

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**KOMBINOVATELNOST
PROENZYMOTERAPIE S LÁTKAMI
PŘÍMO ATAKUJÍCÍMI MALIGNÍ
NÁDORY**

Bakalářská práce

Veronika Živná

Vedoucí práce: RNDr. Jan ŽENKA, CSc.

České Budějovice, 2010

ŽIVNÁ VERONIKA., 2010: KOMBINOVATELNOST PROENZYMOTERAPIE S LÁTKAMI PŘÍMO
ATAKUJÍCÍMI MALIGNÍ NÁDORY [COMBINABILITY OF PROENZYME THERAPY WITH DRUGS
DIRECTLY INVADING MALIGNANT TUMORS, Bc. THESIS, IN CZECH] - P., FACULTY OF NATURAL
SCIENCES, THE UNIVERSITY OF SOUTH BOHEMIA, ČESKÉ BUDĚJOVICE, CZECH REPUBLIC.

Annotation: The aim of this study was to evaluate the effect of both proenzyme therapy and of preparation Ovosan on the growth of melanoma B16-F10 and to find out possibilities of combination of both therapies. Ovosan revealed strong therapeutical effect, but the possibilities of mentioned combination are limited. Experiments on sarcoma S-180 bearing SCID mice indicate indirect effect of Ovosan, which seems to be dependent on acquired immunity.

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 30.4.2010

.....
Veronika Živná

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vedení práce, věnovaný čas a trpělivost, doc. RNDr. Janu Kopeckému CSc., pracovníkům oddělení Imunologie parazitóz za poskytnutí prostor k realizaci pokusu, své rodině za podporu a celému „týmu“, za pomoc při pokusech.

OBSAH:

1. ÚVOD.....	6
1.1 CO JE RAKOVINA.....	6
1.1.1 KLASIFIKACE RAKOVINY	6
1.1.2 PŘÍČINY RAKOVINY A VLASTNOSTI NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	6
1.1.3 RŮST NÁDORU.....	7
1.1.4 LÉČBA RAKOVINY.....	8
1.2. SARKOM	8
1.3 MELANOM	8
1.4 OVOSAN	8
1.5 IMATINIB.....	10
1.6 ENZYMOTERAPIE	11
1.7 PROENZYMOTERAPIE.....	12
2. CÍLE PRÁCE	14
3. MATERIÁL A METODY.....	15
3.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA	15
3.2 NÁDOROVÉ BUŇKY.....	15
3.3 CHEMIKÁLIE.....	15
3.4 TRANSPLANTACE NÁDORU.....	15
3.4.1 PRVNÍ EXPERIMENT	15
3.4.2 DRUHÝ EXPERIMENT	16
3.4.3 TŘETÍ EXPERIMENT.....	16
3.5 ORGANIZACE JEDNOTLIVÝCH EXPERIMENTŮ.....	16
3.5.1 PRVNÍ EXPERIMENT IN VIVO.....	16
3.5.2 DRUHÝ EXPERIMENT IN VIVO	17
3.5.3 TŘETÍ EXPERIMENT IN VIVO.....	17
3.5.4 IN VITRO EXPERIMENT.....	17
3.6 MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ.....	18
3.7 ZPRACOVÁNÍ DAT	18
4. VÝSLEDKY.....	19
4.1 PRVNÍ EXPERIMENT	19
4.1.1 VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORU.....	19
4.1.2 PŘEŽITÍ V JEDNOTLIVÝCH SKUPINÁCH.....	20
4.2 DRUHÝ EXPERIMENT	20
4.2.1 VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORU.....	21
4.3 TŘETÍ EXPERIMENT.....	21
4.4 IN VITRO EXPERIMENT.....	22
5. DISKUSE	24

6. SOUHRN.....	27
7. LITERATURA.....	28

1. ÚVOD

1.1 CO JE RAKOVINA?

Rakovinu lze definovat jako skupinu nemocí, jejichž společným znakem je neomezený růst buněk ve srovnání s růstem normálních buněk v okolní tkáni (Horton a Hill, 1977). Je to genetická choroba-následek patologických změn v informaci nesené DNA. Od ostatních genetických chorob se liší tím, že mutace způsobující rakovinu jsou převážně somatické. Rakovina je následkem mutace a přirozeného výběru v populaci buněk tvořících tělo. K přeměně normální buňky na rakovinnou je třeba více než jedna mutace. Dominantně funkčními mutacemi mohou vznikat onkogeny které vývoj rakoviny podporují (Alberts a kol., 1998).

1.1.1 KLASIFIKACE RAKOVINY

Zatím nebyla přijata jednotná klasifikace různých typů rakoviny. Podle Willise je histogeneze a biologické chování nádorů nejdůležitějším rysem a navrhuje rozdělení nádorů do pěti hlavních skupin:

- Nádory epiteliálního původu (papilom, adenom, karcinom)
- Nádory nehemoetické mezenchymální tkáně (fibrom, lipom, osteom, hemangiom, sarkomy)
- Nádory hemoetických a lymfoidních tkání (myelom, leukémie)
- Nádory nervové tkáně (gliom)
- Smíšené nádory (melanom, teratom)

(Horton a Hill, 1977)

1.1.2 PŘÍČINY RAKOVINY A VLASTNOSTI NÁDOROVÝCH BUŇEK

Rakovinné buňky jsou charakterizovány dvěma dědičnými vlastnostmi:

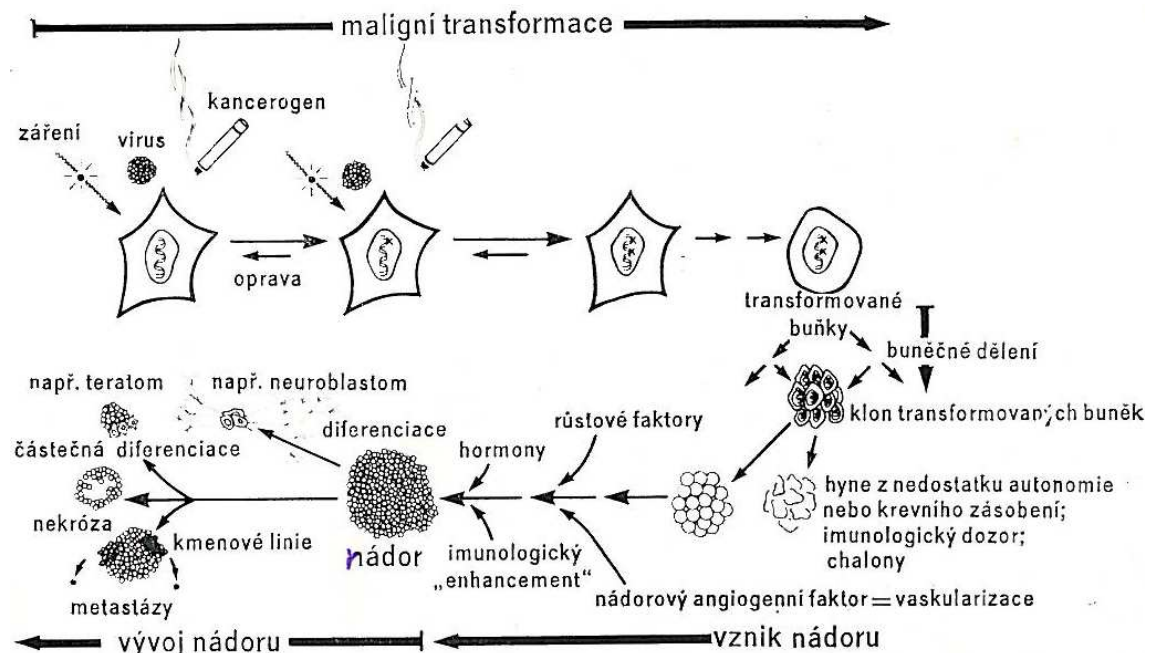
- Ony samy i jejich potomstvo se rozmnožují i bez přítomnosti stimulů k dělení
- Invadují a kolonizují oblasti které jsou normálně vyhrazené pro jiné buňky

U benigních nádorů mají jejich buňky pouze první vlastnost, ale zůstávají na jednom místě, u maligních nádorů buňky mají schopnost invadovat do okolní tkáně (Alberts a kol., 1998).

