

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Katedra medicínské biologie



Bakalářská diplomová práce

**Studium možnosti kombinace proenzymoterapie s cílenou
chemoterapií a s metabolickým ovlivněním nádorů**

Veronika Maierová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2010

Maierová, V., 2010: Studium možnosti kombinace proenzymoterapie s cílenou chemoterapií a s metabolickým ovlivněním nádorů. [Study of possibility of combination of proenzyme therapy with targeted chemotherapy and metabolic interference of tumors. Bc. Thesis, in Czech.] - 49p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this study was to find out the influence of proenzyme therapy, Imatinib therapy and Carbimazol therapy on the murine melanoma B16-F10. The therapies were compared and potential combinations were examined. The effect of beta glucan on melanoma and combination of beta glucan with proenzyme therapy were evaluated as well.

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

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

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2010

.....
Veronika Maierová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vstřícný přístup, cenné rady, ochotu a čas, který mi věnoval během celé mé práce. Ráda bych také poděkovala doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a pracovníkům Oddělení imunologie parazitů a Laboratoře oportunních parazitů za pomoc při experimentech v příjemném pracovním prostředí. Velké díky patří také mé rodině, za jejich podporu a zázemí.

Obsah

1	Úvod	4
1.1	Historie rakoviny	4
1.2	Karcinogeneze	7
1.3	Hlavní rysy nádorových buněk	8
1.3.1	Hlavní typy rakoviny	10
1.4	Melanom	10
1.5	Studie na myších	13
2	Terapie	14
2.1	Enzymoterapie	14
2.2	Proenzymoterapie	16
2.3	Imatinib	18
2.4	Karbimazol	20
2.5	Beta glukan	22
3	Cíle práce	24
4	Materiál a metody	25
4.1	Chemikálie	25
4.2	Laboratorní zvířata	25
4.2.1	Buněčná linie	25
4.3	Transplantace melanomu B16-F10	25
4.4	Měření velikosti nádorů	26
4.5	Počítání metastáz - plíce	26
4.6	Analýza suspenze beta glukanu a sonikované suspenze beta glukanu pomocí skenovacího elektronového mikroskopu	26
4.7	Statistické vyhodnocování	26
4.8	Uspořádání jednotlivých experimentů	27
4.8.1	Pokus č. 1	27
4.8.2	Pokus č. 2	27
4.8.3	Pokus č. 3	28
5	Výsledky	30
5.1	Pokus č. 1	30
5.2	Pokus č. 2	31
5.3	Pokus č. 3	32
6	Diskuse	36
7	Souhrn	39
8	Seznam použité literatury	40

1 Úvod

1.1 Historie rakoviny

Nápadné vnější nádory jsou známy od nepaměti, nikoliv však jejich příčiny. Nejstarší popis rakoviny (ačkoli termín rakovina nebyl použit) byl objeven ve starověkém Egyptě a datován zhruba do roku 1600 př. n. l. Kostní pozůstatky mumií ukázaly výrůstky připomínající rakovinu kostí, osteosarkom. V jiných případech byla nalezena destrukce kostí lebky jako u rakoviny hlavy a krku. The Edwin Smith Papyrus popisuje 8 případů nádorů nebo vředů prsu, které byly léčeny vypalováním, pro které byl používán nástroj, kterému se říkalo: „the fire drill“. V papyru je o této nemoci napsáno: „Neexistuje pro ni žádná léčba.“ Další zmínka pochází od starověkého řeckého lékaře Hippokrata (asi 460 – 377 př. n. l.). Slovo „rakovina“ je nesprávným překladem původně v řečtině používaného slova „karkinóma“ – tedy „krabovina“. Tento termín používal Hippokratés nejspíše proto, že zbytnělé žíly při pokročilé rakovině prsu připomínají klepeto. V latině je obdobou tohoto termínu slovo „cancer“, které se ujalo i v angličtině. Římský lékař Galén (130-200 n. l.) používal k popisu nádorů slovo „oncos“ (řecký výraz pro zduřeninu) (American Cancer Society, 2010).

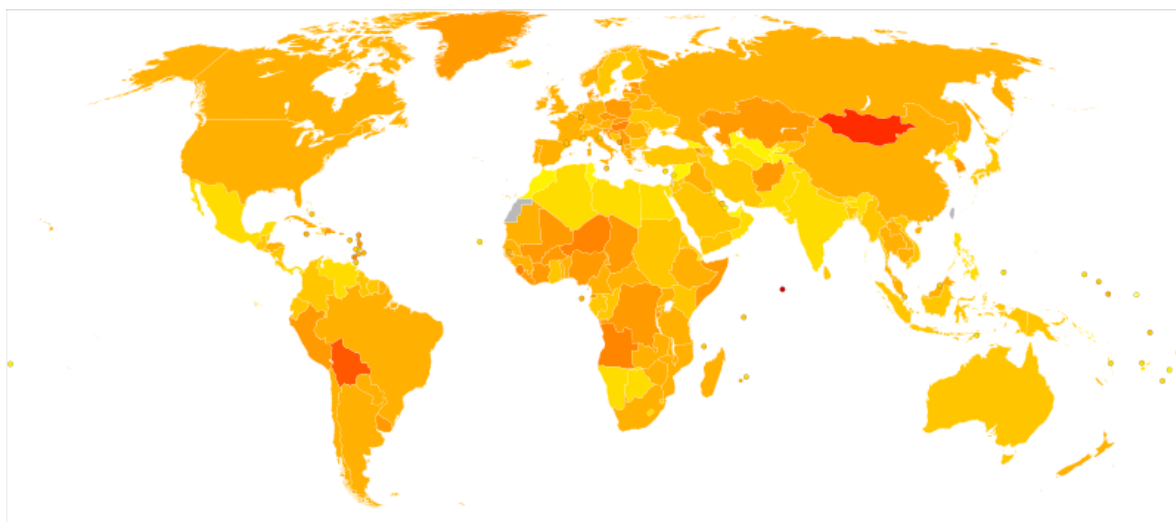
V 18. století se skotský chirurg John Hunter (1728-1793) pokoušel některé nádory chirurgicky operovat. Podle něho, pokud nádor nenapadl sousední tkáň a byl "pohyblivý," poté může být odstraněn. Čímž popsal nádor benigní, který byl klasifikován až mnohem později. V roce 1775 londýnský lékař Percival Pott popsal rakovinu šourku u mužů, kteří v mládí pracovali jako kominíci. Pottův popis je prvním příkladem, kdy působení určitých látek nebo prostředí úzce souvisí s výskytem rakoviny. Spojitost s kouřem byla prokázána, a proto byla o několik desítek let později v Dánsku zavedena první ochranná pracovní pomůcka v historii – kožená zástěra pro kominíky. Brzy na to byla popsána rakovina nosů u lidí šňupajících tabák (Weinberg, 1998). Podobné zprávy se pak začaly sporadicky objevovat i v průběhu 19. století a přidávaly na důležitosti předchozím pozorováním. Například horníci na východě Německa při těžbě smolince často podléhali tehdy jen řídké se vyskytující rakovině plic. V roce 1874 popsal R. Volkmann karcinomy u dělníků pracujících při destilaci uhlí (Trnka, 2008). Jiným příkladem výskytu nádorů

v souvislosti s výkonem zaměstnání byla rakovina jazyka, která se objevovala u žen, které nanášely luminiscenční radium na ručičky náramkových hodinek a měly ve zvyku olizovat chloupky štětečku do špičky. Vnitřní příčinu nemoci naznačily výzkumy Suttona, který u sarančí r. 1903 pozoroval, že chromozomální změny vyvolají u embryí sarančí abnormální vývoj. Zcela jinou příčinu nemoci objevil u slepice Rous v roce 1908. Prokázal, že sarkom slepic je možno přenést na jiného ptáka transfuzí krve, což ukazovalo na šíření nádorů prostřednictvím nějakého patogenu. Nikdo mu nevěřil a virový původ nemoci byl prokázán až v roce 1958 (Sehnal, 2009).













Do 19. století byl výskyt rakoviny vzácný. Rakovina je většinou nemocí starších lidí a v mnoha evropských zemích byl na počátku 19. století průměrný věk okolo 35 let. Mnoho lidí podlelo infekčním chorobám, podvýživě nebo úrazům dříve, než se u nich mohla v pozdějším věku rakovina vyvinout. Rakovina není nahodilá spontánní degenerace tělesných tkání, ale tato nemoc je aktivně vyvolána. Karcinogeny mají schopnost pronikat tkáněmi těla a vyvolat vznik a růst nádoru. Rakovinu, ale nezpůsobují jen mutace v genomu postižené buňky. Peyton Rous objevil v roce 1909 první nádorový virus. Virové částice z nádoru vazivové tkáně (sarkomu) indukují vznik dalších nádorů. Byl pojmenován virus Rousova sarkomu (RSV) a v r. 1961 za tento objev dostal Nobelovu cenu. Kacusaburo Jamagiwa, japonský výzkumník, provedl v roce 1915 historicky první experimentální studii, při níž vycházel z pozorování P. Potta. Jamagiwa opakovaně aplikoval uhelný dehet (dvěma hlavními látkami v něm obsaženými a vyvolávajícími rakovinu jsou 3- methylcholanthren a dimethylbenzanthracen), na uši králíků, kde se po několika měsících vytvořily nádory kůže (Weinberg, 1998). Úspěchem tohoto pokusu byla zahájena éra experimentální onkologie. Když Marie Curie a Pierre Curie objevili na konci 19. století radiaci, narazili na první efektivní nechirurgickou léčbu rakoviny. K dalším objevům cytostatik došlo po 1. světové válce, kdy na tělech vojáků zasažených Yperitem (Bis(2-chlorethyl)sulfid) bylo možno vysledovat zhoubný účinek především na rychle se dělící buňky. Tak přišla na scénu chemoterapie, která poskytla první skutečně účinný způsob jak s rakovinou bojovat. Ohromný pokrok ve výzkumu byl zaznamenán v 80. letech 20. století, kdy situace konečně dovolila se tomuto problému věnovat naplno. Zatímco dříve byly hlavním problémem infekční choroby, po objevu penicilínu a dalších léků se mohla pozornost obrátit jiným směrem (Haven a Kendall, 1994). Od té doby došlo

k mnohým pokrokům v léčbě i prevenci. Bylo objeveno mnoho karcinogenních stimulů ať už fyzikálních, biologických či chemických (Trnka, 2008), byly popsány onkogeny a tumorové supresory (Bishop a spol., 1996). I přes to vznik této choroby není dodnes objasněn. Novodobá historie nám přináší stále nové důkazy o tom, jak nebezpečným a zákeřným onemocněním rakovina je. Jako např. obrovský nárůst výskytu rakoviny (leukémie, nádory prsu, štítné žlázy a plic) jako následek radioaktivního ozáření při výbuchu atomových bomb v roce 1945 v Hirošimě a Nagasaki nebo havárie jaderné elektrárny v Černobylu v roce 1986, kdy radioaktivní mrak, který se uvolnil, kontaminoval rozsáhlé oblasti Ukrajiny, Běloruska a Ruska. V Bělorusku, které bylo zasaženo nejvíce, došlo po 3 letech ke zvýšení výskytu karcinomu štítné žlázy o 50% (Langer, 1998; Mürbeth, 2004; Blahoš a spol., 2006).

Statistické výzkumy incidence a mortality rakovinných onemocnění, jsou prováděny pouze v některých zemích. Proto výsledky studií mají většinou pouze lokální charakter. Světová zdravotnická organizace zveřejnila, že v roce 2007 rakovina způsobila 13 % všech úmrtí na světě (7,6 milionu obyvatel). Obr. 1 uvádí rozložení úmrtnosti způsobené rakovinou na světě.



Obr. 1: Úmrtnost způsobená maligními typy rakoviny na 100 000 obyvatel v roce 2007.

no data  ≤ 55  55-80  80-105  105-130  130-155  155-180  180-205  205-230  230-255  255-280  280-305  ≥ 305 (World Health Organization, 2009).

1.2 Karcinogeneze

Rakovina se často objeví bez zjevného důvodu. Avšak mnohé z jejích příčin již byly objasněny. Bylo objeveno mnoho látek a způsobů karcinogeneze (chemická, fyzikální, biologická). Co se týče chemické karcinogeneze, karcinogenní látky jsou obvykle anorganické nebo organické sloučeniny. Dosud bylo identifikováno přes 3000 karcinogenních sloučenin. Podle současných poznatků je karcinogeneze postupný mnohastupňový proces, při němž dochází ke kumulaci poruch (mutací) určitých genů, vedoucích k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů podílejících se zejména na regulaci, dělení a diferenciaci buňky a stabilitě genomu (Hussain a Harris, 1998). Pro karcinogenezi jsou významné poruchy jen malého počtu genů (méně než 0,1 % z celého genomu). Při vrozené poruše některého z těchto genů, může být karcinogeneze značně urychlena. Většina chemických karcinogenních sloučenin není aktivní ve své nativní formě, ale až po látkové přeměně v játrech. Za společnou vlastnost všech chemických karcinogenů se považuje jejich pozitivní náboj, díky kterému jsou snadno slučitelné s biologickými strukturami. Mezi nejznámější chemické karcinogeny patří: polycyklické aromatické uhlovodíky (benzpyren, antracen), nitrosaminy, aromatické aminy (naftylamin, benzidin), alifatické karcinogeny (vinylchlorid, tetrachlormetan, insekticid DDT), dioxiny (polychlorované bifenyly), arzén, sloučeniny chrómu, kadmia a niklu, azbest, koncentrovaný alkohol (hl. nekvalitní), aflatoxin (produkovaný plísní *Aspergillus flavus*). Mezi fyzikální karcinogenní stimuly patří radiační karcinogeneze, vliv UV záření i z umělých zdrojů (solária), popáleninová karcinogeneze a vliv mechanického působení cizích těles. Do biologické karcinogeneze patří: karcinogeneze virová (první byl objeven virus ptačího sarkomu, poté virus myší leukémie, herpes viry, papilomaviry – spojovány se vznikem karcinomu děložního čípku, viry sérové žloutenky – typu B, C), bakteriální (*Helicobacter pylori*), parazitární (způsobená tropickými parazity), hormonální (karcinom prsu, těla děložního, prostaty, štítné žlázy, v úvahu připadá i melanom) a vliv žlučových kyselin – žluč emulguje tuky, čím tučnější a masitější strava tím větší výskyt nádorů (prostudován u karcinomu tlustého střeva a konečníku).

