

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Studium terapie nádorových onemocnění pomocí  
kationických antimikrobiálních peptidů**

Bakalářská práce

**Hana Husníková**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Husníková H., 2012: Studium terapie nádorových onemocnění pomocí kationických antimikrobiálních peptidů [Study of cancer therapy using cationic antimicrobial peptides. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of these thesis was to study cationic antimicrobial peptides as new cytotoxic drugs for cancer treatment. We tried to compare the effect of various peptides on murine B16-F10 melanoma cells in both *in vitro* and *in vivo* experiments.

**Prohlášení:**

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

**Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.**

V Českých Budějovicích, 26. 4. 2012

.....

Hana Husníková

**Poděkování:**

V této části bakalářské práce bych chtěla poděkovat především svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení bakalářské práce, za vytvoření příjemného studijního prostředí a za ochotu mi kdykoliv a s čímkoliv pomoci. Velký dík samozřejmě patří i mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu mého studia velice podporují.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1. Nádorové onemocnění neboli rakovina .....	1
1.1.1. Historie nádorového onemocnění .....	1
1.1.2. Vznik nádoru .....	2
1.1.3. Klasifikace nádorů .....	2
1.1.4. Faktory vyvolávající nádorové bujení .....	3
1.1.5. Výskyt nádorů .....	4
1.2. Maligní melanom .....	4
1.2.1. Vznik melanomu .....	4
1.2.2. Klasifikace .....	5
1.2.3. Klinický obraz maligního melanomu .....	6
1.2.4. Melanom B16 .....	6
1.3. Diagnostika nádorů .....	7
1.3.1. Diagnostické metody: .....	7
1.4. Terapie nádorů .....	8
1.4.1. Chirurgická léčba .....	8
1.4.2. Radioterapie .....	9
1.4.3. Chemoterapie .....	9
1.4.4. Biologická léčba .....	10
1.5. Imunologie nádorů .....	10
1.5.1. Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem .....	12
1.6. Imunoterapie .....	12
1.6.1. Imunoterapie založená na monoklonálních protilátkách .....	13
1.6.2. Imunoterapie pomocí buněčných mechanismů .....	13
1.6.3. Imunoterapie založená na komplementu .....	14
1.7. Imunoterapie založená na vrozené imunitě .....	15
1.7.1. Buňky vrozené imunity .....	15
1.7.2. Vrozená imunita a rakovina .....	16
1.8. Terapie nádorových onemocnění pomocí kationických antimikrobiálních sloučenin (CAPs) .....	18
1.8.1. Antimikrobiální peptidy .....	18
1.8.2. Struktura antimikrobiálních peptidů .....	19

1.8.3. Mechanismy účinku kationických antimikrobiálních peptidů .....	19
1.8.3.1. Peptidy narušující cytoplasmatickou membránu .....	20
1.8.3.2. Jiné mechanismy účinku antimikrobiálních peptidů .....	20
1.8.4. Terapeutický potenciál kationických antimikrobiálních peptidů .....	20
1.8.5. Kationické antimikrobiální peptidy jako nová cytostatika v terapii nádorového onemocnění.....	21
<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Materiály a metody.....</b>	<b>23</b>
3.1. Chemikálie .....	23
3.2. Experimentální zvířata.....	23
3.3. Buňky melanomu B16-F10.....	23
3.3.1. Příprava buněk myšního melanomu B16-F10 pro <i>in vivo</i> pokusy .....	24
3.4. Příprava primokultury z morčecích ledvin pro <i>in vitro</i> pokusy .....	24
3.5. Transplantace myšního melanomu B16-F10 .....	25
3.6. Měření a statistické vyhodnocení dat .....	25
3.6.1. Měření velikostí nádorů během terapie .....	25
3.6.2. Měření teplot myši během terapie .....	25
3.6.3. Statistické vyhodnocení dat .....	25
3.7. Pokus č. 1: <i>In vitro</i> studium vlivu CAPs na buňky melanomu B16-F10 a na buňky morčecích ledvin .....	26
3.8. Pokus č. 2: <i>In vivo</i> studium vlivu CAPs na růst melanomu.....	26
3.9. Pokus č. 3: <i>In vivo</i> studium závislosti účinku CAPs na koncentraci. Ověření možnosti prohloubení účinku CAPs na základě manosilace .....	27
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>28</b>
4.1. Pokusu č. 1: <i>In vitro</i> studium vlivu CAPs na buňky melanomu B16-F10 a na buňky morčecích ledvin .....	28
4.2. Pokusu č. 2: <i>In vivo</i> studium vlivu CAPs na růst melanomu.....	29
4.3. Pokusu č. 3: <i>In vivo</i> studium závislosti účinku CAPs na koncentraci. Ověření možnosti prohloubení účinku CAPs na základě manosilace .....	34
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Seznam použité literatury .....</b>	<b>41</b>

## **1. Úvod**

### **1.1. Nádorové onemocnění neboli rakovina**

Rakovina je obecný název pro skupinu více než 100 typů onemocnění. Během této nemoci se populace vlastních buněk vymyká kontrole buněčných mechanismů a začíná autonomně růst. Neléčená rakovina může způsobit vážná onemocnění a velmi často smrt.

Rakovina není příliš vhodný název pro nádorové onemocnění, správně bychom měli toto onemocnění nazývat neoplazmaty či nádorovým bujením. Podle doložitelných statistických údajů je úmrtí na zhoubné nádory druhou nejčastější příčinou smrti a představuje zhruba 20 % všech úmrtí (Klener a kol. 1996).

#### **1.1.1. Historie nádorového onemocnění**

I když se rakovina do našeho povědomí dostala teprve nedávno, v moderní době, neznamená to, že je novodobým onemocněním. Od nejstarších dob si lékaři lámali hlavu s tím, co může být příčinou rakoviny. Už ve starověkém Egyptě se lékaři potýkali s rakovinou, ale nevěděli, co ji vyvolává. Vinili proto bohy. Řecký léčitel Hippokrates, který rozdělil osobnosti na čtyři typy podle převažujících tekutin v těle (krev, hlen, žlutá a černá žluč), přišel s myšlenkou, že nadbytek černé žluči v různých částech těla způsobuje rakovinu. Tato teorie o rakovině byla předána Římanům, ale zůstala bez povšimnutí po více jak 1300 let. Během tohoto období byly studie lidského těla, včetně pitev, zakázány z náboženských důvodů. Omezil se tak pokrok celé lékařské vědy. Do konce 18. století lidé věřili, že rakovina se může šířit stejně jako morová nákaza, proto nemocní lidé museli být izolováni, nejlépe ven z obcí a měst, aby se zabránilo šíření rakoviny. Na přelomu 18. a 19. století se začaly objevovat názory, že nádorové bujení vzniká z tělní tekutiny, z tzv. lymfy. V první polovině 19. století němečtí lékaři tvrdili, že rakovina je způsobena rakovinnými buňkami, které ale nepocházejí z normálních buněk. Tyto rakovinné buňky se vyvíjely ze vznikajících elementů, tzv. blastomů. Dalším názorem bylo, že příčinou vzniku rakoviny je chronické dráždění a že se rakovina „šíří jako kapalina“. Ale tento názor byl v druhé polovině 19. století vyvrácen německým chirurgem, který dokázal, že rakovina metastazuje prostřednictvím šířících se zhoubných buněk, a ne jako nějaká „kapalina“. Na konci 19. století byli patologové schopni rozeznávat maligní a benigní léze a rakovina se začala léčit pomocí chirurgického odstranění nádoru. V roce 1895 bylo objeveno rentgenové záření a záhy potom se radioterapie připojila k chirurgické

léčbě. V roce 1940 se poprvé použila chemoterapie, ale mezi základní léčebné metody byla zařazena až od 50. let 20. století. V 70. letech přišli vědci s myšlenkou, že za vznik nádorového bujení jsou zodpovědny buněčné geny, ale nevěděli, jak tuto myšlenku prakticky potvrdit. Až v 80. letech se jim to podařilo díky technologii rekombinační DNA. Touto technologií byl objeven gen *src*, poté co byl přezkoumán virus, zodpovědný za kuřecí sarkom (Olson 1989).

### 1.1.2. Vznik nádoru

Nádorové bujení vzniká následkem maligní transformace v jedné buňce, která se vymyká všem zákonitostem zdravých tkání. Nádorová buňka se od zdravé buňky liší imunologicky a morfologicky. Dále se liší částečně odlišným metabolismem, ale především změnou genetické informace (Klener a kol. 1996).

Každá buňka má v sobě od počátku svého vzniku zakódovaný „plán“, který rozhoduje o počtu buněk, dělení a rozlišování buněk během života člověka. Nádorové buňky mají tento „plán“ narušený, a proto se neřídí regulačními mechanismy jako všechny zdravé buňky. Výsledkem je neorganizovaný a neregulovaný růst buněk nádorových (Pacovský 1993). Při tomto neregulovaném dělení buněk vzniká z jedné maligní buňky celá nádorová populace, tzv. klon (Klener a kol. 1996).

### 1.1.3. Klasifikace nádorů

Pro klasifikaci nádoru je třeba znát morfologii nádoru, a to z hlediska histologického anebo cytologického, mluvíme o tzv. typizaci. Důležitou roli hraje lokalizace nádoru, tzn. místo, kde nádor vznikl (Pacovský 1993).

Podle biologického chování rozlišujeme novotvary do dvou skupin, a to na nezhoubné benigní a zhoubné maligní nádory. Jedná se o primární klasifikaci.

**Nezhoubné benigní nádory** mají ohraničený růst, jejich buňky nemají schopnost pronikat do okolních tkání, tzv. metastazovat. Ale jejich okolní růst může okolní tkáň a orgány ohrozit (Pacovský 1993).

**Zhoubné maligní nádory** mohou pronikat do okolních tkání a destruovat je (ničit je). Mají schopnost metastazovat, tzv. zakládat vzdálená ložiska krevními a mízními cévami. Metastazování neboli zakládání druhotných ložisek je hlavním projevem malignity zhoubných nádorů (Pacovský 1993).

Sekundární klasifikací je klasifikace novotvarů podle tkáňového původu. Nádory pojivové tkáňe jsou pojmenovány podle tkáňe, kterou postihují. Např. benigními nádory

mohou být fibromy (vazivo), myomy (hladké svalstvo) a chondromy (chrupavka). Maligní nádory pojivové tkáně se nazývají sarkomy. Adenomy a papilomy jsou benigní nádory epiteliální tkáně, karcinomy jsou maligní nádory. Mezi nádory hematopoetické tkáně se řadí leukémie a lymfomy, do této skupiny spadá i Hodgkinův lymfom. Meningiomy a neurofibromy jsou benigní nádory nervové soustavy. Maligními nádory jsou neuroblastomy a retinoblastomy. Mezi nádory ze zárodečných tkání řadíme teratomy, které jsou benigní. Seminomy a embryonální karcinomy jsou malignity zárodečné tkáně (Franks a Teich 1999).

#### 1.1.4. Faktory vyvolávající nádorové bujení

Nádorové buňky se od buněk zdravých značně liší, ale liší se i mezi sebou. A to například stupněm zhoubnosti, průběhem onemocnění a prognózou, vlastnostmi růstu, citlivostí k léčbě. Z toho vyplývá, že určení příčiny vzniku nádorů není jednoduché, jednotné a ani identické.

Přes intenzivní výzkumy se doposud nepodařilo plně odhalit přesné příčiny a mechanismus vzniku nádorů. Ale existují skupiny faktorů, které mohou vyvolat vznik nádorů. Jedná se o tzv. kancerogenní faktory, které mají převážně biologický, chemický a fyzikální charakter.

**Biologické faktory:** Vzniku některých druhů nádorů se mohou účastnit viry. Jedná se například o viry z čeledi Papillomaviridae, tzv. papilomaviry, které jsou původcem karcinomu děložního čípku. Nebo se jedná o viry z čeledi Herpesviridae, tzv. herpetické viry, jako je například virus Epstein-Barrové spojovaný se vznikem Burkittova lymfomu anebo virus HTLV-1, který způsobuje vznik některých typů leukémie a lymfomů.

**Chemické faktory:** Chemickými karcinogeny jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky, které jsou obsaženy ve výfukových plynech, tabákovém kouři, dehtu či v průmyslových exhalacích. Dalšími karcinogeny jsou nitrosaminy, které jsou obsaženy v uzených potravinách a konzervačních prostředcích, a aflatoxiny vznikající v plísňích rostoucích na různých druzích potravin.

**Fyzikální faktory:** Hlavním fyzikálním faktorem je ionizující záření, jehož účinek může způsobovat vznik leukémie, sarkomy či jiné nádory. Důkazem tohoto objevu je větší výskyt leukémií u populace, která přežila výbuch atomových bomb či elektráren (atomové bomby - Hirošima a Nagasaki, atomová elektrárna - Černobyl) anebo u lidí pracujících na rtg odděleních. Dalším důkazem je výskyt četných karcinomů plic u horníků pracujících v uranových dolech.



**Jiné faktory vyvolávající nádorová onemocnění:** Mezi jiné faktory, které vyvolávají vznik nádorového bujení, můžeme zařadit například alkohol, příliš solená a kořeněná jídla, nedostatek vlákniny a nadměrnou konzumaci tučných jídel. Jiným faktorem může být také promiskuita, tzn. příliš časně zahájení sexuálního života a časté střídání sexuálních partnerů. To vede u žen ke vzniku karcinomu děložního čípku.

