

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



PROENZYMOVÁ TERAPIE SARKOMU S-180

Bakalářská práce

Pavλίna Kaiserová

Vedoucí práce: RNDr. Jan ŽENKA, CSc.

České Budějovice, 2008

KAISEROVÁ P., 2008: PROENZYMOVÁ TERAPIE SARKOMU S-180 [THE PROENZYME THERAPY OF SARCOMA S-180, Bc. THESIS, IN CZECH] - P., FACULTY OF NATURAL SCIENCES, THE UNIVERSITY OF SOUTH BOHEMIA, ČESKÉ BUDĚJOVICE, CZECH REPUBLIC.

Annotation: Aim of this study was to find out the influence of proenzyme therapy on the growth of sarcoma S-180 and survival time, her optimization and finding the mechanism.

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 fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2008

.....

Pavλίna Kaiserová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení práce, cenné rady a trpělivost, kolektivům laboratoře Imunologie parazitóz a Laboratoře oportunních parazitů za pomoc při realizaci pokusů, přínosné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zejména bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc., RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD a Bc. Veronice Slavíkové, RNDr. Bohumilu Sakovi, PhD a RNDr. Daně Květoňové. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat prof. MVDr. Ivě Dykové, DrSc. a paní Marii Fučíkové za pomoc při zpracování histologického materiálu a jeho diagnostice a kolektivu laboratoře STAFILA za pomoc při analýze hematologických parametrů. A nakonec své rodině za podporu při studiích.

OBSAH:

OBSAH:	4
1. ÚVOD	6
1.1 RAKOVINA	6
1.1.1 STO ONEMOCNĚNÍ	6
1.1.2 SARKOM A JEHO VLASTNOSTI	7
1.2 TERAPIE MALIGNÍCH ONEMOCNĚNÍ ZALOŽENÉ NA POUŽITÍ PROTEÁZ	7
1.2.1 SYSTÉMOVÁ ENZYMOTERAPIE	7
1.2.2 PROENZYMOVÁ TERAPIE	9
1.2.2.1 JOHN BEARD A JEHO NÁSLEDOVNÍCI	9
1.3 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE	10
1.3.1 ČINITELÉ PROTINÁDOROVÉ IMUNITY	10
1.3.1.1 T-LYMFOCYTY	10
1.3.1.2 NK BUŇKY	10
1.3.1.3 MAKROFÁGY	10
1.3.2 TH1/TH2 ROVNOVÁHA	11
1.3.3 OBRANA NÁDORŮ PŘED IMUNITNÍ ODPOVĚDÍ	11
2. CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODY	13
3.1 PRVNÍ EXPERIMENT	13
3.1.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A BUNĚČNÉ LINIE	13
3.1.2 CHEMIKÁLIE	13
3.1.3 SCHÉMA POKUSU	13
3.1.3.1 HISTOLOGIE	14
3.2 DRUHÝ EXPERIMENT	14
3.2.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A BUNĚČNÉ LINIE	14
3.2.2 CHEMIKÁLIE	14
3.2.3 SCHÉMA POKUSU	15
3.3 TŘETÍ EXPERIMENT	16
3.3.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A BUNĚČNÉ LINIE	16
3.3.2 CHEMIKÁLIE	16

3.3.3	SCHÉMA POKUSU	16
3.3.3.1	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	16
3.3.3.2	BLASTICKÁ TRANSFORMACE	17
3.3.3.3	KREVŇÍ OBRAZ.....	17
3.3.3.4	ELISA TEST	17
3.3.3.5	HISTOLOGIE	19
3.4	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	19
4.	VÝSLEDKY.....	20
4.1	PRVNÍ EXPERIMENT	20
4.1.1	PŘEŽITÍ.....	20
4.1.2	OBJEMY NÁDORŮ	20
4.1.3	SKUTEČNOSTI ZJIŠTĚNÉ PITVOU	21
4.1.4	HISTOLOGIE	22
4.1.5	PILI TACTILES	24
4.2	DRUHÝ EXPERIMENT	25
4.3	TŘETÍ EXPERIMENT	27
4.3.1	OBJEM NÁDORŮ	27
4.3.2	SKUTEČNOSTI ZJIŠTĚNÉ PITVOU	27
4.3.3	PILI TACTILES	28
4.3.4	KREVŇÍ OBRAZ.....	29
4.3.5	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	32
4.3.6	BLASTICKÁ TRANSFORMACE	34
4.3.7	ELISA TEST	35
4.3.8	HISTOLOGIE	35
4.3.9	DALŠÍ ZJIŠTĚNÍ.....	37
5.	DISKUSE	38
6.	SOUHRN.....	41
7.	LITERATURA	42

1. ÚVOD

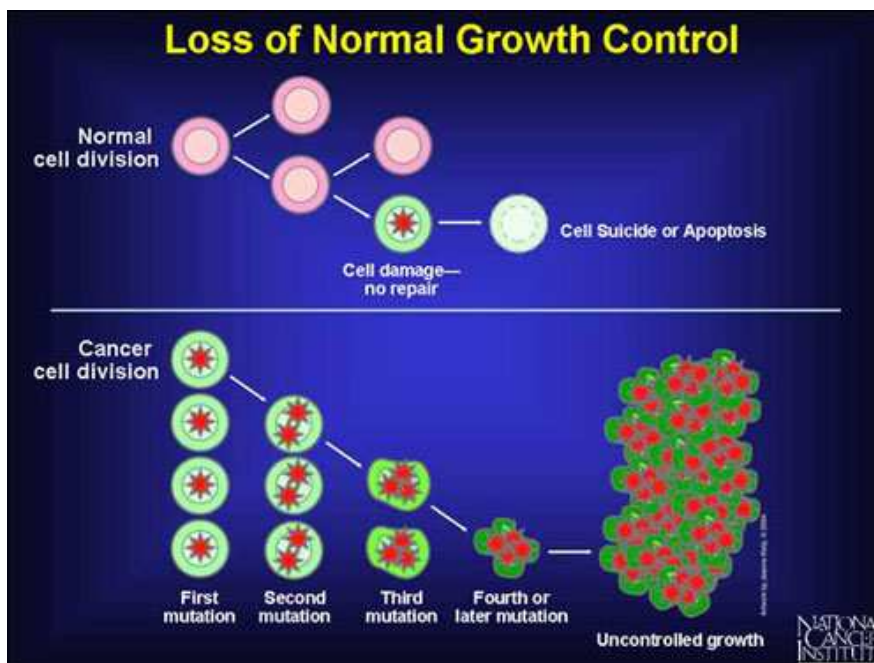
1.1 RAKOVINA

1.1.1 Sto onemocnění

Rakovina, onemocnění, které provází lidi již od počátku věků. Ale co přesně vede k jejímu vzniku a jak ji komplexně léčit, ještě zcela nevíme. Není to totiž jen jediné onemocnění, ale tvoří jej více než 100 různých druhů. Základními typy jsou:

- Karcinom – pocházející z kůže či tkání vnitřních orgánů
- Sarkom – postihující kosti, chrupavku, svaly, tukovou a pojivovou tkáň
- Leukémie – rakovina započínající v kostní dřeni
- Lymfom a myelom – rakovina buněk imunitního systému
- Rakovina centrální nervové soustavy (U.S. National cancer institute 2008)

Co víme je, že rakovina je důsledkem mutace v genetickém kódu třeba jen jediné buňky (Fearon, 1997), která se pak začne nekontrolovaně dělit. Problémem není jen nekontrolované



OBR. 1: SCHÉMA ZTRÁTY KONTROLY NAD BUNĚČNÝM DĚLENÍM ZDROJ: U.S.

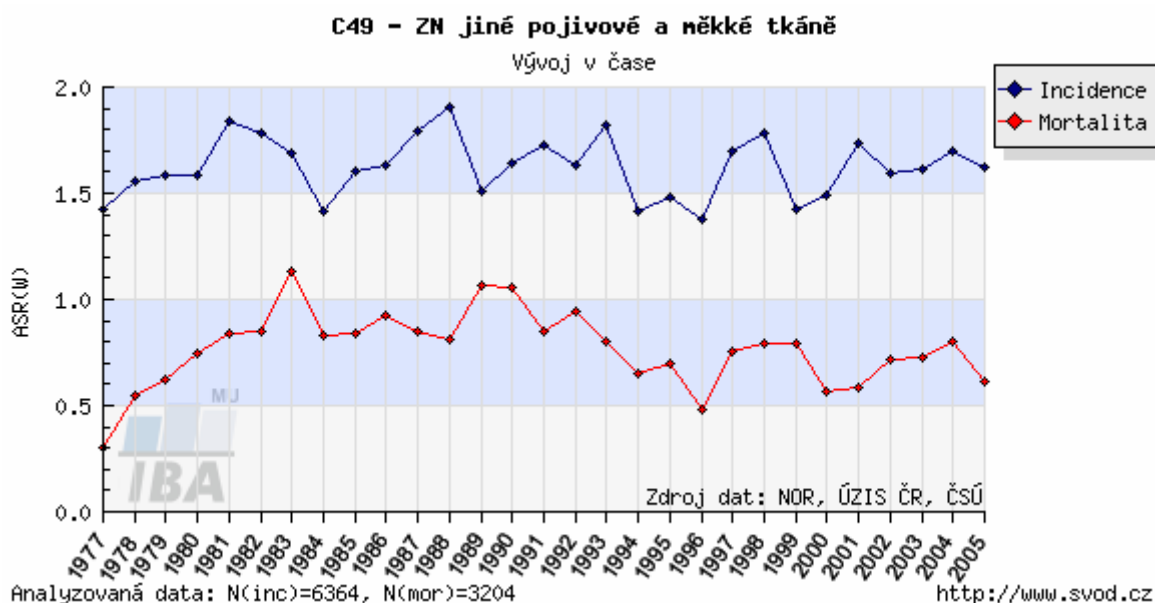
NATIONAL CANCER INSTITUTE (WWW.CANCER.GOV 20/02/2008)

dělení, ale i fakt, že buňky s touto mutací neodumírají, jak by měly, ale mohou dokonce vytvořit shluk, který nazýváme tumor. Ovšem ne každý tumor je rakovinný. Některé, benigní,

se nešíří do ostatních částí těla a po jejich vyjmutí se nádor nemusí už nikdy objevit. U ostatních, maligních, je však situace jiná, jejich základní vlastností je právě jejich agresivita a schopnost šířit se na další místa.

1.1.2 Sarkom a jeho vlastnosti

Jak již bylo řečeno, sarkom je zhoubný nádor postihující tkáň mezenchymálního původu. V České republice jím ročně onemocní zhruba 2 lidé na 100 000 obyvatel, zemře čtvrtina z nich (viz Obr. 2).



OBR. 2: INCIDENCE A MORTALITA SARKOMU V ČR V ČASE NA 100 000 OBYVATEL, ZDROJ: EPIDEMIOLOGIE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ V ČR ([WWW.SVOD.CZ](http://www.svod.cz), 20/3/2008)

Sarkom S180 je myší (Balb/c) sarkom, který se vyznačuje rapidním růstem a vzácným výskytem metastáz, objevuje se u něj také často spontánní regrese, jež je jednoznačně spojena se snižující se fosfolipidovou aktivitou (Jones a spol. 1939).

1.2 TERAPIE MALIGNÍCH ONEMOCNĚNÍ ZALOŽENÉ NA POUŽITÍ PROTEÁZ

1.2.1 Systémová enzymoterapie

V současné době se systematickou enzymoterapií zabývá hned několik subjektů. Enzymy jsou podávány perorálně či perrektálně. Při perorálním užití jsou enzymy jako např. trypsin, chymotrypsin, papain a bromelin uzavřeny v nepropustném obalu, který je chrání před kyselým prostředím v žaludku. Perrektálně se většinou enzymy používají v experimentálních

pokusech na myších. V obou případech jsou dávky enzymů velice vysoké, do krve se však dostane jen nepatrný zlomek.

V krvi jsou poté enzymy okamžitě vychytávány a inhibovány inhibitory proteáz, jako jsou například alfa-2-makroglobulin, alfa-1-antitrypsin, alfa-1 antichymotrypsin. Zvláštním druhem inhibice je působení alfa-2-makroglobulinu. V něm jsou proteázy uzavřeny jako v pasti, nicméně jsou stále aktivní a jsou schopny štěpit nízkomolekulární látky.

Podstata enzymoterapie nejspíše spočívá v aktivaci alfa-2-makroglobulinu, který vychytává cytokiny z krve. Po navázání proteázy na alfa-2makroglobulin, dojde k jeho konformační změně a odhalení doposud nepřístupných receptorů. Ty jsou pak schopny vázat celou řadu cytokinů (Webb 1996), beta-2-mikroglobulin (Gouin-Charnet 2000), růstový hormon (Kratzsch 1996) a leptin (Birkenmeier 1998). Přehled hlavních cytokinů, které váže aktivovaný alfa-2-makroglobulin uvádí Tabulka I.

Nádorové buňky se brání imunitnímu systému vylučováním cytokinů TGF-beta a IL-10 (Harthun a spol. 1997, Chouaib a spol. 1997, Pollock and Roth 1989, Yang a spol. 2002). TGF-beta sice v časně tumorigenese působí na nádorové buňky jako supresor, ale později plně podporuje nádorovou progresi a metastazibilitu (Yang a spol. 2002).

TABULKA 1: CYTOKINY VÁZANÉ NA ALFA-2-MAKROGLOBULIN

Cytokiny vázané alfa-2-makroglobulinem	Autor
TGF-beta1, TGF-beta 2	Crookston 1994; Feige 1996
Inhibin, Activin	Vaughan 1993; Niemuller 1995
Defensin	Panyutich 1991
IGF-1	da-Silva 1996
TGF-alfa	Liebl 1993
TNF-alfa	Crookston 1994
IFN-gama	James 1992
IL-1beta, IL2, IL12	Borth 1986; 1989
IL-6	Matsuda 1989
IL-8	Kurdowska 1997
IL-10	Garber 2000

Odstraňování TGF-beta a IL-10 působením aktivovaného alfa-2-makroglobulinu, snížení navozené imunosuprese a znovuoobnovení Th1/Th2 rovnováhy je zvažováno za jeden z hlavních mechanismů systémové enzymoterapie maligních onemocnění. Snížení hladiny TGF-beta pomocí enzymoterapie bylo prokázáno (Desser a spol. 2001).

