

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Studium mechanismů nádorové imunoterapie
založené na kombinaci resiquimodu s kotveným
mananem a její další optimalizace**

Bakalářská práce

Lucie Paďouková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2016

Paďouková, L., 2016: Studium mechanismů nádorové imunoterapie založené na kombinaci resiquimodu s kotveným mananem a její další optimalizace. [The study of mechanisms of cancer immunotherapy based on the combination of resiquimod with anchored mannan and its further optimisation. Bc. Thesis, in Czech.] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to analyse the tumour infiltration, identify the content of the infiltrate and determine inflammatory cytokine IFN-gamma. We also studied the possibilities of strengthening immunotherapeutic effect.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2016

.....

Lucie Paďouková

Poděkování:

Můj největší dík patří mému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho vždy pozitivní přístup a přínosné rady nejen při tvorbě bakalářské práce. Také bych touto cestou chtěla poděkovat Mgr. Veronice Caisové za její ochotu a pomoc při provádění pokusů i trpělivost při jejich následném vyhodnocování. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia a také při psaní této bakalářské práce.

Obsah:

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED LITERATURY	2
2.1. NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ	2
2.1.1. Vlastnosti nádorů.....	2
2.1.2. Rozdělení nádorů.....	3
2.1.2.1. Melanom.....	3
2.1.2.1.1. Rozdělení melanomů	4
2.1.2.1.2. Léčba melanomu	4
2.1.3. Příčiny vzniku nádorů	5
2.1.3.1. Hypotézy o vzniku.....	5
2.1.3.2. Dědičnost nádorů.....	6
2.1.3.3. Onkogeny, onkosupresivní geny a antionkogeny.....	6
2.1.4. Šíření nádoru organismem	6
2.1.5. Léčba nádorů	7
2.2. IMUNITNÍ SYSTÉM	8
2.2.1. Nеспецифická (vrozená) imunita	8
2.2.1.1. Cytokiny spojené s nádorem.....	9
2.2.1.1.1. Interferony	10
2.2.1.1.2. PRRs (pattern-recognition receptors)	11
2.2.2. Specifická (získaná) imunita	12
2.2. IMUNITNÍ SYSTÉM A NÁDOR	13
2.2.1. Obrana proti nádorům	13
2.2.2. Mechanismy úniku nádorů imunitě.....	15
2.4. IMUNOTERAPIE	16
2.4.1. Imunoterapie založená na specifické imunitě	16
2.4.2. Imunoterapie založená na nespecifické imunitě.....	16
3. CÍLE PRÁCE	18
4. MATERIÁL A METODY.....	19
4.1. Chemikálie	19
4.2. Laboratorní zvířata.....	20
4.3. Nádorové buněčné linie	20
4.4. Příprava melanomových buněk B16-F10 pro <i>in vivo</i>	20
4.5. Transplantace melanomových buněk B16-F10	20
4.6. Měření velikosti nádorů	21

4.7. Vyhodnocení počtu plicních metastáz	21
4.8. Příprava léčebných látek	21
4.8.1. Příprava R-848.HCl.....	21
4.8.2. Příprava mannan-BAM	21
4.8.3. Příprava mannan-SMCC a jeho aplikace	22
4.8.4. Příprava beta glukanu a jeho perorální použití.....	22
4.8.5. Příprava laminarinu a jeho perorální použití.....	22
4.9. Statistické zpracování dat	22
4.10. Experimenty.....	23
4.10.1. Pozorování účinku R-848 a mannanu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6N	23
4.10.2. Účinek R-848 a mannanu kotveného SMCC (pulzní aplikace) s perorálním přidáním beta glukanu nebo laminarinu na redukci nádorového růstu u myši C57BL/6N	23
4.10.3. Stanovení nádorové infiltrace v průběhu léčby s použitím R-848 a mannanu kotveného pomocí SMCC (pulzní aplikace) u myši C57BL/6N.....	24
4.10.4. Metodické porovnání stanovení IFN-gamma pomocí metody ELISA a pomocí průtokového cytometru (intracelulárního stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen	28
4.10.4.1. Intracelulární stanovení IFN-gamma.....	28
4.10.4.2. ELISA stanovení IFN-gamma.....	30
5. VÝSLEDKY.....	33
5.1. Pozorování účinku R-848 a mannanu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6N	33
5.2. Účinek R-848 a mannanu kotveného SMCC (pulzní aplikace) s perorálním přidáním beta glukanu nebo laminarinu na redukci nádorového růstu u myši C57BL/6N.....	35
5.3. Stanovení nádorové infiltrace v průběhu léčby s použitím směsi R-848 a mannanu kotveného pomocí SMCC (pulzní aplikace) u myši C57BL/6N	37
5.4. Metodické porovnání stanovení IFN-gamma pomocí metody ELISA a pomocí průtokového cytometru (intracelulárního stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen.....	40
6. DISKUZE.....	42
7. ZÁVĚR.....	45
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	46
9. LITERATURA.....	48

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění patří v dnešní době mezi nejobávanější onemocnění nejen v České Republice, ale i po celém světě. Rakovina je definována jako onemocnění maligní (tzn. zhoubné), které je charakteristické pro svůj nekontrolovatelný růst, invazi do okolních tkání, schopnost metastazování a celkové negativní působení na organismus.

Rakovina vzniká akumulací genetických změn v lidských genech. Vzhledem k prodlužování střední doby přežití populace dochází k trvalému zvyšování výskytu nádorového onemocnění.

Americká onkologická společnost udává celoživotní riziko výskytu rakoviny u mužů jako 44,7%. Naopak u žen je pravděpodobnost výskytu malignity v průběhu života nepatrně nižší, tedy 38%. Poměr úmrtí na rakovinné bujení u mužů je 23,61% a u žen asi 25% (Vorlíček a kol. 2006).

Incidence rakoviny pro rok 2012 se pohybuje kolem 14,1 milionů nových případů (Ferlay a kol. 2015). Nejčastěji se vyskytující rakovinou se za rok 2008 stává rakovina plic - 12,7%, rakovina prsu - 10,9% a kolorektální karcinom - 9,7% (Ferlay a kol. 2010). Tato statistika se ovšem nemění ani pro rok 2015. V tomto roce je datováno 8,2 milionu úmrtí na maligní onemocnění (Ferlay a kol. 2015). Navzdory zvyšování množství znalostí o jednotlivých druzích rakoviny, se bohužel příliš nedaří tato čísla snižovat.

Ne tak častým, ale zato velmi zákeřným druhem rakoviny je námi studovaný maligní melanom. Celoživotní riziko rozvoje melanomu u bílé rasy je přibližně 3% u mužů (1:34) a 1,9% u žen (1:53). Přitom incidence ročně stoupá o 1,5 - 2,3% (Siegel a kol. 2016).

Mezi běžný způsob léčby zhoubných onemocnění patří zejména chirurgická léčba kombinovaná s chemoterapií, případně radioterapií. V posledních letech se také značně rozvíjí výzkum imunoterapie. Tímto směrem se vydává i moje bakalářská práce, která se zabývá léčbou založenou na aktivaci vrozené imunity. Cílem mé práce je optimalizace léčby působící na imunitní buňky. Námi zvolená léčba má za úkol vyvolat, tolik potřebnou, přirozenou imunitní reakci organismu.

Sílu imunitní reakce stanovujeme pomocí analýzy nádorového infiltrátu a detekce množství jednotlivých buněk. Druhou metodou pro detekci odpovědi imunity je stanovení zánětlivého cytokinu, interferonu gamma (IFN-gamma). IFN-gamma je ukazatelem zásahu imunitního systému uvnitř nádoru.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ

Pojem rakovina je souhrnné označení pro zhoubné nádorové onemocnění. Slovo rakovina se poprvé objevuje již ve druhém století ve starověkém Řecku, kdy Galen zařazuje do slovníku učenců slovo „kakrinos“, které znamená rak případně krab. Podobnost nacházená v prorůstání nádoru okolím a jeho angiogenezi, která nápadně připomíná klepeta raka (nebo kraba) se tedy stává základem pro toto označení (Papavramidou a kol. 2010).

Postupným rozšiřováním znalostí o rakovině se objevují i další označení pro nádor, která již specificky označují bližší lokalizaci novotvarů, včetně určení napadené tkáně (př. kolorektální karcinom).

2.1.1. Vlastnosti nádorů

U nádorů nově vznikajících i již existujících rozlišujeme určitou úroveň angiogeneze (= tvorby cévního zásobení). U rozsáhlejších nádorů lze pozorovat masivní tvorbu krevních cév, pro dostatečné zásobení nádoru nutrieny a kyslíkem. Uvnitř rychle rostoucích novotvarů dochází k hypoxii, což vyvolává tvorbu HIF-1 = Hypoxia-inducible factor 1 a VEGF = vascular endothelial growth factor (Semenza 2003). Angiogeneze je tak zajišťována přirozeným prostředím novotvaru.

V oblasti bioenergetiky je pro nádor typický výskyt tzv. Warburgova jevu. Dochází k převážnému využití anaerobní glykolýzy nádorem za vysoké spotřeby glukózy. Glukóza je přeměňována na kyselinu mléčnou, která je v nadbytku vylučována ven z buňky (Kim a Dang 2006).

Další charakteristickou vlastností novotvarů je schopnost produkovat si vlastní růstové faktory (mitogenní) a také necitlivost vůči inhibičním signálům přicházejícím na jejich receptory. Také neomezený replikační potenciál, kdy pro nádorové buňky neplatí Hayflickova konstanta (pouze 50 - 60 možných dělení jedné buňky), nebo neschopnost apoptózy nádorových buněk přispívají k jejich enormní odolnosti (Gupta a Massagué 2006).

Největším úskalím léčby je ovšem schopnost nádorů metastazovat a jejich invazivita (Gupta a Massagué 2006). Tvorba vzdálených metastáz vede všeobecně k značně horší prognóze (Meyer 2000).

2.1.2. Rozdělení nádorů

Nádory můžeme dělit na nádory zhoubné (maligní), polozhoubné (semimaligní) a nezhoubné (benigní). Toto označení (zhoubné/polozhoubné/nejzhoubné) popisuje schopnost nádoru invadovat okolní tkáň a metastazovat. **Nádory benigní** nemetastazují, ale ačkoliv pomalu rostou, mohou být přesto smrtelně nebezpečné, protože se na okolní tkáň mohou působit expanzivně (tzn., že odtlačují okolní strukturu). Mezi tyto nádory patří například hemangiomy, myxomy, leiomyomy, lipomy, či papilomy. **Semimaligní nádory** se naopak vyznačují velmi agresivním růstem, ale nemetastazují. Mezi ně se řadí např. basaliom. **Nádory maligní** se také vyznačují rychlým růstem, metastazováním a invazivitou - maligní nádory destruuji okolní tkáň (Vorlíček a kol. 2006). K těmto nádorům patří například rakovina tlustého střeva, plic, jícnu, slinivky břišní, děložního čípku atd.

Nádory také dělíme podle původu tkáň, z které vznikají. Takto můžeme nádory dělit na nádory mezenchymové (sarkomy, fibromy, lipomy,...), epitelové (karcinomy, adenomy), neuroektodermové (nádory z CNS, z PNS, z pigmentových buněk), smíšené (germinální nádory), nádory z krvetvorné tkáň kostní dřeně (leukemie), lymfomy, choriokarcinom, nebo mezoteliom (Vorlíček a kol. 2006).

2.1.2.1. Melanom

Melanom nebo také melanoblastom je maligní nádor neuroektodermálního původu. Jako takový vzniká neoplastickou proliferací melanocytů. Melanocyty - neboli pigmentové buňky najdeme ve svrchní vrstvě pokožky, vlasových folikulech nebo například v oku. Produkují pigment melanin. Jsou odvozeny od pluripotentních buněk neurální lišty. Maligní melanom vzniká vycestováním poškozených melanocytů (porucha tvorby melaninu) do svrchní vrstvy pokožky a jejich rozsevem (Hearing a Leong 2007).

Mezi prokázané rizikové faktory patří zejména ultrafialové záření, které pravděpodobně působí jako iniciátor kancerogeneze. Jako velmi rizikové jsou potom dlouhodobé pobyty na slunci bez protekce ochrannými faktory. Jako nejrizikovější část populace se jeví severské typy s velmi světlou pletí, modrýma očima a světlými nebo rzzavými vlasy. K nejohroženějším národům patří Australané, Novozélandčané, či Švédové, nebo Dáni (Erickson a Driscoll 2010).

Velmi diskutabilním faktorem pro vznik nádorového bujení jsou také solária. Nicméně velmi podstatným rizikovým faktorem je i nadměrné slunění v dětství

a v dospívání (Autier a Doré 1998). Nadměrné vystavení slunečním paprskům dětí ve věku do 10 let značně přispívá k pozdější tvorbě maligního melanomu (Tucker a Goldstein 2003).

Maligní melanom je zejména typický pro bílou rasu a přibližně každých deset let stoupá jeho incidence dvojnásobně. Naopak u Asiatů je jeho výskyt velmi řídký, u černochů dokonce vzácný (Ditrichová a Tichý 2006).

2.1.2.1.1. Rozdělení melanomů

Na základě histo-patologického obrazu můžeme maligní melanomy rozdělit do 4 podskupin:

1) Lentigo maligní melanom (LMM) je typický pro starší jedince. Nejčastějšími místy výskytu jsou obličej, krk a hlava. Roste pomaleji. Typicky se tvoří neostře ohraničená skvrna s intenzivním rozvojem po 5-10 letech.

2) Superficiálně se šířící melanom (SSM) se typicky plošně asymetricky rozšiřuje po místě svého výskytu. Běžným umístěním u mužů jsou záda, u žen dolní končetiny. Vytváří se zde tzv. uzlík, který značí intenzivní fázi růstu.

3) Akrolentiginózní melanom (ALM) se nejčastěji vyskytuje na chodidlech, dlaních a prstech, také se vyskytuje na nehtovém lůžku, kde je možná záměna s běžným hematomem. Vznik uzlu opět značí intenzivní fázi růstu.

4) Nodulární melanom (NM) je nejagresivnějším typem melanomu. Je vystouplý a již od počátku vypadá jako uzel (Ditrichová a Tichý 2006).

2.1.2.1.2. Léčba melanomu

Doposud nejběžnější léčbou melanomu je **chirurgické odstranění** nádorového ložiska s následnou **chemoterapií**, případně **radioterapií**, jedná-li se o metastazování zejména do kostí nebo centrálního nervového systému (Adam 2004). Rychle se rozvíjejícím odvětvím léčby je **imunoterapie**, která je i předmětem této bakalářské práce. U maligních melanomů dochází k velkému rozvoji léčiv založených na principech blokace či inhibice nádorových regulátorů imunitní reakce, kterými jsou například anti PD-1 protilátky, nebo CTLA-4.

PD-1, které je přítomno na T-buňce (reguluje její aktivitu) se váže na PD-L1 (B7-H1) receptor na nádorové buňce. To vede k down-regulaci T-buněk (efektorové funkce). Blokáda této dráhy pomocí anti PD-1 protilátek zabrání down-regulaci a dále umožňuje efektorovou funkci T-buňce – tedy eliminaci nádoru (Freeman a kol. 2000, Šťastný a Říhová 2015).

CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen 4) je negativním regulátorem aktivace, proliferace a nádorové infiltrace T lymfocytů. Jedná se o monoklonální protilátku, která blokuje tento regulátor (Hodi a kol. 2010, Šťastný a Říhová 2015).

2.1.3. Příčiny vzniku nádorů

Mezi hlavní příčiny tvorby nádorových onemocnění patří zejména tabákové výrobky a nevhodná strava. Kouření způsobuje ročně jen v USA kolem 30% úmrtí (Trichopoulos 1996). U kuřáků se tak prokazatelně zvyšuje riziko výskytu karcinomu plic, močového měchýře, ledvin, slinivky, nebo děložního čípku.

Náš jídelníček je velmi podstatným faktorem při tvorbě nádorového onemocnění. Obezita ve spojení s nízkou pohybovou aktivitou zvyšuje riziko vzniku rakoviny endometria, prsu, střeva (kolorektální karcinom), nebo například ledvin (Trichopoulos 1996). Také alkohol je nedílným činitelem při rozvoji nádorového onemocnění, v jeho případě trávicího traktu. Ovšem nejedná se pouze o výběr stravy, ale i substance obsažené v ní. Například potravinářská aditiva (jako např. palmový olej) mohou vyvolávat kancerogenezi.

Mimo jiné by zde neměl být opomenut genetický vliv na vznik nádorů, který má integrální vliv při rozvoji nemoci. Negativně mohou také působit psychosociální faktory, mezi které řadíme stres, případně věk, rodinná historie, samotné chování jedince (postoj k nemoci), geografické vlivy apod. (Byers a kol. 2005). Jako podstatné se považují také znečištění životního prostředí, nebo ionizující a UV záření (dále viz kapitola Melanom).