Nádorové buňky ztratily schopnost reagovat na normální podněty, regulující jejich proliferaci a diferenciaci. První zjevnou změnou buňky při postupném vývoji rakoviny

je transformace. Transformované buňky se morfologicky liší od původních buněk, z nichž vznikly. O tom, zda se transformovaná buňka stane nádorovou, rozhoduje řada faktorů. Aby vznikl nádor, musí se transformovaná buňka nejprve pomnožit. Nádorové buňky mohou však být rozpoznány jako organismu cizí a v důsledku toho zničeny imunitním systémem (imunologický dozor).

Rakovina je konečným výsledkem postupného procesu interakcí na úrovni chemické, biochemické, buněčné, tkáňové, orgánové až po reakci celého organismu. Jednotlivé stupně mohou být iniciovány a stimulovány řadou faktorů- působením virů, chemických kancerogenů, fyzikálních kancerogenů.



Obr.1: Vznik a vývoj nádoru

(Horton a Hill, 1977)

1.1.3 RŮST NÁDORU

Rychlost růstu nádoru se vyjadřuje jako čas potřebný ke zdvojení objemu nádoru.

Lidské nádory mají dlouhý čas ke zdvojení objemu-od 1 týdne až 1 roku. Nádor obsahuje asi 10^9 buněk v 1g nádorové masy. Většinu nádorů se nepodaří objevit dokud nedosáhnou velikosti 10^9 až 10^{12} buněk. Faktory ovlivňující rychlost růstu nádoru: rychlost replikace proliferujících buněk, zastoupení proliferujících buněk v celkové buněčné populaci, rychlost ztráty buněk z nádoru (Horton a Hill, 1977).

1.1.4 LÉČBA RAKOVINY

Chemoterapie- typ léčby rakoviny který s použitím léků pracuje tak, že zastavuje nebo zpomaluje růst rakovinných buněk.

Ozařování- použití vysokoenergetické radiace z X-paprsků, gamma paprsků a jiných zdrojů k zabití rakovinných buněk a zmenšení nádorů.

Bio terapie- bioterapie vede k posílení nebo k obnovení schopnosti imunitního systému bojovat s rakovinou, infekcemi a jinými nemocemi. Také se používá pro zmírnění vedlejších účinků které mohou být způsobeny některými léčebnými postupy.

Používanými agens jsou monoklonální protilátky, růstové faktory a vakcíny. Ty mohou mít také přímé protinádorové účinky (U.S. National cancer institute, 2010).

1.2 SARKOM

Obecné označení pro zhoubný nádor z pojivové tkáně (vazivo, chrupavka, kost), krvetvorné a lymfatické tkáně či svalů. Podle tkáně původu se také nazývá (Vokurka a Hugo, 1998).

Velké množství genetické informace sarkomu se nahromadilo během posledních dvou desetiletí s přispěním diagnóz a léčby. V posledním vydání World Health Organization classification, je uvedeno přibližně 40 rozdílných typů sarkomů (Toguchida a Nakayama, 2009).

Sarkom S-180 je jedním z transplantovatelných, nemetastazujících nádorů pojivové tkáně myši (Worley a Spater, 1952).

1.3 MELANOM

Forma rakoviny která začíná v melanocytech (buňkách které vytváří pigment melanin) (U.S. National cancer institute, 2010).

Bývá zejména na kůži ale může být i na sliznicích či v oku. Velkou roli při jeho vzniku má sluneční záření a úbytek ozonu. Projevuje se jako pigmentová skvrna která má nestejnou barvu a nepravidelné okraje (Vokurka a Hugo, 1998).

B16-F10 melanom patří mezi nejagresivnější, špatně imunogenní myši nádory (Pan a kol., 1999).

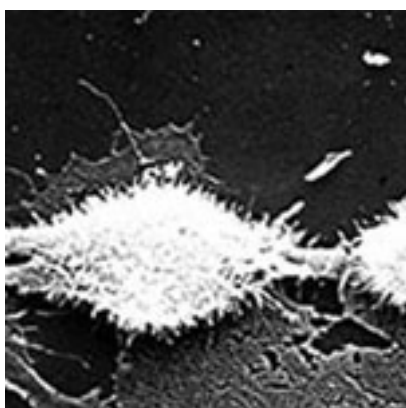
1.4 OVOSAN

Ovosan je komplex biologicky aktivních fosfolipidů, je připravován jako 30% suspenze ve slunečnicovém oleji. Je vyráběn firmou Areko spol. s.r.o. na základě dlouhodobého

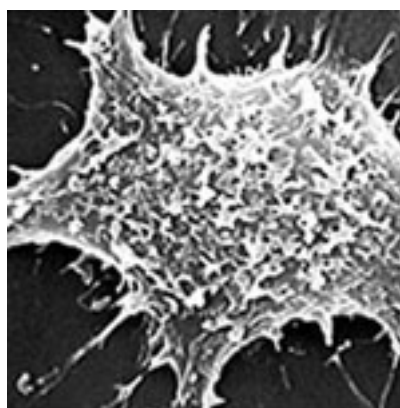
výzkumu RNDr. Jindřicha Káry DrSc. Suspenze vaječných fosfolipidů má jako základní součásti PNAE (30%) a vaječný lecitin (60%). Ether fosfolipidy inhibují aktivitu protein-kinázy C a indukují selektivní destrukci membrán nádorových buněk (Kára a kol., 1986, 2000).

Mechanismus účinku:

Účinnou látkou je ether fosfolipid PNAE (plasmanyl-N-acyl-etanolamin). Jeho působení je založeno na rozdílném metabolismu ether fosfolipidů ve zdravé a nádorové buňce. Ve zdravých buňkách je přítomen enzym alkyl-glycerolmonooxygenáza, který štěpí etherickou vazbu v molekule PNAE. Vzniklé štěpy jsou dále využity pro biosyntézu lipidů a fosfolipidů, které jsou nezbytnou součástí buněčných membrán. V nádorových buňkách tento enzym chybí nebo je téměř inaktivní, což vede ke kumulaci ether fosfolipidů PNAE v membránách nádorových buněk a jejich destrukci (Kára a kol., 1989) (Obr 2 a 3) zatímco zdravé buňky zůstávají nepoškozeny.



Obr.2: Elektron-scanning mikrofotografie lidské nádorové buňky HEp-2 v tkáňové kultuře. Výběžky (mikrovily) na povrchu buňky jsou typické pro živou buňku.



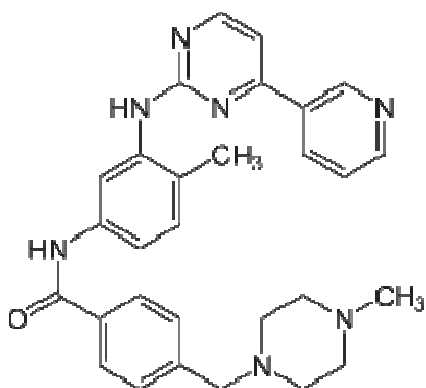
Obr.3: Elektron-scanning mikrofotografie buňky HEp-2 vystavené působení PNAE (50µg/ml) po dobu 24 h. Jsou patrné otvory v buněčné membráně.

Dalším pozitivem je inhibiční působení na proteinkinázu C (PKC), která se v nádorových buňkách vyskytuje ve zvýšené koncentraci. PKC je vnitřním přenašečem signálu v buňce. Ovlivňuje enzymové systémy, které hrají důležitou roli v regulaci buněčné proliferace. Kompetitivní inhibice PKC semisyntetickým preparátem PNAE nemá toxické účinky (Kára a kol., 1993, 2000, Mikhaewich a kol., 1991).

Dále bylo empiricky zjištěno, že užívání Ovosanu podporuje funkce imunitního systému. Úspěšně byl aplikován například při léčbě autoimunitních a alergických onemocnění (Kára, 2000).

