

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studium mechanismů působící při nádorové  
imunoterapii založené na instalaci ligandů  
fagocytárních receptorů na povrch nádorových  
buněk.**

Diplomová práce

**Bc. Denisa Sváčková**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2016

Sváčková, D., 2016: Studium mechanismů působících při nádorové imunoterapii založené na instalaci ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk. [The study of mechanisms acting at tumor immunotherapy based on the installation of ligands phagocytic receptors on the surface of tumor cells. Mgr. Thesis, in Czech] - 92 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of thesis was to study murine melanoma B16- F10 therapy based on the use of TLR agonists combined with activation of phagocytosis. Mechanisms of this therapy were studied on the bases of analysis of tumor infiltrating immune cells and evaluation of their effect on tumor cells.

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 22. 4. 2016

.....

Bc. Denisa Sváčková

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za svědomité vedení mé diplomové práce, velkou trpělivost, ochotu s čímkoli poradit a za cenné rady, které mi v průběhu spolupráce udělil. Dále bych ráda poděkovala celému Oddělení medicínské biologie za vytvoření příjemného prostředí. Rovněž bych chtěla poděkovat celému Oddělení patologie nemocnice Tábor za jejich vstřícnost, laskavost, poskytnutí zázemí a cennou pomoc při zpracování histologických preparátů. Jmenovitě bych ráda poděkovala primáři MUDr. Josefu Kultovi za nesmírnou ochotu, cenné rady a nepostradatelnou pomoc při histologickém vyhodnocování. V neposlední řadě si mé poděkování zaslouží celá má rodina, partner a přátelé za trpělivost a podporu v průběhu celého studia.

# OBSAH

1	Úvod.....	1
1.1	Charakteristika nádorových onemocnění.....	2
1.1.1	Dělení nádorových onemocnění .....	2
1.2	Maligní melanom.....	2
1.2.1	Myší melanom B16- F10.....	3
1.2.2	Histologie kůže.....	3
1.2.3	Histologie maligního melanomu .....	8
1.2.4	Apoptóza a nekróza .....	14
1.2.4.1	Význam apoptózy u maligního melanomu.....	14
1.3	Nádorové bujení a imunitní systém .....	16
1.3.1	Nádorové antigeny.....	16
1.3.2	Protinádorová imunitní odpověď.....	16
1.3.3	Mechanismy úniku nádorových buněk.....	18
1.4	Imunoterapie založená na aktivaci složek vrozené imunity .....	19
1.4.1	Rozpoznávání přítomnosti patogenů vrozenou imunitou.....	20
1.4.2	Imunomodulační látky použité při terapii melanomu B16- F10 .....	22
1.4.2.1	Manan.....	22
1.4.2.2	Flagelin.....	23
1.4.2.3	Resiquimod (R848) .....	23
1.4.2.4	Listeria monocytogenes.....	24
1.4.2.5	Poly I: .....	24
1.4.2.6	Pam3CSK4.....	24
1.4.2.7	Keyhole limpet hemocyanin- KLH .....	24
1.4.3	Látky použité k ukotvení terapeutik na molekuly .....	25
1.4.3.1	Biocompatible Anchor for Cell Membrane- BAM .....	25

1.4.3.2	Succinimidyl- 4- (N- maleimidomethyl) yklohexane- 1- carboxylate- SMCC .....	25
1.4.3.3	Tris (2 – carboxyethyl) phosphine – TCEP .....	25
1.5	Histologické barvení .....	26
2	Cíle práce.....	27
3	Materiály a metody.....	28
3.1	Chemikálie .....	28
3.2	Laboratorní zvířata.....	29
3.3	Nádorová buněčná linie .....	29
3.4	Příprava nádorových buněk B16- F10 pro použití in vivo .....	29
3.5	Transplantace buněk melanomu B16- F10 .....	30
3.6	Měření a výpočet velikosti nádorů.....	30
3.7	Počítání plicních metastáz.....	30
3.8	Statistické vyhodnocení výsledků.....	30
3.9	Příprava terapeutických látek pro in vivo experimenty .....	30
3.9.1	Příprava manan- BAM .....	30
3.9.2	Příprava Pam3CSK4-BAM .....	31
3.9.3	Příprava Pam3CSK4-BAM + manan- BAM.....	31
3.9.4	Příprava flagelin-BAM.....	31
3.9.5	Příprava flagelin-BAM+ manan- BAM.....	31
3.9.6	Příprava Resiquimodu.HCl (R-848. HCl) .....	31
3.9.7	Příprava manan- SMCC .....	31
3.9.8	Příprava <i>Listerie monocytogenes</i> .....	31
3.9.9	Příprava <i>Listerie monocytogenes</i> - SMCC.....	31
3.9.10	Příprava <i>Listerie monocytogenes</i> - SMCC v 0,2mM manan-SMCC .....	32
3.9.11	Příprava redukčního činidla TCEP .....	32
3.9.12	Příprava ostatních experimentálních látek.....	32

3.10	Histologická analýza.....	32
3.10.1	Příprava histologických preparátů.....	32
3.10.2	Vyhodnocení histologických preparátů.....	33
3.11	Jednotlivé experimenty.....	34
3.11.1	Pokus č. 1: Účinek Pam3CSK4-BAM v kombinaci s mananem- BAM na terapii maligního melanomu.....	34
3.11.2	Pokus č. 2: Léčba melanomu pomocí aplikace kotveného flagelinu v kombinaci s kotveným mananem.....	35
3.11.3	Pokus č. 3: Terapie melanomu B16- F10 založená na použití R- 848.HCl, kotvených a nekotvených bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> a kotveného mananu. ....	35
3.11.4	Pokus č. 4: Terapie založená na použití směsi R- 848.HCl v kombinaci s kovalentně vázaným mananem, Pam3CSK4 a KLH u myši se dvěma nádory.....	36
3.11.5	Pokus č. 5: Histologické vyhodnocení průběhu terapie maligního melanomu založené na kombinaci látek- <i>Listeria monocytogenes</i> - SMCC, manan- SMCC, R- 848.HCl a POLY I:C.....	36
4	Výsledky.....	38
4.1	Pokus č. 1: Účinek Pam3CSK4-BAM v kombinaci s mananem- BAM na terapii maligního melanomu. ....	38
4.2	Pokus č. 2: Léčba melanomu pomocí aplikace kotveného flagelinu v kombinaci s kotveným mananem. ....	41
4.3	Pokus č. 3: Terapie melanomu B16- F10 založená na použití R- 848.HCl, kotvených a nekotvených bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> a kotveného mananu. ....	44
4.4	Pokus č. 4: Terapie založená na použití směsi R- 848 v kombinaci s kovalentně vázaným mananem, Pam3CSK4 a KLH u myši se dvěma nádory.....	46
4.5	Pokus č. 5: Histologické vyhodnocení průběhu terapie maligního melanomu založené na kombinaci látek- <i>Listeria monocytogenes</i> - SMCC, manan- SMCC, R- 848 a POLY I: C. ....	48
5	Diskuze.....	56
6	Závěr.....	62
7	Seznam použité literatury.....	63

8	Příloha .....	74
8.1	Příloha 1: Znázornění vlivu léčby na mikroprostředí melanomu. Histologická tkáň neléčeného melanomu (kontrolní skupina-PBS) ve srovnání s léčeným melanomem pomocí <i>Listeria monocytogenes</i> - SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C.	74
8.2	Příloha 2: Typické histologické nálezy u tumorózní tkáni.....	79
8.3	Příloha 3: Typické histologické nálezy při aplikaci <i>Listeria monocytogenes</i> - SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C.....	82

# 1 Úvod

Jednou z nejčastějších příčin v rozvinutých zemích jsou nádorová onemocnění. Jde o celosvětově rozšířený problém a počet nemocných ročně stoupá (Siegel & kol., 2013).

90-95 % nádorových onemocnění je způsobeno životním stylem, pouze v 5-10 % hraje roli dědičnost. Tento problém je velice významným převážně v rozvinutých zemích, kde dochází k prodlužování průměrné délky života a nedodrжуje se zdravý životní styl. Kouření, fyzická inaktivita, nezdravé stravování, konzumace alkoholu, dlouhé vystavování se slunečnímu záření napomáhají rozvoji nádorových onemocnění (Jemal & kol., 2011).

Dnes je stále nejúspěšnějším postupem včasný záchyt a chirurgické odstranění nádoru, což ovšem není možné provést u všech případů. Dalším možným léčebným postupem je chemoterapie a radioterapie, kdy hlavní nevýhodou je nespecifičnost terapie a při kterém dochází k poškozování i zdravých buněk. Proto je studium a hledání účinnější terapie nutné. Výzkum nových léčiv značně pokročil, ovšem na mnoho nádorových onemocnění se stále nenašel účinný a šetrný způsob léčby.

Náš tým se snaží najít cestu v nádorové imunoterapii, založené na vrozené imunitě a přecházející podle posledních poznatků v ataku na úrovni získané imunity, kdy dochází k přímému zacílení na nádorové buňky a tudíž nedochází k poškození zdravých buněk. Vrozená imunita dokáže v některých případech vyhledat nádorové buňky a zničit je (Cui & kol., 2003). Náš přístup je založen primárně na stimulaci vrozené imunity a nasměrování jejího ataku na nádorové buňky tím, že na ně kotvíme ligandy stimulující jejich fagocytózu. Předmětem této diplomové práce je přispět k objasnění mechanismů působící při této terapii.



## 1.1 Charakteristika nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění se řadí do heterogenní skupiny onemocnění, vyznačující se nekontrolovatelným dělením buněk ve tkáních a orgánech. Počet nově vznikajících nádorových onemocnění každým rokem narůstá (Siegel & kol., 2013). Mezi charakteristické rysy nádorových buněk patří neomezený replikační potenciál, necitlivost vůči růstu inhibujícím signálům, soběstačnost v potřebě růstových faktorů, neschopnost apoptózy (řízená buněčná smrt), neoangiogeneze (proces novotvorby krevních kapilár), vytváření metastáz a prorůstání do zdravých tkání. (Hanahan & Weinberg, 2000).

### 1.1.1 Dělení nádorových onemocnění

Nádory lze rozdělit podle prorůstání do zdravých tkání a vytváření metastáz. **Benigní nádory** jsou nemetastazující nádory, které zůstávají na místě svého vzniku. Neprorůstají tedy do okolní tkáně, pouze ji utlačují. Jde o ohraničené nádory, které je možné chirurgicky odstranit. Ve většině případů nemají negativní vliv na organismus, ale i tento typ může ohrozit život jedince. **Maligní nádory** jsou daleko agresivnější a jsou větší hrozbou pro organismus. Buňky maligního melanomu se šíří pomocí krevních kapilár a lymfatických cest, rozšiřují se do okolních tkání a vytvářejí metastáze. Maligní nádory se musí začít včas léčit. Bohužel vytvořené metastáze jsou jen těžko léčitelné, jelikož není snadné je lokalizovat a často dochází k recidivě onemocnění (Chambers & kol., 2002).

Dále nádory třídíme podle orgánové lokalizace. Příkladem jsou nádory plic, varlat, prsu, tlustého střeva, kůže a další.

Důležitým rozdělením je rozlišení podle původu, na nádory epiteliální, mezenchymální, hematopoetické, lymforetikulární, neuroektodermální a nádory smíšené, které pocházejí z více tkání (Sell, 2004).

## 1.2 Maligní melanom

Maligní melanom je agresivní, zhoubný novotvar vznikající z pigmentových buněk (melanocytů), který se vyskytuje převážně na kůži (Clark & kol., 1969). Výskyt na kůži vzniká v důsledku expozice kůže UV záření, tedy při delším vystavení kůže slunečnímu záření (De Grujil & kol., 2001). Maligní melanom může dále postihnout oční tkáň, vzácně sliznice (rekta, pochvy a nosu). Je řazen mezi neuroektodermové nádory (Sell, 2004).

### 1.2.1 Myší melanom B16- F10

Pro naše terapeutické účely využíváme buňky myšího melanomu B16- F10, který se zařazuje do skupiny 4 typů myších melanomů- B16- F0, B16- F1a B16- BL/6 (Owerwijk & Restifo, 2001). Melanom B16- F10 je znám vysokou invazivitou a schopností vytvářet vzdálená ložiska (především metastáze v plicích). Buňky melanomu B16- F10 velmi dobře rostou (doba mitotického cyklu je něco málo přes 12 hodin) a jdou dobře se napěstovat in vitro (Nakamura & kol., 2002).

### 1.2.2 Histologie kůže

Získání znalostí o histologii kůže nám umožní snadnější pochopení dermatopatologie, kam spadá námi zkoumaný melanom. Kůže má životně důležité funkce- epidermis chrání tělo před ztrátou tekutin a zároveň chrání organismus před škodlivými vlivy vnějšího prostředí. Dále se kůže podílí na regulaci tělesné teploty a umožňuje příjem podnětů z okolního prostředí (smyslové receptory). Kůže se skládá z epitelové složky- epidermis (rohovějící vrstevnatý dlaždicový epitel) a z vazivové složky – dermis. Vrstva vazivové a tukové tkáně, ležící pod kůží spolu s kůží vytvářejí kožní pokrývku (integumentu commune). Kožní orgány se vyvíjejí jako deriváty epitelové složky. Patří k nim produkty rohování (vlasy a nehty) a kožní žlázy. Mezi kožní žlázy se také řadí mléčná žláza (Ayadurai, 2010).

### Kožní pokrývka

Největší část těla je pokryta tenkou kůží s rhombickým políčkováním (drobná kosočtverečná políčka). Kůže s políčky obsahuje vlasy, potní a mazové žlázy. Tlustá kůže s hmatovými lištami je bez vlasů a mazových žláz. Kůže je vytvořena z 3 vrstev: epidermis, dermis, subcutis. Dermis (škára) a epidermis jsou spolu- propojeny ve spojovací dermo-epidermové zóně a hranice mezi nimi je zvlněná. Z dermis vybíhají proti epidermis papily. Mezi tyto papily se epidermis zasouvá síťovitě uspořádanými hřebeny vrstvy basale. Subcutis slouží k zajištění spojení kůže s hlouběji uloženými strukturami, funguje jako podložka odolná tlaku. Vlasové folikuly, kožní žlázy jsou v dermis, někdy mohou zasahovat až do subcutis (Ayadurai, 2010).

**Epidermis-** vrstvy epidermis (Obr. 1):

**Stratum basale** – spodní vrstva epidermis je tvořena jednou vrstvou cylindrických buněk, ležících přímo na bazální membráně. Tato vrstva je zdrojem nových keratinocytů,

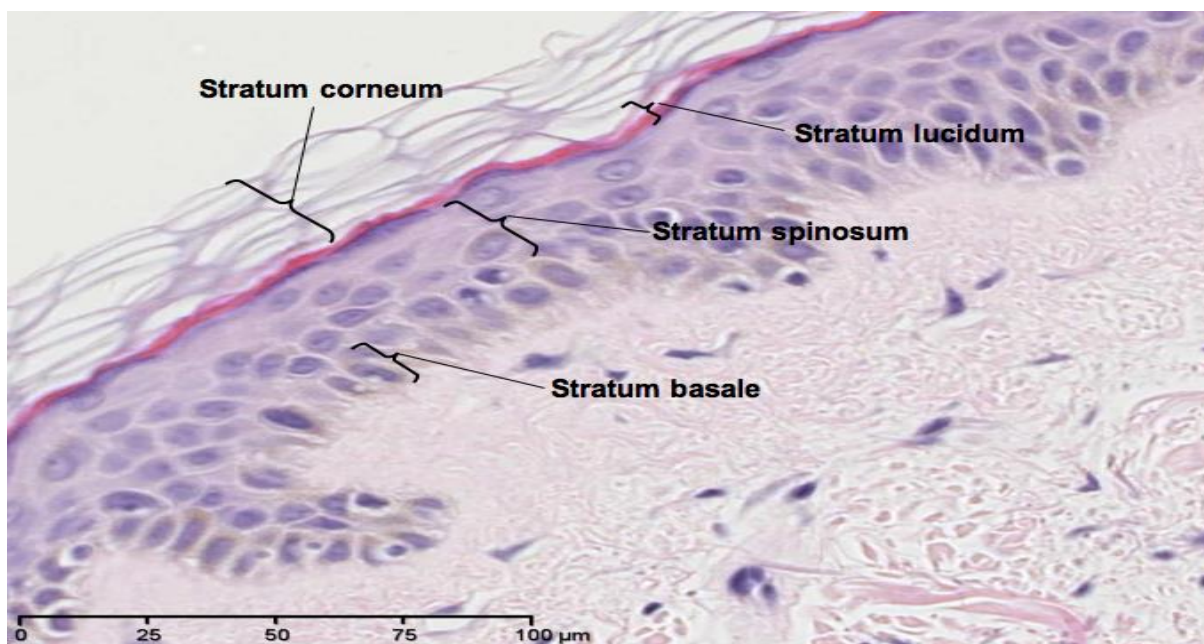
obsahuje kmenové buňky epidermis a progenitorové buňky schopné dělení- jejich dceřiné buňky vstupují do povrchnějších vrstev.

**Stratum spinosum** – nejtlustší vrstva epidermis, je vrstva buněk s trnovitými výběžky a obsahuje 2 až 5 vrstev polygonálních buněk, jejichž desmozomové spojení je kvůli smrštění výrazně patrné- trnovité buňky.

**Stratum granulosum** – obsahuje buňky, u kterých jsou velmi patrná granula keratohyalinu- jde o cytoplazmatické agregáty, které se skládají z filament cyokeratinu a proteinů.

**Stratum lucidum** – se nachází v kůži s lištami mezi vrstvami stratum granulosum a stratum corneum. Je to eozinofilní vrstva, obsahující přechodní stádia mezi keratinocytem a zrohovatělou buňkou.

**Stratum corneum**- zrohovatělá vrstva- v těchto buňkách nejsou žádná jádra ani jiné cytoplazmatické orgány. V histologických preparátech je tato vrstva většinou špatně zachovalá. Zrohovatělá buňky jsou polygonální destičky, pospojované corneodesmozomy (modifikovaný desmozom). Zrohovatělá část kůže s políčky obsahuje až 25 vrstev (v kůži s lištovým charakterem až 100 vrstev). Když dojde k proteolytickému rozvolnění corneodesmozomů, zrohovatělé buňky jednotlivě odlupují (Ayadurai, 2010).

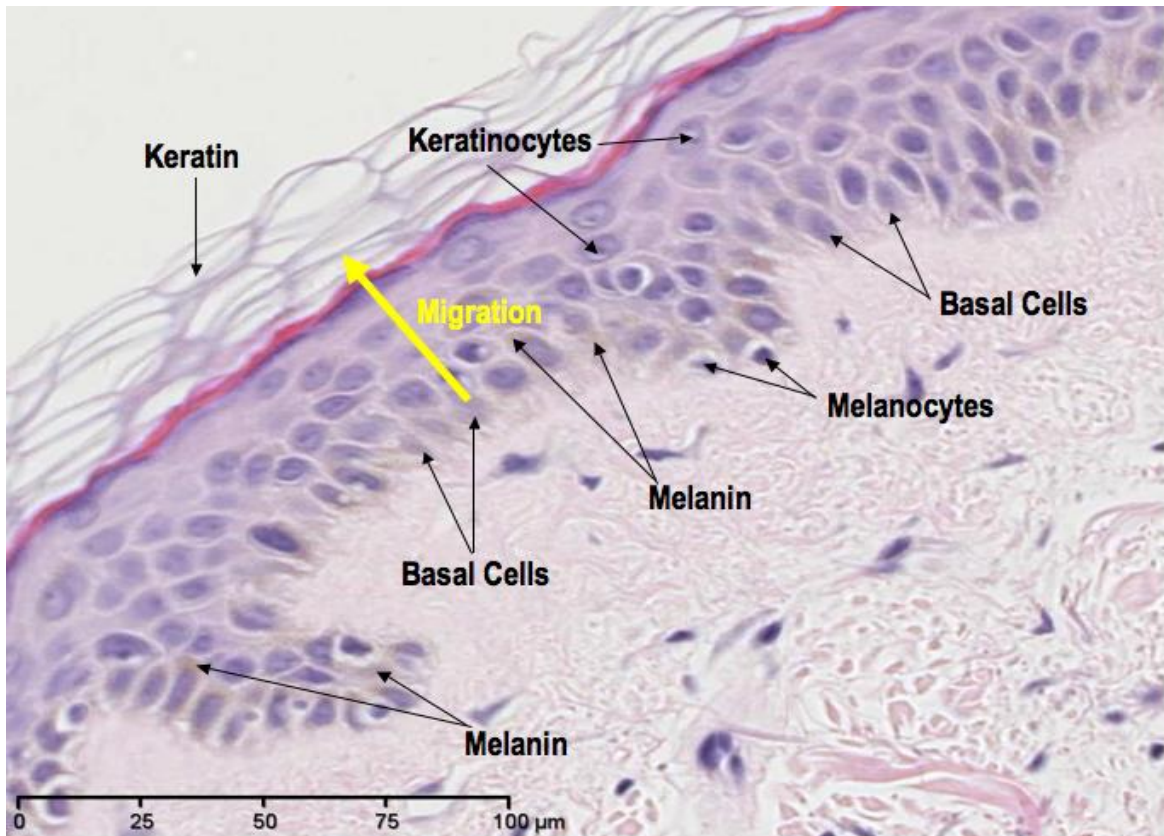


Obr. 1: Histologický řez epidermis a její zvrstvení, barveno hematoxylin-eosinem (Thomas, 2014).

Rohovějící vrstevnatý epitel epidermis se skládá z keratinocytů, pigmentových buněk- melanocytů (Obr. 2). Dále jsou v epidermis obsaženy Langerhansovy buňky patřící do imunitního systému a Merkelovy buňky (dotykové receptory). Epidermis má 4 vrstvy, 3 spodní vrstvy tvoří keratinocyty, vrchní vrstvu tvoří odumřelé zrohovatělé buňky. Tyto zrohovatělé buňky se postupně odlupují a nahrazují je buňky uložené pod nimi. V epidermis probíhá migrace buněk z bazální vrstvy směrem k povrchu. Během tohoto procesu keratinocyty procházejí stádiem diferenciaci. Cílovým produktem diferenciaci jsou zrohovatělé kožní buňky. Když dojde k vytvoření vrstvy zrohovatělých buněk, získává epidermis svou hlavní funkci- udržovat mechanicky a chemicky odolnou, téměř vodotěsnou difúzní bariéru. Funkcí této bariéry je zábrana ztráty vody a vnikání hydrofilních látek do organismu. Také dochází k ochraně organismu před účinky kyselin díky keratinu, který je chemicky odolný. Difúzní bariéra je tvořena spojením lipidů a tight junction. Ve zrohovělé vrstvě jsou mezibuněčné prostory vyplněny polárními lipidy a vytváří tzv. Lipidový uzávěr (Ayadurai, 2010).

Keratinocyty se spojují pomocí desmozomů, hemidesmosomy ukotvují buňky bazální vrstvy k bazální lamině. V keratinocytech probíhají různými směry svazky cytokeratinových filament. Tyto filamenta se upínají do cytoplazmatické membrány v místě desmosomů . Celou epidermis prochází trakční síť, která je napojena na kolagenní vlákna dermis.

Melanocyty spolu s Langerhansovými buňkami se rozlišují v epidermis speciálními barvicími metodami. Pokud je preparát barven klasickým histologickým barvením, jde rozlišit tyto buňky pouze na základě světlejšího buněčného těla oproti keratinocytům. Melanocyty se vyskytují ve stratum basale (spodní vrstva epidermis) a pocházejí z neurální lišty, do epidermis pouze vcestovaly. Melanocyty syntetizují tmavě hnědý pigment **melanin**, mohou tedy za pigmentaci kůže. Tmavý pigment chrání pokožku před UV zářením (Tadokoro & kol., 2005). Melanin vzniká v melanosomech, dokáže absorbovat UV záření a tím ochraňuje mitoticky aktivní buňky bazální vrstvy. Melanocyt tedy zásobuje keratinocyty a tím, že předávají vytvořené melanosomy keratinocytům, sami o sobě obsahují malé množství pigmentu. u syntézy pigmentu v melanocytech působí některé cytokiny - například TNF- $\alpha$  a hormony- adrenokortikotropní hormon a alpha- Melanocyte-stimulating hormon. Tyto látky se ve větší míře uvolňují z keratinocytů a dalších kožních buněk při UV záření a dochází k hnědnutí kůže (Ayadurai, 2010).



Obr. 2: Histologický řez epidermis a její složky, barveno hematoxylin- eosinem (Thomas, 2014).

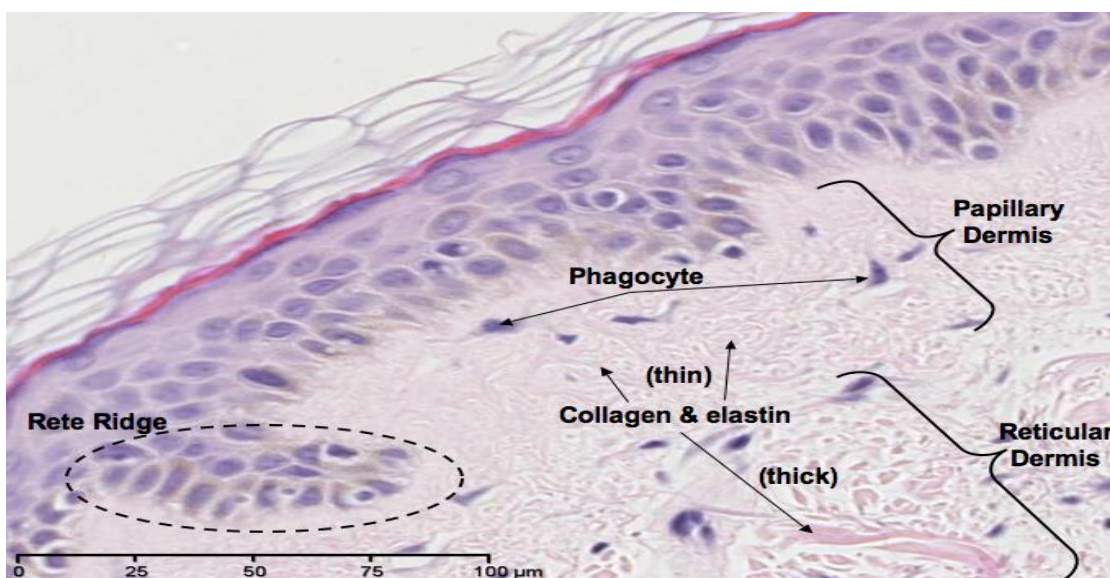
Langerhansovy buňky jsou dendritické buňky epidermis. Mohou se nacházet i v jiných sliznicích- například ve vagině či konečníku. Langerhansovy buňky mají svůj původ v kostní dřeni a jsou derivátem hemopoetické kmenové buňky. Jsou velmi blízké makrofágům (monocytům). Jde o antigen prezentující buňky imunitního systému, které se nacházejí v kůži. Váží na sebe antigeny a tímto antigenem putují do lymfatické uzliny, kde se přeměňují v interdigitující dendritické buňky T- zóny, nastartují tím imunitní kožní reakci. Langerhansovy buňky jsou rovnoměrně rozloženy mezi keratinocyty a dlouhými výběžky kontrolují oblasti. Takto je vytvořena síť pro zachycení antigenů (Ayadurai, 2010).

### **Dermis a subcutis**

**Dermis** neboli škára neboli corium (Obr. 3) je tvořená vazivem, je zodpovědná za odolnost kůže a obsahuje terminální krevní řečiště (epidermis je bez cév). Dermis se skládá ze dvou vrstev- z povrchové vrstvy tvořené papilami (stratum papillare) a zbývající částí stratum reticulare. Stratum papillare je tvořena řídkým vazivem a tenkými vlákny kolagenu. Dále je tvořena vlákny elastickými a různým typem buněk- buňky imunitního systému.

Papila obsahuje nervová zakončení a vlastní kapilární kličku. Nervová zakončení vedou bolest a pocit svědění. V těchto papilách kůže se dále nacházejí Meissnerova hmatová tělíska. V papilární dermis dochází ke kožním zánětům a buňky imunitního systému využívají systém postkapilárních venul ke vstupu do intersticia. Dermální žírné buňky vyplavují histamin a další účinné látky a jsou tedy také zodpovědné za vytvoření akutního zánětu kůže- zvýšení permeability cév, otoky, zarudnutí, svědění (Ayadurai, 2010).

Stratum reticulare je tuhé vazivo se silnými kolagenními vlákny, která doprovází elastická vlákna. Tato dermis dává kůži mechanickou odolnost (odolná proti roztržení), ale zároveň je reverzibilně tažná- vlnitým průběhem kolagenních vláken a jejich mřížkováným uspořádáním. Když dochází k natažení kůže, dojde tím k vyrovnání vlnovitého průběhu a také ke změně tvaru mřížek až k paralelnímu uspořádání kolagenních vláken. Naopak při ochabnutí tažných sil si obnoví elastická vlákna původní uspořádání (Ayadurai, 2010).



Obr. 3: Histologický řez dermis a její složky, barveno hematoxylin-eosinem (Thomas, 2014).

**Subcutis** tvořená řídkým vazivem a rozdílným podílem tukové tkáně, kde jsou obsaženy pleteně nervových vláken a cév. Tato podkožní tuková tkáň je prostoupena pruhy vazivových vláken a má funkci tlakového polštáře (chodidlo), tepelné izolace či zásoby energie. Vazivová vlákna dermis a subcutis jsou obklopeny rosolovitou hmotou bohatou na hyalorunan a proteoglykany. Ty na sebe váží vodu, tudíž kůže je velice důležitou zásobárnou vody pro organismus (Ayadurai, 2010).

## Cévní a nervové zásobení kůže

Důležitou funkcí cévního zásobení kůže je termoregulace. V kůži se vytváří dvě pleteně krevních cév- plexus superficialis a plexus profundus. Tyto pleteně jsou mezi sebou propojeny cévami, probíhajícími vertikálně. Proudění krve ve venózní části povrchové pleteně je pro výdej tepla vyzařováním nejdůležitější. Nervová vlákna vytváří v kůži také dvě pleteně, které obsahují sensitivní a sympatická vlákna. K sensitivním receptorům kůže probíhají tlustá myelinizovaná vlákna typu II, naopak tenká myelinizovaná vlákna či vlákna bez myelinové pochvy končí volnými nervovými zakončeními (některá pronikají až do epidermis). Jejich funkcí je vedení pocitu bolesti a svědění. Postgangliová vlákna spojují nervovými vlákny krevní cévy a potní žlázy (Ayadurai, 2010).

### 1.2.3 Histologie maligního melanomu

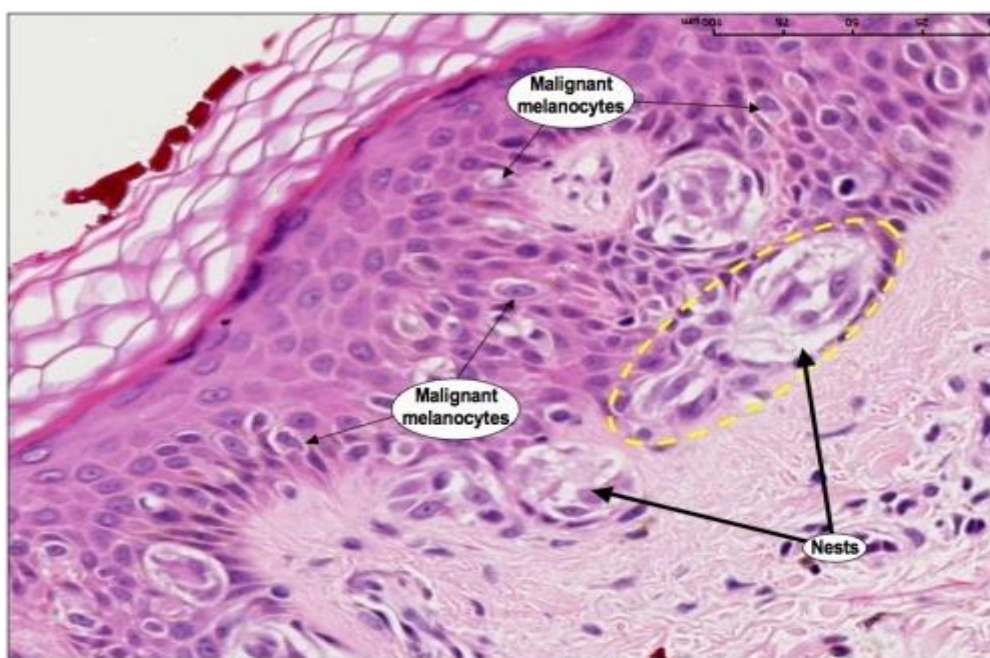
Rozlišují se různé histologické typy maligního melanomu, ovšem většina znaků je společných. Maligní melanom vzniká obvykle v oblasti dermoepidermální junkční zóny. Ze začátku se nádor šíří jen v epidermis (zde by nemělo docházet k metastazování). V tomto případě jde o **melanoma in situ**. Melanocyty nádoru se tu nacházejí pouze ve str. basale (kůže tlustého typu), většinou ve zvýšeném množství. Někdy se nádorové buňky mohou vyskytovat ve vyšších etážích epidermis- "pagetoidní" uspořádání. Zde jsou již buňky atypického tvaru v podobě hyperchromatického jádra, nápadného jadérka. Také dochází ke změně v poměru velikosti jádra a cytoplazmy, tvar a velikost buněk je nepravidelný. Buňky obsahující velké množství melaninu se mohou nacházet i v rohové vrstvě. Vznikají nádorová hnízda různého tvaru a velikosti, nacházející se v junkční zónách (spojení mezi epidermis a škárou) i v jiných vrstvách epidermis. Škára reaguje zánětlivým infiltrátem.

Pokud se atypické melanocyty nacházejí i ve škáře jde o **invazivní melanom**. Je zde opět typická asymetrie, neostře ohraničení, nerovnoměrné odstupy mezi nádorovými hnízdy. V dermální části nádoru nedochází k vyzrávání nádorových buněk. Ovšem mitózy, výskyt melaninu jsou zcela normální a můžeme je naléznout v různých částech nádoru. Pigment melanin může někdy chybět úplně, jde o amelanotický maligní melanom, u tohoto typu melanomu se vytvářejí sheets- splývající plochy. V některých částech nádoru může dokonce dojít ke ztrátě buněčné koheze. Mohou se zde vyskytovat nekrotické melanocyty. Povrch bývá zvředovatěn (Smoller, 2006).

Histologicky se rozlišuje několik typů melanomu. Tyto základní typy odpovídají i klinickému rozdělení melanomu (Smoller, 2006).

