

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění
pomocí sloučenin s terminální manosou**

Bakalářská práce

Zuzana Kumžáková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Kumžáková Z., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí sloučenin s terminální manosou. [Proving the possibility of cancer therapy using compounds with terminal mannose. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The goal of this thesis is to prove whether it is possible to use compounds with terminal mannose (agonists of mannose receptor and mannose-binding lectin) for cancer treatment.

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, 25. 4. 2012

Zuzana Kumžáková

.....

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala svému panu školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc., a to hlavně za nekonečný optimismus, dobrou náladu, obrovské nasazení, ochotu pomoci, skvělé nápady a hromadu užitečných i nezbytných rad, bez nichž bychom se v průběhu našeho snažení jen velmi těžko obešli. Dále děkuji kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za příjemné pracovní prostředí a v neposlední řadě také celé rodině a všem kamarádům, protože jsou mou podporou v průběhu celého studia.

Obsah

1.	Úvodní seznámení s nádorovými onemocněními.....	1
1.1	Nádorové onemocnění (rakovina)	1
1.1.1	Definice	1
1.1.2	Pár slov z historie	1
1.1.3	Společné znaky nádorových onemocnění.....	2
1.1.4	Rozdělení nádorů.....	4
1.2	Maligní melanom.....	5
1.2.1	Epidemiologie.....	5
1.2.2	Etiologie a patogeneze.....	5
1.2.3	Vznik	6
1.2.3.1	Melanocyt.....	6
1.2.3.2	Melanocytem počínaje, melanomem konče	6
1.2.4	Klasifikace	7
1.2.5	Melanom B16-F10.....	8
1.3	Vrozená imunita.....	9
1.3.1	Rozdíl mezi vrozenou a získanou imunitou	9
1.3.2	Rozpoznávání antigenů mechanismy vrozené imunity	9
1.3.2.1	Pathogen associated molecular patterns (PAMPs).....	9
1.3.2.2	Pattern recognition receptors (PRR).....	10
1.3.3	Nádory a imunitní systém.....	14
1.3.3.1	Nádorové antigeny	14
1.3.3.2	Obranné mechanismy nádorů proti imunitnímu útoku	15
1.3.3.3	Imunoterapie nádorů	15
2.	Cíle práce.....	17
3.	Materiál a metody.....	18

3.1	Použité chemikálie	18
3.2	Experimentální zvířata	18
3.3	Buněčná linie	18
3.4	Příprava a transplantace buněk melanomu B16-F10	18
3.5	Měření teploty a velikosti nádorů, aplikace léčiv	19
3.6	Počítání metastáz	19
3.7	Zpracovávání dat.....	20
3.8	Pokus č. 1 –	20
	Vliv nevázané manosy a její kombinace s LPS na růst melanomu	20
3.9	Pokus č. 2 –	20
	Vliv monomanosyldekalysinu na melanomový růst	20
3.10	Pokus č. 3 –	21
	Pokus o stimulaci účinku monomanosyldekalysinu na nádorový růst pomocí LPS	21
3.11	Pokus č. 4 –	21
	Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na terapii maligního melanomu	21
4.	Výsledky.....	23
4.1	Pokus č. 1 –	23
	Vliv nevázané manosy a její kombinace s LPS na růst melanomu	23
4.2	Pokus č. 2 –	24
	Vliv monomanosyldekalysinu na melanomový růst	24
4.3	Pokus č. 3 –	26
	Pokus o stimulaci účinku monomanosyldekalysinu na nádorový růst pomocí LPS	26
4.4	Pokus č. 4 –	29
	Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na terapii maligního melanomu	29
5.	Diskuse	32

6. Závěr.....	35
7. Seznam použité literatury	36

1. Úvodní seznámení s nádorovými onemocněními

1.1 Nádorové onemocnění (rakovina)

1.1.1 Definice

Nádorové onemocnění je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem ostatních tkání a s rovnovážným stavem organismu. Nádorová proliferace přetrvává i po odstranění příčiny vzniku nádoru (Rejthar a Vojtěšek 2002).

1.1.2 Pár slov z historie

První zmínky o tom, že nádorová onemocnění provázejí člověka odnepaměti, pocházejí ze starého Egypta, ale i z Číny, Mezopotámie, Arabských zemí a Japonska (Petera et al. 2005).

Hippokrates, slavný řecký lékař, použil jako první termín karcinom (Javier a Butel 2008), a to k označení pokročilého stádia karcinomu prsu, jenž mu připomínal siluetu pobřežního kraba *Carcinides meanas* (Petera et al. 2005).

Již v dobách starého Řecka se Platón ve své Ústavě zabýval otázkami týkajícími se filosofických a etických aspektů lékařské péče. Domníval se, že lékařství bylo stanoveno k vyhánění nemocí léky a řezáním z těl lidí nemocných, kteří však celkově mají těla v dobrém zdravotním stavu, zatímco o těla skrz naskrz prostoupená nemocí takto pečováno nebylo (Petera et al. 2005).

V období od středověku do 16. století nebyla doporučována chirurgická léčba nádorů, jelikož vedla k progresi onemocnění. Volila se taktika vyčkávání: „Pokud nádor odpočívá, má odpočívat také lékař,“ říkalo se. Pomáhat měli i svatí, sv. Peregrin se stal patronem pro nemocné s nádory, sv. Agáta patronkou pro pacientky s karcinomem prsu a sv. Erasmus pomáhal nemocným s nádory trávicího ústrojí (Petera et al. 2005).

Pokroky v patologické anatomii, anestezii a chirurgické technice vedly v 19. století k zvýšení zájmu o nádorová onemocnění. Na přelomu 19. a 20. století se začalo využívat záření X a gama, radioterapie se postavila vedle chirurgie jako jedna z nejúčinnějších zbraní v boji s rakovinou. Pro 20. století je typický rozvoj chemoterapie a poznání molekulárně biologických mechanismů řízení proliferace a diferenciací buněk a protinádorové imunity

přineslo nové léčebné metody, imunoterapii a biologickou terapii, jež umožňují daleko cílenější, přesnější a specifitější zásah nádorových buněk (Petera et al. 2005).

V současné době výskyt nádorových onemocnění stále roste. Úmrtnost na nádorová onemocnění v rozvinutých zemích už v roce 2010 překročila úmrtnost na ischemickou chorobu srdeční, dřívější nejčastější příčinu smrti (Jemal et al. 2011, Dienstbier 1994).

