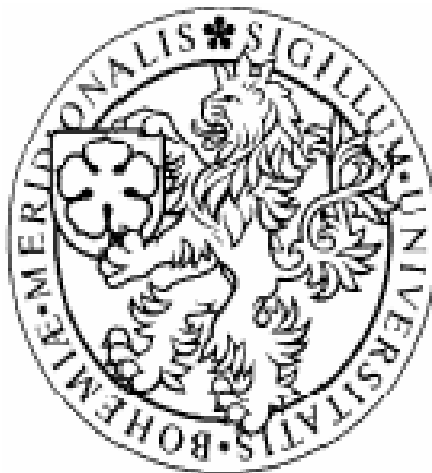


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Bakalářská diplomová práce

Proenzymoterapie melanomu B16-F10

Lucie Kalferstová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2008

Kalferstová L., 2008: Proenzymoterapie melanomu B16-F10 [Proenzyme therapy of melanoma B16-F10. Bc. Thesis, in Czech] - 48 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this study was find out the influence of proenzyme therapy and enzyme therapy on the murine melanoma B16-F10. The proenzyme therapy and enzyme therapy were compared and potential combinations were examined. In the thesis was also studied the effect of beta glucan against melanoma.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 25.4.2008

.....
Lucie Kalferstová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení práce, množství cenných rad a velikou trpělivost. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a kolektivům Oddělení imunologie parazitů a Laboratoře oportunních parazitů za umožnění provedení této práce, a to v příjemném prostředí, a také za jejich ochotu a vstřícnost. Mé velké díky patří i všem blízkým přátelům, zvláště potom mé rodině, za jejich podporu a zázemí vždy, když jsem potřebovala.

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1. Rakovina.....	5
1.1.1. Klasifikace nádorů podle tkáňového původu	6
1.1.2. Vznik nádorů, hypotézy.....	7
1.1.2.1. Zárodečná (embryonální) hypotéza.....	7
1.1.2.2. Iritiční hypotéza	7
1.1.2.3. Regenerační hypotéza	7
1.1.2.4. Mutační genová hypotéza	8
1.1.2.5. Hypotéze předpokládající vznik nádorů z kmenových buněk	8
1.2. Melanom.....	8
1.3. Nádorová imunologie.....	9
1.3.1. Cytokiny	10
1.4. Enzymová terapie.....	11
1.5. Proenzymová terapie	13
1.6. Beta glukán.....	15
2. Cíle práce	17
3. Materiál a metody	18
3.1. Laboratorní zvířata	18
3.2. Buněčné linie.....	18
3.3. Transplantace nádoru	18
3.3.1. Pokus č. 1.....	18
3.3.2. Pokus č. 2.....	19
3.4. Léčba – proenzymová/enzymová terapie	19
3.4.1. Pokus č. 1.....	19
3.4.1.1. Složení podávaných roztoků u jednotlivých skupin.....	19
3.4.2. Pokus č. 2.....	20
3.4.2.1. Složení podávaných roztoků	20
3.4.2.2. Terapie u jednotlivých skupin	21
3.5. Měření velikosti nádorů	22
3.6. Počítání metastáz - plíce.....	22
3.7. Histologické zpracování	22
3.7.1. Fixace	22
3.7.2. Odvodňování	23
3.7.3. Zalévání do parafinu.....	23
3.7.4. Vytvoření bločků	23
3.7.5. Krájení histologických řezů.....	23

3.7.6. Odparafinování řezů	24
3.7.7. Barvení řezů.....	24
3.7.8. Odvodnění řezů.....	24
3.7.9. Montování řezů.....	24
3.7.10. Pozorování histologických preparátů	24
3.8. Statistické vyhodnocování.....	24
4. Výsledky	25
4.1. Pokus č. 1	25
4.1.1. Vliv terapie na velikost nádoru.....	25
4.1.2. Vliv terapie na výskyt metastáz.....	27
4.1.3. Vliv terapie na dobu přežití myši.....	29
4.1.4. Vliv terapie na vypadávání hmatových chlupů (<i>pili tactiles</i>).....	30
4.1.5. Histologické pozorování.....	32
4.2. Pokus č. 2	33
4.2.1. Vliv terapie na velikost nádoru.....	33
4.2.2. Vliv terapie na výskyt metastáz.....	36
4.2.3. Vliv terapie na dobu přežití myši.....	37
4.2.4. Vliv terapie na vypadávání hmatových chlupů (<i>pili tactiles</i>).....	38
4.2.5. Výskyt nádorových nektróz.....	39
5. Diskuze	40
6. Souhrn	43
7. Seznam použité literatury.....	44

1. ÚVOD

1.1. RAKOVINA

Jako rakovinu označujeme skupinu nemocí vyznačujících se nekontrolovatelným buněčným dělením, schopností napadat jiné tkáně a rozšiřovat se do jiných částí těla pomocí metastáz.

Zhoubné nádorové onemocnění bylo poprvé popsáno ve starověkých egyptských spisech kolem roku 1600 př. n. l. Starověký řecký lékař Hipokratés (asi 460-377 př. n. l.) dokázal rozpoznat rozdíl mezi zhoubným a nezhoubným nádorem. Nádor jevící se jako zhoubný pojmenoval „karkinóma“, latinská obdoba tohoto termínu je „cancer“, neboli rak. P. Pott, londýnský chirurg, v roce 1775 upozornil na spojitost mezi denním stykem s uhelným prachem, sazemi a výskytem karcinomů u kominíků. Jamagiva a Išikava, japonští vědci, provedli v roce 1915 historicky první experimentální studii (vyvolali karcinom dlouhodobým potíráním kůže králíků kamenouhelným dehtem), která zahájila éru experimentální onkologie.

Rakovina je výsledkem mutací, které osvobodí buňky od obvyklé regulace buněčného dělení a přežití. Buňka v těle mutuje díky sérii náhodných událostí (mutací musí v buňce proběhnout minimálně 4-7) a získává schopnost proliferovat bez normálních zábran. Potomstvo této buňky mutace zdědí a vzniká z nich nádor, který může neomezeně růst (Alberts a spol., 1998). Nádory většinou vznikají defektem regulace jedné buňky, z tohoto důvodu jsou často monoklonální. U rakovinných buněk neprobíhá apoptóza, dochází k narušení buněčného cyklu. Příčinou transformace buněk na rakovinné může být působení chemických kancerogenů, záření nebo některých virů. DNA buňky může být poškozena také genetickými faktory.

Nádory se dělí na benigní, které nemají schopnost neomezeně růst, neinvadují zdravou okolní tkáň a nejsou tolik nebezpečné. Druhou skupinu tvoří nádory maligní, pro které je typický nekontrolovatelný růst. Tyto nádory jsou progresivně invazivní, velmi často metastazují a mají zvláštní schopnost výživy (primární hostiotrofě, následuje angiogeneze).

1.1.1. Klasifikace nádorů podle tkáňového původu:

- **Epiteliální** (krycí nebo výstelková tkáň)
 - Benigní: epitelom, papilom
 - Maligní: karcinomy
- **Stromální** (pojivové)
 - Benigní: fibromy (vazivo), myomy (hladké svalstvo), chondromy (chrupavka)
 - Maligní: sarkomy
- **Hematopoetické** (z krvetvorných tkání)
 - Maligní: leukémie, lymfomy
- **Neuroektodermu** (nádory CNS a kůže)
 - Benigní (CNS): gliom, neurinom, meningeom
 - Maligní (CNS): glioblastom, neuroblastom
 - Benigní (kůže): pigmentový névus
 - Maligní (kůže): melanom
- **Žlázových tkání**
 - Benigní: adenomy
 - Maligní: adenokarcinomy
- **Germinomy** (ze zárodečných tkání)
 - Benigní: teratomy
 - Maligní: teratokarcinomy, embryonální karcinom
- **Vzácné nádory z ostatních tkání**

Systematické studium kancerogeneze experimentálně zkoumá vliv a mechanismy působení kancerogenů. Kancerogeneze se může dělit dle typu kancerogenů na chemickou, fyzikální a biologickou. Virová kancerogeneze přinesla základ molekulární biologie nádorů. Existuje také několik hypotéz na vysvětlení původu a vzniku nádorů (viz dále).

Chemická kancerogeneze obsahuje širokou škálu několika tisíc látek, která se stále rozšiřuje. Mezi chemické kancerogeny patří například tyto látky: polycyklické aromatické uhlovodíky (benzpyren, antracen), nitrosaminy, aromatické aminy (naftylamin, benzidin), dioxiny, různorodá skupina alifatických kancerogenů (vinylchlorid, tetrachlormetan, insekticid DDT), arzén a jeho sloučeniny, sloučeniny chromu, kadmia a niklu, azbest,

koncentrovaný alkohol a aflatoxin (produkt plísně *Aspergillus flavus*, je na rozhraní mezi biologickým a chemickým kancerogenem).

Do fyzikální kancerogeneze se řadí radiační kancerogeneze, UV záření slunečního spektra i z umělých zdrojů (horské slunce, solária), popáleninová kancerogeneze a vliv mechanického působení cizích těles.

Biologická kancerogeneze zahrnuje kancerogenezi virovou (jako první byl objeven virus ptačího sarkomu, dále virus myší leukémie, virus Epstein-Barrové patřící mezi herpes viry, papilomaviry, viry sérové žloutenky – typu B), bakteriální (*Helicobacter pylori*), parazitární (*Bilharzia*, *Schistosomiaza*, *Amebiaza*) a kancerogenní vliv endogenních tělních produktů jako jsou hormony (vznik karcinomu prsu, děložního těla, prostaty, štítné žlázy a možná i melanomu) a žlučové kyseliny (účinky u karcinomu tlustého střeva a konečníku).

1.1.2. Vznik nádorů, hypotézy:

1.1.2.1. Zárodečná (embryonální) hypotéza:

Tato hypotéza je považována za nejstarší. Je založena na podobnosti růstu tkání zárodku a nádorů. Zahrnuje také trofoblastickou hypotézu vzniku nádorů. S touto myšlenkou přišel srovnávací embryolog John Beard (1857-1924), který vystihl chování zhoubných nádorů porovnáním s trofoblastem. Beard popsal domněnku, že původ nádorů je ze zárodečných buněk. V současné době se některé úvahy zastánců hypotézy vzniku nádorů z kmenových buněk této teorii přibližují.

1.1.2.2. Iritační hypotéza:

Počátku vzniku nádoru předchází dlouhodobé dráždění, zánět, nebo také opakovaná zraňování, což bylo prokázáno u 15% ze všech známých maligních nádorů. Tuto hypotézu podporuje objev zánětlivých cytokinů a zánětlivých růstových faktorů, které se podílejí na vzniku nádorů.

1.1.2.3. Regenerační hypotéza:

Navazuje na iritační hypotézu. Je založena na časté tkáňové obnově, předcházející vzniku nádoru. I tato hypotéza byla v poslední době podpořena. Například poznatky, že nádor se podobá nikdy se nehojící ráně, nebo karikatuře tkáňové obnovy. Opakovaná regenerace je podpořena kmenovými buňkami, které byly nalezeny i v některých nádorech.

1.1.2.4. Mutační genová hypotéza:

Tato v současnosti dominující hypotéza navazuje na studie onkogenů a antionkogenů. Mutace může být bodová (týká se přímo DNA) nebo nepřímá, kvalitativními změnami chromozomů.

1.1.2.5. Hypotéza předpokládající vznik nádorů z kmenových buněk:

Jak bylo zmíněno výše, nádory vznikají většinou z jedné buňky, z které to je, stále není zcela přesně známo. V poslední době se často diskutuje otázka možnosti vzniku nádorů z kmenových buněk. Hovoří se o buňkách kmenových, ale tento předpoklad nebyl dosud podložen důkazy. Kmenové buňky mohou být vysvětlením pro odolnost nádorů vůči cytostatikům a radiačnímu záření. Ve prospěch této hypotézy rovněž hovoří to, že zmíněný počet nutných mutací předpokládá dlouhé trvání příslušné buněčné linie, což je u kmenových buněk zaručeno. Kromě tkáňových kmenových buněk je zvažováno, zda se kancerogeneze neúčastní také VSEL (very small embryonic like) buňky (Kucia a spol, 2006), a to vzhledem k jejich mobilitě, účasti v procesech regenerace i velmi nízkému stupni diferenciaci. Hypotéza předpokládající vznik nádorů z kmenových buněk není v rozporu s mutační genovou hypotézou. Neřeší otázku jak, ale z jakých buněk nádory vznikají.

1.2. MELANOM

Melanom je nádor, který vychází z pigmentových buněk, tzv. melanocytů. Na jeho vzniku se podílí převážně ultrafialové záření, a to zejména jeho UVB složka. Melanocyty produkují pigment melanin, který dodává kůži přirozenou barvu a způsobuje, že nádory jsou černé nebo hnědé. Maligní melanom u lidí je rozlišován na 4 druhy:

- **Povrchově se šířící maligní melanom** – nejčastější typ melanomu, nejprve roste jenom povrchově, v pozdější fázi se dostane do hlubších vrstev kůže
- **Nodulární melanom** – od počátku hrbol nad kůží, nádor prorůstá do větších hloubek kůže
- **Lentigo maligna melanom** – vniká na kůži s patrnými známkami poškození slunečním zářením, jsou to plošná ložiska se střídáním světlých a tmavých odstínů hnědé barvy, nejčastěji u starších osob
- **Akrolentiginózní melanom** – nejčastěji vzniká na periferních partiích lidského těla (na ploskách, dlaních či pod nehty)

U myšího melanomu rozeznáváme čtyři typy rozdílných buněčných linií, B16-F0, -F1, -F10 a B16-BL6. Buněčná linie B16-F1 byla získána jednou selekční procedurou, B16-F10 provedením selekční procedury desetkrát, za použití Fidlerovy metody (Nakumara a spol., 2001). Melanom se myším aplikuje injekčně a to nejčastěji podkožní nebo intravenózní cestou do ocasní žíly. B16-F10 a B16-BL6 buněčné linie mnohem silněji metastazují do plic než buněčné linie B16-F1, ovšem ve zhubnosti nádoru se blízce rovnají (Nakumara a spol., 2001).

1.3. NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE, IMUNOTERAPIE

Pro reakci imunitního systému s nádorovými buňkami je nutná existence nádorově specifických povrchových antigenů umožňujících jejich rozpoznání imunitním systémem. Tyto nádorové antigeny byly identifikovány a rozděleny do dvou kategorií: antigeny specifické pro nádory (TSA - vyskytující se pouze na nádorových buňkách) a antigeny asociované s nádory (TAA - vyskytující se i na normálních buňkách za podmínek, které neindukují stav imunologické tolerance).

Do kategorie antigenů specifických pro nádory patří například: komplexy MHC I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (typické pro chemicky indukované nádory a některé leukémie), komplexy MHC I s fragmenty proteinů onkogenních virů (u nádorů vyvolaných viry), abnormální formy glykoproteinů a idiotopy myelomů a lymfomů.

