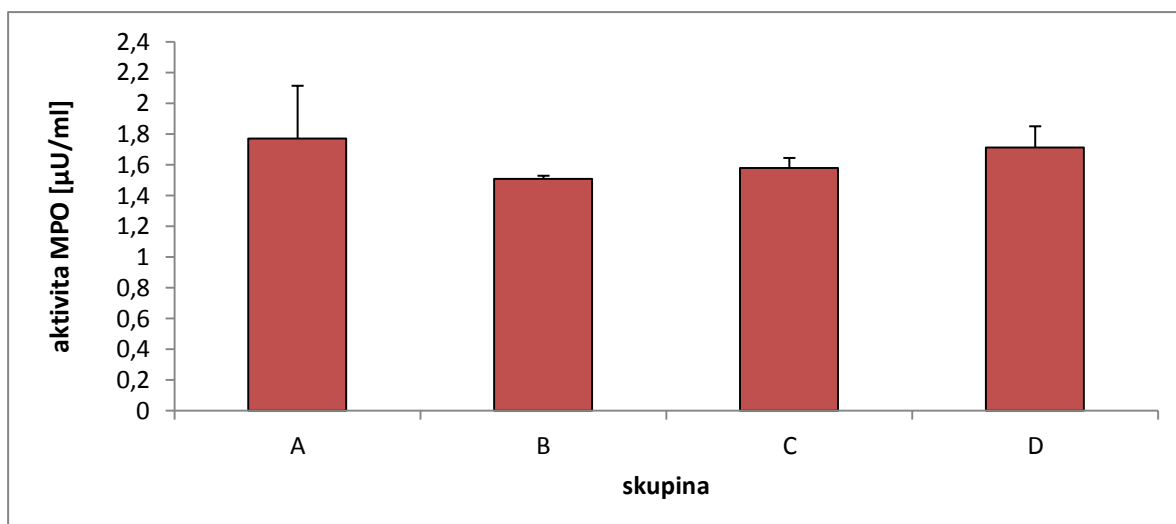
Naměřené hodnoty jsou uvedeny na obrázku 16 a 17. Z následujících grafů je zřejmé, že ani u primovaných neutrofilů se nepodařilo detekovat rozdíly v množství uvolněné MPO a že interakce neutrofilů s nádorovými buňkami nesoucími ligandy nevede k uvolnění detekovatelného množství MPO do média



Obr. 16.: Aktivita MPO v průběhu interakce primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými laminarin-BAM.

A – nádorové buňky značené laminarin-BAM+primované neutrofily,

B – nádorové buňky +primované neutrofily, **C** – primované neutrofily, **D** – nádorové buňky



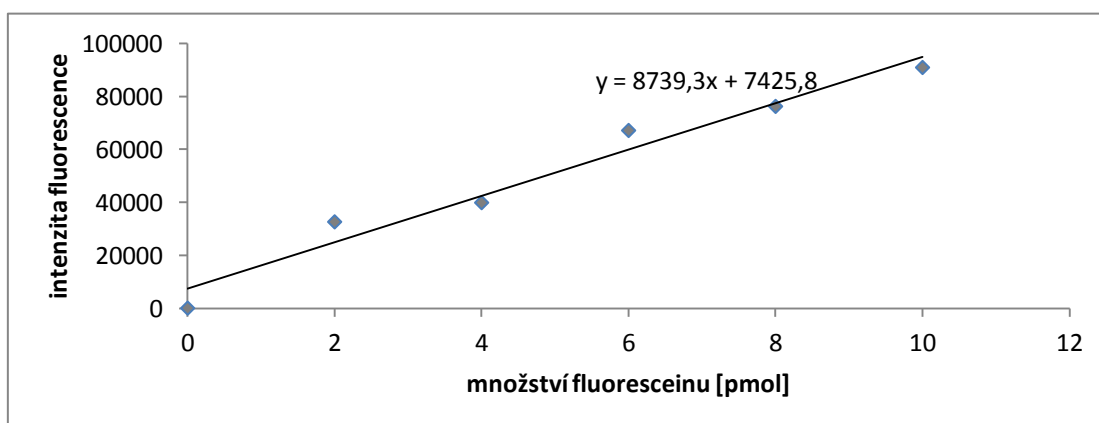
Obr. 17.: Aktivita MPO v průběhu interakce primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými manan-BAM.

A – nádorové buňky značené manan-BAM+primované neutrofily,

B – nádorové buňky +primované neutrofily, **C** – primované neutrofily, **D** – nádorové buňky

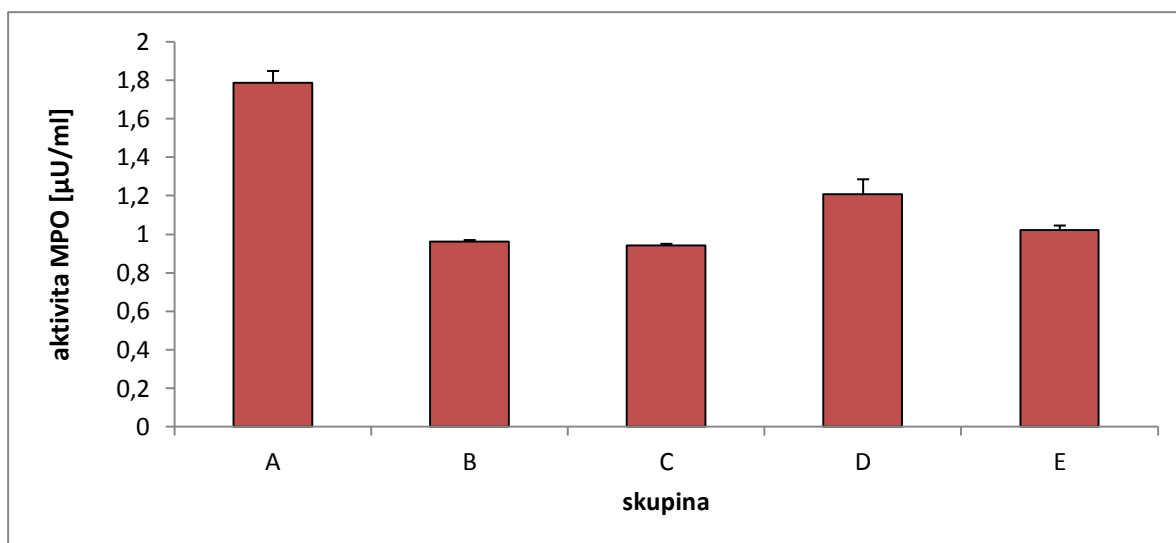
4.7.3. Stanovení aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostoru při interakci primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými Zymosan-SMCC.

In vitro uvolnění MPO bylo měřeno i ligandu Zymosan-SMCC za použití supernatantů odebraných po inkubaci v pokusu č. 6. Kalibrační křivka se nachází na obrázku 18, hodnoty aktivity MPO pak na obrázku 19.



Obr. 18.: Kalibrační křivka pro stanovení MPO u ligandu Zymosan-SMCC.

Jak vyplývá z grafu na obrázku 19, v přítomnosti Zymosan kovalentně kotveného na nádorových buňkách dochází k uvolnění MPO do prostředí. Volný Zymosan, stejně jako samotné nádorové buňky, uvolnění MPO nevyvolal.



Obr. 19.: Míra aktivity MPO v průběhu interakce primovaných neutrofilů s nádorovými buňkami značenými Zymosan-SMCC.

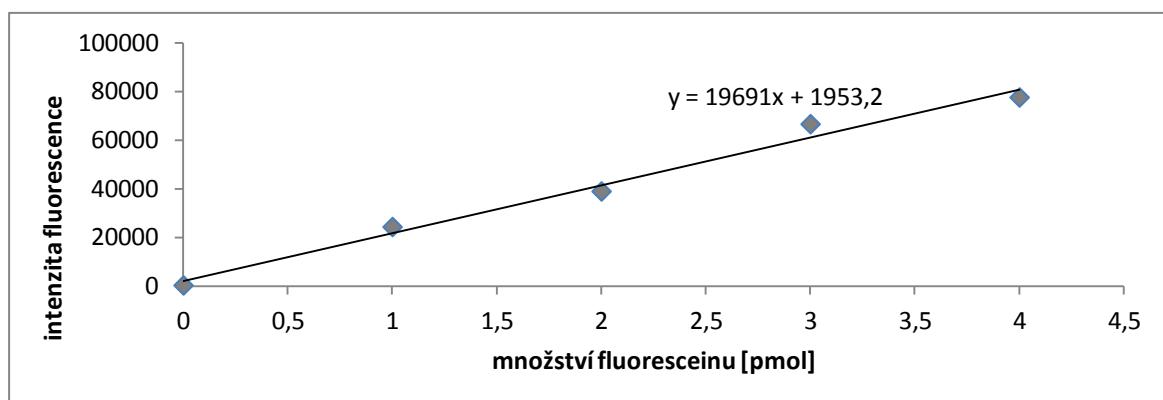
A – nádorové buňky značené Zymosan-SMCC+primované neutrofily,

B – nádorové buňky a volný Zymosan +primované neutrofily,

C – nádorové buňky+ primované neutrofily, **D** – neutrofily, **E** – nádorové buňky