Z českých vědců se enzymoterapií zabývá mj. Wald. Sledoval vliv enzymů, v tomto případě trypsinu, chymotrypsinu a papainu na Lewisův plicní karcinom (Wald a spol. 1998) a melanom B16F10 (Wald a spol. 2001). V obou případech bylo sledováno přežití a distribuce metastáz. Enzymy byly podávány perrektálně, 24 hodin po injekci nádorových buněk, před a po vyoperování nádoru.

1.2.2 Proenzymová terapie

1.2.2.1 John Beard a jeho následovníci

John Beard na přelomu 19. a 20. století poukazoval na podobnost mezi rakovinou a trofoblastem. Účelem trofoblastu je pomoci embryu zavrtat se do stěny dělohy, a proto musí být invazivní, ničivý a schopný se rozšiřovat, což jsou klíčové znaky rakoviny. Nepotlačený trofoblast se také může vyvinout v choriokarcinom. Co ale brání této proměně? Beard se domníval, že je to přítomnost pankreatických enzymů embrya. Tato myšlenka a analogie nádor trofoblast (kterou on nepovažoval za náhodnou) ho dovedla k názoru, že proteolytický enzym trypsin může působit i na rakovinné buňky, což experimentálně potvrdil (Beard 1906, 1911). Na jeho teze poté navázal ve čtyřicátých letech Ernst T. Krebs (Krebs a spol. 1950). Beard je považován za zakladatele enzymoterapie (nazýval ji trypsinovou terapií), ale my se kloníme k názoru Nováka a Trnky, 2005, že nevědomky položil základy proenzymové terapie. K terapii totiž používal velmi čerstvé extrakty pankreatu a jejich čerstvost velmi zdůrazňoval. Léčil tedy preparáty s nutně vysokým obsahem proenzymů (trypsinogen, chymotrypsinogen), které však neznal a které byly objeveny několik desítek let později.

Použitím proenzymů v terapii nádorových onemocnění se v nedávné době zabýval Novák a Trnka, 2005. In vitro pokusy ukázaly inhibiční vliv na migraci a invazivitu nádorových buněk. Pokusy in vivo s použitím směsi trypsinogenu a amylázy prokázaly terapeutický vliv na nádory a zejména výrazný protimetastázový účín, demonstrovaný na melanomu B16. Amyláza, používaná již Beardem (Beard 1911) má pouze podpůrný vliv (Novák a Trnka 2005), lze uvažovat o její účasti při likvidaci glykoproteinů vzniklých rozpadem nádorové hmoty.

1.3 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

1.3.1 Činitelé protinádorové imunity

1.3.1.1 T-lymfocyty

Jedny z nejdůležitějších buněk v protinádorové imunologii jsou cytotoxické T lymfocyty, které rozpoznávají nádorové buňky exprimující antigeny v komplexu s MHC I. Jejich efektorové funkce jsou však patrné v praxi pouze u nádorů vyvolaných onkogenními viry.

CD4+ T-lymfocyty sice cytotoxickou funkci nemají, ale svou práci konají prostřednictvím produkce cytokinů. K tomu, aby mohly být T lymfocyty aktivovány, je zapotřebí zprostředkovatele, takzvaných antigen prezentujících buněk (APC). Nejvýznamnějšími APC jsou dendritické buňky.

Specifická protinádorová reakce CD8+ buněk je nejspíš způsobena tak, že jsou buď nádorové buňky anebo jejich antigeny fagocytovány APC a exprimovány na pozadí MHC I. APC exprimují antigeny také v komplexu s MHC II a pomáhají tak aktivovat CD4+ lymfocyty. (Říhová 2007)

1.3.1.2 NK buňky

NK (natural killers) buňky, neboli přirození zabíječi, jsou snad nejvýznamnější leukocyty v boji proti rakovině. Na rozdíl od T lymfocytů postihují mnohem širší spektrum antigenů, nemají TCR receptor a molekuly MHC I na rozdíl od CTL inhibují jejich aktivitu (Binstadt a spol. 1997). Jejich aktivitu naopak mohou stimulovat některé cytokiny. Aktivované NK buňky nazýváme lymphokine-stimulated killers (Říhová 2007).

1.3.1.3 Makrofágy

Mezi další buňky rozpoznávající nádory patří aktivované makrofágy. Stejně jako NK buňky nejsou závislé na MHC molekulách, mají Fc receptor, který jim umožňuje vázat se k protilátkám na nádorových buňkách a zprostředkovávat tak ADCC odpověď. Jejich schopnost zabíjet nádorové buňky je zprostředkována lytickými enzymy. Mimo jiné také makrofágy produkují cytokiny (Shih a spol. 2006), jako například TNF- α , který způsobuje krvácení a nekrózy nádorů.

1.3.2 TH1/TH2 Rovnováha

Studie mnoha vědců prokázaly, že u lidí (zvířat) trpících nejrůznějšími nádorovými onemocněními se posouvá rovnováha mezi Th1 a Th2 odpovědí směrem k Th2 buněčné odpovědi (Shurin a spol. 1999). Tato nerovnováha souvisí nejen s počty buněk, ale i s výskytem cytokinů v periferní krvi.

Th1 lymfocyty produkují mj. interferon gama, TNF a IL-2, Th2 lymfocyty IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 atd. Produkce těchto cytokinů je úzce spojena se stavem a stupněm malignity (Onishi a spol. 1999).

Nádory samy o sobě produkují mnoho faktorů, které mohou pozměnit bilanci Th1 a Th2 cytokinů. Mezi tyto faktory patří TGF- β , IL-10, prostaglandiny a mnoho dalších látek (Asselin-Paturel a spol. 1998; Chouaib a spol. 1997; Kim a spol. 1995). Například nádorem produkováný TGF- β indukuje nadprodukcii IL-10 a zároveň posun od Th1 k Th2 odpovědi (Maeda a spol. 1996)

1.3.3 Obrana nádorů před imunitní odpovědí

Mechanismů, jimiž se nádory brání imunitní reakci, je hned několik. Ať jde o snížení exprese MHC I molekul, absenci exprese MHC II molekul, produkci cytokinů, již zmíněných v předchozí kapitole, nebo glykokalyx (Říhová 2007). Dalším problémem je také heterogenita cílových antigenů.

2. CÍLE PRÁCE

1. Kultivace nádorových buněk
2. Transplantace nádorových buněk a následná terapie, hledání optimální terapie
3. Osvojení histologických technik, vyhodnocení experimentu

3. MATERIÁL A METODY

3.1 PRVNÍ EXPERIMENT

3.1.1 Laboratorní zvířata a Buněčné linie

Byly použity inbrední linie samic myší Balb/c, dodané firmou Velaz, o průměrné váze 20 g, kterým bylo s. c. (v oblasti vnitřní strany pravé zadní nohy) aplikováno 400 000 buněk sarkomu S-180. Buňky sarkomu S-180 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 5% bovinního fetálního séra.

3.1.2 Chemikálie

Byl použit bovinní trypsinogen (14 000 BAEE jednotek/mg proteinu po aktivaci), bovinní alfa-chymotrypsinogen A (48 BTEE jednotek/mg lyofilizovaného preparátu po aktivaci) a alfa-amyláza z *Bacillus* sp. (1780 maltózových jednotek /mg proteinu) – vše dodáno firmou Sigma.

3.1.3 Schéma pokusu

Experiment trval 100 dní (od aplikace nádorových buněk). Myši byly rozděleny do 4 skupin po 9, 9, 10, 10 kusech a od čtvrtého dne byly myším aplikovány roztoky o následujícím složení, vždy 0,1ml / myš i. m. do svaloviny levé zadní nohy.

- Skupina I - 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,1 mg amylázy / ml fyziologického roztoku
- Skupina II - 1,12 mg trypsinogenu + 0,1 mg amylázy / ml fyziologického roztoku
- Skupina III - 1,12 mg chymotrypsinogenu + 0,1 mg amylázy / ml fyziologického roztoku
- Skupina IV - fyziologický roztok, kontrolní skupina

38. den byla zjištěna zvýšená únava a snížená pohyblivost ve skupinách I,II,III., což byl důsledek zahájení rozpadu nádorů. Od tohoto dne byla zvýšena denní dávka amylázy na 0,04 mg až do konce pokusu. Během několika dnů příznaky únavy pominuly.

Byl sledován vliv terapie na přežití myší a objem nádorů, zjišťovaný dvakrát týdně metodou dle Inaba a spol., 1986, použitou i v dalších experimentech. Posmrtně byla

provedena pitva, kde byla ověřena správnost měření nádorů, a histologie (tumor, plíce, srdce, játra, slezina a ledviny) pro sledování abnormalit.

3.1.3.1 Histologie

Po pitvě byly orgány uloženy do 4% formalinu. Následně byly oříznuty a přeneseny do zalévací kazety, odvodněny v histologické odvodňovací řadě (70% alkohol, 80% alkohol, 96% alkohol, 96% alkohol, aceton, xylen, xylen), prosyceny parafínem a zalaty do bločků.

Po té byly bločky upevněny do držáku mikrotomu, rozkrájeny, přeneseny do předeřháté vodní lázně, kde se natáhly a staženy na sklíčka. Ta byla po vyschnutí odparafinována (xylen, xylen, xylen, 96% alkohol, 96% alkohol, 80% alkohol, 70% alkohol, destilovaná voda 2x), obarvena (hematoxylin, tekoucí voda, eosin, voda) a odvodněna (70% alkohol, 80% alkohol, 96% alkohol (2x), karbolxylen (2x), xylen(3x)). Po odvodnění byla sklíčka zakápnuta kanadským balzámem a byla na ně připevněna krycí sklíčka.

3.2 DRUHÝ EXPERIMENT

3.2.1 Laboratorní zvířata a buněčné linie

Byly použity inbrední linie samic myší Balb/c, dodané firmou Velaz, o průměrné váze 20 g, kterým bylo stejným způsobem jako v předchozím pokusu aplikováno 420 000 buněk sarkomu S-180.

Buněčná vakcína byla získána následujícím způsobem: 100 mil. buněk sarkomu S-180 bylo rozsuspendováno v 42 ml PBS pH 7,2 obsahujícím 20 mg KLH (Sigma). Za stálého míchání bylo přidáno 42 ml 0,4% glutaraldehydu (Sigma). Následovala 1 hod inkubace při 37°C a 4násobné promytí 0,1M glycinem v PBS. Buňky s navázaným KLH byly rozsuspendovány na koncentraci 5 mil./ml fyziologického roztoku a uchovávány při 4°C.

Vakcinace byla prováděna s.c. aplikací (za krk) 0,2 ml výše uvedené suspenze. Vakcinační schéma bylo založeno na 4 s.c. aplikacích v dvoutýdenních rozestupech.

3.2.2 Chemikálie

Byl použit bovinní trypsinogen (14 000 BAEE jednotek/mg proteinu po aktivaci), bovinní alfa-chymotrypsinogen A (48 BTEE jednotek/mg lyofilizovaného preparátu po aktivaci) a alfa-amyláza z Bacillus sp. (1780 maltózových jednotek /mg proteinu) – vše dodáno firmou Sigma.

3.2.3 Schéma pokusu

V tomto experimentu byly myši po aplikaci sarkomu S-180 ponechány 19 dnů. Poté byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 5 skupin (1,2,3,4,5) po osmi. Bylo přitom dbáno, aby velikostní distribuce nádorů a průměrná velikost nádorů byla v jednotlivých skupinách srovnatelná. Téhož dne bylo započato s jednotlivými režimy proenzymoterapie a buněčné vakcinace:

- Skupina 1: Kontrolní skupina, denně i.m. aplikováno po 0,1 ml fyziologického roztoku
- Skupina 2: Proenzymoterapie, denně i.m. aplikováno 0,1 ml roztoku tohoto složení: 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy/ ml fyziologického roztoku
- Skupina 3: Buněčná vakcína aplikovaná poprvé po zmíněných 19 dnech, pak ještě 3x v dvoutýdenních odstupech.
- Skupina 4: Kombinace proenzymoterapie, prováděné jako ve skupině 2 s vakcinací, prováděnou souběžně jako ve skupině 3
- Skupina 5: Zesílená proenzymoterapie, denně i.m. aplikováno 0,1 ml roztoku o 5x vyšší koncentraci jednotlivých komponent, než u skupiny 2. Roztok tedy obsahoval 2,8 mg trypsinogenu + 2,8 mg chymotrypsinogenu + 2 mg amylázy / ml fyziologického roztoku

V souvislosti se vznikem otevřených lézí byl na přechodnou dobu (36. – 45. den po transplantaci sarkomu) aplikován perorálně cefadroxil. Nezaznamenali jsme vliv této látky na průběh experimentu.

3.3 TŘETÍ EXPERIMENT

3.3.1 Laboratorní zvířata a buněčné linie

Byly použity inbrední linie samic myší Balb/c, dodané firmou AnLab (Charles River), o průměrné váze 20 g, kterým bylo stejným způsobem jako v předchozím pokusu aplikováno 500 000 buněk sarkomu S-180.

3.3.2 Chemikálie

Byl použit bovinní trypsinogen (14 000 BAEE jednotek/mg proteinu po aktivaci), bovinní alfa-chymotrypsinogen A (48 BTEE jednotek/mg lyofilizovaného preparátu po aktivaci) a alfa-amyláza z Bacillus sp. (1780 maltózových jednotek /mg proteinu) – vše dodáno firmou Sigma.

3.3.3 Schéma pokusu

Myším bylo s. c. stejným způsobem jako v předchozích pokusech vpíchnuto 500 tisíc buněk sarkomu S180. Myši byly rozděleny do dvou skupin po 13 a 14 kusech a od 15. dne byly myším aplikovány roztoky o následujícím složení, vždy 0,1ml / myš i. m. do svaloviny levé zadní nohy.

- Skupina I, léčené myši - 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy / ml fyziologického roztoku
- Skupina II , neléčené myši - fyziologický roztok, kontrolní skupina

Šesti myším nebyly nádorové buňky aplikovány, tyto myši sloužily jako kontrola neovlivněných fyziologických parametrů + pro posouzení vlivu terapie na zdravé myši.