Mezi antigeny asociované s nádory patří onkofetální antigeny (jsou přítomné v normálních fetálních buňkách, např. α -fetoprotein, karcinoembryonální antigen), některé melanomové antigeny (silně exprimovány na melanomových buňkách, MAGE-1, Melan-A), antigen HER2/neu (receptor růstového faktoru epiteliálních buněk), PSA (prostatický specifický antigen), EPCAM (adhezivní molekula epiteliálních buněk, silná exprese na metastázách karcinomů) a tzv. diferenciační antigeny leukemických buněk.

Normálně bývá vysoká hladina lymfocytů schopných zabít řadu nádorových buněk. Mezi tyto buňky patří NK-buňky, což jsou velké granulární lymfocyty, které nemají membránový Ig ani T receptor. Zabíjení probíhá podobným mechanismem jako u CTL, a navíc ještě NK sekretují rozpustný faktor cytotoxický pouze pro nádorové buňky. Dále sem patří NC (natural cytotoxin) buňky, což jsou T_C buňky s $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ receptory, které nespecificky rozpoznávají a zabíjejí nádorové buňky. Aktivita obou typů těchto buněk (NK i NC) může být zvýšena

působením IFN γ a IL-2. Další obranu proti nádorovým buňkám zajišťují makrofágy. Makrofágy musí být aktivované IFN γ a MAF (makrofágy aktivující faktor), což zvýší jejich cytotoxicitu pro nádorové buňky. Po aktivaci makrofágy produkují větší množství enzymů, které tak dosahují vysokých lokálních koncentrací (např. TNF- α).

Různé typy nádorových buněk se liší způsoby, kterými se mohou vyhnout imunitě. Řada těchto mechanismů je analogická s únikovými mechanismy infekčních mikroorganismů. Mezi nejvýznamnější způsoby úniku nádoru imunitnímu systému se řadí: i) variabilita nádorových buněk (mutantní formy bez nádorového antigenu), ii) nízká hustota exprese nádorových antigenů, iii) syalilace povrchu nádorových buněk (zamaskování některých epitopů nádorových antigenů), iv) produkce faktorů inaktivujících T-lymfocyty nebo jiných blokujících faktorů (IL-10, TGF- β), v) produkce faktorů inhibujících funkce či životnost dendritických buněk (NO, IL-10, TGF- β).

Jedním z největších problémů při nádorové terapii jsou metastázy. Mezi adhezivními molekulami na buňkách má nejpravděpodobněji nejdůležitější roli při vzniku metastáz molekula CD44 (Gebauer a spol., 1997). Z toho důvodu se očekává určité zamezení vzniku metastáz při snížení hustoty výskytu CD44 (Paradis a spol., 1999). Tyto molekuly mohou být blokovány buď monoklonálními protilátkami, nebo také aktivitou proteáz, kterými se tato práce zabývá. Bylo potvrzeno, že směs trypsinu, chymotrypsinu a papainu vedla ke snížení výskytu molekul CD44 na povrchu buněk (Wald a spol., 2001).

1.3.1. Cytokiny

Cytokiny hrají v nádorové imunologii velmi důležitou roli. V patogenních případech dochází v organismu k porušení Th1/Th2 rovnováhy (v případě zánětu převáží Th1 odpověď, v případě nádorového onemocnění dojde k větší produkci Th2 cytokinů). Cytokiny, které jsou produkovány, nepůsobí jenom lokálně, ale i systémově. Smyslem terapie by mělo být znovunastolení rovnováhy mezi produkcí Th1 cytokinů a Th2 cytokinů. Hlavními nádorovými cytokiny, které navozují stav, kdy jsou nádory tolerovány, jsou TGF- β , IL-4, IL-6 a IL-10 (Pawelec, 1999). Tyto cytokiny jsou produkovány jak samotnými nádorovými buňkami, tak i buňkami imunitního systému, které infiltrují a obklopují nádorovou tkáň. Důležitou roli zde hrají hlavně TGF- β a IL-10.

TGF- β inhibuje cytotoxicitu makrofágů a NK buněk (Finke a Bukowski, 2004), suprimuje proliferaci dendritických buněk (Brown a spol., 2001) a T buněk (Weller a Fontana, 1995), inhibuje TCR signalizaci, stimuluje angiogenezi nádorů, inhibuje CTL odpověď a MHC I

(Weller a Fontana, 1995), zesiluje metastázování nádorů a výrazně zhoršuje prognózu. TGF-beta také zesiluje vlastní produkci a zároveň IL-10 produkci (Maeda a Shiraishi, 1996).

IL-10 má stejně jako TGF- β spoustu účinků působících ve prospěch nádoru. Patří sem suprimace dendritických buněk (Shurin a spol., 2002), Th1 (McHugh a spol., 2002), IFN-gama, IL-2 (Finke a Bukowski, 2004), antigenní prezentace (Kim a spol., 1995), snížení exprese MHC I (Terrazzano a spol., 2000) a zvýšení exprese HLA G (brání ataku NK buněk), (Moreau a spol., 1999). Působení IL-10 není ovšem úplně jednoznačné, někdy je schopen vývoj nádorů inhibovat.

1.4. ENZYMOVÁ TERAPIE

Enzymová terapie je v současné době velmi diskutovanou metodou, zejména s ohledem na nevyřešenou otázku perorálního vstřebávání (viz diskuse). Nicméně dokumentované výsledky v klinických zkouškách, a také výrazné efekty v preklinických studiích, založených na spolehlivější perrektální aplikaci, nám umožňují zvažovat tento způsob jako možnost nádorové terapie. Enzymoterapie je v současnosti chápána jako imunomodulace. Mezi nejčastěji užívané enzymy patří trypsin, chymotrypsin, bromelin a papain (např. Wobenzym, Wobe-Mugos). Po vstřebání jsou proteázy vázány cirkulujícími anti-proteázami, jako např. α 2makroglobulin a α 1-proteázový inhibitor. Jak vyplývá z disociačních konstant těchto komplexů, je tato vazba silná a z toho důvodu nelze předpokládat, že by navázané proteázy atakovaly ostatní proteiny v séru. Toto tvrzení bylo experimentálně potvrzeno (Ženka, nepublikováno).

Proteázy se tedy v séru vyskytují přednostně ve formě komplexů s α 2-makroglobulinem (Topping a Seilman, 1979), v případě jeho vyčerpání se postupně navazují na ostatní sérové proteázové inhibitory. Lidský α 2-makroglobulin je glykoprotein o poměrně velké molekulové hmotnosti (718 kDa) a v krvi se vyskytuje ve vysokých koncentracích (2-4 mg/ml), (James, 1990). α 2-makroglobulin, produkováný hepatocyty v játrech, buňkami děložní sliznice (Sayegh a spol., 1995) a makrofágy (Kawser a spol., 1998), je nespecifický proteázy vázající protein (váže proteázy všech čtyř hlavních tříd: aspartátové proteázy, cysteinové proteázy, matrixové metaloproteázy a serinové proteázy).

Důležité je, že α 2-makroglobulin po navázání proteáz přejde do aktivované formy. V této formě získává, případně zesiluje svou schopnost vázat nejrůznější cytokiny.

Přehled cytokinů vázaných α 2-makroglobulinem:

TGF-beta1, TGF-beta 2	Feige a spol., 1996
IL-1beta, IL-2, IL-12	Borth a Luger, 1989
IL-4	Garber a spol, 2000
IL-6	Matsuda a spol, 1989
IL-8	Kurdowska a spol., 1997
IL-10	Garber a spol., 2000
Inhibin, Activin	Niemuller a spol., 1995
Defensin	Panyutich a Ganz, 1991
VEGF	Bhattacharjee a spol., 2000;
NGF-beta	Gonias a spol., 2000
PDGF-BB	Crookston a spol., 1994
FGF 1,2,4,6	Asplin a spol., 2001
EGF	Gettins a Crews, 1993
IGF-1	da-Silva a spol., 1996
OGP	Gavish a spol., 1997
NT-3, CNTF	Liebl a Koo, 1993
TGF-alpha	Liebl a Koo, 1993
beta-2 microglobulin	Gouin-Charnet a spol., 2000
Growth hormone GH	Kratzsch a spol., 1996
Leptin	Birkenmeier a spol., 1998
TNF-alpha	Crookston a spol., 1994
IFN-gamma	James a spol., 1992

Komplex α 2-makroglobulin + enzym + cytokin je odstraněn z cirkulace vazbou na LRP (nízko denzitní lipoproteinový receptor vázající protein, vyskytuje se na povrchu buňky) a zničen ve vakuolách buňky.

Nadprodukce cytokinů charakterizuje vývoj rozdílných chorob. Odčerpáním těchto přebytečných cytokinů a nastolením rovnovážného stavu je možné vysvětlit příznivé působení enzymoterapie při různých stavech jako je zánět, chronický zánět, nádorová onemocnění i autoimunita. V případě terapeutického působení na nádorová onemocnění je zdůrazňován vliv aktivovaného α 2-makroglobulinu na odstraňování nadbytečného TGF- β , kterým nádory potlačují imunitní odpověď.

Multifunkční cytokin TGF- β je zapletený do mnoha různých funkcí buňky. Hraje velmi důležitou roli v buněčné diferenciaci, růstu, formaci matrixu a regulaci imunitní a zánětové

odpovědi. Při rakovině TGF- β podporuje růst nádorových buněk a metastazování (Yang a spol., 2002), inhibuje růst a funkční aktivitu NK buněk aktivovaných lymfokiny, dodatečně redukuje produkci TNF a expresi mRNA perforinu (Abe a spol., 1992), a také inhibuje fagocytózu a cytotoxicitu v makrofázích a granulocytech.

Snižování TGF- β v lidské krvi vlivem enzymové terapie bylo prokázáno (Desser a spol., 2001). TGF- β je autokrinní růstový faktor, který stimuluje svou vlastní produkci (Blanchette a spol., 1997). Z toho vyplývá, že snížení TGF- β snižuje jeho nadprodukcí. Lze tedy předpokládat, že popsané odstraňování jednoho z hlavních cytokinů, podílejících se na nádorové imunosupresi, je přinejmenším spoluodpovědné za pozorované efekty při enzymoterapii rakoviny. Důležitá role TGF- β v nádorové progresi a metastazování souvisí s tím, že nejlepších výsledků bylo dosaženo systémovou enzymovou terapií právě v případě myších metastázových modelů, jako Lewisův plicní karcinom (Wald a spol., 1998) a melanom B16 (Wald a spol., 2001).

1.5. PROENZYMOVÁ TERAPIE

Základy enzymové terapie byly položeny už před sto lety. John Beard, srovnávací embryolog na Edinburghské Univerzitě, se zabýval shodou maligních tumorů a trofoblastu. Všiml si, že u většiny placentálních obratlovců, v době kdy dochází ke zpomalení růstu placenty, se vyvíjí pankreas. Díky vědomosti o shodě mezi vlastnostmi maligních tumorů a trofoblastu (Beard, 1902, 1903, 1905, 1907a, 1907b) předpokládal, že enzymy produkované během vývoje pankreatické žlázy omezují invazi trofoblastu a domníval se, že extrakt pankreatu může mít podobný tlumící účinek na nádorovou invazi (Beard, 1905). To bylo experimentálně potvrzeno, a jako trypsinová terapie nádorových onemocnění také publikováno (Beard, 1911).

Beard používal čerstvé extrakty telecích pankreatů, na použití čerstvých extraktů kladl velký důraz z důvodu, že jediné ty obsahují správné množství účinných látek – trypsinu a amylázy. Pozoroval, že ve starších preparátech se amyláza postupně deaktivuje, zatímco aktivita trypsinu narůstá (v důsledku autoaktivace trypsinogenu, to ovšem nemohl vědět, jelikož proenzymy byly popsány mnohem později). Čerstvý extrakt, který používal, tudíž obsahoval významné množství trypsinogenu, nepochybně i chymotrypsinogenu (ten byl objeven o mnoho desítek let později) a amylázy. Beard tedy spíše než enzymoterapii popsal

nevědomky proenzymoterapii. Na tento omyl poprvé upozornil Trnka a Novák (Trnka a spol., 1999, Novák a Trnka, 2005).

Proenzymy jsou neaktivní a proto se mohou v krvi nerušeně pohybovat. Předpokládá se, že v místě nádoru jsou aktivovány nádorovými proteázami jako je s membránou spojený katepsin B (Kobayashi a spol., 1993), nádorový trypsin (Nyberg a spol., 2006) a urokinasový aktivátor plasminogenu (Uchima a spol., 2003). Zvažována je také účast enterokinázy (Miyata a spol., 1999), nebo enterokináze podobného enzymu (Nyberg a spol., 2002).

Většina pankreatických enzymů je sekretována ve formě proenzymů, které jsou následně účinkem enterokináz aktivovány v duodenu (Borgstrom a spol., 1993). Zásadní hypotéza, že rozhodující složky v Beardově preparátu byly proenzymy a ne enzymy, byla poprvé podpořena experimenty na myších s MCA indukovanými nádory a s transplantovanými melanomy B16 (Trnka a spol., 1999, Novák a Trnka, 2005). V těchto *in vivo* experimentech byla testována směs trypsinogenu a amylázy v přibližné koncentraci doporučené Beardem. Směs měla pozitivní vliv na přežití myši a vykazovala zejména antimetastázový vliv (Trnka a spol., 1999, Novák a Trnka, 2005).

Kaiserová a Ženka (*in prep.*) prokázali synergický účinek trypsinogenu a chymotrypsinogenu. Optimalizovali také množství amylázy, která má sice jen podpůrný vliv (Novák a Trnka, 2005), ale v kombinaci s proenzymy zároveň zlepšuje průběh terapie, a to pravděpodobně odbouráváním glykoproteinů.

Co se týče mechanismů působení proenzymů, předpokládáme, že se uplatňují ve dvou oblastech. Jak už bylo zmíněno, lze očekávat aktivaci proenzymů v místech nádorů, ale také byla popsána pomalá autoaktivace proenzymů v séru, kde klíčovou roli hraje vápník (Ženka, *in prep.*). V tomto ohledu je možno uvažovat o výše zmíněných mechanismech interakce s $\alpha 2$ -makroglobulinem a imunomodulaci, založených na pohlcování cytokinů. Rozpad proenzymů zejména v místě nádorů by poté mohl vést k vyšší lokalizaci a zvýšení účinnosti tohoto jevu, ve srovnání se systémovým působením enzymoterapie.

Po aktivaci proenzymů v místě nádorů, následované případně jejich další autoaktivací, musí alespoň po určitou dobu existovat v aktivním (neinhibovaném) stavu, a to z toho důvodu, že v tomto místě proteolytické aktivity nad inhibičními musí převažovat, jinak by nedocházelo k invazím. Aktivní proteázy mohou interagovat s proteázami aktivovanými receptory (PARs), (Bohm a spol., 1998). Vzhledem k vysoké proteolytické aktivitě však v tomto případě předpokládáme spíše vyčerpání a destrukci těchto receptorů. Další možností působení proteáz je odstraňování nádor maskujících molekul, což vede ke snadnější identifikaci nádorů a jejich případné likvidaci imunitním systémem. Novák a Trnka, 2005

popisují vznik buněčných sferoidů působením enzymů, což by mohlo vést ke snížení mobility nádorových buněk. Naše pozorování (Ženka, *in prep.*) podtrhuje důležitost proteinů v prostředí pro rozvoj těchto procesů.