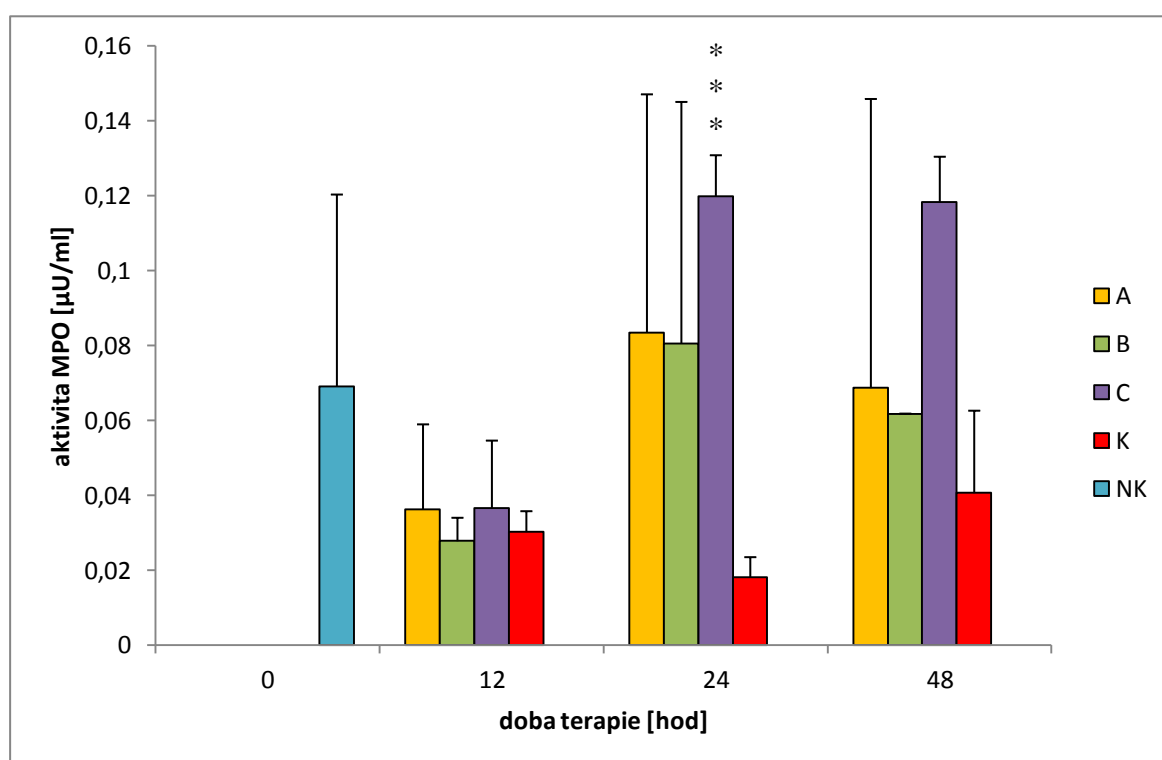
4.7.4. Stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru v nádorové tkáni po aplikaci kotveného Zymosan, LPS a jejich směsi.

V tomto pokusu bylo zjišťováno, zda v nádorové tkáni dochází k uvolňování MPO do mezibuněčného prostoru *in vivo*. Analyzovány byly supernatanty odebrané v pokusu č. 1. Výpočty byly provedeny pomocí kalibrační křivky z obrázku 20.



Obr. 20: Kalibrační křivka pro stanovení MPO uvolněné do extracelulárního prostoru.

Výsledky zaznamenávané v průběhu 48 hodin po aplikaci terapeutických látek, kotveného Zymosanu, LPS a jejich kombinace jsou uvedeny na obrázku 21. Z grafu vidíme, že v čase 12 hodin byla aktivita MPO u všech léčených skupin shodná s aktivitou MPO u skupiny kontrolní. V intervalu 24 hodin je patrné zvýšení aktivity u všech léčených skupin, přičemž nejvyšší množství MPO se uvolnilo v nádorové tkáni vystavené kombinaci Zymosan-SMCC a LPS. Tento nárůst byl statisticky významný a oproti kontrolní skupině 85%ní. Samotná terapeutika stimulovala uvolnění shodného množství enzymu, které bylo 3x vyšší než u kontrolní skupiny. Podobná dynamika probíhala i po 48 hodinách. Z hodnot naměřených v těchto dvou intervalech plyne, že Zymosan i LPS jsou stimulanty exocytózy primárních granul a v kombinaci vykazují aditivitu působení.



Obr. 21.: Vliv terapeutických látek na hladiny uvolněné MPO.

A – LPS, **B** – Zymosan-SMCC, **C** – Zymosan-SMCC+LPS, **K** – PBS, **NK** – negativní kontrola

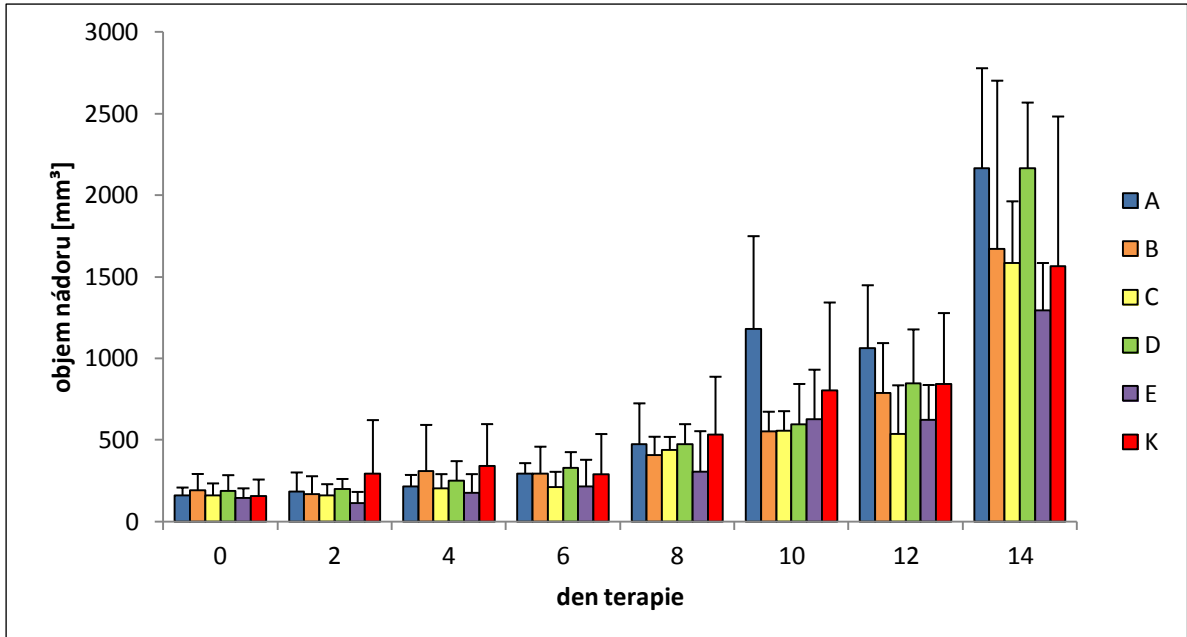
Hladina statisticky významného rozdílu:

*** $P \leq 0,005$ vůči skupině K

4.8. Pokus č. 8: Chemoatrakce neutrofilů do mikroprostředí melanomu B16-F10.

Cílem tohoto experimentu bylo podpořit stávající terapii navýšením počtu granulocytů v nádorové tkáni. Příliv buněk měl být způsoben aplikací látek vyvolávajících lokální zánět - thioglykolátovým médiem a jeho hlavní složkou kaseinem. Současně byl do nádoru injikován také BAMem kotvený manan. Vliv chemoatrakce na redukci nádorového růstu je shrnut v grafu na obrázku 22. Jak je z naměřených objemů nádorů patrné, tento způsob terapie nemá na redukci růstu nádorů žádný vliv. Neúčinná je jak chemoatrakce neutrofilů samotná, tak její kombinace s podpořením fagocytozy nádorových buněk vazbou manan-BAM. Do šestého dne od započetí léčby byly velikosti nádorů u všech skupin shodné s kontrolou. Poté nastalo mírné snížení u skupiny léčené kombinací manan-BAM s kaseinem, které se udrželo do skončení měření. U ostatních skupin se nádory zvětšily nad úroveň kontroly.

