

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Nádorová imunoterapie a možnosti zesílení jejího účinku

Diplomová práce

Bc. Karolína Kvardová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2018

Kvardová K., 2018: Nádorová imunoterapie a možnosti zesílení jejího účinku. [Cancer immunotherapy and the possibility of enhancing its effect. Mgr. Thesis, in Czech] - 86 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation:

The aim of this thesis was to study cancer immunotherapy based on combination of TLR7 signalling and activation of phagocytosis of cancer cells. This thesis was focused on the possibility of enhancing its effect. The possibilities of removing immunosuppressive barriers (esp. MDSCs and adenosine) were studied, using a combination with chemotherapy or enzyme - adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase. The effect of enzymes was studied in both *in vivo* and *in vitro* experiments. As another way of optimizing the therapy used so far, the modulation of the therapeutic mixture using lower molecular weight substances was tried.

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích, 12. dubna 2018

.....

Bc. Karolína Kvardová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla v první řadě poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. nejen za odborné vedení mé diplomové práce, ale i za jeho nekonečnou trpělivost, ochotu kdykoliv poskytnout cenné rady i věčný životní optimismus. Poděkování patří i Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za jeho spolupráci a poskytnutí konzultací při analyzování vzorků pomocí metody LC-MS. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegyním za skvělou spolupráci a obrovský dík patří моým rodičům, kteří mi umožnili studium a po celou dobu jeho trvání mě plně podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	PŘEHLED LITERATURY	2
2.1	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	2
2.1.1	Vznik a rozvoj nádorových onemocnění	2
2.1.1.1	<i>Onkogeny a tumorsupresorové geny</i>	2
2.1.1.2	<i>Kancerogeny</i>	3
2.1.2	Klasifikace nádorových onemocnění.....	3
2.1.3	Nádorové linie studované v této práci	4
2.2	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A IMUNITNÍ SYSTÉM	4
2.2.1	Hlavní složky imunitního systému a jejich mechanismy	5
2.2.1.1	<i>Nespecifická (vrozená) imunitní odpověď</i>	5
2.2.1.2	<i>Specifická (adaptivní, získaná) imunitní odpověď</i>	6
2.2.2	Interakce nádorových buněk s imunitním systémem	8
2.2.3	Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému	8
2.2.4	Antitumorové mechanismy imunitního systému.....	10
2.2.4.1	<i>Nádorové antigeny</i>	10
2.2.4.2	<i>Buňky imunitního systému bojující s nádorem</i>	11
2.2.4.3	<i>Cytokiny</i>	13
2.3	NÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE.....	14
2.3.1	Nádorová imunoterapie založená na nespecifické imunitě	15
2.3.1.1	<i>PAMPs a DAMPs</i>	15
2.3.1.2	<i>Pattern recognition receptors</i>	15
2.3.2	Nádorová imunoterapie studovaná v této práci	18
2.3.2.1	<i>Charakteristika základní dosud užívané terapeutické směsi</i>	18
2.3.2.2	<i>Možnosti optimalizace nádorové imunoterapie studované v této práci</i>	20
3	CÍLE PRÁCE	24

4	MATERIÁL A METODY.....	25
4.1	Chemikálie.....	25
4.2	Laboratorní zvířata.....	26
4.3	Buněčné linie B16-F10 a Panc02 užívané při pokusech.....	26
4.4	Příprava nádorových buněk pro <i>in vivo</i> experimenty.....	26
4.5	Transplantace nádorových buněk pro <i>in vivo</i> experimenty.....	27
4.6	Příprava látek pro terapii.....	27
4.7	Měření velikosti nádorů.....	29
4.8	Hodnocení metastáz na plicích.....	29
4.9	Výpočet průměrné redukce nádorového růstu.....	29
4.10	Analýza dat.....	29
4.11	Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu pomocí LC-MS (LC-MS/MS).....	30
4.11.1	Princip LC-MS (LC-MS/MS) metody.....	30
4.11.2	Použité chemikálie a činidla.....	31
4.11.3	Odběr nádorů využitých na přípravu vzorků pro LC-MS (LC-MS/MS).....	31
4.11.4	Příprava vzorků pro detekci adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí.....	32
4.11.5	Příprava vzorků pro analýzu aktivity enzymu PNP a PNP-BAM.....	32
4.11.6	Vyhodnocení naměřených hodnot pomocí LC-MS/MS.....	33
4.12	Stanovení aktivity ADA a ADA-BAM.....	33
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
5.1	Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a gemcitabinu s následným zaměřením na sledování výskytu metastáz.....	34
5.2	Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu adenosindeaminázy (ADA).....	35
5.3	Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu purinnukleosid-fosforylázy (PNP).....	36
5.4	Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymu ADA-BAM.....	36

5.5	Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM.....	36
5.6	Vliv přidání enzymu ADA-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu. .	37
5.7	Vliv přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.....	38
5.8	Modulace základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA pomocí látek s nižší molekulovou hmotností (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE a fMLFKK-DOPE) při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu.	39
6	VÝSLEDKY.....	40
6.1	Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a gemcitabinu s následným zaměřením na sledování výskytu metastáz.....	40
6.2	Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu adenosindeaminázy (ADA)	44
6.3	Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu purinnukleosid-fosforylázy (PNP).....	45
6.4	Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymu ADA-BAM	46
6.5	Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM.....	48
6.6	Vliv přidání enzymu ADA-BAM k základní terapeutické směsi R-848.HCl, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.....	50
6.7	Vliv přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.....	53
6.8	Modulace základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA pomocí látek s nižší molekulovou hmotností (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE a fMLFKK-DOPE) při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu.	56
7	DISKUZE.....	59
8	ZÁVĚR.....	66

9	SEZNAM ZKRATEK	67
10	PŘEHLED LITERATURY	70

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění ročně postihnou tisíce pacientů. V českých tabulkách dlouhodobě vévodí především karcinomy tlustého střeva a konečníku, karcinomy prsu u žen a zhoubné nádory prostaty u mužů. Nově hlášené případy se podle statistických údajů neustále stupňují do alarmujících rovin, ovšem podle České onkologické společnosti úmrtnost na nádorová onemocnění dlouhodobě stagnuje a rakovina se stává smrtelnou pro téměř 27 000 pacientů ročně.

Absolutní vyléčení všech nádorů se zdá být v současné době prozatím nemožné. Nádorové buňky se velmi efektivně dokážou bránit různým formám léčby, např. na základě multi-drug rezistence jsou schopné odolávat chemoterapii a mají i řadu mechanismů úniku.

Díky novým poznatkům a moderním metodám v oblasti léčby dokážeme v současnosti výrazně ovlivnit léčbu pacientů. Naděje na přežití či výrazné prodloužení života se zvyšují. Obrovskou roli v tom zastává především včasné zachycení. Díky prevenci jsou mnohdy odhaleny i nádory v tzv. spícím stadiu, kdy buňky ještě nezačaly bujet, a léčba je poté pro pacienta mnohem jednodušší. Čím dříve je nádor zachycen, tím nižší je riziko zakládání ložisek metastáz, které jsou v současnosti největším problémem léčby.

Snahy o nalezení nejvhodnější léčby jsou patrné ve většině zemí světa. V současnosti je velký důraz kladen na vyvinutí léčby, která by dokázala pracovat s vlastními imunitními mechanismy a aktivovala tak protinádorové reakce. Jedná se o tzv. cílenou imunoterapii.

Imunoterapie je již dlouhá léta využívána v léčbě nádorových onemocnění. Existuje mnoho přístupů a mechanismů, které mají všechny společný cíl, a to zničit nádorové buňky. Hlavním předmětem této práce je imunoterapie využívající nespecifickou imunitní odpověď, která je založena na kombinaci TLR7 signalizace a aktivace fagocytárních receptorů. Dále jsou sledovány další možnosti optimalizace této terapie.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Nádorová onemocnění (rakovina či zhoubný novotvar) jsou velmi heterogenní skupinou onemocnění. Rozvíjejí se z vlastní tělní tkáně, kde dochází ke změně přirozených vlastností buněk a jejich nekontrolovatelnému množení. Tyto nově vzniklé abnormální buňky jsou označovány jako buňky nádorové.

U nádorových buněk bylo zaznamenáno několik společných charakteristických znaků objevujících se u většiny nádorů. Nádorové buňky jsou soběstačné v produkci růstových faktorů a jsou schopné neomezené replikace. Jako další znak můžeme uvést jejich necitlivost vůči signálům bránícím jejich proliferaci. Specifická je rovněž jejich rezistentce vůči apoptóze a schopnost vyvolat angiogenezi. U většiny nádorů nelze opomenout jejich invazivitu a schopnost metastazovat (Hanahan a Weinberg, 2000).

Mimo tyto základní charakteristiky jsou nádorovým buňkám připisovány i další vlastnosti, např. poškození regulací buněčného metabolismu, nestabilita genomu nádorových buněk, jejich únik imunitnímu systému či indukce zánětu v nádorovém prostředí (Hanahan a Weinberg, 2011).

2.1.1 Vznik a rozvoj nádorových onemocnění

Za příčinu rozvoje nádorových onemocnění, tzv. kancerogeneze, je považována akumulace mutací DNA v somatické buňce (Hemminki, 1993), která následně vyvolává změny v genech. Buňky se změněnými geny se přednostně mnohonásobně dělí a vytváří klon. Akumulací dalších mutací získávají klonální buňky selekční výhodu růstu a nakonec i schopnost invazivity a metastazování (Greaves a kol., 2012).

V 70. letech byly objeveny 2 skupiny genů, u nichž bylo prokázáno, že nahromadění mutací právě v nich vede k nádorovému bujení. Jedná se o onkogeny a tumor-supresorové geny (Sudhakar, 2009). Rozvoj nádorových onemocnění ovšem není dán pouze postupným nahromaděním mutací specifických genů, ale i působením vlivů epigenetických, kdy dochází ke změně exprese specifických genů působením kancerogenů (Ames a Gold, 1997).

2.1.1.1 *Onkogeny a tumorsupresorové geny*

Onkogeny vznikají v důsledku mutace, delece, translokace či zvýšené exprese správně fungujících lidských genů, tzv. protoonkogenů (Croce, 2008). V momentě přeměny těchto genů na onkogeny dochází k tomu, že se zdravá buňka vymyká kontrole a dochází k jejímu nekontrolovatelnému množení (Monier, 2009). Produkty onkogenů (např. růstové

faktory a jejich receptory, transkripční faktory či regulátory apoptózy) mají následně dopad na průběh buněčného cyklu, kde se podílejí zejména na jeho regulaci či diferenciaci buněk a jejich apoptóze (Croce, 2008).

Tumorsupresorové geny se podílejí především na kódování proteinů regulujících buněčný cyklus a proteinů indukujících apoptózu buňky (Park a Vogelstein, 2003). Nesporný vliv mají rovněž na reparaci poškozené DNA v průběhu cyklu (Sudhakar, 2009). Obecně mutace tumorsupresorových genů, stejně jako onkogenů, vede k následné neomezené proliferaci buněk (Hinds a Vogelstein, 1994). Na rozdíl od onkogenů ovšem Knudsonova teorie ukazuje, že k projevu mutace je zapotřebí inaktivace obou alel těchto genů (Knudson, 1971).

Podle novější teorie Kinzlera a Vogelsteina (1977) lze tumorsupresorové geny rozdělit na 2 skupiny - gatekeepers a caretakers. Gatekeeper, označovaný jako vrátný, má vliv na řízení buněčného cyklu a reguluje růst nádoru. Inaktivací obou alel v tomto genu dochází k nekontrolovatelnému množení buněk. Naopak caretaker, tzv. strážce, se nepodílí přímo na řízení cyklu, ale opravuje poškozenou DNA v průběhu rozmnožování buněk. Díky inaktivaci obou alel tohoto genu není buňka schopna opravit genetickou změnu v DNA a výrazně se zvyšuje riziko maligní mutace (Kinzler a Vogelstein, 1977).

2.1.1.2 Kancerogeny

Látky ve smyslu kancerogenů jsou specifické faktory mající schopnost indukovat vznik mutací. Podle jejich vlastností je můžeme rozlišit na biologické, chemické a fyzikální.

Do skupiny **biologických kancerogenů** můžeme zařadit např. viry - lidský papilomavirus (HPV), virus Epstein-Barrová či herpesvirus Kaposiho sarkomu (Pagano a kol., 2004). Na rozvoj nádorového bujení mohou mít vliv i některé bakterie, např. *Helicobacter pylori*. (Forman a kol., 1991). Za **chemické kancerogeny** jsou považovány např. aromatické aminy či polycyklické aromatické uhlovodíky (Hemminki, 1993) a jako **fyzikální kancerogeny** můžeme uvést např. UV záření či ionizační záření (El Ghissassi a kol., 2009).

2.1.2 Klasifikace nádorových onemocnění

Klasifikace nádorových onemocnění je velmi složitá především kvůli rozmanitému množství novotvarů.

Nejčastějším kritériem klasifikace nádorových onemocnění jsou jejich **biologické vlastnosti**. Z tohoto pohledu rozlišujeme nádory benigní a maligní. Benigní (nezhoubné)

jsou charakterizovány tím, že obvykle zůstávají v podobě ohraničeného primárního nádoru a neinvadují do okolní tkáně. Naopak maligní (zhoubné) nádory ohraničené nejsou a velmi rychle se šíří krevními i lymfatickými cestami po celém těle, kde zakládají nová ložiska, tzv. metastázy.

Dalším kritériem pro klasifikaci nádorů může být jejich **tkáňový původ**. Z tohoto hlediska rozlišujeme nádory epitelové či neuroektodermové, dále nádory pojivových tkání či krevní a lymfatické tkáně (Sell, 2004).

U pacientů můžeme rozdělit nádory rovněž podle jejich **orgánové lokalizace**. Jedná se např. o nádory prsu, varlat, plic, žaludku, tlustého střeva a konečníku, močového měchýře, pankreatu či kůže apod. (Siegel a kol., 2015).

2.1.3 Nádorové linie studované v této práci

V našem výzkumu pracujeme se dvěma typy nádorů - maligním melanomem a pankreatickým adenokarcinomem.

V případě maligního melanomu, který je vysoce agresivní vůči terapii rezistentní nádor z melanocytů (Markovic a kol., 2007), je využívána myší linie nádorových buněk B16-F10. Tato melanomová linie je charakteristická svou zvýšenou invazivitou a následnou tvorbou plicních metastáz (Fidler, 1975).

Pankreatický adenokarcinom patří v současnosti mezi jeden z nejhůře léčitelných nádorů. Tento fakt je ovlivněn jeho pozdní manifestací a schopností velmi rychle metastazovat, zejména do jater. V našem případě je studován myší model Panc02, který je považován za jeden z nejagresivnějších nádorů vůbec. Charakteristická je pro něj, mimo výše uvedené vlastnosti, i vysoká denzita nádorové tkáně, čímž je průnik terapeutických látek výrazně snížen (Partecke a kol., 2011).

2.2 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je velice komplexní mechanismus vyvinutý u většiny organismů. Jeho hlavním úkolem je zachování integrity organismu, dále rozpoznání a následná eliminace tzv. cizích materiálů, které jsou pro jedince nebezpečné. Imunitní systém brání organismus nejen proti infekcím, ale i proti nádorům. Nádorová tkáň ovšem vychází z vlastní tkáně organismu, což činí imunitnímu systému velké problémy s identifikací této tkáně jako potencionálně škodlivé a stimul k zahájení imunitního ataku není dostatečný.

2.2.1 Hlavní složky imunitního systému a jejich mechanismy

Imunitní systém jedince lze rozdělit na dvě základní složky - imunita **vrozená** (nespecifická) a **získaná** (specifická, adaptivní), u nichž byla v průběhu různých výzkumů prokázána schopnost kooperace (Janeway a Medzhitov, 2002). Odpověď imunitního systému na přítomnost patogenu může být tedy modulována ve dvou rovinách, z nichž každá zapojuje své specifické mechanismy.

2.2.1.1 Nespecifická (vrozená) imunitní odpověď

Vrozená imunita je z evolučního hlediska považována za starší složku imunitního systému. Její efektorové buňky jsou schopny velmi rychlé aktivace a prakticky okamžité reakce, pokud patogen vstoupí do organismu. Na rozdíl od imunity specifické bohužel nedisponují imunologickou pamětí a nedokážou produkovat paměťové buňky (Medzhitov a Janeway, 2000).

Prvním mechanismem nespecifické imunity, se kterým se musí patogen utkat při vstupu do organismu, jsou fyziologické bariéry, např. epitel kůže, plic či slizniční membrány (Raval a kol. 2014). Jejich funkci mohou podporovat i chemické látky, např. kyselina mléčná, properdin či lysozym (Miller a Watson, 1965).

V případě průniku skrze tyto bariéry nastupují do boje **buněčné složky nespecifické imunity**. Jedná se o monocyty, makrofágy, neutrofilů, bazofilů, eozinofilů, žírné a dendritické buňky. Základním principem fungování těchto buněk je rozpoznání pathogen associated molecular patterns (PAMPs)/damage associated molecular patterns (DAMPs) pomocí pattern recognition receptors (PRRs), (Beutler, 2004; Krysko a kol., 2013). Po rozpoznání těchto motivů jsou patogeny likvidovány pomocí fagocytózy, která patří k základním mechanismům přirozené imunity (Beutler, 2004). Makrofágy a dendritické buňky mohou dále působit i jako antigen prezentující buňky (APC), které jsou po fagocytóze schopny zpracovat a prezentovat cizí částice ve spojení s MHC II na svém povrchu specifických imunitním mechanismům (Greenberg a Grinstein, 2002).

Jedinou výjimku buněčné složky nespecifické imunity tvoří NK buňky (Natural Killers), tzv. přirození zabíječi, kteří nejsou schopni fagocytovat. Jejich základním efektorovým mechanismem je ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) a také produkce zánětlivých cytokinů, z nichž významnou roli zastává INF- γ (interferon gamma), (Vivier a kol., 2008).

Jednou z hlavních složek **humorální nespecifické imunity** je komplement fungující jako enzymatická kaskáda vedoucí k likvidaci patogenů. Tento systém zahrnuje přibližně 30 plazmatických bílkovin, které produkují hepatocyty a částečně makrofágy. Celkově tvoří 9 základních složek (C1 - C9), které jsou kaskádovitě aktivovány v závislosti na jednotlivých podnětech. Složky komplementu jsou aktivovány třemi různými způsoby - klasickou, lektinovou a alternativní cestou. Klasická cesta je zahájena po vazbě složky C1 na komplex antigen-protilátka. Pokud dojde k aktivaci složky C1 pomocí MBL (manan-binding lektin), komplement působí po lektinové dráze, a je-li zprostředkován kontakt složky C3 s patogenem, aktivuje se cesta alternativní. Přesný mechanismus těchto drah je odlišný, ovšem klíčovou roli ve všech hraje komponenta C3, jež je následně konvertována na C3b. Hlavní funkcí C3b je opsonizace a následná podpora fagocytózy. Důsledkem spuštění komplementu může být rovněž odstranění imunokomplexů pomocí C3b, chemotaxe díky C3a/C5a či osmotická lýza vyvolaná komplexem C5b – C9, (Janeway a kol., 2001, Rus a kol., 2005).

Další nedílnou složku humorální imunity tvoří i proteiny akutní fáze (např. C-reaktivní protein) a cytokiny, které patří mezi základní regulátory imunitního systému. Obecně lze říci, že se jedná o látky polypeptidové povahy, mezi něž jsou řazeny interleukiny, chemokiny, interferony či růstové faktory (Bellardeli, 1995).

2.2.1.2 Specifická (adaptivní, získaná) imunitní odpověď

Získaná imunita je vývojově mladší složkou imunitního systému. Tato složka je charakterizována 3 základními znaky - **specifitou, diverzitou a imunologickou pamětí**. Specifita je výsostnou schopností imunitního systému rozpoznat i nepatrné odchylky mezi antigeny. Další neméně významnou vlastností je diverzita, tj. schopnost reagovat na molekuly tvorbou struktur rozpoznávajících antigeny. Výraznou roli ve specifické imunitní odpovědi zastává i imunologická paměť, neboť paměťové buňky produkované imunitním systémem výrazně zvyšují rychlost odezvy imunitního systému při opětovném setkání s antigenem (Bonilla a Oettgen, 2010).

Pro specifickou imunitu je nezbytná schopnost precizní koordinace mechanismů podílejících se na imunitní odpovědi (Dzivenu a kol. 2003). **Buněčnou složku specifické imunity** tvoří T a B lymfocyty. K jejich aktivaci je nutná přítomnost antigenu, na jehož popud B lymfocyty vytvoří protilátky a dojde k destrukci pomocí T-lymfocytů (Medzhitov a Janeway, 1997). Oba dva typy lymfocytů jsou produkovány kostní dření. T-lymfocyty maturují v thymu, kde je exprimován receptor pro antigen. Pro identifikaci příslušného

antigenu je podstatné, aby byl následně prezentován v komplexu s MHC molekulami. Pokud dojde k rozpoznání, je spuštěna proliferace a diferenciaci v efektorové a paměťové buňky. (Gatinonni a kol., 2011).

U T-lymfocytů rozlišujeme 2 hlavní populace - Th (CD4+, helper) a Tc (CD8+, cytotoxické) lymfocyty.

- **CD4+ lymfocyty** lze dále rozdělit na dvě významné subpopulace – Th1 a Th2:

Th1 subpopulace T-lymfocytů se podílí především na buněčné imunitě. Jejím hlavním úkolem je aktivace antigen prezentujících buněk (makrofágy, dendritické buňky), které vyvolají reakci cytotoxických T-lymfocytů (CTL). Ty jsou schopny detekce antigenu ve spojení s MHC II molekulami. Th1 lymfocyty zároveň ovlivňují množení CTL díky produkci cytokinů (Ridge a kol., 1998; Wang, 2001).

Th 2 subpopulace T lymfocytů se na rozdíl od Th1 podílí na imunitě humorální. Působí především na B lymfocyty a podporuje jejich schopnost vytvářet protilátky (Wang, 2001)

Ve skupině CD4+ lymfocytů je nutno zmínit i další méně výrazné subpopulace - Th9 a Th17, které jsou zodpovědné za tvorbu některých cytokinů a podílejí se na indukci zánětu (Korn a kol., 2009; Lu a kol., 2012).

- **CD8+ lymfocyty**

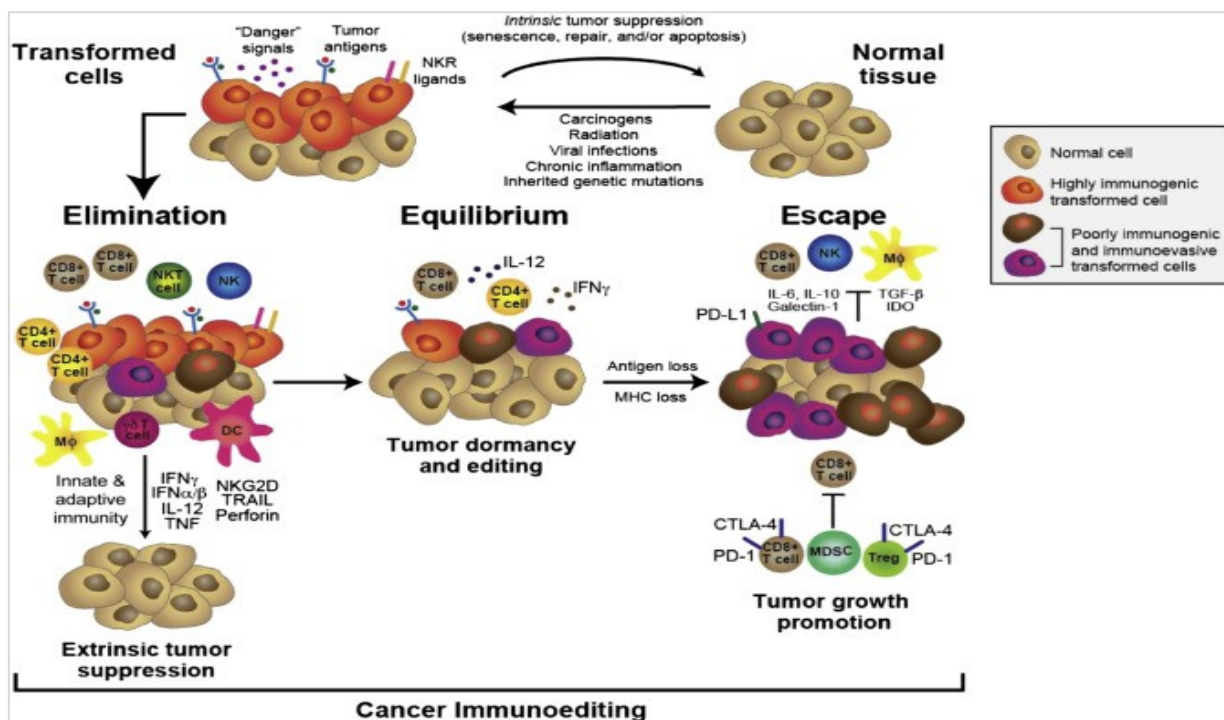
Cytotoxické lymfocyty jsou schopné indukovat v infikovaných/nádorových buňkách apoptózu. Díky svým cytotoxickým mechanismům jsou schopny i přímé eliminace těchto nebezpečných buněk (Ridge a kol., 1998).

U B lymfocytů nedochází k selekci jako u T lymfocytů. Jejich vývoj rovněž začíná v kostní dřeni, následná maturace probíhá po kontaktu s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, mízní uzliny). B lymfocyty jsou následně diferenciovány na paměťové buňky podílející se na imunologické paměti a na plasmatické buňky produkující protilátky (LeBien a Tedder, 2008).

Právě protilátky představují hlavní složku **specifické imunitní humorální odpovědi**. Výrazně se podílejí na opsonizaci, fagocytóze, aktivaci komplementové kaskády či iniciaci antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC) (Bonilla a Oettgen, 2010).

2.2.2 Interakce nádorových buněk s imunitním systémem

U buněk nádorové tkáně byla formulována teorie immunosurveilance (imunitního dohledu), která prokazuje schopnost organismu rozpoznat a následně eliminovat vznikající nádorové buňky. Následkem této reakce je ovšem selekce nádorových buněk, které mají nižší imunogenicitu a unikají obranným mechanismům imunitního systému. Celkový vztah imunitního systému a nádorových buněk je označován jako nádorová imunoeditace, kterou lze rozdělit do 3 základních fází, tzv. tří E. Toto označení vychází z původních anglických výrazů elimination (eliminace), equilibrium (rovnováha) a escape (únik). Každá fáze je charakteristická svými efektorovými buňkami i sekretovanými cytokiny. V úvodní fázi eliminace spolupracuje vrozená a získaná imunita za účelem odhalení a destrukce abnormálních buněk. Tato destrukce ovšem nemusí být absolutní a přeživší nádorové buňky se dostávají do druhé fáze rovnováhy (equilibrium) s imunitním systémem. Během této fáze jsou selektovány méně imunogenní buňky, které v poslední (escape) fázi získávají schopnost uniknout imunitnímu dohledu, a zahájit tak progresivní růst (Kim a kol., 2007; Schreiber a kol., 2011). Celý proces nádorové imunoeditace je zaznamenán na následujícím obrázku (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma imunoeditace (převzato ze Schreiber a kol., 2011).

2.2.3 Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému

V průběhu evoluce se nádorové buňky staly v mnoha ohledech pro imunitní systém nezdolné. Imunitní systém je i přes svou komplexnost a široké spektrum funkcí nedokáže

potlačit a dostat pod kontrolu. Může za to především obrovská snaha nádorových buněk skrýt se mechanismům imunitního systému a uniknout své eliminaci. Imunitní systém se posléze stává bezbranným nástrojem pro boj s těmito buňkami.

Nádorové buňky velmi často využívají **snížené exprese MHC I** molekul na svém povrchu, díky čemuž CTL nejsou schopny zahájit atak (Villalba a kol., 2013). Tento atak by mohl být teoreticky vyvolán i NK buňkami, avšak i s nimi si nádorové buňky dokážou poradit tím, že zahájí expresi MHC Ib molekul, čímž pro NK buňky ztrácejí atraktivitu, protože je považují za vlastní (Haynes-Gilmore a kol., 2014).