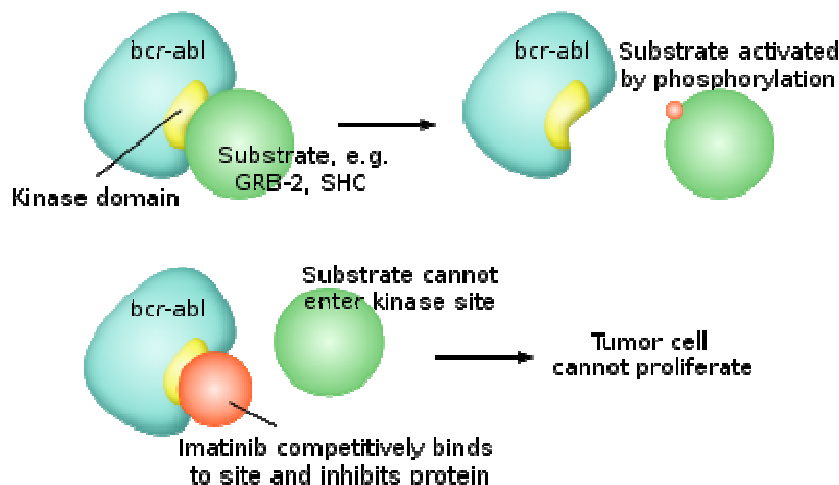
1.5 IMATINIB

Imatinib je lék užívaný k léčbě určitých typů rakoviny. V současné době je prodávána firmou Novartis jako Gleevec (USA) nebo Glivec (Evropa, Austrálie, Jižní Amerika) jeho mesylovaná sůl, imatinib mesylát (INN). Je používán především k léčbě chronické myeloidní leukémie, akutní lymfatické leukémie a gastrointestinálních stromálních nádorů (GISTs). Dá se ale také použít při léčbě maligního melanomu (Wyman a kol., 2006). Je prvním členem nové třídy činidel, která působí specifickým blokováním určitého enzymu, což je lepší než nespecifická blokace a zabíjení všech rychle se dělících buněk.



Obr. 4: Chemický vzorec Imatinibu

Imatinib byl vynalezen v 90. letech 19. století biochemikem Nicholasem Lydonem, bývalým výzkumníkem pro Novartis, onkologem Brianem Drukerem z Oregon Health and Science University (OHSU), a Charlesem Sawyerem z Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, který vedl klinické pokusy potvrzující jeho účinnost při chronické myeloidní leukémii. k jeho vývoji také přispěli Carlo Gambacorti-Passerini, vědec z Univerzity v Miláně v Itálii a John Goldman, hematolog z Hammersmithské nemocnice v Londýně.



Obr. 5: Mechanismus působení Imatinibu

Imatinib je derivát 2-fenylaminopyrimidinu. Funguje jako specifický inhibitor tyrosin kináz. Obsazuje aktivní místo tyrosin kináz, což vede ke snížení jejich aktivity (Obr.5) (Wikipedia, 2010).

Imatinib se váže na vnitrobuněčný váček umístěný uvnitř tyrosin kináz a tím inhibuje vazbu ATP a brání fosforylaci a následné aktivaci růstových receptorů a jejich cestě přenášející signál. Tato látka inhibuje tyrosin kinázy kódované bcr-abl onkogenem stejně jako receptor tyrosin kináz kódovaný c-kit a PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) onkogeny. Inhibice bcr-abl tyrosin kináz má za následek snížení proliferace a zvýšení počtu apoptóz v maligních buňkách (National Cancer Institute, 2010).

U maligního melanomu byla prokázána cesta vedení signálu přes c-kit a PDGFR a tím lze použít Imatinib i při léčbě tohoto typu nádoru (Wyman a kol., 2006).

1.6 ENZYMOTERAPIE

Enzymy jsou proteiny, které mají funkci biologických katalyzátorů (Klouda, 2005). Urychlují metabolické děje o 8 až 14 řádů. Nejdůležitějšími enzymy jsou proteolytické neboli proteázy. Léčba proteázami sahá až do prehistorie (Nouza K. a Nouza M., 2006). Zvláštní formou léčby je systémová enzymoterapie, jejíž zakladatelem byl John Beard. K léčbě používal čerstvé výtažky z pankreatu, které obsahovaly trypsin. Beard trypsin považoval za hlavní účinnou látku a označil svoji terapii za trypsinovou (Beard, 1911). Jeho následovník Wald používal směs trypsinu, chymotrypsinu a papainu. Tato směs inhibovala růst melanomu B16 a snižovala výskyt metastáz (Wald a kol., 1998, 2001). Systémová enzymoterapie se uplatňuje v komplexní

protinádorové léčbě a spočívá v perorálním nebo rektálním podávání kombinací proteolytických enzymů. Při perorálním podávání se navíc musí zajistit ochrana enzymů před kyselým žaludečním prostředím tak, že se tablety s proenzymy opatří obalem, který se rozpustí až v neutrálním nebo alkalickém prostředí střeva (Nouza a Wald, 1995). Tím je zajištěno vstřebání množství schopného zajistit v organismu léčebné účinky (Nouza a kol., 1999). Enzymy, které se vstřebají, zůstávají jen krátkou dobu ve volném stavu. Jsou inhibovány bílkovinami v krvi, které se označují jako antiproteázy nebo inhibitory proteáz (Nouza K. a Nouza M., 2006). Nejznámější inhibitory proteáz jsou například alpha-2 makroglobulin, alfa-1 antitrypsin, alfa-1 antichymotrypsin. Následně vznikají komplexy antiproteáza-proteáza. V důsledku pohlcení proteáz alpha-2 makroglobulinem se zvýší schopnost tohoto inhibitoru vázat některé cytokiny. Protinádorový účinek systémové terapie je spatřován v odstraňování TGF-beta a IL-10, jejichž vylučováním nádory usilují o dosažení imunologické tolerance (Desser a kol., 2001).

1.7 PROENZYMOTERAPIE

Před sto lety, jak bylo zmíněno, položil John Beard, profesor srovnávací embryologie na univerzitě v Edinburghu, základy enzymové terapie. Zjistil, že u většiny placentálních organismů se vyvíjí pankreas v době, kdy placenta zpomaluje růst. Domníval se tedy, že enzymy produkované rozvíjející se pankreatickou žlázou omezují invazi trofoblastu a že pankreatické extrakty by mohly mít podobný inhibiční účinek na invazi nádorů. Je totiž známé, že trofoblast a maligní nádory mají velké množství shodných vlastností.

Podle Bearda musí být pankreatické extrakty čerstvé, jestliže se od nich očekává, že si udrží protinádorovou aktivitu (Beard, 1911). Čerstvý extrakt který používal obsahoval významné množství proenzymů (trypsinogenu, chymotrypsinogenu). Beard tak položil nevědomky základy proenzymoterapie spíše než enzymoterapie. Jelikož zmíněné proenzymy byly objeveny mnohem později, Beard o nich nemohl uvažovat. Beard označil svoji terapii za trypsinovou (Novák a Trnka, 2005). Beard měl celou řadu úspěšných ale i neúspěšných následovníků, kterým se nepodařilo pochopit jeho terapii. Mezi ty úspěšné patří například Trnka a Novák kteří poprvé popsali použití proenzymů při léčbě nádorů (Novák a Trnka, 2005). Ve svých pokusech používali směs trypsinogenu a amylázy. Dosáhli dobrých výsledků když snížili výskyt metastáz u melanomu B16-F10. Dalším úspěšným následovníkem byl Wald, který používal směs

trypsinu, papainu a chymotrypsinu čímž také snížil tvorbu metastáz u melanomu (Wald a kol., 1998) a Lewis lung karcinomu (Wald a kol., 2001) u myší.

Uspěl proto, že směs podával perrektálně (Wald a kol., 1998, 2001), což je lepší než perorálně, protože při perorálním použití není jisté, zda se proteázy vstřebají (Ziv a kol., 1987). Pro dosažení potřebného efektu používal řádově větší množství aktivních enzymů než bylo množství proenzymů použitých Novákem a Trnkou 2005.

