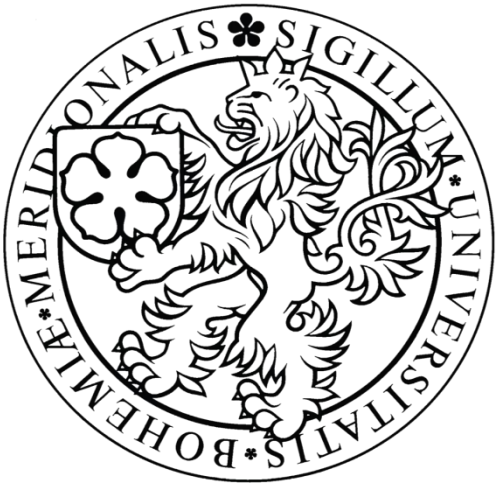
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Magisterská diplomová práce

Optimalizace (pro)enzymové terapie rakoviny

Bc. Lucie Kalferstová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2010

Kalferstová L., 2010: Optimalizace (pro)enzymové terapie rakoviny [Optimizing of (pro)enzyme therapy of cancer. Mgr. Thesis, in Czech] – 65 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to optimize the proenzyme and enzyme therapy of the healthy and mice suffering of cancer and to clarify the mechanism of this therapy. We found optimal mode of application of therapeutic preparations. We studied changes of serum α2-macroglobulin, total level of serum protease inhibitors, and free or latent TGF-β in various modes of experimental tumor therapies.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 23. 4. 2010

……..

Lucie Kalferstová

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení, velké množství cenných rad a obrovskou trpělivost po celou dobu vypracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala

doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc., RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. a kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za umožnění provedení této práce, a také za jejich rady, ochotu a vstřícnost. Mé velké díky patří i všem blízkým přátelům, zvláště potom mé rodině, za jejich podporu a zázemí vždy, když jsem potřebovala.

Obsah

1. ÚVOD 7

1.1. RAKOVINA 7

1.1.1. HLAVNÍ TYPY KANCEROGENEZE 8

1.1.2. DĚLENÍ NÁDORŮ PODLE DRUHU TKÁNĚ 8

1.1.3. MELANOM 9

1.1.4. SARKOM 9

1.1.5. TERAPIE NÁDORŮ 10

1.2. NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE 10

1.2.1. ÚLOHA LEUKOCYTŮ 11

1.2.3. CYTOKINY 13

1.2.3.1. Th1/Th2 rovnováha u nádorových onemocnění 13

1.2.3.2. TGF-β 14

1.2.4. SÉROVÉ INHIBITORY PROTEÁZ 15

1.2.4.1. α2-makroglobulin 15

1.2.4.2. α1-Antitrypsin, contrapsin 18

1.2.4.3. Ostatní inhibitory proteáz 19

1.3. ENZYMOVÁ A PROENZYMOVÁ TERAPIE 19

1.3.1. ENZYMOVÁ TERAPIE 19

1.3.2. MECHANISMUS ENZYMOTERAPIE 20

1.3.3. PROENZYMOVÁ TERAPIE 21

1.3.4. ZPŮSOBY APLIKACE (PRO)ENZYMŮ 22

2. CÍLE PRÁCE 23

3. MATERIÁL A METODY 24

3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 24

3.2. LABORATORNÍ ZVÍŘATA 24

3.3. BUNĚČNÉ LINIE 24

3.4. TRANSPLANTACE NÁDORU 24

3.4.1. EXPERIMENT 4 24

3.4.2. Experiment 3, 5 a 6 24
3.5. Uspořádání jednotlivých *in vivo* experimentů 25
3.5.1. Experiment 1: Porovnání hladin sérových proteáz při různých aplikacích trypsinu zdravým myším C57BL/6 25
3.5.2. Experiment 2: Hodnoty séra po *i.p.* aplikaci trypsinu během 12 hodin 25
3.5.3. Experiment 3: Porovnání terapie *i.p.* a *i.m.* cestou *in vivo* 25
3.5.4. Experiment 4: Stanovení parametrů A, B a D u sér myší kmene BALB/c s velmi vyvinutými nádory sarkomu S-180 25
3.5.5. Experiment 5: Vliv proenzymoterapie na parametry séra (A, B a D) a hladiny volného/vázaného TGF-beta u zdravých a nádorových (melanom B16-F10) myší kmene C57BL/6 26
3.5.6. Experiment 6: Měření hladiny TGF-beta ELISA testem a zjišťování kapacity séra pro vazbu tohoto cytokinu 26
3.6. Měření velikosti nádorů 26
3.7. Odběr a příprava séra 26
3.8. Měření aktivity trypsinu kinetickou metodou (titrace séra trypsinem a trypsinu sérem) 27
3.8.1. Postup přípravy vzorků pro měření – titrace séra trypsinem: 27
3.8.2. Postup přípravy vzorků pro měření – titrace trypsinu sérem: 28
3.9. Měření aktivity trypsinu pomocí endpoint metody (titrace séra trypsinem a trypsinu sérem) 29
3.9.1. Postup přípravy vzorků pro měření – titrace séra trypsinem: 29
3.9.2. Postup přípravy vzorků pro měření – titrace trypsinu sérem: 30
3.9.3. Metoda odečítání hodnot z grafu, titrace séra trypsinem (fotometricky naměřené hodnoty, endpoint metoda) 31
3.10. Měření aktivity trypsinu fluorimetrickou metodou 32
3.10.1. Postup přípravy vzorků pro fluorimetrické měření a vlastní měření: 32
3.10.2. Sestrojení kalibrační křivky pro fluorimetrické měření 33
3.11. Stanovení hladin volného a vázaného TGF-beta v séru pomocí ELISA testu 33
3.12. Měření kapacity séra aktivovaného trypsinem vázat TGF-beta 34
3.13. Statistické vyhodnocování 35

4. VÝSLEDKY 36

4.1. MĚŘENÍ AKTIVITY TRYPSINU V ČASE KINETICKOU METODOU 36
4.2. MĚŘENÍ POMOCÍ ENDPOINT METODY 36
4.3. EXPERIMENT 1: POROVNÁNÍ HLADIN SÉROVÝCH PROTEÁZ PŘI RŮZNÝCH APLIKACÍCH TRYPSINU ZDRAVÝM MYŠÍM C57BL/6 39
4.3.1. FOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ ENDPOINT METODOU, STANOVENÍ PARAMETRŮ B, D 39
4.3.2. FLUORIMETRICKÉ MĚŘENÍ, STANOVENÍ PARAMETRU A 40
4.4. EXPERIMENT 2: HODNOTY SÉRA PO *I.P.* APLIKACI TRYPSINU BĚHEM 12 HODIN 42
4.4.1. FOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ ENDPOINT METODOU, STANOVENÍ PARAMETRŮ B, D 42
4.4.2. FLUORIMETRICKÉ MĚŘENÍ, STANOVENÍ PARAMETRU A 44
4.5. EXPERIMENT 3: POROVNÁNÍ TERAPIE *I.P.* A *I.M.* CESTOU *IN VIVO* 44
4.6. EXPERIMENT 4: STANOVENÍ PARAMETRŮ A, B A D U SÉR MYŠÍ KMENE BALB/C S VELMI VYVINUTÝMI NÁDORY SARKOMU S-180 45
4.7. EXPERIMENT 5: VLIV PROENZYMOTERAPIE NA PARAMETRY SÉRA (A, B A D) A HLADINY VOLNÉHO/VÁZANÉHO TGF-BETA U ZDRAVÝCH A NÁDOROVÝCH (MELANOM B16-F10) MYŠÍ KMENE C57BL/6 47
4.7.1. VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORŮ 47
4.7.3. FLUORIMETRICKÉ MĚŘENÍ, STANOVENÍ PARAMETRU A 49
4.7.4. ELISA TEST, STANOVENÍ TGF-BETA V SÉRU 50
4.8. EXPERIMENT 6: MĚŘENÍ HLADINY TGF-BETA ELISA TESTEM A ZJIŠŤOVÁNÍ KAPACITY SÉRA PRO VAZBU TOHOTO CYTOKINU 53
4.8.1. VAZEBNÁ KAPACITA TGF-BETA: TITRACE + ELISA TEST 53

5. DISKUZE 55

6. SOUHRN 58

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 59

1. Úvod

1.1. Rakovina

V současnosti jsou nádorová onemocnění ve vyspělých zemích druhou nejčastější příčinou úmrtí hned za nemocemi kardiovaskulárního systému. Je známo více než 100 různých typů nádorových onemocnění. K nejčastěji se vyskytujícím patří nádory plic, tlustého střeva, prostaty a prsu. První zmínka o zhoubných nádorech pochází už z dob starověkého Egypta. Otázkou rozdílu mezi zhoubným a nezhoubným nádorem se zabýval již starověký řecký lékař Hipokratés, který dal této chorobě název „karkinóma“ (latinsky cancer), jež se používá dodnes.

Jako nádor (novotvar) označujeme abnormální tkáň, která v organismu nemá fyziologickou funkci a roste nekontrolovatelným buněčným dělením na jeho úkor. Nádor se postupně vyvíjí a v okamžiku, kdy se růst a dělení buněk vymkne kontrolním a regulačním mechanismům, vzniká velké množství nové tkáně tvořené masou nezralých a nediferenciovaných buněk. Nádorové buňky postrádají kontaktní inhibici. Rychlost jejich dělení je stejná, nebo dokonce pomalejší než u zdravých buněk, rozdíl spočívá hlavně v jejich nesmrtelnosti. Podle schopnosti napadat jiné tkáně a rozšiřovat se do jiných částí těla pomocí metastáz dělíme nádory na benigní a maligní. Benigní nádor tvoří jasně ohraničený útvar a zpravidla neinfiltruje do ostatních tkání. Oproti tomu maligní nádory, které mohou být opouzdřené i neopouzdřené, prorůstají do okolních tkání a jsou značně invazivní. Velmi často narušují cévní stěny a nádorové buňky tak mohou metastazovat mízní či krevní cestou do ostatních tkání organismu (Pacovský, 1993).

Nádorová onemocnění vznikají jako následek náhodného nahromadění mutací (minimálně 4-7) v genech kontrolujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk v organismu. Buňka, která je tímto osvobozená od obvyklé regulace buněčného dělení a přežití, má schopnost proliferovat bez normálních zábran. V molekule DNA dochází k mnohým mutacím, kterým zabraňují četné reparační mechanismy. Nicméně poruchy v těchto opravných mechanismech jsou často příčinou vzniku a rozvoje nádorů. Proces vedoucí ke vzniku nádorů se nazývá kancerogeneze.

Mutací je označena změna genetické informace. Geny, které jsou schopny způsobit nebo podpořit nádorovou transformaci se souhrnně nazývají onkogeny. Onkogen vzniká mutací protoonkogenu, což je gen kódující bílkoviny podílející se na přenosu růstových a diferenciačních mitogenních signálů, které jsou schopny zahájit buněčnou proliferaci. Oproti tomu tumorsupresorové geny (např. gen pro p53) kódují bílkoviny, které zastavují

buněčné dělení i růst a mají schopnost vyvolat apoptózu. Ztráta jejich funkce v buňce tudíž také vede k nekontrolovatelnému buněčnému dělení (Alberts a spol., 1998).

1.1.1. Hlavní typy kancerogeneze

Podle typu kancerogenů můžeme dělit kancerogenezi na chemickou, fyzikální a biologickou.

Do chemické kancerogeneze patří doslova tisíce chemikálií, které se mohou podílet na vzniku rakoviny, a tato skupina se stále rozšiřuje. Patří sem dusíkaté sloučeniny (nitrosoaminy), hydraziny (přirozeně se vyskytující deriváty, hlavně ve vyšších houbách), aromatické aminy a amin azobarviva, triaziny, polycyklické aromatické uhlovodíky, deriváty benzenu a stilbenu, polychlorované bifenyly, halogenuhlovodíky a různé kovy a jejich sloučeniny (např. arzen, berylium, olovo).

Do fyzikální části náleží především vysokoenergetické záření. Řadí se sem ionizující záření (např. rentgenové), neionizující záření (např. UV záření, zejména jeho UVB složka-sluneční spektrum i umělé zdroje), popáleniny a různé vlivy mechanického působení cizích těles (např. azbest).

Biologická kancerogeneze zahrnuje virovou (např. ptačí sarkom, virus Ebstein-Barrové, papilomaviry), bakteriální (*Helicobacter pilori*) a parazitární (*Bilharzia, Schistomiaza, Amebiaza*) karcenogenezi. Dále sem patří vliv endogenních tělních produktů, jako jsou hormony a žlučové kyseliny. Do této skupiny také zahrnujeme vliv výživy, který v některých případech mívá velký podíl na vzniku nádorových onemocnění (Jurga, 2000).

1.1.2. Dělení nádorů podle druhu tkáně

- **Epiteliální** (krycí nebo výstelková tkáň)
  - Benigní: epitelom, papilom
  - Maligní: karcinomy
- **Stromální** (pojivové)
  - Benigní: fibromy (vazivo), myomy (hladké svalstvo), chondromy (chrupavka)
  - Maligní: sarkomy
- **Hematopoetické** (z krvetvorných tkání)
  - Maligní: leukémie, lymfomy
- **Neuroektodermu** (nádory CNS a kůže)
  - Benigní (CNS): gliom, neurinom, meningeom

- Maligní (CNS): glioblastom, neuroblastom
- Benigní (kůže): pigmentový névus
- Maligní (kůže): melanom

➢ **Žlázových tkání**

- Benigní: adenomy
- Maligní: adenokarcinomy

➢ **Germinomy** (ze zárodečných tkání)

- Benigní: teratomy
- Maligní: teratokarcinomy, embryonální karcinom

➢ **Vzácné nádory z ostatních tkání**

Během této práce byly používány dva modely rakoviny, melanom B16-F10 a sarkom S-180, jejich bližší charakteristika je uvedena níže.

1.1.3. Melanom

Tento typ nádorů má původ v pigmentových buňkách, tzv. melanocytech. Na vzniku se podílí převážně ultrafialové záření, zejména jeho UVB složka. Pigmentové buňky produkují melanin, což je pigment způsobující přirozenou barvu kůže, a díky tomu jsou melanomy ve škále hnědého až černého zabarvení. U lidí můžeme melanomy rozdělit na 4 druhy. Jsou to povrchově se šířící melanom, což je nejčastěji se vyskytující melanom, dále modulární melanom, lentigo maligna melanom a akrolentiginózní melanom.

U myší jsou rozeznávány 4 buněčné linie melanomů, a to B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. Tyto buněčné linie vznikly různým provedením selekční procedury, za použití Fidlerovy metody (Nakamura a spol., 2002). Melanomy B16-F10 a B16-BL6 velmi silně metastazují do plic, nicméně ve zhoubnosti se všechny zmíněné linie blízce rovnají. Nejčastější transplantace melanomu probíhá buď *s.c.* cestou, nebo přímo *i.v.* cestou do ocasní žíly, což je používáno jako metastázový model (Teicher, 2002).

1.1.4. Sarkom

Sarkom je nádor, který se vyvíjí z pojivové tkáně v nejrůznějších místech organismu, např. ve tkáni tukové (liposarkom), svalové (myosarkom), chrupavce (chondrosarkom), kosti (osteosarkom) či vazivu (fibrosarkom). Na rozdíl od karcinomu, který se vyvíjí přímo z epitelu, sarkom je nádor podpůrných tkání. Zvláštní skupinu tvoří sarkomy v dutině břišní a hrudní. Sarkomy patří mezi nepříliš často se vyskytující nádory, představují méně než

1% všech zhoubných nádorových onemocnění. V České republice je to přibližně 350 onemocnění ročně.

Sarkom S 180 je nemetastazující nádor pojivové tkáně, který je možno transplantovat myším, nejčastěji *s.c.* cestou (Deodhar, 1971).

1.1.5. Terapie nádorů

Maligní onemocnění se ovlivňuje několika způsoby – chirurgicky, aplikací ionizačního záření (teleradiopatie, brachyterapie), podáním chemoterapie, biologickou terapií nebo kombinací těchto uvedených postupů.

Chirurgické postupy jsou bioptické (získání materiálu k určení diagnózy), parciální, nebo radikální (kompletní odstranění nádoru). Jedná se vždy o terapii lokální, která nevylučuje komplikace, jak při vlastním výkonu (krvácení), tak diseminaci nádorových buněk při manipulaci s nádorem.

Teleradioterapie je zevní ozáření, kdy dochází k cílenému podání vysoké dávky na vlastní nádor s vykrytím zdravé tkáně. I zde se jedná o lokální terapii.

Brachyterapie se provádí zavedením zářiče do organizmu prostřednictvím speciálních aplikátorů.

Chemoterapie je při systémovém podání významným modulátorem imunitní odpovědi. Nicméně zásadním efektem bývá vliv na buňku (obvykle s vysokou mitotickou aktivitou) a imunitní stimulace je vedlejším efektem.

Biologická terapie, která může být aktivní nebo pasivní, spočívá v aplikaci imunologicky aktivních látek, jejichž efekt je považován za zásadní. Tento druh terapie může podle typu podané látky působit na různých stupních imunitní kaskády. Nejčastěji aplikovanou látkou jsou cytokiny, nebo také dendritické buňky.

1.2. Nádorová imunologie

Imunitní odpověď organismu se dělí na nespecifickou a specifickou. K nespecifické se řadí systém komplementu, makrofágy/monocyty, granulocyty, trombocyty a NK buňky. Do specifické odpovědi spadají pochody, které souvisí s funkcí a změnami v lymfocytech – T a B. Patří sem jejich přímé působení i tvorba protilátek. Nádorové bujení vytváří v těle oblasti s nefyziologickým mikroprostředím, které je charakterizováno např. hypoxií. Ta je důvodem pro aktivaci složek nespecifické, přirozené imunity (Krejsek a Kopecký, 2004).

Pro rozvoj specifické imunity zprostředkované CD8+ T lymfocyty je potřeba exprese alel HLA I. třídy, které zajistí, že imunodominantní peptidy (nádorové antigeny) budou účinně prezentovány a povedou k rozvoji imunitní reakce (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.2.1. Úloha leukocytů

Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou rozhodující pro rozvoj specifické nádorové imunity, jelikož jedině tyto buňky jsou schopny účinně prezentovat antigeny T lymfocytům, které se s nimi dosud nesetkaly. Nádorové antigeny pohlcují mikropinocytózou a k jejich zpracování dochází v průběhu migrace do sekundárních lymfatických orgánů. Tyto buňky po interakci s T lymfocyty produkují IL-12, který určuje vyzrávání TH0 T lymfocytů do subsetu TH1, který je odpovědný za cytotoxickou buněčnou reaktivitu, která hraje klíčovou roli v obranné reakci proti nádorovému bujení (Veselský a spol., 2004).

NK buňky

NK buňky jsou velmi důležitou součástí protinádorové imunity. Identifikují nádorové buňky prostřednictvím rozmanitých membránových receptorů, které buňce poskytují aktivační nebo naopak inhibiční signály. Po vyhodnocení můžou převládnout aktivační signály, kdy jsou spuštěny lytické mechanismy vedoucí k usmrcení buňky, nebo převládnou inhibiční signály a buňka uniká cytotoxické aktivitě (Veselský a spol., 2004).

Nejvýznamnějším kritériem je absence molekul HLA I. třídy, která je běžná u nádorových buněk, v tomto případě je spuštěna cytotoxická aktivita NK buněk. Naopak expresí molekul HLA-G se nádorové buňky dokáží bránit ataku NK buněk (Finke a Bukowski, 2004).

Cytotoxická aktivita NK buněk je výrazně zesílena působením cytokinů, zvláště potom IL-2.

Granulocyty

Granulocyty patří do efektorové složky přirozené imunity. Uplatňují se především v subtypu neutrofilním, který má schopnost fagocytózy a tvorby kyslíkových radikálů. Patří mezi důležité zdroje cytokinů, jejichž prostřednictvím mohou zasahovat regulačně do funkcí imunitního systému (Veselský a spol., 2004).

Makrofágy

Tyto buňky, které jsou terminálním diferenciačním stádiem monocyto-makrofágové linie, jsou strategicky rozptýleny ve všech orgánech těla. Obsahují molekuly CD14 a HLA II. třídy, což umožňuje rozpoznání a fagocytózu apoptických buněk. Exprimují také povrchové

molekuly CD80 a CD86 a mají jak cytotoxický tak cytostatický efekt (Veselský a spol., 2004).

Lymfocyty typu T

Tyto buňky exprimují molekulu CD3 a existují v subtypu helperů (Th), které mají na povrchu znak CD4+, nebo v subtypu cytotoxických lymfocytů (CTL) se znakem CD8+. Th lymfocyty se dělí na dvě skupiny, Th1 a Th2 lymfocyty. Tyto skupiny se vzájemně inhibují, což je způsobeno tím, že cytokinový produkt Th1 – INFγ inhibuje diferenciaci Th2 buněk, zatímco hlavní produkt Th2 skupiny IL-4 inhibuje vývoj Th1 buněk.

Th1 lymfocyty produkují převážně cytokiny IL-2, INFγ a TNF, které aktivují makrofágy. Dále mají významnou roli v obraně proti intracelulárním parazitům a ativují buněčnou cytotoxickou reaktivitu. Jejich nadprodukce byla prokázána také u autoimunitních onemocnění. Oproti tomu Th2 lymfocyty produkují zejména cytokiny IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Skupina Th2 lymfocytů rozvíjí protilátkovou imunitu a izotopové přepnutí. Treg jsou další podskupinou T lymfocytů, které produkují zejména IL-4, IL-10 a TGF-β. Tato skupina působí imunosupresivně a potlačuje zánětlivé reakce regulací Th1 lymfocytů (Kopřiva a Zápalka, 1999). Treg mají důležitou roli v procesech navození nádorové imunotolerace, viz dále.

Lymfocyty typu B

B lymfocyty jsou odpovědné za specifickou protilátkovou imunitu. Exprimují HLA molekuly II. třídy, kostimulační molekuly a patří k základním antigen prezentujícím buňkám (APC), (Veselský a spol., 2004).

1.2.2. Nádorové antigeny

Nádorové buňky by měly obsahovat molekulové struktury, které by se měly chovat jako antigenní a jejich přítomnost by měla vést k imunitní odpovědi. V mnoha experimentálních modelech byla tato koncepce potvrzena, přesto představují nádory pro imunitní systém závažný problém.

