

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY  
PROENZYMOTERAPIE MALIGNÍCH  
ONEMOCNĚNÍ**

Magisterská diplomová práce

Bc. Pavlína Kaiserová

Vedoucí práce: RNDr. Jan ŽENKA, CSc.

České Budějovice, 2010

KAISEROVÁ P., 2010: IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY PROENZYMOTERAPIE MALIGNÍCH ONEMOCNĚNÍ  
[THE IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF CANCER PROENZYME THERAPY, MGR. THESIS, IN CZECH] -  
51 P., FACULTY OF SCIENCE, THE UNIVERSITY OF SOUTH BOHEMIA, ČESKÉ BUDĚJOVICE, CZECH  
REPUBLIC.

Annotation: Aim of this study was to find the way the proenzyme therapy influences the immune system by using different immunodeficient mice and screening the immunological parameters.

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

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2010

.....

Pavλίna Kaiserová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení práce, cenné rady a trpělivost, kolektivu laboratoře Imunologie parazitóz za pomoc při realizaci pokusů, přínosné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zejména bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc., RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD, Bc. Veronice Slavíkové, RNDr. Jiřímu Jelínkovi a Evě Výletové. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat kolektivu Centra pro Cytometrii a Mikroskopii MBÚ AVČR v.v.i. a samozřejmě celému týmu, přátelům a hlavně rodině za všeobecnou podporu.

# OBSAH:

<b>1.</b>	<b><i>Úvod</i></b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Rakovina</b> .....	<b>7</b>
1.1.1	Obecná charakteristika .....	7
1.1.2	Melanom .....	7
1.1.2.1	Melanom B16-F10 .....	8
1.1.3	Sarkom .....	8
1.1.3.1	Sarkom S-180.....	8
<b>1.2</b>	<b>Terapie maligních onemocnění založené na použití proteáz</b> .....	<b>9</b>
1.2.1	Mechanismus působení (pro)enzymoterapie .....	10
<b>1.3</b>	<b>Nádorová imunologie</b> .....	<b>10</b>
1.3.1	Činitelé protinádorové imunity .....	10
1.3.1.1	CD4+ T lymfocyty .....	10
1.3.1.2	T regulační lymfocyty .....	11
1.3.1.3	CD8+ T lymfocyty .....	11
1.3.1.4	NK buňky .....	11
1.3.1.5	NKT buňky .....	12
1.3.1.6	Makrofágy .....	13
1.3.2	Maligní onemocnění a cytokinová rovnováha .....	13
1.3.2.1	Role TGF- $\beta$ v ovlivnění imunitního systému.....	14
1.3.2.2	Role IL-10 v ovlivnění imunitního systému.....	14
1.3.1	Obrana nádorů proti imunitě .....	15
<b>1.4</b>	<b>Imunodeficientní myši</b> .....	<b>16</b>
1.4.1	SCID myši.....	16
1.4.2	Myši s defektním genem pro CD8 molekulu .....	16
1.4.3	Myši s deficitem pro perforin (PKO) .....	16
<b>2.</b>	<b><i>Cíle práce</i></b> .....	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b><i>Materiál a metody</i></b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité chemikálie</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Laboratorní zvířata a buněčné linie</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Statistické zpracování dat</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Proenzymoterapie, složení proenzymové směsi</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>Studium vlivu proenzymoterapie na růst nádorů u imunodeficientních myší – organizace experimentů</b> .....	<b>19</b>

3.5.1	Působení proenzymoterapie u CD8a- myší.....	19
3.5.1.1	1. experiment – působení terapie u CD8a- myší nesoucích melanom B16-F10.....	19
3.5.1.2	2. experiment – CD8a- sledování vlivu pohlaví na působení proenzymoterapie a růst nádorů (melanom B16-F10) .....	19
3.5.2	Působení proenzymoterapie u SCID myší.....	20
3.5.2.1	1. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u SCID a BALB/c myší na sarkom S-180 .....	20
3.5.2.2	2. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u starších SCID a BALB/c myší na nádory sarkomu S-180.....	20
3.5.2.3	3. experiment – proenzymoterapie melanomu B16-F10 u SCID samců.....	21
3.5.3	Působení terapie u PKO myší (terapie melanomu B16-F10) .....	21
<b>3.6</b>	<b>Sledování imunologických parametrů při proenzymoterapii nádorů .....</b>	<b>22</b>
3.6.1	Stanovení hladin CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, NK a NKT buněk a hladin IFN- $\gamma$ a IL-10.....	22
3.6.1.1	Průtoková cytometrie – stanovení CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulační lymfocytů, NK a NKT buněk .....	22
3.6.1.2	ELISA test – stanovení poměru Th1/Th2 na základě detekce cytokinů IFN- $\gamma$ a IL-10 v ex-vivo kulturách.....	24
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Studium vlivu proenzymoterapie na růst nádorů u imunodeficientních myší .....</b>	<b>25</b>
4.1.1	Působení proenzymoterapie u CD8a- myší.....	25
4.1.1.1	1. experiment – působení terapie u CD8a- myší nesoucích melanom B16-F10.....	25
4.1.1.2	2. experiment – CD8a- sledování vlivu pohlaví na působení proenzymoterapie a růst nádorů (melanom B16-F10) .....	26
4.1.2	Působení proenzymoterapie u SCID myší.....	27
4.1.2.1	1. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u SCID a BALB/c myší na sarkom S-180 .....	27
4.1.2.2	2. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u starších SCID a BALB/c myší na nádory sarkomu S-180.....	28
4.1.2.3	3. experiment – proenzymoterapie melanomu B16-F10 u SCID samců.....	29
4.1.3	Působení terapie u PKO myší (terapie melanomu B16-F10) .....	30
<b>4.2</b>	<b>Sledování imunologických parametrů při proenzymoterapii nádorů .....</b>	<b>31</b>
4.2.1	Stanovení hladin CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, NK a NKT buněk a stanovení poměru Th1/Th2.....	31
4.2.1.1	Průtoková cytometrie – stanovení CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulační lymfocytů, NK a NKT buněk .....	31
4.2.1.2	ELISA test – stanovení poměru Th1/Th2 na základě detekce cytokinů IFN- $\gamma$ a IL-10 v ex-vivo kulturách.....	39

5.	<i>Diskuse</i> .....	41
6.	<i>Souhrn</i> .....	44
7.	<i>Literatura</i> .....	45

# 1. ÚVOD

## 1.1 RAKOVINA

### 1.1.1 Obecná charakteristika

Rakovina je soubor onemocnění, která se vyznačují nekontrolovaným buněčným dělením, invazivitou a v některých případech také metastazibilitou. Právě svou invazivitou a metastazibilitou se liší velmi nebezpečné maligní nádory od méně nebezpečných nádorů benigních.

Rakovina bývá většinou způsobena jednou nebo spíše souborem mutací v genetickém materiálu buňky (Fearon, 1997), po jejichž proběhnutí se buňka začne nejen nekontrolovaně dělit, ale také se prodlouží její životnost. K těmto změnám v genomu buňky dochází například v důsledku působení karcinogenů (cigaretový kouř, radiace, různé chemikálie, bakteriální a virové infekce), chybou při replikaci DNA nebo mohou být dědičné.

Základními typy dle původu dané buňky jsou:

- Karcinom – pocházející z kůže či tkání vnitřních orgánů
- Sarkom – postihující kosti, chrupavku, svaly, tukovou a pojivovou tkáň
- Leukémie – rakovina započínající v kostní dřeni
- Lymfom a myelom – rakovina buněk imunitního systému
- Rakovina centrální nervové soustavy (U.S. National Cancer Institute 2010)

### 1.1.2 Melanom

Melanom je agresivní, vysoce metastazující maligní onemocnění, které vzniká maligní transformací melanocytů kůže, střeva či oka (vzácně).

Původ maligního melanomu je různý. Může vzniknout de novo, nebo z již existujícího melanocytového névu. Rozlišujeme čtyři základní typy melanomu:

- Lentigo maligna melanoma – Tento typ vzniká na podkladě lentigo maligna (pomalu se zvětšující nestejně hnědě pigmentované ložisko na kůži vystavené působení ultrafialového záření, které má histologický obraz melanoma in situ)

zejména v obličeji a na krku starších lidí. Prognóza je u tohoto typu příznivější než u ostatních typů.

- Povrchově se šířící melanom – Je nejčastější formou melanomu, na kůži nejčastěji zad a dolních končetin vzniká nestejně barevné, hladké až několik centimetrů velké ložisko.
- Nodulární melanom – Dominuje u něj vertikální růst, od počátku vzniká jako postupně rostoucí hrbol. Jedná se o nejagresivnější formu melanomu.
- Akrolentiginózní melanom – Tato forma melanomu se od ostatních liší pouze svým umístěním akrolentálně na dlaních, ploskách nohou, na nehtovém lůžku a na sliznicích dutiny ústní a genitálu.(Pizinger 2006, Weedon a spol. 2005)

V České republice je každoročně prokázáno okolo 300 nových případů tohoto onemocnění (Marek 2010), zatímco v USA ročně touto chorobou onemocní 68 720 a zemře 8 650 lidí (U.S. National Cancer Institute 2010).

#### **1.1.2.1 Melanom B16-F10**

Melanom B16-F10 je jedním ze čtyř modelů myšního (C57BL/6) melanomu, který je charakterizován vysokou schopností metastazovat a to zejména do plic (Nakamura et al. 2002). Dalšími modely jsou B16-F0, B16-F1, B16-BL6.

### **1.1.3 Sarkom**

Sarkom je zhoubný nádor postihující tkáň mezenchymálního původu. Dle tkáně, kterou postihuje, dělíme sarkom do dvou hlavních skupin:

- Osteosarkom – sarkom pocházející z kostní tkáň
- Sarkomy měkkých tkání – ty se mohou vyvinout z měkkých tkání, jako jsou například tuková tkáň (liposarkom), svaly (leiomyosarkom) a nervová tkáň (neurofibrosarkom).

V České republice jím ročně onemocní zhruba 2 lidé na 100 000 obyvatel, zemře čtvrtina z nich.

#### **1.1.3.1 Sarkom S-180**

Sarkom S180 je myší (BALB/c) sarkom, který se vyznačuje rapidním růstem a vzácným výskytem metastáz (Deodhar 1971), objevuje se u něj také často spontánní regrese (Shohat a



spol. 1968), jež je jednoznačně spojena se snižující se fosfolipidovou aktivitou (Jones a spol. 1939).

## **1.2 TERAPIE MALIGNÍCH ONEMOCNĚNÍ ZALOŽENÉ NA POUŽITÍ PROTEÁZ**

Zmínku o (pro)enzymoterapii a využití pankreatických enzymů k léčbě maligních onemocnění můžeme najít již na počátku 20. století, jejím zakladatelem byl totiž skotský embryolog John Beard (1857-1924). Ten si při své práci všiml analogie mezi trofoblastem a rakovinou. Aby trofoblast mohl správně vyživovat embryo, musí se zahrnout do stěny dělohy, což je podmíněno jeho invazivitou a schopností se rozšiřovat. Právě těchto znaků si Beard všiml a našel v nich podobnost s rakovinou. Nepotlačený trofoblast se může vyvinout v choriokarcinom. Beard se domníval, že aby se tak nestalo, je zapotřebí přítomnosti pankreatických enzymů embrya. Proto se rozhodl zjistit, jak proteolytický enzym trypsin působí na rakovinné buňky a své domněnky potvrdil (Beard 1906, 1911). Nazval svou léčbu trypsinovou terapií, nicméně použití čerstvých pankreatických výtažků svědčí spíše o přítomnosti enzymů v jejich neaktivní proenzymové formě, což ve své práci zdůrazňují i Novák a Trnka, 2005. Beard tedy léčil preparáty s nutně vysokým obsahem proenzymů (trypsinogen, chymotrypsinogen), které však neznal a které byly objeveny o několik desítek let později.

Jeho domněnky byly dále potvrzeny Beardovými následovníky (Cleaves 1906, Golley 1906, Cambell 1907, Golley 1909), ovšem někteří z nich nebyli tak úspěšní (Bainbridge 1909) a trypsinová terapie upadla v zapomnění. Neschopnost dosáhnout stejných výsledků jako Beard mohla být dána právě mystifikací ohledně aktivity použitého trypsinu.

Systémové enzymoterapii se v současné době věnuje několik subjektů. Enzymy jsou lidem podávány perorálně ve vysokých dávkách či aplikovány na myších modelech perrektálně (Wald 1998, 2001). Ačkoli jsou v obou případech dávky enzymů velice vysoké, do krve se dostane jen nepatrná část. V krvi jsou poté enzymy okamžitě vychytávány a inhibovány inhibitory proteáz, jako jsou například alfa-2-makroglobulin, alfa-1-antitrypsin, alfa-1 antichymotrypsin, případně u myší contrapsin.

Proenzymoterapií se v nedávné době zabýval Novák a Trnka, 2005. Jejich in vitro pokusy odhalily inhibiční vliv proenzymů na migraci a invazivitu nádorových buněk. V pokusech in vivo na myším modelu byl však použit pouze trypsinogen ve směsi s

amylázou. Tato směs prokázala terapeutický a výrazný protimetastázový účinek na melanomu B16. Amyláza zde má pouze podpůrný vliv (Novák a Trnka 2005).

Účinnost terapie založené na proenzymech, konkrétně na kombinaci trypsinogenu, chymotrypsinogenu a amylázy, byla prokázána na myších modelech jak na melanomu B16-F10 (Kalferstová 2008), tak na sarkomu S-180 (Kaiserová 2008).

### 1.2.1 Mechanismus působení (pro)enzymoterapie

Podstatou enzymoterapie je nejspíše aktivace alfa-2-makroglobulinu, který vycytává cytokiny z krve. Po navázání enzymu na alfa-2-makroglobulin, dojde k jeho konformační změně a odhalí se doposud nepřístupné receptory. Ty pak mohou vázat celou řadu cytokinů (Webb 1996).

Nádorové buňky se brání zásahu imunitního systému produkcí cytokinů TGF-beta a IL-10 (Harthun a spol. 1997, Chouaib a spol. 1997, Yang a spol. 2002). Jejich účinky jsou popsány níže v kapitole 1.3.2.

Vychytávání TGF-beta a IL-10 aktivovaným alfa-2-makroglobulinem, z toho vyplývající snížení navozené imunosuprese a obnovení Th1/Th2 rovnováhy je považováno za jeden z hlavních mechanismů systémové enzymoterapie. Snížení hladiny TGF-beta pomocí enzymoterapie bylo již prokázáno (Desser a spol. 2001).

## 1.3 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

### 1.3.1 Činitelé protinádorové imunity

#### 1.3.1.1 CD4+ T lymfocyty

CD4+ T lymfocyty, označované jako pomocné T lymfocyty, rozeznávají peptidové antigenní epitopy prezentované pomocí MHC II molekul, nemají sice cytotoxickou funkci, ale imunitní systém ovlivňují pomocí produkce cytokinů. K tomu, aby mohly být aktivovány, je zapotřebí takzvaných antigen prezentujících buněk (APC; např. dendritické buňky, B lymfocyty, makrofágy).

CD4+ T lymfocyty dělíme do tří základních skupin dle produkce cytokinů, Th1, Th2 a Th3. Th1 lymfocyty jsou hlavními producenty IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  a mohou tak přímo působit na infikované či nádorové buňky (Omyia a spol. 2002), ovšem jejich hlavní funkcí je poskytnutí aktivačního signálu CD8+ T lymfocytům a nespecifickým „zabíječům“, NK buňkám a

makrofágům (Mosman a spol. 1996). Th2 CD4<sup>+</sup> T lymfocyty produkují IL-4, IL-5, IL-10, podporují proliferaci B lymfocytů a produkci imunoglobulinů (Mosman a spol. 1986). Th3 lymfocyty uvolňují především transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), který se účastní např. procesů hojení poškozené tkáně (podrobný popis funkce TGF- $\beta$  viz kapitola 1.3.2.1).