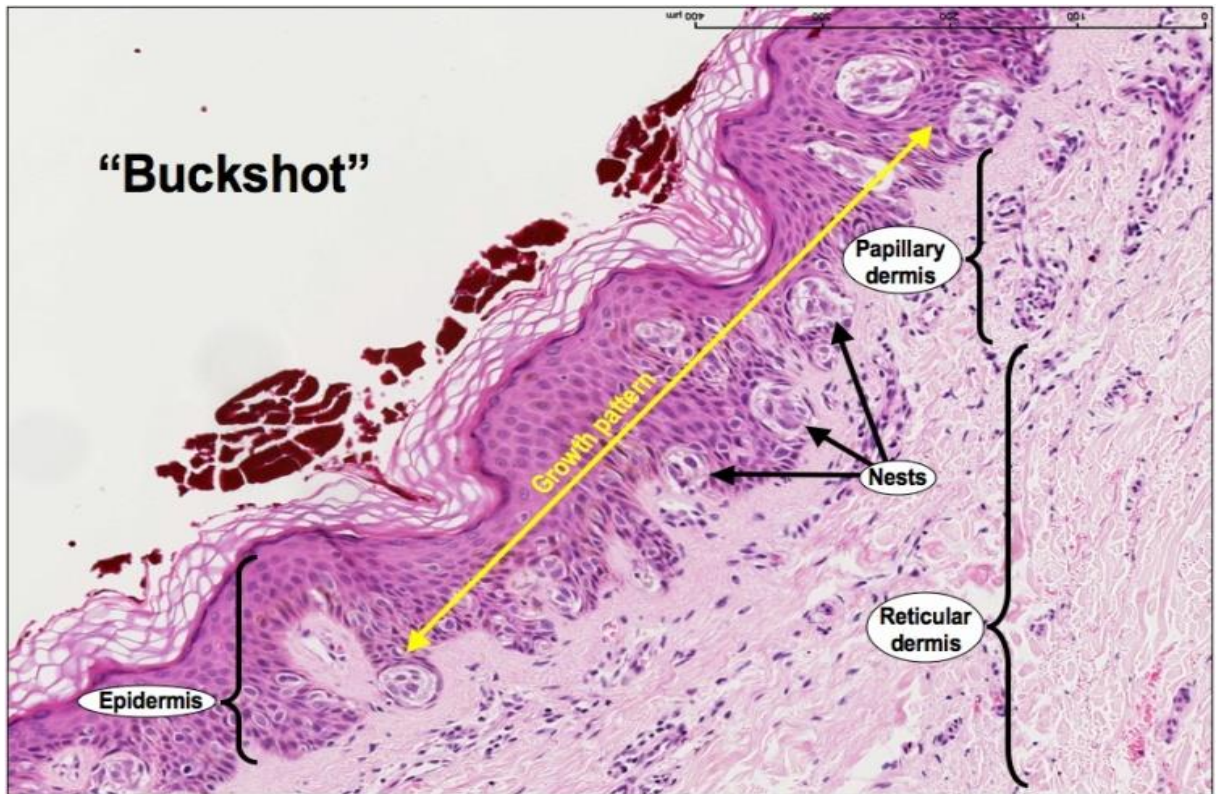
**Superficial spreading melanoma (SSM)**- povrchově se šířící melanom, který je nejčastěji se vyskytujícím typem- 75% všech melanomů. Tento melanom je typickým svým pagetoidním uspořádáním atypických nádorových buněk a obvykle rozšířené epidermis, které je typické v *in situ* fázi. Pagetoidní rozšíření znamená, že mezi epidermis SSM jsou rozeznatelné změny ve struktuře- slabé ohraničení melanocytů a tyto melanocyty jsou neorganizovaně, abnormálně rozmístěny, melanocyty jsou také přítomny nad bazální vrstvou. U tohoto typu jsou také patrné ne spolu-držící hnízda (shluky) melanocytů (Obr. 4) a je zde typické laterální rozšíření maligních melanocytů mezi epidermis. Epidermální melanocyty jsou rozloženy neorganizovaně a je typické, že jednotlivé buňky jsou přilehlé do shluků buněk podél epidermální lišty až dokonce v suprapapilární vrstvě a zároveň dochází k pagetoidní migraci melanocytů (Obr. 5), která se šíří do šířky léze (u benigního nádoru jde o migraci ohniskovou). Intraepidermální buňky melanomu mají eozinofilní cytoplazmu a tyto buňky jsou velké, pleomorfní (vícetvarý) (Obr. 6). Dále v nich můžeme najít mitózy.

Podpůrnou diagnózou nádoru je zánětlivá reakce, kdy zánětlivý infiltrát obklopuje invazivní melanomy. V tomto infiltrátu se vyskytují lymfocyty a poté následuje nekrotizace buněk nádoru. U invazivních melanomů je také typická regrese. Tyto změny jsou histologicky podobné jako u vytváření jizvy a dochází ke vzniku ložiskovému zvětšování papilární dermis (Smoller, 2006).

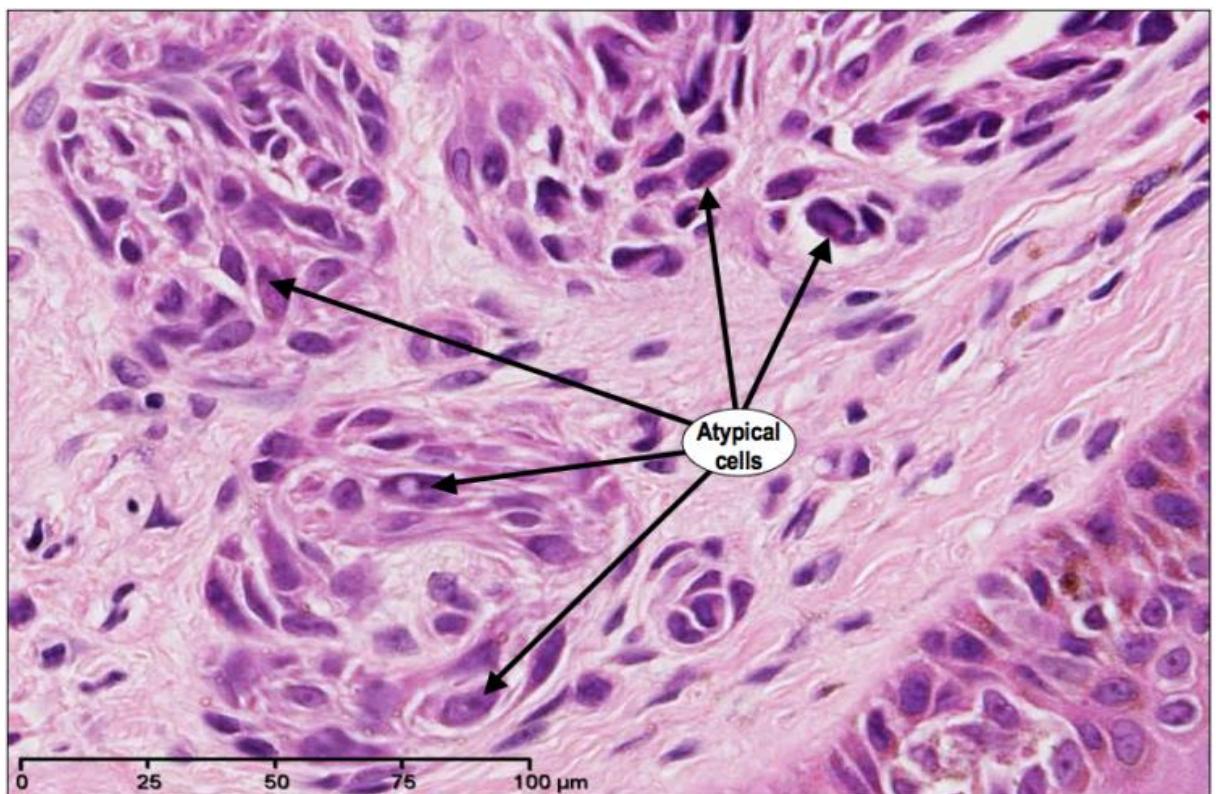


Obr. 4: Histologický řez Superficial spreading melanoma (Thomas, 2014).



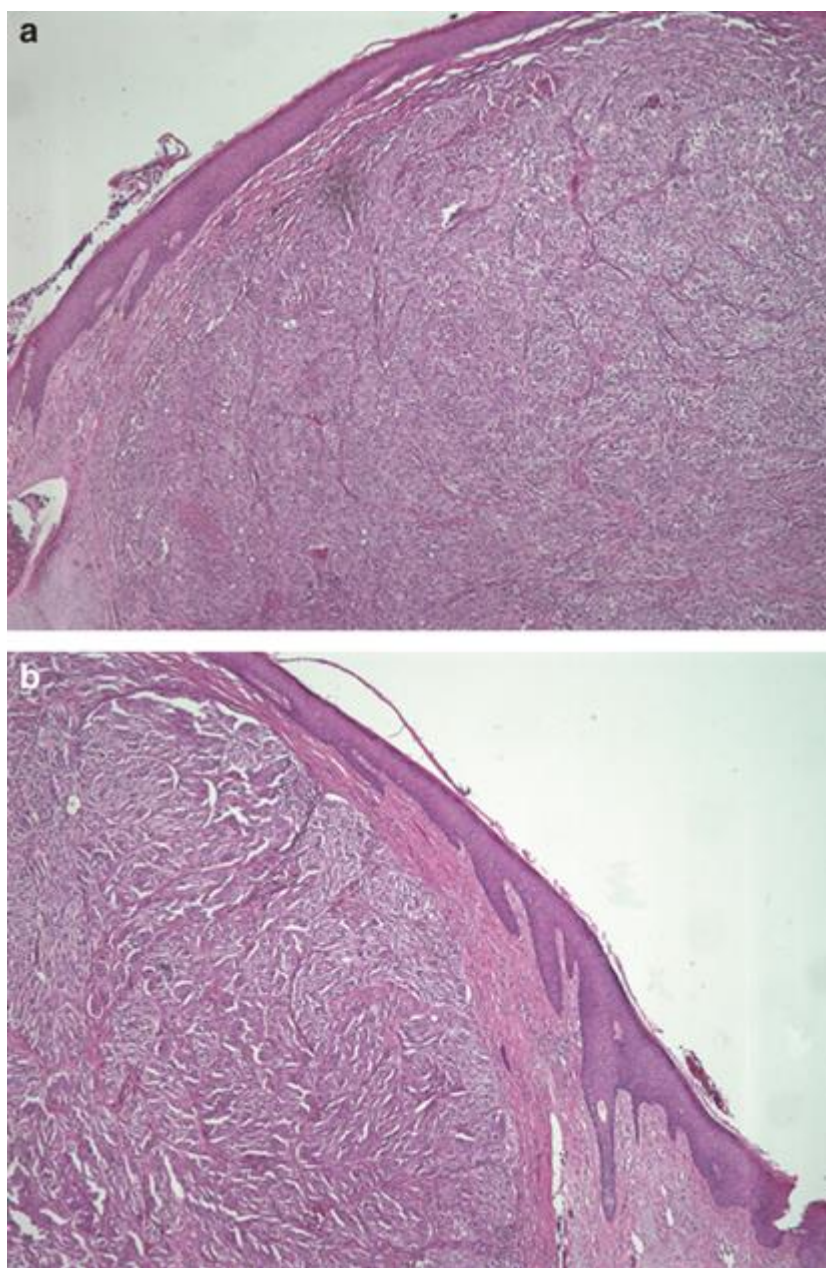


Obr. 5: Pagetoidní rozšíření a nádorové buňky vytvářející hnízda v povrchově se šířícím melanomu (Thomas, 2014).



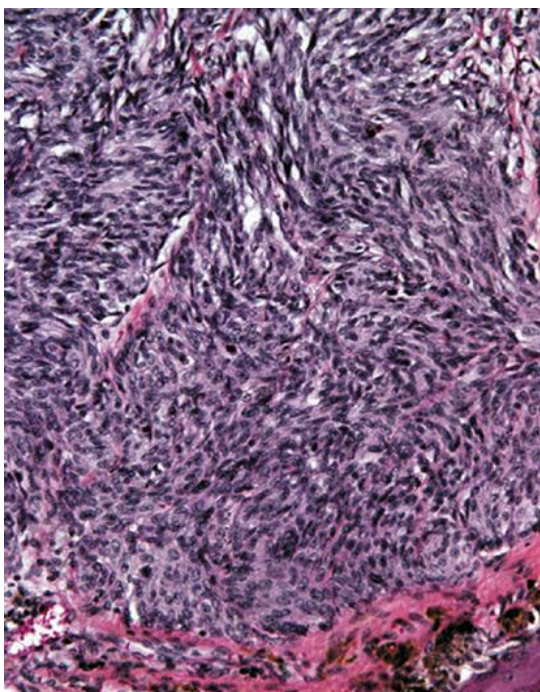
Obr. 6: Pleomorfní, velké intraepidermální buňky melanomu (Thomas, 2014).

**Nodulární melanom (NM)** se vyskytuje nejčastěji na trupu těla a nemá radiální růst, ale okamžitě vstupuje do vertikální růstové fáze, což vykazuje i rapidní růst a rychlý vznik metastáz. Nevykazuje tedy šíření v laterální oblasti (jako u SMM). Typickým znakem modulárního melanomu jsou ostrá ohraničení množících se melanocytů (Obr. 7). Tyto melanomy mají typické epiteloidní melanocyty s velkou cytoplazmou, jádro a výrazná jádérka. U modulárního melanomu jsou buňky pleomorfní a nastává zde ulcerace (zvředovatění) povrchu nádoru dříve než u jiných typů. Pegetoidní buňky nejsou tak časté jako u SSM (Smoller, 2006).

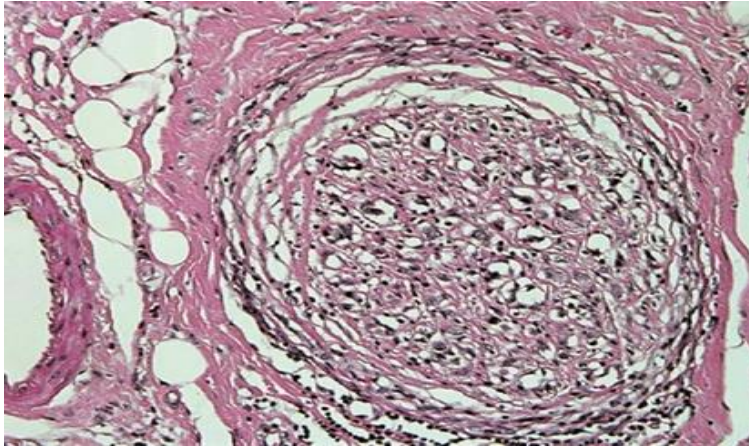


Obr. 7: (a, b) Nodulární melanom, znázorňující ostrá ohraničení množících se melanocytů, hojné množení atypických melanocytů v dermis (Smoller, 2006).

**Lentigo maligna melanom (LMM)** má jako fázi *in situ* lentigo maligna, ta se vyznačuje atrofií epidermis. Lentigo maligna melanom je melanom invadující do dermis, většinou jde o bazální umístění často dendritických nádorových melanocytů. Jakmile dojde k progresi, vznikají junkční hnízda z větvenovitých melanocytů. Buňky jsou hyperchromatické a atypické (často bez jádra a výrazného jadérka), (Obr. 7). V závislosti na věku a lokalizaci, je výrazná solární elastóza vaziva. Až po delší době (cca 14 let) pronikají jednotlivé buňky a jejich hnízda do škóry a možností vzniku metastáz. Vřetenovité melanocyty jsou u cév mezi retikulární dermis a je zde patrné šíření nádoru podél nervových vláken. Výrazné cévy jsou důležitým faktorem u diagnostiky toho typu melanomu (Obr. 8) (Smoller, 2006).

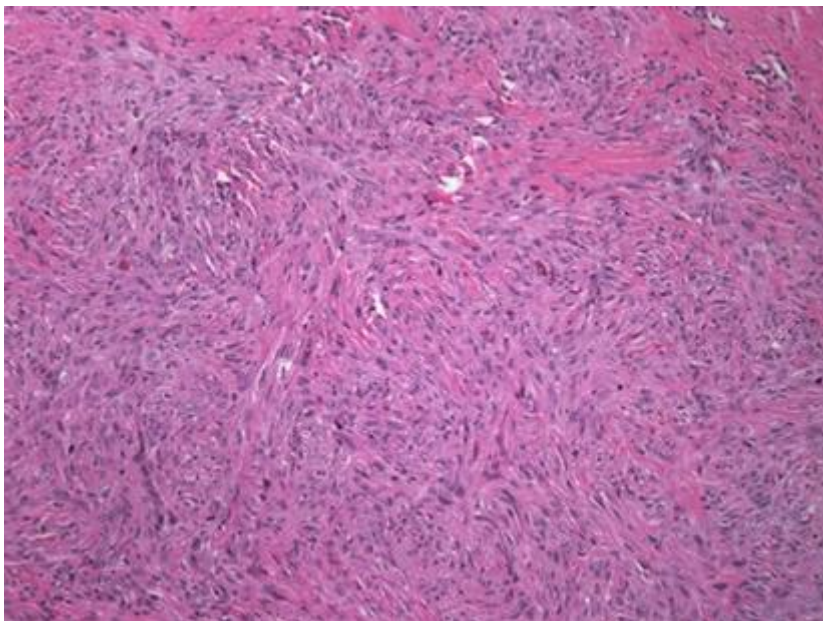


Obr. 7: Proliferace buněk vřetenovitého tvaru a hyperchromatické melanocyty (Smoller, 2006).



Obr. 8: Retikulární dermis a v ní obsažené melanocyty atypického tvaru přítomné u zvětšených cév (Smoller, 2006).

**Akrální lentiginózní melanom (ALM)** má lokalizaci na koncové části končetin (v nehtovém lůžku pod nehtem) a vyskytuje se velmi zřídka. Epidermis při tomto typu melanomu je hyperplastická s lentiginózní hyperplazií. Buňky nádoru jsou většinou dendritické (typické v invazivním nádoru), ale mohou se zde nacházet i buňky epiteloidní. u vaziva je nadměrná tvorba kolagenu ve stromatu, tkáň je pak tuhá- "jizevnatá" (desmoplázie). Melanocyty jsou zde přítomné v hnízdech a také jako jednotlivé buňky okolo dermal epidermal junction. Pagetoidní rozšíření je v celé šířce léze. Intraepidermální melanocyty jsou často hyperchromatické, spirálovité a jádérka nejsou příliš vidět. Dermální melanocyty mají většinou vřetenovitý tvar a jsou hyperchromatické (Obr. 9) (Smoller, 2006).



Obr. 9: Fibrotické stroma s melanocyty vřetenovitého tvaru (Smoller, 2006).

#### **1.2.4 Apoptóza a nekróza**

Buněčná smrt může nastat apoptózou či nekrózou. Nekróza je vždy patologická a vzniká ireverzibilním poškozením buňky – fyzikálními nebo chemickými vlivy, patogenem, ischemií. Dochází při ní k ruptuře cytoplazmatické membrány a membrán lysosomů. Enzymy z lysosomů a cytoplazma vytékají ven, buňka se rozpadá a vznikají substance vyvolávající zánět. Zánět přitahuje bílé krvinky, jde o tzv. zánětlivou reakci (Zeiss, 2003; Hirsch & kol., 1997; Trump & kol., 1997).

Apoptóza (programovaná smrt buňky) je na rozdíl od nekrózy regulovaný, fyziologický děj, který příslušné buňky vede k "sebevražednému programu" (Kerr & kol., 1972). Hraje důležitou roli při udržování homeostázy vnitřního prostředí, v embryonálním vývoji a v řadě procesů imunitního systému (imunitní odpověď, tolerance a suprese) (Melino & Vaux, 2010). Apoptóza většinou nenarušuje celou populaci buněk, ale pouze jednotlivé buňky. Dochází k rozštěpení DNA pomocí enzymů na menší fragmenty. Jádro a tělo buňky se rozpadají na fragmenty ohraničené cytoplazmatickou membránou. Fragmenty jsou rozpoznávány makrofágy a sousedními buňkami pomocí povrchových molekul v cytoplazmatické membráně (fosfatidyl serin) a dochází k fagocytóze fragmentů. Nevzniká žádná zánětlivá reakce. Morfologické znaky apoptózy je kondenzace a precipitace chromatinu, svraštění buňky, vznik fragmentů, které jsou ohraničené membránou. Apoptózu dělíme na tři fáze: iniciační, kontrolní a efektorová. Podněty pro spuštění apoptózy jsou různé- absencí růstových faktorů, hormonů a signálů přežití, vzestupem p53. Apoptóza však končí vždy stejně počínaje aktivací proteáz z rodiny kaspáz, která postupně vede k rozpadu jádra a buněčného těla (Wong, 2011; Trump & kol., 1997).

##### **1.2.4.1 Význam apoptózy u maligního melanomu**

Maligní melanom roste velmi agresivně, často metastazuje a má značnou terapeutickou rezistenci, což poukazuje na porušenou rovnováhu u tohoto typu nádoru. Důležitým mechanismem při vzniku neurodegenerativních nádorových onemocnění je právě zvýšená úroveň apoptózy. Nově popsané molekulární mechanismy apoptózy u melanomu přispívají k racionální léčbě tohoto onemocnění.

Apoptóza v buňkách nádorů probíhá podobně jako v jiných buňkách organismu. V nádorech je možné navodit apoptózu pomocí imunoterapie, chemoterapie nebo radiace. V kancerogenezi hrají podstatnou roli poruchy v průběhu apoptózy v důsledku genetických defektů nebo působením regulačních faktorů. Prokázání těchto změn má významnou roli pro diagnostiku nádorových onemocnění a tím přispět k výběru vhodné terapie. u maligního melanomu je důležitý systém CD95, jelikož je hlavním efektoem imunitního systému proto by blok v jeho signální dráze mohl být zodpovědný za selhání imunoterapie u pacientů (Peter & kol., 2007)

Ovlivnění apoptózy se stalo jednou z hlavních myšlenek protinádorové terapie, která vede ke snížení růstového potenciálu nádorových buněk, návratu nádoru a k pozitivnímu přístupu protinádorové terapie (Wong, 2011).

**Tumor supresorový protein p53** je transkripční faktor, který kontroluje integritu genomové DNA. Pokud dojde k poškození genomové DNA (ionizačním, UV zářením) vede aktivace p53 k zahájení mechanismů, opravujících poškozenou DNA nebo k iniciaci procesů, vedoucích k apoptóze. Pokud se jedná o normální buňky, vede aktivace p53 k zastavení buněčného cyklu, u transformovaných buněk dojde spíše ke spuštění apoptózy. Tumor supresorový protein p53 jako supresor nádorového růstu je velmi důležitý, což vyplývá ze zjištění, že mutace nebo ztráta alel p53 se nachází u více než 50 % všech nádorů (Wong, 2011; Wei & kol., 2012).

## 1.3 Nádorové bujení a imunitní systém

### 1.3.1 Nádorové antigeny

Aby imunitní systém dokázal rozpoznat nádorové buňky, musí nést na svém povrchu antigenní znaky- nádorové antigeny. Tyto nádorové antigeny jsou proteiny, které jsou produkovány nádorovými buňkami a poté jsou exprimovány na jejich povrchu. Nádorové antigeny se dělí na tumor specifické antigeny, které se vyskytují pouze na nádorových buňkách a tumor asociované antigeny, které se vyskytují jak na buňkách nádorových tak na zdravých (Finn, 2008).

Tumor specifické antigeny (TSA) se nacházejí pouze na nádorových buňkách a jejich produkci způsobují většinou bodové mutace. Díky těmto mutacím se pozmění proteiny na povrchu nádorových buněk (Philipps & kol., 1985).

Tumor asociované antigeny (TAA) se nachází na nádorových buňkách ale i na zdravých buňkách a jsou využívány jako markery pro diagnostiku nádorových onemocnění (Old & Chen, 1998).

### 1.3.2 Protinádorová imunitní odpověď

Imunitní systém dokáže bojovat proti nádorovým buňkám v několika rovinách, které zahrnují mechanismy nespecifické i specifické a ty vytvářejí tumor-supresivní celek. Při protinádorové imunitní odpovědi se uplatňují v hlavní roli NK buňky, B a T- lymfocyty, interferony I. i II. Typu (INF I, INF II) a perforiny (Dunn & kol., 2004).

**NK buňky**, objevující se ve všech orgánech těla, mají v každém orgánu jiné zastoupení. Jsou velmi důležitou složkou přirozené imunity, i přes to, že v periferní krvi vytváří pouze 5-10% mononukleárních buněk, což je směs lymfocytární a monocytomakrofágové řady. Vyšší počet NK buněk se vyskytuje v játrech, slezině a plicích (Ferlazzo & kol., 2004). Například v lymfatických orgánech je desetkrát vyšší počet NK buněk oproti periferní krvi (Gregoire & kol., 2007). Role NK a NKT buněk v obraně proti vzniku nádoru a poté vzniku metastáz se potvrdila v pokusech na myších, zbavených lymfocytů (Smyth & kol., 2000). Jakmile dojde ke styku NK buňky s buňkou poškozenou, reagují NK buňky velice rychle a jejich cytotoxicita není závislá na přítomnosti HLA (MHC) systému (French & Yokoyama, 2003; Smyth & kol., 2001). NK buňky nesou na svém povrchu receptory pro MHC i molekuly. Nastávají 2 možnosti: receptory se obsadí MHC i molekulou a tím se působení NK buněk inhibuje nebo se receptory neobsadí MHC i molekulou a tím dojde

k zlikvidování postižené buňky NK buňkami. Nádorové buňky stahují expesi MHC i molekul, kvůli působení T-lymfocytů, tím se stávají pro NK buňky viditelnými. Absence MHC i molekul na nádorových buňkách umožní NK buňkám jejich rozpoznání a zničení. (Garcia-Lora & kol., 2003).

Když dojde k aktivaci NK buněk, vytvoří se řada cytokinů a chemokinů, které se také účastní imunitní reakce, jelikož vedou k autokrinní a parakrinní aktivaci buněk. Takto NK buňky regulují přirozenou i získanou imunitu (Biron & kol., 1999). Na povrchu NK buněk jsou molekuly, fungující jako receptory pro cytokiny a chemokiny. Například krevní lymfocyty mají na svém povrchu CD56 a CD3 molekuly, ovšem NK buňkám úplně chybí receptor T-lymfocytů-CD3 molekula. Molekulu CD7 obsahují na svém povrchu všechny NK buňky (Robertson & Ritz, 1990). Další molekula na povrchu NK buněk je molekula CD16 a hlavní membránovou molekulou NK buněk je molekula CD56 (Lanier & kol., 1986).

Do protinádorové imunity se také řadí **makrofágy**. Makrofágy tvoří většinu leukocytů v nádoru, zapříčinují lýzu buněk a tvoří důležitou součást zánětlivého infiltrátu. Dále produkují tumor necrosis factor beta- TNF- $\beta$ , který se dokáže vázat na receptory na povrchu buněk a tak způsobit jejich programovanou buněčnou smrt (Alleva & kol., 1994). Prekurzorem makrofágů jsou monocyty, které se do nádoru dostávají cíleně, díky chemokinům produkovaných nádorem- Colony Stimulation Factor 1, Vascular Endothelial Growth Factor a CC chemokinů. V makrofágy asociované s nádory (TAM) se přeměňují ve tkáni. Makrofágy ze zdravé či zánětlivé tkáně dokáží lyzovat nádorové buňky, prezentují Tumor asociované antigeny lymfocytům a produkují imunostimulační cytokiny. Cytokiny dokáží zajistit delší přežívání makrofágů v prostředí nádoru a dohromady jsou schopny vytvořit cytotoxicitu proti nádorovým buňkám. Ovšem někdy mohou makrofágy asociované s nádorem růst nádoru podporovat a to vlivem nádorových cytokinů IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$  (Elgert & kol., 1998).

**Dendritické buňky** jsou v nádoru zastoupeny rovnoměrně jako makrofágy, spolu patří k antigen prezentujícím buňkám- APC. Dendritické buňky hrají důležitou úlohu ve spouštění specifické imunity a jsou schopné spojit vrozenou a právě specifickou imunitu. Mechanismy specifické imunity jsou spuštěny fagocytujícími dendritickými buňkami, které prezentují antigeny CD8+ T-lymfocytům či CD4+ T-lymfocytům (Takahashi & Kobayashi, 2003). Dendritické buňky exprimují velké množství molekul MHC II a T-lymfocytům



prezentují antigen. Antigeny uvolněné z rozpadlých nádorových buněk jsou zpracovány antigen prezentujícími buňkami a v komplexu s MHC II molekulami jsou prezentovány CD4+ T- lymfocytům. Tito tzv. helper cells podporují protinádorovou reakci. Helpery se dělí na Th1 a Th2 subpopulaci, podle sekrece cytokinů. Th1 aktivují antigen prezentující buňku (nejvíce dendritickou buňku). Tato dendritická buňka aktivuje CD8+ cytotoxické lymfocyty-CTL. CTL poté rozpoznávají antigen prezentovaný v komplexu s MHC I na té samé antigen prezentující buňce. Th1 lymfocyt také zajišťuje proliferaci CTL, díky produkci cytokinů- IL-2. Po zachycení antigenu migrují dendritické buňky do lymfoidních orgánů, kde právě prezentují antigen lymfocytům – dojde tedy k vlastní imunitní reakci. Tímto se začnou rozšiřovat antigen specifické T- lymfocyty a vzápětí se aktivují B- lymfocyty. B- lymfocyty jsou aktivovány na plazmatické buňky schopné tvorby protilátek díky Th2 lymfocytům. Plazmatická buňka vyměšuje tumor specifické protilátky a tím podporuje protinádorový útok (Wang, 2001; Morel & Oriss, 1998). Dendritické buňky se využívají jako vakcíny proti nádorům, díky tomu, že jsou nejúčinnějšími antigen prezentujícími buňkami. Existují různé strategie, kdy se do dendritických buněk dodávají tumor associated antigens za pomoci nádorové RNA, nádorových lyzátů či nádorových buněk po apoptóze, které jsou schopny vyvolat a posilovat protinádorovou imunitu. Dále existuje alternativní cesta, která navozuje protinádorovou imunitu. Jde o aplikaci buněk získaných fúzí dendritických a nádorových buněk, což má za následek vyvolání silné protinádorové imunitní odpovědi. Fúze těchto buněk má mnoho výhod pro prezentaci nádorových peptidů a navození protinádorové imunity. Jednou z výhod je zpracování a prezentace neidentifikovaných TAA, značná prezentace TAA kostimulačních molekul, dále pak aktivace polyklonálních CD4+ a CD8+ T-buněk, čímž napomáhá T- buňkám k navození CTL reakci (Koido & kol., 2013).

### **1.3.3 Mechanismy úniku nádorových buněk**

Nádorové buňky mají celou řadu únikových mechanismů před imunitním systémem. Na úniku nádorových buněk se podílí nádorové buňky a buňky imunitního systému- převážně s nádory asociované makrofágy- TAM a CD4+, CD25+ regulační T- lymfocyty (Sasada & kol., 2003). Nádor uniká před imunitním systémem tím, že se před ním schovává nebo maskuje a chová se jako by v organismu vůbec nebyl nebo naopak aktivně paralyzuje imunitní systém (Hatina, 2005).

Jedním z těchto mechanismů je aktivní snižování exprese MHC i molekul na povrchu nádorových buněk. Toto snižování exprese MHC i chrání nádorové buňky před cytotoxickými T- lymfocyty, ale také umožňuje atak Natural Killer buněk. Nádory se brání proti tomuto útoku expresí transformovaných MHC Ib, NK buňky rozpoznají nádorovou buňku s MHC Ib jako vlastní a už na ní neutočí (Haynes- Gilmore & kol., 2014).

Dalším mechanismem obrany nádoru proti imunitnímu systému je produkce cytokinu tumor growth factor beta- TGF-  $\beta$ . Tento cytokin vyvolává tvorbu regulačních T-lymfocytů (Tregs) a tím dochází k supresi ataku CTL. T-lymfocyty (Tregs) jsou typem lymfocytů, které vznikají z CD4+ buněk. Tregs udržují toleranci imunitního systému vůči svým vlastním tkáním (Sasada & kol., 2003). Interleukin 10 uvolňovaný nádorem má také suprimující účinek stejně jako TGF- $\beta$ . Spolu dokáží tlumit protinádorovou funkci makrofágů změnou fenotypu. Protinádorový Tumor associated macrophages (TAM M2) fenotyp se účastní přeměny jiných makrofágů na tento alternativní typ. Nádor se snaží udržet tento signál co možná nejvýraznější, ale tato změna je vratná pomocí zvýšení zánětlivých cytokinů (Chan & kol., 2011).

Důležitou roli v únikových mechanismech hraje interakce Fas-receptoru a Fas-ligandu. Navázáním ligandu na receptor zapříčiní apoptózu, která hraje důležitou úlohu v regulaci organismu. Lymfocyty exprimují Fas-ligand s cílem likvidovat nádorové buňky, ale tyto se brání tím, že potlačují expresi Fas-receptoru. Fas ligand je transmembránový protein, běžně se nacházející na povrchu T-lymfocytů. T- lymfocyty mají na svém povrchu i Fas- receptor, tím je zaručena jejich regulace (Kim, & kol., 2007). Pokud dojde k navázání Fas- ligandu nádorových buněk na Fas-receptor T-lymfocytů, dojde k programované buněčné smrti T- lymfocytu. Jde tedy o cílený mechanismus nádorů jak zničit buňky imunitního systému (O'Connell & kol., 1999).

#### **1.4 Imunoterapie založená na aktivaci složek vrozené imunity**

Naše pozornost je věnována převážně vrozené imunitě na základě prací profesora Cuiho a doktora Underhilla. Profesor Zheng Cui objevil mutaci SR/ CR u jedné z myší BALB/ c. Tímto objevem ukázal na fakt, že nádory mohou být ničeny vrozenou imunitou. Z této myši BALB/ c vznikl kmen myši SR/ CR se schopností spontánní regrese nádorových buněk (SR) nebo kompletní rezistence vůči transplantaci těchto buněk (CR). Vysoké dávky nádorových buněk jsou pro divoký typ (WT) myši smrtelné, na rozdíl od myši SR/ CR, které

těmto dávkám odolají. Leukocyty myši s SR/ CR mutací jsou schopné rozeznat nádorové buňky jako tělu cizí a rychle je zničit. Díky tomu jsou myši s mutací SR/ CR tak odolné vůči nádorům. Protinádorová odpověď vychází z vrozené imunity, jelikož SR/ CR myši se dokáží vypořádat s nádorovými buňkami velmi rychle bez předchozího kontaktu. V dalších studiích došlo ke zjištění, že pokud se přenesou leukocyty (granulocyty, makrofágy, NK buňky) z SR/ CR myši na nemutované myši se sarkomem S180 (i na jiné nádory), dosáhne se výrazných léčivých účinků. V konkrétním příkladu myši se sarkomem S180 došlo ke stabilizaci či dokonce úplného vymizení nádorů (9 ze 14), kdy myši s úplnou regresí zůstaly bez známek nádorového bujení 10 měsíců. Buňky vrozené imunity SR/ CR myši dokáží rozeznat určité vlastnosti, společné všem nádorovým buňkám a proto dochází k jejich zničení. (Hicks & kol., 2006). Dále bylo zjištěno, že mutace SR/ CR je závislá na stáří myši. u myši mladších jak 4 měsíce došlo k úplné odolnosti proti transplantovaným nádorům tzv. complete resistant- CR. u myši starších došlo k přijmutí nádoru, ale poté byly postupně zničeny- spontaneous regression- SR (Hicks & kol., 2006). Také byla provedena studie, při níž se zjistilo, že mutace SR/ CR se dá přenést i na jiné linie myši, křížením dojde k přenosu mutace na potomky. Využívány byly myši linie C57BL/ 6, nude mice, které postrádají thymus a CAST / Ei. u nahých myši (nude mice), které postrádají thymus se T-lymfocyty vyskytují velmi vzácně, prokázalo se, že aby došlo k zlikvidování nádoru je nutná vrozená imunita- NK buňky, neutrofily, makrofágy (Cui & kol., 2003; Hicks & kol., 2006).

Na základě práce profesora Cuiho došlo k námi zvolené terapii. Je známo, že nádor je málo imunogenní a uplatňuje imunosupresivní mechanismy, náš imunitní systém ho tedy nedokáže přirozeně zničit. Z tohoto důvodu je třeba nádorové buňky označit, aby došlo k vyvolání ataku na úrovni vrozené imunity, který následuje atak imunity získané. Jelikož vrozená imunita rozpoznává velmi dobře molekulární motiv patogenních organismů (viz dále), byly pro účely tohoto označení použity právě tyto struktury. (Janotová & kol., 2014).

#### **1.4.1 Rozpoznávání přítomnosti patogenů vrozenou imunitou**

Vrozená imunita má receptory, rozpoznávající molekuly patogenních mikroorganismů. Tyto receptory se nazývají Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). Typickým PAMPs jsou lipopolysacharidy, peptidoglykeny, glukany a mannany (Beutler, 2004). Na fagocytech a dalších buňkách vrozené imunity jsou přítomny membránové receptory Pattern Recognition Receptors (PRRs), které umožňují rozpoznání

nebezpečné invaze patogena imunitním systémem. Imunitní systém poté spustí imunitní zánětlivou reakci a poté následuje atak imunity získané (Takeuchi & Akira, 2010).

Jedno z možných dělení PRR, je dělení na sekretované, fagocytární a signální:

**Sekretované receptory**, fungují jako opsoniny, které označí částici za cizorodou. Díky tomu mohou fagocyty a komplement rozpoznat mikrobiální povrchy. Příkladem 21yklohexane21o receptoru je manose-binding lectin- MBL, dále pak C- reaktivní protein- CRP, což je protein akutní fáze, který se váže na motivy na fosfolipidech, které jsou součástí bakteriálního povrchu. Vazba na PAMPszaaktivuje fagocytující buňky a klasickou cestu komplementu (Chang & kol., 2002). Sekretované receptory se naváží na PAMPs různých patogenů a dojde ke spuštění komplementové kaskády, dojde k opsonizaci a také k urychlení fagocytózy.