Mechanismus působení proenzymů: Proenzymy jsou transportovány krví v neaktivní formě. V místě nádoru jsou aktivovány nádorovými proteázami, například kathepsinem B (Kobayashi a kol., 1993, Figarella a kol., 1988), enterokinázou (Miyata a kol., 1999), nádorovým tryptinem (Koivunen a kol., 1991, Nyberg a kol., 2006). Nádorovými enzymy se iniciuje a urychlí rozpad proenzymů, což následně vede k lokálnímu zacílení enzymoterapie. Vzniklý trypsin a chymotrypsin jsou pohlcovány alfa-2 makroglobulinem. Vzniklý komplex pohlcuje různé cytokiny, preferenčně pak TGF-beta. Tento cytokin používá nádor k indukci T_{reg} lymfocytů a tím k navození stavu tolerance (Krasagakis a kol., 1998, Pawelec, 1999). Pohlcování TGF-beta tvorbu této tolerance narušuje.

2. CÍLE PRÁCE

1. Studium in vivo ovlivnění transplantovaného melanomu B16-F10 pomocí proenzymoterapie, Ovosanu a kombinací obou přístupů.
2. Vliv Ovosanu na sarkom S-180 transplantovaný myším BALB/c a SCID, zjištění úlohy imunitního systému.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA

K experimentům byly použity osmitýdenní samice myši kmene C57BL/6 a BALB/c dodané firmou Charles River (Suzfeld, Německo), samci a samice SCID myši (C.B17/Icr-scid) které byly rovněž původně dodány firmou Charles River (Suzfeld, Německo). Myši měly průměrnou hmotnost 18-20 g, Byly krmeny granulovanou stravou a vodou *ad libitum*. Myši SCID byly umístěny ve sterilních izolátorech.

3.2 NÁDOROVÉ BUŇKY

Byly použity buňky melanomu B16-F10 a buňky sarkomu S-180 (obojí dar prof. Říhové, Ústav mikrobiologie, Akademie věd, Praha). Buňky melanomu B16-F10 byly kultivovány v RPMI 1640 obsahujícím 10% fetálního bovinního séra a antibiotika (Sigma-Aldrich). Kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře se 100% nasycením vodními parami a obsahujícím 5% oxidu uhličitého. Buňky sarkomu S-180 byly kultivovány stejným způsobem jako buňky melanomu B16-F10.

3.3 CHEMIKÁLIE

Enzymy: Bovinní trypsinogen (14 000 BAEE U/mg proteinu po aktivaci), boviní alfa-chymotrypsinogen A (48 BTEE U/mg lyofylizovaného preparátu po aktivaci) a alfa-amyláza z *Bacillus sp.* (1780 maltózových U/mg proteinu) byly dodány firmou Sigma-Aldrich

Terapeutické preparáty: Imatinib mesylát (Gleevec) je produktem firmy Novartis, Barcelona, Španělsko. Ovosan jsme získali jako dar od jeho výrobce, firmy AREKO spol. s.r.o., Praha

3.4 TRANSPLANTACE NÁDORU

3.4.1 První experiment

Příprava buněk melanomu B16-F10: médium RPMI s 10% FCS bylo slito, buňky byly dvakrát promyty PBS. Adherované buňky byly opláchnuty trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,5 mM EDTA v PBS). Poté se k nim přidalo 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 1640 bez séra za stejných podmínek centrifugace. Promyté buňky byly rozsuspendovány v 5 ml RPMI 1640 a poté spočítány (Trypanová modř, 1:1). Jejich koncentrace byla upravena na 4 mil/ml. Samice myší kmene C57BL/6 jsme oholili na zádech na pravé straně a následující den jsme aplikovali suspenzi nádorových buněk. Bylo transplantováno s.c. (pravá zadní část zad) 400 000 buněk melanomu B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra/myš.

3.4.2 Druhý experiment

Buňky sarkomu S-180 po centrifugačním promytí bezserovým médiem RPMI 1640 (stejně podmínky, jako v předchozím pokusu) byly spočítány a rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra. Samice a samci myší SCID byly oholeny na zádech na pravé straně a následně jsme aplikovali suspenzi nádorových buněk. Myším bylo transplantováno s.c. (pravá část zad) 400 000 buněk sarkomu S-180 v 0,1 ml RPMI bez séra.

3.4.3 Třetí experiment

Příprava buněk sarkomu S-180 byla stejná jako v předchozím pokusu. Samice myší SCID a BALB/c byly oholeny na zádech na pravé straně a následně jsme aplikovali suspenzi nádorových buněk. Myším bylo transplantováno s.c. (pravá část zad) 400 000 buněk sarkomu S-180 v 0,1 ml RPMI bez séra.

3.5 ORGANIZACE JEDNOTLIVÝCH EXPERIMENTŮ

3.5.1 První experiment in vivo

12 dní po aplikaci buněk melanomu 70 samicím myší C57BL/6 byly tyto rozděleny do pěti skupin tak, aby v každé skupině byly myši s přibližně stejně velkými nádory.

V první skupině bylo 10 myší, ve druhé 30, ve třetí a čtvrté a páté po 10 myších.

Vytvořené skupiny: I: Kontrolní skupina, 10 myší

II: Proenzymoterapie (aplikace 0,1 ml roztoku proenzymů denně do stehenního svalu levé zadní nohy), 30 myší

III: Léčba Ovosanem (200 mikrolitrů perorálně denně), 10 myší

IV: Léčba Ovosanem + proenzymoterapie (denně), 10 myší

V: Léčba Imatinibem (0,2 ml roztoku intraperitoneálně, aplikace 5 dní a 2 dny vynechat-to celé bylo pravidelně opakováno), 10 myší
Složení roztoku použitého pro enzymoterapii: Byl připraven roztok obsahující 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg alfa- chymotrypsinogenu A + 0,4 mg alfa-amylázy/ml fyziologického roztoku, který byl sterilizován filtrací
Složení Ovosanu: 30% roztok fosfolipidů ve slunečnicovém oleji
Složení Imatinibového preparátu: 3,75 mg Imatinibu/ml fyziologického roztoku

3.5.2 Druhý experiment in vivo

Probíhaly dva souběžné pokusy protože jsme měli samice i samce SCID myší. Poté co se u nich vyvinuly nádory (14. den po aplikaci sarkomových buněk) byla provedena randomizace a zahájena terapie. U samců byly 3 myši negativní a proto byly z pokusu vyřazeny. Myši byly umístěny do izolátoru.

Byly vytvořeny tyto skupiny: I: Léčba Ovosanem (200 mikrolitrů denně), 6 samic SCID

II: Kontrolní skupina, 6 samic SCID

III: Léčba Ovosanem (200 mikrolitrů denně), 3 samci

SCID

IV: Kontrolní skupina, 4 samci SCID

Složení Ovosanového preparátu bylo stejné jako v prvním experimentu.

3.5.3 Třetí experiment in vivo

11 dnů po transplantaci sarkomu S-180 22 samicím BALB/c a 20 samicím SCID jsme provedli randomizaci a zahájili léčbu.

Vytvořené skupiny: I: Léčba Ovosanem (200 mikrolitrů denně), 11 samic BALB/c

II: Kontrolní skupina, 11 samic BALB/c

III: Léčba Ovosanem (200 mikrolitrů denně), 10 samic SCID

IV: Kontrolní skupina, 10 samic SCID

Složení Ovosanového preparátu bylo stejné jako v prvním a druhém experimentu.