V současné době je identifikována celá řada nádorových antigenů a je možné je rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny se řadí tzv. antigeny asociované s nádory (TAA). Tyto antigeny jsou vyjádřeny např. v buňkách melanomu a v normálních melanocytech, dále sem patří karcinoembryonální antigen (CEA) u karcinomu tlustého střeva, prsu a plicního adenokarcinomu, prostatický specifický antigen (PSA) u nemocných s karcinomem prostaty, nebo také nádorový antigen HER-2/neu, který je homologický s receptorem pro epidermální

růstový faktor a je vyjádřen na buňkách karcinomu prsu a ovaria. Vůči těmto antigenům se rozvíjí cytotoxická reaktivita.

Do druhé skupiny řadíme nádorově specifické antigeny (TSA), které vycházejí z genových mutací v normálních genech. Nádorově specifické antigeny jsou vyjádřeny pouze na konkrétním typu nádoru u konkrétního jedince. Tyto antigeny jsou silně imunogenní, bohužel využití pro terapeutické zásahy je mimořádně obtížné. Patří sem komplexy MHC I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (typické pro chemicky indukované nádory), komplexy MHC I s fragmenty proteinů orogenních virů, abnormální formy glykoproteinů a idiotipy myelomů a lymfomů (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.2.3. Cytokiny

Cytokiny mají v nádorové imunologii velikou roli. Mají schopnost ovlivnit průběh, jakým se imunitní odpověď bude vyvíjet. Mezi cytokiny působící ve prospěch protinádorové imunity patří např. interferony, které jsou důležitou součástí zejména přirozené imunity. Interferony vykazují antiproliferativní a cytotoxické působení na množící se buňky (zvláště nádorové) a také modulují protinádorovou imunitu. Nejvýznamnější imunomodulační účinky má INFγ, který je produkován Th1 T lymfocyty po antigenní stimulaci. Prostřednictvím INFγ je zesílena exprese molekul HLA I. třídy na povrchu nádorových buněk, čímž se stanou více citlivými vůči nádorově specifickým cytotoxickým CD8+ T lymfocytům. Dochází rovněž k účinnějšímu zpracování a prezenci nádorových antigenů a tím k rozvoji specifické T lymfocytární imunity. INFγ zvyšuje celkovou zánětlivou aktivitu naměřenou proti nádoru (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.2.3.1. Th1/Th2 rovnováha u nádorových onemocnění

Mikroprostředí nádoru je charakterizováno přítomností leukocytů ve stromální i nádorové tkáni. Leukocyty, které infiltrují nádor, mohou přispívat k růstu i diseminaci nádorů, nebo být i příčinou imunosuprese provázející nádorová onemocnění. V patogenních případech dochází v organismu k narušení Th1/Th2 rovnováhy (v případě zánětu převáží Th1 odpověď, v případě nádorového onemocnění Th2 odpověď).

Lymfocyty, které infiltrují nádor, jsou heterogenní populace lymfoidních buněk, především T lymfocytů. Th1 lymfocyty jsou odpovědny za protektivní cytotoxickou reaktivitu namířenou proti nádoru, typická je tvorba INFγ.

V oblasti nádorů ovšem převládá Th2 populace lymfocytů, která je charakterizována tvorbou IL-4, IL-5 a IL-6 (Pawelec, 1999). Dále se zde nachází populace Treg, která

produkuje zejména IL-10 a TGF-β. Aktivita těchto uvedených cytokinů nevede k účinné reakci namířené proti nádoru, naopak omezuje žádoucí aktivity cytokinů produkovaných Th1 lymfocyty. Rovnováha je takto nakloněna k Th2 lymfocytům, které podporují humorální odpověď a tím i k tvorbě cytokinů stimulujících rozvoj nádorů (např. svým angiogenetickým působením) a navozujících stav jejich tolerance. Tyto cytokiny jsou produkovány i samotnými nádorovými buňkami. Zdá se, že mohou inhibovat B-lymfocyty, dendritické buňky, monocyty/makrofágy i NK buňky. Například IL-10 má spoustu účinků působících ve prospěch nádorů: supremace dendritických buněk (Shurin a spol., 2002), Th1 (McHugh a spol., 2002), IFN-γ, IL-2 (Finke a Bukowski, 2004), antigenní prezentace (Kim a spol., 1995), snížení exprese MHC I (Terrazzano a spol., 2000) a zvýšení exprese HLA G (brání ataku NK buněk), (Moreau a spol., 1999). Působení IL-10 není ovšem úplně jednoznačné, někdy je schopen vývoj nádorů inhibovat.

1.2.3.2. TGF-β

TGF-β1, 25kD disulfidicky spojený homodimer, je prototypový člen obrovské rodiny strukturně příbuzných pleiotropicky dekretovaných cytokinů, které hrají klíčovou roli v kontrole diferenciace, proliferace, apoptózy, adheze a stádia aktivace velkého množství různých buněčných typů, zahrnujících také imunitní buňky (Letterio a Roberts, 1998). Imunosupresorová imunita TGF-β byla potvrzena experimenty jak *in vivo*, tak také *in vitro*. Většina buněčných typů zahrnujících nezralé hematopoetické buňky, aktivované T a B buňky, makrofágy, neutrofily a dendritické buňky jsou sensitivní na jeho efekty (Letterio a Roberts, 1998). Aktivita TGF-β vychází z interakce se specifickými faktory na povrchu buněk (např. 53kD glykoprotein), (Boyd a Massague, 1989).

Na vztah mezi TGF-β expresí a růstem nádorů je vztahována veliká pozornost, nejen kvůli lepšímu porozumění procesu kancerogeneze, ale také z důvodu vyvíjení lepších terapeutických strategií (Lauer a spol., 2001). Je známo, že TGF-β1 je potenciální růstový faktor pro vyvinutí rakoviny (Lauer a spol., 2001). Potlačuje imunitu, zejména vlivem na NK buňky a cytotoxické T-lymfocyty, a proto je považován za faktor pro tumorový růst.

TGF-β má v tumorgenezi dvojí roli. V první fázi, když buňky ještě odpovídají efektům růstových inhibitorů TGF-β, může působit jako nádorový supresor. V pozdní fázi buňky selektivně oproštěné z antimitogenické odpovědi TGF-β a tumorové buňky začnou velmi často produkovat velké množství TGF-β, který může v tomto případě působit jako nádorový promotor. Prostřednictvím TGF-β dochází k tomu, že imunitní systém nádor toleruje, a to díky jeho T-buněčné supresorové aktivitě zasahující cytotoxické T lymfocyty a NK

buňky. Vlivem TGF-β dochází k tvorbě Treg z CD4+ lymfocytů. Treg tlumí aktivitu CTL a tím chrání nádory před útokem buněčné imunity. TGF-β takto působí supresivně na T buňky ovlivňující autoimunitní záněty a protinádorovou imunitu (Becker a spol., 2006).

Je dokázáno, že TGF-β přispívá při metastázování, a to stimulací abiogeneze a potlačením imunitního obranného mechanismu (Harthun a spol. 1998).

Experimenty založené na inhibici TGF-β produkce antimediátorovou strategií, nebo neutralizací TGF-β protilátkami byly úspěšné ve zvyšování imunitní odpovědi vůči nádorům u zvířecích modelů, nicméně dlouhotrvající účinek a aplikace u lidí je stále diskutabilní. (Lauer a spol., 2001).

1.2.4. Sérové inhibitory proteáz

Sérovými inhibitory jsme se zabývali ze dvou důvodů. Prvním je fakt, že invazivita maligních tumorů a jejich schopnost metastazovat je spojená s expresí celé řady proteáz (Pandey a spol., 2007). Kdyby se je podařilo účinně inhibovat, znamenalo by to zásah do základních vlastností činících maligní nádory nebezpečnými, jako jsou invazivita a metastazibilita. Druhým důvodem byl jeden z nejvýznamnějších sérových inhibitorů proteáz, α2-makroglobulin. Jak bude dále rozvedeno, tento inhibitor je schopen po interakci s proteázami vázat cytokiny, přednostně pak TGF-β, čímž zasahuje do imunitní protinádorové reakce. Inhibiční komplex séra je však třeba chápat komplexně, proto jsme se v práci věnovali i dalším inhibitorům proteáz nacházejícím se v séru.

1.2.4.1. α2-makroglobulin

Jedním z nejznámějších inhibitorů proteáz je α2-makroglobulin (α2M). Žádný jiný inhibitor nevykazuje tak široký rozsah enzymové specifity (váže proteázy všech čtyř hlavních tříd: aspartátové proteázy, cysteinové proteázy, matrixové metaloproteázy a serinové proteázy). α2M vykonává důležitou biologickou funkci, spojuje metabolismus proteáz s regulací cytokinové aktivity (Lauer a spol., 2001). Je to tetrametrický glykoprotein o velikosti 718kDa, který je v plazmě přítomný ve vysokých koncentracích (2-4mg/ml), (James, 1990).

Nejvyšší hodnota α2M je u dětí (3-5mg/ml), pravděpodobně hraje roli v důležitých biologických funkcích ve vývoji těla. Nicméně, ve starším věku je pozorovaný jeho výrazný pokles (0,8-1,2mg/ml), což se zřejmě shoduje s náporem mnoha nemocí, jako jsou degenerační nemoci, infekce a rakovina. Vyskytuje se také v ostatních tělních tekutinách např. v lymfě, pohrudní tekutině a plodové vodě, díky čemuž má roli v kontrole proteolýzy

i v těchto extracelulárních prostorech. Za hlavní zdroj cirkulujícího α2M jsou považovány hepatocyty v játrech. V kultivačních podmínkách bylo dokázáno, že schopnost syntetizovat α2M mají také lidské embryonální plicní fibroblasty (Mosher a spol., 1977) a krevní monocyty – makrofágy (Hovi a spol., 1977) a alveolární makrofágy (White a spol, 1980), což dokazuje že α2M může hrát roli i na buněčné úrovni. (Saksela a spol, 1984). Kromě inhibičních vlastností je α2M znám také jako nosič cytokinů, který indukuje iNOS expresi a NO syntézu v makrofázích (u myší), (Lysiak a spol., 1995).

Lidský α2M se skládá ze čtyř identických podjednotek (velikost 1451 aminokyselin). Podjednotky jsou spojeny v dimery disulfidickými vazbami a tyto dimery tvoří nekovalentními vazbami homotetramer (Swenson a spol., 1979).

Proteáza a inhibitor nejsou spojeny kovalentně. Poblíž centra každé podjednotky je lokalizovaný „bait" region, který je tvořen třemi distinkčními doménami, dále je zde interní β-cysteinyl-γ-glutamyl thiolester a receptor rozeznávající doménu. Proteázy při reakci s α2M hydrolyticky rozštěpí peptidovou vazbu uvnitř „bait" regionu, poblíž centra α2M podjednotky, což po doprovodném štěpení interního thiolesteru způsobí konformační změnu inhibitoru. Proteázy tímto způsobem setrvávají zachycené ve struktuře podobné pasti, kde zůstávají aktivními k malým substrátům či polypeptidům, které jsou schopny projít touto strukturou. Nejsou ale schopny zachytit a štěpit větší proteiny, které touto strukturou neprojdou. Trypsin štěpí všechny čtyři štěpitelné peptidické vazby α2M, chymotripsyn okolo 2-3 peptidických vazeb, zatímco plasmin štěpí okolo poloviny těchto štěpitelných vazeb. Trypsin je také na α2M vázán čtyřikrát rychleji než chymotrypsin, a stokrát rychleji než plasmin (Howell a spol., 1983).

α2M je tedy rozeznáván ve dvou konformacích. Nativní forma („slow" forma) aktivní jako proteázový inhibitor, která není rozpoznávaná LRP receptorem a je stabilní v krvi a intersticiálním prostoru, a aktivovaná forma α2M („fast" forma), která vzniká konformační změnou po navázání proteázy a je rozpoznávána LRP receptorem (Webb a spol., 1996). Konformační změna α2M odhaluje vazebné místo pro LRP. Toto místo je lokalizováno 18kDa peptidy na C terminální složce každé α2M podjednotky (Webb a spol., 1998). Několik buněk vlastní tyto membránové LRP receptory pro α2M-proteinázový komplex. Vyskytují se převážně na hepatocytech, makrofázích a fibroblastech (Pizzo a Gonias, 1984). Makrofágy jsou zodpovědné za rapidní odstranění α2M-proteinázových komplexů z cirkulace (Saksela a spol., 1984). α2M reaguje ireverzibilně, saturace jedním enzymem zabraňuje následnému navázání jiného enzymu.

α2M je hlavní nosič TGF-β *in vivo* (Webb a spol., 1998). Funkce α2M jako cytokinového nosiče je komplikovaná díky jeho rozlišným konformačním stavům (Crookston a spol., 1994). Jeho schopnost vázat cytokiny a růstové faktory má rozsah mezi nanomolární a mikromolární K_d (Wu a spol., 1998). Místo, na které se v α2M váže TGF-β je velké 700 až 738 aminokyselin. TGF-β je během vazby na α2M v neaktivní formě (Lysiak a spol., 1995). Cytokiny a růstové faktory jsou vázány mechanizmem odlišným od vazby proteáz, zachycení nevyžaduje konformační změnu α2M (ale k aktivované α2M konformaci vykazují daleko vyšší afinitu), při jejich vazbě nejsou štěpeny žádné peptidové vazby a thiolesterová vazba není narušená (Crookston a spol., 1993). Stechiometrie komplexu α2M-proteáza je velmi důležitá v určování TGF-β vazebné aktivity. Binární komplexy (1:1; stav kdy zreaguje okolo poloviny štěpitelných vazeb v α2M) α2M s trypsinem a chymotrypsinem vykazují zvýšené vázání TGF-β1 v poměru k nativnímu α2M. Když je α2M saturován proteázami do ternární formy (2:1; stav kdy zreagují všechny 4 štěpitelné vazby α2M) α2M-proteinázových komplexů, vazba TGF-β je stejná, nebo dokonce i snížená, oproti nativnímu α2M (Hall a spol., 1992). Růstové faktory se vážou nekovalentně a reversibilně, na rozdíl od toho s TGF-β1 a TGF-β2 se tvoří vysoce afinitní interakce. TGF-β, který je vázaný na neporušený α2M není rozeznávaný specifickými protilátkami a jeho aktivita k různým buňkám je neutralizována. (Hall a spol., 1992; Webb a spol., 1994). Je známo, že aktivovaný (případně i neaktivovaný) α2M váže různé cytokiny, ovšem TGF-β je vázán preferenčně před ostatními (Harthun a spol., 1998).

Interakce je ukončena rychlým odstraněním α2M-proteáza-cytokin komplexu z cirkulace receptorem zprostředkovanou endocytózou pomocí LRP receptorů a zničen ve vakuolách. (Lillis a spol., 2005). α2M může měnit balanci cytokinů a tím vlastně i mikroenvironmentální okolí obklopující buňky (Webb a spol., 1994).

In vitro bylo dokázáno, že přibližně 5% totálního α2M bylo transformováno po přidání 10μgT/1ml lidské celé plasmy obsahující 3mg/ml α2M. Z toho vyplývá, že přibližně 30% dodaného trypsinu je zachyceno α2M, i přes to, že se v séru hojně vyskytují jiné inhibitory trypsinu (Birkenmeier a Stigbrand, 1993). Množství transformovaného α2M v plazmě zdravých jedinců se normálně vyskytuje mezi 0,1-1% celkového α2M, což signalizuje fyziologickou variabilitu (Birkmeier a Stigbrand, 1993).

α2-makroglobulin u myší (mα2M)

α2M v myším séru má vysokou sekvenční identitu s lidským α2M (hα2M), ale navíc podstupuje posttranslační štěpení podjednotek (jedná se o 180kDa podjednotky), čímž vykazuje částečnou konformační změnu. Molekula mα2M se tedy skládá

ze čtyř podjednotek, jedná se vždy o dvě podjednotky o molekulární hmotnosti 165kDa a dvě o molekulární velikosti 35kDa (Van Leuven a spol., 1992). Tato molekula je pravděpodobně daleko méně ohebná než je hα2M. (Bhattachajree a spol., 1999). Toto složení je podobné jedině molekulám α2M vyskytujícím se v krysím séru. V krysím séru jsou pozorovány stopy přítomnosti i 185kDa podjednotky (Lonberg-Holm a spol., 1987). Menší 35kDa podjednotka vykazuje sekvenci, která není identická k žádné známé α2M sekvenci. Ve struktuře mα2M chybí disulfidické můstky a cysteinové zbytky jsou nahrazeny fenylalaninovými zbytky. Přesto je mα2M úspěšně stabilní i bez těchto extra disulfidických můstků (VanLeuven a spol., 1992). α2M je jediný myší globulin, který podporuje NO syntézu. *In vivo* byl mα2M prokázán jako neutralizér TGF-β (Webb a spol., 1996).

Do mα2M rodiny patří také proteinázový inhibitor muringlobulin (MUG), jednoduchý řetězec (Mr 180KDa), který se stejně jako α2M nachází v plazmě dospělých myší ve vysokých koncentracích (1mg/ml), (Abe a spol., 1989).

Společné znaky hα2M a mα2M

Prvním společným znakem je prezence v konstantních koncentracích v plazmě (1-2g/l). Strukturálně jsou to oba tetrametrické proteiny, které hrají roli při vychytávání proteináz, jejichž inhibice je zprostředkovaná konformačními změnami (Abe a spol., 1989). Inhibují široké spektrum proteáz podobným zachycujícím mechanismem. Vzniklé proteinázové komplexy jsou následně eliminovány stejným receptorem.

Schopnost vmezeřit neproteolytické ligandy byla pozorována jak u hα2M, tak u mα2M. Toto pozorování je zajímavé vzhledem k určité strukturální odlišnosti mezi těmito molekulami (Bhattacharjee a spol., 1999).

Afinita k TGF-β1 klesá v tomto pořadí: mα2M > ratα2M > ratα1M ≥ hα2M >> MUG (Webb a spol., 1996).

1.2.4.2. α1-Antitrypsin, contrapsin

Lidský α1-antitrypsin je glykoprotein, který je zodpovědný za inhibici široké palety serinových proteáz jako jsou trypsin, chymotrypsin elastaza, plasmin či trombin (Laurell a Jeppsson, 1975). Akutní fázi mnoha nemocí doprovází zvýšení jeho množství, tudíž je často využíván pro diagnostické účely a prognózu (Takahara a Sinahora, 1982).

Nedávno bylo objeveno, že v myším séru existují 2 homology k lidskému α1-antitrypsinu, a to myší α1-antitrypsin a nový inhibitor předběžně zvaný contrapsin, který se nevyskytuje u lidí (Takahara a Sinohara, 1982). Projevem tohoto zjištění může být fakt, že myší sérum má několikrát vyšší kapacitu pro inhibování hovězího trypsinu, nežli je pozorováno u lidského

séra (Takahara a Sinohara, 1982; Takahara a spol. 1983). Byla prokázána homologie mezi lidským α1-antitrypsinem a contrapsinem, z čehož se můžeme domnívat, že tyto inhibitory pochází z evolučně nedávných duplikací genů (Hill a spol., 1984; Hill a Hastie, 1987). Z tohoto zjištění evolučně vyplývá, že myší contrapsin i α1-antitrypsin se vyvinuly ze stejných předků jako α1-antitrypsin u lidí, u kterých k jeho rozvoji nedošlo.

Podle uskutečněných experimentů se zdá, že mezi myšími inhibitory α1-antitrypsinem a contrapsinem existuje určitá dělba práce (Takahara a Sinohara, 1982, Takahara a spol. 1983). Oba tyto inhibitory serinových proteáz jsou monomerní glykoproteiny (α1-antitrypsin 53kDa, contrapsin 55kDa). Hladiny α1-antitrypsinu a contrapsinu v myším séru dosahují několika mg/ml (Yamamoto a Sinahora, 1984). Tyto hodnoty jsou rozdílné mezi samicemi (α1-antitrypsin 3,5mg/ml, contrapsin 2,1mg/ml) a samci (α1-antitrypsin 5,2mg/ml, contrapsin 2,8mg/ml). Tyto dva inhibitory proteáz, nebo také kontrazymy (Takahara a Sinohara, 1982), jsou si podobné ve fyzikálně-chemických vlastnostech, ale výrazně se liší v antigenicitě a v inhibičním spektru proteáz (Takahara a Sinohara, 1982; Takahara a spol., 1983). Tento rozdíl může být důsledkem jejich odlišného reakčního místa (Hill a spol., 1984). Inhibiční spektra těchto dvou inhibitorů se navzájem nepřekrývají, contrapsin inhibuje pouze trypsin a trypsin-like proteázy (Takahara a Sinohara, 1982), α1-antitrypsin inhibuje ještě chymotrypsin a elastázu.

1.2.4.3. Ostatní inhibitory proteáz

Kromě výše zmíněných, dominatních inhibitorů proteáz, zejména tedy trypsinu a chymotrypsinu, patří do této skupiny ještě skupina dalších inhibitorů. Patří sem například α2-antiplasmin, elastin a antithrombin III. Tyto inhibitory nemají důležitou roli v procesech (pro)enzymoterapie, tudíž jim nebyla během experimentů věnována větší pozornost.

1.3. Enzymová a proenzymová terapie

1.3.1. Enzymová terapie

Enzymoterapie nádorů je vázána s dlouhou historií, která sahá až k původním studiím J. Bearda (Beard, 1911). John Beard, který působil jako srovnávací embryolog na Edinburgské univerzitě, se zabýval nápadnou shodou mezi maligními tumory a trofoblasty. Během svého pozorování zaznamenal, že ke zpomalení růstu placenty u většiny placentárních obratlovců dochází právě v období, kdy se začne vyvíjet pankreas u plodu. Na základě těchto informací postavil teorii, ve které se domníval, že extrakt pankreatu bude mít podobný tlumící účinek na nádorovou invazi (Beard, 1905). Tato teorie byla experimentálně potvrzena

a publikována jako trypsinová terapie nádorových onemocnění (Beard, 1911). Rozšířeně se terapie pomocí proteolytických enzymů užívá již od roku 1954, ale princip jejich působení ještě stále není zcela objasněn. Je prokázáno, že tato terapie je prospěšná v klinických situacích, kdy dochází k nadprodukci cytokinu TGF-β, kdy je jeho hladina vlivem léčby snižována (Desser a spol., 2001). Aplikace proteáz za účelem léčby patrně mobilizuje transformovaný α2M ze zásoby nativního α2M k efektivnější podpoře čištění nebo degradaci patologicky zvýšených cytokinů. Účinnost enzymoterapie byla prokázána i v klinických studiích, ale přesný mechanismus účinku působení zůstává stále neznámý (Leipner a Saller, 2000).