### **Fagocytární receptory**

Fagocytární receptory jsou na povrchu fagocytujících buněk- jako jsou makrofágy, dendritické buňky či neutrofilů. Jakmile dojde k rozpoznání mikrobiálních PAMPs, PRRs zajistí jejich navázání na povrch fagocytů a ty zapříčiní jejich usmrcení- fagocytózou daného mikroorganismu. Do této skupiny fagocytárních receptorů patří úklidové receptory- **scavenger receptory**, které jsou exprimované hlavně na buňkách myeloidní řady včetně dendritických buněk a makrofágů. Scavenger receptory jsou schopné vázat ligandy a složky bakteriálních stěn a jsou schopné rozeznat apoptotické buňky a endogenní molekuly (Dunne & kol., 1994). Dále se jedná o **formylpeptidové receptory (FRPs)**, **dectin 1 a manózoový receptor**, který je schopen rozpoznat polysacharidy obsahující D- manózu (Le & kol., 2002; Stahl & Ezekowitz, 1998).

### **Signální receptory**

Signální receptory jsou nejdůležitější ve spuštění vrozené imunity. Nejvýznamnějším příkladem signálních receptorů jsou membránově vázané Toll- like receptory- TLR a cytoplazmatické- NOD- like receptory- NLRs (Moresco & kol., 2011). NLRs mají podobnou funkci jako Toll- like receptory a fungují jako druhá vlna ochrany proti průniku patogenů (Opitz & kol.,2004).

**TLR receptory** jsou schopné rozpoznat chemické struktury typické pro patogeny. Mezi tyto patogeny se řadí lipopolysacharidy (LPS), lipoproteiny, prokaryotické a virové nukleonové kyseliny. Každé TLR váže určité ligandy- TLR 1, 2, 4, 6 jsou schopné rozpoznat část buněčné stěny bakterií- LPS, lipoproteiny, lipoteichovou kyselinu či peptidoglykeny. Intracelulární TLR jsou schopné rozpoznat virovou dsRNA- příkladem je TLR 3 a ssRNA, kde je příkladem TLR 7,8. Dalším TLR, který je schopen rozpoznat nametylovaný úsek DNA bakterií a viru je TLR 9 (Akira & Takeda, 2004). Signální receptory aktivují prozánětlivé cytokiny- IL- 1, IL-6, IL- 8, TNF. Sekrece cytokinů a indukce receptorů je důležitá pro imunitní reakci a její regulaci. TLR jsou lokalizovány na povrchu buněk či v intracelulárních membránách- TLR 3, 7, 8, 9 z celkových 11 TLR známých u savců (11 TLR u myši a 10 TLR u savců). Jsou to transmembránové glykoproteiny s extracelulární doménou, která obsahuje leucin (Akira & kol., 2006).

## **1.4.2 Imunomodulační látky použité při terapii melanomu B16- F10**

### **1.4.2.1 Manan**

Manan se nachází na buněčné stěně kvasinek (například *Saccharomyces cerevisiae*) a gramnegativních bakterií. Jde o polysacharid, který se skládá z D-manózy. D- manózy jsou spojené glykosidickou vazbou (Lipke & Ovalle, 1998). Manan slouží jako PAMPs pro vazbu PRRs. Tato vazba vzniká díky receptorům MBL (sektrovaný) a MR na povrchu makrofágů. Tím dojde k aktivaci komplementového systému lektinovou drahou a fagocytózou podporující opsonizaci (Yeeprae & kol., 2006; Gadjeva & kol., 2001).

Manóza binding lektin- MBL je sérový protein, který rozeznává jednotlivé PAMPs s terminální D- manózou, L- fukózou a N- acetyl- D- glukosaminem a váže se na ně. Takto se účastní aktivace komplementu a má funkci opsoninu pro fagocytózu (Takahashi & Ezekowitz, 2005). Aktivace komplementové kaskády vede k vytvoření jednotek C3b a iC3b (mají též funkci opsoninů). Jednotky C3b a iC3b rozeznává komplement receptor 3- CR3, který je umístěn na povrch neutrofilů během jejich aktivování (Vetvicka & kol., 1996). Sérový protein MBL je syntetizován jako monomer obsahující doménu, která rozpozná C- terminální karbohydrát (Carbohydrate recognition domain – CRD), vrchní oblast a kolagenovou oblast (Epstein & kol., 1996).

Manóзовý receptor je exprimován na makrofágách, dendritických buňkách a jde o transmembránový glykoprotein. Řadí se do skupiny fagocytárních PRRs, jehož ligandem je terminální D- manóza mananu. Důležitou funkcí tohoto receptoru je regulace imunitní odpovědi a samozřejmě fagocytóza (Takahashi & kol, 1998; Gazi & Martinez- Pomares, 2009). Manóзовý receptor se skládá z pěti domén, kdy ektodoména manóзовého receptoru má osm karbohydrát rozpoznávajících domén. Tyto domény jsou schopné rozpoznat vzorce cukru, které jsou obsaženy na povrchu bakterií, kvasinek, parazitů či hub (Takahashi & kol, 1998).

K redukci nádoru u myši C57BL/ 6N nedocházelo po aplikaci volného mananu (Bruzlová, 2012). Volný manan totiž nedokázal zajistit zaktivování fagocytárního receptoru ligandy vázaných na povrchu mikroorganismů (Underhill & Gantner, 2004). Pokud však došlo k ukotvení mananu na povrch nádorových buněk, došlo k protinádorovému efektu (Bruzlová, 2012). Názor Underhilla a Gantnera (2004), že mezi signální a fagocytární signalizací dochází ke spolupůsobení, potvrdil i velký protinádorový účinek u kotveného mananu pomocí kotvy BAM v kombinaci s LPS a LPS/ LTA (Bruzlová, 2012).

#### **1.4.2.2 Flagelin**

Flagelin je složkou bičíků u bakterií. TLR 5 rozpoznává flagelin z bakterií (Gram- pozitivních i Gram-negativních), jeho aktivování podněcuje produkci TNF- $\beta$  a spouští systém NF $\kappa$ B (Hayashi & kol., 2001). Příkladem imunoterapie pomocí flagelinu je terapie karcinomu tlustého střeva přetransplantovaného do myši (z lidského karcinomu). Při této terapii došlo k redukci nádoru aplikováním flagelinu do okolí nádorového bujení (Rhee & kol., 2008).

#### **1.4.2.3 Resiquimod (R848)**

Resiquimod, člen velké imidazoquinolinové rodiny, funguje jako modifikátor imunitní odpovědi. Je to nízkomolekulární syntetický agonista TLR 7 a TLR 8. u R848 a imiquimodu (také člen imidazoquinolinové skupiny) byl zjištěn antivirový a protinádorový účinek (u R848 silnější protinádorový i antivirový účinek). Oba jsou schopni aktivovat imunitní systém indukci cytokinů. Jde například o cytokiny INF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL- 6, TNF-  $\alpha$ . Díky těmto cytokinům poté dochází ke stimulaci monocytů, makrofágů, dendritických buněk (Tomai & kol., 1995; Dockrell & Kinghorn, 2001).

#### **1.4.2.4 Listeria monocytogenes**

*Listeria monocytogenes* patří do skupiny intracelulárních patogenů. Imunoterapie nádorového onemocnění pomocí této malé, pohyblivé, Gram-pozitivní bakterie (původce listeriózy) je založeno na cíleném vázání peptidových a proteinových antigenů, kdy se *Listeria monocytogenes* používá jako vektor pro toto vázání (Wallecha & kol., 2009), (Farber & Peterkin, 1991). V našem případě jsme používali teplem usmrcené bakterie, fungující především jako TLR2 agonist (Flo & kol., 2000).

#### **1.4.2.5 Poly I:**

Poly I: C je agonista TLR 3. Jde o imitaci dvouřetězcové virové RNA, která navozuje protinádorovou imunitní reakci. Dochází k produkci INF-  $\alpha$ , INF-  $\beta$ , IL- 1, IL- 6, IL- 12 a TNF- $\alpha$  (Zhou & kol., 2013).

#### **1.4.2.6 Pam3CSK4**

Pam3CSK4 je syntetický triacyl lipoprotein (LP), který napodobuje acylovaný aminový konec bakteriálního lipoproteinu. Je to účinný aktivátor prozánětlivého transkripčního faktoru NF-  $\kappa$ B. Tato aktivace zprostředkovává interakci mezi TLR2 a TLR1, které rozpoznávají LP se třemi mastnými kyselinami, strukturálně charakteristickým bakteriálním LP (Ozinsky & kol.,2000).

#### **1.4.2.7 Keyhole limpet hemocyanin- KLH**

KLH je velký mettaloprotein pocházející z hemolymfy měkkýše *Megathura crenulata*. Jeho protinádorový účinek byl zjištěn u myšího nádoru močového měchýře (Lamm & kol.,1993).

### **1.4.3 Látky použité k ukotvení terapeutik na molekuly**

#### **1.4.3.1 Biocompatible Anchor for Cell Membrane- BAM**

Tato biokompatibilní kotva BAM má na jednom konci hydrofóbní olejovou skupinu a na druhém konci je hydrofilní skupina tvořená polyethylenglykolem (PEG) a ukončená reaktivní NHS skupinou, pomocí které dochází k navázání terapeutik. Olejová skupina umožňuje pevné ukotvení do cytoplazmatické membrány nádorové buňky (Kato & kol., 2003; NOF Corporation, 2015).

#### **1.4.3.2 Succinimidyl- 4- (N- maleimidomethyl) 25yklohexane- 1- carboxylate- SMCC**

SMCC je amin- sulfanyl membránový biokonjugát, obsahující N- hydroxysuccinimidovou a maleimidovou skupinu. N- hydroxysuccinimid (NHS) reaguje s primárními aminy a maleimidová skupina reaguje s thiolovou skupinou cysteinu (Bieniarz & kol., 1996). SMCC je biokonjugát řadící se mezi heterobifunkční činidla, což znamená, že na každém konci má jinou reaktivní skupinu, tím tedy umožňují spojování molekul s odpovídajícími funkčními skupinami (homobifunkční činidla mají na konci totožné reaktivní skupiny). Biokonjugace neboli crosslinking je proces chemického spojování 2 nebo více molekul kovalentní vazbou. (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL).

Ke správnému navázání SMCC k povrchu nádorových buněk, je zapotřebí nejdříve zajistit přítomnost sulfhydrylových skupin na jejich povrchu. K tomu se využívá Tris(2-carboxyethyl) phosphine (Janotová & kol., 2014).

#### **1.4.3.3 Tris (2 – carboxyethyl) phosphine – TCEP**

TCEP dokáže redukcí cysteinů potřebné – SH vazby uvolnit a tím umožnit kovalentní vazbu SMCC, která nese terapeutika (Janotová & kol., 2014). TCEP dokáže redukovat alkylové disulfidy a je resistentní vůči oxidaci vzduchu (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL).



## 1.5 Histologické barvení

Cílem klasického barvení je zdůraznit nejdůležitější struktury tkáně tak, aby se od sebe daly odlišit. Jde o různou afinitu barviv k určitým složkám tkání. Za barvení jsou většinou zodpovědné elektrostatické interakce mezi barvivem a složkou tkáně.

**Bazická- kationová barviva** se váží na aniontové složky, kterými mohou být DNA, RNA, sulfatované glykosaminoglykany. Označují se jako bazofilní. Bazická barviva se využívají k barvení jader. Nejběžnějším bazickým barvivem je **hematoxylin**, toto barvivo se používá nejčastěji. Při tomto barvení je haematein komplexně vázán s ionty kovů, kdy jsou ionty kovů nositeli kladného náboje. Většinou jsou do roztoku barviva dávány ve formě kamenců. Komplex barviva a iontů u kamence hlinitého označujeme jako haemalaun. Jinak je to železitý hematoxylin či chromový hematoxylin. Mezi další bazické barvení se řadí Pappenheimovo barvení (methylenová modř, azur), Giemsovo barvení (pro řezy lymfatickou tkání) a Nisslovo barvení (používané v neuroanatomii).

**Kyselá- aniontová barviva** se váží na kationové složky, kterými mohou být různé cytoplazmatické proteiny, hemoglobin, mitochondrie. Označují se jako eozinofilní nebo acidofilní. Kyselá barviva se používají nejčastěji k barvení cytoplazmy. Nejběžnějším barvivem je **eosin**. Dále jsou používána kyselá barviva jako například azokarmín, kyselý fuchsin, ponceau, oranž G a kyselina pikrová.

U barvení hematoxylin- eosin (H. E.) se zřetelně zdůrazní jádra a cytoplazma, kdy jádra jsou obarvena modrou barvou (modročerná), cytoplazma obarví eosin růžově (světle fialově), červenou značí krvácení (pokud je bohatá na ribozomy tak je modravá), kolagenní vlákna červeně a elastická vlákna bledě červeně či nezbarvená (Fischer & kol., 2008).

## 2 Cíle práce

- Hledání cesty k nejvhodnější nádorové imunoterapii, která bude použitelná v humánní medicíně.
- Studium mechanismů probíhající při nádorové imunoterapii histologickými metodami.
- Histologické vyhodnocení průběhu imunoterapie založené na použití směsi *Listeria monocytogenes*- SMCC, manan- SMCC, R- 848 a POLY I: C.
- Na základě histologického vyhodnocení popsat typické nálezy u neléčených nádorů a nádorů léčených pomocí směsi *Listeriamonocytogenes*- SMCC, manan- SMCC, R- 848 a POLY I: C.

## 3 Materiály a metody

### 3.1 Chemikálie

V pokusech byly používány tyto chemikálie:

**Aditiva- antibiotická/ antimykotická směs (amphotericin B, penicilin G, streptomycin)** (Biosera)

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

**EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová** (Sigma Aldrich)

**FCS – bovinní fetální sérum** (HyClone)

**Flagelin – z bakterie Bacillus subtilis** (InvivoGen)

**Keyhole limpet hemocyanin- KLH** (Sigma-Aldrich)

**Krevní agar** (P-Lab a.s., Česká republika)

**Listeria monocytogenes (Heat killed Listeria monocytogenes)** (InvivoGen)

**Manan – z Saccharomyces cerevisce** (Sigma- Aldrich)

**Pam3CSK4** (InvivoGen)

**Poly I:C** (Sigma- Aldrich)

**Reziquimod (R-848)** (ENZO)

**RPMI 1640** (Sigma- Aldrich)

**SMCC (Succinimidyl-4-(N- maleimidomethyl) cyklohexane-1-carboxylate)** (Thermo Scientific)

**TCEP- Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride** (Sigma Aldrich)

**Trypanová modř** (Sigma Aldrich)

**Trypsin** (Sigma Aldrich)

### **3.2 Laboratorní zvířata**

Při všech in vivo pokusech byly použity samice inbredních myší kmene C57BL/6N od společnosti Charles River Laboratories. Při zahájení pokusu, byly myši staré 8 týdnů a jejich váha byla 18-20 g. Všechny myši byly chovány za standardních podmínek, v místnosti s fotoperiodou 12/12, při konstantní teplotě 22°C, relativní vlhkosti vzduchu 65 % a za stálého přísunu potravy (granulovaná směs) a sterilní vody.

### **3.3 Nádorová buněčná linie**

Při našich experimentech byly použity nádorové buňky z buněčné linie melanomu B16-F10, věnované od prof. Říhové (Mikrobiologický ústav AV, ČR, Praha). Buňky byly umístěny v termostatu o teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a 5% oxidem uhličitým. Tato kultivace probíhala v médiu RPMI 1640 s 10% bovinním fetálním sérem a s aditivy o těchto výsledných koncentracích: Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 j./ml, Streptomycin 100 µg/ml a L-glutamin 292 µg/ml.

### **3.4 Příprava nádorových buněk B16- F10 pro použití in vivo**

Poté, co nádorové buňky narostly v dostačujícím množství a vytvořily souvislou vrstvu, jsme odstranili kultivační médium a narostlá buněčná kolonie byla 3x promyta sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). K promytým adherovaným buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02% trypsin, 0,02% EDTA v PBS). Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 5 minut za účelem uvolnění adherovaných buněk. Poté došlo k zastavení trypsinizace přidáním 15 ml média RPMI 1640 s 10% FCS. Suspenze uvolněných buněk byla přelita do centrifugací zkumavky a centrifugována (10 min, 150G, 4°C). Dále byly buňky naředěny na požadovaný objem přidáním RPMI 1640. Aby se stanovil počet buněk, bylo odpipetováno malé množství buněk do zkumavky a obarveno trypanovou modří (v poměru 1:1). Buňky byly spočítány v Bürgerově komůrce (mrtvé buňky nabarvené modře, živé buňky zůstávají bílé) a výsledná koncentrace byla upravena na 4 miliony buněk/ ml RPMI 1640.

### **3.5 Transplantace buněk melanomu B16- F10**

Transplantace myšího melanomu byla prováděna na osmítýdenních myších oholených ve spodní části zad, kdy jim bylo do pravého oholeného boku podkožně aplikováno 400 000 buněk melanomu B16- F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš.

### **3.6 Měření a výpočet velikosti nádorů**

Velikost nádoru byla měřena pomocí kaliperu a z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádoru podle vzorce  $V = \pi/6AB^2$ , kde  $a$  představuje největší rozměr nádoru (délku) a  $B$  představuje nejmenší rozměr nádoru (výšku), (Inaba & kol., 1986). Nádory byly myším během pokusu měřeny obden a následné objemy byly statisticky vyhodnoceny.

### **3.7 Počítání plicních metastáz**

Po vypitvání myších plic, byly plíce uchovány v 4 % roztoku formaldehydu. Následně byly prohlíženy pod binokulární lupou, kdy se spočítala všechna metastatická ložiska, která vypadají jako černé tečky různých tvarů (Větvička & kol.,2007).

### **3.8 Statistické vyhodnocení výsledků**

Výsledná data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu MS Excel a STATISTICA 13. Grafy pro přežívání myší byly vytvořené na základě testu Kaplan-Meier pomocí programu STATISTICA 13 a statistická významnost byla zjišťována pomocí ANOVY pro opakovaná měření doplněná post-hoc Tukeyovým testem, popřípadě Unequal N testem. Analýza přežívání byla po ukončení léčby provedena pomocí Log- rank testu.

### **3.9 Příprava terapeutických látek pro in vivo experimenty**

#### **3.9.1 Příprava manan- BAM**

Po pětidenní redukční aminaci roztoku mananu kyanoborohydridem sodným v prostředí octanu amonného při  $\text{pH} = 7,5$  a při teplotě  $50^\circ\text{C}$  byl získán roztok manan- $\text{NH}_2$ . Roztok manan- $\text{NH}_2$  byl skrz dialyzační membránu MWCO 3500 (Serva) dialyzován proti PBS (přes noc za stálého míchání a při teplotě  $4^\circ\text{C}$ ) (Torosantucci & kol.,2005). Při  $\text{pH} = 7,3$  byla BAM navázána na aminoskupinu mananu (Kato & kol.,2004). K 12 ml 0,25 mM mannan- $\text{NH}_2$  bylo přidáno 600  $\mu\text{l}$  7,3 mM BAM<sub>4000</sub> v DMSO. Roztok byl promíchán a inkubován při pokojové teplotě 2 hodiny . Poté došlo k zastavení reakce 600  $\mu\text{l}$  1 M TRIS/ HCl  $\text{pH} = 8$ . Následovala další dialýza a konečná úprava na 0,2 mM roztok manan-BAM<sub>4000</sub> v PBS.

### 3.9.2 Příprava Pam3CSK4-BAM

Byl smíchán 1 mg Pam3CSK4+ 1,9 ml PBS+ 100  $\mu$ l 6,6 mM roztoku BAM<sub>4000</sub> v DMSO. Roztok byl inkubován při pokojové teplotě 1 hodinu.

### 3.9.3 Příprava Pam3CSK4-BAM + manan- BAM

Byl smíchán 1 mg Pam3CSK4+ 1,9 ml 0,2mM manan- BAM + 100  $\mu$ l 6,6 mM BAM<sub>4000</sub> v DMSO. Roztok byl inkubován při pokojové teplotě 1 hodinu.

### 3.9.4 Příprava flagelin-BAM

Bylo smícháno 0,1 ml zásobního roztoku flagelinu (100  $\mu$ g/ ml PBS) + 5  $\mu$ l roztoku BAM<sub>4000</sub> v DMSO. Roztok byl inkubován při pokojové teplotě 1 hodinu. Poté došlo k přidání 1,9 ml PBS..

### 3.9.5 Příprava flagelin-BAM+ manan- BAM

Bylo smícháno 0,1 ml zásobního roztoku flagelinu (100  $\mu$ g/ ml PBS) + 5  $\mu$ l roztoku BAM<sub>4000</sub> v DMSO. Roztok byl inkubován při pokojové teplotě 1 hodinu. Poté došlo k přidání 1,9 ml 0,2 mM manan- BAM.

### 3.9.6 Příprava Resiquimodu.HCl (R-848. HCl)

Z R-848 byl nejdříve připraven pomocí ekvivalentu HCl hydrochlorid. Tento hydrochlorid jsme získali smícháním 1,5 mg R-848 s 4,2  $\mu$ l 3,5% HCl a následně jsme jeho koncentraci upravili přidáním PBS.

### 3.9.7 Příprava manan- SMCC

Roztok mananu-NH<sub>2</sub>(připraven výše popsaným způsobem) byl použit k navázání SMCC (heterobifunkční činidlo) na aminoskupinu mananu. Byl připraven 0,2 mM manan-SMCC v PBS.

### 3.9.8 Příprava Listerie monocytogenes

Tepelně usmrcené bakterie *Listeria monocytogenes* byly nejdříve rozsuspendovány v PBS (10<sup>10</sup> bakterií na 1 ml PBS). Poté došlo k upravení koncentrace suspenze tak, aby odpovídala 1 miliardě bakterií na 1 ml PBS.

### 3.9.9 Příprava Listerie monocytogenes- SMCC

Z vytvořené suspenze 10<sup>10</sup> bakterií *Listeria monocytogenes* v 1 ml PBS došlo k odebrání 300 $\mu$ l a společně s 0,75 mg SMCCse vše řádně promíchalo ve 3 ml PBS. Inkubace při pokojové teplotě probíhala 40 minut a poté následovala dialýza proti PBS

pomocí dialyzační membrány MWCO 3500 (přes noc za stálého míchání, při 4°C). Poté došlo opět k upravení koncentrace, aby odpovídala 1 miliardě bakterií *Listeria monocytogenes* s navázaným SMCC na 1 ml PBS.

### **3.9.10 Příprava *Listerie monocytogenes*- SMCC v 0,2mM manan-SMCC**

Ze suspenze  $10^{10}$  bakterií *Listeria monocytogenes* v 1 ml PBS došlo k odebrání 300 $\mu$ l a společně s 0,75 mg SMCCse vše řádně promíchalo ve 3 ml roztoku manan- SMCC v PBS. Příprava manan-SMCC je popsána výše (kapitola 4.9.4.). Tento roztok byl opět inkubován (40 minut, pokojová teplota), poté dialyzován proti PBS přes noc (přes dialyzační mebránu, za stálého míchání, při teplotě 4°C). Výslednou koncentraci jsme upravili na 1 miliardu bakterií *Listeria monocytogeness* navázaným SMCC na 1 ml roztoku mananu- SMCC v PBS.

### **3.9.11 Příprava redukčního činidla TCEP**

. Redukční činidla, redukující disulfidické můstky (cystin), aby byla – SH skupina přístupná pro vazbu SMCC. V našem případě bylo použito redukční činidlo TCEP.

50 mM roztok Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) v PBS

### **3.9.12 Příprava ostatních experimentálních látek**

Ostatní terapeutické látky byly připravovány vzájemným smícháním roztoků (příprava těchto roztoků popsána ve výše uvedených kapitolách) nebo smícháním některého roztoku s chemikáliemi uvedenými ve výše uvedené kapitole (kapitola 4.1).

## **3.10 Histologická analýza**

### **3.10.1 Příprava histologických preparátů**

Myší melanomy byly extirpovány po aplikaci terapeutické látky ve dnech popsaných u schématu histologického pokusu (viz. dále). Nádory byly fixovány ve 4% roztoku formaldehydu při pokojové teplotě. Po vyjmutí z formaldehydu byly nádory krájeny na vhodnou velikost a následovalo odvodnění a poté prosycení vzorku parafinem. Následující den byly vzorky zality parafinem na parafínové lince (LEICA EG1150 H) a hned poté byly zchlazeny. Z takto vytvořených parafínových bločků se na sáňkovém mikrotomu (LEICA SM 2000R) nakrájely histologické řezy o tloušťce 5  $\mu$ m. Řezy byly nataženy na vodní hladině při přibližně 50°C a přeneseny na podložní sklíčka. Následovalo fixování v termostatu po dobu 30 minuta následně odparafinování xylenem. Každý histologický preparát byl nabarven základní metodou Hematoxylin-eosin. Dále následovalo odvodnění

vzestupnou alkoholovou řadou a obarvené histologické řezy byly zamontovány do montovacího média.

### **3.10.2 Vyhodnocení histologických preparátů**

K pozorování preparátů byl použit mikroskop (Olympus CX41), zvětšení objektivu 40x s připojením fotoaparátu (Olympus E-MS II). Veškerá fotodokumentace byla pořízena tímto digitálním fotoaparátem. Vyhodnocování histologických preparátů bylo provedeno analýzou fází v programu QuickPHOTOMICRO 3.1. K vyhodnocení nekrotických pomoci programu QuickPHOTOMICRO 3.1 byly použity snímky při zvětšení objektivu 4x. V tomto programu bylo provedeno vyhodnocení obrazové analýzy fotografií, kdy se na fotografiích histologických preparátů označovala nekrotická a zbytky tumorózní tkáň analýzou fází. Poté bylo vypočítáno, jakou procentuální část tvoří nekrotická.

Vyhodnocení ostatních histologických nálezů- rozsah apoptózy, výskyt granulocytů a plazmocytů bylo provedeno podle histologického hodnocení na křížky, které jsou znázorněny v následující tabulce (Tabulka I). Touto metodou byl vyhodnocen také rozsah nekrotických pro porovnání s vyhodnocením pomocí analýzy fází.



Tabulka I.:

Hodnocení na křížky	Přepoččet křížků na třetiny	Přepoččet na procenta [%]
+	Zastoupení sledovaných buněk do 1/3	33,33
++	Zastoupení sledovaných buněk do 2/3	66,67
+++	Více jak 2/3 sledovaných buněk	100

### 3.11 Jednotlivé experimenty

Myši byly 12. den po transplantaci nádorů randomizovány do skupin, vytvořených podle typu léčby. Byly jim změřeny velikosti melanomů a došlo k zahájení terapie.

#### 3.11.1 Pokus č. 1: Účinek Pam3CSK4-BAM v kombinaci s mananem- BAM na terapii maligního melanomu.

K tomuto pokusu bylo použito 30 samic myšního kmene C57BL/6, které byly náhodně rozděleny po pěti do šesti 6 skupin (A, B, C, D, E, K) podle podávaných terapeutických roztoků.

Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10 bylo myším intratumorálně aplikováno po 50  $\mu$ l jednotlivých roztoků dle následujícího schématu:

**Skupina A:** 0,5 mg Pam3CSK4/ml PBS

**Skupina B:** 0,5 mg Pam3CSK4- BAM/ml PBS

**Skupina C:** 0,5 mg Pam3CSK4/ml 0,2 mM manan- BAM v PBS

**Skupina D:** 0,5 mg Pam3CSK4- BAM /ml 0,2 mM manan- BAM v PBS

**Skupina E:** 0,2 mM manan- BAM v PBS

**Skupina K:** PBS

Po zahájení terapie byly vždy ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 měřeny velikosti nádorů a po uplynutí čtrnácti dnů od zahájení terapie byly myši po změření velikosti nádoru usmrceny cervikální dislokací (zlomení vazy) a následně jim byly vyjmuty plíce pro vyhodnocování metastáz plic.

### **3.11.2 Pokus č. 2: Léčba melanomu pomocí aplikace kotveného flagelinu v kombinaci s kotveným mananem.**

Pro tento pokus bylo použito 25 samic myšího kmene C57BL/6, které byly randomizovány po pěti do pěti skupin (A, B, C, D, K) podle podávaných terapeutik.

Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10 bylo myším intratumorálně aplikováno po 50  $\mu$ l jednotlivých terapeutických roztoků takto:

**Skupina A:** 5  $\mu$ g flagelinu/ml PBS

**Skupina B:** 5  $\mu$ g flagelin-BAM/ml PBS

**Skupina C:** 5  $\mu$ g flagelinu /ml 0,2 mM manan- BAM v PBS

**Skupina D:** 5  $\mu$ g flagelinu- BAM/ml 0,2 mM manan- BAM v PBS

**Skupina K:** PBS

U myší byla obden až do čtrnáctého dne od zahájení terapie měřena velikost melanomů, poté byly myši usmrceny cervikální dislokací a byly jim spočítány metastáze.

### **3.11.3 Pokus č. 3: Terapie melanomu B16- F10 založená na použití R- 848.HCl, kotvených a nekotvených bakterií *Listeria monocytogenes* a kotveného mananu.**

Do tohoto pokusu bylo zahrnuto 30 samic myšího kmene C57BL/6, které byly náhodně rozděleny po šesti do pěti skupin (A, B, C, D, K) podle aplikovaných léčivých látek.

Terapeutické směsi byly podávány ve čtyřech třídenních pulzech, konkrétně ve dnech- 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26. Nejprve bylo vždy intratumorálně aplikováno redukční činidlo TCEP- 50  $\mu$ l na myš. Po uplynutí jedné hodiny následovala intratumorální aplikace terapeutických směsí 50  $\mu$ l na myš dle následujícího schématu:

**Skupina A:** 0,5 mg R- 848.HCl/ml PBS

**Skupina B:** 1 mld Listeria+ 0,5 mg R- 848.HCl/ml PBS

**Skupina C:** 1 mld Listeria- SMCC+ 0,5 mg R- 848.HCl/ml PBS

**Skupina D:** 1 mld Listeria- SMCC+ 0,5 mg R- 848.HCl/ml 0,2 mM manan- SMCC  
v PBS

### **Skupina K: PBS**

U myši byla vždy ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 měřena velikost nádorů a po ukončení experimentu byla sledována doba přežití myši a zaznamenávána data jejich úhynů (kvůli vyhodnocování analýzy přežití).

#### **3.11.4 Pokus č. 4: Terapie založená na použití směsi R- 848.HCl v kombinaci s kovalentně vázaným mananem, Pam3CSK4 a KLH u myši se dvěma nádory.**

K tomuto pokusu bylo použito 24 myši se dvěma nádory (na pravém a levém boku), které byly randomizovány po šesti do čtyř skupin (A, B, C, K) podle aplikovaných terapeutických látek. Terapeutická látka byla vždy aplikována do pravého nádoru.

Léčba probíhala ve čtyřech tří denních pulzech a to ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26, kdy bylo všem skupinám nejdříve aplikováno redukční činidlo TCEP (50  $\mu$ l/ myš) a o hodinu později se aplikovala terapeutická směs (50  $\mu$ l/myš) podle následujícího schématu:

**Skupina A:** 0,5 mg R- 848.HCl / ml 0,2 mM mannan- SMCC v PBS

**Skupina B:** 0,5 mg R- 848.HCl / ml + 0,5 mg KLH/ ml 0,2 mM mannan- SMCC v PBS

**Skupina C:** 0,5 mg R- 848 + 0,5 mg pam3CSK4 / ml 0,2 mM mannan- SMCC v PBS

### **Skupina K: PBS**

U myši byla obden až do třicátého dne od zahájení terapie měřena velikost melanomů (jak na pravé, tak i levé straně), poté byla sledována doba přežití myši a zaznamenávána data jejich úhynů.

#### **3.11.5 Pokus č. 5: Histologické vyhodnocení průběhu terapie maligního melanomu založené na kombinaci látek- *Listeria monocytogenes*- SMCC, manan- SMCC, R- 848.HCl a POLY I:C.**

Pro tento pokus bylo použito 51 samic myšního kmene C57BL/6. Před zahájením léčby jsme náhodně vybraly 3 myši s malým, středním a velkým nádorem, které byly usmrceny cervikální dislokací a byly jim vypitvány melanomy, které se daly do formalinu a později byly využity pro histologické vyhodnocení. Tyto 3 vyjmuté nádory sloužily jako

kontrola. Ostatní myši byly randomizovány po dvaceti čtyřechmyších do dvou skupin (A, K). Dvanáctý den po transplantaci melanomu byla zahájena léčba, která probíhala ve čtyřech tří denních pulzech a to ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26, kdy bylo nejdříve aplikováno všem skupinám redukční činidlo TCEP (50  $\mu$ l) a po hodině se aplikovala terapeutická směs podle tohoto schématu:

**Skupina A:** 1 mld *Listeria monocytogenes*-SMCC + 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C/ml 0,2 mM manan-SMCC v PBS

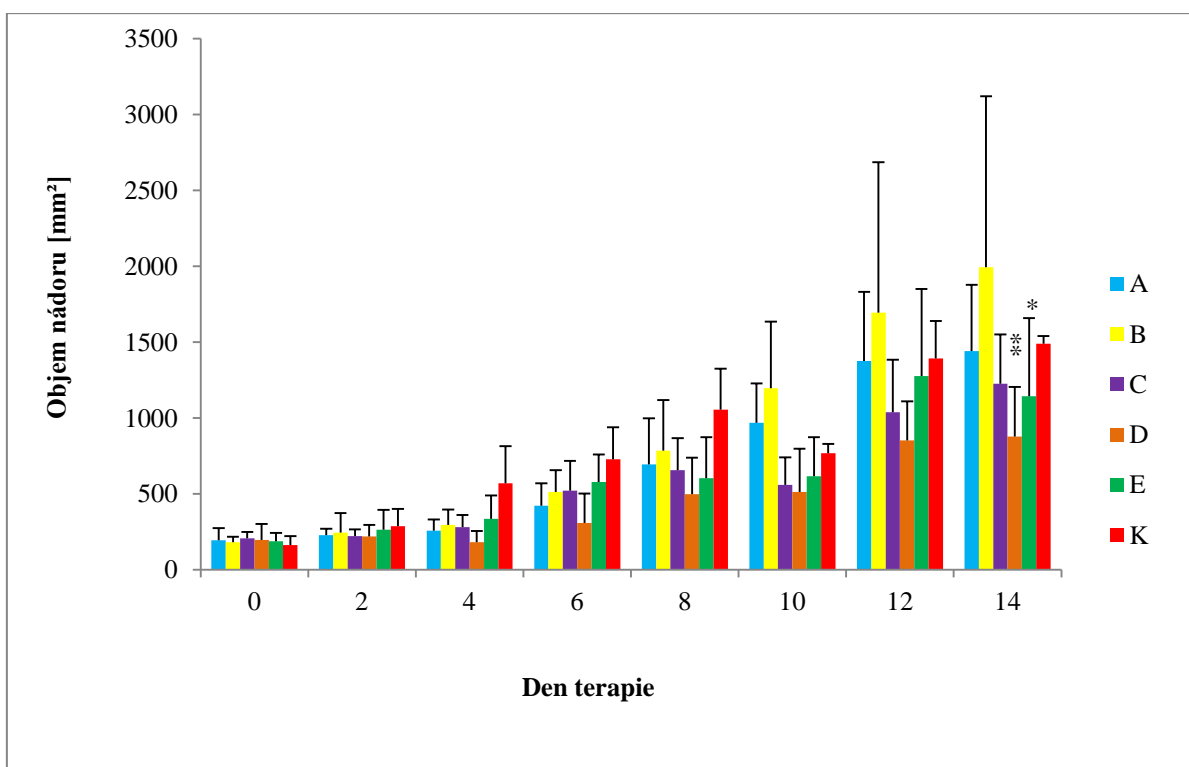
**Skupina K:** PBS

Velikost nádorů byla měřena u všech myši ve dnech 3, 7, 11, 15, 19, 19, 23, 27 a 31 a vždy v tyto dny (3, 7, 11, 15, 19, 19, 23, 27 a 31) byly vybrány tři myši z léčené skupiny a a tři myši z kontrolní skupiny K, kdy se vybíral vždy z každé skupiny malý, střední a velký melanom. Tyto myši byly usmrceny cervikální dislokací a poté jim byly vypitvány nádory, které se ukládaly do formalínu a byly později histologicky analyzovány.

## 4 Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1: Účinek Pam3CSK4-BAM v kombinaci s mananem- BAM na terapii maligního melanomu.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda kotvené Pam3CSK4 v kombinaci s kotveným mananem má na růst nádoru větší vliv, než samotné kotvené či nekotvené Pam3CSK4 a kotvený manan. Z grafu (Obr. 10), kde jsou znázorněny objemy jednotlivých skupin. Je zřejmé, že na růst nádoru má opravdu největší vliv kotvené Pam3CSK4 v kombinaci s kotveným mananem- nejvíce snižoval velikost nádoru. Účinek této směsi byl statisticky významný ve srovnání se skupinou B, nicméně vliv této terapie, ani žádné jiné nevykázal ve srovnání s kontrolou signifikantní rozdíl.