3.5.4 In vitro experiment

Srovnání přímého vlivu Ovosanu na buňky melanomu B16-F10 bylo provedeno metodou dle Redondo a kol., 2004, použitou pro testování cytotoxicity Imatinibu in vitro. Buňky melanomu B16-F10 byly kultivovány nejprve 24 hod na dvou 6-ti jamkových destičkách (průměr jamky 3 cm, NUNC) v RPMI 1640 s 10% FCS za výše

uvedených kultivačních podmínek. Původní množství buněk bylo 100 000 na jamku. Následovalo stažení média. Jamky (vždy 4 paralelní) byly pak naplněny po třech mililitrech média tohoto složení:

I: RPMI s 10 % FCS – kontrola

II: RPMI s 10 % FCS obsahující Ovosan, vytvářející 0,3% suspenzi fosfolipidů

III: RPMI s 10 % FCS obsahující 15 μ M Imatinibu

Po dalších 24 hod inkubace byla opatrně stažena média. Následovala trypsinizace přidavkem 1 ml trypsinizační směsi (0,02% trypsin, 0,5 mM EDTA v PBS). Po 5 minutách byla trypsinizace zastavena přidavkem 2 ml RPMI s 10 % FCS, důkladné promíchání 15-ti násobným protažením pasterkou, přidání Trypanové modři a spočítání živých buněk.

Složení Ovosanového preparátu: 15% suspenze fosfolipidů ve fyziologickém roztoku, dodáno firmou Areko

3.6 MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ

Nádory byly měřeny dvakrát týdně kaliperem. Objemy nádorů byly vypočítány metodou Inaba a kol., 1986, pomocí vzorce $V = \pi/6 * A * B^2$ (A je největší rozměr nádoru, B je nejmenší rozměr nádoru).

3.7 ZPRACOVÁNÍ DAT

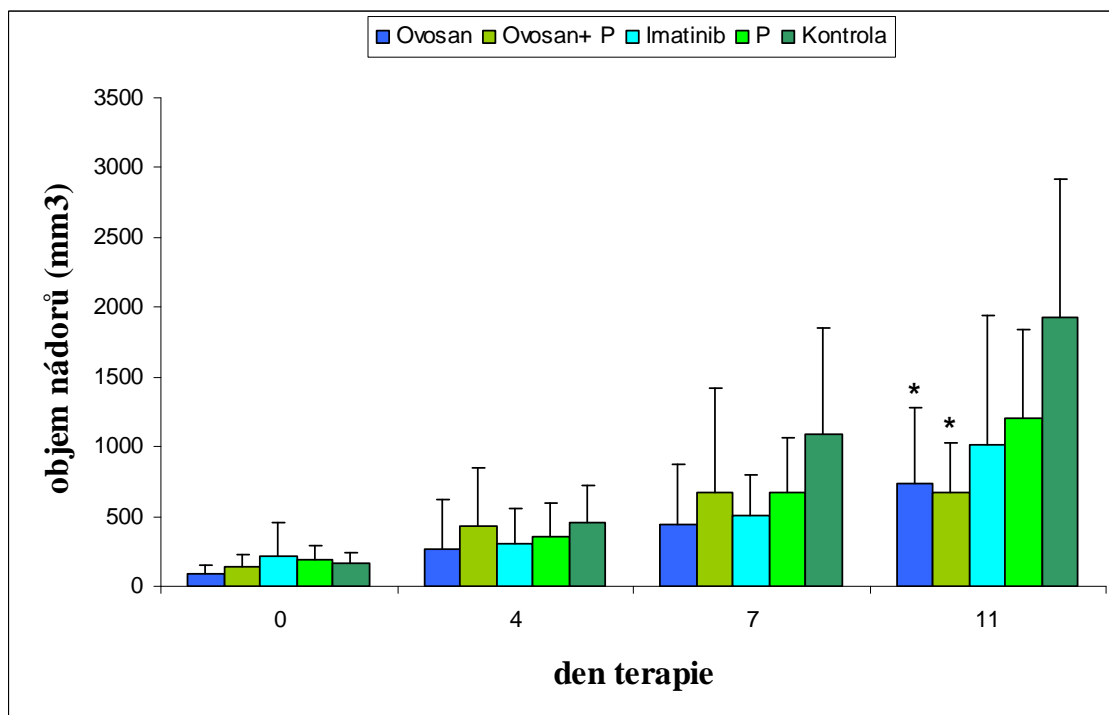
Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t-testu a programu STATISTICA VIII od firmy StatSoft INC (Survival Analysis). Grafy byly vytvořeny v programu Excel.

4. VÝSLEDKY

4.1 PRVNÍ EXPERIMENT

4.1.1 VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORU (melanom B16-F10)

Z jednotlivých testovaných preparátů na růst nádorů působil nejúčinněji Ovosan. Dosáhl jedenáctý den terapie toho, že nádory měly 38,5% objemu kontroly. Co se týče kombinace, Ovosan s přidavkem proenzymů dosáhl dokonce redukce nádorového objemu na 35,2% kontroly, byla zjištěna mírná aditivita. Jedenáctý den rozdíl objemu mezi skupinou číslo I (kontrola) a IV (Ovosan+proenzymy) dosáhl statistické významnosti ($P=0,026$). Rovněž tak dosáhl statistické významnosti rozdíl mezi skupinou I (kontrola) a skupinou III (Ovosan), $P=0,031$. Nejméně působily samy proenzymy, které měly maximum účinku 7. den kdy se dostaly na 61,4% kontroly.

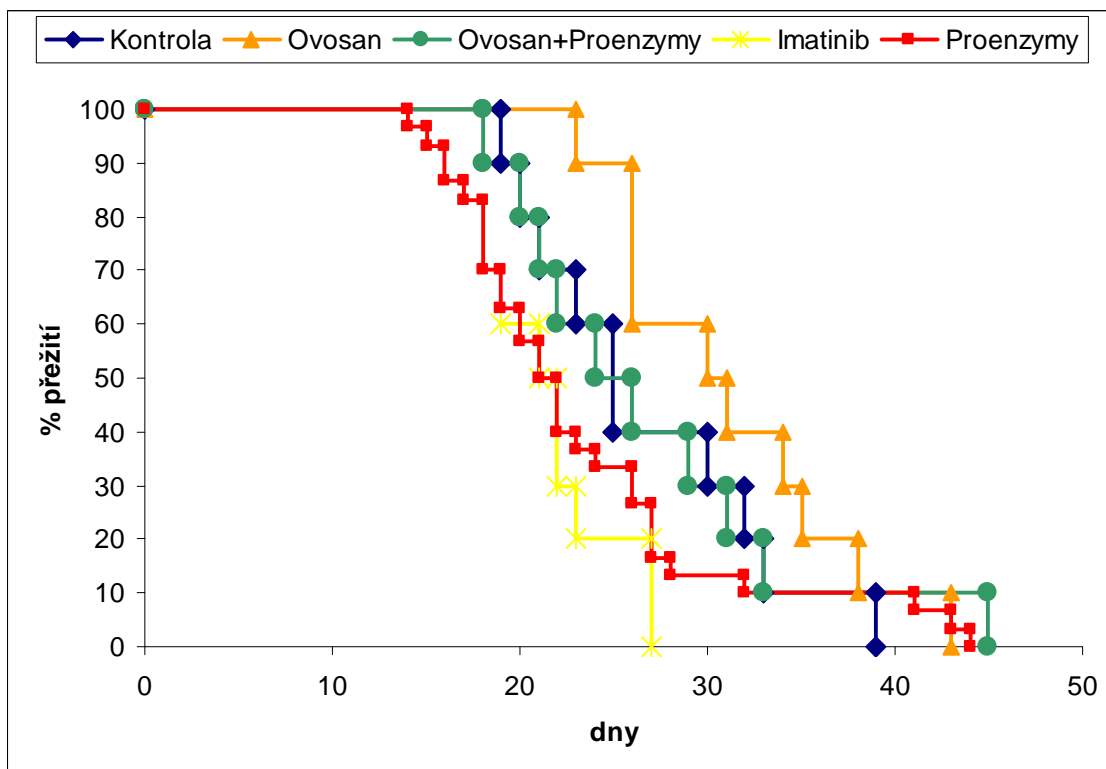


Obr.6: Působení Ovosanu, Imatinibu, proenzymů (P) a kombinace Ovosanu s proenzymy na melanom B16-F10.

* $P \leq 0,05$, vztaženo ke kontrolní skupině

4.1.2 PŘEŽITÍ V JEDNOTLIVÝCH SKUPINÁCH

Nejvyššího přežití bylo dosaženo ve skupině III (Ovosan), naopak nejmenšího ve skupině V (Imatinib). Ve skupině IV (Ovosan+proenzymy) bylo přežití průměrné, nicméně jedna myš přežila nejdéle. Ovosan život ve srovnání s kontrolou prodlužoval a Imatinib krátil (viz Obr.7).