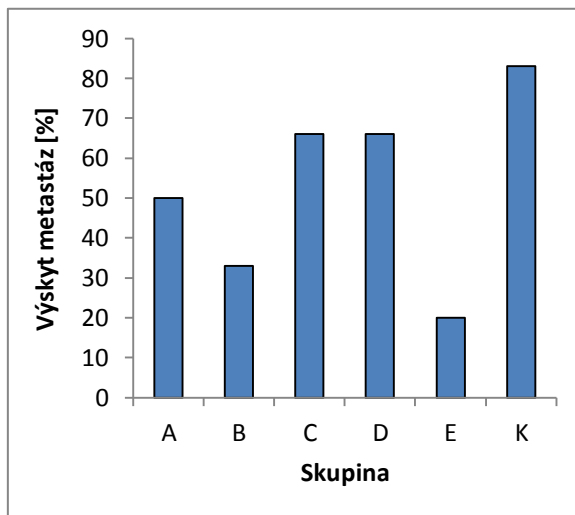
Po ukončení terapie byla zhodnocena přítomnost metastatických ložisek v plicích. Na obrázku 23 je uveden výskyt metastáz, tedy procento myší, u kterých byly metastázy nalezeny z celkového počtu myší ve skupině. Obrázek 24 doplňuje údaj o intenzitě metastazování, tedy průměrném počtu metastáz u myší, u kterých byly metastázy nalezeny. Z porovnání obou grafů vyplývá, že intenzitu metastazování nejlépe snižuje manan-BAM samotný i v kombinaci s chemoatraktanty (skupiny C, D, E), neboť pokud se u těchto myší metastázy vyskytly, tak pouze v nízkém počtu jednoho či dvou ložisek. Výskyt metastáz příznivě ovlivňuje také terapie s použitím manan-BAM s kaseinem.



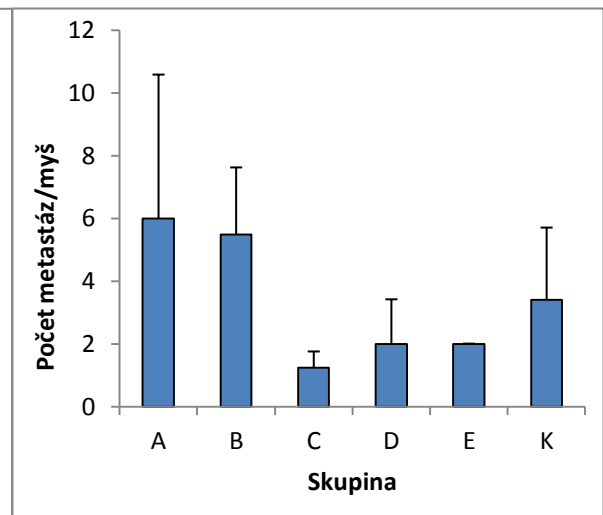
Obr. 22: Vliv terapie na velikost nádoru.

A – thioglykolátové médium, **B** – kasein, **C** – manan-BAM,

D – thioglykolátové médium+manan-BAM, **E** – kasein + manan-BAM, **K** - PBS



Obr. 23.: Vliv terapie na výskyt metastáz.



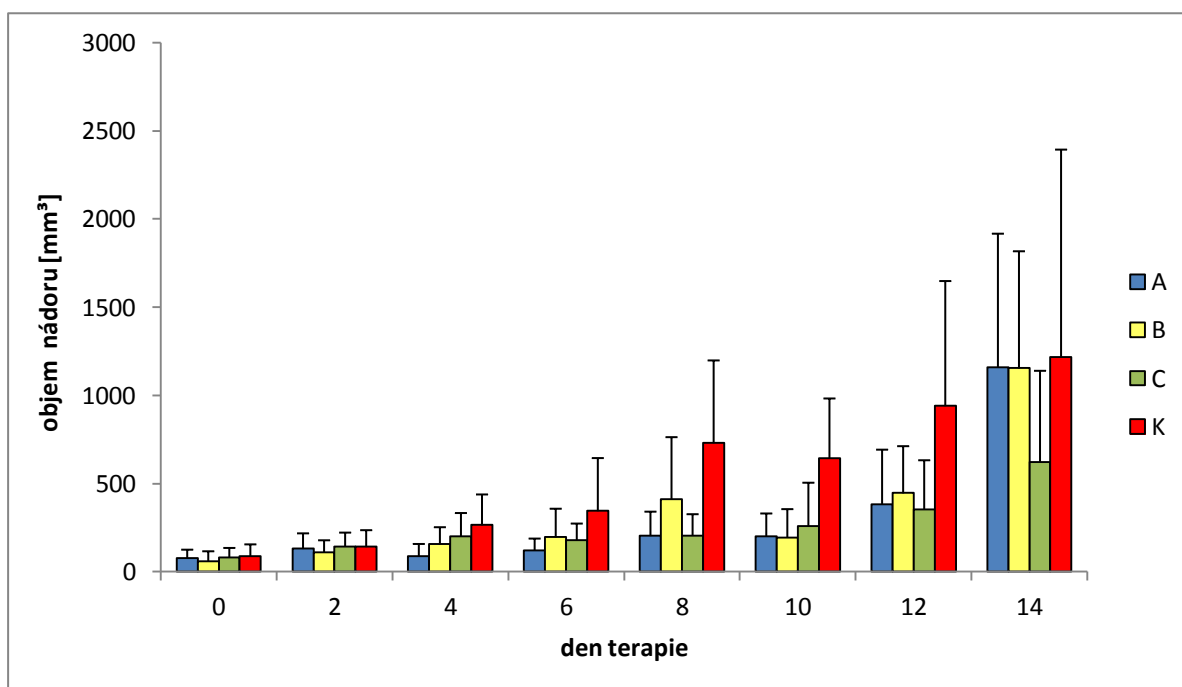
Obr. 24: Vliv terapie na průměrný počet metastáz.

A – thioglykolátové médium, **B** – kasein, **C** – manan-BAM,

D – thioglykolátové médium+manan-BAM, **E** – kasein + manan-BAM, **K** - PBS

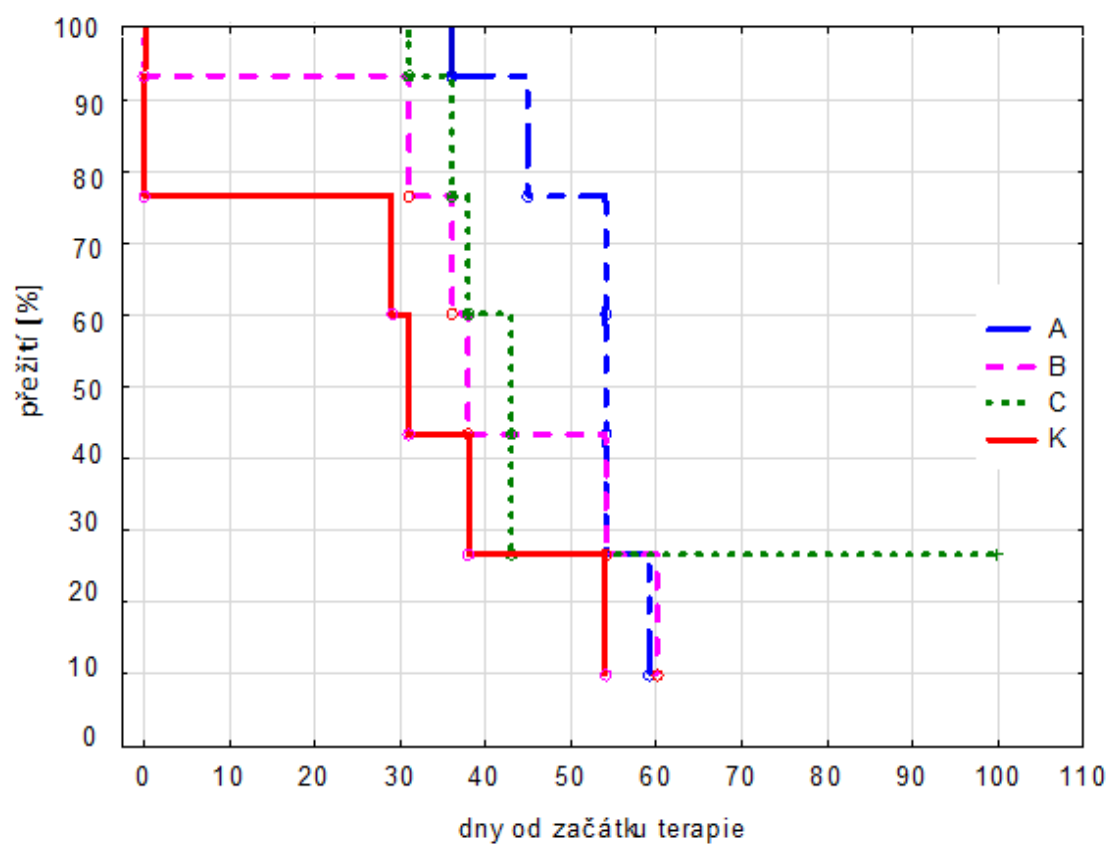
4.9. Pokus č. 9: Terapie melanomu B16-F10 založená na použití manan-BAM a R-848.

Poslední experiment byl zaměřen na ověření možnosti použití subkutánně injikovaného R-848 jako náhrady LPS. V grafu na obrázku 25 jsou vyneseny hodnoty velikosti nádorů u jednotlivých skupin v průběhu léčby. Do osmého dne terapie byly velikosti léčených nádorů srovnatelné s kontrolou. Poté lze pozorovat u všech typů terapie redukci nádorového růstu (skupina A průměrně 51%, B 42%, C 60% redukce). Subkutánní aplikace R-848 společně s intratumorálním podáním manan-BAM udržela trend redukce až do skončení terapie. Z této skupiny přežila také jedna myš více než 100 dní, jak je uvedeno na obrázku 26. Ve srovnání s kontrolou nešlo o statisticky významnou hodnotu. U ostatních skupin nebyla přesažena hranice 60 dní života.