Podstatným faktorem pro vznik novotvaru jsou infekční agens. Mezi ně můžeme zařadit například lidský papilomavirus (HPV), virus hepatitidy B, nebo například bakterii *Helicobacter pylori* (Vorlíček a kol. 2006). Mezi nádory způsobené lidskými papilomaviry řadíme hlavně nádor děložního čípku, nádory jazyka, mandlí, hltanu, hrtanu, dutiny nosní, nebo také rtů (Altaner 2008).

2.1.3.1. Hypotézy o vzniku

V dnešní době převládající hypotézou o vzniku nádorového onemocnění je **mutační genová hypotéza**, která, jak už název sám napovídá, je založená na hromadění mutací v jedné buňce. Jedná se o 4-7 mutací a to zejména v genech pro řízení a diferenciaci buňky (Trnka 2007).

Mezi dalšími dílčími teoriemi můžeme zmínit například **kmenovou hypotézu**. Jedná se o teorii, kdy maligně zvrhlou buňkou nemá být jakákoliv buňka, ale pouze buňka

kmenová. Také hypotézy **iritační** - u tkání drážděných opakovanými lokálními záněty dochází k častějšímu dělení buněk (Nordling 1953), nebo **regenerační** (důsledkem předchozího dráždění tkáně dochází k nástupu opravných mechanismů a chyb s nimi spjatých).

2.1.3.2. Dědičnost nádorů

V případech dědičnosti nádorů mluvíme o predispozicích daného nádorového onemocnění vycházejících zejména z rodinné historie. Hovoří se o tzv. „familiárním výskytu“ popisující fakt, že určitý typ nádoru se vyskytl v rámci jedné rodiny vícekrát. Mají jednu společnou vlastnost: postihují spíše osoby mladšího věku (Vorlíček a kol. 2006).

2.1.3.3. Onkogeny, onkosupresivní geny a antionkogeny

Jak již bylo zmíněno k nejčastějším důvodům, proč dochází k maligní transformaci buněk, jsou mutace. Tyto mutace jsou ve specifických genech – onkogenech. Jako takové zřejmě hrají důležitou roli v buněčné histogenezi (omezená diferenciaci, proliferace, diferenciaci v post-mitotický stav) jak uvádí Knudson ve své publikaci (Knudson 1985). Onkogeny mohou vznikat buď z normálních genů, protoonkogenů (součástí normálních genů), nebo mohou pocházet z virů. Přibližně 40 onkogenů bylo popsáno zejména díky studiím na retrovirech nebo díky *in vitro* analýzám, jako je transfekce (Spandidos a Anderson 1989).

Působení onkogenů potom regulují antionkogeny nebo onkosupresivní geny. Jejich produkty inhibují vliv onkogenů. Potlačují buněčnou proliferaci a tak se vznik rakoviny stává pouze souhrou veškerých, již zmíněných, faktorů.

2.1.4. Šíření nádoru organismem

Děje se dvojnásobným způsobem:

1) Pokračování růstu a invadování okolních tkání.

2) Metastazování:

a) **lymfatickou cestou** – zakládání vzdálenějších ložisek v cestováním maligních buněk do lymfy. Velmi často přechází v šíření krevní cestou, kdy maligní buňky vycestují do krevního řečiště.

b) **krevní cestou** – přesun maligních buněk do orgánů, měkkých tkání apod. krevním řečištěm (Zeidman 1957).

Tato invazivní schopnost nádorových buněk metastazovat značně přispívá k horší prognóze nemoci a k tomu, že nádorové onemocnění bezprostředně ohrožuje život (Chambers 2002).

2.1.5. Léčba nádorů

Jednou z nejběžnějších terapií je **terapie chirurgická**. Spočívá v chirurgickém odstranění nádorového ložiska celého, případně pouze jeho části. Velmi často zároveň dochází i k odstranění spádových mízních uzlin, které mohou obsahovat nádorové buňky, které jsou podkladem pro metastatický rozsev. To, zda bude odebrán celý nádor, nebo pouze jeho část je ovlivněno zejména velikostí nádoru a jeho přístupností. Mnohokrát ale není dostupná další následná léčba a chirurgická terapie se tak stává nejúčinnější, jako je tomu například u námi studovaného melanomu (Meyer 2000).

V kombinaci s chirurgickou terapií je velmi často používána **chemoterapie**. Chemoterapie se provádí prostřednictvím cytostatik. Ta jsou podávána systémově, zejména arteriální infuzí. Jsou inhibitory buněčného dělení a jsou zacílena na buňky organismu, které se rychle dělí. Vedlejším účinkem je ovšem poškození zdravých tkání, které nesou společnou vlastnost rychlé obnovy. Mezi ně patří například vlasové folikuly, nebo buňky kostní dřeně. V poslední době směřuje vývoj k eliminaci těchto vedlejších účinků pomocí lokalizované chemoterapie, která využívá mikrodialyzačních metod (Martins a de Oliviera 2009).

Další možností boje s rakovinou je využití **ionizujících zařízení (radioterapie)**, které rozlišujeme na fotonové a částicové. U fotonového (elektromagnetického) záření rozlišujeme gama a X záření (Vorlíček a kol. 2006). Rozlišujeme zde teleterapii, kde je záření pacientovi aplikováno zevně, přes kůži na daný nádor a brachyterapii, kde se zářič dostává do bezprostřední blízkosti nádoru, čímž se zvyšuje dávka radiace a namáhání okolních zdravých tkání. Právě brachyterapie v poslední době zaznamenává značný rozvoj, díky vývoji 3D skenování nádorových ložisek (Lee 2014).

Ohromný rozvoj v posledních letech zaznamenává také **biologická terapie** a to zejména **imunoterapie**. Jako označení biologická terapie používáme látky, které jsou syntetizovány na základě látek tělu vlastních (jsou buď podobné, nebo shodné s fyziologickými substancemi lidského těla). Často ovšem mnohonásobně převyšují jejich přirozené fyziologické hodnoty. K těmto látkám například řadíme, již zmíněný, IFN-gamma, nebo IL-2, které slouží ke stimulaci imunity.

Velká pozornost je tedy věnována monoklonálním protilátkám. Ukázalo se, že mohou upravovat nádorovou signalizaci a také vykazují imunomodulační vlastnosti (mohou

ovlivňovat inhibici, či aktivaci některé molekuly imunitního systému). Mohou tedy podpořit indukci protinádorové imunitní odpovědi. To vedlo k vytváření nových strategií léčby rakoviny založených na monoklonálních protilátkách (Weiner a kol. 2010). Takovýmto „hitem“ poslední doby se staly například monoklonální protilátky anti PD-1, nebo CTLA-4 (viz kapitola 2.1.2.1.2. Léčba melanomu).

2.2. IMUNITNÍ SYSTÉM

Je nejzásadnějším obranným mechanismem našeho těla vůči okolním patogenům a cizorodým částicím. Jedná se o difuzní orgán, jež živočichy brání vůči okolnímu prostředí (Southam 1960). Tvoří jej buňky cirkulující krví a lymfou a buňky usazené v lymfatických orgánech. Velmi podstatnou součástí imunitního systému (=IS) jsou také rodiny adhezivních receptorů, které zajišťují komunikaci mezi molekulami imunitního systému navzájem a s okolními tkáněmi (Springer 1990).

Nejpodstatnější vlastností je **schopnost rozpoznávat vlastní a cizí molekuly**, což slouží k již zmíněné ochraně proti cizím antigenům (tělu nevlastní molekuly) – jsou imunitním systémem eliminovány. Zároveň také zajišťuje IS imunologický dohled - např. ochrana proti vlastním transformovaným buňkám – nádorovým. Nicméně velké množství mikroorganismů, které obývají naše těla, dokáží žít v symbióze s naší imunitou (Hooper a kol. 2012). Mimo jiné k dalším vlastnostem IS řadíme i **paměť a specifčnost**.

2.2.1. Nespecifická (vrozená) imunita

Jde o fylogeneticky starověký obranný mechanismus, kterému se říká nespecifická imunita, jelikož působí proti antigenům všeobecně, nikoliv proti jednomu specifickému antigenu (Ferenčík a kol. 2005). Charakteristickou vlastností nespecifické imunity je také neschopnost paměti. Proto její opětovné setkání s určitým antigenem není ovlivněno jeho předchozím zapamatováním.

Evolučně bylo nutné správné rozpoznání vlastních a cizích antigenů, zejména k tomu, aby se předešlo poškození vlastních tkání a tak se vyvinula vrozená imunita (Medzhitov a Janeway 1997). Je založená na bazálním fungování organismu, kde se jedná o tvorbu přirozených bariér, kterými jsou například mukózní membrány (Turner 2009). Hlavním mechanismem je fagocytóza, kdy dochází k enzymatickému štěpení cizorodých částic.

Rozlišujeme humorální a buněčnou složku. Mechanismy humorálními, spadajícími pod přirozenou imunitu, jsou komplementový systém, cytokiny (jako jsou např. interferony), nebo enzymy a inhibitory.

Mezi buňky buněčné přirozené imunity řadíme fagocyty (granulocyty, makrofágy a dendritické buňky), NK buňky, nebo například žírné buňky, epitelové nebo endotelové buňky. Tyto buňky mají tedy schopnost správně rozpoznat patogen a to zejména díky přítomnosti molekulárních vzorů spojených s patogenitou (pathogen associated molecular patterns = PAMPs). Ty jsou rozpoznávány receptory rozpoznávajícími vzory (PRRs = pattern recognition receptors), které nacházíme na povrchu již zmíněných buněk (Tang a kol. 2012, Ferenčík a kol. 2005).

2.2.1.1. Cytokiny spojené s nádorem

Cytokiny jsou rozpustnými glykoproteiny, které tvoří buňky imunitního systému (Ferenčík a kol. 2005). Hrají velmi důležitou roli v kancerogenezi. Na jedné straně mohou sloužit k aktivaci imunitních zbraní, na straně druhé ovšem mohou přispívat k maligní transformaci, či růstu nádoru (Smyth 2004). Jejich hlavním úkolem je regulace rozsahu, délky a směru trvání imunitní odpovědi (Ferenčík a kol. 2005).

Cytokiny můžeme rozdělit do několika hlavních skupin, dle jejich funkcí, viz Tab. I (Ferenčík a kol. 2005, Vilček a Feldmann 2004, Smyth a kol. 2004).

Tab. I: Hlavní skupiny cytokinu (převzato z Ferenčík a kol. 2005, Vilček a Feldmann 2004, Smyth a kol. 2004).

NÁZEV	FUNKCE
Interleukiny	Různorodá regulace imunitních reakcí
Tumor nekrotizující faktory	Regulace zánětu, protinádorová funkce
Interferony	Antivirový účinek, velké množství různých funkcí (vrozená i získaná imunita)
Faktory stimulující kolonie	Stimulují proliferaci a diferenciaci u některých imunitních buněk (např.: G-CSF: stimulace granulocytů, GM-CSF: stimulace makrofágů a granulocytů, apod.)
Transformující růstové faktory	Regulace přeměny buněk na nádorové, imunitních reakcí, embryonálního vývoje
Chemokiny	Stimulují chemotaxi (migraci) imunitních buněk, prozánětlivá funkce
Lymfokiny	Aktivace makrofágů

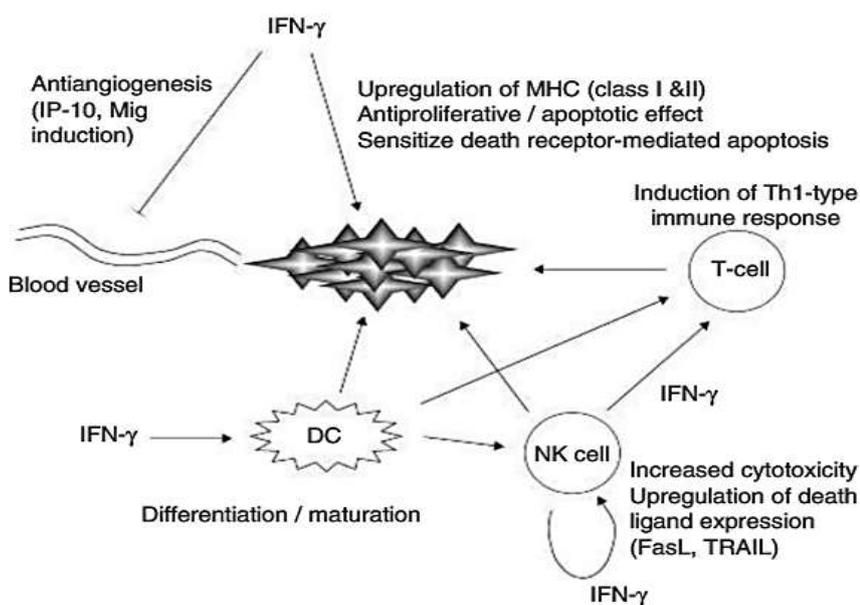
2.2.1.1.1. Interferony

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením interferonů (IFN-gamma). Rozlišujeme několik druhů interferonů, k nejznámějším patří IFN-alfa, IFN-beta a IFN-gamma. IFN-alfa/beta proteiny jsou kódovány více geny (u savců) a jsou produkovány různými druhy imunitních buněk, jako jsou například dendritické buňky, makrofágy, nebo monocyty. IFN-beta je také secernován fibroblasty (Vilček a Feldmann 2004). Alfa a beta rodina interferonů navozuje ve zdravých i nakažených (infikovaných) buňkách antivirový stav.

Pro mou bakalářskou práci je nejpodstatnější IFN-gamma. Ten je naopak kódován jediným genem (u savců) a produkován NK buňkami v odpovědi na některé aktivační stimuly (Vilček a Feldmann 2004, Schoenborn 2007). Jako takový se IFN-gamma uplatňuje při imunologickém dohledu na nádor. Tlumí růst nádoru (spolu s IL-12) indukci nádorových buněk pro antiangiogenezi (Coughlin a kol. 1998). Zároveň je také citlivost IFN-gamma vůči nádorovým buňkám velmi podstatná pro aktivaci MHC I, či II komplexu. Tak se zvyšuje prezentace antigenu fagocytům. Ty následně způsobí destrukci nádorové tkáně a dochází k útlumu růstu nádorové masy.

IFN-gamma také podporuje aktivaci CTL (cytotoxické T lymfocyty) a také diferenciaci a maturaci dendritických buněk (Smyth a kol. 2004). Th1 lymfocyty stimulují tvorbu cytokinů (např. také IFN-gamma) a IFN-gamma zpětně aktivuje diferenciaci Th0 lymfocytů na Th1. Th1 lymfocyty následně aktivují makrofágy.

Účinky IFN-gamma jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1: Účinky IFN-gamma na imunitní systém (převzato z Smyth a kol. 2004).

Díky léčebným úspěchům s použitím interferonů při terapii maligních melanomů se interferony stávají nadějnou terapeutickou možností (Agarwala a Kirkwood 1999).

Interferony, podobně jako většinu cytokinů, není snadné stanovit, protože jsou produkovány ve velmi malé míře, téměř nedetekovatelné (Vilček a Feldmann 2004). Proto v této práci porovnávám dvě různé metody, které jsou hypersensitivní a jsou schopné zachytit toto (velmi malé) množství IFN-gamma.

2.2.1.2. PRRs (pattern-recognition receptors)

Receptory rozpoznávající vzory (PRRs), jež nacházíme na povrchu buněk vrozené imunity, rozpoznávají PAMPs (viz výše) a DAMPs na povrchu organismů (Ferenčík a kol. 2005). Typickými zástupci PAMPs jsou LPS (lipopolysacharid), námi využívaný mannan, nebo například beta glukan. DAMPs (damage-associated molecular patterns) slouží jako „alarm“ v případě poškození buňky.

PRRs můžeme rozdělit do tří skupin na membránové, cytoplazmatické a sekretované, jak uvádí Abouelmaatti a kol. ve své publikaci (Abouelmaatti a kol. 2013).

Mezi **membránové PRRs** řadíme zejména Toll-like receptory (TLR), manózoový receptor (MR), scavenger receptory (SR), lektinové receptory typu C, kam řadíme například Dectin-1 (beta glukan) (Gordon 2002). K **cytoplazmatickým PRRs** můžeme řadit NOD-like receptory (NLR), nebo RIG-like receptory (RLR). A poslední skupinu tvoří **sekretované PRRs**, kam řadíme například C-reaktivní protein (CRP), nebo mannan-binding lectin (MBL=manózu vázající lektin) (Abouelmaatti a kol. 2013).

I naše léčba je postavena na principu těchto PRRs. Pro nás nejpodstatnějšími PRRs jsou **TLR, MBL, MR, Dectin-1 a CR3**. Proto zde uvádím jejich stručnou charakteristiku.

TLR (Toll-like receptor): hrají hlavní roli v odpovědi na mikrobiální patogeny. V lidských buňkách bylo doposud rozpoznáno 10 členů TLR rodiny značených TLR 1-10. TLR jsou zabudovány do cytoplazmatické membrány většinou jako dimery (Ferenčík a kol. 2005).