Nádorové buňky dokážou unikat imunitnímu dohledu i díky výrazné **produkci cytokinu TGF- β (transforming growth factor beta)**, který vyvolává vznik regulačních T-lymfocytů, tzv. Tregs z C4+ T-lymfocytů. Nádor je díky nim chráněn před imunitním systémem a navíc samy produkují TGF- β , čímž stimulují svou vlastní tvorbu (Darrasse-Jèze a kol., 2009). Kromě TGF- β jsou Tregs schopny stimulovat i tvorbu protizánětlivého IL-10, který inhibuje buněčnou imunitní odpověď a podporuje navození tolerance vůči nádorovým buňkám. U Tregs byla detekována i schopnost podílet se na angiogenezi nádorových buněk pomocí VEGF (vascular endothelial growth factor) (Facciabene a kol., 2012) a neméně významnou roli hrají i v nádorovém mikroprostředí, kde napomáhají produkovat a hromadit adenosin, který brání imunitnímu systému vypořádat se s nádorovými buňkami (Deaglio a kol., 2007).

V přehledu mechanismů úniků je nutno dále zmínit i **mechanismus Fas ligandu a Fas receptoru**. Interakce Fas ligandu s Fas receptorem indukuje apoptózu buňky. Z tohoto důvodu T lymfocyty exprimují Fas ligand, aby mohlo dojít k likvidaci buněk nádorových. Nádorové buňky jsou schopny na tento proces reagovat tím, že cíleně snižují expresi Fas receptoru. Tento Fas receptor je exprimován i na povrchu T lymfocytů, aby byla zajištěna jejich regulace. Nádorové buňky jsou schopny zvýšením exprese Fas ligandu zapříčinit vazbu na Fas receptor v infiltrujících lymfocytech, což způsobí, že se T-lymfocyty ocitají v pasti a dochází k jejich destrukci díky apoptóze (O'Connell a kol., 1999).

Problémy imunitnímu systému v boji s nádorovými buňkami způsobují i **myeloidní derivované supresorové buňky** (MDSCs), které jsou charakteristické svou supresorovou aktivitou imunitní odpovědi. Tato suprese je zprostředkována buď přímým kontaktem buněk, či prostřednictvím mediátorů (např. GM-CSF, M-CSF, VEGF, TNF- α , INF- γ či interleukiny). V důsledku jejich aktivace dochází k inhibici imunitních odpovědí T lymfocytů, NK buněk; k potlačení produkce protilátek pomocí B lymfocytů a rovněž stimulaci Tregs. Obecně lze

řící, že jejich přítomnost v nádorovém prostředí výrazně podporuje expanzi nádorové tkáně (Gabrilovich a Nagaraj, 2009; Sevko a Umansky, 2013).

Ve výčtu obranných mechanismů bychom mohli dále uvést i **inhibici komplementu** pomocí molekuly CD55 (Loberg a kol., 2006) či „**don't eat me**“ signály exprimované na povrchu některých molekul, ze kterých můžeme jmenovat CD47. Navázáním CD47 a proteinu SIRP α na makrofágu získává buňka CD47 označení, které ji chrání před likvidací pomocí imunitního systému (Willingham a kol., 2012).

Tyto mechanismy nejsou zdaleka konečným výčtem geniálních schopností nádorových buněk předčit imunitní systém. Nádorové buňky ukazují, že dokážou bojovat s imunitním systémem na mnoha úrovních. Pro léčbu těchto onemocnění je proto velmi obtížné vzít v úvahu všechny tyto vlastnosti a absolutně potlačit jejich přítomnost v organismu. Ovšem ani imunitní systém sám o sobě není zcela bezmocný a disponuje škálou efektorových mechanismů, které se snaží nádorové buňky potlačit.

2.2.4 Antitumorové mechanismy imunitního systému

K tomu, aby se mohl imunitní systém utkat s nádorovými buňkami, je nutná především jejich identifikace. K tomuto rozpoznání výrazně přispívá schopnost nádorových buněk exprimovat na svém povrchu nádorové antigeny (Finn, 2008). Po rozpoznání těchto antigenů reaguje imunitní systém zapojením buněk své vrozené (např. makrofágy, NK buňky, neutrofilů) i získané (např. CTLs) složky a nedílnou součástí tohoto procesu je zapojení cytokinů.

2.2.4.1 Nádorové antigeny

V současné době jsou definovány dvě skupiny antigenů. Jedná se o tumor asociované antigeny (TAA) a tumor specifické antigeny (TSA), (Finn, 2008).

- **Tumor specifické antigeny (TSA)**

Tumor specifické antigeny se vyskytují výhradně u nádorových buněk jako důsledek bodových mutací genů, které způsobily změny proteinových struktur na povrchu těchto buněk, nebo jako antigeny virového původu. Tyto antigeny jsou prezentovány na povrchu buněk společně s molekulami MHC I, díky čemuž jsou nádorové buňky identifikovány T-lymfocyty a imunitní systém může zahájit jejich eliminaci (Philipps a kol., 1985; Finn, 2008).

- **Tumor asociované antigeny (TAA)**

Tumor asociované geny můžeme detekovat nejen v nádorových, ale i ve zdravých buňkách. Tyto antigeny se od antigenů zdravých buněk neliší specifickou strukturou, ale změnou exprese (čas, místo a intenzita výskytu). Především výrazné zvýšení hladin těchto antigenů je typické pro nádorové buňky a těchto poznatků lze využít v nádorové diagnostice, kde mohou fungovat jako nádorové markery (Old a Chen, 1998).

2.2.4.2 Buňky imunitního systému bojující s nádorem

Do přehledu buněk, které se účastní zneškodnění nádorových buněk, řadíme makrofágy, NK buňky, neutrofile, dendritické buňky a T lymfocyty (především CTLs).

- **Makrofágy**

Makrofágy, mononukleární leukocyty, lze nalézt prakticky ve všech orgánech organismu, proto je šance na jejich střet s antigenem relativně vysoká. Hlavní úlohou těchto buněk je fagocytóza abnormálních buněk, ale nespornou měrou se rovněž podílejí na prezentaci antigenu či produkci cytokinů (Naradin a Abastado, 2008). V nádorovém prostředí dochází k jejich přeměně v tzv. tumor associated macrophages (TAMs), které se projevují pronádorově či protinádorově v závislosti na přítomnosti cytokinů či růstových faktorů v tomto prostředí. V přítomnosti prozánětlivých cytokinů vyvolávají fagocytózu a jsou schopny produkovat další imunostimulační cytokiny (Elgert a kol., 1998; Naradin a Abastado, 2008), z nichž důležitou roli v protinádorové imunitě zastává především TNF- β (tumor necrosis faktor beta), který je schopný indukovat apoptózu (Elhelu, 1983). Naopak pod vlivem cytokinů IL-4, IL-10 a TGF- β evokují TAMs spíše nádorový růst (Elgert a kol., 1998).

- **NK buňky**

NK buňky (Natural killers), označované jako přirození zabíječi, jsou specifické granulocytární lymfocyty, které nelze zařadit mezi B- ani T-lymfocyty. Jejich hlavní role v boji s nádorem je spatřována především v jeho cytotoxické likvidaci (Medzhitov, 2007). K identifikaci svého cíle využívají dvou signálů - pozitivního a negativního. Pokud dojde k přemostění lektinového receptoru NKG2, vytvoří se signál, který vede NK buňky k destrukci daného cíle. Za negativní signál je považována snížená exprese MHC I typická u nádorových buněk. Po rozpoznání tohoto znaku je vyvolán cytotoxický efekt NK buněk, které využijí perforinů a granzymů obsažených ve svých granulech. Perforiny v nádorových buňkách indukují tvorbu pórů a granzymy spustí programovanou buněčnou smrt (Bellora a kol., 2014).

- **Neutrofilly**

Neutrofilly se vyznačují členitým jádrem a přítomností granul, ostatně jako další polymorfonukleární granulocyty, do jejichž skupiny jsou řazeny. U člověka tvoří 70 % bílé krevní řady a jsou velmi důležitou složkou v boji s patogeny, protože jsou schopny patogen odstranit bez jakéhokoliv negativního efektu na hostitele (Summers a kol., 2010). Jsou považovány za profesionální fagocyty, které pohlcují škodlivé patogeny do tzv. fagolysosomů a pomocí antimikrobiálních peptidů či produkcí aktivních forem kyslíku (ROS) je destrukují (Nathan, 2006). U neutrofilů, stejně jako u makrofágů, lze v masě nádorových buněk detekovat 2 odlišné fenotypy neutrofilů, tzv. tumor associated neutrofil (TAN), značené N1 a N2. Fenotyp N1 se podílí na likvidaci nádorových buněk, zatímco fenotyp N2 využívá nádor ve svůj prospěch. Vliv na vývoj fenotypu má především TGF- β , který vyvolává přeměnu fenotypu N1 na N2. V případě, že je tento faktor blokován, dochází ve zvýšené míře k zabíjení nádorových buněk, produkci cytokinů i aktivaci CTLs pomocí N1 (Fridlender a kol., 2009). U neutrofilů byl zjištěn vliv na rozpad nádorových buněk zprostředkovaný pomocí ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) (Hubert a kol., 2011).

- **Dendritické buňky**

Dendritické buňky společně s makrofágy patří mezi nejvýraznější antigen prezentující buňky. Fungují v podstatě jako spojovník mezi imunitou vrozenou a získanou, jelikož efektorové mechanismy specifické imunity jsou iniciovány fagocytujícími dendritickými buňkami, díky nimž jsou antigeny prezentovány CD8⁺/CD4⁺ lymfocytům (Takahashi & Kobayashi, 2003). K pohlcení apoptických nádorových buněk využívají dendritické buňky různé receptory, např. CD36, TIM, TAM nebo FCR. Dále se stejně jako makrofágy podílí na produkci cytokinů podporujících aktivaci APC, která navodí specifickou imunitní odpověď (Liu a Zheng, 2012).

- **T-lymfocyty (cytotoxické T lymfocyty)**

Aktivace získané imunitní odpovědi prostřednictvím T lymfocytů je založena na dvou rozličných podnětech. Prvním z nich je vazba T-buněčných receptorů (TCR) naivních T-lymfocytů s antigenem exprimovaným na povrchu APC. Jak již bylo zmíněno, nedílnou součástí tohoto kroku je zapojení dendritických buněk, ale také makrofágů či B lymfocytů. Díky nim jsou příslušné antigeny prezentovány v komplexu s MHC II molekulami a následně mohou být detekovány subpopulací CD4⁺ T lymfocytů (Phang a kol., 2003). Výsledkem této aktivace CD4⁺ T-lymfocytů je produkce řady cytokinů, které mají vliv na přeměnu CD8⁺ lymfocytů v cytotoxické T-lymfocyty (CTLs) (Janssen a kol. 2003). Za druhý signál

aktivace imunitní odpovědi je považována vazba molekuly CD28 na T-buňkách s molekulami CD80/CD86 na povrchu antigen prezentujících buněk (Phang a kol., 2003).

Za efektorové mechanismy T-lymfocytů jsou považovány především cytotoxické T-lymfocyty. Jejich přímé cytotoxické účinky jsou zprostředkovány dvěma mechanismy. Prioritním je Ca^{2+} dependentní mechanismus perforin - granzym B dráhy, druhým vazba Fas ligandu (Ribas a kol., 2003).

2.2.4.3 Cytokiny

Cytokiny jsou proteiny sekretované především leukocyty, které fungují jako významné regulátory imunitního systému. Prostřednictvím vazby na buněčný receptor mohou vyvolat expresi genů, která následně vede k proliferaci, diferenciaci či aktivaci buněk. Stejným způsobem mohou vyvolat i efekt opačný a proliferaci inhibovat. Výrazný vliv mají i na sekreci dalších cytokinů (Dranoff, 2004). Na odstranění nádorové tkáně se podílejí dvěma mechanismy: buď přímo vykazují protinádorové účinky, nebo nepřímo zvyšují pronádorovou imunitní odpověď (Dzivenu a kol., 2003).

Jako cytokiny s **přímým účinkem** můžeme uvést např. interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), dále interferony alfa ($\text{INF-}\alpha$) a beta ($\text{INF-}\beta$) či tumor necrosis factor alfa ($\text{TNF-}\alpha$), které jsou schopny vyvolat apoptózu nádorových buněk nebo minimálně výrazně zpomalit expanzi nádoru. Pokud se tyto cytokiny vyskytují v synergii, jejich účinek je mnohonásobně vyšší (Dzivenu a kol., 2003).

Mezi cytokiny s **nepřímým účinkem** můžeme zařadit interleukin-2 (IL-2), který stimuluje proliferaci a aktivaci CTL či NK buněk; dále GM-CSF (growth macrophages colony stimulating factor), který působí na APCs a výrazně zvyšuje produkci MHC molekul či imunitních kostimulátorů CD80 a CD86, které napomáhají aktivaci T-lymfocytů (Dzivenu a kol., 2003). Důležitým cytokinem je rovněž interferon gamma ($\text{INF-}\gamma$) aktivující především makrofágy a NK buňky. Mimo to stimuluje i expresi antigenů MHC (Huang a kol., 1993).

V závislosti na expresi různých cytokinů je regulována odpověď imunitního systému. Poměr mezi subpopulacemi CD4^+ T-lymfocytů v nádorovém prostředí udává, jakým směrem se imunitní odpověď bude vyvíjet (Mosmann a kol., 1986). Cytokiny $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, IL-2 a IL-12, které jsou produkovány subpopulací Th1, jsou schopny vyvolat cytotoxické vlastnosti M1 makrofágů, CTLs či NK buněk. Především z tohoto důvodu buňky Th1 sehrávají významnou roli v boji proti nádorům. Th2 buňky, produkující IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13, v nádorovém prostředí podporují spíše protilátkovou odpověď B lymfocytů, která je považována za nepodstatnou v potlačení nádorových buněk (Burkholder a kol.,

2014). Obecně je přijímán fakt, který udává, že převažující stav Th1 subpopulace působí proti nádoru a Th2 odpověď hraje ve prospěch nádoru (Haabeth a kol., 2011).

2.3 NÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE

Nádorová imunoterapie v současné době zažívá velký „boom“ především díky své šetrnosti k organismu pacienta. Její hlavní úlohou je snaha maximálně využít specifitu imunitního systému, a vyvinout tak terapeutickou formu, která bude vysoce účinná a méně toxická na rozdíl od dosud využívaných postupů (Gray a kol., 2006). Především díky pochopení některých mechanismů nádorových buněk můžeme dnes vyvíjet mnohem efektivnější způsoby imunoterapie. Mnohem snáze lze dosáhnout vyšší kvality efektorových mechanismů imunitních buněk, blokovat imunosupresivní účinky nádorů a lépe odhalovat jejich antigeny (Schreiber, 2011).

V současnosti vévodí nádorové terapii trend využívající spíše specifické složky imunitního systému. Velmi hojně jsou využívány **monoklonální protilátky (MAbs)**, které díky své vazbě na nádorové buňky aktivují cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC) nebo na komplementu (CDC), popř. aktivují na protilátkách závislou buněčnou fagocytózu (ADCP) (Scott a kol., 2012). Doslova vrcholnou éru zažívají monoklonální protilátky, které jsou cíleny na imunitní kontrolní body, tzv. checkpointy, které působí jako stimulant či inhibitor imunitní reakce. Jako příklady inhibitorů můžeme uvést anti-CTLA-4 či anti-PD-1, které jsou dnes využívány v mnoha moderních terapeutických postupech. Mezi monoklonální protilátky stimulující imunitní odpověď patří např. anti-CD40 (Swart a kol., 2016).

V nádorové imunoterapii zastává dlouhodobě své místo i imunoterapie využívající **dendritické buňky (DC)**, které je nutno připravit ve formě nezralých DCs z odebraných patientských monocytů. Z nádorové tkáně od stejného pacienta je dále nutno vytvořit směs nádorových antigenů, které jsou zpracovány předem odebranými nezralými patientskými DCs. Na jejich povrchu dochází k prezentaci antigenů v komplexu s MHC II molekulami. Po stimulaci maturace a expresi kostimulačních molekul jsou takto připravené buňky retransplantovány do těla pacienta, kde aktivují T-lymfocyty atakující nádorové buňky (Gilboa, 2007).

Navzdory dnešnímu směru medicíny využívat především složky získané imunity - imunoterapie studovaná v této práci naopak staví na imunitě vrozené, která bude podrobněji představena v následující kapitole.

2.3.1 Nádorová imunoterapie založená na nespecifické imunitě

Základním dogmatem imunoterapie založené na nespecifické imunitě je identifikace motivů, tzv. pathogen associated molecular patterns (PAMPs)/damage associated molecular pattern (DAMPs), pomocí pattern recognition receptors (PRRs), (Thomas a Badini, 2011).

2.3.1.1 PAMPs a DAMPs

Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) jsou velmi malé molekuly, mnohdy pouze malé části molekul, běžně se vyskytující na povrchu bakterií, hub, kvasinek virů a dalších infekčních mikroorganismů. Buňky nespecifické imunity mají pro každý motiv PAMPs připravený příslušný pattern recognition receptors (PRRs). Ve výčtu těchto motivů můžeme nalézt např. lipoproteiny, lipopolysacharidy, peptidoglykan, formyl-methionin, flagelin, manan, či dvouřetězcovou RNA (Thomas a Badini, 2011). Pokud dojde k rozpoznání PAMPs pomocí PRRs, velmi rychle je spuštěna celá řada antimikrobiálních odpovědí, které jsou vyvolány především zánětlivými cytokiny, chemokiny či interferony I. typu. Následně může být rozvinuta i patogenně specifická dlouhotrvající odezva získané imunity pomocí B- a T-lymfocytů (Kumar a kol., 2009).

K zahájení imunitní odpovědi může vést i identifikace **damage associated molecular pattern (DAMPs)** pomocí PRRs. Tyto motivy jsou produktem buněk procházejících neprogramovanou buněčnou smrtí. Nedojde-li k přirozené apoptóze, organismus má vyvinuté velice vnímavé mechanismy, které jsou schopny tyto DAMPs rozpoznat. Do této kategorie motivů spadají např. HMGB1 (high mobility group box 1), IL-1 α , HSPs (heat shock proteins), S100 proteiny nebo kyselina močová (Bianchi a kol., 2007).

2.3.1.2 Pattern recognition receptors

Pattern recognition receptors, rozpoznávající motivy PAMPs/DAMPs, zaujímají širokou škálu receptorů, které jsou exprimovány nespecifickými imunitními buňkami. Podle jejich výskytu je můžeme rozdělit do 3 kategorií, a to na **PRRs cytoplazmatické, sekretované a membránové** (Akira a kol., 2006; Elfeil a kol., 2013).

- **PRRs cytoplazmatické**

Mezi cytoplazmatické receptory patří skupina **NOD like receptorů (NLRs)**, která působí ve druhé linii při napadení organismu patogeny. Mezi nejvýraznější zástupce

patří NOD1 a NOD2 receptory, které jsou schopny detekovat především kompartmenty bakterií (Akira a kol., 2006).

Do této kategorie jsou řazeny také **RIG-1-like receptory**, které pracují na podobném mechanismu jako NLR s tím rozdílem, že rozpoznávají virovou RNA (Akira a kol., 2006).

- **PRRs sekretované**

Pro tuto skupinu PRRs je společná jejich schopnost opsonizovat patogeny, což podporuje aktivaci komplementu a fagocytózu. Mezi sekretované PRRs řadíme **C-reaktivní protein (CRP)**, který je produkován hepatocyty při akutních infekcích. CRP je považován za velmi významný reaktant akutní fáze zánětu (Janeway a Medzhitov, 2002). Druhým zástupcem této skupiny je **lektin vázající manózu (MBL)**, který je rovněž produkován játry a váže se na karbohydráty na povrchu mikroorganismů, např. virů, bakterií, prvoků i hub (Peterslund a kol., 2001).

- **PRRs membránové**

Jak napovídá jejich název, jedná se o receptory ukotvené v membránách buněk, které rozpoznávají své motivy v mimobuněčném prostoru, endozómech či fagozómech (Akira a kol., 2006). Do této kategorie spadají **C-typ lektin receptory (CLRs)**, které jsou exprimovány na povrchu monocytů, makrofágů či dendritických buněk. Pokud identifikují příslušný motiv PAMPs (např. manózu nebo fruktózu), aktivují intrabuněčné signální dráhy a tím regulují genovou expresi. Jako významné CLRs jsou považovány Dectin1, Dectin2 (Figdor a kol., 2002) nebo manózový receptor, který rozpoznává manózové zbytky vyskytující se na povrchu bakterií a virů (Crespo a kol., 2011).

Další podmnožinou membránových receptorů jsou **scavengerové receptory**, které jsou schopny vazby modifikovaných lipoproteinů o nízké hustotě, ale zároveň mohou detekovat apoptické buňky, endogenní bílkoviny či patogeny (Zani a kol., 2015).

Formyl peptidové receptory (FPRs) byly původně považovány za záležitost polymorfonukleárních buněk, monocytů a makrofágů, následně byla však jejich přítomnost prokázána i u dendritických buněk, neuronů, trombocytů či hepatocytů. K jejich expresi dochází rovněž na neutrofilech (Becker a kol. 1998). Detekují formyl peptidové molekuly, jako je např. N-Formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (fMLF), (Fu a kol., 2006), který je využíván jako jedna z možných složek imunoterapie naší laboratoře.

Nejvýznamnější a velmi detailně prostudovanou třídou membránových receptorů jsou **Toll-like receptory (TLRs)**. Rodina TLRs zahrnuje 10 lidských (TLR 1-10) a 12 myších (TLR 1-9 a TLR 11-13) typů, které jsou lokalizovány přímo v buněčné membráně či v endozómech. Jsou schopné detekovat široké spektrum motivů PAMPs,

např. lipidy, proteiny, lipoproteiny a nukleové kyseliny (Kawasaki a Kawai, 2013). TLRs jsou hojně exprimovány na povrchu myeloidních i lymfoidních buněk, které prostupují do nádorového mikroprostředí (Marabelle a kol., 2014). Na svém extracelulárním N-konci obsahují leucinové repetice (tvz. LTR doména) a na intracelulárním cytoplazmatickou doménu TIR (Toll/IL-1 receptor), neboť cytoplazmatická oblast TLRs je shodná s cytoplazmatickou oblastí interleukin-1 receptorů. Díky této doméně je zprostředkována samotná TLR signalizace, ke které dochází pomocí vazby adaptorových molekul obsahujících TIR k TIR doménám TLR receptorů. Mezi adaptorové molekuly můžeme zařadit např. MyD88, TRIF nebo TIRAP. Navázáním těchto molekul jsou aktivovány různé transkripční faktory, např. NF- κ B, IRF3/7 či MAP kinázy, které jsou schopné vyvolat produkci zánětlivých cytokinů, chemokinů či interferonů I. typu (Takeuchi a Akira, 2010).

Podrobný přehled všech Toll-like receptorů je uveden v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Přehled TLRs, včetně jejich lokalizace, adaptorové molekuly a jejich příslušných ligandů (převzato z Kaczanowska a kol. 2013).

TLR	Buněčná lokalizace	Adaptorová molekula	Ligand	Zdroj ligandu
TLR1-2	Membrána	MyD 88	Triacylované lipoproteiny, lipoteichová kyselina, peptidoglykany	Bakterie
			Zymosan	Houby
			Pam ₃ CSK ₄	Syntetické
TLR2-6	Membrána	MyD 88	Diacylované lipopeptidy	Bakterie
			HSPs, HMGB1, kyselina močová, fibronectin, ECM proteiny	Endogenní
TLR3	Endozomy	TRIF	ds RNA	Viry
			POLY I:C	Syntetické
TLR4	Membrána (popř. endozomy)	MyD 88/ TRIF	LPS, lipoteichová kyselina	Bakterie
			β -defensin 2, fibronectin EDA, HMGB1, snapin, tenascin C	Endogenní
TLR5	Membrána	MyD 88	Flagellin	Bakterie
TLR7-8	Endozomy	MyD 88	ss RNA	Viry
			CpG-A, Poly G10, Poly G3	Syntetické
TLR 9	Endozomy	MyD 88	nemetylované CpG DNA	Syntetické
TLR10	Membrána	MyD 88	Neznámé přírodní ligandy	
			Pam ₃ CSK ₄ , PamCysPamSK ₄	Syntetické
TLR11	-	-	<i>Toxoplasma gondii</i> , profilin	Prvoci
TLR12	-	-	neznámé	-
TLR13	Endozomy	MyD 88	VSV	Virus

2.3.2 Nádorová imunoterapie studovaná v této práci

Myšlenka využití terapii na základě vrozené imunity vychází především z unikátního pozorování dr. Cuiho, který objevil SR/CR (spontaneous regression / complete resistance) myši, u kterých mechanismy vrozené imunity detekovaly a eliminovaly nádorové buňky. Mechanismus dodnes není zcela jasný, ale ukazuje, že buňky vrozené imunity se s nádorem dokážou vypořádat (Cui a kol., 2003).

Nádorová imunoterapie naší laboratoře je založena především na **kombinaci TLR ligandů a agonistů receptorů stimulujících fagocytózu**. TLR signalizace zprostředkováná pomocí rozpustných ligandů spojených s aktivací ligandů receptorů stimulujících fagocytózu vychází z předchozí práce Underhilla a Gantnera (2004). V průběhu mnoha let zkoumání laboratoře dr. Ženky bylo dokázáno, že právě tato kombinace je vysoce efektivním způsobem imunoterapie. Základním principem je využití rozpustných ligandů, které mají signalizační účinek, a ligandů fagocytárních receptorů, které fungují jako kotva na buňky nádorové. Signalizace stimuluje především granulocytární infiltraci a rozvíjí proces zánětu. Agonisté fagocytárních receptorů pomáhají namířit fagocytární buňky na nádorové a indukovat jejich destrukci. Jasným cílem tohoto procesu je kompletní zničení nádorové tkáně, nebo alespoň její podstatný úbytek. Z předchozích pokusů bylo zjištěno, že nejvhodnější terapií navrženou naší laboratoří je čtyřsložková směs skládající se z TLR agonistů - **Resiquimodu (R-848)**, **polyinosinické-polycitidylické kyseliny (poly(I:C))**, **lipoteichoové kyseliny (LTA)** a **mananu**, jakožto ligandu vázajícího se na nádorové buňky. Nejvhodnějším způsobem ukotvení na nádorové buňky se jeví využití biokompatibilní kotvy pro membrány **BAM** (Janotová a kol. 2014, Waldmannová a kol., 2016, Caisová a kol., 2016), která je tvořena hydrofóbním řetězcem kyseliny olejové, díky níž je umožněno kotvení do cytoplazmatické membrány nádorových buněk. Na opačný konec je vázáno terapeutikum, díky skupině -NHS, která dovoluje připojení ligandů (Kato a kol., 2004).

2.3.2.1 Charakteristika základní dosud užívané terapeutické směsi

Jak již bylo zmíněno výše, hlavními složkami naší terapie vykazujícími nejlepší terapeutický efekt jsou v současnosti tři signalizační TLR ligandy (R-848, poly(I:C), LTA) a ligand podporujícího fagocytózu - manan-BAM. Pro maximální účinnost této imunoterapeutické směsi je zásadní na vhodné časové rozložení aplikací, aby nedošlo k navození rezistence u TLR agonistů, proto je aplikace podávána ve 4 pulzech, čímž se blíží

vakcinačnímu schématu (Marabelle a kol., 2014; Waldmannová a kol., 2016; Caisová a kol., 2016).