Aplikace enzymů a proenzymů obecně může vést k zvýšené produkci inhibitorů, které poté potlačují zejména nádorovou invazivitu a metastázování. Tato enzymová „vakcinace“ pak může probíhat jak systémově (použití enzymů), tak může mít i lokální charakter. Tak např. α -1-antitrypsin není produkován jenom játry, ale může být produkován též lokálně (Carlson a spol., 1988). Je možné si tedy představit jeho zesílenou lokální produkci vyvolanou nádory a také jimi aktivovanými proenzymy. Vyšší úroveň hladiny α -1-antitrypsinu uvnitř nádorů často vyvolá tendenci k lepšímu klinickému výsledku (Allagayer a spol., 1998).

Celkově tedy enzymoterapie a zejména proenzymoterapie stále vyvolávají otázku, jaké mechanismy způsobují pozorované efekty. Lze předpokládat účast více mechanismů najednou i střídání jejich proporcí během terapie. Jejich poznání je velmi důležité z hlediska další celkové optimalizace terapie.

1.6. BETA GLUKAN

Existuje několik odlišných typů glukanů s různou mírou aktivity. Nejaktivnější a z toho důvodu nejdůležitější druh glukanu je beta-1,3-D-glukan (Obr. 1.1.). Beta glukan je přírodní polysacharid, který lze izolovat z buněčných stěn kvasinek a hub. Je to poly-beta-1,3-D-glukopyróza s vysokou molekulovou hmotností. Tato molekula je ve vodě málo rozpustná, až nerozpustná.

Ve výzkumném středisku Harvardské Univerzity bylo zjištěno, že existují určité receptory (proteinový komplex, který se na makrofázích vyskytuje od počátku jejich zrání v kostní dřeni i během jejich diferenciací) na membránách makrofágů, které dovedou tyto glukany zachytit. Nejčastěji jsou to receptory, které rozeznávají zhruba sedm sacharidových jednotek. Tato interakce je významná aktivací makrofágů, které zajišťují nespecifickou imunitu. Zralé makrofágy se vyskytují ve všech tkáních, i v tkáni centrálního nervového systému. Když dojde k setkání makrofágu s beta-1,3-D-glukanem, molekula se naváže na makrofág prostřednictvím receptoru a ten se tím aktivuje.

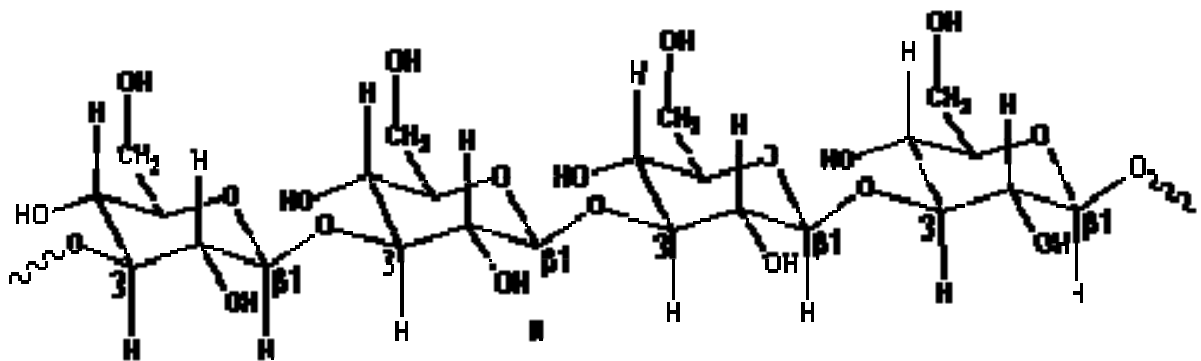
Aktivace makrofágu představuje: zvýšení jeho fagocytární funkce, uvolňování primárních i sekundárních cytokinů, uvolňování kolonizačních stimulačních faktorů GM-CSF a interferonů

a aktivaci T a B buněk. Aktivované makrofágy se spolu s cytokiny podílejí na nespecifické imunitě.

Beta glukan účinkuje dvojitým způsobem, přímo a nepřímo. Glukan působí také jako scavenger volných radikálů a antioxidační látka. Lokálně podané injekce beta-1,3-D-glukanové suspenze do melanomové léze přinesly úspěšné výsledky (Mansell a spol., 1978). Toto pozorování je pravděpodobně zapříčiněno právě schopností beta glukanu zesilovat nespecifickou imunitu (aktivování makrofágů, NK buněk).

V jiných experimentálních studiích bylo zjištěno, že beta glukan má také výrazné účinky na metastázování nádorů. U myši, kterým byl glukan podáván, byl pozorován značný pokles vzniku metastázových ložisek na plicích oproti myším v kontrolních skupinách (Moon a spol., 2005, Vetvicka a spol., 2007).

Beta glukan lze aplikovat orálně nebo injekčně. Je zcela bez nežádoucích účinků a je netoxický.



Obr. 1.1. Vzorec beta 1,3-D-glukanu.

2. CÍLE PRÁCE

- Kultivace nádorových buněk
- Transplantace nádorových buněk myším a následná terapie proenzymy proteáz (trypsinogen, chymotrypsinogen)
- Srovnání proenzymoterapie se systémovou enzymoterapií
- Vyhodnocení experimentů, posouzení možných mechanismů

3. MATERIÁL A METODY

3.1. LABORATORNÍ ZVÍŘATA

Při pokusech byly použity SPF myši kmene C57BL/6 (Charles River) samičího pohlaví. Na začátku pokusu byly myši 8 týdnů staré a vážily 19-21g. Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Krmeny byly standardní komerční granulovanou stravou a vodou *ad libitum*.

3.2. BUNĚČNÉ LINIE

Použity byly nádorové buňky melanomu B16-F10 (dar prof. Říhové, MBÚ AV ČR, Praha). Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 obsahujícím 10% fetálního bovinního séra a antibiotika (Sigma). Kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

3.3. TRANSPLANTACE NÁDORU

3.3.1. Pokus č. 1

Bylo oholeno (záda, pravá strana dole) 55 samic C57BL/6.

Příprava buněk - médium (RPMI s 10% FCS) bylo slito, buňky byly dvakrát promyty větším množstvím PBS. Následovalo krátké opláchnutí adhezaných buněk trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,5 mM EDTA v PBS). Poté se k nim přidalo cca 0,5 ml trypsinizační směsi. Následovala 1-5 minutová inkubace při 37°C, dokud nedošlo k zakulacení a uvolnění buněk. Poté se k buňkám přidalo 5 ml RPMI s 10% FCS a buňky byly centrifugovány 10 min při 4°C a při 150g. Následně byly buňky dvakrát centrifugačně promyty s RPMI bez séra za stejných podmínek centrifugace. Promyté buňky byly rozsuspendovány v 5 ml RPMI a poté spočítány (Trypanová modř, 1:1). Jejich koncentrace byla upravena na 4 mil/ml.

Myším bylo transplantováno *s.c.* do oholeného místa 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI bez séra.

3.3.2. Pokus č. 2

Bylo oholeno 78 samic C57BL/6 (záda, pravá strana dole). V tomto pokusu byla použita stejná buněčná linie, příprava buněk proběhla stejným způsobem jako v prvním pokusu. Výsledná koncentrace buněk byla upravena na 5 mil/ml.

Myším bylo *s.c.* transplantováno 500 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI bez séra.

3.4. LÉČBA – PROENZYMOVÁ/ENZYMOVÁ TERAPIE

3.4.1. Pokus č. 1

Po transplantaci nádorových buněk byly myši sledovány kvůli počátkům výskytu nádoru. 11. den po transplantaci bylo shledáno 24 myši pozitivních a 31 myši negativních. U pozitivních myši se nejdříve nádory změřily kaliperem. Změřené myši byly rovnoměrně podle velikosti nádorů rozděleny do 4 skupin. Do I., II. a IV. skupiny se přidalo po osmi čistých myši, do III. skupiny se přidalo sedm čistých myši. Tentýž den byla započata léčba podle rozdělení do skupin. Každé myši bylo denně aplikováno *i.m.* do levé zadní nohy 0,1 ml roztoku (složení roztoků u jednotlivých skupin různé).

3.4.1.1. Složení podávaných roztoků u jednotlivých skupin

Skupina č. I. (proenzymoterapie):

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 33,6 mg trypsinogenu (T1143), aktivita: 11300 BAEE U/mg protein (po akt.)
- 33,6 mg α -chymotrypsinogenu A (C4879), aktivita: 56 BTEE U/mg solid (po aktivaci), (1 U před aktivaci)
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizace filtrací, potom zamražení po 1,5 ml.

Skupina č. II. (enzymoterapie):

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 38 mg trypsinu (T1426), aktivita: 10 000 BAEE U/mg protein
- 34,2 mg α -chymotrypsinu (C4129), aktivita: 55 BTEE U/mg solid
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizace filtrací, potom zamražení po 1,5 ml.

Skupina č. III. (enzymoterapie, snížená koncentrace):

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 3,8 mg trypsinu (T1426), aktivita: 10 000 BAEE U/mg protein
- 3,42 mg α -chymotrypsinu (C4129), aktivita: 55 BTEE U/mg solid
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizace filtrací, potom zamražení po 1,5 ml.

Skupina č. IV. (kontrolní skupina)

- Fyziologický roztok sterilizovaný filtrací zamražený po 1,5 ml.

3.4.2. Pokus č. 2

Po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši pozorovány, aby byl včas zachycen rozvoj nádorů. 10. den po transplantaci bylo 48 myši shledáno pozitivních. Nádory byly jako v pokuse č. 1 změřeny kaliperem a myši podle jejich velikosti rovnoměrně rozděleny do šesti skupin. Do každé skupiny bylo poté přidáno 6 myší, u kterých se nádor prozatím nerozvinul.

3.4.2.1. Složení podávaných roztoků

Beta glukan

Beta glukan byl získán jako dar (Transfer Point, USA). Použit byl produkt Beta-1,3-D glukan, 500 mg na kapsli (v kapslích se beta glukan nachází čisté formě). Beta glukan od Transfer Point byl v experimentálních testech vyhodnocen jako nejúčinnější (Vetvicka a Vetvickova, 2007). Myšim byly podávány 3 mg beta glukanu rozsuspendované v 0,05 ml vody. Pro perorální aplikaci byla připravena suspenze 60 mg beta glukanu na 1 ml vody.

Proenzymoterapie

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 33,6 mg trypsinogenu (T1143), aktivita: 11300 BAEE U/mg protein
- 33,6 mg α -chymotrypsinogenu A (C4879), aktivita: 56 BTEE U/mg solid (po akt.),
(1 U před aktivací)
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizováno filtrací, pak zamražení po 1,5 ml.

Enzymoterapie

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 2,8 mg trypsinu (T1426), aktivita: 13 500 BAEE U/mg protein
- 3,42 mg α -chymotrypsinu (C4129), aktivita: 55 BTEE U/mg solid
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizováno filtrací, potom zamražení po 1,5 ml.

3.4.2.2. Terapie u jednotlivých skupin

Skupina I (beta glukan)

Myším v této skupině bylo denně perorálně podáváno 0,05 ml suspenze beta glukanu (= 3 mg beta glukanu). K perorálnímu podání suspenze myším byla používána mikropipeta.

Skupina II (kombinovaná terapie - beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie)

V této skupině byl myším denně podáván beta glukan jako ve skupině č. 1. K tomu zde byla aplikována proenzymoterapie kombinovaná s enzymoterapií.

Proenzymoterapie – v liché dny (počítání dnů bylo započato spolu s vlastní terapií) se myším *i.m.* do levé zadní nohy podávalo 0,1 ml proenzymové směsi.

Enzymoterapie – v sudé dny se myším *i.m.* do pravé zadní nohy podávalo 0,1 ml enzymové směsi.

Skupina III (kombinovaná terapie - proenzymoterapie + enzymoterapie)

V této skupině byla použita proenzymoterapie kombinovaná s enzymoterapií.

Proenzymoterapie – v liché dny (počítání dnů bylo započato spolu s vlastní terapií) se myším *i.m.* do levé zadní nohy podávalo 0,1 ml proenzymové směsi.

Enzymoterapie – v sudé dny se myším *i.m.* do pravé zadní nohy podávalo 0,1 ml enzymové směsi.

Skupina IV (proenzymoterapie)

U myši v této skupině byla aplikována pouze proenzymoterapie. Podávání probíhalo pouze v liché dny - 0,1 ml proenzymové směsi *i.m.* do levé zadní nohy.

Skupina V (enzymoterapie)

V této skupině byla aplikována pouze enzymoterapie. Myším bylo v lichých dnech *i.m.* do levé zadní nohy podáváno 0,1 ml enzymové směsi.

Skupina VI (kontrola)

Tato skupina byla určena jako kontrolní, myším nebylo nic podáváno.

3.5. MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ

V obou pokusech byl růst nádorů sledován. Nádory byly dvakrát týdně měřeny pomocí kaliperu. Měřily se tři hodnoty (šířka, délka, výška), podle kterých se vypočítal pravděpodobný objem jednotlivých nádorů (Inaba a spol., 1986).

3.6. POČÍTÁNÍ METASTÁZ – PLÍCE

Před vlastním histologickým zpracováním, byly všechny plíce důkladně prohlédnuty. Prohlížení bylo provedeno pomocí binolupy. U plic obsahujících metastatická ložiska (černé tečky) se spočítalo jejich množství (Vetvicka a spol., 2007). Plíce byly prohlédnutou v obou pokusech.

3.7. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Histologické zpracování bylo provedeno u myši z pokusu č. 1.

3.7.1. Fixace vzorků

Po úhynu byly myši pitvány. Orgány (plíce, srdce, slezina, játra, ledviny a nádor) byly dávány do 4 % roztoku neutrálního formaldehydu, kde došlo k jejich fixaci (rychlá denaturace bílkovin cytoplasmu buněk).

3.7.2. Odvodňování

Vzorky musely být odvodněny, aby mohly být zality parafinem, který není mísitelný s vodou. Odvodnění bylo provedeno pomocí vzestupné alkoholové řady, poté 100% xylenem, který má schopnost mísit se s parafinem. Odvodňování bylo provedeno v těchto krocích:

- | | |
|--------------|---------|
| ➤ Voda | 15 min. |
| ➤ 70% etanol | 60 min. |
| ➤ 80% etanol | 60 min. |
| ➤ 96% etanol | 60 min. |
| ➤ 96% etanol | 60 min. |
| ➤ Aceton | 60 min. |
| ➤ Xylen | 60 min. |
| ➤ Xylen | 90 min. |

3.7.3. Zalévání do parafinu

Odvodněné vzorky bylo potřeba prosytit parafinem, aby je bylo možno nakrájet. Princip spočíval v prosycení odvodněné tkáně parafinem (bod tání již při 56 - 58°C) ředěným v xylenu v tomto poměru:

- | | |
|------------------------|------------|
| ➤ Kyveta 1 (poměr 1:3) | 2-4 hodiny |
| ➤ Kyveta 2 (poměr 1:1) | 4-6 hodin |
| ➤ Kyveta 3 (poměr 3:1) | 8-12 hodin |

3.7.4. Vytvoření bločků

Bložky byly zalévány v zalévací komůrce (kovová krabička), která byla naplněna tekutým parafinem. Do těchto komůrek byly vkládány vzorky prosycené parafinem. Po ztuhnutí se bločky vyndaly z komůrek a upravily ořezáním. Takto upravené bločky byly připevněny na nosiče bločků (dřevěné špalíčky).