1.3.2. Mechanismus enzymoterapie

Enzymová terapie, v současné době velmi diskutovaná metoda léčby rakoviny, může být považována za určitou imunomodulaci. Nejčastěji používanými enzymy pro terapii jsou trypsin, chymotrypsin, papain a bromelain. Rychlost jejich vstřebávání je závislá na způsobu aplikace. V těle jsou proteázy vychytávány antiproteázami vyskytujícími se v séru. Mezi tyto inhibitory proteáz patří již zmiňovaný α2-makroglobulin, α1-antitrypsin, contrapsin, *etc*.

Bylo zjištěno, že proteázy se v lidském séru váží přednostně na α2-makroglobulin (Topping a Seilman, 1979), který je neinhibuje úplně. α2-makroglobulin pohlcuje proteázy do struktury podobné pasti, ve které jim zůstává zřetelná proteolytická aktivita. Navázáním proteázy dochází ke konformační změně a přechodu α2-makroglobulinu do aktivované („fast“) formy, ve které je schopen vázat cytokiny s daleko větší afinitou. Spektrum odstraňovaných cytokinů je široké, obsahuje pro i protizánětlivé faktory, Th1 i Th2 cytokiny (viz tab. 1).

Přehled cytokinů vázaných α2-makroglobulinem:

Tab I Přehled cytokinů vázaných na α2-makroglobulin.

TGF-β1, TGF-β2	Feige a spol., 1996
IL-1beta, IL-2, IL-12	Borth a Luger, 1989
IL-4	Garber a spol, 2000
IL-6	Matsuda a spol, 1989
IL-8	Kurdowska a spol., 1997
IL-10	Garber a spol., 2000
Inhibin, Activin	Niemuller a spol., 1995
Defensin	Panyutich a Ganz, 1991
VEGF	Bhattacharjee a spol., 2000;
NGF-β	Gonias a spol., 2000
PDGF-BB	Crookston a spol., 1994
FGF 1,2,4,6	Asplin a spol., 2001

EGF	Gettins a Crews, 1993
IGF-1	da-Silva a spol., 1996
OGP	Gavish a spol., 1997
NT-3, CNTF, TGF-α	Liebl a Koo, 1993
β2-microglobulin	Gouin-Charnet a spol., 2000
Growth hormone GH	Kratzsch a spol., 1996
Leptin	Birkenmeier a spol., 1998
TNF-α	Crookston a spol., 1994
IFN-γ	James a spol., 1992

Na aktivovaném komplexu α2-makroglobulin+proteáza+cytokin se odkrývá vazebné místo pro receptor LRP, díky kterému dochází k rychlému odstranění těchto komplexů z oběhu a jeho následnému zničení ve vakuolách. Odčerpáváním těchto přebytečných cytokinů můžeme dosáhnout rovnovážného stavu Th1/Th2, čímž se vysvětlují příznivé účinky tohoto způsobu léčby. V případě nádorových onemocnění dochází k odstraňování nadbytečných cytokinů TGF-β, díky kterým nádory navozují svou imunotoleranci. Vlivem TGF-β dochází k tvorbě Treg z CD4+ lymfocytů. Treg tlumí aktivitu CTL a tím chrání nádory před útokem buněčné imunity. TGF-β takto působí supresivně na T buňky ovlivňující autoimunitní záněty a protinádorovou imunitu (Becker a spol., 2006).

1.3.3. Proenzymová terapie

Novák a Trnka (Trnka a spol., 1999, Novák a Trnka, 2005), kteří se ve svých experimentech zabývali teorií J. Bearda, vnesli na tuto terapii nový pohled. Bylo zjištěno, že Beard svým pacientům podával extrakty z čerstvých telecích pankreatů. Tento čerstvý extrakt musel obsahovat významné množství trypsinogenu, pravděpodobně také chymotrypsinogenu (objeveného později) a amylázy. Z tohoto důvodu můžeme usoudit, že Beard spíše než enzymoterapii popsal ve svých experimentech proenzymoterapii.

Výhoda použití proenzymů tkví v tom, že jsou neaktivní, a proto se mohou volně pohybovat v krvi. Jejich aktivace pravděpodobně probíhá v místě nádoru a to nádorovými proteázami jako jsou s membránou spojený katepsin (Kobayashi a spol., 1993), nádorový trypsin (Nyberg a spol., 2006), urokinázový inhibitor plasminogenu (Uchima a spol., 2003), patrně také enterokináza (Miyata a spol. 1999) a enterokináze podobný enzym (Nyberg a spol., 2002). U proenzymů dochází také k autoaktivaci trypsinogenu nově vznikajícím trypsinem (Kay a Kassel, 1971). Těmito způsoby se v místě nádorů hromadí aktivní enzymy. Po interakci těchto aktivních enzymů s α2-makroglobulinem dochází k vychytání cytokinů, jak je popsáno výše. Největší rozdíl tkví v tom, že tyto zmíněné procesy jsou daleko více

cílené, koncentrované na nádor, tudíž účinnější i při použití menších množství proteáz (Novák a Trnka, 2005).

1.3.4. Způsoby aplikace (pro)enzymů

Aktivní enzymy jsou lidem podávány perorálně, v podobě tablet s obalem chránícím před kyselinami v žaludku. Tento způsob je využíván zejména firmami produkujícími přípravky založené na kombinaci trypsinu, chymotrypsinu, papainu a bromelinu (Wobenzym, Wobemucos). V tomto případě je pacientům podáváno obrovské množství enzymů. Názory na vstřebatelnost takto podaných enzymů se však různí. Uvádí se, že se u perorálních aplikací do krevního oběhu dostane pouze nepatrný zlomek této dávky (Šťastný a spol., 2002; Roots 1997; Ziv a spol., 1987), nebo dokonce vůbec nic (Gewert a spol, 2004). V experimentech na myších byl použit perrektální způsob aplikace. Perrektální podání směsi trypsinu chymotrypsinu a papainu výrazně ovlivnilo tvorbu metastáz u melanového modelu rakoviny (Wald a spol., 2001) a také u Lewisova plicního karcinomu (Wald a spol., 1998).

Proenzymy (trypsinogen ve směsi s podpůrnou amylázou) aplikované *s.c.* byly použity v experimentu na myším modelu (Novák a Trnka, 2005). Na metastázovém modelu B16-F10 byl pozorován úspěšný vliv terapie na přežití myší.

Ukázalo se, což dále uvedené práce potvrdily, že v případě aplikace proenzymů je použitelná koncentrace k dosažení obdobných terapeutických efektů o řád a více nižší než je tomu u enzymů.

Proenzymoterapie založená na synergicky působící směsi trypsinogenu a chymotrypsinogenu s podpůrnou amylázou v optimalizované koncentraci aplikovanou *i.m.* byla použita na myším modelu se sarkomem S-180 (Kaiserová, 2008). Tato terapie měla vliv na redukci nádorového růstu a prodloužení přežití. *I.m.* aplikace stejné směsi v případě myšího modelu melanomu B16-F10 vedla kromě redukce nádorového růstu k redukci výskytu metastáz (Kalferstová, 2008).

Další způsoby aplikace (pro) enzymů nebyly dosud zkoušeny.

2. Cíle práce

- Charakterizovat systém proteázových inhibitorů v séru u zdravých a nádorových myší, studium možností ovlivnění tohoto systému k dosažení terapeutického protinádorového efektu.

- Zavedení metod titrace myšího séra trypsinem a titrace trypsinu myším sérem, pomocí těchto metod sledovat vysycenost α2-makroglobulinu proteázami a korelaci s vazebnou kapacitou TGF-β, množství navázaného TGF-β zjistit pomocí metody ELISA.

- Sledovat *in vivo* dynamiku aktivovaného α2-makroglobulinu při užití různých forem aplikace (pro)enzymů (*i.p., s.c., i.m., p.o.*).

- Provést (pro)enzymoterapii nádorů, ve srovnání s kontrolou sledovat α2-makroglobulin, jeho schopnost vázat TGF-β a vazebné rezervy dané množností další aktivace.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

Trypsin 14 300 U/mg (Sigma-Aldrich), bovinní trypsinogen 14 000 U/mg (Sigma), bovinní alfa-chymotrypsinogen A 48 U/mg (Sigma), alfa-amyláza z *Bacillus sp.* 1780 maltózových U/mg proteinu (Sigma), TES (Sigma), BAPNA (Sigma), ELISA READY-SET-GO! Human/Mouse TGF-beta1 (Bioscience), Bz-DL-Arg-AMC.HCl.

3.2. Laboratorní zvířata

U pokusů prováděných během této práce byly použity inbrední samice myší kmene C57BL/6, Charles River (myši použité v experimentech 1, 2, 3, 4, 5, 6) a inbrední samice myší kmene BALB/c, Charles River (myši použité v experimentu 4). Váha myší při dodání se pohybovala kolem 18-20g. Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

3.3. Buněčné linie

Při pokusech byly použity nádorové buňky melanomu B16-F10 a sarkomu S-180 (dar prof. Říhové, MBÚ AV ČR, Praha). Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 obsahujícím 10% bovinního fetálního séra a antibiotika (Sigma). Jejich kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

3.4. Transplantace nádoru

3.4.1. Experiment 4

Buňky sarkomu S-180 byly po centrifugačním promytí rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra. S.*c.* cestou bylo myším BALB/c aplikováno 400 000 těchto buněk (0,1ml suspenze/myš) do předem oholeného místa v pravé zadní části zad.

3.4.2. Experiment 3, 5 a 6

Po trypsinizaci a centrifugačním promytí byly buňky melanomu B16-F10 rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra. Do předem oholeného místa v zadní části zad myší C57BL/6 bylo injikováno 0,1 ml suspenze těchto buněk obsahující 400 000 buněk.

3.5. Uspořádání jednotlivých *in vivo* experimentů

3.5.1. Experiment 1: Porovnání hladin sérových proteáz při různých aplikacích trypsinu zdravým myším C57BL/6

V pokusu bylo použito 43 samic C57BL/6. Tři myši byly použity jako čisté, kontrolní. Ostatních čtyřicet myší bylo po deseti rozděleno do čtyř skupin – 1, 2, 3 a 4.

První den pokusu (aplikace proběhla v 8:00):

- Skupina 1: 10mg trypsinu/0,05ml fyziologického roztoku, *p.o.* podání
- Skupina 2: 1mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku, *i.p.* podání
- Skupina 3: 1mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku, *s.c.* podání
- Skupina 4: 1mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku, *i.m.* podání

Všechny další dny byly myším aplikovány poloviční dávky trypsinu, a to:

- Skupina 1: 5mg trypsinu/0,05ml fyziologického roztoku, *p.o.* podání
- Skupina 2: 0,5mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku, *i.p.* podání
- Skupina 3: 0,5mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku, *s.c.* podání
- Skupina 4: 0,5mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku, *i.m.* podání

3.5.2. Experiment 2: Hodnoty séra po *i.p.* aplikaci trypsinu během 12 hodin

V tomto experimentu bylo použito 15 samic myší kmene C57BL/6. Z toho 12-ti myším byl v 8:00 hodin aplikován 1mg trypsinu/0,1ml fyziologického roztoku a to *i.p.* cestou, 3 myši byly ponechány jako čisté, kontrolní.

3.5.3. Experiment 3: Porovnání terapie *i.p.* a *i.m.* cestou *in vivo*

V experimentu bylo použito 10 samic myší kmene C57BL/6. Myším bylo *s.c.* cestou aplikováno 400 000 buněk melanom B16-F10. Dvanáctý den po transplantaci nádorů byly myši rovnoměrně podle velikosti nádorů rozděleny do dvou skupin po 5. Tentýž den byla započata léčba dle následujícího uspořádání:

- Skupina I: nádorové myši (5), denně aplikováno *i.m.* cestou 0,1ml proenzymové směsi
- Skupina II: nádorové myši (5), denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml proenzymové směsi

3.5.4. Experiment 4: Stanovení parametrů A, B a D u sér myší kmene BALB/c s velmi vyvinutými nádory sarkomu S-180

V pokusu bylo použito 6 bílých myší, samic BALB/c. Třem myším bylo *s.c.* cestou transplantováno 400 000 buněk sarkomu S-180, zbylé tři myši byly ponechány jako čisté, kontrolní. Myším po dobu experimentu nebylo nic aplikováno.

3.5.5. <u>Experiment 5:</u> Vliv proenzymoterapie na parametry séra (A, B a D) a hladiny volného/vázaného TGF-β u zdravých a nádorových (melanom B16-F10) myší kmene C57BL/6

V experimentu bylo použito 30 myší, samic C57BL/6. 18-ti myším bylo *s.c.* transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. Po rozvinutí se nádorů (11. den) byly rozděleny (rovnoměrně podle srovnatelných velikostí) po 9 myších do skupin I a II. Čisté myši byly rozděleny po 6 do skupin III a IV. Ve stejný den (11. den po aplikaci nádorových buněk) byla započata terapie dle následujícího uspořádání:

- Skupina I: nádorové myši (9), denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml fyziologického roztoku
- Skupina II: nádorové myši (9), denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml proenzymové směsi
- Skupina III: čisté myši (6), denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml proenzymové směsi
- Skupina IV: čisté myši (6), denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml fyziologického roztoku

3.5.6. <u>Experiment 6:</u> Měření hladiny TGF-β ELISA testem a zjišťování kapacity séra pro vazbu tohoto cytokinu

V posledním experimentu bylo použito 80 myší, samic C57BL/6. 60-ti myším bylo *s.c.* cestou transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. Zbývajících 20 myší bylo ponecháno jako čisté, kontrolní. Jedenáctý den po transplantaci byly nádorové myši rovnoměrně rozděleny do tří skupin po 20. Stejný den byla započata terapie dle následujícího uspořádání:

- Skupina A: kontrolní skupina bez nádorů, 20 myší
- Skupina B: nádorové myši (20), bez ovlivění terapií
- Skupina C: nádorové myši (20), denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml proenzymové směsi
- Skupina D: nádorové myši (20), denně aplikováno *i.m.* cestou 0,1ml proenzymové směsi

3.6. Měření velikosti nádorů

V experimentech, ve kterých byl myším transplantován nádor (melanom B16F10, sarkom S-180), byl sledován jeho nárůst u jednotlivých myší v jednotlivých skupinách. Nádory byly měřeny dvakrát týdně pomocí kaliperu. Z naměřených hodnot se vypočítal pravděpodobný objem jednotlivých nádorů, podle vzorce $V = \pi/6\ AB^2$, kdy A je největší naměřený rozměr nádoru a B je nejmenší naměřený rozměr nádoru (Inaba a spol., 1986).

3.7. Odběr a příprava séra

Myš byla před vlastním odběrem krve uspaná v etheru. Poté jí byla z krční tepny pomocí pasteurovy pipety odebrána krev do připravené eppendorfky. Krev v eppendorfce se nechala

při pokojové teplotě hodinu srážet. Poté byla stočena pomocí centrifugy, 10 minut 5000 x g. Ze stočené krve bylo odebráno čisté sérum a poté se nechalo zamrazit. V případě séra myší, kterým byla aplikována proenzymová terapie bylo sérum zamraženo při -80°C a v co nejkratší době zpracováváno (v rámci několika dní).

3.8. Měření aktivity trypsinu kinetickou metodou (titrace séra trypsinem a trypsinu sérem)

Toto měření bylo prováděno pomocí spektrofotometru Tecan infinite M200. Vzorky byly připravovány v mikrotitrační destičce, ve které byla následně měřena změna absorbance v čase při 410nm (Erlanger a spol., 1961). Jako substrát byl v této metodě použit N-alpha-benzoyl-DL-Arg-p-nitroanilid (BAPNA, Sigma-Aldrich).

3.8.1. Postup přípravy vzorků pro měření – titrace séra trypsinem:

- Bylo označeno 16 jamek v mikrotitrační destičce, 15 pro vzorek, 1 byla označena jako Blank
- do všech jamek v mikrotitrační destičce bylo napipetováno 100µl Tris (100mM TRIS, pH 7,8)
- dalším krokem bylo přidání H_2O podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
H_2O (µl)	90	87	84	81	78	75	72	69
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
H_2O (µl)	66	63	60	57	54	50	40	100

- do jamek 1-15 bylo přidáno 10µl séra (sérum bylo ředěné 1:8, k ředění byl použit fyziologický roztok), jamka obsahující Blank se vynechala
- poté byl přidán Trypsin (100µg/ml, 5mM Na/acetátu, pH 5,0), podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Trypsin (µl)	0	3	6	9	12	15	18	21
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
Trypsin (µl)	24	27	30	33	36	40	50	0

- vzorky se nechaly 20 minut inkubovat za pokojové teploty
- po inkubaci se do všech jamek přidalo 50µl substrátu (3,6mg BAPNA + 150µl DMSO + 1350µl H_2O)
- po přidání substrátu byla kinetika vzorků změřena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200

3.8.2. Postup přípravy vzorků pro měření – titrace trypsinu sérem:

- bylo označeno 16 jamek v mikrotitrační destičce, 15 pro vzorek, 1 byla označena jako Blank
- do všech jamek v mikrotitrační destičce bylo napipetováno100µl Tris (100mM TRIS, pH 7,8)
- dalším krokem bylo přidání H_2O podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
H_2O (µl)	60	57	54	51	48	45	42	39
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
H_2O (µl)	36	33	30	27	24	20	10	100

- do jamek 1-15 bylo přidáno 40µl Trypsinu (20µg/ml, 25mM Na/acetát, pH 5,0), jamka obsahující Blank se vynechala
- poté bylo přidáno sérum (sérum bylo ředěné 1:5, k ředění byl použit fyziologický roztok), podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Sérum (µl)	0	3	6	9	12	15	18	21
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
Sérum (µl)	24	27	30	33	36	40	50	0

- vzorky se nechaly 20 minut inkubovat za pokojové teploty
- po inkubaci se do všech jamek přidalo 50µl substrátu (3,6mg BAPNA + 150µl DMSO + 1350µl H_2O)

- po přidání substrátu byla kinetika vzorků změřena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200

3.9. Měření aktivity trypsinu pomocí endpoint metody (titrace séra trypsinem a trypsinu sérem)

Měření bylo provedeno na spektrofotometru PYE UNICAM SP 1800. Postup práce vznikl na základě endpoint metody (de Albuquerque a Cavalcanti, 2001). Měření bylo provedeno v kyvetách o optické dráze 1cm proti destilované vodě.

3.9.1. Postup přípravy vzorků pro měření – <u>titrace séra trypsinem:</u>

- bylo označeno 16 eppendorfek 1-15 (1,5ml), jedna byla označena jako B (Blank)
- do všech eppendorfek bylo napipetováno 100µl Tris (100mM TRIS, pH 7,8, t=30°C)
- dalším krokem bylo přidání H_2O (t=30°C) podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
H_2O (µl)	90	80	70	60	50	40	30	20
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
H_2O (µl)	10	0	40	30	20	10	0	90

- do eppendorfek 1-15 se přidalo 10µl séra (sérum bylo ředěné 1:8, k ředění byl použit fyziologický roztok, uchováváno na ledu)
- poté byl do vzorků 2-10 přidán trypsin-I (100µg/ml, 5mM Na/acetát, pH 5,0, uchováván na ledu), a do vzorků 11-15 trypsin-II (200µg/ml, 5mM Na/acetát, pH 5,0, uchováván na ledu) podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Trypsin (µl)	0	10	20	30	40	50	60	70
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
Trypsin (µl)	80	90	50	60	70	80	90	0

- všechny zkumavky byly promíchány pomocí vortexu, a poté 15min inkubovány při teplotě 30°C
- po inkubaci bylo do každé zkumavky přidáno 50µl substrátu (3,6mg BAPNA + 150µl DMSO + 1350µl H_2O, uchováváno na ledu)

- vzorky byly znovu promíchány pomocí vortexu a poté proběhla inkubace 20min při 30°C
- po druhé inkubaci byla reakce ve vzorcích zastavena přidáním 50µl 40% kyseliny octové (pokojová teplota)
- po zastavení reakce byly vzorky promíchány, do eppendorfky obsahující Blank bylo přidáno 10µl séra a obsah byl znovu promíchán pomocí vortexu, poté byly všechny vzorky změřeny pomocí spektrofotometru PYE UNICAM SP 1800 při vlnové délce 410nm, měření probíhalo proti destilované vodě, od všech výsledných hodnot byla odečtena hodnota Blanku

3.9.2. Postup přípravy vzorků pro měření – <u>titrace trypsinu sérem:</u>

- bylo označeno 16 eppendorfek 1-15, jedna byla označena jako B (Blank)
- do všech zkumavek bylo napipetováno 100µl Tris (100mM TRIS, pH 7,8, t=30°C)
- dalším krokem bylo přidání H_2O (t=30°C) podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
H_2O (µl)	60	57	54	51	48	45	42	39
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
H_2O (µl)	36	33	30	27	24	20	10	100

- do eppendorfek 1-15 se přidalo 40µl Trypsinu (100µg/ml, 5mM Na/acetát, pH 5,0, uchováván na ledu)
- poté se přidalo sérum (sérum bylo ředěné 5x, k ředění byl použit fyziologický roztok, uchováváno na ledu), podle návodu:

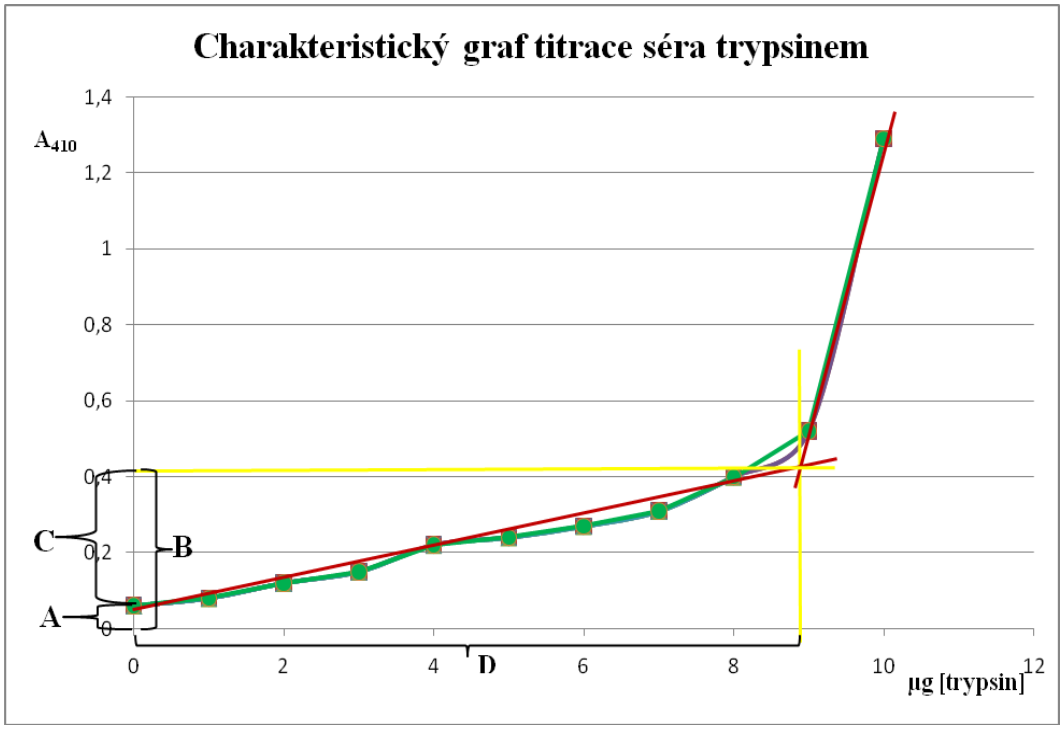
Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Sérum (µl)	0	3	6	9	12	15	18	21
Číslo vzorku	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**B**
Sérum (µl)	24	27	30	33	36	40	50	0

- všechny vzorky byly promíchány pomocí vortexu a poté 15min inkubovány při teplotě 30°C

- po inkubaci se do každé eppendorfky přidalo 50µl substrátu (3,6mg BAPNA + 150µl DMSO + 1350µl H_2O, uchováváno na ledu)
- vzorky byly znovu promíchány pomocí vortexu a poté proběhla inkubace 20min při 30°C
- po druhé inkubaci byla reakce ve vzorcích zastavena přidáním 50µl 40% kyseliny octové (pokojová teplota)
- po zastavení reakce byly vzorky promíchány, a poté změřeny pomocí spektrofotometru PYE UNICAM SP 1800 při vlnové délce 410nm, měření probíhalo proti destilované vodě, od všech výsledných hodnot byla odečtena hodnota Blanku

3.9.3. Metoda odečítání hodnot z grafu, titrace séra trypsinem (fotometricky naměřené hodnoty, endpoint metoda)

Hodnoty naměřené titrací séra trypsinem byly vyneseny do grafu. Z grafu byly poté odečteny hodnoty A, B, C a D (obr. 1).