### **1.3.1.2 T regulační lymfocyty**

Zvláštní skupinou CD4<sup>+</sup> T lymfocytů jsou T regulační lymfocyty, které kromě CD4 molekuly nesou také molekulu CD25 a Foxp3. Mají supresivní funkci, tlumí aktivitu autoreaktivních T buněk, aniž by je ničily (Bach 2003). Mechanismus jejich působení není zcela znám, nejspíše se jedná o kontakt buňka – buňka, nebo je ovlivňují produkcí IL-10 a TGF-beta. T regulační lymfocyty mají 2 populace: přirozené (natural) a adaptivní (adaptive) (Bluestone a spol. 2003). Přirozené CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulační lymfocyty vyzrávají v thymu za homeostatických podmínek a jejich účelem je zabránit autoimunitnímu onemocnění, zatímco adaptivní vznikají během zánětlivých procesů (infekce, ale i maligní onemocnění) a zde rozličnými způsoby tlumí imunitní odpověď. Kromě T lymfocytů tlumí rovněž funkci NK buněk (Ghiringhelli a spol. 2006), B lymfocytů (Lim a spol. 2005) a dalších buněk imunitního systému a mohou inhibovat nádorově specifické CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T efekторы (Curiel 2007).

### **1.3.1.3 CD8<sup>+</sup> T lymfocyty**

CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, cytotoxické T lymfocyty, mohou rakovinné buňky rozpoznat jen tehdy, jsou-li antigeny nádoru vyjádřeny pomocí MHC I molekul. Specifická protinádorová reakce CD8<sup>+</sup> buněk je nejspíš zapříčiněna tím, že jsou buď nádorové buňky anebo jejich antigeny fagocytovány APC a prezentovány v komplexu s MHC I molekulami (Říhová 2007).

### **1.3.1.4 NK buňky**

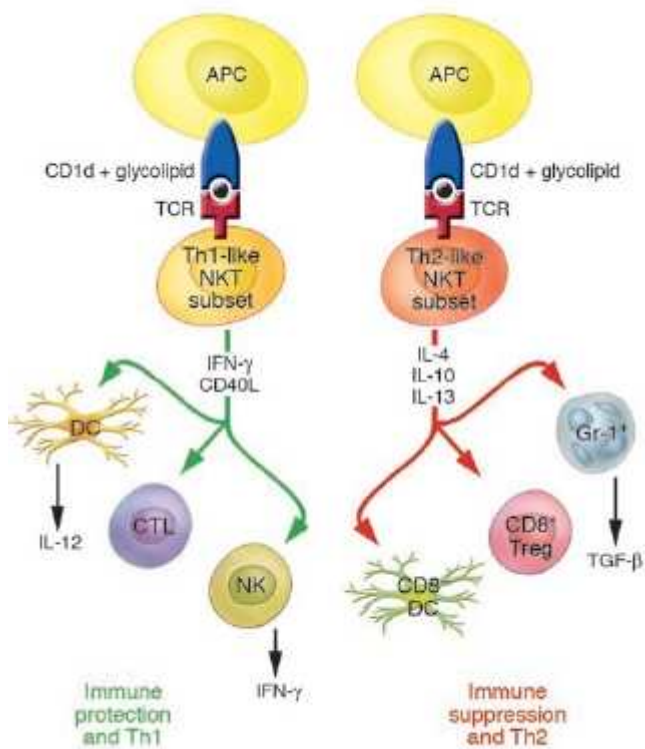
NK buňky, neboli přirození zabíječi, jsou subpopulací lymfocytů čítající v krvi zdravého jedince asi 10% lymfocytů (Raulet 1999). Na rozdíl od T lymfocytů nemají TCR receptor a molekuly MHC I, které rozpoznávají za pomoci tzv. inhibičních receptorů, inhibují jejich aktivitu (Binstadt a spol. 1997). NK buňky nesou na svém povrchu receptory (tzv. aktivační receptory) specifické pro cílové buňky. Jejich hlavním úkolem je rozpoznání vlastních proteinů, jejichž produkce byla ve změněných buňkách buď potlačena, nebo naopak nadměrně zvýšena (Raulet 2004). Cesta, kterou NK buňky používají ke zničení cílové buňky, spočívá v těsném kontaktu s cílovou buňkou a vypuštěním cytolytických granulí obsahujících perforin a granzymy. NK buňky také mohou ovlivnit adaptivní imunitní odpověď sekrecí

cytokinů, jako je IFN- $\gamma$ , která vede k Th1 odpovědi. NK buňky nesou na svém povrchu CD16 molekulu, nízkofiní receptor pro imunoglobulin G, ten jim dovoluje zúčastnit se procesu na protilátkách závislé buňkami zprostředkované cytotoxicity (ADCC) (Lanier a spol. 1983).

### 1.3.1.5 NKT buňky

NKT buňky jsou speciální subpopulací T lymfocytů, které kromě T receptoru nesou rovněž molekuly typické pro NK buňky. Na rozdíl od normálních T lymfocytů nerozpoznávají antigeny v kontextu s MHC I ani MHC II molekulami. Na místo toho odpovídají na lipidové a glykolipidové antigeny, prezentované MHC-like CD1d molekulami, které rozpoznávají svým TCR receptorem (Jerud a spol. 2006).

NKT buňky se vyskytují převážně v určitých tkáních, tvoří 20-30% jaterních a T lymfocytů kostní dřeně, 10-20% dospělých thymocytů a 0,5-1% splenocytů.



**OB. 1: JAK NKT BUŇKY OVLIVŇUJÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ TH1 NEBO TH2 SMĚREM (GODFREY A SPOL. 2004)**

Přestože mají také cytolytickou funkci, jsou považovány spíše za regulátory imunitní odpovědi právě díky rychlé produkci Th1 a Th2 cytokinů. NKT buňky typu II nejsou  $\alpha$ -GalCer-reaktivní, po stimulaci jejich Tcr receptoru rovněž produkují řadu Th1 a Th2

NKT buňky produkují řadu Th2 cytokinů, jako jsou IL-4 a IL-10 (Hammond a spol. 1998) a IL-5, ale rovněž produkují Th1 cytokiny jako IFN- $\gamma$  a TNF- $\beta$  (Bendelac a spol. 1997). Prostřednictvím cytokinů pak ovlivňují NK buňky, CTL, CD8+ T regulační lymfocyty a další buňky (viz Obr. 1).

V protinádorové terapii se uplatňuje modelový antigen,  $\alpha$ -galactosylceramid ( $\alpha$ -GalCer), který byl izolován z mořských hub jako protinádorová látka, ale v savčích buňkách se nevyskytuje. Část NKT buněk, konkrétně NKT buňky typu I ( $\alpha$ -GalCer-reaktivní NKT, iNKT), po stimulaci tímto antigenem produkuje velké množství Th1 (IFN- $\gamma$ ) a Th2 (IL-4, IL-13) cytokinů.

cytokinů, nicméně jejich role v imunitním systému spočívá v cytolytické aktivitě těchto buněk. Jedná se tedy zřejmě o prozánětlivou a autodestrukční populaci T lymfocytů (Terabe a spol. 2007)

#### **1.3.1.6 Makrofágy**

Makrofágy jsou klíčovými činiteli chronického zánětu. Stejně jako u NK buněk není rozpoznávání cílových buněk závislé na MHC molekulách, mají Fc receptor, který jim umožňuje vázat se k protilátkám specifickým pro nádorové buňky a zprostředkovávat tak ADCC odpověď. Můžeme je rozdělit do dvou skupin, dle jejich progenitorů. M1 makrofágy, jež jsou většinou aktivovány mikrobiálními produkty a interferonem gama, slouží jako hlavní efektor zabíjející potencionální mikroorganismy a nádorové buňky (Hamilton 2002). Oproti tomu M2 makrofágy regulují zánět a adaptivní imunitu, podporují buněčnou proliferaci produkcí růstových faktorů, odklízejí pozůstatky buňky expresí scavenger receptorů, stimulují angiogenezi, přestavbu tkáně a opravy. Rozdíl mezi M1 a M2 makrofágy spočívá také v produkci cytokinů, zatímco M1 produkují TNF- $\alpha$  a IL-12, M2 produkují IL-10, antagonistu IL-1 receptor (IL-1ra) a IL-1 receptor typu II (Mantovani 1999)

Makrofágy jsou nejpočetnější skupinou leukocytů infiltrující tumor. Nádorem asociované makrofágy (TAMs) mají dvojí funkci při interakci s nádorovými buňkami. Po aktivaci rakovinnými buňkami mohou produkovat cytokiny, růstové hormony, proteolytické enzymy a prozánětlivé mediátory, které umožňují nádoru lépe metastazovat a růst. Na druhou stranu některé studie ukázaly, že nádorem asociované makrofágy mohou hrát důležitou roli v protinádorové imunitě. Možný protinádorový účinek může být dán zvýšením hladiny migraci inhibujícího faktoru (MIF), který inhibuje migraci makrofágů z nádoru a stimuluje fagocytózu a nepřímo tak i prezentaci nádorových antigenů efektorovým buňkám. Zvýšení produkce GM-CSF (granulocyte/macrophage – colony stimulating factor) nádorovými buňkami může u nádorem asociovaných makrofágů vyvolat posílení přímého cytotoxického účinku (Bingle a spol. 2002). Ve většině případů však byla prokázána jejich pronádorová funkce (Mantovani a spol. 1992, Balkwill a spol. 2001)

#### **1.3.2 Maligní onemocnění a cytokinová rovnováha**

V průběhu maligního onemocnění se posouvá rovnováha mezi Th1 a Th2 odpovědí směrem k Th2 (Shurin a spol. 1999). Tato nerovnováha je způsobena mimo jiné také produkcí jednotlivých cytokinů T lymfocyty, ale i nádorovými buňkami.

Th1 lymfocyty produkují například IL-2, interferon gama a tumor necrosis factor, Th2 lymfocyty IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a mnoho dalších. Podle hladiny těchto cytokinů je možné určit stav a stupeň malignity (Onishi a spol. 1999).

Také nádory produkují mnoho faktorů, které mohou narušit rovnováhu Th1 a Th2 cytokinů. Mezi tyto faktory patří TGF- $\beta$ , IL-10, prostaglandiny a mnoho dalších látek (Asselin-Paturel a spol. 1998; Chouaib a spol. 1997; Kim a spol. 1995).

### **1.3.2.1 Role TGF- $\beta$ v ovlivnění imunitního systému**

Transformující růstový faktor beta je cytokin produkovaný hlavně T regulačními a Th3 lymfocyty, ale také nádorovými buňkami. V organismu má široké spektrum účinku. Jak se ukázalo, TGF- $\beta$  hraje roli v buněčném růstu, diferenciaci a transformaci, také upravuje imunitní reakci hostitele na růst a metastazování nádorů. Zvýšení hladiny TGF- $\beta$  v séru koreluje s progresí rakoviny a snížením přežití u různých druhů rakoviny (Gold 1999).

Nádorové buňky ovlivňují pomocí TGF- $\beta$  buňky imunitního systému. Imunitní odpověď makrofágu TGF- $\beta$  ovlivňuje hned několika způsoby. Tlumí proliferaci prekursorových buněk v kostní dřeni závislou na kolonie stimulujícím faktoru 1 (CSF) a tím pádem i tvorbu makrofágů (Strassman a spol. 1988), inhibuje proliferaci makrofágů indukovanou lipoproteinem (Sato a spol. 1996), potlačuje cytolytickou funkci aktivovaných makrofágů (lipopolysacharidem, IFN- $\gamma$ ) odvozených z kostní dřene (Pinson a spol. 1992). TGF- $\beta$  tlumí aktivitu T lymfocytů, snižuje expresi perforinu v periferních CD8+ T lymfocytech (Smyth a spol. 1991) a snižuje produkci cytokinů T lymfocyty (Fargeas a spol. 1992). TGF- $\beta$  má rovněž inhibiční vliv na periferní NK buňky, snižuje jejich proliferaci a produkci cytokinů (Bellone a spol. 1995)

Ačkoli TGF- $\beta$  inhibuje expresi MHC molekul druhé třídy na povrchu nádorových buněk, většina z nich odolává jeho supresivním účinkům. Nádorové buňky se brání účinkům TGF- $\beta$  několika mechanismy: snížením počtu receptorů pro TGF- $\beta$  (Paterson a spol. 2001), inaktivujícími mutacemi v TGF- $\beta$  receptoru (Garigue-Antar a spol. 1995) nebo změnami v postreceptorové signalizační dráze zahrnující Smad proteiny (West a spol. 2000).

### **1.3.2.2 Role IL-10 v ovlivnění imunitního systému**

Lidský interleukin 10 (IL-10) je 17-20kDa glykoproteinový cytokin působící přes IL-10 receptor, člen interferonové receptorové rodiny, který se skládá ze dvou podjednotek, IL-10

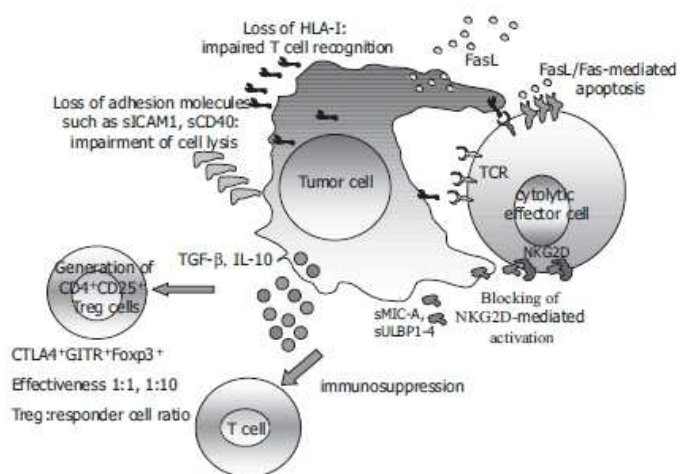
receptoru 1 (ligand vážící podjednotka) a IL-10 receptoru 2 (signální podjednotka) (Moore a spol. 2001)

Je produkován Th2 subpopulací T lymfocytů za přítomnosti antigen prezentujících buněk (Florentino a spol. 1989), B buňkami, monocyty, NK buňkami a nádor infiltrujícím T lymfocyty (Becker a spol. 1994; Ortelgel a spol. 2000; Cooper a spol. 2001).

Jeho vliv na imunitní systém spočívá v potlačení produkce cytokinů, prostaglandinů, oxidu dusnatého makrofágy a potlačení jejich cytotoxické aktivity (de Waal Malefyt a spol. 1991; Berg a spol. 2001; Oswald a spol. 1992), také snižuje jejich efektivitu jako antigen prezentujících buněk redukcí exprese MHC druhé třídy na jejich povrchu. Interakcí s IL-10 receptory na povrchu T lymfocytů tlumí produkci cytokinů typu I (IL-12 a TNF- $\alpha$ ) a brzdí antigenem spuštěnou proliferaci CD4+ T lymfocytů (de Waal Malefyt a spol. 1993). Přes výše zmíněný inhibiční efekt má IL-10 i stimulační vlastnosti, povzbuzuje produkci cytokinů NK buňkami a nepřímo stimuluje jejich proliferaci indukovanou IL-2 (Carson a spol. 1995).

### 1.3.1 Obrana nádorů proti imunitě

Mechanismů, kterými se nádory brání před eliminací imunitním systémem, je mnoho (viz Obr. 2). Patří mezi ně například potlačení exprese MHC I molekul, jež vede k tomu, že nádory nemohou být rozpoznány cytotoxickými T lymfocyty. Ztráta adhezních molekul (ICAM1, CD40) vede ke snížení interakcí s efektorovými lymfocyty. Nádorové buňky rovněž produkují cytokiny, TGF beta a IL-10, které mají přímý imunosupresivní vliv na proliferaci T lymfocytů. Tyto cytokiny jsou rovněž důležité při vytváření CD4+CD25+ T regulačních lymfocytů. Jedním z dalších mechanismů je vypuštění sFasL (soluble Fas ligand) nádorovými buňkami. Ty pak interagují s Fas receptory na povrchu protinádorových efektorových buněk a mohou způsobit jejich apoptózu (Poggi a spol. 2006)



**OBR. 2: MECHANISMY OBRANY NÁDORU PŘED IMUNITNÍM SYSTÉMEM (POGGI A SPOL. 2006)**

proliferaci T lymfocytů. Tyto cytokiny jsou rovněž důležité při vytváření CD4+CD25+ T regulačních lymfocytů. Jedním z dalších mechanismů je vypuštění sFasL (soluble Fas ligand) nádorovými buňkami. Ty pak interagují s Fas receptory na povrchu protinádorových efektorových buněk a mohou způsobit jejich apoptózu (Poggi a spol. 2006)

## **1.4 IMUNODEFICIENTNÍ MYŠI**

### **1.4.1 SCID myši**

Označení kmene: C.B17-scid/IcrCrl

SCID myši byly vytvořeny v roce 1980 z C.B-17/Icr myší ve Fox Chase Cancer Center ve Filadelfii. Mají genetickou autosomálně recesivní mutaci scid (severe combined imunodeficiency = těžká kombinovaná imunodeficiencie). Tato zvířata trpí výraznou deficiencí T- a B- lymfocytů. Mají normální hladinu NK buněk, makrofágů a granulocytů (AnLab 2010).