1.3 Hlavní rysy nádorových buněk

- Mutace v DNA
- Soběstačnost v produkci růstových signálů
- Necitlivost k inhibičním a regulačním signálům
- Poruchy apoptózy
- Neomezený replikační potenciál
- Trvalá angiogeneze
- Schopnost tkáňové invazivity a metastázování
- Nestabilita genomu (Hanahan a Weinberg, 2000)

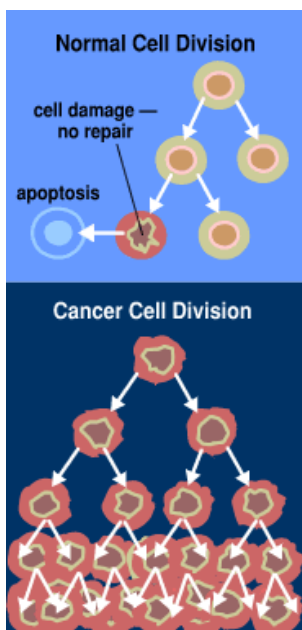
Aby vůbec mohlo ke vzniku nádoru dojít, musí buňka prodělat nejméně 4 - 7 mutací (Renan, 1993). Vznik nádoru je velmi pomalý proces, který může trvat desetiletí, přičemž buňky, které nádor tvoří, jsou klony jediného vzdáleného předchůdce – odrodilé buňky, která se objevila mnohem dříve, než bylo přítomnost nádoru možné zjistit.

Rakovina nebo též nádorové onemocnění je různorodá skupina chorob, jejichž společným rysem je, že se některá buňka vymkne kontrole a začne se nekontrolovatelně dělit. Toto dělení má takřka neomezený potenciál (neplatí pro ně omezení vyjádřené Hayflickovým číslem). Omezení proliferace na určitý počet dělení bylo zjištěno u všech buněk, s výjimkou zárodečné linie (Hayflick a Moorhead, 1961). Nové pozměněné buňky mají schopnost autonomně růst a napadat ostatní tkáň. Často začínají jako benigní nádory a postupně se hromaděním mutací v dělicích se buňkách mění na maligní.

- Benigní nádory - rostou pomalu, zůstávají na místě svého vzniku, nejsou invazivní a nemetastázuji. Často nemají větší negativní účinek na organismus.
- Maligní nádory - rostou zpravidla rychle, šíří se infiltrativně do okolí, mají schopnost rozsévat se po těle pomocí krevního a lymfatického systému a zakládat vzdálená ložiska – metastázy (McKinnell a spol., 2006).

Morfologicky se nádor projevuje třemi způsoby růstu. Expanzivním (dochází k útlaku okolí – rostou tak benigní nádory). Infiltrativním (nádorové buňky vrůstají mezi buňky okolních tkání). Invazivním (nádorové buňky poškozují a ničí buňky tkání v okolí – rostou tak maligní nádory) (Vorlíček a spol., 2006).

Tělo je tvořeno mnoha typy buněk, které rostou a dělí se kontrolovaným způsobem. Když dojde k jejich poškození, spáchají apoptózu neboli programovanou buněčnou smrt a jsou nahrazeny buňkami jinými. Avšak někdy tento systematický proces selže. DNA buňky se poškodí nebo změní mutacemi působícími na normální buněčný růst a dělení. Buňky neumírají kdy by měly a vzniká nádor (Alberts a spol., 1998) (viz. Obr. 2).



Normální buňky reagují na neopravitelné poškození programovanou smrtí - apoptózou.

Nádorově pozměněné buňky nejsou k mechanismu apoptózy citlivé.

Obr. 2: Schéma ztráty kontroly nad buněčným dělením (U.S. National Cancer Institute, 2005).

Dalším mechanismem, který nádorové buňky využívají je reparace koncových částí chromozomů - telomer. Využívají k tomu enzym – telomerazu, který si dokáží samy vyrobit. Tento enzym vždy doplní chybějící počet nukleotidů na konec telomer a zabrání tak jejich zkracování, které by vedlo ke ztrátě replikační schopnosti a v konečném důsledku až k apoptóze buňky (Bryan a Cech, 1999). Nádorové buňky se tak stávají nesmrtelnými (Counter a spol., 1998). Zvýšená aktivita telomerázy je potřebná v místech, kde je třeba, aby docházelo k intenzivnímu dělení buněk (zárodečné buňky, buňky epiteliální aj.). Avšak v buňkách rakovinných je tento efekt velmi nežádoucí (Blasco, 2007). Role telomerázy v nesmrtelnosti buněk byla potvrzena v *in vitro* experimentech (Bodnar a spol., 1998; Vaziri a Benchimol, 1998). Aktivita telomerázy je prokázána prakticky ve všech typech maligních buněk (Shay a Bacchetti, 1997).

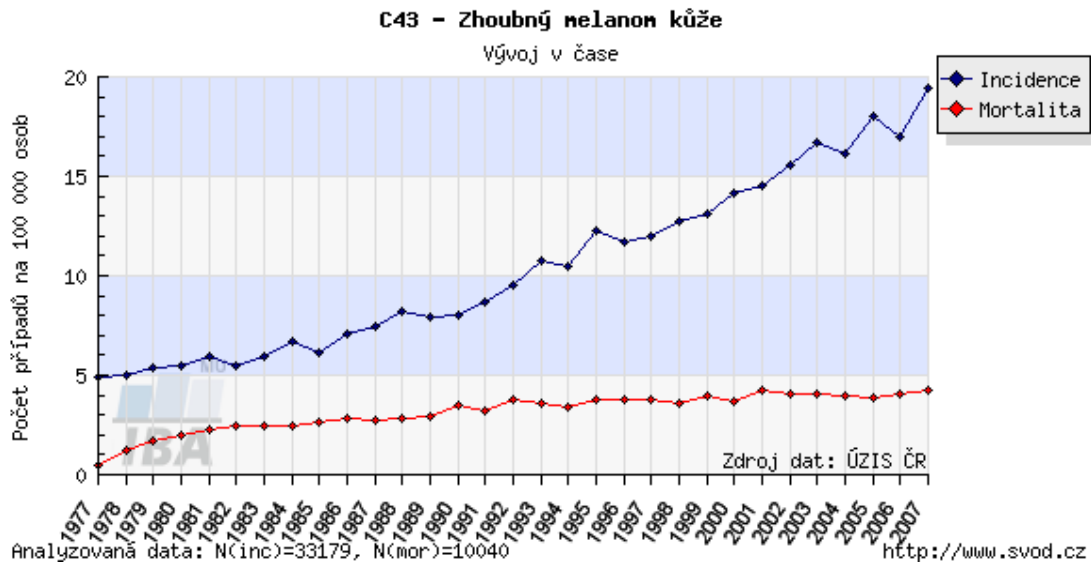
Když shluk buněk dosáhne asi jednoho milionu vyvolá nízká tenze kyslíku prorůstání cév (vaskularizaci) do nádoru, který ještě není morfologicky detekovatelný. Diagnostika a tím pádem i léčba je obvykle možná, když počet buněk v nádoru dosáhne miliardy a velikost nádoru se blíží 1 cm (Gilbert, 2006). Dělení buněk se poté zpomalí (většina zůstane v G1 fázi), prokrvení však umožní šíření nádorových buněk do dalších orgánů. Výsledná pozorování několika studií naznačují, že neovaskularizace je nezbytným předpokladem pro rychlou klonální expanzi spojenou se vznikem nádoru. Iniciačními signály angiogeneze jsou vascular endothelial growth factor (VEGF) a angiogenin (Fett a spol., 1985; Plate a spol., 1992; Shweiki a spol., 1992; Veikkola a Alitalo, 1999). Počínající angiogeneze byla prokázána v premaligních lézích melanocytů (Hanahan a Folkman, 1996).

1.3.1 Hlavní typy rakoviny

Většina nádorů dostala svůj název podle orgánu nebo typu buňky, ve kterém vzniká. Nádor může vzniknout v jakékoliv tkáni. Nejčastěji však vzniká tam, kde je dělení buněk nejintenzivnější (dýchací soustava, trávicí soustava) nebo kde jsou buňky stimulovány hormony (prostata, vaječníky, prsy). Není známa rakovina vlastní mozkové tkáně. V tomto případě totiž nedochází k obnovování buněk, čímž není možné ani jejich zvrhnutí. Nitrolební nádory vždy vznikají pouze z mozkových plen anebo z podpůrné gliové tkáně (American cancer society, 2010).

1.4 Melanom

Maligní melanom je neuroektodermální nádor vznikající proliferací melanocytů, které během embryonálního vývoje vycestovaly z embryonálního základu pro nervovou tkáň typicky do kůže, ale i do jiných orgánů (oko, vzácněji sliznice). Melanocyty jsou buňky tvořící pigment melanin, který je zodpovědný za zbarvení kůže a také těchto nádorů (hnědá, černá barva) (McKinnell a spol., 2006). Počet onemocnění maligním melanomem se každých 10 let zdvojnásobí. Zatímco na začátku 70. let minulého století byla incidence melanomu v České republice 3,2 : 100 000 obyvatel činila v roce 2007 již 19,3 : 100 000 obyvatel přičemž zemře 20 % postižených (viz. obr. 3).



Obr. 3: Incidence a mortalita zhoubného melanomu kůže v celé populaci ČR v čase na 100 000 obyvatel (Svod, 2010).

Maligní melanom patří k nejzhoubnějším lidským nádorům s trvale rostoucí incidencí. Příčina vzniku není přesně známa (Petruželka a spol., 2002). Hlavní rizikové faktory jsou popsány níže. Průměrný věk pacienta s melanomem při stanovení první diagnózy je 56 let.

Hlavní rizikové faktory, podílející se na vzniku melanomu:

- genetická dispozice (Holman a Armstrong, 1984; Garbe a spol., 1995)
- dysplastické névy (shluky pigmentu – „mateřská znaménka“) (Grulich, 1998)
- imunosuprese - vyvolaná léky nebo onemocněními (HIV) (Faizi a spol., 1999)
- radiace (Petruželka a spol., 2002)
- UV záření - zejména UVB záření (Faizi a spol., 1999)
- fototyp kůže (ohrožen je zejména fototyp I a II) (Faizi a spol., 1999)
- dlouhodobé pobyty v blízkosti rovníku (Wiecker a spol., 2003)
- občas pozorované spontánní remise vedou k úvaze o možné účasti imunologických faktorů (Petruželka a spol., 2002)

UVB záření indukuje v kůži řadu patologických procesů, jako je imunosupresivní účinek, vznik volných kyslíkových radikálů a poškození DNA melanocytů. Největší riziko vzniku melanomu na kůži je spojeno s akutním spálením kůže a to zejména v dětském věku

(Whiteman, 2001). Chronická UV expozice se podílí na vzniku pouze jednoho typu melanomu, a to lentigo maligna melanoma. Výskyt melanomu je častější v zemích blízce rovníku. V Austrálii a na Novém Zélandu je to přes 40 nových případů za rok (zvláště u imigrantů se světlou pletí) (Hunter a spol., 2002; Weedon, 2002). Melanom postihuje převážně bílou rasu, u Asiatů a černochoů je vzácný (Petruželka a spol., 2002).

Na rozdíl od ostatních epitelálních kožních nádorů se melanom nevyznačuje lokálním destruktivním růstem, ale nebezpečím časného hematogenního či lymfogenního metastátování. Dělení na klinická stadia onemocnění je založeno na histologickém hodnocení podle Breslowa (1970) a Clarka (1969). Podle Breslowovy klasifikace byla stanovena kritéria mortality. Ta je založena na hodnocení tloušťky a šířky nádoru v milimetrech. Klasifikace podle Clarka (Clark I-IV) je založena na určení hloubky invaze podle histologických vrstev kůže (Šlampa a spol., 2007).

Klinicky a histologicky rozlišujeme 4 typy maligního melanomu: (Hunter a spol., 2002)

- **Povrchově se šířící maligní melanom** - nejčastější typ melanomu. Roste nejprve povrchově, v pozdější fázi začne pronikat do hlubších vrstev kůže. Na kůži se takový růst projevuje vytvořením hrboleku na tmavě hnědé až černé plošce.
- **Nodulární melanom** - charakteristický již od počátku hrbolem vyvýšeným nad okolní kůži, který signalizuje prorůstání nádoru do větší hloubky.
- **Lentigo maligna melanom** - vzniká na kůži s patrnými známkami poškození slunečním zářením. Nejčastěji u starších osob. Lentigo maligna je pokládáno za melanom *in situ* tzn. šíří se povrchově (Šlampa a spol., 2007).
- **Akrolentiginózní melanom** - vzniká především na periferních partiích lidského těla, typicky na ploskách či dlaních nebo pod nehty.

Vzhledem k tomu, že jde o relativně radiorezistentní onemocnění, radioterapie není používána. Chemoterapie má význam pouze paliativní. Jedinou opravdu účinnou léčebnou metodou tak zůstává resekce primárního ložiska při včasné diagnostice (Šlampa a spol., 2007; Krajsová, 2009). Pro maligní melanom je charakteristický sklon k časnému metastazování (Weedon, 2002). Z primárního nádoru se zpravidla šíří maligní buňky lymfogenně do okolní kůže až ke spádovým lymfatickým uzlinám. Metastazování krevní cestou postihuje zejména plíce, játra, mozek a kosti (Krajsová, 2009).

Myší melanom B16 je pro onkologický výzkum používán od roku 1970 (Fidler, 1970). Rozeznávají se čtyři typy rozdílných buněčných linií: B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. V současnosti se v experimentálních studiích nejčastěji používají buněčné linie B16-F1 a B16-F10. Liší se v tom, že buněčná linie B16-F1 byla získána jednou selekční procedurou, B16-F10 deseti selekčními procedurami, metodou podle Fidlera (Fidler, 1973). Melanom je myším aplikován injekčně, nejčastěji podkožně nebo intravenózně ocasní žílou. B16-F10 a B16-BL6 buněčné linie mnohem častěji metastázuje, primárně do plic, než B16-F1 (Hart, 1979; Poste a Nicolson, 1980).