**Faktory dědičné:** I když nádorová onemocnění nejsou dědičná, členové některých rodin mají mnohem větší riziko, že se u nich vyskytne nádor. Důležitá je proto podrobná rodinná i osobní anamnéza (Pacovský 1993).

### **1.1.5. Výskyt nádorů**

Nádory se vyskytují v různých tkáních. Největší výskyt nádorů je však tam, kde dochází k největšímu množení buněk, např. dýchací, trávicí soustava, nebo tam, kde jsou stimulovány hormony, jako např. vaječníky, prsy či prostata (Pacovský 1993).

## **1.2. Maligní melanom**

Maligní melanom je řazen mezi nejzhoubnější nádory vzhledem k jeho agresivnímu chování. Vzniká invazivní neoplastickou proliferací melanocytů převážně na kůži a v oku. Může se vytvořit i v jiných orgánech, jako např. v plicích, trávicím ústrojí, močovém měchýři či ve vaječnících, ale zde je jeho výskyt méně častý (Krajsová a Bauer 1994).

Výskyt maligního melanomu neustále stoupá i přes všechna preventivní opatření. Největší výskyt tohoto nádoru u bílé rasy je v oblastech s vysokou intenzitou slunečního záření. Z toho vyplývá, že největším rizikovým faktorem je UV záření. Jinými faktory jsou kožní fenotypy I a II, genetické mutace a dědičné predispozice. Častěji se maligní melanom vyskytuje u žen, ale mortalita je vyšší u mužů. Pravděpodobně je to dáno tím, že muži přicházejí k lékaři mnohem později než ženy, v době, kdy projevy melanomu jsou dosti nepříznivé (Krajsová a Bauer 1994).

### **1.2.1. Vznik melanomu**

Melanom vzniká invazivní neoplastickou proliferací melanocytů. Melanocyty jsou diferencované dendritické buňky, které produkují pigment melanin. Jejich původ je v neurálním zárodečném listu. Většina melanocytů v embryogenezi migruje do bazální vrstvy epidermis. Kožní melanocyty jsou obklopeny keratinocyty a na jejich receptory je přenášen pigment melanin. Tím je pokožka chráněna před UV zářením, ale pokud je

narušena tvorba melaninu, vede to ke vzniku melanomových buněk a poté ke kožnímu nádoru (Bandarchi a kol. 2010).

Melanocyty savců neprodukují pouze tmavý pigment, ale i jiné odstíny - eumelanin a feomelanin. Eumelanin je obvykle hnědý až černý, feomelanin je červený až žlutý. Většina kožních nádorů má hnědou nebo černou barvu, ale některé nádory mohou mít barvu kůže, protože neprodukují pigment (Barnhill a kol. 2004).

### **1.2.2. Klasifikace**

Rozlišujeme 5 typů melanomu u lidí:

#### **1. Lentigo maligna melanom (LMM)**

Lentigo maligna melanom vzniká na podkladě předchozí lentigo maligna u starších osob. Lentigo melanom je hnědá skvrna na kůži, která má histologický obraz melanomu. Tento typ melanomu se vyskytuje převážně na kůži krku a obličeje. Klinickým projevem je nepřesně ohraničená, pigmentovaná skvrna o velikosti až několika centimetrů. Nejprve se šíří plošně, ale po několika letech dochází k vyvyšování skvrny nad kožní povrch, dojde tedy k vytvoření pigmentového uzlu (Krajsová a Bauer 1994).

#### **2. Povrchově šířící se melanom (Superficial spreading melanoma-SSM)**

Tento typ melanomu představuje až 70 % všech melanomů kůže, je tedy nejčastěji vyskytujícím se kožním nádorem. Postihuje převážně osoby ve středním věku. Vzniká z ostře ohraničeného pigmentového ložiska o velikosti více jak 6 mm. Ložisko se poté vyvyšuje nad kožní povrch a vzniká pigmentový uzel, který má nepravidelné výběžky (Krajsová a Bauer 1994).

Jednotlivé části tohoto typu melanomu mohou mít různá barevná zbarvení (černé, hnědé, světlehnědé, modrošedé, modré...), to záleží na množství a typu melaninu (Souhami a Tobias 2005).

#### **3. Nodulární melanom (Nodular melanoma-NM)**

Nodulární melanom je druhý nejčastější typ, zodpovídá za 15 – 30 % všech melanomů. Klinickým projevem je různě velký, pigmentový uzel, který vznikl v krátké době (během několika málo měsíců). Povrch uzlu se může odlupovat a často krvácet, jinak bývá hladká a tmavé barvy. U tohoto typu melanomu jsou časté metastázy v kůži, kostech, plicích, játrech, mozku a regionálních uzlinách, jejichž prognóza bývá nepříznivá (Krajsová a Bauer 1994).

#### **4. Akrolentigózní melanom (Acral-lentiginous melanoma-ALM)**

Akrolentigózní melanom se asi jen z 2 – 10 % vyskytuje u bílé rasy, ale u černé rasy je to nejčastější typ kožního nádoru (Souhami a Tobias 2005).

Objevuje se u lidí ve vyšším věku a postihuje dlaně, podnehtové oblasti (hlavně palců) a paty. Nejprve se projevuje jako nepravidelná, světle až tmavohnědá pigmentová skvrna, která ale začíná nabírat na tloušťce (až 3 cm) a roste do struktury kůže. Pokud se melanom vyskytuje pod nehty, je většinou doprovázen krvácením z prstu (Krajsová a Bauer 1994).

#### **5. Mukolentiginózní melanom (Mucosal lentiginous melanoma-MLM)**

MLM je tzv. slizniční melanom, který vzniká např. v epitelu dutiny ústní, nosu, hrtanu, játrech, jícnu, močové trubici, vagíně a dalších orgánech. Vzhledem se podobá ALM. Patří mezi nejméně často vyskytující se melanomy (Souhami a Tabias 2005).

##### **1.2.3. Klinický obraz maligního melanomu**

Melanom se nejprve projevuje jako drobná pigmentová skvrna na povrchu kůže, převážně tmavé barvy. Tato skvrna se postupem času mění - velikost, tvar, barva. Dochází k vyvyšování skvrny nad kožní povrch a vytvoření pigmentového uzlu (Krajsová a Bauer 1994).

Pro správné rozpoznání maligního melanomu bylo vytvořeno ABCD pravidlo :

A - (asymetry) - melanom vytváří již od počátku nepravidelný a nesymetrický tvar

B - (borderline) - nepravidelně ohraničený melanom s různými zářezy nebo výběžky

C - (colour) - různé typy zbarvení (černá, hnědá, světlehnědá, šedá, modrošedá...)

D - (diameter) - velikost melanomu by měla být větší než 5mm (Vorlíček a kol. 2006)

##### **1.2.4. Melanom B16**

Existují čtyři druhy melanomu B16: B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. Melanom B16-F0 je mateřskou buněčnou linií. B16-F1 byl získán jednorázovou a B16-F10 několikanásobnou selektivní metodou (Nakamura a kol. 2002).

Melanom B16-F10 se vyznačuje největší schopností metastazovat, a to převážně do plic. Narušuje strukturu plic, jejich funkci a objem. Jako modelový mechanismus, který umožňuje zkoumat různé způsoby léčby kožních nádorů, slouží myši C57BL/6N. Jinými vhodnými modelovými mechanismy jsou krysy, králíci, fretky nebo psi (Brown a kol. 2002).

### 1.3. Diagnostika nádorů

Pro nejúspěšnější léčbu rakoviny je důležitý včasný příchod pacienta k lékaři a včasné stanovení diagnózy. Pokud na sobě pacienti pozorují určité změny zdravotního stavu nebo pokud si sami nahmatají nějaký útvar na kůži či v podkoží, měli by vyhledat pomoc lékaře. Ne vždy ale tak pacienti učiní, a tím se úspěšnost léčby snižuje. Včasné stanovení diagnózy nádorového onemocnění je také velice důležité. To však není tak jednoduché, pokud se nejedná o nádory, které jsou pouhým okem viditelné, jako jsou kožní nádory a nádory rostoucí v podkoží. Většina nádorů je diagnostikována pomocí zobrazovacích metod - rentgenové vyšetření, ultrasonografie nebo magnetická rezonance. Klinickými příznaky, které naznačují, že se u pacientů vyskytuje nádor, a kterým by se měla věnovat obzvlášť pozornost, mohou být dlouho přetrvávající kašel a chraptot, krev ve stolici, krev v moči, bolestivá porucha menstruace, polykací potíže, nechutenství, potíže při vyprazdňování, zvětšené mízní uzliny, únava nebo úbytek tělesné váhy. Často vše bývá doprovázeno nesnesitelnými bolestmi a někdy i teplotou (Klener a kol. 1996).

#### 1.3.1. Diagnostické metody:

**1. Fyzikální vyšetření** - patří mezi základní vyšetření. Při tomto vyšetření se lékaři zaměřují na zvětšené mízní uzliny a kožní změny. U žen by měly být řádně vyšetřeny a prohmatány prsy. Mezi fyzikální vyšetření spadá také vyšetření konečníku (Klener a kol. 1996).

**2. Zobrazovací metody** - tyto metody slouží k odhalení nádorů, které nejsou viditelné pouhým okem. Řadíme sem rentgenové vyšetření, ultrasonografii a magnetickou rezonanci (Klener a kol. 1996).

**3. Biochemické vyšetření** - toto vyšetření pouze doplňuje ostatní vyšetření (Klener a kol. 1996).

**4. Cytologické vyšetření** - při tomto vyšetření lékaři zkoumají jednotlivé buňky, které byly odebrány stěrem nebo buňky získané ze vzorků z výměšků, výpotků a tělesných tekutin (Pacovský 1993).

**5. Hematologické vyšetření** - jedná se o vyšetření krve a kostní dřeně. Tímto vyšetřením se odhalí nádory hematopoetické tkáně, jako je leukémie a lymfomy (Klener a kol. 1996).

**6. Endoskopické vyšetření** - umožňuje odebrat vzorky z tkání, u kterých je podezření, že se v nich vyskytuje nádor, př. trávicí trubice, průdušky (Klener a kol. 1996).

**7. Histologické vyšetření** - řadí se mezi nejdůležitější vyšetření vůbec. Pomáhá lékaři odhadnout, jak moc je nádor maligní a jaké jsou jeho hranice růstu (Pacovský 1993).

#### **1.4. Terapie nádorů**

V poslední době byl zaznamenán veliký pokrok v terapii nádorového onemocnění. Úspěšnost léčby závisí na typu nádoru, na metodě, kterou je nádor léčen, na stádiu, ve kterém byl nádor objeven a také na přístupu pacienta a na jeho spolupráci s lékařem (Pacovský 1993).

Nádory se léčí dvěma způsoby - kurativní nebo paliativní léčbou. Cílem kurativní léčby je zlikvidovat celý nádorový proces. Paliativní léčba částečně zastavuje růst nádoru a jeho šíření a také zmírňuje bolestivé potíže pacienta, které jsou způsobeny tlakem rostoucího nádoru. Hlavním cílem paliativní léčby je dosažení co nejlepší kvality života pacienta (Pacovský 1993).

Při léčbě nádorového onemocnění jsou k dispozici čtyři standardní metody: chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie, radioterapie, biologická léčba a imunoterapie. K úspěšnému vyléčení rakoviny nestačí většinou jen jedna metoda, ale komplexní přístup, tedy kombinace více metod, např. chirurgické odstranění nádoru a radioterapie, často doplněná chemoterapií. Kvůli tomuto multidisciplinárnímu přístupu je mnoho pacientů s rakovinou léčeno ve specializovaných centrech (Franks a Teich 1999).

##### **1.4.1. Chirurgická léčba**

Chirurgická léčba je nejstarší způsob léčby rakoviny, který se vyvinul na počátku 19. století. Úspěšnost závisí na typu nádoru, jeho velikosti, jak je rakovina pokročilá a které orgány nádor obklopuje. Tento typ léčby má smysl pouze u lokalizovaných nádorů (Pollock a kol. 2008).

Chirurgické odstranění nádoru patří mezi nejrizikovější způsoby léčby, protože během zákroku může dojít k mnoha komplikacím, např. nádorové buňky se mohou během vyřezávání nádoru dostat do okolních struktur či do krevního oběhu a tam později zakládají nová nádorová ložiska, metastázy. Poměrně často se nádorové buňky dostávají do pooperační rány, kde pak vzniká nový nádor. Součástí tohoto zákroku bývá často vyjmutí lymfatických uzlin. Důvodem je to, že lymfatické uzliny bývají obsazeny nádorovými buňkami, a tím by v těle mohl na jiném místě vzniknout nový nádor (Pollock a kol. 2008).

### 1.4.2. Radioterapie

V současnosti jednou z nejpoužívanějších metod při léčbě rakoviny je radioterapie. Radioterapií se pomocí ionizujícího záření cíleně ozařuje celý nádor. Při tomto ozáření je poškozena struktura DNA nádorových buněk a dojde k tzv. nevratným změnám - buňky se nemohou dělit a růst (Franks a Teich 1999).

Nevýhodou je, že radiací nezaniká pouze nádor, ale jsou poškozovány i okolní tkáň. Proto musí být radioterapie naplánována a prováděna tak, aby byly nádorové buňky ozářeny co největší radiační dávkou, zatímco okolní tkáň byla co nejméně poškozeny. Rozdělení radioterapie (Pacovský 1993) :

**a) teleterapie** - nádor je ozařován přístrojem ze zevního prostředí (mimo tělo). Při této metodě jsou ohroženy okolní tkáň.