1.1.3 Společné znaky nádorových onemocnění

Nádorové onemocnění je termín označující obrovskou skupinu onemocnění lišících se tkáňovým původem, mechanismem vzniku a případného šíření, ale i letalitou. I přes velkou různorodost genotypických projevů je možno najít některé společné charakteristické znaky, kterými se nádorové buňky liší od zdravých buněk somatických (Petera et al. 2005). Jsou jimi:

a) zvýšená proliferační aktivita

U mnohobuněčných organismů je nezbytná intenzivní proliferační aktivita v období embryonálního vývoje, kdy vzniká potomstvo jedné buňky čítající $10^{12} - 10^{14}$ buněk. U dospělých je počet dělení konstantní, ale ne malý, jelikož organismus musí nahrazovat ztráty způsobené poškozením a opotřebením. Tato aktivita je velmi přesně řízena, reaguje na aktuální potřeby a stav organismu i na změny v jeho okolí. Základním znakem maligních transformací je porucha či ztráta mechanismů regulujících proliferační aktivitu (Petera et al. 2005). Počet nekoordinovaně rostoucích transformovaných buněk v nádorové populaci se proti zdravé tkáni obvykle rychle zvyšuje, ale čas mezi jednotlivými mitózami (tedy čas zdvojení buněk) je výrazně delší (Rejthar a Vojtěšek 2002). Toho se využívá při terapii nádorových onemocnění.

b) snížený rozsah programované buněčné smrti, neschopnost aktivovat apoptózu

Apoptóza, čili programovaná buněčná smrt, je typická pro somatické buňky poškozené či neodpovídající na buněčné signály. Nádorové buňky si na základě různých strategií vytvářejí vůči apoptóze odolnost. Například protein P53, produkt p53 tumor supresorového genu, je důležitou složkou senzoru sloužícího k rozpoznání poškození DNA a takto poškozenou buňku pošle do apoptózy. U 50% lidských nádorových onemocnění bývá tento systém poškozen (Rejthar a Vojtěšek 2002).

c) dediferenciace, únik z terminální diference

Dělení somatických buněk je závislé na jejich diferenciaci. Kmenová buňka se dělí nestejnoměrně, dochází k takzvané asymetrické mitóze. Při ní vznikají dvě buňky, přičemž jedna z nich nahradí buňku kmenovou (setrvává ve fázi G0) a druhá se diferencuje. U neoplastických buněk vzniká kvantitativní diferenciacní porucha, pro niž je typické zablokování diference, což znemožňuje úplné funkční dozrávání nádorové buňky ve všech fenotypových oblastech (Rejthar a Vojtěšek 2002).

d) imortalita, obcházení replikační senescence

Zdravá somatická buňka je schopna se během svého života dělit 50 – 60. Toto udává tzv. Hayflickova konstanta. Během dělení dochází ke zkracování konců chromozomů, tzv. telomér. Nádorová buňka má vlastní enzym, telomerázu, která slouží k dosyntetizování telomér, tedy umožňuje její neomezené dělení (Rejthar a Vojtěšek 2002).

e) zvýšená invazivita

Neoplastické buňky jsou obecně agresivní vůči svému okolí. To vede k jejich zvýšené invazivitě a zakládání sekundárních nádorových ložisek, takzvaných metastáz, v případě maligních onemocnění. (Petera et al. 2005)

f) neoangiogeneze

Nádory nesou plně autonomní, do určité míry jsou vždy závislé na obvyklých vlivech organismu. Jedná se o růstovou závislost, reakce na změny krevního zásobení a sycení krve kyslíkem, glykémii, přítomnost cytokinů aj. (Rejthar a Vojtěšek 2002) Jsou ale schopny vyvolávat svou vlastní vaskularizaci, bez níž by nedosahovaly objemu většího než 1 až 2 mm³.

g) autonomie – snížení závislosti neoplastických buněk na okolním prostředí

Nádorové buňky jsou in vitro schopny růstu v základním médiu (bez séra). Nepotřebují růstové faktory, kyslík a rostou i bez přítomnosti dalších buněk. Vytvářejí kolonie i při nízké hustotě nasazení. V suspenzní kultuře se mohou se množit, i když se nedotýkají podložky (tento jev se používá k průkazu malignity). Ztrácejí schopnost kontaktní inhibice pohybu a proliferace, rostou tedy do vysokých hustot a někdy vytvářejí i několik vrstev buněk na sobě. (Petera et al. 2005)

h) nestabilita genetické informace (genomu)

I na cytogenetické úrovni je možno najít rozdíly mezi nádorovou buňkou a buňkou somatickou. Pro nádory je typická změna počtu chromozómů (aneuploidie a polyploidie).

Chromozomální změny jsou známy například u chronické myeloidní leukémie, kde dochází ke vzniku takzvaného Filadelfského chromozomu translokací t (9;22). (Petera et al. 2005)

Syndrom chromozomální nestability je jiný název pro nestabilitu genomu. U takto postižených jedinců se často vyskytují mnohočetné nádory již v raném věku. V těchto případech lze často prokázat změny v reparačních systémech opravujících mutace DNA (Petera et al. 2005).

1.1.4 Rozdělení nádorů

Podle vztahu nádoru k obklopující tkáni a podle způsobu jeho šíření a tím daného biologického i klinického chování rozdělujeme nádory na benigní a maligní (Rejthar a Vojtěšek 2002).

Nádory benigní jsou nezhoubné. Oproti jiným proliferujícím buňkám v organismu nemají výrazně pozměněné buněčné povrchy, zachovávají si kohezivitu i vztah ke stromatu, proto je jejich růst pouze místně expanzivní. Bývají homologní a většinou rostou pomalu. Jsou buď jen ohraničené, nebo i zapouzdřené, což umožňuje jejich relativně snadné chirurgické odstranění. Na své okolí působí většinou jen tlakem a endokrinní aktivitou (Rejthar a Vojtěšek 2002).

Nádory maligní jsou zhoubné, rostou agresivně a invazivně a mají schopnost vytvářet nová, dceřiná nádorová ložiska v místech vzdálených od primárního nádoru a bez morfologické souvislosti s ním, tedy metastazovat. Bývají nepřesně ohraničené, což je příčinou jejich složitějšího chirurgického odstraňování. Svým biologickým chováním destrukují napadenou tkáň a bez včasné diagnózy a léčby jsou fatální (Rejthar a Vojtěšek 2002).