1.5 Studie na myších

V rámci projektu výzkumu lidského genetického kódu Human Genome Project (2003) byl také zmapován genom myši. Bylo zjištěno, že lidé a myši mají asi z 99 % totožný genom (Rogers a Bradley, 2001). Jane Rogersová a Chris Pointing z Wellcome Trust Sanger Institute v Cambridgi a konsorcium vědců z celého světa spolupracovali na projektu genetické mapy. Dá se předpokládat, že vznik různých zhoubných chorob bude mít velmi podobný průběh u obou druhů (Mills a Bradley, 2001). Myší genom je nyní bezplatně přístupný na internetu. Oba druhy mají asi 30 000 genů, přičemž naprostou většinu spolu sdílejí a jen asi 300 genů je naprosto jedinečných, díky čemuž je myš ideálním zvířetem pro výzkum lidských chorob (Lindblad-Toh a spol., 2001). Myši jsou malé, výborně přizpůsobené laboratornímu prostředí a jsou neustále rozsáhle studovány (McKinnell a spol., 2006). Většina genů, které mají pouze myši, je spojena s mnohem vyvinutějším čichem a reprodukčními schopnostmi. Asi devět desetin genů spojovaných u lidí s nemocemi je podobných s geny u myši. Jedním z důvodů přízvěnosti může být skutečnost, že lidé i myši mají společného předka, tvora velikosti malého hlodavce, který žil zhruba před 75 - 125 miliony let. Není přesně známo, kolik myši je ročně použito při výzkumech, ale odhaduje se, že je to kolem 25 milionů (Rogers a Bradley, 2001).

2 Terapie

Terapie nádorů je uskutečňována řadou přístupů, od chirurgického zásahu, přes ozařování, podávání chemoterapeutik až k biologické terapii, která se často pohybuje v rovině imunomodulační. Jednotlivé terapie jsou často kombinovány.

2.1 Enzymoterapie

Enzymoterapie nádorů má dlouhou historii a i v současnosti je systematická enzymoterapie stále aktuální metodou. Enzymy jsou aplikovány buď perorální nebo v případě preklinických studií perrektální cestou. Při perorálním způsobu podání je v přípravcích použita kombinace trypsinu, chymotrypsinu, papainu a bromelinu (Desser a spol., 2001). Tablety jsou opatřeny nepropustným obalem, který je chrání před kyselým prostředím žaludku, aby ke vstřebání mohlo dojít až v prostředí duodena. Odtud se látky dostávají do krve. V případě molekul o vyšší molekulové hmotnosti je spolehlivější aplikační cestou aplikace perrektální. Wald a spol. zaznamenal s použitím této aplikace výrazné úspěchy (Wald a spol., 1998, 2001).

Enzymy jsou v krvi ihned vychytávány a inhibovány inhibitory proteáz jako je např. α 2-makroglobulin, α 1-antitrypsin, α 1-antichymotrypsin, neboť sérum obsahuje jejich značné koncentrace. Proteázy se v lidském séru vyskytují přednostně ve formě komplexů s α 2-makroglobulinem (Topping a Seilman, 1979), který svým navázáním aktivují. Proteázy jsou v něm uzavřeny, avšak zůstávají aktivní a uchovávají si schopnost štěpit nízkomolekulární látky. Následně dojde k jeho konformační změně a odhalení receptorů, které doposud nebyly přístupné. Takové jsou pak schopny vázat cytokiny (Webb, 1996). Přehled hlavních cytokinů, které váže aktivovaný α 2-makroglobulin, je uveden níže.

Seznam hlavních cytokinů vázaných na α 2-makroglobulin:

beta-2 microglobulin	Gouin-Charnet a spol., 2000
Defensin	Panyutich a Ganz, 1991
IFN-gamma	James a spol., 1992
IGF-1	Da Silva a spol., 1996
IL-10	Garber a spol., 2000
IL-1beta, IL-2, IL-12	Borth a Teodorescu, 1986; Borth a Luger, 1989
IL-4	Garber a spol., 2000
IL-6	Matsuda a spol., 1989
IL-8	Kurdowska a spol., 1997
Inhibin, Activin	Vaughan a Vale, 1993; Niemuller a spol., 1995
PDGF-BB	Crookston a spol., 1994
TGF-alpha	Liebl a Koo, 1993
TGF-beta1, TGF-beta 2	Crookston a spol., 1994; Feige a spol., 1996
TNF-alpha	Crookston a spol., 1994
VEGF	Bhattacharjee a spol., 2000

Ze séra jsou cytokiny odstraňovány následujícím způsobem. Celý komplex α 2-makroglobulin-proteáza-cytokin je pohlcen hepatocyty, makrofágy a fibroblasty a zničen v jejich vakuolách.

Předpokládá se, že aktivovaný α 2-makroglobulin váže vysoké hladiny TGF- β i IL-10 aj.. Tímto si vysvětlujeme pozitivní výsledky systémové enzymoterapie (Leipner a Saller, 2000; Desser a spol., 2001), neboť produkcí zmíněných cytokinů nádor usiluje o nastolení imunologické tolerance.

TGF- β má široké působení. Jednak inhibuje cytotoxicitu makrofágů a NK buněk (Artega a spol., 1993; Finke a Bukowski, 2004), má vliv na proliferaci T-buněk (Weller a Fontana, 1995; Ghiringhelli a spol., 2005) stimuluje angiogenezi a metastázování nádorů (Yang a spol., 2002), dále zesiluje vlastní produkci a stimuluje produkci IL-10 (Maeda a Shiraishi, 1996).

IL-10 je protizánětlivý cytokin. Inhibuje sekreci Th1 lymfocytů jak myších tak lidských čímž potlačuje sekreci IL-2, INF-gama a brání aktivaci makrofágů (Moore a spol., 2001; Finke a Bukowski, 2004). Aktivuje B-lymfocyty (Romagni, 2000) a za určitých okolností zvyšuje cytotoxicitu a proliferaci T-lymfocytů (Groux a spol., 1998; Rowbottom a spol., 1999; Moore a spol., 2001). Jeho působení tak není úplně jednoznačné.

Výrazných úspěchů s použitím systémové enzymoterapie bylo dosaženo v experimentálním studiu na myších metastázových modelech. Použitá směs trypsinu, chymotrypsinu a papainu významně ovlivňovala tvorbu metastáz u melanomu B16 (Wald a spol., 2001) a Lewis lung karcinomu (Wald a spol., 1998), nicméně bylo potřeba užít účinné perrektální aplikace velkého množství enzymů.

2.2 Proenzymoterapie

Současný hlavní výzkumný zájem je pochopit protinádorové a antimetastatické účinky směsi proenzymů. Léčba je založena na více než 100 let starém pozorování provedeném Johnem Beardem (1858-1924), embryologem působícím na Universitě v Edinburghu. Beard se domníval, že maligní tumor a trofoblast je jedno a totéž. Tvrdil, že nádory vznikají z části primordiálních gonocytů (PGCs), které během své embryonální migrace uvízly v různých tkáních. Vznik nádorů chápal jako embryogenezi v nesprávném místě a čase (Beard, 1902). Časní embryologové a histologové vnímali trofoblast jako tkáň, která zprostředkovává předávání živin od matky plodu. Takto vznikl v roce 1888 jeho název, jehož autorem je Ambrosius Arnold Willem Hubrecht: od trophe: výživa a blastos: klíčky. Funkce trofoblastu je pro vývoj savců klíčová. Kmenové buňky zárodečné linie nejdříve diferencují a vytvářejí blastocystu, která se rozliší na vnější a vnitřní vrstvu buněk. Z vnitřní vrstvy se stává embryoblast, z vnější trofoblast. Z embryoblastu se vyvine embryo, buňky trofoblastu vylučují enzymy (proteinázy, hyaluronidázu) (Sehnal, 2009), které umožní blastocystě se zahnídit ve stěně dělohy. Aby k tomu došlo, buňky musejí být invazivní, ničivé a schopné se rozšiřovat, což je klíčovým znakem rakoviny. Jestliže trofoblast není ničím omezen, může se změnit do choriokarcinomu, který patří mezi nejvíce maligní typy rakoviny. Podle Bearda rakovina vzniká aktivací zárodečných buněk (PGCs), které zabloudily mezi ostatní somatické tkáně během jejich migrace do gonád v rostoucím embryu. Co udržuje trofoblast, aby se nestal invazivním je podle Bearda

přítomnost pankreatických enzymů embrya. Všiml si, že v době kdy dochází ke zpomalení růstu placenty (po 7. týdnu těhotenství), v trofoblastu ustávají mitózy a dochází k útlumu. V této době Beard pozoroval dokončení vývoje zymogenních granul v embryonálním pankreatu. Přisoudil tedy pankreatickým enzymům důležitou roli při regulaci trofoblastu (Beard, 1902, 1905) a rozhodl se použít extrakty pankreatu pro redukci maligních nádorů (Beard, 1902, 1903, 1905, 1907a, 1907b). Účinek vstříknutí pankreatického proteolytického enzymu trypsinu na zabíjení nádorových buněk byl experimentálně potvrzen a publikován jako trypsinová terapie nádorových onemocnění (Beard, 1906, 1911). Přestože úspěchy Beardovi práce byly dlouhou dobu zapomenuty, protože jiní lékaři nebyli schopni jeho práci zopakovat (Hald, 1907; Bainbridge, 1909) obnovený zájem ji opět vynesl na světlo vědy. Ernst T. Krebs se ve 40. letech začal Beardovými výzkumy zabývat a sestavil rozsáhlý seznam funkcí a produkovaných látek společných výhradně nádorovým buňkám a trofoblastu, ale ne tělu nebo somatickým tkáním (Krebs a spol., 1950). Beard spíše než enzymoterapii (podle něj trypsinová terapie) popsal proenzymoterapii, na což poprvé upozornili Trnka a Novák poté, co provedli experimenty na myších s transplantovanými melanomy B16 a s MCA indukovanými nádory (Trnka a spol., 1999; Novak a Trnka, 2005). *In vivo* jsou proenzymy příčinou zvýšené hladiny angiostatických peptidů v krvi (Elzer a spol., 2008). Beard používal velmi čerstvé extrakty telecích pankreatů a jako takové musely nutně obsahovat vysoké množství proenzymů (trypsinogenu, chymotrypsinogenu), které však byly popsány až mnohem později, tudíž o jejich účinku nemohl vědět. Trnka a spol., 1999 a Novák a Trnka, 2005 použili směs trypsinogenu a amylázy a zaznamenaly velmi dobré protimetastázové účinky na modelu melanomu B16/F10 studovaného na myších. Amyláza má podpůrný vliv, daný pravděpodobně odbouráváním glykogenu z rozpadlých nádorových buněk (Takahashi a spol., 1999; Rousset a spol., 1980) a přispěla k celkovému terapeutickému efektu.

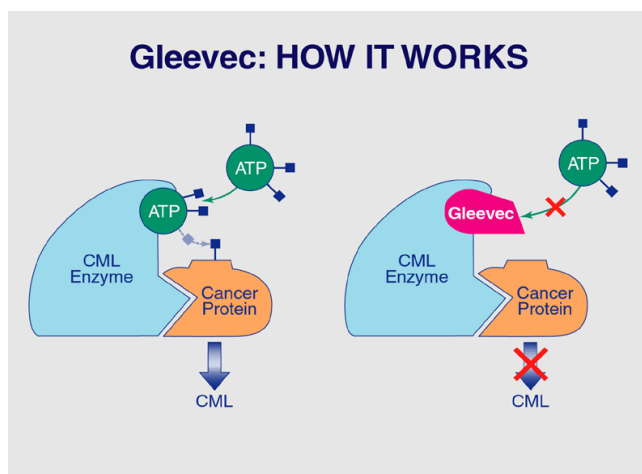
Hlavní výhodou proenzymoterapie je možnost použít řádově nižších koncentrací proenzymů, neboť tyto jsou pravděpodobně v místě nádorů vychytávány a aktivovány (Novak a Trnka, 2005). Naše dosavadní zkušenosti potvrdily protimetastázový účinek proenzymů a dále jsme pozorovali výrazný útlum růstu primárních nádorů a prodloužení přežití tumor nesoucích myší (Kalferstová, 2008; Kaiserová, 2008). V naší práci jsme se zaměřili na řešení otázky možnosti kombinace této metody s jinými terapeutickými přístupy.

2.3 Imatinib

Imatinib mesylate (IM) je derivátem 2-fenylaminopyrimidinu. Fenylaminopyrimidiny jako deriváty využitelné k blokadě tyrosinových kináz byly objeveny v 90. letech minulého století a IM byl syntetizován v roce 1992. V preklinických studiích byl označován jako STI571. Díky jeho pozitivním účinkům byl již v roce 2001 uveden na trh pod obchodním názvem Gleevec (USA) nebo Glivec (Evropa, Austrálie) americkou firmou Novartis. Byl vyvinut pro léčbu chronické myeloidní leukémie (CML) (Druker a spol., 2001; Kantarjian a spol., 2002; Sawyers a spol., 2002; Talpaz a spol., 2002; O'Brien a spol., 2003; Deininger a Druker, 2003). Od roku 2002 je používán pro léčbu gastrointestinálních stromálních tumorů (GISTs) (Joensuu a spol., 2001; Demetri a spol., 2002; Corless, 2008) kde ve specifických případech vedlo zvýšení dávky k dosažení účinnosti léčby, která nebyla do té doby efektivní (Heizmann a spol., 2004; Onitilo a Engel, 2009). V současnosti je používán také pro léčbu neuroblastomu (Beppu a spol., 2004), akutní lymfoblastické leukémie (ALL) (Wassmann a spol., 2003; Ottmann a spol., 2004) a melanomu (Curtin a spol., 2006). Na něj je zaměřená právě probíhající klinická studie, která je ve II. fázi experimentů a jejíž výsledky vypadají slibně (Carvajal a spol., 2009). IM patří mezi novou skupinu léků proti rakovině jejichž cílem jsou abnormální buněčné proteiny nádorových buněk. IM tak působí velice specificky a bude fungovat pouze v případě, jestliže je cílový protein přítomný a zapojený do vzniku nádoru. Mechanismus účinku IM je nejlépe prozkoumán v BCR/ABL-pozitivních buňkách kde blokováním abnormálního proteinu BCR/ABL např. IM zabíjí leukemické buňky.