- **TLR agonisté**

Resiquimod (R-848) je nízkomolekulární molekula považována za TLR7 agonistu u myši a TLR 7/8 u lidí, který je vázán na příslušné receptory exprimované na makrofázích, dendritických buňkách, B-lymfocytech a NK buňkách. Vykazuje silné protinádorové i protivirové účinky. Jeho navázáním na TLRs je indukována tvorba protilátek a cytokinů (např. INF- α , IL-1 β , IL-6, TNF- α), (Zhou a Sun 2015). Zejména produkce prozánětlivého cytokinu IL-12 a aktivace cytotoxických mechanismů NK buněk je zásadní pro indukci programované buněčné smrti nádorových buněk. Vliv R-848 byl prokázán i na maturaci plazmacytoidních dendritických buněk, které produkují zánětlivé interferony I. typu, a dále napomáhá expresi CD80/86 na povrchu dendritických buněk, což vede k aktivaci T-buněk (Meyer a kol., 2013).

Polyinosinická-polycitidylická kyselina (POLY I:C) je považovaná za agonistu TLR3. Jedná se o synteticky vyrobenou napodobeninu ds RNA. Po navázání na receptor TLR3 dochází k produkci interferonu a dalších zánětlivých cytokinů. Rovněž je stimulováno vyzrání dendritických buněk, které má vliv na antigenní prezentaci a cytotoxickou aktivitu NK buněk (Cheng a Xu, 2010).

Lipoteichová kyselina (LTA), řazena mezi ligandy TLR2, je běžnou součástí stěny většiny grampozitivních bakterií. Po navázání na TLR2 dochází k zahájení imunitní odpovědi, přičemž jsou produkovány prozánětlivé mediátory (např. IL-12, TNF- α a IL-1 β) a je aktivována komplementová kaskáda. Dále mohou být uvolněny radikály kyslíku a dusíku z neutrofilů či makrofágů (Schwandner a kol., 1999). Rovněž byl prokázán vliv na vyzrání dendritických buněk (Roses a kol., 2008).

Cílem této kombinace TLR ligandů je vyvolat silnou tvorbu prozánětlivých cytokinů a způsobit zánětlivou infiltraci. Díky tomu dochází k **produkci IL-12**, který hraje klíčovou roli v nádorovém mikroprostředí, kde je schopen navodit Th1 imunitní odpověď charakterizovanou tvorbou Th1 lymfocytů a produkcí INF- γ . Produkce INF- γ napomáhá i aktivaci fagocytární buněk v místě nádoru a převažující stav Th1, označovaný za protinádorový, indukuje cytotoxické vlastnosti M1 makrofágů, CTLs či NK buněk (Trinchieri, 2003). Především díky kombinaci R-848 a poly (I:C), které jdou do výrazné synergie, je tvorba IL-12 mnohonásobně vyšší, což vede k diferenciaci naivních Th-lymfocytů ve prospěch Th1 subpopulace a vzniku útočné odpovědi proti nádoru (Napolitani a kol., 2005.) IL-12 indukované procesy názorně ukazují, že imunitní systém

dokáže propojit vrozenou i získanou složku imunitní odpovědi (Trinchieri, 2003), čemuž napovídají i výsledky naší práce, kde byla prokázána odolnost vůči retransplantaci nádorových buněk i význačný protimetastázový účinek (Caisová a kol., 2016).

Všichni tři tyto TLR agonisté společně vykazují i dopad na **vyzrávání dendritických buněk**. Právě tyto buňky jsou schopny integrace mezi přirozenou a adaptovanou složkou imunity. TLR agonisté podporují především expresi CD80/86 na povrchu dendritických buněk (Michelsen a kol., 2001; Longhi a kol., 2009; Meyer a kol., 2013).

- **Manan - ligand podporující fagocytózu**

Jak již bylo zmíněno, k destrukci nádoru je kromě TLR ligandů nutné využít i ligand stimulujiící fagocytózu kotvený na nádorové buňky. V této terapeutické směsi tuto funkci zastává manan kotvený pomocí BAM.

Manan, nacházející se v buněčné stěně kvasinek, popř. gramnegativních bakterií, je polysacharid složený z několika podjednotek D-manózu spojených pomocí glykosidické vazby (Cawley a Ballou, 1972). Je považován za antigenní látku, která slouží jako PAMPs pro vazbu PRRs. Tato vazba je zprostředkována pomocí receptoru MBL (lektin vázající manózu) a manósového receptoru (MR), který se nachází na povrchu makrofágů (Yeeprae a kol., 2006).

V rámci naší terapeutické směsi je terminální D-manóza rozpoznávána pomocí MBL a následně dochází k aktivaci kaskády komplementu (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016), pomocí níž jsou indukována tvorba jednotek C3b a iC3b, které mohou fungovat i jako opsoniny. Tyto jednotky jsou detekovány pomocí komplement receptoru 3 (CR3) (Větvíčka a kol., 1996). Stimulací tvorby iC3b je několikanásobně zesílen atak fagocytů, zejména neutrofilů, a NK buněk. Fragmenty nádorových buněk opsonizované iC3b jsou lépe pohlcovány i dendritickými buňkami, pokud jsou v zánětlivém a apoptickém prostředí. Tato skutečnost vede k zeslabení nádorů nebo jejich úplné eliminaci (Janotová a kol., 2014, Waldmannová a kol., 2016, Caisová a kol., 2016).

2.3.2.2 Možnosti optimalizace nádorové imunoterapie studované v této práci

Výše uvedená čtyřsložková směs se prokázala jako vysoce účinná v boji s maligním melanomem, ovšem v boji s pankreatickým adenokarcinomem takových výsledků nedosahuje. Tato práce je proto cílena na další možnosti optimalizace této směsi.

- **Ovlivnění nádorového mikroprostředí**

Nádorové mikroprostředí generuje velké množství imunopresivních mechanismů, z nichž se tato práce zabývá MDSCs a adenosinem.

MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) jsou velice heterogenní skupinou buněk vznikající z myeloidní linie, které jsou považovány za jednu z nejsilnějších imunopresivních bariér. Nejvíce prostudovány jsou u nádorových onemocnění, kde byly poprvé objeveny, a u chronického zánětu. Mnohé studie prokazují, že při výskytu nádoru se jejich hladina zvyšuje i v periferní krvi (Khaled a kol., 2014). V nádorovém mikroprostředí je indukováno mnoho faktorů, které poškozují myelopoézu, což podporuje tvorbu MDSCs a jejich aktivaci. Tyto buňky se následně výrazně podílejí na progresi nádorového růstu především inhibicí protinádorových funkcí T a NK buněk. Vývoji nádoru napomáhá i jejich přímá podpora neovaskularizace, invaze nádorových buněk a indukce pre-metastatického prostředí. Přesný mechanismus působení MDSCs nebyl dosud zcela objasněn, nicméně je jisté, že jeho pochopení by výrazně napomohlo vývoji nádorové imunoterapie (Umansky a kol., 2016). Většina studií udává, že imunopresivní schopnost MDSCs je zprostředkována přímým kontaktem mezi buňkami prostřednictvím povrchových receptorů, či uvolňováním rozpustných mediátorů. Jedná se o enzymy arginázu a iNOS (inducible nitric oxide synthase), které v případě zvýšeného výskytu v nádorovém prostředí inhibují T-buňky (Gabrilovich a Nagaraj, 2009). Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím supresivní aktivitu MDSCs je i zvýšená produkce ROS (reactive oxygen species), která se objevila jako jedna z prvních charakteristik u myší nesoucích nádor (Youn a kol., 2008).

Inhibiční účinky na MDSC vykazují některá chemoterapeutika, proto byla naše terapeutická směs doplněna o **gemcitabin** (Suzuki a kol., 2005), který je běžně užíván k léčbě pankreatického adenokarcinomu v pokročilém stadiu (Oettle a kol., 2013).

Adenosin je extracelulární signální molekula schopná regulace téměř všech aspektů tkáňových funkcí. Význačnou funkci zastává i v nádorovém mikroprostředí. Ve fyziologickém rozmezí se koncentrace extracelulárního adenosinu pohybuje ve velmi nízkých koncentracích v rozmezí 20-200 nM, ovšem v nádorovém prostředí, zejména v důsledku hypoxie a zánětlivých procesů, se jeho koncentrace rapidně zvyšuje a začíná působit jako imunopresivní bariéra. Extracelulární adenosin se v mikroprostředí nádoru objevuje v důsledku nekróz a uvolnění ATP, které je degradováno na AMP pomocí CD39 na buněčném povrchu. Pomocí dalšího membránového enzymu CD73 je katalyzována konverze extracelulárního AMP na konečný adenosin. Zda se bude adenosin podílet

na pro- či protinádorové imunitní odpovědi (Antonioli a kol., 2013), závisí především na zapojení určité signální dráhy, stejně tak i na konkrétní linii nádorových buněk (Sakowicz-Burkiewicz a kol., 2013). Signalizační účinky adenosinu jsou zprostředkovány za pomoci 4 receptorů označovaných A1, A2A, A2B a A3, které patří do rodopsinové rodiny (třídy A) receptorů spřažených trimerními G proteiny (GPCRs), (Katritch a kol., 2013).

Imunosupresivní funkce adenosinu je zprostředkována především receptory A2A, které působí na buňky specifické i nespecifické imunity a inhibují jejich funkci. Následkem signalizace pomocí A2A je rovněž indukce angiogeneze stimulované pomocí VEGF a podpora metastatického efektu (Montesinos a kol., 2002). Aktivace A2A se ukazuje jako nezbytná pro invazi nádorového růstu. Naopak blokace tohoto receptoru přispívá k inhibici expanze nádorů (Mediavilla-Varela a kol., 2013), stejně jako vyřazení receptoru A2B (Wei a kol., 2013), který je běžně považován za imunosupresivní mechanismus spjatý především s vývojem anomálních dendritických buněk, které rovněž zvyšují produkci VEGF, podílejí se na angiogenezi a podporují vaskularizaci nádoru a jeho růst (Antonioli a kol., 2013). Naopak aktivace A3 receptorů působí převážně protinádorově. Signalizace prostřednictvím těchto receptorů vede k aktivaci kaspáz, čímž je indukována apoptóza (Otsuki a kol., 2012).

Pod vlivem enzymu adenosin-deaminázy je adenosin metabolizován na **inosin**, u něhož byly rovněž prokázány imunosupresivní účinky. Jeho signální dráhy jsou regulovány pomocí stejných adenosinových receptorů, proto se vlastnosti inosinu od adenosinu neliší (Haskö a kol., 2004).

V této práci jsou studovány možnosti odbourávání adenosinu a inosinu v nádorovém mikroprostředí pomocí dvou enzymů - **adenosin-deaminázy**, která se fyziologicky objevuje v nádorovém mikroprostředí a katalyzuje přeměnu adenosinu na inosin (Antonioli a kol., 2013); a **purinnukleosid-fosforylázy** metabolizující inosin na hypoxantin (Parkinson a kol., 2006).

- **Optimalizace terapie pomocí látek s nižší molekulovou hmotností**

Denzita nádorové masy pankreatického adenokarcinomu velmi ztěžuje boj s mechanismy nádorových buněk. V této práci je proto sledováno využití látek s menší molekulovou hmotností, jakožto ligandů podporujících fagocytózu, konkrétně **mannosaminu a fMLF**.

Mannosamin díky uspořádání OH skupin v poloze 3 a 4 umožňuje vazbu MBL stejně jako koncová manóza mananu. Aminoskupina manosaminu v poloze 2 umožňuje přímé navázání BAM.

Formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (f-MLF) je formylmethioninový peptid typický pro prokaryonta a mitochondrie. K jeho rozpoznávání jsou využívány FPRs. F-MLF působí jako výrazný chemoreaktant pro profesionální fagocyty, jimž signalizuje patogenní přítomnost a dává signál k likvidaci. Ta je indukována především díky produkci superoxidových aniontů (Hayashi a kol. 2013). Je-li f-MLF kotven na nádorové buňky, stimuluje jejich fagocytózu (Waldmannová a kol., 2016).

Jako kotva pro tyto molekuly byla využita biokompatibilní membrána BAM a hydrofóbní kotva DOPE (N-(Succinimidyloxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine), která byly využívána již v předchozím výzkumu naší laboratoře (Janotová a kol., 2014).

3 CÍLE PRÁCE

- Studium možnosti odstranění imunosupresivních bariér (MDSC, adenosin) při nádorové imunoterapii

- Optimalizace nádorové imunoterapie pomocí menších molekul agonistů podporujících fagocytózu

- *In-vitro* studium příslušných mechanismů

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

ADA (Adenosine deaminase from calf intestine; Sigma Aldrich)

Adenosine Deaminase Activity Kit (Calorimetric; BioVision)

Antibiotic-Antimycotic Solution (Penicilin, Streptomycin, Amfotericin B; Sigma-Aldrich)

BAM (biocompatible anchor for cell membranes; Mw 4000; NOF Europe)

D-mannosamine hydrochlorid (Sigma Aldrich)

D-MEM (Dulbecco's modified eagle medium; VWR)

DMSO (dimetyl-sulfoxid; Sigma-Aldrich)

DOPE (N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, Dioleoyl; NOF Corporation)

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma-Aldrich)

FCS (fetal calf serum, VWR)

f-MLFKK (N-formyl methionyl leucyl phenylalanine + lysine, lysine; N-Schafer)

Gemcitabin (Accord Healthcare Limited, UK)

L-Glutamin (Sigma-Aldrich)

LTA (lipoteichoic acid, Bacillus subtilis; Sigma-Aldrich)

Manan (Sigma-Aldrich)

Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

PBS (phosphate-buffered saline; VWR)

PNP (Nucleoside phosphorylase from microorganism; Sigma Aldrich)

POLY (I:C), (polyinosinic-polycytidylic acid, sodium salt; Sigma-Aldrich)

RPMI 1640 (Roswell park memorial institute medium; VWR)

R-848 (resiquimod; Tocris Bioscience)

Trypanová modř (0,5% vodný roztok; Sigma-Aldrich)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

(pozn. materiál pro analýzu LC-MS je uveden v příslušné kapitole zabývající se touto metodou)

4.2 Laboratorní zvířata

Všechny pokusy byly provedeny s wild-type SPF (specific pathogen free) samicemi kmene C57BL/6N z kmene Charles River Laboratories. Myši pro pokusy byly použity ve stáří 8 týdnů o průměrné hmotnosti 18 - 20 g. V prostorách zvěřince Katedry medicínské biologie byly chovány ve sterilních IVC (individually ventilated cages) boxech s podestýlkou z dřevěné drtě a s volným přístupem k vodě a krmným peletám. V místnosti byla udržována konstantní teplota 22°C a relativní vzdušná vlhkost 65% s nastavenou fotoperiodou na 12/12 hodin.

Pro část *in vivo* pokusů byly využity i prostory zvěřince Parazitologického ústavu, kde byly myším poskytnuty stejné podmínky s rozdílem boxů, ve kterých byly myši přechovávány. V těchto prostorách byly využity plastové klece s uzavíracím kovovým víkem.

4.3 Buněčné linie B16-F10 a Panc02 užití při pokusech

Buněčná linie B16-F10 (myši melanom) byla kultivována v RPMI 1640 obohaceném o 10% FCS, penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM). Kultivace buněk probíhala v termostatu o teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a 5% oxidem uhličitým. Buněčná linie myšního melanomu byla zakoupena u American Type Culture Collection.

Buněčná linie Panc02 (pankreatický adenokarcinom) byla kultivována v DMEM obohaceném o 10% FCS, penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM). Kultivace buněk rovněž probíhala v termostatu o teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a 5% oxidem uhličitým. Buněčná linie Panc02 byla darována Larsem Ivem Partacklem (University of Griefswald).

4.4 Příprava nádorových buněk pro *in vivo* experimenty

Po vytvoření jednovrstvé konfluentní kultury v kultivačním médiu bylo toto médium slito a narostlé nádorové buňky byly 3x důkladně promyty sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) pro následnou trypsinizaci. V trypsinizační směsi (0,25% trypsin, 0,02% EDTA v HBSS) byly buňky inkubovány po dobu 5 minut v termostatu o teplotě 37°C, aby došlo k rozvolnění adherovaných buněk. Poté byla trypsinizace ukončena přidávkem příslušného média obohaceného o 10% FCS v závislosti na buněčné linii a suspenze buněk byla převedena do zkumavky. Buňky byly následně

spočteny v Bürkerově komůrce. Vzorek suspenze byl naředěn v poměru 1:1 s trypanovou modří pro usnadnění rozlišení mrtvých a živých buněk a jejich množství bylo dále upraveno na koncentraci vyžadovanou pro příslušný pokus. Následně byly buňky zcentrifugovány (10 min, 160g, při teplotě 4°C) a převedeny do média, které odpovídalo potřebám daného pokusu.

Pro kultivaci a zpracování nádorových buněk B16-F10 bylo použito médium RPMI 1640. Pro buněčnou linii Panc02 se využívalo média D-MEM. Všechny ostatní úkony probíhaly za stejných podmínek.

4.5 Transplantace nádorových buněk pro *in vivo* experimenty

Myši byly oholeny na pravém boku pro usnadnění transplantace i následného měření velikosti nádorů ve věku 8 týdnů. V prvním pokusu jim bylo do této oblasti subkutánně transplantováno 4×10^5 melanomových buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez FCS na myš. Kromě klasické transplantace proběhla také transplantace těchto buněk do ocasní žíly, tzv. intravenózně. V tomto případě bylo injikováno 1×10^5 melanomových buněk v 50 μ l média bez FCS/myš.

V pokusech, kde byly užity buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02, byly do oholené oblasti pravého boku transplantovány buňky v množství 4×10^5 v 0,1 ml D-MEM bez FCS na myš.

4.6 Příprava látek pro terapii

- **Příprava Resiquimodu.HCl**

Z R-848 byl získán hydrochlorid přidáním ekvimolárního množství HCl. Koncentrace R848.HCl byla následně upravena na 0,5 mg v 1ml PBS.

- **Syntéza manan-BAM₄₀₀₀**

K syntéze mananu-BAM bylo nutné nejprve provést redukční aminaci mananu. Roztok mananu byl redukován v prostředí octanu amonného (při pH 7,4, 50°C) kyanoborohydridem sodným po dobu pěti dnů. Posléze byl výsledný roztok dialyzován za použití dialyzační membrány MWCO 3500 (Serva - Heidelberg, Německo) proti PBS při 4°C. Samotná vazba biokompatibilní kotvy pro membrány BAM (konkrétně její NHS skupiny) na vzniklý manan-NH₂ probíhala v průběhu dvouhodinové inkubační doby v pokojové teplotě při pH 7,3 (Kato a kol., 2004). Tato reakce byla zastavena přidáním 1 M TRIS/HCl (pH 8) a vzniklý roztok byl opět dialyzován v dialyzační trubici MWCO 3500 (Serva - Heidelberg, Německo) proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání. Sterilizace

výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 μm). Výsledný roztok 0,2 mM manan-BAM₄₀₀₀ v PBS byl skladován při teplotě -20°C (Janotová a kol., 2014).

- **Syntéza mannosamin-BAM₄₀₀₀**

Výsledného produktu syntézy mannosamin-BAM₄₀₀₀ bylo dosaženo přidáním vazebné molekuly BAM na molekulu D-mannosaminu.HCl. K 0,21 mM mannoseaminu.HCl bylo přidáno ekvimolární množství 7,3 mM BAM₄₀₀₀ v DMSO. Následně byla provedena inkubace, která probíhala při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny při pH 7,4. Sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 μm). Výsledný roztok 0,2 mM mannosamin-BAM₄₀₀₀ v PBS byl skladován při teplotě -20°C.

- **Syntéza mannosamin-DOPE**

K 0,21 mM mannosaminu.HCl bylo přidáno ekvimolární množství 7,3 mM DOPE v DMSO. Následně byla provedena inkubace, která probíhala při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny při pH 7,4. Sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 μm). Výsledný roztok 0,2 mM mannosamin-DOPE v PBS byl skladován při teplotě -20°C.

- **Syntéza f-MLFKK-DOPE**

Výsledného produktu syntézy f-MLFKK-DOPE bylo dosaženo přidáním vazebné molekuly DOPE na molekulu f-MLFKK. K 0,53 mM f-MLFKK bylo přidáno ekvimolární množství 9 mM DOPE-NHS v DMSO. Následně byla provedena inkubace, která probíhala při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny při pH 7,4. Sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 μm) a výsledný roztok 0,5 mM f-MLFKK-DOPE byl uschován při teplotě -20°C.

- **Syntéza ADA-BAM₄₀₀₀**

Nejprve byl dialýzou odstraněn síran amonný, který byl v dodaném preparátu. Výsledného produktu syntézy ADA-BAM bylo dosaženo přidáním vazebné molekuly BAM₄₀₀₀ na molekulu ADA. K roztoku ADA (400 U/ml) bylo přidáno ekvimolární množství 7,3 mM BAM₄₀₀₀ v DMSO. Následně byla provedena inkubace, která probíhala při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny při pH 7,4. Sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 μm). Výsledný roztok ADA-BAM (400 U/ml) byl skladován při teplotě -20°C.

- **Syntéza PNP-BAM₄₀₀₀**

Výsledného produktu syntézy PNP-BAM bylo dosaženo přidáním vazebné molekuly BAM₄₀₀₀ na molekulu PNP. K roztoku PNP (100U/ml) bylo přidáno ekvimolární množství 7,3 mM BAM₄₀₀₀ v DMSO. Následně byla provedena inkubace, která probíhala při pokojové

teplotě po dobu 1 hodiny při pH 7,4. Sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 µm). Výsledný roztok PNP-BAM (100 U/ml) byl skladován při teplotě -20°C.

4.7 Měření velikosti nádorů

Účinnost terapeutických směsí byla určována dle měření velikosti nádorů pomocí kaliperu. Toto měření probíhalo každý druhý den. Výsledný objem nádoru byl získán dosazením naměřených hodnot do vzorce $V = \pi/6 * AB^2$ a jeho vypočítáním. Ve vzorci platí, že hodnota A je nejdelší naměřený rozměr a B nejkratší naměřený rozměr, zpravidla výška nádoru. Obě hodnoty jsou uváděny v milimetrech (Li a kol., 2009).

4.8 Hodnocení metastáz na plicích

Vzhledem k metastatické aktivitě melanomu B16-F10 do plicní tkáně byly v prvním experimentu plíce myši analyzovány bezprostředně po uhynutí. Po vyjmutí plic z hrudníku byla počítána metastatická ložiska, která se jevila jako černé tečky různých velikostí. Následně byla provedena distribuce metastáz dle velikosti a hodnoty byly zaznamenány do příslušné tabulky. Po vyhodnocení byly plíce uloženy ve 4 % roztoku formaldehydu.

Ze získaných hodnot byl následně vypočten průměrný počet metastáz na jednu myš (pro myši léčené stejnou terapií). K výpočtu byl využit vzorec:

$$\frac{\text{celkový počet metastáz všech myší stejné skupiny}}{\text{počet myší ve skupině}}$$

4.9 Výpočet průměrné redukce nádorového růstu

Výpočet redukce nádorového růstu v porovnání s kontrolou byl proveden dle vzorce:

$$\frac{(\text{průměrný objem nádoru v kontrolní skupině} - \text{průměrný objem nádoru v léčené skupině})}{\text{průměrný objem nádoru v kontrolní skupině}} \times 100\%$$

Redukce nádorového růstu byla stanovována ve dnech 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 od počátku terapie. Z těchto hodnot byla v závěru získána hodnota průměrné redukce nádorového růstu vůči kontrolní skupině.

4.10 Analýza dat

Data byla zpracována v programu MS Excel. Pro statistické vyhodnocení byla vypočtena průměrná plocha pod křivkou (AUC) pro každou myš. Ze statistických analýz byla využita jednocestná ANOVA s následným Tukeyho post hoc. V případě hodnocení jednotlivých dní terapie byla využita rovněž jednocestná ANOVA s následným

post hoc Tukey nebo Unequal testem. Vliv na přežití myší byl hodnocen Kaplan-Mayerovou analýzou, která byla statisticky doplněna o Log-rank test (STATISTICA 13.2, StatSoft, Inc.). Ve všech grafech byla užitá střední chyba průměru (SEM).

4.11 Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu pomocí LC-MS (LC-MS/MS)

Hladiny adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí byly stanoveny analytickým chemikem Ing. Davidem Kahounem, Ph. D. na Katedře chemie a biochemie PřF JU. Adenosin byl analyzován na základě metody, která byla popsána v publikaci Oliviera a kol., 2011. Z této publikace vychází i předpoklady pro stanovení inosinu a hypoxantinu. Částečně byla ovšem tato metoda pro detekci těchto analytů upravena dle publikace Don Farthing a kol., 2007. K samotnému stanovení byla užitá technika LC-MS (pro adenosin a vnitřní standard 2-chloradenosin - LC-MS/MS). Pomocí této metody byl rovněž stanoven vliv vazby BAM na aktivitu enzymu PNP díky porovnání hladin hypoxantinu obsažených ve vzorcích připravených pro tuto analýzu.

V následující části je popsán princip této metody a příprava vzorků, které byly vyhodnoceny touto metodou.

4.11.1 Princip LC-MS (LC-MS/MS) metody

Metoda LC-MS (LC-MS/MS) je jednou z technik využívaných v analytické chemii. Jak napovídá označení, tato technika spojuje metodu kapalinové chromatografie (LC; liquid chromatography) a hmotnostní spektrometrie (MS; mass spectrometry). Tento tandemový systém synergicky zesiluje jednotlivé schopnosti obou užívaných technik a dovoluje přesné stanovení široké škály složek v komplexních vzorcích. Kapalinová chromatografie dokáže velmi účinně separovat jednotlivé složky analyzované směsi, zatímco hmotnostní spektrometrie umožňuje konkrétní identifikaci těchto složek s vysokou molekulární selektivitou a detekční citlivostí.

V průběhu kapalinové chromatografie přechází vzorky přes systém kapilár, ve kterém jsou jednotlivé složky vzorku separovány na základě chemicko-fyzikálních vlastností. Obecně lze princip této metody popsat jako rovnovážnou distribuci složek mezi dvě heterogenní fáze, tzv. mobilní a stacionární fází. Díky pohybu polární mobilní fáze (př. methanol/acetonitril/voda) proniká vzorek kolonou (nepolární stacionární fází), na kterou jsou vychytávány jednotlivé složky vzorku. Na základě síly interakce se stacionární fází jsou tyto složky separovány. Kapalným eluátem z LC kolony je následně

čerpán sprejovací sondou, která umožňuje tzv. elektrosprejovou ionizaci a následný přesun vzorku k analýze pomocí tandemově připojeného hmotnostního spektrometru. Sprejovací sonda, kolmo umístěna ke vstupu do MS systému, vstříkují pod vysokým tlakem kapalinu do komory, kde je v proudu dusíku za vysokých teplot v elektrickém poli vytvářena mlhovina z drobných kapiček, na nichž jsou následně povrchově lokalizovány náboje a generovány ionty. Ty mohou být dále uvolňovány do plynné fáze a přecházet do vysokotlaké komory, tzv. iontové pasti, kde je maximalizováno zachycení externě vstupujících iontů. Následně jsou tyto rozlišovány na základě poměru hmotnosti a náboje jednotlivých částic (m/z). V případě LC-MS/MS dochází k definovanému štěpení jednoho vybraného iontu, který je podroben kolizní disociaci s plynem (fragmentační reakci) a z něj vzniklé ionty se dále analyzují. Hmotnostní analyzátor rozlišuje ionty s využitím elektromagnetických polí, zatímco detektor vykazuje kvalitativní a kvantitativní informace o iontech v reálném čase.

LC-MS (LC-MS/MS) analýza přináší jako finální výsledek dva záznamy, a to chromatogram a hmotnostní spektrum. Chromatogram graficky znázorňuje odezvy detektoru v retenčním čase. Ty jsou obvykle znázorněny jako tzv. chromatografické zóny (píky), které jsou navzájem odděleny základní linií. Plocha chromatografických zón analytů udává kvantitativní informace o vzorku, zatímco určení retenčních časů daných analytů umožňuje kvalitativní vyhodnocení. Hmotnostní spektrum zaznamenává relativní intenzity vzniklých iontů (Grebe a Singh, 2011; Pitt, 2017).