Nádory lze dále dělit podle toho, v jaké tkáni vznikají, a to následovně (Vorlíček et al. 2006):

- **nádory epiteliálního původu**
 - benigní – papilom, adenom
 - maligní – karcinom, adenokarcinom
- **nádory mezenchymálního původu**
 - benigní – fibrom, chondrom, myom
 - maligní – sarkom
- **nádory z hematopoetické a lymforetikulární tkáně**
 - maligní – lymfom a leukémie

- **nádory neuroektodermového původu (nádory CNS a kůže)**
 - benigní – pigmentový névus, gliom, neurinom, meningeom
 - maligní – melanom, glioblastom, neuroblastom
- **nádory germinální a teratomy**
 - benigní – teratom
 - maligní – teratokarcinom, embryonální karcinom
- **nádory smíšené**
- **nádory z ostatních tkání**

1.2 Maligní melanom

1.2.1 Epidemiologie

První popis maligního melanomu pochází z Evropy z roku 1776. Pod názvem naevus malignus jej prezentoval Plenck. V Americe o melanomu poprvé referoval Parrish v roce 1837. Tehdy použil název melanosis, zavedený v roce 1806 Laennecem. Tímto termínem byly označovány všechny černé kožní projevy nádorového charakteru. Onkogeneze melanomu byla zprvu nejasná. Virchow (1821 – 1902) dokonce rozlišoval mezi melanomy, melanosarkomy melanokarcinomy. Teprve s postupem času bylo zjištěno, že melanom je maligní novotvar z névových buněk odvozených od melanocytů, které pocházejí s největší pravděpodobností z nervové tkáně (Novák et al. 1980).

Incidence melanomu během posledních několika desetiletí stoupá takřka po celém světě. Zhoubný melanom je onemocněním středního věku, nejčastěji se primární nádor vytváří mezi 40. a 50. rokem života. U předpubertálních dětí se vyskytuje jen velmi vzácně. Postihuje častěji ženy (55%), než muže. Primární nádor vzniká na různých místech, u žen nejčastěji na obličeji či dolních končetinách, zatímco u mužů bývá nejčastěji lokalizován na hrudníku. Mezi rizikové faktory vzniku maligního melanomu patří pozitivní rodinná anamnéza na melanom, vysoký výskyt různých melanocytových afekcí na kůži, světlý typ kůže (horší snášenlivost UV záření) a výskyt kongenitálních névů. Pro maligní melanom je typická tvorba metastáz (Pizinger 2003).

1.2.2 Etiologie a patogeneze

U nadpoloviční většiny nemocných (50 – 70%) vzniká melanom na klinicky zdravé, normálně vyhlížející kůži. Ve zbylých případech se objevuje na místě již existujících

melanocytových afekcí. K hodnocení melanocytových projevů je používáno pravidlo ABCDE, kdy se pozorují změny (podle anglického označení): A (Asymetry), B (Border), C (Colour), D (Diameter), E (Enlargement). Pokud dochází k popisovaným změnám v zprvu stálé melanocytové afekci, může se jednat o signál o počínajícím vzniku melanomu (Pizinger 2003, Čáp et al. 2005). Dalšími znaky poukazujícími na maligní transformaci névu jsou krvácení, zánět v okolí névů a mokvání a nodulární růst (Čáp et al. 2005).

1.2.3 Vznik

1.2.3.1 Melanocyt

Melanocyty jsou dendritické buňky vyskytující se v epidermis, které tvoří melaninový pigment a dále jej předávají keratinocytům. Jsou rozmístěny v celém kožním systému v různém počtu. V epidermis jsou melanocyty rozloženy mezi keratinocyty v poměru 1:4 – 1:15, přičemž jejich počet je u všech jedinců přibližně stejný, nezávisí na pohlaví a rase jedince. Jeden melanocyt společně s asi třemi desítkami keratinocytů tvoří takzvanou epidermální melaninovou jednotku. Mimo kůže se melanocyty vyskytují také v horní části epitelu vlasového folikulu, v bulbu folikulů a v horní části vývodu potních žláz (Pizinger 2003).

Kožní melanocyty mají původ v neurální trubici – jejím vývojem a následným dorzolaterálním oddělením buněk vzniká neurální lišta, která je prekurzorem nejen zmiňovaných melanocytů, ale i periferních neuronů, Schwannových buněk, glií, některých kostních komponent, komponent měkkých tkání, živnatky, vnitřního ucha a měkkých plen mozkových (Pizinger 2003, Novák et al. 1980).

Melanocyty obsahují enzym dávající vzniku melaninu, tyrozinázu, která je ve váčcích zvaných melanosomy transportována do dendritických výběžků melanocytů. Tyto vbíhají mezi keratinocyty, čímž dojde k předání melaninového pigmentu. Toho jsou schopny pouze melanocyty v kůži.

Rozdíly v barvě kůže jednotlivých lidských ras nejsou způsobeny rozdílným počtem melanocytů, ale jejich rozdílnou aktivitou v produkci melaninu a jeho předávání keratinocytům do svrchních vrstev epidermis (Pizinger 2003).

1.2.3.2 Melanocytem počínaje, melanomem konče

Počáteční změnou vedoucí ke vzniku maligního melanomu je porucha tvorby melaninu v melanocytech. Následkem tohoto poškození vznikají melanomové buňky, pro

něž je typická migrace do svrchních vrstev epidermis a následné rozptýlení mezi epiteliální buňky. V tomto stádiu dosud neprolomily melanomové buňky bazální membránu. Následné pronikání melanomových buněk dermálně-epidermálním spojem vede k vzniku maligního melanomu (Bandarchi et al. 2010, Pawelek a Körner 1982).

1.2.4 Klasifikace

V současné době se stále ještě vychází z klasifikace, již před více než čtyřiceti lety představil Clark, a později byla doplněna. Rámcově a schematicky rozděluje melanomy podle klinických a histopatologických znaků do **pěti skupin** (Novák et al. 1980):

- a) **lentigo maligna melanoma** (LMM)
- b) **povrchově se šířící melanom** (superficial spreading melanoma, SSM)
- c) **nodulární maligní melanom** (NMM)
- d) **melanom akrolentiginózní** (ALM)
- e) **mukolentiginózní melanom** (mucosal lentiginous melanoma, MLM).