3.7.5. Krájení histologických řezů

Z připravených tkáňových bločků se pomocí mikrotomu zhotovily tenké histologické řezy silné 5-7 μm . Řezy byly snímány z nože pomocí štětečku do předehřáté vodní lázně. Ve vodní lázni se narovnaly, poté byly vhodné řezy stahovány na podložní sklíčko, které se následně nechalo oschnout na vyhřáté plotýnce.

3.7.6. Odparafinování řezů

Jelikož je většina barviv používaných v histologii rozpustná ve vodě, bylo nutno vzorek odparafinovat a převést zpátky do vody. Sklíčka byla vložena do nosiče. Nosič spolu se sklíčky byl přendáván po pěti minutách mezi kyvetami v digestoři. Pořadí kyvet:

xylén – xylén – xylén – 96% EtOH - 96% EtOH - 80% EtOH - 70% EtOH – dest. H₂O - dest. H₂O

3.7.7. Barvení řezů

K barvení řezů byla použita histologická barviva – hemotoxylin, eosin.

Hemotoxylin – zásadité barvivo, obsahuje zásadité radikály, dobře barví jádro

Eosin – kyselé barvivo, obsahuje kyselé radikály. Barvicí řada:

Hematoxylin (10 min) – tekoucí voda (10 min) – eosin (5 min) – voda (opláchnout)

3.7.8. Odvodnění řezů

Po barvení se pokračovalo v této řadě oplachováním:

70% EtOH - 80% EtOH - 96% EtOH - 96% EtOH – karboxylen (1 min) – karboxylen (1 min) – xylén – xylén - xylén

3.7.9. Montování řezů

Na sklíčka byl hned po vytažení z poslední kyvety s xylemem kápnut kanadský balzám (je rozpustný v xylenu) a přiloženo krycí sklíčko. Zhotovená sklíčka se nechala zaschnout v termostatu.

3.7.10. Pozorování histologických preparátů

Zhotovené histologické preparáty byly pozorovány v mikroskopu zn. Olympus BX51 při zvětšení 100-200x. Zajímavé úkazy byly zaznamenány pomocí fotoaparátu.

3.8. STATISTICKÉ VYHODNOCOVÁNÍ

Statistické analýzy byly prováděny pomocí Studentova t-testu a programu STATISTICA VII od firmy StatSoft INC, pomocí Survival Analysis. V programu Microsoft Excel byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky, které poté byly použity pro vytvoření grafů.

4. VÝSLEDKY

4.1. POKUS Č. 1

Ve všech vyhodnoceních, která byla provedena, se počítalo pouze s myšmi, u kterých se nádor (i během pokusu) uchytil. V pokusu číslo jedna se nádor neuchytil celkem u 12,7% myší.

Výsledný počet myší zahrnutých do pokusu byl: skupina I - 13 myší, skupina II - 10 myší, skupina III - 13 myší a skupina IV - 12 myší.

Množství myší v jednotlivých skupinách, u kterých se nádor neuchytil, bylo: skupina I - 1 myš, skupina II - 4 myši, skupina III - žádná myš a skupina IV - 2 myši.

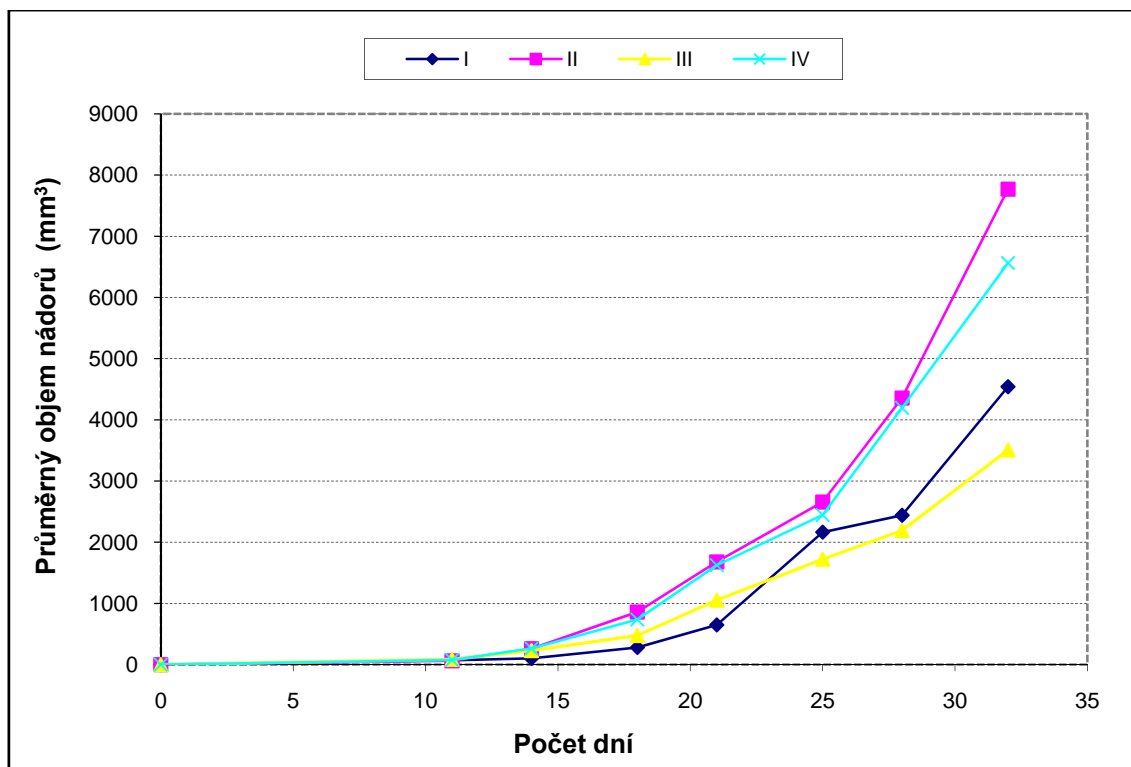
4.1.1. Vliv terapie na velikost nádoru

Prvním krokem bylo určení, jak terapie ovlivňuje růst transplantovaného nádoru u jednotlivých skupin. Nádory byly měřeny do té doby, než myši začaly hynout ve větším počtu.

Z naměřených hodnot se nejprve vypočítal objem nádoru u jednotlivých myší, a poté průměrná velikost nádoru v jednotlivých skupinách (podíl celkového objemu nádorů ve skupině a počtu nádorů ve skupině v daný den měření). Hodnoty byly zaneseny do grafu (obr. 4.1.).

Růst nádorů byl zpočátku nejvíce inhibován proenzymy (skupina I), později neúčinněji působila směs enzymů o koncentraci 10 x nižší, než měly proenzymy (skupina III). Při použití enzymů v ekvimolární koncentraci s proenzymy (skupina II) byl růst nádorů dokonce vyšší, než u kontrolní skupiny.

Osmnáctý den se rozdíl objemu mezi skupinou číslo I a IV přiblížil statistické významnosti ($P=0,06$).

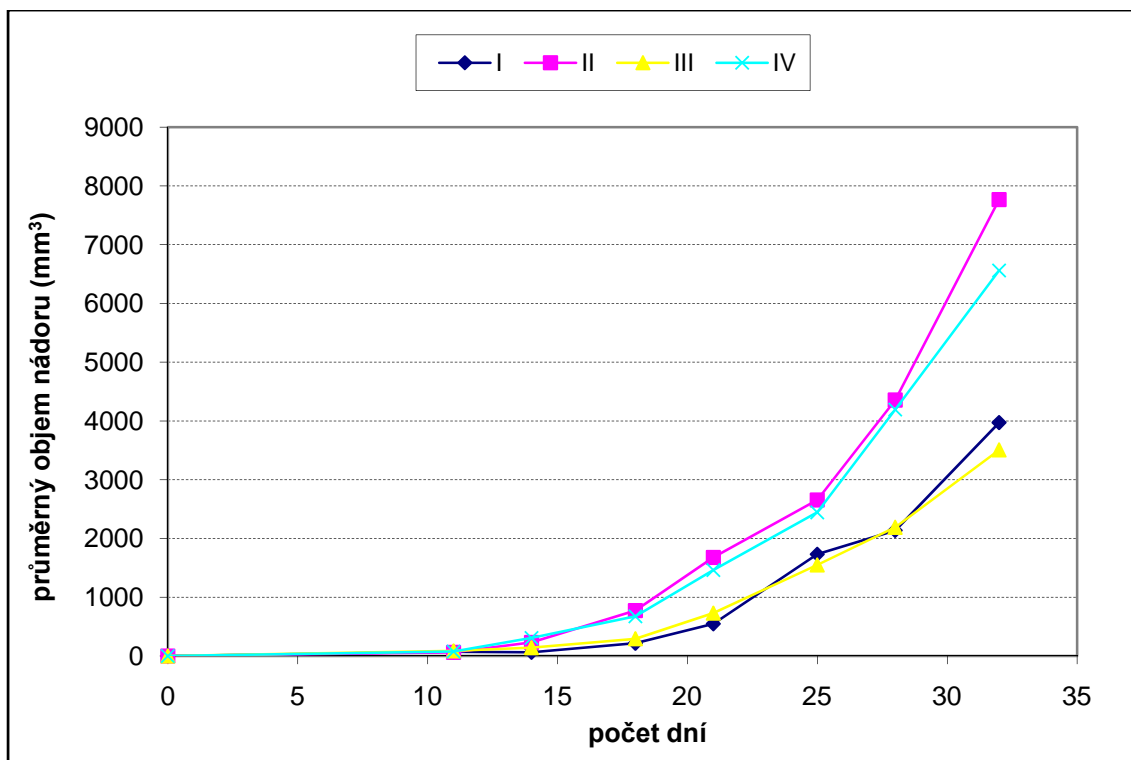


Obr. 4.1. Průměrná velikost nádoru v jednotlivých skupinách (vztaženo na myši, které měly v den měření nádor). I - proenzymy, II- enzymy v ekvimolární koncentraci s proenzymy, III- enzymy o desetinné koncentraci ve srovnání s proenzymy, IV- kontrola.

Jelikož byly v pokusu myši, u kterých se nádor projevil až v průběhu pokusu, bylo provedeno další vyhodnocení, při kterém se celkový objem nádorů daný den v dané skupině dělil celkovým počtem myši ve skupině. V počátečních dnech experimentu sice u části myši nádory nebyly vyvinuty, ale v neměřitelné formě několika buněk musely existovat. Výsledky tohoto vyhodnocení byly zaneseny do grafu (obr. 4.2.). Hodnoty byly velmi podobné výsledkům prvního vyhodnocení.

Osmnáctý den pokusu došlo k dosažení statistické významnosti u rozdílu velikosti mezi skupinou číslo I a skupinou číslo IV, $P \leq 0,05$.

Ve sledovaném období ovlivnění nádorového růstu (14-32 den) působily největší redukci nádorového růstu (průměrně 45,2% objemu nádorů v kontrole) proenzymy (skupina I). Enzymy v desetinné koncentraci (skupina III) redukovaly objem nádorů vůči kontrole na 51,3 %.



Obr. 4.2. Průměrný objem nádorů vztažený na všechny myši v dané skupině.

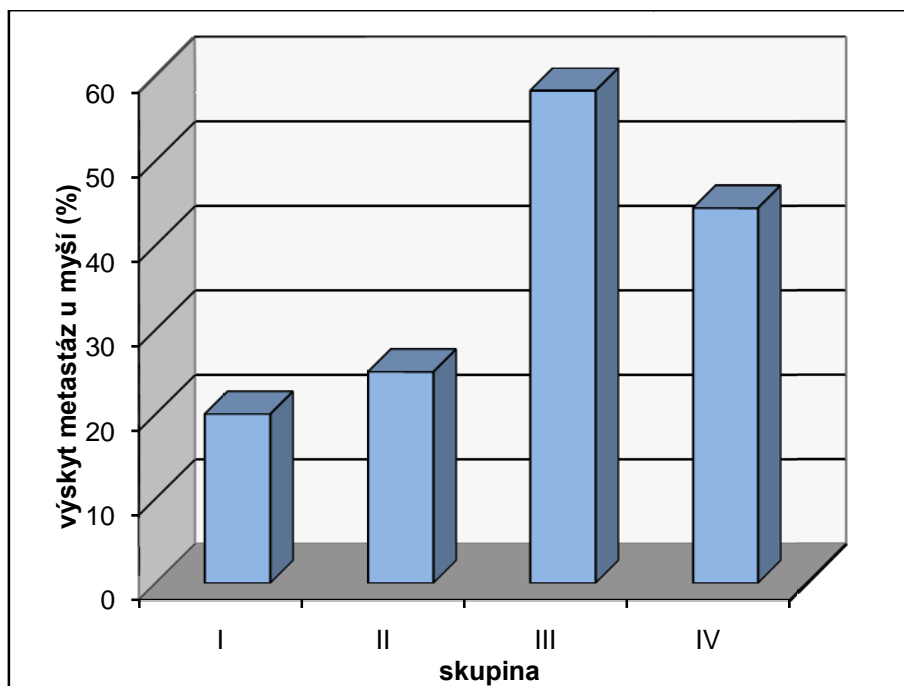
I – proenzymy, II- enzymy v ekvimolární koncentraci s proenzymy, III- enzymy o desetinné koncentraci ve srovnání s proenzymy, IV- kontrola.

4.1.2. Vliv terapie na výskyt metastáz

Dalším důležitým sledovaným prvkem byl vliv terapií v různých skupinách na uchycení a vznik metastáz na plicích.

Plice byly prohlédnuty u každé pitvané myši. U myši, kde se na plicích prokázal výskyt metastáz, byla jednotlivá ložiska spočítána. Ze získaných hodnot byl nejprve vypočítán výskyt metastáz na plicích u myši v jednotlivých skupinách v procentech (obr. 4.3.).

Největší počet myši, u kterých se metastázy objevily, byl zaznamenán ve skupině III, kde se projeví u 58,3% z celkového počtu nádorových myši. Nejmenší výskyt byl zjištěn u skupiny I (skupina léčená proenzymoterapií), kde byl výskyt metastáz jen u 20% myši.