MBL (mannan vázající lektin): je protein akutní fáze, který je syntetizován hepatocyty jater. MBL je molekula, která je schopná rozpoznávat vzor opakování řady sacharidů na mnoha mikrobech a stimulovat jejich opsonizaci. Může také aktivovat komplement. Problémem ovšem je absence MBL u přibližně 10% populace (Kilpatrick 2002).

MR (manóзовý receptor): je endocytický receptor exprimovaný makrofágy, dendritickými buňkami a některými endoteliálními buňkami. MR obsahuje N-terminální doménu bohatou na cystein. Rozpoznává patogeny díky přítomnosti D-manózy (Gordon 2002).

Dectin-1: je typ II transmembránového proteinu s doménou typu C lektinu. Dectin-1 rozpoznává beta glukan (laminarin) a je primárním receptorem makrofágů pro fagocytózu částic obsahujících beta glukan (laminarin). Také byl nalezen v neutrofilech a dendritických buňkách. Pro svou aktivaci vyžaduje ITAM motiv v intracelulární doméně (Akira a kol. 2006, Gordon 2002, Gersuk a kol. 2006).

CR 3 (komplementový receptor 3): je fagocytární receptor, který nacházíme na myeloidních buňkách (makrofázích, neutrofilech, NK buňkách). Je to $\beta 2$ integrin také známý jako CD18 nebo CD11b. Pro CR3 je velmi podstatný námi využívaný beta glukan. Když se na CR3 naváže beta glukan spolu s C3 složkou komplementu, dochází k jeho aktivaci a přenosu signálu do buňky, u které dochází k její degranulaci a aktivaci (Xia a kol. 1999).

2.2.2. Specifická (získaná) imunita

Stejně jako mechanismy vrozené imunity můžeme i mechanismy imunity specifické rozdělit na buněčné a humorální. Získaná imunita buněčná je zajišťována zejména T lymfocyty a některými cytokiny. Naopak humorální zprostředkovávají B lymfocyty, které se dále diferencují v plazmatické buňky, které se uplatňují v protilátkové imunitě.

Hlavní vlastností získané imunity je tak **specifičnost** (schopnost specificky rozpoznat jednotlivé antigeny) a **paměť** (tyto antigeny si zapamatovat a při jejich opětovném vniknutí do organismu vyvolat kaskádu imunitní odpovědi dle zapamatovaného vzorce).

Specifičnost je zde zprostředkována antigenními receptory, které nacházíme na obou typech lymfocytů. Rozlišujeme proto **B-buněčný receptor** (B-cell receptor) a **T-buněčný receptor** (T-cell receptor) (Hood 1985).

T lymfocyty rozpoznávají pouze antigeny prezentované APC (antigen prezentujícími buňkami), kam patří zejména dendritické buňky, monocyty a makrofágy. Lze je rozlišit na Tc a Th lymfocyty. **B lymfocyty** jsou aktivovány Th lymfocyty. Dochází k jejich zmnožení a jedna polovina se diferencuje na paměťové buňky a druhá polovina v plazmatické buňky, které produkují protilátky (Hořejší 2015).

2.2. IMUNITNÍ SYSTÉM A NÁDOR

Imunitní systém by měl být schopen bránit naše tělo vůči nebezpečím cizího i vlastního původu. Provádí tzv. imunitní dozor nad našim tělem. Takto dokáže také eliminovat nádorové buňky, které jsou pozměněnými buňkami našeho vlastního těla. Eliminuje je zejména prostřednictvím mechanismů, jako je fagocytóza, NK buňky, CTL (=cytotoxické T lymfocyty), nebo protilátkami. Mimo jiné taky za pomoci buněčných subpopulací Th1 a Th17, které produkují velkou řadu prozánětlivých cytokinů, jako je např. IL-2, IFN-gamma, IL-6, jak uvádí Hořejší ve své publikaci (Hořejší 2015).

Důležitým předpokladem rozvoje reakce proti nádoru je rozpoznání nádoru imunitním systémem prostřednictvím nádorových **povrchových antigenů**. Zde rozlišujeme dva základní typy antigenů: **antigeny specifické pro nádor** (TSA = tumor-specific antigens) a **antigeny asociované s nádory** (TAA = tumor-associated antigens) (Neler a kol. 2008).

Mezi **TSA** řadíme molekuly, které nenajdeme na zdravých buňkách (Neler a kol. 2008). Těmi jsou například komplexy HLA (human leucocyte antigen) molekul I. třídy s abnormálními fragmenty buněčných proteinů, nebo onkogenních virů, případně abnormální formy glykoproteinů (Hořejší 2015).

Naopak k **TAA** řadíme molekuly, které je možné naleznout i na zdravých buňkách (Neler a kol. 2008). Velmi často slouží i jako nádorové markery, jako jsou některé onkofetální antigeny na nádorových buňkách, nebo melanomové antigeny, jako je MAGE-1 (Melanoma antigen family 1), nebo Melan-A (Hořejší 2015).

Tyto nádorové antigeny jsou nejčastěji prezentovány MHC I a MHC II komplexy na povrchu buněk.

2.2.1. Obrana proti nádorům

Jelikož jsou nádorové buňky buňkami organismu vlastními, sdílí velmi často s ostatními zdravými buňkami stejné povrchové antigeny. Velmi často dochází k jejich tolerování imunitním systémem. Pokud se ovšem u nádorových buněk vyskytne odlišnost, je okamžitě rozpoznána imunitními mechanismy (Hořejší 2015).

Mezi tyto mechanismy řadíme neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK buňky, ale i opsonizační protilátky aktivující komplement, fagocytózu, buněčnou cytotoxicitu: Th1 a CTL a již zmíněné cytokiny (Hořejší 2015).

Aktivované makrofágy zajišťují odstraňování zbytků odumřelých buněk, jejich fagocytózu a také eliminaci nádorových buněk. Také jsou hlavními buňkami, které se

uplatňují při rozvoji zánětu, který je velmi podstatným faktorem při boji s nádory (Mantovani a Sica 2010). Zde rozlišujeme dva druhy aktivovaných makrofágů. **M1**, které vznikají indukcí IFN-gamma a jejich hlavní úloha je likvidace poškozených buněk a produkce IL-12 (ten stimuluje T lymfocyty a NK buňky). **M2** vznikají z klidových makrofágů za působení IL-4 a IL-13, které napomáhají regeneraci a hojení poškozených buněk. Produkují ovšem protizánětlivé cytokiny jako je IL-10, nebo TGF- β , které naopak zamezují rozvoji imunitní odpovědi – viz dále (Hořejší 2015, Ostrand-Rosenberg 2012).

Při likvidaci nádorových buněk (a virem infikovaných buněk) se uplatňují také **NK buňky**, které patří mezi lymfocyty. Jsou aktivovány cytokiny a na rozdíl od T a B lymfocytů nemají antigenně specifické receptory (Lodoen a Lanier 2006). Specifické rozpoznání zde probíhá díky značně sníženému množství MHC I. molekul na povrchu nádorových buněk (=NB), které jsou NK buňky schopny rozpoznat. Také rozpoznávají své aktivační molekuly jako je **NKG2D**, **CD94**, nebo **NKp46**. Dochází k aktivaci NK buněk, které uvolní své cytotoxické granule do bezprostředního okolí NB. Podobnou reakcí je i působení přes Fc receptor CD16, který interreaguje s Fc částmi protilátek navázaných na NB a tak spouští degranulaci NK buněk. Této reakci se říká **na protilátkách závislá cytotoxicita - ADCC** (=antibody-dependent cellular toxicity) (Lodoen a Lanier 2006, Hořejší 2015).

V protinádorové obraně se uplatňují také **protilátky**. Ty se váží na povrchové nádorové antigeny, jako je TSA, nebo TAA a tak je opsonizují (označí pro fagocytózu) a umožní jejich likvidaci pomocí makrofágů M1, neutrofilních granulocytů, nebo NK buněk (ADCC). Může také docházet k aktivaci klasické cesty komplementu, což také vede k opsonizaci a chemotaxi fagocytárních buněk (Hořejší 2015). Pro protilátky jsou nutné kostimulační signály dodávané Th lymfocyty a také, aby antigeny byly rozpoznány specifickými receptory B lymfocytů (BCR) (Ferenčík a kol. 2005).

Ovšem nejdůležitější protinádorovou zbraní jsou **Tc lymfocyty (CD8+)**. Mají schopnost rozpoznávat poškozené buňky a s nimi i NB. Tc lymfocyty ničí NB zejména mechanismy založenými na bezprostředním kontaktu. Antigeny jsou Tc lymfocytům prezentovány APC (antigen prezentujícími buňkami, viz výše). Jakmile dojde k prvnímu kontaktu s antigenem, začnou se Tc lymfocyty diferencovat na **efektorové cytotoxické buňky – CTL** (Hořejší 2015). Ty jsou roznášeny krevním oběhem až na místo svého působení (Ferenčík a kol. 2005). CTL používají tři mechanismy cytotoxicity. Zaprvé ve své cytoplazmě obsahují cytotoxické granule, které obsahují protein perforin a proteázy, které

jsou zodpovědné za apoptózu NB. Zadruhé na svém povrchu mají Fas-ligand (Fas-L), který v interakci s receptorem Fas aktivuje v NB apoptózu. A za třetí využívají k likvidaci své sekretované cytokiny, jako je TNF- β , které působí jako Fas-L (Hořejší 2015).

Th lymfocyty (CD4+) slouží k rozpoznání antigenů, které jsou následně prezentovány APC. Mimo jiné jsou Th lymfocyty hlavními producenty cytokinů. Mezi nejdůležitější pak patří například IL-2, nebo IFN-gamma (Ferenčík a kol. 2005). (viz 1.1.2.2. Cytokiny spojené s nádorem.)

2.2.2. Mechanismy úniku nádorů imunitě

Únikové strategie nádorů imunitnímu systému jsou rozličné. Můžeme zmínit **pasivní obranu nádorů**. Kde může docházet ke **ztrátám nádorům typických povrchových antigenů** důsledkem mutací, případně **maskování jejich antigenů** molekulami glykokalyxu, protože nádory často exprimují více glykokalyxových molekul. Mimo jiné již zmíněná **snížená exprese MHC molekul I. třídy** může vést k neschopnosti rozpoznat NB pomocí CTL (Šťastný a Říhová 2015). Záleží ovšem na množství MHC I, protože i velmi malé množství jsou schopny rozpoznat NK buňky (Lodien a Lanier 2006).

Také ale dochází i k **aktivní obraně** nádorových buněk vůči IS. Mezi tyto aktivní mechanismy řadíme **inhibiční molekuly**, jako je například již zmíněný PD-1 receptor, či CTLA-4 negativní regulátor imunitní odpovědi. Snížení imunitní odpovědi může také ovlivňovat přítomnost **IL-10**, který inhibuje nadměrnou imunitní odpověď a tak zabraňuje tvorbě zánětu (Šťastný a Říhová 2015). Případně **TGF- β** , jenž sice v počátku růstu nádoru působí tumor-supresivně, ale studie ukazují, že nádor si dokáže vyvolat odolnost vůči TGF- β a dokonce využít TGF- β ke svému prospěchu. TGF- β pak podporuje tvorbu **Treg** buněk z T buněk (tvoří 5-10%) (Massagué 2008). Tyto Treg inhibují funkce efektorových T lymfocytů (jakými jsou například CTL nebo Th lymfocyty). Také inhibují IL-17, který produkuje Th17 buňky, které regulují NK buňky a makrofágy (Klabusay 2015).

Dalším mechanismem jsou i **myeloidní tlumivé buňky** (MDSC = myeloid-derived suppressor cells), které inhibují funkci imunitních buněk v nádoru (Ostrand-Rosenberg 2012). Také zesílená exprese Fas-L je nádorovým buňkám vlastní. Indukují tak apoptózu na ostatních imunitních buňkách se kterými přicházejí do styku (Šťastný a Říhová 2015).

2.4. IMUNOTERAPIE

2.4.1. Imunoterapie založená na specifické imunitě

V poslední době zaznamenává značný rozvoj. Jedná se o aplikaci znalostí specifické imunity při nádorové terapii. Velká řada nově se rozvíjejících terapií je založená na **použití monoklonálních protilátek**. Mezi nejnovější mechanismy můžeme zařadit například terapii pro potlačování M2 makrofágů (hlavně díky produkci IL-10 a TGF- β) a buněk MDSC. Nevýhodou této terapie však bylo, že po skončení terapie se prokázalo obnovení metastazování, dokonce ještě ve větší míře. Dalším typem terapie je využití protilátek proti některým TSA, či TAA. Mechanismus jejich působení je rozmanitý, založený na podpoře přirozených vlastností protilátek (Hořejší 2015). Dále také využití protilátek, které blokují tlumivé receptory, kam patří například CTLA-4 či PD-1 apod.

Dalším rozvíjejícím se typem imunoterapie založené na specifické imunitě je využití **nádorových vakcín**. Zde se jedná o použití dendritických buněk *in vitro* kultivovaných s nádorovými antigeny, které dávají vznik připraveným APC. Dendritické buňky jsou připraveny z monocytů působením směsi cytokinů. Takto „připravené“ APC stimulují v organismu (*in vivo*) T lymfocyty (Palucka.a Banchereau 2012).

2.4.2. Imunoterapie založená na nespecifické imunitě

Tato imunoterapie vychází ze schopnosti rozpoznat PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) prostřednictvím PRRs (pattern recognition receptors). V případě, že je patogen rozpoznán, dochází k jeho eliminaci. Tímto patogenem mohou samozřejmě být i vlastní pozměněné buňky – nádorové buňky.

Tohoto principu využívá i tým dr. Ženky. Jak zjistila Janotová a kol. (Janotová a kol. 2014), největšího účinku terapie je dosahováno za použití TLR agonistů v kombinaci s ligandy podporujícími fagocytózu kotvenými přímo na nádorové buňky. Naše imunoterapie je obdobně založená na třech hlavních aspektech. Prvním bodem je využití **TLR agonistů**. Dříve se jednalo zejména o použití LPS, kterým se zabývá práce Janotové a kol. (Janotová a kol. 2014). Ovšem toxicita LPS byla hlavním důvodem, proč bylo odstoupeno od dalšího zkoumání této slibné terapie. A tak se naše pozornost obrátila k využití resiquimodu (R-848) jako bezpečnějšího TLR agonisty.

R-848 (resiquimod): jedná se o ligand TLR 7 u myši a ligand TLR 7 a 8 u lidí. Ligace R-848 urychluje dozrávání dendritických buněk a také nejspíše zvyšuje aktivaci T buněk. Také indukuje tvorbu cytokinů, jako jsou IL-6, IL-12, TNF- α , či IFN-alfa a IFN-gamma. Kromě toho, R-848 indukuje sekreci chemokinů (IL-8, MIP-1 a, MCP-1) z dendritických buněk (Ahonen a kol. 1999).

Druhým bodem je využití **ligandů podporujících fagocytózu**, mezi které řadíme laminarin, mannan a f-MLF (N-formyl-methioninyl-leucyl-phenylalanine). Tímto bodem se zabývá i má bakalářská práce, která se věnuje využití mannanu jako ligandu podporujícího fagocytózu a snaží se optimalizovat jeho vhodné využití.

Mannan: řadíme mezi PAMPs. Mannan je lineární polymer D-manosy spojené glykosidickou vazbou, který je získáván z hub (kvasinek), nejčastěji ze *Saccharomyces cerevisiae*. Imunitní systém rozpoznává mannan pomocí dvou receptorů. Jsou jimi mannan vázající lektin (MBL) a manózový receptor (MR), jak je uvedeno výše.

Laminarin: je získáván z hnědé řasy *Laminaria digitata*. Má nízkou molekulovou hmotnost - MW=6000. Je to ve vodě rozpustný beta glukán. Může se vázat na receptor dectin-1, ale vazba laminarinu na dectin-1 se liší v závislosti na jeho izoformy. Buňky exprimující lidskou izoformu dectin-1b nereagují na laminarin, zatímco buňky exprimující lidskou izoformu dectin-1a jsou na laminarin vysoce citlivé (Gersuk a kol. 2006).

Motivy stimulující fagocytózu ovšem nemají signalizační účinek, musí být vázány, teprve následně vzniká signál pro fagocytózu. Bez vhodného kotvení by byly bohužel našim imunitním systémem zničeny a nevyužity pro terapii. Proto je nutná třetí část naší léčby, kterou tvoří **kotvení do fosfolipidové dvojvrstvy nádorových buněk**. To probíhá pomocí BAM. Další eventualitou je kovalentní vazba na membránové proteiny pomocí SMCC (kapitola: 4.8. Příprava léčebných látek).