### **1.4.2 Myši s defektním genem pro CD8 molekulu**

Označení kmene: B6.129S2-Cd8atm1Mak/J

Tento kmen byl vyvinut cílenou mutací genu pro CD8 receptor u C57BL/6 myší. Mutace v tomto genu způsobuje neschopnost vývoje CD8+ cytotoxických lymfocytů. Absence cytotoxických lymfocytů má pak za následek zvýšenou citlivost k vnitrobuněčným infekcím (Jax mice database 2010).

### **1.4.3 Myši s deficitem pro perforin (PKO)**

Označení kmene: C57BL/6-Prf1<sup>tm1Sdz</sup> /J

Myši s deficitem pro perforin mají normální hladiny imunitních efektorů. Ovšem CTL a NK buňky nejsou schopny lyzovat virem napadené buňky a alogenní fibroblasty in vitro (Jax mice database 2010).

Perforin je protein klíčový pro cytotoxickou funkci NK buněk a cytotoxických T lymfocytů (CTL), je uložen v granulích cytoplazmy těchto buněk. Pokud CTL rozpozná pozměněnou buňku, obsah granulí se uvolní, monomery perforinu utvoří polymerní strukturu na povrchu cílové buňky a v tomto místě vznikne otvor v membráně, který zapříčiní smrt této buňky (Boháček 1994)



## **2. CÍLE PRÁCE**

- Zjistit závislost proenzymoterapie na imunitním systému
- Proenzymoterapie malignit u SCID a CD8a- myši

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE**

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

#### **3.2 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A BUNĚČNÉ LINIE**

SPF BALB/c myši byly dodány firmou Charles River Laboratories Laboratories (Sulzfeld, Německo), CD8a- myši (B6.129S2-Cd8atm1Mak/J), SCID (C.B17-scid/IcrCrl) myši a PKO myši (C57BL/6-Prf1<tm1Sdz> /J) z chovu Parazitologického Ústavu AV ČR, chovné páry byly dodány firmou Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

Imunodeficientní myši (CD8a-, SCID, PKO) byly chovány v přetlakových izolátorech (BEM Znojmo).

Buněčné linie sarkomu S-180 a melanomu B16/F10, oboje dar od Prof. Říhové, Mikrobiologický Ústav AV ČR, Praha, byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% FCS a antibiotiky (Sigma Aldrich).

#### **3.3 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT**

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel.

#### **3.4 PROENZYMOTERAPIE, SLOŽENÍ PROENZYMOVÉ SMĚSI**

Byla použita směs o následujícím složení: 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy na ml fyziologického roztoku, sterilizované filtrací.

### **3.5 STUDIUM VLIVU PROENZYMOTERAPIE NA RŮST NÁDORŮ U IMUNODEFICIENTNÍCH MYŠÍ – ORGANIZACE EXPERIMENTŮ**

#### **3.5.1 Působení proenzymoterapie u CD8a- myší**

##### **3.5.1.1 1. experiment – působení terapie u CD8a- myší nesoucích melanom B16-F10**

Byly použity 8týdenní samice myší CD8a-. Všem myším bylo aplikováno s.c. 450 000 buněk melanomu B16-F10. 13. den po aplikaci melanomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 2 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách. Téhož dne byla započata proenzymoterapie.

- **Skupina I:** 3 samice CD8a-, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno po 0,1 ml fyziologického roztoku
- **Skupina II:** 4 samice CD8a-, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi

Byl sledován vliv proenzymoterapie na růst nádorů.

##### **3.5.1.2 2. experiment – CD8a- sledování vlivu pohlaví na působení proenzymoterapie a růst nádorů (melanom B16- F10)**

Byly použity 8týdenní samice a samci myší CD8a-. Všem myším bylo aplikováno s.c. 450 000 buněk melanomu B16-F10. 11. den po aplikaci melanomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 4 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách. Téhož dne byla započata proenzymoterapie.

- **Skupina I:** 5 samců CD8a-, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi
- **Skupina II:** 5 samců CD8a-, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno po 0,1 ml fyziologického roztoku
- **Skupina III:** 4 samice CD8a-, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi

- **Skupina IV:** 3 samice CD8a-, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno po 0,1 ml fyziologického roztoku

Byl sledován vliv proenzymoterapie na růst nádorů a závislost tohoto účinku na pohlaví.

### 3.5.2 Působení proenzymoterapie u SCID myší

#### 3.5.2.1 1. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u SCID a BALB/c myší na sarkom S-180

Byly použity 8týdenní samice myší SCID a BALB/c. Všem myším bylo aplikováno s.c. 500 000 buněk sarkomu S180. 13. den po aplikaci sarkomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 4 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách.

- **Skupina I:** 6 samic SCID, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku
- **Skupina II:** 6 samic SCID, proenzymoterapie, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi
- **Skupina III:** 8 samic BALB/c, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku
- **Skupina IV:** 8 samic BALB/c, proenzymoterapie, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi

Byl sledován vliv proenzymoterapie na růst nádorů a rozdíly v jejím působení u obou kmenů myší.

#### 3.5.2.2 2. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u starších SCID a BALB/c myší na nádory sarkomu S-180

Byly použity 18týdenní samice myší SCID a BALB/c. Všem myším bylo aplikováno s.c. 400 000 buněk sarkomu S180. 11. den po aplikaci sarkomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 4 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách.

- **Skupina I:** 10 samic SCID, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi

- **Skupina II:** 10 samic SCID, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku
- **Skupina III:** 10 samic BALB/c, , denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi
- **Skupina IV:** 10 samic BALB/c, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku

Stejně jako v předchozím experimentu byly sledovány rozdíly v působení proenzymoterapie a růstu nádorů u obou kmenů myší.

### 3.5.2.3 3. experiment – proenzymoterapie melanomu B16-F10 u SCID samců

Byli použiti 10týdenní samci myší SCID. Všem myším bylo aplikováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. 11. den po aplikaci melanomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 2 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách.

- **Skupina I:** 13 samců SCID, proenzymoterapie, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi
- **Skupina II:** 13 samců SCID, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku

Byl sledován vliv proenzymoterapie na růst nádoru, rychlost růstu a uchycení melanomu u SCID myší. V tomto pokusu byli použiti samci z důvodu rychlejšího růstu a lepšího uchycení nádorů.

### 3.5.3 Působení terapie u PKO myší (terapie melanomu B16-F10)

Byly použity 8týdenní samice myší PKO. Všem myším bylo aplikováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. 11. den po aplikaci melanomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 2 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách. Rozdělení:

- **Skupina I:** 6 samic PKO, proenzymoterapie, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi

- **Skupina II:** 6 samic PKO, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku

Byl sledován vliv proenzymoterapie na růst nádorů.

### **3.6 SLEDOVÁNÍ IMUNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ PŘI PROENZYMOTERAPII NÁDORŮ**

#### **3.6.1 Stanovení hladin CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, NK a NKT buněk a hladin IFN- $\gamma$ a IL-10**

Byly použity 12týdenní samice C57BL/6. Polovině myší bylo aplikováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. 11. den po aplikaci melanomu byly myši, u kterých bylo možné pohmatem detekovat nádory, rozděleny do 2 skupin (viz níže). Bylo při tom dbáno na srovnatelnost velikostní distribuce v jednotlivých skupinách. Druhá polovina myší, bez nádorů, byla rovněž rozdělena do 2 skupin. Rozdělení:

- **Skupina I:** 12 samic C57BL/6 s nádorem, proenzymoterapie, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi
- **Skupina II:** 12 samic C57BL/6 s nádorem, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku
- **Skupina III:** 9 samic C57BL/6 bez nádoru, proenzymoterapie, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi
- **Skupina IV:** 9 samic C57BL/6 bez nádoru, denně i.m. do svaloviny levé zadní nohy aplikováno 0,1 ml fyziologického roztoku.

21., 28. a 34. den experimentu bylo usmrceno vždy po třech myších z každé skupiny, byl proveden odběr krve z cév ramenního pletence a byla vyjmuta slezina. Slezina pak byla použita ke stanovení poměru CD4 a CD8 T lymfocytů, zastoupení T regulačních lymfocytů a NK buněk na průtokovém cytometru a rovněž ke stanovení hladiny produkce cytokinů metodou ELISA.

#### **3.6.1.1 Průtoková cytometrie – stanovení CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulační lymfocytů, NK a NKT buněk**

Odebraná slezina byla rozmělněna přes sítko a buňky byly rozsuspendovány v RPMI 1640 s 5% FCS a třikrát promyty. Poté byly rozsuspendovány v 1ml média a spočítány v Bürkerově

komůrce. Bylo odděleno 10 milionů buněk, ve kterých byly zlyzovány erytrocyty pomocí 0,84% roztoku NH<sub>4</sub>Cl. Buňky byly dvakrát promyty v PBS s 2% FCS a nakonec rozděleny po 1 milionu do 96 jamkového panelu (viz Tabulka 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	neg	CD4	CD8	CD25	FoxP3	NK	CD3					
		FITC	PE	APC	PE	PE	FITC					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>B</b>	I A					III A						
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<b>C</b>	I B					III B						
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
<b>D</b>	I C					III C						
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
<b>E</b>	II A					IV A						
	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
<b>F</b>	II B					IV B						
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
<b>G</b>	II C					IV C						
	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
<b>H</b>												
	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
	neg	CD4	FITC/PE	CD4/CD25	CD3/NK	neg	CD4	FITC/PE	CD4/CD25	CD3/NK		
		CD8a	iso	Foxp3			CD8a	iso	Foxp3			

TABULKA 1: ROZVRŽENÍ 96TIJAMKOVÉHO PANELU

Po té bylo k buňkám, kromě negativní kontroly, přidáno 10 µl extracelulárně barvicí směsi:

- CD4/CD8: FITC Conjugated Anti-Mouse CD4 (L3T4) (eBioscience) a PE Conjugated Anti-Mouse CD8a (Ly-2) (eBioscience) ředěny 1:100
- FITC/PE isotypová kontrola: FITC Conjugated Armenian Hamster IgG isotype control a PE Conjugated Armenian Hamster IgG isotype control (eBioscience) ředěny 1: 100

- CD4/CD25: FITC Conjugated Anti-Mouse CD4 (L3T4) (eBioscience), Allophycocyanin (APC) anti-mouse CD25 (IL-2 Receptor  $\alpha$ , p55) (eBioscience) ředěny 1:100
- CD3/NK: Phycoerythrin (PE) anti-mouse NK1.1(eBioscience) ředěna 1:100, Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse CD3 (CD3e, epsilon subunit) (eBioscience) ředěna 1: 200
- Do horní řady bylo přidáno 10  $\mu$ l jednotlivých naředěných protilátek v příslušné koncentraci.

Po 20 minutách byly buňky promyty 150  $\mu$ l PBS s 2% FCS a bylo k nim přidáno 50  $\mu$ l fixačně-permeabilizačního roztoku připraveného z PE anti-mouse/rat Foxp3 Staining Setu (eBioscience). Po uplynutí 30tíminutové fixační doby byly buňky promyty v permeabilizačním pufru a k příslušným vzorkům bylo přidáno 10  $\mu$ l roztoku PE Conjugated Foxp3 z PE anti-mouse/rat Foxp3 Staining Setu (eBioscience), naředěné 1:100 v permeabilizačním pufru. Po 30 minutách byly buňky dvakrát promyty, rozsuspendovány v permeabilizačním pufru a změřeny na průtokovém cytometru BD LSR II. Výsledky byly vyhodnoceny v programu FlowJo.

### **3.6.1.2 ELISA test – stanovení poměru Th1/Th2 na základě detekce cytokinů IFN- $\gamma$ a IL-10 v ex-vivo kulturách**

Po milionu buněk z rozmělněné sleziny bylo ponecháno ve 200  $\mu$ l RPMI s 5% FCS při teplotě 37°C. Po 24 hodinách bylo odebráno 150  $\mu$ l média. V médiu byla pomocí metody ELISA stanovována hladina IFN- $\gamma$  a IL-10.

Detekce IFN- $\gamma$  byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu Mouse IFN $\gamma$  (Interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ) ‘Femto-HS’ High Sensitivity ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, cat. no. 88-8314-88) dle návodu výrobce.

Detekce IL-10 byla také provedena pomocí komerčně dodávaného kitu Mouse IL-10 (Interleukin-10, IL10) ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, cat. no. 88-7104-88) dle přiloženého návodu.

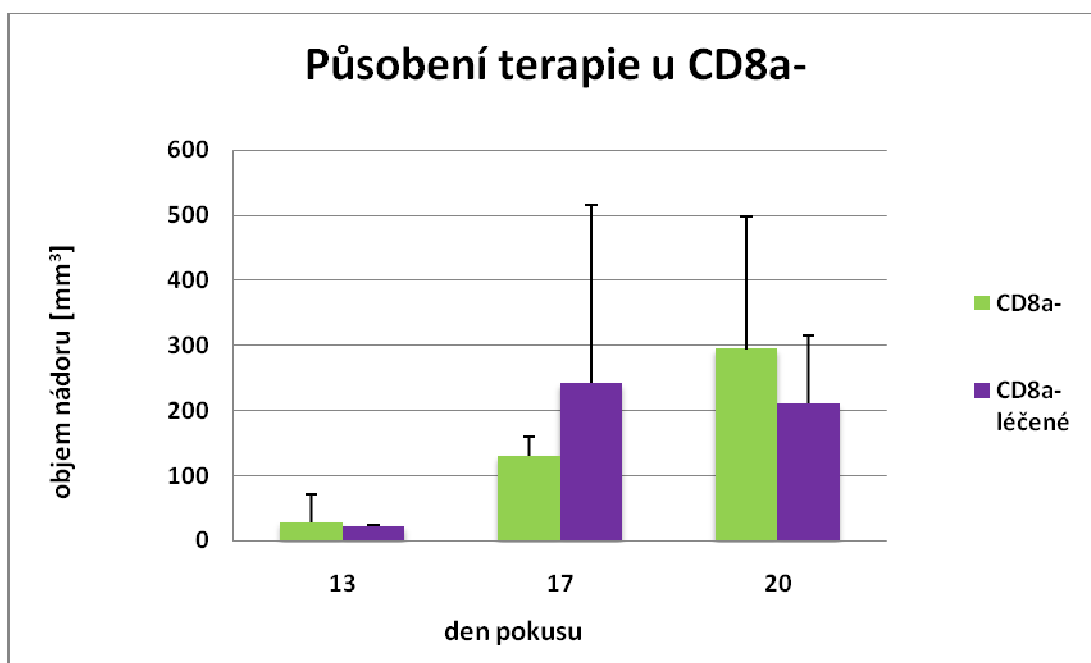


## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 STUDIUM VLIVU PROENZYMOTERAPIE NA RŮST NÁDORŮ U IMUNODEFICIENTNÍCH MYŠÍ