Obr. 25.: Vliv terapie na velikost nádoru.

A – R-848, **B** – manan-BAM, **C** – R-848+manan-BAM, **K** – PBS



Obr. 26.: Vliv terapie na přežívání myši.

A – *R-848*, **B** – *manan-BAM*, **C** – *R-848+manan-BAM*, **K** – *PBS*

5. Diskuse

Objev účinného imunoterapeutika pro léčbu maligních onemocnění přináší oproti standardním postupům nesporné výhody. V rámci našeho týmu se soustředíme na protinádorové působení vrozené imunity a směřujeme výzkum k aktivaci jejích složek instalací bakteriálních PAMPs na povrch melanomových buněk. Jako původní inspiraci můžeme zmínit práci doktora Coleyho, který úspěšně léčil inoperabilní nádory, především sarkomy, pomocí směsi bakterií zvané Coleyho toxin. S rozvojem radioterapie a chemoterapie se od Coleyho objevu upustilo, přesto i ve 21. století existují studie, které se použitím bakterií v nádorové imunoterapii zabývají. Experimenty prováděné se Zymosanem, LPS či flagelinem dokazují, že bakteriální motivy jsou účinnými agonisty PRR receptorů a způsobují redukcii nádorového růstu (Mariani a kol., 2007; Rhee a kol., 2008). V rámci našich předchozích pokusů se osvědčila kombinovaná terapie, kdy současně dochází ke stimulaci signálních a fagocytárních PRR. Použití agonistů těchto dvou typů receptorů vede k synergii působení a k výrazné redukcii nádorového růstu (Janotová, 2014). Dosavadní výsledky potvrzují myšlenku Underhilla a Gantnera (2004), kteří ve své práci o nutnosti současné stimulace PRR hovoří. Postupně byl objasněn význam kotvení ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk, neboť takto se celý atak imunitního systému přímo zacílí (Janotová, 2014). Při histologickém zpracování nádorů léčených kombinací Zymosanu s LPS byla prokázána přítomnost granulocytární infiltrace (Kovářová, 2013). Podobně pozorovala zvýšené množství granulocytů i kolegyně Caisová (2013) při použití fMLF. Ekvivalentních výsledků bylo dosaženo i s mananem (Maierová, 2012). Na základě zmíněných zjištění jsme se začali o největnější populaci bílé krevní řady blíže zajímat.

Cílem výzkumu prováděného v této diplomové práci bylo objasnit interakci neutrofilů s nádorovými buňkami značenými ligandy PRR receptorů. Vzhledem k tomu, že se jedná o terapii založenou na stimulaci nespecifické části imunitního systému, bylo potřeba opět určit zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů v mikroprostředí nádoru.

Nádorová infiltrace

V prvním pokusu byla pomocí průtokové cytometrie vyhodnocována infiltrace po aplikaci Zymosanu-SMCC. Výsledky potvrzují, že hlavní složkou nádorového infiltrátu jsou granulocyty. Statisticky významná, výrazná granulocytární infiltrace nastala 48 hodin po aplikaci kovalentně kotveného Zymosanu. Synergistický vztah fagocytárního ligandu a

signálního LPS, pozorovaný v předchozích experimentech na úrovni terapeutického účinku, se na úrovni počtu infiltrujících buněk neprojevil. To odpovídá i poznatkům Janotové a kol. 2014 s kombinací LPS a jednotlivých ligandů fagocytárních receptorů. Tento jev je vysvětlován synergií na úrovni účinku, kdy TLR signalizace odpovídá za velikost infiltrátu a ligandy pak atak usměrňují na nádorové buňky. V tomto případě je navíc Zymosan díky korpuskulární povaze schopen stimulovat fagocytární receptor Dectin-1 a zároveň díky svému složení signální TLR2. Kombinace Zymosanu-SMCC s LPS tedy nepřinesla žádné zvýšení infiltrace buněk. U redukce nádorového růstu však působila nejlépe. Ekvivalentní redukce bylo dosaženo i v předchozích experimentech při použití kotvy SMCC i BAM (Kovářová, 2013; Waldmannová, 2012). Nízké počty buněk pozorujeme u makrofágů, které se objevují v místě zánětu až od 48 hod výše (Eming a kol., 2007). Buňky adaptivní imunity tvořily nejvýše 2% infiltrátu bez rozdílu terapie. Bodey a kolegové, kteří pomocí monoklonálních protilátek charakterizovali buňky infiltrující neléčený primární a metastazující lidský melanom, zjistili též nízké rozpočty T-lymfocytů (5-10% všech buněk) i B-lymfocytů (<5% všech buněk), což potvrzuje, že se jich určité množství vyskytuje přirozeně (Bodey a kol., 1999).

In vitro experimenty

Po potvrzení přítomnosti neutrofilů v nádoru byla posuzována jejich cytotoxická aktivita sérií in vitro pokusů. Napříč odbornou literaturou lze nalézt množství publikací, které dokládají, že cytotoxické působení neutrofilů a následná lýza nádorových buněk je zprostředkována dvěma mechanismy - produkcí ROS (Zivkovic a kol., 2005) a/nebo uvolněním lytických enzymů z granul (Barker a kol., 1993). Ve velké části studií se lýza nádorových buněk neutrofilů vyskytuje ve spojitosti s ADCC, která byla navozena např. vůči buňkám kolorektálního karcinomu značeným monoklonální protilátkou (Reali a kol., 1994). Jelikož protilátky zprostředkují adhezi neutrofilů k povrchu nádorových buněk a následnou lýzu, lze odvodit nutnost kontaktu obou buněk. Naším cílem bylo určit, zde se neutrofil adherovaný k nádorové buňce přes ligand fagocytárního receptoru bude chovat také cytotoxicky. V další studii prováděné na lymfoblastoidních buňkách byla popsána exocytóza granul a uvolnění jejich obsahu do extracelulárního prostoru (Dallegri a kol., 1987). Po zohlednění velikosti melanomových buněk (~ 10-15 μ m v průměru; Sharma a kol., 1996) jsme předpokládali, že je neutrofil vyhodnotí jako nepohltitelné objekty a vyloučí obsah granul do extracelulárního prostředí, jak bylo původně objeveno při interakci neutrofilů

s IgG vázanými na povrchu sklička (Henson, 1971). Jako indikátor degranulace jsme zvolili stanovení hladiny MPO.

Pro pokusy jsme izolovali myší neutrofilů z kostní dřeně, neboť u původně používaných neutrofilů izolovaných z peritonea pomocí thioglykolátového média se ani po sonikaci nepodařilo detekovat MPO (Auerová, 2014; Waldmanová, 2014). Thioglykolátové médium může neutrofilů aktivovat a uvolnění granul by tak nastalo dříve, než by byly efektoři připraveny pro samotné použití (Itou a kol., 2006). K primingu získaných naivních neutrofilů byla použita směs cytokinů TNF α a GM-CSF, která dle Dewase a kolektivu aktivuje NADPH oxidázu, enzym klíčový pro oxidativní vzplanutí neutrofilů a produkci ROS (Dewas a kol., 2003). Takto jsme kromě působení lytických enzymů umožnili současné zapojení cytotoxických procesů závislých na kyslíku.

V in vitro pokusech byly nádorové buňky značené kotvenými ligandy vystaveny dvouhodinové inkubaci s neutrofilů s cílem vyhodnotit míru cytotoxicity a její případnou závislost na typu použitého ligandu. Předěšlé in vitro pokusy prováděné s makrofágy prokázaly význam kotvení ligandů (Janotová, 2014). Předpokládali jsme, že volné ligandy by byly neutrofilů pohlceny a cytotoxický obsah granul vyloučen do fagozomu ke zničení internalizovaných částic. Domněnka byla potvrzena u volného laminarinu i Zymosanu, kde jsme redukcii počtu melanomových buněk nezaznamenali. Současně probíhající pokusy vyvrátily i vliv nekotveného mananu (Fáberová, in prep.). Přesto starší studie uvádí výrazný cytotoxický efekt neutrofilů na nádorové buňky při použití volného beta glukanu a Zymosanu jako imunomodulátorů (Morikawa a kol., 1985). Z hlediska metodiky nejsou však výsledky s našimi srovnatelné. Morikawa v pokusech inkuboval neutrofilů s targety po dobu 16hod v mikrotitrační destičce, kde mohly tvořit shluky a stimulované neutrofilů pak vyloučily cytotoxické působky do okolí. Cytotoxicita se rovněž mohla projevit jako důsledek přirozeného rozpadu neutrofilů.

V našich pokusech byly melanomové buňky značené laminarinem-BAM srovnatelnou mírou likvidovány jak naivními, tak primovanými neutrofilů. To lze vysvětlit faktem, že vazba betaglukanů, ke kterým se laminarin řadí, na Dectin-1 spustí produkci prozánětlivých cytokinů - TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2 a CCL3 a ROS u fagocytů (Brown a kol., 2003). Laminarin zde pravděpodobně zprostředkoval jak aktivaci neutrofilů, tak jejich kontakt s melanomovými buňkami, jelikož kolegyně souběžně pozorovala jak neutrofilů na povrch nádorových buněk adherují (Vácová, in prep.). Priming neutrofilů vede často k přemístění receptorů, jako je CR3, z granul na povrch neutrofilů (Borregaard a kol.,

2007). To zde nenastává, Dectin-1 je na povrchu neutrofilů přítomen, tudíž úloha primingu v tomto případě není až tak zásadní.