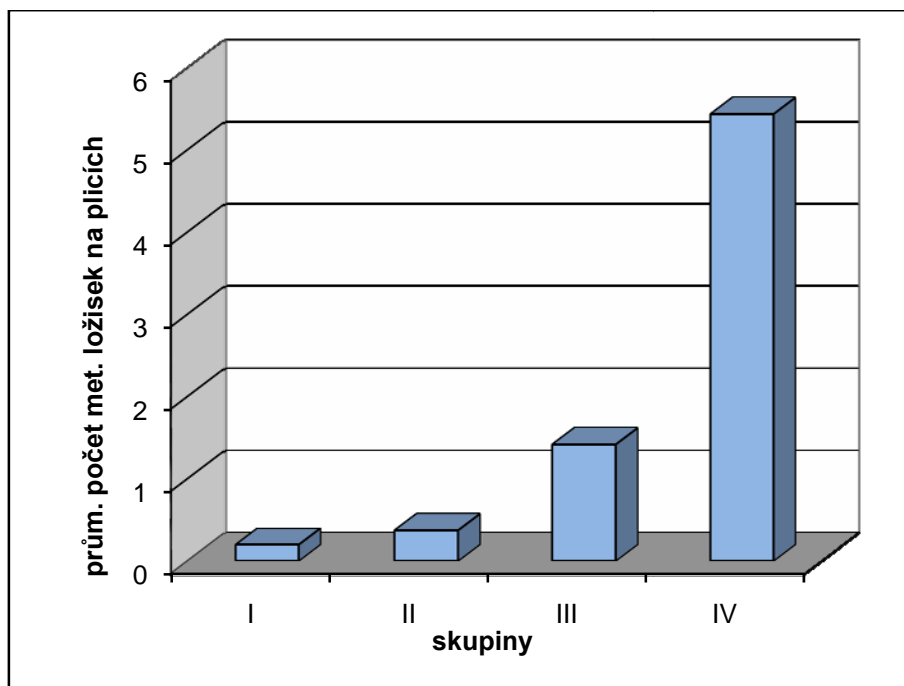


Obr. 4.3. Procentuální výskyt metastáz u myši v jednotlivých skupinách. I – proenzymy, II- enzymy v ekvimolární koncentraci s proenzymy, III- enzymy o desetkové koncentraci ve srovnání s proenzymy, IV- kontrola.

Jak již bylo zmíněno, jednotlivá zaznamenaná ložiska na plicích byla spočítána. Z těchto hodnot byl vypočítán průměrný počet metastázových ložisek na myš v jednotlivých skupinách (obr. 4.4.).

Největší počet ložisek byl zjištěn ve skupině číslo IV, kde jejich průměrný počet byl 5,44 ložisek na myš. Nejmenší výskyt byl zaznamenán u skupiny číslo I, kde byl tento počet 0,2 ložisek na myš.

Celkově tedy lze konstatovat, že největší výskyt metastáz se prokázal u myši ve skupině III, ale zároveň proces metastazování dosahoval největší intenzity ve skupině IV. Nejúčinnější ochranu proti metastazování poskytla proenzymoterapie (skupina I).



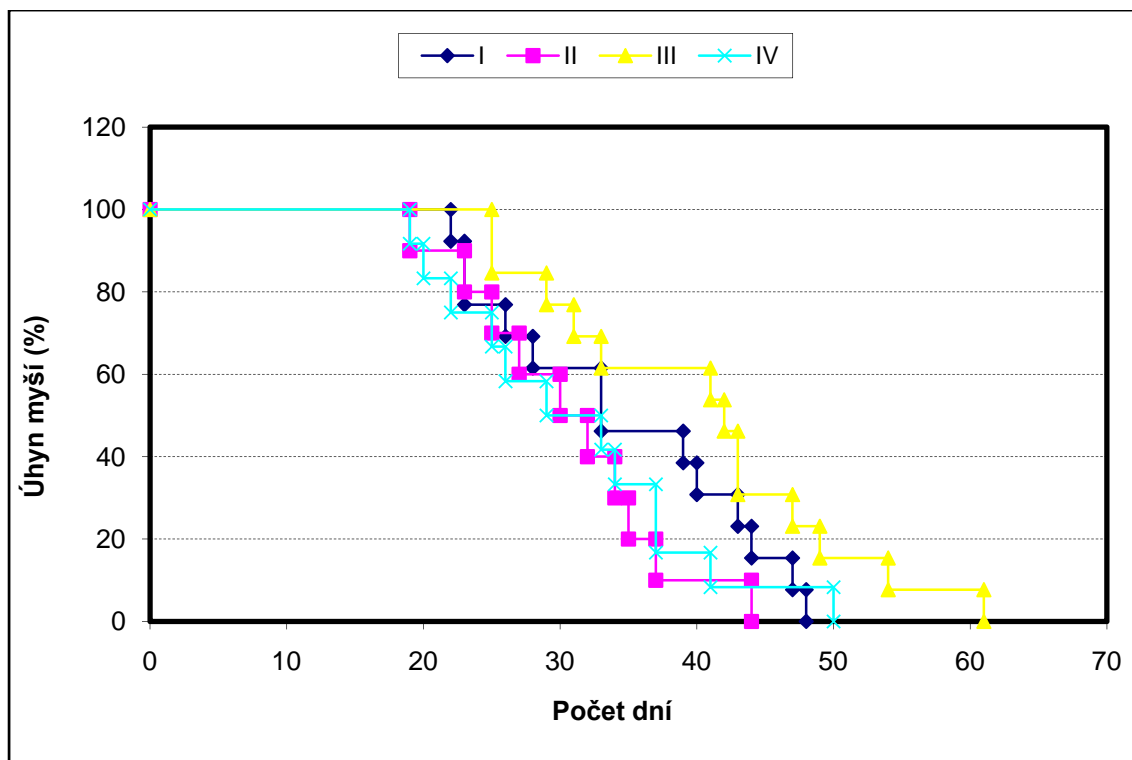
Obr. 4.4. Průměrný počet metastázových ložisek na plicích myší v jednotlivých skupinách. I – proenzymy, II- enzymy v ekvimolární koncentraci s proenzymy, III- enzymy o desetinné koncentraci ve srovnání s proenzymy, IV- kontrola.

4.1.3. Vliv terapie na dobu přežití myší

Úhyn myší během pokusu patřil mezi další sledované parametry. Celkový počet myší byl pře počítán na procenta a zaznamenán do grafu proti počtu přežitých dnů (obr. 4.5.).

Nejhůře dopadla skupina číslo II, kde byla aplikována enzymoterapie. Nejdelší přežití myší bylo pozorováno ve skupině číslo III, kde byly při terapii aplikovány enzymy se sníženou (desetinovou) koncentrací. Rozdíl vůči kontrolní skupině nebyl však statisticky signifikantní ani u této skupiny, ani u skupiny s proenzymy (I), kde byl také pozorován trend delšího přežívání.

Statistické významnosti ($P=0,058$) se přiblížil rozdíl mezi skupinou III a II, tedy mezi vysokou a nízkou dávkou enzymů, který svědčí o nutnosti přesného dávkování a optimalizace dávek při enzymoterapii.



Obr. 4.5. Procentuální úhyn myši během pokusu. I – proenzymy, II- enzymy v ekvimolární koncentraci s proenzymy, III- enzymy o desetinné koncentraci ve srovnání s proenzymy, IV- kontrola

4.1.4. Vliv terapie na vypadávání hmatových chlupů (*pili tactiles*)

Během pokusu byl pozorován zvláštní jev, který byl zaznamenán i u druhého pokusu. U myši ve skupině II bylo zaznamenáno vypadávání hmatových chlupů u myši.

Množství hmatových chlupů bylo vyhodnoceno v procentech: u myši, které neměly žádné hmatové chlupy 0%, u myši které měly přibližně polovinu hmatových chlupů (velmi řídké a krátké, případně chlupy jen na jedné straně) 50%, a konečně myši, u kterých nebyla pozorována žádná ztráta hmatových chlupů 100% (obr. 4.6.).

Z pozorovaných hodnot bylo spočítáno průměrné množství *pili tactiles* u myši v jednotlivých skupinách. Hodnoty byly zaneseny do grafu (obr. 4.7.). Z grafu vyplývá, že u myši ze skupiny č. II byla významná ztráta hmatových chlupů, což může být spojeno s vlivem terapie.

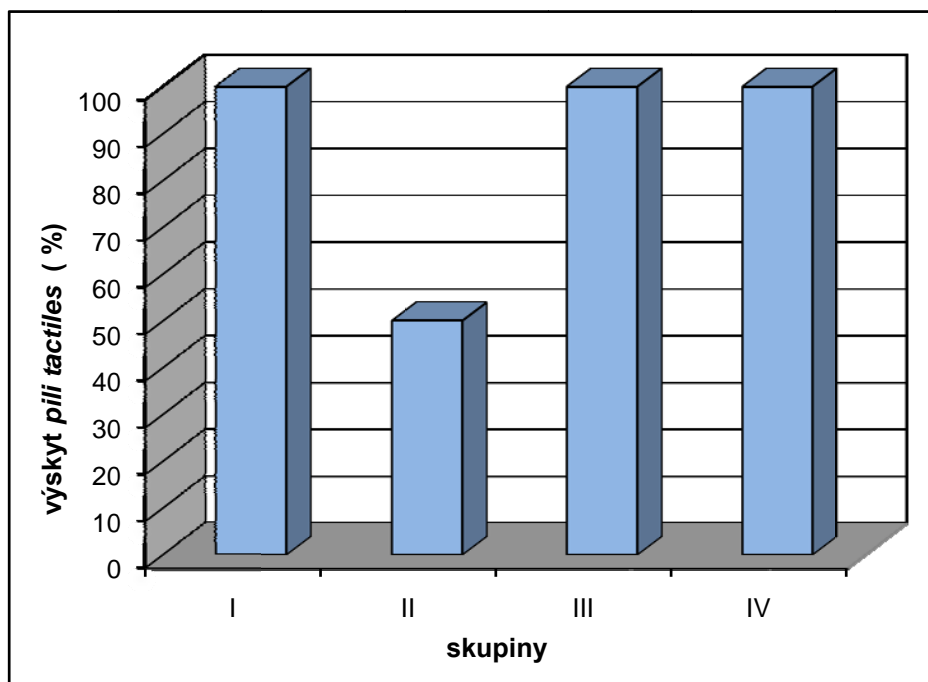
1



2



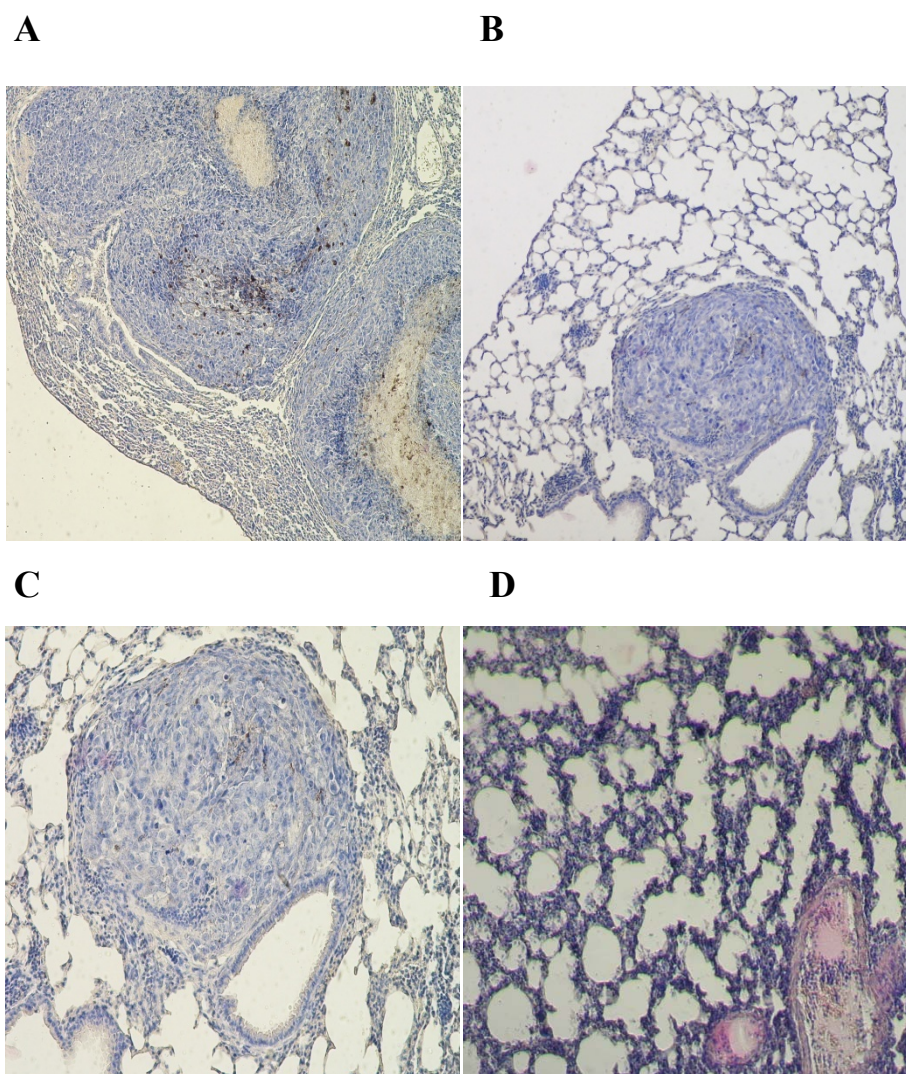
Obr. 4.6. Vliv terapie na ztrátu *pili tactiles*. Na obrázku 1 je myš, která má množství *pili tactiles* 50%, obrázek 2 zobrazuje 100% množství *pili tactiles* u myši



Obr. 4.7. Množství *pili tactiles* myši u jednotlivých skupin v procentech. I – proenzymy
 II- enzymy v ekvimolární koncentraci s proenzymy, III- enzymy o desetkové koncentraci ve
 srovnání s proenzymy, IV- kontrola.

4.1.5. HISTOLOGICKÉ POZOROVÁNÍ

Histologicky zpracovány byly orgány (plíce, slezina, ledviny, játra, srdce) z pitvaných myší. Hotové preparáty byly pozorovány pomocí mikroskopu Olympus BX51. Cílem pozorování bylo porovnat množství výskytu metastáz v jednotlivých orgánech. Největší množství metastáz bylo pozorováno na plicích (Obr. 4.8.). V ostatních orgánech se metastázová ložiska objevovala jen vzácně (pozorování před histologickým zpracováním pomocí binolupy), ale histologicky nebyl jejich výskyt potvrzen. Toto pozorování koresponduje s tím, že melanom B16-F10 je považován za plicní metastázový model



Obr. 4.8. Histologické preparáty. Na obrázku A a B jsou zobrazena metastázová ložiska na plicích při zvětšení 100x, na obrázku C je metastázové ložisko na plicích při zvětšení 200x a obrázek D zobrazuje čistou plicní tkáň při zvětšení 100x.