LMM zprvu roste velmi pomalu (z tohoto důvodu je považován za relativně nejbenignější ze všech typů maligního melanomu). Poté, co se stane invazivním, roste rychleji. Relativně velmi pomalý růst umožňuje včasné diagnostikování v době, kdy je ještě léčitelný. Vyskytuje se nejčastěji u jedinců, jejichž věk přesahuje 60 let. Představuje 5 – 10% ze všech primárních maligních melanomů a perspektiva pětiletého přežití dosahuje 80%.

SSM roste pomalu a zprvu jen horizontálně (přesto ale rychleji než LMM). Jakmile se stane invazivním, rychlost růstu se zvětší. Pomalý růst je značnou výhodou a šancí pro včasnou diagnózu ve stádiu, které je ještě léčitelné. Vyskytuje se nejčastěji – představuje 50 – 70% ze všech primárních maligních melanomů. Udává se 70% perspektiva pětiletého přežití.

Pro **NMM** je typický relativně rychlý růst v porovnání s ostatními typy maligních melanomů. Z tohoto důvodu je NMM ze všech melanomů nejagresivnější. Vyskytuje se častěji u starších jedinců a tvoří 15 – 30% ze všech primárních melanomů. Udávaná pravděpodobnost pětiletého přežití je 53%.

ALM a **MLM** patří mezi onemocnění vcelku vzácná. Mají podobný vzhled a vyskytují se u všech etnických skupin. Spekuluje se dokonce i o možnosti, že jejich vznik nesouvisí se slunečním zářením. Zatímco ALM se vyskytuje především za nehty, na dlaních a patách, místem výskytu MLM jsou sliznice (vzniká v dutině ústní, jícnu, vagíně apod.). Pro

oba typy maligního melanomu je typický výskyt u starších jedinců. (Pizinger 2003, Novák et al. 1980).

Další z Clarkových snah bylo uvedení mikroskopických změn v maligním melanomu ve vztah ke klinickému obrazu. Snažil se odkrýt korelaci mezi charakterem, stupněm nádorových změn a prognózou a vytvořit tak systém dělení, jež by mohl sloužit pro srovnání výsledků léčby a vyšetření. Nejvhodnějším parametrem a měřítkem malignity podle Clarka je stupeň invaze nádoru do hloubky, a podle toho v roce 1967 rozlišil **pět stupňů**, lépe řečeno rovin, malignity melanomu (Novák et al. 1980, Pizinger 2003):

a) rovina I:

Nádorové buňky jsou lokalizovány pouze v epidermis, což bývá označováno jako melanoma in situ (Pizinger 2003).

b) rovina II:

Nádorové buňky prolomily bazální membránu epidermis a šíří se v papilách, aniž by pronikaly do retikulární vrstvy koria. Tato rovina odpovídá zvýšené aktivitě, která je vždy charakterem iniciálního melanomu. Zachycení melanomu v tomto raném stádiu je spíše vzácností (Novák et al. 1980, Pizinger 2003).

c) rovina III:

Nádorové buňky již pronikly do koria, vyplňují jeho papily, ale ještě nezasahují do jeho části nazývané pars reticularis (Pizinger 2003).

d) rovina IV:

Nádorové buňky pronikly masívně mezi svazky kolagenu do pars reticularis koria (Novák et al. 1980).

e) rovina V:

Nádor pronikl do podkožního vaziva (Pizinger 2003).

1.2.5 Melanom B16-F10

Existují celkem čtyři druhy maligního melanomu, které byly popsány u myší. Jedná se o typy B16-F10, B16-F0, B16-F1 a B16-BL. Naše experimenty byly založeny na modelu melanomu B16-F10, jelikož je charakteristický vysokou mírou invazivity a tvorby metastáz, a to především v plicích (Maierová 2010).

1.3 Vrozená imunita

1.3.1 Rozdíl mezi vrozenou a získanou imunitou

Imunitní systém plní tři hlavní úkoly; zachovává integritu organismu, rozpoznává „vlastní od cizího“, přičemž to „cizí“ eliminuje, a likvidací vlastních degradačních produktů a nádorových buněk zajišťuje imunologický dohled (DeFranco et al. 2007, Krejsek a Kopecký 2004).

K plnění výše zmíněných úkolů jsou nezbytné obě dvě složky imunitního systému, tedy vrozená (nebo také přirozená či nespecifická) i získaná (neboli adaptivní či specifická) imunita (Krejsek a Kopecký 2004, DeFranco et al. 2007).

Vrozená imunita zajišťuje nespecifický mechanismus imunitní odpovědi proti antigenu. Nedochozí k rozpoznávání každého možného antigenu, ale určitých konzervativních struktur mikroorganismů, jež se nazývají PAMPs. Imunitní odpověď je okamžitá (nebo začíná nejdéle po několika hodinách po setkání s antigenem) a nebývá rychlejší při opakovaném setkání s tímtéž antigenem. Mezi mechanismy, jimiž vrozená imunita bojuje s infekcí, patří kůže (slouží jako anatomická bariéra), sekrety produkované sliznicemi (obsahují antibakteriální a antivirové proteiny), fagocytóza (zprostředkovaná hlavně neutrofily a makrofágy), cytotoxicita (NK buňky) a zánětlivá reakce. Důležitou roli hraje i komplement (Krejsek a Kopecký, DeFranco et al. 2007).

Získaná imunita je velmi specifická, dokáže rozpoznat i ten nejmenší rozdíl mezi antigeny. Vytváří protilátky a paměťové buňky, které při následném setkání s antigenem urychlují imunitní odpověď. Obě dvě složky imunitního systému spolu úzce spolupracují a za normálních okolností reagují pouze proti cizím antigenům, nikoli proti buňkám těla vlastním (Krejsek a Kopecký 2004, DeFranco et al. 2007).

1.3.2 Rozpoznávání antigenů mechanismy vrozené imunity

1.3.2.1 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)

Mechanismy vrozené imunity jsou pro organismus nezbytné, slouží k eliminaci patogenních organismů v těle. Nejsou však schopny specificky rozpoznávat rozdíly mezi jednotlivými antigeny. Imunitní odpověď na přítomnost antigenu je téměř okamžitá, nejpozději však začíná během několika hodin po setkání s antigenem. Cizí buňka není rozpoznávána podle jednotlivých antigenů (respektive jejich antigenních determinant –

epitopů), jak je tomu u získané imunity, ale podle konzervativních struktur nazývaných pathogen associated molecular patterns, neboli PAMPs. PAMPs jsou vysoce konzervativní molekuly společné pro fylogeneticky blízké mikroorganismy, které jsou nezbytné pro jejich přežití. Nevyskytují se však u buněk savčích, což umožňuje jejich rozpoznání mechanismy vrozené imunity. Následně dojde k okamžitému vzniku imunitní odpovědi, která vede k degradaci cizí buňky (DeFranco et al. 2007, Madigan a Martinko 2006).