V případě, kdy byl na nádorové buňky kotven manan, nastala redukce jejich počtu po inkubaci s naivními ani primovanými neutrofilů. Pozornost byla proto obrácena na mechanismus, kterým neutrofilů rozpoznávají iC3b opsonizované částice. K zásadnímu poznatku v této problematice dospěl Větvička se svým týmem. Výsledky jeho práce říkají, že pro vazbu iC3b opsonizovaných částic, jejichž membrána postrádá polysacharidy, na CR3 receptor je potřeba nejprve navodit primovaný stav receptoru. Priming je zprostředkovan vazbou polysacharidů na lektinovou doménu CR3 (Větvička a kol., 1996). Větvička použil rozpustný betaglukan o Mw 19,6 kDa a primoval tak CR3 neutrofilů s navozením cytotoxicity vůči nádorovým buňkám opsonizovaným iC3b. Kritériem výběru betaglukanu vhodného pro priming CR3 v našich pokusech byla molekulová váha. Větvička totiž dále uvádí, že betaglukany o vysoké Mw způsobují prozánětlivou aktivaci a oxidativní vzplanutí neutrofilů, které se však na iC3b opsonizované částice už neváží. Cílem našich experimentů bylo zprostředkovat kontakt buněk, tedy jsme zvolili nízkomolekulární rozpustný laminarin. Naš záměr podpořila studie Lia, který s kolegy prokázal, že duální ligace CR3 vede k degranulaci, oxidativnímu vzplanutí a cytotoxickému efektu fagocytů vůči nádorovým buňkám (Li a kol., 2006). Přidáním laminarinu o Mw 6kDa do primovací směsi cytokinů jsme docílili 50% redukce melanomových buněk.

V závěrečném *in vitro* experimentu byl na nádorové buňky kotven Zymosan, skládající se z betaglukanu a mananu, který *in vivo* úspěšně redukoval růst myšího sarkomu (Bradner a kol., 1958), a který se nám rovněž v kombinaci s LPS plně osvědčil v terapii melanomu (Waldmannová, 2012; Kovářová, 2013). V prostředí se zachovanými složkami komplementu způsobily neutrofilů primované laminarinem statisticky významnou redukci Zymosanem značených nádorových buněk. Navíc jsme pozorovali neutrofilů adhezi k nádorovým buňkám, což dokazuje, že ke kontaktu efektorů s targety dochází. Kolegyně Vácová prokázala adhezi neutrofilů i k nádorovým buňkám s kotveným laminarinem a mananem (složkám Zymosanu)(Vácová, *in prep.*). O účincích Zymosanu svědčí mnohé publikace. Mezi prvními např. Clark a Klebanoff (1975), kteří prokázali schopnost preopsonizovaného Zymosanu spustit peroxidázový systém neutrofilů s následnou likvidací buněk lymfomu. Na rozdíl od našich experimentů byly v Clarkových použity intaktní neutrofilů bez primingu k oxidativnímu vzplanutí. Nesoulad objasnila nedávná studie, která udává, že opsonizovaný i neopsonizovaný Zymosan aktivují NADPH oxidázu (Makni

Maalej, 2013). Zda by mohly být u Zymosanu použity neutrofilny neprimované cytokiny bude předmětem dalšího zkoumání. Pravděpodobně by ale došlo k oslabení efektu, neboť cytokiny GM-CSF a TNF α zvyšují produkci ROS při vystavení neutrofilů sekundárnímu stimulu (El-Benna a kol., 2008). TNF α navíc zvyšuje expresi CR3 a na něm závislé oxidativní vzplanutí (Forsberg a kol., 2001).

Pro kontrolu aktivace cytotoxických pochodů byly neutrofilny inkubovány v přítomnosti PMA, která funguje jako nefagocytovatelný aktivátor oxidativního vzplanutí a neutrofilny touto látkou stimulované vykazují cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám (Dallegrí a kol., 1983). Výsledky demonstrujeme na příkladu laminarinu. Cytotoxicita neutrofilů stimulovaných PMA byla nižší v porovnání s primovanými i intaktními neutrofilny. To souhlasí s experimentem Makni-Maaleje, který pozoroval vyšší produkci ROS u neutrofilů stimulovaných neopsonizovaným Zymosanem než PMA. Zymosan je tvořen převážně betaglukanem, proto lze výsledky porovnávat. Při současné aktivaci neutrofilů laminarinem a PMA mohl nastat určitý inhibiční účinek. Bližším vysvětlením jsme se nezabývali, protože PMA nám sloužila jen jako pozitivní kontrola.

Primingem CR3 receptoru nízkomolekulárním laminarinem jsme potvrdili podpůrné účinky betaglukanů, které se manifestují zejména při in vivo použití. Bylo prokázáno, že perorálně podané betaglukany jsou pohlceny gastrointestinálními makrofágy a transportovány do kostní dřene a sleziny, kde následuje proces jejich zpracování. Makrofágy poté vyloučí malé rozpustné fragmenty betaglukanů, které primují CR3 receptor neutrofilů pro vazbu na i-C3b opsonizované částice a to již v kostní dřeni (Hong a kol., 2004). Navíc betaglukany stimulují makrofágy k produkci cytokinů a ty mohou aktivovat složky adaptivní imunity (Li a kol., 2006). Podání betaglukanů zajišťuje tumoricidní aktivitu neutrofilů během imunoterapie monoklonálními protilátkami (Hong a kol., 2003; Hong a kol., 2004). Nádorové buňky značené protilátkou jsou opsonizovány iC3b a rozpoznávány CR3 neutrofilů. Naše terapie je založena po podobném principu, neboť mannan kotvený na nádorové buňky je rozpoznáván sérovým lektinem MBL, dojde k aktivaci komplementu lektinovou cestou a iC3b opsonizací nádorové buňky, která je tímto zviditelněna pro neutrofilní atak. Perorálně podanými betaglukany v kombinaci s intratumorální aplikací mananu-BAM dosáhla kolegyně 60% redukce nádorového růstu (Husníková, 2014).

Stanovení myeloperoxidázy

Kromě cytotoxického působení jsme v in vitro pokusech detekovali také míru degranulace pomocí MPO neuvolněné do extracelulárního prostoru. MPO obsažená

v primárních granulích katalyzuje tvorbu HClO, která je nejvíce toxická ze všech ROS a lyzuje nádorové buňky (Dallegrí a kol., 1991). I přes prokázanou cytotoxickou aktivitu neutrofilů vůči nádorovým buňkám značeným laminarinem a mananem se nám nepodařilo u těchto ligandů aktivitu MPO detekovat. Hodnoty naměřené MPO byly shodné s hodnotami pro samotné nádorové buňky, které enzym neobsahují. Zvýšená aktivita enzymu byla prokázána u sonikovaných neutrofilů, čímž jsme si ověřili funkčnost stanovení. Nárůst aktivity MPO, který kopíroval cytotoxické působení neutrofilů byl pozorován pouze u Zymosanu. Vysvětlení mohou nabídnout články výše zmíněné v souvislosti se Zymosanem (Fosberg a kol., 2001; El-Benna a kol., 2008; Makni-Maalej a kol., 2013). Na základě těchto studií a hodnot naměřené MPO můžeme tvrdit, že Zymosan aktivuje oxidativní vzplanutí neutrofilů více než zbylé dva ligandy. I přes nárůst u Zymosanu se však aktivita MPO *in vitro* pohybuje na hranici detekovatelnosti.

Závěrečné stanovení MPO mělo za cíl detekovat její množství uvolněné do extracelulárního prostoru nádorové tkáně v časech 12, 24 a 48 hodin od aplikace ligandů. Za povšimnutí stojí množství MPO u skupiny s LPS, které napovídá, že degranulace neutrofilů může při dostatečné aktivaci nastat i bez zprostředkovaného kontaktu s nádorovou buňkou. To je ve shodě se studií, v níž je LPS popisováno jako přímý stimulant degranulace (Weiss a Evanson, 2002). LPS v kombinaci se Zymosanem vykazovaly aditivitu působení. Nárůst aktivity byl patrný u všech léčených skupin od 24 hodiny a zůstal již nezměněn.

Rozdíl v účinnosti metody detekce MPO uvolněné *in vitro* a *in vivo* je zřejmý. Možný důvod tohoto jevu předkládá ve svém článku Klebanoff, který tvrdí, že neutrofil při kontaktu s nepohltitelným objektem přilne k povrchu a roztáhne podél patogena svou membránu. Mezi neutrofilem a cílovou buňkou tak vzniká izolovaný prostor, který se podobá prostředí fagozómu, neboť do něj unikají cytotoxické působky, včetně enzymu MPO (Klebanoff, 2005). Při *in vitro* stanovení mohla MPO zůstat uzavřená v „kapsách“ a *in vivo* unikla do prostředí díky rozvolnění nádorové tkáně DNAsou a liberázou. Ze zmíněných experimentů lze odvozovat, že MPO je vhodným indikátorem degranulace neutrofilů pro *in vivo*, nikoliv *in vitro* stanovení.