Pro analýzu v této práci byl použit kapalinový chromatograf UltiMate 3000 a hmotnostní spektrometr VelosPro (Thermo).

4.11.2 Použité chemikálie a činidla

Pro detekci přítomnosti adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí byly užity následující standardy: adenosinový standard adenosinu (Sigma Aldrich), inosinový standard inosinu (Sigma Aldrich), hypoxantinový standard hypoxantinu (Sigma Aldrich) a vnitřní standard 2-chloroadenosin (Sigma Aldrich). Pro hodnocení čistoty LC-MS byl užit acetonitril (Fluca Analytical a Merck) a kyselina mravenčí (Sigma Aldrich).

4.11.3 Odběr nádorů využitých na přípravu vzorků pro LC-MS (LC-MS/MS)

Po cervikální dislokaci byl myším co nejrychleji odebrán nádor z pravého boku, který byl zvážen na analytických váhách a následně byl přenesen do konické ependorfky s 600 μ l 20 % roztoku kyseliny trichloroctové v destilované vodě. Poté byla provedena

homogenizace pomocí konického pístového homogenizátoru a vzorky byly uschovány v -20°C do doby stanovení pomocí LC-MS.

4.11.4 Příprava vzorků pro detekci adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí

Po rozmražení nádorů odebraných způsobem popsáním v předchozí kapitole (4.10.3), byly vzorky centrifugovány (30 min, 160g, 4°C). Následně z nich byly odebrány supernatanty a připraveny zásobní vzorky o objemu 150 µl.

Do 1,8 ml mikrozkušavky určené k LC-MS bylo napipetováno 175µl vody, 25µl vnitřního standardu a 50 µl vzorku odebraného z nádoru. Zkušavky byly uzavřeny silikonovým víkem a vortexovány po dobu 10 sekund. Takto připravené vzorky byly okamžitě analyzovány pomocí LC-MS/MS.

Jako blank byl pro tuto analýzu připraven vzorek, který vznikl smícháním 225 µl vody s 25µl vnitřního standardu. Následující postup přípravy blanku je shodný s přípravou vzorků.

4.11.5 Příprava vzorků pro analýzu aktivity enzymu PNP a PNP-BAM

K 200µl 1mM inosinu bylo napipetováno 0,4 µl PNP (100 U/ml). Po 2, 5 a 10 minutách inkubace při teplotě 37°C bylo postupně odebráno po 50 µl vzorku, který byl přenesen do inaktivační lázně o teplotě 95°C na dobu 5 minut. 1 mM roztok inosinu bez přídavku enzymu, ale podrobený stejnému působení inaktivační lázně sloužil jako hodnota v nulovém čase.

Stejným způsobem byly připraveny i vzorky s využitím enzymu PNP-BAM (100 U/ml), který byl přidán k 1mM inosinu ve stejném množství. Následně byly všechny vzorky uchovávány při teplotě -20°C do doby stanovení hladin hypoxantinu.

Pro samotné stanovení pomocí LC-MS/MS byly vzorky rozmrazeny. Do 1,8 ml mikrozkušavky určené pro tuto metodu bylo odpipetováno 880 µl vody, 100 µl vnitřního standardu a 20 µl samotného vzorku. Takto připravená směs byla dále uzavřena silikonovým víčkem, vortexována po dobu 10 sekund a ihned postoupena analýze.

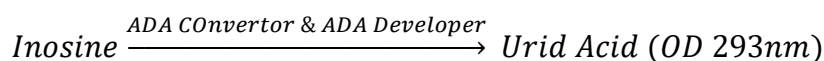
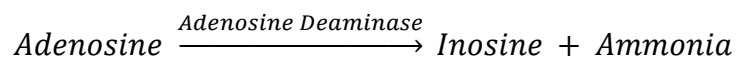
Jako blank byl pro tuto analýzu připraven vzorek, který vznikl smícháním 900 µl vody s 100µl vnitřního standardu. Následující postup přípravy blanku je shodný s přípravou vzorků.

4.11.6 Vyhodnocení naměřených hodnot pomocí LC-MS/MS

K vyhodnocení dat této metody byly využity softwary Chromeleon Xpress, LTQ Tune plus 2.7, Xcalibur 2.2 a DC MS Link. Naměřené koncentrace metabolitů ve vzorku byly následně přepočítány na objem nádoru jednotlivého vzorku a výsledky byly zpracovány v programu MS Excel.

4.12 Stanovení aktivity ADA a ADA-BAM

Ke stanovení aktivity enzymů ADA a kotveného enzymu ADA-BAM bylo užito komerčního kitu Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (Calorimetric). Základním principem stanovení enzymové aktivity pomocí tohoto kitu je detekce konečného produktu enzymatické kaskády způsobené adenosin-deaminázou Tento enzym katalyzuje konverzi adenosinu (popř. 2-deoxyadenosinu) na inosin (popř. 2-deoxyinosin) a amoniak. Inosin je dále pomocí ADA Converteru a ADA Developeru v tomto kitu metabolizován na kyselinu močovou, která je výsledným produktem této metabolické dráhy. Metabolické děje modulované aktivitou adenosine-deaminázy jsou popsány následujícími rovnicemi:



Detekce cílového produktu, tzn. kyseliny močové, byla provedena pomocí přístroje Microplate reader SYNERGY™ H1 (Biotek®) v kinetickém módu po dobu 30 minut při vlnové délce 293nm. Aktivita enzymu byla následně získána dosazením naměřených dat do příslušného vzorce:

$$\text{aktivita enzymu ve vzorku} = \frac{B}{\Delta T \times \mu\text{g proteinu}} = U/\text{mg}$$

(B = množství inosinu odečtené ze standartní inosinové křivky (nmol), ΔT = reakční čas (min), $\mu\text{g proteinu}$ = množství proteinu na jamku).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a gemcitabinu s následným zaměřením na sledování výskytu metastáz

Pro tento experiment bylo užito 24 myší. Každé myši byly transplantovány melanomové buňky subkutánně do pravého boku a rovněž jim byla aplikována dávka těchto buněk *intravenózně*. Po uplynutí 12 dnů od injekce byly myši rozděleny do 4 skupin (A - D). Každá myš byla umístěna do samostatného boxu a následně byla zahájena jejich léčba (den terapie 0). Myším bylo aplikováno 50 μ l terapeutické směsi *intratumorálně* (i.t.) ve 4 pulzech dle běžně využívaného schématu naší laboratoře, tj. 12 injekcí podaných ve dnech 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25 a 26. Tato terapie byla systémově kombinována s *intraperitoneální* aplikací 200 μ l gemcitabinu či PBS dle schématu pokusu podávaného ve dnech 0, 4, 8, 12, 16 a 20. Celkové schéma terapie je uvedeno v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: Schéma terapie pomocí R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a gemcitabinu.

Skupina	<i>i.t.</i> aplikace (50 μ l) roztoku	Dny podání	<i>i.p.</i> aplikace (200 μ l) roztoku	Dny podání
A	0,5 mg R-848+ 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26	PBS	0; 4; 8; 12; 16; 20
B	0,5 mg R-848+ 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26	12 mg gemcitabinu / ml PBS	0; 4; 8; 12; 16; 20
C	PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26	12 mg gemcitabinu / ml PBS	0; 4; 8; 12; 16; 20
D	PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26	PBS	0; 4; 8; 12; 16; 20

Pro vyhodnocení pokusu bylo provedeno každý druhý den měření velikosti nádorů a rozměry byly zaznamenány. Po ukončení léčby (26. den) bylo sledováno přežití myší a bezprostředně po úhynu byl vyhodnocen výskyt plicních metastáz, které byly zaznamenány do tabulky.

5.2 Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu adenosindeaminázy (ADA)

Na 96 jamkovou destičku, přiloženou výrobcem komerčního kitu Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (Calorimetric), byla ve dvou sériích napipetována řada 0, 2, 4, 6, 8 a 10 nmol roztoku inosinového standardu na jamku. Jako reagent Background control bylo do dalších dvou jamek naneseo 50 μ l ADA Assay Bufferu a pro pozitivní kontrolu bylo v dubletu na destičku přidáno po 2 μ l ADA Positive Control. V tripletu po 5 μ l byly naneseeny oba vzorky - ADA (0,2 U/ml) a ADA-BAM (odvozený z ADA, tudíž mající stejnou aktivitu, nedojde-li k jejímu snížení vazbou BAM). Objem jamek pozitivní kontroly a vzorků byl doplněn na 50 μ l pomocí ADA Assay Bufferu. Jako BLANK byla využita destilovaná voda napipetovaná po 100 μ l do dalších 2 jamek.

Z příslušných reagensů byly následně dle pokynů výrobce připraveny 2 mixy - background control mix a reaction mix. Background control mix byl přidán po 50 μ l k řadě inosinového standardu, zatímco reaction mix byl ve stejném množství napipetován do jamek příslušících každému vzorku, pozitivní kontrole a reagent background control. Takto připravená destička byla postoupena pětiminutové inkubaci při teplotě 37°C.

Pro ilustraci následuje schéma využití části 96 jamkové destičky se záznamem všech reagensů (Obr. 2).

	1	2	3	4
A	Inosine standard (0 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	Inosine standard (0 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	BLANK (100 μ l vody)	BLANK (100 μ l vody)
B	Inosine standard (2 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	Inosine standard (2 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	ADA (5 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)	ADA-BAM (5 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)
C	Inosine standard (4 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	Inosine standard (4 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	ADA (5 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)	ADA-BAM (5 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)
D	Inosine standard (6 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	Inosine standard (6 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	ADA (5 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)	ADA-BAM (5 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)
E	Inosine standard (8 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	Inosine standard (8 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)		
F	Inosine standard (10 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)	Inosine standard (10 μ l/50 μ l AAB) Background control mix (50 μ l)		
G	Positive control (2 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)	Positive control (2 μ l/50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)		
H	R. Backgroundn control (50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)	R. Backgroundn control (50 μ l AAB) Reaction mix (50 μ l)		

Obr. 2: Rozložení jamek na 96 jamkové destičce (pozn. zkratka AAB = ADA Assay Buffer).

Měření aktivity enzymů bylo provedeno pomocí přístroje Microplate reader SYNERGYTM H1 (Biotek®). Absorbance (OD 293nm) byla vyhodnocována v kinetickém

módu přístroje po dobu 30 min. Ze získaných hodnot byla stanovena konečná aktivita enzymů ADA a ADA-BAM.

(pozn. na přístroji se nepodařila nastavit optimální teplota reakce 37°C, reakce probíhala při teplotě 25°C)

5.3 Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu purinnukleosid-fosforylázy (PNP)

Pro tento pokus bylo připraveno 7 vzorků, které byly vytvořeny dle kapitoly 4.11.5. V následující tabulce (Tab. 3) je uvedeno příslušné schéma těchto vzorků, které byly analyzovány pomocí LC-MS.

Tab. 3: Vzorky připravené pro sledování aktivity enzymu PNP po vazbě na kotvu BAM.

Výchozí vzorek (50µl)	Přidaný enzym (100U/ml)	Doba působení enzymu
INOSIN (1mM)	-	0
INOSIN (1mM)	PNP	2
INOSIN (1mM)	PNP	5
INOSIN (1mM)	PNP	10
INOSIN (1mM)	PNP-BAM	2
INOSIN (1mM)	PNP-BAM	5
INOSIN (1mM)	PNP-BAM	10

5.4 Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymu ADA-BAM

Pro tento pokus bylo použito 12 myší, kterým byly subkutánně transplantovány buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02. Po 25 dnech proběhla distribuce těchto myší do 4 skupin (A-D). Skupině A byly odebrány nádory způsobem popsáním v kapitole 4.11.3. Ostatním myším (skupiny B-D) bylo *intatumorálně* aplikováno 50 µl roztoku obsahujícího enzym ADA-BAM (400U/ml) v PBS. Následně byly tyto myši dle skupin usmrcovány v čase 1,2 a 4 hodiny od podání enzymu.

Z odebraných nádorů byly připraveny vzorky dle kapitoly 4.11.4 a vyhodnoceny pomocí LC-MS.

5.5 Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM

Stejně jako v předchozím experimentu bylo užito 12 myší, kterým byly subkutánně transplantovány buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02. Po 25 dnech proběhla

distribuce těchto myší do 4 skupin (A-D). Skupině A byly odebrány nádory způsobem popsaným v kapitole 4.11.3. Ostatním myším (skupiny B-D) bylo *intatumorálně* aplikováno 50 µl roztoku obsahujícího enzymy ADA-BAM (400U/ml) + PNP-BAM (100U/ml) v PBS. Následně byly tyto myši dle skupin jako v předchozím pokusu usmrcovány v čase 1,2 a 4 hodiny od podání enzymu.

Z odebraných nádorů byly připraveny vzorky dle kapitoly 4.11.4 a vyhodnoceny pomocí LC-MS.

5.6 Vliv přidání enzymu ADA-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.

Pro tento experiment bylo užito 24 samic kmene C57BL/6N. Každé myši byly transplantovány buňky Panc02 do pravého boku. Po dvanácti dnech byly myši rozděleny do 4 skupin (A-D) po 6 myších, kde každá myš byla umístěna do sterilního boxu. V den distribuce (den terapie 0) byla započata 4 pulzní terapie pomocí příslušné terapeutické směsi dle skupiny. Schéma pokusu je zaznamenáno v následující tabulce (Tab. 4).

Tab. 4: Schéma pokusu využívajícího terapie pomocí R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a ADA-BAM.

Skupina	<i>i.t.</i> aplikace (50µl) roztoku	Dny podání
A	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
B	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA + 20 U ADA-BAM / ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0; 8; 16; 24;
	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	1, 2; 9,10; 17, 18; 25, 26
C	20 U ADA-BAM /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0; 8; 16; 24;
	PBS	1, 2; 9,10; 17, 18; 25, 26
D	PBS	0, 1, 2; 8, 9 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26

Terapeutické látky byly podány ve 12 injekcích ve dnech 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26. Enzym ADA-BAM, jímž byla obohacena základní terapie, byl obsažen v terapeutické směsi pouze ve 4 injekcích podávaných ve dnech 0, 8, 16 a 24. Každý druhý den byla změřena velikost nádoru a rozměry byly zaznamenány pro další vyhodnocení.

Po ukončení léčby byly myši nadále pozorovány a byl analyzován vliv terapie na dobu jejich přežití po ukončení léčby.

U myších doživších se 120. dne byla provedena retransplantace pankreatického adenokarcinomu Panc02 do pravého boku a 164. den od počátku terapie byly myši retransplantovány i pomocí nádorové buněčné linie B16-F10. Vliv retransplantací na myši byl dále sledován do projevu obnovení nádorů.

5.7 Vliv přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.

Pro tento experiment bylo užito 18 samic kmene C57BL/6N. Každé myši byly transplantovány buňky Panc02 do pravého boku. Po dvanácti dnech byly myši rozděleny do 3 skupin (A-C) po 6 myších, kde každá myš byla umístěna do sterilního boxu. V den distribuce (den terapie 0) byla započata klasická 4 pulzní terapie pomocí příslušné terapeutické směsi dle skupiny. Schéma celého pokusu je uvedeno v následující tabulce (Tab. 5).

Tab. 5: Schéma pokusu využívajícího terapie pomocí R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM, ADA-BAM a PNP-BAM.

Skupina	<i>i.t.</i> aplikace (50µl) roztoku	Dny podání
A	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
B	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA + 20 U ADA-BAM + 5 U PNP-BAM /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 2; 8, 10; 16, 18; 24, 26;
	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	1; 9; 17; 25
D	PBS	0, 1, 2; 8,9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26

Terapeutické látky byly opět podány ve 12 injekcích ve dnech 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26. Každý druhý den byla změřena velikost nádoru a rozměry byly zaznamenány do tabulky pro další vyhodnocení. I v tomto případě byly myši sledovány a proběhla analýza jejich přežití.

5.8 Modulace základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA pomocí látek s nižší molekulovou hmotností (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE a fMLFKK-DOPE) při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu.

Experiment byl proveden na 30 samicích kmene C57BL/6N. Každé myši byly transplantovány buňky Panc02 do pravého boku. Po dvanácti dnech byly myši rozděleny do 5 skupin (A-E) po 6 myších, kde každá myš byla umístěna do sterilního boxu. V den distribuce (den terapie 0) byla započata klasická 4 pulzní terapie pomocí příslušné terapeutické směsi dle skupiny. Schéma celého pokusu je uvedeno v následující tabulce (Tab. 6).

Tab. 6: Schéma pokusu pomocí molekul s nižší molekulovou hmotností (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE a fMLFKK-DOPE).

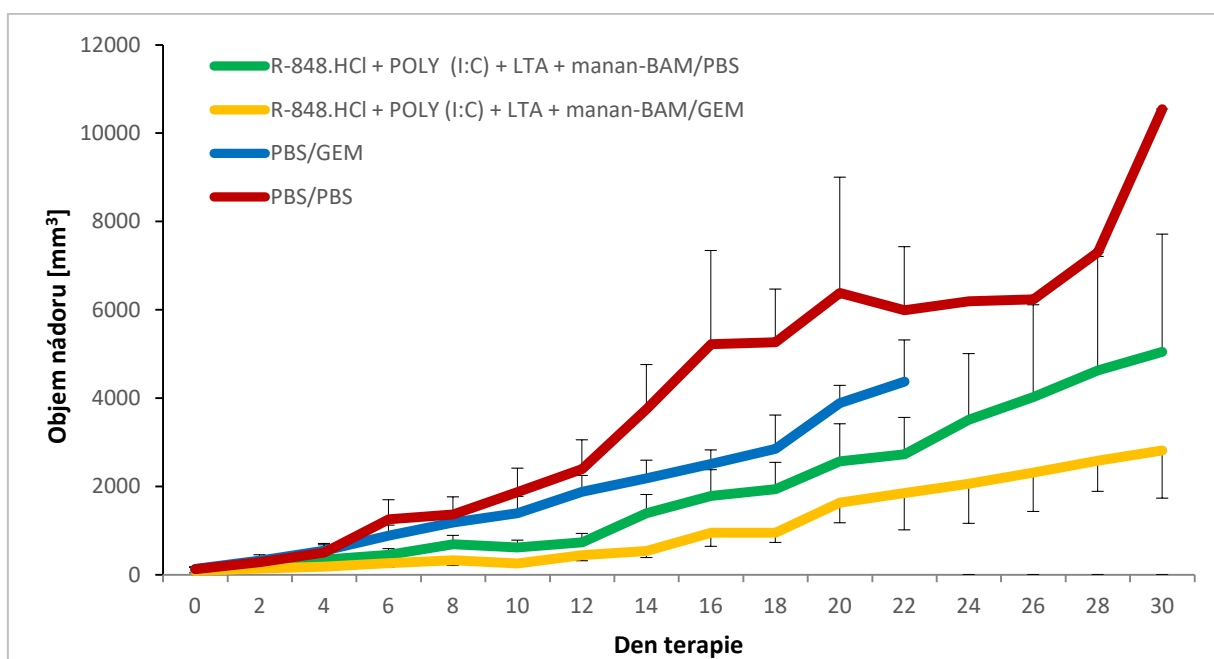
Skupina	<i>i.t. aplikace (50µl) roztoku</i>	Dny podání
A	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA / ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
B	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannosaminu-BAM v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
C	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA /ml 0,2 mM mannosaminu-DOPE v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
D	0,5 mg R-848+0,5 mg POLY (I:C) +0,5 mg LTA /ml 0,5 mM f-MLFKK -DOPE v PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
E	PBS	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26

Terapeutické látky byly podány způsobem uvedeným v předchozích pokusech. Po ukončení terapie byl nadále vyhodnocován vliv terapie na jejich přežití.

6 VÝSLEDKY

6.1 Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a gemcitabinu s následným zaměřením na sledování výskytu metastáz

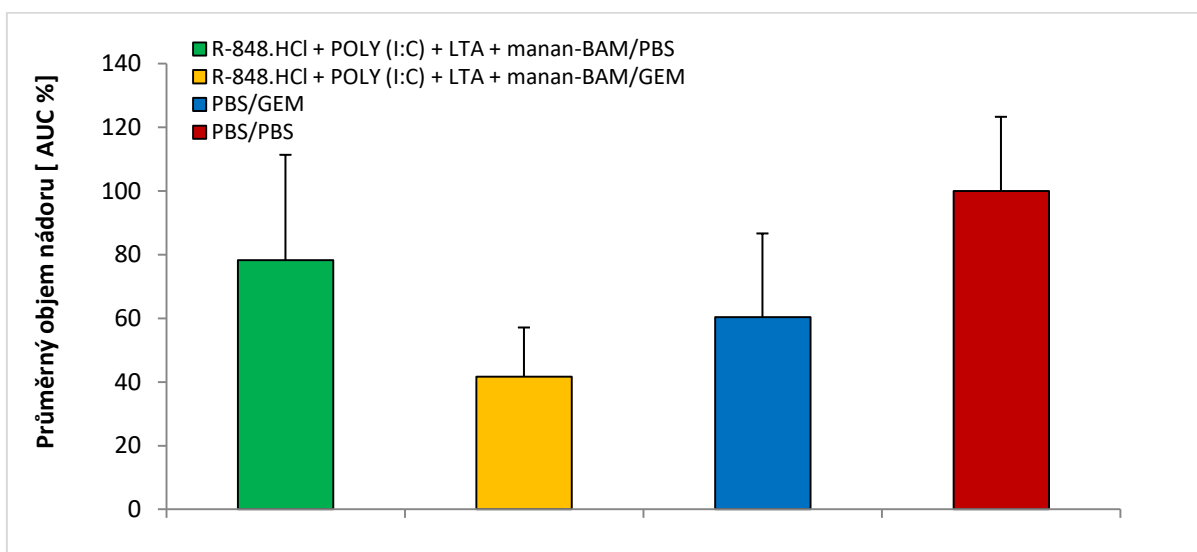
Tento pokus byl zaměřen na vliv systémově podávaného samotného gemcitabinu či v kombinaci s terapeutickou směsí zavedenou v rámci výzkumu naší laboratoře. Z grafu vývoje terapie v průběhu pokusu je viditelná redukce nádorového růstu pomocí terapie s využitím R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM (zelená křivka) o 37, 64 % proti kontrolní skupině (červená křivka). Pokud byla tato směs navíc kombinována se systémovým podáním gemcitabinu (žlutá křivka), celková redukce nádorového růstu byla ještě o 24,81 % vyšší než u léčené skupiny bez chemoterapeutika. Podání samotného gemcitabinu (modrá křivka) nemělo na terapii zásadní terapeutický účinek a vedlo k úhynu myši ještě před ukončením terapie (Obr. 3).



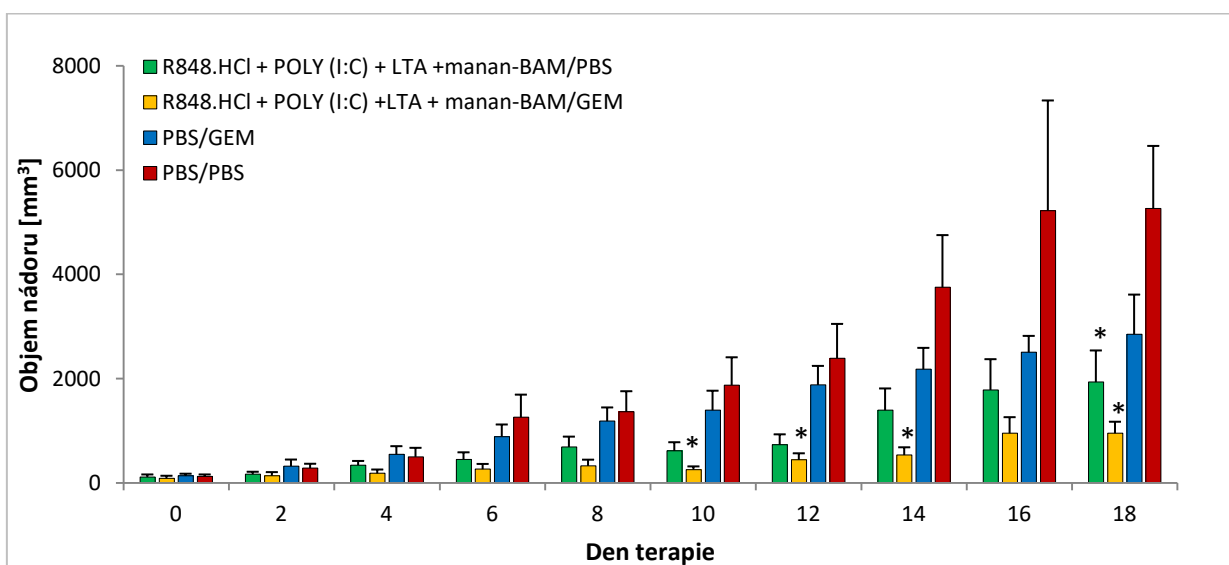
Obr. 3: Vývoj terapie pomocí R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM se systémovým podáním gemcitabinu.

Pro statistické vyhodnocení celkového vlivu terapie byla vypočtena plocha pod křivkou AUC, která je vynesena v následujícím grafu (Obr. 4). Ani jedna z terapeutických složek nevykazovala statistickou významnost, ale v případě hodnocení

vlivu terapie v jednotlivé dny (Obr. 5) se ukázalo, že v počáteční fázi má terapeutická směs R-848.HCl, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a gemcitabin statisticky prokazatelný vliv oproti kontrole.



Obr. 4: Průměrný objem nádorů [AUC %] pro terapii R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM se systémovým podáním gemcitabinu.

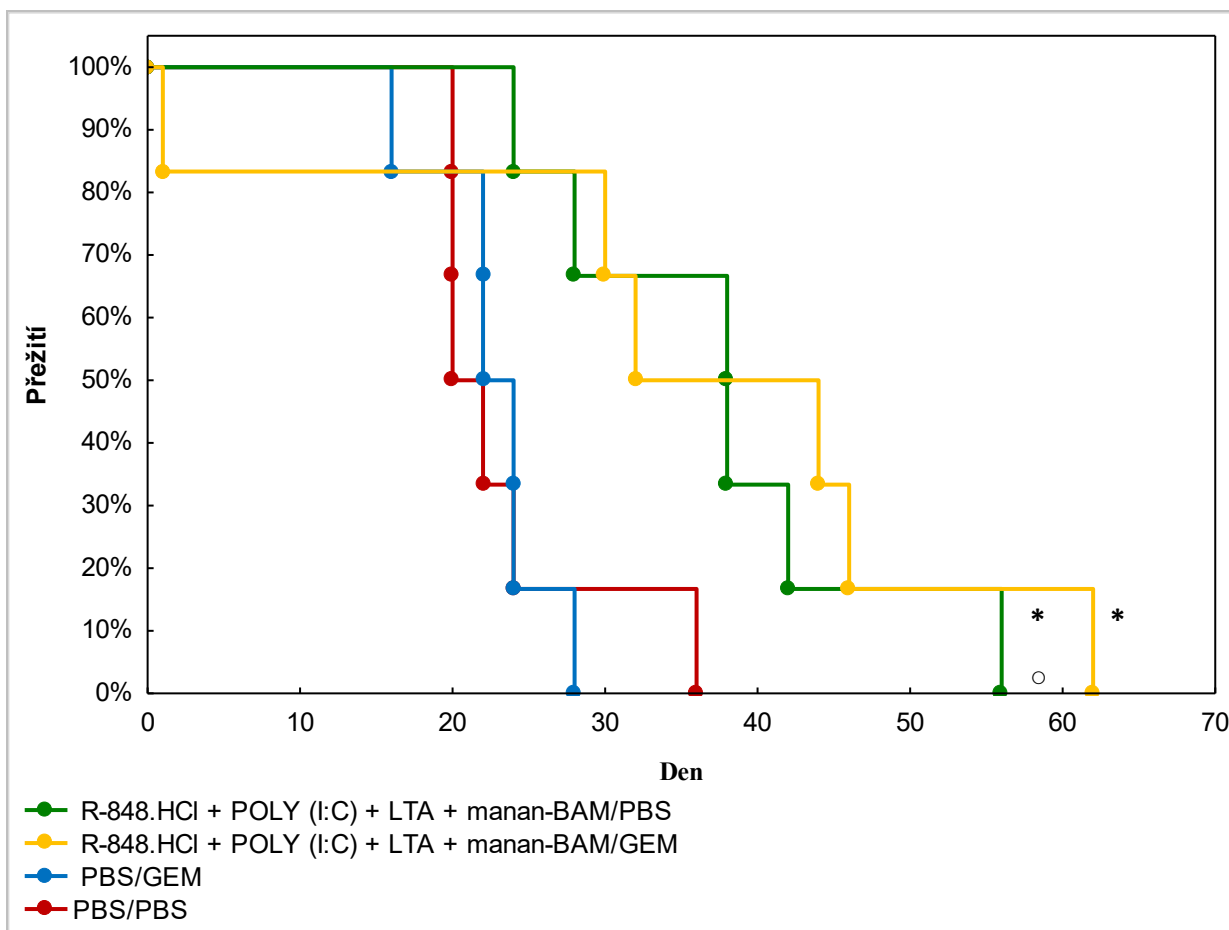


Obr. 5: Statistické vyhodnocení terapie R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM se systémovým podáním gemcitabinu pro počáteční fázi terapie.