3. CÍLE PRÁCE

Společným rysem této bakalářské práce bylo studium kombinované léčby melanomů pomocí resiquimodu (R-848) v součinnosti s vázaným mannanem a její kompletní analýza.

- 1) Optimalizace léčby pomocí R-848 s vázaným mannanem.
- 2) Porovnání kotvení mannanu a to BAM nebo SMCC.
- 3) Studium možností dalšího zesílení imunoterapeutického efektu.
- 4) Analýza nádorové infiltrace - stanovení jednotlivých množství imunitních buněk infiltrovaných do nádoru.
- 5) Metodické porovnání stanovení IFN-gamma metodami ELISA a pomocí intracelulárního barvení INF-gamma ve slezině (FACS).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Chemikálie

- **ELISA kit IFN-gamma** (eBioscience, USA)
- **resiquimod (R-848)** (Tocris Bioscience, UK)
- **mannan** (Sigma-Aldrich, USA)
- **SMCC = Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate ether** (Thermo scientific, Belgium)
- **TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid** (Sigma-Aldrich, USA)
- **RPMI 1640** (Sigma Aldrich, USA)
- **Trypanová modř** (Sigma Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma Aldrich, USA)
- **FCS = Fetal Calf Serum** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Concanavalin A** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Monensin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Foxp3 = Fixation/Permeabilization working solution**
- **Permeabilization buffer**
- **PBS = pufovaný fyziologický roztok** (Sigma Aldrich, USA)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostic, Německo)
- **DNáza I** (Roche Diagnostic, Německo)
- **BAM = Biocompatible anchor for cell membrane, Mw 4000** (NOF Europe, Belgium)
- **beta glukán (suspenze)** (Transfer Point, USA)
- **laminarin** (Sigma Aldrich, USA)
- **Fluorescenčně značené kalibrační kuličky** (Invitrogen, USA)
- **Fluorescenčně značené monoklonální protilátky pro průtokovou cytometrii:**
 - **Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)
 - **Anti-Mouse CD45 APC; clone 30-F11; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)
 - **Anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)
 - **Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0.5 mg/ml** (eBioscience, USA)
 - **Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1.5; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)
 - **Anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)

- **Anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7; clone BM8; 0.2 mg/ml** (eBioscience, USA)

4.2. Laboratorní zvířata

Pro naše pokusy byly používány myši C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Jednalo se o osmi týdenní samice chované jednotlivě při standardních podmínkách (neustálý přístup ke krmivu a vodě) ve zvěřinci Katedry medicínské biologie chované v individuálně ventilovaných chovných boxech. S denním režimem 12/12 hodin.

4.3. Nádorové buněčné linie

Použita byla myší melanomová linie B16-F10. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI s 10% FCS (1% antibiotikum, 1% glutamin a 0,1% merkaptoethanol).

4.4. Příprava melanomových buněk B16-F10 pro *in vivo*

Z buněk kultivovaných v kultivačních nádobách se nejprve odstranilo médium, které bylo následně nahrazeno sterilním PBS. Pomocí PBS byly buňky 3x promyty. Dále byla provedena trypsinizace (trypsinizační směs – trypsin 0,02%, 0,25% - EDTA v HBSS) pro uvolnění B16-F10 ze dna kultivační nádoby. Následovala přibližně dvouminutová inkubace v termostatu při 37°C v 5% CO₂ atmosféře. Po vyjmutí byla reakce zastavena přidáním RPMI s 10% FCS. Vzniklá suspenze buněk byla přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugována 5 minut (150 g, 4°C). Supernatant byl odstraněn a suspenze byla naředěna RPMI s 10% FCS na požadovanou koncentraci na základě kvantifikace buněk v Bürkerově komůrce.

4.5. Transplantace melanomových buněk B16-F10

Pro transplantaci byly využity osmi týdenní samice myší rodu C57BL/6N. Buňky B16-F10 byly myším aplikovány subkutánně na pravý vyholený bok v množství 4x10⁵ buněk na myš.

4.6. Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů byla měřena každý druhý den pomocí kaliperu. Byly měřeny dva rozměry: rozměr A (délka nádoru) a rozměr B (výška nádoru). Z těchto rozměrů byl objem vypočítán pomocí vzorce pro objem rotačního elipsoidu:

$$V = \frac{\pi}{6} * a * b^2 \quad (\text{Jung Li a kol. 2009})$$

4.7. Vyhodnocení počtu plicních metastáz

Myši byly usmrceny stržením vazů. Plíce byly uloženy do PBS a následně prohlíženy pod binokulární lupou. Počty metastáz byly zaznamenány a dále zpracovány. Následné vyhodnocení bylo provedeno stanovením prevalence metastáz a průměrným počtem metastáz na 1 myš z dané léčené skupiny. Prevalence metastáz byla určena dle následujícího vzorce:

$$\frac{\text{počet myši ve skupině, které mají metastázy}}{\text{celkový počet myši ve skupině}} * 100 (\%).$$

Průměrný počet metastáz na 1 myš z léčené skupiny byl dále stanoven podle vzorce:

$$\frac{\text{součet všech metastáz ve skupině}}{\text{počet myši}}.$$

4.8. Příprava léčebných látek

4.8.1. Příprava R-848.HCl

0,5 mg resiquimodu bylo smícháno s 1,4 μ l 3,5% HCl. Dále bylo přidáno 10 μ l PBS pro rozpuštění a posléze 1 ml PBS pro doplnění na požadovaný objem. Resiquimod lze jen stěží rozpustit ve vodném prostředí, proto je nutné navázat na něj předem HCl (hydrochlorid).

4.8.2. Příprava mannan-BAM

Nejprve byl aminovaný mannan připraven reduktivní aminací. Roztok mannanu byl v prostředí octanu amonného a kyanoborohydridu sodného redukován při pH 7,5 a 50°C po dobu pěti dní. Dále byl dialyzován za použití MWCO 3500 dialyzační trubice (Serva, Německo) při 4°C přes noc proti PBS. Vazba BAM na aminoskupinu mannanu byla provedena při pH 7,3, reakční doba byla 1 hodina. Během této hodiny při pokojové teplotě

zreagovala aminoskupina mannanu se skupinou NHS (N-hydroxysukcinimid) BAM. Získaný roztok byl skladován zamražený (-20°C) a při použití rozmražen v pokojové teplotě (Janotová a kol. 2014).

4.8.3. Příprava mannan-SMCC a jeho aplikace

I v tomto případě se jedná o reakci aminoskupiny aminovaného mannanu s NHS skupinou SMCC. Aby byla zajištěna vazba mannan-SMCC na nádorové buňky, bylo zapotřebí zajistit existenci -SH skupin na těchto buňkách. Toto bylo provedeno redukcí cystinů, k čemuž byl použit 50 mM roztok TCEP v PBS (Janotová a kol. 2014). TCEP byl intratumorálně aplikován myši 1 hodinu v předstihu. Takto připravené roztoky byly také skladovány zamražené (při -20°C) a při použití rozmraženy při pokojové teplotě.

4.8.4. Příprava beta glukanu a jeho perorální použití

Byla připravena suspenze 60 mg beta glukanu od Transfer point v 1 ml vody. Která byla následně myším podávána perorálně v množství 50 µl. Bylo nutné v předstihu alespoň 2,5 hodiny (maximálně 5 hodin) odebrat myším krmivo. Toto krmivo mohlo být zpět vráceno půl hodiny po aplikaci beta glukanu.

4.8.5. Příprava laminarinu a jeho perorální použití

Byla připravena suspenze 60 mg laminarinu od Transfer point v 1 ml vody. Laminarin je rozpustný tudíž se myším může rovnou podat perorálně v množství 50 µl. Pro perorální podání laminarinu platí stejná pravidla s odebráním krmiva, jako pro podávání beta glukanu.

4.9. Statistické zpracování dat

Data získaná z experimentů byla dále zpracovávána pomocí MS Excel (výpočty objemu nádorů, střední chyby průměru, tvorba grafů), STATISTICA 12 (Survival Analysis - Kaplan Meier, ANOVA, post-hoc Tukey test, UnequalN test). Ve všech uvedených grafech byla použita střední chyba průměru (SEM).

4.10. Experimenty

4.10.1. Pozorování účinku R-848 a mannanu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6N

Pro tento pokus bylo použito 24 myší C57BL/6N. 12. den po transplantaci melanomu byly randomizačně rozděleny do čtyřech skupin (I, II, III, IV) po 6 myších podle následující tabulky (Tab.II).

Tab. II: Rozdělení myší do skupin dle terapeutické látky.

SKUPINA	LÉČEBNÁ SMĚS
I.	Mannan-BAM
II.	Resiquimod.HCl
III.	Resiquimod.HCl / mannan-BAM
IV.	PBS

Jednotlivé léčebné látky byly aplikovány subkutánně ve čtyřech terapeutických pulzech. Aplikace probíhala v následujících dnech: 0, 1, 2 ...pauza... 8, 9, 10 ...pauza... 16, 17, 18 ...pauza...24, 25, 26.

Takto bylo aplikováno 50 µl léčebné směsi (I.: 0,2 mM roztok mannan-BAM v PBS, II.: Resiquimod.HCL – 0,5 mg/ml PBS, III. 0,5 mg resiquimod-HCL/ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS, IV. PBS) intratumorálně. Obden byla měřena velikost nádorů pomocí kaliperu. Po ukončení pokusu byly myši 30. den usmrceny stržením vazů a byla provedena analýza plicních metastáz.

4.10.2. Účinek R-848 a mannanu kotveného SMCC (pulzní aplikace) s perorálním přidáním beta glukanu nebo laminarinu na redukci nádorového růstu u myši C57BL/6N

V tomto experimentu bylo použito 24 samic C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories, které byly osmitýdenní. Myším byl transplantován melanom B16-F10. Dvanáctý den po transplantaci byla započata léčba. Ta probíhala ve čtyřech terapeutických pulzech v následujících dnech: 0, 1, 2 ...pauza... 8, 9, 10 ...pauza... 16, 17, 18 ...pauza...24, 25, 26.

Myši byly rozděleny do čtyřech skupin (I, II, III, IV) podle druhu terapie, jak je uvedeno v následující tabulce (Tab.III). Roztok TCEP i terapeutická směs byly aplikovány v množství 50 μ l na myš intratumorálně. TCEP byl o 50 mM koncentraci (v PBS), terapeutikum byla směs 0,5 mg resiquimod.HCl/ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS.

Terapeutické látky byly aplikovány v množství 50 μ l na myš intratumorálně.

Tab. III: Rozdělení myši do léčebných skupin dle terapeutické látky.

SKUPINA	(1. aplikace)	TERAPEUTICKÁ SMĚS (2. aplikace – po hodině)	TERAPEUTICKÁ LÁTKA (perorálně)
I.	TCEP	Resiquimod.HCl / mannan-SMCC	-
II.	TCEP	Resiquimod.HCl / mannan-SMCC	Beta glukan
III.	TCEP	Resiquimod.HCl / mannan-SMCC	Laminarin
IV.	TCEP	PBS	-

U skupin I, II, III a IV probíhala aplikace terapeutické látky ve dvou oddělených fázích. Nejprve se injikovalo TCEP intratumorálně. Nechalo se hodinu působit – pro redukci cystinu na cystein na povrchu buněk pro navázání SMCC. Následně se po jedné hodině aplikovala 2. terapeutická látka, dle typu skupiny.

U skupin II a III se beta glukan a laminarin podávali myším perorálně nezávisle na intratumorální léčbě v průběhu dní 0 - 15. Byly jim podávány 3 mg beta glukanu/laminarinu v 50 μ l vody na myš. Obden byla měřena velikost nádorů pomocí kaliperu.

U myši byla měřena doba přežití sto dní. Ta byla následně vyhodnocena Kaplan Meierovou křivkou přežití pro každou jednotlivou léčenou skupinu. Také byla provedena retransplantace nádorové linie B16-F10 u přeživších myši.

4.10.3. Stanovení nádorové infiltrace v průběhu léčby s použitím R-848 a mannanu kotveného pomocí SMCC (pulzní aplikace) u myši C57BL/6N

V tomto pokusu byla stanovována nádorová infiltrace v průběhu léčby v časech 12, 24 a 48 hodin na průtokovém cytometru FACS Canto II (BD Bioscience, USA). Bylo stanovováno celkové množství leukocytů, granulocytů, makrofágů/monocytů, T (CD4+, CD8+) buněk, B buněk a NK buněk.

Pro pokus byly použity osmi týdenní myši C57BL/6N (samice) z chovu Charles River Laboratories. Dvanáctý den po transplantaci melanomu B16-F10 byly myši

randomizovány do čtyřech skupin I, II, III, IV po devíti jedincích. Do pokusu byla také zařazena skupina V o třech myších (viz. Tab. IV), která sloužila jako neléčená kontrola v čase 0.

Tab. IV: Rozdělení myší do skupin podle rozdílných léčebných látek.

SKUPINA	1. aplikace	TERAPEUTICKÁ SMĚS	
		2. aplikace - po 1 hodině	
I.	TCEP	0,5 mg resiquimod.HCl/ml PBS	
II.	TCEP	0,5 mg resiquimod.HCl/ml	0,2 mM mannan-SMCC
III.	TCEP	0,2 mM mannan-SMCC v PBS	
IV.	TCEP	PBS	
V.	-	-	

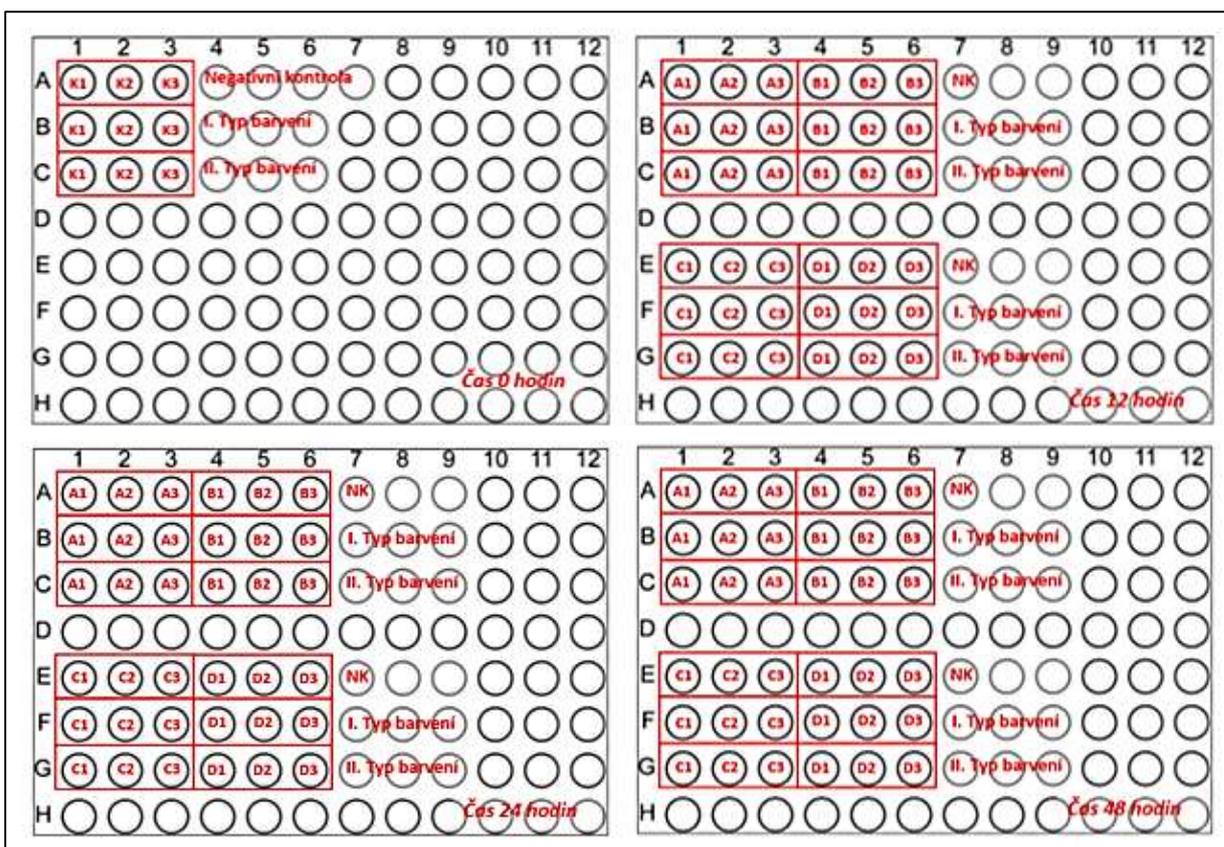
V čase 0 hodin byly zabity stržením vazů všechny 3 myši ze skupiny V (neléčená kontrola v čase 0) a nádory zpracovány na analýzu nádorového infiltrátu. V čas 0 hodin byla rovněž započata terapie intratumorální aplikací látek dle schématu uvedeného v Tab. III (vždy 50 μ l jednotlivých roztoků). Dále v časech 12, 24, 48 hodin byly zabity vždy 3 myši z každé skupiny (I, II, III a IV). Myši pro analýzu v jednotlivých časech byly vybírány tak, že nádory byly změřeny kaliperem a z jednotlivých skupin byly vždy vybrány 3 jedinci s malým, středním a velkým nádorem (pro zachování srovnatelnosti analýzy).