**b) brachyterapie** - nádor je ozářen pomocí vnitřních zářičů (radionuklidů). Do bezprostřední blízkosti nádoru se aplikuje radiační tekutina nebo pevný útvar, tím je nádor vystaven co největšímu radiačnímu účinku a okolní tkáň jsou mnohem méně vystaveny riziku než je tomu u teleterapie.

### 1.4.3. Chemoterapie

Chemoterapie je léčebná metoda, která se v onkologii začala používat nejprve pouze jako doplňková metoda, ale dnes patří mezi základní léčebné metody rakoviny. Principem je používání chemických látek, cytostatik, které mají schopnost zasahovat do metabolických dějů v buňkách, a omezovat tím tak buněčné dělení. Cytostatika však nepůsobí jen na buňky nádorové, ale na všechny dělicí se buňky v těle. Chemoterapie využívá delší doby buněčného cyklu nádorových buněk. Normální buňky mají kratší dobu buněčného cyklu, z toho vyplývá, že normální buňky se po chemoterapii stačí obnovovat, zatímco nádorové buňky ubývají. Po několika cyklech chemoterapie se dosáhne stavu, kdy je nádorových buněk tak málo, že si s nimi imunitní systém poradí a odstraní je (Klener a kol. 1996).

Cytostatika jsou chemické látky, které mají toxický účinek na všechny dělicí se buňky. Působí tedy systémově. Toxický účinek je spojen s mnoha nežádoucími účinky. Mezi nejčastější patří nevolnost, průjem a zvracení. Vše bývá u většiny pacientů doplněno vypadáváním vlasů, protože buňky vlasových folikulů jsou poškozeny. Závažné nežádoucí účinky jsou dehydratace, minerální rozpad a hlavně poškození krvetvorby (Pacovský 1993).

Cytostatika se podávají různými způsoby. Nejpříjemnější způsob podání je perorálně. Nečastější způsob aplikace je intravenózní cestou. Méně často se cytostatika podávají nitrosvalově, intraarteriálně nebo intrakavitálně (do dutiny). Výjimečně se aplikují přímo do nádoru, jedná se o lokální podání cytostatik (Šafránková a Nejedlá 2006).

#### **1.4.4. Biologická léčba**

Je to nová léčebná metoda, která se začala vyvíjet v druhé polovině 20. století, ale do popředí se dostala až na začátku 90. let, díky technice genového inženýrství a sekvenování bílkovin a nukleových kyselin. Tato metoda se zaměřuje pouze na nádorové buňky, proto je doprovázena minimálním množstvím nežádoucích účinků. Avšak ne všechny typy nádorů mohou být biologickými léky vyléčeny (Foon a Muss 1998).

Nejslibnějšími biologickými léčivými jsou interferony a monoklonální protilátky, které jsou zaměřené proti buněčným receptorům nádorových buněk. Tyto receptory jsou jimi zablokovány a nádorové buňky zničeny. Látky obou skupin vykazují aktivitu v řadě studií u hematologických malignit, a to i u dříve léčených pacientů (Foon 1986).

Jinými léčivými jsou inhibitory tyrozin kináz. To jsou enzymy, které předávají do buňky z jejího buněčného povrchu pokyny, jak se má buňka chovat a kdy se má dělit. Pokud jsou tyto inhibitory zablokovány, do buňky nejsou předávány pokyny, buňka je „zmatená“, nedělí se a tím se zabrání růstu nádoru (Foon a Muss 1998).

Biologická léčba nemusí být vždy zaměřená na samotný nádor. Příkladem je zacílení biologické léčby proti cévám, které vyživují nádor. Cévy přestanou nádor vyživovat a nádor zpomalí nebo úplně zastaví svůj růst (Foon a Muss 1998).

### **1.5. Imunologie nádorů**

Nádorová buňka se od normální buňky liší imunologicky, morfoloogicky, odlišným metabolismem, delším buněčným cyklem a odlišnou genetickou informací. Zdá se, že by imunitní systém měl tyto buňky rychle rozpoznat a eliminovat. Pravda je však jiná. Nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují být před imunitním systémem „maskovány“, imunitní systém je nepozná nebo úplně ignoruje (Hořejší a Bartůňková 2009).

Imunitní systém rozpoznává nádory pomocí nádorově specifických povrchových antigenů, které jsou rozděleny do dvou kategorií:

**Antigeny specifické pro nádory (TSA)** - do této kategorie řadíme proteiny, které se vyskytují pouze na nádorových buňkách.

**Antigeny asociované s nádory (TAA)** - do této kategorie řadíme proteiny, které se vyskytují jak na nádorových buňkách, tak i na některých normálních buňkách. Liší se pouze množstvím exprese antigenů nebo abnormální místní nebo časovou expresí antigenů (Hořejší a Bartůňková 2009).

Jestliže jsou nádorové antigeny pomocí dendritických buněk prezentovány T-lymfocytům, imunitní systém je schopen rozpoznat nádorové buňky a pomocí specifické a nespecifické imunity je zničit. Když je porušena prezentace nádorových antigenů, imunitní systém nerozpozná nádorové buňky a nerozběhne se imunitní reakce proti nádorům (Hořejší a Bartůňková 2009).

Hlavní eliminační schopnost nádorových buněk mají T-lymfocyty. Peptidy prezentované molekulami MHC II třídy (major histocompatibility komplex) jsou rozpoznány T-lymfocyty, nazývané také jako tzv. „pomahači“, které nesou na svém povrchu CD4+ glykoprotein. Naproti tomu peptidy vázané na molekuly MHC I třídy stimulují cytotoxické T-lymfocyty, které nesou na svém povrchu odlišný glykoprotein CD8+. T-lymfocyty (CD4+) se v první fázi aktivují po setkání s nádorovým antigenem prezentovaným v podobě peptidu na povrchu profesionální antigen prezentující buňky (APC). Profesionální APC jsou např. dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty nebo Langerhansovy buňky. Poté, co jsou aktivovány CD4+ T-lymfocyty, dochází k aktivaci CD8+ T-lymfocytů. Tyto lymfocyty začnou produkovat množství cytokinů (IFN  $\gamma$ , TNF), které zničí nádorové buňky (Franks a Teich 1999).

Jinou zbraní imunitního systému proti nádorovým buňkám jsou NK buňky. NK buňky jsou vývojově blízké T-lymfocytům. S T-lymfocyty a monocyty sdílí povrchové antigeny, ale netvoří T-buněčné receptory (TCR) (Franks a Teich 1999).

Na svém povrchu mají NK buňky receptory pro MHC glykoproteiny I. Právě tyto receptory pro MHC gp I hrají důležitou roli v protinádorové imunitě. Normální zdravé buňky mají na svém povrchu MHC gp I. NK buňky tyto molekuly rozpoznávají a buňky neničí. Ale některým nádorovým buňkám MHC gp I chybí, NK buňky je rozpoznají a zničí (Hořejší a Bartůňková 2009).



### 1.5.1. Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Existuje celá řada mechanismů, kterými nádorové buňky unikají kontrolám imunitního systému. Nejdůležitější z nich jsou:

- Antigenní variabilita - některé nádorové buňky tvoří různé mutantní formy, při kterých ztrácejí nebo pozměňují nádorový antigen.
- Nízká hustota nádorových antigenů - při nedostatečné expresi nádorových antigenů nejsou nádorové buňky imunitním systémem rozpoznány nebo jsou zcela ignorovány.
- Nepřítomnost kostimulačních molekul CD80 a CD86 - jsou-li nádorové antigeny prezentovány Th i Tc-lymfocytům bez kostimulačních faktorů, vede to k navození tolerance nádoru.
- Produkce blokujících faktorů - některé nádory produkují blokující faktory, které zablokují funkci cytotoxických T-lymfocytů a ty nemohou nádorové buňky destruovat (př. TGF- $\beta$ , IL-10).
- Produkce FasL - tato molekula může způsobit apoptózu T-lymfocytů.
- Regulační T-lymfocyty - tyto lymfocyty chrání nádor před jejich vlastními autoimunitními mechanismy (Hořejší a Bartůňková 2009).

### 1.6. Imunoterapie

Imunoterapie je nejnovější léčebná metoda používaná při léčbě nádorového onemocnění. Tato metoda prodělala dlouholetý vývoj, během kterého se neustále střídaly úspěchy s neúspěchy. V současné době stále nemůžeme říci, zda je tento postup maximálně účinný, ale existuje reálná šance, že se rakovina bude léčit hlavně pomocí imunoterapie. Důvodem je to, že by tato metoda neměla zatěžovat organismus tolik jako léčba pomocí chemoterapie či radioterapie. Imunoterapie si klade za cíl eliminovat nádor, aniž by byl pacient poškozen. Principem je vyvolání protinádorové imunity nebo využití mechanismů imunitního systému, které směřují dané léčivo do nádoru. Zatím se imunoterapie používá pouze při léčbě tzv. reziduální nemoci, to znamená po snížení nádorové masy jinými léčebnými postupy (Hořejší a Bartůňková 2009).

Imunoterapeutickými metodami jsou:

- Imunoterapie založená na monoklonálních protilátkách
- Imunoterapie pomocí buněčných mechanismů
- Imunoterapie založená na komplementu

### 1.6.1. Imunoterapie založená na monoklonálních protilátkách

Proč se používají protilátky k léčbě nádorového onemocnění? Protilátky fungují jako nosiče léčiv a toxinů. Využívá se i jejich fyziologických funkcí, jako je opsonizace či aktivace komplementu (Hořejší a Bartůňková 2009).

- **Monoklonální protilátky** - monoklonální protilátky mají schopnost vázat se na nádorový antigen. Touto vazbou zanesou protilátka příslušný toxin do místa nádoru, a způsobí tím nekrózu buněk a tkání. Problém, který zde může nastat, je poškození zdravé tkáně a nebo rezistence nádorových buněk vůči danému toxinu. Někdy se používají samotné monoklonální protilátky, které jsou zaměřené proti nádorovému antigenu. Tím, že se protilátka naváže na antigen, dojde k vyvolání apoptózy, neboli programované smrti, nádorových buněk, nebo se opsonizací aktivují efektorové mechanismy imunitního systému a dojde např. k fagocytóze (Hořejší a Bartůňková 2009).
- **Bispecifické protilátky** - jsou uměle vyrobené protilátky, které mají dvě vazebná místa. Jedno z nich reaguje s nádorovým antigenem a druhé s efektorovou buňkou - T-lymfocytem nebo NK buňkou. Fc část protilátkové molekuly aktivuje Fc receptory na fagocytech a nebo NK buňkách (Hořejší a Bartůňková 2009).
- **Čištění suspenze buněk kostní dřeně po autotransplantaci** - tato metoda spočívá v odebrání vzorku kostní dřeně pacientovi s nádorovým onemocněním. Použitím monoklonálních protilátek proti nádorovému antigenu se ze vzorku kostní dřeně odstraní nádorové buňky. Pacient je pak po určité době léčen chemoterapií nebo radioterapií. Následně je mu pomocí autotransplantace vrácena vyčištěná kostní dřeň s kmenovými buňkami, které krvetvorbu opět obnoví. Riziko návratu nádoru je v tomto případě poměrně časté (Hořejší a Bartůňková 2009).

### 1.6.2. Imunoterapie pomocí buněčných mechanismů

- **Nespecifická stimulace zánětu.** Pomocí suspenze mykobakteriální vakcíny je v místě nádoru vyvolán zánět (Hořejší a Bartůňková 2009).
- **Stimulace LAK a TIL buněk.** LAK (lymfokiny aktivovaní zabíječi) buňky jsou získávány stimulací směsí T-lymfocytů a NK buněk *in vitro* pomocí cytokinů, převážně IL-2. Takto stimulované buňky jsou navraceny zpět pacientovi a svým působením alespoň z části potlačí růst nádoru. TIL (tumor infiltruující lymfocyty) buňky se připravují z lymfocytů, které se vmezeřily do nádoru. Aktivují se *in vitro* a po aktivaci se navrátí zpět do nádoru. Jedná se ale o velmi náročné laboratorní pokusy, které se v praxi běžně moc nepoužívají (Hořejší a Bartůňková 2009).

- **Zlepšení antigen-prezentující funkce nádorových buněk.** Principem této metody je *in vitro* genetická úprava nádorových buněk, vedoucí k produkci cytokinů, např. GM-CSF, IL-2, a k expresi kostimulačních molekul CD80 nebo CD86. Posílí se tak její schopnost prezentovat antigeny. Buňky se pak ozáří nebo ošetří cytostatiky a vrátí zpět pacientovi. Jinou metodou je hybridizace nádorové buňky s antigen prezentujícími buňkami (např. s dendritickými buňkami, B-lymfocyty). Vznikne hybrid, který prezentuje nádorové antigeny T-lymfocytům (Hořejší a Bartůňková 2009).
- **Nádorové vakcíny.** Cílem této metody je zvýšit množství protinádorových cytotoxických T-lymfocytů (Tc-lymfocyty), a to tím, že se zvýší exprese MHC glykoproteinu I a kostimulačních faktorů a nebo exprese nádorových antigenů (Hořejší a Bartůňková 2009).
- **Použití dendritických buněk.** Pomocí směsi cytokinů se *in vitro* připraví z periferních monocytů velké množství dendritických buněk. Ty se pak kultivují s nádorovými antigeny a po kultivaci jsou následně vloženy pacientovi, kde aktivují jeho T-lymfocyty k protinádorové odpovědi (Hořejší a Bartůňková 2009)
- **Imunoterapie založená na alogenní transplantaci.** Tato metoda se používá u pacientů, kterým byla transplantována kostní dřeň. V nové kostní dřeni by mělo být co nejmenší množství T-lymfocytů, které mohou způsobit velmi nebezpečnou alogenní reakci štěpu proti hostiteli (Hořejší a Bartůňková 2009).
- **Použití produktů imunitního systému.** Pro posílení buněčných mechanismů imunity se používají různé cytokiny (IFN- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2, GM-CSF) (Hořejší a Bartůňková 2009).