#### 4.1.1 Působení proenzymoterapie u CD8a- myší

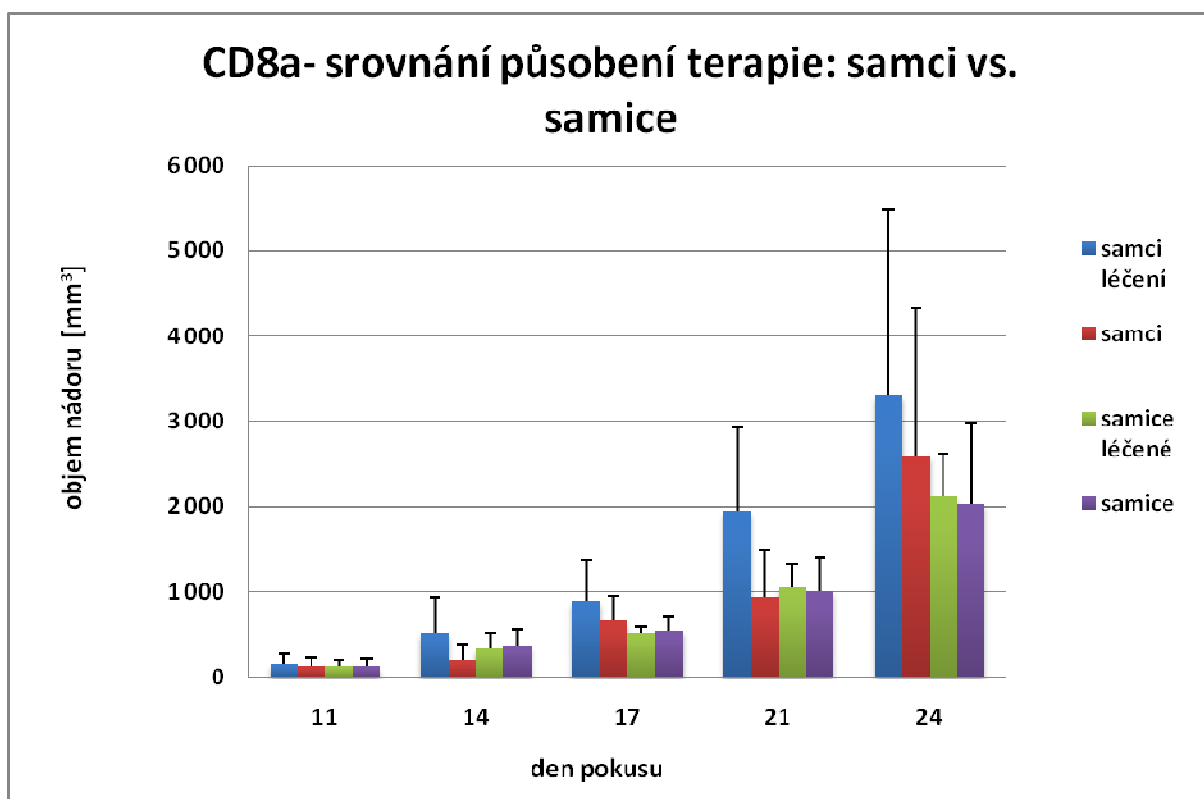
##### 4.1.1.1 1. experiment – působení terapie u CD8a- myší nesoucích melanom B16-F10



OBR. 3: PŮSOBNÍ TERAPIE U CD8A- MYŠÍ NESOUCÍCH MELANOM B16-F10

V tomto experimentu byl sledován vliv proenzymoterapie na růst nádorů u myší s defektním genem pro CD8 molekulu. Plán pokusu popisuje kapitola 3.5.1.1. Kontrolní C57BL/6 myši nebyly použity, jelikož účinek proenzymové směsi při terapii melanomu B16-F10 (více než 50% redukce růstu nádorů) byl již několikrát (7x) v minulosti statisticky významně potvrzen (Kalferstová 2008). Mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný rozdíl a z grafu lze vyčíst, že proenzymoterapie neměla na růst nádorů vliv (Obr. 3).

#### 4.1.1.2 2. experiment – CD8a- sledování vlivu pohlaví na působení proenzymoterapie a růst nádorů (melanom B16-F10)

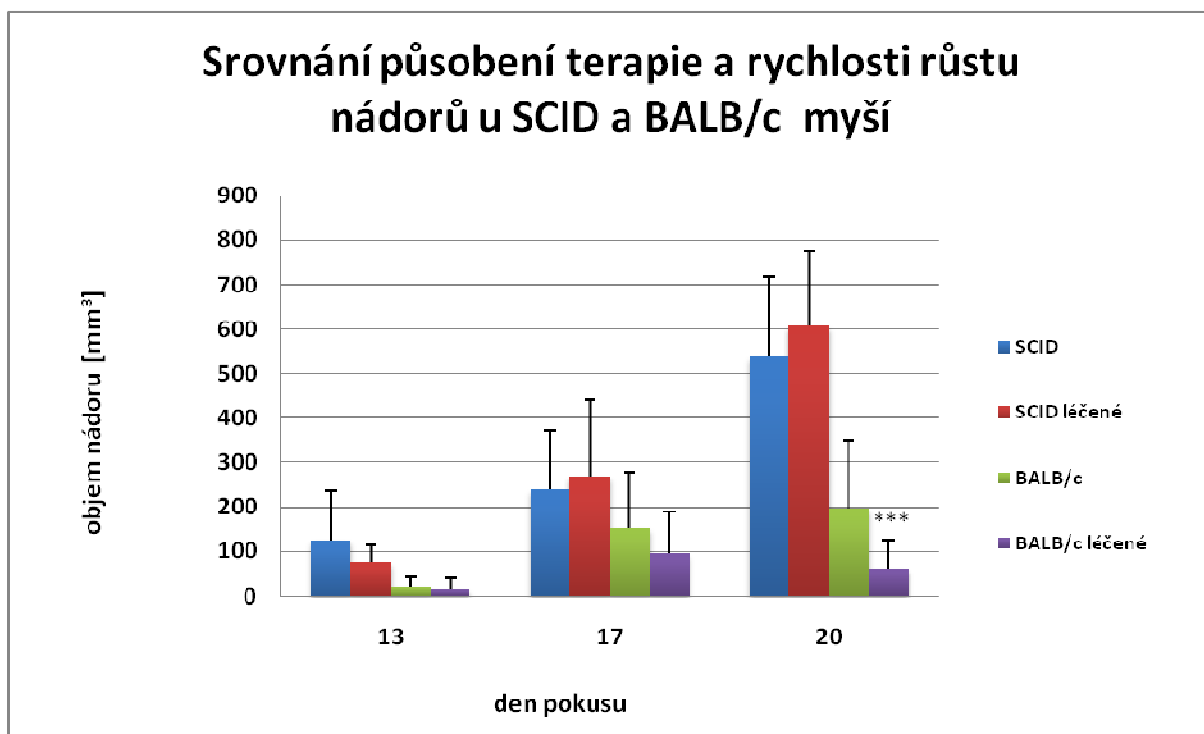


OBR. 4: SROVNÁNÍ PŮSOBNÍ TERAPIE MEZI CD8A- SAMCI A SAMICEMI

V tomto pokusu byl srovnáván vliv proenzymoterapie a pohlaví na růst nádoru. Schéma pokusu zachycuje kapitola 3.5.1.2. Z grafu (Obr. 4) je patrné, že nádory u samců rostly rychleji než u samic a působení směsi chymotrypsinogenu, trypsinogenu a amylázy mělo u samců spíše opačný než terapeutický účinek. Ve velikosti nádorů nebyl mezi léčenými a neléčenými samicemi stejně jako v předchozím experimentu rozdíl.

## 4.1.2 Působení proenzymoterapie u SCID myší

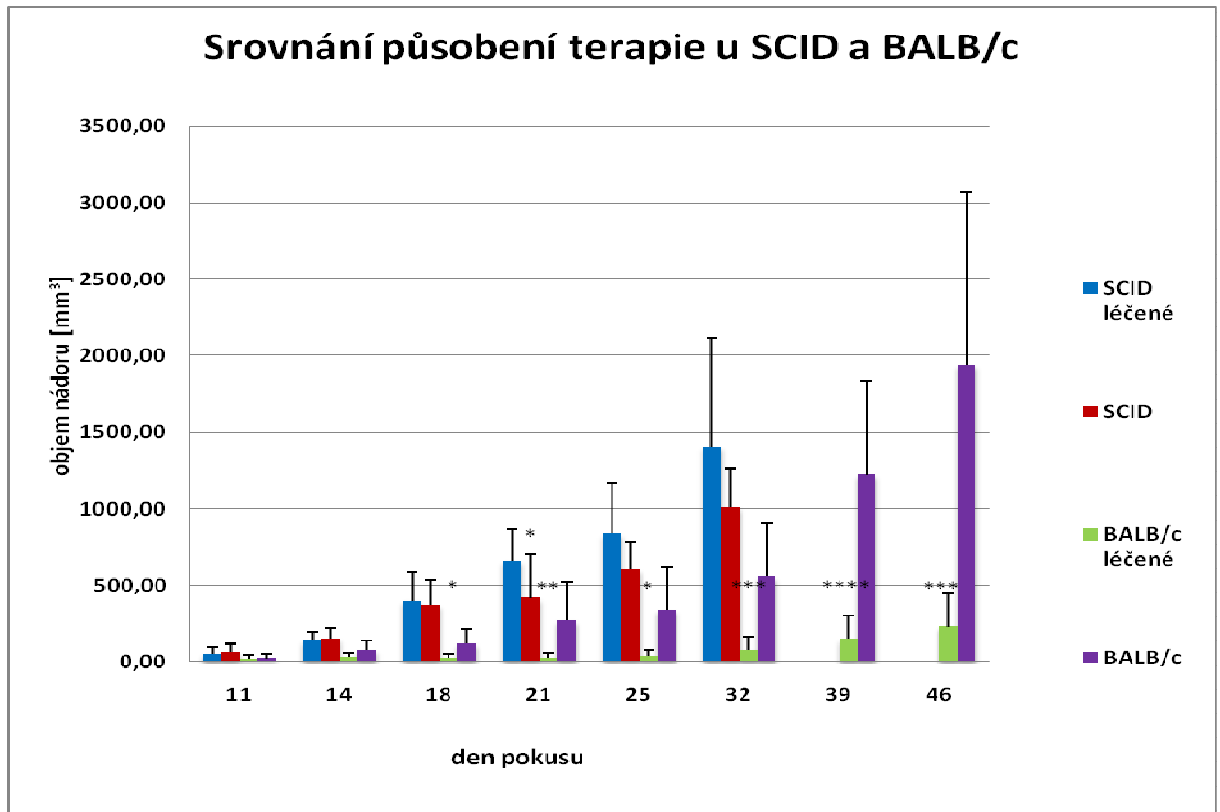
### 4.1.2.1 1. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u SCID a BALB/c myší na sarkomu S-180



**OBR. 5: SROVNÁNÍ PŮSOBNÍ TERAPIE A RYCHLOSTI RŮSTU SARKOMU S-180 U SCID A BALB/C MYŠÍ; \*\*\* =  $P < 0,0001$**

Cílem tohoto experimentu bylo srovnání působení terapie u SCID a BALB/c myší. Schéma tohoto pokusu je popsáno v kapitole 3.5.2.1. U imunodeficientních myší opět nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi léčenými a neléčenými samicemi (viz Obr 5). Nádory u imunodeficientních myší rostly podstatně rychleji než u zdravých myší. Terapie sarkomu S-180 u BALB/c myší dosáhla 20. den statisticky významného výsledku v redukci růstu nádorů.

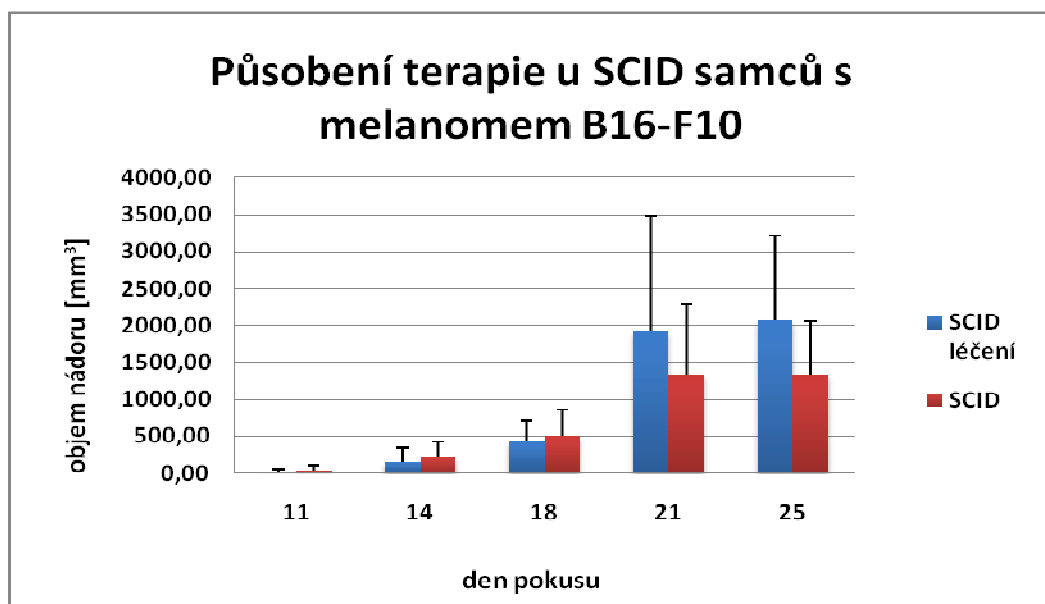
#### 4.1.2.2 2. experiment – srovnání působení proenzymoterapie u starších SCID a BALB/c myši na nádory sarkomu S-180



**OBR. 6: SROVNÁNÍ PŮSOBENÍ TERAPIE A RYCHLOSTI RŮSTU SARKOMU S-180 U SCID A BALB/C MYŠÍ; \* = P < 0,05, \*\* = P < 0,01, \*\*\* = P < 0,005, \*\*\*\* = P < 0,0005**

Stejně jako v předchozím experimentu byl sledován a srovnáván vliv proenzymoterapie na růst sarkomu S-180 u SCID a BALB/c myši. Schéma pokusu popisuje kapitola 3.5.2.2. U SCID myši neměla proenzymoterapie terapeutický účinek, naopak růst nádorů z neznámých důvodů stimulovala, tato skutečnost je v grafu (Obr. 6) jasně patrná, nicméně kromě 21. dne ( $P < 0,05$ ) nedosáhla hladiny statistické významnosti. Redukce růstu sarkomu pod vlivem terapie u BALB/c myši dosáhla 18., 21., 25., 32., 39. a 46. dne statistické významnosti. Po 32. dni byla část pokusu zahrnující SCID myši ukončena z důvodu příliš velkého objemu nádorů.

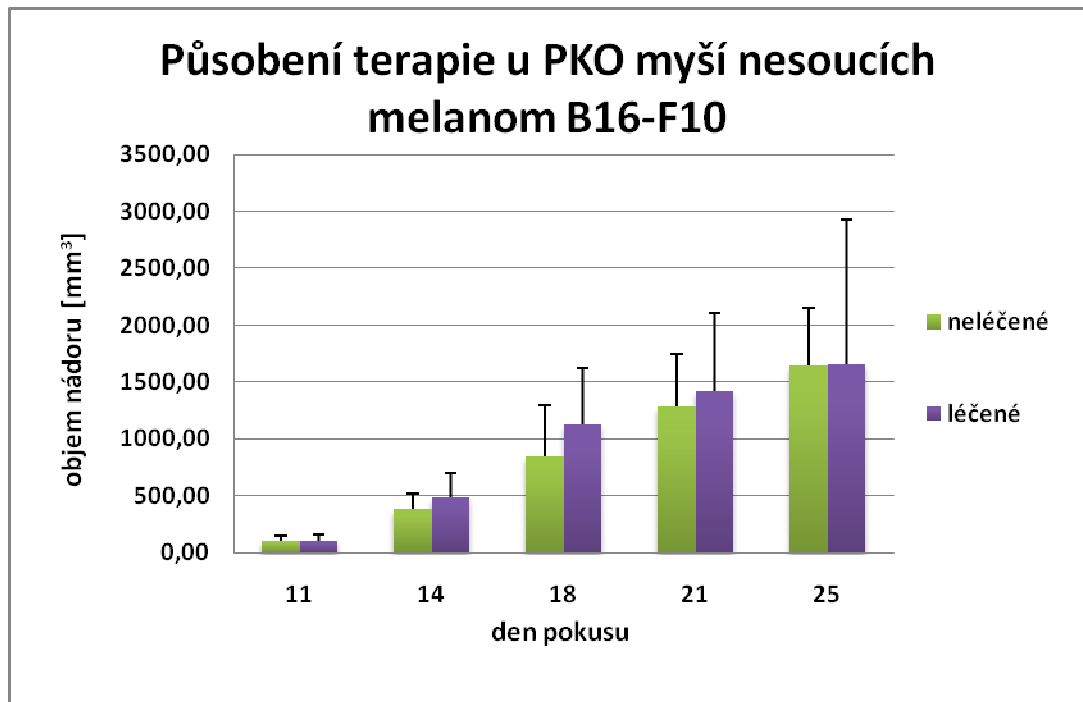
#### 4.1.2.3 3. experiment – proenzymoterapie melanomu B16-F10 u SCID samců



OBR. 7: PŮSOBENÍ TERAPIE NA RYCHLOST RŮSTU MELANOMU B16-F10 U SCID SAMCŮ

Hlavní cíle tohoto pokusu byly dva, sledování vlivu terapie na růst nádorů a sledování růstu melanomu B16-F10 u SCID samců. Plán tohoto pokusu je popsán v kapitole 3.5.2.3. Dle očekávání se melanom B16-F10 ujal u naprosté většiny samců. Samci byli vybráni z důvodu rychlejšího růstu nádorů. Stejně jako v předchozích dvou pokusech vykazala terapie opačný účinek a to stimulaci nádorového růstu, což je dobře patrné v grafu (Obr. 7).