Rozdíl v přežívání byl statisticky významný mezi skupinami: III (Ovosan) a V (Imatinib), $P \leq 0,05$; III (Ovosan) a II (proenzymy), $P \leq 0,05$. Rozdíly v přežívání mezi ostatními skupinami nebyly statisticky významné.

Obr.7: Terapie melanomu B16-F10 různými preparáty a sledování přežití myší v jednotlivých skupinách.

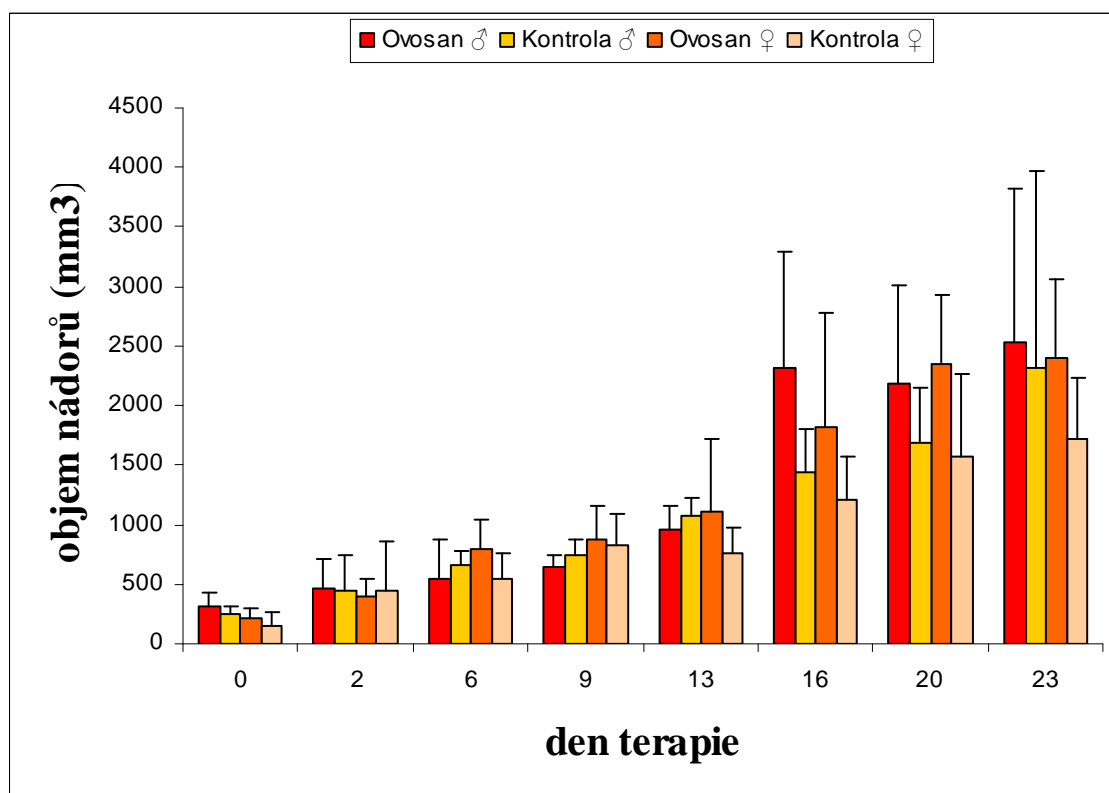
Myši léčené Ovosanem byly velmi pohyblivé.

4.2 DRUHÝ EXPERIMENT

Na začátku experimentu byly u samců shledány tři myši negativní u kterých se ani později sarkom neujal a proto byly z experimentu vyřazeny. Konečný počet myší s vyvinutými nádory byl ve skupinách následující: skupina I: 6 samic SCID, skupina II: 6 samic SCID, skupina III: 3 samci SCID, skupina IV: 4 samci SCID

4.2.1 VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORU (sarkom S-180, SCID myši)

Ovosan neovlivnil růst nádorů u samců ani u samic (viz obr.8). Statisticky významného rozdílu mezi skupinami nebylo dosaženo.



Obr.8: Působení Ovosanu na sarkom S-180 u samců a samic myši SCID

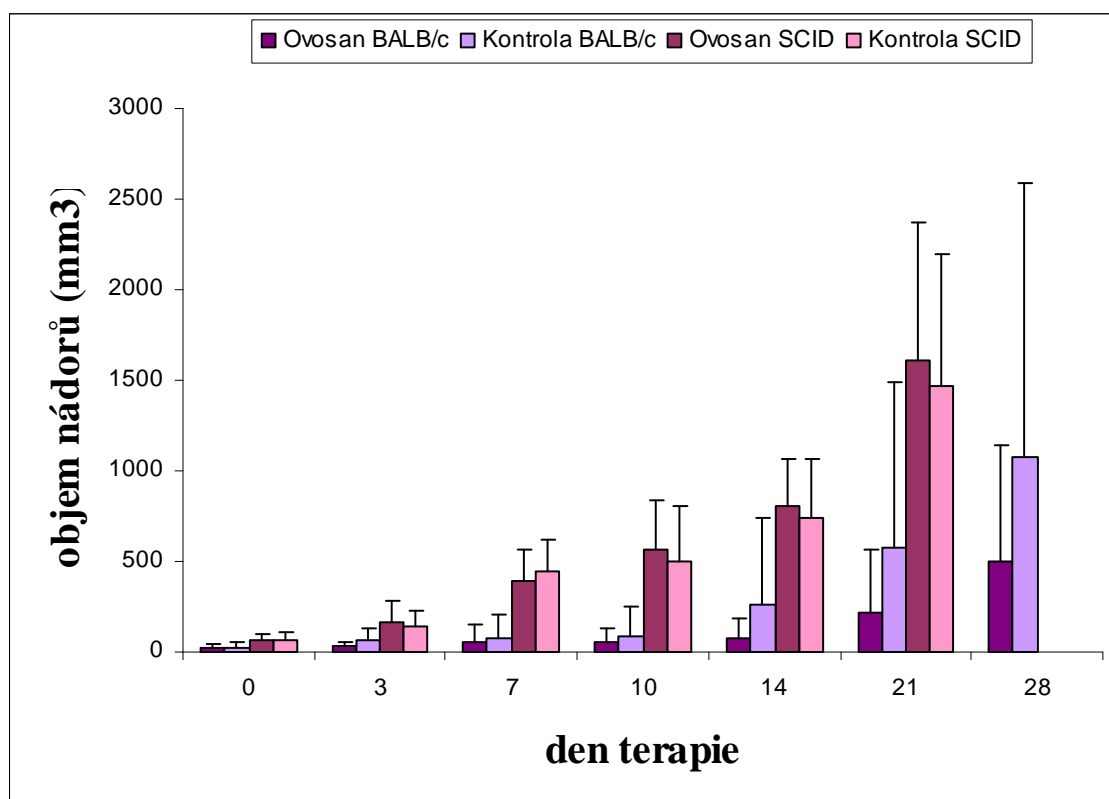
Mezi skupinami kontrolními a skupinami léčenými Ovosanem nebyly žádné rozdíly v pohyblivosti jako v prvním experimentu.

4.3 TŘETÍ EXPERIMENT

4.3.1 VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORU (sarkom S-180, myši BALB/c a SCID)

Jak je patrné z Obr.9, u skupiny myši BALB/c Ovosan výrazně redukoval nádorový růst, nicméně z důvodu velkého rozptylu naměřených hodnot objemů nádorů nebylo dosaženo statistické významnosti. U skupiny myši SCID Ovosan na růst nádoru nepůsobil.