IM je specifický inhibitor určitých proteinových tyrosinových kináz (Abl, BCR/ABL, PDGFR, KIT) (Druker a spol., 1996; Buchdunger a spol., 2000). PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) a KIT se nacházejí v receptorech na povrchu nádorových buněk. ABL a fúzní protein BCR/ABL cirkulují v cytoplazmě. Tyrosinkinázy katalyzují fosforylaci proteinů čímž regulují jejich aktivitu. Mechanismus účinku IM spočívá ve specifické inhibici těchto kináz. Váže se na jejich vazebné místo určené pro ATP (Kurzrock a spol., 2003; Deininger a spol., 2005). Díky tomu nedochází k přenosu aktivního fosfátu na tyrosin bílkoviny nádorové buňky. Dojde k blokadě fosforylace a

následně k zastavení aktivace signálních drah vedoucích ke stimulaci růstových receptorů. Působení IM tak vede k zástavě proliferace a apoptóze nádorových buněk (viz Obr. 4.)



Obr. 4: Působení Gliveku na modelu CML (U.S. National Cancer Institute, 2010).

Bylo prokázáno angiogenní působení IM *in vitro* i *in vivo* (Buchdunger a spol., 2002). Biologický poločas eliminace IM umožňuje jeho podávání jednou denně. Obecně je velmi dobře snášen. V plazmě je vázán na bílkoviny, zejména na albumin, metabolizován je v játrech (Novartis Pharmaceuticals Corporation, 2002). Výsledkem degradace je řada látek, které jsou vylučovány převážně stolicí (70%).

Terapie melanomu je založená na přítomnosti pozitivní reakce na KIT, která byla objevena ve všech 4 podskupinách melanomů (uvedeno v kapitole melanom), kromě kožního melanomu vzniklého bez chronického poškození sluncem (Curtin a spol., 2006). Přenos signálu přes c-kit a PDGFR byl prokázán také u maligního melanomu (Wyman, 2006). Nicméně samotný IM má u maligního melanomu jen minimální klinickou účinnost (Urugel a spol., 2005; Kim a spol., 2008). Existuje stále více důkazů, že kombinace IM a chemoterapeutických látek, jako jsou taxany nebo gemcitabiny, mají synergickou protinádorovou aktivitu *in vitro* i *in vivo* (Pietras a spol., 2002; Hwang a spol., 2003; Mathew a spol., 2004). Úspěšnost jeho léčby bude záležet na výběru vhodných pacientů a kombinovatelnosti s jinými látkami. Stále proto probíhají další studie na pacientech s pokročilým melanomem zaměřené na změny v c-kit (Kim a spol., 2008). Jelikož výsledky u tohoto typu nádoru nejsou tak ideální jako u jiných typů rakoviny a stále probíhají výzkumy, rozhodli jsme se jím zabývat také my. IM byl s pozitivními výsledky použit na myším modelu B16-F10 a z tohoto experimentu vycházíme (Redondo a spol., 2004).

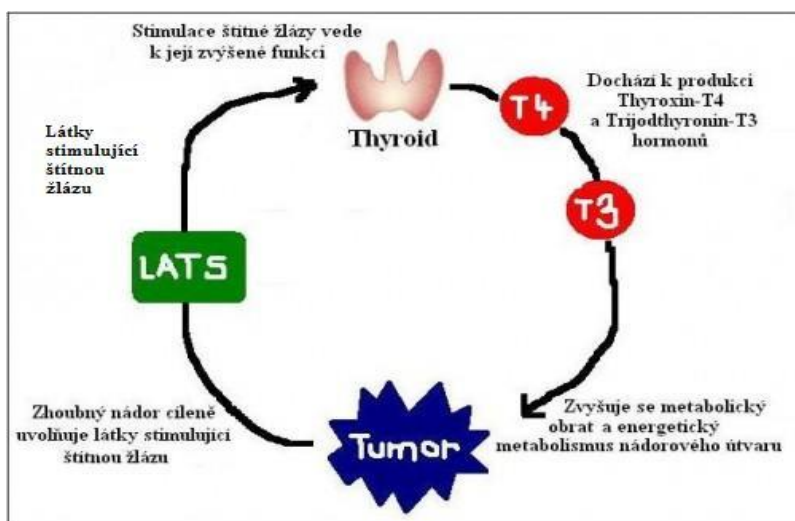
2.4 Karbimazol

Karbimazol je chemický derivát imidazolu s obsahem síry (karbentoxy-3-metyl-2-thialidazolium) patřící do skupiny thiokarbamidů. Vlastní biologicky účinnou látkou je však methimazol (1,3-Dihydro-1-methyl-2H-imidazol-2-thion), který vzniká jeho metabolizací v organismu. Methimazol je lék blokující činnost štítné žlázy. Na trh byl uveden v roce 1949 a je široce používán k léčbě hypertyreózy (porucha štítné žlázy). Avšak nejsou k dispozici žádná data, týkající se účinku methimazolu na rakovinu. Byly publikovány jediné dvě analýzy provedené ve Velké Británii a USA zabývající se rizikem vzniku rakoviny u žen s hypertyreózou, které byly léčeny léky působícími proti štítné žláze. Působení Methimazolu po perorálním podání bylo omezeně testováno také na myších a laboratorních krysách. Výsledky jsou však značně rozporuplné a nedostatečné (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2001).

Ve druhé polovině minulého století, se touto problematikou začal zabývat MUDr. Kamil Jurkovič, slovenský lékař z Trenčína. V roce 1973 vyléčil prvního pacienta a se svou metodou slavil obrovské úspěchy. Revolučním na tom bylo především to, že dokázal vyléčit pacienty s obrovskými nádory, kterým už onkologové nedávali žádnou šanci. Důvodem, že se o jeho práci všeobecně neví, zapříčinily tehdejší poměry v Československu. Vydána byla jen jediná kniha (Jurkovič, 2003), ve které autor shrnuje své poznatky a domněnky a uvádí způsob léčby a údaje o svých pacientech. Jurkovič vycházel z toho, že rostoucí nádor potřebuje ke svému životu především dostatečný přívod živin a aby tyto látky získal, působí na štítnou žlázu, která je regulátorem metabolismu v organismu a stimuluje ji ke zvýšené činnosti. Aby metabolismus zhoubného nádoru potlačil, ztlumil činnost štítné žlázy Karbimazolem. Následkem terapie došlo k resorpci nádorového ložiska.

Štítná žláza je tvořena dvěma typy buněk. Folikulárními buňkami a parafolikulárními buňkami. Většina tkáně je složena z folikulárních buněk, které produkují jód obsahující hormon Thyroxin (T4) a Trijodthyronin (T3). Parafolikulární buňky produkují hormon kalcitonin. K produkci hormonů potřebuje štítná žláza jód. Štítné žláze nadřazená je hypofýza, která produkuje thyreotropní hormon (TSH), který stimuluje syntézu a

uvolňování hormonů štítné žlázy. Na vrcholu kontrolního systému stojí hypotalamus. Zjednodušená představa jak nádor ovlivňuje štítnou žlázu je na obr. 5.



Obr. 5: Stimulace štítné žlázy nádorem, upraveno (Léčba rakoviny, 2008).

Štítnou žlázu dle Jurkoviče můžeme blokovat pouze tehdy, pokud je její činnost zvýšená vlivem onkogenního onemocnění. Pokud by se štítná žláza blokovala pacientovi bez zhoubné nemoci, štítná žláza by v krátké době reagovala zvětšením. Pacientovi se zhoubným nádorem je možné aplikovat tyreostatikum i několik let beze změn či poškození štítné žlázy. Ta reaguje zvětšením až tehdy, pokud se nádor důsledkem terapie změní na nezhoubný nebo se úplně resorbuje. Po skončení léčby se štítná žláza upraví na normu. Jelikož nádor působí také na imunitní systém, kostní dřeň a životně důležité orgány, bylo součástí jeho léčby podávání látek, které maximálně tyto průvodní jevy omezí (Jurkovič, 2003). Na univerzitě v Texasu v M. D. Anderson Cancer Center byl v roce 2009 zkoumán vliv hypothyreózy na prevenci rakoviny prsu s pozitivním výsledkem. Ten samí závěr mají i další studie (Hercbergs a spol., 2004; Howell a spol., 2009).

2.5 Beta glukan

Počátky výzkumu beta-glukanů spadají do 40. let minulého století. V jejich průběhu bylo připraveno několik přípravků s obsahem různých druhů beta glukanu (Zyosan - směs polysacharidů, izolovaná ze stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Pillemer a Ecker, 1941), Hydroglukan, Glukan - izolován z buněčných stěn hub (Chihara a spol., 1969). V přírodě se však nachází ještě v dalších zdrojích např. ho obsahují mořské řasy (Black a spol., 1951), obiloviny, produkován je i některými bakteriemi (Harada a spol., 1968). Všechny uvedené přípravky měly stimulační účinek na imunitní systém. To bylo znovu potvrzeno v roce 2001 (Brown a Gordon, 2001).

Beta glukan je chemické označení jednoho z polymerů beta glukosy. Existuje několik odlišných typů glukanů s různou mírou aktivity. Nejaktivnější a proto nejdůležitější z glukanů je beta-1,3-D-glukan. Je to přírodní polysacharid, který se nachází v buněčných stěnách kvasinek a některých hub (např. hlívy ústříčné). Ve vodě je tato molekula velmi málo rozpustná. Ve výzkumném středisku na Harvardské Univerzitě bylo zjištěno, že dojde-li k setkání makrofágu s beta glukanem, molekula, jejíž částice ideálně vyhovují receptorům makrofágů, se na něj naváže právě prostřednictvím receptoru (proteinový komplex, který se vyskytuje od počátku zrání těchto buněk v kostní dřeni i během jejich diferenciaci) a makrofág se aktivuje (Compton a spol., 1996). Dojde ke zvýšení jeho fagocytárních funkcí, produkci cytokinů, aktivace T a B buněk, uvolňování kolonizačních stimulačních faktorů GM-CSF a interferonů. Aktivované makrofágy se spolu s cytokiny podílejí na nespecifické imunitě.

Beta-1,3-D-glukan působí selektivně, je netoxický a nemá žádné vedlejší účinky (Chan a spol., 2009). Prokázalo se také, že zásadní význam má rovněž čistota použitého přípravku. Pouze příslušně očištěný beta-1,3-D-glukan (zbavený bílkovin a tuků), z něhož jsou odtraněny vedlejší látky oslabující jeho účinek, aktivuje makrofágy. Mimo jiné působí protinádorově (Di Luzio a spol., 1979; Mimura a spol., 1985) a uplatňuje se i v prevenci karcinogeneze (např. zachycuje volné radikály) (Sherwood a spol., 1986; Vetvicka a spol., 1999).

Lokálně podané injekce beta-1,3-D-glukanové suspenze do melanomové léze přinesly úspěšné výsledky (Mansel, 1978). U myši, kterým byl transplantován melanom došlo ke snížení nádorového růstu a významnému prodloužení přežití. Toto pozorování je způsobeno schopností beta glukanu vázat se na makrofágy a NK buňky a aktivovat je. Stejný výsledek s použitím beta-glukanu přinesla i tato studie (Hong a spol., 2003). Výzkumy provedené Allendorfem a spol. (Allendorf, 2003) jasně ukázaly, že beta- glukan podávaný perorálně, má hematopoetický efekt podobný beta glukanu vpravovanému i.v. metodami. Práce Vetvicky a spol. ukázala mechanismus přenosu beta glukanu skrze gastrointestinální trakt (Vetvicka, 2007). Dále bylo zjištěno, že beta glukán má výrazné účinky na metastázování nádorů. U myši, kterým byl podáván beta glukán, se projevil značný pokles vzniku plicních metastáz oproti myším v kontrolních skupinách (Moon a spol., 2005; Vetvicka a spol., 2007). Vliv beta glukanu na redukci nádorového růstu a metastázování melanomu B16-F10 prokázala Kalferstová, 2008. Použila stejný beta glukán, jako jsme se rozhodli použít i my, a to dodaný firmou Transfer Point. Tento beta glukán byl v rozsáhlých testech vyhodnocen jako neúčinnější (Vetvicka a Vetvickova, 2007).

2 Cíle práce:

- Terapie transplantovaného melanomu B16-F10 pomocí proenzymoterapie, Imatinibu a kombinace obou metod
- Studium kombinace proenzymoterapie s ovlivněním metabolismu nádorů pomocí Karbimazolu
- Srovnání terapeutického efektu proenzymoterapie a beta glukanu, kombinace obou metod

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

- amyláza (Sigma-Aldrich), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- trypsinogenu (Sigma-Aldrich), aktivita: 11300 BAEE U/mg protein (po akt.)
- α -chymotrypsinogen A (Sigma-Aldrich), aktivita: 56 BTEE U/mg solid (po aktivaci), (1 U před aktivací)
- Imatinib mesylate - (STI571, Gleevec, Novartis)
- Karbimazol - Slovakofarma, 5 mg v tableť
- Beta glukán (Beta-1,3-D glukán) - (Transfer Point, Columbia, SC, USA).

4.2 Laboratorní zvířata

Při pokusech byly použity SPF (special pathogen free) myši kmene C57BL/6 (Charles River) samičího pohlaví. Pokud není jinak uvedeno, myši byly 8 týdnů staré a vážily 18-20g. Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Krmény byly standardní komerční granulovanou stravou, ke stravě a vodě měly přístup 24h denně.