Mezi PAMPs řadíme lipopolysacharid (LPS) gramnegativních bakterií, peptidoglykan a kyselinu lipoteichovou grampozitivních bakterií, také flagelin, diacyllipoproteiny, triacyllipoproteiny, lipopeptidy a N-formylmethionin všech bakterií, dále terminální manosu, častou u mikrobiálních glykolipidů a glykoproteinů, jež se však zřídka vyskytuje u savčích buněk, manany a glukany, jež jsou typické pro plísňe a kvasinky, jednořetězcovou a dvouřetězcovou RNA virů a nemetylovaná CpG DNA bakterií a virů. Důležitými fagocytárními stimuly, které však neřadíme mezi PAMPs, ale plní podobnou roli, jsou povrchové receptory apoptotických buněk. (Mushegian a Medzhitov 2001, Medzhitov a Janeway 2002).

Pokud jsou tyto molekuly prezentovány na povrchu stresovaných, poškozených, infikovaných a transformovaných buněk, vede to též k jejich degradaci (Mushegian a Medzhitov 2001).

1.3.2.2 Pattern recognition receptors (PRR)

K rozpoznávání konzervativních PAMPs slouží receptory nazývané PRR (pattern recognition receptors). Umožňují rozpoznání až 10^3 různých struktur. Vyskytují se u makrofágů, granulocytů, dendritických, endoteliálních a slizničních buněk a B lymfocytů. Bývají na povrchu buněk (interagují s povrchovými PAMPs), také jsou součástí fagolysosomů fagocytujících buněk (reagují s intracelulárními PAMPs) a některé se vyskytují dokonce i v cytosolu (Krejsek a Kopecký 2004, Mushegian a Medzhitov 2001, Medzhitov a Janeway 2002). První z receptorů rozpoznávajících PAMPs byly objeveny u *Drosophily* a nazvány Toll receptory (Madigan a Martinko 2006).

Po rozpoznání zmiňovaných struktur PRR je okamžitě indukována imunitní odpověď vedoucí k degradaci patogenního organismu. Destrukce je provedena buď samotnými fagocyty (neutrofilů a makrofágů), nebo pomocí komplementu (Krejsek a Kopecký 2004, Medzhitov a Janeway 2002).

1.3.2.2.1 Rozdělení PRR

PRR lze rozdělit podle typů PAMPs, které váží, a zároveň podle účinku, jež tato vazba vyvolává, do tří skupin. Jedná se o sekretované, signální a fagocytární PRR (Krejsek a Kopecký 2004).

a) Sekretované receptory

Váží PAMPs mnohých patogenů, což vede ke spuštění komplementové kaskády. Následkem je opsonizace a urychlení fagocytózy. Mezi sekretované PRR řadíme například mannose-binding lectin (MBL) a C reaktivní protein (Krejsek a Kopecký 2004).

MBL

MBL je sérový protein, jež je produkován hepatocyty. Poprvé byl objeven v 70. letech 20. století v králičích játrech kvůli své schopnosti vázat určité molekuly z buněčné stěny kvasinek. MBL rozpoznává a váže širokou škálu povrchových molekul ze stěn gramnegativních i grampozitivních bakterií, kvasinek, parazitů i určitých typů virů. Přitom je schopen odlišovat karbohydráty patogenních organismů od vlastních glykoproteinů (Fraser et al. 1998, Ezekowitz 2003). K tomu dochází díky specifické struktuře patogenních molekul - pro navázání sacharidových zbytků k MBL je nezbytné, aby OH skupiny na 3C a 4C sacharidů byly volné, a tudíž zaujímaly ekvatoriální rovinu (Krejsek a Kopecký 2004, Fraser et al. 1998). Tímto se patogenní karbohydráty odlišují od vlastních (Fraser et al. 1998). Vazba MBL na PAMPs je znázorněna na Obrázku 1.

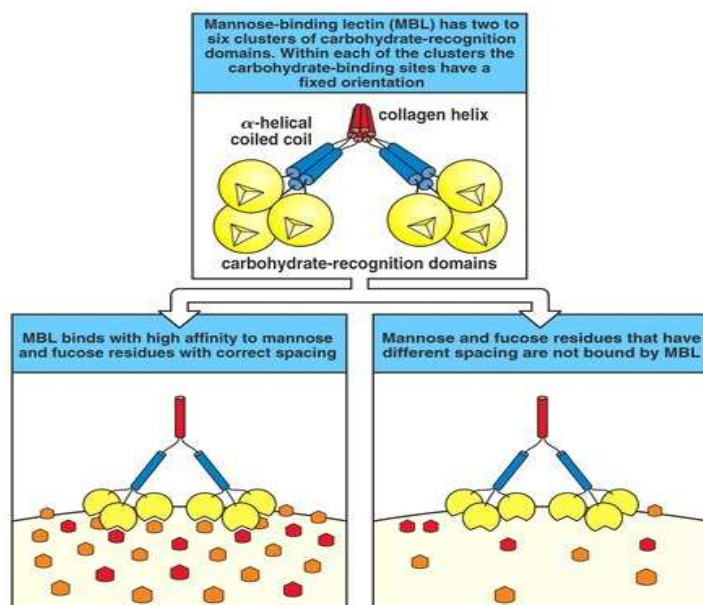


Figure 2-11 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Obr. 1: Schematické znázornění vazby MBL na povrchová sacharidová rezidua.

(Janeway et al. 2005)

Vznikem vazby mezi výše zmiňovanými PAMPs a MBL dochází k aktivaci komplementové kaskády lektinovou cestou (Fraser et al. 1998, DeFranco et al. 2007, Krejsek a Kopecký 2004, Madigan a Martinko 2006).

Druhou funkcí MBL je vázání se na povrch stárnoucích a apoptotických buněk, což vede ke zvyšování míry pohlcování celku (Krejsek a Kopecký 2004).