### 1.6.3. Imunoterapie založená na komplementu

Komplement je soustava proteinů a glykoproteinů, které spolu navzájem spolupracují a spolupracují i s jinými mechanismy imunitního systému. Nejdůležitější složkou komplementu je 9 sérových proteinů (C1-C9), které cirkulují v séru v neaktivní formě. Protinádorová imunita založená na komplementu začíná vazbou C1 proteinu (složitý komplex podjednotek C1q, C1r a C1s) na protilátku, která je na povrchu nádoru. Rozběhne se kaskádovitá aktivace jednotlivých složek komplementu, přičemž nejdůležitější složkou komplementu je C3 protein, hlavně jeho enzym C3-konvertáza, která má opsonizační a chemotaxní účinky. Komplex proteinů C5b, C6, C7, C8 a C9 proděraví membránu nádorové buňky, způsobí osmotickou lýzu a buňku tím zabijí (Hořejší a Bartůňková 2009).

## 1.7. Imunoterapie založená na vrozené imunitě

Imunitní systém lze rozdělit na nespecifický (neadaptivní, vrozený) a antigeně specifický (adaptivní, získaný). Hlavní složky imunitního systému jsou složky humorální a buněčné. Humorální složku představují proteiny a složku buněčnou tvoří různé typy buněk (Hořejší a Bartůňková 2009).

Vrozená imunita je evolučně starší než získaná imunita. Její složky reagují na patogeny mnohem rychleji a nemají tzv. imunologickou paměť jako získaná imunita. To znamená, že si nepamatují opakovaný styk s patogenem. Buněčnou složku vrozené imunity tvoří fagocytující buňky, žírné buňky, eosinofily a NK buňky, humorální složku interferony, laktiny, komplementový systém a proteiny akutní fáze (Hořejší a Bartůňková 2009).

Svou roli v obraně organismu sehrávají také mechanické, chemické a mikrobiální bariéry na povrchu kůže a sliznic (Hořejší a Bartůňková 2009).

### 1.7.1. Buňky vrozené imunity

Buněčnými složkami nespecifické imunity jsou neutrofilní, eosinofilní a basofilní granulocyty, monocyty a jejich tkáňová forma - makrofágy, dále dendritické buňky, žírné buňky a NK buňky (Hořejší a Bartůňková 2009).

Neutrofilní a eosinofilní granulocyty, spolu s monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami, jsou označovány za fagocytující buňky. Fagocytóza je schopnost fagocytujících buněk pohlcovat různé částice (mikroby, poškozené buňky apod.). Samotný proces fagocytózy probíhá tak, že fagocyt se nejprve pomocí svých povrchových receptorů dotkne cizorodé částice a svými panožkami ji obklopuje. Částice je nakonec obklopena povrchovou membránou fagocytu a uzavřena do fagozomu (vzniklá vakuola). Celý proces fagocytózy je řízen signály z povrchových receptorů fagocytů (Hořejší a Bartůňková 2009).

Jednotlivé fáze fagocytózy jsou:

- Směřovaný pohyb (pohyb fagocytu k zaznamenané cizorodé částici)
- Adheze (přilnutí k antigenu)
- Ingesce (obklopení cizorodé částice a vznik fagozomu)
- Cidie (usmrcení částice)
- Degradace (usmrcená částice je hydrolyzována enzymy na nízkomolekulární fragmenty)

Hlavní funkcí žírných buněk (heparinocytů) není fagocytóza, ale účastní se alergických procesů. Uplatňují se také při komunikaci mezi nervovým a imunitním systémem (Hořejší a Bartůňková 2009).

Basofilní granulocyty - výbavou a funkcemi jsou podobné žírným buňkám. Basofily zodpovídají za anafylaktický šok a mohou se účastnit obrany proti parazitům (Hořejší a Bartůňková 2009).

NK buňky - jsou součástí antigenně nespecifické imunity. Jejich schopností je rozeznávat buňky, které mají na povrchu malé množství MHC gp I, např. nádorové buňky nebo buňky napadené viry (Hořejší a Bartůňková 2009).

### **1.7.2. Vrozená imunita a rakovina**

Příroda nás obdarovala infekcí - chronickou a akutní. Obě tyto infekce mají škodlivé i prospěšné účinky na lidský organismus. Celosvětově je velký počet chronických infekcí spojen s rizikem vzniku rakoviny, ale je také známo, že nádorová regrese může být spojena s akutní infekcí (např. bakteriální, virová, plísňová atd.). Již od dob Hippokrata se ví, že akutní chronická infekce může léčit různá onemocnění. Jedním z projevů akutní infekce je silná imunologická odpověď a mimo jiné i horečka. Když pacienta s rakovinou postihne akutní infekce spojená s horečkou, dojde k aktivaci vrozené nespecifické imunity. Vrozená imunita pak může zahájit proces potlačení nádorového bujení (Thomas a Badini 2011).

První, kdo přišel s myšlenkou, že by se rakovina mohla léčit tím, že se v těle vyvolá infekce, byl William Bradley Coley. Coley, nazývaný jako „Otec imunoterapie“, věděl, že pouze chirurgické odstranění nádoru nevede k úplnému vyléčení. U jednoho pacienta si všiml, že když se mu do rány dostaly bakterie *Streptococcus erysipelas*, rozpoutala se u něj horečka. Jako odpověď na bakteriální infekci, nádor zanikal, až nakonec vymizel úplně (Dalglish a Whelan 2006). Na konci 19. století začal pacientům s maligními nádory, převážně se sarkomy, aplikovat přímo do nádoru suspenzi bakterií *Streptococcus erysipelas*. Prvním příznakem infekce byla zimnice, kterou záhy vystřídala horečka (40,83 °C). Velikost nádoru začala ustupovat a nádor nakonec buď zcela anebo úplně vymizel. Zprvu používání směsi bakterií *Streptococcus erysipelas*, též nazývané jako Coleyho toxin, bylo úspěšné. Ale když Coley zkoumal účinek této směsi na deseti pacientech, u sedmi z nich se nepodařilo vyvolat infekci a u tří pacientů infekce nastala, nádory se zmenšovaly, ale nakonec došlo k relapsu. Během dalších pokusů začal Coley používat jiný toxin, kterým byla směs bakteriálních kultur *Streptococcus erysipelas* a *Serratia marcescens*. I zde byly zaznamenány úspěchy (Coley 1910). Coley na základě

svých pokusů poznamenal, že jako reakce na bakteriální vakcínu je nezbytná horečka, že vakcína musí být podávána denně a že dávky musí být zvyšovány, aby nedošlo k chybám (Dalglish a Whelan 2006).

Coleyho myšlenky nebyly špatné, ale ve společnosti se příliš neujaly. Hlavně poté, co začala éra léčby rakoviny pomocí radiačního záření. Hlavním důvodem bylo, že radiační terapie přinášela jasně prokazatelné výsledky v léčbě rakoviny. Zatímco Coleyovi se ne vždy podařilo dosáhnout očekávaných výsledků (Nauts a kol. 1990). Hlavním problémem bylo, že ne vždy se u pacientů po podání bakteriální vakcíny podařilo vyvolat infekci a aktivovat tím vrozenou imunitu. Jiným závažným problémem bylo riziko spojené s infekcí. Infekce mohla pacientovi přitížit nebo dokonce způsobit smrt. Používání infekce jako terapeutické metody, to je otázka, která zůstává nadále otevřená (Wiemann a Starnes 1994).

Cizorodé patogeny (viry, bakterie, houby) jsou rozpoznány na základě PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), které se nachází u všech mikroorganismů, a pomocí receptorů, které tyto patogeny rozpoznávají. Příslušné receptory se nazývají PRRs (Pattern Recognition Receptors). PAMPs jsou např. součástí lipopolysacharidů (endotoxiny), peptidoglykanů (buněčná stěna), lipoproteinů (bakteriální tobolky). Vrozená imunita má schopnost rozlišovat mezi strukturami vlastními a strukturami mikroorganismů, u kterých se nachází PAMPs (Thomas a Badini 2011).

Nádorové buňky neobsahují žádné PAMPs, což naznačuje, že by vrozená imunita neměla tyto buňky rozpoznávat a eliminovat je. Výše uvedená pozorování nádorové regrese v důsledku prudké infekce lze tedy chápat jako důsledek nespecifického působení stimulovaného imunitního systému.

## **1.8. Terapie nádorových onemocnění pomocí kationických antimikrobiálních peptidů (CAPs)**

### **1.8.1. Antimikrobiální peptidy**

Antimikrobiální peptidy se vyskytují u více než 1000 druhů organismů v přírodě a představují první obrannou linii při napadení infekčním mikroorganismem (Doležilková a kol. 2011).

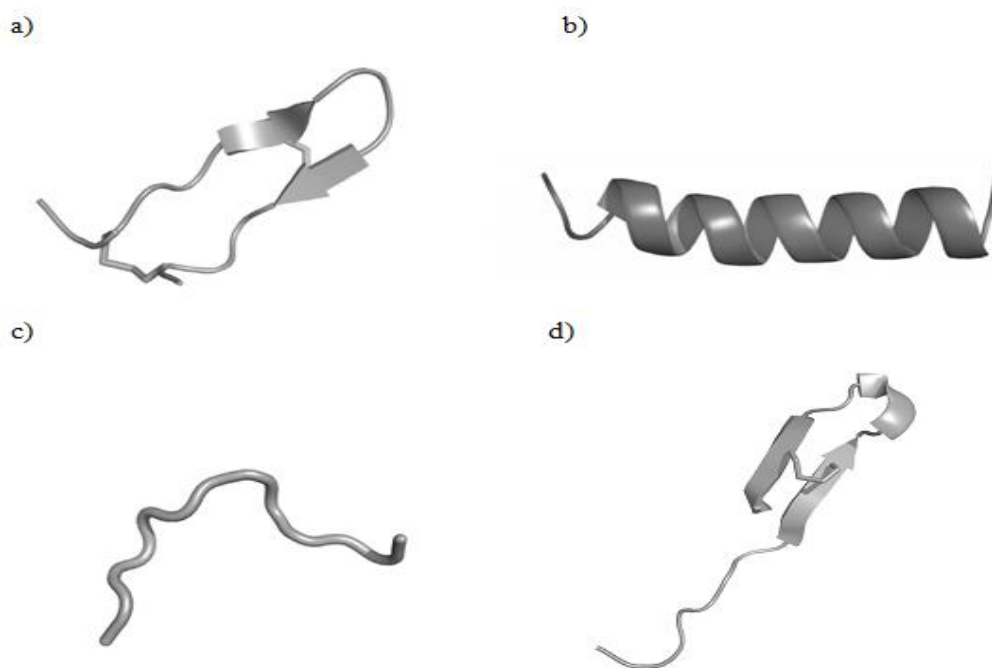
Antimikrobiálních peptidů je několik druhů. Nejpočetnější skupinou jsou kationické a anionické antimikrobiální peptidy, ale patří sem i aromatické dipeptidy a deriváty proteinů vázající kyslík (Neubauerová a kol. 2009).

Anionické antimikrobiální peptidy jsou malé peptidy, které mají anionický charakter. Tento charakter je dán homopolymerní aspartátovou oblastí, která jako kofaktor potřebuje zinek. Poprvé byly objeveny u ovcí, ale jejich účinek nebyl zatím prokázán. Předpokládá se, že jsou přijímány bakteriálními buňkami společně se zinkem. Tyto peptidy byly objeveny v játrech, tenkém střevě, plicích a krevním séru savců (Doležilková a kol. 2011).

Kationické antimikrobiální peptidy (CAPs) jsou nejpočetnější skupinou antimikrobiálních peptidů vůbec. Těchto peptidů je známo přes 700 druhů a převážná část byla izolována z hmyzu (Neubauerová a kol. 2009). CAPs se skládají z méně než 50 aminokyselin, obsahují velké množství lysinových a argininových zbytků a více jak 50 % hydrofobních reziduí. Jejich důležitou vlastností je převažující pozitivní náboj. Díky tomuto náboji reagují s bakteriálními membránami, které nesou na povrchu negativní náboj. CAPs prostřednictvím pórů pronikají přes bakteriální membránu do cytoplasmy a zde např. narušením DNA, RNA syntézy proteinů navodí buněčnou smrt (Doležilková a kol. 2011). Minimální množství náboje, kterým peptid reaguje s membránou patogenu, je +2 a maximální množství je +10 (Neubauerová a kol. 2009). Kationické antimikrobiální peptidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti protozoím, grampozitivním a gramnegativním bakteriím a mikroskopickým houbám. Některé peptidy také inhibují replikaci obalených virů, podporují hojení a vykazují protinádorovou aktivitu. Nedávné studie ukázaly, že kationické peptidy mohou působit jako efektory vnitřní imunologické odpovědi (Doležilková a kol. 2011).