Příprava buněčných frakcí:

Nádory byly z myší pečlivě vypitvány. Očištěné nádory byly promyty v chladném (4°C) RPMI. Následně byly nastříhány na menší kousky a umístěny do Eppendorf zkumavek s enzymatickou směsí 1 ml RPMI + 20 μ l Liberasa DL (5mg/ml) + 67 μ l DNase I (10 mg/ml). Takto připravené nádory byly inkubovány 1 hodinu za stálého třepání (400 kmitů/minutu) při 37°C. Následně byly tyto agregáty centrifugovány 5 minut při 160g/4°C.

Výsledné pelety byly převedeny přes sítko (70 μ m, BD Biosciences, USA) do chladného PBS (pH=7,3) a znovu promyty centrifugací 160g/5 min/4°C. Tyto vzorky byly ředěny dle hustoty daných nádorových suspenzí do půl, jednoho, dvou, nebo třech ml. Toto ředění bylo následně zohledněno v přepočtu pro množství jednotlivých subpopulací buněk.

Připravené vzorky byly převedeny do 96ti jamkové destičky (Corning Incorporated, USA). Od každého nádoru byly připraveny do destičky 3 vzorky (po 10 μ l/jamku), z nichž každý byl značen jiným mastermixem (směs fluorescenčně značených protilátek). První vzorek byl vždy značen I. typem barvení (viz Tab. V.). Druhý vzorek byl značen II typem barvení (viz Tab. VI.). Poslední třetí vzorek sloužil jako nebarvená kontrola. Toto rozložení řaděných vzorků je uvedeno na Obr. 2.



Obr. 2: Rozložení vzorků v 96 jamkovém panelu a jejich typ barvení pro čas 0, 12, 24 a 48 hodin.

Tab. V: Mix fluorescenčně značených monoklonálních protilátek – I. barvení.

I. BARVENÍ		
TYP FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	TYP BUNĚK, KTERÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA ZNAČÍ	ŘEDĚNÍ
Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	Leukocyty	200 x
Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	T lymfocyty	100 x
Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1.5; 0,2 mg/ml)	CD4+ T lymfocyty	100 x
Anti-Mouse CD8a PE Cy7; clone 53-6.7; 0,2mg/ml	CD8+ T lymfocyty	100 x
Anti-Mouse NK 1.1 PE; clone PK136; 0,2 mg/ml	NK buňky	100 x

Tab. VI: Mix fluorescenčně značených monoklonálních protilátek – II. barvení.

II. BARVENÍ		
TYP FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	TYP BUNĚK, KTERÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA ZNAČÍ	ŘEDĚNÍ
Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	Leukocyty	200 x
Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	T lymfocyty	100 x
Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0,2 mg/ml	Granulocyty	100 x
Anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3; 0,2 mg/ml	B lymfocyty	100 x
Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7; clone BM8; 0,2 mg/ml	Monocyty/makrofágy	100 x

Po přidání značených protilátek byla destička inkubována v chladničce přibližně 20 minut. Následně byla destička promyta 150 μ l PBS/jamku pro odstranění nenavázaných fluorescenčně značených monoklonálních protilátek.

Destička byla centrifugována 2 min/180g/4°C. Supernatant byl odstraněn a do jamek bylo přidáno 140 μ l PBS a 10 μ l absolut count kuliček. Takto připravené vzorky byly přeneseny do zkumavek pro analýzu na průtokovém cytometru. Průtokový cytometr byl nastaven na následující hodnoty (viz. Tab.VII).

Tab.VII: Nastavení laserů při měření na průtokovém cytometru BD FACS Canto II.

Nastavení laserů	
Events	20 000
Window extention	2,00
FSC Area scaling	0,80
Area scaling blue	0,80
Area scaling red	1,30
Laser Delay blue	0,00
Laser Delay red	30,00

Značené buněčné populace byly analyzovány za pomoci BD FACS Diva software 6.1.3. Jednotlivé buněčné populace byly následně přepočítány (pomocí MS Excel) na počet buňek/mm³ nádorové tkáně.

4.10.4. Metodické porovnání stanovení IFN-gamma pomocí metody ELISA a pomocí průtokového cytometru (intracelulárního stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen

Při metodickém porovnání byly použity dvě odlišné metody stanovení množství INF-gamma a to (1) intracelulární stanovení (FACS), a (2) ELISA stanovení.

Po tento pokus bylo použito 48 myši C57BL/6N. 12. den po transplantaci melanomu byly randomizačně rozděleny do dvou skupin (I, II) po 24 myších podle následující tabulky (Tab.VIII).

Tab. VIII: Rozdělení myši do skupin dle terapeutické látky.

SKUPINA	1. Aplikace	LÉČEBNÁ SMĚS (2. aplikace)
I.	TCEP	Listeria-monocytogenes-SMCC, 1000 mil./ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS + 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C/ml
II.	TCEP	PBS

Jednotlivé léčebné látky byly aplikovány subkutánně ve čtyřech terapeutických pulzech. Aplikace probíhala v následujících dnech: 0, 1, 2 ...pauza... 8, 9, 10 ...pauza... 16, 17, 18 ...pauza...24, 25, 26. Takto bylo aplikováno 50 µl léčebné směsi intratumorálně. Obden byla měřena velikost nádorů pomocí kaliperu. Po proběhnutí studia nádorové infiltrace bylo přikročeno k měření tvorby IFN-gamma ve splenocytech po jejich interakci s nádorovým antigenem.

Pro stanovení bylo použito šest myši. Vyhodnocení bylo provedeno ve dvou fázích. První část pokusu byla provedena se 2 myšmi léčenými (sk. I – myši Ia, Ib) a 2 myšmi neléčenými (sk. II – myši IIa, IIb). Tyto 4 myši byly analyzovány 32. od počátku pokusu. Dále byly použity myši 78. den od počátku pokusu, pouze léčená skupina (sk. I – myši Ic, Id). 78. den nemohla být provedena analýza neléčených myši, jelikož se 78. dne nedožila ani jedna myš z neléčené skupiny (sk. II).

4.10.4.1. Intracelulární stanovení IFN-gamma

Nejprve byl připraven dostatečný počet nádorových buněk B16-F10 ve 20 ml chladného RPMI. Tyto buňky byly usmrceny UV zářením přiložením Petriho misek s 10 ml buněčné suspenze přibližně 20 cm od UV zářivky. UV záření působilo na buňky 1 hodinu.

Na závěr byly zabitě buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a naředěny na požadovanou koncentraci.

Potom byly odebrány sleziny ze čtyř léčených myší (léčba: *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC v PBS + R-848.HCl +POLY I:C) a jedné zdravé (úplně negativní kontrola). Takto odebrané sleziny byly převedeny přes filtr (70 μ m, BD Biosciences, USA). Následně byla tato suspenze buněk centrifugována 10min/160g/4°C. Byla provedena lýza erytrocytů 2 minuty jedním ml 0,84% NH₄Cl ohřátého na 37°C. Lýza byla zastavena přidáním 10ml média RPMI s 10% FCS. Dále byly buňky opětovně centrifugovány 10 min/160g/4°C.

Splenocyty byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a naředěny na požadovanou koncentraci. Následně byly splenocyty smíchány v jamkách s usmrcenými nádorovými buňkami B16-F10 v poměru 900 000 splenocytů ku 150 000 B16-F10. Objem v jamce byl doplněn na 1 ml přidáním RPMI 10%. Do jamky pro pozitivní kontrolu bylo přidáno 2,5 μ l Concanavalin A (s koncentrací $c=2,5 \mu$ l/ml). Concanavalin A je mitogen, tudíž by měl aktivovat T lymfocyty k produkci IFN-gamma.

Celkem bylo použito pět kontrol: pozitivní kontrola, izotopová kontrola pro INF-gamma, kontrolní slezina ze zdravé (neléčené) myši, nebarvená kontrola a kontrola s obarvenými povrchovým znaky.

Izotopová kontrola sloužila k eliminaci nespecifického barvení. Kontrola ze sleziny zdravé myši určovala pohled na zdravé buňky.

Panel pro FACS byl inkubován v termostatu 1 hodinu při 37°C a 5% CO₂. Po této inkubaci byl použit Monensin, který byl přidán do všech jamek (finální koncentrace $c=10 \mu$ g/ml). Monensin je inhibitor intracelulárního transportu a sloužil k zabránění úniku vzniklého IFN-gamma ven z buňky. Takto připravený panel byl inkubován dalších 5 hodin v termostatu při 37°C a 5%CO₂.

Po ukončení inkubace byly vzorky přemístěny do zkumavek pro průtokový cytometr a byl připraven mastermix fluorescenčně značených monoklonálních protilátek pro povrchové značení buněk (viz. Tab.IX).

Tab. IX: Příprava barvení I fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami.

BARVENÍ I		
TYP FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	TYP BUNĚK, KTERÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA ZNAČÍ	ŘEDĚNÍ
Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0,5 mg/ml	T- lymfocyty	100 x
Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1.5; 2mg/ml	CD4+ T lymfocyty	100 x
Anti-Mouse CD8a PE Cy7; clone 53-6.7; 0,2 mg/ml	CD8+ T lymfocyty	100 x

Ke každému vzorku bylo přidáno 10 μ l mastermixu a vzorky byly inkubovány v chladu a tmě 30 minut. Po inkubaci byl přidán FF (1% roztok FCS v PBS) a zkumavky byly centrifugovány 5 min/160 g/4°C.

Vzorky byly ještě jednou promyty FF a centrifugovány za stejných podmínek. Pelet byl rozsuspendován ve zbylé tekutině a následně byl přidán 1 ml Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution.

Po 40 minutové inkubaci v chladnu byly vzorky dvakrát promyty centrifugací (5min/350g/pokožová teplota). Pro promytí byly použity 2 ml Permeabilization buffer. Pro blokaci formaldehydu, který je součástí Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution, byly přidány 2 μ l inaktivovaného bovinního séra a vzorky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě ve tmě.

Dále byla přidána fluorescenční značená protilátka proti barvení IFN-gamma (intracelulární značení). Do izotypové kontroly byl přidán IgG PE (Rat IgG kappa Iso Control PE – 40x ředění). Takto upravené vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po označení buněk byly vzorky dvakrát promyty centrifugací (5min/350g/pokožová teplota) za použití 2 ml Permeabilization buffer.

Takto připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II (BD Bioscience, USA) a byly analyzovány programem BD FACS Diva verze 6.1.3.

4.10.4.2. ELISA stanovení IFN-gamma

Pro stanovení IFN-gamma pomocí ELISA byl použit supersenzitivní kit IFN-gamma ELISA (eBioscience, USA), kde byl při stanovování následován postup dodávaný společně s kitem. Při přípravě panelů bylo postupováno jako v odstavci 4.10.4.1. Intracelulární stanovení IFN-gamma, včetně pozitivní kontroly.

Celkem byly použity 2+2 myši léčené (léčba: *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC v PBS + R-848.HCl +POLY I:C), dvě neléčené a jedna zdravá myš. Panely byly připraveny stejným způsobem jako pro intracelulární stanovení, ovšem bez použití monenzinu. Panely pro stanovení ELISA byly inkubovány v termostatu 24 a 48 hodin při 37°C a 5% CO₂. Po uplynutí inkubační doby byly supernatanty z jamek přeneseny do Ependorf zkumavek a uchovány při -80°C. Pro další použití byly později supernatanty šetrně rozmrazeny při pokojové teplotě.

Destička (96 jamek) s navázanou anti IFN-gamma protilátkou byla dvakrát promyta 400 µl Wash buffer (1x ředěný deionizovanou vodou). Tekutina byla odstraněna oklepáním o papírovou utěrku. Dále byla připravena kalibrační řada pomocí Calibrator Diluent desítkovým ředěním, jak je uvedeno v následující tabulce (Tab. X). Jako blank sloužil samotný 100 µl Calibrator diluent.

Tab. X: Desítkové ředění Calibrator Diluent pro kalibrační křivku.

A	Standard 1	40,00 pg/ml
B	Standard 2	20,00 pg/ml
C	Standard 3	10,00 pg/ml
D	Standard 4	5,00 pg/ml
E	Standard 5	2,50 pg/ml
F	Standard 6	1,25 pg/ml
G	Standard 7	0,63 pg/ml
H	BLANK	BLANK

Dále bylo přidáno do jamek 80 µl Sample diluent a 20 µl daných vzorků. Finální objem v jamkách tvořil 100 µl. Poté bylo do všech jamek (i blank) přidáno 50 µl Biotin-Conjugate. Destička byla pokryta adhezivním filmem a inkubována na třepačce při pokojové teplotě po dobu 2 hodin.

Po uplynutí dané doby byl odebrán adhezivní film a roztok byl odstraněn. Dále byly jamky 6x promyty 400 µl Wash buffer (1x ředěný deionizovanou vodou). Po posledním pečlivém odstranění tekutiny a osušení byl přidán do všech jamek Streptavidin-HRP (horse raddish peroxidase). Destička byla znovu zakryta adhezivním filmem a inkubována při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny na třepačce.

Po odstranění filmu byly jamky znovu 6x promyty 400 µl Wash buffer (1x ředěný deionizovanou vodou) a ihned poté bylo přidáno do všech jamek 100 µl TMB Substrate Solution. Dále byla destička inkubována půl hodiny v pokojové teplotě a bylo sledováno zabarvení vzorků v jamkách. Ve vhodné dobu byla reakce zastavena.

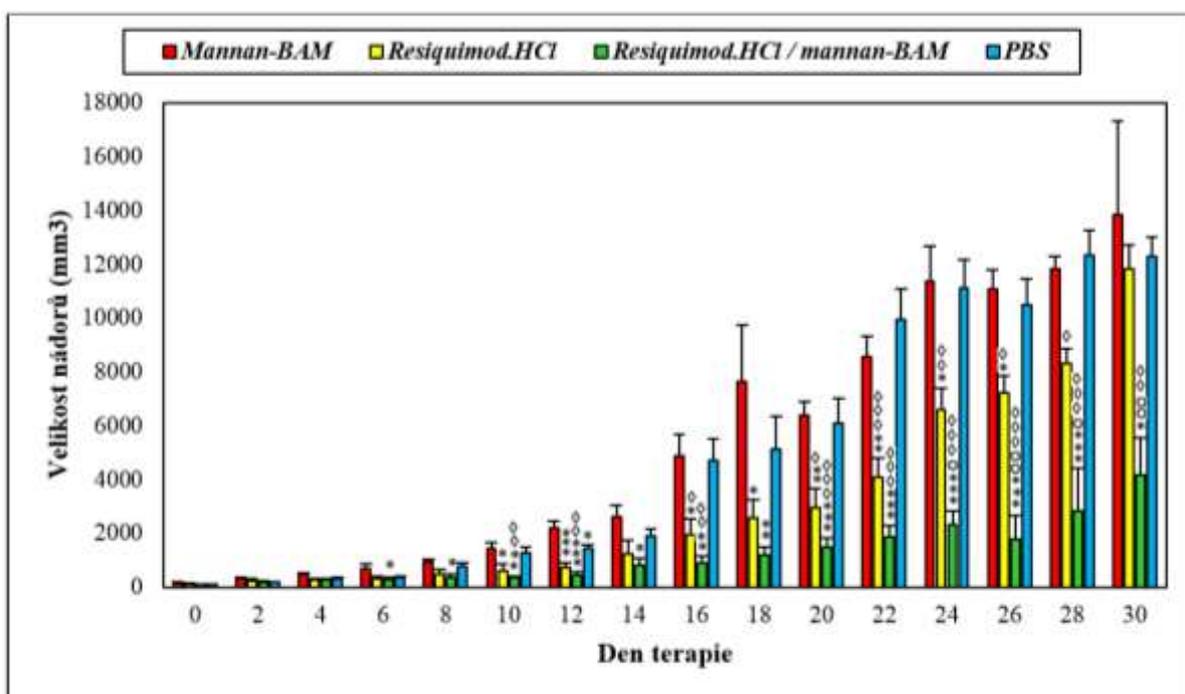
Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l Stop Solution do každé jamky. Ihned po zastavení reakce byla destička proměřena na ELISA readeru (SYNERGY H1 microplate reader; BIOTEK). ELISA reader byl nastaven na měření při vlnové délce 450 nm. Takto byly vyhodnoceny jednotlivé absorbance vzorků. Tyto absorbance byly měřeny duplikátně, proto byl proveden průměr těchto absorbancí a od něj byl odečten blank.