4.2. POKUS Č. 2

Ve všech vyhodnoceních, která byla provedena, bylo počítáno pouze s myšmi, u kterých se nádor (i během pokusu) uchytil. V tomto pokusu se nádor neuchytil u 21,8% ze všech myší, kterým byl nádor transplantován.

Výsledný počet myší, u kterých se nádor uchytil, a které byly zahrnuty do pokusu, byl tento: skupina I - 11 myší, skupina II - 11 myší, skupina III - 9 myší, skupina IV - 8 myší, skupina V - 10 myší a skupina VI - 12 myší.

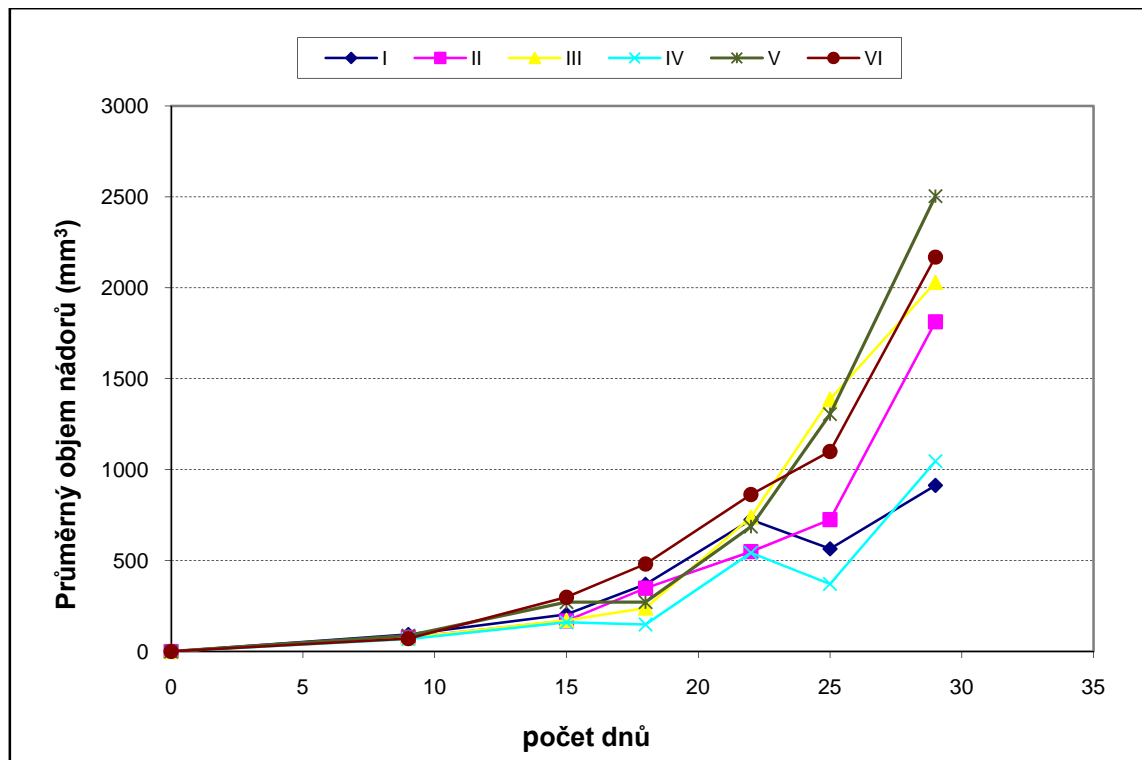
Množství myší v jednotlivých skupinách, u kterých se nádor neuchytil, bylo: skupina I - 2 myši, skupina II - 2 myši, skupina III - 4 myši, skupina IV - 5 myší, skupina V - 3 myši a skupina VI - 1 myš.

4.2.1. Vliv terapie na velikost nádoru

I u druhého pokusu byla jedním z hlavních sledovaných parametrů velikost nádoru u myší. Nádory byly měřeny dvakrát týdně do doby počátku většího úhynu myší. Z naměřených hodnot byly přes objemy nádorů u jednotlivých myší vypočítány průměrné velikosti nádoru ve skupině (celkový objem nádorů dělený počtem nádorů). Tyto hodnoty byly zaneseny do grafu (obr. 4.8.).

Z grafu je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo u skupiny I, kde byl podáván beta glukan, a u skupiny IV, kde byla aplikována proenzymoterapie (stejná koncentrace jako v pokusu č. 1, ale podávaná každý druhý den). Nejhuře se projevila skupina V, kde byly podávány enzymy (stejná koncentrace jako ve skupině III v pokusu č. 1, ale podávaná každý druhý den.).

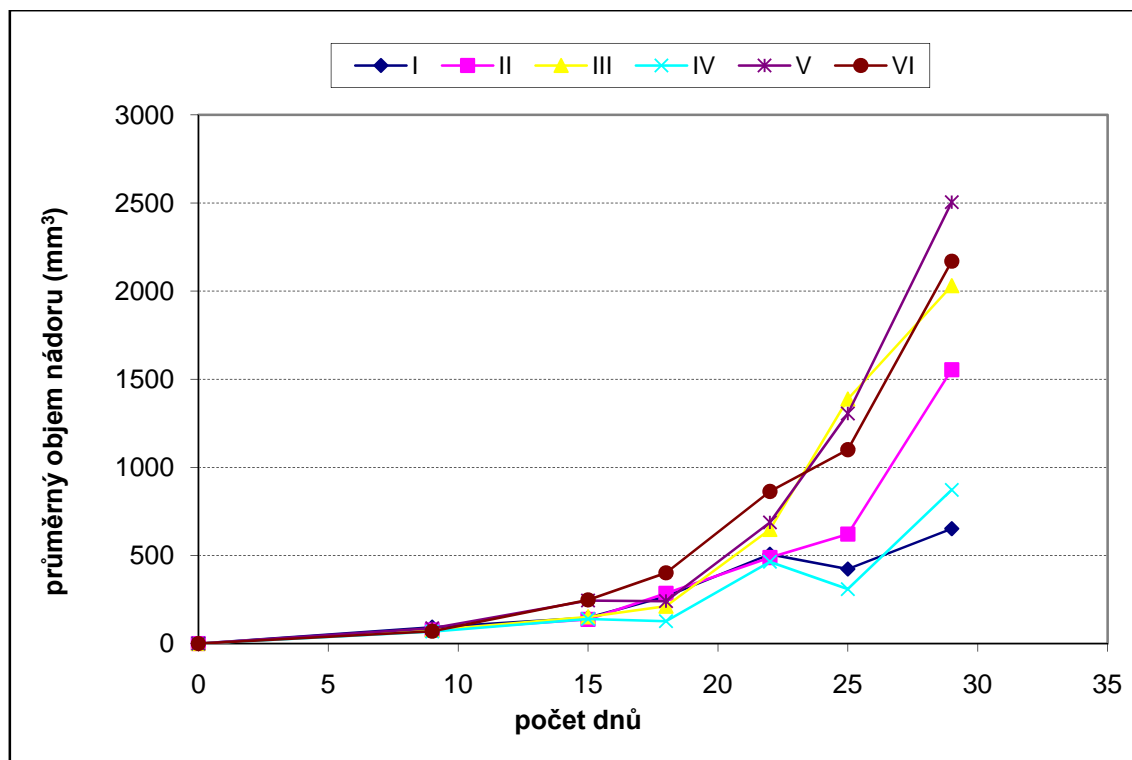
Osmnáctý den pokusu se rozdíl skupiny IV (proenzymy) vůči skupině VI (kontrolní) přiblížil statistické významnosti, ($P=0,06$).



Obr. 4.9. Průměrná velikost nádoru u jednotlivých skupin (vztaženo na myši, které měly v den měření nádor) během průběhu pokusu. I- beta glukan, II- beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie, III- proenzymoterapie + enzymoterapie, IV- proenzymoterapie, V- enzymoterapie, VI- kontrola.

Stejně jako v pokusu č. 1 bylo provedeno i druhé vyhodnocení, kdy se průměrná velikost nádorů v jednotlivých skupinách rozpočítala na všechny myši, u kterých se nádor i během pokusu rozvinul (obr. 4.9.). Ve skupinách I a IV byla znovu zaznamenána největší redukce nádorového růstu. Největší nárůst nádorů se projevil ve skupině V, kde byla aplikována nízká koncentrace enzymů, která se prokázala jako velmi nedostatečná. V počátku pokusu byl nejmenší růst nádorů zjištěn u proenzymů (skupina IV).

Rozdíl velikostí nádorů ve skupinách IV a VI byl 25. den pokusu statisticky významný, ($P \leq 0,05$).



Obr. 4.10. Průměrná velikost nádoru vztažena na všechny myši v jednotlivých skupinách. I- beta glukán, II- beta glukán + proenzymoterapie + enzymoterapie, III- proenzymoterapie + enzymoterapie, IV- proenzymoterapie, V- enzymoterapie, VI- kontrola.

Důležitým kritériem pro posouzení účinnosti terapie je redukce objemu nádorů vzhledem ke kontrole. Tato účinnost byla sledována v období 15. – 29. dne experimentu a opět dopadla nejlépe ve skupině IV (proenzymy) – 42,1%. To je dokonce více, než bylo zjištěno v prvním experimentu (45,2%) a to i přes to, (nebo právě proto?), že terapeutické dávky proenzymů byly ve druhém experimentu podávány každý druhý den.

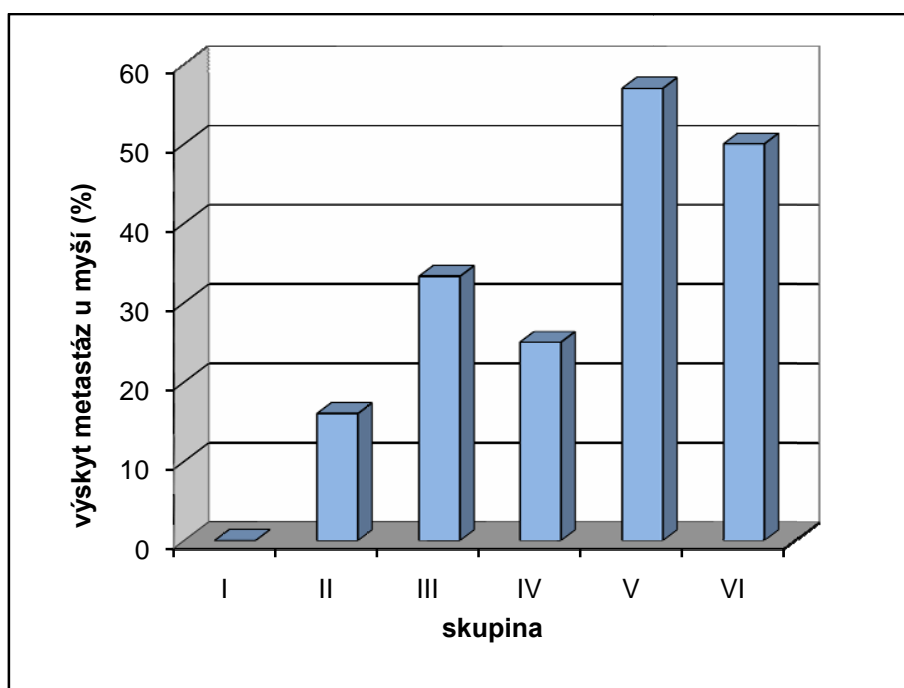
Na rozdíl od tohoto zjištění, podávání enzymů, které v koncentraci rovnající se desetíně proenzymů bylo v minulém experimentu alespoň z hlediska redukce nádorového růstu úspěšné, nesneslo již další snížení a při podávání každý druhý den a nevykázalo žádnou redukci nádorového růstu.

Beta glukán (skupina I) snížil proti kontrole nádorový růst průměrně na 50,1%.

4.2.2. Vliv terapie na výskyt metastáz

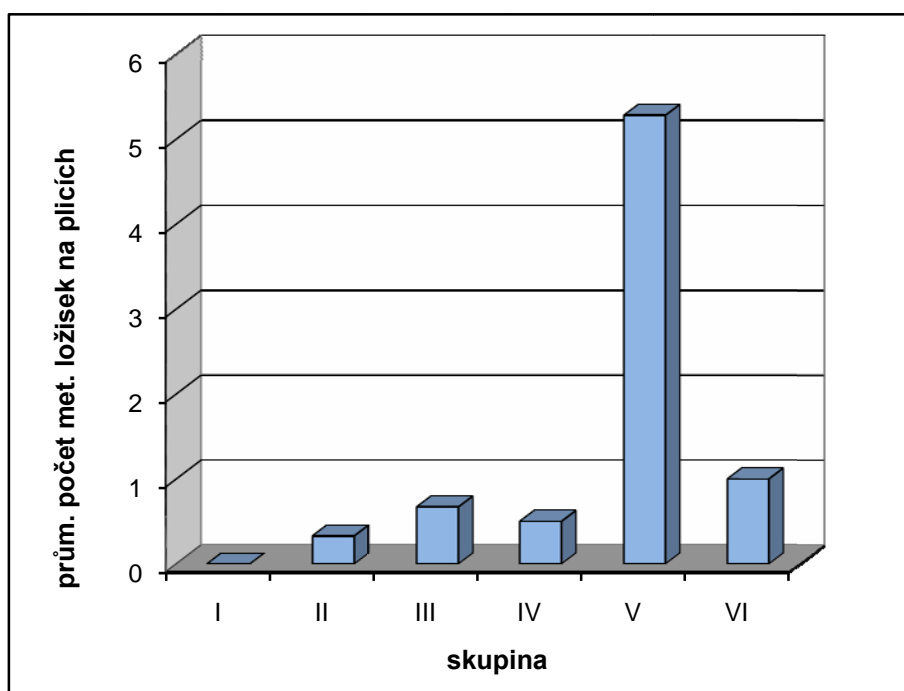
Důležitým sledovaným faktorem byl i v druhém pokusu vliv terapií v různých skupinách na uchycení a vznik metastázových ložisek na plicích. U každé pitvané myši byly plíce prohlédnuty pomocí binolupy. U plic, kde byla zpozorována metastázová ložiska, bylo spočítáno a zaznamenáno jejich množství. Z pozorovaných výsledků se vypočítalo množství myší s plicními metastázami v jednotlivých skupinách v procentech (Obr. 4.10.).

Ve výskytu myší s metastázami na plicích nejlépe dopadly skupina I (beta glukan), kde nebylo nalezeno žádné metastázové ložisko, a skupina II (kombinovaná terapie, beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie), kde byl výskyt metastáz prokázán u 16% prohlížených myší. Následovala skupina IV (proenzymoterapie) s 25% výskytem metastáz. Nejhorší výsledky byly dosaženy u skupiny V (enzymoterapie), zde byla metastázová ložiska nalezena u 57% prohlížených myší, a u skupiny VI (kontrolní), kde se výskyt metastáz prokázal u 50% myší.



Obr. 4.11. Výskyt metastázových ložisek na plicích u jednotlivých skupin v procentech. I- beta glukan, II- beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie, III- proenzymoterapie + enzymoterapie, IV- proenzymoterapie, V- enzymoterapie, VI- kontrola.