Hladiny statistické významnosti:

* $P \leq 0,05$ vztaheno ke kontrolní skupině PBS/PBS

Výrazný vliv terapie se projevil na přežití léčených myší oproti kontrole. Obě léčené skupiny žily přibližně 2x déle než kontrolní skupiny. Tento efekt byl statisticky významně prokazatelný (Obr. 6).



Obr. 6: Vliv léčby pomocí terapie R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM se systémovým podáním gemcitabinu na přežití myši.

Hladiny statistické významnosti:

* $P \leq 0,05$ vůči PBS/GEM

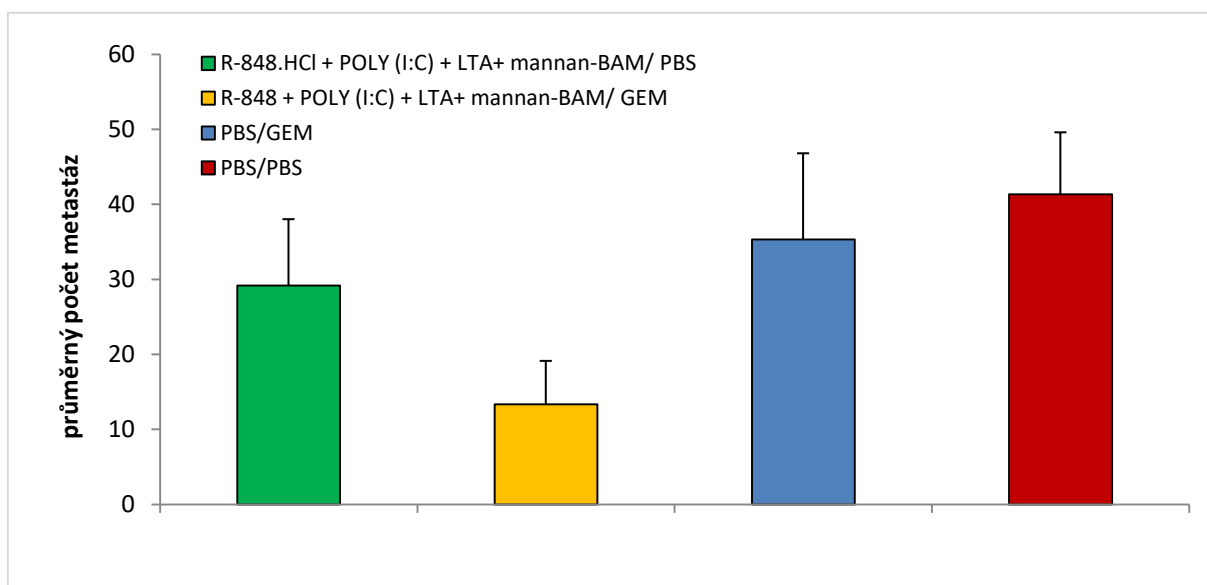
O $P \leq 0,05$ vůči PBS/PBS

Nedílnou součástí tohoto pokusu bylo sledování výskytu metastáz na plicích uhynulých myši, které byly analyzovány ihned po úhynu jednotlivých myši. V následující tabulce (Tab. 7) je uvedena distribuce metastáz dle velikosti u jednotlivých myši tohoto pokusu.

Tab. 7: Analýza metastáz detekovaných na plicích uhynulých myší.

Myš	Den úhynu	Počet metastáz dle velikosti				Celkový počet mets
		0-1 mm	1-2 mm	2-3 mm	3-více mm	
A1	36	20	18	8	3	49
A 2	24	16	15	7	4	42
A 3	20	20	24	9	3	56
A 4	20	8	-	-	-	8
A 5	22	28	22	9	5	64
A 6	20	18	7	2	2	29
B 1	38	8	7	9	9	33
B 2	24	28	23	7	3	59
B 3	56	-	-	-	-	0
B 4	42	12	6	3	1	22
B 5	28	13	21	11	2	47
B 6	38	7	1	2	4	14
C 1	44	3	1	-	-	4
C 2	30	15	14	7	3	39
C 3	1	3	1	-	-	4
C 4	32	6	9	2	3	20
C 5	62	9	2	-	-	11
C 6	46	2	-	-	-	2
D 1	24	18	22	17	9	66
D 2	22	29	18	21	7	75
D 3	28	6	2	-	-	8
D 4	24	9	3	2	-	14
D 5	22	16	4	4	1	25
D 6	16	14	5	5	-	24

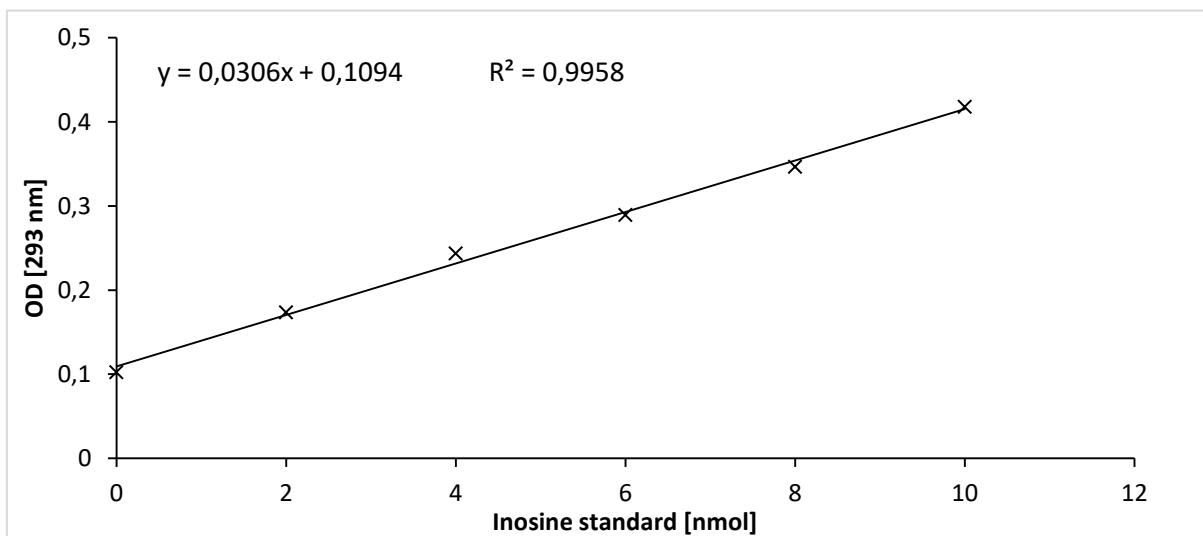
Na celkový počet metastáz v rámci jedné skupiny neměla terapie statisticky prokazatelný efekt, což je znázorněno na následujícím grafu (Obr. 7).



Obr. 7: Celkový počet metastáz v rámci skupin léčených R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a mannan-BAM se systémovým podáním gemcitabinu.

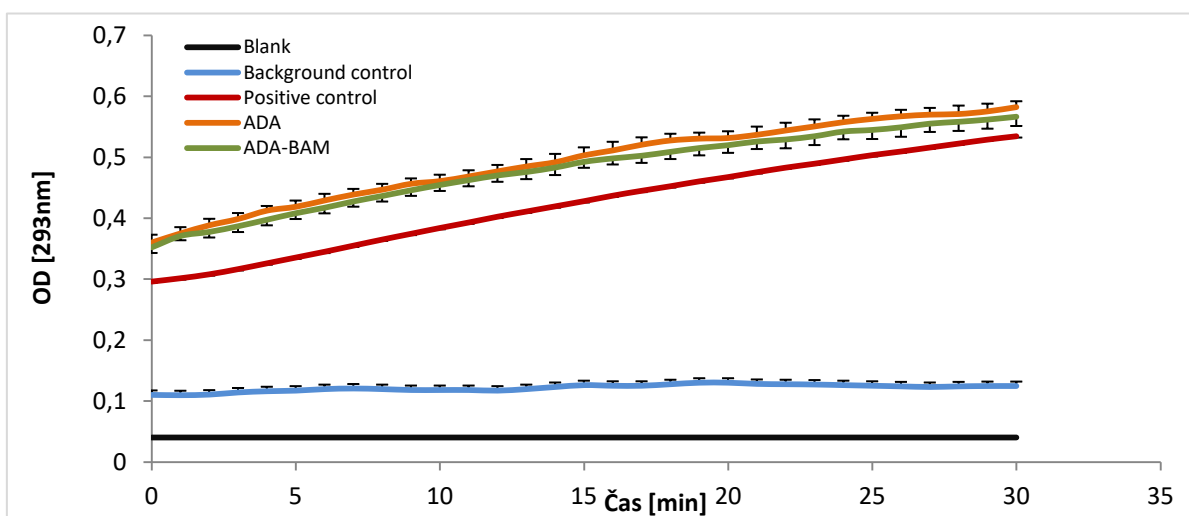
6.2 Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu adenosindeaminázy (ADA)

Hlavním úkolem tohoto pokusu bylo zjistit ovlivnění aktivity enzymu adenosindeaminázy po navázání biokompatibilní kotvy na membrány BAM na tento enzym. S využitím komerčního kitu Adenosine deaminase Activity Assay kit byla sestrojena kalibrační křivka inosinového standardu. Rovnice získaná z kalibrační křivky byla stanovena $y = 0,0306x + 0,1094$ s hodnotou koeficientu spolehlivosti $R = 0,9958$ (kritérium přijatelnosti $R > 0,9900$), (Obr. 8).



Obr. 8: Kalibrační křivka inosinu pro stanovení aktivity enzymu ADA a ADA-BAM.

Vzorky ADA a ADA-BAM byly analyzovány pomocí Microplate readeru SYNERGYTM H1 (Biotek®) při vlnové délce 293 nm. Naměřené hodnoty byly následně vyneseny do grafu (Obr. 9) a pomocí vzorce byla vypočtena aktivita příslušných enzymů.

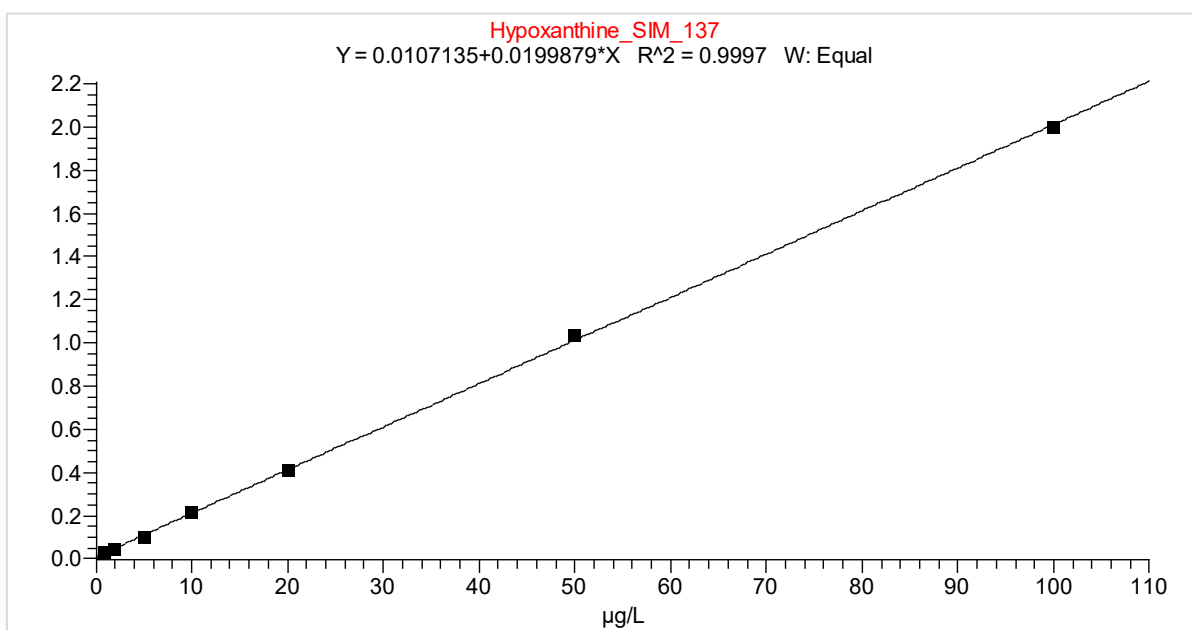


Obr. 9: Hodnoty absorbance vzorků ADA a ADA-BAM zaznamenané v průběhu reakce.

Již z pohledu na graf je viditelné, že přidání kotvy BAM nemělo na aktivitu enzymu výrazný vliv a aktivita byla srovnatelná. Výpočtem byla stanovena aktivita ADA 30 U/mg a aktivita ADA-BAM 28 U/mg. Přidáním kotvy aktivita poklesla o 6,67 %.

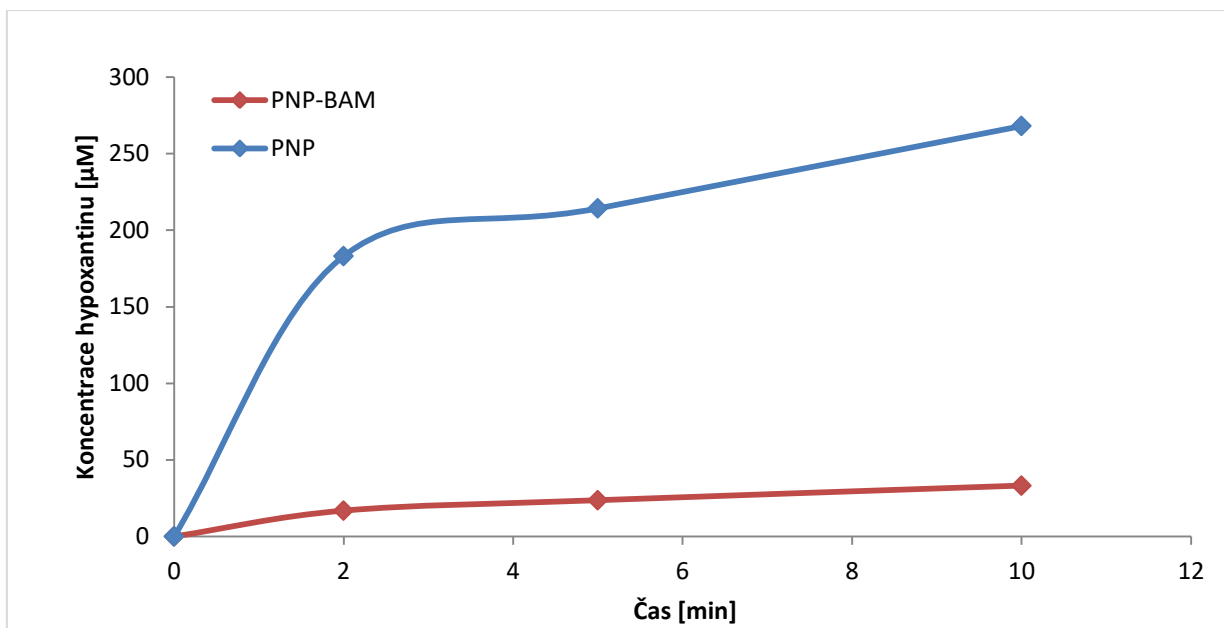
6.3 Vliv vazby BAM na aktivitu enzymu purinnukleosid-fosforylázy (PNP)

Stejně jako v předchozím experimentu se tento pokus zabýval vlivem kotvy BAM na aktivitu enzymu, v tomto případě purinnukleosid-fosforylázy. V tomto případě byl detekován hypoxantin, výsledný produkt metabolické dráhy katalyzované pomocí PNP. Ke stanovení byla užita technika LC-MS, která byla optimalizována pro měření hypoxantinu. Rovnice získaná z kalibrační křivky dosahovala hodnoty $y = 0,0107135 + 0,0199879 \cdot x$ s hodnotou koeficientu spolehlivosti $R = 0,9997$ (kritérium přijatelnosti $R > 0,9900$), (Obr. 10).



Obr. 10: Hodnoty absorbance vzorků ADA a ADA-BAM zaznamenané v průběhu reakce.

Z naměřených hodnot koncentrace vzniklého hypoxantinu v čase 10 min. byla vypočtena aktivita příslušných enzymů. Aktivita enzymu PNP byla stanovena na 27,9 U/mg, zatímco aktivita enzymu PNP-BAM byla o řád nižší. Tato hodnota činila 3,49 U/mg. Tento výrazný pokles aktivity PNP po navázání kotvy BAM je patrný v následujícím obrázku (Obr. 11).

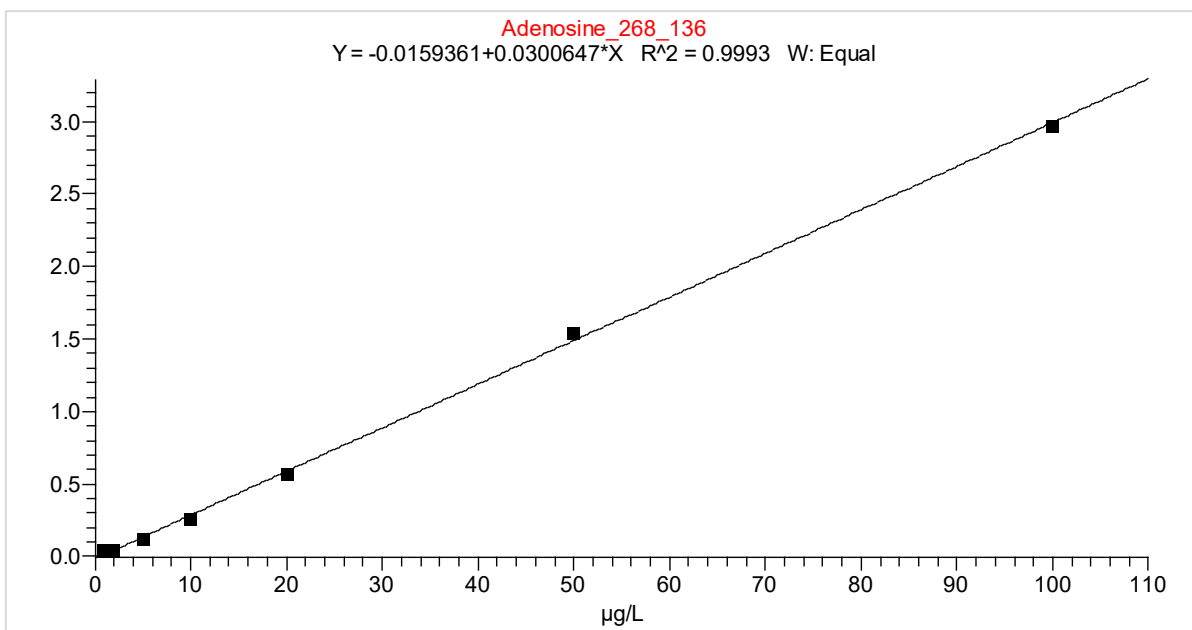


Obr. 11: Koncentrace hypoxantinu vznikající odbouráváním 1mM inosinu po přidání enzymů PNP a PNP-BAM.

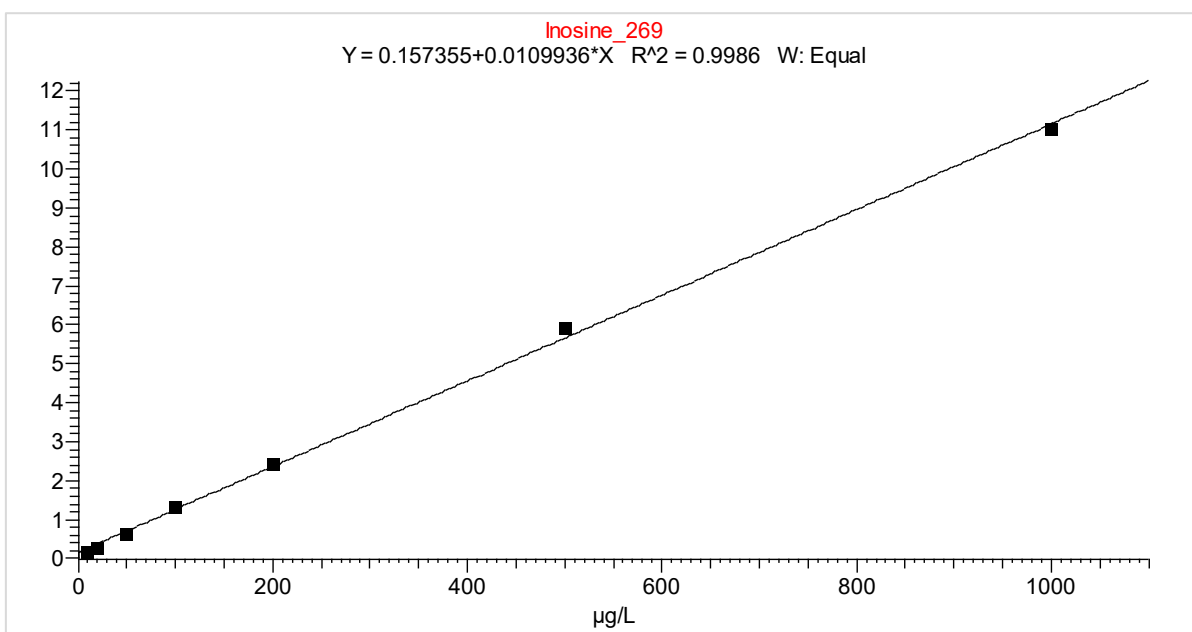
(pozn. toto měření bylo stanoveno pouze z jedné série vzorků, není možné stanovit odchylku SEM)

6.4 Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymu ADA-BAM

Hladiny adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém prostředí byly stanoveny rovněž za pomoci LC-MS (LC-MS/LS) metody. Cílem tohoto experimentu bylo sledování těchto analytů po injikaci nádorového prostředí enzymem ADA-BAM. Pro všechny analyty byly sestrojeny kalibrační křivky. Rovnice získaná z kalibrační křivky pro adenosin dosahovala hodnoty $y = 0,0159361 + 0,0300647 \cdot x$ s hodnotou koeficientu spolehlivosti $R = 0,9993$ (kritérium přijatelnosti $R > 0,9900$), (Obr. 12). Pro inosin tato rovnice činila $y = 0,0159361 + 0,0300647 \cdot x$ s hodnotou koeficientu spolehlivosti $R = 0,9998$ (kritérium přijatelnosti $R > 0,9900$), (Obr. 13) a kalibrační křivka pro hypoxantin byla uvedena v předchozím experimentu (kapitola 6.3; Obr. 10).



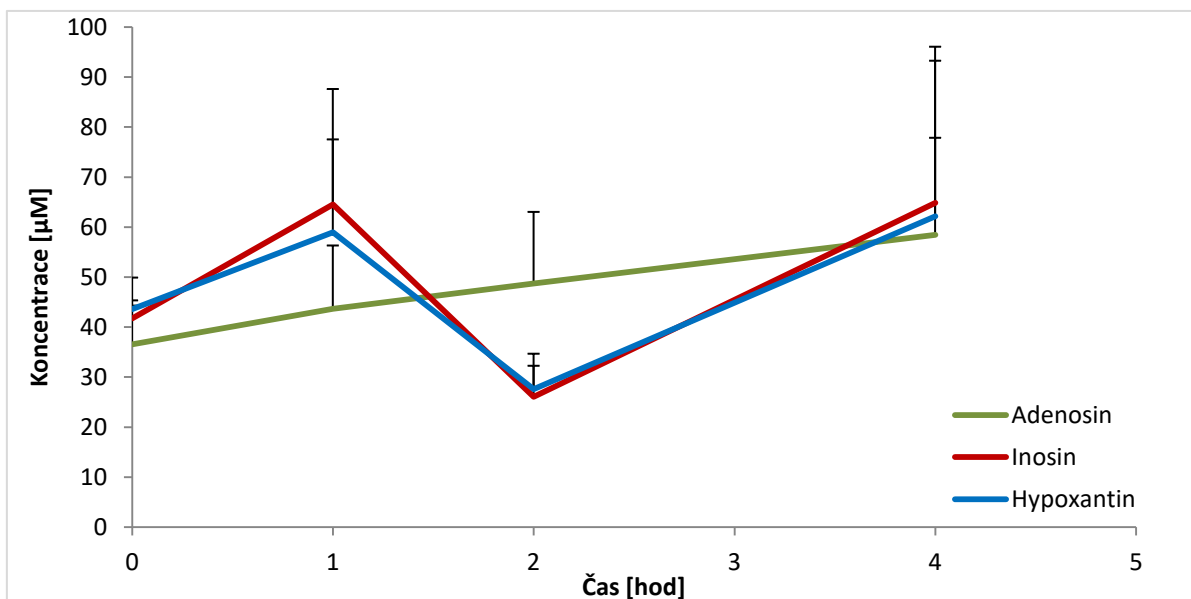
Obr. 12: Kalibrační křivka adenosinu pro LC-MS/MS.



Obr. 13: Kalibrační křivka inosinu pro LC-MS.

Z hodnot stanovených pomocí LC-MS (LC-MS/MS) byly následně přepočítány hladiny adenosinu, inosinu a hypoxantinu na objem nádoru a tyto hodnoty byly zaznamenány do následujícího grafu (Obr. 14), z něhož je patrné, že koncentrace adenosinu (zelená křivka) se lineárně zvyšovala v průběhu analýzy. Hladiny adenosinu se pohybovaly v rozmezí 35,68 - 58,44 µM. U jeho metabolitů došlo po hodině působení enzymu ADA

k prudkému poklesu, ovšem následně se hladiny inosinu a hypoxantinu dle očekávání zvyšovaly.