Byl sledován vliv vývoje sarkomu na počty krevních buněk v krvi a ve slezině a dále na jejich odpověď na sarkomový antigen a Anti-CD3.

Každý týden byly usmrceny 4 myši (od třetího týdne 6 myší). Byl proveden odběr krve z cév ramenního pletence, vyjmuta slezina a provedena pitva a následně histologie (tumor, plíce, srdce, játra a ledviny).

3.3.3.1 Průtoková cytometrie

Odebraná slezina byla rozmělněna přes sítko a buňky byly rozsuspendovány v RPMI 1640 s 5% FCS a třikrát promyty. Poté byly rozsuspendovány v 1ml média a spočítány v Bürkerově komůrce. Byly odděleny 2 miliony buněk, které byly zlyzovány pomocí 0,84% roztoku

NH₄Cl. Dvakrát promyty v PBS s 2% FCS a nakonec rozděleny po 500 tisících do 4 zkumavek. Jedna byla ponechána jako negativní kontrola, do druhé bylo přidáno po 0,5μl FITC Conjugated Anti-Mouse CD4 (L3T4) (eBioscience) a PE Conjugated Anti-Mouse CD8a (Ly-2) (eBioscience), do třetí bylo přidáno po 0,5μl FITC Conjugated American Hamster IgG isotope control a PE Conjugated American Hamster IgG isotope control (eBioscience), do poslední bylo přidáno 5μl Mouse Antimouse NK cells RPE (Serotec). Poté byly zkumavky uloženy na tmavém a chladném místě po dobu 30-ti minut, následně byly promyty PBS s 2% FCS, doplněny na 0,5ml a proměřeny na průtokovém cytometru Coulter Epics XL. Po té byla data zpracována v programu MS Excel a vynesena do grafů.

3.3.3.2 Blastická transformace

Citlivost buněk sleziny na S180 antigen a Anti-CD3 byla měřena pomocí blastické transformace podle manuálu výrobce Cell Counting Kit-8 (BioChemica).

Do 96tjankového panelu bylo nasazeno po 1 milionu splenocytů na jamku, od každé myši do 9 jamek. Do prvních tří jamek byl přidán sarkomový antigen o koncentraci 10μg/ml, do druhých tří jamek byl přidán Anti-CD3 antigen v koncentraci 0,1μg/ml. Třetí tři jamky zůstaly jako negativní kontrola. Poté byl panel vložen do termostatu, kde byl při 37°C a 3,5% CO₂ uložen po 24 hodin. Po 24 hodinách bylo z panelu přeneseno po 100μl média z každé jamky, u kterých byla provedena elisa, a bylo přidáno po 10μl Cell-counting kitu-8, se kterým se buňky inkubovaly v termostatu po 2 hodiny. Po dvou hodinách byl panel přeměřen na spektrofotometru při absorbanci 450nm. Po té byla data zpracována v programu MS Excel a vynesena do grafů.

3.3.3.3 Krevní obraz

Odebraná krev byla přeměřena na přístroji Cell-Dyn 3200 firmy Abbott. Po té byla data zpracována v programu MS Excel a vynesena do grafů.

3.3.3.4 Elisa test

Médium odebrané po blastické transformaci bylo metodou elisa testováno na přítomnost interferonu gama a interleukinu 10.

Použité protilátky:

IFN-γ:

- Monoclonal Anti-mouse IFN-γ Antibody (RnDsystems)
- Biotin Rat Anti-mouse IFN-γ Antibody (BD Biosciences)

IL-10:

- Purified Rat Anti-Mouse IL-10 Monoclonal Antibody (BD Biosciences)
- Biotinilated Rat Anti-Mouse IL-10 Monoclonal Antibody (BD Biosciences)

Roztoky:

- vazebný roztok:
 - IFN- γ : uhličitanový pufr pH 9,4 (0,43 g NaHCO₃, 0,53 g Na₂CO₃ ve 100 ml deionizované vody)
 - IL-10: fosfáto-sodný pufr pH 6 (3,6g Na₂HPO₄ . 12H₂O ve 100ml, 1,6g NaH₂PO₄ . 2 H₂O ve 100ml, smícháno v poměru 1:1)
- promývací roztok: PBS s 0,5% Tween-20
- blokovací roztok: 10% PTS v PBS
- ředicí roztok: 10% PTS v PBS
- substrátový roztok: 10 ml fosfocitrátového pufru + 4 mg OPD (Sigma) + 4 μ l H₂O₂
- zastavovací roztok: 2M H₂SO₄

Postup:

První den:

- Coatování desky – purifikovaná protilátka rozmíchaná ve vazebném roztoku 50 μ l na jamku, ponecháno při 4°C přes noc ve vlhké komůrce
 - IFN- γ : 2 μ l/ ml vazebného roztoku
 - IL-10: 10 μ l/ml vazebného roztoku

Druhý den:

- 2x promyto PBS + Tween (0,05%)
- blokování – 10%PTS v PBS, 200 μ l na jamku, ponecháno 2 hodiny při laboratorní teplotě
- 2x promyto PBS + Tween (0,05%)
- Vneseny vzorky v triplikacích, 40 μ l na jamku

- Kalibrace – 5 jamek + blank, dvojkovým ředěním 40 µl na jamku

Třetí den:

- 4x promyto PBS + Tween (0,05%)
- přidána biotinylovaná protilátka rozmíchaná v ředícím roztoku, 50 µl na jamku, ponecháno 45 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě
- 6x promyto PBS + Tween (0,05%)
- Přidána streptavidinperoxidáza rozmíchaná 1:1000 v ředícím roztoku, 100 µl na jamku, ponecháno 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě
- 8x promyto PBS + Tween (0,05%)
- přidán substrátový roztok, 100 µl na jamku, inkubace 10-45 minut ve tmě při laboratorní teplotě
- přidán zastavovací roztok, 100 µl na jamku
- měření na spektrometru při 490nm

3.3.3.5 Histologie

Histologie byla provedena stejným způsobem jako v prvním pokusu.

3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t-testu a programu STATISTICA VII od firmy StatSoft INC (Survival Analysis).

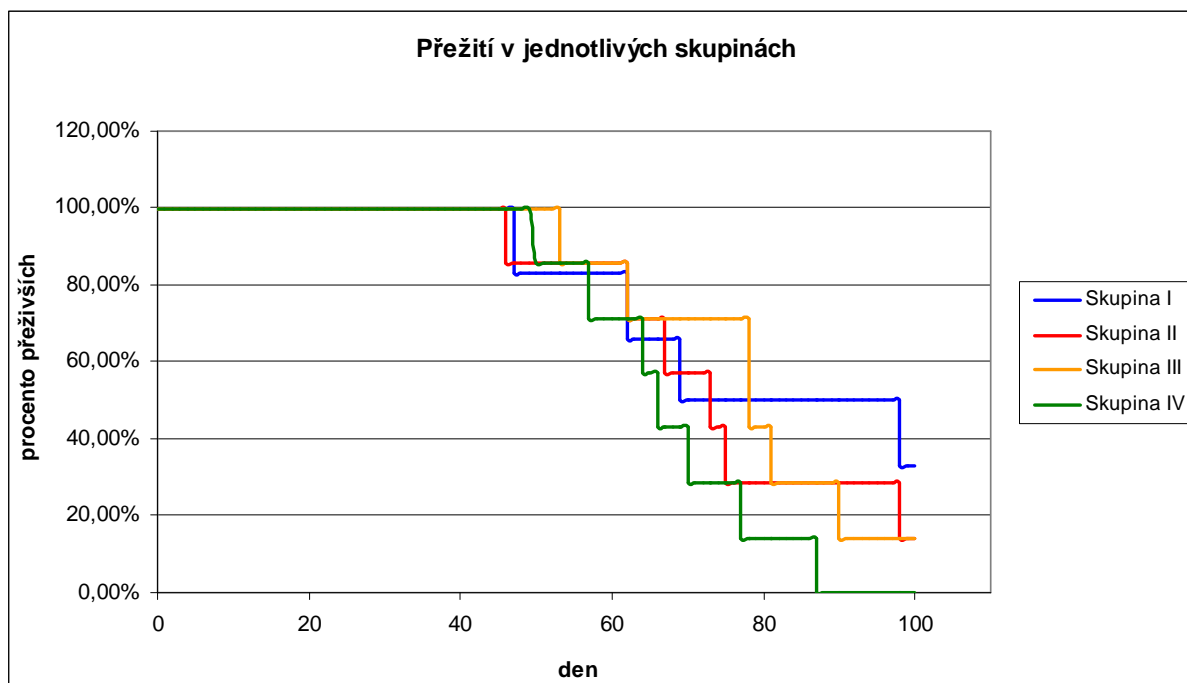
4. VÝSLEDKY

4.1 PRVNÍ EXPERIMENT

4.1.1 Přežití

V průběhu experimentu se ukázalo, že u cca 30 % myší v každé skupině se sarkom neujal. Tyto myši byly sledovány, ale do experimentu nebyly zahrnuty. Konečný počet myší s vyvinutými nádory byl ve skupinách I, II, III, IV poměrně rovnoměrný - 6, 7, 7, 7.

Nejvyššího přežití bylo docíleno ve skupině I a to 33%, ve skupině II a III činilo přežití shodně 14%. V kontrolní skupině IV činilo přežití 0% (viz obr. 3).

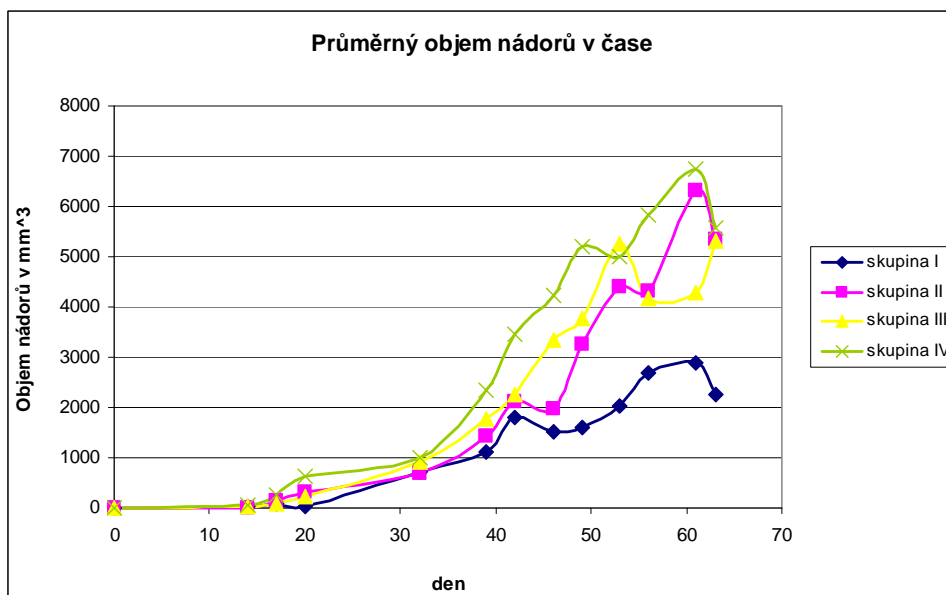


OBR. 3: PŘEŽITÍ V JEDNOTLIVÝCH SKUPINÁCH: I – TRYPSINOGEN+ CHYMOTRYPSINOGEN+AMYLÁZA, II- TRYPSINOGEN+AMYLÁZA, III-CHYMOTRYPSINOGEN+AMYLÁZA, IV- KONTROLA, FYZIOLICKÝ ROZTOK

4.1.2 Objemy nádorů

Z obr. 4 vyplývá značný vliv směsi I na velikost nádorů, které byly v porovnání s kontrolou (IV) 2-3x menší. Statistická významnost rozdílu skupiny I a IV se v průběhu experimentu stále zvyšovala. Statisticky signifikantního rozdílu skupin I a IV pak bylo dosaženo ve 49., 61. a 64. dni experimentu ($P < 0,05$). Jednotlivé proenzymy vykazovaly nižší účinek než jejich směs.

Vzhledem k tomu, že v pozdějším období docházelo k častým úhynům zvířat, nemělo toto vyhodnocení smysl dále sledovat. Průměrná velikost byla později dána stále se snižujícím počtem nádorů, úhyny myši s velkými nádory vedly k chaotickému chování průběhu křivek a ke znemožnění interpretace.



OBR. 4: PRŮMĚRNÝ OBJEM NÁDORŮ: I – TRYPSINOGEN+ CHYMOTRYPSINOGEN+AMYLÁZA, II- TRYPSINOGEN+AMYLÁZA, III-CHYMOTRYPSINOGEN+AMYLÁZA, IV- KONTROLA, FYZIOLOGICKÝ ROZTOK

Značné rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly i na úrovni vzhledu nádorů. Ve všech skupinách ovlivněným proenzymoterapií (I,II,III) došlo ke vzniku rozsáhlých povrchových lézí a nekrotizace nádorů. Povrchová nekrotizace se brzo propadla dovnitř a tak měly nádory tvar promáčknutého ping-pongového míčku. Dalším stupněm bylo vypadnutí části nekrotizace a prohloubení tohoto obrazu. U skupin I a II se tato morfologie dále neměnila, u skupiny III však došlo k tomu, že na okrajích léze došlo k iniciaci další progresu nádoru. V kontrolní skupině nebyly pozorovány žádné léze, jen ojedinělé nepatrné nekrotizace po stranách nádorů, s výše popsanými změnami naprosto nesrovnatelné.

Pozoruhodná byla též morfologie nádorů. Zatímco především v kontrolní skupině IV měly nádory tvar rotačního elipsoidu, který se z původní lokalizace protahoval po zádech až k páteři, všechny nádory ve skupině I byly kulovité.

4.1.3 Skutečnosti zjištěné pitvou

Co se týče velikosti nádorů, zjištěných pitvou, největší rozdíl byl mezi skupinou I ($4026 \pm 2514 \text{ mm}^3$) a skupinou IV ($6792 \pm 2200 \text{ mm}^3$). Tento rozdíl však nebyl statisticky významný ($P=0,06$). Toto srovnání je však zkreslené tím, že myši přežívaly různou dobu..

V případě zabití myši v jeden den by bylo srovnání metodicky správnější, ale nás zajímala otázka doby přežití, kterou bychom takto nezjistili.