### 1.8.2. Struktura antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy jsou podle struktury rozděleny do 4 skupin:  $\beta$ -list,  $\alpha$ -helix, smyčka a rozvolněné peptidy. Více jak 800 druhů antimikrobiálních peptidů bylo izolováno z přírodních zdrojů, ale existují i syntetické varianty (Doležilková a kol. 2011).



Obr. 1: Grafické znázornění struktur antimikrobiálních peptidů: a)  $\beta$ -list, tachyplesin I, b)  $\alpha$ -helix, magainin 2, c) rozvolněná struktura, indolicidin, d) smyčka, thanatin. Převzato z databáze Protein Data Bank (PDB) (Doležilková a kol. 2011).

Nejznámějšími antimikrobiálními peptidy u lidí jsou katelicidin a defensin, které jsou produkovány buňkami imunitního systému a histamin produkován a vylučován do slin například příušními žlázami (Peters a kol. 2010).

### 1.8.3. Mechanismy účinku kationických antimikrobiálních peptidů

Po dlouholetém studování mechanismů účinku kationických antimikrobiálních peptidů se ukázalo, že tyto peptidy vykazují mnohonásobně větší účinek na buňky, než ostatní druhy peptidů. CAPs jsou schopné např. permeabilizace buněčné membrány, působit na buněčnou stěnu a nebo dokonce inhibovat syntézu molekul. Mechanismus účinku kationických antimikrobiálních peptidů je nejvíce prostudován u gramnegativních bakterií a podle všeho se podobá mechanismu účinku u nádorových buněk. Vše začíná reakcí mezi



kladně nabitým peptidem (kation) a negativně nabitou vrstvou lipidů (anion) ve vnější vrstvě membrány, čímž dojde k narušení membrány. Kationické peptidy vykazují vysokou afinitu k lipopolysacharidům (LPS) a nízkou k dvoumocným kationům ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) uvnitř membrány. Peptidy vytlačí dvoumocné kationy od negativně nabitých LPS a dojde k narušení stability membrány. Přes takto narušenou membránu se peptidy dostanou k cytoplasmatické membráně a reagují s její vnější vrstvou (Doležilková a kol. 2011).

#### **1.8.3.1. Peptidy narušující cytoplasmatickou membránu**

Většina peptidů, které mají  $\alpha$ -helikální strukturu reagují s vnější vrstvou cytoplasmatické membrány, a tím ji narušují. Tím, že je narušena cytoplasmatická membrána, dojde k její depolarizaci vedoucí k buněčné smrti. Existují tři mechanismy, kterými je cytoplasmatická membrána narušena (závisí na druhu peptidu):

- Mechanismus „sudové skruže“ - tvoří transmembránové póry, a to tak, že se amfipatické peptidy (peptidy, ve kterých se střídají hydrofobní nebo hydrofilní oblasti) natočí směrem kolmo k membráně. Postranní hydrofobní řetězce směřují vně do lipidické dvojvrstvy a dovnitř směřují polární postranní řetězce. Transmembránové póry narušují membránový potenciál a umožňují, aby přes ně unikaly různé komponenty cytoplasmatické membrány.
- Mechanismus „micelárních agregátů“ - v tomto mechanismu tvoří peptidy micelární uspořádání a tím narušují membránu cytoplasmy.
- „Kobercový“ mechanismus - peptidy přilnou k dvojvrstvě lipidů, dojde k porušení stability membrány a vzniku trhlin, kterými vytékají různé komponenty cytoplasmatické membrány (Doležilková a kol. 2011).

#### **1.8.3.2. Jiné mechanismy účinku antimikrobiálních peptidů**

Během studií eukaryotních buněk se ukázalo, že některé peptidy s vyšším obsahem argininu mají schopnost projít přes buněčnou a jadernou stěnu a přenášejí různé navázané látky (Doležilková a kol. 2011). Pokud peptid projde přes jadernou stěnu, je schopen inhibice DNA syntézy a zablokování RNA syntézy. Dále může inhibovat ribosomální funkci a proteosyntézu (Peters a kol. 2010).

#### **1.8.4. Terapeutický potenciál kationických antimikrobiálních peptidů**

Kationické antimikrobiální peptidy mají díky svým vlastnostem velký budoucí terapeutický potenciál. Hlavními výhodami jsou: obrovské spektrum antimikrobiální

aktivity (působí cytotoxicky na mikrobiální buňky a zároveň nepůsobí toxicky na savčí buňky), rychlé zabití mikrobů, neutralizace endotoxinů, podpora hojení ran a odolnost vůči působení antibiotik. Nedávné studie odhalily, že kationické peptidy se mohou využívat jako antimikrobiální látky, modifikátory zánětu nebo při léčbě nádorového onemocnění (Peters a kol. 2010).

### **1.8.5. Kationické antimikrobiální peptidy jako nová cytostatika v terapii nádorového onemocnění**

Chemoterapie je dnes jedna z nejpoužívanějších léčebných metod při léčbě rakoviny. Ale přesto spousta lékařů od této metody ustupuje, a to hned ze dvou důvodů. Prvním je, že cytostatika působí toxicky nejen pro nádorové buňky, ale i pro buňky zdravých tkání. Druhým důvodem je častá multi-drug rezistence nádorových buněk. Novou slibnou metodou je používání kationických peptidů (CAPs), kde se vedlejších účinků nemusíme tolik obávat jako u chemoterapie. Kationické peptidy vykazují selektivní cytotoxicitu proti širokému spektru lidských nádorových buněk, včetně neoplastických buněk, které získaly multi-drug rezistentní genotyp (Mader a Hoskin 2006). Nádorová selektivita je dána tím, že stejně jako bakterie se nádorové buňky vyznačují zřetelným záporným nábojem (Marquez a kol. 2004). Zabíjení nádorových buněk prostřednictvím CAPs probíhá obvykle pomocí buněčného membránově-lytického efektu. Některé peptidy jsou schopné spustit apoptózu nádorových buněk narušením mitochondriální membrány nebo jsou označovány jako potenciální inhibitory angiogeneze (vznik nových krevních kapilár) (Mader a Hoskin 2006).

## 2. Cíl práce

- *In vivo* a *in vitro* studium vlivu kationických antimikrobiálních peptidů na nádorové buňky.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1. Chemikálie

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich)

Použité kationické antimikrobiální peptidy:

**LL-8**, vzorec, H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH<sub>2</sub>, všechny aminokyseliny jsou v L konfiguraci (Slaninová, ÚOCHB Praha).

**LL-8/12**, vzorec, H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH<sub>2</sub>, totožná sekvence, ale všechny aminokyseliny jsou v D konfiguraci (Slaninová, ÚOCHB Praha).

**CAP (J)**, vzorec, H-Lys-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Lys-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH<sub>2</sub>, všechny aminokyseliny jsou v L konfiguraci (Ježek, VŠCHT Praha).

**(man)<sub>2</sub> CAP (J)**, který je stejný jako „CAP“ ale má na NH<sub>2</sub> skupině v bočních řetězcích lysinu navázané navíc 2 molekuly manosy (Ježek, VŠCHT Praha).

#### 3.2. Experimentální zvířata

Jako experimentální zvířata v našich experimentech sloužily samice myši z inbredního kmene C57BL/6N od firmy Charles River Laboratories. Myši byly 8 týdnů staré a jejich váha se pohybovala mezi 18 - 20 g. Myši byly chovány za standardních podmínek ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích, fotoperioda 12/12, přístup k potravě a vodě *ad libitum*.

#### 3.3. Buňky melanomu B16-F10

V našich experimentech byly používány buňky myšního melanomu B16-F10, které byly implantovány myším C57BL/6N. Tyto buňky jsme dostali darem od profesorky Říhové z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze.

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem a antibiotiky v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.3.1. Příprava buněk myšího melanomu B16-F10 pro *in vivo* pokusy**

Kultivované buňky byly vyndány z termostatu a bylo z nich odstraněno RPMI médium. Poté byly buňky 2x propláchnuty PBS a po vypláchnutí se provedla trypsinizace (0,02% trypsin v 0,02% EDTA v PBS). Buňky byly vloženy cca na 5 minut do termostatu nastaveného na 37 °C. Po vyjmutí z termostatu bylo k buňkám přidáno médium RPMI s 10% FCS a pomocí sterilní Pasteurovy pipety byly buňky rozvolněny. Takto oddělené buňky byly nality do centrifugační zkumavky a vše bylo centrifugováno (150 g, 10 minut). Po centrifugaci byly buňky usazené na dně centrifugační zkumavky. Centrifugační zkumavka byla doplněna RPMI médiem na známý objem (např. 3 ml) a sterilní Pasteurovou pipetou byly buňky opatrně rozvolněny. Malé množství z této zkumavky (např. 30 µl) bylo odpipetováno do zkumavky a obarveno pomocí trypanové modři. Takto obarvené buňky byly počítány v Bürkerově komůrce. Koncentrace buněk byla následně upravena dle potřeby. Podle počtu živých buněk byl roztok buď naředěn, nebo stočen v centrifuze a opět naředěn na potřebnou koncentraci.

### **3.4. Příprava primokultury z morčecích ledvin pro *in vitro* pokusy**

Z morčecí ledviny byly nejprve odstraněny ledvinové pánvičky a kalichy. Zbývající tkáň byla rozstříhána a promyta PBS. Tkáň byla pak přemístěna do 300 ml Erlenmayerovy baňky. Byl přidán 0,25% roztok trypsinu v PBS, 20 ml/g tkáně. Po pětiminutovém míchání na elektromagnetické míchačce při pokojové teplotě byla tekutina odlita a vyhozena. Následně byla přidána další dávka trypsinu a následovalo dvacetiminutové míchání. Supernatant byl slit do nádoby s vychlazeným telecím sérem. Byl přidán trypsin a znovu pokračovalo natravování tkáně. Proces byl opakován, dokud výtěžek buněk nezačal prudce klesat. Získaná suspenze buněk byla centrifugována - 150 g 5 minut. Sediment byl rozsuspendován v RPMI 1640 obsahujícím 5% FCS, glutamin a antibiotika. Následovala filtrace přes sterilní gázu, centrifugace a rozsuspendování v RPMI 1640 obsahujícím 10% FCS, glutamin a antibiotika.

### **3.5. Transplantace myšího melanomu B16-F10**

Myši byly oholeny na pravé zadní části zad. Zvolila se tato část těla, protože buňky melanomu B16-F10 jsou do tohoto místa snadno aplikovatelné a rostoucí nádor je zde dobře identifikovatelný a měřitelný. Pro experiment, při kterém se měřily teploty, byl oholen i levý bok.

Pod kůži oholeného místa bylo myším aplikováno po 400 000 buňkách B16-F10 v 0,1 ml RPMI média. Dvanáctý den po transplantaci se zahájila terapie.

### **3.6. Měření a statistické vyhodnocení dat**

#### **3.6.1. Měření velikostí nádorů během terapie**

V probíhajících experimentech byl u každé myši sledován růst a objem nádoru. Nádory byly každý druhý den měřeny antropometrickým měřidlem, kaliperem.

Pro výpočet objemu nádoru byl použit vzorec:  $V = \pi/6 AB^2$ , kde A je délka nádoru a B je výška nádoru.

#### **3.6.2. Měření teplot myší během terapie**

Ve druhém experimentu byla myším každý druhý den změřena teplota nádoru (L) a referenčního bodu na protilehlé straně zad (P). Měřilo se teploměrem IR RODENT THERMOMETER 153 IRB od firmy BIOSEB.

#### **3.6.3. Statistické vyhodnocení dat**

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

Přežívání myší bylo vyhodnoceno pomocí analýzy přežití Kaplan-Meier v programu MedCalc.

### **3.7. Pokus č. 1: *In vitro* studium vlivu CAPs na buňky melanomu B16-F10 a na buňky morčecích ledvin**

V prvním pokuse byl vyhodnocován vliv LL-8 a LL-8/12 na buňky melanomu B16-F10 *in vitro* a srovnáván s vlivem na primokulturu buněk morčecích ledvin.

Pro tento účel byly nejprve kultivovány obojí buňky na 96jamkovém panelu v množství 20 000 buněk/jamku v 200  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% FCS. Po 24 hodinách bylo médium opatrně odstraněno a nahrazeno 100  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% FCS obsahujícími látky LL-8 a LL-8/12 v koncentracích 5 – 20 mM. Kontrolou bylo 100  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% FCS. Vše bylo prováděno ve dvou paralelkách. Byla provedena 24hodinová kultivace, kdy byl průběžně sledován stupeň adherence buněk, a na závěr byly buňky sklizeny trypsinizací a s pomocí Trypanové modři a Bürkerovy komůrky byl vyhodnocen počet buněk.

### **3.8. Pokus č. 2: *In vivo* studium vlivu CAPs na růst melanomu**

Ve druhém pokusu bylo použito 18 samic myši kmene C57BL/6N, kterým byl s.c. transplantován melanom B16-F10 (400 000 buněk/myš). Po dvanácti dnech byla zahájena terapie.

Myši byly nejdříve randomizovány do tří skupin (A, B a K), každou skupinu tvořilo 6 myší.

#### **Schéma experimentu:**

Skupina A: i.t. aplikace 50  $\mu$ l 4 mM LL-8 v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina B: i.t. aplikace 50  $\mu$ l 4 mM LL-8/12 v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina K – kontrola: i.t. aplikace 50  $\mu$ l PBS v den 0, 1, 2.

Prvních čtrnáct dnů byla obden měřena velikost nádorů a teplota, následně pak byla sledována doba přežití.