4.2.1 Buněčná linie

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

4.3 Transplantace melanomu B16-F10

Příprava buněk B16-F10 - po odstranění media byly buňky třikrát propláchnuty sterilním PBS. Poté se buňky krátce propláchly cca 2 ml trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,5 mM EDTA v PBS) a po přidání 0,5 ml trypsinizační směsí následovala 1 – 4 minutová inkubace v termostatu při 37°C. Po této době došlo k odpoutání buněk adherovaných k povrchu. Následně bylo k buňkám přidáno 5 ml RPMI s 10% FCS což zainhibovalo trypsin. Buňky byly poté centrifugovány 10 min při 4°C a při 150G. Následovalo

centrifugační promytí buněk s RPMI 1640 bez séra za stejných podmínek. Promyté buňky byly rozsuspendovány v 5 ml RPMI 1640 a spočítány (Trypanová modř, 1:1). Jejich koncentrace byla upravena na 4 mil/ml. Myši byly nejprve oholeny (pravá zadní část zad) a poté bylo do oholeného místa s.c. injikováno 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

4.4 Měření velikosti nádorů

Ve všech třech pokusech byl sledován růst a objem nádorů. Nádory byly dvakrát týdně měřeny kaliperem metodou podle Inaba (Inaba a spol., 1986). Pro výpočet objemu nádoru byl použit vzorec $V = \pi/6 AB^2$ (A je největší rozměr nádoru, B je nejmenší rozměr nádoru).

4.5 Počítání metastáz - plíce

Provádělo se pouze u třetího pokusu. Všechny plíce byly prohlédnuty pod binolupou a byla spočítána metastatická ložiska (černé tečky) (Vetvicka a spol., 2007).

4.6 Analýza suspenze beta glukanu (pro perorální podání) a sonikované suspenze beta glukanu (pro i.v. a i.t. aplikaci) pomocí skenovacího elektronového mikroskopu

Byla připravena suspenze beta glukanu pro perorální aplikaci i sonikovaná suspenze pro i.v. a i.t. aplikaci (viz níže). Obě suspenze byly připraveny v destilované vodě a nakápnuty na podložní sklíčko. Po odpaření vody bylo provedeno pokovení 20 nm zlata. Preparáty byly prohlíženy pomocí skenovacího elektronového mikroskopu JEOL JSM 7401F při zvětšení 150 – 9500.

4.7 Statistické vyhodnocování

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí oboustranného Studentova t-testu a programu STATISTICA VII od firmy StatSoft INC (Survival Analysis). V programu Microsoft Excel byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky, které byly použity pro vytvoření grafů.

4.8 Uspořádání jednotlivých experimentů

4.8.1 Pokus č. 1

Proenzymoterapie, chemoterapie pomocí Imatinibu a kombinace obou metod

12. den po transplantaci melanomu B16-F10 byly nádory změřeny kaliperem a myši byly randomizovány do 4 skupin. Tento den byl zároveň počátkem terapie.

Myším v I. skupině bylo denně aplikováno i.p. 0,2 ml roztoku Imatinibu (10 myši).

Myším ve II. skupině bylo denně aplikováno i.m. 0,1 ml roztoku proenzymů do stehenního svalu levé zadní nohy a současně dostávaly i.p. 0,2 ml Imatinibu (10 myši).

Myším ve III. skupině byl aplikován roztok proenzymů tak, jako skupině II. (30 myši).

IV. skupina představovala neléčenou kontrolu (10 myši).

Použité roztoky:

- Imatinib: 3,75 mg Imatinibu / ml fyziologického roztoku
- Roztok proenzymů: Byla použita směs o tomto složení: 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy na ml fyziologického roztoku, sterilizováno filtrací

4.8.2 Pokus č. 2

Proenzymoterapie, ovlivňování metabolismu nádorů pomocí karbimazolu a kombinace obou metod

13. den po transplantaci melanomu B16-F10 byly nádory změřeny kaliperem a myši byly randomizovány do 4 skupin. Tento den byla započata léčba.

I. skupině bylo denně podáváno i.m. 0,1 ml roztoku proenzymů (stejně složení, jako v pokuse I.) do stehenního svalu levé zadní nohy (10 myši)

II. skupině byl perorálně podáván roztok karbimazolu, složení viz níže (10 myši)

III. skupině byly podávány proenzymy a karbimazol ve stejných dávkách jako ve skupinách I. a II. (10 myši)

IV. neléčené, kontrolní myši (10 myši)

Roztok Karbimazolu:

Karbimazol je ve vodě mírně rozpustný, plně rozpustný je v etanolu. Z tohoto důvodu byl výsledný roztok připraven následujícím způsobem. Dvě tablety carbimazolu byly rozemlety na prášek a rozpuštěny v 1 ml čistého etanolu. Směs byla postupně rozředěna vodou na 500 ml a podávána myším k pití, což představovalo 10 mg látky rozpuštěné v 500ml vody. Jelikož myš vypije 5 ml/den dostane každý den 0,1 mg účinné látky.

4.8.3 Pokus č. 3

Proenzymoterapie, terapie pomocí beta glukanu a kombinace obou metod

Z důvodů uvedených v diskusi jsme použili starší myši, které v době transplantace byly 15 týdnů staré.

11. den po transplantaci melanomu B16-F10 byly nádory změřeny kaliperem a myši byly randomizovány do 10 skupin. Tento den započala terapie.

- I. skupina: i. m. 0,1 ml roztoku proenzymů + perorálně 0,05ml beta glukanu (8 myši)
- II. skupina: i. p. 0,1 ml roztoku proenzymů + perorálně 0,05 ml beta glukanu (8 myši)
- III. skupina: i. m. 0,1 ml roztoku proenzymů + 0,1ml sonikovaného beta glukanu intravenózně (8 myši)
- IV. skupina: i.p. 0,1ml roztoku proenzymů + 0,1ml sonikovaného beta glukanu intravenózně (8 myši)
- V. skupina: perorálně 0,050 ml beta glukanu (8 myši)
- VI. skupina: 0,1ml sonikovaného beta glukanu intravenózně (8 myši)
- VII. skupina: i. p . 0,1 ml roztoku proenzymů (20 myši)
- VIII. skupina: i. m. 0,1 ml roztoku proenzymů (20 myši)
- IX. skupina: kontrolní, neléčené myši (20 myši)
- X. skupina: intratumorálně 0,1 ml sonikovaného beta glukanu (3 myši)

Aplikace roztoků: Ve skupinách I. - VIII. bylo vše podáváno denně. Ve skupině X. byl beta glukán aplikován obden.

Pozn.: Skupiny VII., VIII. a IX. byly součástí experimentu Hany Maršíkové, který probíhal paralelně a za stejných podmínek a mohl tak posloužit jako kontrola pro náš experiment.

Složení podávaných roztoků:

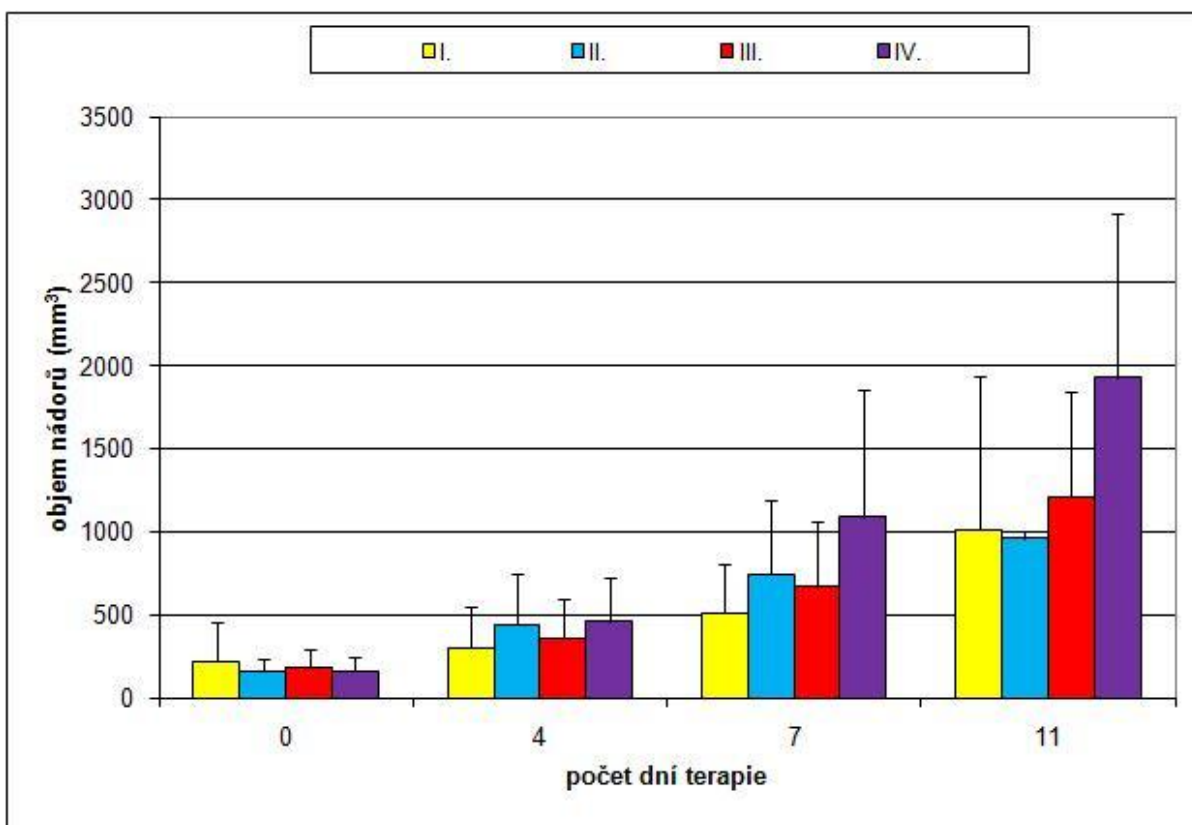
- Roztok proenzymů – stejný roztok, jako v pokusu 1.
- Beta glukan pro perorální aplikaci: 60 mg β -glukanu / ml vody z vodovodu. Jelikož se jednalo o suspenzi, byly alikvoty odebírány z míchané suspenze špičkou se širokým otvorem.
- Sonikovaný beta glukan: Byl použit stejný beta glukan jako v případě perorální aplikace, ale byl upraven pomocí sonikátoru. Nejdříve se beta glukan vysterilizoval působením UV světla po dobu 30 minut ve sterilním boxu. Následně se smícháním takto vysterilizovaného beta glukanu se sterilním fyziologickým roztokem vytvořilo 50 ml suspenze. Pak proběhlo sonikování 12 x 10 s pomocí sonikátoru HIELSCHER UP 200S. Kvůli zahřívání jsme vše prováděli v ledové lázni. Vždy 10s jsme prováděli ozvučení a 10s jsme chladili. Částice takto připraveného sonikovaného beta glukanu měly velikost 1 μ m (ověřeno ELMI), což bylo nezbytné pro intravenózní aplikaci.

5 Výsledky

5.1 Pokus č. 1

Proenzymoterapie, chemoterapie pomocí Imatinibu a kombinace obou metod

Sledovali jsme vliv Imatinibu a proenzymů a jejich vzájemné kombinace na růst transplantovaného nádoru u jednotlivých skupin. Výsledné hodnoty udává Obr. 6. Všechny způsoby terapie vedly k výraznému snížení růstu nádorů, který však nedosáhl statistické významnosti. Imatinib a proenzymoterapie vykazovaly srovnatelný efekt. Jejich kombinace však nevedla ani k aditivitě, ani k synergii. Rozdíly v přežívání nebyly statisticky významné.

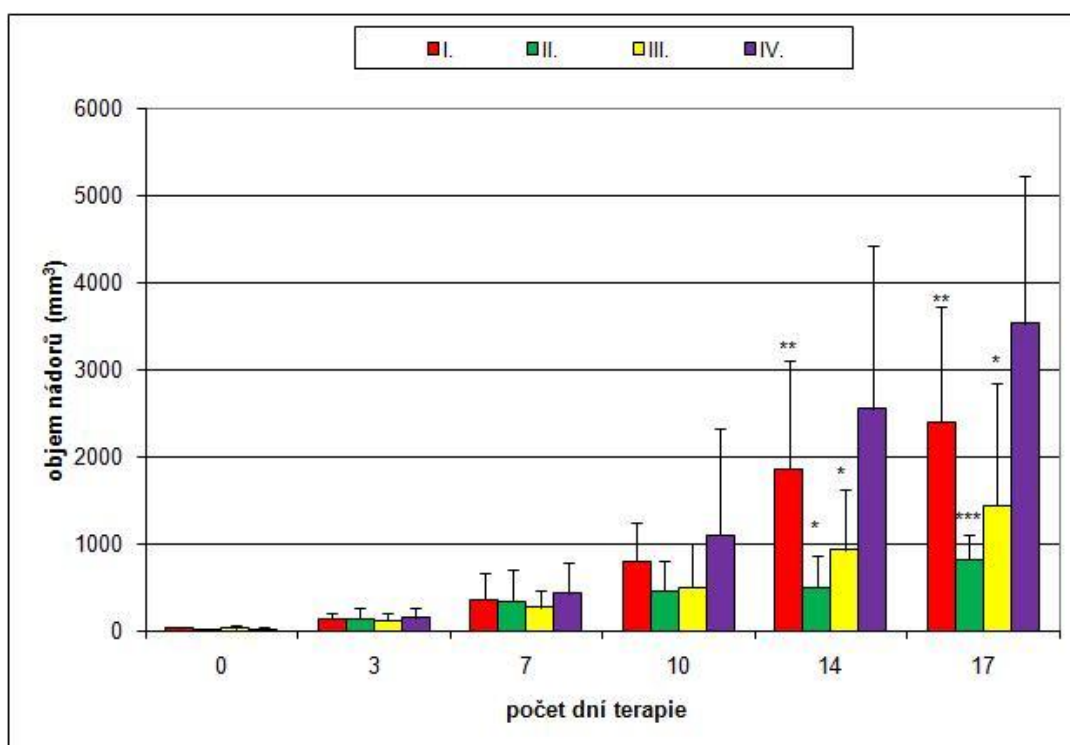


Obr. 6: Průměrný objem nádorů v jednotlivých skupinách. I. - Imatinib, II. - Imatinib v kombinaci s proenzymy, III. - proenzymy, IV. - kontrola.