#### 4.1.3 Působení terapie u PKO myši (terapie melanomu B16-F10)



**OBŘ. 8: PŮSOBNÍ TERAPIE NA RYCHLOST RŮSTU MELANOMU B16-F10 U PKO MYŠÍ**

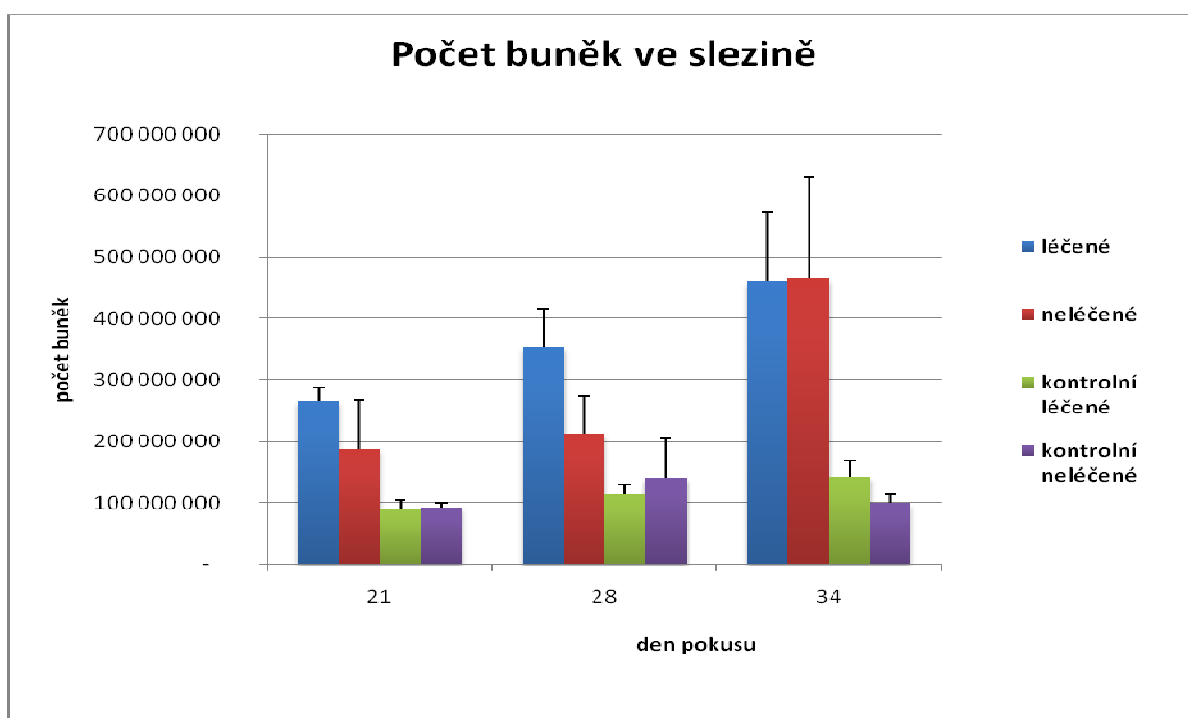
V tomto experimentu byl sledován vliv terapie na růst nádorů u myši s deficitem pro perforin. Plán experimentu popisuje kapitola 5.3.3. Stejně jako u CD8a- myši neměla terapie vliv na rychlost růstu nádorů (viz Obr. 8).

## 4.2 SLEDOVÁNÍ IMUNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ PŘI PROENZYMOTERAPII NÁDORŮ

### 4.2.1 Stanovení hladin CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, NK a NKT buněk a stanovení poměru Th1/Th2

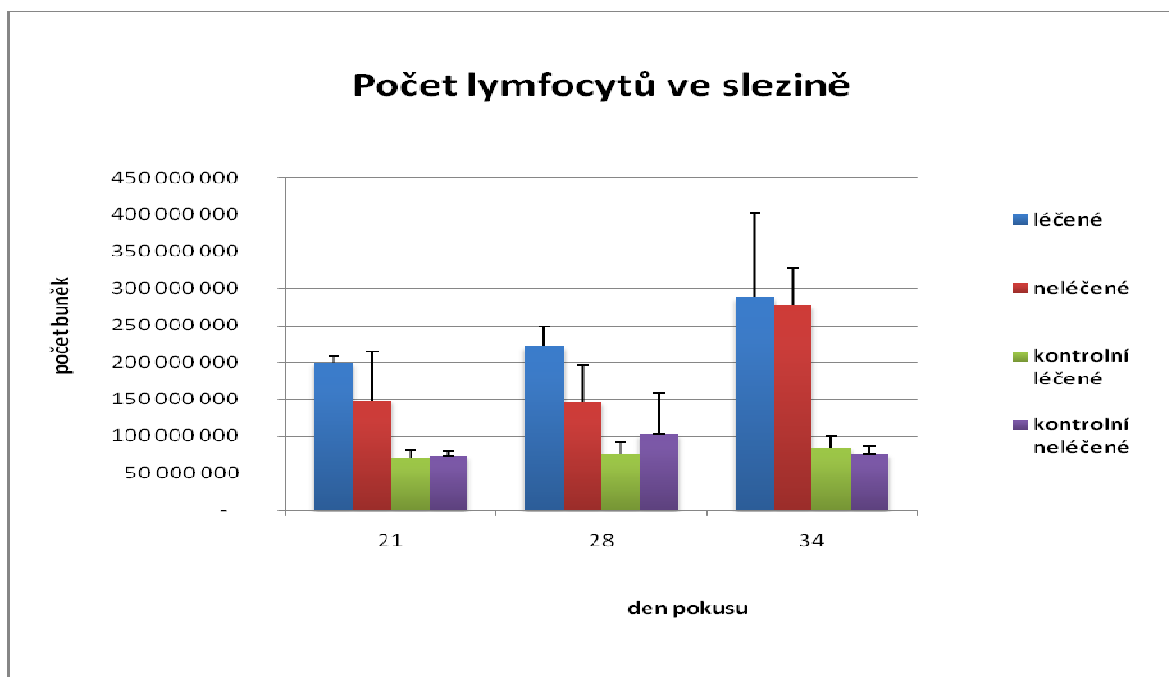
Tento pokus byl zaměřen na sledování imunologických parametrů, jako jsou hladiny CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, NK a NKT buněk ve slezině a poměru Th1/Th2 detekcí produkce IFN- $\gamma$  a IL-10 slezinnými buňkami. Podrobný popis pokusu je zahrnut v kapitole 3.6.2.

#### 4.2.1.1 Průtoková cytometrie – stanovení CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, NK a NKT buněk

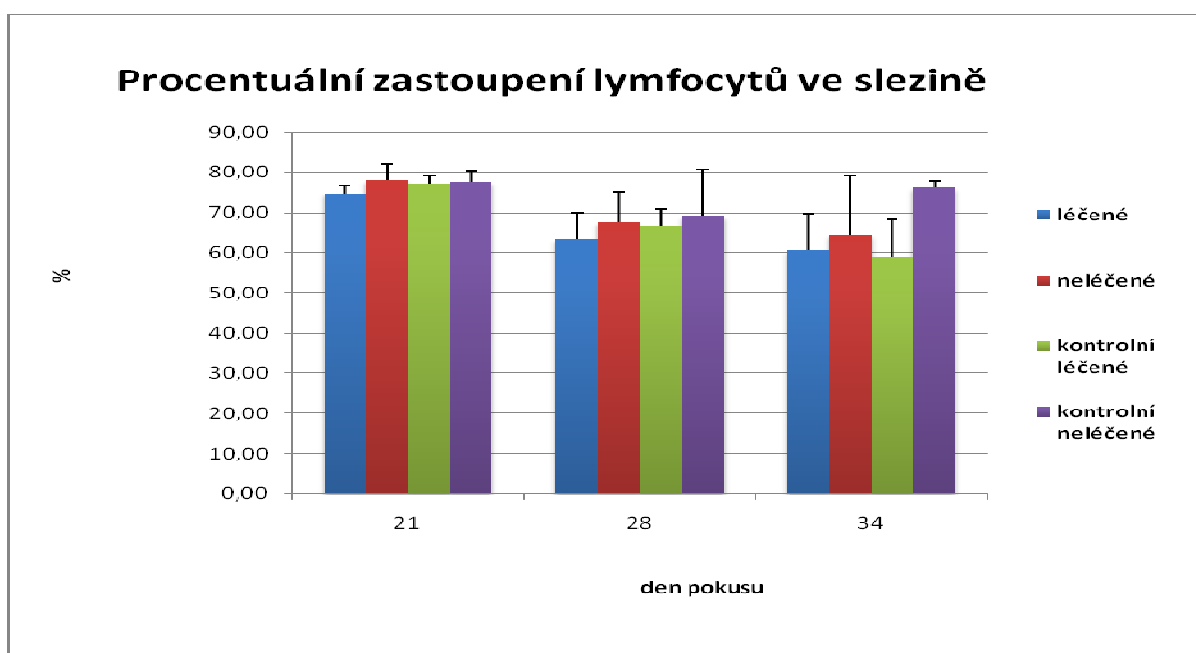


OBR. 9: POČET BUNĚK VE SLEZINĚ

Počet buněk sleziny rostl v průběhu pokusu úměrně s velikostí nádorů. Rovněž byl zaznamenán lehký vzestup počtu buněk u kontrolních léčených myší (viz Obr. 9).



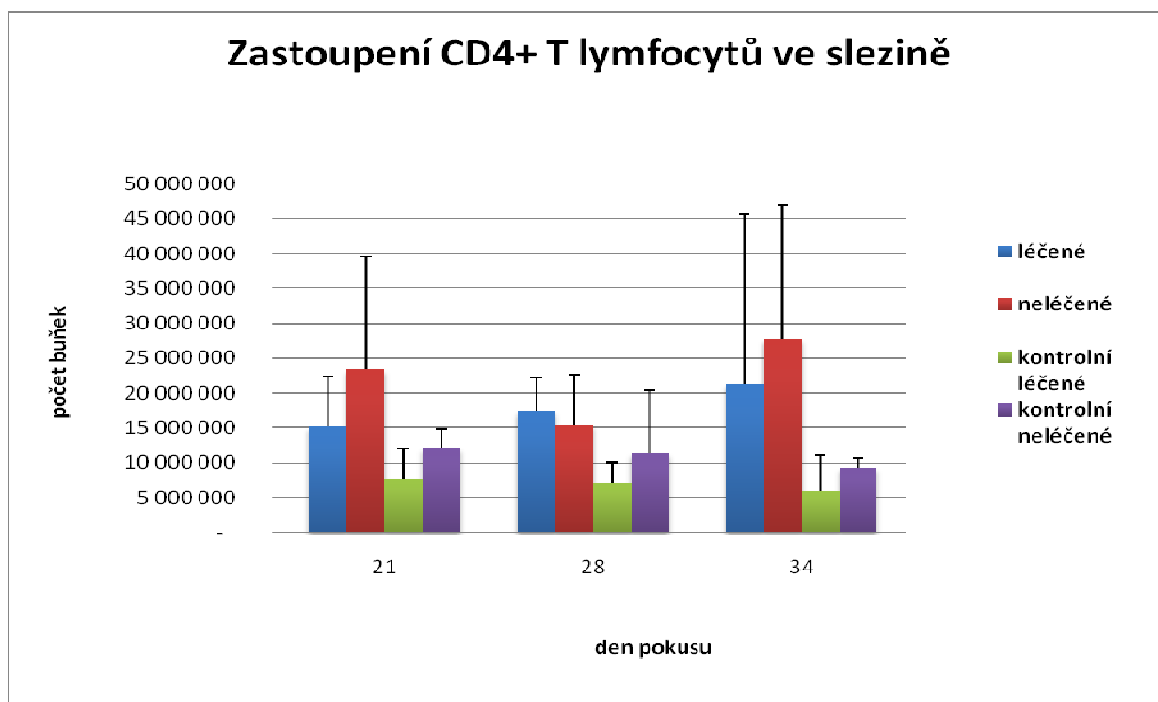
**OBR. 10: ZASTOUPENÍ LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ – POČET**



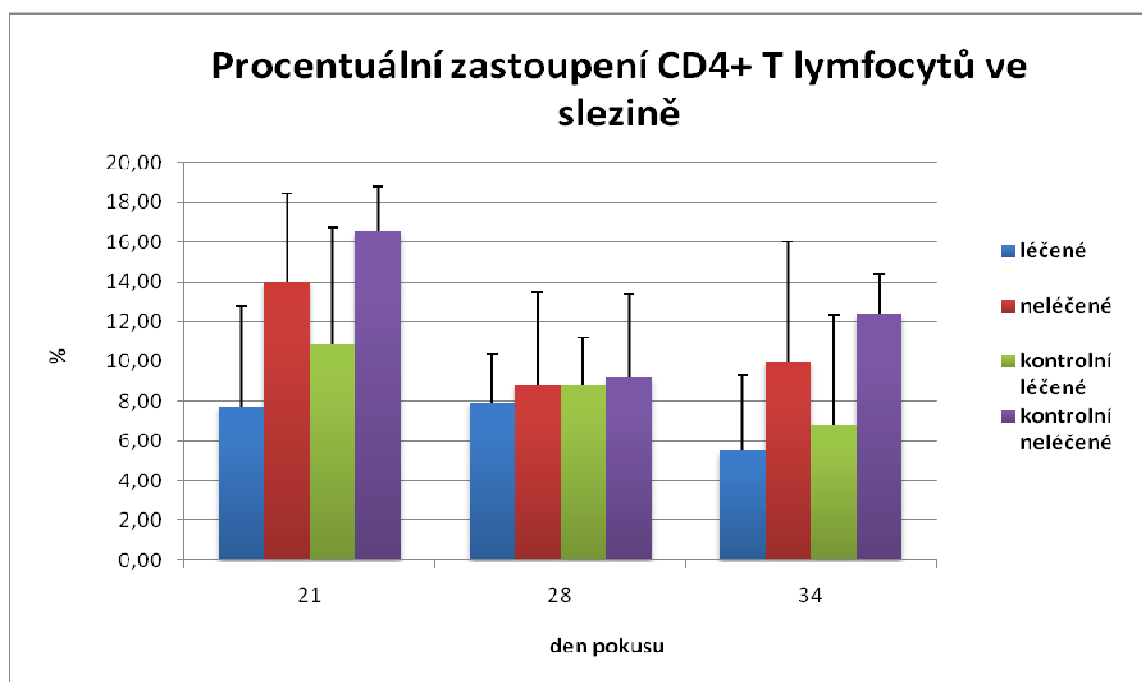
**OBR. 11: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ**

Poměrné zastoupení lymfocytů ve slezině odpovídalo poměru počtů buněk sleziny v jednotlivých skupinách (Obr. 10). Také rostlo úměrně s velikostí nádorů. Došlo ovšem ke snížení procentuálního zastoupení lymfocytů, které bylo spjaté s terapií i růstem nádorů. (viz Obr. 11)