Jak ukázal pitevní nález, bezprostřední příčinou úmrtí byla často nekrotizace střev vyvolaná tlakem nádorů na konečník. Výskyt této příčiny byl přitom následující:

Skupina I – 33%, skupina II – 43%, skupina III – 57%, skupina IV-71%. Nejvyšší výskyt byl tedy v neovlivněné kontrolní skupině. Nejčastější příčinou úmrtí (50 %) ve skupině I byla pak kachexie daná s největší pravděpodobností rozpadem nádorů a následnou intoxikací organismů.

Po ukončení pokusu byly přeživší myši sledovány dál.. Bylo dosaženo poměrně výrazného přežití (dalších 10 a 15 dnů ve skupině I, 15 dnů ve skupině II a 143 dnů ve skupině III).

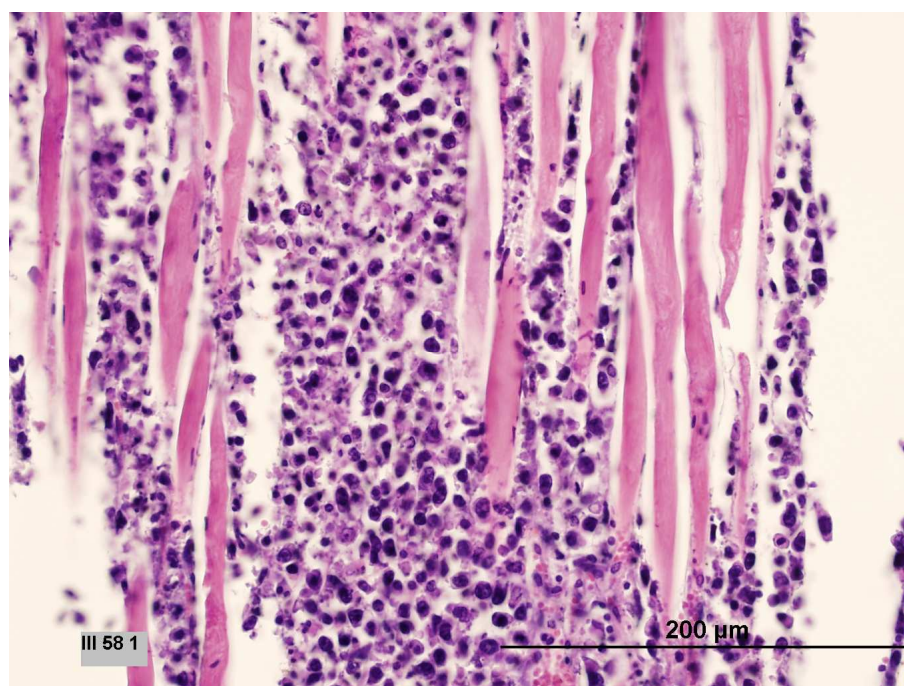
V případě myši s 15 denním přežitím ve skupině I (celkově myš žila 115 dní od aplikace sarkomu) došlo k velmi výrazné redukci objemu nádoru. Pitevně bylo zjištěno, že jeho objem byl pouze 224 mm³, což je třicetina průměrné velikosti nádorů zjištěné při pitvě v kontrolní skupině IV. Nádor přitom v době počátku nekrózy (89 den pokusu) dosahoval 4000 mm³. Došlo k jeho nekrotizaci a postupnému vypadávání nekrotizované tkáně. Na rozdíl od všech ostatních myši tato myš + ještě jedna ze skupiny I neměla paralyzovanou pravou zadní končetinu, jak tomu bylo v důsledku tlaku nádoru u všech ostatních myši.

Zajímavý byl vývoj v případě myši ze skupiny III, která uhynula až 143 den. Do 84. dne měla nádor o velikosti 63 mm³, teprve pak začalo jeho postupné zvětšování. Nelze však jednoznačně rozhodnout, zda dlouhodobá inhibice jeho růstu byla způsobena chymotrypsinogenem, či zda svoji roli sehrály i jiné faktory.

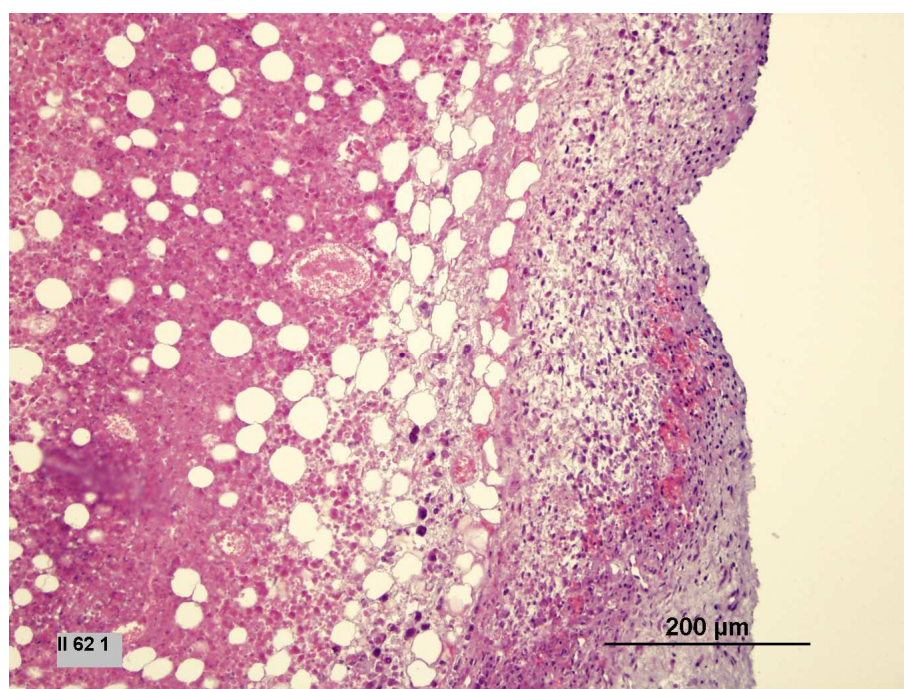
4.1.4 Histologie

V rámci prvního pokusu byla histologie pouze orientační, protože vzhledem k zaměření pokusu na přežití nešlo rozhodnout, zda šlo u různých případů o nekrózu či autolýzu materiálu. Nicméně bylo prokázáno, že metastázy se u tohoto modelu vyskytují velice zřídka a to zejména u velmi zesláblých jedinců.

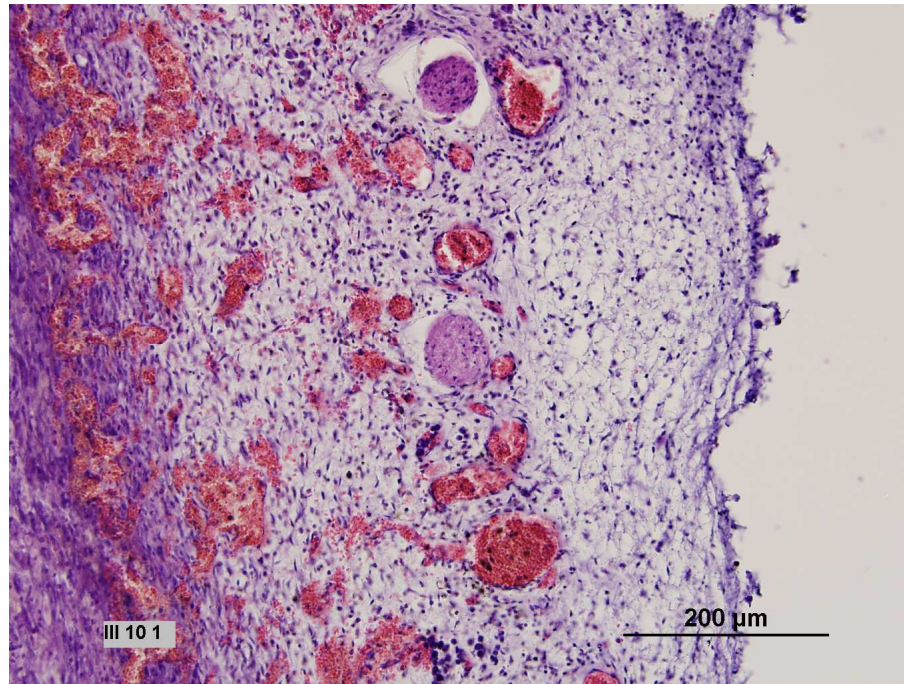
Pro další pozorování byly vyzdviženy jisté znaky, které měly být potvrzeny či vyvráceny. Za zmínku jistě stojí agresivita nádoru a jeho schopnost prorůstat svalovou tkání (viz obr. 5), lytické či nekrotické změny na nádoru (viz obr. 6), vaskularizace nádoru (viz obr. 7), metastázy na slezině (viz obr. 8)



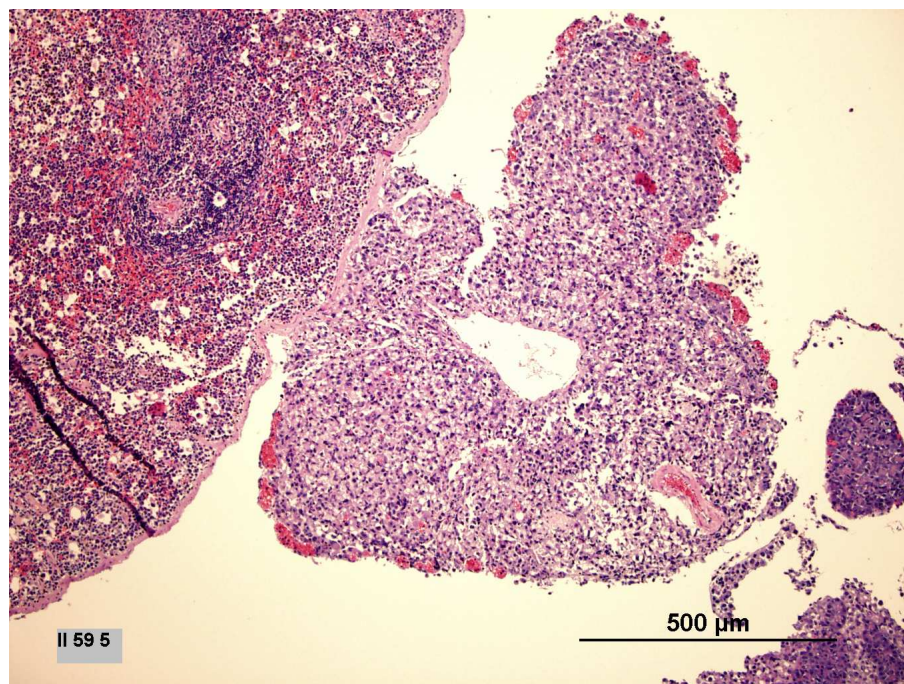
OBR. 5: PRORŮSTÁNÍ NÁDORU SVALOVOU TKÁNÍ



OBR. 6: AUTOLYTICKÉ ČI NEKROTICKÉ ZMĚNY NA NÁDORU



OBR. 7: VASKULARIZACE NÁDORU

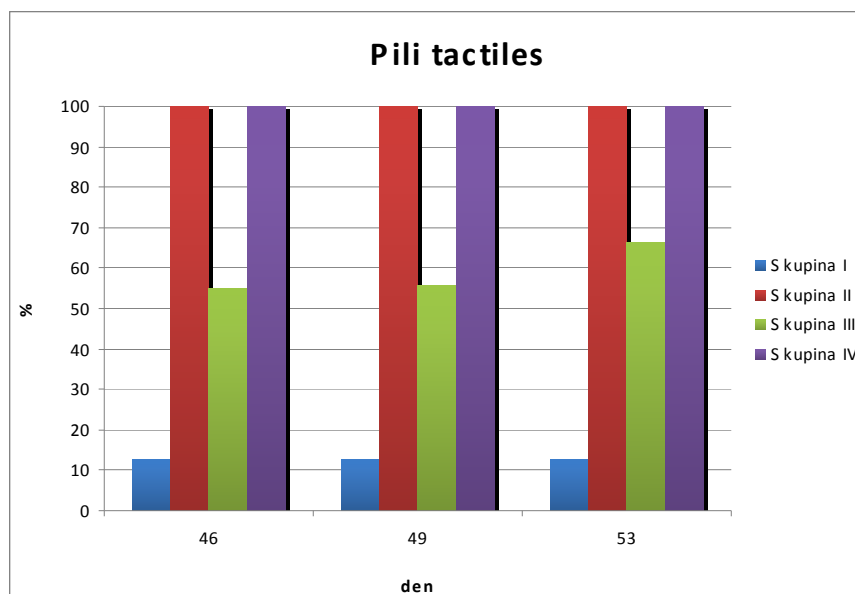


OBR. 8: METASTÁZY NA SLEZINĚ

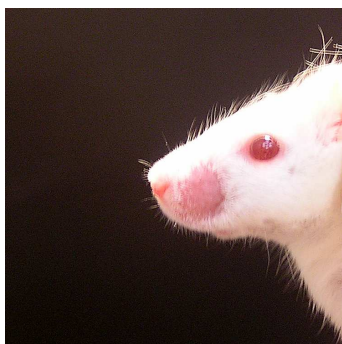
4.1.5 Pili tactiles

Během experimentu byla zjištěna redukce či dokonce absence hmatových vousů na čenichu u některých myší. Tento jev nezávisel ani na velikosti nádoru ani na váze myši. Ale

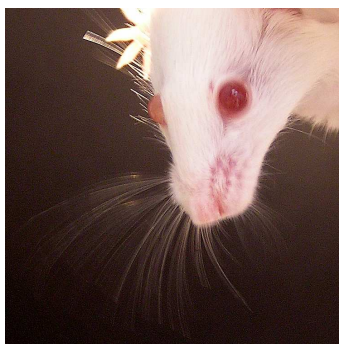
zjevně byl spjat s terapií a jejím způsobem (viz obr. 9). Na obrázcích je znázorněno, jak vypadají myši s 0% (viz obr. 10), 50% (viz obr. 11) a 100% (viz obr. 12) hmatovými vousy.