Jednotlivá zaznamenaná metastázová ložiska na plicích byla spočítána. Z těchto hodnot byl vypočítán průměrný počet metastázových ložisek na všechny myši (i s nádorem rozvinutým během pokusu) v jednotlivých skupinách. Hodnoty byly zaneseny do grafu (Obr. 4.11.). Nejlepší výsledky byly dosaženy u skupiny I, kde byl počet metastázových ložisek na myš nulový. Následovala opět skupina II a IV. Největší počet metastázových ložisek byl zjištěn u skupiny V, kde dosahoval hodnoty 5,28 ložisek na myš.

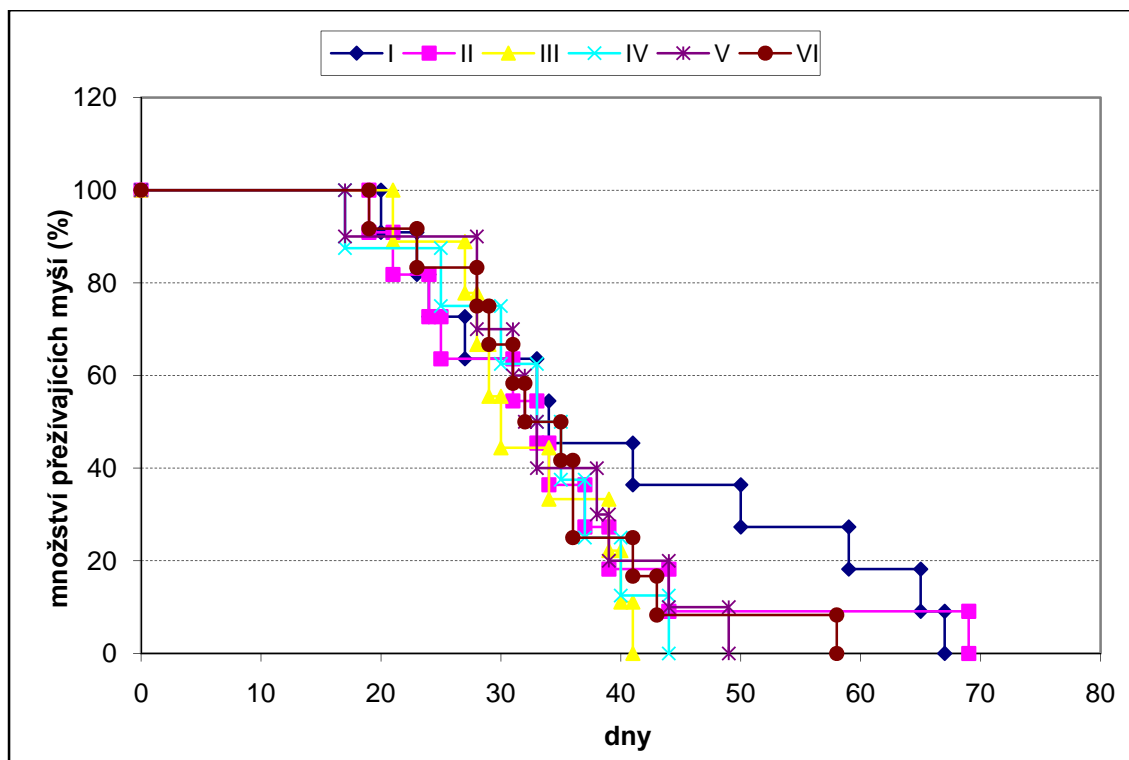


Obr. 4.12. Průměrný počet metastázových ložisek na plicích myši v jednotlivých skupinách. I- beta glukan, II- beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie, III- proenzymoterapie + enzymoterapie, IV- proenzymoterapie, V- enzymoterapie, VI- kontrola.

4.2.3. Vliv terapie na dobu přežití myší

Mezi důležité parametry, které bylo třeba sledovat, patřil i v druhém pokusu vliv terapie v jednotlivých skupinách na délku života myší. Jednotlivé počty myší ve skupinách byly převedeny na procenta (počáteční počet myší = 100%) a zaznamenány do grafu (obr. 4.12.).

Nejdéle přežívaly myši ze skupiny II (kombinovaná terapie, beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie) a skupiny I (beta glukan). Nejhůře dopadla skupina III, kde byla aplikována proenzymoterapie s enzymoterapií. Vyhodnocení pomocí programu Survival Analysis nenašlo žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

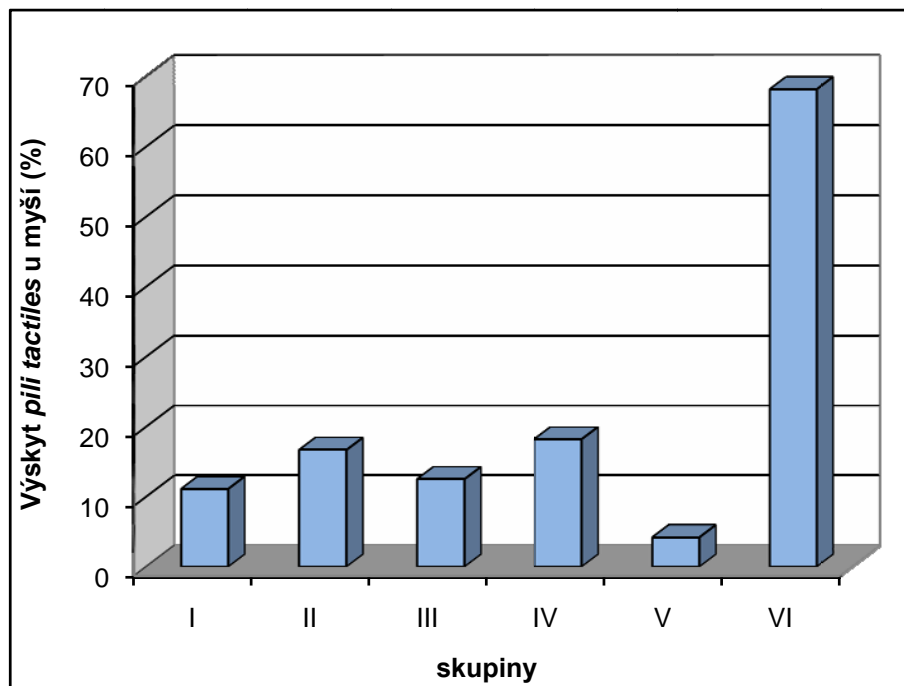


Obr. 4.13. Přežívání myši v jednotlivých skupinách během pokusu. I- beta glukan, II- beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie, III- proenzymoterapie + enzymoterapie, IV- proenzymoterapie, V- enzymoterapie, VI- kontrola.

4.2.4. Vliv terapie na vypadávání hmatových chlupů (*pili tactiles*)

Stejně jako u pokusu č.1 bylo i zde pozorováno vypadávání *pili tactiles* u myši. Množství hmatových chlupů bylo vyhodnoceno stejně jako v prvním pokuse v procentech: u myši, které neměly žádné hmatové chlupy 0%, u myši které měly přibližně polovinu hmatových chlupů (velmi řídké a krátké, případně chlupy jen na jedné straně) 50%, a konečně myši, u kterých nebyla pozorována žádná ztráta hmatových chlupů 100%. Naměřené hodnoty byly zaneseny do grafu (obr. 4.13.). Stav hmatových chlupů žádným způsobem nekoreloval s velikostí nádoru.

Z grafu je zřejmé, že hmatové chlupy byly nejvýrazněji ovlivněny u skupin, kde byla aplikována terapie. Rozdíl množství *pili tactiles* mezi skupinou VI (kontrolní) a všemi ostatními skupinami (I, II, III, IV i V) jednotlivě hodnocenými vyšel statisticky významný. U skupiny II proti skupině VI byla významnost $P \leq 0,05$, u rozdílu ostatních skupin vůči skupině VI byla významnost $P \leq 0,01$.



Obr. 4.14. Výskyt *pili tactiles* u myši v jednotlivých skupinách. I- beta glukan, II- beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie, III- proenzymoterapie + enzymoterapie, IV proenzymoterapie, V- enzymoterapie, VI- kontrola.

4.2.5. Výskyt nádorových nekrotéz

Během pokusu byl pozorován další jev, kdy došlo k nekrotizování nádorů. Jev byl pozorován u skupiny IV a V (obr. 4.14.). Nekrózy se v obou případech objevily ve stejný den = 25. den pokusu. Tento jev byl pozorován ojedinele, jen v případě těchto dvou myši.



Obr. 4.15. Výskyt nekrotéz u nádorů. Na obrázku A je myš ze skupiny číslo IV (proenzymoterapie), na obrázku B je myš ze skupiny číslo V (enzymoterapie).

5. DISKUSE

Oba experimenty provedené v této práci prokázaly výrazný vliv směsi proenzymů (trypsinogen + chymotrypsinogen) na redukci nádorového růstu a to jak při denní *i.m.* aplikaci, tak také při *i.m.* aplikaci směsi každý druhý den. Redukce nádorového růstu byla vyšší než 50%, což činí tento preparát zajímavým z hlediska dalšího výzkumu a terapeutického použití. Směs obsahovala též amylázu, která však působí jen podpůrně. Výsledky korespondují s poznatky o působení směsi proenzymů na redukci růstu sarkomu S-180 (Kaiserová, Ženka, *in prep.*).

Novák a Trnka, 2005 studovali *in vivo* směs trypsinogenu a amylázy, ale nezabývali se otázkou potlačení nádorového růstu. Určité srovnání je tedy možno provést pouze s prací Walda (Wald a spol., 2001), kde byla zaznamenána statisticky významná redukce růstu melanomů B16 a to 10. den po jejich transplantaci, poté ale byly nádory chirurgicky odstraněny. V jejich pokusu byla použita směs trypsinu, chymotrypsinu a papainu podávaná myším perrektálně dvakrát denně. Denní dávky enzymů byly 20x vyšší, než dávky proenzymů použitých v experimentech této práce.

Vliv směsi proenzymů na redukci výskytu a četnosti metastáz byl v našem pokusu rovněž výrazný a byl překonán pouze beta glukánem. Tento poznatek je ve shodě s prací Nováka a Trnky (Novák a Trnka, 2005), kde byl použit trypsinogen a amyláza, a pracemi Walda, ve kterých byl zkoumán Lewisův plicní karcinom (Wald a spol., 1998) a melanom B16 (Wald a spol., 2001), kde, jak bylo zmíněno, byla použita vysoká množství aktivních enzymů.

Vliv proenzymů na prodloužení přežívání nebyl zaznamenán. Toto pozorování je dáno především tím, že jsme nádor u myši ponechali po celý průběh pokusu. Ve všech pracích uvedených v předchozím odstavci byl nádor 10. - 12. den odstraněn. Díky tomu byly myši vystaveny působení pouze omezeného množství metastáz (uvolněné pouze do doby odstranění nádoru), což jim dávalo mnohem větší šanci na přežití a tím pádem proenzymové a enzymové preparáty opravdu přežití myši zvýšily. V našich experimentech byly myši vystaveny neustálému náporu metastáz a především velmi rychle rostoucím a velice agresivním nádorem, který dorůstal do 12 – 14 g hmotnosti a jeho prasknutí se stávalo hlavní příčinou úhynu myši.

Co se týče enzymů (směsi trypsinu a chymotrypsinu s podpůrnou amylázou) pokusy svědčí o velkém významu zvolené koncentrace. Jejich desetinná koncentrace ve srovnání

s proenzymy působila srovnatelně dobře na redukci nádorového růstu. Vyšší koncentrace (ekvimolární s proenzymy) nádorový růst nebrzdila vůbec, stejně jako aplikace poloviční dávky v druhém pokusu. V případě vysoké dávky lze uvažovat o vysycení omezeného množství α 2-makroglobulinu enzymy, v případě nízké dávky o vzniku nedostatečného množství komplexů α 2-makroglobulinu s proteázami, ale to je jen jedno z možných vysvětlení. Veliký význam dobře zvolené koncentrace se projevil i na době přežití v prvním pokusu. Celkově lze konstatovat, že jakékoliv podávání enzymů, kde není optimalizována dávka (nebo ji nelze zaručit), může být hazardování se zdravím pacienta. Obzvláště riskantní se z tohoto hlediska jeví perorální aplikace. Přestože jsou proteázy podávány zpravidla ve velkém množství a u lidí denní dávky dosahují dokonce gramových množství, někteří autoři se domnívají, že není vstřebáno nic (Gewert a spol., 2004), nebo jen malá frakce (0.002-0.0025%, Ziv a spol., 1987, 0,01 – 0,001 %, Šťastný a spol., 2002).

Vliv na metastázy u desetinové dávky enzymů a u stejné dávky podávané každý druhý den nebyl terapeutický, spíše naopak. Efekt byl zaznamenán pouze u dávky ekvimolární s proenzymy, ta ale nebrzdila růst nádorů a tím bylo zkráceno přežívání myši. Vysoké dávky enzymů (20-400x vyšší, než dávky používané v této práci) aplikované perrektálně myším (Wald a spol., 1998 a 2001) byly tedy použitelné jen za situace, kdy byl odoperován primární nádor. Na omezené množství metastáz bylo v jejich experimentu působeno pokud možno co nejdříve vysokými dávkami enzymů, zaručenými perrektální aplikací.

Jedním z cílů práce bylo porovnání účinku proenzymů a enzymů. Lze tedy shrnout, že proenzymy v širším koncentračním rozmezí mají dobrý vliv na redukci růstu nádorů a potlačování metastáz. Enzymy se v optimální koncentraci proenzymům při redukci nádorového růstu přibližují, působí spíše později a déle, včetně určitého trendu prodloužit přežívání. Na metastázy působí pouze vyšší koncentrace, které však nelze použít v přítomnosti primárního nádoru.

Úkolem druhého pokusu bylo zjistit, jaké jsou možnosti synergie jednotlivých způsobů terapie. Cíl byl nejen bezprostředně praktický, a to nalezení nejúčinnější terapie, ale i teoretický, úvaha o mechanismech účinku. Lze konstatovat, že kombinování proenzymoterapie s enzymoterapií, případně ještě s beta glukanem nezpůsobilo nejen synergický, ale ani aditivní efekt, přestože k tomu byly vytvořeny vhodné předpoklady (spojování polovičních dávek nemohlo vést k předávkování). Z toho je možno odvodit, že mechanismy působení proenzymů a enzymů nemohou být identické. Kdyby byly identické a proenzymy se pouze přeměňovaly na enzymy, muselo by docházet k aditivitě. Zdá se, že

příslušný systém (imunitní odpověď) je jednou terapií ovlivněn tak, že není vnímavý ke druhé, je tomu tak alespoň v reálném čase. Možnost postupného působení různých terapií je třeba prostudovat.