5.2 Pokus č. 2

Proenzymoterapie, ovlivňování metabolismu nádorů pomocí karbimazolu a kombinace obou metod

Sledovali jsme vliv Karbimazolu a proenzymů a jejich kombinací. Výsledné hodnoty uvádí Obr. 7. Růst nádorů byl nejvíce inhibován Karbimazolem (skupina II.), tento trend přetrvával po celou dobu terapie a jeho účinek byl výrazný proti všem ostatním skupinám. Proti proenzymoterapii nabyl tento rozdíl statistické významnosti 14. a 17. den terapie. Kombinace Karbimazolu s proenzymy se zpočátku jevila velmi nadějně a inhibiční vliv byl do 7. dne větší než Karbimazolu, avšak od 10. dne začal účinek této kombinované terapie klesat. Koncem experimentu vykazovala kombinace Karbimazolu a proenzymů účinek, který byl průměrem efektu jednotlivých složek, nelze tedy hovořit ani o aditivitě a vůbec už ne o synergii. Mezi skupinami nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v době přežití.



Obr. 7: Průměrný objem nádorů v jednotlivých skupinách. I. - proenzymy, II. - Karbimazol, III. - Karbimazol v kombinaci s proenzymy, IV. - kontrola.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (IV.)

** $P \leq 0,05$ vztaženo ke Karbimazolu (II.)

*** $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (IV.)

5.3 Pokus č. 3

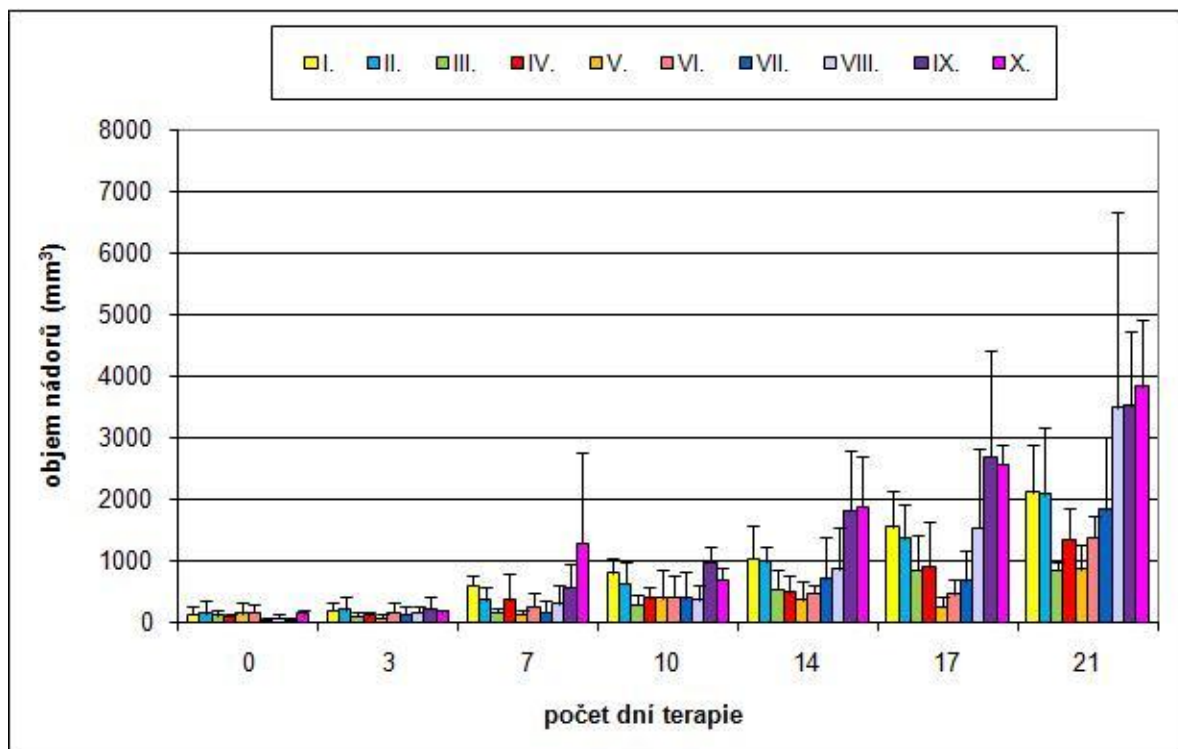
Proenzymoterapie, terapie pomocí beta glukanu a kombinace obou metod

Sledovali jsme vliv beta glukanu a proenzymů a jejich kombinací. Výsledky udává Obr. 8. Nejvíce růst nádoru inhiboval beta glukan podávaný perorálně a to po celou dobu pokusu. 3., 7., 14., a 21. den terapie došlo k dosažení statistické významnosti rozdílu velikosti mezi beta glukanem podávaným perorálně a kontrolou. Sonikovaný beta glukan podávaný intravenózně si vedl také velice dobře po celou dobu pokusu, do 14. dne terapie byl jeho účinek srovnatelný s působením perorálně podávaného beta glukanu, poté ale došlo k útlumu. Mohlo to být důsledkem toho, že myši měly již rozpíchané ocásky a látka se hůře aplikovala. 7. a 10. den terapie došlo k dosažení statistické významnosti rozdílu mezi sonikovaným i.v. aplikovaným beta glukanem a kontrolou. Co se týče srovnání sonikovaného beta glukanu aplikovaného přímo do nádorů, zde se inhibiční účinek neprojevil vůbec, i když mezi 7. a 10. dnem došlo k zabrání terapie, byl tento inhibiční účinek pouze přechodný a po celou dobu terapie nevykazovala žádný rozdíl od kontroly. Beta glukan aplikovaný přímo do nádoru neměl na jejich růst žádný vliv.

Samotné proenzymy inhibovaly nádorový růst velice efektivně až do 10 dne. Poté jejich účinek začal slábnout. Účinek proenzymů podávaných oběma cestami byl srovnatelný až do 14. dne, kdy proenzymy s intramuskulární aplikací začaly výrazně ztrácet na účinku a na konci pokusu se dokonce velice přiblížily kontrole, zatímco proenzymy podávané intraperitoneálně si inhibiční účinek udržely. Od 7. do 14. dne byla zaznamenána statistická významnost rozdílu mezi oběma skupinami proenzymů a kontrolou, přičemž proenzymy podávané intraperitoneálně si statisticky významný rozdíl vůči kontrole udržely až do dne 17..

Veškeré kombinace proenzymů podávaných oběma cestami s perorální a intravenózní aplikací beta glukanu se ukázaly jako neúčinné, nedocházelo k aditivě ani synergii a kombinovaná terapie často působila hůře než jednotlivé její složky. Pouze u kombinace i.m. aplikace proenzymů s i.v. aplikací beta glukanu byly na začátku a na konci experimentu zaznamenány nepatrné náznaky aditivity účinku.

Všechny údaje o dosažení statistické významnosti jsou kvůli jejich množství uvedeny zvlášť v tabulce Tab. I..



Obr. 8: Průměrný objem nádorů v jednotlivých skupinách.

I. - P i.m. + B-glukan per os

VI. - B-glukan sonik. i.v.

II. - P i.p. + B-glukan per os

VII. - P i.p.

III. - P i.m. + B-glukan sonik. i.v.

VIII. - P i.m.

IV. - P i.p. + B-glukan sonik. i.v.

IX. - kontrola

V. - B-glukan per os

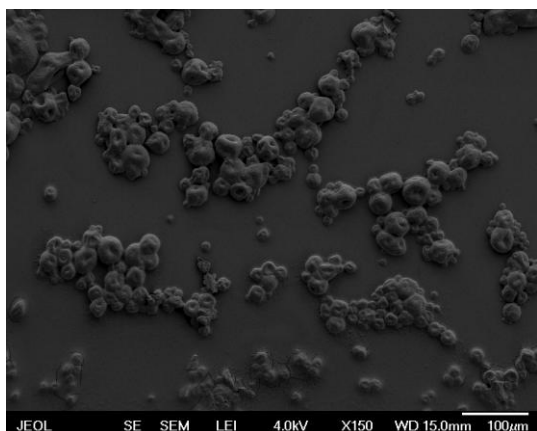
X. - B-glukan sonik. do nádorů

Tab. I: Dosažené statistické významnosti v jednotlivých dnech terapie.

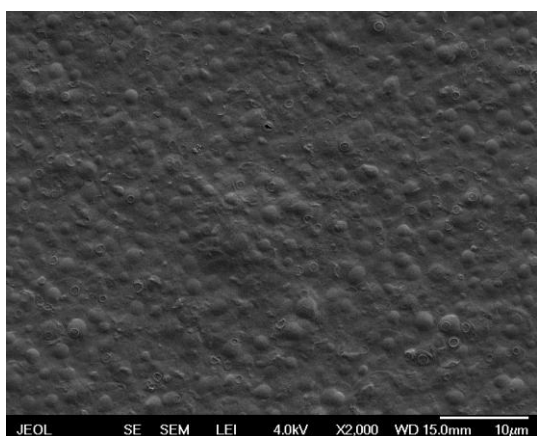
3. den	7. den	10. den	14. den	17. den	21. den
III. x IX.	I. x III.	I. x III.	I. x IX.	I. x V.	I. x III.
$P \leq 0,05$	$P \leq 0,005$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
III. x X.	I. x V.	I. x IV.	II. x III.	I. x VI.	I. x IX.
$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
V. x VIII.	I. x VI.	I. x VII.	II. x IV.	I. x VII.	III. x VII.
$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,005$
V. x IX.	I. x VII.	I. x VIII.	II. x VI.	I. x IX.	III. x VIII.
$P \leq 0,05$	$P \leq 0,005$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
V. x X.	I. x VIII.	III. x IX.	II. x IX.	I. x X.	III. x X.
$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,0005$	$P \leq 0,005$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
	II. x III.	VI. x IX.	V. x IX.	II. x V.	IV. x X.
	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
	II. x V.	VII. x IX.	VII. x IX.	II. x VI.	V. x VIII.
	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,005$	$P \leq 0,0005$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
	III. x IX.	VIII. x IX.	VIII. x IX.	II. x IX.	V. x IX.
	$P \leq 0,0005$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,005$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,005$
	V. x IX.			II. x X.	V. x X.
	$P \leq 0,0005$			$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
	V. x VIII.			III. x IX.	VI. x X.
	$P \leq 0,05$			$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$
	VI. x IX.			III. x X.	
	$P \leq 0,05$			$P \leq 0,05$	
	VII. x IX.			IV. x IX.	
	$P \leq 0,005$			$P \leq 0,005$	
	VIII. x IX.			IV. x X.	
	$P \leq 0,05$			$P \leq 0,005$	
				V. x VII.	
				$P \leq 0,05$	
				V. x VIII.	
				$P \leq 0,05$	
				V. x X.	
				$P \leq 0,005$	
				VI. x VIII.	
				$P \leq 0,05$	
				VI. x X.	
				$P \leq 0,001$	
				VII. x IX.	
				$P \leq 0,0005$	

Antimetastatické působení jednotlivých terapií bylo velmi těžké posuzovat kvůli značným rozdílům v počtu myši v jednotlivých skupinách, což by po vyhodnocení mohlo poskytnout zavádějící údaje. Nejvýraznější protimetastázový účinek byl patrný ve skupině s beta glukanem podávaným intravenózně spolu s proenzymy aplikovanými intraperitoneální cestou (skupina IV.) kde byl účinek 100%.

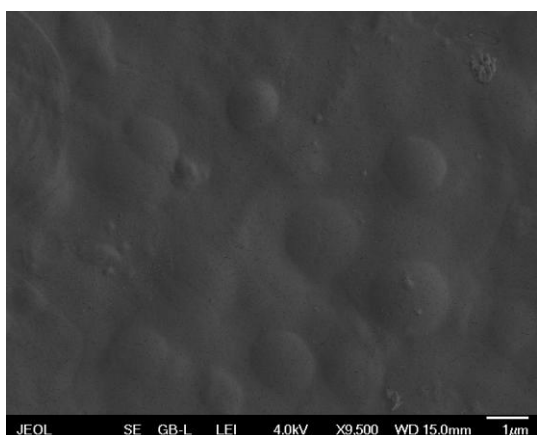
Jak vyplývá z Obr. 9, 10 a 11, sonikace použitá při přípravě preparátu pro i.v. a i.t. aplikace vedla k výraznému zmenšení částic BG. Sonikovaný preparát obsahoval částice kolem 1 mikrometru velké, takže ho bylo možno použít i pro i.v. aplikaci.



Obr. 9: Původní nesonikovaná suspenze beta glukanu při 150 násobném zvětšení.



Obr. 10: Sonikovaná suspenze beta glukanu při zvětšení 2000x.



Obr. 11: Sonikovaná suspenze beta glukanu při zvětšení 9500x. Jak je patrné, částice beta glukanu dosahují rozměrů 1 – 1,5 mikrometrů.

6 Diskuse

V našich experimentech jsme testovali proenzymoterapii, Imatinib, Karbimazol a beta glukan. S proenzymoterapií jsme srovnávali účinek Imatinibu, chemoterapeutika nové generace s cíleným účinkem, účinek Karbimazolu, ovlivňujícího úroveň celkového metabolismu a účinek beta glukanu, stimujícího vrozenou imunitu. Proenzymoterapii můžeme chápat jako imunomodulaci působící na úrovni získané imunity, výsledky Kaiserové připravované pro magisterskou práci tento přístup podporují. Zajímala nás kombinovatelnost metod a to z důvodu praktických, ale i z důvodů bližšího poznání mechanismů působení terapií.

Co se týče proenzymoterapie, její účín byl o něco nižší, než popisuje na stejném modelu Kalferstová, 2008. Důvodem může být, že jsme randomizaci myši prováděli o dva až tři dny později, což se může projevit (Kaiserová a spol., in prep.). Poučili jsme se rovněž z našich dosavadních zkušeností a ve třetím experimentu jsme použili starší myši. Proenzymoterapie je totiž závislá na vyvinutém imunitním systému (Kaiserová a spol., in prep) a je tedy vhodnější se začátkem experimentu počkat. Díky tomu jsme dosáhli, zejména pak s i.p. aplikací proenzymů, účinné inhibice nádorového růstu, která byla statisticky velmi významná ($P \leq 0,0005$).