Struktura MBL je oligomerní, jeho celková molekulová hmotnost činí 700kDa. Monomer MBL se skládá z čtyř podjednotek obsahujících 3 téměř identické peptidové řetězce (každý 30 kDa). První region je bohatý na cystein, druhá doména je kolagenová, třetí se nazývá krček a poslední je doména rozpoznávající karbohydráty. Zde vzniká vazba mezi PAMPs a MBL. (DeFranco et al. 2007, Takahashi a Ezekowitz 2005).

CRP

CRP váže mnohé povrchové PAMPs. Řadí se mezi proteiny akutní fáze. Spouští komplementovou kaskádu a zesiluje makrofágovou fagocytózu (Krejsek a Kopecký 2004).

b) Signální receptory

Signální receptory mají hlavní roli ve spouštění mechanismů vrozené imunity. Řadíme sem především Toll-like receptory (TLR), ale i NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) receptory (Krejsek a Kopecký 2004).

TLR

TLR nejen spouštějí mechanismy vrozené imunity, ale i přispívají ke spouštění mechanismů imunity získané. Jedná se o skupinu receptorů jak povrchových, tak i intracelulárních; u savců jich bylo popsáno 13 typů, u člověka 10 (Krejsek a Kopecký 2004).

Povrchové TLR váží PAMPs buněčné stěny bakterií a hub. K tomu jim slouží pro ně typická extracelulární část bohatá na leucin. Intracelulární TLR vyskytující se v membráně fagolysosomů jsou schopny rozpoznávat a vázat nukleové kyseliny virů a mikrobů. Vazbou TLR s PAMPs je aktivován transkripční faktor vedoucí ke zvýšené transkripci genů pro IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 a TNF- α (DeFranco et al. 2007, Krejsek a Kopecký).

NOD molekuly

NOD receptory se nacházejí v cytoplazmě. Dělí se na NOD-1 a NOD-2 typy, oba však rozpoznávají bakteriální peptidoglykan na základě detekce různých muramyldipeptidů (DeFranco et al. 2007).

c) Fagocytární receptory

Fagocytární PRR jsou lokalizovány na povrchu fagocytů (neutrofilů, makrofágů a dendritických buněk). Interakce fagocytárních receptorů s příslušnými PAMPs vede

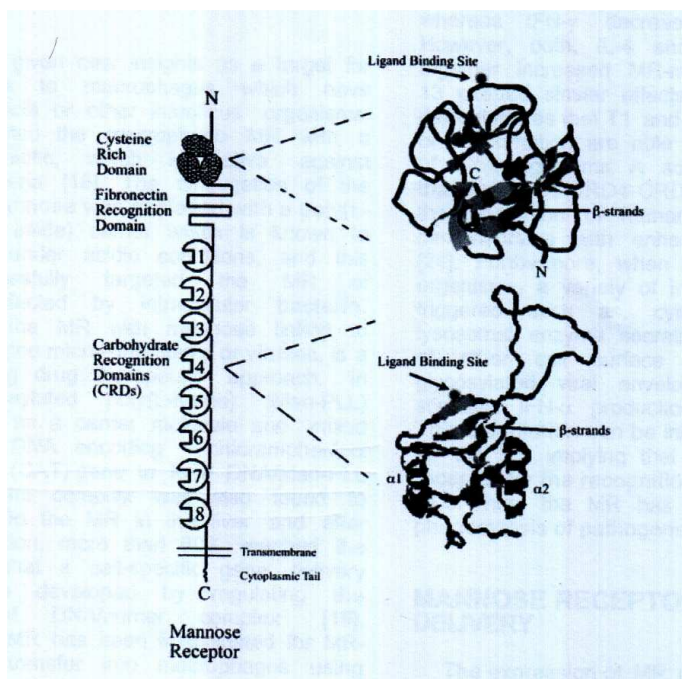
k fagocytóze mikroorganismů, jenž nesou dané PAMPs na svých povrchích. Mezi fagocytární receptory řadíme manosový receptor, scavenger receptory, N-formylmethioninové receptory a dectin 1 (Krejsek a Kopecký 2004).

Manosové receptory

Manosové receptory jsou transmembránové proteiny, jejichž molekulová hmotnost činí 180kDa. Patří do rodiny lektinů typu C (Yeeprae et al. 2006). Poprvé byly objeveny v membráně savčích makrofágů, později u dendritických buněk i mnohých buněk endoteliálních a epiteliálních (Le Cabec et al. 2005).

MR rozeznávají a váží manosové, fukosové a N-acetylglukosaminové zbytky na povrchu patogenů a endogenních glykoproteinů, což vede k likvidaci patogenních struktur. MR je tedy jedním z hlavních endocytárních a fagocytárních receptorů, ale to není jeho jediná funkce; plní svoji roli i při vzniku adaptivní imunitní odpovědi (Apostolopoulos a McKenzie 2001).

Co se týče struktury MR, je znázorněna na Obrázku 2. MR se skládají z 5 domén. První doména je bohatá na cystein a vyskytuje se na N-terminálním konci proteinu. Druhá doména se nazývá fibronektinová a třetí jsou na kalcium závislé domény rozpoznávající karbohydráty (CRDs). CRDs slouží k vazbě výše zmiňovaných sacharidů z povrchu patogenních buněk. Zajímavé je, že mezi myšími a lidskými CRDs existuje 76 – 92% homologie. Čtvrtá doména se nazývá transmembránová a pátá cytoplazmatická (Apostolopoulos a McKenzie 2001).



Obr. 2 – Schematické znázornění manosového receptoru a jeho jednotlivých domén.

(Apostolopoulos a McKenzie 2001)

Scavenger receptory

Scavenger receptory jsou schopny rozpoznat jak komponenty apoptotických buněk, tak i patogenní struktury. U těch se váží na LPS, peptidoglykan a teichoové kyseliny (DeFranco et al. 2007).

N-formylmethioninové receptory

N-formylmethioninem začíná syntéza všech prokaryotních proteinů. Rozpoznávají je receptory makrofágů a neutrofilů, což vede k chemotaxi a fagocytóze (DeFranco et al. 2007).

Dectin 1

Dectin 1 slouží jako fagocytární receptor β -glukanu (DeFranco et al. 2007).