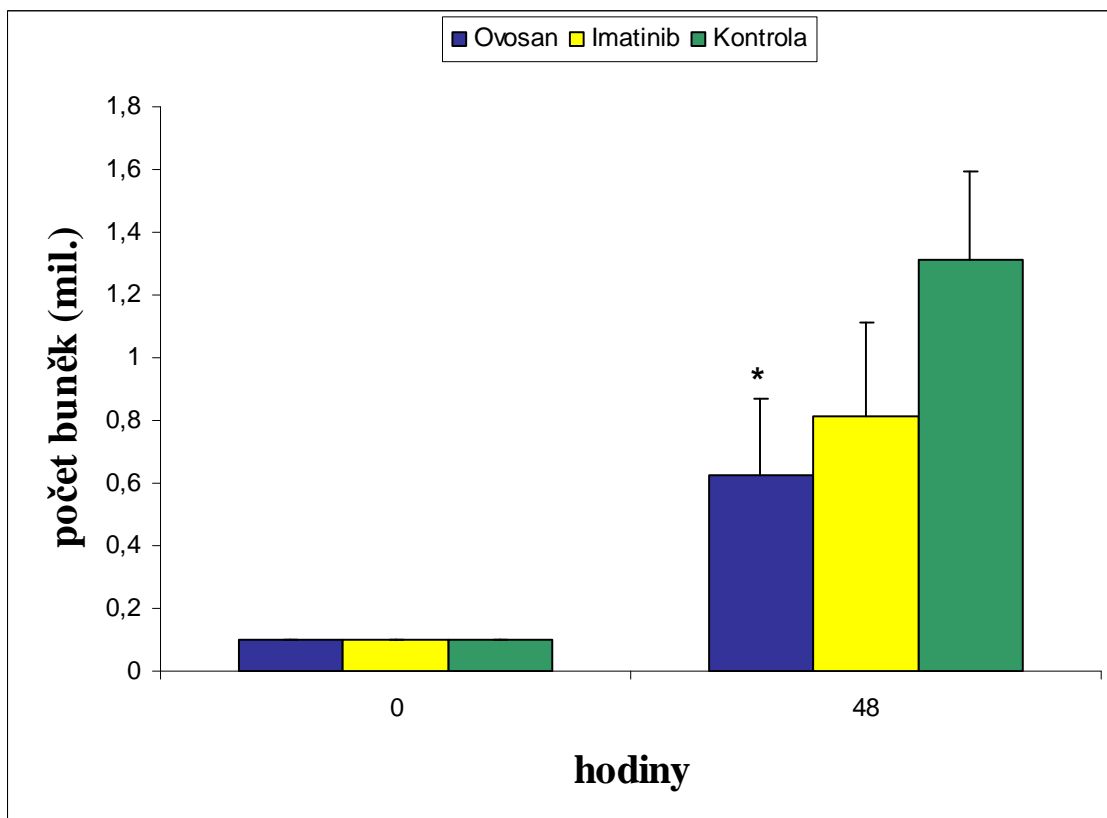
Nádory na myších SCID rostly nezávisle na terapii výrazně rychleji, než na myších BALB/c. Z důvodů, že nádory dosáhly velkých rozměrů, byly myši SCID předčasně utraceny.



Obr.9: Působení Ovosanu na Sarkom S-180 u myší SCID a BALB/c

4.4 IN VITRO EXPERIMENT

Bylo zjištěno, že Ovosan tlumil proliferaci buněk melanomu B16-F10 a to účinněji, než Imatinib (Obr.10). Působení Imatinibu bylo srovnatelné s výsledky Redonda a spol., 2004



Obr.10: Působení Ovosanu a Imatinibu na melanom B16-F10 in vitro

* $P \leq 0,05$ - vztaženo ke kontrole

5. DISKUSE

V prvním experimentu jsme studovali, jak působí preparát Ovosan, preparát Imatinib, proenzymy a kombinace proenzymů s Ovosanem, na melanom B16-F10. Nejlepších výsledků dosáhl Ovosan. Výsledek nemůžeme porovnávat s literaturou, protože zatím nebyl publikován žádný experiment ve kterém by byl použit Ovosan na myším modelu. Byl pouze sledován vliv PNAE na růst lidského karcinomu rekta transplantovaného nu/nu myším, u kterého se v tomto experimentu neprokázal inhibiční účinek (Poučková a kol., 1987). Co však můžeme konstatovat je, že Ovosan působil lépe než proenzymová směs a to nejen v našem experimentu, ale i v experimentech provedených na stejném modelu stejnou směsí (Kalferstová, 2008). Experimenty Nováka a Trnky, 2005 byly prováděny se směsí bez chymotrypsinogenu a sledovaly jiné cíle (metastázování), experimenty Walda a kol. 1998, 2001 používali perrektální aplikaci aktivních enzymů a byly tedy rovněž vzdálené. Preparáty obsahující aktivní proteázy, které jsou dnes nabízeny několika firmami, mají velký nedostatek v tom, že jsou podávány perorálně, neboť je zde otázka, zda se enzymy vůbec vstřebají (Gewert a kol., 2004), a jestliže ano, tak pravděpodobně jen velmi malá část (Ziv a kol., 1987, Šťastný a kol., 2002). Navíc jsou podávány lidem a tak další srovnávání by bylo zavádějící.

Ovosan působil větší inhibici nádorového růstu melanomu B16-F10, než Imatinib a to za podmínek, které byly použity pro studium vlivu Imatinibu na tento nádor (Redondo a kol., 2004). Imatinib sice není přímo konstruován pro terapii melanomů, na melanomy však působí (Redondo a kol., 2004) a výsledky s Ovosanem, který toto působení překonal, jsou velmi povzbudivé. Rovněž tak bylo velmi pozitivní, že jsme pozorovali výrazný vliv Ovosanu na pohyblivost a vitalitu myší. Tento jev odpovídá pozorování Dr. Poučkové (ústní sdělení). Vyústěním tohoto jevu bylo statisticky významné prodloužení přežití myší léčených Ovosanem a to jak v porovnání s proenzymovou terapií, tak s terapií Imatinibem. Naopak v případě Imatinibu jsme pozorovaly výrazně rychlejší hynutí, než tomu bylo v ostatních skupinách. Snaha o dosažení ještě výraznějšího působení na základě kombinace Ovosanu a proenzymoterapie vedla k zanedbatelnému zvýšení účinku. Jelikož se jeví jako velmi pravděpodobné, že nejen dále diskutované působení Ovosanu je závislé na získané imunitě, ale že i proenzymová terapie nefunguje bez kompletní, plně funkční imunity (připravovaná diplomová práce P. Kaiserové), můžeme se domnívat, že obě terapie soutěží a interagují s podobnými,

nebo svázanými součástmi imunitního systému a že místo synergie, či plné aditivity zde částečně interferuje určitá kompetice.

V druhém experimentu jsme se snažili zjistit závislost účinku Ovosanu na funkci imunitního systému a tím se přiblížit k poznání mechanismu jeho působení. Použili jsme model SCID myši/sarkom S-180. Vzhledem k tomu, že ani u samců ani u samic myši SCID které nemají získanou imunitu Ovosan neovlivnil růst nádoru, můžeme se domnívat, že závislost účinku Ovosanu na imunitě existuje. Třetím experimentem jsme znovu potvrdili, že Ovosan na sarkom S-180 u myši SCID nepůsobí. Nádory rostly nezávisle na terapii. V kontrole na imunitně plně vyvinutých myších BALB/c Ovosan výrazně redukoval nádorový růst. Druhý a třetí experiment tedy podporují představu, že Ovosan působí nepřímo stimulací imunitního systému. Tento fakt je sice uváděn, ale dosud nebyl podpořen experimentálními údaji. V této souvislosti se jeví jako velmi zajímavými poznatky o inhibičním působení Ovosanu na nádory pankreatu transplantované NuNu myším, prezentované Dr. Poučkovou na pracovním semináři firmy Areko v roce 2010. SCID myši nemají T a B lymfocyty, NuNu myši nemají T lymfocyty. Z toho vyplývá, že by výkonným elementem, který zaručuje protinádorové působení Ovosanu mohly být B lymfocyty a protilátková odpověď. To si však vyžádá další studium a potvrzení, neboť nebyly použity stejné nádorové modely.