Co se týče působení Imatinibu, provedli jsme experiment stejný, jako Redondo a spol., 2004. Autoři této práce dosáhli sice vyššího potlačení nádorového růstu (až na 23% kontroly, my jsme dosáhli jen inhibice na 53%), tento efekt však nebyl statisticky významný. Jelikož IM se ve všech indikacích podává denně a dlouhodobě nebo trvale, byla by zajímavá pozorování z hlediska dlouhodobé toxicity. Australští vědci popsali výrazné změny některých imunologických parametrů (pokles gamaglobulinů IgG a IgM, snížení počtu lymfocytů CD4+) vyvolané dlouhodobým podáváním IM (Seymour a spol., 2004). Tento imunosupresivní účinek souvisí nejspíše s inhibičním účinkem IM na T-lymfocyty, jenž byl popsán v experimentech *in vitro* (k redukci subpopulací B-lymfocytů totiž nedochází) (Cwynarski a spol., 2004). Bylo by proto zajímavé, srovnat IM v kombinaci s beta glukaniem, který má na imunitu, byť zejména vrozenou, výrazný stimulační vliv (Brown a Gordon, 2001).

My jsme testovali kombinaci Imatinib proenzymy a zjistili jsme, že nedochází k žádné aditivě, ani synergii, kombinování těchto přístupů se ukázalo jako nevhodné. Může to souviset s uvedeným imunosupresivním vedlejším účinkem Imatinibu. Jak prokázala Kaiserová (připravovaná magisterská práce), je účinek proenzymoterapie závislý na plně funkčním imunitním systému.

Inhibiční účinek Karbimazolu oproti kontrole byl 43%. Jurkovič (2003) popisuje u lidí mnohem výraznější úspěchy včetně úplného vyléčení. My jsme přitom pracovali s dávkami, které jsou ekvivalentní těm, které tento autor používal u lidí. Na rozdíl od nás Jurkovič používal injekci imunoglobulinu G do svalů, což se nedomníváme, že by bylo pro nádorovou terapii rozhodující. Dalším aditivem, které tento autor používal byl trypsin a chymotrypsin, které dle autora podporují vstřebávání výpotků v tělních dutinách a pomáhají imunitnímu systému s odbouráváním nádorů tím, že odbourávají bílkovinný obal na povrchu nádorových buněk. Zejména s druhou částí nemůžeme souhlasit, aktivní proteázy jsou v krvi okamžitě inhibovány a účinek enzymoterapie je na úrovni pohlcování TGF-beta aktivovaným alfa-2 makroglobulinem (Leipner a Saller, 2000; Desser a spol., 2001). My jsme použili mnohem účinnější přístup, založený na proenzymech (Novak a Trnka, 2005; Kaiserová, 2008; Kalferstová, 2008). Nicméně kombinovaná terapie přinesla jen zpočátku velmi slabý aditivní efekt, který záhy zmizel. Kombinovaná terapie pak vykazovala horší výsledky, než působení samotného Karbimazolu. Vysvětlení můžeme hledat v tom, že celková inhibice metabolismu se týká nejen nádoru, ale postihuje vše, tedy i imunitní systém, na jehož fungování, jak bylo uvedeno, je proenzymoterapie velmi závislá.

Karbimazol vykazoval sice větší účinek, než proenzymoterapie, ale zdaleka nedosahoval výsledků, popisovaných Jurkovičem u lidí. Vysvětlení může být v tom, že myší model není vhodný, nebo v tom, že jsme použili velmi agresivní a aktivní model – melanom B16-F10.

Beta glukan vykazoval velmi dobrou redukci nádorového růstu zejména při perorální aplikaci, ale i i.v. aplikace byla velmi účinná. Účinek byl výraznější proti výsledkům Kalferstové, 2008, vysvětlení možno spatřovat v použití imunologicky vyvrážděných myší. Ve shodě s uvedenou prací je i výrazný inhibiční účinek na výskyt metastáz. Vetvicka a spol. zaznamenal rovněž tento protimetastázový účinek beta glukanu (76-80%) na modelu Lewisova plicního karcinomu (Vetvicka a spol., 2007).

Byl potvrzen pozitivní stimulační účinek beta glukanu na imunitní systém (Brown a Gordon, 2001), zejména pak na aktivaci makrofágů (Compton a spol., 1996). Molekula β -1,3-D-glukanu je rezistentní vůči kyselému prostředí. Po perorální aplikaci dochází k průchodu přes žaludek až do střeva, kde díky specifickému enzymu β -1,3-D-glukanózy dochází ke štěpení glukanu (Vetvicka, 2007). Ten poté přechází přes intestinální stěnu do lymfy, kde interaguje s makrofágy přičemž dojde k jejich aktivaci (Frey a spol., 1996) a následně k uvolnění cytokinů. Že je beta glukan skutečně vstřebáván dokazuje jeho nález v séru (Tsukagoshi a spol., 1984). Beta glukan, jakožto agonist TLR-2 je tedy nepochybně úzce spjat s aktivací vrozené imunity. Jak bylo výše uvedeno, proenzymy spojují svůj účinek s kompletním imunitním systémem a vyžadují přítomnost všech složek získané imunity. Zdálo by se, že nic nebrání tomu, aby kombinace obou terapeutických přístupů vedla k aditivním, nebo i synergickým účinkům. Opak je pravdou, s výjimkou nepatrných stop aditivity u kombinace i.m. aplikace proenzymů s i.v. aplikací beta glukanu k ničemu takovému nedošlo. Vysvětlení pro tento jev dosud nemáme.

7 Souhrn

- Bylo ověřeno inhibiční působení Imatinibu a proenzymové terapie na růst melanomu B16-F10 na myším modelu. Obě terapie vykazovaly srovnatelný efekt, jejich kombinace však nepřinesla žádný pozitivní efekt, nebylo dosaženo ani aditivity, ani synergie.
- Karbimazol způsoboval výraznější inhibici nádorového růstu, než proenzymoterapie. Kombinace obou metod přinesla zpočátku náznak aditivity, později se tento efekt ztratil.
- Účin beta glukanu podávaného perorálně i intravenózně (sonikovaný beta glukán) byl velmi výrazný a vedl k většímu potlačení nádorového růstu, než bylo dosaženo proenzymy podávanými i.m. a i.p. Jakékoli kombinace beta glukanu a proenzymoterapie se ukázaly až na výjimečné, přechodné stopy aditivity, jako neúspěšné.
- Přímá aplikace sonikovaného beta glukanu nemá na růst melanomu B16-F10 žádný vliv.

8 Seznam použité literatury

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M. et al. (1998):** Základy buněčné biologie. Espero Publishing.: 587-589.
- Allendorf D.J., Baran J.T., Ratajczak M.Z., Dyke C.W., Ostroff G. (2003):** Oral WGP beta glucan treatment accelerates myeloid recovery after radiation exposure. BTR.: 104-114.
- American cancer society.** <http://www.cancer.org> [cit. 2010-03-22].
- Arteaga C.L., Hurd S.D., Winnier A.R., Johnson M.D., Fendly B.M. et al. (1993):** Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. J Clin Invest 92: 2569-2576.
- Bainbridge W.S. (1909):** The enzyme treatment for cancer. NY Skin and Cancer Hospital. Commit Sci Res 39.
- Beard J. (1902):** Embryological aspects and etiology of carcinoma. Lancet 21: 1758-1761.
- Beard J. (1903):** The embryology of tumours. Anat Anz 23: 486-494.
- Beard J. (1905):** The cancer problem. Lancet 4: 281-283.
- Beard J. (1907a):** The interlude of cancer. Med Record 2: 169-175.
- Beard J. (1907b):** The scientific criterion of a malignant tumor. Med Record 5: 24-25.
- Beard J. (1911):** The enzyme treatment of cancer and its scientific basis. London, Chatto and Windus.
- Beppu K., Jaboine J., Merchant M.S., Mackall C.L., Thiele C.J. (2004):** Effect of Imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. J Nat Cancer Inst 96: 46-55.
- Bhattacharjee G., Asplin I.R., Wu S.M., Gawdi G., Pizzo S.V. (2000):** The conformation - dependent interaction of alpha 2-macroglobulin with vascular endothelial growth factor. A novel mechanism of alpha 2-macroglobulin/growth factor binding. J Biol Chem 275: 26806-26811.
- Bishop J.M., Weinberg R.A. (1996):** Molecular oncology. NY: Scientific American, Inc..
- Black W.A.P., Cornhill W.J., Dewar E.T., Woodward F.N. (1951):** Manufacture of algal chemicals. III. Laboratory scale isolation of laminarin from brown marine algae. J Appl Chem 1: 505-507.
- Blahoš J., Zamrazil V., Cibula D., Dostál C., Hainer V. et al. (2006):** Endokrinologie. Triton.: 505.
- Blasco M.A. (2007):** The epigenetic regulation of mammalian telomeres. Nat Rev Genet 8: 299-309.

Bodnar A.G., Ouellete M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C. et al. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.

Breslow A. (1970): Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172: 902-908.

Brown G.D., Gordon S. (2001): Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413: 36-37.

Bryan T.M., Cech T.R. (1999): Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11: 318-324.

Buchdunger E., Cioffi C.L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S. et al. (2000): Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits *in vitro* signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 139-145.

Buchdunger E., O'Reilly T., Wood J. (2002): Pharmacology of imatinib (STI571). *European J Cancer* 38: 28-36.

Carvajal R.D., Chapman P.B., Wolchok J.D., Cane L., Teitcher J.B. et al. (2009): A phase II study of imatinib mesylate (IM) for patients with advanced melanoma harboring somatic alterations of KIT. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 27: 9001.

Clark W.H., From L., Bernardino E.A., Mihm M.C. (1969): The histogenesis and biological behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 29: 705-727.

Compton R., Williams D., Browder W. (1996): The beneficial effect of enhanced macrophage function on the healing of bowel anastomoses. *Am Surg* 62: 14-18.

Corless C.L., Heinrich M.C. (2008): Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu Rev Pathol* 3: 557-586.

Counter C.M., Hahn W.C., Wei W., Caddle S.D., Beijersbergen R.L. et al. (1998): Dissociation among *in vitro* telomerase activity, telomere maintenance and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14723-14728.

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

Curtin J.A., Busam K., Pinkel D., Bastian B.C. (2006): Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *J Clin Oncology* 24: 4340-4346.

Cwynarski K., Laylor R., Macchiarulo E., Goldman J., Lombardi G. et al. (2004): Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes *in vitro*. *Leukemia* 18: 1332-1339.

- Da Silva G.C., Teixeira N., Bell S.C. (1996):** Major secretory product of the mesometrial decidua in the rat, a variant of alpha-2-macroglobulin, binds insulin-like growth factor I via a protease- dependent mechanism. *Mol Reprod Dev* 44: 103-110.
- Deininger M., Buchdunger E., Druker B.J. (2005):** The development of Imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105: 2640-2653.
- Deininger M., Druker B.J. (2003):** Specific targeted therapy of Chronic myelogenous leukemia with Imatinib. *Pharmacol Rev* 55: 401-423.
- Demetri G.D., Mehren vM., Blanke C.D., Van den Abbeele A.D., Eisenberg B. et al. (2002):** Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347: 472-480.
- Desser L., Holomanova D., Zavadova E., Pavelka K., Mohr T. et al. (2001):** Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. *Cancer Chem Pharmacol* 47: 10-15.
- Di Luzio N.R., Williams D.L., McNamee R.B., Edwards B.F., Kitahama A. (1979):** Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int J Cancer* 24: 773-779.
- Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J., Peng B., Buchdunger E. et al. (2001):** Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344:1031-1037.
- Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M. et al. (1996):** Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-566.
- Elzer K.L, Heitzman D.A., Chernin M.I., Novak J.F. (2008):** Differential effects of serine proteases on the migration of normal and tumor cells: implications for tumor microenvironment. *Integr Cancer Ther* 7: 282-294.
- Feige J.J., Negoescu M., Keramidas M., Souhelnitskiy S., Chambaz E.M. (1996):** Alpha2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor – beta and variol cytokines. *J Biol Chem* 45: 885-889.
- Fett J.W., Strydom D.J., Lubb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L. et al. (1985):** Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochem* 24: 5480-5486.
- Fidler I. (1970):** Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-782.
- Fidler I. (1973):** Selection of successive tumour lines for metastasis. *Natl New Biol* 242: 148-149.

- Finke J.H., Bukowski R.M. (2004):** Cancer immunotherapy at the crossroads how tumors evade immunity and what can be done.
- Frey A., Giannasca K.T., Weltzin R., Giannasca P.J., Reggio H. et al. (1996):** Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 184: 1045-1059.
- Garbe C., Büttner P., Bertz J., Burg G., d'Hoedt B. et al. (1995):** Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 75: 2484-2491.
- Garber T.R., Gonias S.L., Webb D.J. (2000):** IL-4 and IL-10 bind covalently to activated human alpha 2-macroglobulin by a mechanism that requires Cys949. *J Interferon Cytokine* 20: 125-131.
- Ghiringhelli F., Puig P.E., Roux S., Parcellier A., Schmitt E. et al. (2005):** Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *JEM* 202: 919-929.
- Gilbert F.S. (2006):** Angiogenesis Factors in Cancer, AIDS, and Diabetes. *Developmental biology*. Sinauer Associates.: 480: 390.
- Gouin-Charnet A., Laune D., Granier C., Mani J. C., Pau B. et al. (2000):** Alpha2-macroglobulin, the main serum antiprotease, binds beta2-microglobulin, the light chain of the class I major histocompatibility complex, which is involved in human disease. *Clin Sci* 98: 427-433.
- Groux H., Bigler M., de Vries J. E., Roncarolo M. G. (1998):** Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. *J Immunol* 160: 3188-3193.
- Grulich A.E., Bataille V., Swerdlow A.J., Newton-Bishop J.A., Cuzick J. et al. (1998):** Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: A case-control study in new South Wales, Australia *International J Cancer* 67: 485-491.
- Hald P.T. (1907):** Comparative researches on the tryptic strength of different trypsin preparations and on their action on the human body. *Lancet* 2: 1371-1375.
- Hanahan D., Folkman J. (1996):** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.
- Hanahan D., Weinberg A. (2000):** The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Harada T., Misaki A., Saitô H. (1968):** *Arch Biochem Biophys* 124: 292-298.
- Hart I.R. (1979):** The selection and characterization of an invasive variant of the B 16 melanoma. *Am J Pathol* 97: 587-600.
- Hayflick L., Moorhead P.S. (1961):** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.