Pro zpracování absorbancí byla použita kalibrační křivka ze známých koncentrací standardů vytvořených dvojkovým ředěním. Z rovnice přímky vytvořené pomocí MS Excel byly vypočteny jednotlivé koncentrace IFN-gamma v našich vzorcích. Také byl vypočten koeficient variace (C. V.) a podle něj byly vyřazeny vzorky, které měly koeficient variance (C. V.) vyšší než 20. Mimo to byly také vyřazeny vzorky, kde se jejich hodnota po odečtení blanku pohybovala v záporných hodnotách. Takto byly stanoveny koncentrace, které byly převedeny na 1 mm^3 nádoru. Koncentrace byla vypočtena v pg/ml.

5. VÝSLEDKY

5.1. Pozorování účinku R-848 a mannanu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6N

Graf na Obr. 3 znázorňuje vliv terapie pomocí R-848, mannan-BAM a jejich kombinace na redukci nádorového růstu. Z tohoto grafu je patrné, že mannan-BAM (skupina I., červený sloupec) samotný (bez R-848) neměl na redukci nádorového růstu žádný vliv. R-848 samotný (skupina II., žlutý sloupec) měl na počátku terapie vliv na redukci růstu nádorů, ovšem v závěru terapie došlo k vyrovnání hodnot s kontrolní skupinou (skupina IV., modrý sloupec). Ovšem kombinací mannan-BAM a R-848 (skupina III., zelený sloupec) došlo k signifikantní redukci nádorového růstu v porovnání s kontrolní skupinou (skupina IV., modrý sloupec) i s jednotlivými složkami použitými samostatně.



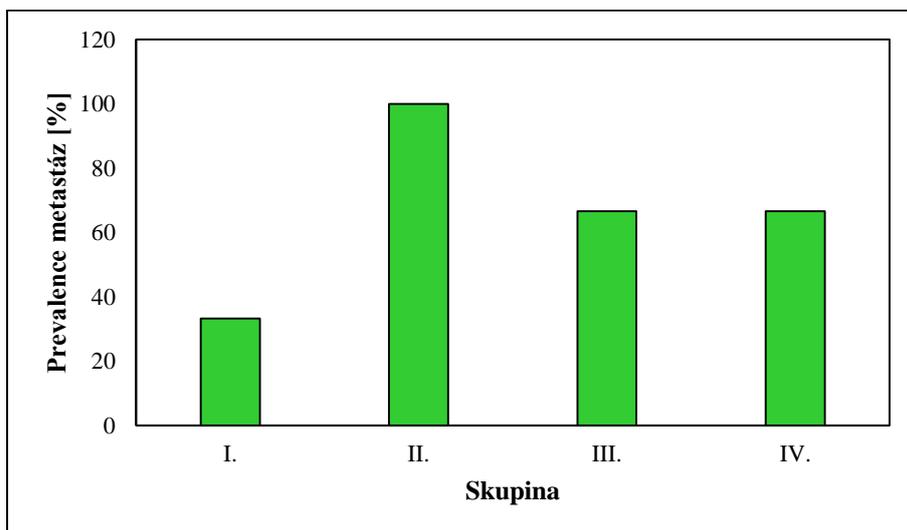
Obr. 3: Vliv terapie pomocí R-848, mannan-BAM a jejich kombinace na redukci růstu melanomů.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině I. (mannan-BAM), ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině I. (mannan-BAM), *** $P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině I. (mannan-BAM), o $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině II. (Resiquimod.HCl), oo $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině II. (Resiquimod.HCl), ◇ $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině IV. (PBS), ◇◇ $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině IV. (PBS), ◇◇◇ $P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině IV. (PBS).

Na Obr. 4 je graf pro zhodnocení prevalence metastáz v jednotlivých skupinách. Z grafu je patrné, že jednotlivé druhy léčby neměly na metastazování příliš vliv. Nicméně

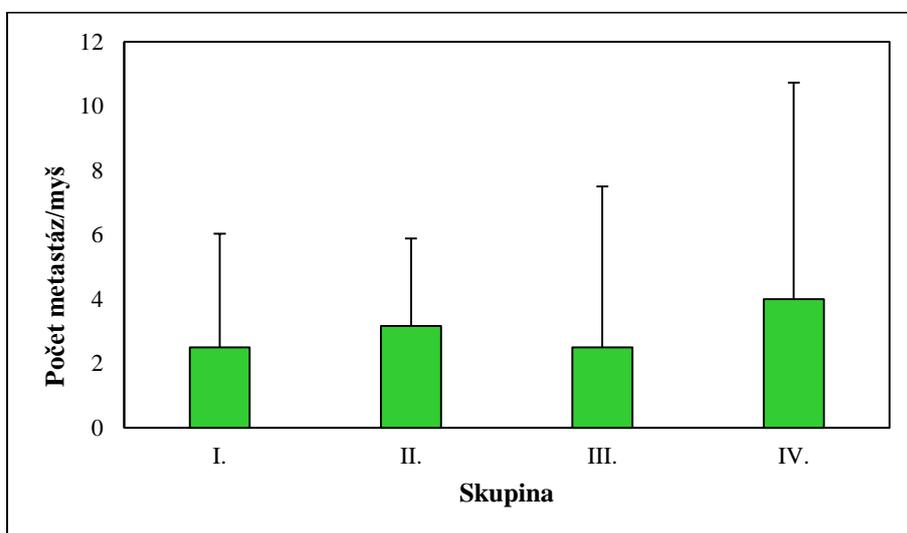
nejvyšší výskyt metastáz byl detekován u léčby Resiquimod.HCl, naopak nejnižší u léčby mannan/BAM. U kontrolní skupiny (PBS) a u terapie Resiquimod.HCl/mannan-BAM byl počet metastáz téměř shodný.

Co se týče počtu metastáz na myš v jednotlivých skupinách, nebyla zaznamenána žádná výrazná změna v závislosti na druhu aplikované látky, což je zřejmé z Obr. 5.



Obr. 4: Prevalence metastáz u léčených myší (den 30).

I. mannan-BAM, **II.** Resiquimod.HCl, **III.** Resiquimod.HCl / mannan-BAM, **IV.** PBS.



Obr. 5: Počet metastáz na myš u léčených myší (den 30).

I. mannan-BAM, **II.** Resiquimod.HCl, **III.** Resiquimod.HCl / mannan-BAM, **IV.** PBS.

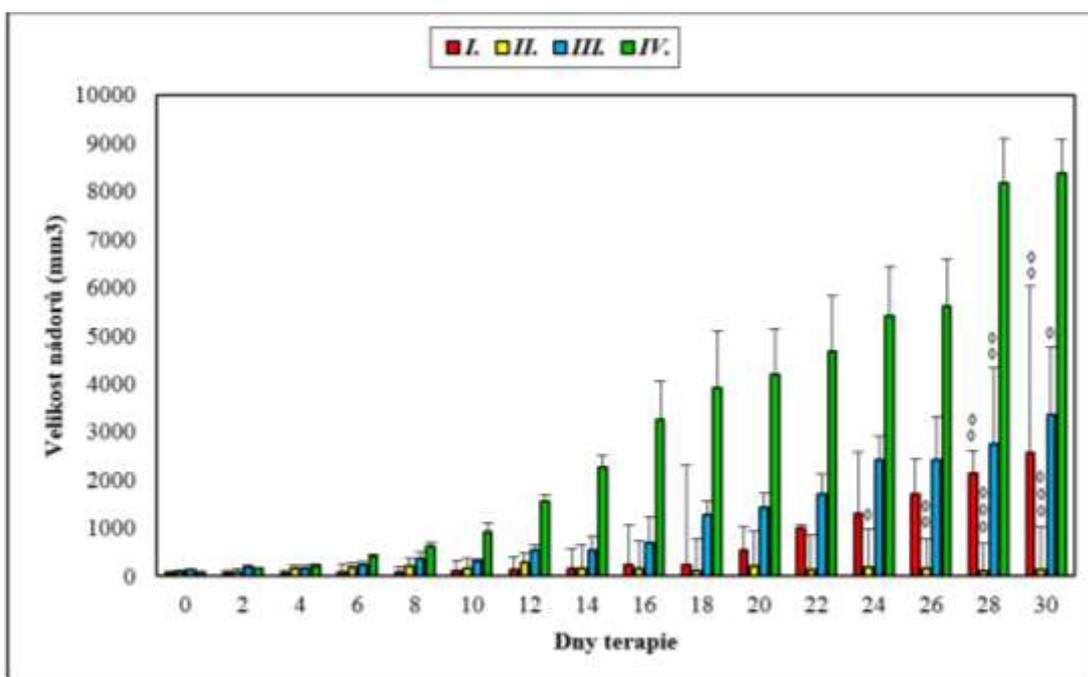
Dále byla vypočtena průměrná redukce objemu nádorů podle skupiny.

Skupina I.: 18,64 %; Skupina II.: 33,42 %; Skupina III.: 78,54 %.

5.2. Účinek R-848 a mannanu kotveného SMCC (pulzní aplikace) s perorálním přidáním beta glukanu nebo laminarinu na redukci nádorového růstu u myši C57BL/6N

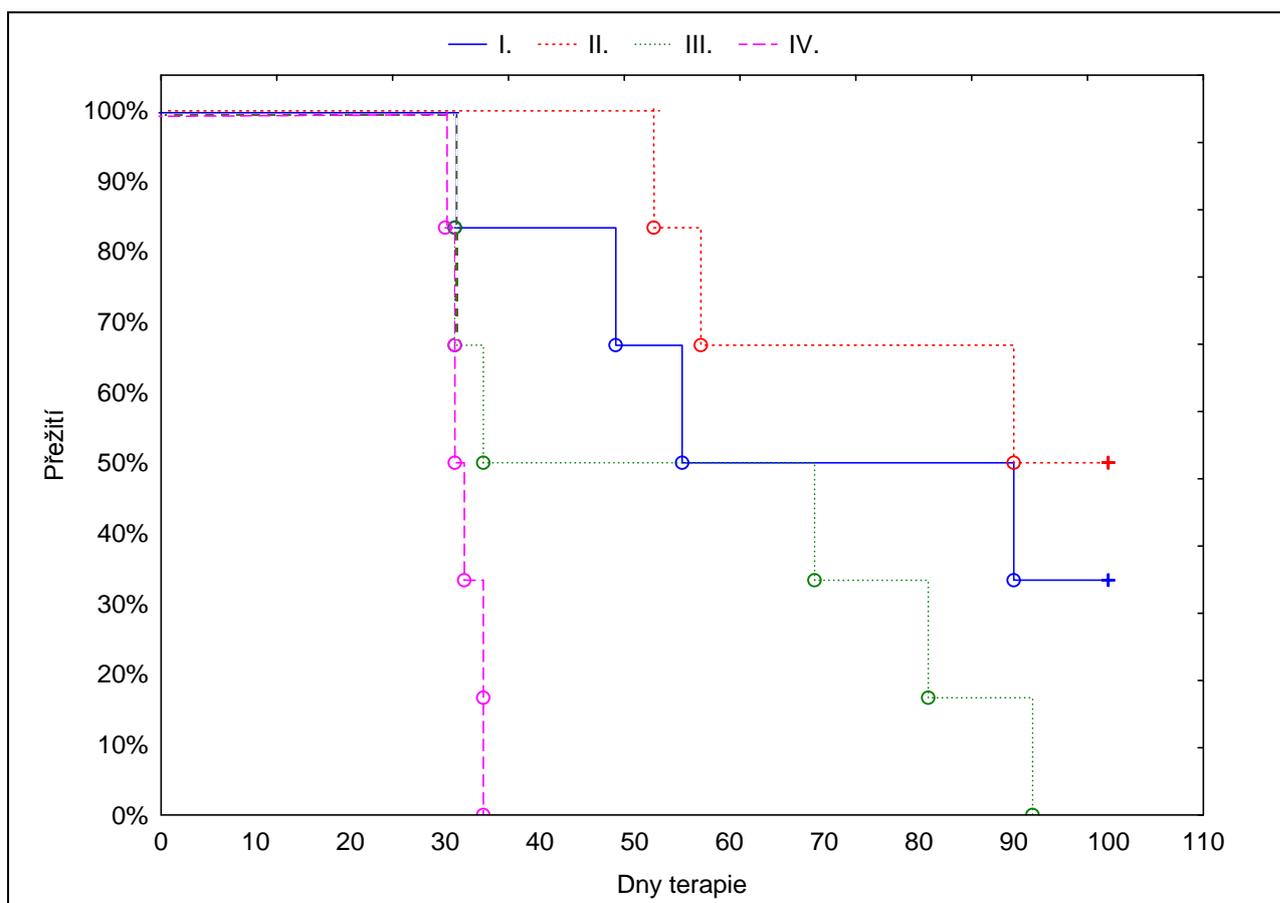
Obr. 6 znázorňuje vliv léčby na redukci nádorového růstu. V tomto pokusu byla použita intratumorální aplikace kombinace látek resiquimod.HCl/mannan-SMCC s aplikací TCEP v předstihu jedné hodiny. Tato terapie byla u některých skupin doplněna perorálním podáváním beta glukanu nebo laminarinu.

Jak je z grafu patrné, intratumorální aplikace kombinace látek resiquimod.HCl/mannan-SMCC (skupina I., červený sloupec) způsobuje redukci nádorového růstu oproti kontrolní skupině (skupina IV., zelený sloupec). Tento efekt je značně posílen perorální aplikací beta glukanu, kdy se redukce stává signifikantní oproti kontrolní skupině. V případě perorální aplikace Laminarinu (skupina III., modrý sloupec) nebylo dosaženo zvýšení redukce nádorového růstu oproti skupině resiquimod.HCl/mannan-SMCC (skupina I., červený sloupec).



Obr. 6: Vliv léčby R-848/mannan-SMCC v kombinaci s beta glukanem a laminarinem na redukci nádorového růstu. **I.** resiquimod.HCl / mannan-SMCC + TCEP, **II.** resiquimod.HCl / mannan-SMCC + beta glukan (perorálně), **III.** resiquimod.HCl / mannan-SMCC + laminarin (perorálně), **IV.** PBS. $\diamond P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině IV. (PBS), $\diamond\diamond P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině IV. (PBS), $\diamond\diamond\diamond P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině IV. (PBS).

Na Obr. 7 jsou znázorněny křivky přežití dle jednotlivých skupin. I zde je vidět pozitivní efekt podávání perorálního beta glukanu k terapeutické směsi resiquimod.HCl/mannan-SMCC (skupina II., červená přerušovaná křivka). V této skupině přežilo sto dní 50% jedinců. Ve skupině se samotnou kombinací resiquimod.HCl/mannan-SMCC (skupina I., modrá křivka) hranici sta dní přežili pouze dva jedinci ze šesti. Perorální podávání laminarinu s terapeutickou směsí resiquimod.HCl/mannan-SMCC (skupina III., zelená křivka) mělo dokonce horší efekt na přežití myši, než u skupiny bez laminarinu.



Obr. 7: Graf přežití (Kaplan – Meier) 100 dní.

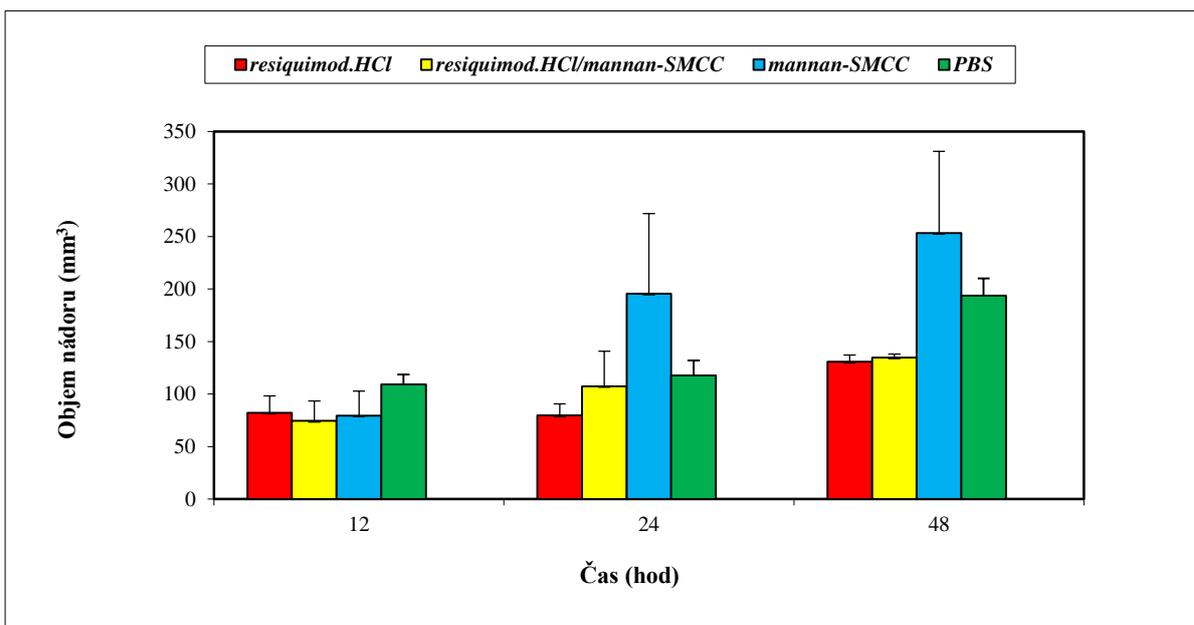
I. resiquimod.HCl/mannan-SMCC, **II.** resiquimod.HCl/mannan-SMCC + beta glukán (perorálně), **III.** resiquimod.HCl/mannan-SMCC + laminarin (perorálně), **IV.** PBS.