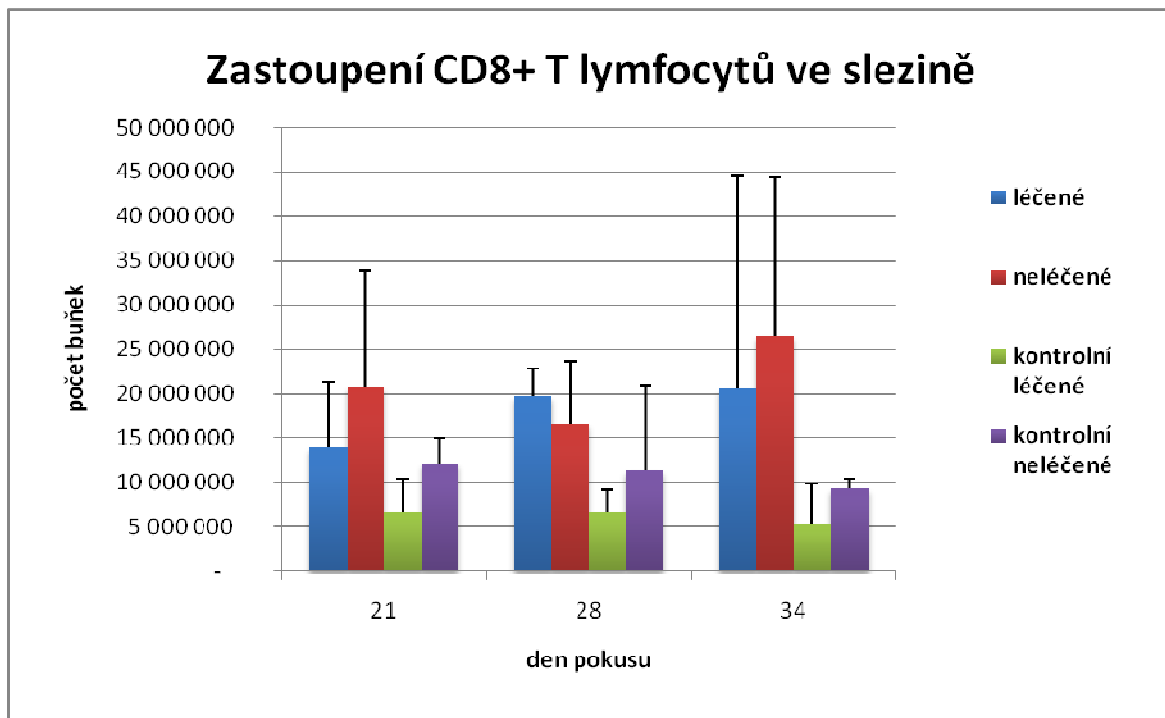


**OBR. 12: ZASTOUPENÍ CD4+ T LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ - POČET**

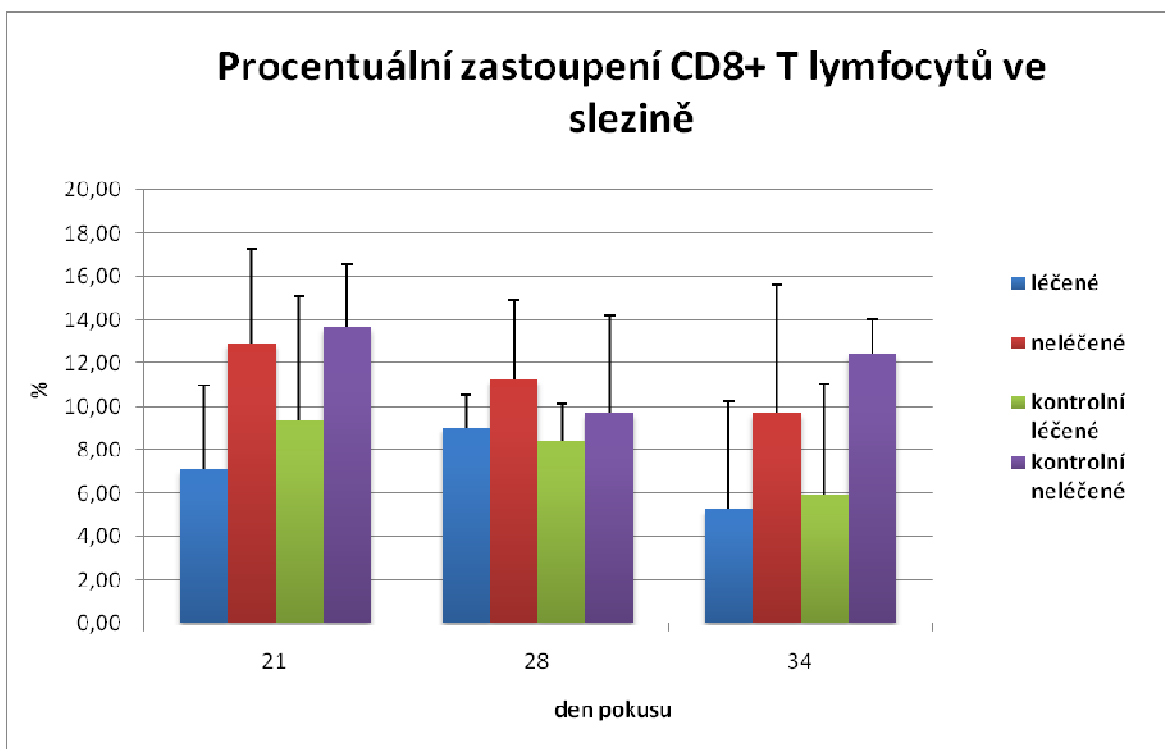


**OBR. 13: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ CD4+ T LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ**

U nádorových myší byl zaznamenán vzestup absolutního počtu CD4+ T lymfocytů (Obr. 12), jejich procentuální zastoupení se ovšem snižovalo (Obr. 13). U kontrolních léčených myší byl zaznamenán lehký pokles absolutního počtu i procentuálního zastoupení.

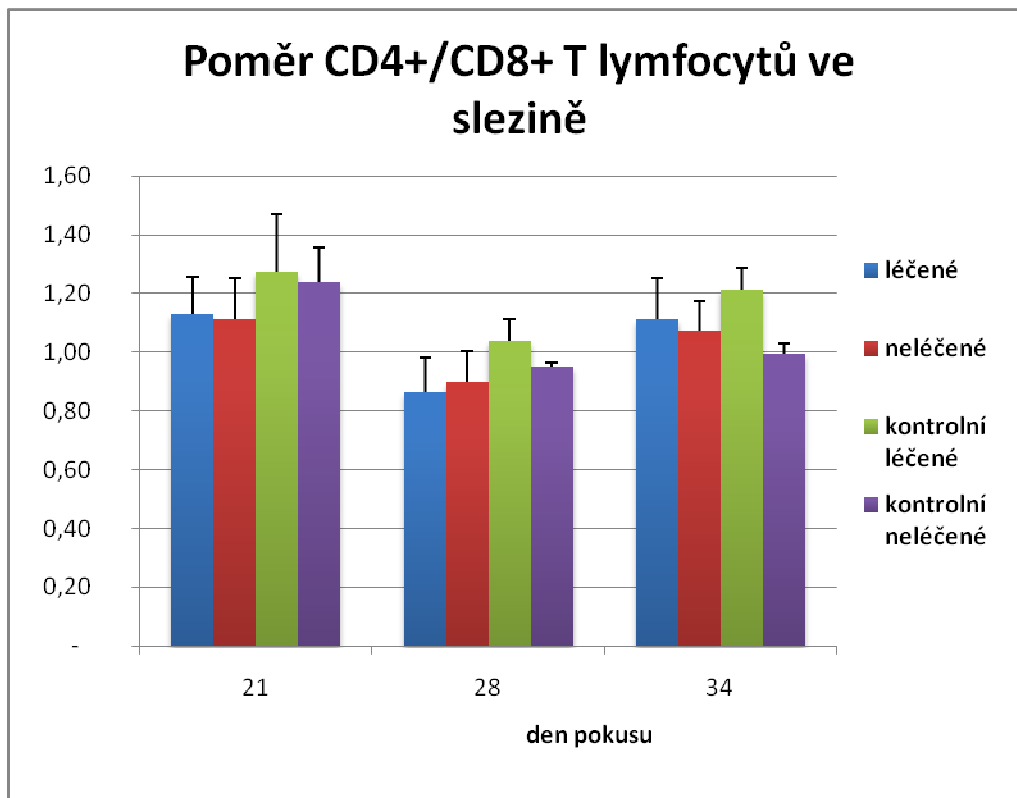


OBR.14: ZASTOUPENÍ CD8+ T LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ - POČET



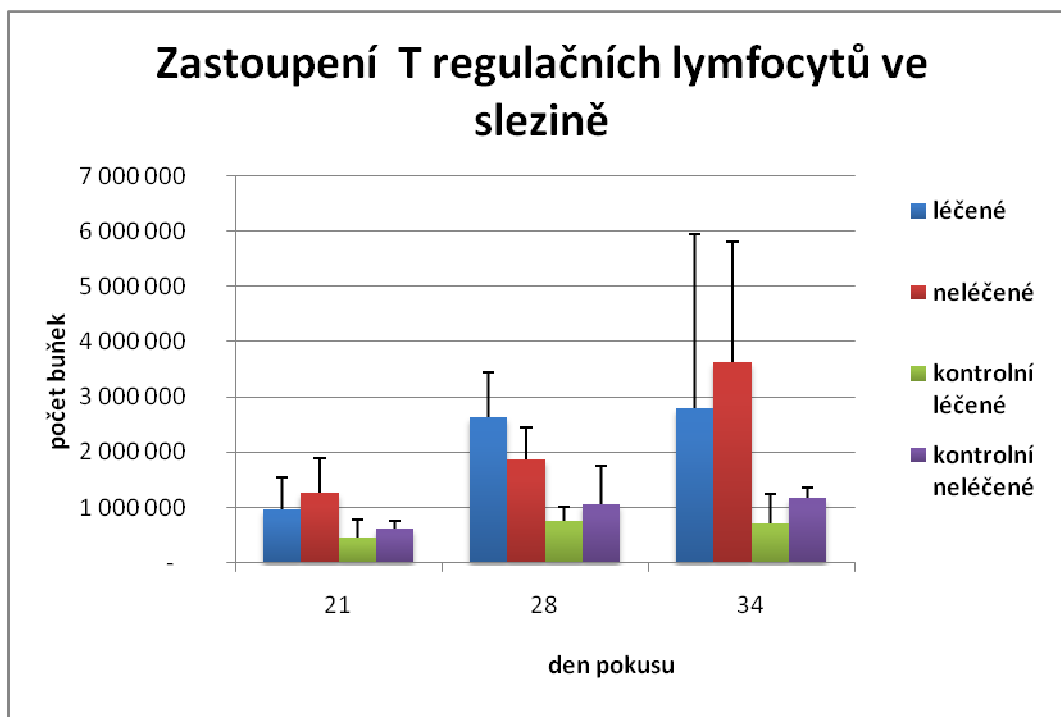
OBR.15: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ CD8+ T LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ

CD8+ T lymfocyty byly z hlediska absolutního počtu zvýšeny u nádorových myší (Obr. 14), nicméně snížení jejich procentuálního zastoupení bylo spojeno s velikostí nádorů a terapií (Obr. 15).

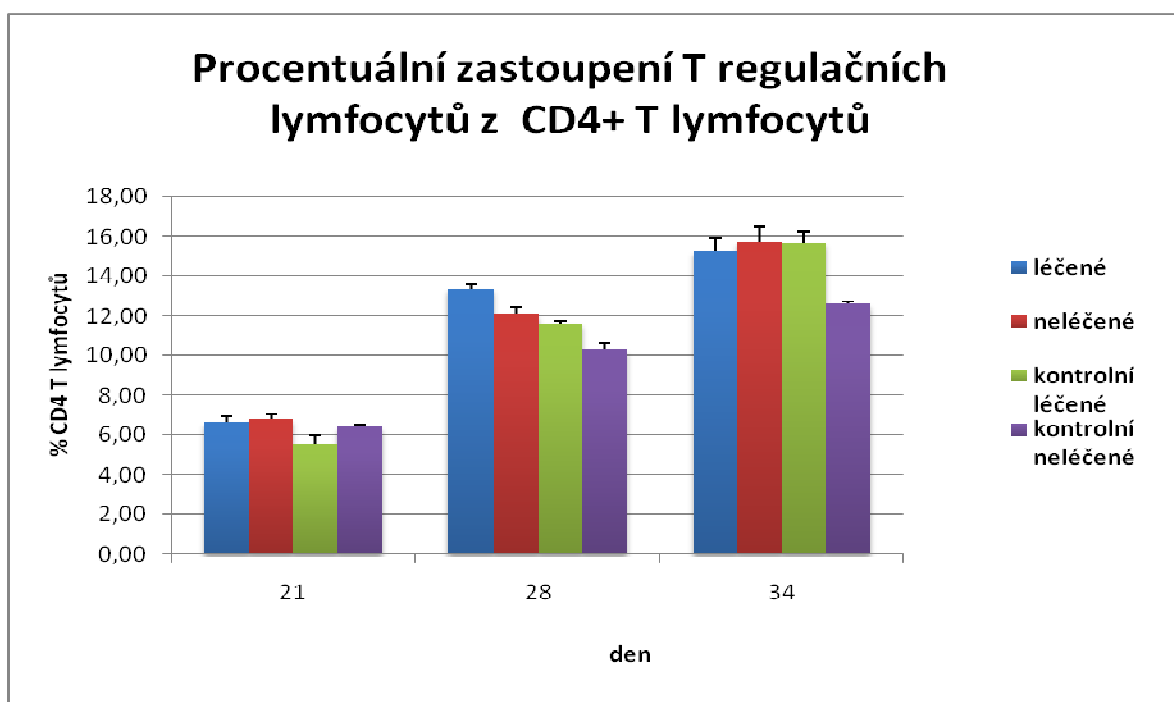


**OBR.16: POMĚR CD4/CD8 T LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ**

U všech myší (léčených i neléčených) došlo ke snížení poměru CD4+ a CD8+ T lymfocytů (viz Obr. 16).