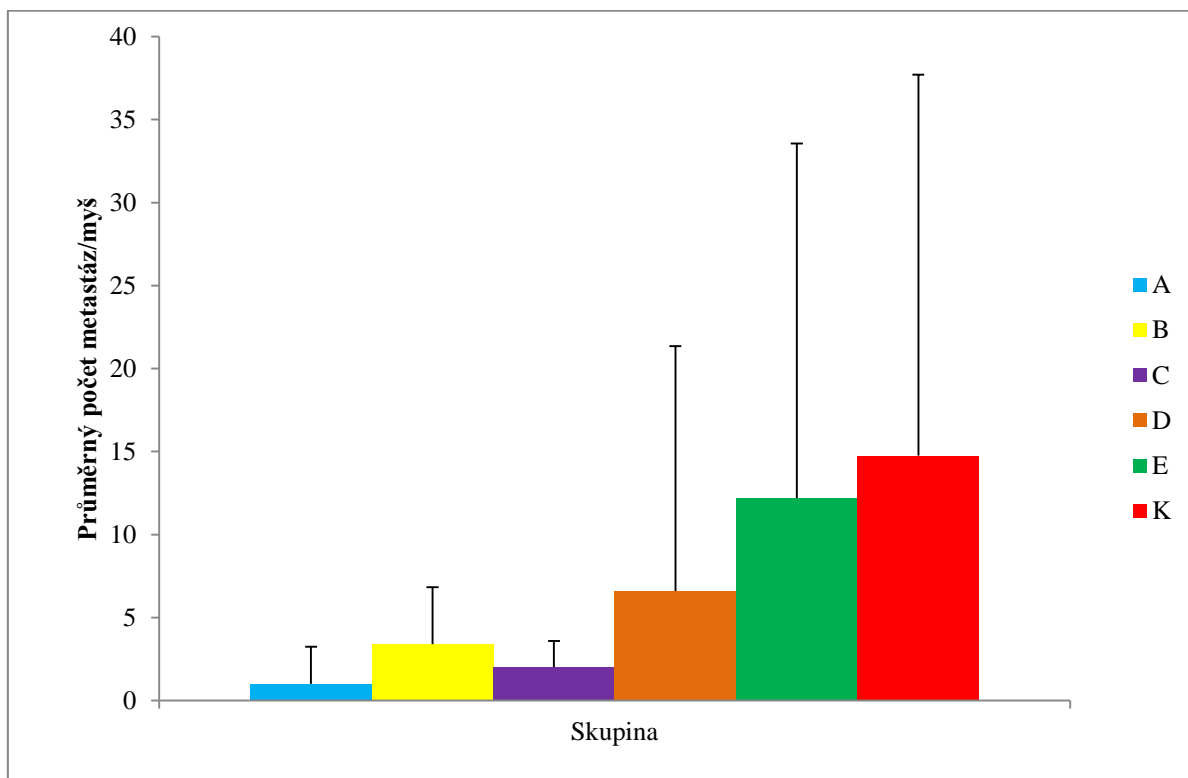


**Obr. 10:** Vliv Pam3CSK4-BAM v kombinaci s mananem- BAM na velikost melanomu.

**A-** Pam3CSK4, **B-** Pam3CSK4- BAM, **C-** Pam3CSK4+ manan-BAM, **D-** Pam3CSK4-BAM+ manan-BAM, **E-** Manan-BAM, **K-** PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání se skupinou B: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,005$ .

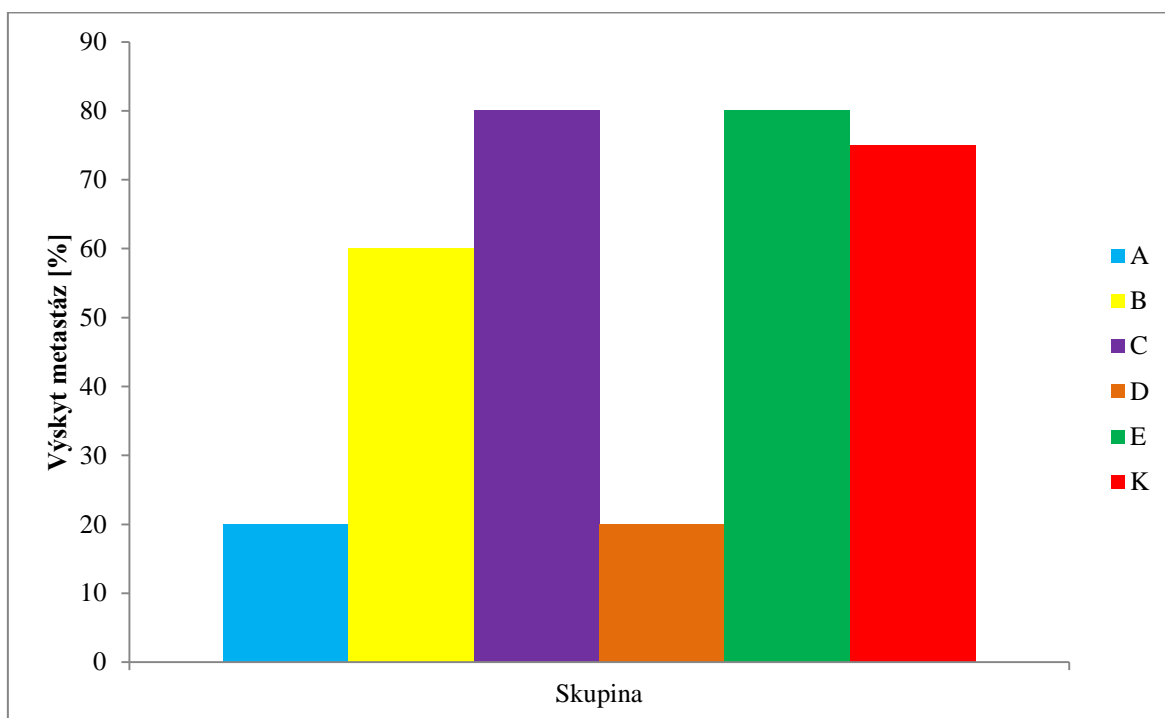
Po ukončení terapie byly spočítány metastázy u jednotlivých skupin. Graf (Obr. 11) znázorňuje vliv léčby na intenzitu metastazování, tedy na průměrný počet metastáz v plicích u myši, u kterých byly nalezeny. Z grafu je zřejmé, že v kontrolní skupině K byl přítomný nejvyšší počet metastáz.



**Obr. 11:** Vliv Pam3CSK4 v kombinaci s mananem- BAM na průměrný počet metastáz v plicích.

**A-** Pam3CSK4, **B-** Pam3CSK4- BAM, **C-** Pam3CSK4+ manan-BAM, **D-** Pam3CSK4-BAM+ manan-BAM, **E-** Manan-BAM, **K-** PBS.

Na dalším uváděném grafu (Obr. 12) je zaznamenán prevalence metastáz u jednotlivých skupin (v procentech). Ve většině skupin (B, C, E, K) byl výskyt metastáz vysoký. Nejnižší procentuální výskyt metastáz byl u léčených skupin a a D.

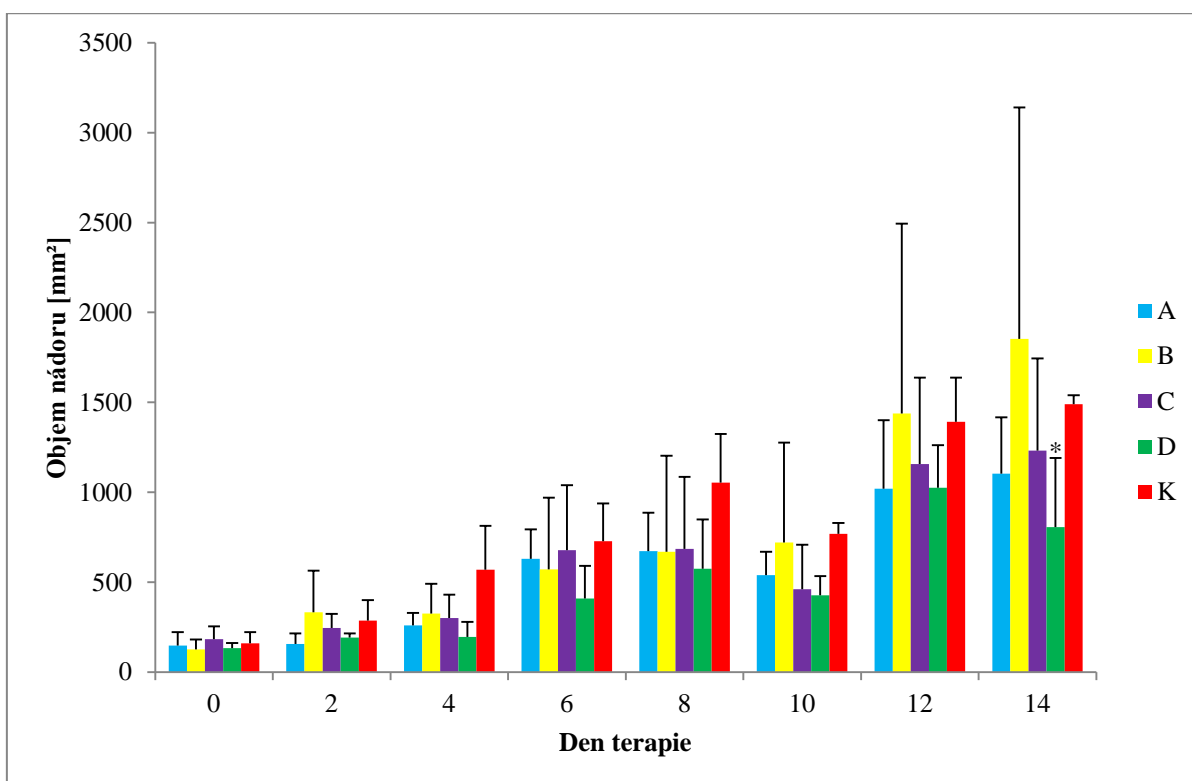


**Obr. 12:** Vliv Pam3CSK4-BAM v kombinaci s mananem- BAM na prevalenci metastáz v plicích u myši jednotlivých skupin.

**A-** Pam3CSK4, **B-** Pam3CSK4- BAM, **C-** Pam3CSK4+ manan-BAM, **D-** Pam3CSK4-BAM+ manan-BAM, **E-** Manan-BAM, **K-** PBS.

## 4.2 Pokus č. 2: Léčba melanomu pomocí aplikace kotveného flagelinu v kombinaci s kotveným mananem.

V tomto pokusu jsme se zabývali léčbou melanomu pomocí kotveného a nekotveného flagelinu a jeho kombinací s mananem. Z grafu (Obr. 13) je patrné, že na růst nádoru má největší vliv terapie s použitím flagelinu- BAM ve spojení s mananem- BAM. Žádný terapeutický preparát ale nedosáhl statisticky významného účinku ve srovnání s kontrolou.



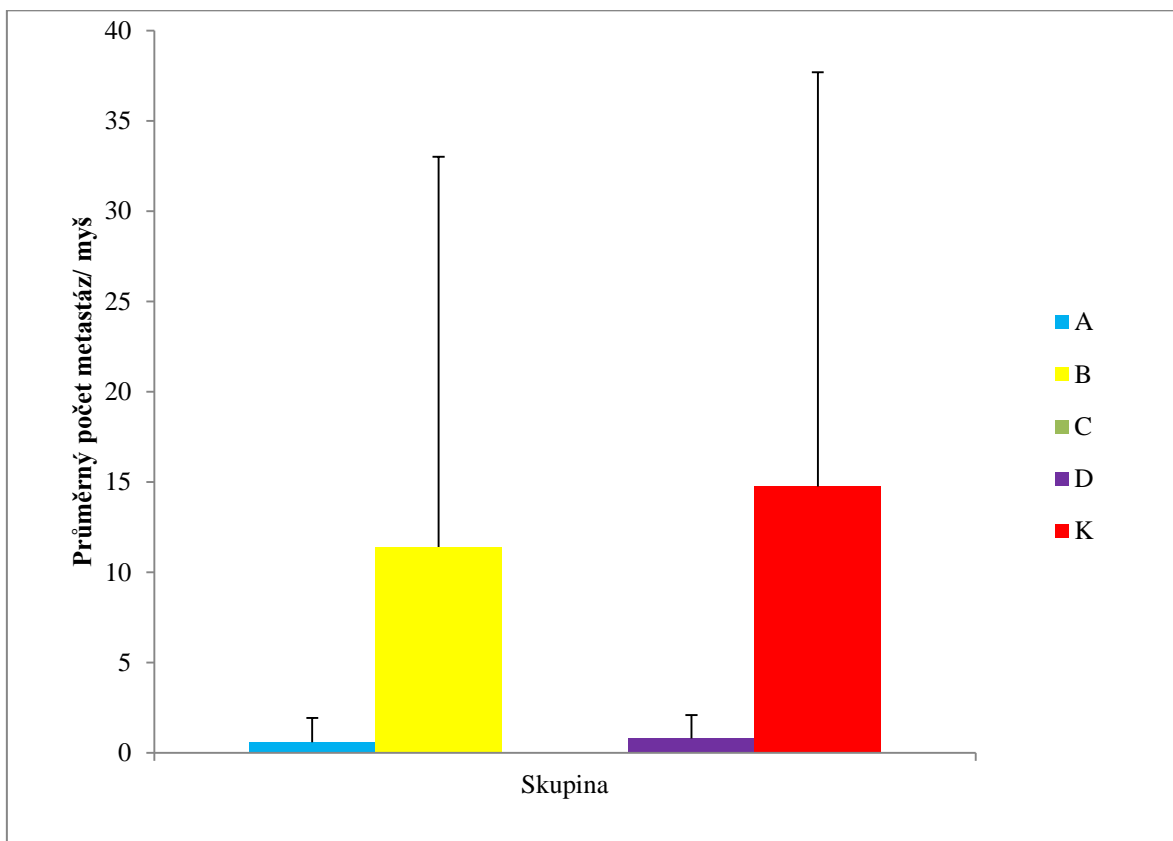
**Obr. 13:** Vliv flagelinu- BAM v kombinaci s mananem- BAM na velikost melanomu.

**A-** flagelin, **B-** flagelin- BAM, **C-** flagelin+ manan- BAM, **D-** flagelin- BAM+ manan- BAM, **K-** PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání se skupinou B: \*  $P \leq 0,05$



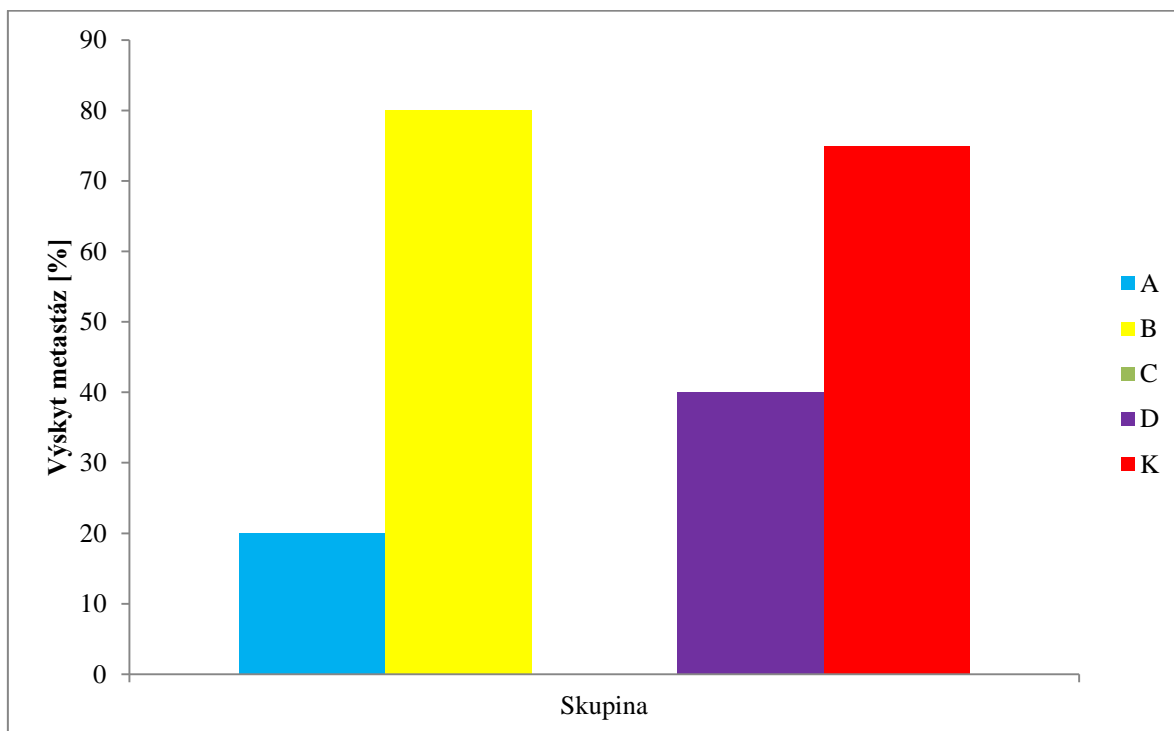
Po ukončení této terapie byly vyhodnoceny metastázy u jednotlivých skupin. Z grafu (Obr. 14) vyplývá, že průměrný počet metastáz na myš je nejvyšší u kontrolní skupiny K, která měla průměrně 15 metastáz na myš. u skupiny C, léčené flagelinem ve spojení s mananem- BAM se nenacházely metastázy žádné. Dále je z grafu zřejmé, že skupina A, léčená pouze flagelinem a skupina D, léčená kombinací flagelinu- BAM a mananu- BAM mají velmi nízký průměrný počet metastáz na myš, která nedosahuje průměrně ani jedné metastáze na myš.



**Obr. 14:** Vliv flagelinu- BAM v kombinaci s mananem- BAM na průměrný počet metastáz v plicích.

**A-** flagelin, **B-** flagelin- BAM, **C-** flagelin+ manan- BAM, **D-** flagelin- BAM+ manan- BAM, **K-** PBS.

Z následujícího grafu (Obr.15) vyplývá, že metastáze se nejvíce vyskytovaly u skupiny B- léčené pomocí flagelinu- BAM a u kontrolní skupiny K, kdy byl výskyt metastáz okolo 80 %. Oproti tomu u skupiny léčené flagelinem- BAM v kombinaci s mananem- BAM, je procentuální výskyt nulový.

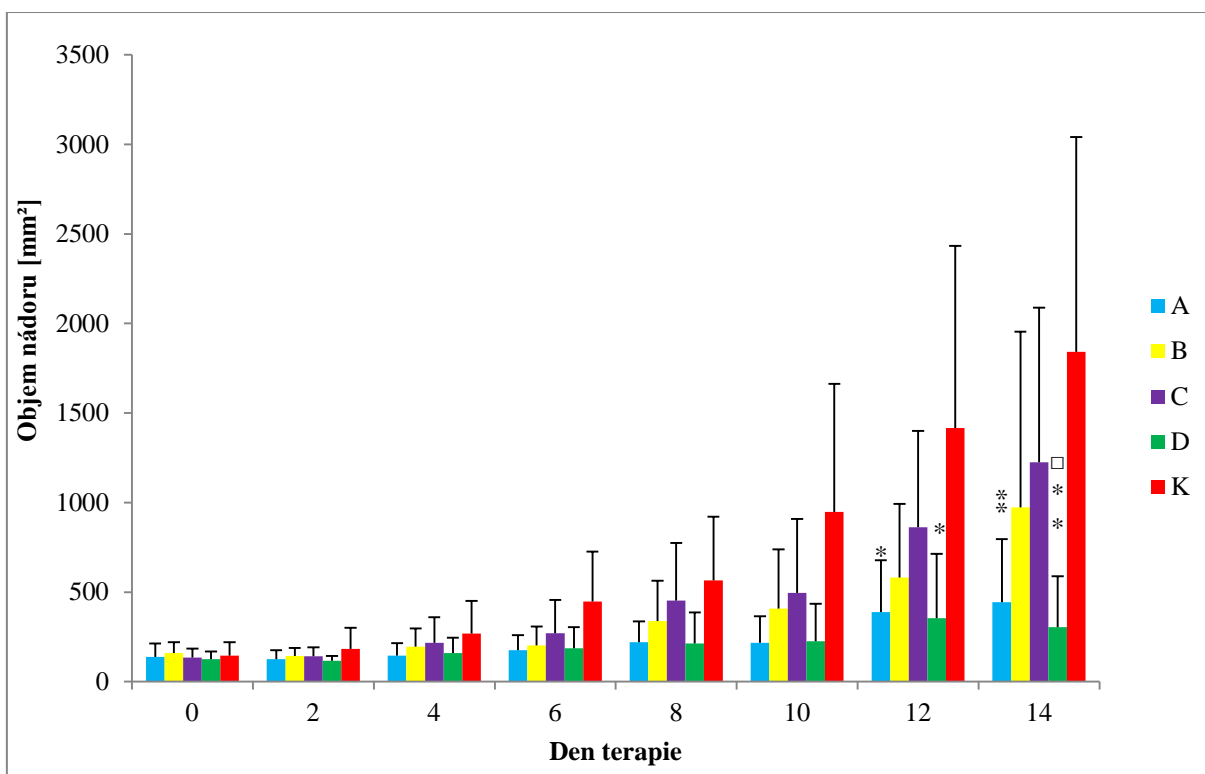


**Obr. 15:** Vliv flagelinu- BAM v kombinaci s mananem- BAM na procentuální výskyt metastáz v plicích.

**A-** flagelin, **B-** flagelin- BAM, **C-** flagelin+ manan- BAM, **D-** flagelin- BAM+ manan- BAM, **K-** PBS.

### 4.3 Pokus č. 3: Terapie melanomu B16- F10 založená na použití R- 848.HCl, kotvených a nekotvených bakterií *Listeria monocytogenes* a kotveného mananu.

Z grafu (Obr. 16), kde jsou zaznamenány objemy jednotlivých skupin je zřejmé, že na růst nádoru má největší vliv terapie pomocí kovalentně kotvené *Listerie* v kombinaci s R- 848 a kovalentně vázaným mananem. Účinek této směsi byl však vyšší ve srovnání se samotným R-848 až ke konci experimentu.



**Obr. 16:** Vliv R- 848 v kombinaci s *Listeria monocytogenes* a mananem-SMCC na velikost melanomu.

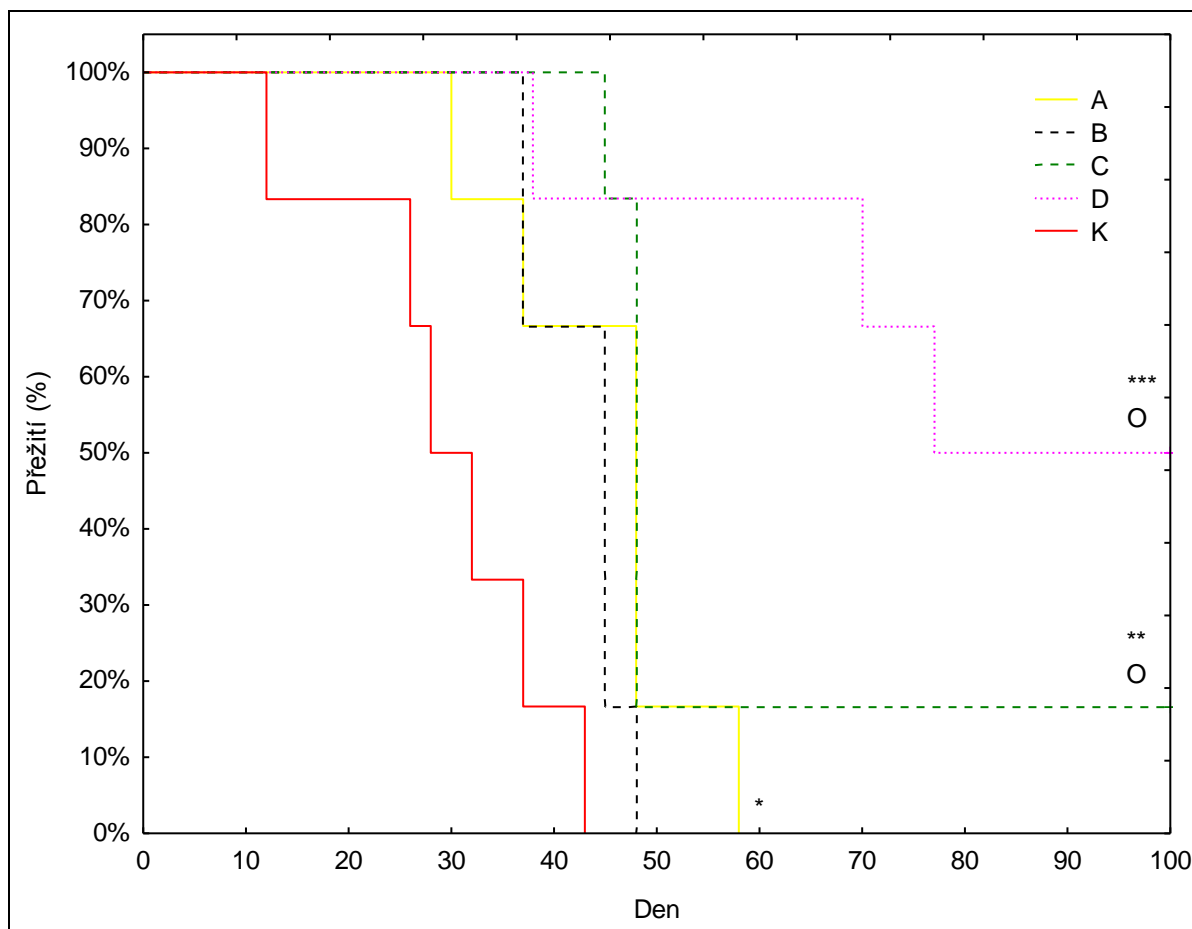
**A-**Resiquimod.HCl (R- 848), **B-** *Listeria*+ R- 848, **C-** *Listeria*- SMCC+ R- 848, **D-** *Listeria*- SMCC+ R- 848+ manan-SMCC, **K-** PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou K: \*  $P \leq 0,05$ ,

\*\*  $P \leq 0,005$ .

Hladina statistické významnosti ve srovnání se skupinou C: □  $P \leq 0,05$ .

Po ukončení pokusu byla pozorována doba přežití myší, aby bylo ukázáno, jaký vliv mají jednotlivé terapie na prodloužení života myši. Ze zaznamenaných dat (Obr. 17) je patrné, že terapie pomocí směsi *Listerie*- SMCC, R- 848 a mananu- SMCC měla velký vliv na přežití myší. V této skupině přežili pozorovanou hranici 100 dní tři myši. V tomto experimentu se hranici 100 dní podařilo přežít jedné myši ze skupiny C, léčené *Listéria*-SMCC ve spojení s R- 848. Došlo zde ke statistické významnosti v přežití myší, kdy nejvyšších hodnot statistické významnosti dosáhla skupina D.



**Obr. 17:** Vliv *Listerie* v kombinaci s R- 848 a mananem- SMCC na dobu přežívání myší.

**A-**Resiquimod.HCl (R- 848), **B-** *Listeria*+ R- 848, **C-** *Listeria*- SMCC+ R- 848, **D-** *Listeria*-SMCC+ R- 848+ manan-SMCC, **K-** PBS.

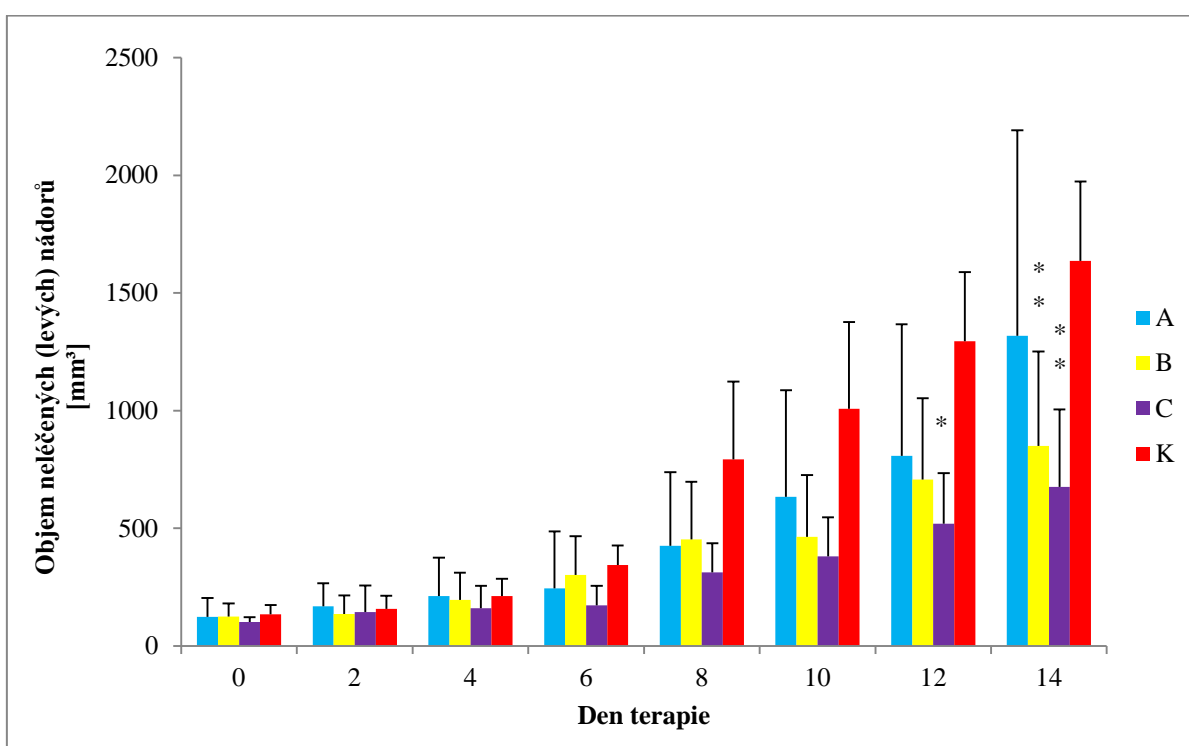
Hladina statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou K: \*  $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$

\*\*\*  $P \leq 0,005$ .

Hladina statistické významnosti ve srovnání se skupinou B: o  $P \leq 0,05$ .

#### 4.4 Pokus č. 4: Terapie založená na použití směsi R- 848 v kombinaci s kovalentně vázaným mananem, Pam3CSK4 a KLH u myši se dvěma nádory.

Z grafu (Obr. 18), kde jsou znázorněny objemy levých neléčených nádorů jednotlivých skupin, je zřejmé, že na růst nádoru má největší vliv terapie pravých nádorů pomocí R-848 v kombinaci s kovalentně vázaným mananem a Pam3CSK4. Účinek této směsi byl statisticky významný ve srovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významnou skupinou je ve srovnání s kontrolní skupinou K i skupina B, léčená pomocí R-848 v kombinaci s kovalentně vázaným mananem a KLH.



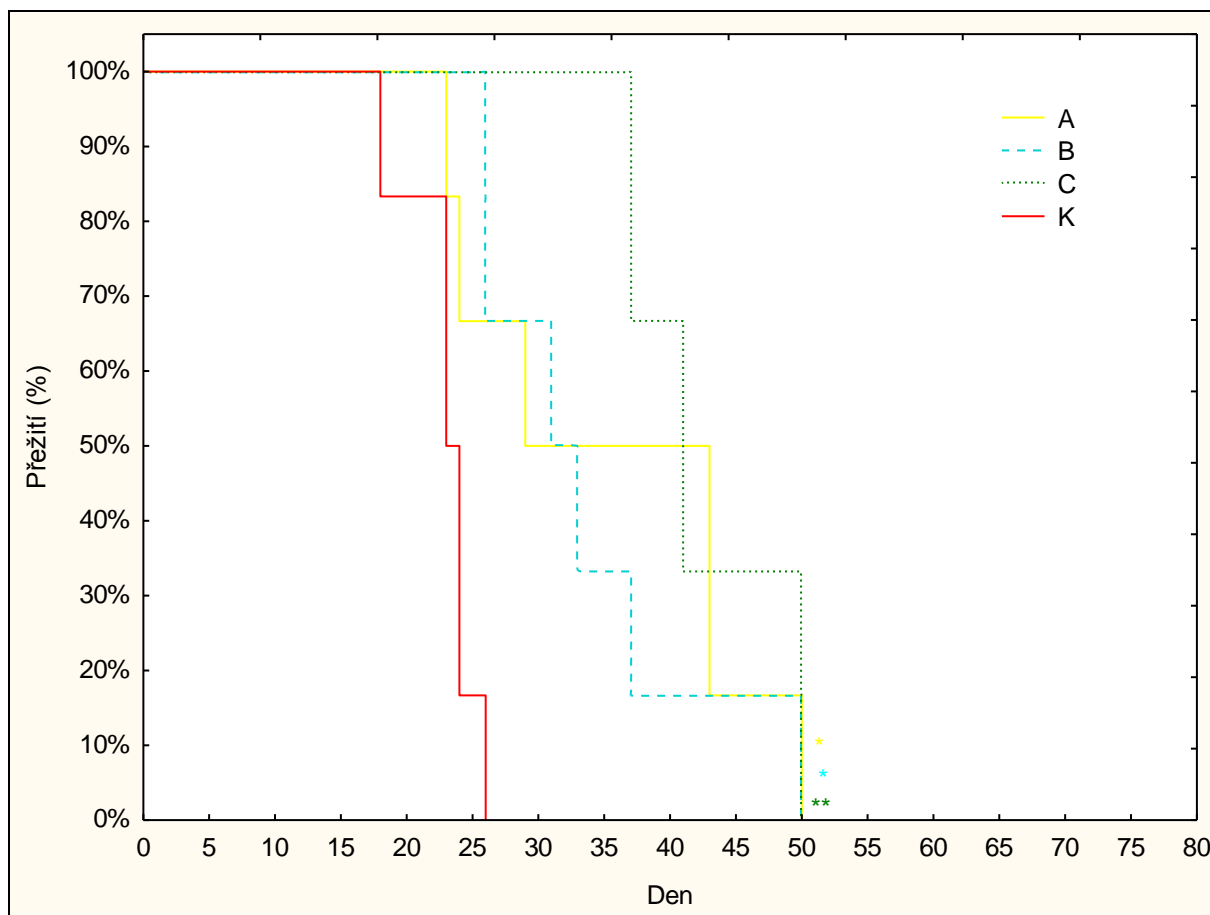
**Obr. 18:** Vliv terapie nádorů pomocí R-848+ manan-SMCC v kombinaci s KLH, či v kombinaci s Pam3CSK4 narůst paralelních nádorů.

**A-** R- 848+ 0,2 mM manan- SMCC, **B-** R- 848+ 0,2 mM manan- SMCC+ KLH, **C-** R- 848+ 0,2 mM manan- SMCC+ Pam3CSK4, **K-** PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou K: \*  $P \leq 0,01$ ,

\*\*  $P \leq 0,005$ .

Po ukončení experimentu byla pozorována doba přežití myši, což sloužilo ke zjištění, jaký vliv mají jednotlivé terapie na prodloužení života myši. Z grafu (Obr. 19) je patrné, že žádná myš nedosáhla hranice přežití 100 dnů a rozdíly v přežití myši byly statisticky významné.