Byla provedena retransplantace nádorové linie B16-F10 v 142. den od počátku pokusu. Jednalo se pouze o 3 přeživší myši ze skupiny II (resiquimod.HCl/mannan-SMCC + beta glukán) a 2 myši ze skupiny I (resiquimod.HCl/mannan-SMCC). Nádor byl nalezen pouze u jedné myši ze skupiny I (resiquimod.HCl/mannan-SMCC), u ostatních myši byla retransplantace neúčinná.

5.3. Stanovení nádorové infiltrace v průběhu léčby s použitím směsi R-848 a mannanu kotveného pomocí SMCC (pulzní aplikace) u myši C57BL/6N

V tomto pokusu byl prováděn rozbor nádorového infiltrátu. Bylo stanovováno množství leukocytů a jejich subpopulací v závislosti na typu terapeutické látky.

Na Obr. 8 je uveden růst nádorů v průběhu pokusu. Z výsledků měření je zřejmé, že u všech skupin docházelo v průběhu času k nárůstu nádorové hmoty.

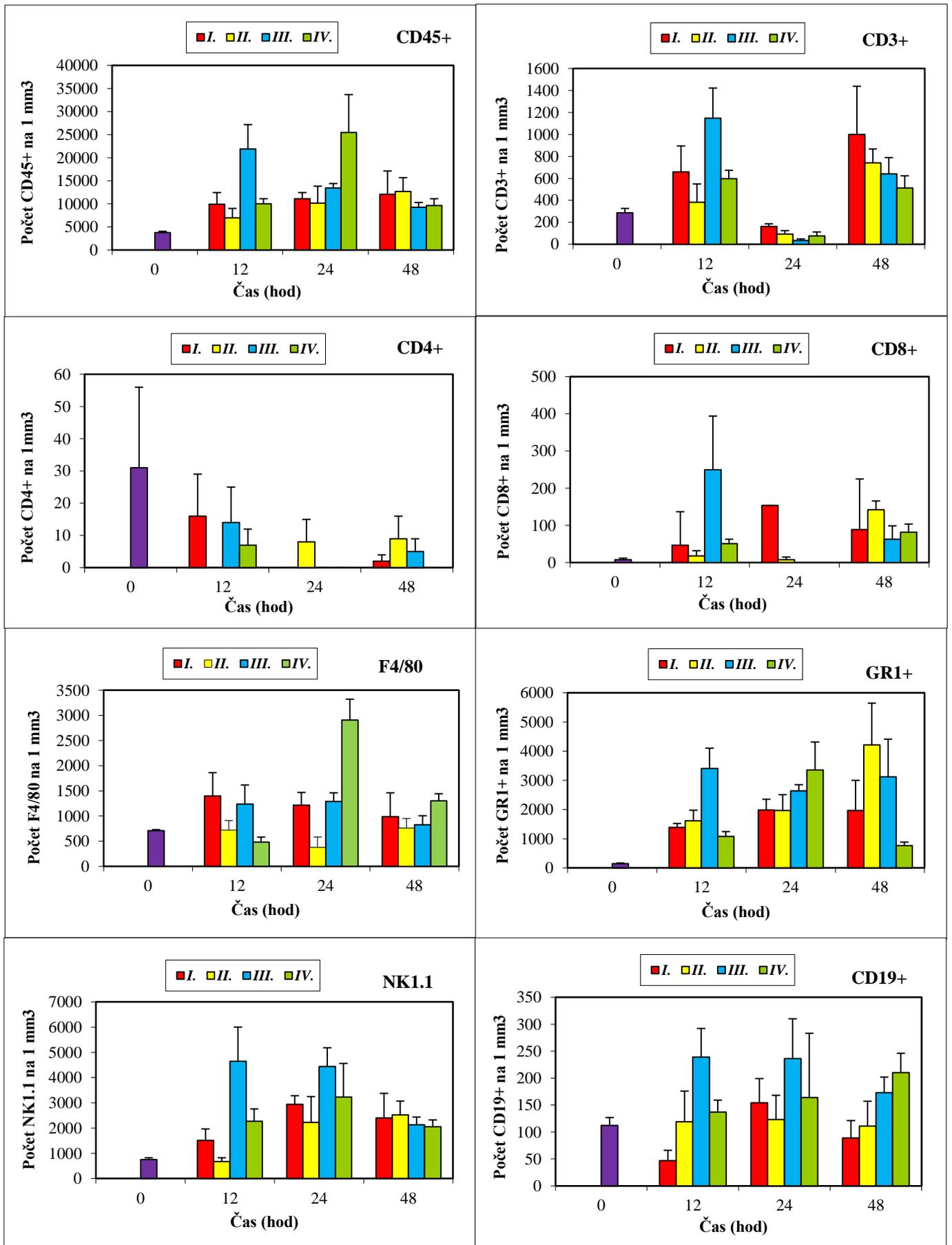


Obr. 8: Graf objemu nádoru (mm³) v časech 12, 24 a 48 hodin v průběhu nádorové infiltrace.

Na Obr. 9. lze vidět množství jednotlivých infiltrovaných buněk do melanomu v daných časových intervalech: leukocytů (CD45+), lymfocytů (CD3+), B lymfocytů (CD19+), Th lymfocytů (CD4+), Tc lymfocytů (CD8+), granulocytů (GR1+), monocytů/makrofágů (F4/80) a NK buněk (CD161+).

V periodě 12-48 hodin bylo u všech studovaných skupin pozorováno zvýšení celkových **leukocytů (CD45+)**.

U **lymfocytů (CD3+)** lze pozorovat mírný vzrůst jejich počtu v čase 12 hodin, který je znatelný zejména u skupiny I. (Resiquimod.HCl + TCEP, červený sloupec viz Obr. 9) a také u skupiny III. (mannan-SMCC, modrý sloupec viz Obr. 9). Naopak mírný pokles u všech testovaných skupin byl zaznamenán ve 24 hodinách s následným růstem ve 48 hodinách (opět všechny skupiny).



Obr. 9: Množstevní zastoupení jednotlivých infiltrovaných buněk do melanomu (leukocytů)

(CD 45+), lymfocytů (CD 3+), B lymfocytů (CD 19+), Th lymfocytů (CD 4+), Tc lymfocytů (CD 8+), granulocytů (GR 1+), monocytů/makrofágů (F4/80) a NK buněk (NK1.1)) léčeného níže uvedenými směsmi: **I.** resiquimod.HCl, **II.** resiquimod.HCl/mannan-SMCC, **III.** mannan-SMCC, **IV.** PBS.

U **Th lymfocytů (CD4+)** se v počtu buněk dostáváme řádově pouze k desítkám, proto je nelze hodnotit. Je nutno poznamenat, že v některých případech nebyly CD4+ buňky detekovány vůbec, jako například u skupiny II. V čase 12 hodin (resiquimod.HCl/mannan-SMCC, žlutý sloupec viz Obr. 9).

U **Tc lymfocytů (CD8+)** detekovaných ve dvanácti hodinách lze pozorovat vzestup u všech sledovaných skupin vůči kontrolnímu času 0 hodin. Ovšem opět u některých skupin (skupiny III. a IV.) nebyly v čase 24 hodin detekovány žádné Tc lymfocyty. Celkově nelze ale z tak nízkého počtu buněk vyvozovat závěry.

Monocyty a makrofágy (F4/80) mají relativně vyrovnané hodnoty ve všech skupinách. Lze však pozorovat určitý pokles v čase 24 hodin u skupiny III. (resiquimod.HCl/mannan-SMCC, modrý sloupec viz Obr. 9) a zároveň nápadný vzestup u skupiny kontrolní IV. (PBS, zelený sloupec viz Obr. 9).

Co se týče **Granulocytů (GR1+)** jsou zde spolu s NK buňkami a monocytů/makrofágy nejpočetnější skupinou buněk nádorového infiltrátu. Zejména u skupiny II. (resiquimod.HCl/mannan-SMCC, žlutý sloupec viz Obr. 9), dochází v průběhu času k vzrůstu počtu z počátečních 150 buněk v čase 0 až k cca 4000 GR1+ v čase 48 hodin.

NK buňky (NK1.1.) byly detekovány v počtech tisíců buněk. Určitý vrchol infiltrace NK buněk nastal u většiny skupin mezi 12. a 24. hodinou. Ve 48 hodinách naopak došlo k poklesu infiltrace.

B lymfocyty (CD19+) hodnoty jsou pro všechny skupiny poměrně vyrovnané až na skupiny I. a III. Zřejmý rozdíl je u skupiny I. (resiquimod.HCl, červený sloupec viz Obr. 9), kdy lze pozorovat menší pokles ve dvanácti hodinách. Naopak počty B lymfocytů mírně stoupají u skupiny III. (mannan-SMCC, modrý sloupec viz Obr. 9). Počty buněk zde však dosahují malých hodnot, proto nelze z těchto výsledků dělat závěry.

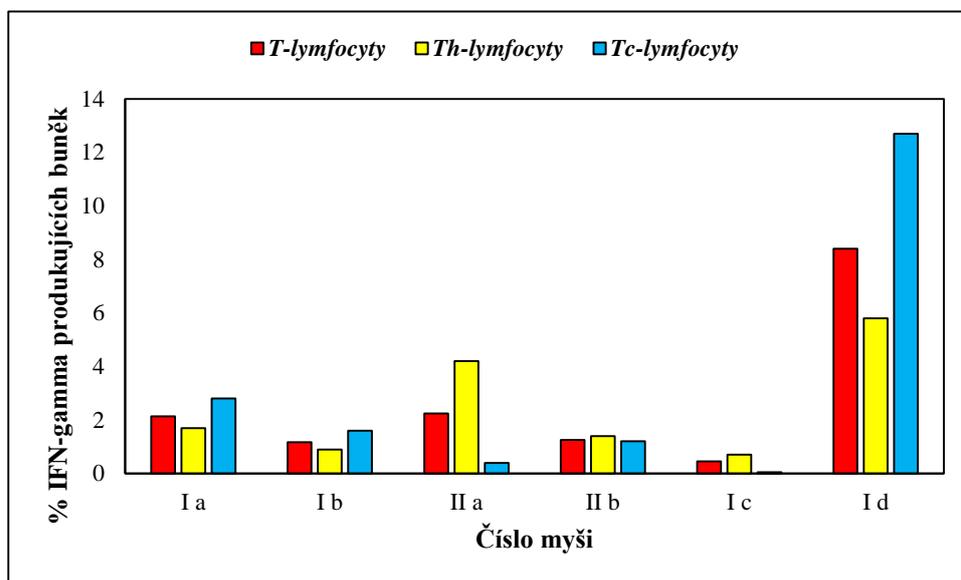
5.4. Metodické porovnání stanovení IFN-gamma pomocí metody ELISA a pomocí průtokového cytometru (intracelulárního stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen

Daná hladina byla detekována dvojím stanovením. Základní rozdíl těchto stanovení je citlivost jednotlivých metod.

Co se týká stanovení intracelulárního IFN-gamma pomocí průtokové cytometrie, jedná se o stanovení % buněk, reagujících na antigen produkcí IFN-gamma. Velkou výhodou je schopnost metody rozlišit procentuální produkci IFN-gamma u T lymfocytů pro Th a Tc lymfocyty.

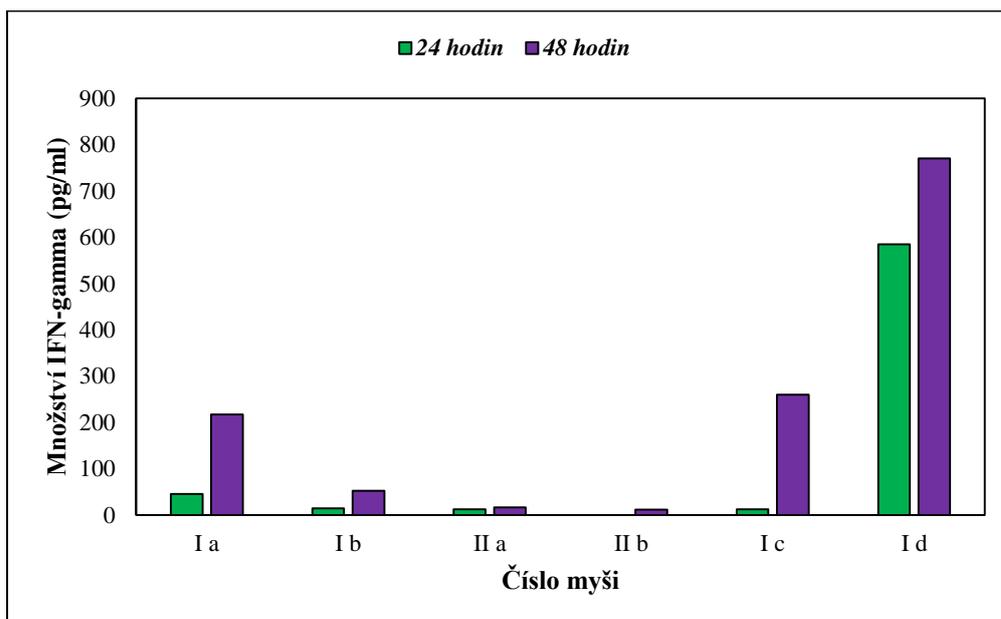
V případě stanovení IFN-gamma pomocí ELISA se jedná o stanovování množství extracelulárně produkovaného IFN-gamma **pg/ml**. Jedná se o supersenzitivní ELISA kit, tudíž je schopna určit i nepatrné množství IFN-gamma.

Pro porovnání byly připojeny grafy (Obr. 10, Obr. 11) z daných pokusů. Obr. 10 udává množství IFN-gamma stanovovaného intracelulárně s rozlišením produkce IFN-gamma T lymfocyty pro Th a Tc lymfocytární produkci.



Obr. 10: Stanovení množství IFN-gamma intracelulárně (%) s rozlišením produkce T lymfocyty, Th a Tc lymfocyty.

Obr. 11 znázorňuje stanovení pomocí supersenzitivního ELISA kitu. Ten udává množství v pg/ml.



Obr. 11: Stanovení množství IFN-gamma pomocí supersensitivní ELISA v jednotkách pg/ml.

Jednotlivé grafy (Obr. 10, Obr. 11) nelze porovnávat, díky různé citlivosti metod, ovšem je zřejmé, že produkce IFN-gamma u jednotlivých myši v porovnání navzájem koreluje. Citlivost obou metod je pro analýzu dostatečná.

Pro naši práci jsou ovšem přínosné výsledky obou stanovení. Velmi cenné je rozlišení produkce IFN-gamma Th a Tc lymfocyty, které umožňuje bližší vhled do imunitní reakce probíhající uvnitř léčených nádorů.

6. DISKUZE

Jak již bylo zmíněno, pracovní skupina doktora Ženky se již delší dobu věnuje nádorové imunoterapii. I tato práce navazuje na předešlý výzkum. V poslední době řeší tým doktora Ženky zejména náhradu LPS jako TLR agonisty. Jak je uvedeno v práci Janotové a kol. (Janotová a kol. 2014), LPS se zdá být jako terapeutikum velmi slibné a úspěšné. Nicméně díky toxicitě lipopolysacharidu bylo nutné ho nahradit. Jednou z možných náhrad se zdá být resiquimod.HCl.

Resiquimod.HCl (R-848.HCl) v kombinaci s mannan-BAM byl zkoumán u prvního pokusu. Zdá se, že R-848.HCl + mannan-BAM má na rozdíl od LPS + mannan-BAM delší dobu „nástupu“ léčebného efektu. LPS + mannan-BAM dosahuje terapeutického účinku již velmi brzy, jak je zřejmé z práce Janotové a kol. (Janotová a kol. 2014). Naopak u R-848.HCl + mannan-BAM si můžeme povšimnout první redukce nádorového růstu teprve až od pozdějších dní terapie. Na rozdíl od práce Glaserové (Glaserová 2015), která použila terapii pomocí R-848.HCl + mannan-BAM a jejich kombinace aplikovanou pouze ve dvou pulzech (dny 0, 1, 2 ... 8, 9, 10), zde byla použita terapie o 4 pulzech (dny 0, 1, 2 8, 9, 10 16, 17, 18 24, 25, 26). V prvních dnech byl průběh terapie podobný, ale pro nás zajímavějšími byly dny následující. Zatímco jednotlivé složky (R-848, mannan-BAM) prakticky přestaly fungovat, synergický efekt jejich směsi byl výrazný.