### **3.9. Pokus č. 3: *In vivo* studium závislosti účinku CAPs na koncentraci. Ověření možnosti prohloubení účinku CAPs na základě manosilace**

V tomto pokusu bylo použito 36 samic myši kmene C57BL/6N. Dvanáct dní po s.c. transplantaci melanomu B16-F10 (400 000 buněk/myš) byly myši rozděleny do šesti skupin (A, B, C, D, E a K), každou skupinu tvořilo 6 myší.

#### **Schéma experimentu:**

Skupina A: i.t aplikace 50  $\mu$ l 4 mM LL-8/12 v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina B: i.t aplikace 50  $\mu$ l 1 mM LL-8/12 v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina C: i.t aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM LL-8/12 v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina D: i.t aplikace 50  $\mu$ l 4 mM (man)<sub>2</sub> CAP (J) v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina E: i.t aplikace 50  $\mu$ l 4 mM CAP (J) v PBS v den 0, 1, 2.

Skupina K – kontrola: i.t aplikace 50  $\mu$ l PBS v den 0, 1, 2.

Obden byla prvních 14 dnů měřena velikost nádorů. Poté bylo sledováno přežití myší.



## 4. Výsledky

### 4.1. Pokusu č. 1: *In vitro* studium vlivu CAPs na buňky melanomu B16-F10 a na buňky morčecích ledvin

Katnické peptidy LL-8 a LL-8/12 působily účinně jak na nádorové buňky, tak i na buňky morčecích ledvin. Již po půl hodině bylo možno u vyšších koncentrací CAP pozorovat rušení adherence buněk, které se stále prohlubovalo. Účinněji oba peptidy působily na nádorové buňky, a to již při 10mikromolárních koncentracích. Na buňky morčecích ledvin působily koncentrace až 20mikromolární. Látky LL-8 a LL-8/12 ve vzájemném srovnání měly stejný vliv na rušení adherence buněk.

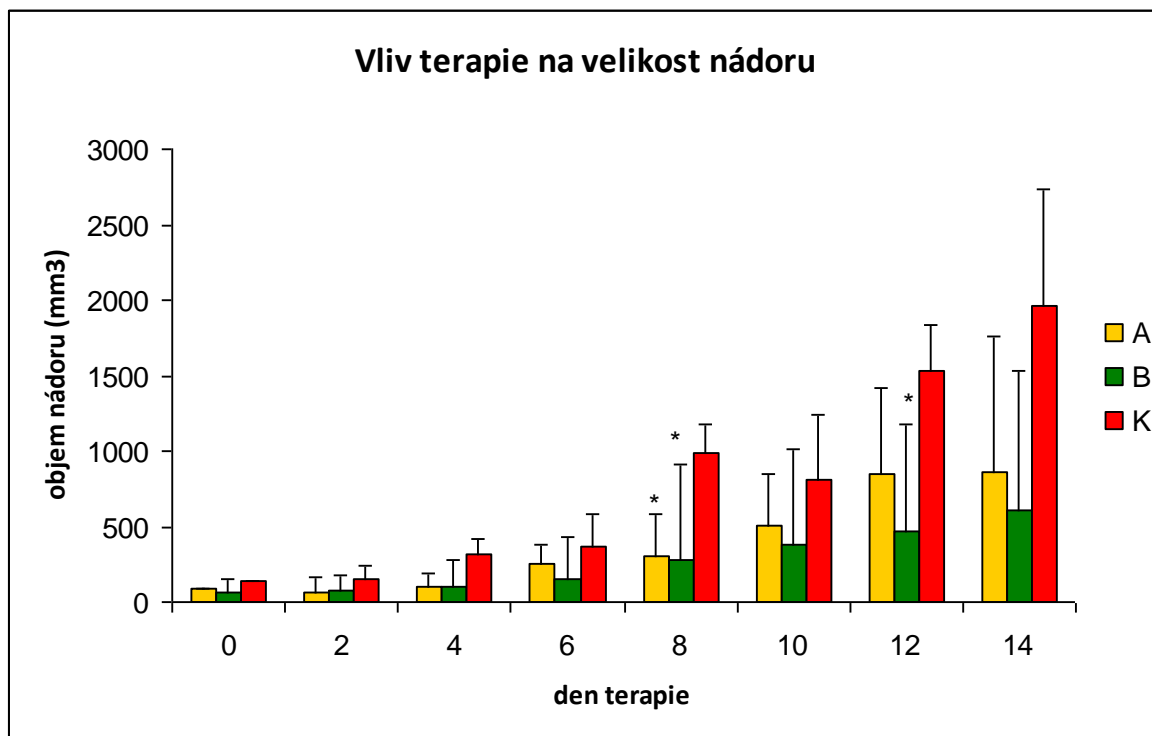
Během počítání živých buněk po experimentu jsme došli ke stejnému závěru. V tomto případě také nebyl výraznější rozdíl mezi látkou LL-8 a LL-8/12. Výrazné redukce nádorových buněk bylo dosaženo opět již při 10mikromolárních koncentracích. Buňky morčecích ledvin byly odolnější, zde byly pro výraznou redukci počtu buněk potřebné 20mikromolární koncentrace (viz Tab. 1).

	<b>B16-F10</b>	<b>Morčecí ledviny</b>
<b>LL-8</b> <b>20 μM</b>	6 000	11 500
<b>LL-8</b> <b>10 μM</b>	34 500	30 000
<b>LL-8</b> <b>5 μM</b>	79 000	37 000
<b>LL-8/12</b> <b>20 μM</b>	0	1 500
<b>LL-8/12</b> <b>10 μM</b>	31 500	41 000
<b>LL-8/12</b> <b>5 μM</b>	77 500	44 500
<b>kontrola</b>	93 500	44 500

Tab. 1.: Působení LL8 a LL8/12 na buňky morčecích ledvin (primokultura) a na buňky melanomu B16-F10. V tabulce jsou uvedeny průměrné počty živých buněk po 24 hodinové kultivaci.

#### 4.2. Pokusu č. 2: *In vivo* studium vlivu CAPs na růst melanomu

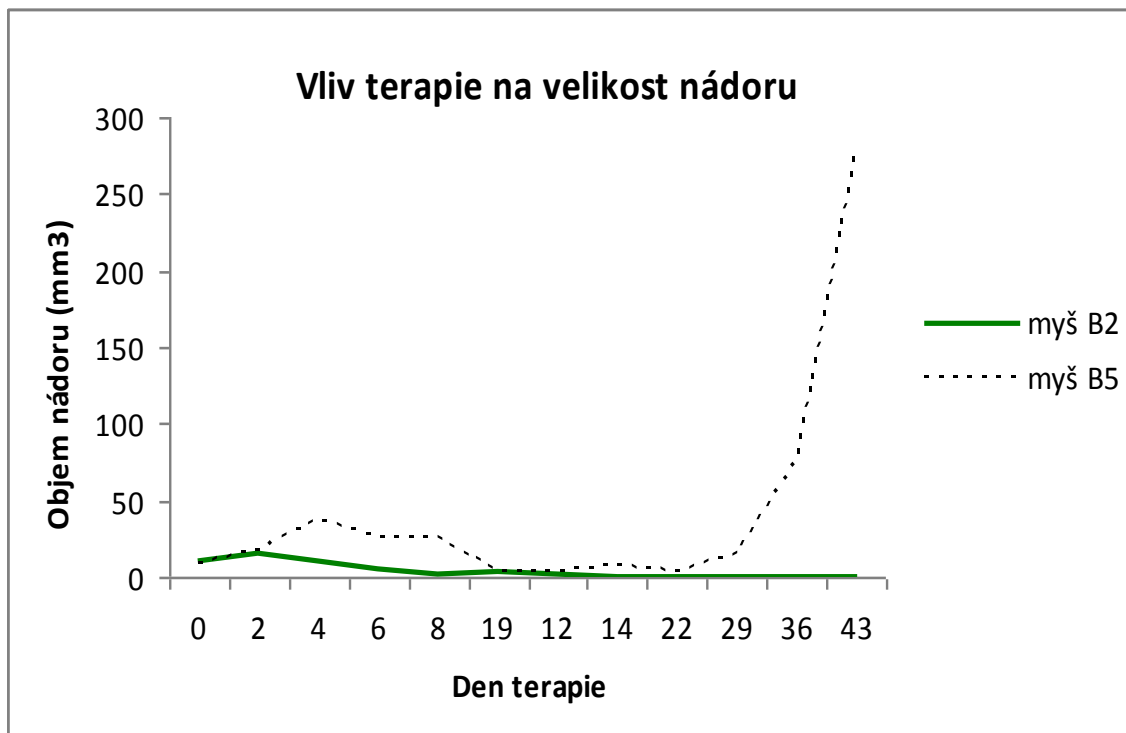
Výsledky vlivu látek LL-8 a LL-8/12 na růst melanomů udává obrázek 2. Z grafu vyplývá statisticky významná redukce nádorového růstu, vyšší v případě použití preparátu LL-8/12, tedy s D-aminokyselinami.



Obr. 2: Vliv terapie na velikost nádoru: Skupina A - léčená LL-8, skupina B - léčená LL-8/12, skupina K je kontrolní (PBS).

\* =  $P \leq 0,05$

Dvě myši ze skupiny B (LL-8/12) přežily po transplantaci 100 dnů. Průběh velikosti jejich nádorů v čase znázorňuje obrázek 3. U myši B2 nádor zmizel a již se neobjevil (myš nyní žije 408 dní od transplantace a je zcela bez nádoru). U myši B5 došlo k recidivě a myš 104 dnů po transplantaci uhynula.



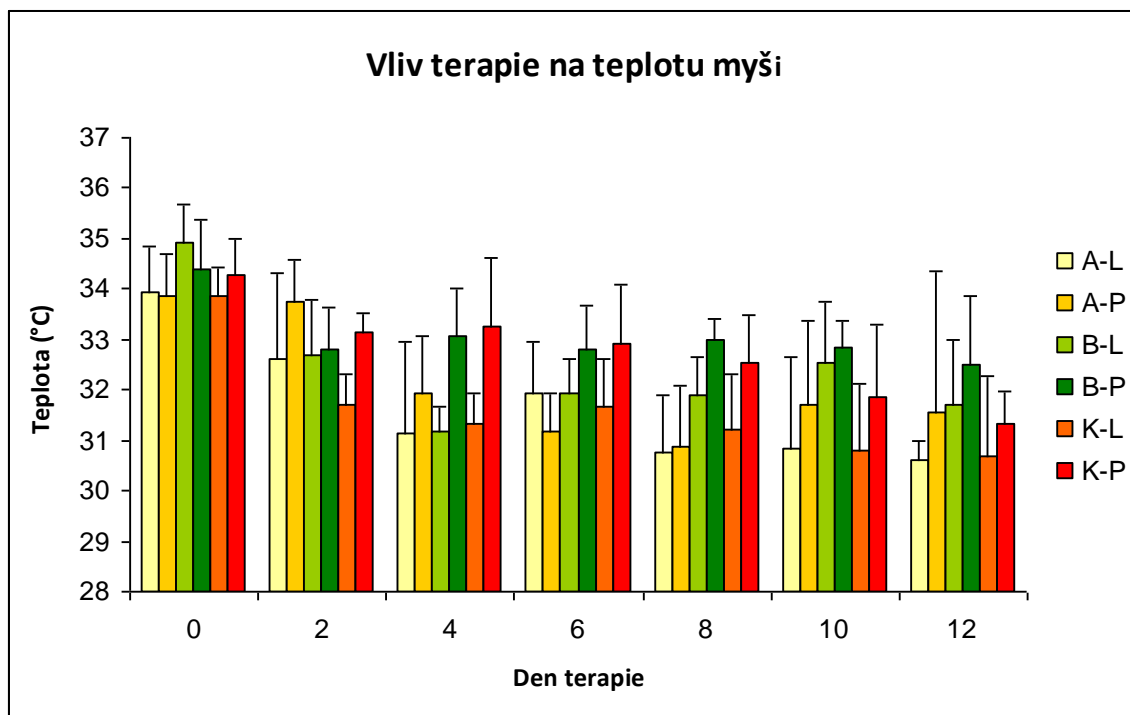
Obr. 3: Vliv terapie na velikost nádoru: Myš B2 žije 408 dnů, myš B5 104 dnů po transplantaci uhynula.

Na obrázku 4 je fotografie myši B2, která přežila po transplantaci buněk B16-F10 a byla úspěšně vyléčena. Myš nyní žije 408 dní od transplantace.