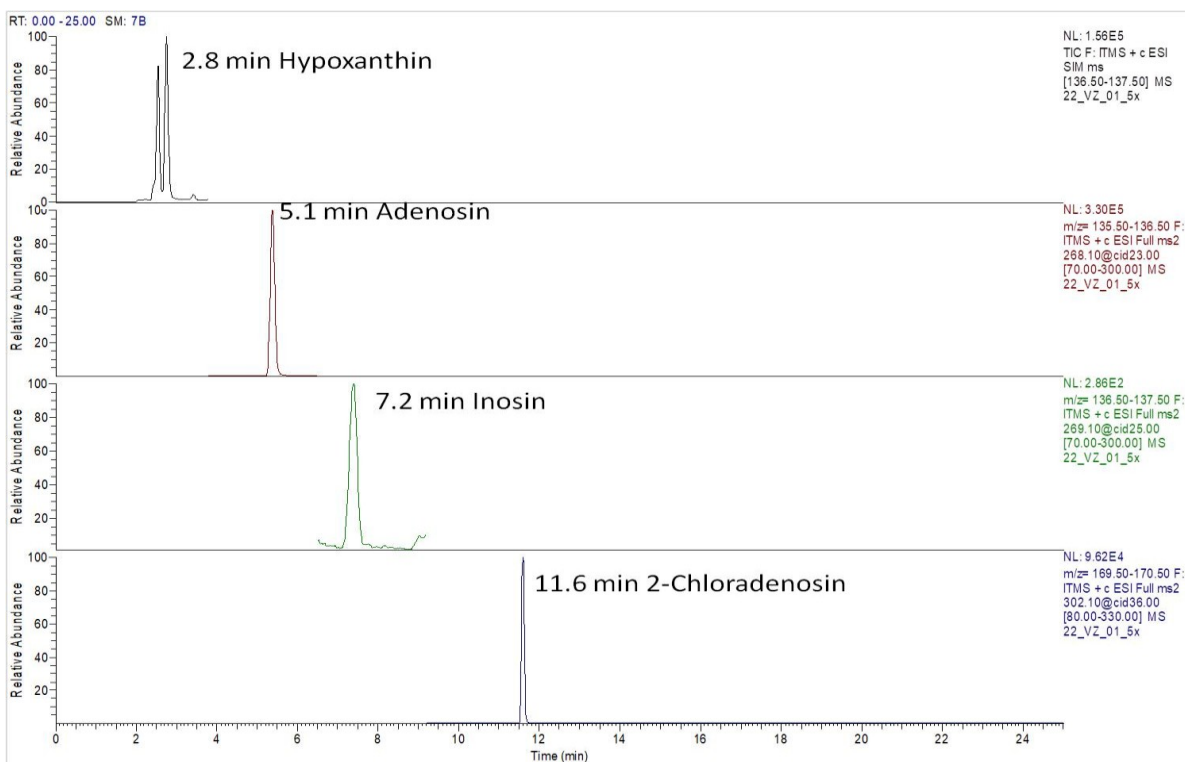


Obr. 14: Hladiny adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po injikaci enzymem ADA-BAM.

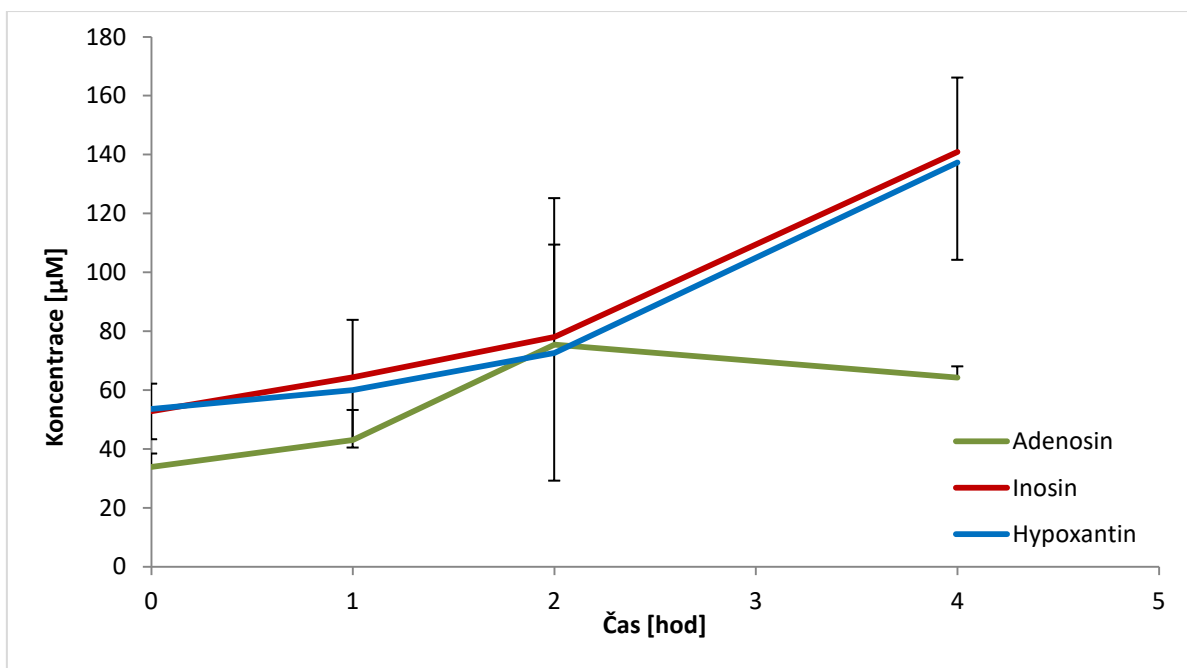
6.5 Stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM

Rovněž jako předchozí experiment je tento pokus zaměřen na působení enzymů v nádorovém mikroprostředí, v tomto případě ADA-BAM a PNP-BAM. I pro tento experiment bylo využito stanovení hladin adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém prostředí pomocí LC-MS (LC-MS/LS) metody. Kalibrační křivky pro tuto metodu jsou uvedeny v předchozích experimentech (kapitola 6.3; 6.4)

Hladiny těchto analytů, stejně jako v předchozích měřeních pomocí LC-MS (LC-MS/MS), byly odečteny z chromatogramů (ukázkový chromatogram reálného vzorku - obr. 15), následně byla přepočítána koncentrace těchto analytů na objem nádoru reálného vzorku a hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr. 16), z něhož je patrné, že po 2 hodinách působení směsi enzymů ADA-BAM a PNP-BAM docházelo k odbourávání adenosinu, což způsobilo zvýšení jeho metabolitů inosinu i hypoxantinu.



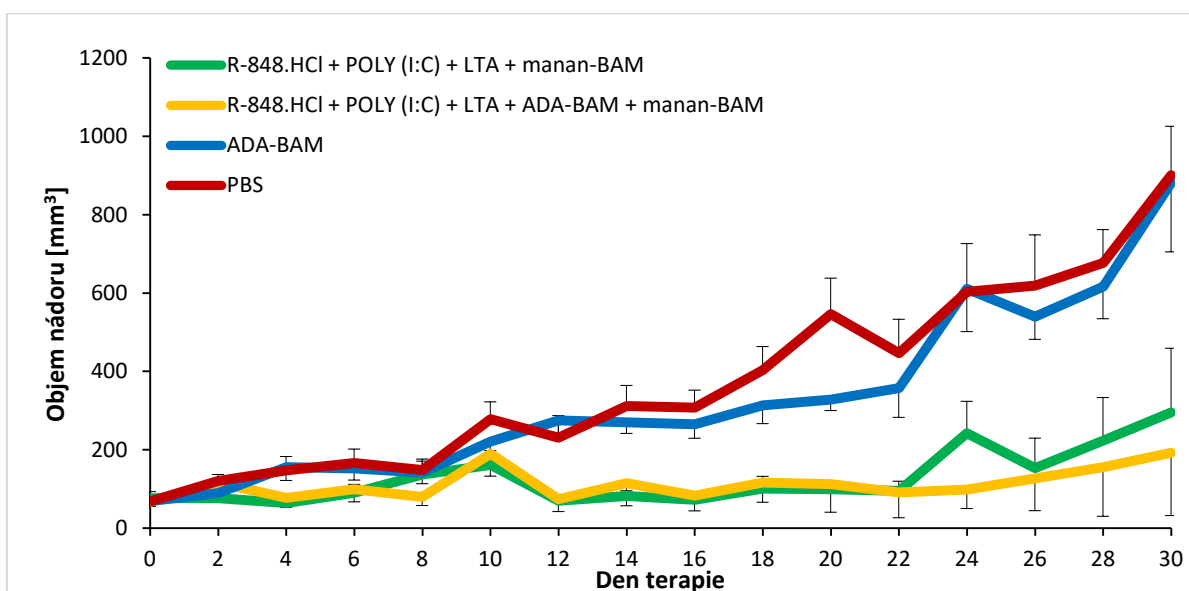
Obr. 15: Ukázkový chromatogram reálného vzorku odebraného nádoru.



Obr. 16: Hladiny adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém mikroprostředí po injikaci enzymy ADA-BAM a PNP-BAM.

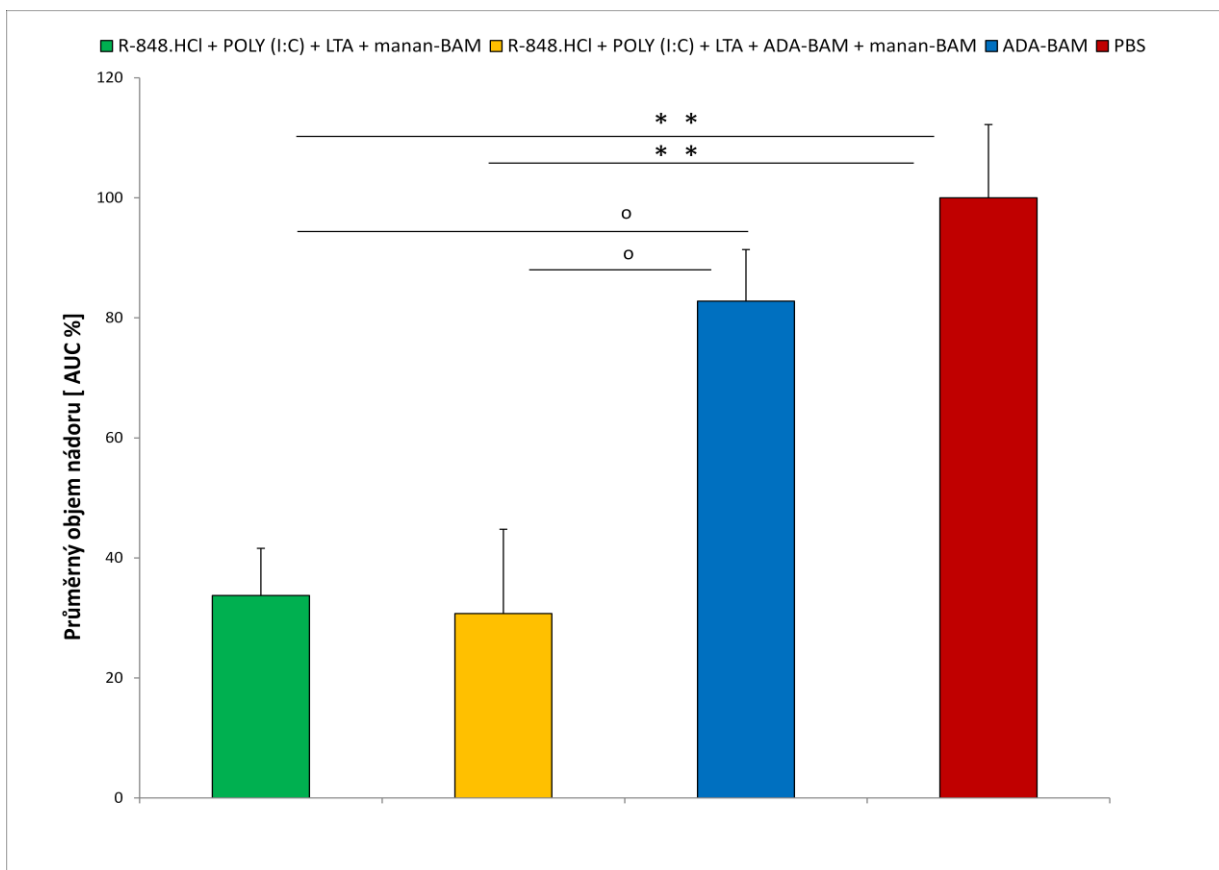
6.6 Vliv přidání enzymu ADA-BAM k základní terapeutické směsi R-848.HCl, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.

Hlavním cílem tohoto pokusu bylo porovnání námi dosud užívané terapie (R-848.HCl, POLY I:C, LTA a manan-BAM) s terapií obohacenou o enzym ADA-BAM, který byl přidán za účelem stimulace dějů v nádorovém mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu. Z následujícího grafu (Obr. 17) je patrné, že skupiny léčené pomocí základní terapeutické směsi či této směsi v kombinaci s ADA-BAM měly srovnatelný vliv na redukci nádorového růstu. Základní terapeutická směs (zelená křivka) vykazovala 65,88% redukci nádorového růstu a 70,02% redukce byla stanovena u terapie obohacené o ADA-BAM. Samotné přidání kotveného enzymu terapii nijak výrazně neovlivňuje.



Obr. 17: Vliv přidání enzymu ADA-BAM k základní terapeutické směsi R-848.HCl, POLY I:C, LTA a manan-BAM.

Pro statistické vyhodnocení celkového vlivu terapie byla vypočtena plocha pod křivkou AUC, která je vynesena v následujícím grafu (Obr. 18). Obě léčené skupiny (zelený a žlutý sloupec) vykazují statistickou významnost oproti kontrole i skupině se samotným enzymem, ovšem výraznější efekt na základní terapeutickou směs přidání kotveného enzymu ADA-BAM nemá.



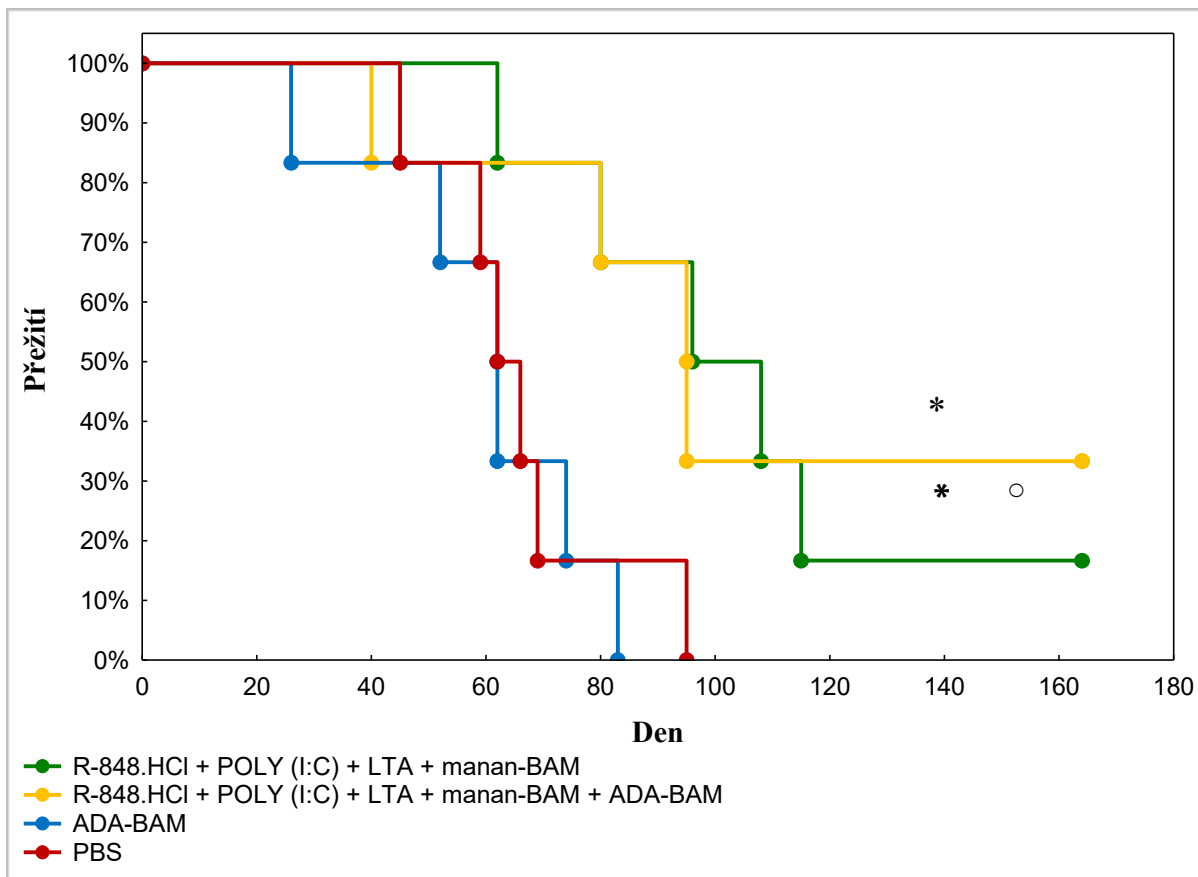
Obr. 18: Statistické vyhodnocení celkového vlivu terapie pomocí základní terapeutické směsi R-848.HCl, POLY I:C, LTA , manan-BAM a enzymu ADA-BAM.

Hladiny statistické významnosti:

o $P \leq 0,05$ vůči ADA-BAM

** $P \leq 0,005$ vůči PBS

Zásadní bylo v tomto pokusu rovněž sledování délky přežití myši po ukončení terapie, které je zaznamenáno v následujícím grafu (Obr. 19). Myši léčených skupin umíraly dvakrát pomaleji než kontrolní skupina (modrá křivka) i skupina, které byl podáván samostatný enzym ADA-BAM (červená křivka). Ve skupině léčené pomocí R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM byl prokázán statisticky významný efekt terapie na dobu přežití oproti kontrole i skupině se samostatným enzymem ADA-BAM. Pokud byla terapeutická směs kombinována s enzymem ADA-BAM (žlutá křivka), 164. dne od počátku terapie se dožilo 33,33 % myši bez jakékoliv známky nádorového projevu Panc02. I tato skupina byla statisticky významnou oproti kontrole.



Obr. 19: Vliv terapie pomocí R-848.HCl, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a ADA-BAM na přežití myši.

Hladiny statistické významnosti:

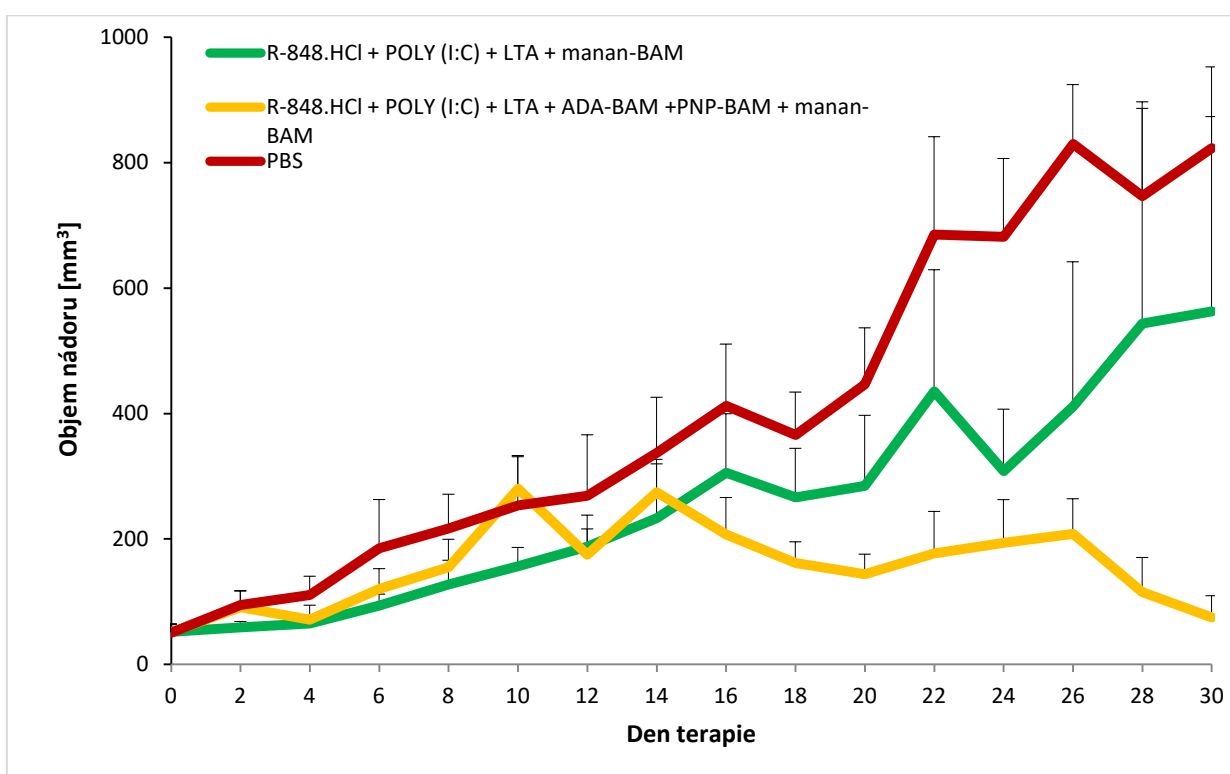
* $P \leq 0,05$ vůči ADA-BAM

O $P \leq 0,05$ vůči PBS

V průběhu sledování přežití myši v tomto pokusu byla provedena retransplantace přeživších vyléčených myši buňkami Panc02 120. den od zahájení léčby. Ani u jedné myši se další růst nádoru Panc02 neprojevil a 164. den bylo sledování myši ukončeno. V tento den byly těmito myším dále aplikovány buňky maligního melanomu B16-F10 do pravého boku a myši byly dále pozorovány. V tomto případě se nádorová linie na myších uchytila a všechny měly 205. den velký nádor. Následně byly tyto myši usmrceny pomocí cervikální dislokace.

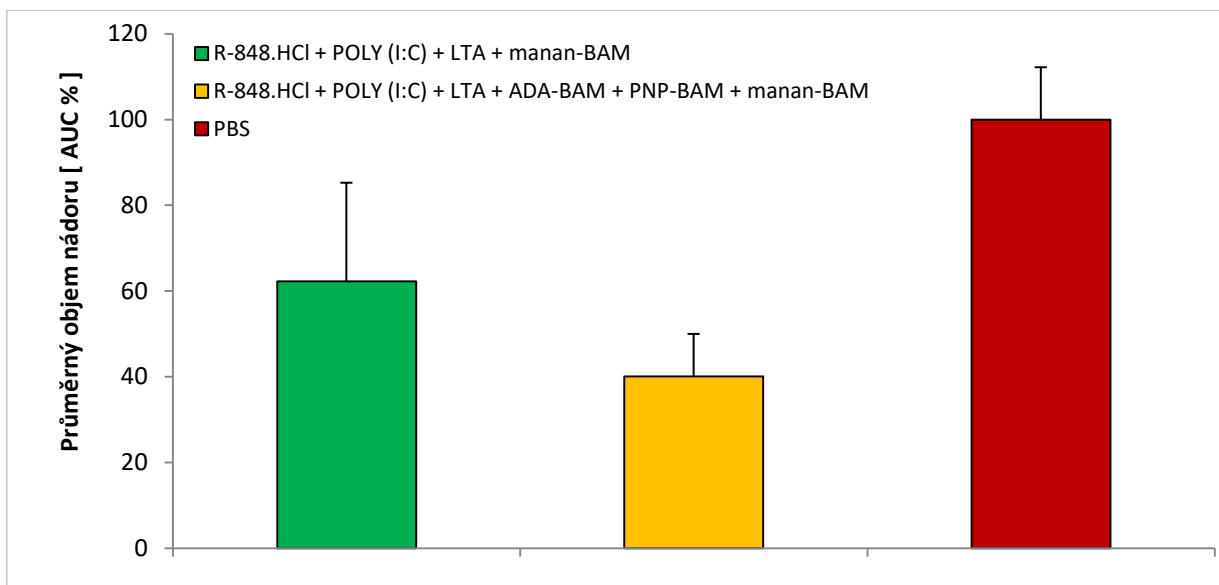
6.7 Vliv přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na účinnost imunoterapie pankreatického adenokarcinomu.

Smyslem tohoto experimentu navazujícího na předchozí (kapitola 6.6) bylo pozorování efektu dvou enzymů ADA-BAM a PNP-BAM na dosud zavedenou terapii R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM. Z následujícího grafu (Obr. 20) lze odečíst, že efekt terapie s kombinací enzymů měl na redukci nádorového růstu výrazný vliv. Tato redukce oproti kontrole činila 61,76 %. Terapeutická směs bez enzymů měla v tomto případě vliv na nádorový růst téměř poloviční, a to 37,12 %.

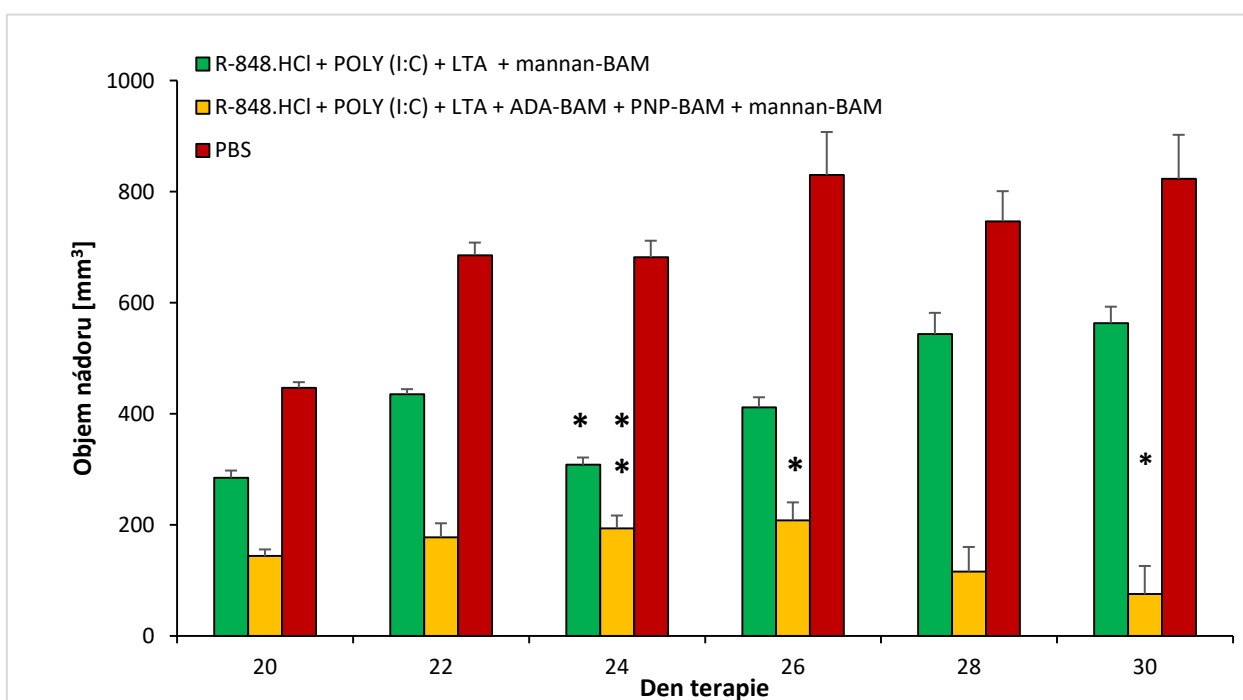


Obr. 20: Efekt přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM.

Statistické vyhodnocení celkového vlivu terapie bylo stanoveno na základě průměrné plochy pod křivkou AUC zobrazené v následujícím grafu (Obr. 21). Z tohoto grafu vyplývá, že ani jedna léčená skupina (zelený/žlutý sloupec) nevykazuje statisticky významný efekt oproti kontrole v celkovém hodnocení vlivu terapie v průběhu 30 dnů. Dále byla statisticky vyhodnocena i závěrečná část vlivu terapie na nádorový růst (Obr. 22). V tomto případě byl statisticky prokázán vliv léčby s přidáními enzymy ADA-BAM a PNP-BAM oproti kontrolní skupině.



Obr. 21: Statistické vyhodnocení celkového vlivu terapie pomocí základní terapeutické směsi R-848.HCl, POLY I:C, LTA, manan-BAM a enzymů ADA-BAM + PNP-BAM.