Obr. 1 Charakteristický graf titrace séra trypsinem.

Graf zhotovený z hodnot naměřených při fotometrii měl vždy charakteristicky lomený průběh. Pro odečtení hodnot byly nejprve zkonstruovány dvě spojnice trendu, jedna pro mírné stoupání v grafu, druhá od zlomu do strmého stoupání. Jejich konstrukce byla provedena metodou lineární regrese. Vzniklý průsečík znázorňuje okamžik, kdy je α2M v daném séru zcela vysycen.

Hodnota A vypovídá o celkové původní proteolytické aktivitě séra, a je dána aktivitou proteáz v sérovém α2-makroglobulinu. Hodnota B odráží celkové množství α2-makroglobulinu. Hodnota C, která je výsledkem odečtení hodnoty A od B koresponduje s kapacitou sérového α2-makroglobulinu vázat další proteázy, v tomto případě trypsin. Hodnota D vypovídá o celkové inhibiční schopnosti séra pro trypsin. Parametry A, B, C a D nemají charakter absolutních veličin a slouží k popisu systému a jeho změn vždy za daných experimentálních podmínek.

3.10. Měření aktivity trypsinu fluorimetrickou metodou

Fluorimetrické stanovení bylo zavedeno z toho důvodu, že fotometrie při detekci původní proteolytické aktivity séra (určení hodnoty A) nebyla dostatečně citlivá a spolehlivá. Tato metoda (Zimmerman a spol., 1977) nám umožnila detekci aktivity až v nanogramech trypsinu obsaženého v séru.

Jako substrát byl použit Bz-DL-Arg-AMC.HCl, což je 7-(N-benzoyl-DL-argininamid) -4-methyl cumarin. Tento substrát je specifický pro trypsin, který štěpí molekulu za argininem. Odštípnutá část substrátu, tedy 7amino-4-methylcumarin, je fluoreskující molekula. Tento produkt byl měřený pomocí přístroje Mini-Fluorometr TBS-380, od firmy Turner Biosystems (excitace 365-395, emise 440-470nm). Fluorescence 7amino-4-methylcumarinu je 380/460nm, tudíž v rozmezí použitého fluorimetru.

3.10.1. Postup přípravy vzorků pro fluorimetrické měření a vlastní měření:

- nejdříve byl připraven roztok (40µl) obsahující substrát:
  -75mM TES
  -15mM $CaCl_2$
  - 1,5% DMSO
  - 0,3mM substrát - Bz-DL-Arg-AMC.HCl
  substrát byl nejprve rozpuštěn v DMSO a po jeho úplném rozpuštění převeden do roztoku
- přístroj byl před každým měřením kalibrován:
  0 RFU … 60µl 0,1N H_2SO_4
  10 RFU … 60µl 0,0135mM chinin sulfát (rozpuštěný v 0,1N H_2SO_4)
  (RFU – relativní fluorescenční jednotka)
- do připravené mikrokyvety bylo napipetováno 20µl roztoku obsahujícího sérum (ředění 4x; 5µl séra + 15µl fyziologického roztoku)

- roztok se v mikrokyvetě nechal 3 minuty temperovat, poté k němu bylo přidáno 40µl roztoku obsahujícího substrát
- před vlastním měřením se vzorek nechal další 3 minuty ustálit
- fluorescence se měřila v ose: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 minut
- naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu, ze kterého se následně odečetla počáteční rychlost enzymové reakce (ΔRFU/min)

3.10.2. Sestrojení kalibrační křivky pro fluorimetrické měření

Pro určení množství trypsinu byla sestrojena kalibrační křivka. Měření bylo provedeno podle stejného návodu (viz „Postup přípravy vzorků pro fluorimetrické měření a vlastní měření“), pouze roztok séra byl nahrazen trypsinovým roztokem (trypsin rozpuštěný ve fyziologickém roztoku) v těchto koncentracích: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 a 200µg/ml.

Z naměřených hodnot byly sestaveny grafy, ze kterých byla odečtena počáteční rychlost enzymové reakce (ΔRFU/min) u jednotlivých koncentrací trypsinu. Následně byla sestavena kalibrační křivka.

3.11. Stanovení hladin volného a vázaného TGF-β v séru pomocí ELISA testu

Měření metodou sendvič ELISA bylo prováděno ke zjištění hladin vázaného a volného TGF-β v séru. Použit byl kit ELISA READY-SET-GO! Human/Mouse TGF-beta1 (Bioscience).

Postup stanovení volného/vázaného TGF-β v séru

- nejprve bylo provedeno nakoutování ELISA destičky, do každé jamky bylo napipetováno100µl vazebného roztoku (roztok: 48µl capture Ab/12ml koutovacího pufru), destička se nechala přes noc při 4°C ve vlhké komůrce
- destička byla 5x promyta promývacím roztokem PBS+Tween 0,05%, do každé jamky bylo napipetováno 200µl 1x assay diluent, destička se nechala 1h inkubovat při pokojové teplotě
- destička byla znovu 5x promyta promývacím roztokem, do každé jamky bylo přidáno 100µl předem připravených vzorků
- příprava vzorků: sérum bylo naředěno v poměru 1:5 v PBS, poté byl vzorek rozdělen na dvě poloviny, jedna polovina byla kysele aktivována, k této polovině bylo přidáno 20µl HCl na 100µl séra, po inkubaci (10 minut) bylo přidáno stejné množství NaOH jako neutralizační činidlo, ke druhé (neaktivované) polovině bylo přidáno stejné

objemové množství (HCl+ NaOH) PBS, takto připravené vzorky byly v triplikacích naneseny na destičku

- příprava standardu: byl připraven základní roztok standardu, 2µl standard solution + 250µl 1x Assay dilluent, 100µl této směsi bylo přidáno do první a druhé jamky, z druhé jamky bylo provedeno dvojkové ředění (s 1x Assay dilluent)
- destička s přidanými vzorky se nechala přes noc inkubovat ve vlhké komůrce při 4°C
- následující den byla destička 5x promyta promývacím roztokem, poté bylo do každé jamky přidáno 100µl roztoku s detekční protilátkou (48µl detekční protilátky/ 12ml 1x assay dilluent), destička se nechala inkubovat 1h při pokojové teplotě
- destička byla znovu 5x promyta promývacím roztokem, poté bylo do každé jamky přidáno 100µl enzymového roztoku (48µl enzymu Avidin-HRP + 12ml 1x assay diluent), destička se nechlala inkubovat 30 minut při pokojové teplotě
- následovalo 7x vymytí promývacím roztokem, do každé jamky bylo přidáno 100µl substrátového roztoku, poté se destička nechala 15 minut inkubovat na tmavém místě
- reakce byla zastavena přidáním 50µl H_2SO_4/jamka
- poté byla destička čtena pomocí spektrofotometru, 450nm

3.12. Měření kapacity séra aktivovaného trypsinem vázat TGF-β

Postup přípravy vzorků a měření vazebné kapacity:

- do připravených 11 eppendorfek (1-11) bylo napipetováno 80µl PBS
- poté byla do zkumavek přidána H_2O v následujícím pořadí:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
H_2O	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0	40

- následně bylo do každé zkumavky přidáno 10µl séra (ředěné 1:8 v PBS)
- poté se přidalo do vzorků 2 – 10 Trypsin I (100µg/ml, 5mM Na/acetát, pH 5,0, uchováván na ledu), a do vzorku 11 Trypsin II (200µg/ml, 5mM Na/acetát, pH 5,0, uchováván na ledu) podle návodu:

Číslo vzorku	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Trypsin (µl)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	50

- dalším krokem bylo přidání 20µl roztoku TGF-β (80ng TGF-β /20µl PBS) do každé zkumavky

- vzorky se nechaly 30 minut inkubovat
- následně byly rozděleny na dvě části
- do první části bylo přidáno 20µl HCl na 100µl vzorku, po 10 minutové inkubaci proběhla neutralizace - 20µl NaOH na 100µl vzorku
- do druhé části se přidalo 40µl PBS na 100µl vzorku
- takto připravené vzorky byly napipetovány do předem nakoutované ELISA desky, poté proběhlo stanovení TGF-β metodou ELISA (viz 3.9. ELISA test)
- absorbance vzorků byla měřena při 450nm, hodnoty byly zpracovány a vyneseny do grafu

3.13. Statistické vyhodnocování

Statistické analýzy vyskytující se v této práci byly prováděny pomocí Studentova t-testu. V programu Microsoft Excel byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky, které byly následně použity pro vytvoření grafů.

4. Výsledky

4.1. Měření aktivity trypsinu v čase kinetickou metodou

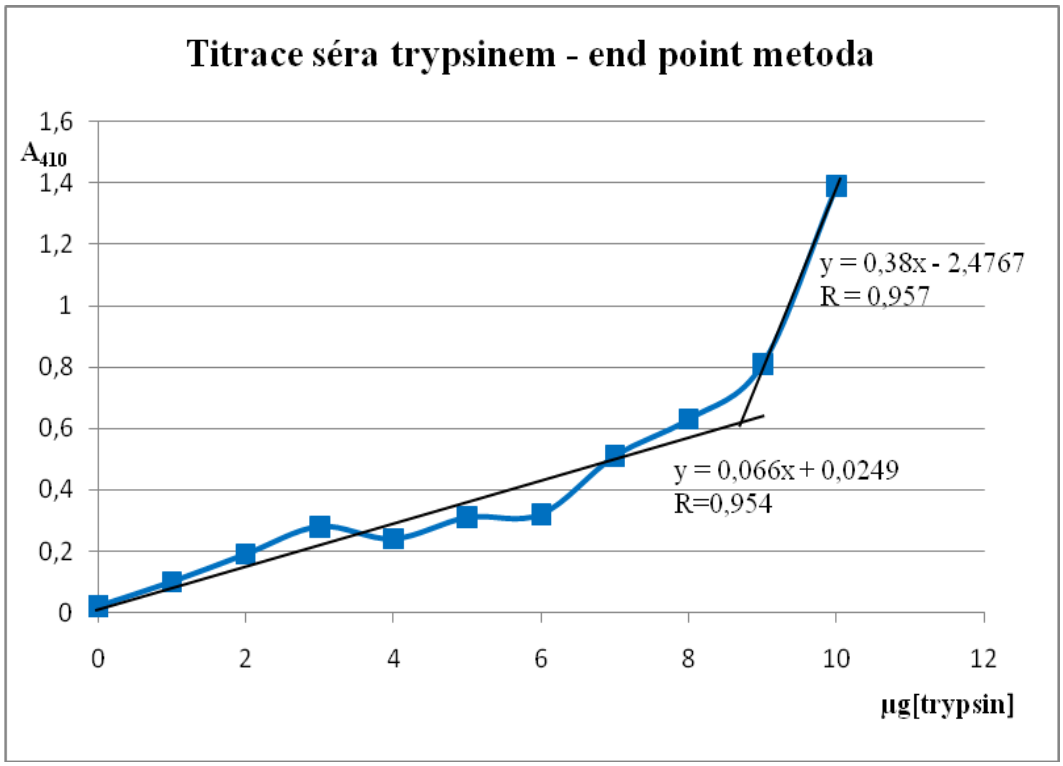
U naměřených hodnot byl pozorován velký rozptyl hodnot. Tato situace mohla nastat z důvodu nízké absorbance a jejích malých změn, nebo díky velmi krátké optické dráze. Další nepřesnosti mohly být způsobeny tím, že během měření nebyly pod kontrolou nečistoty a vzduchové bubliny, které se mohly utvořit. Z těchto důvodů bylo měření touto metodou v dalších pokusech vynecháno.

4.2. Měření pomocí endpoint metody

Touto metodou se nepřesnosti, které jsme pozorovali během první metody, redukovaly.

a) Titrace séra trypsinem, endpoint metoda

Byla měřena séra zdravých ničím neovlivněných myší, samic kmene C57BL/6. Typický průběh grafu z fotometricky naměřených hodnot je uveden na (obr. 2).



Obr. 2 Titrace séra trypsinem za použití metody endpoint. Měření proběhlo na spektrofotometru PYE UNICAM SP 1800 při 410nm.

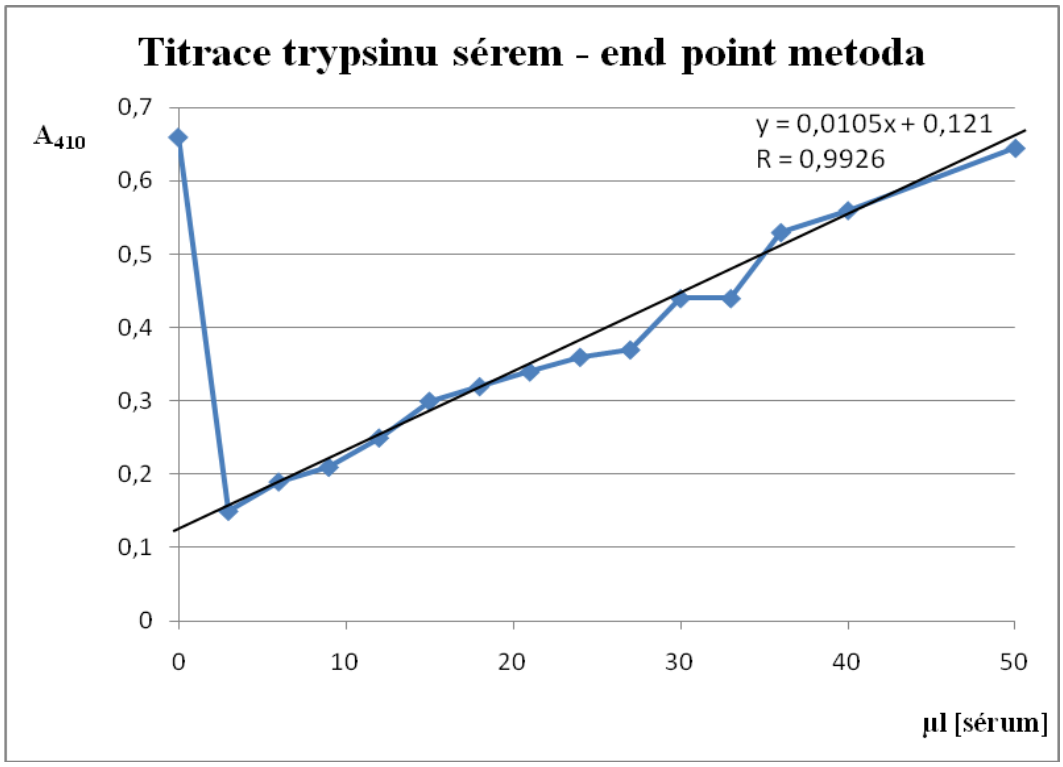
Během měření bylo zjištěno, že séra mají nenulovou aktivitu (k měření byla použita séra čistých myší). V grafu můžeme pozorovat bod zlomu, kdy absorbance séra začíná strmě stoupat. Tento bod se pravděpodobně rovná bodu, kdy je inhibiční aktivita séra vysycená.

Lze předpokládat, že v tomto bodě jsou α1-antitrypsin a α2-makroglobulin a jiné inhibitory plně vysyceny trypsinem. Je známo, že aktivitu vykazuje pouze trypsin navázaný na α2-makroglobulin.

Tato metoda se ukázala jako použitelná pro měření během *in vivo* pokusů, jelikož nám umožňuje zjistit základní charakteristiky séra (A, B, C a D viz výše). Během desítek dalších měření se ukázalo, že takto zjištěné hodnoty původní proteolytické aktivity jsou zanedbatelné a fotometrické měření není k jejich stanovení vhodné. Proto byl v dalších experimentech tento postup použit pouze pro stanovení hodnot B (koreluje s celkovým množstvím sérového α2-makroglobulinu) a D (udává celkovou inhibiční aktivitu proteázových inhibitorů obsažených v séru). Hodnota A byla nadále určována fluorimetricky.

b) Titrace trypsinu sérem, endpoint metoda

Byla měřena séra zdravých ničím neovlivněných myší, samic C57BL/6. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu (obr. 3).



Obr. 3 Titrace trypsinu sérem za použití metody endpoint. Před vlastní titrací bylo sérum naředěno (1:4). Měření proběhlo na spektrofotometru PYE UNICAM SP 1800 při 410nm.

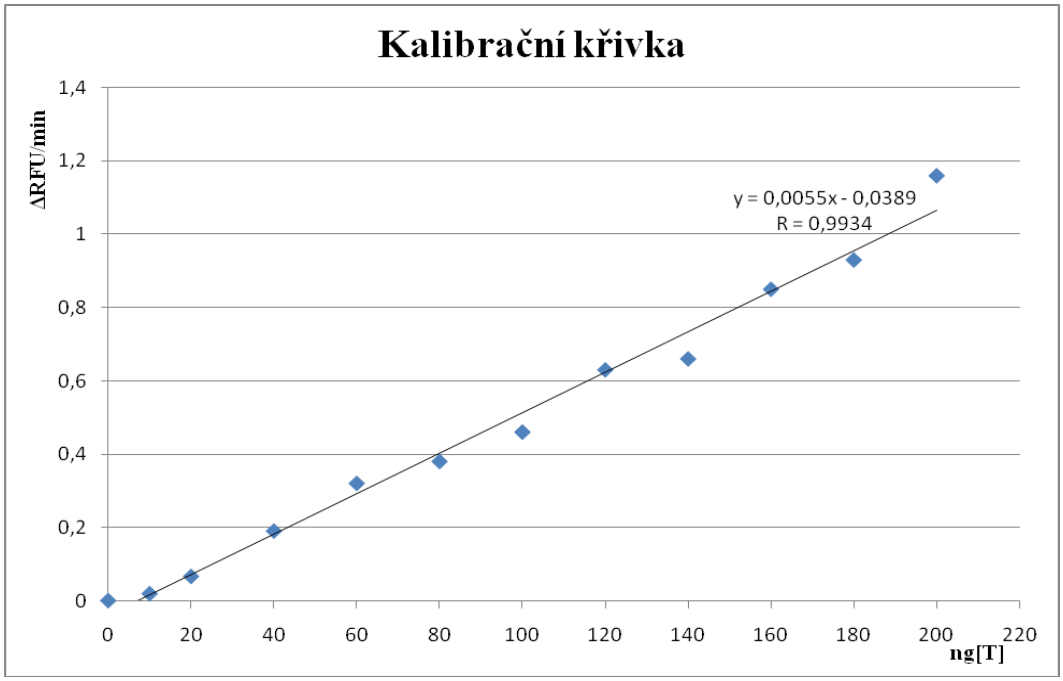
Tato metoda byla provedena na základě práce zabývající se aktivitou trypsinu v lidském séru (Topping a Seilman, 1978), která nás inspirovala k měření obrácené titrace. Tito autoři pozorovali zajímavý průběh titrace, který se lišil od našeho jak tím, že byl čtyřfázový

(v tomto grafu po dosažení minima, na rozdíl od našeho pozorování, následovalo přechodné zvyšování tryptické aktivity, které bylo dané především vychytáním části trypsinu do komplexu s α2-makroglobulinem), tak tím, že další nadbytek séra již nevyvolával žádné změny naměřené aktivity. Jimi měřená lidská séra vykazovala nulovou proteázovou aktivitu. Růst naměřené aktivity během našich experimentů byl ve stoupající části grafu lineární a přesně koreloval s grafem růstu proteolytické aktivity séra v závislosti na jeho množství, které bylo zjištěno v nezávislém experimentu bez původního trypsinu. V našem měření nebyla pozorována tak silná afinita α2-makroglobulinu k trypsinu, která by způsobovala narušení komplexů trypsinu s ostatními inhibitory a jeho následný přesun do komplexů s α2-makroglobulinem, jak bylo pozorováno při měření u lidského séra.