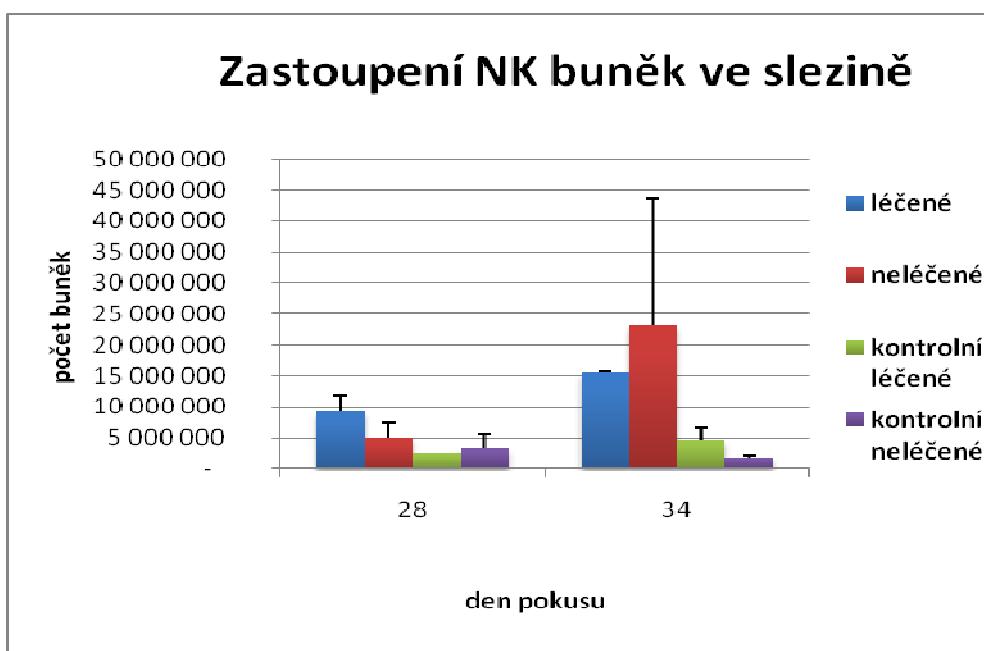


OBR.17: ZASTOUPENÍ CD4+CD25+ T REGULAČNÍCH LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ - POČET

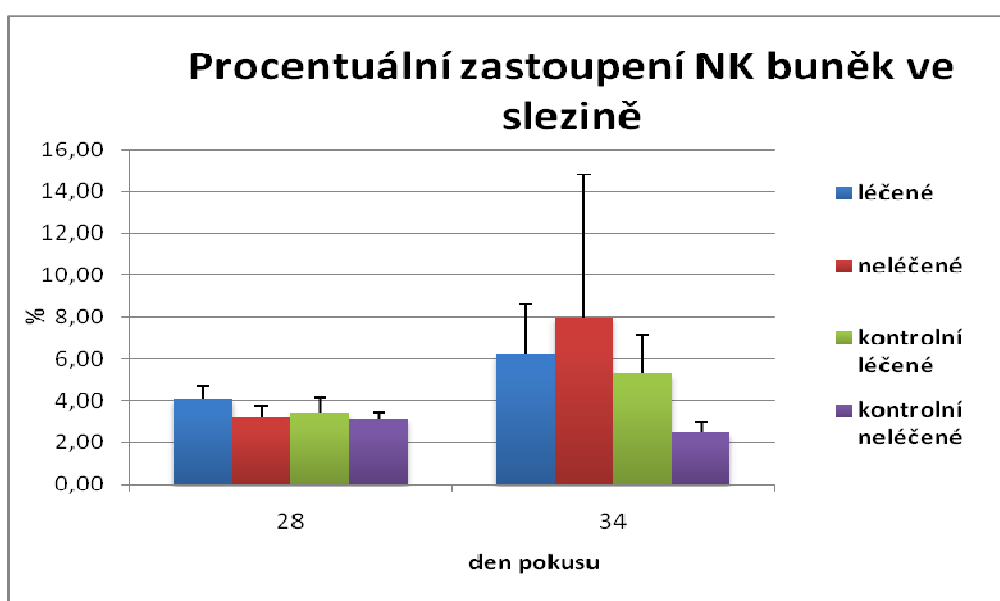


OBR.18: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ CD4+CD25 T REGULAČNÍCH LYMFOCYTŮ VE SLEZINĚ

Z hlediska absolutních počtů (Obr. 17) byly T regulační lymfocyty zvýšeny u myší nesoucích melanom B16-F10. Jejich procentuální zastoupení se ale v rámci skupin nelišilo (Obr. 18)

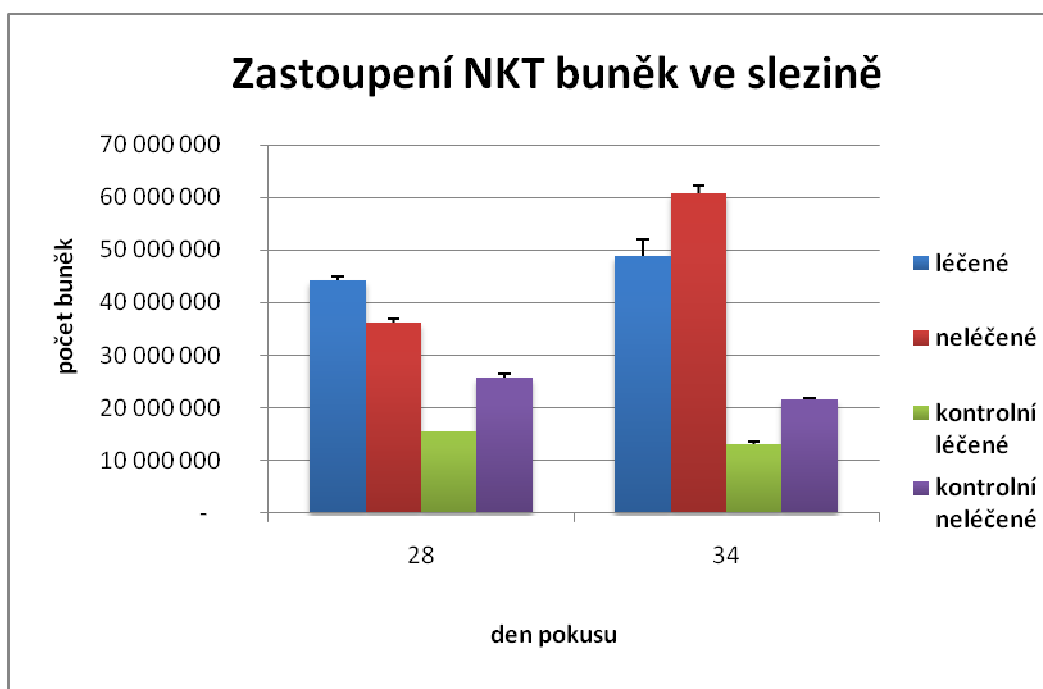


OBR.19: ZASTOUPENÍ NK BUNĚK VE SLEZINĚ - POČET

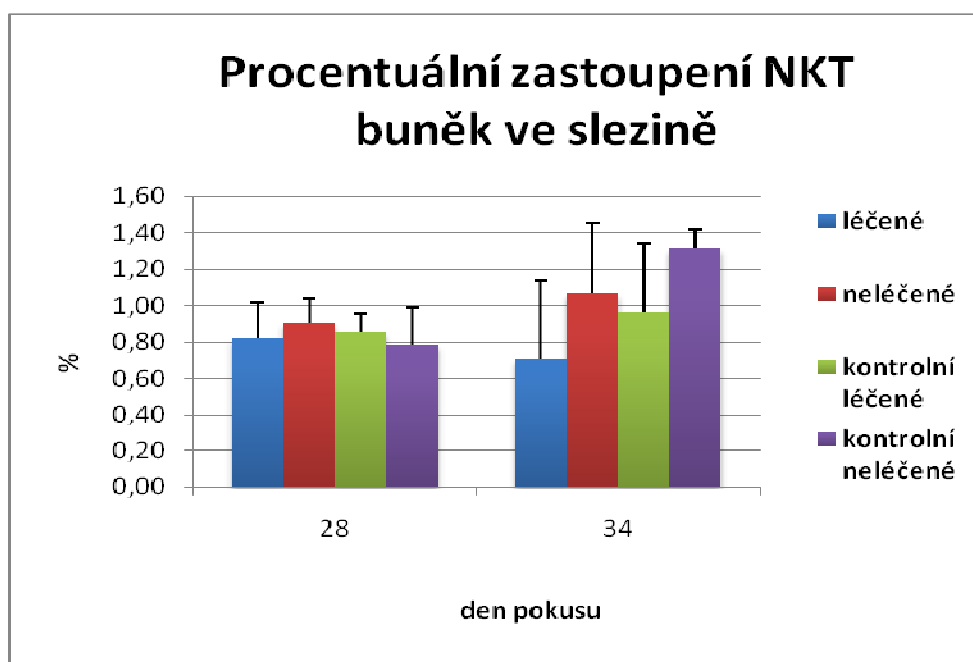


OBR.20: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ NK BUNĚK VE SLEZINĚ

Zastoupení NK buněk ve slezině bylo 28. den z hlediska absolutních počtů (Obr. 19) i procentuálního zastoupení (Obr. 20) mezi skupinami vyrovnané, 34. den však došlo k nárůstu jak počtu, tak procentuálního zastoupení u nádorových myší a skupiny kontrolních léčených myší.



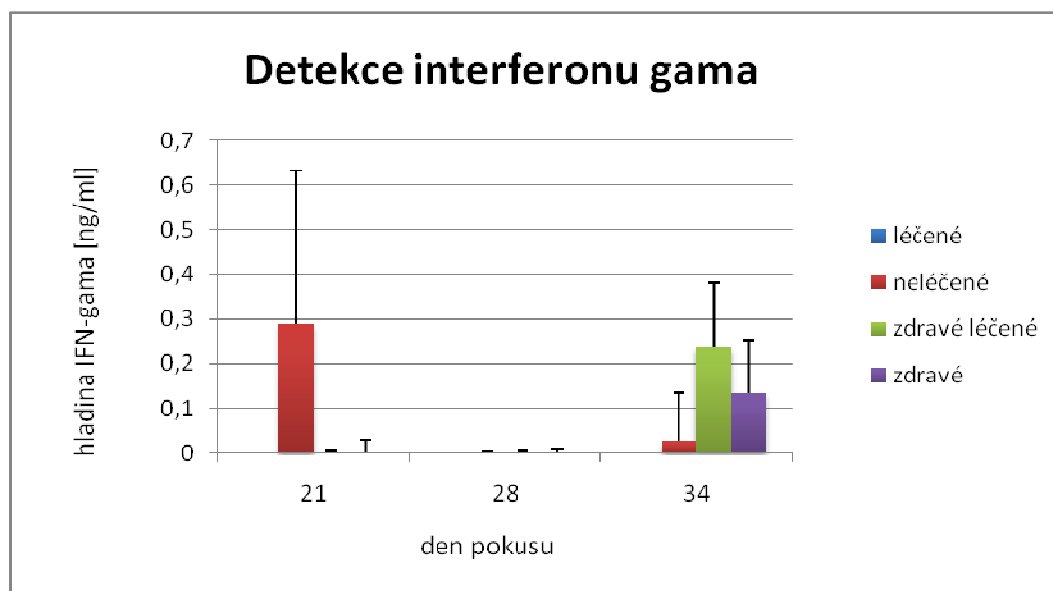
OBR.21: ZASTOUPENÍ NKT BUNĚK VE SLEZINĚ - POČET



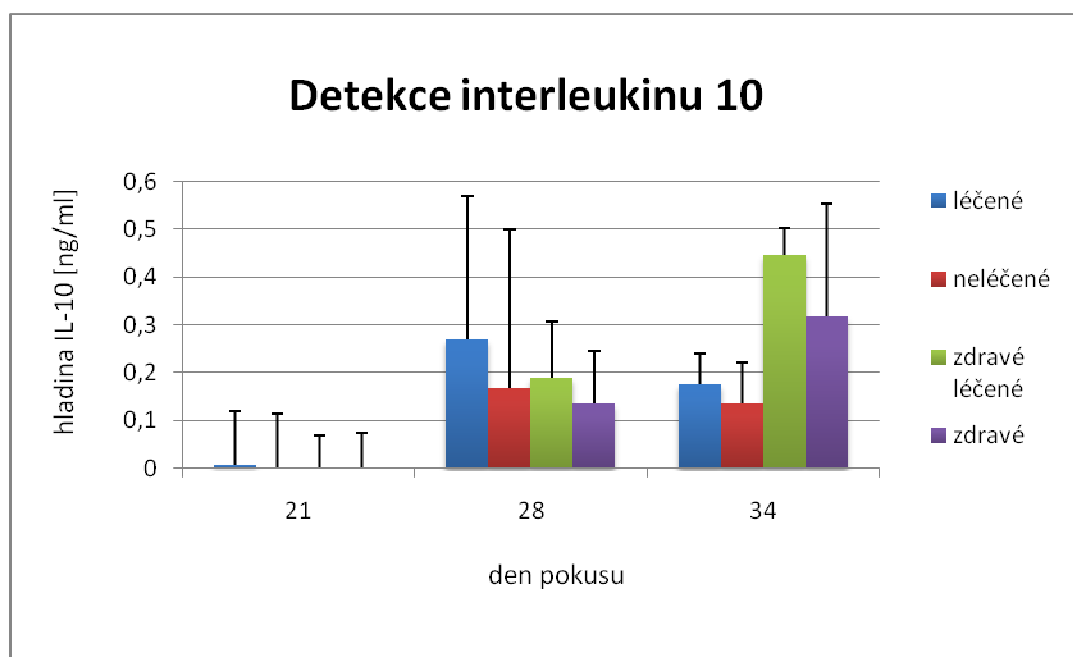
OBR.22: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ NKT BUNĚK VE SLEZINĚ

Počet NKT buněk byl výrazně zvýšen u myši nesoucích melanom B16-F10 (viz Obr. 21). Procentuální zastoupení (viz Obr. 22) bylo 28. den vyrovnané a 34. den lehce poklesla hladina NKT buněk u léčených myši s melanomem a vzrostla hladina těchto buněk u kontrolních myši.

#### 4.2.1.2 ELISA test – stanovení poměru Th1/Th2 na základě detekce cytokinů IFN- $\gamma$ a IL-10 v ex-vivo kulturách



OBR.23: DETEKCE IFN- $\gamma$  Z MÉDIA EX-VIVO KULTUR



OBR.24: DETEKCE IL-10 Z MÉDIA EX-VIVO KULTUR

V prvním bodě měření byl IFN- $\gamma$  detekovatelný pouze u neléčených myší s melanomem, u ostatních skupin byl IFN- $\gamma$  stejně jako 28. den na hranici detekovatelnosti (viz Obr 23). 34. den byla zaznamenána vyšší produkce interferonu u kontrolních léčených myší a neléčených myší. U neléčených myší s melanomem byla hladina interferonu oproti 21. dni snížena.

21. den experimentu byla produkce IL-10 splenocyty ve všech skupinách na hranici detekovatelnosti. 28. den byla zaznamenána nejvyšší produkce u obou léčených skupin a 34. den byla hladina interleukinu nejvyšší u kontrolních léčených myší (viz Obr 24).



## 5. DISKUSE

Hlavními cíly této práce bylo sledování vlivu proenzymoterapie nádorů u imunodeficientních myší a vlivu terapie a nádorové progresy na imunologické parametry. Dosavadní výsledky ukazují, že proenzymoterapie výrazně snižuje nádorový růst jak sarkomů (Kaiserová 2008), tak melanomů (Kalferstová 2008), snižuje metastazibilitu melanomu a prodlužuje přežití u myší bez imunodeficiency. Možným mechanismem by mohla být aktivace proenzymů v blízkosti nádorů (Novák a Trnka 2005). Podle této teorie se proenzymy mění v místě nádoru na aktivní enzymy a lokálně působí, je tedy vyžadováno menší množství proteáz než v případě systémové enzymoterapie. Aktivní enzymy pak aktivují alfa-2-makroglobulin a ten vazbou nádorem produkovaných cytokinů narušuje stav imunotolerance nádoru. Tento mechanismus však není plně experimentálně podložen (Desser a spol. 2001, Leipner a Saller 2000)

U myší bez získané imunity, tj. SCID myší bez T a B lymfocytů, myší s defektem pro CD8a molekulu a deficitem pro perforin proenzymoterapie selhávala a v některých případech, konkrétně u SCID myší, nádorový růst dokonce podporovala. Z tohoto pozorování tedy vyplývá, že je proenzymoterapie závislá na plnohodnotném imunitním systému a její působení je nepřímé, zprostředkované imunitním systémem. Ze skutečnosti, že u SCID myší léčba nejen nefungovala, ba dokonce podporovala růst nádorů, lze vyvodit, že roli v úspěšnosti léčby hrají nejen efektové CTL lymfocyty, ale i CD4+ T lymfocyty a B lymfocyty. Tato zjištění nejsou přímým důkazem mechanismů výše uvedených, ale jsou s nimi ve shodě a podporují je.

Pro podporu nádorového růstu pod vlivem terapie u SCID myší máme následující vysvětlení. Aktivní proteázy vznikající z proenzymů v místě nádorů (Novák a Trnka, 2005) převáděly lokálně alfa-2 makroglobulin do "fast" formy a docházelo k vychytávání cytokinů navozujících toleranci. Imunodeficientní myši se od myší s kompletní imunitou liší pouze různě hlubokými dopady tohoto jevu na fungování imunity. Na rozhraní tkáň-nádor působí enzymy spojené s přirozenou nádorovou invazivitou a dochází zde rovněž k aktivaci proenzymů. Před vyvázáním trypsinu a chymotrypsinu alfa-2-makroglobulinem zde mohlo docházet ke krátkodobému zvýšení proteolytické aktivity, jež působila na obě strany. Ve směru ke tkáni prohlubovala invazi nádoru a ve směru k nádoru vedla ke vzniku sféroidů (Novák a Trnka, 2005, Kaiserová a spol., *in prep.*). Vznik sféroidů může sice ovlivňovat

metastázování (Novák a Trnka, 2005), ale zřejmě nebyl pro růst nádorů rozhodující a tak v celkovém úhrnu byla nejspíše rozhodující podpora invazivity. Proto u imunodeficientních myší nádory rostly rychleji a bylo to patrné tím více, čím více imunita selhávala. U myší s nenarušenou imunitou pak převážil vliv podpory imunity.