OBR 9: PILI TACTILES. I – TRYPSINOGEN+ CHYMOTRYPSINOGEN+AMYLÁZA, II- TRYPSINOGEN+AMYLÁZA, III-CHYMOTRYPSINOGEN+AMYLÁZA, IV- KONTROLA, FYZIOLOGICKÝ ROZTOK



**OBR. 10: MYŠ s 0%
HMATOVÝMI VOUSY**



**OBR. 11: MYŠ s 50%
HMATOVÝMI VOUSY**



**OBR. 12: MYŠ SE 100%
HMATOVÝMI VOUSY**

4.2 DRUHÝ EXPERIMENT

Proenzymoterapie směsí trypsinogen, chymotrypsinogen a amyláza ve skupině 2 (viz obr. 13 – Skupina 2) měla na již vytvořené nádory mnohem menší vliv, než v předchozím experimentu.

Tento vliv byl ve srovnání s kontrolou prvních 8 dnů nulový, 16. den pak došlo k tomu, že ovlivňované nádory měly 67 % objemu kontrolní skupiny. Naproti tomu v prvním

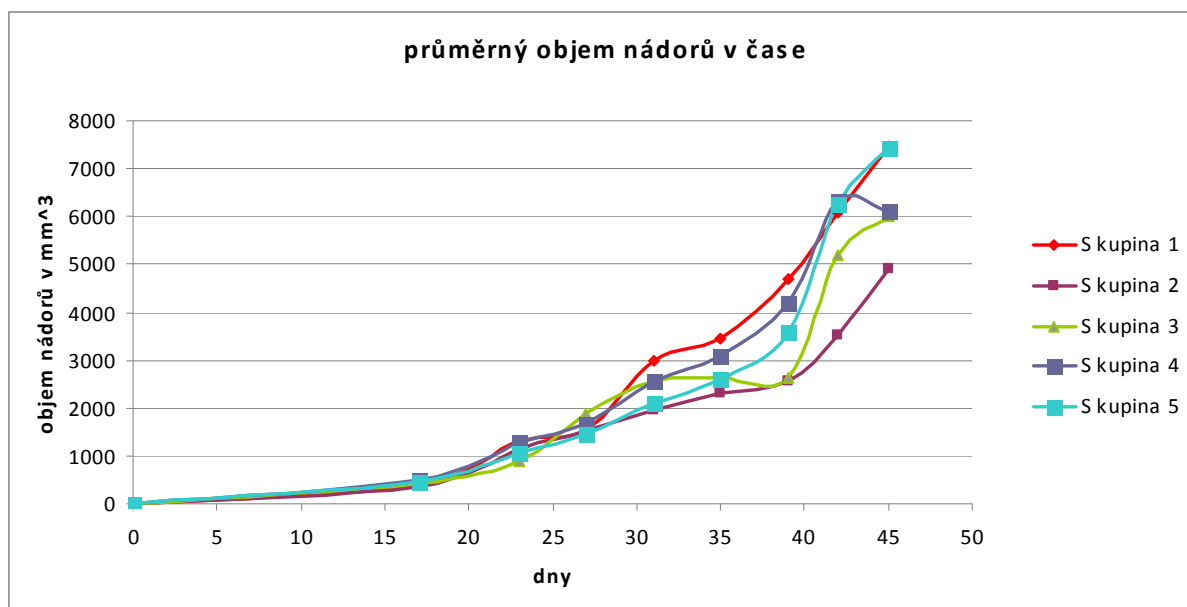
experimentu po 16 dnech terapie činil průměrný objem nádorů pouze 6 % objemu v kontrolní skupině. Enzymoterapie v průběhu experimentu trvale snižovala rychlost růstu nádorů, i když o něco méně výrazně, než v pokusu 1. Statistické významnosti ($P < 0,05$) dosáhl rozdíl velikosti nádorů ve skupině 2 ve srovnání s kontrolou (skupina 1) pouze 42. den.

Pětinasobná dávka enzymů ve skupině 5 (viz obr. 13 – Skupina 5) vykázala ve srovnání se základní dávkou efekt menší a přechodný. Proenzymoterapie tedy vykazuje koncentrační optimum, jehož přesažení snižuje terapeutický efekt.

Vakcinace ve skupině 3 (viz obr. 13 – skupina 3) dokázala zabrzdit mezi 31-39 dnem růst nádorů a přiblížila se k účinkům proenzymoterapie. Pak její vliv náhle polevil a došlo k prudkému nárůstu nádorů.

Kombinace vakcinace s proenzymoterapií základní dávkou ve skupině 4 (viz obr. 13 – Skupina 4) byla horší, než vliv vakcinace a proenzymoterapie samotné. Dochází zřejmě k nežádoucí interferenci obou metod.

Dále bylo sledováno přežití myší v jednotlivých skupinách. Žádný z terapeutických přístupů (skupiny 2,3,4 a 5) nevedl k prodloužení doby přežití. Všechny myši uhynuly do 80 dní po transplantaci sarkomu.

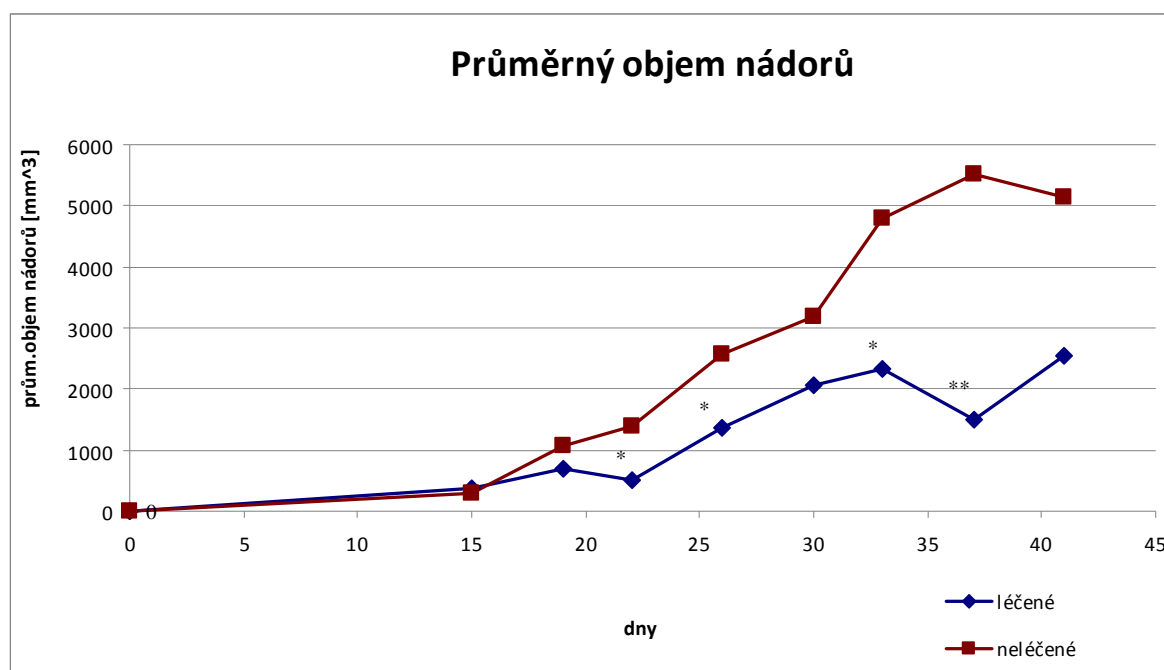


OBR. 13: PRŮMĚRNÝ OBJEM NÁDORŮ. 1-KONTROLA, FYZIOLOGICKÝ ROZTOK, 2- PROENZYMOTERAPIE, 3-BUNĚČNÁ VAKCÍNA, 4-PROENZYMOTERAPIE+BUNĚČNÁ VAKCÍNA, 5-PĚTINASOBNĚ KONCENTROVANÁ PROENZYMOTERAPIE

4.3 TŘETÍ EXPERIMENT

4.3.1 Objem nádorů

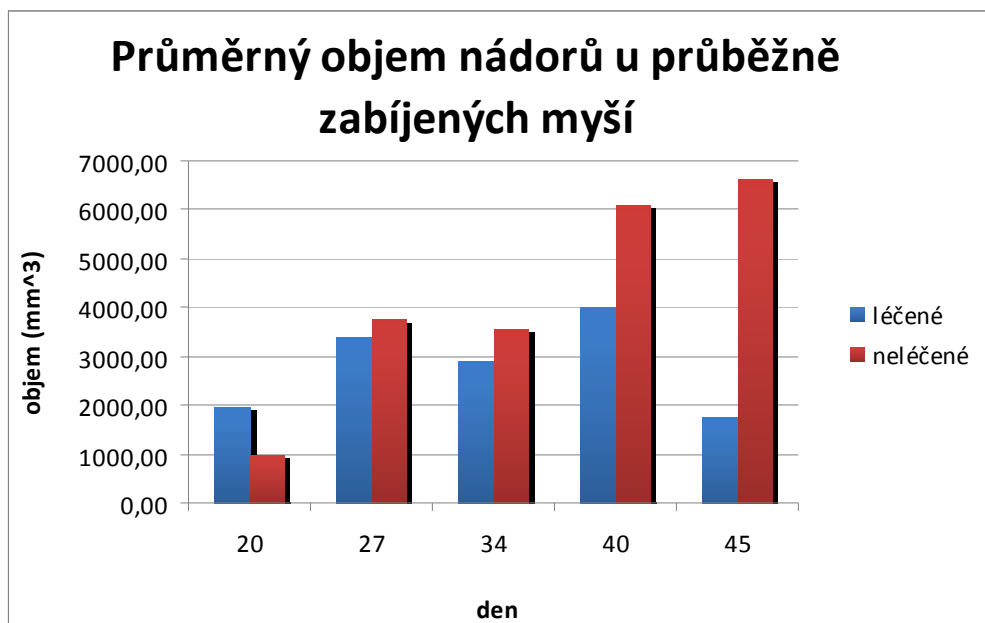
Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve skupině I (viz obr. 14), to znamená u léčených myší, v rozmezí 19. a 41. dne byl průměrný objem nádorů v této skupině roven 49% průměrného objemu nádorů v kontrolní skupině. 22., 26., 33. a 37. den experimentu bylo dosaženo statistické významnosti (22. den $P = 0,029$, 26. den $P = 0,029$, 33. den $P = 0,025$, 37. den $P = 0,0041$).



OBR. 14: PRŮMĚRNÝ OBJEM NÁDORŮ. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,005$

4.3.2 Skutečnosti zjištěné pitvou

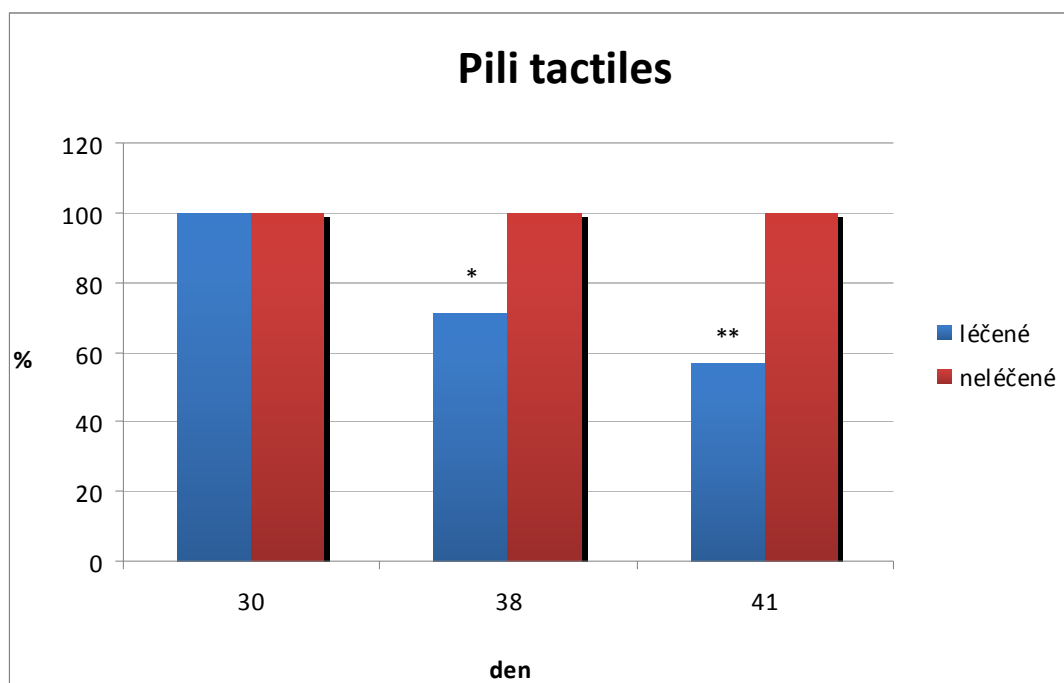
Po pitvě byly přeměřeny rozměry nádorů a vypočítán jejich objem. Tyto hodnoty byly poté v programu MS Excel vyneseny do grafu (viz obr. 15)



OBR. 15: PRŮMĚRNÝ OBJEM NÁDORŮ U PRŮBĚŽNĚ ZABÍJENÝCH MÝŠÍ

4.3.3 Pili tactiles

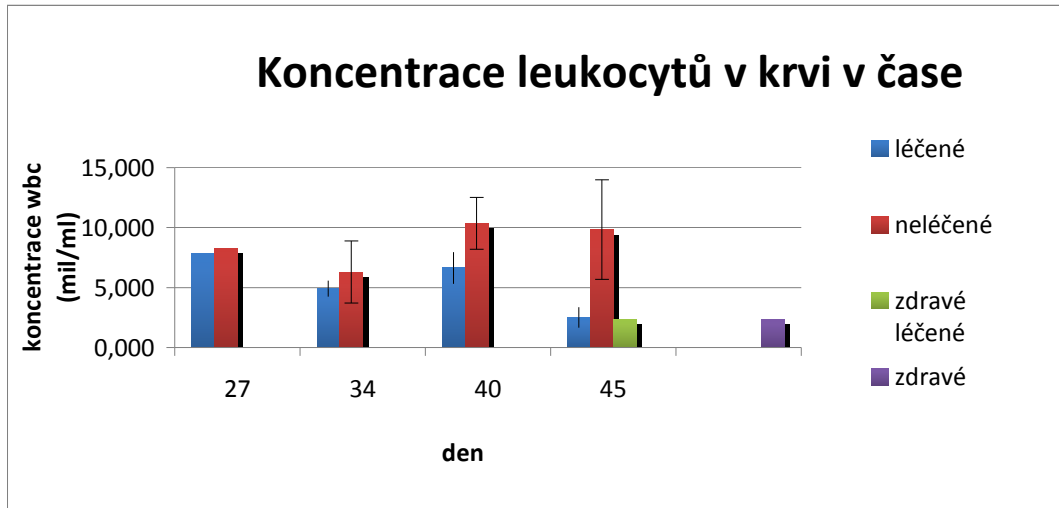
Bylo potvrzeno, že redukce hmatových vousů je spjata s terapií (viz obr. 16). 38. a 41. den bylo dosaženo v tomto pozorování statistické významnosti (38. den $P = 0,03$, 41. den dokonce $P = 0,00096$).