1.3.3 Nádory a imunitní systém

1.3.3.1 Nádorové antigeny

Nádorové antigeny se dělí na dvě skupiny, TSA (tumor specific antigens) a TAA (tumor associated antigens). Zatímco TSA se vyskytují pouze na povrchu nádorových buněk, TAA jsou přítomny i na povrchu buněk jiných (například během fetálního vývoje nebo ve velmi malých koncentracích na povrchu některých somatických buněk). Nádorové antigeny obecně většinou indukují buněčnou, nikoli humorální odpověď. Většina nádorových buněk

bývá zneškodněna imunitním systémem ještě dříve, než dojde ke vzniku klinicky manifestního onemocnění (Krejsek a Kopecký 2004, DeFranco et al. 2007, Madigan a Martinko 2006, Silverstein a Morton 1973).

1.3.3.2 Obranné mechanismy nádorů proti imunitnímu útoku

Nádory jsou obecně známy svou nízkou imunogenicitou. Vznikají totiž procesem maligního zvratu z buněk těla vlastních a antigeny takto vzniklé jsou velmi slabé (Alberts et al. 1998).

Hovoříme-li o mechanismech získané imunity, pak antigen musí být prezentován T a B lymfocytům v komplexu s MHC molekulami a kostimulačními molekulami. Ty však bývají u nádorů exprimovány velmi slabě, či úplně chybí. Snížená exprese MHC molekul by tedy mohla vést ke zvýšenému útoku NK buněk, ale nádory produkují MHC Ib molekuly, jež mu brání. Nepřítomnost kostimulačních molekul v komplexu s antigenem a MHC vede nikoli k vzniku imunitní odpovědi, ale naopak k navození tolerance vůči antigenu (Alberts et al. 1998).

Navíc nádory samy sebe autokrinně podporují v růstu sekrecí TGF- β . Kromě toho jsou dále schopny inhibovat působení komplementu díky CD55 a CD57 molekulám a způsobovat apoptózu infiltrujících lymfocytů pomocí Fas ligandu (Alberts et al. 1998).

1.3.3.3 Imunoterapie nádorů

V minulosti byla ve většině případů klíčová role v boji proti nádorům přisuzována získané imunitě. Antigeny v komplexu s MHC molekulami a kostimulačními molekulami jsou rozpoznávány B a T lymfocyty, což vede ke tvorbě protilátek, respektive k cytotoxické reakci. Důležitá je i tvorba paměťových buněk (DeFranco et al. 2007).

K imunoterapii se často používají monoklonální protilátky. Ty aktivují komplement, spouštějí fagocytózu a ADCC reakci. Jelikož nejsou ale všechny nádorové buňky stejné a nemají tedy totožné antigeny, monoklonální protilátky nejsou schopny vést k likvidaci všech takovýchto buněk. Některé monoklonální protilátky se používají také jako vysoce specifický nosič. Navázáním látky na monoklonální protilátku je zajištěno její dopravení k cílové buňce s danou antigenní determinantou (Ko et al. 2005).

Nádorové buňky si vytvořily řadu mechanismů, jimiž se brání imunitnímu útoku. Tyto mechanismy se ve velké většině případů týkají inhibice funkce mechanismů získané imunity, a proto je na místě klást si otázku, jakou roli hraje v imunoterapii vrozená imunita. Jelikož nádorové buňky na svém povrchu nenesou žádné PAMPs, dalo by se předpokládat,

že vrozená imunita nebude hrát v boji s nádorovým onemocněním žádnou významnou roli (Weinberg 2003, Alberts et al. 1998).

Již několik století je však pozorován vztah mezi silnými infekcemi a určitým omezením vedoucím až likvidací nádorů. Tuto záležitost studoval a do medicínské aplikace dovedl Coley (1890). Jeho „toxin“, směs dvou bakterií, byl po velmi dlouhou dobu se střídavými úspěchy používán v protinádorové terapii. Z jeho výsledků je zřejmé, že jím vyvolaná silná aktivace vrozené a následně získané imunity má protinádorový účinek (Cann et al. 2006).

Velmi zajímavé poznatky ukazující netušené možnosti protinádorové terapie založené na využití vrozené imunity přinášejí práce prof. Cui, kterému se podařilo prokázat, že vrozená imunita je schopna zlikvidovat nádor, a to dokonce i v pokročilém stádiu (Cui et al. 2003, Hicks et al. 2006). Objevil totiž dominantní mutaci nazývanou SR/CR u myší kmene BALB/c, již následně přenesl i na jiné kmeny myší. Název této mutace byl odvozen od dvou vlastností takto zmutovaným jedincům příslušným: spontánní regrese (jedincům starším 4 měsíců zprvu nádor roste rychlým tempem, později se však růst zpomaluje, až zastavuje a nádor nakonec spontánně degraduje) a kompletní rezistence (jedinci, jejichž věk nedosahuje 4 měsíců, jsou úplně rezistentní vůči transplantaci nádorů).

Z pokusů pana profesora Cui tedy plyne, že vrozená imunita je schopna zlikvidovat nádor, pokud jej však rozpozná. To se však běžně nestává. Naším cílem je tedy navázat na povrch nádorových buněk PAMPs, aby došlo k jejich rozpoznání a ke stimulaci mohutné imunitní odpovědi vedoucí k likvidaci nádorových buněk.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo řešit vliv kotvení manosy k povrchu nádorových buněk na intenzitu protinádorové imunitní reakce.

3. Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

- dekalysin (Vidia)
- LPS (Sigma-Aldrich)
- manosa (G)5 (K)12 (Schafer-N)
- manosa (G)5 (K)10 STE (Schafer-N)
- monomanosyldekalysin (Vidia)
- roztok trypanové modři (Sigma-Aldrich)
- Fetal Calf Serum (Sigma-Aldrich)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

3.2 Experimentální zvířata

Byly použity myši kmene C57BL/6N, samice, 8 týdnů staré, 18 – 20g (Charles River Laboratories). Byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České Republiky v Českých Budějovicích za standardních podmínek a světelného režimu 12/12.

3.3 Buněčná linie

Pro naše pokusy byla používána buněčná linie melanomu B16-F10, kterou jsme získali darem od paní profesorky Říhové z ÚMG v Praze. Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoetanolem a antibiotiky v termostatu při 37°C.

3.4 Příprava a transplantace buněk melanomu B16-F10

Z kultivovaných a plně adheovaných buněk bylo slito médium, následně byly buňky třikrát po sobě propláchnuty sterilním PBS. Dalším krokem byla trypsinizace (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS). K takto uvolněným buňkám bylo přidáno médium RPMI 1640 s 10% FCS a pomocí Pasteurovy pipety byly buňky rozsuspendovány. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 150g. Z usazených buněk bylo slito médium a posléze přidáno RPMI 1640 bez séra tak, aby celkový objem byl 2ml. Pasteurovou pipetou byly buňky s médiem opět opatrně rozsuspendovány. Vzorek byl smíchán s trypanovou modří a

následovalo počítání buněk v Bürkerově komůrce. Byla připravena suspenze o koncentraci 4 miliony buněk na 1ml RPMI.