- Heizmann M., Widmer N., Decosterd L.A., Tobler A., Oppliger E. (2004):** Dose –adjustment of imatinib based on plasma level measurement in a patient with CML. *Hematol J* 5: 39.
- Hercbergs A., Mason J., Reddy Ch., Elson P. (2004):** Thyroid hormones and lung cancer: Primary hypothyroidism is prognostically significant for survival in lung cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 45: 2004.
- Holman C.D., Armstrong B.K. (1984):** Pigmentary traits, ethnic origin, benign nevi, and family history as risk factors for cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 72: 257-266.
- Hong F., Hansen R.D., Yan J., Allendorf D.J., Baran J.T. et al. (2003):** β -Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res* 63: 9023-9031.
- Howell A., Chapman M., Harvie M. (2009):** Energy restriction for breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 181: 97-111.
- Hunter J., Savin J., Dahl M. (2002):** *Clinical Dermatology*. Oxford: Blackwell Publishing.: 365.
- Hussain S.P., Harris C.C. (1998):** Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58: 4023-37.
- Hwang R.F., Yokoi K., Bucana C.D., Tsan R., Killion J.J. et al. (2003):** Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastatic of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 9: 6534-6544.
- Chan G.Ch., Chan W.K., Sze D. M. (2009):** The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematology and Oncology* 2: 25.
- Chihara G., Maeda Y.Y., Hamuro J., Sasaki T., Fukuoka F. (1969):** *Nature* 222: 687.
- Inaba M., Tazuko T., Fujimoto S., Sakurai M.K., Ohnishi Y. et al. (1986):** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn J Cancer Res* 77: 190-196.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2001):** *Summaries & Evaluations, Methimazole.*: 79: 53.
- James K., van-den-Haan J., Lens S., Farmer K. (1992):** Preliminary studies on the interaction of TNF alpha and IFN gamma with alpha 2-macroglobulin. *Immunol Lett* 32: 49-57.
- Joensuu H., Roberts P.J., Sarlomo-Rikala M., Andersson L.C., Tervahartiala P. et al. (2001):** Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344: 1052-1056.
- Jurkovič K. (2003):** *Revoluce v léčení rakoviny*. Fontána.: 8-17, 231-233.

- Kaiserová P. (2008):** Proenzymová terapie sarkomu S-180. České Budějovice: Jihočeská Univerzita. Přírodovědecká fakulta. Katedra medicínské biologie, 20-41 s. Vedoucí bakalářské diplomové práce RNDr. Jan Ženka, CSc.
- Kalferstová L. (2008):** Proenzymoterapie melanomu B16-F10. České Budějovice: Jihočeská Univerzita. Přírodovědecká fakulta. Katedra medicínské biologie, 25-43 s. Vedoucí bakalářské diplomové práce RNDr. Jan Ženka, CSc.
- Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A., Guilhot F., Schiffer C. et al. (2002):** Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 346: 645-652.
- Kim K.B., Eton O., Davis D.W., Frazier M.L., McConkey D.J. et al. (2008):** Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma. *Br J Cancer* 99: 734-740.
- Krajsová I. (2009):** Metastazující melanom, možnosti léčby.: 35-39.
- Krebs E.T., Jr. Krebs E.T., Beard H.H. (1950):** The trophoblastic thesis of malignancy. *Medical Record* 163: 148.
- Kurdowska A., Carr F.K., Stevens M.D., Baughman R.P., Martin T.R. (1997):** Studies on the Interaction of IL-8 with human plasma alpha 2-macroglobulin: evidence for the presence of IL-8 complexed to alpha 2-macroglobulin in lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *J Immunol* 158: 1930-1940.
- Kurzrock R., Kantarjian H.M., Druker B.J., Talpaz M. (2003):** Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138: 819-830.
- Langer P. (1998):** Patofyziológia štítnej žľazy. Slovak Academic Press: 829-849.
- Léčba rakoviny.** www.lecba-rakoviny.estranky.cz [cit. 2008-04-19].
- Leipner J., Saller R. (2000):** Systemic enzyme therapy in oncology: Effect and mode of action. *Drugs* 59:769-80.
- Liebl D.J., Koo P.H. (1993):** Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1255-1261.
- Lindblad-Toh K., Lander E.S., McPherson J.D., Waterson R.H., Rodgers J. et al. (2001):** Progress in sequencing the mouse genome. *Genesis* 31: 137-141.
- Maeda H., Shiraishi A. (1996):** TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 156: 73-78.
- Mansell P.W.A., Rowden G., Hammer C. (1978):** Clinical experiences with the use of glucan. Raven Press: 255-280.
- Mathew P., Fidler I.J., Logothetis C.J. (2004):** Combination docetaxel and platelet-derived growth factor receptor inhibition with imatinib mesylate in prostate cancer. *Semin Oncol* 31: 24-29.

- Matsuda T., Hirano T., Nagasawa S., Kishimoto T. (1989):** Identification of alpha 2 macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J Immunol* 142: 148-152.
- McKinnell R.G., Parchment R.E., Perantoni A.O., Damjanov I., Pierce G.B. (2006):** The biological basis of cancer. Cambridge university press.: 18-19, 217.
- Mills A.A., Bradley A. (2001):** From mouse to man: Generating megabase chromosome rearrangements. *Trends Genet* 17: 331-339.
- Mimura H., Ohno N., Suzuki I., Yadomae T. (1985):** Purification, antitumor activity, and structural characterization of beta-1,3-glucan from *Peziza vesiculosa*. *Chem Pharm Bull* 33: 5096-5099.
- Moon S.H., Heo J.Ch., Fine R.L., Kim H.M., Kim, S.U. et al. (2005):** BRD-glucan exhibits potent immunotherapeutic activity *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol* 26: 395-404.
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. (2001):** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Mürbeth S., Rousarova M., Scherb H., Lengfelder E. (2004):** Thyroid cancer has increased in the adult populations of countries moderately affected by Chernobyl fallout. *Med Sci Monit* 10: 300-306.
- Niemuller C.A., Randall K.J., Webb D.J., Gonias S.L., LaMarre J. (1995):** Alpha 2-macroglobulin conformation determines binding affinity for activin A and plasma clearance of activin A/alpha 2-macroglobulin complex. *Endocrinology* 136: 5343-5349.
- Novak J.F., Trnka F. (2005):** Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res* 25: 1157-1178.
- Novartis Pharmaceuticals Corporation (2002):** Gleevec imatinib mesylate: full prescribing information. Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ..
- O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A., Gathmann I., Baccarani M. et al. (2003):** Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348: 994-1004.
- Onitilo A.A., Engel J.M. (2009):** Managing relapse of CML using therapeutic Imatinib plasma level. *Clinical advances in Hematology & Oncology* 7: 763-765.
- Ottmann O.G., Wassmann B., Pfeifer H., Goekbuget N., Bug G. et al. (2004):** Imatinib given concurrently with induction chemotherapy is superior to imatinib subsequent to induction and consolidation in newly diagnosed Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (PH+ALL). *Blood* 104: 197a..
- Panyutich A., Ganz T. (1991):** Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 101-106.
- Petruželka L., Novotný J., Krajsová I. (2002):** Maligní melanom. Doporučené postupy.: 1-8.

- Pietras K., Rubin K., Sjoblom T., Buchdunger E., Sjoquist M. et al. (2002):** Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 62: 5476-5484.
- Pillemer L., Ecker E.E. (1941):** Anticomplementary factor in fresh yeast. *J Biol Chem* 137: 139-142.
- Plate K.H., Breier G., Weich H.A., Risau W. (1992):** Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 359: 845-848.
- Pollock R.E., Roth J.A. (2006):** Cancer-induced immunosuppression: Implications for therapy? *Semin in Surg Oncol* 5: 414-419.
- Poste G., Nicolson G.L. (1980):** Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 399-403.
- Redondo P., Loret P., Andreu E.J., Inoges S. (2004):** Imatinib mesylate in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 123: 1208-1209.
- Renan M.J. (1993):** How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7: 139-146.
- Rogers J., Bradley A. (2001):** The mouse genome sequence: Status and prospects. *Genomics* 77: 117-118.
- Romagni S. (2000):** T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85: 9-18.
- Rousset M., Dussaulx E., Chevalier G., Zweibaum A. (1980):** Growth-related glycogen levels of human intestine carcinoma cell lines grown *in vitro* and *in vivo* in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 65: 885-889.
- Rowbottom A., Lepper M., Garland R., Cox C., Corley E. et al. (1999):** IL-10 induced CD8 cell proliferation. *Immunol* 98: 80-89.
- Sawyers C.L., Hocchaus A., Feldman E., Goldman C.L., Miller C.B. et al. (2002):** Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99: 3530-3539.
- Sehnal F. (2009):** Vývojová biologie.: 3: 8-11, <http://rum.prf.jcu.cz/public/>
- Seymour J.F., Grigg A., Reynolds J., Matthews J., Schwarzer A.P. et al. (2004):** Imatinib's potential effects on fertility, immunity and pulmonary function: a prospective study in patients iwth previously untreated CML. *Blood* 104: 1020.
- Shay J.W., Bacchetti S. (1997):** A s urvey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787-791.
- Sherwood E.R., Williams D.L., DiLuzio N.R. (1986):** Methods find. *Exp Clin Pharmacol* 8: 157.

- Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. (1992):** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845.
- Siddigi F.A., Martino D., Sasson H.N. (1999):** Plastic surgery secrets.: 38-45.
Svod. www.svod.cz [cit. 2010-01-14].
- Šlampa P., Petera J. et al. (2007):** Radiační onkologie. Galén.: 193-194.
- Takahashi S., Satomi A., Yano K., Kawase H., Tanimizu T. et al. (1999):** Estimation of glycogen levels in human colorectal cancer tissue: relationship with cell cycle and tumor outgrowth. *J Gastroenterol* 34: 474-480.
- Talpaz M., Silver R.T., Druker B.J., Goldman J.M., Gambacorti-Passerini C.B. et al. (2002):** Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 99: 1928-1937.
- Topping R.M., Seilman S. (1979):** A four-straight-line model for the proteinase-binding characteristics of human blood serum. *Biochem J* 177: 493-499.
- Trnka F. (2008):** O nádorech pro zdravě zvědavé. Inpress.: 6-23.
- Trnka F., Rybak M., Marek R., Vavra L. (1999):** Pharmaceutical composition containing an isolated protease proenzyme, amylase, and aprotinin. United States Patent: # 5,858,357.
- Tsukagoshi S., Hashimoto Y., Fujii G., Kobayashi H., Nomoto K. et al. (1984):** Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* 11: 131-155.
- Urugel S., Hildenbrand R., Zimpfer A., La Rosée P., Paschka P. et al. (2005):** Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 92: 1398-1405.
- U. S. National Cancer Institute.** <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancer/cancer01.htm> [cit. 2005-09-17]; www.gov.com [cit. 2010-03-30].
- Vaughan J.M., Vale W.W. (1993):** Alpha 2-macroglobulin is a binding protein of inhibin and activin. *Endocrinology* 132: 2038-2050.
- Vaziri H., Benchimol S. (1998):** Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8: 279-282.
- Veikkola T., Alitalo K. (1999):** VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9: 211-220.
- Vetvicka V., Dvorak B., Vetvickova J., Richter J., Krizan J. et al. (2007):** Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan phycarine stimulans both humoral and cellular immunity. *Int J Biol Macromol* 40: 291-298.
- Vetvicka V., Ross G.D., Yan J., Xia Y., Vetvickova J. (1999):** Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacol* 42: 61-74.
- Vetvicka V., Vetvickova J. (2007):** An evaluation of the immunological activities of commercially available β1, 3-Glucans. *Jana* 10: 25-31.

- Vorlíček J., Abrahámová J., Vorlíčková H. (2006):** Klinická onkologie pro sestry. Grada publishing.: 35.
- Wald M., Olejar T., Pouckova P., Zadinova M. (1998):** Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with Lewis lung carcinoma. *Life Sci* 63: 237-243.
- Wald M., Olejar T., Sebkova V., Zadinova M., Boubelik M. et al. (2001):** Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formativ of metastases and extend survival time of C57Bl6, mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 12-22.
- Wassmann B., Scheuring U., Pfeifer H., Binckebanck A., Käbisch A. et al. (2003):** Efficacy and safety of imatinib mesylate (Glivec) in combination with interferon-alpha (IFN- α) in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph⁺ALL). *Leukemia* 17: 1919-1924.
- Webb D.J., Weaver A.M., Atkins-Brady T.L., Gonias S.L. (1996):** Proteinases are isoform-specific regulators of the binding of transforming growth factor beta to alpha 2-macroglobulin. *Biochem J* 320: 551-555.
- Weedon D. (2002):** Skin pathology. Edinburg: Churchill Livingstone.: 1157.
- Weinberg R.A. (1998):** Jediná odrodilá buňka. *Academia.*: 12, 23-24.
- Weller M., Fontana A. (1995):** The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumorderived TGF-beta, T-cell apoptosis and the immune privilege of the brain. *Brain Res Rev* 21: 128-151.
- Whiteman D.C., Whiteman C.A., Green A.C. (2001):** Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes and Control* 12: 69-82.
- Wiecker T.S., Luther H., Buettner P., Bauer J., Garbe C. (2003):** Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood. *Cancer* 97: 628-638.
- World Health Organization.** www.who.int [cit. 2010-03-30].
- Wyman K., Atkins M.B., Prieto V., Eton O., McDermott D.F. et al. (2006):** Multicenter phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer* 106: 2005-2011.
- Yang Y., Dukhanina O., Tang B. (2002):** Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastatic without adverse side effects. *J Clin Invest* 109: 1607-1615.