Přítomnost původní proteolytické aktivity v séru nám znemožňovala odečíst z grafu požadované parametry, jako je celková inhibiční aktivita a údaj, který by se shodoval s množstvím α2-makroglobulinu.

Pro měření vzorků v následujících *in vivo* experimentech byla z výše uvedených důvodů zvolena titrace séra trypsinem s měřením proteázových aktivit endpoint metodou na spektrofotometru Pye Unicam SP 1800. Takto byly získávány základní charakteristické parametry séra - hodnoty B a D.

Pro určení původní proteolytické aktivity séra (hodnoty A) bylo třeba použít mnohem citlivější a to fluorimetrickou metodu. Jak vyplývá z kalibrační křivky (obr. 4), jedná se o metodu velmi citlivou s lineární odpovědí v dostatečně širokém rozsahu.



Obr. 4 Kalibrační křivka pro fluorimetrické měření.

4.3. Experiment 1: Porovnání hladin sérových proteáz při různých aplikacích trypsinu zdravým myším C57BL/6

Uspořádání experimentu a aplikované dávky trypsinu jsou uvedeny v části Materiál a metody. První den po aplikaci trypsinu bylo v každé skupině odebráno sérum z pěti myší, pro sledování krátkodobé dynamiky vstřebávání trypsinu a to v čase: 1hod, 3hod, 6hod, 12hod a 24hod.

U zbylých myší ve skupinách byla sledována dlouhodobá dynamika vstřebávání trypsinu v časové ose: 3dny, 7dní, 14dní, 21dní a 24dní. Vždy v daný den pokusu bylo odebráno sérum z jedné myši v každé skupině (odběr byl proveden před aplikací trypsinu daný den).

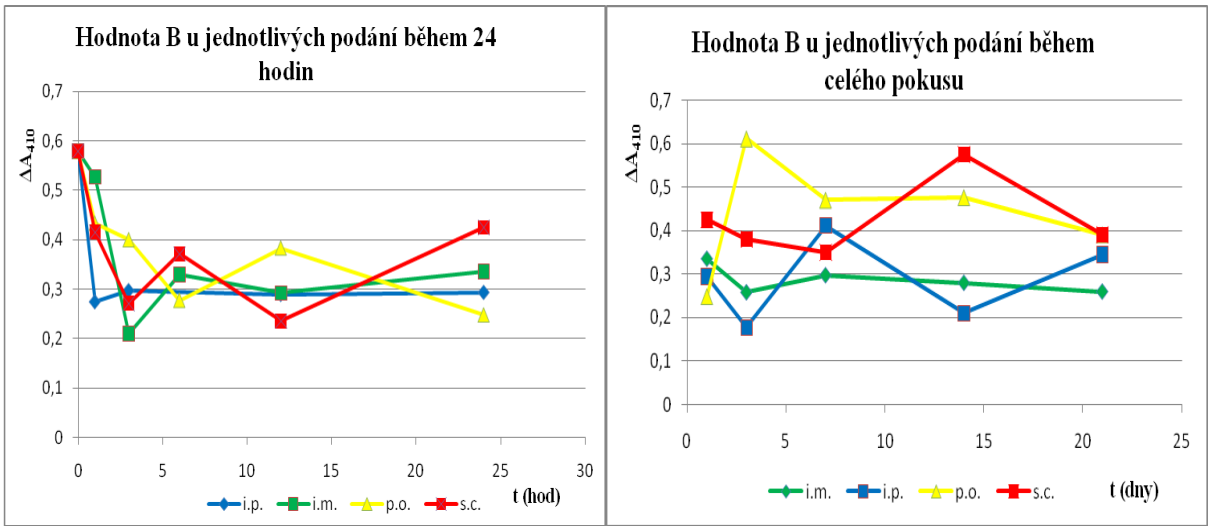
U myší v kontrolní skupině bylo sérum odebráno v časové dynamice 9:00, 13:00 a 20:00, za účelem zjištění, zda se hodnoty mění během dne. Z naměřených hodnot jsme zjistili, že časová dynamika odebrání séra u zdravých neléčených myší během jednoho dne nemá na výslednou hodnotu parametrů A, B, a D vliv. Séra byla měřena fotometrickou endpoint metodou (titrace séra trypsinem) a fluorimetrickou metodou, viz výše popsané metody.

4.3.1. Fotometrické měření endpoint metodou, stanovení parametrů B, D

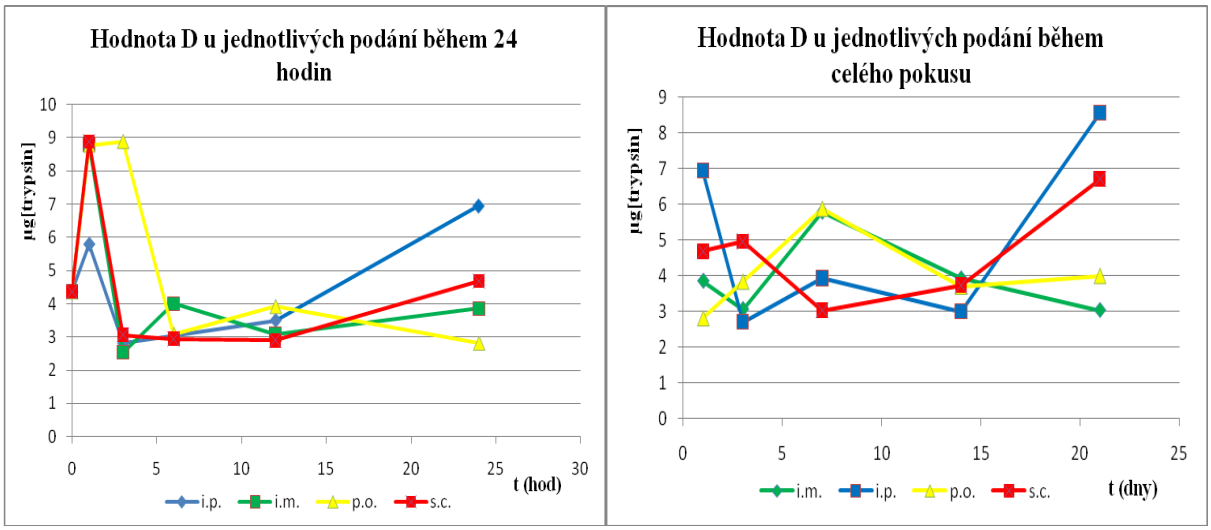
Odebraná séra byla měřena fotometrickou endpoint metodou (viz titrace séra trypsinem). Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafů, ze kterých byly následně odvozeny hodnoty B a D. U hodnot B i D byly zhotoveny vždy dva grafy, jeden znázorňující dynamiku aktivity trypsinu během 24 hodin po podání různými cestami (*i.p., i.m., s.c., p.o.*), v druhých grafech jsou vyneseny hodnoty B a D u jednotlivých podání během celého pokusu (24dní).

Z grafů (obr. 5) je patrné, že se po počátečním poklesu zejména hodnot parametru B po podání trypsinu se hodnoty obou parametrů u jednotlivých podání během 24h (obr. 5 - I, II) nijak zvlášť nemění. U grafů z průběhu celého pokusu (obr. 5 - III, IV) také nepozorujeme žádné významné rozdíly mezi jednotlivými způsoby podání enzymů. Zjistili jsme, že hodnoty obou parametrů jsou jak během 24 hodin, tak i dlouhodobě rozkolísané, ovšem žádné trendy a systematické rozdíly s výjimkou uvedeného počátečního poklesu nebyly pozorovány. Experiment vypovídá o pufrační kapacitě séra a stabilitě systému, která je tak veliká, že i dodání velkého množství trypsinu nedokázalo tuto stabilitu ovlivnit.

I II



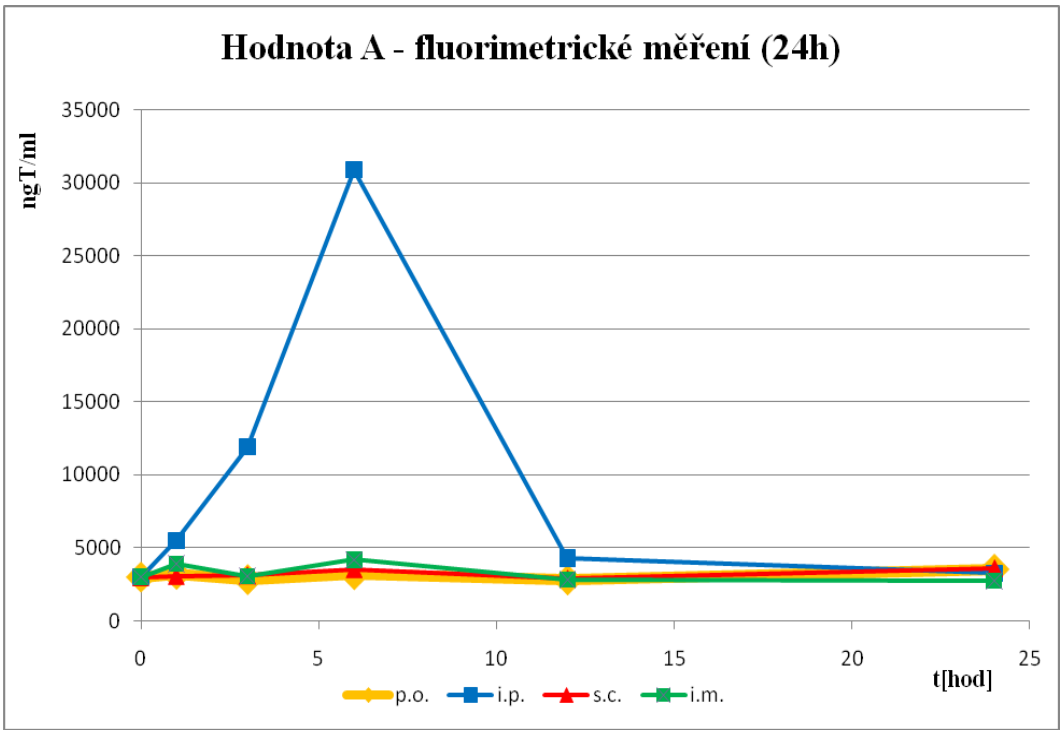
III IV



Obr. 5 Hodnoty sérových paramtrů odvozené z fotometrického měření. V grafu I je znázorněná hodnota B u jednotlivých aplikací během 24 hodin, v grafu II je vynesena hodnota B u jednotlivých aplikací během celého pokusu, graf III znázorňuje hodnotu D během 24 hodin a na grafu IV je znázorněna hodnota D během celého pokusu.

4.3.2. Fluorimetrické měření, stanovení parametru A

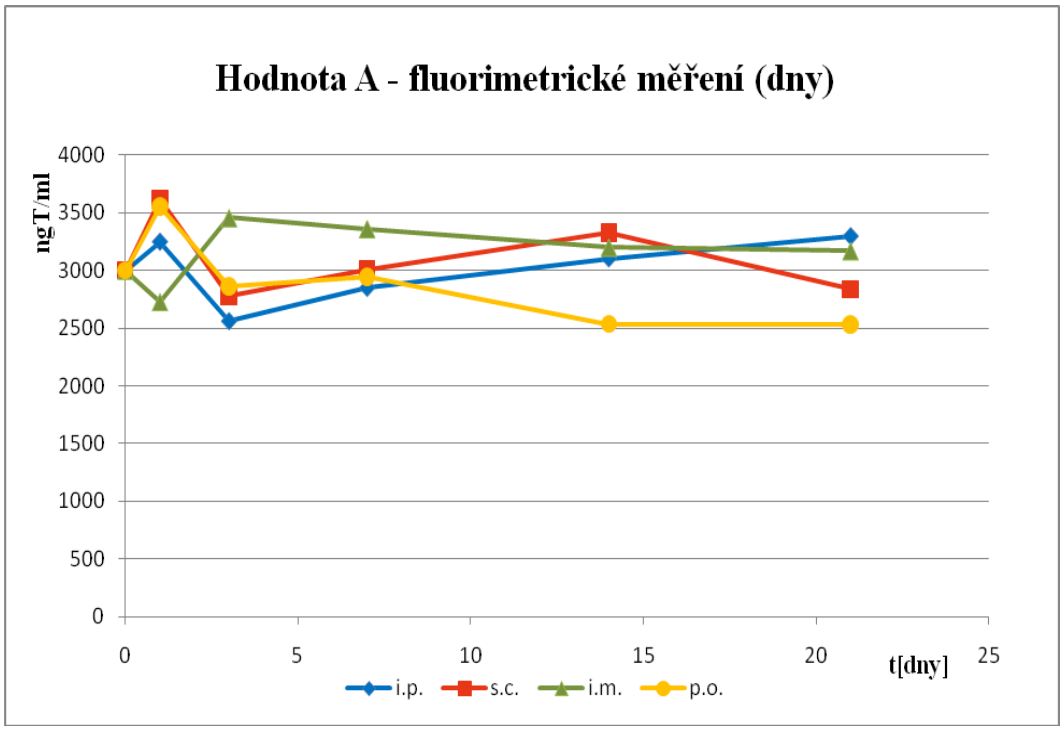
Nárůst fluorescence naměřený u jednotlivých vzorků byl vynesen do grafů proti času. Z grafů jsme odečetli počáteční enzymovou rychlost (ΔRFU/min). Tyto hodnoty byly pomocí kalibrační křivky převedeny na vlastní množství aktivovaného trypsinu, které je v grafu uváděno v ngT/ml séra (obr. 6).



Obr. 6 Hodnota A v ng trypsinu/ml séra u jednotlivých způsobů aplikace během intervalu 24 hodin (1, 3, 6, 12 a 24).

Množství trypsinu během pokusu u jednotlivých způsobů podání je znázorněno v grafech (obr. 6,7). Z těchto grafů je patrné, že u *p.o.* podání neproběhly žádné změny v krátkodobém ani dlouhodobém podání. A to i přes to, že při tomto způsobu aplikace bylo myším podáváno 10x víc trypsinu, než u ostatních aplikací. Bylo podáváno až 10mg T/myš, což v přepočtu na povrch vychází 3g, nebo v přepočtu na váhu 30g u lidí. Zjištěné pozorování do značné míry zpochybňuje tento způsob aplikace. *S.c.* aplikace byla nepatrně lepší, než *p.o.* aplikace, nicméně vstřebání trypsinu se opět ukázalo jako velmi slabé.

Lepších výsledků u vstřebávání trypsinu bylo dosaženo u *i.m.* aplikace. S opravdu velmi výrazným rozdílem se ukázala jako nejlepší způsob pro podávání trypsinu *i.p.* aplikace. Je známo, že toto podání zaručuje výborné vstřebávání, a i z grafu je patrné, že nejvyšší nárůst trypsinu byl pozorovaný u séra odebraného šestou hodinu po aplikaci. Mezi další zjištění patří, že vstřebávání trypsinu vykazuje denní dynamiku a po rychlém vzrůstu jeho aktivity v séru dojde k jeho poklesu, vše je nejlépe viditelné u *i.p.* aplikace. V dlouhodobém průběhu experimentu nedochází k tomu, že by hladiny trypsinu v séru byly nějak ovlivňovány, jak můžeme pozorovat v grafu (obr. 7).



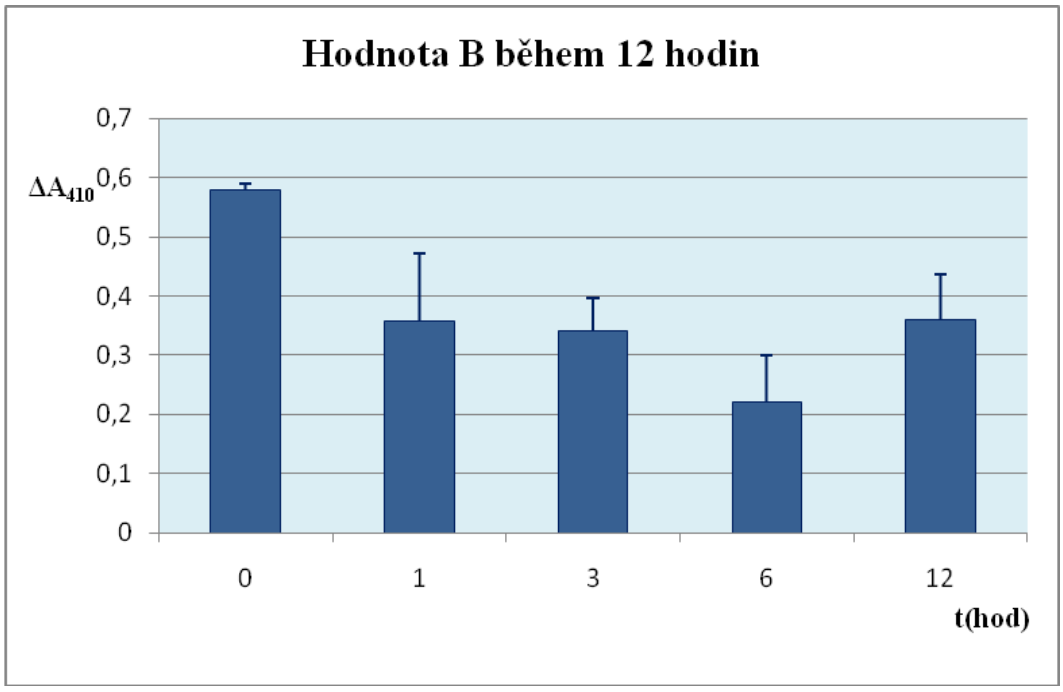
Obr. 7 Hodnota A v ngT(trypsinu)/ml séra u jednotlivých aplikací během dní (0 = kontrolní, 1, 3, 7, 14, 21 a 24).

4.4. Experiment 2: Hodnoty séra po *i.p.* aplikaci trypsinu během 12 hodin

Na základně zjištění z experimentu 1 jsme se rozhodli více zaměřit na hodnoty séra při *i.p.* podání trypsinu a ještě jednou si získané poznatky ověřit. Během tohoto experimentu byla pozorována změna aktivity séra po jeho podání během 12hodin. Myším byl aplikován trypsin *i.p.* cestou. Po 1, 3, 6 a 12 hodinách bylo odebráno sérum, vždy v počtu tří myší. Séra byla měřena pomocí fotometrické a fluorimetrické metody.

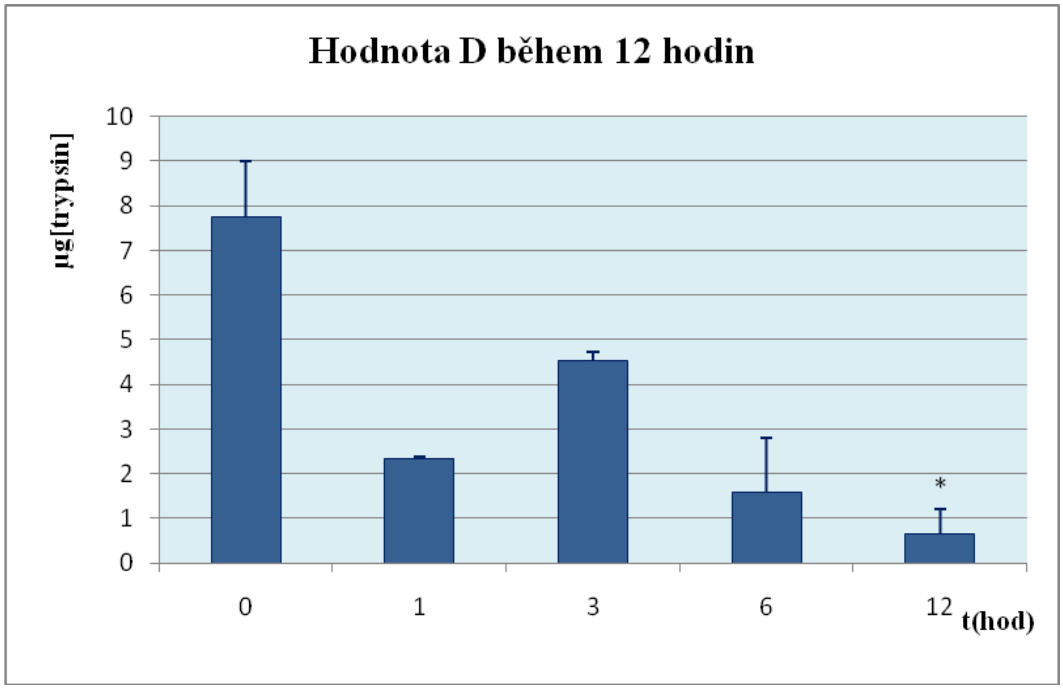
4.4.1. Fotometrické měření endpoint metodou, stanovení parametrů B, D

U odebraných myších sér byla fotometricky měřena titrace séra trypsinem (endpoint metoda). Z naměřených hodnot byly zhotoveny grafy, ze kterých byly následně odečteny hodnoty B a D. Tyto hodnoty v průběhu pokusu byly vyneseny do grafů (obr. 7, 8).



Obr. 8 Hodnota B v sérech odebraných 0, 1, 3, 6 a 12 hodin po *i.p.* aplikaci trypsinu.

U hodnoty B (obr. 8) můžeme pozorovat její pokles vrcholící při odběru 6h po aplikaci trypsinu. Tato hodnota vypovídá o celkovém množství α2-makroglobulinu v séru. Můžeme se domnívat, že pokles vypovídá o vychytávání komplexů α2-makroglobulinu s trypsinem, případně navázanými cytokiny. Je známo, že tento komplex je rapidně vychytáván z oběhu a poté destruován ve vakuolách (Lillis a spol., 2005).