**Obr. 19:** Vliv R- 848+ manan- SMCC v kombinaci s KLH, či s Pam3CSK4 na dobu přežívání myši se dvěma nádory.

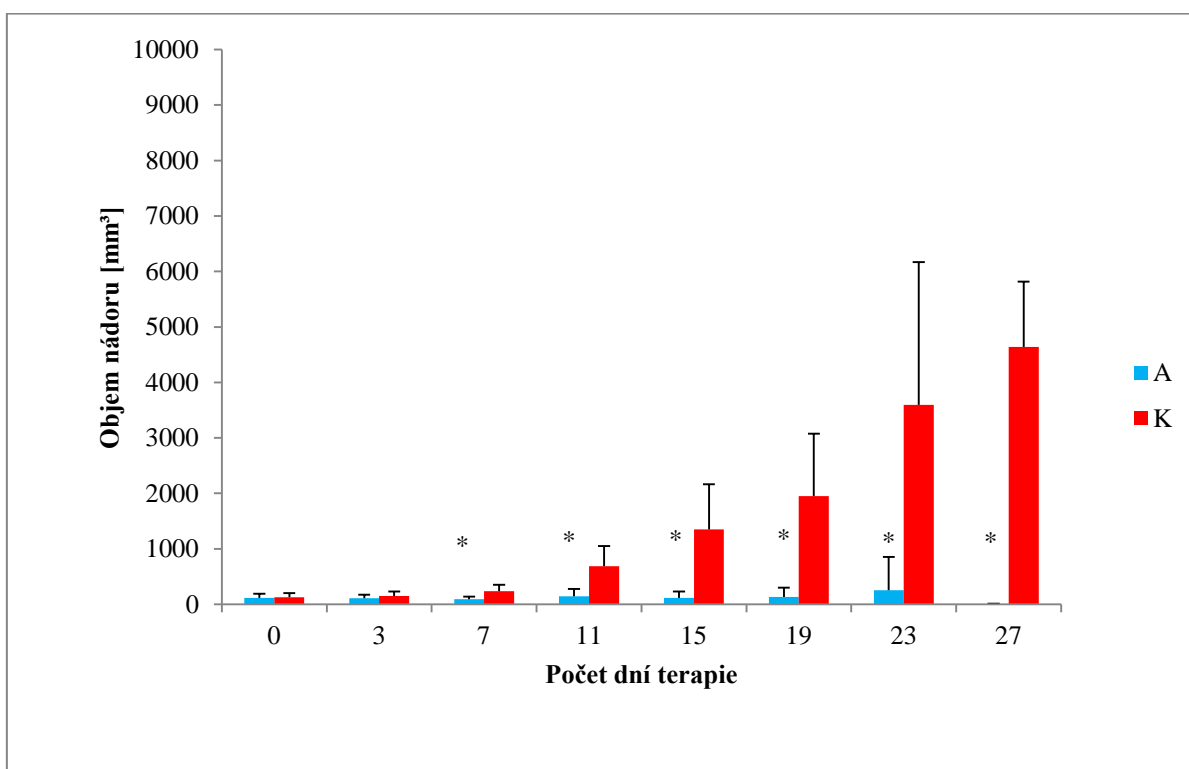
**A-** R- 848+ 0,2 mM manan- SMCC, **B-** R- 848+ 0,2 mM manan- SMCC+ KLH, **C-** R- 848+ 0,2 mM manan- SMCC+ Pam3CSK4, **K-** PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou K: \*  $P \leq 0,05$ ,

\*\*  $P \leq 0,01$ .

#### 4.5 Pokus č. 5: Histologické vyhodnocení průběhu terapie maligního melanomu založené na kombinaci látek- *Listeria monocytogenes*- SMCC, manan- SMCC, R- 848 a POLY I: C.

V tomto experimentu šlo o histologické vyhodnocení průběhu terapie, kdy se zjišťovalo jak velký vliv má terapie založená na kombinaci látek *Listeria monocytogenes*- SMCC, manan- SMCC, R- 848 a POLY I: C. Na následujícím grafu (Obr. 20) je vyhodnocen vliv terapie na objem melanomu. Z grafu je patrné že na růst nádoru má tato terapie velmi silný vliv. Účinek této směsi byl statisticky významný ve srovnání s kontrolní skupinou.

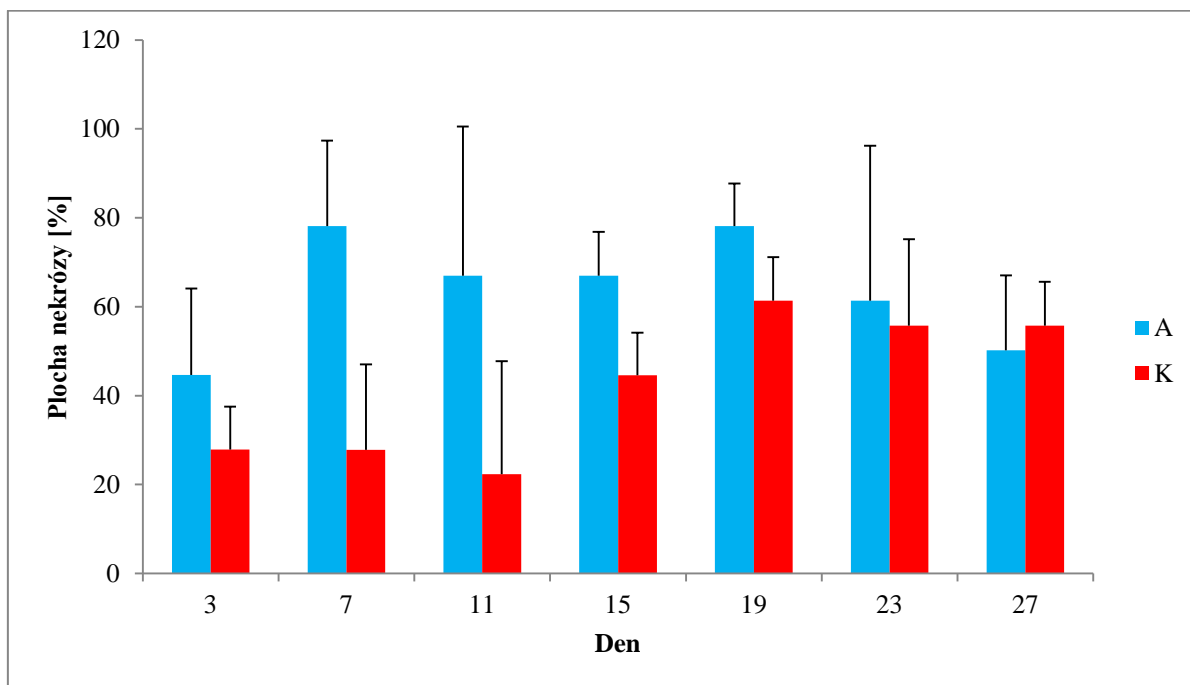


**Obr. 20:** Vliv *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C na velikost melanomu.

A- *Listeria monocytogenes*- SMCC + manan- SMCC+ R- 848.HCl a POLY I: C, K- PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou K: \*  $P \leq 0,005$ .

Obr. 21 znázorňuje tutéž terapii, ovšem zde se zjišťovalo, do jaké míry vyvolávají námi používané ligandy histologické změny u melanomu. Jako hlavní kritérium jsme zvolili přítomnost nekrózy a její rozsah (hodnocení na křížky). Na obr. 21 je tedy vyhodnocena nekrotizace nádoru. Vidíme zde, že tato terapie má velký vliv na výskyt nekrózy.

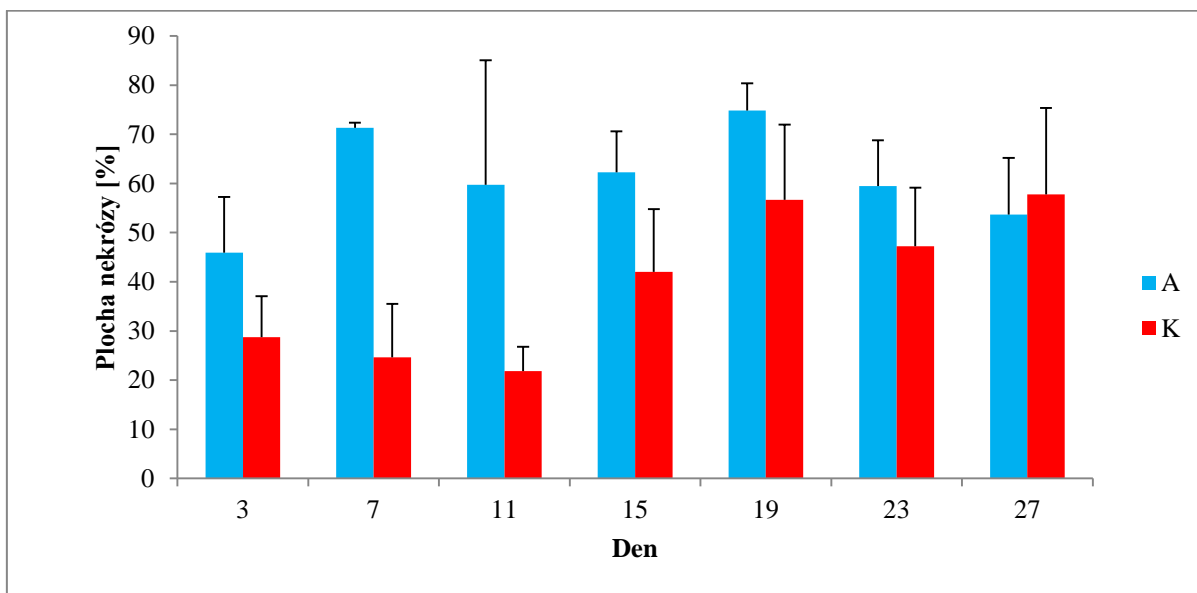


**Obr. 21:** Vliv *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci smananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C na nekrotizaci melanomu.

**A-** *Listeria monocytogenes*- SMCC + manan- SMCC+ R- 848.HCl a POLY I: C, **K-** PBS.



Pro porovnání je na následujícím grafu (Obr. 22) znázorněna také nekrotizace nádoru, kde vidíme obdobné zastoupení nekrózy (jak u léčené, tak i kontrolní skupiny) jako u předchozího grafu. Tento graf byl vyhodnocen analýzou fází. Lze konstatovat velmi dobrou korelaci obou metod vyhodnocení.



**Obr. 22:** Vliv *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C na nekrotizaci melanomu.

**A-** *Listeria monocytogenes*- SMCC + manan- SMCC+ R- 848. HCl a POLY I: C, **K-** PBS.

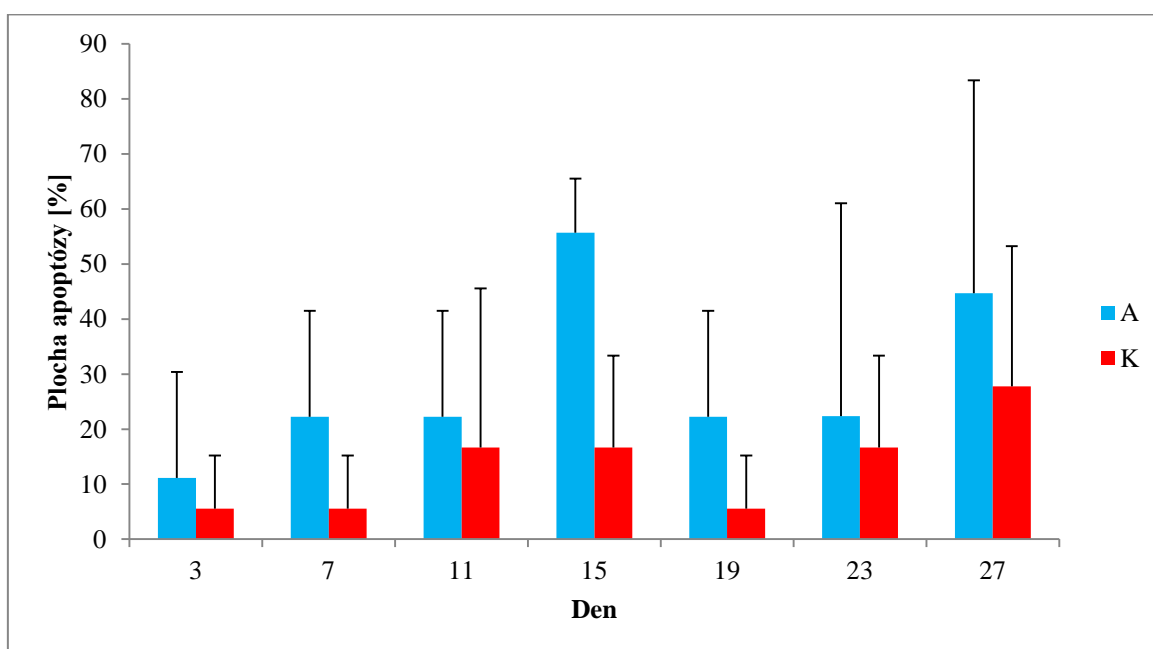
V příloze 1 ukazují obrázky 26- 43 typické vzorky odebírané v určitých dnech terapie- 0, 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31. Z celé řady fotografií je patrná výrazná nekrotizace tkáně, která koreluje s předešlým grafickým znázorněním (Obr. 21, Obr. 22). Tyto snímky byly použity při zvětšení objektivu 4x, aby byla obsažena celá plocha nádoru a bylo zřetelné zastoupení nekrózy a nádorové masy. V příloze 1 je vždy na obrázku vlevo znázorněna kontrolní skupina a na obrázku vpravo skupina léčená směsí *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C. Při histologickém porovnání kontrolní skupiny a skupiny léčené vidíme na fotografiích (příloha 1) zejména značný rozdíl mezi strukturami nacházejících se u kontroly a léčené skupiny. U kontrolní skupiny je nádorová masa tvořena převážně melanocyty, u léčeného melanomu dochází k přeměně tumorové masy na nekrotickou masu (N).

V příloze 2 obrázky 44-49 znázorňují větší detail typických neléčených nádorů, kde jsou přítomné pouze pigmentové buňky-melanocyty, zrna melaninu, popřípadě

invazemelanomových buněk do okolí, což přináší větší prostor k růstu nádoru. (Obr. 47). Dále je zde patrná nekrotizace nádoru, z důvodu velkých rozměrů melanomu neléčených melanomů (Obr. 20). Z grafu (Obr. 20) je zjevné, že 27. den terapie dosahovaly objemy nádorů nejvyšších hodnot, což koreluje s výskytem nekrózy u takto velkých nádorů, snímky jsou zaznamenány v příloze 2 (Obr. 48). U takto velkých nádorů v kontrolní skupině dochází také k výskytu hemoragie- krvácení do nekrózy, zobrazené také v příloze 2 při detailnějším zvětšení (Obr. 49).

Příloha 3 (obrázky 48- 69) ukazuje typické histologické nálezy při likvidaci nádorových buněk terapií pomocí směsi *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci smananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C. Snímky jsou pořízeny při větším zvětšení objektivu pro detailnější zobrazení buněk.

Jako další kritérium jsme zvolili přítomnost apoptózy a její rozsah (hodnocení na křížky, přepočteno na procenta). Obr. 23 ukazuje procentuální množství apoptózy v melanomu a je patrné, že rozsah apoptózy nádorových buněk převažuje ve všech dnech námi použité terapie rozsah apoptóz v kontrolní skupině.

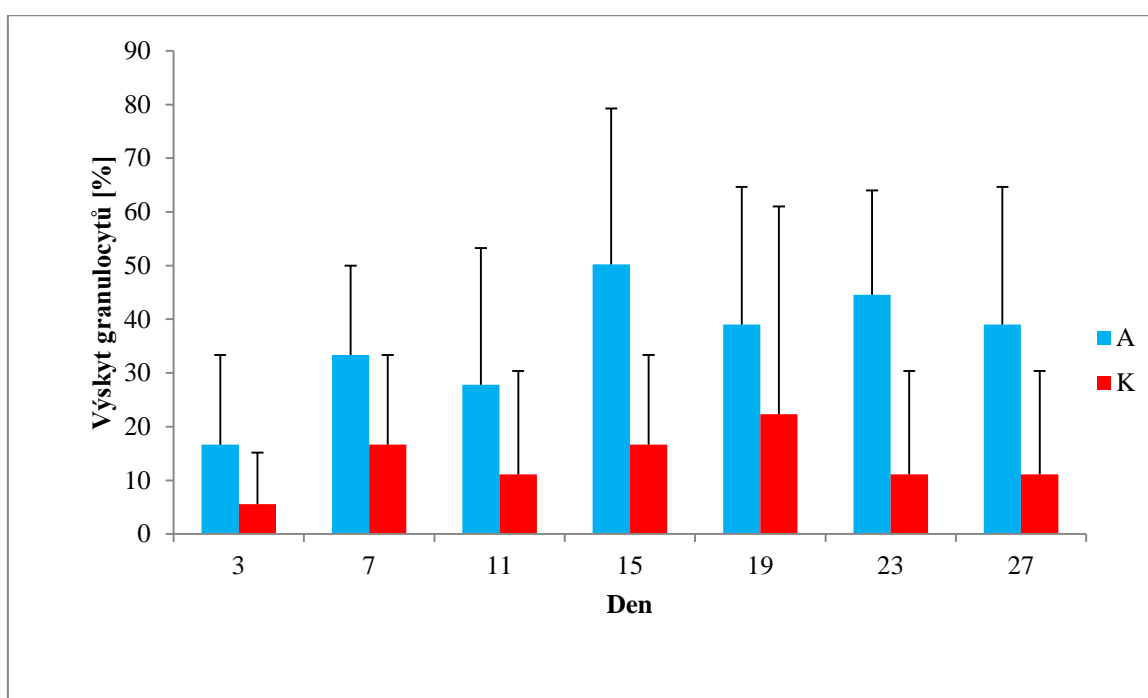


**Obr. 23:** Vliv *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci smananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C na výskyt apoptózy.

**A-** *Listeria monocytogenes*- SMCC + manan- SMCC+ R- 848 HCl a POLY I: C, **K-** PBS.

Největší rozsah apoptózy je znázorněn na grafu (Obr. 23) patnáctý den terapie, kdy dosahuje 50%, výskyt apoptózy patnáctý den terapie je zachycen na fotografii v příloze 3 (Obr. 58), kde je zobrazen kousek nádoru obklopený apoptopickými nádorovými buňkami. Další fotografie apoptózy (Obr. 54, 55, 56) byly pořízeny z histologického preparátu jedenáctý den terapie, kdy dosahuje přes 20% plochy nádoru. Na těchto snímcích je apoptóza znázorněna spolu s nekrózou, kterou obklopuje. Stejně plochy dosahuje apoptóza i v den devatenáctý (Obr. 23) zobrazené na obrázku 60 v příloze 3, kdy apoptóza prostupuje nekrotickou masu.

Dalším možným kritériem, určujícím histologické změny u melanomu námi vybranou terapeutickou směsí, je výskyt granulocytárního infiltrátu. Značná granulocytární infiltrace u léčené skupiny výrazně převyšuje výskyt granulocytů u kontrolní skupiny. Největší zastoupení granulocytů se vyskytuje u léčeného melanomu patnáctý den terapie, kdy dosahuje celých 50%.

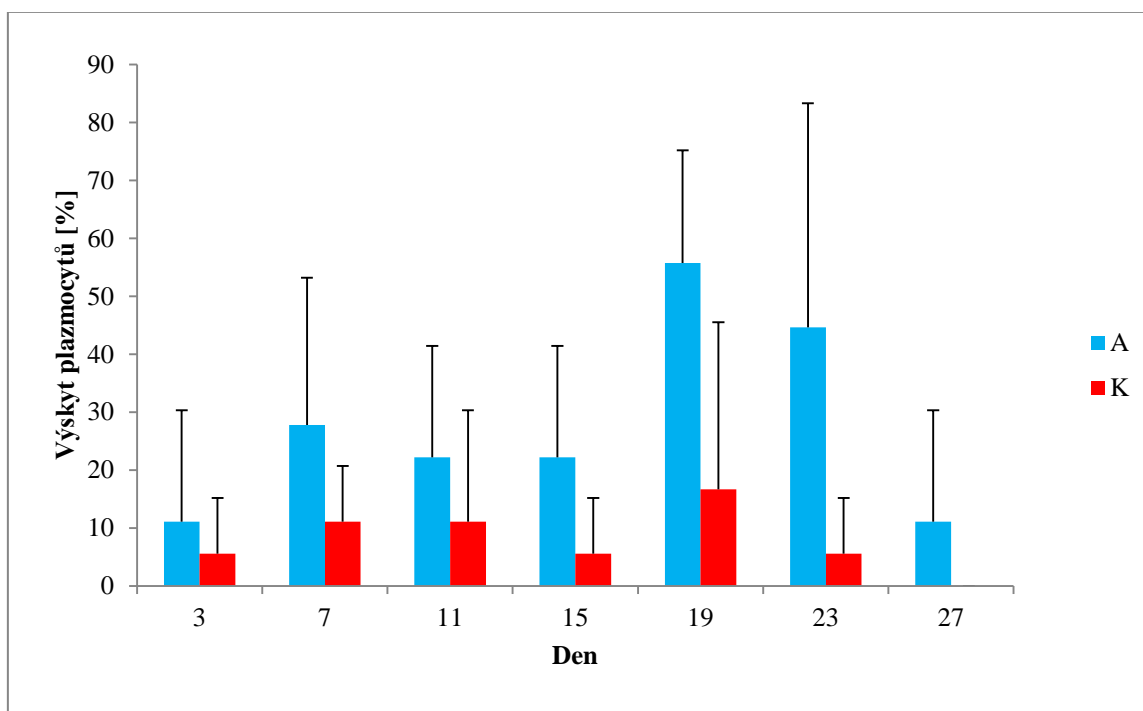


**Obr. 24:** Vliv *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci smananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C na výskyt granulocytů.

**A-** *Listeria monocytogenes*- SMCC + manan- SMCC+ R- 848.HCl a POLY I: C, **K-** PBS.

V příloze 3 ukazují obrázky 50- 69 typické vzorky odebírané ve dnech terapie- 0, 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31 ve větším detailu, aby byl patrný granulocytární infiltrát. Tyto fotografie byly nafoceny při zvětšení objektivu 20x, 40x nebo 60x. Týkají se pouze léčené skupiny, v kontrolní skupině byl výskyt granulocytů oproti léčené skupině minimální. Třetí den terapie je výskyt granulocytů okolo 16%, granulocyty jsou zaznamenány v příloze 3 (Obr. 50). Sedmý den je granulocytární infiltrace daleko vyšší a dosahuje přes 30%, kdy je na fotografii (Obr. 51) znázorněn granulocytární poprašek- poprašky zbytků jader granulocytů po vzniklém boji infiltrátu imunitního systému a nádorových buněk. Obrázek 52 zobrazuje granulocyty ve větším detailu. Nejvyšší výskyt granulocytární infiltrace je patnáctý den terapie, kdy dosahuje 50%. 15. den terapie je znázorněn v příloze 3 (Obr. 66-67). Velký výskyt granulocytární infiltrace (okolo 40%) je dle grafu (Obr. 24) přítomný i dvacátý sedmý den, což je zachyceno na fotografii v příloze 3 (Obr. 66), kde je náplava granulocytů. Fotografie (Obr. 41) v příloze 1 znázorňuje dvacátý sedmý den terapie, kdy byl u myši přítomný strup (3x3) a ze snímku (Obr. 66) v příloze 3 je patrný velký výskyt granulocytárního infiltrátu, dále se zde nachází vazivo s fibrilární strukturou. Přímý záběr na granulocyty 27. den terapie je zobrazen na snímku v příloze 3 (Obr. 67).

Posledním hodnoceným kritériem je výskyt plazmocytů (konečné diferenciační stádium B- lymfocytů) v melanomu. Z grafu (Obr. 25) je patrné, že plazmocyty se daleko ve větší míře vyskytují v léčené skupině oproti skupině kontrolní, kde je zastoupení plazmocytů minimální. Největší nárůst výskytu plazmocytů je patrný u léčeného melanomu devatenáctý den, kdy dosahuje 55%.



**Obr. 25:** Vliv *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C na výskyt plazmocytů.

**A-** *Listeria monocytogenes*- SMCC + manan- SMCC+ R- 848.HCl a POLY I: C, **K-** PBS.

Plazmocyty se v léčené skupině ve zvýšené míře vyskytují sedmý, jedenáctý a patnáctý den, kdy dosahují přes 20 % plochy nádoru (Obr. 25) Fotografie plazmocytů jsou zobrazeny v příloze 3 (Obr. 53), kde jsou ve tkáňové reakci sedmý den terapie, dále jsou znázorněny 11 den terapie na obrázku 57, kde jsou zastoupeny nejvíce kolem nekrózy a na obrázku 59, kde jsou zobrazeny spolu s granulocyty (smíšený infiltrát). Největší výskyt plazmocytů je devatenáctý den terapie (Obr. 25), který zachycuje fotografie (Obr. 61), na které je zobrazen sval a záplava plazmocytů. Dvacátý třetí den terapie dosahují plazmocyty téměř 45% plochy nádoru a jsou znázorněny na fotografiích (Obr. 62, 64), kdy na obrázku 64 jsou znázorněny v lymfoplazmocytárním infiltrátu.

V příloze 3 jsou také obrázky (63-65) histologických preparátů obsahující další buňky imunitního systému- makrofágy a zralé lymfocyty, které byly patrné ve větší míře u léčené skupiny (oproti kontrole) a to od třetího dne terapie. Výskyt lymfocytů a makrofágů nebyl graficky znázorněn z důvodu malého procentuálního zastoupení. Největší náplava lymfocytů byla 23. den terapie (Obr. 63, 64). Výskyt makrofágů pak 19. a 23. den terapie (Obr. 65).

Dále jsou v příloze 3 přítomny obrázky (68, 69) myší epidermis ve větším detailu (oproti obrázku 43 v příloze 1, kde je zobrazena v menším zvětšení) Všechny tyto obrázky jsou pořízené po třicátém prvním dnu terapie. Na obrázku 68 je vidět pouze lehká nekróza a ulcerace epidermis. Je patrné, že nádor zcela vymizel, je zde viditelné normální vazivo. Na obrázku 49 a 69 je zobrazena papilární vrstva, podkoží nekrotická tkáň s fibrinem-tzv. strup.

## 5 Diskuze

V této práci se navazuje na předchozí výzkumy provedených na Katedře medicínské biologie, které jsou zaměřeny na nádorovou imunoterapii především s využitím vrozené imunity. V předchozích pokusech došlo k velkému účinku v redukci nádorového bujení, či dokonce k úplnému vymizení nádoru. Vykonané pokusy s flagelinem, LPS či Zymosanem ukazují, že bakteriální motivy jsou účinnými agonisty PRR a dochází k redukci nádorového bujení (Mariani & kol., 2007; Rhee & kol., 2008). V práci Underhilla a Gantnera (2004) se pojednává o nutnosti současné stimulace PRR. Vliv této stimulace byl potvrzen v mnoha předešlých pokusech, kdy kombinace signálních a fagocytárních PRR vedla k synergii, při které bylo dosaženo výrazné redukci nádorového bujení (Janotová & kol., 2014). V této práci byla řešena otázka hledání nejvhodnější terapie, která by nahradila LPS adekvátními agonisty TLR receptorů spolu v kombinaci s motivy fagocytárními. Důvodem náhrady LPS je lidská citlivost vůči LPS, která může v určité dávce vyvolat septický šok, smrt (Sauter & kol., 1980). Z důvodu vysoké toxicity není tedy možné využít tohoto agonisty TLR v humánní medicíně (Janotová & kol., 2014). Cílem naší práce bylo tedy hledání cesty k nejvhodnější nádorové imunoterapii, která bude účinná v humánní medicíně a dále studium mechanismů probíhajících při nádorové imunoterapii. Tyto mechanismy jsou analyzovány z hlediska dynamiky buněčných změn v nádoru. Přestože se náš výzkumný tým zabýval převážně imunitou vrozenou, která měla vliv na redukci nádorového růstu, je jisté, že i imunita získaná hraje důležitou roli v těchto mechanismech.

Cílem prvních dvou experimentů bylo zjistit, zda Pam3CSK4 jakožto TLR1,2 ligand (případně flagelin /TLR5 ligand) bude možno použít jako náhradu LPS a zda tyto ligandy vykáží synergii s kotveným mananem (stimulace fagocytózy) při redukci nádorového růstu. I přesto, že flagelin v roli imunoterapeutika působil při terapii lidského karcinomu tlustého střeva transplantovaného myším velmi dobře, a aplikací flagelinu do okolí nádoru došlo k výrazné redukci nádoru (Rhee & kol., 2008), v našich experimentech nebyl na redukci nádoru zaznamenán statisticky významný vliv. Samotný flagelin nevyvolával významnou redukci nádoru, což plně podpořilo práci Kovářové (2013), kdy při histologické analýze došla k závěru, že flagelin vykazoval pouze slabý efekt a tudíž se jako ekvivalent k LPS neosvědčil. V našem experimentu nepomohlo ani vázání flagelinu pomocí kotvy BAM a ani kombinace s mananem- BAM. Toll- like receptor 5 (TLR 5) rozpoznává flagelin z Gram- pozitivních a Gram-negativních bakterií. Aktivace receptoru spouští signální systém NF $\kappa$ B, který stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů- TNF-  $\alpha$  (Hayashi & kol., 2001).

Flagelin se ukázal jako nevhodný pro naši terapii, předpokládáme, že z důvodu malé stimulace tvorby prozánětlivých cytokinů, ale to by bylo třeba ověřit.

Kotvené či nekotvené Pam3CSK4 (první experiment) a kotvený či nekotvený flagelin byl použit s mananem –BAM. Jelikož volná manóza nevyvolává žádný protinádorový účinek (Maierová 2012), bylo zapotřebí manan vázat. V předešlých pokusech se došlo k závěru, že manan (agonista MBL), patřící do skupiny PRRs musí být kotven do membrány nádorových buněk. Tímto ukotvením dojde k aktivaci komplementu, která vede k opsonizaci na úrovni iC3b a degradaci takto označené buňky (Janotová a kol., 2014). Nutnost kotvení ligandů a jejich synergie vychází opět z poznatků Underhilla a Gantnera (2004).

Kotvené či nekotvené Pam3CSK4 spolu s mananem-BAM použité v prvním experimentu a kotvený či nekotvený flagelin+ manan-BAM v druhém experimentu nevyvolal zdaleka takový protinádorový účinek ve srovnání s terapií pomocí manan-BAM+ LPS. (Maierová, 2012), kde kombinace manan-BAM s LPS dosáhla enormního synergického působení. Vše je shrnuto v práci Janotové a kolektivu (Janotová & kol., 2014). Mezi novější náhrady LPS se řadí také Resiquimod (R-848)- agonista TLR7/8. Námi použitá terapeutika (Pam3CSK4, flagelin v kombinaci s mananem-BAM) ve srovnání s léčbou R-848 v kombinaci s mananem –BAM vykazují také daleko menší redukci nádorového růstu. V práci Glaserové (2015) vykazovala kombinace R-848+ manan – BAM synergii a bylo zde dosaženo 74,7% průměrné redukce nádorového růstu, která byla statisticky významná ( $P \leq 0,0005$ ). V práci Kumžákové (2015) se také potvrdilo, že léčba pomocí R-848+ manan-BAM se jeví jako účinnější (redukce nádorového růstu 62,7 %), než námi provedená terapie pomocí Pam3CSK4 či flagelinu.

Obě tyto terapie byly však účinné proti vzniku metastáz. V prvním pokusu měl nejmenší zastoupení metastáz volný Pam3CSK4 a v pokusu druhém nebyla u terapie pomocí flagelin+ manan-BAM přítomna jediná metastáza. Bakteriální flagelin účinkuje jako silný antigen pro T- lymfocyty, díky čemuž může být považován za potencionální adjuvant. Na rozdíl od jiných TLR agonistů (vyvolávající pouze Th1 imunitní odpověď) má totiž schopnost vyvolat Th1 i Th2 imunitní odpověď. Specifika signální kaskády je odlišná u různých typů buněk, jimiž jsou buňky epitelální, endotelové, dendritické, dále makrofágy a T- lymfocyty. Flagelin tedy spojuje vrozenou a získanou imunitu v případě dendritických buněk a T-lymfocytů (Steiner., 2007). Obdobné informace jsou zjištěny i u Pam3CSK4.



TLR receptory jsou schopné aktivovat odpověď získané imunity na několika rovinách, příkladem je kontrola vyžívání dendritických buněk a cytokinová produkce (Iwasaki & Medzhitov, 2004; Pasare & Medzhitov, 2004).

Bylo zjištěno, že Pam3CSK4 i flagelin mají příznivý vliv na vyžívání dendritických buněk (Means & kol., 2003; Deifl & kol., 2014). Flagelin a Pam3CSK4 tedy spojují vrozenou imunitu se získanou imunitou, což by mohlo být důvodem nízkého výskytu metastáz u myši léčených těmito látkami.

Ze všech testovaných náhrad LPS v našich experimentech jsme došli k závěru, že R-848 vykazoval nejlepší výsledky. V dalších experimentech jsme se tedy rozhodli pro jeho používání.

Účelem třetího pokusu bylo testování použití kovalentně kotvené a volné *Listeria monocytogenes* pro terapii myšího melanomu. *Listeria monocytogenes* je řazena mezi Gram-pozitivní bakterie a její stěna neobsahuje LPS (Farber a Peterkin., 1991). Z tohoto důvodu byla právě tato bakterie vybrána. Interakcí mezi bakteriálními ligandy a TLR2 dochází k sekreci prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-12) a chemokinů, čímž dojde k aktivaci imunitních buněk (Torres & kol., 2004). V předešlých pokusech došlo ke zjištění, že je vhodné ukotvení jak fagocytárních tak signálních receptorů, z tohoto důvodu byla testována jak volná tak kovalentně vázaná *Listeria monocytogenes*, nicméně rozdíly mezi těmito způsoby aplikace nebyly výrazné. Největší terapeutický efekt byl dosažen pomocí směsi R-848, manan-SMCC v kombinaci s kotvenou *Listerií*-SMCC, což potvrdilo závěry Kumžákové (2015). Jak je patrné z výsledků, nepostradatelnou složkou účinného systému je manan-SMCC, jelikož R-848 v kombinaci s volnou ani kotvenou *Listerií* na kompletní vyléčení nestačí. Výhodnost terapie pomocí směsi R-848 s *Listeria monocytogenes*-SMCC a mananem-SMCC je zde sledována až ke konci léčby, což koreluje s poznatkami Paďoukové (Paďouková, in prep.), kdy se rovněž účinek směsi projevil ve srovnání s účinkem složek až později. Je zde také významná doba přežívání, kdy pomocí této směsi došlo ke statistické významnosti přežívání myši a 50% myši přežilo hranici 100 dní. Tento přínosný efekt směsi na přežívání potvrzuje výsledky diplomové práce Kumžákové (2015), kde měl přírůstek *Listeria monocytogenes*-SMCC na přežití výrazný vliv. Z provedeného pokusu, kdy k eliminaci nádorů a kompletnímu vyléčení myši docházelo až po ukončení injekce terapeutické směsi usuzujeme, že na prvotní atak vrozené imunity navázal atak imunity získané. Tento poznatek, který má zásadní význam i pro terapeutické ovlivnění metastáz

bude vyžadovat další experimenty. Příspěvkem k řešení této otázky byl i následující experiment.

Čtvrtý experiment se zabýval léčbou pomocí kovalentně vázaného mananu spolu s R- 848, KLH či Pam3CSK4 a vlivem této terapie na paralelní, neléčený nádor. Vliv terapie pomocí R-848 + manan-SMCC+ Pam3CSK4 vykazoval statistickou významnost ve srovnání s kontrolní skupinou. Vliv této terapie pravého nádoru na druhý nádor (levý) je možno dávat do souvislosti s vlivem Pam3CSK4 na metastázy, což vypovídá o tom, že jde o vliv systémový, který je dán s největší pravděpodobností iniciací získané imunity.

V tomto experimentu se bohužel nepodařilo dosáhnout statisticky významného přežití léčených skupin, což mohlo být způsobeno velkým zatížením imunitního systému organismu dvěma nádory.

Doposud jsme se zabývali otázkou hledání cesty k nejlepší terapii, tato terapie byla nalezena a cílem posledního, pátého pokusu bylo přispět k objasnění mechanismů při nádorové terapii. Úkolem tohoto experimentu byla detailní histologická analýza působení směsi *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC, R- 848 a POLY I: C. Tato směs byla použita v předešlých pokusech, kdy přidáním poly (I:C) agonisty TLR3ke směsi *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC, R-848 došlo k zesílení synergického působení a tato léčba dosahovala až 82,3 % průměrné redukce nádorového růstu (Glaserová, 2015). Z tohoto důvodu byla tato terapeutická směs vybrána jako nejvhodnější terapie, kde nám šlo o zjištění, do jaké míry vyvolávají námi používané ligandy histologické změny u melanomu. Tato terapie má na růst nádoru velmi silný vliv. Účinek této směsi byl statisticky významný ve srovnání s kontrolní skupinou ( $P \leq 0,005$ ).

Pozorováním histologických změn v nádoru došlo ke zjištění, že největší zastoupení v leukocytárním infiltrátu mají granulocyty. Tato informace o největším zastoupení granulocytů koreluje s výsledky Kovářové (2015), která použila terapii pomocí Zymosanu-SMCC, který manan rovněž obsahuje. Dále v práci Janotové a kolektivu došlo k zjištění, že v nádorovém infiltrátu mají největší zastoupení právě granulocyty (terapie pomocí mananu vázaného hydrofobní kotvou BAM+ LPS, dále pak laminarin-BAM + LPS, f-MLFKK-BAM+ LPS a samotným LPS (Janotová & kol.,2014).