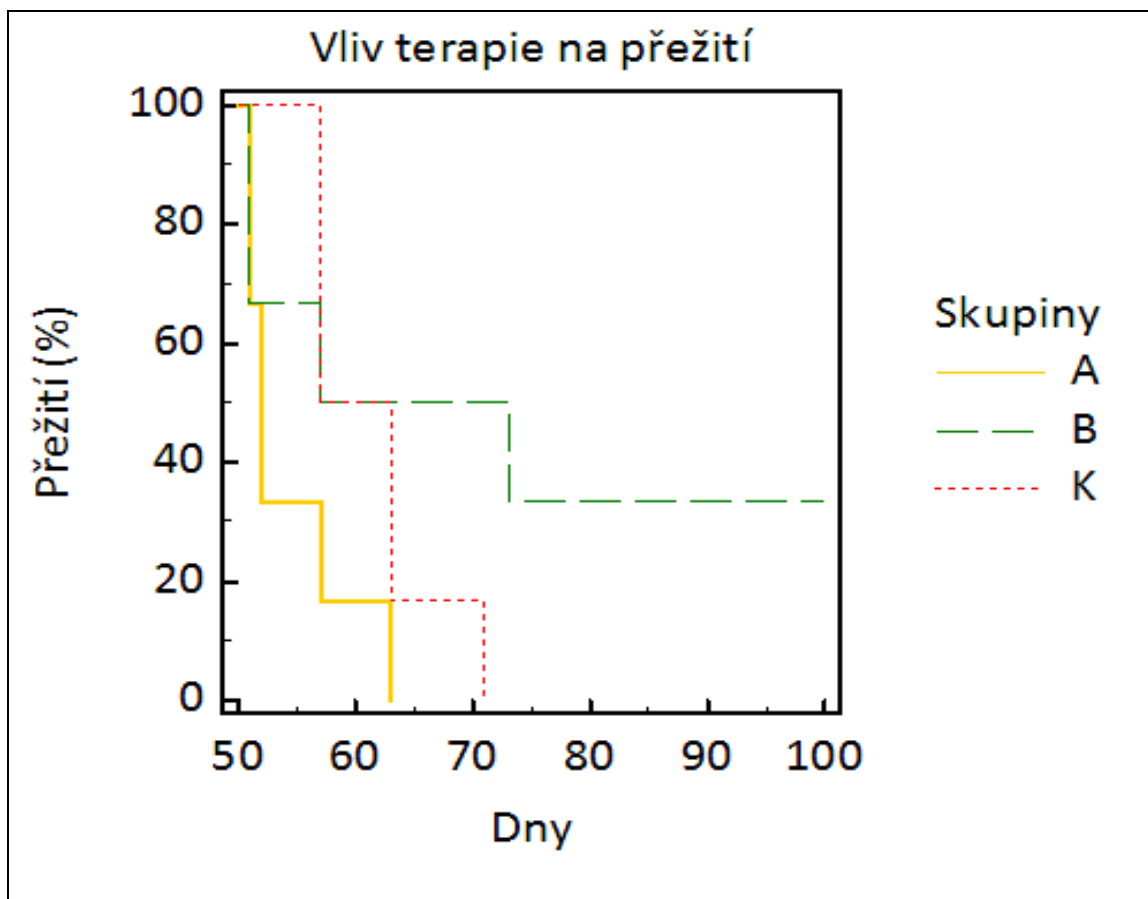
Obr. 4: Myš B2 408 dní po transplantaci buněk B16-F10.

Na obrázku 5 můžeme vidět, jak se měnila teplota nádoru a referenčního bodu během terapie. Kromě zpravidla nižší teploty nádoru a postupného poklesu všech teplot během experimentu, teploty způsob a průběh terapie neodrážely.



Obr. 5: Vliv terapie na teplotu myši: L – teplota nádoru, P – referenční bod na protilehlé straně zad. Skupina A - léčená LL-8, skupina B - léčená LL-8/12, skupina K je kontrolní (PBS).

Obrázek 6 udává analýzu přežití podle Kaplan-Meiera. Na rozdíl od preparátu LL-8 (skupina A), který vyvolal statisticky významné ( \* =  $P \leq 0,05$  ) zkrácení doby přežití, preparát B (LL-8/12) sice u dvou myší vyvolal výrazné prodloužení jejich přežití (u jedné došlo k uzdravení), ale statisticky to významné nebylo.



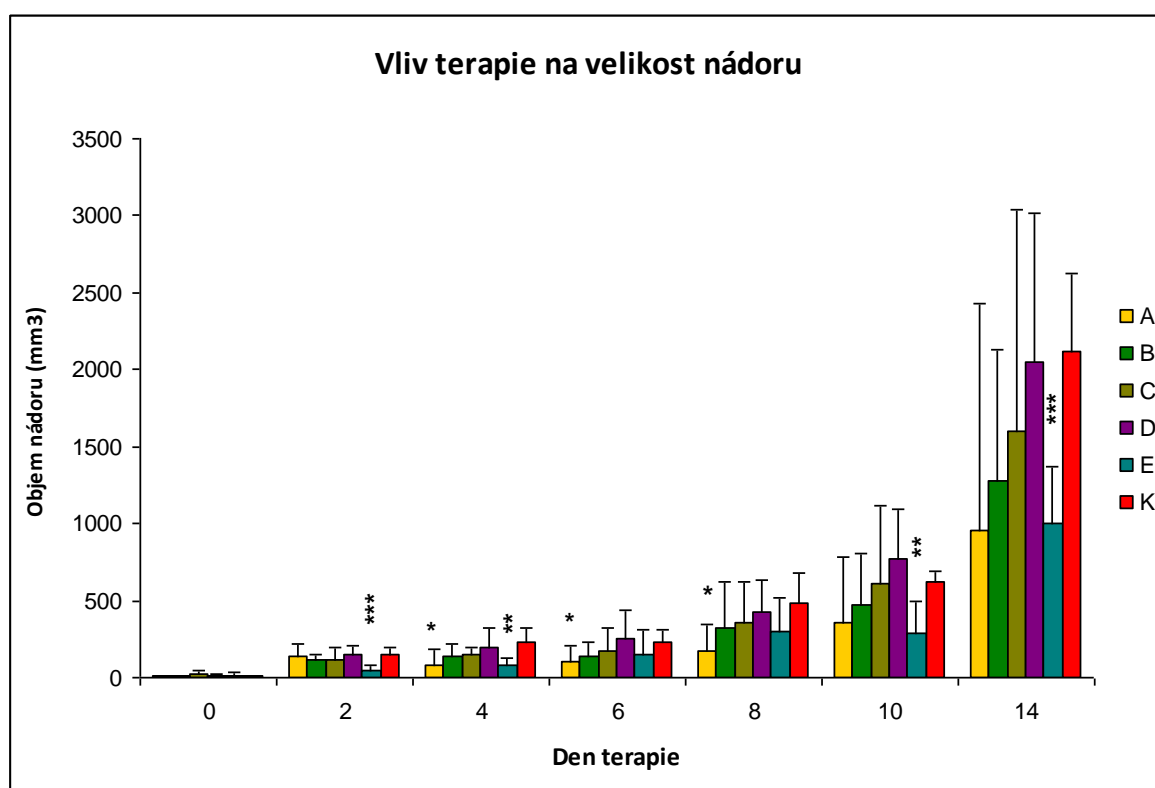
Obr. 6: Analýza přežití podle Kaplan-Meiera.

\* =  $P \leq 0,05$  A verus K

### 4.3. Pokusu č. 3: *In vivo* studium závislosti účinku CAPs na koncentraci. Ověření možnosti prohloubení účinku CAPs na základě manosilace

Vyhodnocení třetího pokusu je zobrazeno na obrázku 7. Z něj vyplývá, že účinek látky LL-8/12 je koncentračně závislý a jeho 4 mM koncentrace vyvolává statisticky významnou redukci nádorového růstu, pozorovanou i ve druhém experimentu.

Z peptidů od doktora Ježka vykazuje velice příznivou, statisticky významnou a s LL-8/12 srovnatelnou redukci nádorového růstu peptid ve skupině E, tedy 4 mM CAP(J). Peptid ve skupině D – 4 mM (man)<sub>2</sub> CAP(J) nevykazoval žádnou redukci nádorového růstu.



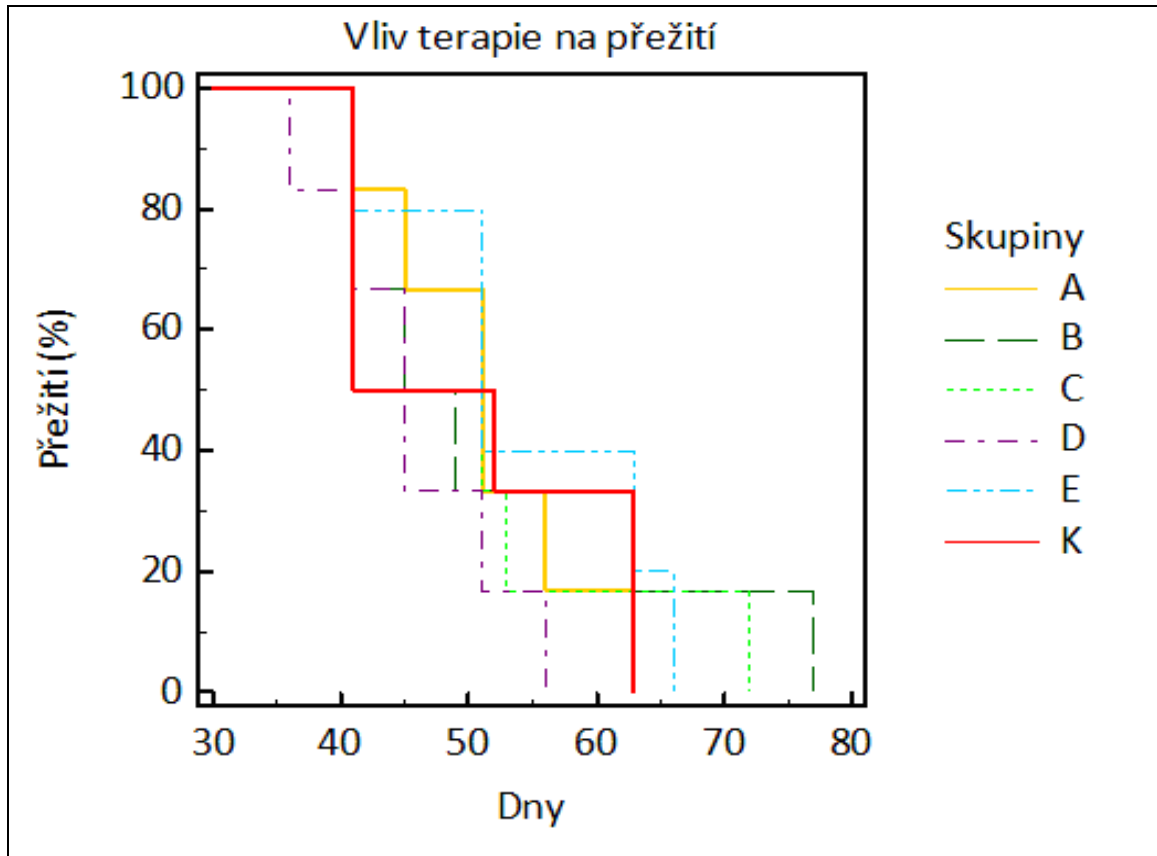
Obr. 7: Vliv terapie na velikost nádoru: Skupina A - léčená 4 mM LL-8/12, skupina B - léčená 1 mM LL-8/12, skupina C - léčená 0,5 mM LL-8/12, skupina D - léčená 4 mM (man)<sub>2</sub> CAP (J), skupina E - léčená 4 mM CAP (J), skupina K je kontrolní (PBS).

\* = P ≤ 0,05

\*\* = P ≤ 0,01

\*\*\* = P ≤ 0,005

Obrázek 8 udává analýzu přežití. Analýza podle Kaplan-Meiera neprokázala statistickou významnost rozdílu mezi jednotlivými léčenými skupinami navzájem ani v jejich srovnání s kontrolou.



Obr. 8: Analýza přežití podle Kaplan-Meiera.



## 5. Diskuze

Použití kationických antimikrobiálních peptidů v nádorové terapii vychází z jedné z jejich hlavních vlastností. Tou je pozitivní náboj. Díky kladně nabitému náboji jsou peptidy schopny navázat se na buněčnou membránu, a to nejen mikroorganismů, které jsou záporně nabitě s výjimkou *Stenotrophomonas maltophilia* (Jucker a kol. 1996), ale i na nádorové buňky, které rovněž nesou na svém povrchu negativní náboj (Marquez a kol. 2004). Tím se naruší struktura buňky a její funkce. Proniknutím peptidů do cytoplasmy dochází k buněčné smrti buňky, např. když je porušena syntéza DNA či RNA (Doležilková a kol. 2011).

Nádorové buňky na povrchu své buněčné membrány nesou silný negativní náboj, za který jsou zodpovědné anionické molekuly jako fosfatidyl serin a *O*-glykosylované muciny. Jen pro srovnání, buněčná stěna normálních buněk je bohatá na zwitterionické molekuly, jako jsou např. sfingomyelin a fosfatidyl cholin, díky kterým mají normální buňky neutrální náboj (Huang a kol. 2010). Významný podíl na záporném náboji nádorových buněk má kyselina sialová. Nádorové buňky mnohem více podléhají sialylaci než buňky normálních tkání. Sialová kyselina přispívá k malignímu fenotypu nádorových buněk, ovlivňující metastazující potenciál. Sialová kyselina má silný elektronegativní náboj za fyziologického pH. To umožňuje elektrostatické interakce s kationickými peptidy (Marquez a kol. 2004).

Záporný náboj nádorových buněk umožňuje interakci s CAPs a určuje selektivitu tohoto účinku (Marquez a kol. 2004). Ta se projevila v našem prvním experimentu vyšší mírou ataku nádorových buněk ve srovnání s normálními buňkami. Tento rozdíl účinku je však dramaticky vyšší, když jsou nádorové a normální buňky ve směsi a když se může uplatnit nábojově daná selektivita (Slaninová, *ústní sdělení*).