Chemoatrakce neutrofilů

Pokus o chemoatrakci neutrofilů potvrdil dvojí charakter a plasticitu jejich chování v prostředí nádoru. Za neúspěch terapie může několik faktorů.

Prvním vysvětlením by mohlo být, že thioglykolátové médium podnítí k migraci do nádoru pouze neutrofile z okolních cév a nespustí celou signální kaskádu vedoucí

k mobilizaci buněk na úrovni kostní dřeně. Většina neutrofilů přežívá v kostní dřeni, v krevním oběhu jsou jich jen 2%, což by k likvidaci nádorových buněk nestačilo (Semerad a kol., 2002). Wengner s kolegy však potvrdil, že u peritonitidy vyvolané thioglykolátem dochází k 4,5 násobnému navýšení počtu neutrofilů v krevním oběhu. Pokud je před thioglykolátem injikována protilátka proti MIP-2 nebo G-CSF, sníží se počet neutrofilů v oběhu o 84% resp. 74% (Wengner, 2008). Tato studie dokazuje, že zánět vyvolaný thioglykolátovým médiem stimuluje migraci neutrofilů z KD prostřednictvím chemokinů MIP-2 a G-CSF. Navíc se thioglykolátové médium využívá k izolaci neutrofilů a makrofágů z peritoneální dutiny, tudíž musí zajistit příliv dostatečného množství buněk (Baron a Proctor, 1982). V našem experimentu bylo médium injikováno myším opakovaně, přičemž jsme u nich pozorovali zčervenání kůže a lokální zvýšení teploty v okolí nádoru. Předpokládáme, že k rozvoji zánětu došlo a chemokiny KD stimulovaly. Výsledky napovídají jiný problém. U skupin léčených thioglykolátem rostly nádory v porovnání s kontrolní skupinou rychleji. Možný důvod tkví v existenci dvou subpopulací neutrofilů – protinádorové N1 a pronádorové N2 subpopulace. Atrakované neutrofilie se mohly vlivem TGF- β přeměnit na N2 fenotyp a podporovaly růst nádoru. Tuto hypotézu podporuje studie Frindlendera a kol. (2009), který při blokaci TGF- β pozoroval zpomalení nádorového růstu, aktivaci CD8+ lymfocytů a makrofágů. Blokací zároveň docílil přílivu N1 TAN, které působily cytotoxicky na nádorové buňky a produkovaly prozánětlivé cytokiny. Dalším problémem se zdá být nedostatečná aktivace neutrofilů k tomu, aby produkovaly potřebné množství cytotoxických mediátorů. Rozdíl mezi N1 a N2 spočívá ve stupni aktivace, jak tvrdí Di Carlo (2001). Tuto teorii potvrzují in vivo experimenty s použitím buněk myšího adenokarcinomu, kterým byly transdukovány geny pro produkci IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, INF- α , INF- γ a TNF- α . Soustavná produkce cytokinů vedla k aktivaci neutrofilů a rejekci karcinomu (Musiani a kol., 1996). Podobně Colombo pozoroval cytotoxické působení neutrofilů na nádorové buňky modifikované pouze k produkci GM-CSF (Colombo, 1992). Melanomové buňky použité v tomto experimentu nebyly k produkci cytokinů modifikovány, tudíž předpokládáme, že neutrofilie zůstaly ve stavu N2 vlivem TGF- β .

Dosavadní výsledky našeho týmu shrnuté v publikaci Janotové a kol. (2014) ukazovaly vždy na synergii signalizace prostřednictvím TLR agonistů a nádorového ataku daného instalací ligandů fagocytárních receptorů na nádorové buňky. Z výše diskutovaného experimentu vyplývá, že účelem signalizace není jen pouhé vyvolání zánětlivé infiltrace a že ani aktivace neutrofilů daná jejich průchodem mezi endoteliálními buňkami není dostatečná.

Dostatečné terapeutické efekty se nepodařilo vyvolat ani přímou injekcí neutrofilů nebo makrofágů do nádorů (ústní sdělení, Ženka). Podstatnou se tedy jeví stálá přítomnost agonistů TLR v nádoru, zabezpečená v minulých experimentech LPS a v nedávných studiích TLR7 a TLR2 signalizací (Resiquimod, *Listeria monocytogenes*) (Glaserová in prep.; Jačková in prep.; Kumžáková in prep.). Zdá se, že jedině takovému prostředí umožňuje dostatečný atak a polarizaci efektorových buněk do jejich účinné formy (N1 u neutrofilů, M1 u makrofágů).

Pokus byl ukončen vyhodnocením přítomnosti metastatických ložisek v plicích. Snížená intenzita metastazování byla vždy dána přítomností mananu-BAM v léčebné směsi. Thioglykolátové médium i kasein metastazování spíše podporovaly.

Závěrem lze k roli neutrofilů říci, že tyto profesionální fagocyty nepochybně produkují dostatek cytotoxických látek, které umožní zabití nádorové buňky. Pro výsledný léčebný účinek je nutná souhra několika faktorů, která aktivuje neutrofil tak, aby své cytotoxické zbraně vyloučily v dostatečné koncentraci a na správném místě. Z našich dosavadních experimentů plyne, že prioritou je volba ligandu, který zajistí opsonizaci iC3b a jeho ukotvení na nádorové buňky při současném perorálním podání beta glukanů. Neméně důležitým faktorem je pak zajištění dostatečné infiltrace buněk vrozené imunity a jejich správná aktivace nejen během migrační dráhy, ale i přímo v nádoru.

Náhrada LPS

Poslední experiment byl zaměřen na hledání náhrady lipopolysacharidu (LPS), který se doposud vyskytoval v rámci našich pokusů jako účinný, avšak pro člověka toxický, agonista TLR 4 receptoru. Byť tento experiment nezapadá do celkové kompozice práce, bylo nutné jej provést, abychom mohli na základě jeho závěrů modifikovat další postupy. Jako náhradu LPS jsme zvolili agonistu myšího TLR7 – Reziquimod (R-848), aplikovaný subkutánně v kombinaci s mananem. Směsí terapeutik bylo dosaženo průměrné 60% redukce nádorového růstu, která přetrvala do 14 dne. Pokud byly manan a R-848 aplikovány samostatně 14 byly již nádory zvětšeny na úroveň kontrolních. Simultánní intratumorální aplikací mananu a R-848 se zabývaly kolegyně Kumžáková, Jačková a Glaserová, in prep., která dosáhly výrazné redukce srovnatelné s použitím mananu ve směsi s LPS (Janotová, 2014). Bylo zjištěno, že subkutánní aplikace R-848 není tak účinná a není ekvivalentní k použití LPS.

6. Závěr

- Analýzou nádorové infiltrace při léčbě kombinací LPS a Zymosanu byla prokázána přítomnost neutrofilních granulocytů v mikroprostředí melanonu. Z výsledků vyplývá, že terapeuticky synergické působení signálních a fagocytárních ligandů se u počtu infiltrujících buněk neprojevuje.
- Laminarin-BAM je účinným ligandem, který podnítl atak naivních neutrofilů na nádorové buňky. Tento atak není ovlivněn primováním neutrofilů TNF α a GM-CSF.
- Při sledování cytotoxického efektu vůči nádorovým buňkám značeným mannan-BAM a Zymosan-SMCC se osvědčil priming CR3 receptoru neutrofilů pomocí rozpustného laminarinu o nízké Mw.
- Zymosan efektivně zviditelňuje melanomové buňky a zprostředkuje adhezi neutrofilů na jejich povrch.
- Ligandy laminarin-BAM, mannan-BAM a Zymosan-SMCC navázané na nádorové buňky působí srovnatelnou redukcí počtu nádorových buněk neutrofilů.
- Stanovení myeloperoxidázy je indikátorem degranulace neutrofilů do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně. In vitro však použít nelze.
- Chemoatrakce neutrofilů do nádoru pomocí thioglykolátového média a jeho hlavní složky kaseinu nevykazuje žádný terapeutický účinek.
- R-848 aplikovaný subkutánně není vhodnou formou podpory imunoterapie melanomu založené na instalaci ligandů na nádorové buňky.

7. Seznam použité literatury

Abulafi AM, Williams NS. Photodynamic therapy for cancer. *British Medical Journal* 1992; 304(6827): 589-590.

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

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4(7): 499-511.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783-801.

Ames BN, Gold LS. The causes and prevention of cancer: gaining perspective. *Environmental Health Perspectives* 1997; 105: 865-873.

Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar K B, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 2008; 25(9): 2097-2116.

Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(26): 20157-20167.

Arkenau HT, Carden CP, de Bono JS. Targeted agents in cancer therapy. *Medicine* 2008; 36(1): 33-37.

Auerová M. Mechanismy imunitní odpovědi při léčbě rakoviny kotvením ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce 2014; 82 s.

Barker E, Reisfeld RA. A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Research* 1993; 53(2): 362-367.