OBR. 16: PILI TACTILES. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$

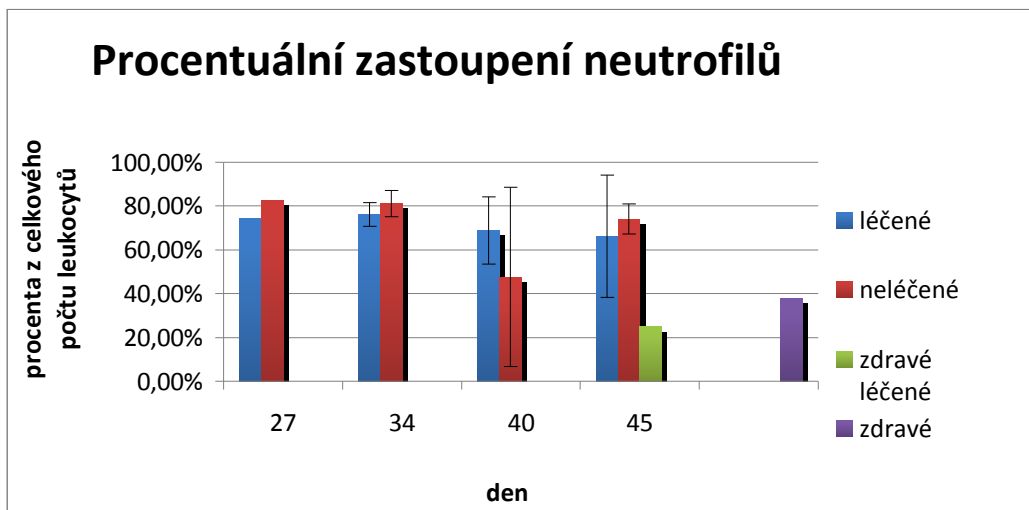
4.3.4 Krevní obraz

Koncentrace leukocytů v krvi byla značně zvýšena a byla spjata s velikostí tumorů a nikoliv s terapií (viz obr. 17).



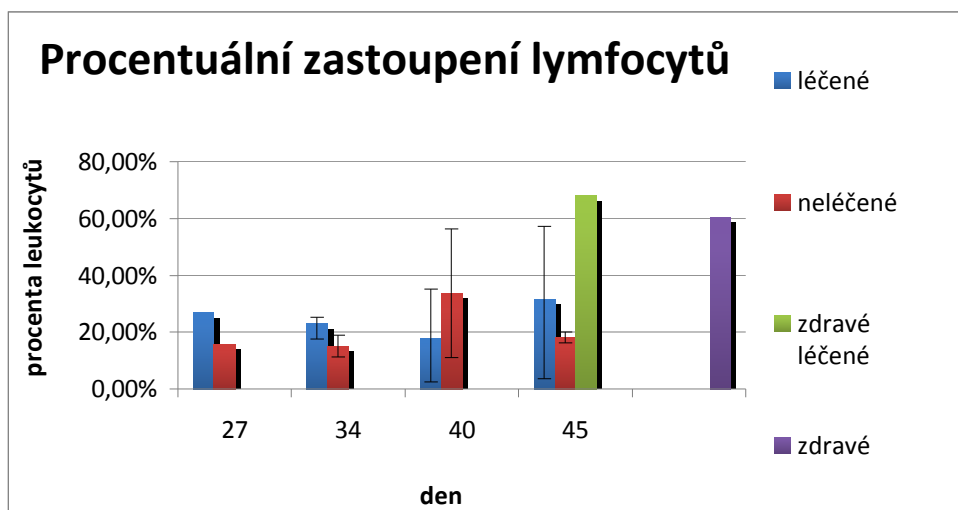
OBR. 17: KONCENTRACE LEUKOCYTŮ V KRVI

Procentuální zastoupení neutrofilů bylo také oproti zdravím jedincům zvýšené, ale mezi skupinami nebyl významný rozdíl (viz obr. 18).



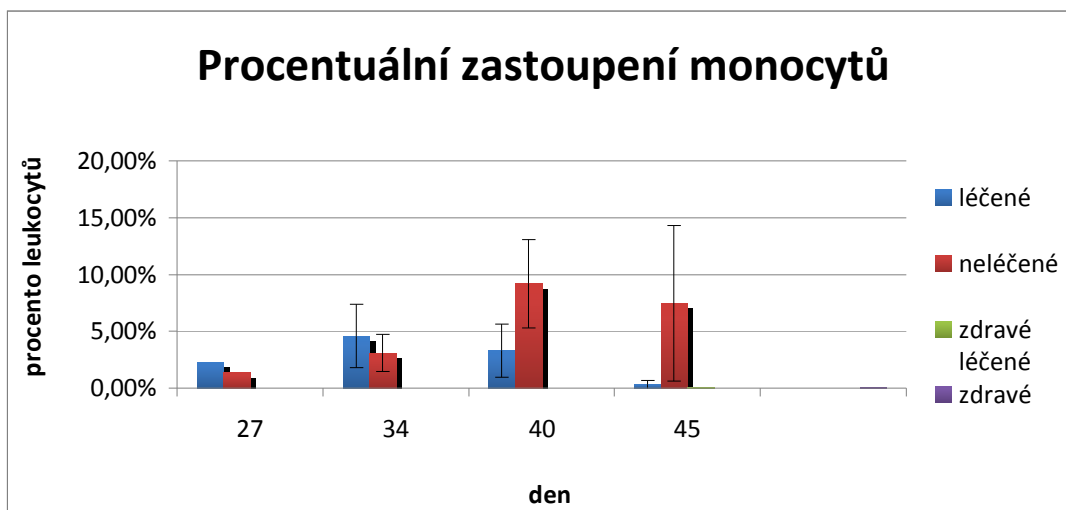
OBR. 18: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ NEUTROFILŮ

Procentuální zastoupení lymfocytů bylo sníženo, mezi jednotlivými skupinami nebyl významný rozdíl (viz obr. 19).



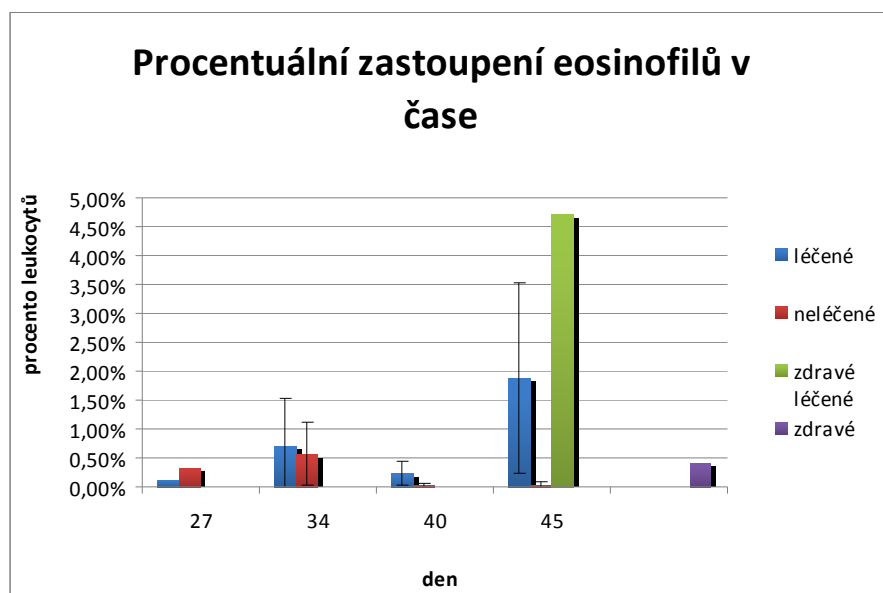
OBR. 19: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ LYMFOCYTŮ

Procentuální zastoupení monocytů rostlo s velikostí nádorů (viz obr. 20).



OBR. 20: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ MONOCYTŮ

Nárůst eosinofilů obecně signalizuje počátek uzdravování, což odpovídá malým nádorům zjištěným 45 den (viz obr. 21).

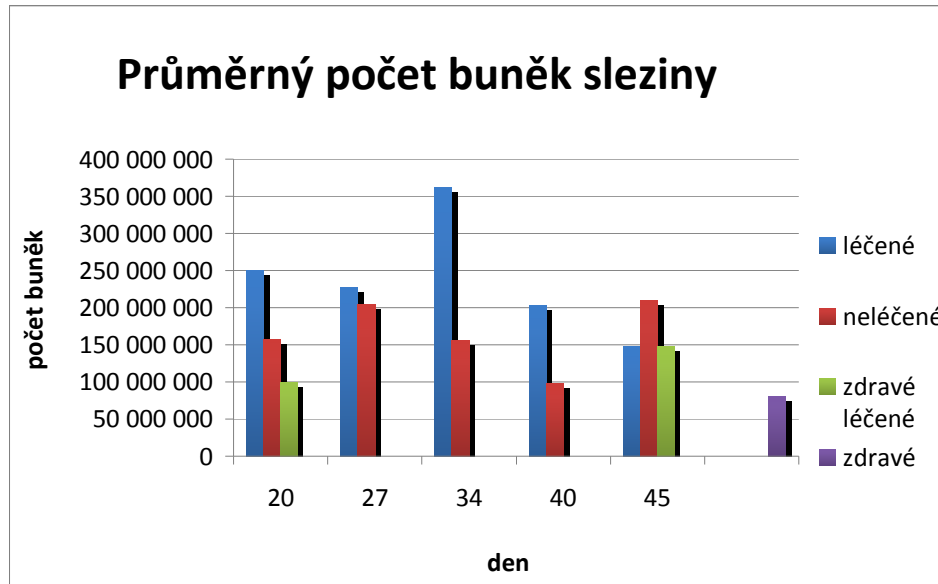


OBR. 21: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ EOSINOFILŮ

Ve všech dalších sledovaných hematologických parametrech, jako je koncentrace erytrocytů, koncentrace hemoglobinu, procentuální zastoupení hematokritu, průměrný korpuskulární objem, průměrný korpuskulární hemoglobin, průměrná koncentrace korpuskulárního hemoglobinu, distribuce erytrocytů, koncentrace trombocytů a průměrný objem trombocytů, nebyly zaznamenány významné změny, které by korelovaly se způsobem léčby nádor nesoucích myši, případně vznikly v důsledku působení léčebného preparátu na zdravé myši.

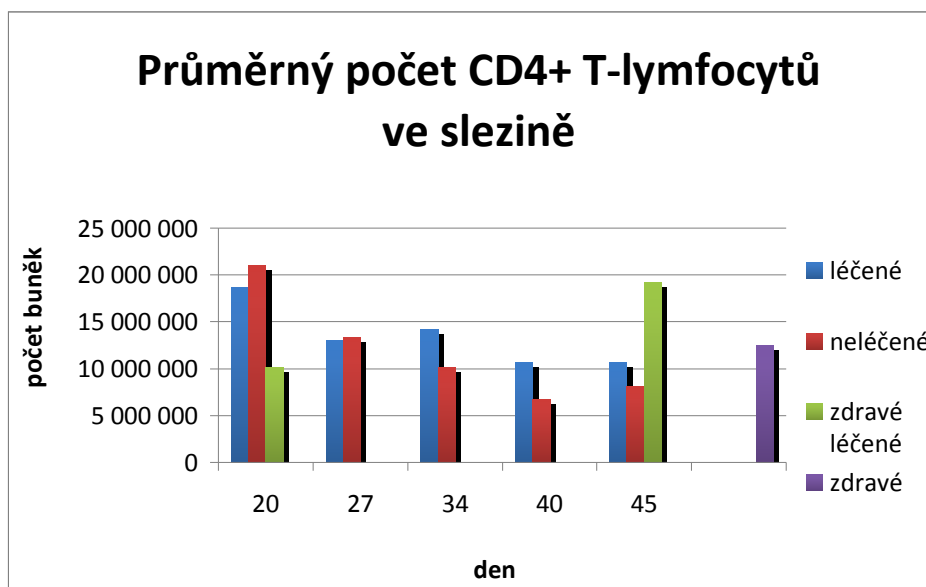
4.3.5 Průtoková cytometrie

Průměrný počet buněk sleziny byl spjat jednak s terapií, ale i s velikostí nádorů (viz obr. 22).