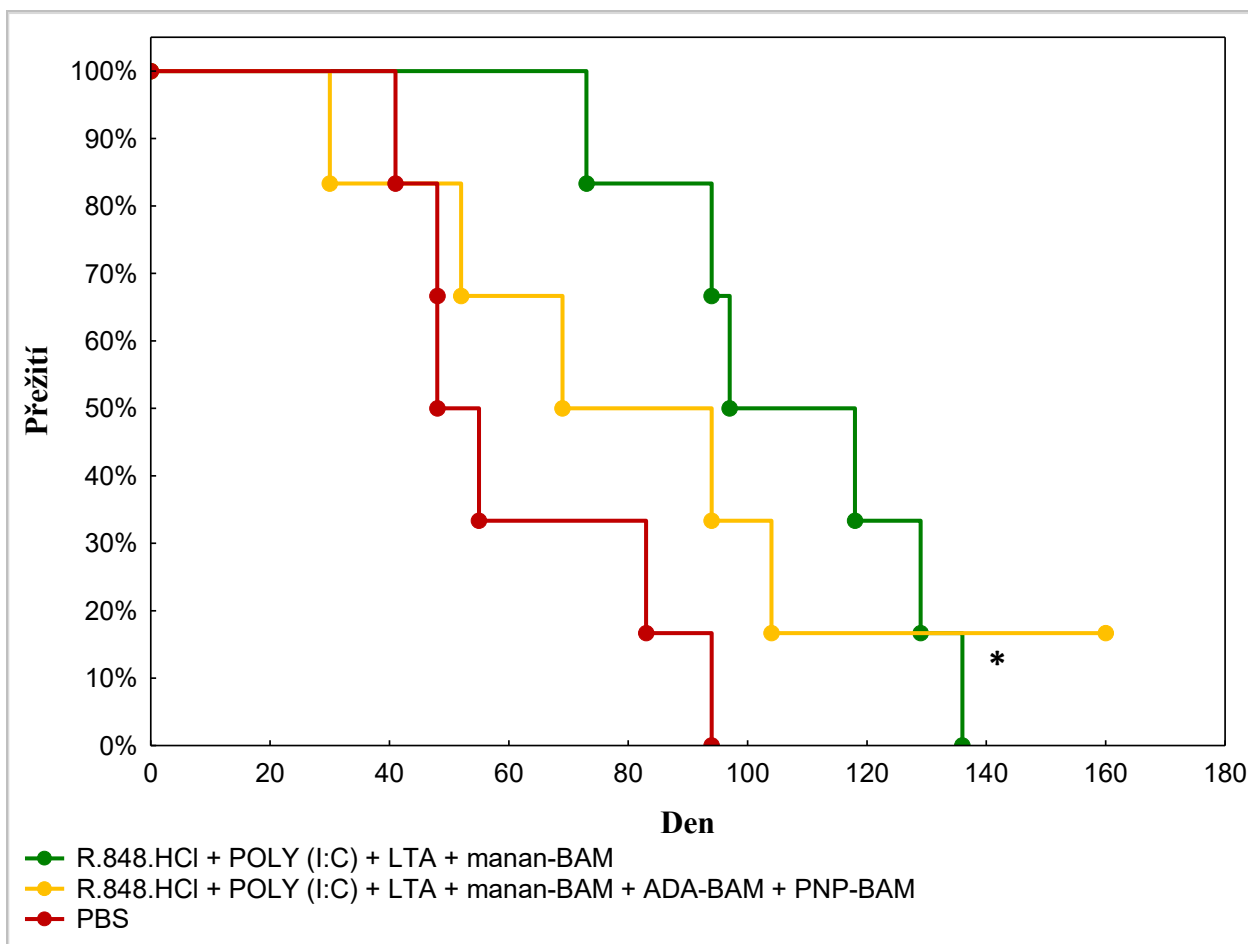
Obr. 22: Statistické vyhodnocení jednotlivých dnů v závěrečné fázi terapie (den 20-30) pomocí základní terapeutické směsi R-848.HCl, POLY I:C, LTA, manan-BAM a enzymů ADA-BAM + PNP-BAM.

Hladiny statistické významnosti:

* $P \leq 0,05$ vůči PBS

** $P \leq 0,005$ vůči PBS

Vliv terapie R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM se projevil i na délce přežití myši po ukončení terapie, kde byla prokázána statistická významnost (Obr. 23). Přidání enzymů ovšem výraznější vliv než dosud využívaná terapie neprokazovalo a sledování bylo ukončeno po 160 dnech od zahájení pokusu. Jediná vyléčená myš byla následně usmrcena cervikální dislokací.



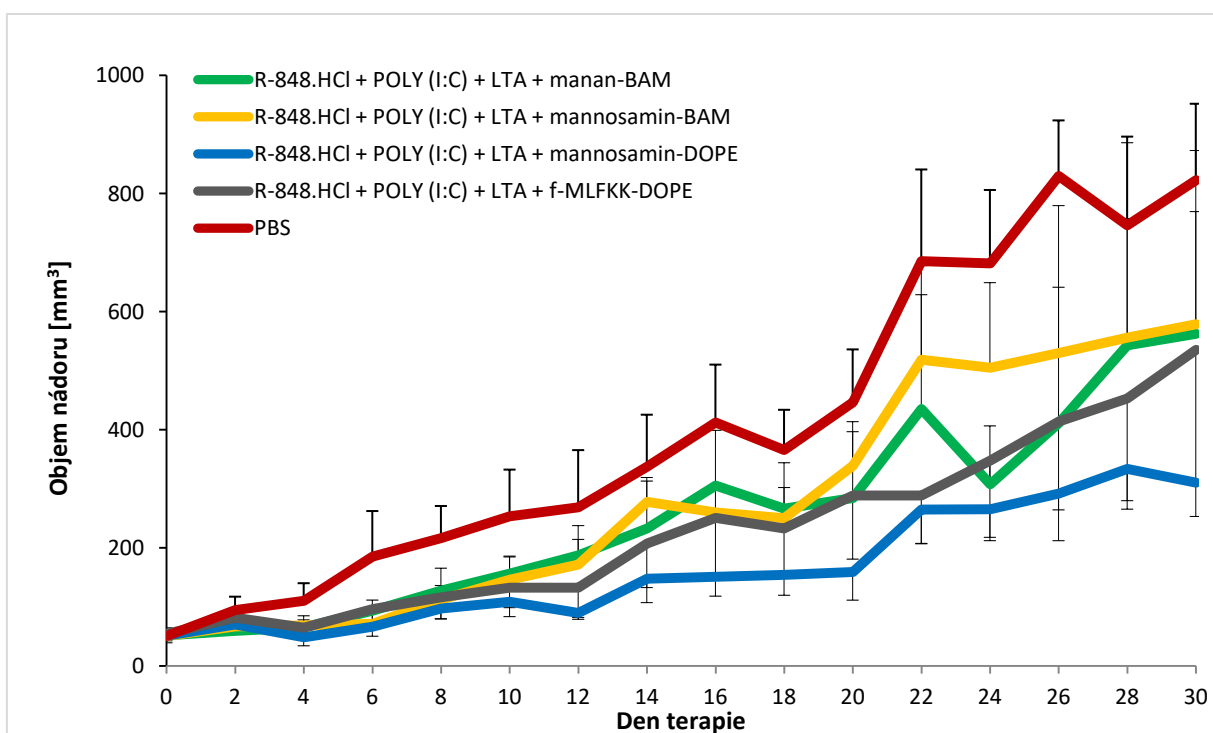
Obr. 23: Efekt přidání enzymů ADA-BAM a PNP-BAM k základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM na přežití myši po ukončení terapie.

Hladiny statistické významnosti:

* $P \leq 0,05$ vůči PBS

6.8 Modulace základní terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA pomocí látek s nižší molekulovou hmotností (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE a fMLFKK-DOPE) při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu.

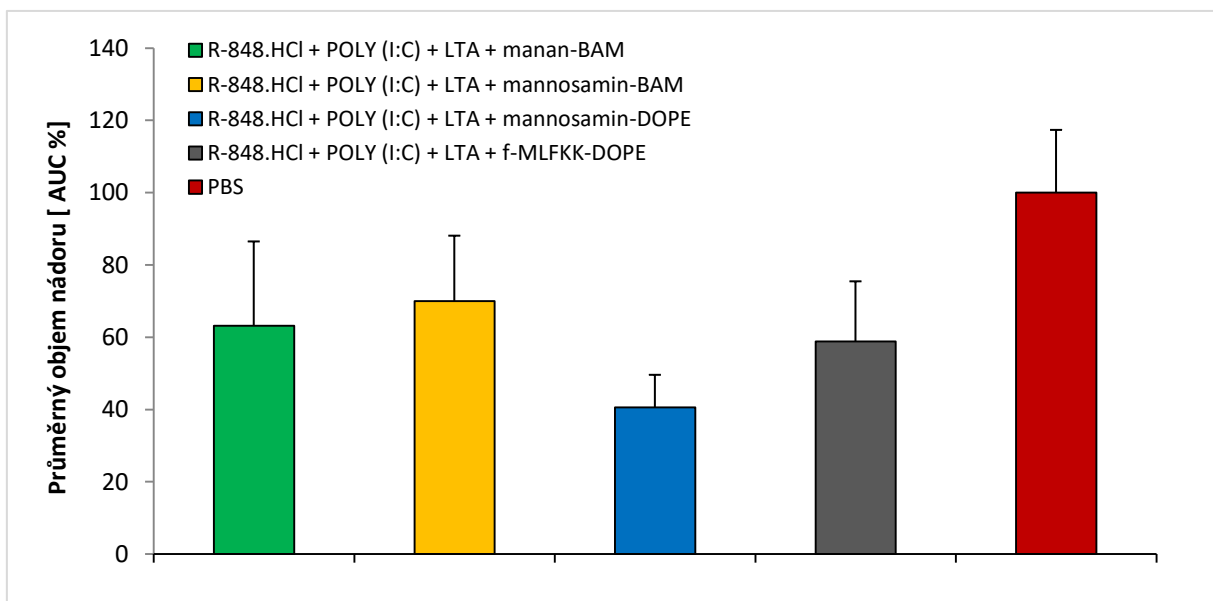
Cílem tohoto experimentu bylo posouzení možnosti využití molekul s nižší molekulovou hmotností namísto dosud zavedeného mananu-BAM jakožto agonisty stimulujícího fagocytózu. Z vyhodnocení průběhu terapie (Obr. 24) je evidentní, že všechny terapeutické směsi vykazují srovnatelnou redukci nádorového růstu pohybující se od 30 do 40 %. Výjimku tvoří skupina, jejíž složkou byl mannosamin-DOPE (modrá křivka), která dosáhla redukce nádorového růstu 59,20%. Tato modulace směsi se ovšem neprokázala významnou oproti zavedené terapii.



Obr. 24: Průběh terapie s využitím látek o nižší molekulové hmotnosti (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE, f-MLFKK-DOPE).

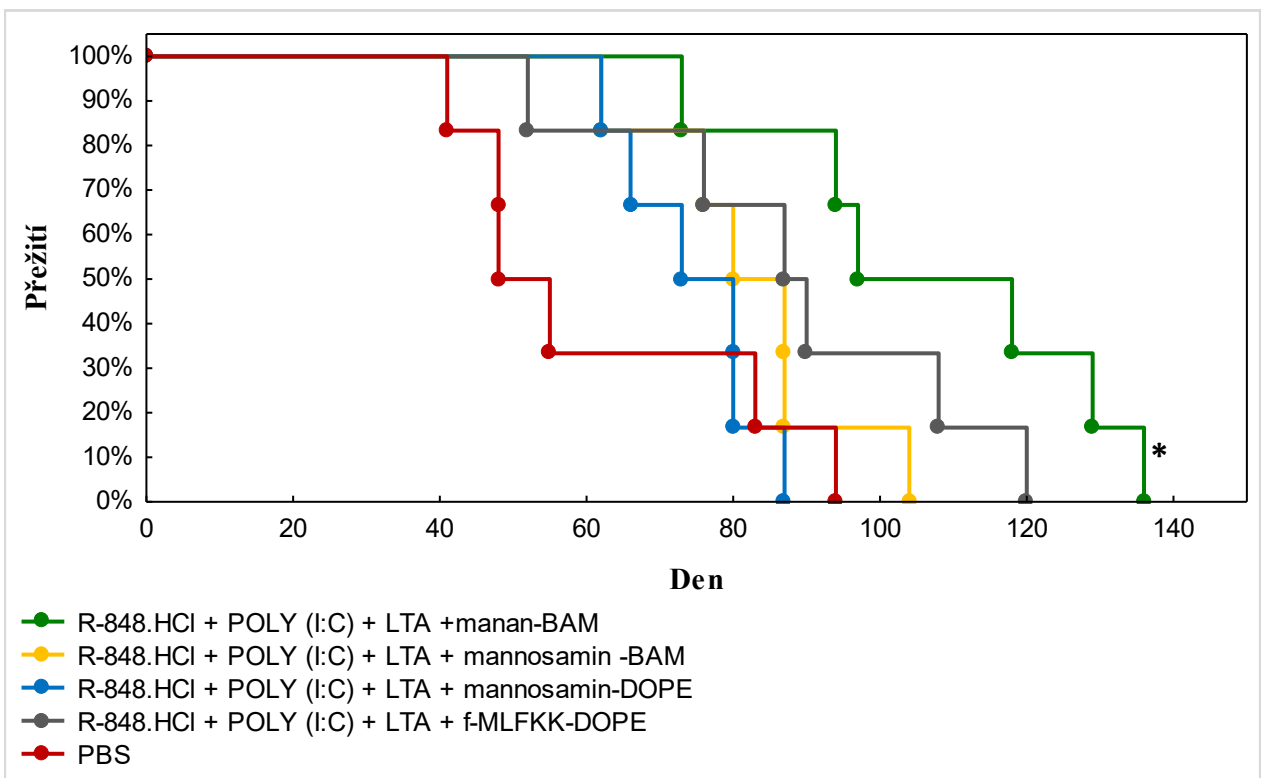
Rovněž jako v předchozích *in vivo* pokusech byl vyhodnocen celkový vliv terapie na základě vypočtení průměrné plochy pod křivkou AUC zobrazené v následujícím grafu (Obr. 25). Ani jedna z terapeutických směsí se neprokázala jako statisticky významná oproti kontrole. Mezi těmito terapiemi nebyl rovněž dosažen výrazný rozdíl jejich efekt se prokázal srovnatelný. Vyhodnocen byl i vliv terapie na redukci nádorového růstu v závěru

terapie a i přesto, že nádorový růst byl výrazně pomalejší, ani zde nebyla vykázána významnost.



Obr. 24: Statistické vyhodnocení terapie s využitím látek o nižší molekulové hmotnosti (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE, f-MLFKK-DOPE).

Po ukončení terapie bylo nadále analyzováno přežití myši, které je zaznamenáno v následujícím grafu (Obr. 25). Terapie se složkou mannosamin-DOPE (modrá křivka), u níž byla zaznamenána nejvyšší redukce nádorového růstu, se v dlouhodobém působení na nádorové bujení prokázala jako nejhůře fungující a všechny myši léčené touto směsí uhynuly ještě dříve než kontrolní neléčená skupina. Další modulace naší zavedené terapie fungovaly o poznání lépe a myši léčené pomocí směsí obsahujících mannosamin-BAM či f-MLFKK-DOPE (žlutá/šedá křivka) vydržely déle než kontrolní skupina. Nejvyšší efekt na přežití ovšem vykazovala základní terapie zavedená naší laboratoří R-848.HCl, POLY (I:C), LTA a manan-BAM (zelená křivka), kde byl prokázán signifikantní vliv na přežití myši oproti kontrolní skupině.



Obr. 25: Analýza vlivu na přežití myši léčených pomocí terapií s využitím látek o nižší molekulové hmotnosti (mannosamin-BAM, mannosamin-DOPE, f-MLFKK-DOPE).

Hladiny statistické významnosti:

* $P \leq 0,05$ vůči PBS

7 DISKUZE

Tato diplomová práce vznikla v rámci dlouhodobého výzkumu na Katedře medicínské biologie, který se zabývá hledáním nejvhodnější terapie nádorových onemocnění. Jak již bylo zmíněno, laboratoř pod vedením Dr. Ženky, se zabývá především imunoterapií založenou na nespecifické imunitě. V předchozích několika desítkách pokusů byla potvrzena nutnost spolupůsobení signálních a fagocytózu iniciujících motivů PAMPs rozpoznávaných PRRs, které jsou exprimovány především fagocytujícími buňkami, ale i NK buňkami (Janotová a kol., 2014). Tato základní myšlenka vychází z práce Underhilla a Gantnera (2004), která pojednává o nutnosti současné stimulace signálních a fagocytárních PRRs. V našem případě pomocí intratumorální aplikace směsi TLR agonistů dochází k indukci zánětlivé odpovědi a manan-BAM, ukotven do membrány na nádorových buňkách, aktivuje komplement. Rovněž dochází k opsonizaci těchto buněk pomocí iC3b molekul, které jsou rozpoznávány buňkami vrozené imunity prostřednictvím CR3 a destruovány (Janotová a kol., Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016). Po vyzkoušení mnoha kombinací terapeutických složek se jako nejefektivnější prokázala terapie pomocí R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM. Na modelu myšního melanomu B16-F10 tato terapeutická směs dosahuje 83% vyléčení všech myší. Velkým problémem u maligního melanomu ovšem zůstávají metastázy, které výrazně komplikují léčbu a mnohdy stojí za smrtí pacienta.

Za jednu z možných variant náchylnosti melanomu k tvorbě metastáz je považován imunosupresivní vliv MDSCs. U pacientů s maligním melanomem byly prokázány vyšší frekvence výskytu MDSCs zejména v pozdější fázi nádorového bujení, kdy docházelo k tvorbě metastáz. Přítomnost těchto imunosupresivních buněk v nádorovém mikroprostředí vedla k potlačení protinádorové odpovědi a následné výrazné progresi nádorového růstu (Meyer a kol., 2014; Umansky a kol., 2014). V několika studiích na různých rakovinných modelech bylo zjištěno, že lze MDSCs selektivně eliminovat pomocí chemoterapeutických látek, které bez toxických účinků na jiné podskupiny leukocytů vyvolávají silný protinádorový účinek. Zejména cílením na chemokiny (např. CCL2, CCL3, CCL4 a CCL5) pocházející z nádoru je bráněno migraci MDSCs do nádorového ložiska a dochází k poklesu těchto buněk v nádorovém mikroprostředí. Vlivem tohoto faktu je inhibována tvorba metastáz i neoangiogeneze, či výrazně redukován nádorový růst (Boelte a kol., 2011).

Na problematiku MDSCs v nádorovém mikroprostředí byl cílen **první experiment**, který byl jako jediný v této práci proveden na modelu maligního myšního

melanomu B16-F10. Důvodem využití této nádorové linie byly především předchozí poznatky o významu MDSCs u maligního melanomu. Jako chemoterapeutikum vedoucí k potlačení těchto buněk byl využit gemcitabin, známý inhibitor MDSCs u pankreatického karcinomu (Suzuki a kol., 2005). Jedná se o analog deoxycytidinu, který je v buňkách přeměněn na aktivní formy - gemcitabin difosfát a gemcitabin trifosfát. Začlenění těchto nukleotidů gemcitabinu do DNA má za následek inhibici procesů nutných pro syntézu DNA a následnou apoptózu buněk (Plunkett a kol., 1995). V tomto experimentu, kde byl myší organismus výrazně zatížen *s.c.* i *i.v.* aplikací nádorových buněk, byl sledován vliv na průběh terapie a rovněž na výskyt metastáz při kombinaci dosud zavedené terapie s gemcitabinem. Ukázalo se, že podání gemcitabinu částečně vyvolalo redukci nádorového růstu ať už v kombinaci s terapeutickou směsí či bez ní. Bohužel v případě samotného systémového podání gemcitabinu došlo k úhynu všech myší (den 24.) ještě před ukončením třicetidenního denního cyklu terapie z neznámých důvodů. Tento fakt lze přikládat pravděpodobně razantní terapii, kterou myší organismus nebyl schopen zvládnout. V kombinaci s námi dosud zavedenou terapeutickou směsí (R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM) se gemcitabin ukázal jako příznivěji působící složka. Jeho efekt v synergii s terapií byl ovšem slabý a nevykazoval výraznější vliv v porovnání se samotnou terapií R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM. Kombinace gemcitabinu s terapií rovněž nepřinesla výraznější efekt na prodloužení přežití myší, ani na projev metastáz. Navzdory našemu očekávání a původní myšlence vylepšení terapie se kombinace s chemoterapií projevila bez výraznějšího pozitivního efektu. Domníváme se, že gemcitabin mohl ovlivňovat účinky samotné terapie R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM a pravděpodobně potlačovat funkci celého imunitního systému, nejen jeho imunosupresivních složek, na které bylo primárně zamýšleno cílit.

Série dalších pokusů v této práci se věnuje problematice adenosinu, jakožto jedné z dalších imunosupresivních bariér. Pro mikroprostředí nádorů jsou charakteristické hypoxické a zánětlivé podmínky. Buňky stresované těmito faktory vykazují zvýšenou apoptickou aktivitu a uvolňují ATP. To je generováno i v důsledku nekrotizace nádorové tkáně. V extracelulárním nádorovém prostředí je vytvořené ATP velmi rychle degradováno na adenosin prostřednictvím ektonukleotidáz - CD39 a CD73. Adenosin se následně akumuluje v nádorovém mikroprostředí nad rámec fyziologického rozmezí, inhibuje cytotoxickou aktivitu NK buněk především prostřednictvím svých A2A receptorů (Raskovalova a kol., 2005), poškozuje odpovědi protinádorových makrofágů a T-buněk

(Clayton a kol, 2011). Lze předpokládat, že adenosin může být klíčovým faktorem v regulaci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů proti nádorovým buňkám. Imunosupresivní adenosin je v nádorovém mikroprostředí přirozeně odbouráván pomocí enzymu adenosin-deaminázy (ADA), jehož relativně vysoké hladiny jsou známy u T buněk. Ovšem cytotoxické T-lymfocyty vykazují aktivitu ADA nižší. ADA je lokalizována na povrchu T buněk společně s kofaktorem CD26, jakožto antigenem aktivace T buněk. Ukazuje se, že procesy v adenosinových signalizačních drahách v nádorovém prostředí jsou velmi provázané a adenosin může být důležitou složkou v autoregulační aktivitě T buněk (Blay a kol., 1997).

Domníváme se, že možnost redukce adenosinu v nádorovém mikroprostředí by mohla přinést zlepšení imunitní odpovědi proti nádorovému ataku. Adenosin vyskytující se zpočátku v nanomolární koncentraci vykazuje vyšší afinitu k A3 receptoru, prostřednictvím něhož inhibuje proliferaci nádorových buněk (Ohana a kol., 2001). Později ale jeho hladiny nabývají mikromolárních koncentrací především díky zvýšené expresi enzymu CD73 na nádorových buňkách, což přispívá k udržení vysokých hladin adenosinu v nádorovém prostředí. Adenosin generovaný nádory následně vazbou přes A2A receptor inhibuje aktivaci buněk imunitního systému (T-buněk, NK buněk, MDSCs, makrofágů a dendritických buněk) a tlumí protinádorovou odpověď. Jeho nadměrné koncentrace v nádorovém mikroprostředí vedou i ke zvýšení počtu Tregs, které rovněž potlačují funkci buněk imunitního systému (Milne a Palmer, 2011, Cekic a kol., 2014). V nádorovém mikroprostředí ovšem není generováno dostatečné množství enzymu ADA, aby mohlo dojít k rychlému odbourání na inosin a další metabolity (Antonioli a kol., 2013).

Hlavní myšlenkou následující série pokusů proto bylo ovlivnit degradaci adenosinu v nádorovém mikroprostředí pomocí kotveného enzymu adenosin-deaminázy. Ke kotvení bylo přistoupeno z důvodu udržení tohoto enzymu v nádorovém mikroprostředí a zlepšení efektu terapie. Z literatury bylo zjištěno, že nejen adenosin tvoří imunosupresivní bariéru imunitní odpovědi, ale rovněž inosin, který interaguje s adenosinovými receptory, vykazuje pronádorovou aktivitu. Proto byl do sledování zařazen enzym purinnukleosid-fosforyláza katalyzující přeměnu inosinu na hypoxantin, který je následně degradován na kyselinu močovou. Celý proces katabolické degradace inosinu probíhá v intracelulárním prostoru, kam se extracelulární inosin (i adenosin) dostává pomocí ekvalibračních i koncentračních nukleosidových transportérů (Haskó a kol., 2004). Stejně jako adenosin deamináza byl tento enzym ukotven pomocí biokompatibilní kotvy pro membránu BAM.

Enzymy jsou z chemického i biologického hlediska velmi nestabilní látky, proto bylo ve **druhém a třetím experimentu** ověřeno, jak vazba kotvy BAM ovlivní aktivitu těchto látek. Tyto pokusy sloužily především k ověření látek využitých v následujících *in vivo* experimentech. Ukázalo se, že v případě enzymu ADA po navázání kotvy BAM byla aktivita lehce snížena o 6,67%. Lze tedy říci, že aktivita enzymu zůstala beze ztrát a je vhodné ho užívat i ve spojení s biokompatibilní membránou. V případě druhého enzymu purinnukleosid-fosforylázy byla situace zcela opačná oproti očekávání. Výsledky ukázaly, že tento enzym ve spojení s kotvou BAM výrazně snížil svou aktivitu o 87,5% a neproказuje se jako vhodné ho užívat ve spojení s BAM. I přes tento fakt výrazného snížení aktivity byl ovšem tento enzym využit v následujících *in vivo* experimentech, protože bylo celkově pracováno s poměrně velkými enzymovými aktivitami a tak i zbytková aktivita enzymů mohla vykazovat určitý efekt.

Další **experimenty čtyři a pět** byly provedeny za účelem získání představy o koncentracích adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém prostředí pankreatického adenokarcinomu; a zároveň z důvodu analýzy dynamické aktivity enzymů *in vivo*. Tyto experimenty byly provedeny pro prvotní screening a je nutné jejich výsledky dále rozvinout. V obou případech bylo očekáváno, že po podání příslušných enzymů ADA-BAM či v kombinaci s PNP-BAM bude docházet ke snížení adenosinu v nádorovém prostředí a jeho metabolity budou naopak svou koncentraci zvyšovat díky zvýšenému množství enzymů v mikroprostředí nádoru. Výsledky čtvrtého experimentu bohužel naše předpoklady nenaplnily. Po podání enzymu ADA-BAM docházelo k pozvolnému zvýšení hladin adenosinu. U jeho metabolitů inosinu a hypoxantinu byl zaznamenán nevysvětlitelný zlom v průběhu čtyřhodinového působení enzymu.

Jedno z možných vysvětlení lze spatřovat v tom, že se jedná o otevřený systém, kde enzymy přirozeně existují. V nádorovém mikroprostředí dochází zároveň k neustálému generování ATP v důsledku biologických pochodů, s čímž souvisí i neustálá tvorba dalšího adenosinu. V předchozí práci Blaye a kol. (1997) bylo zaznamenáno, že hladiny adenosinu navíc nekorelují s velikostí nádorů, ani s rozsahem nádorových hmotností, tudíž i tímto faktem mohl být ovlivněn konečný výsledek pokusu, jelikož výchozí množství adenosinu v nádorové tkáni jednotlivých myší mohlo být nerovnoměrně rozloženo. Efekt působení enzymu může být rovněž ovlivněn difúzí všech látek v nádorovém mikroprostředí. Jedná se o velmi složitý komplex dějů, které přidáním enzymu modulujeme pouze částečně, a celkový vliv se dle našich výsledků jeví jako velmi slabý.

V potaz u tohoto experimentu musí být brán i metabolismus inosinu, který s adenosinem úzce souvisí. Inosin je po konverzi adenosin-deaminázou vytvářen v extracelulárním i intracelulárním prostředí. K odbourávání inosinu ovšem dochází v intracelulárním prostředí, kam má extracelulární inosin přístup skrze nukleosidové transportéry. Stejným způsobem může do buněk pronikat i adenosin, který s inosinem o tyto transportéry soutěží. Extracelulární inosin proto může zvýšit hladiny extracelulárního adenosinu tím, že zabrání vychytávání adenosinu z extracelulárního prostoru, a sekundárně tak indukuje nepřímé biologické účinky adenosinu na své receptory (Pastor-Anglada a kol., 2001). Tento fakt může částečně vysvětlit stoupající hladinu adenosinu v průběhu působení enzymu ADA-BAM. Další experiment č. 5, kde byl pro odbourávání inosinu využit i druhý enzym PNP-BAM, vykazoval příznivější výsledky a po dvou hodinách spolupůsobení enzymů v nádorové tkáni odpovídal našim očekávaným předpokladům. Koncentrace adenosinu výrazněji poklesla a naopak u inosinu i hypoxantinu se projevil opačný efekt. Lze tedy pravděpodobně uvažovat, že působení na metabolismus inosinu napomohlo k odbourávání adenosinu.