Baron EJ, Proctor RA. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. *Journal of Immunological Methods* 1982; 49(3): 305-313.

Baronzio G, Parmar G, Ballerini M, Szasz A, Baronzio M. A brief overview of hyperthermia in cancer treatment. *Journal of Integrative Oncology* 2014; 3(1): 1-10.

Barth RJ, Camp BJ, Martuscello TA, Dain BJ, Memoli VA. The cytokine microenvironment of human colon carcinoma: Lymphocyte expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-4 predicts improved survival. *Cancer* 1996; 78(6): 1168-1178.

Battle J, Ha T, Li C, Della Beffa V, Rice P, Kalbfleisch J, Browder W, Williams D. Ligand binding to the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptor stimulates NF κ B activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 249(2): 499-504.

Bodey B, Bodey Jr B, Siegel SE, Kaiser HE. Controversies on the prognostic significance of tumor infiltrating leukocytes in solid human tumors. *Anticancer Research* 1999; 20(3A): 1759-1768.

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33(5): 657-670.

Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology* 2007; 28(8): 340-345.

Bradner WT, Clarke DA, Stock CC. Stimulation of host defense against experimental cancer I. Zymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Research* 1958; 18(3): 347-351.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology* 2012; 13: 790-801.

Brown GD, Gordon S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003; 19(3): 311-315.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology* 2005; 7(4): 471-479.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition: a new receptor for β -glucans. *Nature* 2001, 413(6851): 36-37.

Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 197(9): 1119-1124.

Caisová V. Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce 2013; 74 s.

Cancer Research UK (2014): World cancer factsheet: World cancer burden 2012: In: [online].[cit.2015-03-21]. Dostupné z: http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_REPORT_WORLD.pdf

Candeias LP, Patel KB, Stratford MR, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Letters* 1993; 333(1): 151-153.

Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *The Journal of Experimental Medicine* 1975; 141(6): 1442-1447.

Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (The mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1910; 3: 1-48.

Colombo MP, Lombardi L, Stoppacciaro A, Melani C, Parenza M, Bottazzi B, Parmiani G. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gene transduction in murine adenocarcinoma drives neutrophil-mediated tumor inhibition in vivo. Neutrophils discriminate between G-CSF-producing and G-CSF-nonproducing tumor cells. *The Journal of Immunology* 1992; 149(1): 113-119.

Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ. Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2003; 100(11): 6682-6687.

Dallegri F, Frumento G, Ballestrero A, Goretti R, Patrone F. Relationship between antibody-dependent tumour cell lysis and primary granule exocytosis by human neutrophils. *Clinical and Experimental Immunology* 1987; 70(2): 479.

Dallegri F, Frumento G, Patrone F. Mechanisms of tumour cell destruction by PMA-activated human neutrophils. *Immunology* 1983; 48(2): 273-279.

Dallegri F, Ottonello L, Ballestrero A, Dapino P, Ferrando F, Patrone F, Sacchetti C. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation* 1991; 15(1): 15-30.

Delves PJ, Roitt I. The immune system: first of two parts. *New England Journal of Medicine* 2000; 343(1): 37-49.

Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J. TNF- α induces phosphorylation of p47^{phox} in human neutrophils: Partial phosphorylation of p47^{phox} is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Immunology*. 2003; 171: 4392-4398

Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001; 97(2): 339-345.

Di Carlo FJ, Fiore JV. On the composition of zymosan. *Science* 1958; 127(3301): 756-757.

Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U,....., Rosenberg SA. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(32), 5233-5239.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002; 3(11): 991-998.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21(2): 137-148.

Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *The Journal of Clinical Investigation* 2010; 120(7): 2423.

El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidallo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47^{phox} phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunopathology* 2008; 30(3): 279-289.

- Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW.** Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; 64(3): 275-290.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM.** Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127(3): 514-525.
- Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O.** Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *Apmis* 1996; 104(7-8): 629-639.
- Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O.** MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 1997; 45(4): 463-470.
- Engstad CS, Engstad RE, Olsen JO, Østerud B.** The effect of soluble β -1, 3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *International Immunopharmacology* 2002; 2(11): 1585-1597.
- Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM.** Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *The Journal of Immunology* 2001; 166(11): 6847-6854.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM.** A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000; 405(6782): 85-90.
- Faurschou M, Borregaard N.** Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003; 5(14): 1317-1327.
- Finn OJ.** Cancer immunology. *New England Journal of Medicine* 2008; 358(25): 2704-2715.
- Forsberg M, Löfgren R, Zheng L, Stendahl O.** Tumour necrosis factor- α potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils. *Immunology* 2001; 103(4): 465-472.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM.** Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009; 16(3): 183-194.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A.** Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 2007; 176(2): 231-241.
- Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP.** Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998; 92(11): 4150-4166.
- Gadjeva M, Takahashi K, Thiel S.** Mannan-binding lectin—a soluble pattern recognition molecule. *Molecular Immunology* 2004; 41(2): 113-121.
- Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F.** MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of Cellular Physiology* 2003; 195(3): 346-355.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunology Today* 1997; 18(2): 89-95.

Geiser AG, Der CJ, Marshall CJ, Stanbridge EJ. Suppression of tumorigenicity with continued expression of the c-Ha-ras oncogene in EJ bladder carcinoma-human fibroblast hybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986; 83(14): 5209-5213.

Gerrard TL, Cohen DJ, Kaplan AM. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1981; 66(3): 483-488.

Goldszmid RS, Idoyaga J, Bravo AI, Steinman R, Mordoh J, Wainstok R. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *The Journal of Immunology* 2003; 171(11): 5940-5947.

Gollob JA, Sciambi CJ, Huang Z, Dressman HK. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN- γ . *Cancer Research* 2005; 65(19): 8869-8877.

Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwil FR. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- κ B and JNK. *The Journal of Immunology* 2005; 175(2): 1197-1205.

Hajdu Steven I. "A note from history: landmarks in history of cancer, part 1." *Cancer* 2011; 117(5): 1097-1102.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92(9): 3007-3017.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.

Hassid WZ, Joslyn M, McCready RM. The molecular constitution of an insoluble polysaccharide from yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Chemical Society* 1941; 63(1): 295-298.

Henson PM. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces. *The Journal of Immunology* 1971; 107(6): 1547-1557.

Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Advances in Cancer Research* 1978; 27: 305-377.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Current opinion in Immunology* 2003; 15(5): 578-584.

Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, Simpson Andrew JG, Old LJ, Cui Z. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2006; 103(20): 7753-7758.

Hida TH, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Shirasu Y, Ohno N. Cytokine induction by a linear 1, 3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes in vitro. *Inflammation Research* 2009; 58(1): 9-14.

Hong F, Hansen RD, Yan J, Allendorf DJ, Baran JT, Ostroff GR, Ross GD. β -Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Research* 2003; 63(24): 9023-9031.

Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, Xing PX, Cheng N-KV, Ross GD. Mechanism by which orally administered β -1, 3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *The Journal of Immunology* 2004; 173(2): 797-806.

Houghton AM. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* 2010; 9(9): 1732-1737.

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; 188(12): 2357-2368.

Husníková H. Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů, kotvených na nádorové buňky. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce 2014; 83 s.

Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology* 2009; 2(25): 1-11.

Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research* 2007; 111(6): 635-652.

Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 2001; 11(7): 304-311.

Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakurai MK, Ohnishi Y, Ueyama Y, Nomura T. Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research* 1986; 77: 190-196.

Ishibashi KI, Miura NN, Adachi Y, Ogura N, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. Relationship between the physical properties of *Candida albicans* cell wall β -glucan and activation of leukocytes in vitro. *International Immunopharmacology* 2002; 2(8): 1109-1122.

Itou T, Collins V, Thorén FB, Dahlgren C, Karlsson A. Changes in Activation States of Murine Polymorphonuclear Leukocytes (PMN) during Inflammation: a Comparison of Bone Marrow and Peritoneal Exudate PMN. *Clinical Vaccine Immunology* 2006;13: 575-583

Jack DL, Turner MW. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31(4): 753-757.

Janeway CA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today* 1992; 13(1): 11-16.

Janotová T, Jalovecká M, Auerová M, Švecová I, Bruzlová P, Maierová V,... Ženka J. The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PloS one* 2014; 9(1): e85222.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011; 61: 69-90.

Kato K., Itoh Ch., Yasukouchi T., Nagamune T. Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly(ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnology Progress* 2004; 20 (3): 897-904

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121(1): 1-14.

Kindzelskii AL, Petty HR. Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytolysis. *The Journal of Immunology* 1999; 162(6): 3188-3192.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *Journal of Bacteriology* 1968; 95(6): 2131-2138.

Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 77(5): 598-625.

Kovářová M. Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce 2013; 52 s.

Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125(5): 985-992.

Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y. Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 71(6), 950-956.

Ladányi A, Tímár J, Lapis K. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1993; 36(2): 123-126.

Lamm DL. Efficacy and safety of bacille Calmette-Guérin immunotherapy in superficial bladder cancer. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31: S86-S90.

Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC, Schnaar RL. Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259(3): 1764-1769.

Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271(5256): 1734-1736.

Lee JY, Kim YJ, Kim HJ, Kim YS, Park W. Immunostimulatory effect of laminarin on RAW 264.7 mouse macrophages. *Molecules* 2012; 17(5): 5404-5411.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6): 973-983.

Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 57(5): 747-751.

Ley K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological Reviews* 2002; 186(1): 8-18.

Li B, Allendorf DJ, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, Yan J. Yeast β -glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Immunology* 2006; 177(3): 1661-1669.

Liepmann AH, Nairn CJ, Willats WG, Sørensen I, Roberts AW, Keegstra K. Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. *Plant Physiology* 2007; 143(4): 1881-1893.

Lichtenstein A, Seelig M, Berek J, Zigelboim J. Human neutrophil-mediated lysis of ovarian cancer cells. *Blood* 1989; 74(2): 805-809.

Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Bermudes D. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting in vivo. *Nature Biotechnology* 1999; 17(1): 37-41.

Maierová V. Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce 2012; 71 s.

Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidaló MA, Dang PMC, El-Benna J. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochemical Pharmacology* 2013; 85(1): 92-100.

Mariani CL, Rajon D, Bova FJ, Streit WJ. Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and Zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2007; 85: 231-240.

Maródi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston Jr RB. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91(6): 2596.

Menegazzi R, Decleva E, Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore?. *Blood* 2012; 119(5): 1214-1216.

Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011; 117(3): 953-959.

Monier R. Oncogenes and anti-oncogenes in tumorigenesis. *Reproduction Nutrition Development* 1990; 30(3): 445-454.

Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Critical Reviews in Immunology* 1998; 18(4): 275-303

Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunology Letters* 2005; 100(1): 7-13.

Mori S, Jewett A, Murakami-Mori K, Cavalcanti M, Bonavida B. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1997; 44(5): 282-290.

Morikawa K, Takeda R, Yamazaki M, Mizuno DI. Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear β -1, 3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. *Cancer Research* 1985; 45(4): 1496-1501.

Morshed MT, Rahman S, Rahman S, Jahan S, Mukti M, Taznin I, Chawdhury MH, Rahmatullah M. Antihyperglycemic and antinociceptive effects of a commercially produced beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in Swiss albino mice. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 2013; 7(4): 373-376.

Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, Schreiber RD, Schreiber H. CD4⁺ T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN- γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96(15): 8633-8638.

Musiani P, Allione A, Modica A, Lollini PL, Giovarelli M, Cavallo F, Belardelli F, Forni G, Modesti A. Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology* 1996; 74(1): 146-157.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6(3): 173-182.

O'connell J, O'sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *The Journal of Experimental Medicine* 1996; 184(3): 1075-1082.

Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor- κ B activation in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of Immunology* 1998; 160(3): 1224-1232.

Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Seminars in Cancer Biology* 2004; 14(6): 453-471.

Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12(4): 265-277.

Patyar S, Joshi R, Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK. Review Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science* 2010; 17(1): 21-30.

Petkowicz CDO, Reicher F, Chanzy H, Taravel FR, Vuong R. Linear mannan in the endospore of *Schizolobium amazonicum*. *Carbohydrate Polymers* 2001; 44(2): 107-112.

Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2012; 82(3): 296-309.

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, ...Beutler B.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396): 2085-2088.
- Qin Z, Blankenstein T.** CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN γ receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 2000; 12(6): 677-686.
- Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, Cuzin F.** The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 1982; 300: 713-718.
- Reali E, Guiliani AL, Spisani S, Moretti S, Gavioli R, Masucci G, Gambari R, Traniello S.** Interferon- γ enhances monoclonal antibody 17-1A-dependent neutrophil cytotoxicity toward colorectal carcinoma cell line SW11-16. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1994; 71(1): 105-112.
- Reid DM, Gow NA, Brown GD.** Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion in Immunology* 2009; 21(1): 30-37.
- Rhee SH, Im E, Pothoulakis C.** Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* 2008; 135(2): 518-528.
- Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL.** Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 72(1): 140-146.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P.** A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4 $\&$ plus; T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393(6684): 474-478.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME.** Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8(4): 299-308.
- Ross GD, Větvička V.** CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clinical & Experimental Immunology* 1993; 92(2): 181-184.
- Rouleux-bonnin F, Monsigny M, Legrand A.** Transcriptional expression of mannose receptor gene during differentiation of human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 217(1): 106-112.
- Salazar-Onfray F, Charo J, Petersson M, Frelund S, Noffz G, Qin Z, Blankenstein T, Ljunggren HG, Kiessling R.** Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *The Journal of Immunology* 1997; 159(7): 3195-3202.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A.** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of Experimental Medicine* 1995; 182(2): 389-400.

- Scott AM, Allison JP, Wolchok JD.** Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity* 2012; 12: 14-22.
- Semerad, C. L., Liu, F., Gregory, A. D., Stumpf, K., & Link, D. C.** (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 17(4), 413-423.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD.** IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410(6832): 1107-1111.
- Sharma SD, Jiang J, Hadley ME, Bentley DL, Hruby VJ.** Melanotropic peptide-conjugated beads for microscopic visualization and characterization of melanoma melanotropin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 13715–13720.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ.** Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024): 1565-1570.
- Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI.** NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *International Immunology* 2001; 13(4): 459-463.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI.** Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 191(4): 661-668.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA.** Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 192(5): 755-760.
- Soehnlein O, Zernecke A, Weber C.** Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thrombosis and Haemostasis* 2009; 102(2): 198-205.
- Stassen M, Valeva A, Walev I, Schmitt E.** Activation of mast cells by streptolysin O and lipopolysaccharide. *Methods in Molecular Biology* 2006; 315: 393– 403.
- Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky M.** Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(19): 13425-13433.
- Stokes Z, Chan S.** Principles of cancer treatment by hormone therapy. *Surgery* 2006; 24(2): 59-62.
- Strouhal E.** Tumors in the remains of ancient Egyptians. *American Journal of Physical Anthropology* 1976; 45: 613-620.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S.** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75(6): 1169-1178.
- Sudhakar A.** History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science and Therapy* 2009; 1(2): 1-4.

Summers, C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 2010; 31(8): 318-324.

Takahashi M, Kobayashi Y. Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cellular Immunology* 2003; 226(2): 105-115.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN- γ -dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cellular Immunology* 2001; 214(2): 194-200.

Tan SY, Dee MK. Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Medical Journal* 2009; 50(5): 456-457.

Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265(21): 12156-12162.

Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY. 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* 2002; 169(7): 3876-3882.

Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *The Yale journal of Biology and Medicine* 1982; 55(3-4): 329-333.

Thornton BP, Větvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *The Journal of Immunology* 1996; 156(3): 1235-1246.

Torosantucci A, Bromuro C, Chiani C, De Bernardis F, Berti F, Galli CH, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Constantino P, Rappuoli R, Cassone A. A novel glyco-conjugate valine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 202: 597-606.

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

Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *Journal of Endotoxin Research* 2003; 9(3): 176-180.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology* 2006; 8(4): 668-676.

van Bruggen R, Drewniak A, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Chapel H, Verhoeven AJ, Kuijpers TW. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for β -glucan-bearing particles. *Molecular Immunology* 2009; 47(2): 575-581.

Vetvicka V, Yvin JC. Effects of marine β -1, 3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology* 2004; 4(6): 721-730.

Větvicka V, Dvořák B, Větvíčková J, Richter J, Krizan J. Orally administered marine (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan phycarine stimulans both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; 40: 291-298.

Větvička V, Thornton BP, Ross GD. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98(1): 50-61.

Wakshull E, Brunke-Reese D, Lindermuth J, Fiset L, Nathans RS, Crowley JJ, Tufts JC, Zimmerman J, Mackin W, Adams, D. S. PGG-glucan, a soluble β -(1, 3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF- κ B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid β -(1, 3)-glucan receptor. *Immunopharmacology* 1999; 41(2): 89-107.

Waldmannová E. Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce 2012; 48 s.

Waldmannová E. Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených agonistů fagocytárních receptorů. Studium mechanismů pomocí imunodeficientních myší. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce 2014; 81 s.

Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in Immunology* 2001; 22(5): 269-276.

Weiss DJ, Evanson OA. Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research* 2002; 63 (6): 811-815.

Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR+ CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 2008; 111(1): 42-49.

Wheeler ML, Underhill DM. Time to cast a larger net. *Nature Immunology* 2014; 15(11): 1000-1001.

Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 1994, 64(3): 529-564.

Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 2001; 166(1): 3-10.

Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010; 49(9): 1618-1631.

Xia Y, Ross GD. Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional β -glucan-binding lectin site of CR3 (CD11b/CD18). *The Journal of Immunology* 1999; 162(12): 7285-7293.

Xie J, Guo L, Ruan Y, Zhu H, L, Zhou L, Yun X, Gu J. Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 391(1): 958-962.

Yadomae T. Structure and biological activities of fungal beta-1, 3-glucans. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2000; 120(5): 413-431.

Yan J, Větvička V, Xia Y, Coxon A, Carroll MC, Mayadas TN, Ross GD. β -Glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic

recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *The Journal of Immunology* 1999; 163(6): 3045-3052.

Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β -(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(34): 22014-22020.

Zivkovic M, Poljak-Blazi M, Zarkovic K, Mihaljevic D, Schaur RJ, Zarkovic N. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. *Cancer Letters* 2007; 246(1): 100-108.