Druhý pokus se zabývá **využitím R-848.HCl v kombinaci s mannan-SMCC s perorálním podáním beta glukanu a laminarinu**. Xia a kol. (Xia a kol. 1999) ve své publikaci popisuje účinek fragmentů beta glukanu o Mw do 20 000, které se váží na lektinovou doménu komplement receptoru 3 (CR3), což výrazně stimuluje cytotoxické a fagocytární schopnosti buněk imunitního systému s tímto receptorem (makrofágy, neutrofilů, NK buňky).

Poměrně solidní úspěch beta glukanu podávaného perorálně v kombinaci R-848.HCl + mannan-SMCC na redukci nádorového růstu můžeme zaznamenat i u pokusů provedených v této bakalářské práci, důkazem je sto denní přežití 50% myši z této skupiny. Podobný účinek byl očekáván i u léčby pomocí perorálního podání laminarinu s R-848.HCl + mannan-SMCC. Tento předpoklad vycházel z poznatků kolegyně Kovářové a Vácové, které zkoumaly jeho využití *in vitro* pro aktivaci CR3 (Kovářová 2015,

Vácová 2015). Perorálně podávaný vysokomolekulární beta glukán je štěpen na fragmenty, které aktivují CR3 (viz výše, Xia a kol. 1999). Domnívali jsme se tudíž, že laminarin, který má molekuly o Mw 6000 by mohl přímo CR3 aktivovat, tak jak bylo popsáno *in vitro* v uvedených diplomových pracích Kovářové a Vácové (Kovářová 2015, Vácová 2015). Nicméně takového efektu nebylo dosaženo a je nutné dále zkoumat, čím byl tento neúspěch způsoben.

V třetím pokusu této bakalářské práce byla stanovována **nádorová infiltrace**. Záměrem tohoto pokusu bylo přiblížit si prostředí nádoru a určení buněk, které jsou do nádoru infiltrovány následkem léčby. Byly zkoumány jednotlivé složky léčebné suspenze samostatně i dohromady. U léčebné kombinace R-848.HCl + mannan-SMCC byl očekáván nejsilnější účinek. Tento předpoklad byl také potvrzen. Hlavní složku nádorového infiltrátu zde tvořily hlavně granulocyty, monocyty, makrofágy a NK buňky. Tato analýza navazuje na předchozí zkoumání vzájemných kombinací jednotlivých složek a to v kombinacích mannan-BAM + LPS (Janotová a kol. 2014), Zymosan-SMCC (Kovářová 2015) a Mycobacterium tuberculosis-SMCC (Jačková 2015).

Ve všech uvedených pracích včetně mé byl pozorován s terapií spojený silný leukocytární infiltrát, jehož nejdůležitější složkou byly granulocyty. Jejich nárůst byl nejsilnější v terapii založené na kombinaci mannan-BAM s LPS (Janotová a kol. 2014), následovala terapie pomocí Zymosanu-SMCC (Kovářová 2015). Naopak nejslabší aktivace bylo dosaženo u terapie založené na kombinaci Mycobacterium tuberculosis-SMCC (Jačková 2015). Rozdíly v infiltraci si vysvětlujeme jako důsledek synergického působení daných komplexů PAMPs na stimulaci tvorby prozánětlivých cytokinů. Je zřejmé, že k nejvýraznější stimulaci zánětlivé infiltrace je dosaženo tam, kde byl použit LPS.

Poslední, čtvrtý pokus se zabývá využitím **metod pro stanovení množství IFN-gamma**. Úkolem bylo zavést metody a prokázat jejich použitelnost. Důvodem testování směsi *Listeria monocytogenes*-SMCC, mannan-SMCC v PBS + R-848.HCl +POLY I:C byl velmi dobrý výsledek zjištěný kolegyní Kumžákovou (Kumžáková, 2015). Tato terapie mimo jiné velmi dobře fungovala i proti retransplantaci (120. a 500. den). Tudíž jsme se prostřednictvím těchto metod stanovení rozhodli testovat, zda u této terapie nedochází k přenosu informace na získanou imunitu a jak je tento jev silný. Bylo potřeba nejprve metody zavést a ověřit, zda jsou použitelné a zda je signál vůbec měřitelný. Zde byly porovnávány dvě metody, intracelulární stanovení lymfocytární produkce IFN-gamma po setkání

s antigenem pomocí průtokového cytometru a stanovení extracelulární produkce metodou ELISA. Jak již bylo uvedeno, základní rozdíl metod je citlivost. Supersenzitivní kit ELISA nám umožňuje zachytit i velmi nízké množství IFN-gamma, což je zajisté velikou výhodou. Naopak nevýhodou je bohužel absence rozlišení původu INF-gamma. Tedy neschopnost určit, jaký typ buněk interferon produkuje. Proto je pro naši skupinu velmi cenným přínosem stanovení IFN-gamma pomocí průtokového cytometru (intracelulárně). To nám umožňuje rozlišení produkce IFN-gamma celkovými, Th a Tc lymfocyty (v %). Výsledné hodnoty nelze mezi sebou porovnávat, díky odlišným jednotkám. Výstupem metody ELISA jsou hodnoty v pg/ml, naopak intracelulární stanovení udáváme, jak již bylo zmíněno, v procentech. Ovšem díky tomu, že pro oba pokusy byly použity stejné myši, lze odhadem porovnat, zda mezi sebou metody korelují. Tato poměrně dobrá korelace byla zaznamenána. Také můžeme porovnávat hodnoty naměřené při 24 a 48 hodinách. Takto docházíme k zjištění, že při 48 hodinách se množství INF-gamma spíše zvyšuje. Nejen díky tomu lze také uvažovat o již zmíněném přenosu na získanou imunitu. Můžeme porovnávat množství INF-gamma u léčených myši 32. den a 78. den. Sedmdesátý - osmý den pozorujeme u myši vyšší množství interferonu než den 32. Tento fakt nejspíše značí uplatnění získané imunity při tvorbě sekundární imunitní odpovědi. Naši teorii by také stvrzovala již zmiňovaná neúspěšná retransplantace 120. a 500. den. Přenos informace na získanou imunitu nacházíme i v publikaci Fucikove a kol. (Fucikova a kol. 2014). Otázkou zůstává použití negativních kontrol bez antigenů při budoucím opakování intracelulárního stanovení, jak uvádí ve své publikaci Fucikova a kol. (Fucikova a kol. 2014). Tyto negativní kontroly sice poskytují slabý signál, ale je třeba je zařadit. Celkově tedy můžeme konstatovat, že obě metody jsou dostatečně citlivé, korelují a poskytují možnost sledování přenosu informace na získanou imunitu v průběhu terapie.

7. ZÁVĚR

- Vhodnou náhradou LPS se zdá být resiquimod.HCl, který se úspěšně uplatňuje zejména při dlouhodobější imunoterapii melanomů.
- Perorální podání beta glukanu významně zesiluje účinek terapie založené na kombinaci resiquimodu s kotveným mannanem.
- Perorální podání laminarinu bohužel nedosáhlo kýženého účinku.
- Analýzou nádorové infiltrace při léčbě mannan-SMCC + R-848.HCl bylo vyšetřeno zvýšené množství granulocytů, monocytů, makrofágů a NK buněk. Pomocí této terapie je tedy stimulována nespecifická imunita.
- Byly zavedeny dvě metody na stanovení lymfocytární produkce IFN-gamma v reakci na nádorový antigen. Obě metody (intra- a extracelulární produkce jsou dostatečně citlivé a vzájemně spolu korelují.
- Výhodou metody stanovení intracelulární produkce (průtoková cytometrie) je rozlišení IFN-gamma produkujících buněk (CD8+, CD4+).
- Detekci extracelulárního IFN-gamma je vhodnější provádět po 48 hodinové interakci lymfocytů s nádorovým antigenem.
- Při použití terapie založené na směsi Listeria monocytogenes-SMCC + mannan-SMCC + R-848.HCl + POLY I:C dochází pravděpodobně k přenosu informace na specifickou imunitu, tento poznatek bude ale třeba dále ověřit.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ADCC** = na protilátkách závislá cytotoxicita (antibody-dependent cytotoxicity)
- APC** = antigen prezentující buňky (antigen presenting cells)
- ALM** = akrolentigimózní melanom
- B16-F10** = nádorová linie myšího melanomu
- BCR** = B buněčný receptor
- C57BL/6N** = imbreďní myší linie
- CNS** = centrální nervová soustava
- CTL** = cytotoxické T lymfocyty (cytotoxic T lymphocytes)
- CTLA-4** = cytotoxický T-lymfocytární antigen 4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
- CR 3** = komplementový receptor 3 (complement receptor 3)
- CRP** = C reaktivní protein
- DAMPs** = s nebezpečím asociované molekulární vzory (danger-associated molecular patterns)
- ELISA** = metoda (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- Fas-L** = Fas ligand
- G-CSF** = granulocyt – kolonie stimulující faktor (granulocyte-colony stimulating factor)
- GM-CSF** = granulocyt/makrofág – kolonie stimulující faktor (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor)
- HIF 1** = hypoxií vyvolaný faktor 1 (Hypoxia-inducible factor 1)
- IFN–alfa, beta, gamma** = interferon alfa, beta, gamma
- IL** = interleukin
- IS** = imunitní systém
- LMM** = lentigo maligní melanom
- LPS** = lipopolysacharid
- MBL** = manózu vázající lektin (mannan binding lectin)
- MDSC** = myeloidní tlumivé buňky (myeloid-derived suppressor cells)
- MHC I, II** = hlavní histokompatibilní komplex (main histocompatibility complex)
- MR** = manózový receptor
- MS Excel** = Microsoft Excel

NB = nádorové buňky
NK buňky (NK1.1) = přirození zabíječi (natural killers)
NLR = NOD-like receptory
NM = nodulární melanom
PAMPs = s patogenem-asociované molekulární vzory (pathogen-associated molecular patterns)
PD-1 = protein pro programovanou buněčnou smrt 1 (programmed cell death protein 1)
PRRs = vzory rozpoznávající receptor (pattern-recognition receptor)
PNS = periferní nervová soustava
RLR = RIG-like receptory
SSM = superficiálně se šířící melanom
TAA = antigeny asociované s nádory (tumor-associated antigens)
TGF- β = transformační růstový faktor β (transforming-growth factor β)
TLR = toll-like receptory
TNF- α = tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TSA = antigeny specifické pro nádor (tumor-specific antigens)
Treg = T regulační lymfocyty
VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

9. LITERATURA

Abouelmaatti, R., Elfeil, W., Liu, S., & Wang, Y. Pattern Recognition Receptors mini review.

Ahonen, C. L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, L. K., Lindh, J. M., Tomai, M. A., & Vasilakos, J. P. (1999). Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cellular immunology*, 197(1), 62-72.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Allen, A. C., & Spitz, S. (1953). Malignant melanoma. A clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer*, 6(1), 1-45.

Agarwala, S. S., & Kirkwood, J. M. (1999, December). Update on the role of adjuvant interferon for high risk melanoma. In *Forum (Genoa, Italy)* (Vol. 10, No. 3, pp. 230-239).

Autier, P., for Epimel, D., & Eortc Melanoma Cooperative Group, J. F. (1998). Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. *International Journal of Cancer*, 77(4), 533-537.

Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., ... & Liao, F. (1998). Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*, 9(1), 25-34.

Ditrichová, D., & Tichý, M. (2006). Maligní melanom – nejzhubnější kožní nádor. *Interní medicína*, 7 a 8: 352-354.

Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514-525.

Erickson, C., & Driscoll, M. S. (2010). Melanoma epidemic: facts and controversies. *Clinics in dermatology*, 28(3), 281-286.

Ferenčík, M. (2005). *Imunitní systém: informace pro každého*. Grada Publishing as.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer*, 49(6), 1374-1403.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., ... & Horton, H. F. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1027-1034.
- Fucikova, J., Moserova, I., Truxova, I., Hermanova, I., Vancurova, I., Partlova, S., ... & Rob, L. (2014). High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer*, 135(5), 1165-1177.
- Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L., & Marr, K. A. (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3717-3724.
- Glaserová, S. (2015). Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů (Diplomová práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927-930.
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.
- Hearing, V. J., & Leong, S. P. (2007). *From melanocytes to melanoma: the progression to malignancy*. Springer Science & Business Media.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., ... & Akerley, W. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8), 711-723.

- Hood, L., Kronenberg, M., & Hunkapiller, T. (1985). T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell*, 40(2), 225-229.
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268-1273.
- Hořejší, V. Protinádorové zbraně imunitního systému. *KLINICKÁ ONKOLOGIE*, 15.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563-572.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., ... & Rozsypalová, P. (2014). The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PloS one*, 9(1), e85222.
- Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1572(2), 401-413.
- Kim, J. W., & Dang, C. V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer research*, 66(18), 8927-8930.
- Klabusay, M. Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi. *KLINICKÁ ONKOLOGIE*, 23.
- Knudson, A. G. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*, 45(4), 1437-1443.
- Kovářová, M. (2015). Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii (Diplomová práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Kumžáková, Z. (2015). Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně (Diplomová práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Lodoen, M. B., & Lanier, L. L. (2006). Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current opinion in immunology*, 18(4), 391-398.

- Lee, C. D. (2014). Recent developments and best practice in brachytherapy treatment planning. *The British journal of radiology*, 87(1041), 20140146.
- Li, J., Piao, Y. F., Jiang, Z., Chen, L., & Sun, H. B. (2009). Silencing of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses growth of human hepatocellular carcinoma in tumor-bearing nude mice. *World J Gastroenterol*, 15(21), 2602-2608.
- Mantovani, A., & Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current opinion in immunology*, 22(2), 231-237.
- Martins, F. C., & de Oliveira, C. F. (2008). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European journal of gynaecological oncology*, 30(1), 5-8.
- Massagué, J. (2008). TGF β in cancer. *Cell*, 134(2), 215-230.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *cell*, 91(3), 295-298.
- Meyer, T., Merkel, S., Goehl, J., & Hohenberger, W. (2000). Surgical therapy for distant metastases of malignant melanoma. *Cancer*, 89(9), 1983-1991.
- Neller, M. A., López, J. A., & Schmidt, C. W. (2008, October). Antigens for cancer immunotherapy. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 5, pp. 286-295). Academic Press.
- Nordling, C. O. (1953). A new theory on the cancer-inducing mechanism. *British journal of cancer*, 7(1), 68.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Beury, D. W., & Clements, V. K. (2012, August). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 22, No. 4, pp. 275-281). Academic Press.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 265-277.

- Papavramidou, N., Papavramidis, T., & Demetriou, T. (2010). Ancient Greek and Greco-Roman methods in modern surgical treatment of cancer. *Annals of surgical oncology*, 17(3), 665-667.
- Ross, G. D., Cain, J. A., & Lachmann, P. J. (1985). Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *The Journal of Immunology*, 134(5), 3307-3315.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews cancer*, 3(10), 721-732.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, 96, 41-101.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., & Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological reviews*, 202(1), 275-293.
- Southam, C. M. (1960). Relationships of immunology to cancer: a review. *Cancer research*, 20(3 Part 1), 271-291.
- Spandidos, D. A., & Anderson, M. L. (1989). Oncogenes and onco-suppressor genes: Their involvement in cancer. *The Journal of pathology*, 157(1), 1-10.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), 425-434.
- Šťastný, M., & Říhová, B. Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *KLINICKÁ ONKOLOGIE*, 28.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*, 249(1), 158-175.
- Tucker, M. A., & Goldstein, A. M. (2003). Melanoma etiology: where are we?. *Oncogene*, 22(20), 3042-3052.

Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799-809.

Trichopoulos, D., Li, F. P., & Hunter, D. J. (1996). What causes cancer?. *Scientific American*, 275(3), 80-84.

Vácová, N. (2015). Použití agonistů fagocytárních receptorů pro terapii nádorových onemocnění a studium možnosti zesílení jejich účinků současnou stimulací TLR receptorů (Diplomová práce). České Budějovice: PřF JČU.

Vilček, J., & Feldmann, M. (2004). Historical review: cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*, 25(4), 201-209.

Vorlíček, J., Abrahámová, J., & Vorlíčková, H. (2006). *Klinická onkologie pro sestry*. Grada Publishing as.

Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 317-327.

Wold, K. S., Byers, T., Crane, L. A., & Ahnen, D. (2005). What do cancer survivors believe causes cancer?(United States). *Cancer Causes & Control*, 16(2), 115-123.

Xia, Y., Větvička, V., Yan, J., Hanikýřová, M., Mayadas, T., & Ross, G. D. (1999). The β -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *The Journal of Immunology*, 162(4), 2281-2290.

Zeidman, I. (1957). Metastasis: A review of recent advances. *Cancer research*, 17(3), 157-162.