Stejně tak bude třeba optimalizovat podávání beta glukanu, který vykázal dobrý efekt při inhibici metastazování. Původní záměr vycházel z toho, že tato látka stimuluje zejména makrofágy a NK buňky. Vzhledem k tomu, že jedním z efektů nádory produkovaného TGF- β je inhibice makrofágů a NK buněk, domnívali jsme se, že když (pro)enzymoterapie potlačí vliv TGF- β , bude možné neinhibované makrofágy a NK buňky beta glukaniem aktivovat a tím zajistit vzájemnou koordinovanost obou terapií, která vyústí v aditivitu či synergii. Situace se ale zdá být složitější. Otázku synergie (či aditivity) beta glukanu a (pro)enzymoterapie v oblasti působení na metastazování (jeho potlačení) je třeba ještě podrobněji prostudovat. V této práci byl zjištěn silný antimetastázový účinek samotného beta glukanu. Obdobný vysoký účinek (76-80% inhibice) byl zaznamenán na modelu Lewisova plicního karcinomu (Větvicka a spol., 2007), za použití beta glukanu z odlišného zdroje (*Laminaria digitata*). V jiném experimentu studujícím metastazování B16-F10 (metastázový model byl podpořen aplikací nádorových buněk přímo do ocasní žíly), kde byl také použit beta glukán z jiného zdroje (*Aureobasidium sp.*), bylo dosaženo 36% inhibice metastáz (Moon a spol., 2005).

Pozorované vypadávání hmatových chlupů korelovalo s terapií, nikoli však s velikostí nádorů. Obdobný jev byl pozorován i u proenzymoterapie sarkomu S-180 (Kaiserová, Ženka, *in prep.*). Domníváme se, že tento úkaz by mohl být nejen vedlejším efektem, ale mohl by přispět k objasnění mechanismů působení terapie. To však bude vyžadovat systematické studium tohoto jevu, naše práce zaměřená jiným směrem na něj pouze upozorňuje.

Úkolem další práce bude přiblížit se co nejvíce k pochopení mechanismu působení enzymů/proenzymů, aby bylo možno dále optimalizovat jejich působení případně navrhnout účinné možnosti kombinace s jinými způsoby terapie.

6. SOUHRN

- Byl zjištěn výrazný inhibiční účinek *i.m.* podávané směsi proenzymů (trypsinogen + chymotrypsinogen) na růst transplantovaného melanomu B16-F10 u myši. Tato směs rovněž výrazně potlačovala výskyt a intenzitu metastáz.
- Byl zjištěn veliký význam optimální dávky aktivních enzymů (trypsin, chymotrypsin) při brzdění růstu melanomu B16-F10. Zcela jiné koncentrace pak byly nutné pro potlačení rozvoje metastáz.
- Bylo zjištěno, že kombinace proenzymoterapie a enzymoterapie není ani synergní a ani aditivní, což ukazuje na rozdíly v mechanismu jejich působení.
- Byl zjištěn výrazný protimetastázový účinek beta-glukanu.
- Prodloužení doby přežití u myši, kde byla terapie aplikována, nedosáhlo statistické významnosti. Myši hynuly vlivem velmi agresivního transplantovaného primárního nádoru, který nebyl chirurgicky odstraněn a tudíž pozitivní změny, jako je redukce počtu metastáz, neměly prostor k uplatnění.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe Y., Miyake M., Osuka Y., Kimura S., Granger A., Gatanaga T. 1992:** Transforming growth factor-beta 1 down-regulates expression of membráně-associated lymphotoxin by human lymphokine-activated killer T cells *in vitro*. *Lymphokine Cytokine* 11: 245-251.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998:** *Základy buněčné biologie*, nakl. Espero Publishing, s. r. o.: 587-589.
- Allgayer H., Babic R., Grutzner K. U. 1998:** Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis* 16: 62-73.
- Asplin I. R., Wu S. M., Mathew S., Bhattacharjee G., Pizzo S. V. 2001:** Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by alpha(2)-macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2-induced angiogenesis. *Blood* 97 (11): 3450-3457.
- Beard J. 1902:** Embryological aspects and etiology of carcinoma. *Lancet* 21: 1758-1761.
- Beard J. 1903:** The embryology of tumours. *Anat Anz* 23: 486-494.
- Beard J. 1905:** The cancer problem. *Lancet* 4: 281-283.
- Beard J. 1907a:** The interlude of cancer. *Medical Record* 2: 169-175.
- Beard J. 1907b:** The scientific criterion of a malignant tumor. *Medical Record* 5: 24-25.
- Beard J. 1911:** *The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis*. London, Chatto and Windus.
- Bhattacharjee G., Asplin I. R., Wu S. M., Gawdi G., Pizzo S. V. 2000:** The conformation-dependent interaction of alpha 2-macroglobulin with vascular endothelial growth factor. A novel mechanism of alpha 2-macroglobulin/growth factor binding. *J Biol Chem*. 275: 26806-26811.
- Birkenmeier G., Kampfer I., Kratzsch J., Schellenberger W. 1998:** Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognized by the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *Eur J Endocrinol* 139: 224-230.
- Blanchette F., Day R., Dong W., Laprise M. H., Dubois C. M. 1997:** TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* 99: 1974-1983.
- Bohm S. K., McConlogue K., Kong W., Bunnett N. W. 1998:** Proteinase-activated receptors: New function for old enzymes. *News Physiol Sci* 13: 231-240.
- Borgstorm A., Erlanson-Albertsson C., Borgstorm B. 1993:** Human pancreatic proenzymes are activated at different rates *in vitro*. *Scand J Gastroenterol* 28: 455-459.
- Borth W., Luger T. A. 1989:** Identification of alpha 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 beta to "F" alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem*. 264: 5818-5825.

Brown R. D., Pope B., Murray A. 2001: Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Blood* 98: 2992–2998.

Carlson J. A., Rogers B. B., Sifers R. N., Hawkins H. K., Finegold M. J., Woo S. L. 1988: Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest* 82: 26-36.

Crookston K. P., Webb D. J., Wolf B. B., Gonias S. L. 1994: Classification of alpha-2-makroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J Biol Chem* 269: 1533-1540.

Dresser L., Holomanova D., Zavadova E., Pavelka K., Mohr T., Herbacek I. 2001: Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 10-15.

Feige J. J., Negoescu M., Keramidas M., Souchelnitskiy S. a Chambaz E. M. 1996: Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor – beta and variol cytokines. *J Biol Chem* 45: 885-889.

Finke J. H., Bukowski R. M. 2004: Cancer immunotherapy at the crossroads how tumors evade immunity and what can be done.

Garber T. R., Gonias S. L., Webb D. J. 2000: IL-4 and IL-10 bind covalently to activated human alpha 2-macroglobulin by a mechanism that requires Cys949. *J Interferon Cytokine* 20: 125-131.

Gavish H., Bab I., Tartakovsky A., Chorev M., Mansur N., Greenberg Z., Nandar Attar M., Muhlrad A. 1997: Human alpha 2-macroglobulin is an osteogenic growth peptide-binding protein. *Biochemistry* 36: 14883-14888.

Gebauer F., Micheel B., Stauder G., Ransberger K., Kunze R. 1997: Proteolytic enzymes modulate the adhesion molecule CD44 on malignant cells in vitro. *Int J Immunother* 13: 111.

Gettins P. G., Crews B. C. 1993: Epidermal growth factor binding to human alpha 2-macroglobulin. Implications for alpha 2-macroglobulin-growth factor interactions. *Biochemistry* 32: 7916-7921.

Gewert K., Holowachuk S. A., Rippe C., Gregory P. C., Erlanson-Albertson C., Olicecrona G., Kruszewska D., Piedra J. V., Westrom B., Pierzynowski S. G. 2004: The enzyme preparation (Creon 10,000) in pankreas-insufficient pigs. *Pancreas* 28: 80-88.

Gonias S. L., Carmichael A., Mettenburg J. M., Roadcap D. W., Irvin W. P., Webb D. J. 2000: Identical or overlapping sequences in the primary structure of human alpha(2)microglobulin are responsible for the binding of nerve growth factor-beta, platelet-derived growth factor-BB, and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 275: 5826-5831.

- Gouin-Charnet A., Laune D., Granier C., Mani J. C., Pau B., Mourad G., Argiles A. 2000:** Alpha2-macroglobulin, the main serum antiprotease, binds beta2-microglobulin, the light chain of the class I major histocompatibility complex, which is involved in human disease. *Clin Sci Colch* 98: 427-433.
- Inaba M., Tazuko T., Fujimoto S., Sakurai M. K., Ohnishi Y., Ueyama Y., Nomura T. 1986:** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn J Cancer Res* 77: 190-196.
- James K. 1990:** Interactions between cytokines and alpha 2-macroglobulin. *Immunol Today* 11: 163-165.
- James K., van-den-Haan J., Lens S., Farmer K. 1992:** Preliminary studies on the interaction of TNF alpha and IFN gamma with alpha 2-macroglobulin. *Immunol Lett.* 32: 49-57.
- Kawser C. A., Iredale J. P., Winwood P. J., Arthur M. J. 1998:** Rat hepatic stellate cell expression of alpha 2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodeling in hepatic fibrosis. *Clin Sci Colch* 95: 179-186.
- Kim J., Modlin R. L., Moy R. L. 1995:** IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas: A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 155: 2240–2247.
- Kobayashi H., Mubuhiko N., Sugimura M., Shinohara H., Ohi H., Terao T. 1993:** Effect of membrane-associated cathepsin B on their activation of receptor-bound pro-urokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes. *Biochem Biophys Acta* 1178: 55-62.
- Kratzsch J., Selisko T., Birkenmeier G. 1996:** Transformed alpha 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein. *Acta Paediatr Suppl.* 417: 108-110.
- Kucia M., Reza R., Campbell F. R. 2006:** A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺ SSEA-1⁺ Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20: 857-869.
- Kurdowska A., Carr F. K., Stevens M. D., Baughman R. P., Martin T. R. 1997:** Studies on the interaction of IL-8 with human plasma alpha 2-macroglobulin: evidence for the presence of IL-8 complexed to alpha 2-macroglobulin in lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *J Immunol.* 158: 1930-1940
- Liebl D. J., Koo P. H. 1993:** Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 193: 1255-61.
- Maeda H., Shiraishi A. 1996:** TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 156: 73–78.

- Mansell P. W. A., Rowden G., Hammer C. 1978:** Clinical experiences with the use of glucan. Chirigos MA, ed.; Immune Modulation and Control of Neoplasia by Adjuvant Therapy. Raven Press: 255-280.
- Matsuda T., Hirano T., Nagasawa S., Kishimoto T. 1989:** Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J Immunol* 142: 148-152.
- McHugh R. S., Shevach E. M. 2002:** The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110: 693–702.
- Miyata S., Koshikawa N., Higashi S. 1999:** Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture. *J Biochem* 125: 1067-1076.
- Moon S. H., Heo J. Ch., Fine R. L., Kim H. M., Kim, S. U., Yoon B. D., Lee S. H. 2005:** BRD-glucan exhibits potent immunochemotherapeutic activity *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol* 26: 395-404.
- Moreau P., Adrian-Cabestre F., Menier C. 1999:** IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11: 803–811.
- Nakumara K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. 2001:** Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci* 70: 791-798.
- Niemuller C. A., Randall K. J., Webb D. J., Gonias S. L., LaMarre J. 1995:** Alpha 2-macroglobulin conformation determines binding affinity for activin A and plasma clearance macroglobulin complex. *Endocrinology* 136: 5343-5349.
- Novak J. F., Trnka F. 2005:** Proenzyme Therapy of Cancer (Preliminary report dedicated to the Memory of John Beard (1857-1924). *Anticancer Res* 25: 1157-1178.
- Nyberg P., Moilanen M., Paju A. 2002:** MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances *in vivo* invasion of human tongue carcinoma cells. *J Dent Res* 81: 831-835.
- Nyberg P., Ylipalosaari M., Sorsa T., Salo T. 2006:** Trypsin and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312: 1219-1228.
- Panyutich A., Ganz T. 1991:** Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5: 101-106.
- Paradis V., Ferlicot S., Ghannam E., Zeimoura L., Blanchet P., Eschwege P., Jardin A., Benoit G., Bedossa P. 1999:** CD44 is an independent prognostic factor in conventional renal cell carcinomas. *J Urol* 161: 1984.
- Pawelec G. 1999:** Tumor escape from the immune response: the last hurdle for successful immunotherapy of cancer? *Cancer Immunol Immunother* 48: 343-345.
- Sayegh R., Awwad J. T., Maxwell C., Lessey B., Isaacson K. 1995:** Alpha 2-macroglobulin production by the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1021-1026.

- da Silva G. C., Teixeira N., Bell S. C. 1996:** Major secretory product of the mesometrial decidua in the rat, a variant of alpha-2-macroglobulin, binds insulin-like growth factor I via a protease- dependent mechanism. *Mol Reprod Dev* 44: 103-110.
- Shurin M. R., Yurkovetsky Z. R., Tourkova I. L., Balkir L., Shurin G. V. 2002:** Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer* 101: 61–68.
- Šťastný F., Pliss L., Höschl C. 2002:** Interakce mezi protézami a hematoencefalickou bariérou: možné důsledky pro klinickou praxi. *Psychiatrie* 6: 230-241.
- Terrazzano G., Romano M. F., Turco M. C., Salzano S., Ottaiano A., Venuta S. 2000:** HLA class I antigen downregulation by interleukin (IL)-10 is predominantly governed by NK-kappaB in the short term and by TAP1+2 in the long term. *Tissue Antigens* 55: 326–332.
- Topping M., Seilman S. 1979:** A four-line model for the proteinase-binding characteristic of human blood serum. *Biochem J* 177: 493-499.
- Trnka F., Rybak M., Marek R., Vavra L. 1999:** Pharmaceutical composition containing an isolated protease proenzyme, amylase, and aprotinin. United States Patent # 5, 858, 357.
- Uchima Y., Sawada T., Nishihara T. 2003:** Identification of a trypsinogen activity stimulating factor produced by pancreatic cancer cells: Its role in tumor invasion and metastasis. *Int J Mol Med* 12: 871-878.
- Vetvicka V., Dvorak B., Vetvickova J., Richter J., Krizan J., Sima P., Yvin J. C. 2007:** Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *Int J Biol Macromol* 40: 291-298.
- Vetvicka V., Vetvickova J. 2007:** An Evaluation of the Immunological Activities of Commercially Available β1, 3-Glucans. *Jana* 10: 25-31.
- Wald M., Olejar T., Pouckova P., Zadinova M. 1998:** Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C₅₇Bl₆ mice with Lewis lung carcinoma. *Life Sci* 63: 237-243.
- Wald M., Olejar T., Sebkova V., Zadinova M., Boubelik M., Pouckova P. 2001:** Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C₅₇Bl₆ mice with syngenic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 12-22.
- Weller M., Fontana A. 1995:** The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis and the immune privilege of the brain. *Brain Res Rev* 21: 128–151.
- Yang Y., Dukhanina O., Tang B. 2002:** Lifetime exposure to a soluble TGF-β antagonist protects mice against metastatic without adverse side effects. *J Clin Invest* 109: 1607-1615.
- Ziv E., Lior O., Kidron M. 1987:** Absorption of protein *via* the intestinal wall. A quantitative model. *Biochem Pharmacol* 36: 1035-1039.