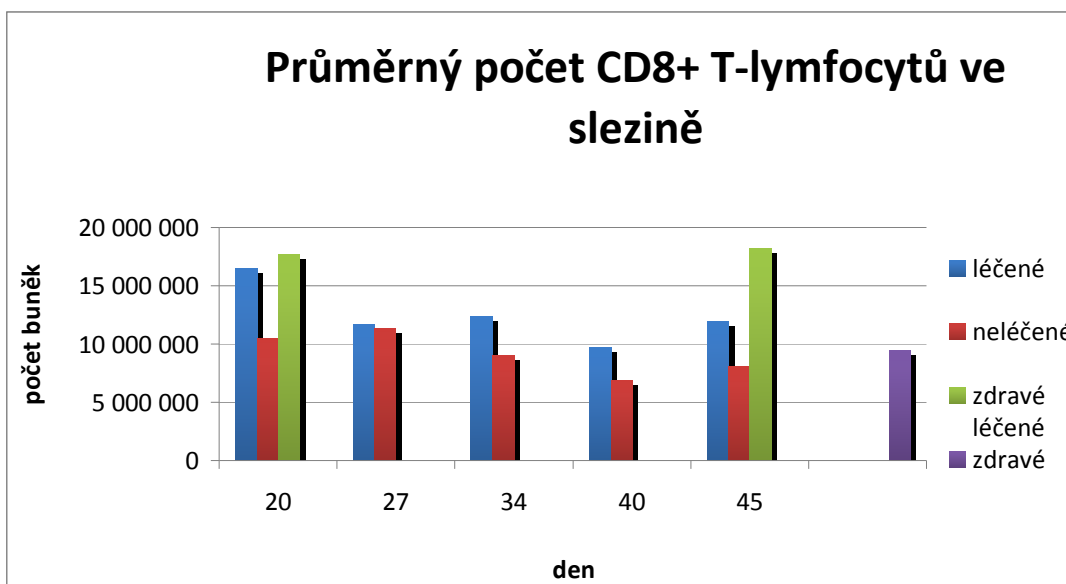


OBR. 22: PRŮMĚRNÝ POČET BUNĚK SLEZINY

V průběhu experimentu došlo u všech myší (léčených i neléčených) ke změně poměru CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů z původních 2:1 na 1:1. Co se týče rozdílu mezi skupinami v počtu CD4⁺ a CD8⁺, měla na pokles jejich počtu ve slezině vliv velikost nádoru, na začátku experimentu došlo u obou skupin ke zvýšení počtu buněk (viz obr. 23, 24), nicméně v dalším průběhu byla tato tendence spíše opačná. Na konci se léčená skupina přiblížila hodnotám zdravých jedinců, zatímco hodnoty v neléčené skupině byly nižší.

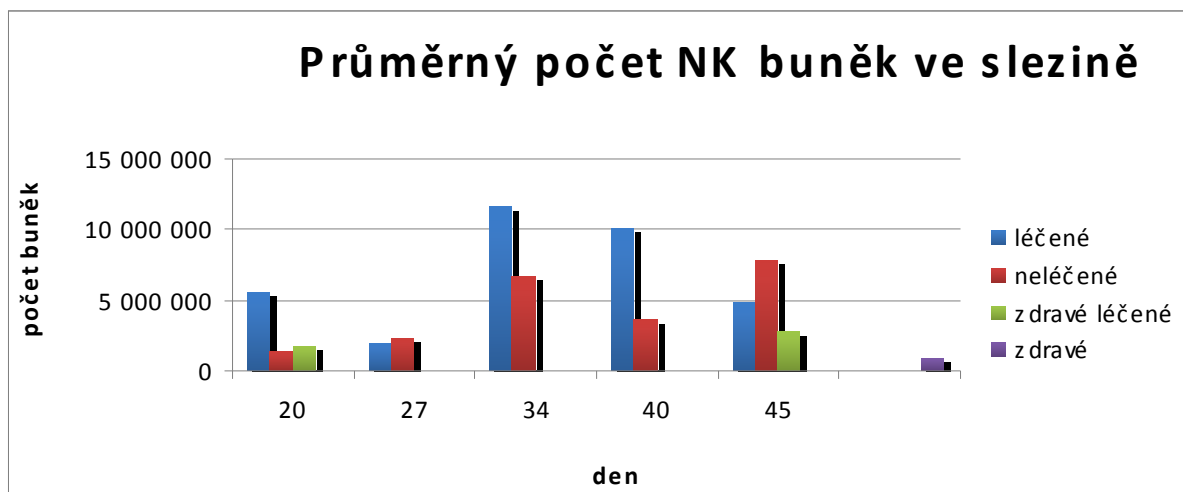


OBR. 23: PRŮMĚRNÝ POČET CD4+ T- LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ



OBR. 24: PRŮMĚRNÝ POČET CD8+ T-LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ

Na počet NK buněk měly vliv jak velikost nádoru, tak i terapie. Na začátku experimentu lze v grafu vidět výrazný rozdíl v počtu mezi léčenou a neléčenou skupinou (viz obr. 25). Ještě 40. den bylo ve slezinách myší léčené skupiny podstatně více NK buněk než u myší neléčených. 45. den ale byla skutečnost opačná, což lze přičíst výrazně většímu objemu nádorů v kontrolní skupině.

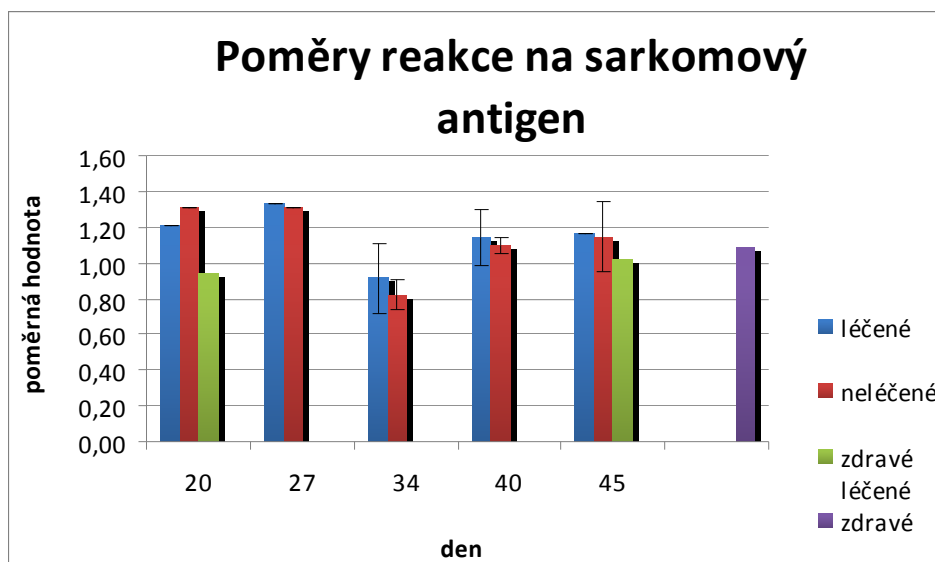


OBR. 25: PRŮMĚRNÝ POČET NK BUNĚK VE SLEZINĚ

4.3.6 Blastická transformace

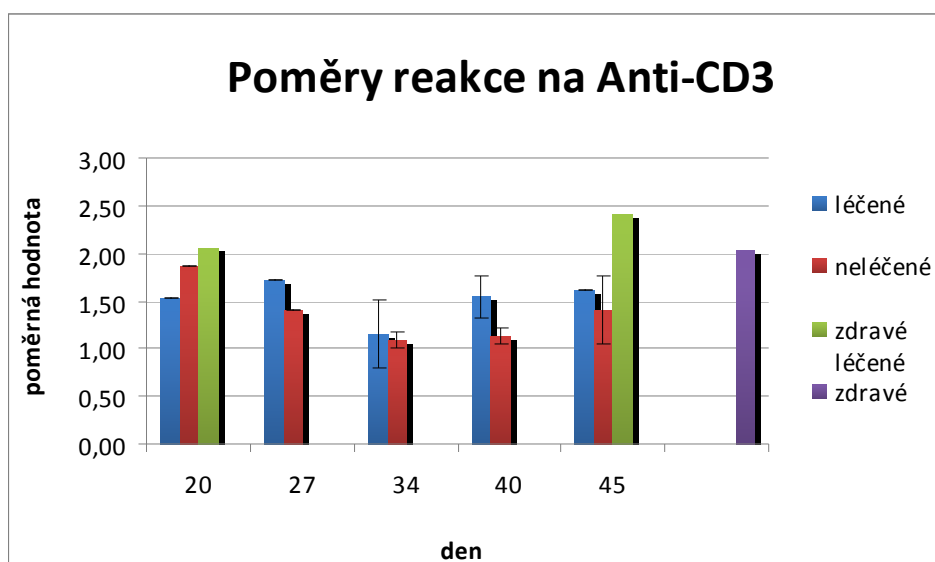
Naměřené absorbance byly u buněk reagujících na sarkomový antigen a anti-CD3 byla vztažena k negativní kontrole a jejich poměry byly vyneseny do grafu. U zdravé myši je reakce na sarkomový antigen nulová a na anti-CD3 vůči negativní kontrole dvojnásobná.

Reakce splenocytů na sarkomový antigen nebyla moc výrazná a v rámci skupin se takřka nelišila (viz obr. 26).



OBR. 26: POMĚRY REAKCE NA SARKOMOVÝ ANTIGEN V BLASTICKÉ TRANSFORMACI

Reakce na Anti-CD3 byla však patrnější v léčené skupině (viz obr. 27).



OBR. 27: POMĚRY REAKCE NA ANTI-CD3 V BLASTICKÉ TRANSFORMACI

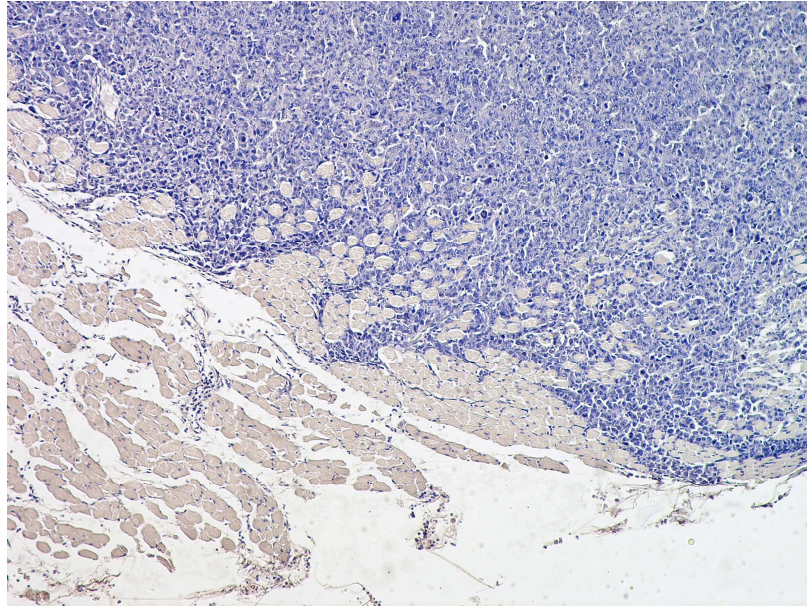
4.3.7 Elisa test

Výsledky Elisa testu v případě IL-10 nevyšly v souladu s očekáváním, jeho hladina u neléčených myší klesala a u léčených stoupala. Hladina interferonu sice u léčených myší s nádorem rostla, ale vzhledem k tomu, že test byl proveden pouze jednou a nebyl opakován, nebyly z těchto výsledků vyvozeny žádné závěry a v dalších testech bude tento poznatek potvrzen či vyvrácen.

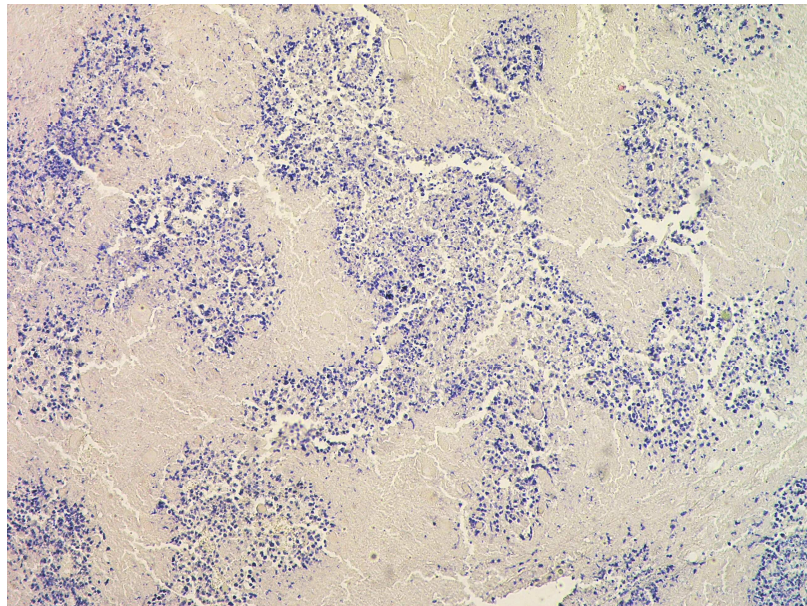
4.3.8 Histologie

Invasivita nádoru z hlediska prorůstání do svalové tkáně byla u obou skupin shodná (viz obr. 28). Velké nádory nekrotizovaly zevnitř v důsledku nedostatku výživy (viz obr. 29). Ve tkáních tumorů léčených myší byl zaznamenán větší výskyt děr (viz obr. 30). Vaskularizace nádoru by měla být předmětem dalšího studia, neboť histologie se nezdá být nejlepší metodou její kvantifikace.

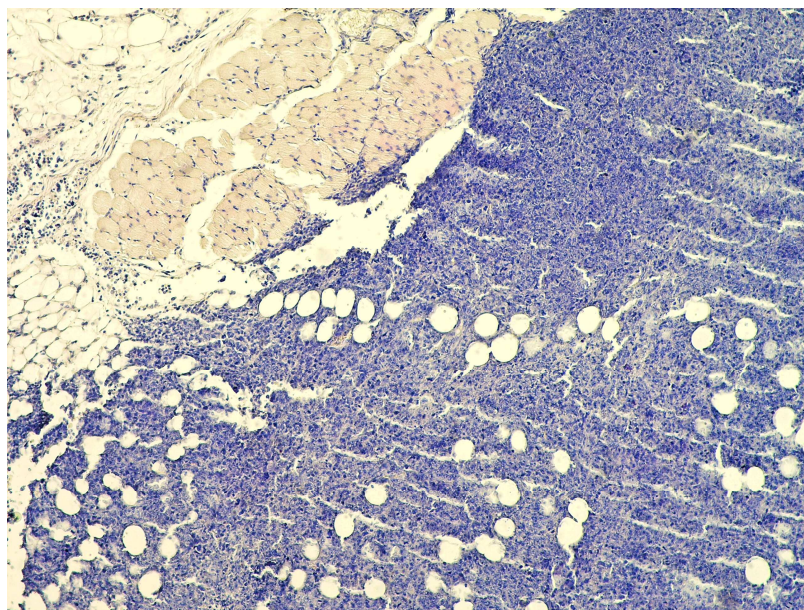
Metastázy nebyly pozorovány ani v jedné skupině myší. Což je dáno i modelem, který je, jak jsem již uvedla v úvodu, málo metastazující.