Pro experiment in vitro byla použita koncentrace Ovosanu, používaná firmou Areko k in vitro ověřování účinnosti preparátu. Byl nalezen účín vyšší, než účín Imatinibu, což sice odpovídá výsledkům prvního in vivo experimentu, ale neodpovídá závěrům experimentů na SCID myších, které hovoří proti přímému působení preparátu. Domníváme se, že perorálním podáním Ovosanu nelze v místě nádoru docílit tak vysokých koncentrací, které byly použity v in vitro experimentu. Přímé působení Ovosanu pak bude in vivo daleko nižší a celý efekt bude záviset na stimulaci imunity. Přímé působení Ovosanu na nádory však úplně vyloučit nelze. Tento případný efekt by však evidentně nebránil proliferaci nádorových buněk, způsobil by však určitá narušení a defekty, které se projeví až v kombinaci s imunitním atakem.

Celkově možno konstatovat, že preparát Ovosan vykazuje pozoruhodně vysokou protinádorovou aktivitu. Vzhledem k tomu, že se jedná o směs byť s dominantní účinnou složkou PNAE (Kára, 2000), a vzhledem i k tomu, že se do celého mechanismu zapojuje velmi složitý imunitní systém, lze předpokládat, že detailní poznání

mechanismů působení Ovosanu si vyžádá ještě hodně dlouhé studium. To však vzhledem k markantním hlavním a nulovým vedlejším účinkům nebrání tomu, aby byl Ovosan používán jako podpůrný prostředek, potravinový doplněk.

6. SOUHRN

- Bylo zjištěno, že Ovosan účinně potlačuje růst melanomu B16-F10 a působí příznivě na vitalitu a přežití tumor nesoucích myší. Jeho protinádorové působení bylo výrazně lepší, než účinek Imatinibu.
- Ovosan působí účinněji, než proenzymoterapie. Kombinace těchto terapií vykazuje jen velmi slabé známky aditivity.
- Působení Ovosanu není zřejmě přímé, ale je zprostředkováno imunitním systémem, získanou (specifickou imunitou). V případě imunodeficientních myší (SCID) nesoucích nádory se jeho protinádorové účinky ztratily.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walters P.: Základy buněčné biologie, nakl. Espero Publishing, s. r. o., 618-620, 1998
- Beard J.: The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis, 1911
- Desser L., Holomanova D., Zavadová E., Pavelka K., Mohr T., Herbacek I.: Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-levels in human blood. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47, S10-S15, 2001
- Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett A.: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens: activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen 1., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 293-298; 1988.
- Gewert, K.; Holowachuk, S.A.; Rippe, C.; Gregory, P.C.; Erlanson-Albertsson, C.; Olivecrona, G.; Kruszewska, D.; Piedra, J.V.; Weström, B.; Pierzynowski, S.G. The enzyme levels in blood are not affected by oral administration of a pancreatic enzyme preparation (Creon 10,000) in pancreas-insufficient pigs. *Pancreas* 28, 80-88; 2004.
- Horton J., Hill G.J.: *Klinická onkologie*, nakl. Avicenum, 18-39, 1977
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Imatinib>, 12.3.2010
- <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment>, 12.3.2010
- <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/melanoma>, 12.3.2010
- Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakurai M.K., 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.*,77, 190-196, 1986
- Kalferstová L.: Proenzymoterapie melanomu B16-F10, 2008
- Kára J., Borovička M., Liebl V., Smolíková J., Ubik K.: A novel nontoxic alkyl-phospholipid with selective antitumor activity, plasmanyl-(N-acyl)ethanolamine (PNAE), isolated from degenerating chick embryo tissues and from an anticancer biopreparation cACPL. *Neoplasma*, 33, 187-205, 1986.
- Kára J., Konovalová A.L., Krásnová M.A., Liebl V., Bejšovcová L.: New tumoricidal semisynthetic ether phospholipid, plasmanyl-(N-acyl)ethanolamine (PNAEs) and enhancement of its tumoricidal activity by calcium ions. *Neoplasma*, 40, 213-217, 1993.

- Kára J., Liebl V., Pelcbauer Z.: Natural and semisynthetic ether phospholipids with selective antitumor activity; their chemical structure and mechanism of action leading to tumor cell membrane destruction. *Highlights of Modern Biochemistry*, 2,1459-1474, 1989.
- Kára J.: Ether fosfolipid PNAE proti nádorovým buňkám: Prevence a terapie metastáz, 2000
- Klouda P.: *Základy biochemie*, nakl. Pavel Klouda, 49-57, 2005
- Kobayashi H., Mobuhiko N., Sugimura M., Shinohara H., Ohi H., Terao T.: 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, 1993
- Koivunen E., Ristimäki A., Itkonen O., Osman S., Vuento M., Stenman U-H.: Tumor-associated Trypsin Participates in Cancer Cell-mediated Degradation of Extracellular Matrix, *Cancer res.*, 51, 2107-2112, 1991
- Krasagakis K., Tholke D., Farthmann B. et al.: Elevated plasma levels of and in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer*. 77, 1492-1494, 1998
- Mikhaewich I.S., Gerasimova G.K., Kára J.: Inhibition of protein kinase C by semisynthetic phospholipid plasmanyl-(N-acyl)ethanolamine, a nontoxic antitumor preparation. *Biochemistry International*, 23, 215-220, 1991.
- Miyata S., Koshikawa N., Higashi S.: 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, 1999
- Nouza K., Nouza M.: Systémová enzymoterapie-perorální podávání kombinace proteáz: farmakologie a využití v léčebné praxi, *Praktické lékařství*, 3, 123-125, 2006
- Nouza K., Olejář T., Nouza M.: Proteázy v regulaci a modulaci imunity, *Klinická imunologie a alergologie*, 3, 22-27, 1999
- Nouza K., Wald M.: Systémová enzymoterapie: K problematice vstřebávání enzymových makromolekul. *Časopis lékařů českých*, 134, 615-619, 1995
- Novák J.F., Trnka F.: Proenzyme therapy of cancer, *Anticancer research*, 25, 1157-1178, 2005

- Nyberg P., Ylipalosaari M., Sorsa T., Salo T.: Trypsin and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312, 1219-1228, 2006
- Pan Z-K., Weiskirch L. M., Paterson Y.: Regression of established B16F10 melanoma with a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine, *Cancer Research*, 1999
- Pawelec G.: Tumour escape from the immune response: the last hurdle for successful immunotherapy of cancer? *Cancer Immunol Immunother.* 48, 343-345, 1999
- Poučková P., Zadinová M., Navrátil L., Blehová Z.: Vliv plasmanyln-(N-acyl)ethanolaminu na růst karcinomu recta xenotransplantovaného na athymické nu/nu myši. *Časopis lékařů českých*, 126, 1569-1571, 1987
- Redondo P., Lloret P., Andreu E.J., Inoges S.: Imatinib mesylate in cutaneous melanoma, *Journal of investigative dermatology*, 123, 1208-1209, 2004
- Šťastný, F.; Pliss, L.; Höschl, C. Interaction between proteases and blood-brain barrier: Possible sequellae for clinical praxis. *Psychiatrie* 4, 230-241; 2002.
- Toguchida J., Nakayama T.: Molecular genetics of sarcomas: Applications to diagnoses and therapy, *Cancer Science*, 100, 9, 1573-1580, 2009
- Vokurka M., Hugo J.: *Praktický slovník medicíny*, Praha, 1998
- Wald, M., Olejář, T., Poučková, P., Zadinová, M.: Proteinase reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with Lewis lung carcinoma. *Life Science* 63, 237-243; 1998.
- Wald, M., Olejář, T., Šebková, V., Zadinová, M., Boubelík, M., Poučková, P.: Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extend survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47 (suppl), S16-22, 2001.
- Worley L.G, Spater H.W.: The cytoplasmic cytology of sarcoma 180, 413-425, 1952
- Wyman K, Atkins MB, Prieto V, et al: Multicenter phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic melanoma: Significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer* 106, 2005-2011, 2006
- Ziv E., Lior O., Kidron M.: Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. *Biochem. Pharmacol.* 36, 1035-1039, 1987