V tomto experimentu šlo o zjištění, jaké buňky imunitního systému se zde vyskytují a jaké je jejich zastoupení při této terapii. Dále byl pozorován výskyt nekózy a apoptózy , což

by mohlopotencionálně přinést informace o způsobu likvidace nádorových buněk buňkami imunitního systému a jejich zbraněmi (granulocyty, plazmocyty, lymfocyty, makrofágy). Studium nádorové infiltrace při tzv. komplexní léčbě - směsi *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan- SMCC, R- 848 a POLY I: C byla zkoumána také průtokovou cytometrií, kde došlo opět k největšímu výskytu granulocytů v leukocytárním infiltrátu. Výskyt granulocytů v průběhu léčby převyšoval kontrolní skupinu a to od sedmého dne terapie (Krejčová, in prep.), což plně podporuje výsledky histologické analýzy, kdy je značná granulocytární infiltrace u léčené skupiny výrazně vyšší než výskyt granulocytů u kontrolní skupiny.

V histologických preparátech jsme dále detekovali plazmocyty, zralé lymfocyty a makrofágy, kdy zastoupení zralých lymfocytů a makrofágů bylo velmi nízké a oba typy buněk byly patrné ve větší míře u léčené skupiny (oproti kontrole) a to od třetího dne terapie. V práci Krejčové (in prep.) je zastoupení monocytů/ makrofágů v řádu stovek na mm<sup>3</sup> což koreluje s nízkým procentuálním zastoupením v histologické analýze. Dále jsou v práci Krejčové (in prep.) obsaženy informace o buňkách získané imunity, které dosahují přibližně 15% z celkového leukocytárního buněčného infiltrátu. Histologické vyhodnocení také vypovídá o spolupráci buněk vrozené i získané imunity. U získané imunity jde hlavně o výskyt zralých lymfocytů a plazmocytů- plazmatických buněk, které jsou konečným diferenciačním stádiem B- lymfocytů. Výskyt plazmocytů je v histologické analýze poměrně častý a svého maxima dosahuje devatenáctý den terapie.

Histologická analýza také zjišťovala rozsah nekrózy. Z předešlých pokusů víme, že léčba pomocí LPS v kombinaci se stimulací fagocytóz vykazovala největší efekt v začátcích terapie a pokud nedošlo k vyléčení nádoru v počáteční fázi léčby, byly poté tyto nádory v pokročilé fázi neléčitelné. U terapie pomocí LPS dochází k rychlé destrukci tumorové tkáně, která se přeměňuje v tkáň nekrotickou. Rychlý nástup nekrotizace tkáně je vystižen v práci Divoké (2014), kdy po aplikaci LPS v kombinaci s kotveným mananem došlo již po 24 hodinách k 68,93% nekrotizaci tkáně. Po 72 hodinách došlo po použití LPS k 51,61% nekrotizaci tkáně (Divoká, 2014). Při použití námi aplikované směsi *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC, R-848 a POLY I: C došlo třetí den (72 hodin) k srovnatelně vysokému rozsahu nekrózy (45,89%), což plně podporuje efektivnost této léčby.

Atak vrozené imunity, vyvolaný zejména výskytem granulocytárního infiltrátu spojený s nekrotizací nádoru, postupně přechází v atak získané imunity, spojený více s apoptózou, čemuž napovídá poměrně vysoký výskyt apoptózy od patnáctého dne, kdy

dosahuje téměř 56%, dále pak dvacátý sedmý den terapie dosahuje 44,67%. Dále tento atak vrozené imunity přecházející v atak imunity získané koreluje s výskytem plazmocytů, který dosahuje vrcholu devatenáctý den (55,78%) a dvacátý třetí den (44,67%) dvacátý sedmý den terapie. Zapojení získané imunity odpovídá našim výše uvedeným pozorováním průběhu terapie (postupná likvidace nádorů i po ukončení terapie, vliv na metastázy, vliv na růst paralelního nádoru). Zapojení získané imunity potvrdila Kumžáková (2015) pozorováním získané rezistentností myši vůči nádorové retransplantaci.

Tímto histologickým vyhodnocením získáme obraz mikroprostředí nádoru, kde můžeme vidět v čase postupující degradaci tkáně, ovšem nejsme schopni rozpoznat všechny typy buněk- NK buňky, dendritické buňky, popřípadě Tc- lymfocyty, jako dokáže průtoková cytometrie. Vhodným řešením je použití imunohistochemického zpracování.

## 6 Závěr

- Flagelin a Pam3CSK4 se neosvědčily jako vhodná náhrada LPS v nádorové terapii založené na kombinaci TLR agonistů se stimulací fagocytózy.
- Pam3CSK4 a flagelin v kombinaci s mananem- BAM byli však účinné proti vzniku metastáz, což si vysvětlujeme stimulací vyžívání dendritických buněk a tedy spojením vrozené a získané imunity.
- Nebyly zjištěny zásadní rozdíly mezi použitím volné či vázané *Listeria monocytogenes* pro účely nádorové imunoterapie.
- Byl potvrzen význam použití většího komplexu TLR stimulantů a nutnost jejich kombinace s kotvením mananu pro účinnou nádorovou terapii.
- Byl studován vliv imunoterapie primárních nádorů na růst paralelních neléčených tumorů. Největší efekt byl nalezen u terapie směsí R-848 + Pam3CSK4 + manan-SMCC. Tento systémový efekt je dáván do souvislosti s protimetastatickým vlivem a interpretován zapojením získané imunity.
- Byly studovány buněčné změny v nádoru v průběhu imunoterapie založené na použití TLR agonistů a mananu-SMCC histologickou analýzou.
- Histologické vyhodnocení terapie směsí *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC, R-848 a POLY I:C potvrdilo efektivnost této terapie, kdy došlo k velkému výskytu nekrózy a granulocytárního infiltrátu, který byl srovnatelný s léčbou pomocí terapeutických směsí obsahujících LPS.
- Fotografiemi histologických preparátů byly zdokumentovány typické rysy neléčeného melanomu i typické nálezy po imunoterapii pomocí směsí *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC, R-848 a POLY I:C.

## 7 Seznam použité literatury

- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*; 4(7):499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*; 124(4): 783-801 .
- Alleva, D. G., Burger, C. J., & Elgert, K. D. (1994). Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta and prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*; 153: 1674-1686 .
- Ayadurai, K. (2010). Histology of skin. *Malaysian Journal of Dermatology (online)*; 24: 6-8. Dostupné z:[http://www.dermatology.org.my/pdf/19RCD\\_Abstract%20Book%20A.pdf](http://www.dermatology.org.my/pdf/19RCD_Abstract%20Book%20A.pdf) .
- Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*; 4: 540-550 .
- Bayston, K. F., & Cohen, J. (1990). Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *Journal of Medical Microbiology*; 31(2): 73-83 .
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. . *Molecular Immunology*; 40: 845-859 .
- Bieniarz, C., Husain, M., Barnes, G., King, C. A., & Welch, C. J. (1996). Extended length heterobifunctional coupling agents for protein conjugations. *Bioconjugate Chemistry*; 7(1):88-95 .
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., & Pien, G. C. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Reviews Immunology*; 17: 189-220 .
- Bruzlová, P. (2012). Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce*; 37 s.
- Bruzlová, P. (2012). *Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Clark, W. H., From, L., & Bernardino, E. A. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research*; 29: 705- 726 .

- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, D., Hawkins, G. A., a další. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Science*; 100(11): 6682-6687.
- De Gruijl, F. R., Van Kraner, H. J., & Mullenders, L. H. (2001). UV- induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 63: 19-27 .
- Deifl, S., Kitzmuller, C., Steinberge, P., Himly, M., Jahn-Schmid, B., Fischer, G. F., a další. (2014). Differential activation of dendritic cells by toll-like receptors causes diverse differentiation of naïve CD4+ T cells from allergic patients. *Allergy*; 69: 1602–1609 .
- Divoká, P. (2014). Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce*; 91 s.
- Dockrell, D. H., & Kinghorn, G. R. (2001). Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48:751-755 .
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*; 21(2): 137-148 .
- Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M., & Joiner, K. A. (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91: 1863-1867 .
- Elgert, K. D., Alleva, D. G., & Mullins, D. W. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. . *Journal of Leukocyte Biology*; 64(3): 275-290 .
- Epstein, J., Eichbaum, Q., Sheriff, S., & Ezenkowitz, R. A. (1996). The collectins in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*; 8 (1): 29–35. DOI: 10.1016/S0952-7915(96)80101-4.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*; 55:476-511 .

- Ferlazzo, G., Thomas, D., & Lin, S. L. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytotoxic. *The Journal of Immunology*; 172: 1455-1462 .
- Finn, O. J. (2008). Cancer immunology. . *New England Journal of Medicine*; 358(25): 2704-2715 .
- Fischer, A. H., Jacobson, K., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*; doi:10.1101/pdb.prot4986 .
- French, A. R., & Yokoyama, W. M. (2003). Natural killer cells and viral infections. *Current Opinion in Immunology*; 15: 45-51 .
- Gadjeva, M., Thiel, S., & Jensenius, J. C. (2001). The mannan-binding lectin pathway of the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*; 13(1):74-78 .
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., & Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. . *Journal of Cellular Physiology*; 195(3): 346-355 .
- Gazi, U., & Martinez- Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*; 214 : 554 – 561 .
- Glaserová, S. (2015). Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce*; 66 s.
- Gregoire, C., Chasson, L., & Luci, C. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews*; 220: 169-182 .
- Gross, S., & Walden, P. (2008). Immunosuppressive mechanism in human tumors: Why we still cannot cure cancer. *Immunology Letters*; 116(1): 7-14 .
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: 57-70 .
- Hatina, J. (2005). Tumour immunology – present status and lessons from the 1st international conference on basic and clinical immunogenomics. *Klinická onkologie*; 18: 119-125 .



Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawna, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., a další. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*; 410: 1099-1103 .

Haynes- Gilmore, N., Banach, M., Edholm, E. S., Lord, E., Robert, J., Ferlazzo, G., a další. (2014). a critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*; 35: 1807 – 1813 .

Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Miller, M. A., Von Kap-Herr, C., Pettenati, M. J., a další. (2006). Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/ complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 103(20): 7753-7758 .

Hirsch, T., Marchetti, P., . Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., a další. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*; 15(13): 1573-1581 .

Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*; 2: 563- 572 .

Chan, T., Wiltrout, R. H., & Weiss, J. M. (2011). Immunotherapeutic modulation of the suppressive liver and tumor microenvironments. *International Immunopharmacology*; 11:879 – 889 .

Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M., & Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand:phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 99: 13043-13048 .

Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T., Fujimoto, S., Sakurai, Y., Maruo, K., a další. (1986). Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research*; 77: 190-196 .

Iwasak, A., & R, M. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*; 5: 987-995 .

- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., a další. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PloS One*; 9(1): e85222 .
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*; 61: 69-90 .
- Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., & Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(etyleneglykol) derivatives. *Biotechnology Progress*; 20: 897 – 904 .
- Kato, K., Umezawa, K., Funerilu, D. P., Miyake, M., & Nagamune, T. (2003). Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether modified surface. . *Biotechniques*; 35(5):1014-1018 .
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*; 26(4): 239-257 .
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*; 121: 1 – 14 .
- Koido, Shigeo, Gong, & Jianlin. (2013). Characterization of Structure and Direct Antigen Presentation by Dendritic/Tumor-fused Cells as Cancer Vaccines. *Anticancer Research*; 33(2): 347-354 .
- Kovářová, M. (2015). Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce*; 80 s.
- Kovářová, M. (2013). Studium možnosti použití kotveného Zymosanu a pro imunoterapii melanomu. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce*; 52 s.
- Kumžáková, Z. (2015). Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce*; 86 s.

- Lamm, D. L., DeHaven, J. I., R, R. D., Delgra, C., & Burrell, R. (1993). Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of murine bladder cancer. . *Urological Research*; 21: 33-37 .
- Lanier, L. L., Civin, C. I., & Loken, M. R. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology*; 136(12): 4480-4486 .
- Le, Y., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*; 23(11):541-548 .
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*; 180(15): 3735-3740 .
- Maierová, V. (2012). Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce; 71 s.*
- Mariani, C. L., Rajon, D., Bova, F. J., & Streit, W. J. (2007). 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*; 85: 231-240 .
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., & Luster, A. D. (2003). The Toll-Like Receptor 5 Stimulus Bacterial Flagellin Induces Maturation and Chemokine Production in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*; 170: 5165–5175 .
- Melino, G., & Vaux, D. (2010). Cell Death. 1 edition Wiley; 316: ISBN: 978-0-470- .
- Morel, P. A., & Oriss, T. B. (1998). Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Critical Reviews in Immunology*; 18(4): 275-303 .
- Moresco, E. M., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*; 21(13):R488-R493 .
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*; 70: 791-798 .

NOF. (2015). NOF CORPORATION. Biocompatible PEG anchors for cell membrane <BAM>. *NOF Corporation. 2015. Dostupné z: [http://www.peg-drug.com/peg\\_product/biocompatible.html](http://www.peg-drug.com/peg_product/biocompatible.html)* .

O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K., & Shanahan, F. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 6: 457-463 .

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

Opitz, B., Püschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., a další. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*; 279: 36426-36432 .

Owerwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001). B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology*; 39: 1-29 .

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., a další. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America.*; 97(25): 13766-13771 .

Pasare, C., & Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell mediated suppression by dendritic cells. . *Science*; 229: 1033-1036 .

Peter, M. E., Budd, R., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A. O., Newell, M. K., a další. (2007). The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell*; 129: 447- 450 .

Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., a další. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 82: 5140-5144 .

- Rhee, S. H., Im, E., & Pothoulakis, C. (2008). Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology*; 135(2): 518-528 .
- Rhee, S. H., Im, E., & Pothoulakis, C. (2008). Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology*; 135(2): 518-528 .
- Robertson, M. J., & Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural-killer-cells. *Blood*; 76(12): 2421-2438 .
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., & Takabayashi, A. (2003). CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. . *Cancer*; 98: 1089-1099 .
- Sauter, C., & Wolfensberger, C. (1980). Interferon in human serum after injection of endotoxin. *The Lancet*; 2: 852–853 .
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*; 51 (1): 1- 28 .
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*; 63: 11-30 .
- Smoller, B. R. (2006). Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology*; 19: 34-40 .
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001). a fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*; 2: 293-299 .
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., a další. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. . *The Journal of Experimental Medicine*; 191(4): 661-668 .
- Stahl, P. D., & Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defence. . *Current Opinion in Immunology*; 10(1):50-55 .
- Steiner, T. S. (2007). How Flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection. . *Infection and Immunity*; 75: 545-552 .

- Tadokoro, T., Yamaguchi, Y., Batzer, J., Coelho, S. G., Zmudzka, B. Z., Miller, S. A., a další. (2005). Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *Journal of Investigative Dermatology*; 124: 1326-1332 .
- Takahashi, K., & Ezekowitz, R. A. (2005). The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *Clinical Infectious Diseases*; 41: 440 – 444 .
- Takahashi, K., Donovan, M. J., Rogers, R. A., & Ezenkowiz, R. A. (1998). Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell and Tissue Research*; 292 (2): 311-323 .
- Takahashi, M., & Kobayashi, Y. (2003). Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cellular Immunology*; 226(2): 105-115 .
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*; 140: 805-820 .
- Thermo. (2014). Thermo Scientific. SMCC: An amine-to- sulfhydryl crosslinker with a medium-length cyclohexane-stabilized spacer arm (8.3 angstroms). *Thermo Fisher Scientific Inc.* ; Dostupné z: <http://www.piercenet.com/product/smcc>.
- Thermo. (2014). THERMO SCIENTIFIC. TCEP-HCl: a thiol-free, odorless yet potent reducing agent for cleaving disulfide bonds. *Thermo Fisher Scientific Inc. 2014.* Dostupné z: <http://www.piercenet.com/product/tcep-hcl>.
- Thomas, D. (2014). HistoQuarterly: SUPERFICIAL SPREADING MALIGNANT MELANOMA. *Micro to tele, and anything in between.* Dostupné z: <http://micro2tele.com/2014/01/23/histoquarterly-superficial-spreading-malignant-melanoma/> .
- TOMAI, M. A., GIBSON, S. J., IMBERTSON, L. M., MILLER, R. L., MYHRE, P. E., REITER, M. J., a další. (1995). Immunomodulation and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Research*; 28 :253–64 .
- Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., a další. (2005). a novel glyco- conjugate vaccine against fungal pathogens. . *The Journal of Experimental Medicine*; 202: 597-606 .

- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., J, Q. V., Maillet, I., Akira, S., a další. (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and Immunology*; 72(4): 2131-2139 .
- Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*; 25(1): 82-88 .
- Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*; 6: 1368-1373 .
- Vetvicka, V., Thornton, B. P., & Ross, G. D. (1996). 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*; 98: 50 – 61 .
- Větvička, V., Dvořák, B., Větvičková, J., Richter, J., Křížan, J., Šíma, P., a další. (2007). Orally administered marine (1→3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*; 40: 291–298 .
- Wallecha, A., Maciag, P. C., Rivera, S., Paterson, Y., & Shahabi, V. (2009). Construction and characterization of an attenuated *Listeria monocytogenes* strain for clinical use in cancer immunotherapy. *Clinical and Vaccine Immunology*; 16(1):96-103 .
- Wang, R. F. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in Immunology*; 22(5): 269-276 .
- Wei, J., Zaika, E., & Zaika, A. (2012). p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer; Article ID 687359: 19. *Journal of Nucleic Acids* .
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; DOI: 10.1186/1756-9966-30-87 .
- Yeeprae, W., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2006). Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages. *Journal of Controlled Release*; 114(2): 193-201 .
- Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*; 40(5): 481-495 .

Zhou, Y. G., Li, J., Wang, Y., Ye, L., Dai, M., Zhou, L., a další. (2013). TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. . *Journal of Innate Immunity*; 19(2):184-192 .



## 8 Příloha

### 8.1 Příloha 1: Znárodnění vlivu léčby na mikroprostředí melanomu. Histologická tkáň neléčeného melanomu (kontrolní skupina-PBS) ve srovnání s léčeným melanomem pomocí *Listeria monocytogenes*- SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C.

Použité zkratky:

**E**- rozvolněné edematózní vazivo

**N**- nekróza

**Ery**- erytrocyty

**Nf**- nekrotická tkáň s fibrinem

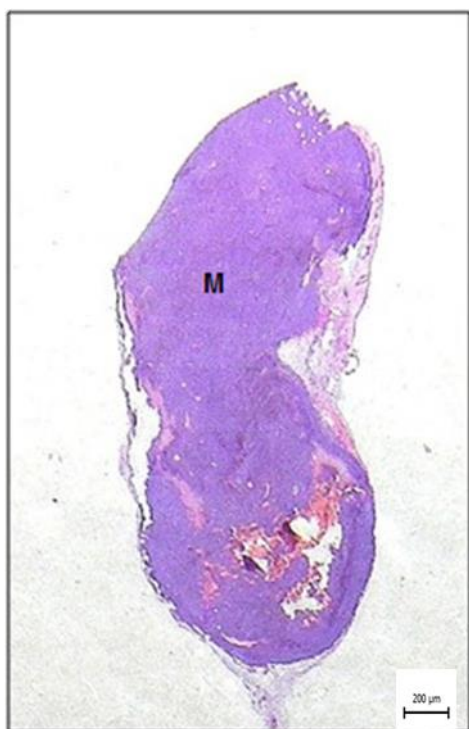
**Gr** – granulační lem (infiltrát)

**P**– poprašky rozlámaných jader granulocytů

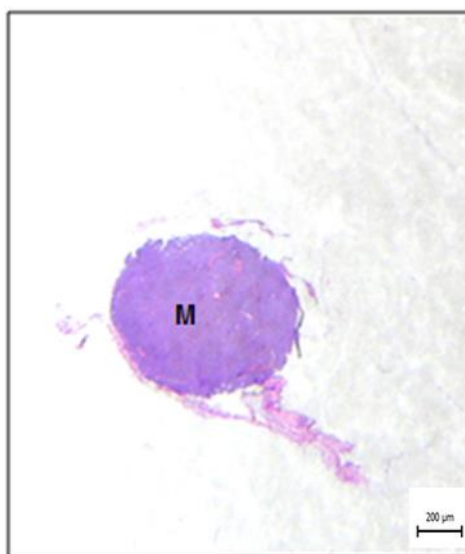
**H**- hemoragie (krvácení)

**Pap**- papilární vrstva

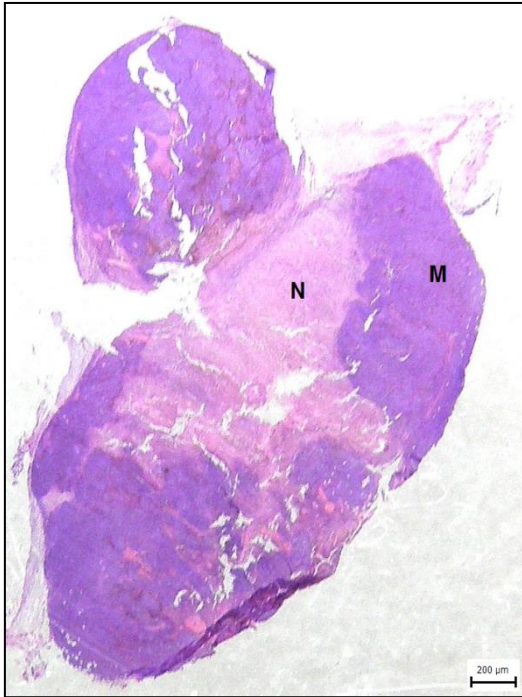
**M**-melanomové buňky



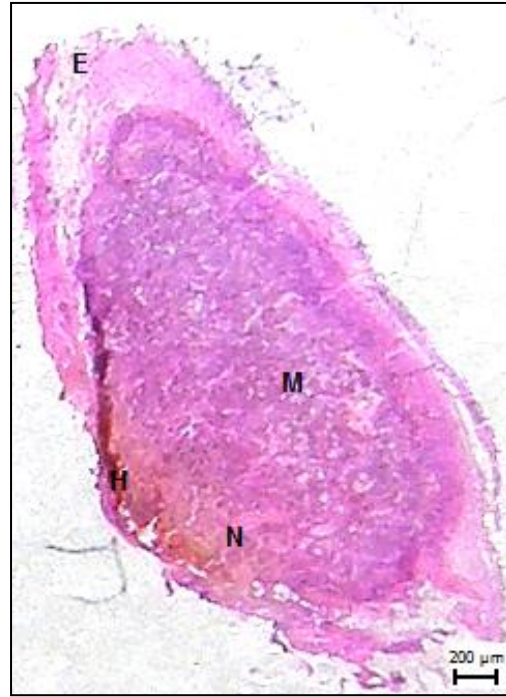
**Obr. 26:** Zahájení terapie- nultý den. Kontrolní skupina.



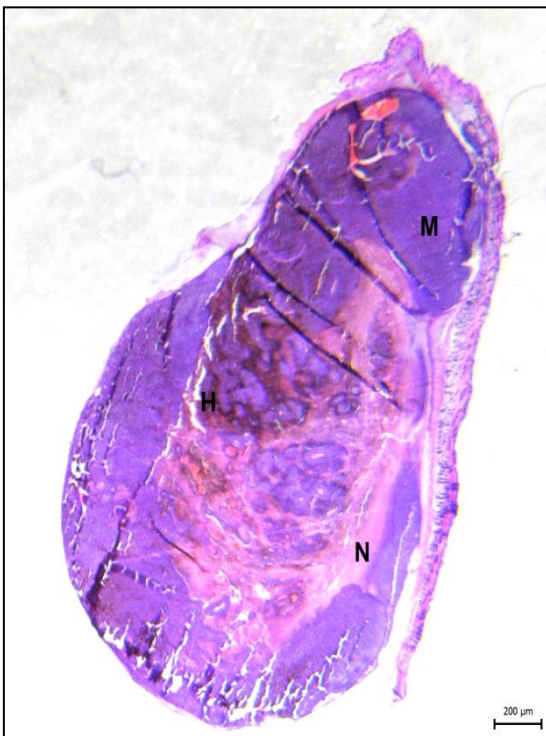
**Obr. 27:** Zahájení terapie- nultý den. Kontrolní skupina.



**Obr. 28:** Třetí den terapie- PBS.



**Obr. 29:** Třetí den terapie- léčený melanom.



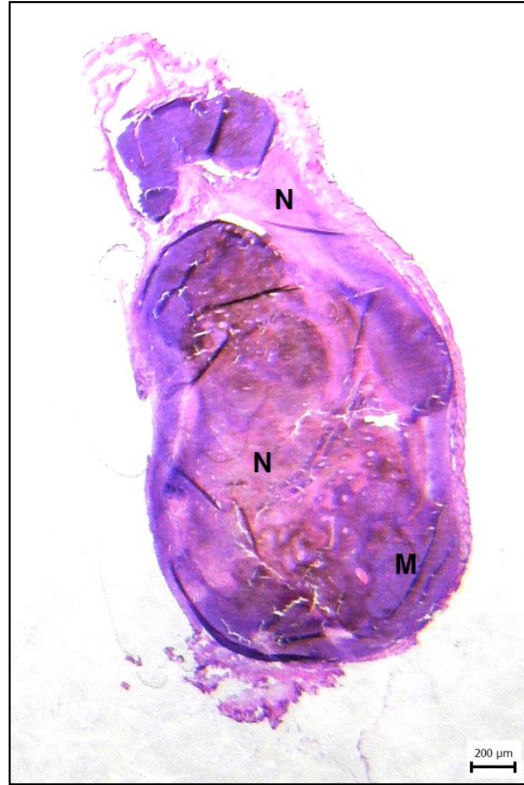
**Obr. 30:** Sedmý den terapie- PBS.



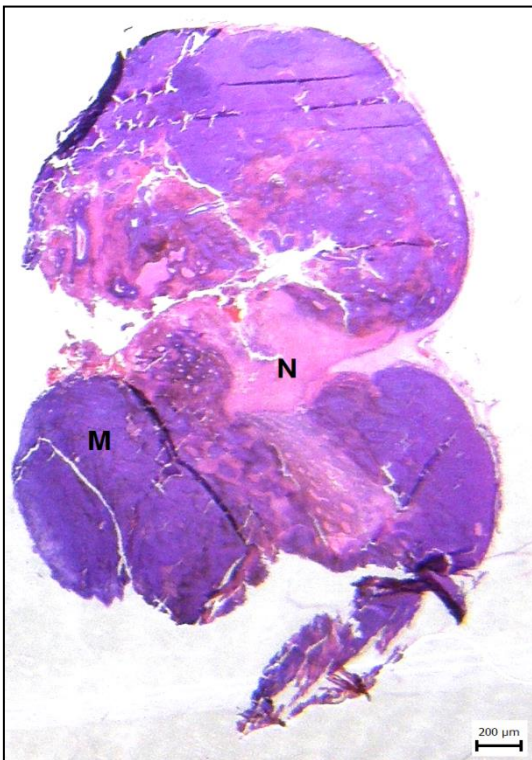
**Obr. 31:** Sedmý den terapie- léčený melanom.



**Obr. 32:** Jedenáctý den terapie- PBS.



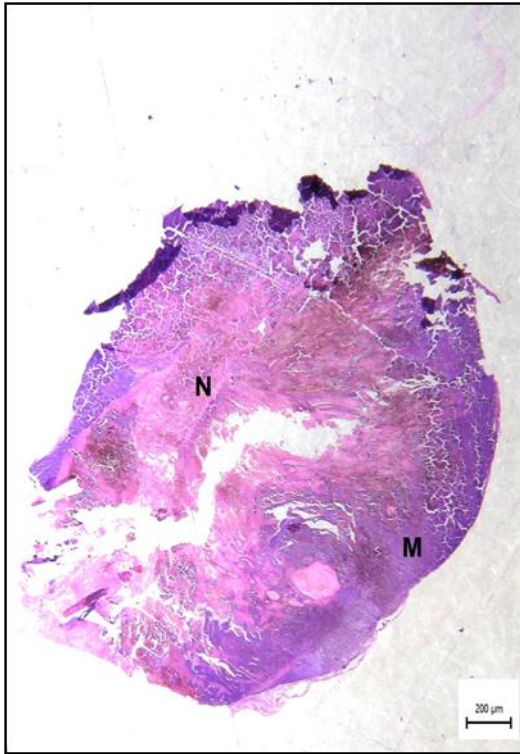
**Obr. 33:** Jedenáctý den terapie- léčený melanom.



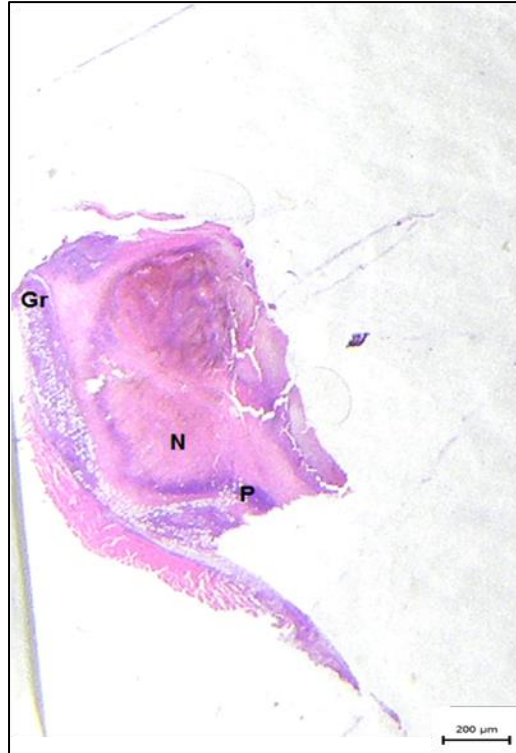
**Obr. 34:** Patnáctý den terapie- PBS.



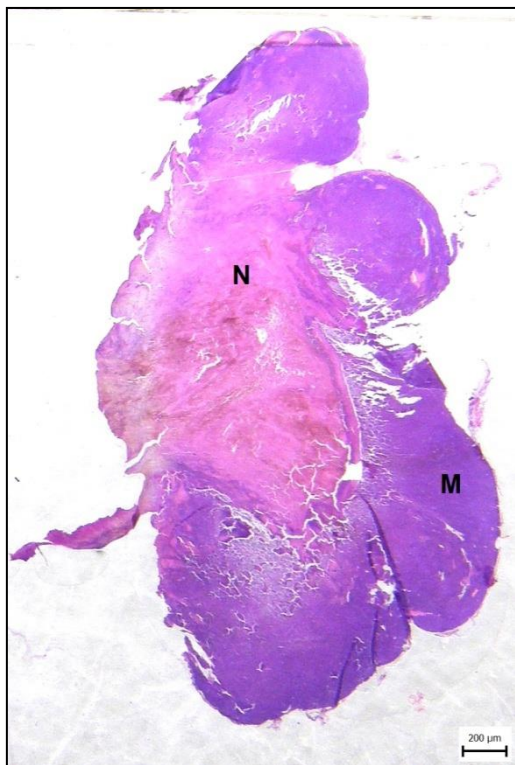
**Obr. 35:** Patnáctý den terapie- léčený melanom.



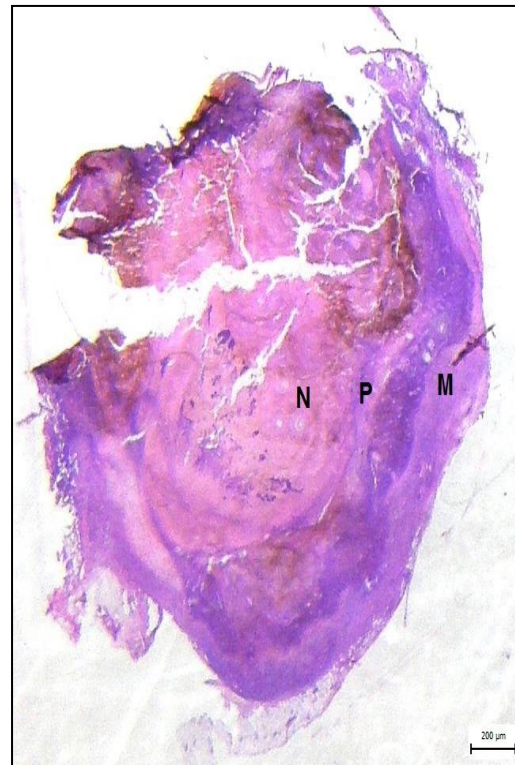
**Obr. 36:** Devatenáctý den terapie- PBS.



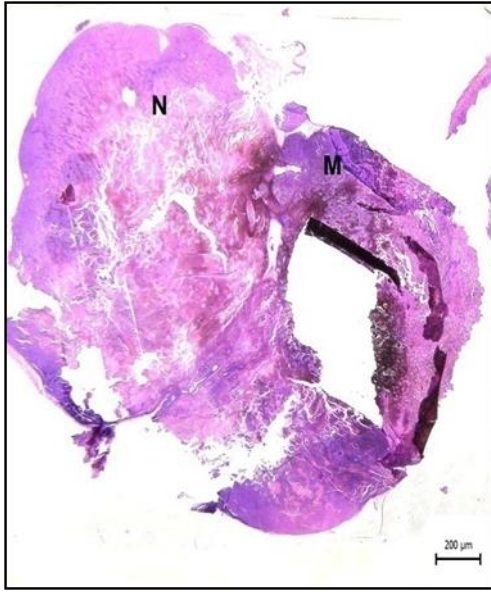
**Obr. 37:** Devatenáctý den terapie- léčený melanom.



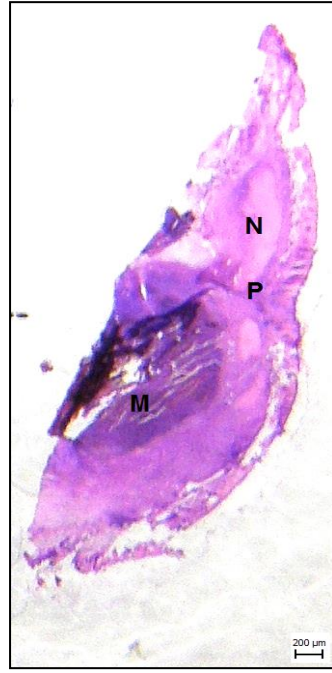
**Obr. 38:** Dvacátý třetí den terapie – PBS.



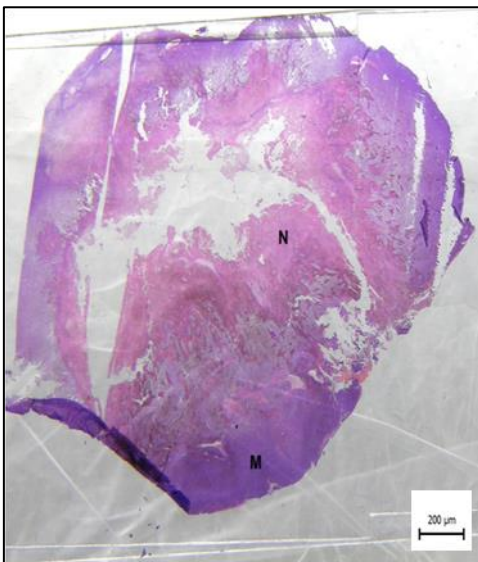
**Obr. 39:** Dvacátý třetí den terapie- léčený melanom.



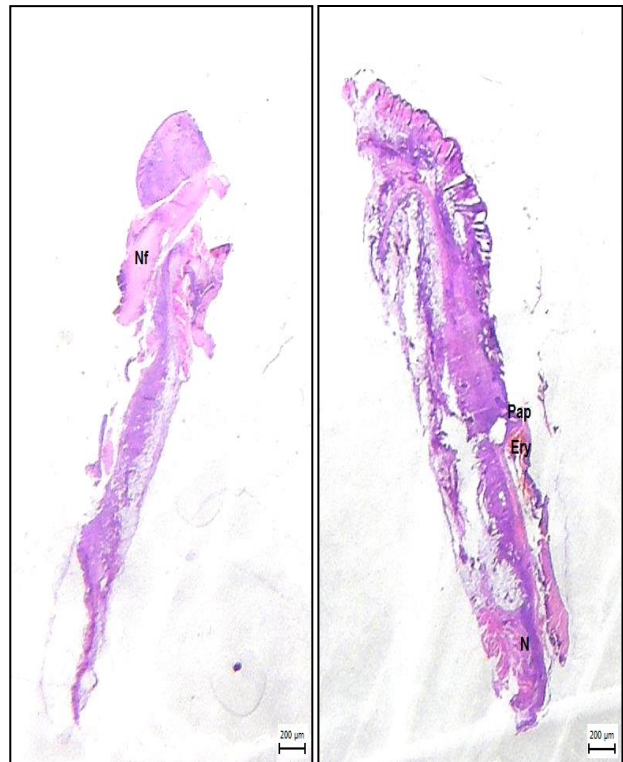
**Obr. 40:** Dvacátý sedmý den terapie- PBS.