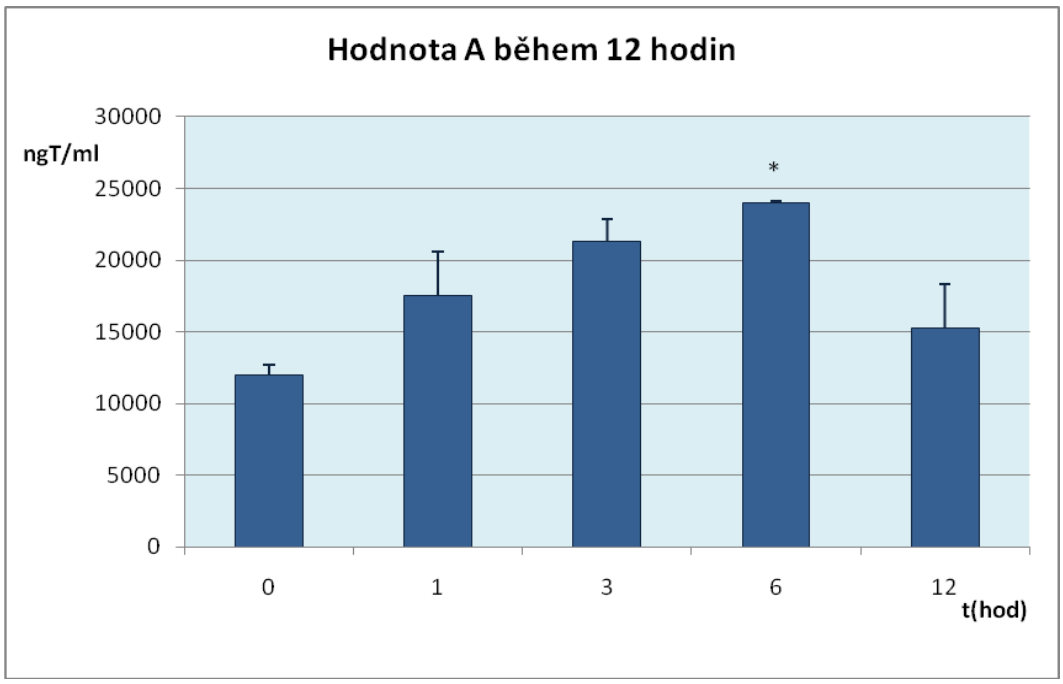


Obr. 9 Hodnota D v sérech odebraných 0, 1, 3, 6 a 12 hodin po *i.p.* aplikaci trypsinu. *P≤0,05 vztaženo k času 0 (zdravé myši před podáním trypsinu).

V grafu (obr. 9) můžeme pozorovat, že hodnota D, která vypovídá o celkové inhibiční kapacitě, opět poklesla. Tento jev chápeme jako důsledek odstraňování komplexů α2-makroglobulinu+proteáza (viz výše), který nedokázal být v tomto krátkém časovém intervalu kompenzován syntézou nového α2-makroglobulinu, ani jiných sérových inhibitorů.

4.4.2. Fluorimetrické měření, stanovení parametru A

U odebraných sér bylo provedeno také měření fluorimetrickou metodou. V grafu (obr. 10) můžeme pozorovat, že bylo prokázáno tvrzení v experimentu 1, *i.p.* aplikace se projevila jako velmi účinná metoda aplikace trypsinu. K největšímu vzestupu aktivity séra dochází během 6h po podání trypsinu.

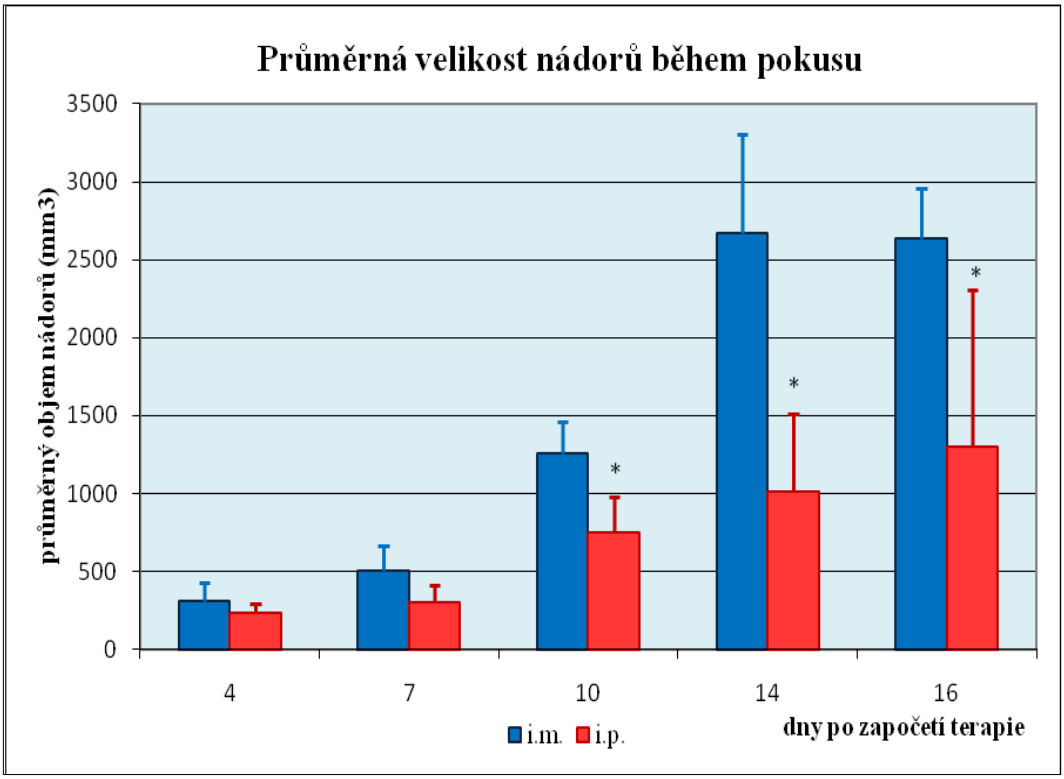


Obr. 10 Hodnota A v sérech odebraných po 0, 1, 3, 6 a 12 hodinách myším, kterým byl *i.p.* aplikován trypsin. *P≤0,005 vztaženo ke času 0 (zdravé myši před podáním trypsinu).

4.5. Experiment 3: Porovnání terapie *i.p.* a *i.m.* cestou *in vivo*

Experiment 1 a 2 naznačily, že *i.p.* aplikace je nejlepší cestou pro vstřebávání proteáz. Zmíněné experimenty byly z důvodu snažší detekce provedeny s aktivními enzymy. Předpokládali jsme, že je toto tvrzení platné i pro vstřebávání proenzymů, tedy pro proenzymoterapii. Byl proveden předběžný pokus, ve kterém byl srovnáván dosud používaný *i.m.* způsob aplikace proenzymů (Kaiserová 2008, Kalferstová 2008) s aplikací *i.p.* způsobem. Nádory byly během experimentu pravidelně měřeny pomocí kaliperu. Z hodnot

získaných naměřením velikosti nádorů byly vypočítány průměrné objemy nádorů v jednotlivých skupinách, které jsou zaznamenány v grafu (obr. 11).



Obr. 11 Průměrná velikost nádorů v jednotlivých skupinách během terapie. * P≤0,05.

Z grafu (obr. 11) je patrné, že výsledky fluorimetrického měření (viz experiment 1,2) korelují s *in vivo* pozozorováním. U myší ve skupině, kde byly proenzymy aplikovány *i.p.* cestou narůstaly nádory mnohem pomaleji. Průměrná velikost jejich nádorů byla v porovnání s velikostí nádorů u myší, kterým byla aplikována proenzymová směs *i.m.* cestou daleko menší. K takto velkým rozdílům došlo i přes to, že obě skupiny byly léčeny proenzymovou směsí o stejné koncentraci. Je zřejmé, že aplikace proenzymů *i.p.* cestou zaručuje rychlejší a účinnější vstřebávání této směsi a poskytuje lepší terapeutické výsledky, nežli aplikace proenzymů *i.m.* cestou, v naší laboratoři do této doby používanou. Experimenty týkající se vstřebatelnosti enzymů u jednotlivých způsobů podání nás tudíž přivedly k lepším terapeutickým výsledkům.

4.6. Experiment 4: Stanovení parametrů A, B a D u sér myší kmene BALB/c s velmi vyvinutými nádory sarkomu S-180

V pokusu bylo použito 6 bílých myší, samic BALB/c. Třem myším byly aplikovány buňky sarkomu S-180, zbylé tři myši byly ponechány jako čisté, kontrolní.

80. den pokusu bylo všem myším odebráno sérum. U nádorových myší byl vypočítán objem jejich nádorů. Odebraná séra byla měřena pomocí fluorimetrické a fotometrické endpoint metody (titrace séra trysinem), tedy metod pro zjištění parametrů A, B a D. Veškeré hodnoty jsou uvedeny v Tab II.

Tab II Průměrné hodnoty A, B a D s jejich SD u sér myší s rozvinutým sarkomem S-180 a u zdravých myší. Pro srovnání je v tabulce zařazena velikost nádorů.

	Nádorové myši	**Čisté myši**
A (ngT/ml)	8124, 95±1244,2	10557,7±2335,9
B (ΔA410)	0,244±0,057	0,497±0,194
D (μg T)	3,073±1,117	3,933±0,94
Velikost nádoru 80. den pokusu (mm^3)	1284,4±283,72	0

V tabulce (Tab. II) můžeme pozorovat mírný pokles hodnoty A (celková aktivity séra) u nádorových myší oproti čistým.

Z výsledků je patrné, že u nádorových myší se hodnota B zmenšila průměrně o ½ v porovnání s hodnotou B u čistých myší. Z toho vyplývá, že hodnota α2-makroglobulinu se u nádorových myší snížila, tento rozdíl však nedosáhl statistické významnosti. I přes to, že sérum bylo odebráno 80. den pokusu, kdy byly myši již zcela vyčerpané nátlakem nemoci, byla tato hodnota (množství inhibitorů a α2-makroglobulinu) snížena pouze o ½, z čehož vyvozujeme, že nádory nevyčerpaly inhibiční kapacitu séra, a to ani v případě takovéto extrémnosti nemoci.

Hodnota D (celková inhibiční kapacita séra) se v rámci nádorových a čistých myší nijak zvlášť nelišila. Přítomnost sarkomu u myší BALB/c neměla na hodnotu parametru D vliv.

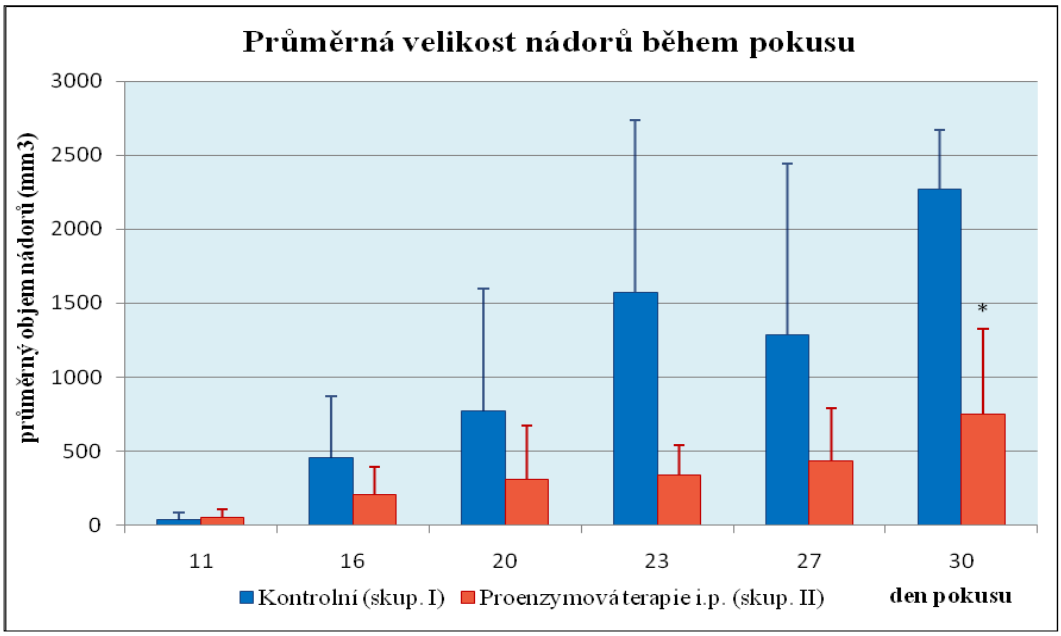
4.7. Experiment 5: Vliv proenzymoterapie na parametry séra (A, B a D) a hladiny volného/vázaného TGF-β u zdravých a nádorových (melanom B16-F10) myší kmene C57BL/6

V experimentu bylo použito celkem 30 myší, samic C57Bl/6. Myši byly rozděleny do čtyř skupin. Skupina I a II zahrnovala vždy 9 myší s melanomem C57Bl/6, skupina III a IV zahrnovala vždy 6 čistých myší. Myším ve skupinách II a III byly podávány proenzymy (*i.p.*), myším ve skupinách I a IV byl podáván fyziologický roztok (*i.p.*). Během pokusu se pozoroval vliv terapie na velikost nádorů. Den před počátkem pokusu (den nula) bylo odebráno sérum ze tří zdravých ničím neovlivněných myší. Jedenáctý den pokusu byla započata léčba podáváním proenzymů a fyziologického roztoku. Devatenáctý a třicátý den pokusu bylo odebráno sérum vždy ze tří myší v každé skupině. Všechna séra byla měřena pomocí fotometrické (endpoint, titrace séra trypsinem) a fluorimetrické metody, dále zde byla zjišťována hladina TGF-β pomocí ELISA kitu.

4.7.1. Vliv terapie na velikost nádorů

Během pokusu probíhalo dvakrát týdně měření nádorů ve skupinách I a II. Z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádorů u jednotlivých myší a z těchto velikostí průměrná hodnota objemu nádorů ve skupině.

Průměrné objemy nádorů myší v jednotlivých skupinách byly vyneseny do grafu (obr. 12).

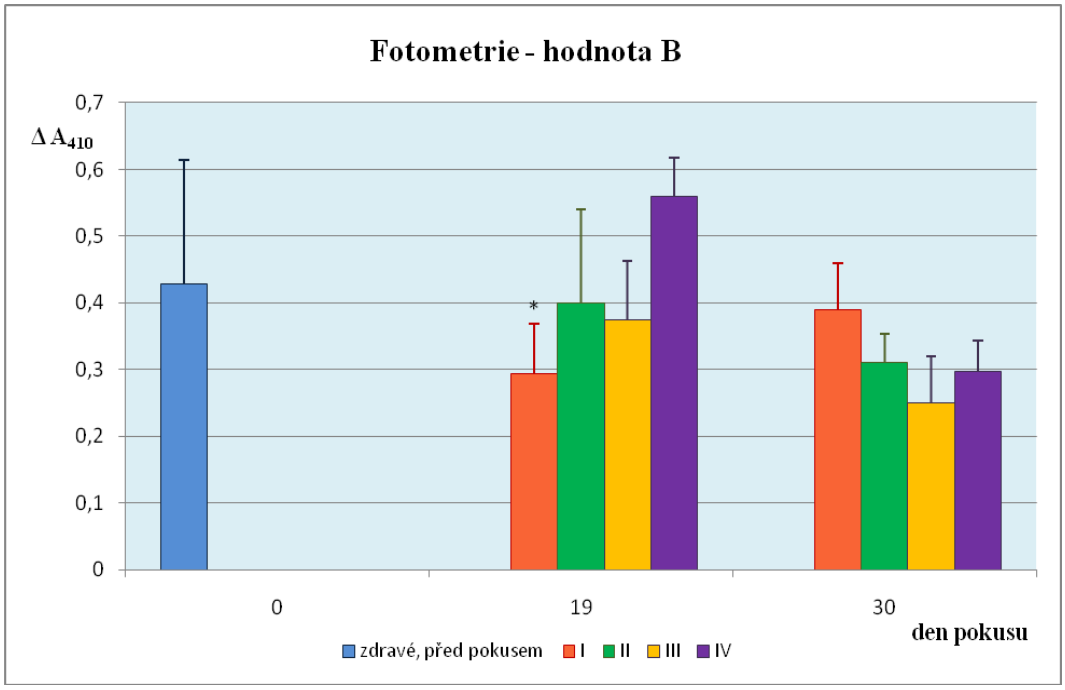


Obr. 12 Porovnání velikosti nádorů ve skupině I (nádorové myši, kterým byl *i.p.* aplikovaný fyziologický roztok) a ve skupině II (nádorové myši, kterým byla *i.p.* aplikována proenzymová terapie). 11 den = den počátku terapie. * P≤ 0,05.

Z grafu (obr. 12) vyplývá, že růst nádorů byl proenzymovou terapií v průběhu experimentu inhibován. Třicátý den pokusu (devatenáctý den terapie) dosáhl rozdíl objemu nádorů mezi skupinami I (fyziologický roztok) a II (proenzymová směs) statistické významnosti, P≤0,05.

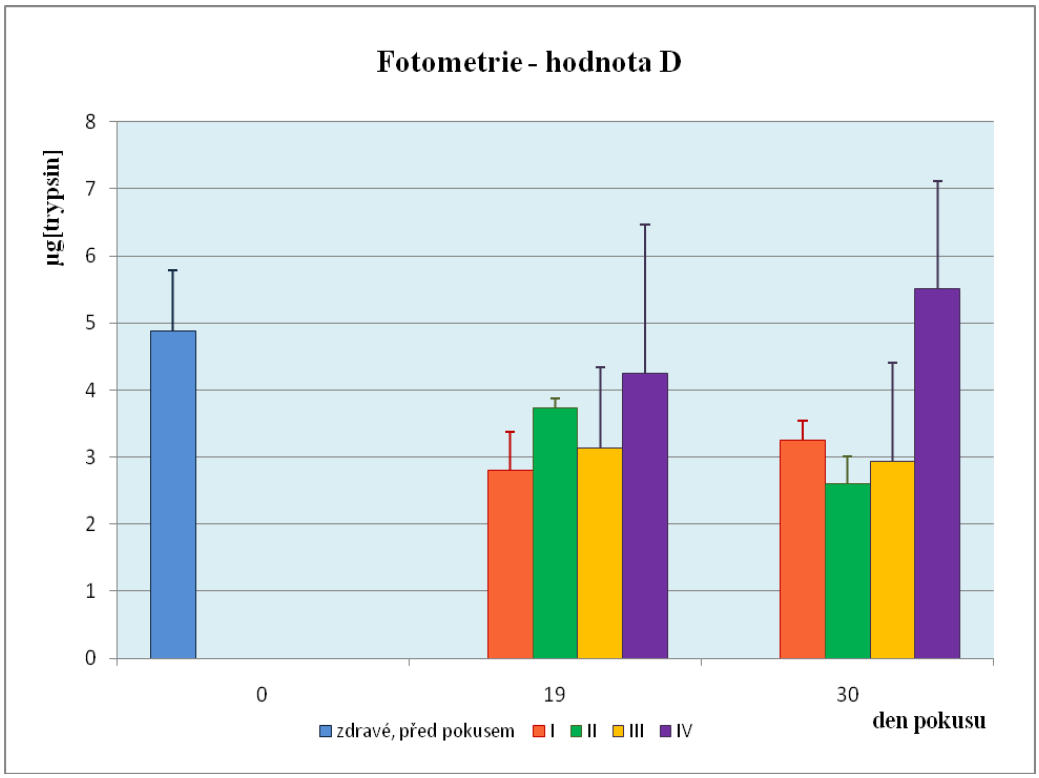
4.7.2. Fotometrické měření endpoint metodou, stanovení parametrů B, D

Během pokusu byla v časové dynamice odebírána séra myší z jednotlivých skupin. První séra byla odebrána ze zdravých myší před zahájením pokusu (den nula), dále potom v 19. a 30. den, vždy po třech myší z každé skupiny. Odebraná séra byla měřena fotometrickou endpoint metodou (titrace séra trypsinem). Z naměřených hodnot byly zhotoveny grafy, ze kterých se odečetly hodnoty B a D. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafů (obr. 13, obr. 14).



Obr. 13 Hodnota B u jednotlivých skupin v průběhu pokusu. Světle modře je vyznačen stav před pokusem (zdravé myši), dále I – melanom B16F10 + *i.p.* fyziologický roztok, II – melanom B16F10 + *i.p.* proenzymová směs, III – čisté myši + *i.p.* proenzymová směs, IV – čisté myši + *i.p.* fyziologický roztok. * P≤0,05, vztaženo ke skupině IV stejný den.

Z grafu (obr. 13) můžeme pozorovat stabilitu parametru B (celková hladina α2-makroglobulinu). Statisticky významný pokles hladiny α2-makroglobulinu u nádorových neléčených myší z 19. dne se během experimentu stabilizoval a bylo dosaženo normálních hodnot. Ostatní změny nebyly statisticky významné.

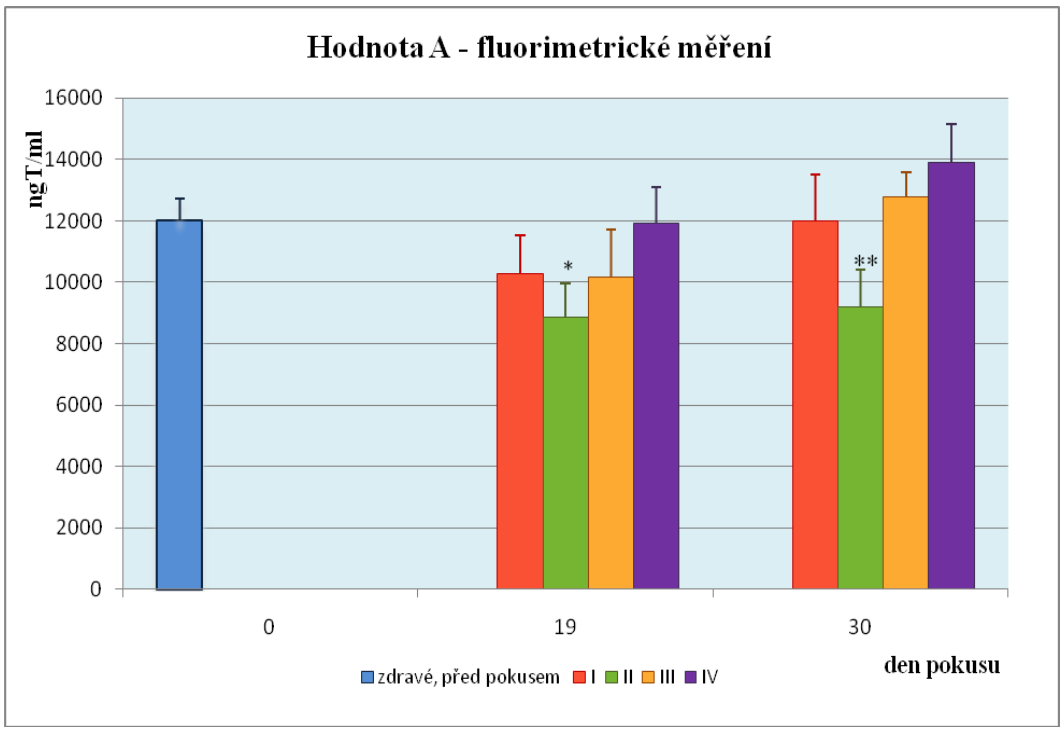


Obr. 14 Hodnota D u jednotlivých skupin v průběhu pokusu. Světle modře je vyznačen stav před pokusem (zdravé myši), dále I – melanom B16F10 + *i.p.* fyziologický roztok, II – melanom B16F10 + *i.p.* proenzymová směs, III – čisté myši + *i.p.* proenzymová směs, IV – čisté myši + *i.p.* fyziologický roztok.