U obou experimentů (č. 4 a 5) je ovšem nutné zvážit i samotný stres nádoru, ať už z důvodu zasažení metabolických dějů enzymy či samotnou injikací, který může být odpovědný za kolísání hladin adenosinu a jeho metabolitů. Abychom mohli tuto otázku přesněji posoudit, bude v dalších experimentech nutné zařadit kontrolu, kde bude injikováno pouze PBS a následně sledován vliv na koncentrace adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorovém prostředí.

Šestý a sedmý *in vivo* experiment byl zaměřen na působení těchto enzymů v kombinaci s námi dosud zavedenou terapií R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM v léčbě pankreatického adenokarcinomu Panc02. V šestém experimentu se podání samotného ADA-BAM ukázalo zcela bez terapeutického efektu. V kombinaci s terapií R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM byl statisticky prokázán výrazný vliv na redukci nádorového růstu, která dosahovala 70,02% oproti kontrolní skupině. V porovnání se samostatnou terapií R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM, kde bylo dosaženo redukce nádorového růstu oproti kontrole 65,88%, ovšem výraznější účinky nevykazovala. Tento pokus se projevil lepším přežitím myši, kde ve skupině léčené pomocí R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM a ADA-BAM přežilo 33,33% myši, ve skupině léčené stejnou směsí bez enzymu to bylo 16,66 %. Po retransplantaci Panc02, která byla provedena 120. den od počátku terapie, nedošlo ani v jednom případě k uchycení nádorových buněk, což svědčí

o zapojení získané imunity, které bylo zaznamenáno i v předchozích experimentech provedených naší laboratoří (Waldmannová a kol., 2016, Caisová a kol., 2016). V sedmém experimentu, kde byla terapeutická směs R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM doplněna o oba enzymy ADA-BAM i PNP-BAM, byla zaznamenána mnohem výraznější redukce nádorového růstu oproti terapii bez enzymů. Směs s enzymy dosáhla redukce nádorového růstu 61,76%, zatímco bez enzymů činila pouhých 37,12 %. V tomto případě se projevila statisticky výrazná redukce nádorového růstu především v pozdější fázi terapie, kdy lze předpokládat větší podíl anaerobní tvorby ATP i generování ATP v důsledku nekrotizace nádorové tkáně. Adenosin se v nádorové hmotě pravděpodobně akumuluje v pozdější fázi terapie, a enzymy proto sehrávají výraznější roli v závěru terapeutické léčby. S tímto faktem souvisí i vliv na přežití myši, kde ve skupině léčené pomocí R-848, POLY (I:C), LTA, manan-BAM, ADA-BAM a PNP-BAM přežilo 16,66% myši, zatímco v ostatních skupinách došlo k úhynu všech myši. Domníváme se, že působení terapie v pozdější fázi příznivě ovlivnilo nastupující úroveň získané imunitní odpovědi, proto bylo zaznamenáno mírné zlepšení přežití v obou případech terapie s využitím enzymu samotného enzymu ADA-BAM či v kombinaci s PNP-BAM. Využití enzymů neprokázalo výraznější efekt na dosud užívanou terapii. V úvahu musí být brán fakt, že adenosin zdaleka není jediným imunosupresivním mechanismem v nádorovém mikroprostředí a existuje mnoho dalších mechanismů (např. Tregs, MDSCs atd.), které brání správnému působení terapie. Adenosin pravděpodobně nebude tak výraznou složkou, jak jsme předpokládali, nicméně bude třeba provést další výzkumy v této oblasti. Je možné, že u jiných nádorů s vyšší mírou anaerobiózy a nekrotizace bude mít předkládaný způsob zesílení imunoterapie založený na odstraňování adenosinu a inosinu větší význam.

Poslední experiment byl zaměřen na terapii pankretického adenokarcinomu pomocí molekul s nižší molekulovou hmotností. Jak již bylo zmíněno, pankreatický adenokarcinom se vyznačuje vysokou denzitou nádorové tkáně, což výrazně zhoršuje penetraci terapeutické látky nádorovou masou. Z tohoto důvodu byla v terapeutické směsi nahrazena složka mananu (průměrná molekulová hmotnost 48250) kotveného pomocí BAM (Mw 4000) za účelem usnadnění průniku terapeutika skrz nádorovou tkáň. Jako alternativní molekuly byly vyzkoušeny mannosamin (Mw 215,63) a f-MLFKK (Mw 665,9). Pro ukotvení těchto látek byly využity již testované způsoby kotvení v rámci výzkumu naší laboratoře BAM a DOPE (Mw 977,2). V případě mannosaminu byly vyzkoušeny oba typy kotvení, u molekuly f-MLFKK byl užit pouze DOPE. Výsledky tohoto experimentu ukázaly,

že využití těchto molekul na místo dosud používaného mananu-BAM není vhodné. Vliv těchto alternativních molekul nemá výraznější efekt na redukci nádorového růstu. Nejvyšší redukce nádorového růstu byla v průběhu terapie dosažena u terapie pomocí R-848, POLY (I:C), LTA a mannosaminu-DOPE, kdy došlo k redukci nádorového růstu o 59,20% oproti kontrole. Skupiny, kde byl použit mannosamin-BAM a F-MLFKK-DOPE, vykazují srovnatelný efekt s dosud využívanou terapií R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM. Tato terapie se rovněž jako jediná projevila se statisticky významným efektem na přežívání myši, tudíž ji lze považovat za nejvhodnější způsob terapie testovaný v tomto experimentu. Zajímavý efekt na dlouhodobé přežití myši byl ovšem zaznamenán u skupiny s nejvyšší redukcí nádorového růstu v průběhu terapie pomocí R-848, POLY (I:C), LTA a mannosaminu-DOPE. V analýze přežití myši se tato terapie ukázala jako nejméně vhodnou variantou. S tím, že zpočátku velmi účinná terapie v závěrečném hodnocení vykazuje nejhorší výsledky, se v rámci naší laboratoře setkáváme častěji. Tento poznatek koreluje s výsledky pokusů, kdy byla naše terapie kombinována s anti-CD47 a enzymem laktát oxidázou (Lencová, *in prep.*, Masáková, *in prep.*). Domníváme se, že pokud agresivní terapie zbaví organismus nádorové hmoty, připravíme se o možnost vakcinace organismu, k čemuž je nutné využít i správný timing. Celkově lze naši terapii přiblížit vakcinačnímu schématu, tudíž i myšlence intratumorální vakcinace, kde díky správné koncepci terapie dochází k zapojení získané imunity ovlivňující dlouhodobé působení terapie (Marabelle a kol., 2014).

8 ZÁVĚR

- Systémové podání gemcitabinu k základní terapeutické směsi R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM nevykazovalo výraznější účinek na nádorový růst ani na redukci tvorby metastáz.
- Po připojení kotvy BAM k enzymu ADA nedošlo ke ztrátám aktivity tohoto enzymu.
- Naopak kotvení BAM k enzymu PNP se ukázalo jako nevhodné, jelikož došlo k výraznému snížení aktivity enzymu.
- Doplnění terapeutické směsi o enzymy ADA-BAM a PNP-BAM nepřineslo výraznější redukci nádorového růstu oproti základní terapii (R-848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM), jejich efekt byl spatřován především v lepším přežití myší.
- Modulační terapeutické směsi pomocí molekul s nižší molekulovou hmotností se ukázala jako nevhodná.

9 SEZNAM ZKRATEK

AAB - *ADA Assay Buffer*

ADA - adenosin-deamináza (*adenosine deaminase*)

ADCC - buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)

ADCP - buněčná fagocytóza závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular phagocytosis*)

AMP- adenosin monofosfát (*adenosine monophosphate*)

APC - antigen prezentující buňka (*antigen presenting cell*)

ATP- adenosin trifosfát (*adenosine triphosphate*)

AUC - průměrná plocha pod křivkou (*area under the curve*)

BAM - biokompatibilní kotva pro membrány (*biocompatible anchor for cell membrane*)

CD - difeneciační skupina (doplněno o příslušné číslo), (*cluster of differentiation*)

CDC - cytotoxicita závislá na komplementu (*complement dependent cytotoxicity*)

CLRs - C-typ lektinové receptory (*C-type lectin receptors*)

CTLA-4 - cytotoxický T-lymfocytární antigen-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)

CTLs - cytotoxické T lymfocyty (*cytotoxic T lymphocytes*)

CRP - C-reaktivní protein (*C-reactive protein*)

CR3 - komplementový receptor 3 (*complement receptor 3*)

DAMPs - *damage-associated molecular patterns*

DOPE - N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- α -fosfatidylethanolamin (*N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine*)

DCs - dendritické buňky (*dendritic cells*)

D-MEM - *dulbecco's modified eagle medium*

DMSO - dimetylsulfoxid (*dimethylsulfoxide*)

DNA - deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FCS - fetální bovinní sérum (*fetal calf serum*)

FCR - *receptor for the Fc domain of immunoglobulin G*

fMLF - formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (*formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*)

f-MLFCK - formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin + lysin, lysin (*formyl methionyl leucyl phenylalanine + lysine, lysine*)

FPRs – formyl peptidové receptory (*formyl-peptide receptors*)

GEM - gemcitabin (*gemcitabine*)

GM – CSF - faktor stimulující vznik kolonií granulocytů a makrofágů (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*)

GPCRs - receptory spřažené s G- proteiny (*G-protein–coupled receptors*)

HBSS - Hanks' balanced salt solution

HMGB1 – *hight mobility group box*

HPV - lidský papilomavirus (*human papillomavirus*)

HSPs – proteiny teplotního šoku (*heat shock proteins*)

IFN $\alpha/\beta/\gamma$ - interferon alfa/beta/gama (*interferon alpha/betha/gamma*)

iNOS - *inducible nitric oxide synthase*

IL - interleukin (doplněno o příslušné číslo), (*interleukin*)

i.p. - *intraperitoneální* (aplikace), (*intraperitoneal*)

IRF 3/7 - interferon regulatory factor 3/7

i.t. - *intratumorální* (aplikace), (*intratumoral*)

IVC - *individually ventilated cages*

i.v. - *intravenózní* (aplikace), (*intravenous*)

LC-MS - kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (*liquid chromatography - mass spectrometry*)

LTA - lipoteichová kyselina (*lipoteichoic acid*)

LTR - *long terminal repeat (domain)*

MAbs - monoklonální protilátky (*monoclonal antibodies*)

MAP kináza – mitogenem aktivovaná protein kináza (*mitogen-activated protein kinases*)

MBL - lektin vázající manózu, manan (*manan binding lectin*)

M – CSF - faktor stimulující vznik kolonií makrofágů (*macrophage colony stimulating factor*)

MDSC - myeloidní supresorové buňky (*myeloid-derived suppressor cells*)

MHC - hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)

MR - manózový receptor (*mannose receptor*)

MyD 88 - *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NF- κ B – nukleární faktor *kappa B* (*nuclear factor kappa B*)

NHS - N-hydroxysukcinimid (*N-hydroxysuccinimide*)

NK buňky - přirození zabíječi (*natural killer*)

NKG2 - *natural killer group 2* (receptor)

NLRs - *NOD-like* receptors
PAMPs – molekulové vzory spojené s patogeny (*pathogen associated molecular patterns*)
PBS - fosfáty pufovaný fyziologický roztok (*phosphate-buffered saline*)
PD-1 - *programmed cell death 1* (receptor)
PNP - purinnucleosid-fosforyláza (*purine nucleoside phosphorylase*)
POLY I:C – polyinosinická -polycitidylická kyselina (*polyinosinic-polycytidylic acid*)
PRRs – receptory rozpoznávající molekulové vzory (*pattern recognition receptors*)
RNA - ribonukleová kyselina (*ribonucleic acid*)
ROS - reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species*)
RPMI - *Roswell park memorial institute* (medium)
R-848 - resiquimod (*resiquimod*)
s.c. - subkutánní (aplikace), (*subcutaneous*)
SEM - střední chyba průměru (*standard error of the mean*)
SIRP α - *signal regulatory protein alpha*
SPF - *specific pathogen free*
TAA - tumor asociované antigeny (*tumor associated antigens*)
TAMs - s nádorem asociované makrofágy (*tumor associated macrophages*)
TAM - *Tyro3, Axl, Mer - family of receptor tyrosine kinases*
TANs - s nádorem asociované neutrofily (*tumor associated neutrophils*)
TCR - T buněčný receptor (*T cell receptor*)
TGF- β - transformující růstový faktor beta (*transforming growth factor beta*)
TH - pomocné T lymfocyty (*T helper lymphocytes*)
TIM - *T cell immunoglobulin mucin* (receptor)
TIR - *toll/interleukin-1 receptor* (domain)
TIRAP - *Toll–interleukin 1 receptor (TIR) domain–containing adapter protein*
TLR(s) - toll-like receptor/y (*toll-like receptor/s*)
TNF α - *tumor necrosis factor alpha*
Treg - T regulační lymfocyty (*T regulatory lymphocytes*)
TRIF - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
TSA - tumor specifické antigeny (*tumor specific antigens*)
UV - ultrafialové (záření), (*ultraviolet*)
VEGF - vaskulární edoteliální růstový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

10 PŘEHLED LITERATURY

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Ames, B. N., & Gold, L. S. (1997). The causes and prevention of cancer: gaining perspective. *Environmental Health Perspectives*, 105(Suppl 4), 865.
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 842.
- Becker, E., Forouhar, F. A., Grunnet, M. L., Boulay, F., Tardif, M., Bormann, B. J., Sodja, D., Richard, D. Y., Woska Jr, J. R. & Murphy, P. M. (1998). Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell and Tissue Research*, 292, 129-135.
- Belardelli, F. I. L. I. P. P. O. (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis*, 103(1-6), 161-179.
- Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Carrega, P., Mantovani, A., Ferlazzo, G., Moretta, A., & Bottino, C. (2014). Human NK cells and NK receptors. *Immunology Letters*, 161(2), 168-173.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.
- Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2007). S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 108-118.
- Blay, J., White, T. D., & Hoskin, D. W. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Research*, 57(13), 2602-2605.

- Boelte, K. C., Gordy, L. E., Joyce, S., Thompson, M. A., Yang, L., & Lin, P. C. (2011). Rgs2 mediates pro-angiogenic function of myeloid derived suppressor cells in the tumor microenvironment via upregulation of MCP-1. *PloS ONE*, 6(4), e18534.
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33-S40.
- Burkholder, B., Huang, R. Y., Burgess, R., Luo, S., Jones, V. S., Zhang, W., Lv Z., Gao Ch., Wang B., Zhang Y., & Huang, R. P. (2014). Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845(2), 182-201.
- Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., Krejčová, G., Paďouková, L., Jochmanová, I., Wolf, K. I., Chmelař, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16(1), 940.
- Cawley, T. N., & Ballou, C. E. (1972). Identification of two *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannan chemotypes. *Journal of Bacteriology*, 111(3), 690-695.
- Cekic, C., Day, Y. J., Sag, D., & Linden, J. (2014). Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Research*, 74(24), 7250-7259.
- Cheng, Y. S., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, 10(12), 1219-1223.
- Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2011). Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *The Journal of Immunology*, 187(2), 676-683.

- Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomeres, L., Amorena, B., & de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Veterinary Research*, 42(1), 28.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502-511.
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, T. D., Hawkins, G. A., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W., & DeLong, C. J. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6682-6687.
- Darrasse-Jèze, G., Bergot, A. S., Durgeau, A., Billiard, F., Salomon, B. L., Cohen, J. L., & Klatzmann, D. (2009). Tumor emergence is sensed by self-specific CD44^{hi} memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2648-2662.
- Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enyoloji K., Linden J., Oukka M., Strom T.B., Robson S.C. & Kuchroo, V. K. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1257-1265.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11.
- Dzivenu, O. K., O'Donnell-Tormey, J., & O'Donnell-Tormey, J. (2003). Cancer and the immune system: the vital connection. *Cancer Research Institute: New York*, 883-99.
- Elfeil, W., Shanshan, L., Reham, A., & Yu, W. (2013). Pattern recognition receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, 1, 1118-1127.

- Elgert, K. D., Alleva, D. G., & Mullins, D. W. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *Journal of Leukocyte Biology*, 64(3), 275-290.
- El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., & Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens—part D: radiation. *The Lancet Oncology*, 10(8), 751-752.
- Elhelu, M. A. (1983). The role of macrophages in immunology. *Journal of the National Medical Association*, 75(3), 314.
- Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Research*, 72(9), 2162-2171.
- Farthing, D., Sica, D., Gehr, T., Wilson, B., Fakhry, I., Larus, T., Farthing, Ch., & Karnes, H. T. (2007). An HPLC method for determination of inosine and hypoxanthine in human plasma from healthy volunteers and patients presenting with potential acute cardiac ischemia. *Journal of Chromatography B*, 854(1-2), 158-164.
- Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35(1), 218-224.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 77.
- Finn, O. J. (2008). Cancer immunology. *New England Journal of Medicine*, 358(25), 2704-2715.
- Forman, D., Newell, D. G., Fullerton, F., Yarnell, J. W., Stacey, A. R., Wald, N., & Sitas, F. (1991). Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*, 302(6788), 1302-1305.

- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183-194.
- Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(2), 247-256.
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3), 162.
- Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M. F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. & Wang, E. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, 17(10), 1290.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1195-1203.
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306.
- Gray, J. C., Johnson, P. W., & Glennie, M. J. (2006). Therapeutic potential of immunostimulatory monoclonal antibodies. *Clinical Science*, 111(2), 93-106.
- Grebe, S. K., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory—where to from here?. *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(1), 5.
- Greenberg, S., & Grinstein, S. (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 136-145.
- Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B., & Corthay, A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, 2, 240.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Haskó, G., Sitkovsky, M. V., & Szabo, C. (2004). Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(3), 152-157.
- Hayashi, R., Miyazaki, M., Osada, S., Kawasaki, H., Fujita, I., Hamasaki, Y., & Kodama, H. (2013). A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *21*(3), 668-675.
- Haynes-Gilmore, N., Banach, M., Edholm, E. S., Lord, E., & Robert, J. (2014). A critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*, *35*(8), 1807-1813.
- Hemminki, K. (1993). DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis*, *14*(10), 2007-2012.
- Hinds, P. W., & Weinberg, R. A. (1994). Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, *4*(1), 135-141.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferongamma receptor. *Science*, *259*(5102), 1742-1745.
- Hubert, P., Heitzmann, A., Viel, S., Nicolas, A., Sastre-Garau, X., Oppezso, P., Pritsch O., Osinaga E., & Amigorena, S. (2011). Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Research*, *71*(15), 5134-5143.

- Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The complement system and innate immunity.
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., & Schoenberger, S. P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature*, 421(6925), 852.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PloS ONE*, 9(1), e85222.
- Kaczanowska, S., Joseph, A. M., & Davila, E. (2013). TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), 847-863.
- Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., & Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*, 20(3), 897-904.
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 531-556.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2013). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461-461.
- Khaled, Y. S., Ammori, B. J., & Elkord, E. (2014). Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients. *Journal of Immunology Research*, 2014.

- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1-14.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Gatekeepers and caretakers. *Nature*, *386*(6627), 761.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *68*(4), 820-823.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, *27*, 485-517.
- Krysko, O., Aaes, T. L., Bachert, C., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death & Disease*, *4*(5), e631.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal*, *420*(1), 1-16.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30*(1), 16-34.
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570-1580.
- 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 Journal of Gastroenterology: WJG*, *15*(21), 2602.
- Liu, Y., & Zeng, G. (2012). Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *35*(4), 299.

- Loberg, R. D., Day, L. L., Dunn, R., Kalikin, L. M., & Pienta, K. J. (2006). Inhibition of decay-accelerating factor (CD55) attenuates prostate cancer growth and survival in vivo. *Neoplasia*, 8(1), 69-78.
- Longhi, M. P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, K. M., Steinman, R. M., & Steinman, R. M. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1589-1602.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Qian, J., Yi, Q., & Yang, J. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4160-4171.
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., & Levy, R. (2014). Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(7), 1747-1756.
- Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., McWilliams, R. R., Kottschade, L. A., Creagan, E. T., Weenig, R. H., Hand, J. L., Pittelkow, M. R., Pockaj, B. A., Vachon, C. M., Schield, S. E., Laman, S. D., Cameron, J. D., Maples W. J., Pulido, J. S., & Bardia, A. (2007, March). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 82, No. 3, pp. 364-380). Elsevier.
- Mediavilla-Varela, M., Luddy, K., Noyes, D., Khalil, F. K., Neuger, A. M., Soliman, H., & Antonia, S. J. (2013). Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer biology & Therapy*, 14(9), 860-868.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819.
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), 4-9.

- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338-344.
- Meyer, T., Surber, C., French, L. E., & Stockfleth, E. (2013). Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(1), 149-159.
- Meyer, C., Cagnon, L., Costa-Nunes, C. M., Baumgaertner, P., Montandon, N., Leyvraz, L., Michielin, O., Romano, E., & Speiser, D. E. (2014). Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(3), 247-257.
- Michelsen, K. S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C. J., & Schumann, R. R. (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs) Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 25680-25686.
- Miller, T. E., & Watson, D. W. (1965). Innate immunity. *Medical Clinics of North America*, 49(6), 1489-1504.
- Milne, G. R., & Palmer, T. M. (2011). Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor. *The Scientific World Journal*, 11, 320-339.
- Monier, R. (1990). Oncogenes and anti-oncogenes in tumorigenesis. *Reproduction Nutrition Development*, 30(3), 445-454.
- Montesinos, M. C., Desai, A., Chen, J. F., Yee, H., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., & Cronstein, B. N. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors. *The American Journal of Pathology*, 160(6), 2009-2018.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2348-2357.

- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 173.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertonni, F., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(8), 769.
- Naradin, A., & Abastado, J. P. (2008) Macrophages and cancer. *Frontiers in Bioscience*, 13, 3493-3505.
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zülke, C., Fahlke, J., Arning, M. B., Hinke, A., Riess, H., & Sinn, M. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *Jama*, 310(14), 1473-1481.
- O’Connell, J., Bennett, M. W., O’Sullivan, G. C., O’Callaghan, J., Collins, J. K., & Shanahan, F. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(4), 457-463.
- Ohana, G., Bar-Yehuda, S., Barer, F., & Fishman, P. (2001). Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *Journal of Cellular Physiology*, 186(1), 19-23.
- Old, L. J., & Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1163-1167.
- Oliveira, C. J. F., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Carregaro, V., Anatriello, E., Silva, J. S., de Miranda Santos, I., Ribeiro, J., & Ferreira, B. R. (2011). Deconstructing tick saliva non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 10960-10969.

- Otsuki, T. I., Kanno, T., Fujita, Y., Tabata, C., Fukuoka, K., Nakano, T., Gotoh, A., & Nishizaki, T. (2012). A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(1), 210-220.
- Pagano, J. S., Blaser, M., Buendia, M. A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N., & Roizman, B. (2004, December). Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 14, No. 6, pp. 453-471). Academic Press.
- Park, B. H. & Vogelstein, B. (2003). Tumor-suppressor genes. *Cancer Medicine*, 6, 87-102.
- Parkinson, F. E., Ferguson, J., Zamzow, C. R., & Xiong, W. (2006). Gene expression for enzymes and transporters involved in regulating adenosine and inosine levels in rat forebrain neurons, astrocytes and C6 glioma cells. *Journal of Neuroscience Research*, 84(4), 801-808.
- Partecke, L. I., Sendler, M., Kaeding, A., Weiss, F. U., Mayerle, J., Dummer, A., Nguyen, T. D., Albers, N., Speerforck, S., Lerch, M. M., von Bernstorff, W., Stier, A., & Heidecke, C. D. (2011). A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *European Surgical Research*, 47(2), 98-107.
- Pastor-Anglada, M., Casado, F. J., Valdés, R., Mata, J., García-Manteiga, J., & Molina, M. (2001). Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Molecular Membrane Biology*, 18(1), 81-85.
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworht, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis S. A., Duray P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. P., Davis, T. A., & Rosenberg, S.A. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8372-8377.

- Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., Womack, J. L., Goodenow, R. S., & Schreiber, H. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(15), 5140-5144.
- Peterslund, N. A., Koch, C., Jensenius, J. C., & Thiel, S. (2001). Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *The Lancet*, 358(9282), 637-638.
- Petersen, S. V., Thiel, S., & Jensenius, J. C. (2001). The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunology*, 38(2-3), 133-149.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Z., Heinemann, V., Grunewald, R., & Gandhi, V. (1995, August). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. In *Seminars in oncology* (Vol. 22, No. 4 Suppl 11, pp. 3-10).
- Raskovalova, T., Huang, X., Sitkovsky, M., Zacharia, L. C., Jackson, E. K., & Gorelik, E. (2005). Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4383-4391.
- Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., & Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2(1), 14.
- Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A., & Economou, J. S. (2003). Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 21(12), 2415-2432.

- Ridge, J. P., Di Rosa, F., & Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 393(6684), 474-478.
- Roses, R. E., Xu, S., Xu, M., Koldovsky, U., Koski, G., & Czerniecki, B. J. (2008). Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *The Journal of Immunology*, 181(7), 5120-5127.
- Rus, H., Cudrici, C., & Niculescu, F. (2005). The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic Research*, 33(2), 103-112.
- Sakowicz-Burkiewicz, M., Kitowska, A., Grden, M., Maciejewska, I., Szutowicz, A., & Pawelczyk, T. (2013). Differential effect of adenosine receptors on growth of human colon cancer HCT 116 and HT-29 cell lines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 533(1-2), 47-54.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 278-287.
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51(1), 1-28.
- Sevko, A., & Umansky, V. (2013). Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. *Journal of Cancer*, 4(1), 3.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565-1570.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17406-17409.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5-29.
- Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(8), 318-324.
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R., & Albelda, S. M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical Cancer Research*, 11(18), 6713-6721.
- Swart, M., Verbrugge, I., & Beltman, J. B. (2016). Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 6, 233.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Takahashi, M., & Kobayashi, Y. (2003). Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cellular Immunology*, 226(2), 105-115.
- Thomas, J. A., & Badini, M. (2011). The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian Journal of Cancer*, 48(2), 246.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 133.
- Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 6(15), 1368-1373.

- Umansky, V., Blattner, C., Gebhardt, C., & Utikal, J. (2016). The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines*, 4(4), 36.
- Umansky, V., Sevko, A., Gebhardt, C., & Utikal, J. (2014). Myeloid-derived suppressor cells in malignant melanoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12(11), 1021-1027.
- Vetvicka, V., Thornton, B. P., & Ross, G. D. (1996). Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 50-61.
- Villalba, M., Rathore, M. G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., & Allende-Vega, N. (2013). From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(1), 106-113.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503.
- Waldmannová E., Caisová V., Fáberová J., Sváčková P., Kovářová M., Sváčková D., Kumžáková Z., Jačková A., Vácová N., Nedbalová P., Horká M., Kopecký J., & Ženka J., 2016. The use of zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*, 39: 295-306
- Wang, R. F. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity. *Trends in Immunology*, 22(5), 269-276.
- Wei, Q., Costanzi, S., Balasubramanian, R., Gao, Z. G., & Jacobson, K. A. (2013). A 2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signalling*, 9(2), 271-280.

- Willingham, S. B., Volkmer, J. P., Gentles, A. J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S. S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J. D., Scheeren, F. A., Chao, M. P., Weiskopf, K., Tang, C., Iweissman, I. L. & Lovelace, P. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6662-6667.
- Yeeprae, W., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2006). Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages. *Journal of Controlled Release*, 114(2), 193-201.
- Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M., & Gabrilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology*, 181(8), 5791-5802.
- Zani, I. A., Stephen, S. L., Mughal, N. A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S. B., & Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*, 4(2), 178-201.
- Zhou, Z. X., & Sun, L. (2015). Immune effects of R848: evidences that suggest an essential role of TLR7/8-induced, Myd88-and NF- κ B-dependent signaling in the antiviral immunity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 113-120.