OBR. 28: PRORŮSTÁNÍ TUMORU DO SVALOVÉ TKÁNĚ, ZV. 100X



OBR. 29: NEKROTIZACE TUMORU V DŮSLEDKU NEDOSTATKU VÝŽIVY, ZV. 100X



OBR. 30: DÍRY V NÁDOROVÉ TKÁNI, ZV. 100X

4.3.9 Další zjištění

Během pokusu byly také zjištěny změny v kvalitě srsti myší (viz obr. 31, 32) a v jejich celkové aktivitě.



OBR. 31: KVALITA SRSTI – SKUPINA I – LÉČENÉ MYŠI



OBR. 32: KVALITA SRSTI – SKUPINA II – NELÉČENÉ MYŠI

5. DISKUSE

Dosažené výsledky je poněkud obtížné srovnávat s literaturou, neboť ostatní autoři pracovali jinak a na jiných modelech. My jsme studovali sarkom S-180, který je charakteristický tím, že metastázuje jen výjimečně. Wald a spol. 1998 studoval terapii plicního karcinomu a melanomu B16 (Wald a spol. 2001). To, že tento model byl ryze metastázovým, bylo zdůrazněno odstraněním „primárního“ tumoru. Pro terapii byly použity enzymy v aktivní formě (trypsin, chymotrypsin, papain), jejichž působení, jak prokázala Kalferstová a Ženka (v přípravě) není shodné s působením proenzymů. Byla použita perrektální aplikace velmi vysokých množství enzymů (řádově vyšší koncentrace, než v našem případě). Novák a Trnka 2005 testovali trypsinogen ve směsi s amylázou, použili však opět stejný metastázový model melanomu B16 s odstraněním „primárního“ nádoru desátý den.

Zcela mimo jakékoliv srovnání jsou studie firmy Wobe-Mugos, založené na perorální aplikaci aktivních enzymů, neboť je zde velmi diskutovatelné množství vstřebaných enzymů. (Gewert a spol. 2004, Ziv a spol. 1987, Šťastný a spol. 2002).

Působení trypsinogenu a chymotrypsinogenu se zdá být synergické. Mechanismus jejich účinku zřejmě není identický, jinak by jejich působení bylo pouze aditivní. Přesné zjištění mechanismu však vyžaduje další studium.

Optimální směs se zdá být trypsinogen, chymotrypsinogen a amyláza, která způsobila redukci nádoru až na 40,5%. Směs navíc dokázala udržet kulovitý tvar nádorů a omezila jejich penetraci do těla myši. Optimalizovali jsme množství amylázy, osvědčilo se používání vyšších koncentrací, než použil Novák a Trnka, 2005.

Vliv na přežití byl v prvním pokuse na hranici statistické významnosti. Byl sice nižší než ve studiích Walda a spol., 1998, 2001) a Nováka a Trnky, 2005, srovnání je však obtížné. V našem případě došlo k rychlému růstu transplantovaného nádoru, který působil u většiny myši úhyn v důsledku tlaku na vnitřní orgány. Ve zmíněných studiích byl primární nádor odstraněn, myši byly vystaveny jen omezené dávce metastazujících buněk, jejichž přichycení bylo ovlivňováno terapií.

Ve druhém pokusu byl prokázán význam terapeutické dávky. Pětinásobné množství se ukázalo být neúčinným. Ukázalo se, že je nutné používat optimální množství proenzymů, což bylo potvrzeno i v oblasti terapie aktivními enzymy (Kalferstová, Ženka, v přípravě). Význam

tohoto zjištění je zásadní, neboť zpochybňuje veškeré způsoby aplikace, kdy nelze zaručit aplikaci správné terapeutické dávky (zejména perorální aplikace).

Spojení proenzymoterapie s vakcinací se ukázalo jako neúčinné. Samotná vakcinace dokázala na několik dní pozdržet růst nádoru, což je velmi pozoruhodný výsledek (většinou preparáty pouze snižují rychlost růstu nádorů), poté ale došlo k prudkému zvýšení nádorového růstu. Samotná proenzymoterapie zpomalovala růst nádorů. Spojení vakcinace a proenzymoterapie vedlo ke zrušení všech efektů a vyústilo v úplnou neúčinnost této kombinace. Vysvětlení je možno spatřovat v tom, že vakcinace stáhne na sebe pozornost imunitního systému a kompetuje s rozvíjejícím se nádorem o jeho působení. Pro potřeby konstrukce žádoucích synergických systému je třeba pečlivě hledat systémy, které budou nezávislé, nebo si nebudou alespoň konkurovat.

Ze srovnání prvního a druhého pokusu plyne, že výsledky proenzymoterapie (redukce nádorového růstu, prodloužení přežití) výrazně závisí na včasnosti aplikace terapie.

Třetí pokus byl zaměřen na screening parametrů, které rakovina ovlivňuje. Pozornost byla zaměřena na srovnání skupiny léčených a neléčených myší s nádory. Jako v předchozích pokusech byl zaznamenán vliv terapie na růst nádoru, který se 22., 26., 33. a 37. den ukázal jako statisticky významný. Dále byl potvrzen vliv léčby na stav hmatových vousů, který 38. a 41. den dosáhl statistické významnosti.

V periferní krvi byly u obou skupin zvýšeny leukocyty, a to zejména neutrofilů, tento efekt nebyl spjat s léčbou, ale zjevně s velikostí tumoru. Hladina lymfocytů byla snížena, což byl zřejmě důsledek vlivu tumoru, jelikož ve skupině zdravých léčených myší došlo k jejich prudkému nárůstu. Hladina monocytů rostla s velikostí tumoru. U léčených a zdravých léčených myší byl pozorován vysoký nárůst eosinofilů, což obecně signalizuje proces uzdravování a koreluje s velikostí nádorů 45. den. Ostatní parametry nebyly terapií ovlivněny, terapie tudíž nevykazuje žádné výrazné vedlejší efekty.

Průtokovou cytometrií byl zjištěn nárůst počtu NK buněk a CD8+ T lymfocytů, z čehož by pravděpodobně mohl být odvozen mechanismus účinku léčby, který by spočíval v nespecifické stimulaci imunitního systému. Nicméně tyto domněnky je třeba potvrdit dalším pozorováním.

Ve skupině léčených myší byla reakce na stimul Anti-CD3 výraznější než ve skupině neléčených myší, rovněž ve skupině zdravých léčených myší byl pozorován stejný trend. Z výsledků je zřejmý suprimační vliv nádorů na T lymfocyty a jeho částečné rušení

proenzymoterapií. Vliv stimulace sarkomovým antigenem byl dle očekávání velmi nízký, neboť nádorové antigeny jsou všeobecně imunitním systémem málo rozpoznávány.

Histologie prokázala u obou skupin stejnou invazivitu nádorů z hlediska prorůstání nádorů do svalové tkáně. Velké nádory byly u obou skupin nekrotizované zevnitř z důvodu nedostatku výživy. Avšak u skupiny léčených myší byl prokázán častější výskyt děr v nádorové tkáni i při povrchu nádoru.

Další výzkum chceme zaměřit na hlubší poznání mechanismů působení proenzymoterapie nádorových onemocnění zejména v oblasti výše pozorovaných změn imunologických parametrů.

6. SOUHRN

- Byl prokázán synergický účín trypsinogenu a chymotrypsinogenu při terapii sarkomu S-180
- Proenzymoterapi založená na směsi trypsinogenu, chymotrypsinogenu a podpůrné amyláze v námi optimalizované koncentraci výrazně redukovala růst nádorů
- Tato proenzymoterapie pozitivně ovlivnila dobu přežití
- Experimenty upozornily na vliv terapie na stav hmatových vousů. Souvislost s hlavními či vedlejšími mechanismy působení terapie je však třeba dále studovat
- Byla zjištěna důležitost správné koncentrace proenzymů, což má význam pro optimalizace terapie a zvážování vhodné aplikační cesty
- Proenzymoterapie nebyla kombinovatelná s vakcínací.
- Bylo zjištěno, že na úspěšnost terapie má vliv doba jejího započetí po transplantaci nádoru
- Terapie nevykazovala výrazný vliv na hematologické parametry
- Pod vlivem léčby dochází ke stimulaci imunitního systému, zvyšují se počty NK buněk a CD8+ lymfocytů. Dochází k částečnému potlačení imunosuprese T lymfocytů dané nádorem.

7. LITERATURA

- Asselin-Paturel C, Echcharkir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, Chouaib S, Mami-Chouaib F: Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta 1 cytokine expression in tumor, TIL and PLB of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 77: 7.
- Beard J. The action of 'trypsin' upon living cells of the Jensen sarcoma. *Brit Med J* 1906;1:140-141
- Beard J. *The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis*. London, Chatto and Windus 1911.
- Binstadt BA, Brumbaugh KM, Leibson PJ: Signal transduction by human NK cell MHC-recognizing receptors. *Immunological Reviews* 1997; 155 (1):197.
- Birkenmeier G, Kampfer I, Kratzsch J, Schellenberger W: Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognised by the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *Eur J Endocrinol* 1998; 139 (2):224-230.
- Borth W, Luger TA: Identification of alpha 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 beta to "F" alpha 2-macroglobulin. *J.Biol.Chem.* 1989; 264 (10):5818-5825.
- Borth W, Teodorescu M: Inactivation of human interleukin-2 (IL-2) by alpha 2-macroglobulintrypsin complexes. *Immunology* 1986; 57 (3):367-371.
- Crookston KP, Webb DJ, Wolf BB, Gonias SL: Classification of alpha 2-macroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J Biol Chem* 1994; 269 (2):1533-40.
- Da Silva GC, Teixeira N, Bell SC: 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.* 1996 (1): 103-10.
- Desser L, Holomanova D., Zavadová E., Pavelka K., Mohr T., Herbacek I.: Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF- β levels in human blood. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2001; 47: S10-S15.
- Fearon EC: Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *SCIENCE* 1997 278: 1034 – 1050

- Feige JJ, Negoescu A, Keramidas M, Souchelnskiy M, Chambaz EM: Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor- beta and various cytokines. *Horm.Res.* 1996; 45 (3-5):227-232,
- Garber TR, Gonias SL, Webb DJ: Interleukin-4 and IL-10 bind covalently to activated human alpha(2)-Macroglobulin by a mechanism that requires Cys(949). *Journal Of Interferon And Cytosine Research* 2000; 20 (2):125-131.
- Gouin-Charnet A; Laune D; Granier C; Mani JC; Pau B; Mourad G; Argiles A: 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.* 2000 Apr; 98(4): 427-33
- Harthun NL, Weaver AM, Brinckerhoff LH, Deacon DH, Gonias SL, Slingluff CL: Activated alpha 2-macroglobulin reverses the immunosuppressive activity in human breast cancer cell-conditioned medium by selectively neutralising transforming growth factor-beta in the presence of interleukin-2. *J Immunother* 1997;21(1):85-94.
- Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY: The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; 18(10):493-7.
- Chuaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chuaib F, Caignard A, Blay JY: The host immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; 18: 493.
- Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakuraiy MK, Ohnishi Y, Ueyama Y, Nomura T: Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn J Cancer Res* 1986;77:190-196.
- James K, van den Haan J, Lens S, Farmer K: Preliminary studies on the interaction of TNF alpha and IFN gamma with alpha 2-macroglobulin. *Immunol-Lett.* 1992; 32(1): 49-57.
- Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dobinett SM, Mc Hugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K: IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T-cell immune response. *J Immunol* 1995; 155:2240
- Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G: Transformed alpha 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein. *Acta Paediatr.Suppl.* 1996: 417:108-110,
- Krebs ET, Jr. Krebs ET, Beard HH. The trophoblastic thesis of malignancy. *Medical Record* 1950;163:148.

- Kurdowska A, Carr FK, Stevens MD, Baughman RP, Martin TR: 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.* 1997; 158 (4):1930-1940.
- Liebl DJ, Koo PH: Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 1993; 193(3): 1255-61.
- Maeda H, Shiraishi A: TGF-beta contributes to the shift Th2-type responses through direct IL-10 mediated pathways in tumor-bearing mouse. *J. Immunol* 1996, 156:73
- Matsuda T, Hirano T, Nagasawa S, Kishimoto T: Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J Immunol* 1989; 142 (1):148-152.
- Niemuller CA, Randall KJ, Webb DJ, Gonias SL, LaMarre J: Alpha 2-macroglobulin conformation determines binding affinity for activin A and plasma clearance of activin A/alpha 2-macroglobulin complex. *Endocrinology* 1995; 136 (12):5343-5349.
- Novak JF, Trnka F: Proenzyme therapy of Cancer. *Anticancer research* 2005; 25: 1157-1178.
- Onishi T, Onishi Y, Imagava K, Ohmoto Y, Murata K: An assessment of immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. *British Journal of Urol Int* 1999; 83: 488.
- Panyutich A, Ganz T: Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am-JRespir-Cell-Mol-Biol.* 1991; (2): 101-6.
- Pollock RE, Roth JA. Cancer-induced immunosuppression: implications for therapy *Semin Surg Oncol* 1989;5(6):414-9.
- Říhová B: Protinádorová imunita a cílená terapie. *Buněčné a molekulární základy Imunologie, Česká Imunologická společnost* 2007, 169-179.
- Shih JY, Yuan A, Chen JJW, Yang PC: Tumor-Associated Macrophage: Its Role in Cancer Invasion and Metastasis. *J. Cancer Mol.* 2006; 2(3): 101-106.
- Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT: Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 339-359.
- U. S. National Cancer Institute, www.cancer.gov 22/2/2008
- Varhan JM, Vale WW: Alpha 2-macroglobulin is a binding protein of inhibin and activin. *Endocrinology* 1993; 132 (5):2038-2050.

- Wald M, Oleár T, Poučková P, Zadinová M: Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C₅₇Bl₆ mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sciences* 1998; 63 (17), 237-243.
- Wald M, Oleár T, Šebková V, Zadinová M, Boubelík M, Poučková P: Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C₁₇Bl₆ mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47 (Suppl): S16-S22.
- Webb DJ, Weaver AM, Atkins BTL, Goulias SL: Proteinases are isoform-specific regulators of the binding of transforming growth factor beta to alpha 2-macroglobulin. *Biochem.J.* 1996;320, 551-555.
- Yang Y, Dukhanina O, Tang B, et al.: Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest* 2002; 109 (12):1607-15.