**Obr. 41:** Dvacátý sedmý den terapie- léčený melanom.



**Obr. 42:** Poslední (31) den terapie-PBS.



**Obr. 43:** Poslední (31) den terapie- léčený melanom- epidermis.

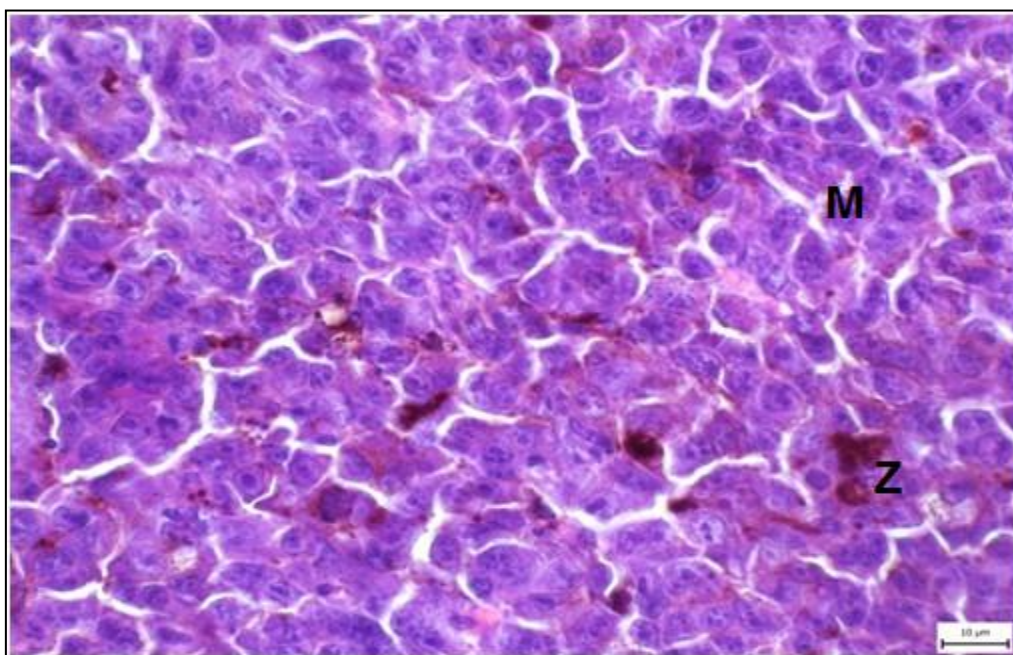
## 8.2 Příloha 2: Typické histologické nálezy u tumorózní tkáně.

Použité zkratky:

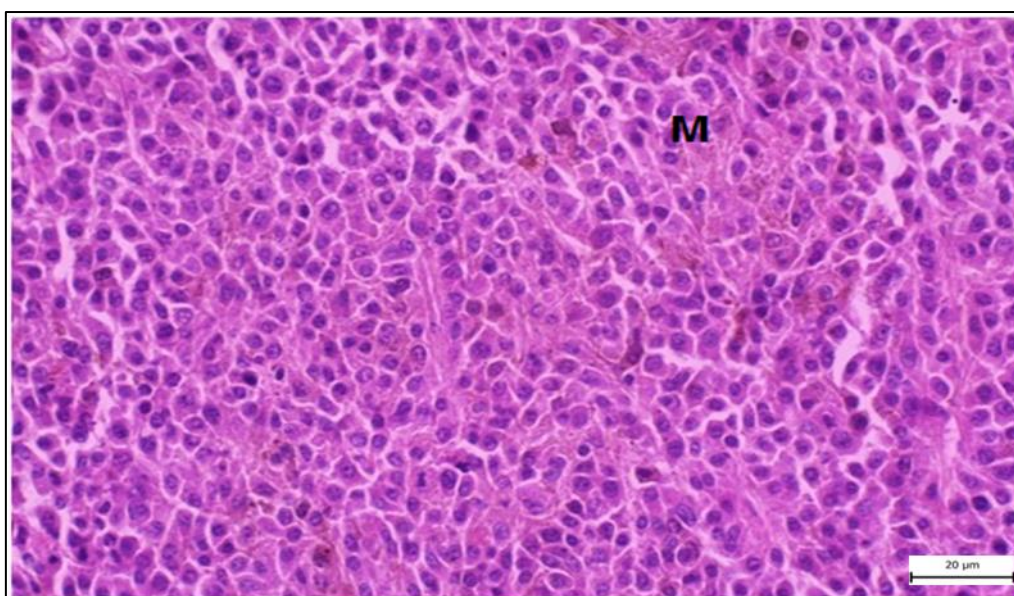
**M**- melanomové buňky (melanocyty)

**Z**- zrna melaninu

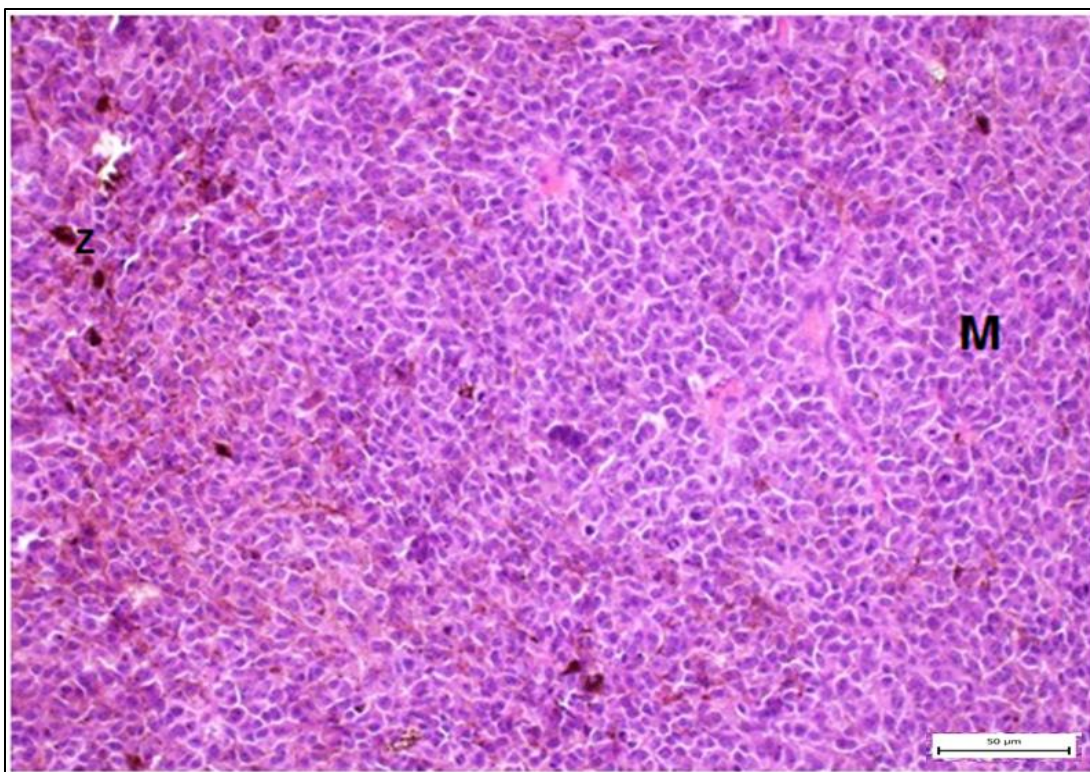
**I**- invaze melanomových buněk do okolí



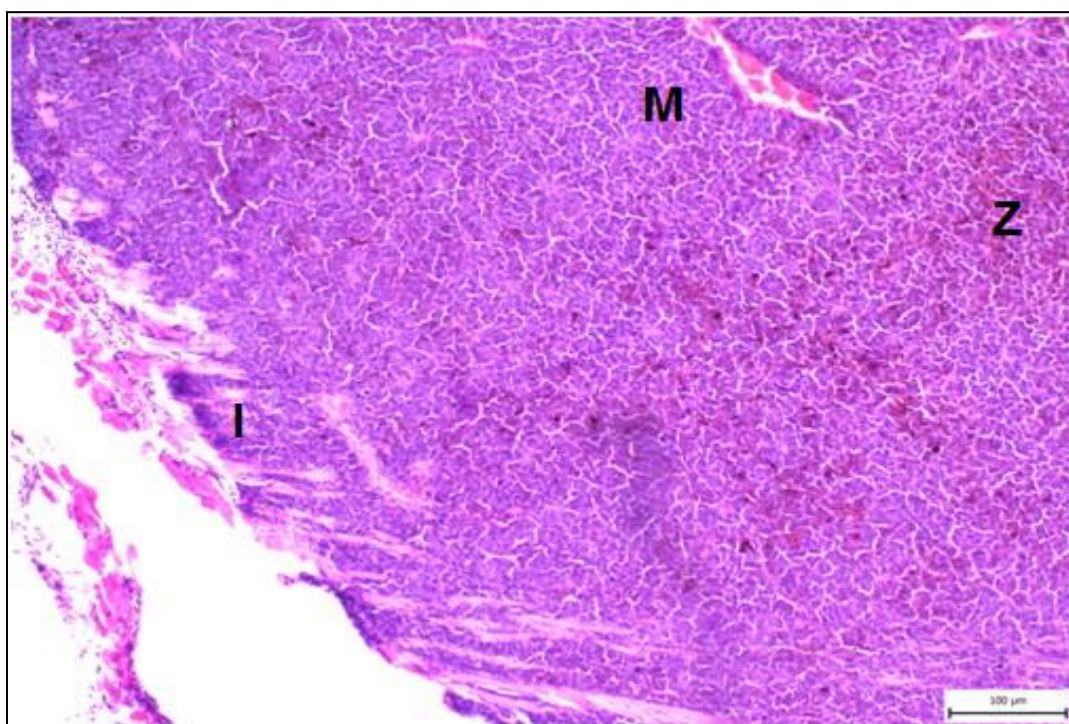
**Obr. 44:** Počáteční den terapie (den 0). Kontrolní skupina. Zvětšení objektivu 60x.



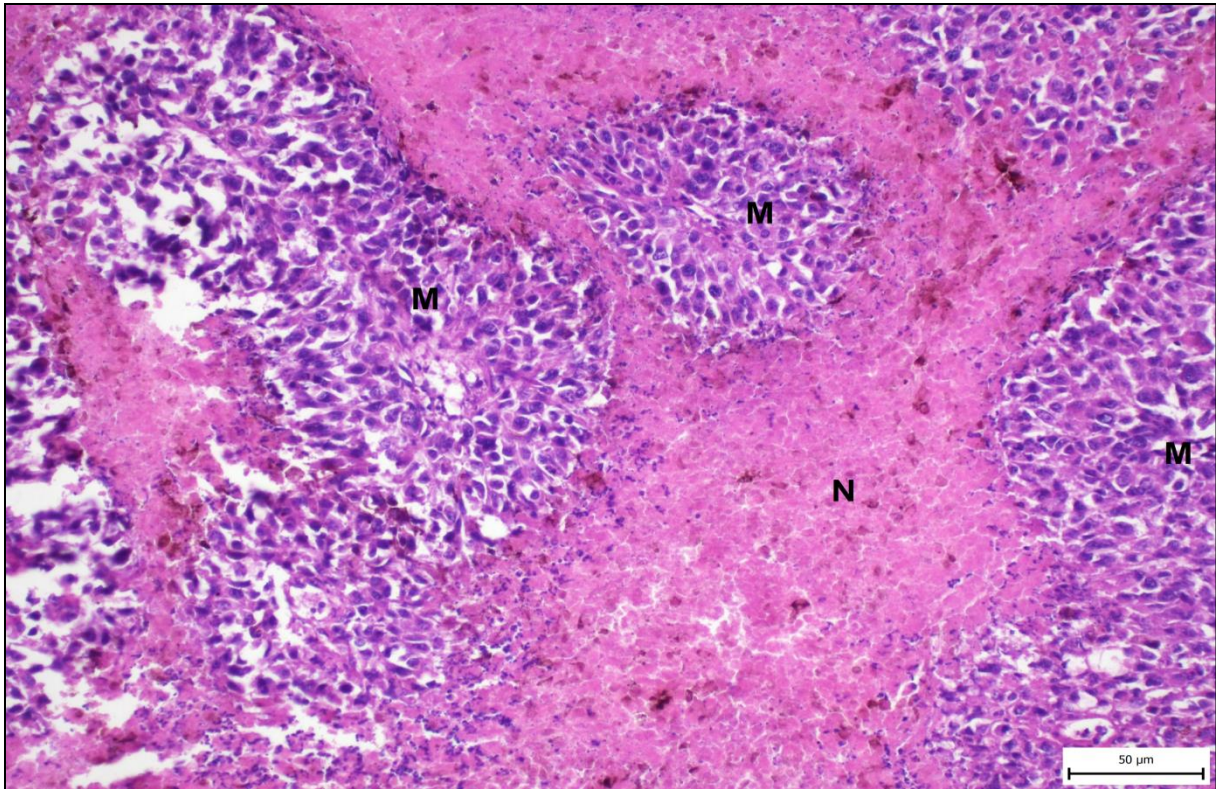
**Obr. 45:** Počáteční den terapie (den 0). Kontrolní skupina. Zvětšení objektivu 40x.



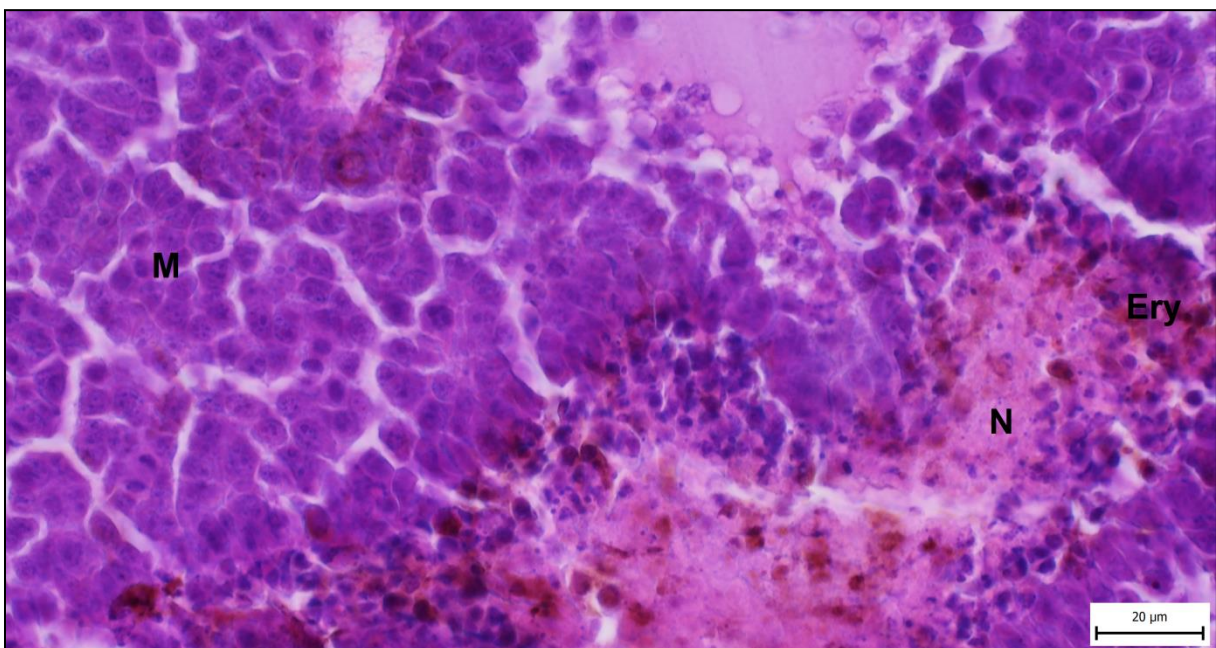
**Obr. 46:** Počáteční den terapie (den 0). Kontrolní skupina. Zvětšení objektivu 20x.



**Obr. 47:** Počáteční den terapie (den 0). Kontrolní skupina. Zvětšení objektivu 10x. Písmeno I poukazuje na prostupující nádorové buňky do další vrstvy kůže- tzv. invaze do okolí.



**Obr. 48:** Neléčený melanom dvacátý sedmý den po aplikaci PBS. Zvětšení objektivu 20x.



**Obr. 49:** Neléčený melanom dvacátý sedmý den po aplikaci PBS. Zvětšení objektivu 40x.  
Krvácení do nekrózy.



### 8.3 Příloha 3: Typické histologické nálezy při aplikaci *Listeria monocytogenes*-SMCC v kombinaci s mananem- SMCC, R- 848 a POLY I: C.

Použité zkratky:

**A-** apoptóza

**Nf-** nekrotická tkáň s fibrinem

**Ery-** erytrocyty

**P-** plazmocyty

**Gr-** granulocyty

**Pap-** papilární vrstva

**L-** lymfocyt

**Pod-** podkoží

**M-** melanomové buňky

**S-** sval

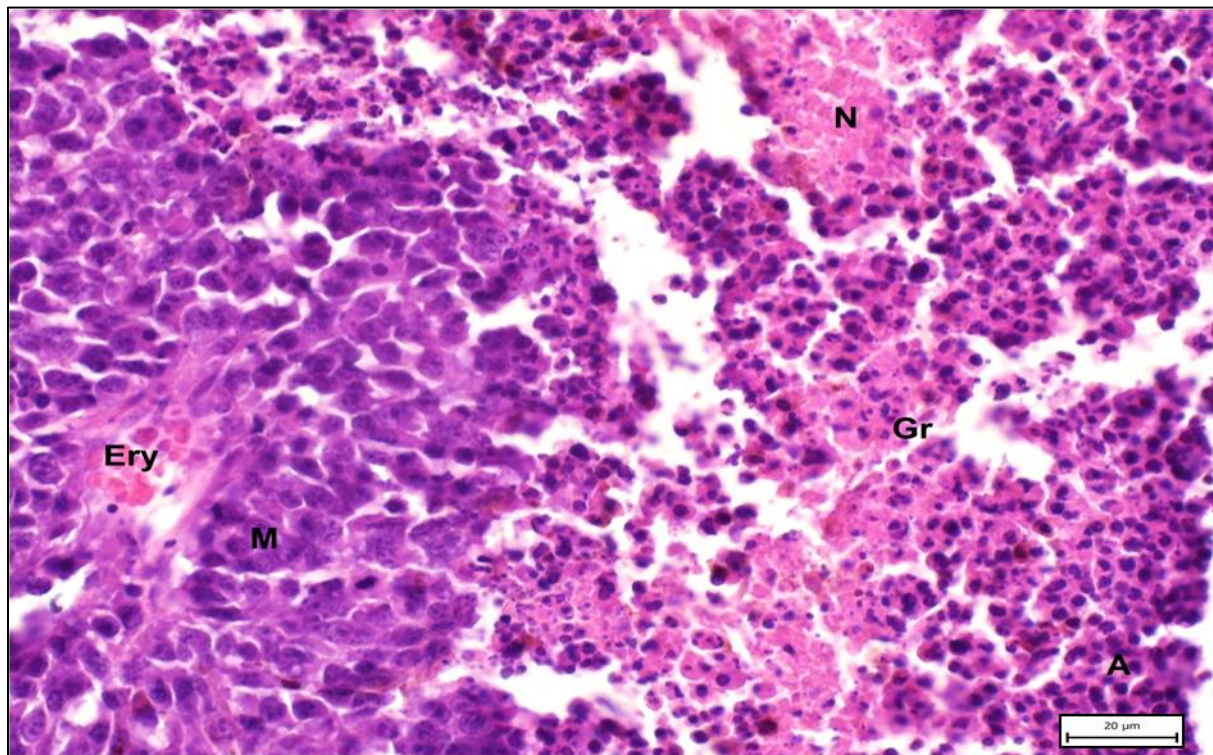
**Mak-** makrofág

**T-** tuková buňka

**N-** nekróza **V-** vazivo

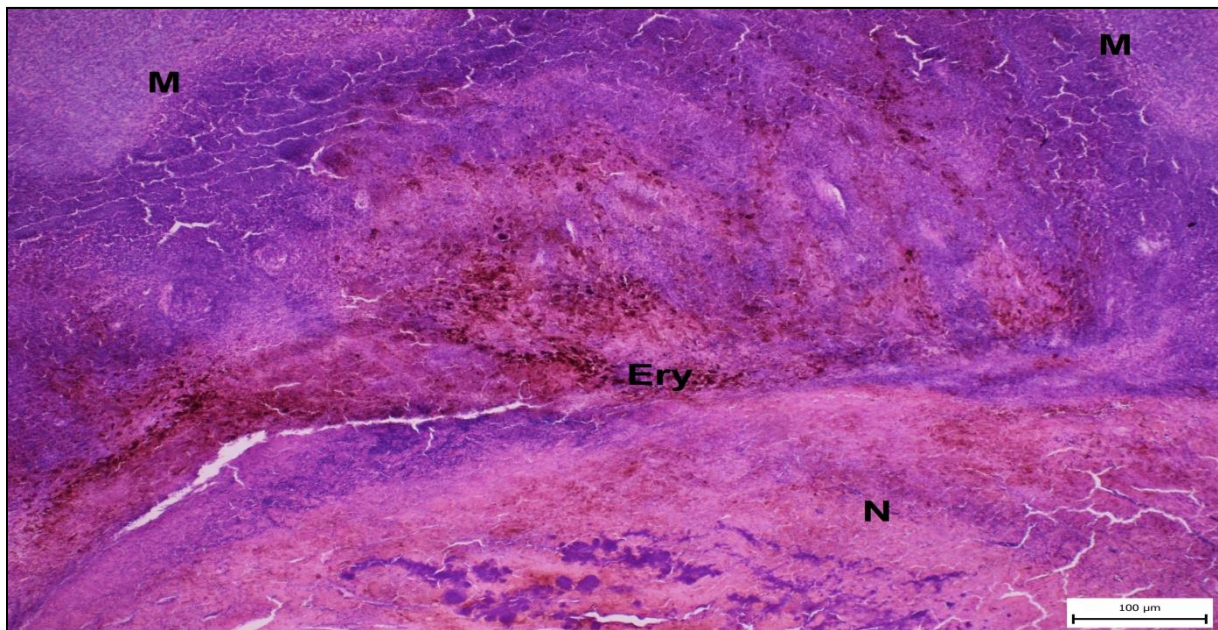
**Z-** zrna melanin

**Třetí den terapie**

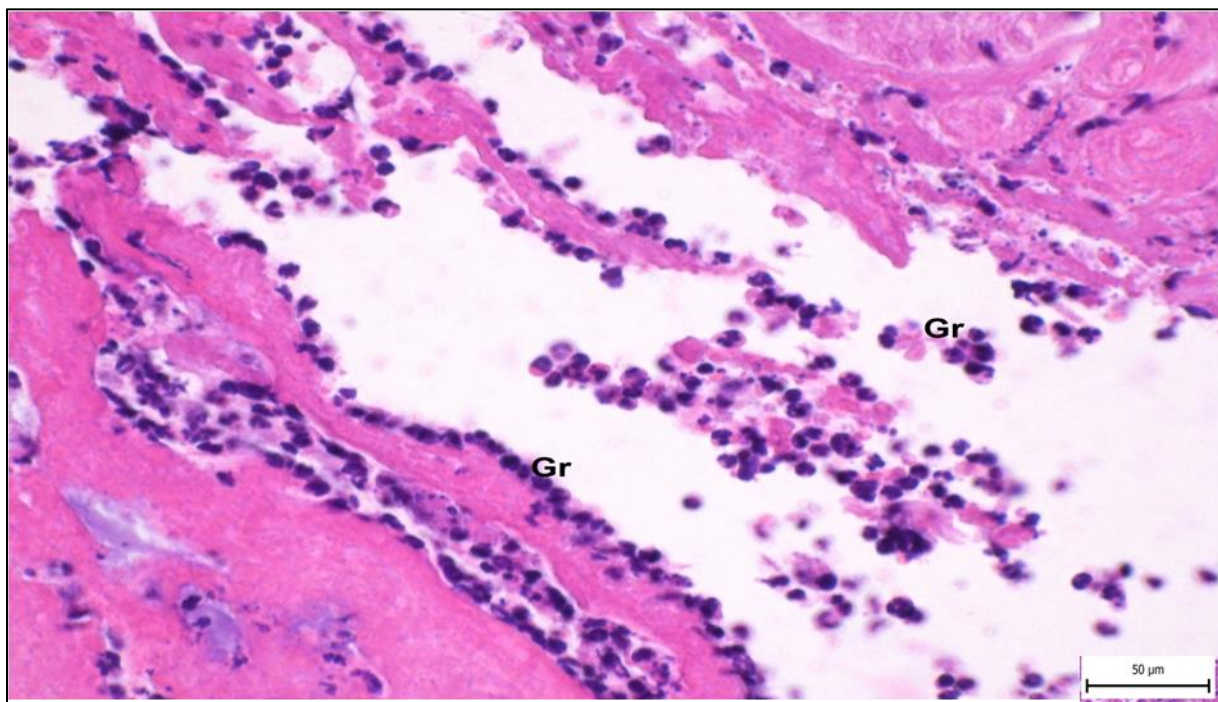


**Obr. 50:** Léčený melanom třetí den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x.

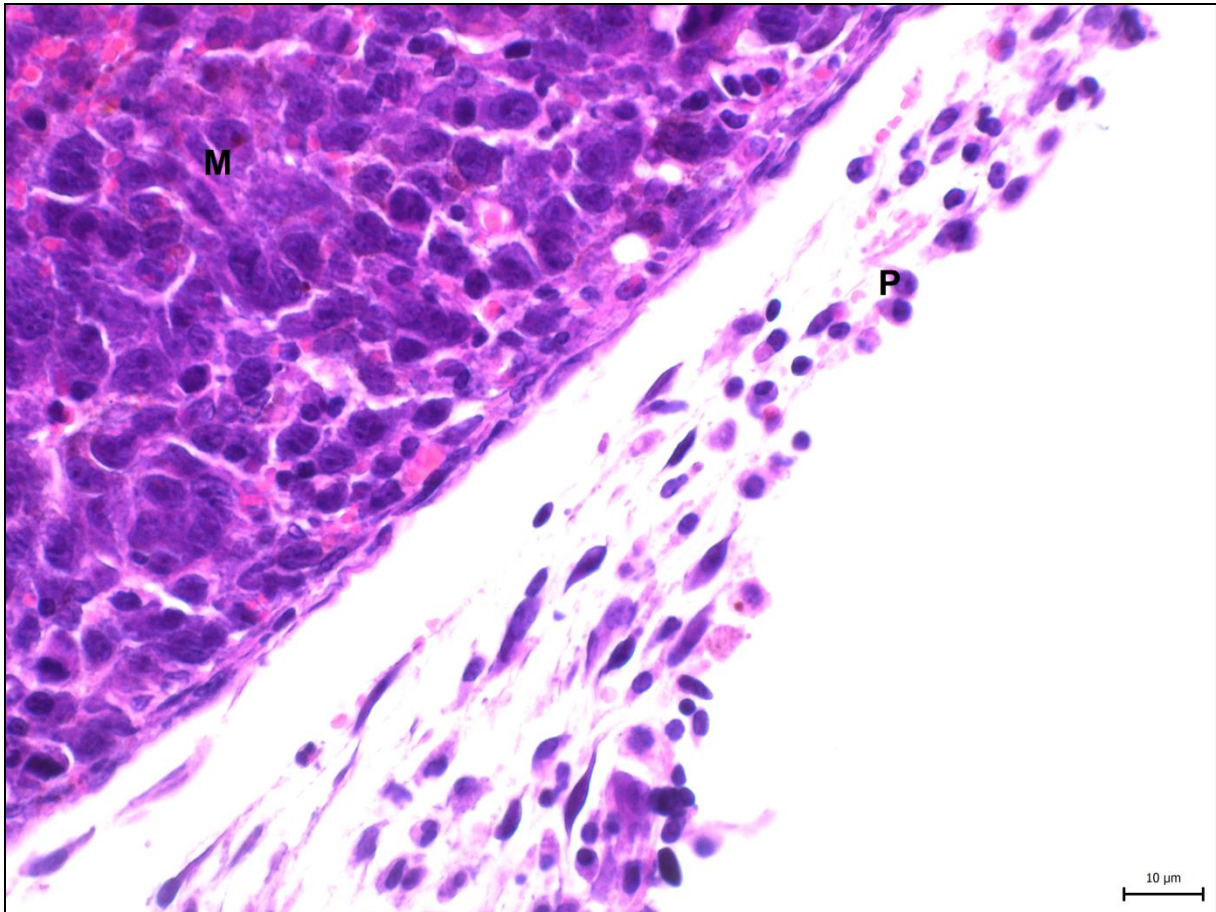
**Sedmý den terapie.**



**Obr. 51:** Léčený melanom sedmý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 10x. Nekróza+ granulocytární poprašek.

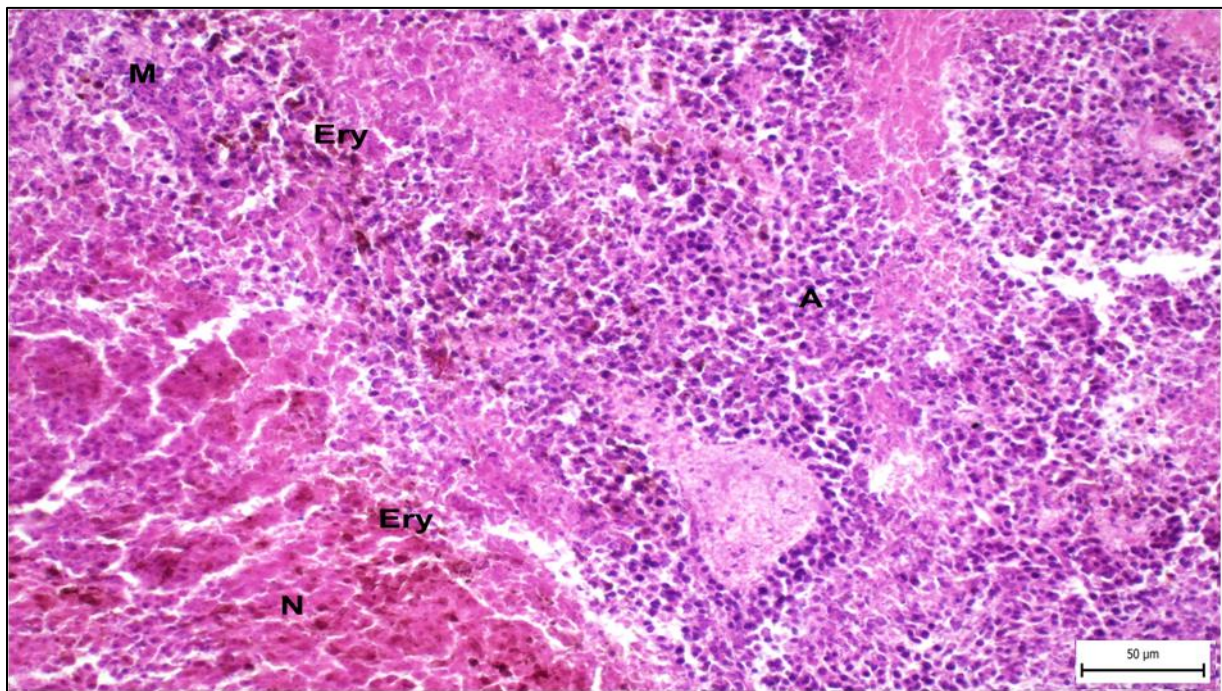


**Obr. 52:** Léčený melanom sedmý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 20x. Granulocyty.

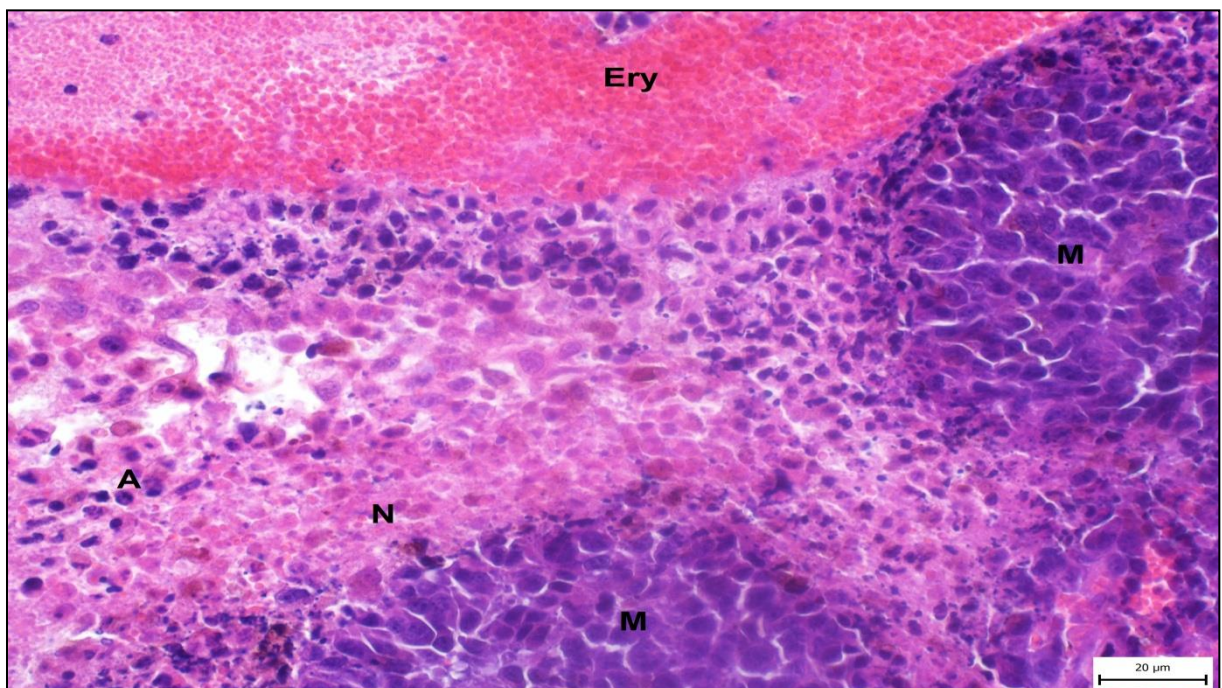


**Obr. 53:** Léčený melanom sedmý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 60x. Plazmocyty ve tkáňové reakci.