Z grafu (obr. 14) je patrné, že rozdíly parametru D v jednotlivých skupinách nebyly statisticky významné, tudíž přítomnost nádorů ani aplikace proenzymové směsi zásadním způsobem neovlivnily celkovou inhibiční schopnost séra.

4.7.3. Fluorimetrické měření, stanovení parametru A

Všechna odebraná séra byla měřena pomocí fluorimetrické metody. Z naměřených hodnot poté bylo pomocí kalibrační křivky vypočítáno množství trypsinu ve vzorku. Hodnoty byly vyneseny do grafu (obr. 15).



Obr. 15 Hodnota A v průběhu pokusu u jednotlivých skupin. Světle modře je vyznačen stav před pokusem (zdravé myši), dále I – melanom B16F10 + *i.p.* fyziologický roztok, II – melanom B16F10 + *i.p.* proenzymová směs, III – čisté myši + *i.p.* proenzymová směs, IV – čisté myši + *i.p.* fyziologický roztok. * P≤0,05 vztaženo ke skupině IV (tentýž den), ** P≤0,01 vztaženo ke skupině III i IV (tentýž den).

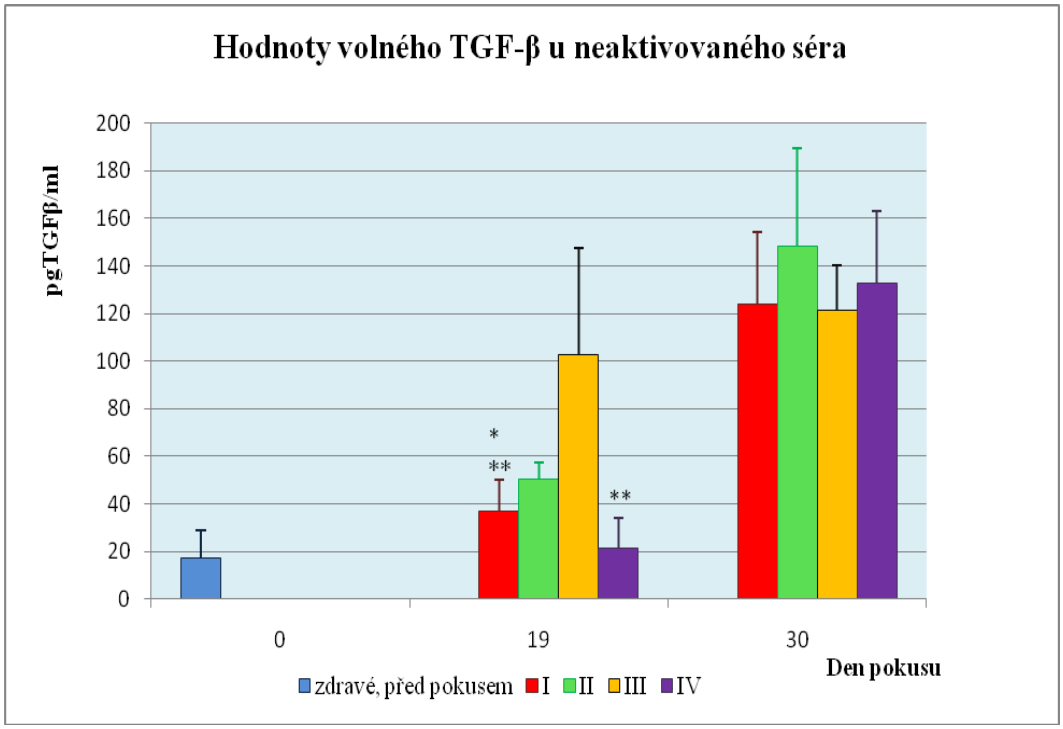
Z grafu (obr. 15) můžeme pozorovat určitý pokles hodnoty A (sérové proteázové aktivity) u myší s nádorem pod vlivem proenzymoterapie. Toto pozorování chápeme jako důsledek toho, že po aplikaci proenzymů nádorovým myším dochází k tvorbě komplexů α2-makroglobulin+proteázy+cytokiny (zejména TGF-β a IL-10). Tyto komplexy jsou pravděpodobně rychle odstraňovány z oběhu.

Ostatní změny parametru A v jednotlivých skupinách nebyly významné.

4.7.4. ELISA test, stanovení TGF-β v séru

U všech sér odebraných v den nula (zdravé neléčené myši), a dále u sér odebraných z myší ze všech skupin devatenáctý a třicátý den bylo provedeno měření množství TGF-β pomocí ELISA kitu. Séra byla měřena dvěma způsoby, první metoda spočívala v aktivování séra kyselinou, kdy dochází k rozpadnutí komplexů α2M+proteáza+cytokin nacházejících se v séru a uvolnění TGF-β v nich navázaného. Druhým způsobem bylo měření neaktivovaných sér, kdy bylo měřeno množství volného TGF-β, které se nachází v séru. Z naměřených hodnot bylo pomocí kalibrační křivky vypočítáno množství TGF-β, které bylo

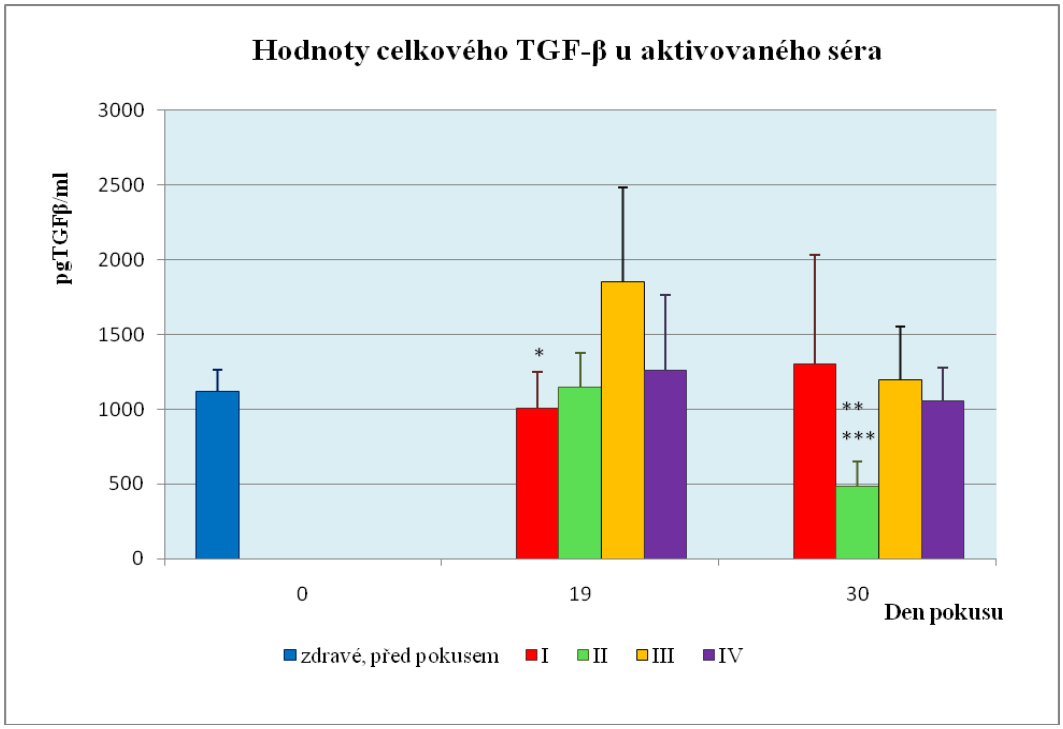
následně přepočítáno na pgTGF-β/ml séra. Jednotlivé hodnoty byly zaznamenány do dvou grafů, neaktivované sérum (obr. 16) a aktivované sérum (obr. 17).



Obr. 16 Hodnoty volného TGF-β (sérum neaktivované kyselinou). Světle modře je vyznačen stav před pokusem (zdravé myši), dále I – melanom B16F10 + *i.p.* fyziologický roztok, II – melanom B16F10 + *i.p.* proenzymová směs, III – čisté myši + *i.p.* proenzymová směs, IV – čisté myši + *i.p.* fyziologický roztok. * P≤0,05 vztaženo ke skupině II (tentýž den), ** P≤0,05 vztaženo ke skupině III (tentýž den).

Z grafu (obr. 16) vyplývá značná rozkolísanost hodnot volného TGF-β v séru mezi jednotlivými skupinami. Třicátý den pokusu se jednotlivé hodnoty poměrně vyrovnaly.

Rozkolísanost hodnot pozorovaná 19. den je těžko vysvětlitelná. Je otázkou, do jaké míry tento způsob stanovení volného TGF-β odráží poměry v séru, zejména vazbu na α2-makroglobulin a způsob této vazby (TGF-β je vázán jak aktivovaným tak neaktivovaným α2-makroglobulinem, také je možno předpokládat určitou vazbu na jiné proteiny). Výpovědní hodnota tohoto stanovení o tom, co se děje v séru se zdá být sporná.



Obr. 17 Hodnoty celkového TGF-β v séru (aktivované kyselinou). Světle modře je vyznačen stav před pokusem (zdravé myši), dále I – melanom B16F10 + *i.p.* fyziologický roztok, II – melanom B16F10 + *i.p.* proenzymová směs, III – čisté myši + *i.p.* proenzymová směs, IV – čisté myši + *i.p.* fyziologický roztok. *P≤0,05 vztaženo ke skupině III (tentýž den), **P≤0,005 vztaženo ke skupinám III a IV (tentýž den), ***P≤0,05, vztaženo ke skupině I (tentýž den).

Z grafu (obr. 17) vyplývá relativní stabilita celkového TGF-β u zdravých myší, kolísání hladiny TGF-β u nádorových neléčených myší a pokles TGF-β u nádorových proenzymoterapií léčených myší v období ke konci experimentu.

Pokles TGF-β u nádorových neléčených myší 19. den není velký a jeho signifikantnost je irelevantní, neboť existuje pouze ve skupině III, která není považována za vhodnou kontrolu. Logickým se zdá být jeho nárůst 30. den, neboť nádory, které dosáhly velkých rozměrů se pomocí tohoto cytokinu brání imunologickému ataku. Naproti tomu vlivem proenzymoterapie je TGF-β vázán a odstraňován z oběhu, tudíž jeho celkové množství dosáhlo 30. den minimální hodnoty. Rovněž tak, jak vyplývá z grafu (obr. 17), byly nádory ve skupině léčené proenzymovou směsí v porovnání se skupinou s neléčenými nádory výrazně menší. Přestože terapie začala působit velmi rychle po jejím započetí, změny na úrovni TGF-β jsou v séru pozorovatelné až později.

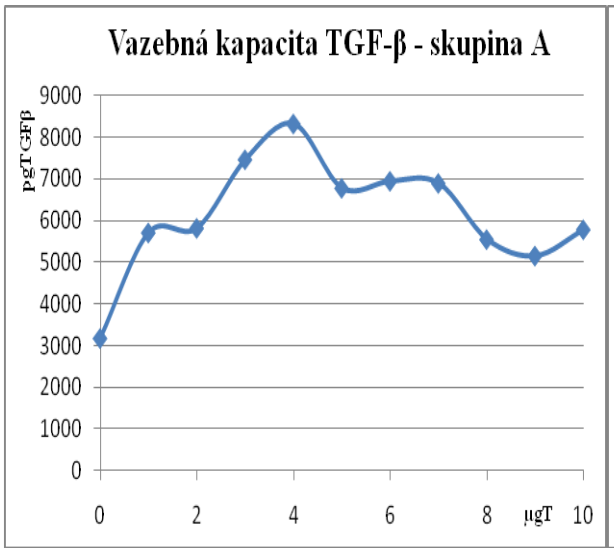
4.8. Experiment 6: Měření hladiny TGF-β ELISA testem a zjišťování kapacity séra pro vazbu tohoto cytokinu

V tomto experimentu bylo použito 80 samic C57BL/6. Myši byly rozděleny do čtyř skupin po dvaceti: A – čisté myši, B – nádorové neléčené myši, C – nádorové myši, léčené *i.p.* cestou proenzymy a skupina D – nádorové myši léčené *i.m.*. aplikací proenzymů. Všem myším bylo sérum odebráno 33. den pokusu (= 22. den terapie). U všech skupin byla měřena vazebná kapacita TGF-β v séru. K měření byly použity pooly sér (alikvoty ze všech myší v dané skupině). Toto měření bylo součástí kolektivního pokusu, kde byly porovnávány režimi aplikace proenzymové směsi ve větších skupinách.

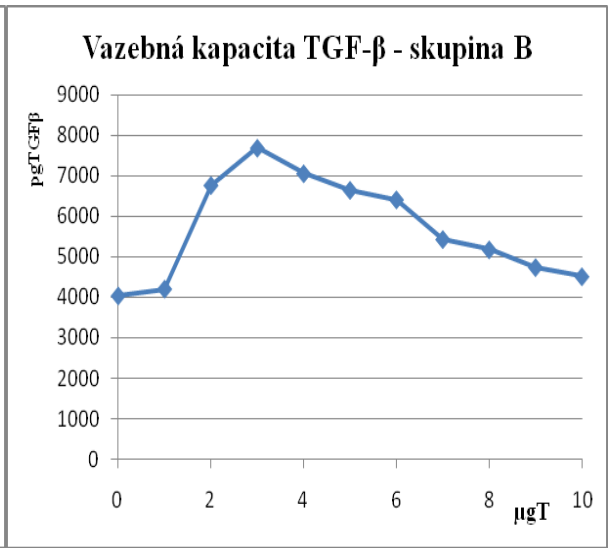
4.8.1. Vazebná kapacita TGF-β: titrace + ELISA test

U všech odebraných sér v tomto pokusu byla provedena titrace trypsinem, za následného nadbytku TGF-β. Po titraci bylo množství TGF-β měřeno pomocí ELISA testu. Z naměřených hodnot bylo pomocí kalibrační křivky vypočítáno množství TGF-β, které se následně přepočítalo na pgTGF-β/ml séra. Naměřené hodnoty jednotlivých titračních křivek byly zaznamenány do grafů I (vazebná kapacita TGF-β u poolu sér ze skupiny A), II (vazebná kapacita TGF-β u poolu sér ze skupiny B) III (vazebná kapacita TGF-β u poolu sér ze skupiny C) a IV (vazebná kapacita TGF-β u poolu sér ze skupiny D), (obr. 18).

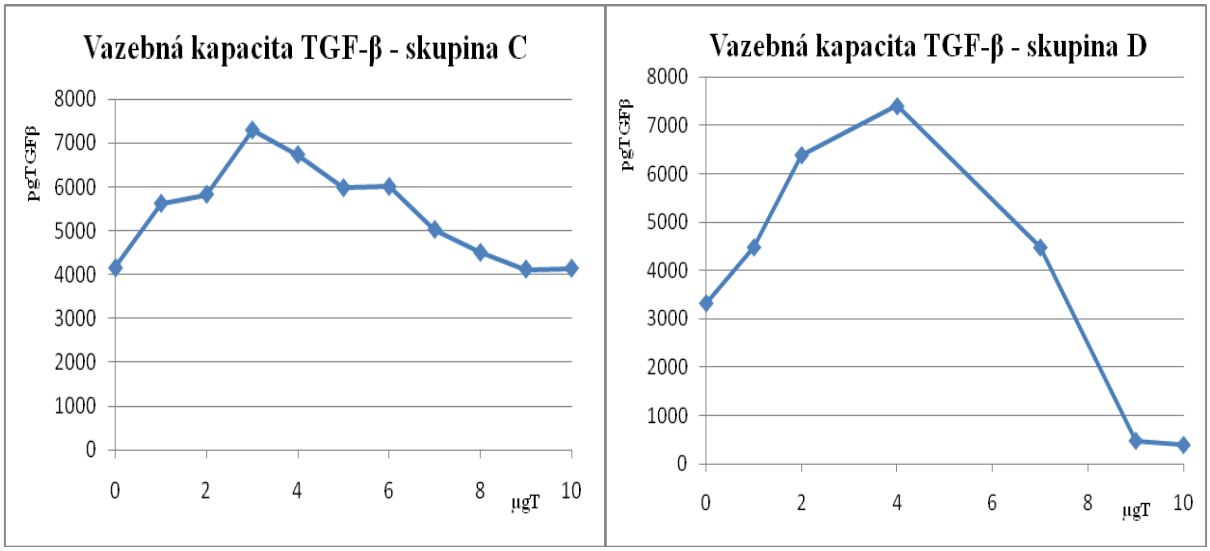
I



II



III **IV**



Obr. 18 Grafy s výslednými hodnotami u titrace séra trypsinem v nadbytku TGF-β u jednotlivých skupin: A, B, C a D.

Z grafů (obr. 18) můžeme pozorovat, že titrace séra trypsinem, s následnou inkubací TGF-β měla obdobný průběh ve všech skupinách. Hodnota TGF-β v séru se stoupajícím množstvím trypsinu nejprve stoupala, a po dosažení určitého bodu začala zpátky klesat. Toto pozorování bylo v rozporu s naším očekáváním, což bude diskutováno dále. V tomto případě jde o volný TGF-β, sérum nebylo při měření metodou ELISA kyseleno.

Situace v séru je zřejmě mnohem složitější, než jsme předpokládali. Očekávali jsme, že aktivací α2-makroglobulinu bude narůstat jeho vazebná kapacita pro TGF-β, což povede ke snižování jeho volné hladiny. Tato hladina je však v séru velmi nízká, jak můžeme pozorovat v grafech (obr. 16 a 17). Většina TGF-β je již vázána a i po přidání poměrně značného množství tohoto cytokinu se většina naváže. TGF-β může být vázán na neaktivovaný α2-makroglobulin (Crookston a spol., 1993), aktivovaný α2-makroglobulin (Philip a spol., 1991) a nemůžeme vyloučit ani vazbu na jiné proteiny. Přídavek enzymů sice zvýšil podíl aktivovaného α2-makroglobulinu a tím upevnil jeho vazbu s TGF-β, ovšem napohled se tyto změny nemusí nutně projevit většími výkyvy u hladiny volného TGF-β. Z počátku tomu je dokonce naopak, jak můžeme pozorovat v grafu (obr. 18). Z tohoto zjištění vyvozujeme, že pro posouzení schopnosti séra vázat v průběhu proenzymové terapie TGF-β se jako nejvýhodnější jeví vycházet z celkové hladiny α2-makroglobulinu (hodnota B), případně z možností jeho další aktivace (B=A, tedy hodnota C).

5. Diskuze

Z důvodu přehlednosti byly některé důležité poznatky již diskutovány v předchozí kapitole.

Pro charakteristiku inhibičních parametrů séra se jako nejvhodnější ukázala metoda titrace séra trypsinem založená na fotometrickém endpoint stanovení trypsinu. Touto metodou je možné zjistit celkovou inhibiční schopnost séra (parametr D) i získat představy o množství α2-makroglobulinu v séru (parametr B). Celková inhibiční schopnost je dána součtem inhibičních vlastností α2-makroglobulinu, α1-antitrypsinu, contrapsinu, elastinu, antitrombinu III a α2-antiplasminu, které mají v rejstříku působení též trypsin. Dosažení celkové inhibiční kapacity séra bylo indikováno vždy prudkým zlomem na titrační křivce. Aktivity naměřené do tohoto zlomového bodu jsou spojeny s faktem, že po interakci s α2-makroglobulinem je trypsin uzavřen ve struktuře podobné pasti, ve které si zachovává schopnost vyvíjet aktivitu vůči substrátům nižší molekulové hmotnosti (do 6000Da).

Nemůžeme se ovšem domnívat, že naměřená aktivita komlexu α2-makroglobulin+trypsin je identická s aktivitou pohlceného trypsinu. Nelze vyloučit určité stérické zábrany průchodu substrátu, otázky difuze substrátu nebo produktu a jiné interakce nekovalentního charakteru. Přesto se však domníváme, že naměřená hodnota B koreluje s množstvím α2-makroglobulinu, kdy přinejmenším změny tohoto parametru mohou odrážet skutečné přeměny hladiny tohoto inhibitoru.

Parametr A dosahoval při fotometrickém měření velmi nízkých hodnot, tudíž k jeho stanovení bylo nutno zavést mnohem citlivější fluorescenční metodu. Tento parametr odráží původní proteázovou aktivitu séra, tedy množství převážně trypsinu, a částečně také proteáz s obdobnou schopností rozložit substrát, navázaných v α2-makroglobulinové pasti. Fluorimetricky zjišťovaný parametr A nám velmi posloužil při studiu vstřebatelnosti proteáz.

Parametr C (množství aktivovatelného α2-makroglobulinu, výsledek rozdílu hodnot B-A) jsme se vzhledem k velmi nízkým hodnotám A (naměřených při fotometrii) rozhodli nepoužívat.

Aplikace poměrně velkého množství trypsinu různými cestami ukázala na řadu zajímavých skutečností. Velmi pozoruhodný byl nový poznatek o vstřebatelnosti trypsinu. Byla zjištěna praktická nefunkčnost perorálního podání, což zpochybňuje používání preparátů obsahujících proteázy nabízené různými firmami (u nás např. Wobe-Mucos), které by měly být účinné proti řadě nemocí včetně nádorových onemocnění. Byla zjištěna velmi dobrá vstřebatelnost trypsinu při jeho aplikaci *i.p.* cestou. Tato aplikace se ukázala

jako účinnější i v porovnání s *i.m.* aplikací, dosud používanou v naší laboratoři, případně *s.c.* aplikací užívanou v experimentech Novákem a Trnkou (2005). Na základě těchto pozorování byl navržen experiment založený na srovnání účinku proenzymového preparátu podávaného *i.p.* a *i.m.* na růst melanomu B16-F10. Experiment potvrdil výrazně lepší účinek *i.p.* aplikace. Následný pokus provedený na větších souborech (po dvaceti myších) znovu prokázal výborný účinek této aplikace (připravovaná diplomová práce Hany Maršíkové). Vstřebatelnost byla testována na trypsinu, avšak v následných experimentech byla aplikována proenzymová směs založená na trypsinogenu a chymotrypsinogenu. Nicméně naše závěry o vstřebatelnosti odvozené z experimentů s trypsinem dobře korelovaly s terapeutickými výsledky pozorovanými u podávání proenzymové směsi.