Potenciální úspěšnost léčby kationickými peptidy je omezena pouze na aplikaci peptidů místně, oblastně nebo přímo do nádoru. CAPs není vhodné používat pro systematickou léčbu vzhledem k produkci sialové kyseliny červenými buňkami a také kvůli silné tendenci nespecifické imunity odstraňovat CAPs z krevního oběhu (Marquez a kol. 2004).

Ve druhém pokusu jsme se zaměřili na zkoumání vlivu peptidů LL-8 a LL-8/12 *in vivo* na melanomy. Z výsledků vyplývá, že oba peptidy způsobují redukci nádoru. Více účinný byl peptid LL-8/12, především ve svém vlivu na přežití. Nebylo sice dosaženo statisticky významného prodloužení přežití, ale úplné vyléčení myši od agresivního a rychle

rostoucího melanomu je jevem unikátním. Je možné, že za lepší výsledky je zodpovědná D konfigurace aminokyselin v peptidickém řetězci. Peptidy složené z L i D aminokyselin se neliší nábojově a pravděpodobně se nebudou lišit ani v mechanismech perforace buněčné membrány, ale zásadní rozdíl by mohl být v jejich stabilitě. Peptid z D aminokyselin bude odolný vůči proteázám, hojným v nádorech. Vzhledem k tomu, že jsme použili krátkou terapii (pouze ve třech prvních dnech), bude možnost perzistence D peptidu výhodou.

Ve třetím pokuse jsme na základě výsledků druhého pokusu zkoumali vliv LL-8/12 o různých koncentracích *in vivo* na melanomu B16-F10. Použití alespoň 4 mM koncentrací se ukázalo jako nezbytné, protože nižší koncentrace měly slabou účinnost. Otázka prodloužení použití této látky nebo opakování tří denního terapeutického cyklu je otevřena, naráží jen na vysokou cenu syntetizovaných látek.

Dále jsme zkoumali vliv peptidu CAP (J) na nádorový růst a srovnávali ho s peptidem LL-8/12. Účinky na nádorový růst byly velmi podobné, což jistě souvisí s velmi podobnou strukturou. CAP (J) je na rozdíl od LL-8/12 složen jen z L-aminokyselin. Srovnání je uvedeno na obrázku 9.

**LL-8/12:** H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH<sub>2</sub>

**CAP (J):** H-Lys-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Lys-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH<sub>2</sub>

Obr. 9: Srovnání peptidu LL-8/12 a CAP(J).

Testování (man)<sub>2</sub> CAP (J) bylo dáno tím, že je v laboratoři paralelně řešena otázka instalace fagocytárních ligandů na povrch nádorových buněk s cílem stimulace ataku v rovině vrozené imunity. Imobilizace manosy se ukázala jako perspektivní (Kumžáková, *in prep.*), nicméně náš pokus použít pro imobilizaci molekuly kationického antimikrobiálního peptidu zklamal. Důvodem může být nejen to, že vazba manosových molekul mohla poškodit samotnou cytotoxičnost molekul, a tím snížit jejich působení, ale i to, že takto navázané molekuly manosy jsou pravděpodobně pro receptory (MR, MBL) nečitelné. Později jsme totiž zjistili, že molekuly manosy je třeba instalovat nejen co nejpevněji, ale je třeba, aby byly v prostoru, spojené s kotvící částí spacerem (Kumžáková, *in prep.*).

Kationické peptidy použité v této práci je možno porovnat s peptidem P18. Jedná se o uměle vyrobený peptid s  $\alpha$ -helikální strukturou, který obsahuje 17 reziduí aminokyselin (KWKFKKIPKFLHLAKKF-NH<sub>2</sub>) a dva helikální segmenty, N-helikální segment a C-helikální segment. Není přesně jasné, který segment vykazuje silnější antibiotickou aktivitu (Shin a kol. 2001). P18 vykazuje silnou cytotoxicitu proti lidským nádorovým buňkám, aniž by způsoboval hemolýzu normálních buněk. Tento peptid má schopnost se během několika minut navázat díky elektrostatickým interakcím na membránu maligní buňky, membrána praskne a uvolní se obsah cytoplasmatické membrány. Vše je zprostředkováno  $\alpha$ -helikální strukturou peptidu P18, která tvoří iontové kanálky. Tyto kanálky zvyšují propustnost membrány, jež nakonec praskne. Během experimentů s tímto peptidem bylo objeveno, že peptid P18 navodí smrt buňky prostřednictvím nekrózy. Jiné peptidy způsobí smrt buňky prostřednictvím klasické apoptózy (Huang a kol. 2010).

Účinek peptidu P18 byl zkoumán při *in vitro* experimentech (3denní působení) na lidských maligních melanomových buňkách A375, M14 melanomových buňkách a na NIH-3T3 fibroblastech myši. Výsledkem celého experimentu bylo, že peptid P18 vykazoval silnou toxicitu proti A375 a M14 melanomovým buňkám a nízkou proti normálním NIH-3T3 buňkám. Délka přežití melanomové nádorové linie byla méně než 50 % poté, co bylo na tyto buňky působeno 40  $\mu$ M P18, zatímco k dosažení stejného výsledku u buněk NIH-3T3 bylo potřeba až 80  $\mu$ M P18. Z toho vyplývá, že buňky nádorové melanomové linie byly, stejně jako v našem případě, dvakrát citlivější ve srovnání s normálními buňkami. Rovněž naše přípravky byly zřejmě účinnější, používali jsme koncentrace 4x nižší. (Huang a kol. 2020).

Jiný kationický peptid, který byl zkoumán *in vitro* a *in vivo* jako nový možný terapeutický prostředek proti rakovině, je Gomesin. Gomesin, se strukturou  $\beta$ -listu, byl izolován z hemocytů (krevní buňky bezobratlých) brazilského pavouka *Acanthoscurria gomesiana*. Obsahuje 18 reziduí aminokyselin (ZCRRLCYKQRCVTYCRGR<sub>NH2</sub>) a nese dva helikální segmenty, N-helikální segment a C-helikální segment. Gomesin se váže na povrch nádorových buněk díky elektrostatickým a hydrofobním interakcím. Zřejmě nevyžaduje žádné specifické povrchové receptory, aby snížil životaschopnost nádorových buněk. Gomesin působí cytotoxicky jako všechny přírodní peptidy (Rodrigues a kol 2008).

Během *in vitro* experimentu byly zkoumány různé účinky koncentrací Gomesinu. Buňky sublinie B16-F10 Nex2 byly inkubovány s rozdílnými koncentracemi Gomesinu (1, 5, 10 a 20  $\mu$ M) po dobu 15 minut až 5 hodin. Po 5hodinové inkubaci byly buňky promyty, aby se odstranil peptid, a pak byly dalších 24 hodin inkubovány. Další den se

buňky obarvily Trypanovou modří a pod mikroskopem bylo spočítáno množství živých buněk. Po ukončení experimentu vykazovaly největší redukční schopnost koncentrace 20 a 10 mikromolární, avšak redukční účinek byl pozorován již při 5  $\mu$ M koncentraci (Rodrigues a kol. 2008). Přestože uspořádání experimentu nebylo totožné s naším, lze konstatovat, že účinek Gomesinu na melanomové buňky nastává za srovnatelných koncentrací jako v našem experimentu.

Rodrigues a kol. (2008) provedli i experimenty s úspěšnou *in vivo* terapií melanomu B16-F10 Nex2 pomocí Gomesinu a zjistili příznivou redukci nádorového růstu a prodloužení doby přežití. Bližší srovnání s našimi experimenty není možné, protože zmíněný tým používal jako aplikační formu krém, který na nádory lokálně nanášel.

## 6. Závěr

- Zjistili jsme cytotoxický účinek CAPs na buňky myšního melanomu B16-F10 a primokultury buněk morčecích ledvin při *in vitro* pokusech. Účinek na nádorové buňky byl vyšší.
- Zjistili jsme výrazný koncentračně závislý terapeutický účinek CAPs na nádory myšního melanomu B16-F10 při *in vivo* pokusech. Vyšší účinek vyvolává all-D forma, pomocí které lze ojediněle dosáhnout úplného vyléčení.
- Manosylace CAPs za účelem kostimulace vrozené imunity se ukázala jako nevhodné řešení, CAPs pozbyly veškeré protinádorové účinky.
- Měření povrchové teploty nádorů a myši se ukázalo jako nevhodné pro monitorování nádorové terapie založené na použití CAPs.

## 7. Seznam použité literatury

BROWN, L.M.; WELCH, D.R.; RANNELS, S.R. *B16F10 melanoma cell colonization of mouse lung is enhanced by partial pneumonectomy*. *Clinical & Experimental Metastasi*. 2002, 19, 5, s. 369 - 376.

BANDARCHI, B.; MA, L.; NAVAB, R.; SETH, A.; RASTY, G. *From melanocyte to metastatic malignant melanom*. *Dermatology Reseach and Practise*. 2010, 7, s. 1 - 8.

BARNHILL, R.L.; PIEPKORN, M.; BUSAM, K.J. *Pathology of melanocytic nevi and malignant mealonoma*. Second edition. New York: Springer, 2004. 237 s.

COLEY, W.B. *The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins: the mixed toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1910, 3, s. 1 - 48.

DAGLEISH, A.M.; WHELAN, M.A. *Cancer vaccines as a therapeutic modality: the long trek*. *Cancer Immunol Immunother*. 2006, 55, s. 1025 – 1032.

DOLEŽÍLKOVÁ, I.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T. *Antimikrobiální Peptidy: vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou*. *Chemické listy*. 2011, 105, s. 246 - 355.

FOON, K.A. *Biological therapy of cancer*. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1986, 7, 1, s. 5 - 14.

FOON, K.A.; MUSS, H.B. *Biological and hormonal therapies of cancer*. United States of America: Kluwer Academic Publisher, 1998. 289 s.

FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Third edition. Oxford: Oxford University Press, 1999. 457 s.

HOŘEJŠÍ, V.; BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Čtvrté vydání. Praha: Triton, 2009. 316 s.

HUANG, W.; LU, L.; SHAO, X.; TANG, CH.; ZHAO, X. *Anti-melanoma activity of hybrid peptide P18 and its mechanism of action*. Biotechnology Letters. 2010, 32, s. 463 - 469.

JUCKER, B.A.; HARMS, H.; ZEHNDER, A.J.B *Adhesion of the positively charged bacterium Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia 70401 to glass and teflon*. Journal of Bakteriology. 1996, 178, 18, s. 5472 - 5479.

KLENER, P.; a kol. *Základy vnitřního lékařství pro bakalářské studium*. Praha: Karolinum, 1996. 170 s.

KRAJSOVÁ, I.; BAUER, J. *Kožní nádory: prevence a včasná diagnostika*. Praha: Jessenius, 1994. 64 s.

MADER, J.S.; HOSKIN, D.W. *Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment*. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2006, 15, 8, s. 933 - 946.

MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; LENNARTSSON, L.; LIU, Z.; TAMMELA, T.; RAITANEN, M.; HOLMBERG, A.R. *Charge-dependent targeting: results in six tumor cell lines*. Anticancer Research. 2004, 24, s. 1347 - 1352.

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 Science. 2002, 70, 7, s. 781 - 798.

NAUTS, H.C.; McLAREN, J.R. *Coley toxin-the first century*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 1990, 267, s. 483 - 500.

NEUBAUEROVÁ, T.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T.; KOUTEK, B. *Kationické antimikrobiální peptidy*. Chemické listy. 2009, 103, s. 460 - 468.

OLSON, J.S. *The history of cancer: an annotated bibliography*. Connecticut: Greenwood Press, 1989. 426 s.

PACOVSKÝ, V. *Vnitřní lékařství: učebnice pro střední zdravotnické školy*. Praha: Osveta-Avicenum, 1993. 343 s.

PETERS, B.M.; SHIRTLIFF, M.E.; JABRA-RIZK, M.A. *Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?* Plos Pathogens. 2010, 6, 10.

POLLOCK, R.E.; CURLEY, S.A.; ROSS, M.I.; a kol. *Advanced therapy in surgical oncology*. United States of America: BC Decker, 2008. 885 s.

RODRIGUES, E.G.; DOBROFF, A.S.S.; CAVARSAN, C.F.; PASCHOALIN, T.; NIMRICHTER, L.; MORTARA, R.A.; SANTOS, E.L.; FÁZIO, M.A.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; TRAVASSOS, L.R. *Effective topical treatment of subcutaneous murine B16-F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide Gomesin*. Neoplasia. 2008, 10, 1, s. 61 - 68.

SHIN, S.Y.; LEE, S.H.; YANG, S.T.; PARK, E.J; LEE, D.G.; LEE, M.K.; EOM, S.H.; SONG, W.K.; KIM, Y.; HAHM, K.S.; KIM, J.I. *Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of alpha-helical antibiotic peptide, P18 and its analogs*. The Journal of Peptide Research. 2001, 58, 6, s. 504 - 514.

SOUHAMI, R.L.; TOBIAS, J. *Cancer and its management*. Fifth edition. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2005. 533 s.

ŠAFRÁNKOVÁ, A.; NEJEDLÁ, M. *Interní ošetřovatelství II*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. 211 s.

THOMAS, J.A.; BADINI, M. *The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer*. Review Article. 2011, 48, 2, s. 246 - 251.

VORLÍČEK, J.; ABRAHÁMOVÁ, J.; VORLÍČKOVÁ, H.; a kol. *Klinická onkologie pro sestry*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. 328 s.

WEIMANN, B.; STARNES, CH.O. *Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective*. Pharmacology & Therapeutics. 1994, 64, s. 529 - 564.