Poznání principů působení (pro)enzymové terapie bude vyžadovat zřejmě ještě mnoho dalšího úsilí, ale i dosavadní poznatky mají bezprostřední praktický dopad. Proteázové přípravky pro systémovou enzymovou terapii různých onemocnění včetně nádorových nabízí řada firem. Přípravky jsou velmi často doporučovány jako podpůrné po chemoterapii. Imunitní systém je po chemoterapii vždy velmi vážně poškozen, tudíž vzhledem k výše uvedenému požadavku na plně funkční imunitu můžeme konstatovat, že uvedená doporučení jsou nesmyslná a používání těchto drahých preparátů je bohužel za popsanych okolností marné.

V průběhu experimentů docházelo k rapidnímu zvýšení počtu buněk sleziny, které bylo zjevně spjaté s nádorovým růstem a částečně i s terapií. V závislosti na působení terapie a na nádorovém růstu došlo ke snížení procentuálního zastoupení lymfocytů, neznamená to ovšem, že by došlo k redukci počtu lymfocytů, ten rostl s rostoucím počtem buněk sleziny, nicméně došlo k pomnožení jiných v tomto experimentu neidentifikovaných buněk.

Množství CD4+ a zejména CD8+ T lymfocytů se pod vlivem růstu nádorů zvyšovalo a jejich poměr se u všech myší změnil na 1:1, nicméně jejich procentuální zastoupení naopak jako v případě všech lymfocytů pod vlivem nádorového růstu a rovněž terapie klesalo. Stejně jako u počtu a procent lymfocytů se domníváme, že se tak dělo v souvislosti s růstem počtu buněk sleziny a pomnožení ostatních buněk.

Z hlediska absolutních počtů bylo zastoupení T regulačních lymfocytů zvýšené u myší nesoucích melanom B16-F10, jejich procentuální zastoupení však bylo oproti očekávání mezi skupinami vyrovnané a tento výsledek lze opět přičítat pouze zvýšenému počtu buněk ve slezinách myší nesoucích melanom. Dle výše uvedených představ o fungování proenzymoterapie (úloha alfa-2-makroglobulinu atd.) jsme očekávali výrazný pokles T regulačních lymfocytů u skupin léčených myší. Tento efekt se však systémově projevil jen částečně a jen při vyhodnocení počtu T regulačních lymfocytů. Pro jeho prokázání (či úplné vyvrácení) bude tedy třeba zanalyzovat prostředí samotných nádorů.

Pod vlivem nádorového růstu, ale hlavně terapie byl 34. den zaznamenán, jak procentuální, tak početní nárůst NK buněk. Tato skutečnost na rozdíl od ostatních parametrů nebyla závislá jen na počtu buněk sleziny.

Procentuální zastoupení NKT buněk bylo 28. den vyrovnané, 34. dne lehce poklesla hladina u myší nesoucích melanom a lehce se zvýšila hladina u kontrolních neléčených myší. V zásadě však výsledky korelovaly s velikostí sleziny.

Celkově to tedy znamená, že podobně jako růst nádorů měla i proenzymoterapie vliv na proliferaci buněk imunitního systému a jejich zmnožení ve slezině. A tato skutečnost měla nepřímý vliv na zvýšení počtu jednotlivých buněk imunitního systému. Pouze na NK buňky ovšem zapůsobila proenzymoterapie nejspíše přímo.

Během experimentu bylo zaznamenáno zvýšení produkce IL-10 a tím pádem posunutí Th1/Th2 rovnováhy směrem k Th2. Snížení produkce IL-10 34. den u myší nesoucích melanom si vysvětlujeme celkovým vyčerpáním organismu a tudíž i imunitního systému.

Zvýšení hladiny IL-10 rovněž vysvětluje zvýšení počtu NK buněk. IL-10 totiž nepřímo stimuluje jejich proliferaci (Carson a spol. 1995). Právě tato skutečnost by mohla být další částí skládky k nalezení mechanismu proenzymoterapie.

Cílem dalších studií by tedy mělo být odhalení „totožnosti“ buněk, které byly ve slezině zmnoženy, zjištění zastoupení B lymfocytů, monocytů/makrofágů a granulocytů, srovnání zastoupení jednotlivých buněk imunitního systému v krvi, slezině a případně v nádoru.

## 6. SOUHRN

- Byl potvrzen statisticky významný účinek proenzymoterapie na snížení růstu nádorů u BALB/c myší.
- U SCID myší rostly nádory rychleji než u kontrolních myší (BALB/c). U samců rychleji než u samic.
- Proenzymoterapie nefungovala u žádného z kmenů imunodeficientních myší (SCID, CD8a-, PKO).
- Závislost proenzymoterapie na plně funkčním imunitním systému koreluje s uvažovaným mechanismem vázání cytokinů navozujících toleranci do komplexu s aktivovaným alfa-2-makroglobulinem, není však přímým důkazem tohoto mechanismu.
- Nepřímé (na imunitě závislé) působení proenzymoterapie poukazuje na nutnost používat terapie založené na působení proteáz jen u lidí s nenarušenou imunitou, tedy ne např. po chemoterapii.
- Byl zjištěn prudký vzestup počtu buněk sleziny u C57BL/6 myší nesoucích melanom B16-F10 pod vlivem nádorového růstu, ale i proenzymoterapie.
- Pod vlivem zvýšení počtu buněk sleziny došlo ke zvýšení počtu CD4+, CD8+ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů a NKT buněk, jejich procentuální zastoupení však u nádorových myší buď klesalo (CD4+, CD8+ T lymfocyty), nebo zůstalo srovnatelné s ostatními skupinami.
- Proenzymoterapie, stejně jako nádorový růst, vykazovala vliv na zvýšení počtu i procentuálního zastoupení NK buněk.

## 7. LITERATURA

- AnLab Ltd., [www.anlab.cz](http://www.anlab.cz), 1/4/2010
- Asselin-Paturel C, Echcharkir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, Chouaib S, Mami-Chouaib F: Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta 1 cytokine expression in tumor, TIL and PLB of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 77: 7
- Bach JF: Regulatory T cells under scrutiny; *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 189-198
- Bainbridge WS: *The Enzyme Treatment for Cancer*; Committee on Scientific Research. New York Skin and Cancer Hospital; 1909: 39 pp
- Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow?; *Lancet* 2001; 357: 539–545
- Beard J. The action of 'trypsin' upon living cells of the Jensen sarcoma. *Brit Med J* 1906;1:140-141
- Beard J. *The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis*. London, Chatto and Windus 1911.
- Becker JC, Czerny C, Bröcker EB: Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10; *Int Immunol.* 1994; 6(10): 1605-12
- Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U: Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1; *J Immunol* 1995; 155: 1066
- Bendelac A, Rivera MN, Park S, Roark JH: MOUSE CD1-SPECIFIC NK1 T CELLS: Development, Specificity, and Function; *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15:535–62
- Berg DJ, Zhang J, Lauricella DM, Moore SA: Il-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production; *J Immunol.* 2001; 166(4): 2674-80
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196: 254-265
- Binstadt BA, Brumbaugh KM, Leibson PJ: Signal transduction by human NK cell MHC-recognizing receptors. *Immunological Reviews* 1997; 155 (1):197.

- Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells; *Nat. Rev Immunol.* 2003; 3: 253-257
- Boháček I: Děravá pravda o perforinu; *Vesmír* 1994; 8(73): 473
- Campbell JT: Trypsin treatment of a case of malignant disease, involving the left tonsil, base of tongue and epiglottis; *JAMA* 1907; 48: 225-226
- Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, Narula S, Caligiuri MA: The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells; *Blood.* 1995; 85(12): 3577-85
- Cleaves MA: Pancreatic ferments in the treatment of cancer and their role in prophylaxis. *Med. Record* 1906; 70: 918-919
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset; *Blood.* 2001; 97(10): 3146-51
- Curiel TJ: Tregs and rethinking cancer immunotherapy; *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1167-1174
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes; *J Exp Med.* 1991; 174(5): 1209-20
- de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE: Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation; *J Immunol.* 1993; 150(11): 4754-65
- Deodhar SD: Enhancement of Metastases by L-Asparaginase in a Mouse Tumor System; *Nature* 1971; 231: 319-321
- Desser L, Holomanova D., Závadová E., Pavelka K., Mohr T., Herbáček I.: Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF- $\beta$  levels in human blood. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2001; 47: S10-S15.
- Fargeas C, Wu CY, Nakajima T, Cox D, Nutman T, Delespesse G: Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes; *Eur J Immunol.* 1992; 22(8): 2173-6
- Fearon EC: Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *SCIENCE* 1997 278: 1034 – 1050

- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones; *J Exp Med.* 1989; 170(6): 2081-95
- Garigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Velluci VF, Reiss M: Missense mutations of transforming growth factor  $\beta$  type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells; *Cancer Res* 1995; 55: 3982
- Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L: The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression; *Immunol. Rev.* 2006; 214: 229-238
- Godfrey DI, Kronenberg M: Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells; *J. Clin. Invest* 2004; 114:1379–1388
- Gold LI: The role for transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in human cancer; *Crit. Rev. Oncogenes* 1999; 10: 303
- Golley FB Two cases of cancer treated with trypsin; *Med. Record* 1909; 75: 804-805
- Golley FB: Two cases of cancer treated by the injection of pancreatic extract; *Med.Record* 1906; 70: 918-919;.
- Hamilton TA: Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. In *The Macrophage, 2nd Edition* (Bourke, B.L., C., ed.), 2002; Oxford University Press, Oxford, UK (in press).
- Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG: alpha/beta-T cell receptor (TCR) +CD4–CD8– (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL-)-4 and/or IL-10; *J Exp Med* 1998;187:1047–1056.
- Harthun NL, Weaver AM, Brinckerhoff LH, Deacon DH, Gonias SL, Slingluff CL: Activated alpha 2-macroglobulin reverses the immunosuppressive activity in human breast cancer cell-conditioned medium by selectively neutralising transforming growth factor-beta in the presence of interleukin-2; *J Immunother* 1997;21(1):85-94.
- Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY: The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; 18(10):493-7.

- Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY: The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction; *Immunol Today* 1997; 18(10):493-7.
- Jax Mice Database, The Jackson laboratory, <http://jaxmice.jax.org>, 1/4/2010
- Jerud ES, Bricard G, Procelli SA: CD1d-Restricted Natural Killer T Cells: Roles in Tumor Immunosurveillance and Tolerance; *Transfus Med Hemother* 2006;33:18–36
- Jones HB, Chaikoff IL, Lawrence JH: Radioactive Phosphorus as an Indication of Phospholipid Metabolism. IV. The Phospholipid Metabolism of Neoplastic Tissues (Mammary Carcinoma, Lymphoma, Lymphosarcoma, Sarcoma 180). *J. Biol. Chem.* 1939; 128: 631-644
- Kaiserova P, Kalferstova L, Marsikova H, Bartonova I, Konik P, Kopecky J, Zenka J: (Pro)enzyme therapy of sarcoma S-180 and melanoma B16-F10; in prep. 2010
- Kaiserová P: Proenzymová terapie sarkomu S-S180; bakalářská práce; Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity; 2008
- Kalferstová L: Proenzymoterapie melanomu B16F10; bakalářská práce; Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity; 2008
- Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dobinett SM, Mc Hugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K: IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T-cell immune response. *J Immunol* 1995; 155:2240
- Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens; *J Immunol* 1983; 131:1789–1796.
- Leipner J, Saller L: Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action; *Drugs*. 2000; 59(4): 769-8
- Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH: Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells; *J. Immunol* 2005;175: 4180-4183
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L: The origin and function of tumor-associated macrophages; *Immunol. Today* 1992; 13: 265–270
- Mantovani A: The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* 1999; 20: 254–257
- Marek I.: Melanoma malignum, [www.orl.cz](http://www.orl.cz), 20/3/2010



- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor; *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 683-765
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins; *J Immunol* 1986; 136: 2348–2357
- Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more; *Immunol Today* 1996; 17: 138–146
- Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M: Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model; *Life Sciences* 2002; 70 (7): 791-798(8)
- Novak JF, Trnka F: Proenzyme therapy of Cancer. *Anticancer research* 2005; 25: 1157-1178.
- Omiya R, Buteau C, Kobayashi H, Paya CV, Celis E: Inhibition of EBV-induced lymphoproliferation by CD4+ T cells specific for an MHC class II promiscuous epitope; *J Immunol* 2002; 169: 2172–2179
- Onishi T, Onishi Y, Imagava K, Ohmoto Y, Murata K: An assessment of immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. *British Journal of Urol Int* 1999; 83: 488.
- Ortel JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP: Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small-cell lung carcinoma; *Cancer Immunol Immunother.* 2000; 48(11): 627-34
- Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL: IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity; *J Immunol.* 1992; 148(11): 3578-82
- Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK, Prime SS: Decreased expression of TGF- $\beta$  cell surface receptor during progression of human oral squamous cell carcinoma; *J Pathol* 2001; 193: 458
- Pinson DM, LeClaire RD, Lorsbach RB, Parmely MJ, Russell SW: Regulation by transforming growth factor-beta 1 of expression and function of the receptor for IFN-gamma on mouse macrophages; *J Immunol.* 1992; 149(6): 2028-34
- Pizinger K: Diferenciální diagnostika pigmentových lézí ve vyšším věku; *ČES GER REV* 2006; 4(1)

- Poggi A, Zocchi ML: Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells; *Arch Immunol Ther Exp* 2006; 54: 323–333
- Raulet DH: Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat. Immunol* 2004; 5:996–1002.
- Raulet DH: Natural killer cells; *Fundamental Immunology* 1999: 365–391.
- Říhová B: Protinádorová imunita a cílená terapie. *Buněčné a molekulární základy Imunologie*, Česká Imunologická společnost 2007, 169-179.
- Sato Y, Kobori S, Sakai M, Yano T, Higashi T, Matsumura T, Morikawa W, Terano T, Miyazaki A, Horiuchi S, Shichiri M: Lipoprotein(a) induces cell growth in rat peritoneal macrophages through inhibition of transforming growth factor-beta activation; *Atherosclerosis*. 1996; 125(1):15-26
- Shohat B, Joshua H: Host defence mechanisms in the spontaneous regression of S-180; *Eur.J.Canc* 1969; 5 (1): 69-72, IN7, 73-75
- Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT: Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 339-359.
- Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC: Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta; *J Immunol* 1991; 146(10): 3289-97.
- Strassmann G, Cole MD, Newman W: Regulation of colony-stimulating factor 1-dependent macrophage precursor proliferation by type beta transforming growth factor; *J Immunol* 1988; 140: 2645
- Terabe M, Berzofsky AJ: NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis; *Tren Immunol* 2007, Volume 28, Issue 11, 491-496
- U.S. National Cancer Institute, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov), 20/3/2010
- Wald M, Oleár T, Poučková P, Zadinová M: Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sciences* 1998; 63 (17), 237-243.
- Wald M, Oleár T, Šebková V, Zadinová M, Boubelík M, Poučková P: Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends

survival time of C<sub>17</sub>Bl<sub>6</sub> mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47 (Suppl): S16-S22.

- Webb DJ, Weaver AM, Atkins BTL, Gonias SL: Proteinases are isoform-specific regulators of the binding of transforming growth factor beta to alpha 2-macroglobulin. *Biochem.J.* 1996;320, 551-555.
- Weedon D, LeBoit P, Burg G, Sarasin A: *Pathology and Genetics of Tumours of the Skin* 2005; 360 pages, ISBN 92 83 22414 0
- West J, Munoz-Antonia T, Johnson JG, Klotch D, Muro-Cacho CA: Transforming growth  $\beta$  type II receptors and smad proteins in follicular thyroid tumors; *Laryngoscope* 2000; 110: 1323
- Yang YA, Dukhanina O, Tang B, Mamura M, Letterio JJ, MacGregor J, Patel SC, Khozin S, Liu ZY, Green J, Anver MR, Merlino G, Wakefield LM: Lifetime exposure to a soluble TGF- $\beta$  antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest* 2002; 109 (12):1607-15.