Parametr B má po aplikaci trypsinu tendenci krátkodobě poklesnout, což si vysvětlujeme pohlcením a odstraněním komlexů α2-makroglobulin+proteáza+cytokiny. Tento jev zřejmě zapříčinil i pokles celkové inhibiční schopnosti séra (parametr D). V průběhu experimentu se hodnoty obou parametrů stabilizovaly a v dlouhodobém horizontu se už dále nijak významně neměnily. Stabilita parametru B, tedy hladina α2-makroglobulinu, je dobrou zprávou pro proenzymovou terapii. Svědčí o značné stabilitě systému, jelikož ani jeho dlouhodobé zatěžování proteázami v rámci proenzymoterapie, a stejně tak ani jeho zatěžování proteázami produkovanými nádorem hladinu α2-makroglobulinu nijak neovlivní. Díky tomu je v systému dostatek aktivovatelných molekul α2-makroglobulinu schopných vychytávat nádor maskující cytokiny, zejména TGF-β. Stabilita celkové inhibiční aktivity svědčí o neměnné syntéze ostatních inhibitorů, které by jinak kompetovaly o vazbu trypsinu. Tato kompetice mezi inhibitory by snížila účinnost proenzymoterapie, která je založená na aktivaci α2-makroglobulinu trypsinem a chymotrypsinem (předpokládáme aktivaci proenzymů v místě nádorů, viz výše).

Úvahy o stabilitě parametrů B a D byly získány v experimentech využívajících aplikaci trypsinu zdravým myším. Pro ověření bylo uskutečněno několik experimentů s využitím myších nádorových modelů. Základním byl experiment založen na modelu myší kmene C57BL/6 nesoucích melanom B16-F10. V tomto experimentu byl pozorován přechodný a nepříliš výrazný pokles parametru B u neléčených myší a stabilita tohoto parametru u myší léčených proenzymoterapií. Parametr D byl stabilní u nádorových léčených i neléčených myší. Druhým užitým modelem byly myši kmene BALB/c nesoucí sarkom S-180. V tomto experimentu bylo u velmi pozdního neléčeného stádia zjištěno snížení α2-makroglobulinu (nicméně statisticky nevýznamné) a stabilita parametru D. Můžeme konstatovat, že α2-makroglobulin je pravděpodobně vždy přítomen v dostatečné koncentraci. Tudíž

předpokládáme, že o tento inhibitor můžeme v průběhu vývoje onemocnění opřít protinádorovou terapii založenou na jeho aktivaci proteázami. Bylo zjištěno, že se kompetice ostatních inhibitorů o proteázy během vývoje léčeného či neléčeného nádorového onemocnění nemění. Obdobný závěr o nepříliš dramatických změnách v hladinách α2-makroglobulinu a v hladinách ostaních proteázových inhibitorů během vývoje proenzymově léčeného i neléčeného nádorového onemocnění byl prokázán i v připravované bakalářské práci Ireny Bartoňové, která hladinu jednotlivých proteázových inhibitorů stanovovala pomocí hmotnostní spektrometrie. Tato stabilita systému je dobrou zprávou pro nádorové terapie, které jsou založené na použití proteáz. Pro její optimalizaci na této úrovni není třeba přijmout žádná opatření.

Tvrzení o neměnnosti ostatních inhibitorů proteáz v důsledku terapie nádorů proenzymy, ani v důsledku aplikace značných dávek trypsinu, je důležité pro uvažovanou proenzymoterapii, která je pravděpodobně terapií imunomodulační (potvrzeno studiem imunodeficientních myší v připravované diplomové práci Pavlíny Kaiserové). Tyto výsledky bohužel plně vyvracejí naše úvahy o možném ochromení nádorové invazivity indukcí sérových proteázových inhibitorů.

Konečným efektem aktivovaného α2-makroglobulinu je pravděpodobně pohlcování cytokinů, kterými se nádor snaží navodit svoji imunotoleranci (zejména TGF-β). Pokusili jsme se studovat tuto vazebnou schopnost α2-makroglobulinu přímo, v *in vitro* podmínkách. Titrování sérového α2-makroglobulinu založené na měření volného TGF-β však nepřineslo hledané výsledky, pravděpodobně z důvodu komplexnosti systému, jak již bylo uvedeno. Užitečnějším pro monitorování léčby se ukázalo stanovení celkového TGF-β v séru. Nicméně i toto stanovení se vzhledem k existenci těžko podchytitelných systémů odstraňujících komlexy α2-makroglobulin+proteáza+cytokiny (Lillis a spol., 2005) jeví pouze jako doplňkové. Domníváme se, že lepší představu o poměrech panujících v séru včetně jeho potenciálu vázat cytokiny je možno získat z titrace založené na fotometrii případně doplněné fluorimetrickým stanovením proteolytických aktivit.

6. Souhrn

- Na principu titrace séra trypsinem s endpoint fotometrickým měřením byl vypracován systém pro analýzu inhibičních parametrů séra odrážející zejména hladinu α2-makroglobulinu.

- Byla zavedena citlivá fluorimetrická metoda detekce proteázových aktivit séra.

- Mezi myším a lidským sérem byly zjištěny rozdíly v poměru afinit α2-makroglobulinu a ostatních inhibitorů k trypsinu.

- Po provedení srovnávacího experimentu ve vstřebávání trypsinu různými cestami podání byla zjištěna jako nejúčinnější aplikace *i.p.* cesta. Tento závěr vedl k optimalizaci účinnosti proenzymové terapie.

- Byla zjištěna dostatečná stabilita hladin α2-makroglobulinu v séru proezymoterapií léčených i neléčených nádorových myší, což dává předpoklady pro použití této terapie prakticky v kterémkoli okamžiku vývoje nádorového onemocnění.

- Stabilní hladina ostatních proteázových inhibitorů byla potvrzena, což vylučuje možnost jejich kompetice a rušení proenzymové terapie**.**

- Byla sledována hladina TGF-β v séru proenzymoterapií léčených i neléčených nádorových myší. U léčených myší došlo k jeho poklesu, ovšem tento jev byl pozorován až po delší aplikaci proenzymoterapie.

7. Seznam použité literatury

Abe K., Yamamoto K., Sinahora 1989: Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and alpha-macroglobulin. J.Biochem. 106: 564-568.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998: Základy buněčné biologie, nakl. Espero Publishing, s. r. o.: 587-589.

deAlbuquerque-Cavalcanti Ch., García-Carreño F., Navarrete del Toro M.A. 2002: Trypsin and trypsin inhibitors from penaeid shrimp. Journal of Food Biochemistry 26: 233-251.

Asplin I. R., Wu S. M., Mathew S., Bhattacharjee G., Pizzo S. V. 2001: Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by alpha(2)-macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2-induced angiogenesis. Blood 97 (11): 3450-3457.

Beard J. 1905: The cancer problem. Lancet 4: 281-283.

Beard J. 1911: The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis. London, Chatto and Windus.

Becker Ch., Fantini M.C., Neurath M.F. 2006: TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. Cytokine and growth factor reviews 17: 97-106.

Bhattachajree G., Gron H., Pizzo S.V. 1999: Incorporation of non-proteolytic proteins by murine α2-macroglobulin. Biochemica et Biophysica Acta 1432: 49-56.

Bhattacharjee G., Asplin I. R., Wu S. M., Gawdi G., Pizzo S. V. 2000: The conformation-dependent interaction of alpha 2-macroglobulin with vascular endothelial growth factor. A novel mechanism of alpha 2-macroglobulin/growth factor binding. J Biol Chem. 275: 26806-26811.

Birkenmeier G., Stigbrand T. 1993: Production of conformation – specific monoclonal antibodies against alpha 2 macroglobulin and their use for quantitation of total and transformed alpha 2 macroglobulin in human blood. J Immunul Methods 162: 59-67.

Birkenmeier G., Kampfer I., Kratzsch J., Schellenberger W. 1998: Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognized by the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Eur J Endocrinol 139: 224-230.

Borth W., Luger T. A. 1989: Identification of alpha 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 beta to "F" alpha 2-macroglobulin. J Biol Chem.264: 5818-5825.

Boyd F.T., Massague J. 1989: Transforming growth factor beta inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kD membráně receptor. J. Biol. Chem. 264: 2272-2278.

Crookston K.P., Webb D.J., LaMarre J., Gonias S.L. 1993: Binding of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 to alpha 2-macroglobulin in vitro and in vivo: comparison of receptor-recognized and non-recognized alpha 2-macroglobulin conformations. Biochem J 293: 443-450.

Crookston K.P., Webb D.J., Wolf B.B., Gonias S.L. 1994: Classification of α2-macroglobulin-Cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. J.Biol. Chem. 269: 1533-1540.

Deodhar S.D. 1971: Enhancement of metastases by L-Asparaginase in a Mouse tumor system. Nature 231: 319-321.

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

Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. 1961: The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95: 271-278.

Feige J. J., Negoescu M., Keramidas M., Souchelnitskiy S. a Chambaz E. M. 1996: Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor – beta and various cytokines. Horm Res 45: 227-232.

Finke J. H., Bukowski R. M. 2004: Cancer immunotherapy at the crossroads how tumors evade immunity and what can be done. Humana Press, Towora, New Jersey, 386 pp.

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

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.

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

Gewert K., Holowachuk S. A., Rippe C., Gregory P. C., Erlanson-Albertson C., Olicecrona G., Kruszewska D., Piedra J. V., Westrom B., Pierzynnowski S. G. 2004: 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.

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

Gouin-Charnet A., Laune D., Granier C., Mani J. C., Pau B., Mourad G., Argiles A. 2000: Alpha2-macroglobulin, the main serum antiprotease, binds beta2-microglobulin, the light chain of the class I major histocompatibility komplex, which is involved in human disease. Clin Sci Colch 98: 427-433.

Hall S.W., LaMarre J., Marshall L.B., Hayes M.A., Gonias L. 1998: Binding of transforming growth factor-β1 to methylamine-modiffied α2-macroglobulin and to binary and tenary α2-macroglobulin-proteinase complexes. Biochem. J. 281: 569-575.

Harthun N.L., Weaver A.M., Brinckerhoff L.H., Deacon D.H., Gonias S.L., Slinhhuff C.L. JR. 1998: Activated alpha 2-macroglobulin reverses the immunosuppressive activity in human breast cancer cell-conditioned medium by selectively neutralizing transforming growth factor-beta in the presence of interleukin-2. J Immunother. 21: 85-94.

Hill R.E., Shaw P.H., Boyd P.A., Baumann H., Hastie N.D. 1984: Plasma protease inhibitors in mouse and man: divergence within the reactive centre regions. Nature 311: 175-177.

Hill R.E., Hastie N.D. 1987: Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. Nature 326: 96-99.

Hovi T. Mosher D. a Vaheri A. 1977: Cultured human monocytes synthesize and secrete alpha2-macroglobulin. J. Exp. Med. 145: 1580-1589.

Howel J.B., Beck T., Bates B., Hunter M.J. 1983: Interaction of α2-macroglobulin with Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin and papain. Achieves of biochemistry and biophysics 221: 261-270.

Inaba M., Tazuko T., Fujimoto S., Sakuraiy M. K., Ohnishi Y., Ueyama Y., Nomura T. 1986: Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. Jpn J Cancer Res 77: 190-196.

James K. 1990: Interactions between cytokines and alpha 2-macroglobulin. Immunol Today 11: 163-166.

Jurga L. a kol. 2000: Klinická onkológia a radioterapie. Slovak Academic Press: 40-60.

Kaiserová 2008: Proenzymoterapie sarkomu S-180. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce 45 str.

Kalferstová 2008: Proenzymoterapie melanomu B16-F10. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce 48 str.

Kay J., Kassel B. 1971: The autoactivation of trypsinogen. J Biol Chem 246: 6661-6665.

Kim J., Modlin R. L., Moy R. L. 1995: IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas: A mechanism for evading the local T cell immune response. J Immunol155: 2240–2247.

Kobayashi H., Mobuhiko N., Sugimura M., Shinohara H., Ohi H., Terao T. 1993: Effect of membrane-associated cathepsin B on thein activation of receptor-bound prourokinase and subsequent invasion of reconstituted besement membranes. Biochem Biophys Acta 1178: 55-62.

Kopřiva F., Zápalka M. 1999: Lymfocyty Th1 a Th2 v patogenezi onemocnění. Alergie 4/99: 199-203.

Kratzsch J., Selisko T., Birkenmeier G. 1996: Transformed alpha 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein. Acta Peaditr Supp. 417: 108-110.

Krejsek J., Kopecký O. 2004: Klinická imunologie. Nucleus HK® : 541-566.

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 toalpha 2-macroglobulin in lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. J Immunol. 158: 1930-1940.

Laurell C.B., Jeppsson J.0. 1975: Protease inhibitors in plasma. The Plasma Proteins 1(Edited by Putnam F.W.), Academic Press, New York: 229-264.

Lauer Dorothea, Müller Reinhard, Cott Christiane, Otto Andreas, Naumann Manfred a Birkenmeier Gred 2001: Modulation of growth factor binding properties of α2-macroglobulin by enzyme therapy. Cancer Chemother Pharmacol 47: S4-S9.

Leipner J., Saller R. 2000: Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. Drugs 59: 769-780.

Letterio J.J., Roberts A.B. 1998: Regulation of immune responses by TGFβ. Annu Rev. Immunol. 16: 137-161.

Liebl D. J., Koo P. H. 1993: Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. Biochem Biophys Res Commun. 193: 1255-61.

Lillis AP, Mikhailenko I., Strickland DK 2005: Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. J Thromb Haemost 3: 1884-1893.

Lonberg-Holm K., Reed D.L. Roberts C.L., Damato-McCabe D 1987: Three high molecular weight proteinase inhibitor of rat plasma. Reactions with trypsin. J Biol. Chem. 262: 4844-4856.

Lysiak J.J., Hussaini I.M., Webb D.J., Glas W.F., Allietta M., Gonias S.L. 1995: α2-macroglobulin functions as a cytokine Carrier to induce nitric oxide synthesis and cause nitric oxide – dependent cytotoxicity in the RAW 264.7 Macrophage cell line. J Biol Chem 270: 21919-21927.

Matsuda T., Hirano T., Nagasawa S., Kishimoto T. 1989: Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. J Immunol 142: 148-152.

McHugh R. S., Shevach E. M. 2002: The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. J Allergy Clin Immunol 110: 693–702.

Moreau P., Adrian-Cabestre F., Menier C. 1999: IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. Int Immunol 11: 803–811.

Mosher D.F., Saksela O. a Vaheri A. 1977: A Synthesis and secretion of α2-macroglobulin by cultured adherent lung cells: comparsion with cell srains derived from other tissues. J. Clin. Invest. 60: 1036-1045.

Miyata S., Koshikawa N., Higashi S. 1999: Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture. J Biochem 125: 1067-1076.

Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. 2002: Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. Life Sci 70: 791-798.

Niemuller C. A., Randall K. J., Webb D. J., Gonias S. L., LaMarre J. 1995: Alpha 2-macroglobulin conformation determines binding affinity for activin A and plasma clearance macroglobulin complex. Endocrinology 136: 5343-5349.

Novák J. F., Trnka F. 2005: Proenzyme Therapy of Cancer (Preliminary report dedicated to the Memory of John Beard (1857-1924). Anticancer Res 25: 1157-1178.

Nyberg P., Moilanen M., Paju A., Sarin A., Stenman U.H., Sorsa T., Salo T. 2002: MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances *in vivo* invasion of human tongue carcinoma cells. J Dent Res 81: 831-835.

Nyberg P., Ylipalosaari M., Sorsa T., Salo T. 2006: Trypsin and their role in carcinoma growth. Exp Cell Res 312: 1219-1228.

Pacovský V. 1993: Vnitřní lékařství. Osveta: 167-176.

Pandey R., Patil N., Rao M. 2007: Proteases and protease inhibitors: Implication in antitumorgenesis and drug development. Int J Hum Genet 7: 67-82.

Panyutich A., Ganz T. 1991: Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. Am J Respir Cell Mol Biol. 5: 101-106.

Pawelec G. 1999: Tumor escape from the immune response: the last hurdle for succesful immunotherapy of cancer? Cancer Immunol Immunother 48: 343-345.

Philip A., O´Connor-McCourt M.D. 1991: Interaction of transforming growth factor-beta 1 with alpha 2-macroglobulin. Role in transforming growth factor-beta 1clearence. J Biol Chem 266: 22290-22296.

Pizzo S. V., Gonias S. L. 1984: Receptor – mediated protease regulation. The receptors 1, Academic press, New York: 178-221.

Roots I. 1997: Biologická dostupnost trypsinu, bromelainu a rutinových metabolitů po perorálním podání Phlogenzymu® u zdravých osob (MU-695427). Studie číslo MU-695 427: 1-36.

Saksela O., Wahlström T., Meyer B. a Vaheri A. 1984: Presence of α-2-Macroglobulin in Normal but not in Malignant Cervical Epithelium. Cancer research 44: 2942-2946.

Shurin M. R.,Yurkovetsky Z. R., Tourkova I. L., Balkir L., Shurin G. V. 2002: Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. Int J Cancer 101: 61–68.

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.

Swenson R. P., Howard J. B. 1979: Structural characterization of human alpha2-macroglobulin subunits. J. Biol. Chem. 254: 4452-4456.

Šťastný F., Pliss L., Höschl C. 2002: Interakce mezi proteázami a hematoencefalickou bariérou: možné důsledky pro klinickou praxi. Psychiatrie 6: 230-241.

Takahara H., Sinohara H. 1982: Mouse plasma trypsin inhibitors: Isolation and characterization of a-l-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor. J. biol. Chem. 257: 2438-2446.

Takahara H., Nakamura Y., Yamamoto K., Sinohara H. 1983: Comparative studies on the serum levels of a-l-antitrypsin and a-macroglobulin in several mammals. J. exp. Med. 139: 265-270.

Teicher B.A. 2002: Tumor models in cancer research. Humana Press: 78-89.

Terrazzano G., Romano M. F., Turco M. C., Salzano S., Ottaiano A., Venuta S. 2000: HLA class I antigen downregulation by interleukin (IL)-10 is predominantly governed by NK-kappaB in the short term and by TAP1+2 in the long term. Tissue Antigens 55: 326–332.

Topping M., Seilman S. 1979: A four-line model for the proteinase-binding characteristic of human blood serum. Biochem J 177: 493-499.

Trnka F., Rybak M., Marek R., Vavra L. 1999: Pharmaceutical composition containing an isolated protease proenzyme, amylase, and aprotinin. United States Patent # 5, 858, 357.

Uchima Y., Sawada T., Nishihara T. 2003: Identification of a trypsinogen activity stimulating factor produced by pancreatic cancer cells: Its role in tumor invasion and metastasis. Int J Mol Med 12: 871-878.

VanLeuven F., Torrekens S., Overbergh L., Lorent K., DeStrooper B., VanDenBerghe 1992: The primary sequence and the subunit structure of mouse α-2-Macroglobulin deduced from protein sequencing of the isolated subunits and from molecular cloning of the cDNA. Eur.J. Biochem. 210: 319-327.

Veselský Z., Macek P., Morávek P., Maťha V., Fröstl M., Višňovský P., Prošvic P., Odrážka K., Vaculíková M., Holub L. 2004: Základy imunologie nádorových onemocnění. Urologie pro praxi 1, www.urologiepropraxi.cz

Wald M., Olejar T., Pouckova P., Zadinova M. **1998:** Proteinase reduce metastatic dissemination and increase survival time in $C_{57}Bl_6$ mice with Lewis lung carcinoma. Life Sci 63:237-243.

Wald M., Olejar T., Sebkova V., Zadinova M., Boubelik M., Pouckova P. 2001: Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formativ of metastases and extends survival time of $C_{57}Bl_6$ mice with syngenic melanoma B16. Cancer Chemother Pharmacol 47: 12-22.

Webb D.J., Atkins T.A., Crookston K.P., Burmester J.K., Quian S.W., Gonias S.L. 1994: Transforming growth factor beta isoform 2-specific high affinity binding to native alpha 2-macroglobulin. Chimeras identify a sequence that determines affinity for native but not activated alpha 2-macroglobulin. J. Biol. Chem. 269: 30402-30406.

Webb J. D., Wen J., Lysiak J.J., Umans L., Leucen F.V. a Gonias S.L. 1996: Murine α2-Macroglobulins Demonstrate Divertigent Activities as Neitralizers of Transforming Growth Factor-β and as Inducers of Nitric Oxide Syntesis. J. Biol. Chem. 271: 24982-24988.

Webb D.J., Wen J., Karns L. R., Kurilla M.G., Gonias S.L. 1998: Localization of the Binding Site for Transforming Growth Factor-β in Human α2-macroglobulin to a 20-kDA Peptide That Also Contains the Bait Region. The J.Biol. Chem. 273: 13339-13346.

White R., Janoff A. and Godfrey H.P. 1980: Secretion of α2-macroglobulin by human alveolar macrophages. Lung 158: 9-14.

Wu S.M., Patel D.D., Pizzo S.V. 1998: Oxidized {alpha}2-Macroglobulin ({alpha}2M) Differentially Regulates Receptor Binding by Cytokines/Growth Factors: Implications for Tissue Injury and Repair Mechanisms in Inflammation. J Immunol 161: 4356-4365.

Yamamoto K., Sinahora H. 1984: Regulation by sex hormones of serum levels of contrapsin and alpha 1-antiprotease in the mouse. Biochim. Biophys. Acta. 798: 231-234.

Zimmerman M., Ashe B., Yurewicz C., Patel G. 1977: Sensitive assays fot trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. Analytical Biochem 78: 47-51.

Ziv E., Lior O., Kidron M. 1987: Absorption of protein *via* the intestinal wall. A quantitative model. Biochem Pharmacol 36: 1035-1039.