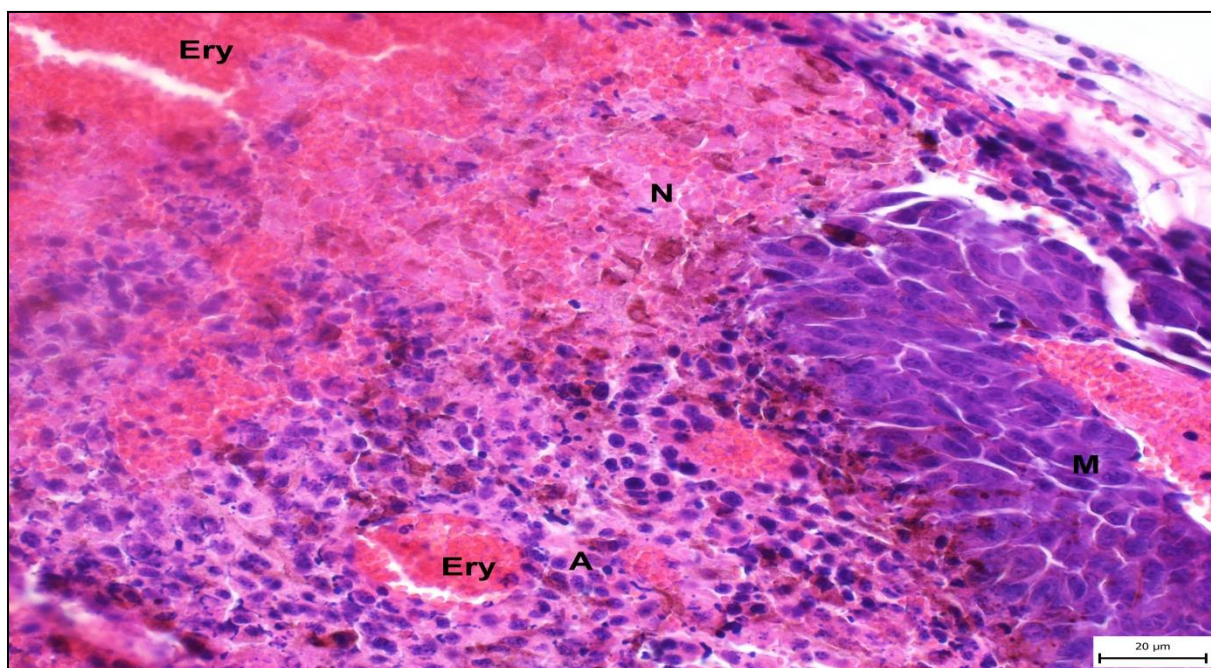
**Jedenáctý den terapie.**



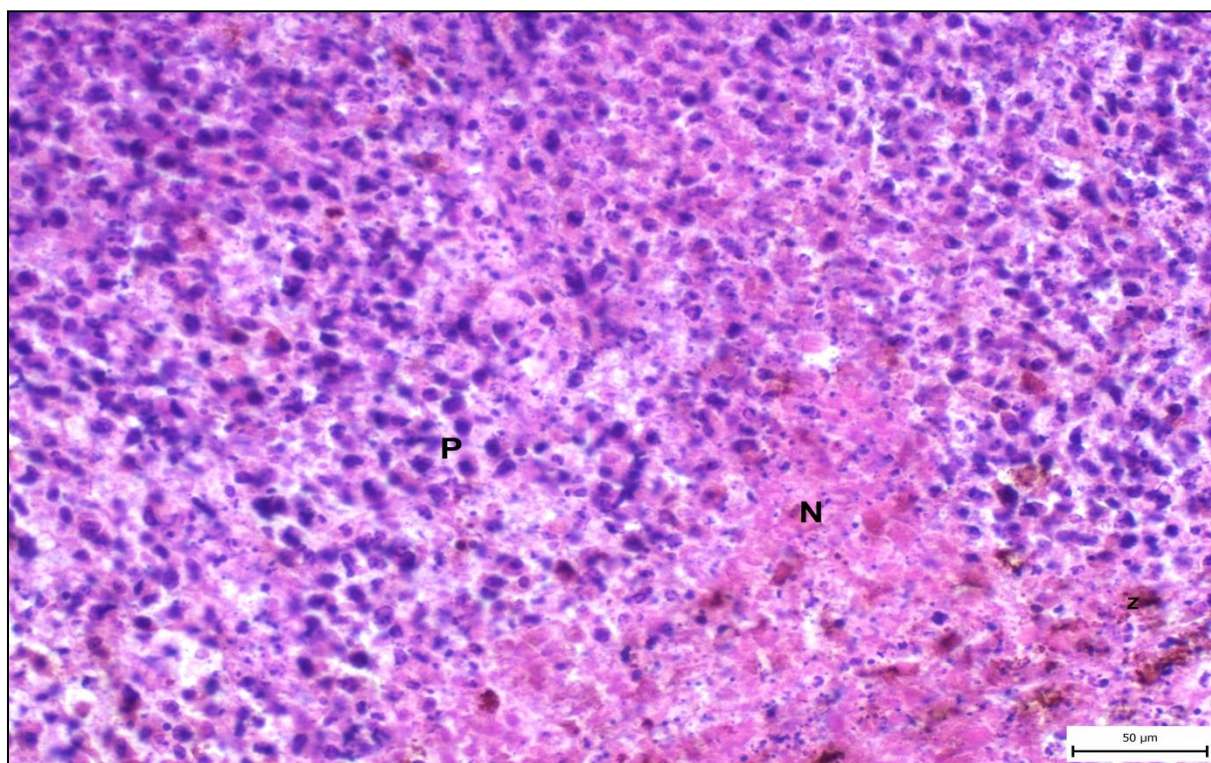
**Obr. 54:** Léčený melanom jedenáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 20x.



**Obr. 55:** Léčený melanom jedenáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x.

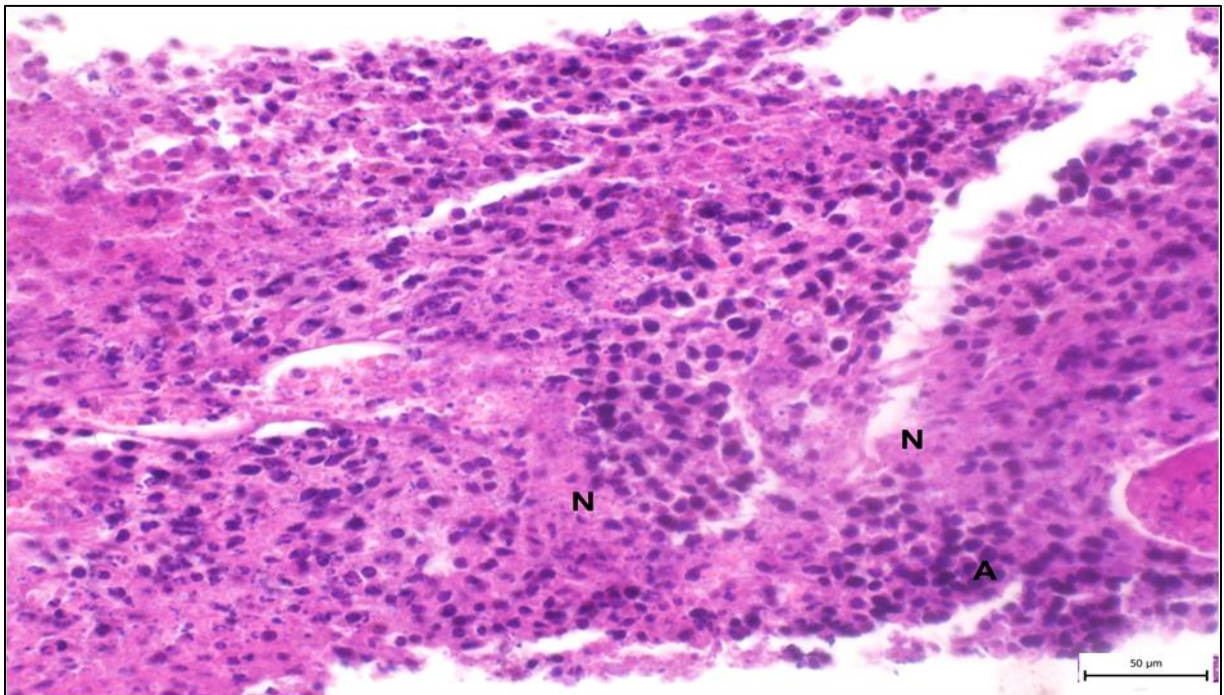


**Obr. 56:** Léčený melanom jedenáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x.

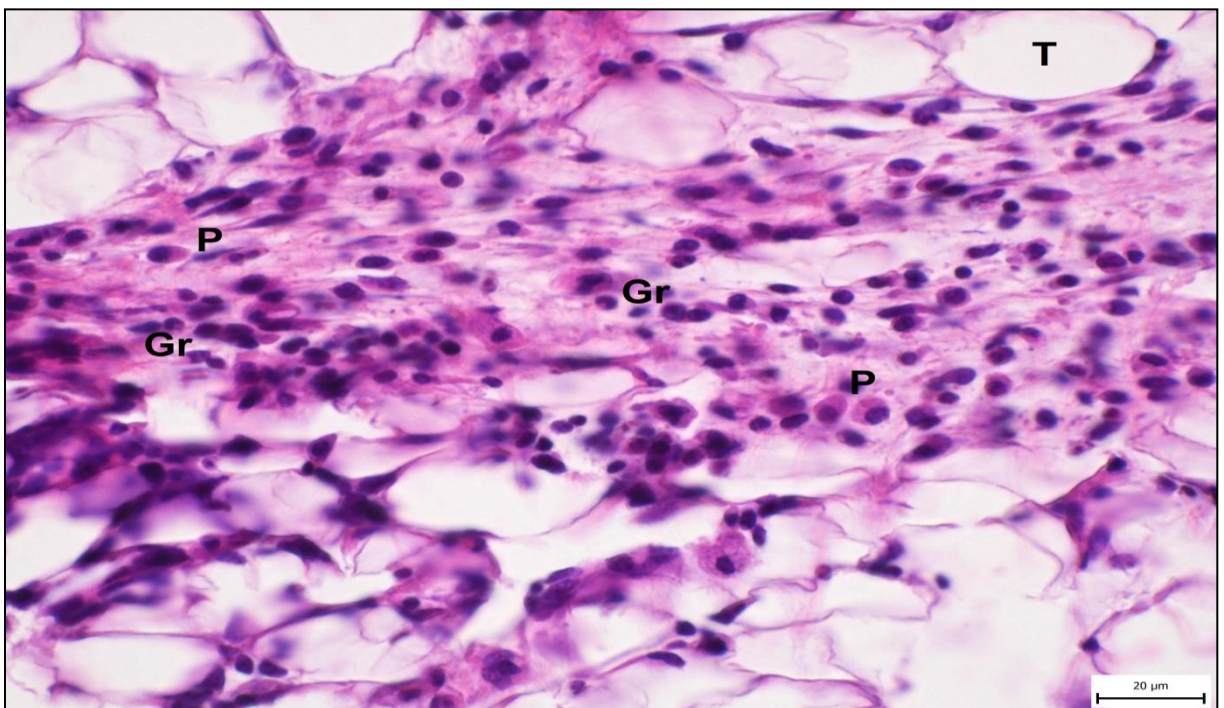


**Obr. 57:** Léčený melanom jedenáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 20x.

**Patnáctý den terapie.**

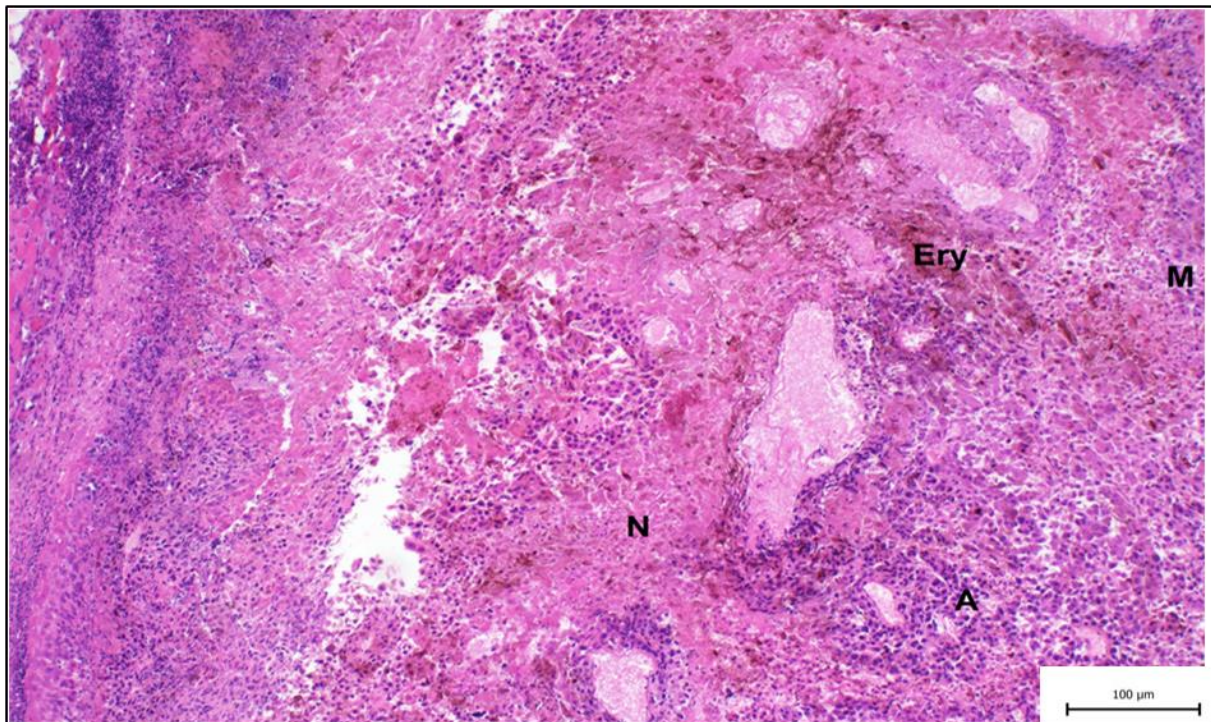


**Obr. 58:** Léčený melanom patnáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 20x.

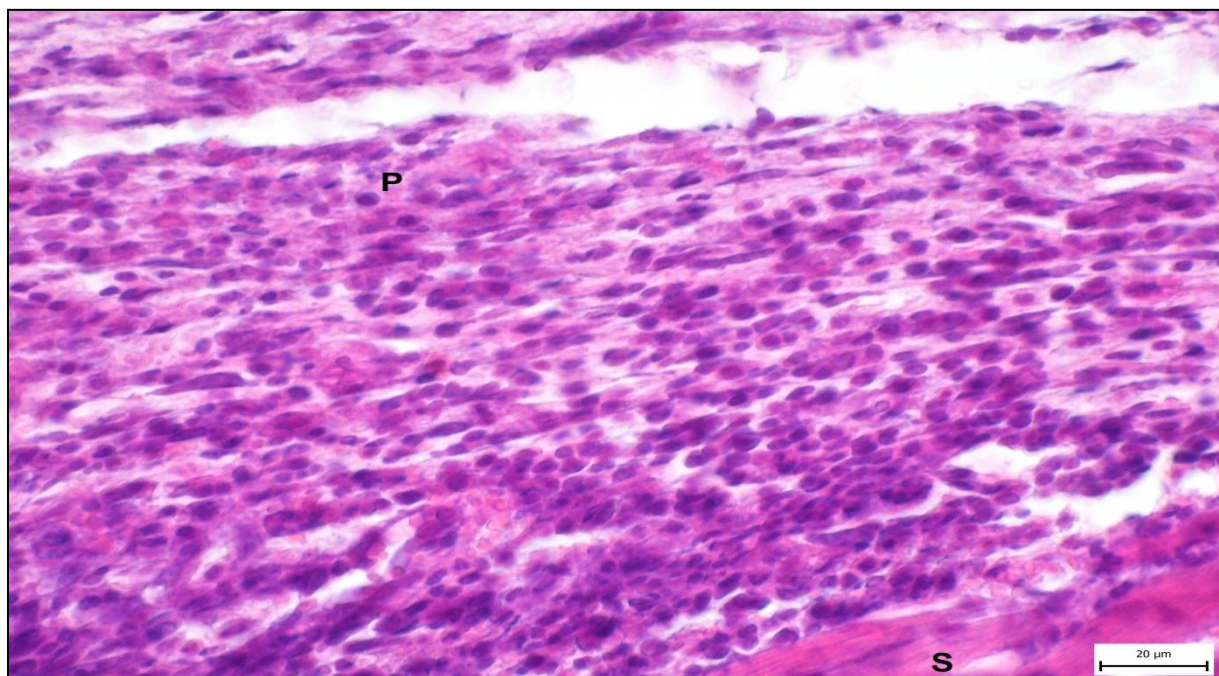


**Obr. 59:** Léčený melanom patnáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x. Smíšený infiltrát- granulocyty, plazmocyty.

**Devatenáctý den terapie.**

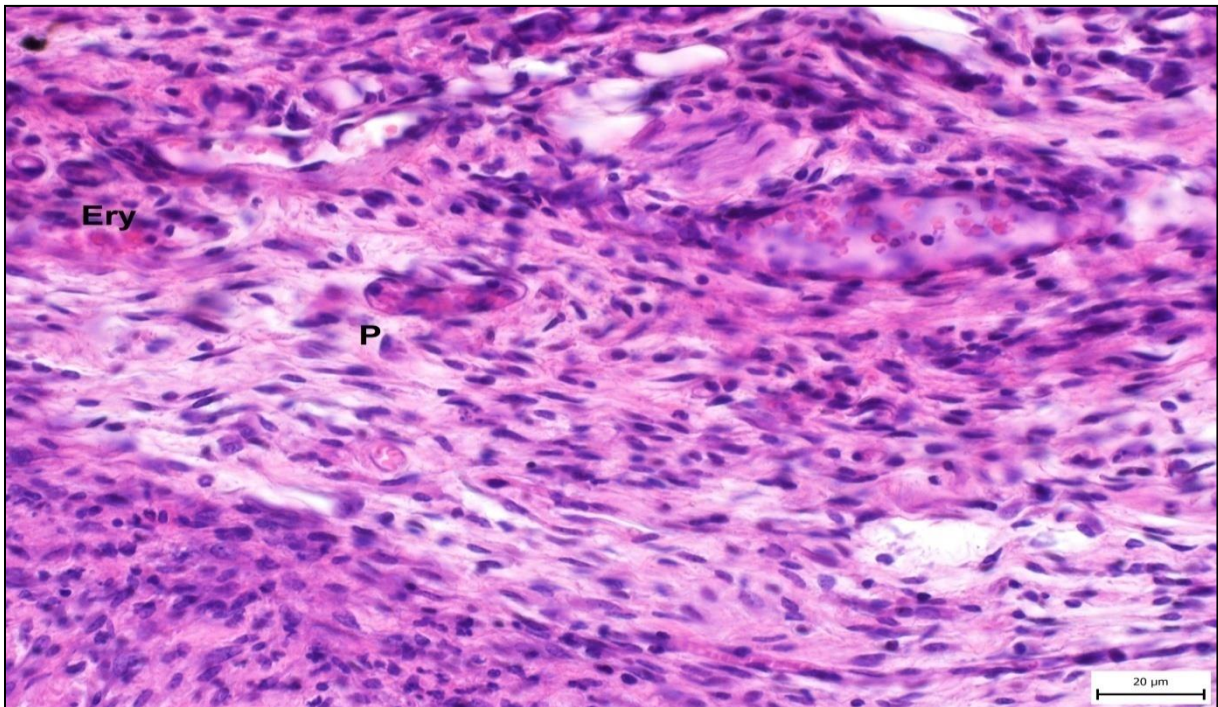


**Obr. 60:** Léčený melanom devatenáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 10x.

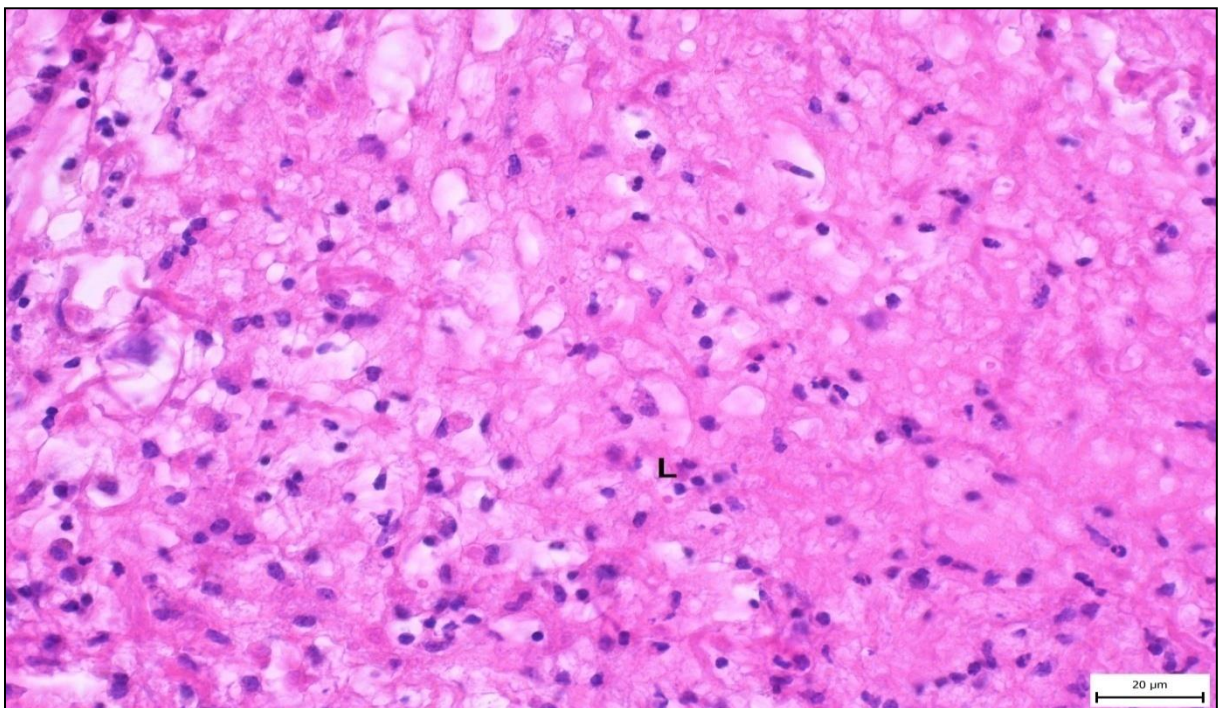


**Obr. 61:** Léčený melanom devatenáctý den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x. Plazmocyty.

**Dvacátý třetí den terapie.**

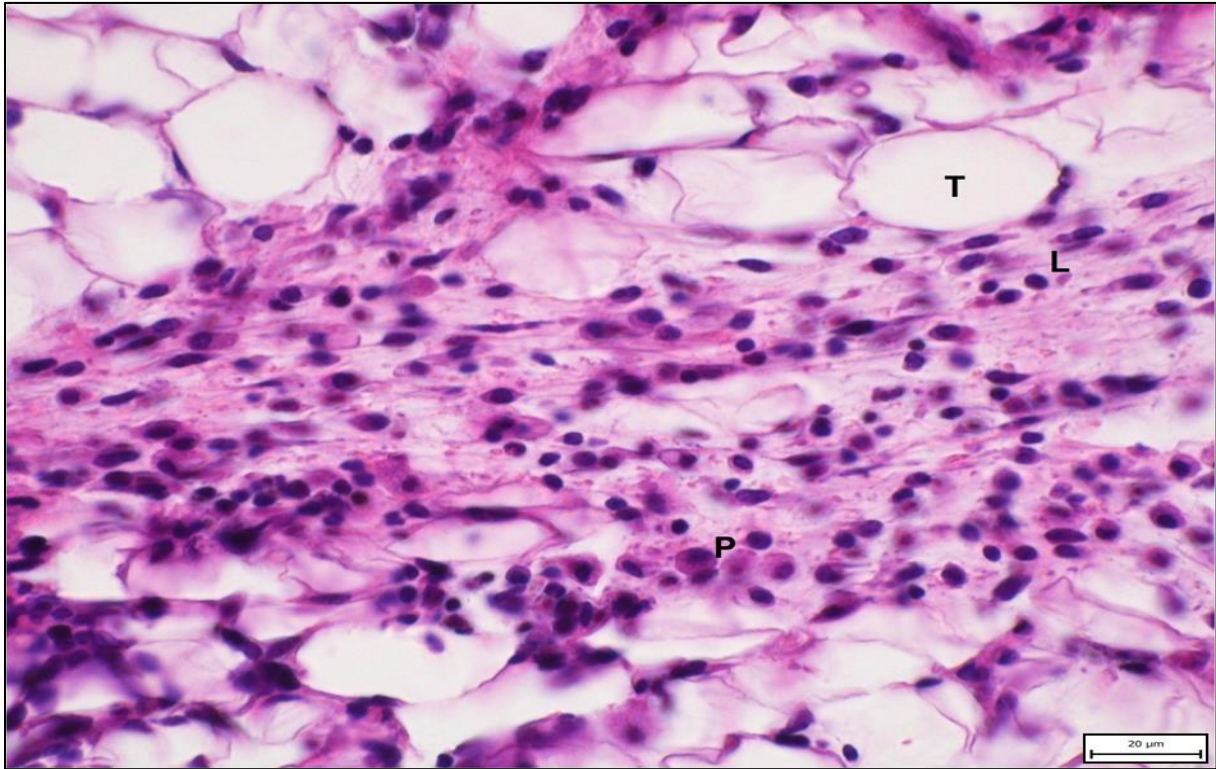


**Obr. 62:** Léčený melanom dvacátý třetí den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x.

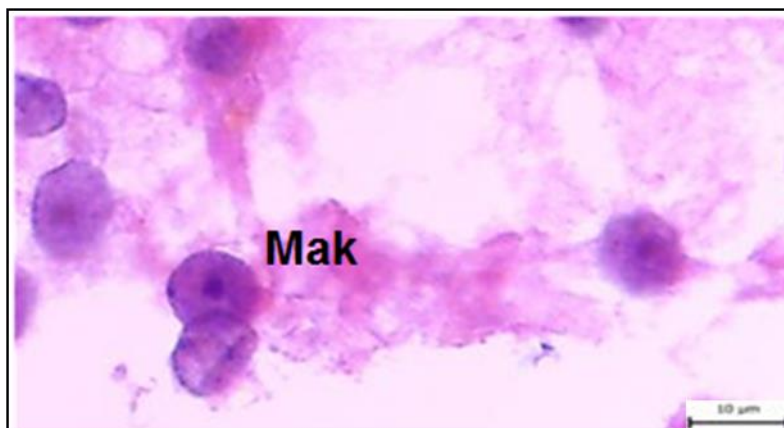


**Obr. 63:** Léčený melanom dvacátý třetí den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x. Lymfocyty.



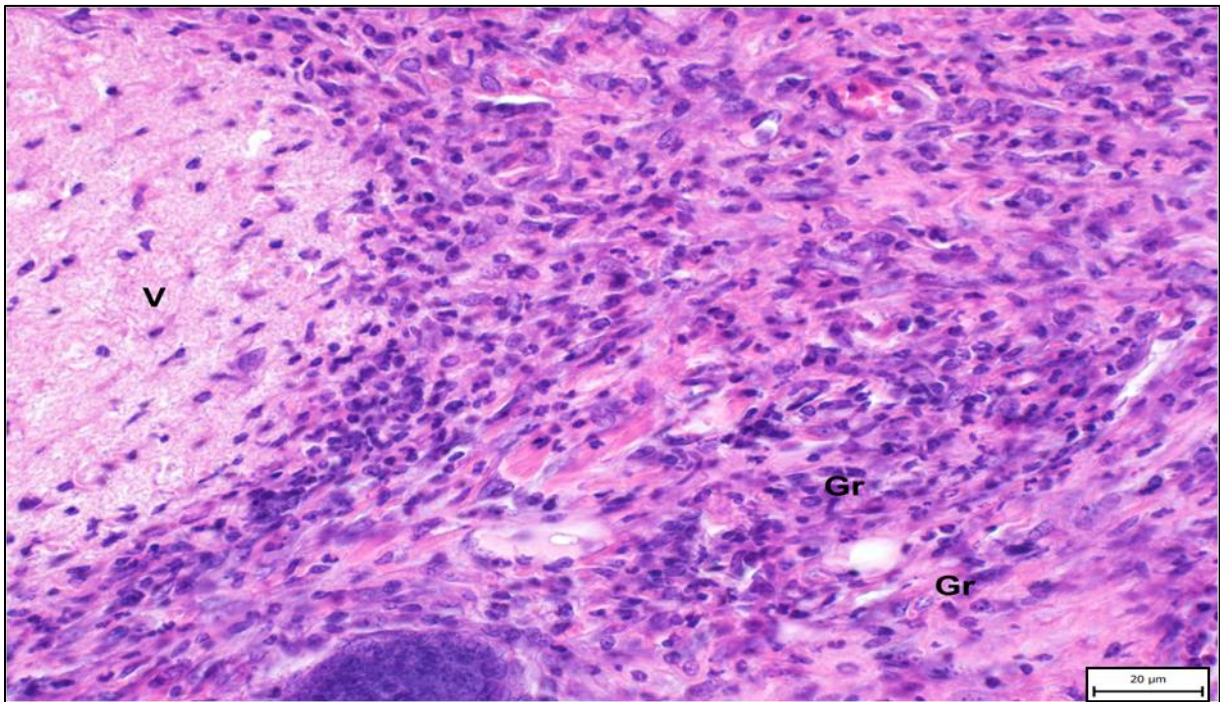


**Obr. 64:** Léčený melanom dvacátý třetí den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 40x. Lymfoplazmocyární infiltrát.

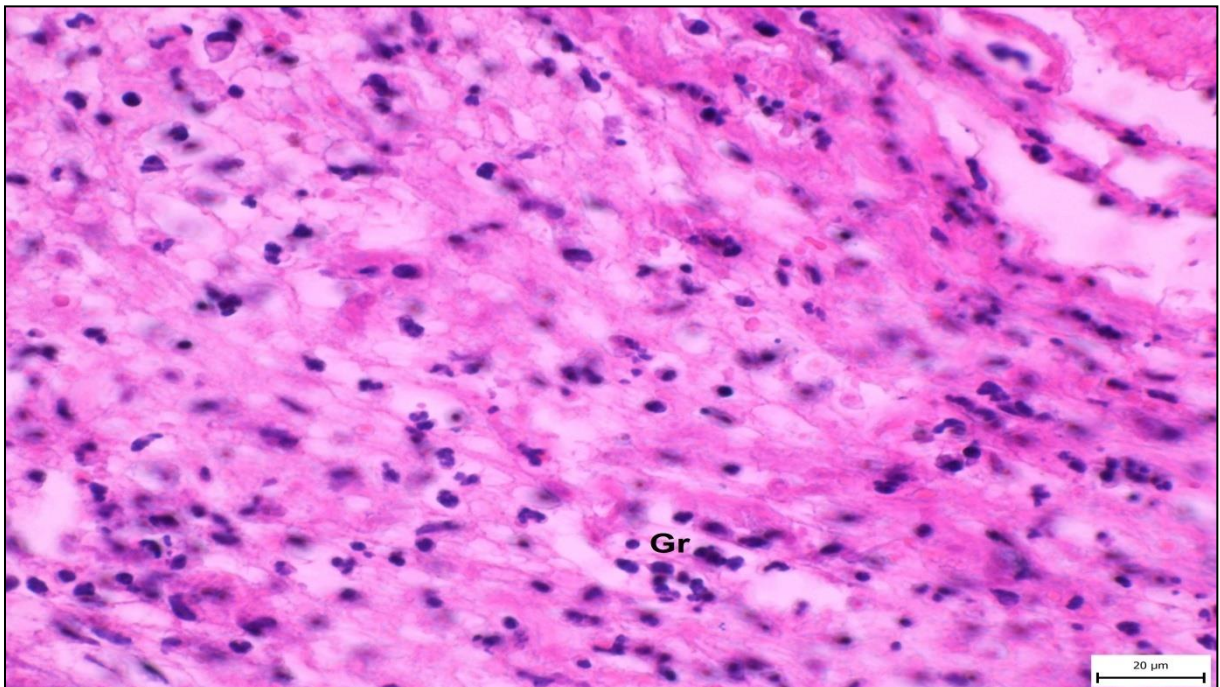


**Obr. 65:** Léčený melanom dvacátý třetí den po aplikaci terapeutické směsi. Zvětšení objektivu 100x. Makrofág.

**Dvacátý sedmý den terapie.**

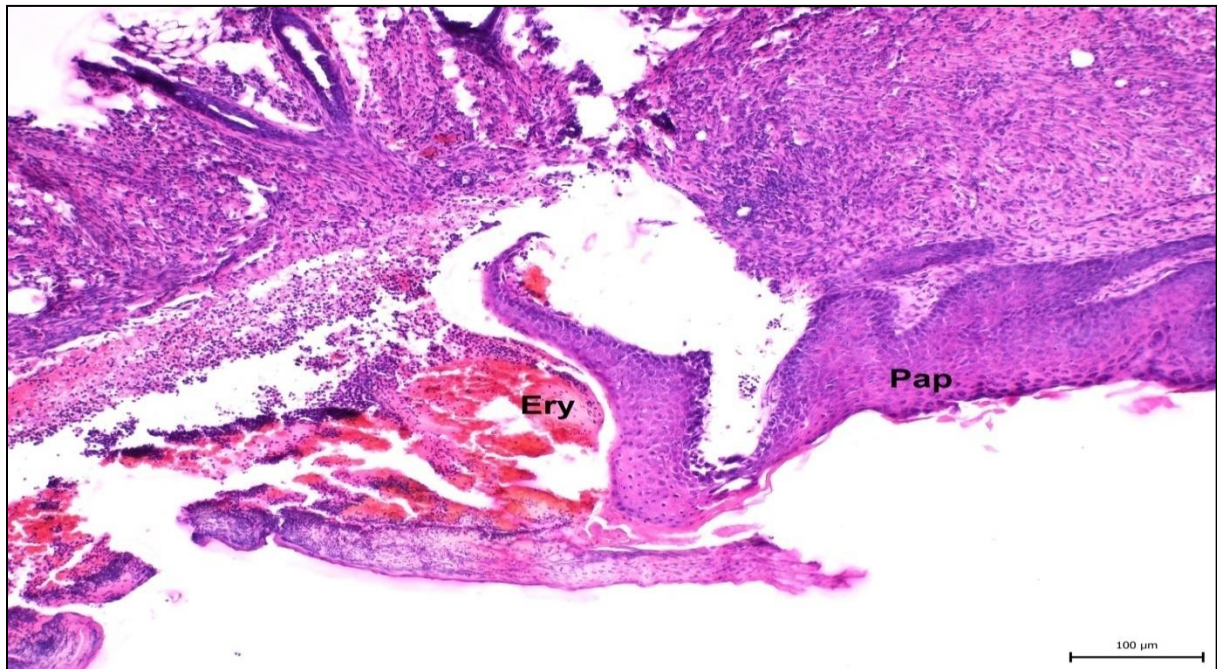


**Obr. 66:** Dvacátý sedmý den terapie- léčený melanom. Strup- vazivo s fibrilární strukturou a náplava granulocytů. Zvětšení objektivu 40x.

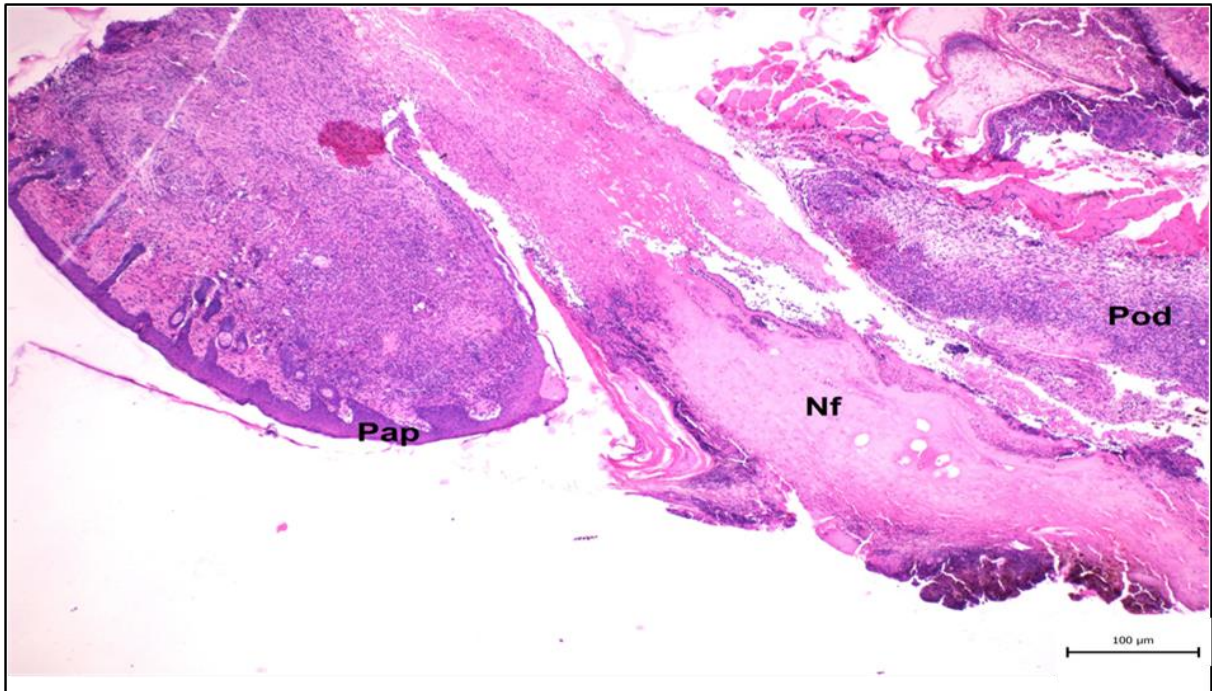


**Obr. 67:** Dvacátý sedmý den terapie- léčený melanom. Granulocyty. Zvětšení objektivu 40x.

**Třicátý první den terapie.**



**Obr. 68:** Léčený melanom třicátý první den terapie. Epidermis- strup. Zvětšení objektivu 10x.



**Obr. 69:** Léčený melanom třicátý první den terapie. Epidermis- nekrotická tkáň s fibrinem. Zvětšení objektivu 10x.