Před přípravou buněk byly myši oholeny na pravé i levé části zad. Zatímco vpravo jsme transplantovali melanomové buňky, oholené místo na levé polovině těla sloužilo jako kontrola pro měření teploty a její srovnání s teplotou nádoru.

Každé takto připravené myši bylo transplantováno 400 000 melanomových buněk v 0,1ml RPMI 1640 bez séra s. c. (pod kůži).

3.5 Měření teploty a velikosti nádorů, aplikace léčiv

Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši randomizovány do skupin a byla zahájena terapie. Prvních deset dní bylo schéma takové, že obden byla vždy nejprve změřena teplota nádoru a kontrolního místa na druhém boku, následně velikost nádoru a nakonec bylo i. t. (do nádoru) podáno 50 μ l léčivé látky. Celkem tedy proběhlo 6 aplikací terapeutik a příslušných měření (den 0, 2, 4, 6, 8 a 10).

Dvanáctý a čtrnáctý den bylo provedeno pouze měření teploty a velikosti nádorů.

Měření teploty bylo prováděno celkem jedenáctkrát (den 0, ¼, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, a 14) bezdotykovým infračerveným teploměrem IR Rodent Thermometer 153 IRB od firmy Bioseb. Čidlo teploměru bylo přiloženo 2mm od povrchu nádoru nebo od kontrolního bodu na druhém vyholeném boku. Teploty obou boků byly zaznamenány.

Měření nádorů probíhalo podle Inabovy metody (Inaba et al. 1986). Velikost nádoru byla zjišťována kaliperem, přičemž jsme měřili největší a nejmenší rozměr nádoru (zploštělý rotační elipsoid). Objemy jednotlivých nádorů byly vypočítány podle vzorce $V = \frac{\pi}{6} \times A \times B^2$, kde A je číslo odpovídající největšímu a B nejmenšímu rozměru nádoru.

3.6 Počítání metastáz

Počítání metastáz probíhalo metodou podle Vetvicky (Vetvicka 2007). Myší plíce byly zakonzervovány v čtyřprocentním roztoku formaldehydu a po určité době prohlíženy pod binolupou. Metastázy se jeví na světlé tkáni jako černé tečky (nutné odlišení od hematomů vypadajících jako hnědé tečky).

3.7 Zpracování dat

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu MS Excel (výpočet směrodatné odchylky SD, vyhodnocení statistické významnosti pomocí Studentova T-testu, grafy).

3.8 Pokus č. 1 –

Vliv nevázané manosy a její kombinace s LPS na růst melanomu

K tomuto pokusu bylo použito 16 samic myšního kmene C57BL/6N.

Dvanáctý den po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši randomizovány do skupin. Poté byla zahájena terapie. V tento den (0), a pak ve dnech 2, 4, 6, 8 a 10 byla vždy změřena teplota nádoru a kontrolního místa, velikost nádoru a následně bylo i. t. aplikováno 50 μ l látek dle následujícího schématu:

- A) 4 myši – 3mM manosa v PBS
- B) 4 myši – 3mM manosa v PBS in LPS (0,5 mg/ml)
- C) 4 myši – LPS (0,5 mg/ml PBS)
- D) 4 myši – PBS

Dvanáctý a čtrnáctý den už byly jen změřeny teploty nádorů a kontrolních míst na druhém boku. Měření teplot probíhalo tedy ve dnech 0, ¼, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Následně byly myši usmrceny.

3.9 Pokus č. 2 –

Vliv monomanosyldekalysinu na melanomový růst

Pro tento pokus bylo použito 24 myší (C57BL/6N) samičího pohlaví.

Dvanáct dní po transplantaci melanomových buněk byly myši randomizovány do skupin a byla zahájena terapie. Tento den (0), a pak ve dnech 2,4,6,8,10 byla vždy změřena teplota nádoru a kontrolního místa, velikost nádoru a následně bylo i. t. aplikováno 50 μ l látek dle následujícího schématu:

- A) 8 myší – 3mM monomanosyldekalysin v PBS
- B) 8 myší – 3mM dekalysin v PBS
- C) 8 myší – PBS

Dvanáctý a čtrnáctý den bylo provedeno pouze měření teploty a velikosti nádoru. Měření teplot probíhalo tedy ve dnech 0, ¼, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Poté byly myši usmrceny. Z důvodu neúčinnosti našich léčiv nebyly myším vyjímány plíce pro počítání metastáz.

3.10 Pokus č. 3 –

Pokus o stimulaci účinku monomanosyldekalysinu na nádorový růst pomocí LPS

Na tento pokus bylo použito 24 samic myšího kmene C57BL/6N.

Dvanáct dnů po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do skupin a započali jsme terapii. Tento den (0), a pak ve dnech 2,4,6,8,10 byla vždy změřena teplota nádoru a kontrolního místa, velikost nádoru a následně bylo i. t. aplikováno 50µl látek dle následujícího schématu:

- A) 6 myší – 3mM monomanosyldekalysin v PBS
- B) 6 myší – LPS (0,5 mg/ml PBS)
- C) 6 myší – 3mM monomanosyldekalyzin v PBS in LPS (0,5 mg/ml)
- D) 6 myší – PBS

Dvanáctý a čtrnáctý den bylo provedeno pouze měření teploty a velikosti nádoru. Měření teplot probíhalo tedy ve dnech 0, ¼, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Následně byly myši usmrceny a byla spočítána metastatická ložiska na jejich plicích.

3.11 Pokus č. 4 –

Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na terapii maligního melanomu

K tomuto pokusu jsme potřebovali 16 samic myšího kmene C57BL/6.

Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši randomizovány do skupin a byla zahájena terapie. Tento den (0), a pak ve dnech 2,4,6,8,10 byla vždy změřena teplota nádoru a kontrolního místa, velikost nádoru a následně bylo i. t. aplikováno 50µl látek dle následujícího schématu:

- A) 4 myši – 3mM manosa (G)5 (K)12 v PBS
- B) 6 myší – 3mM manosa (G)5 (K)10 STE v PBS
- C) 6 myší – PBS

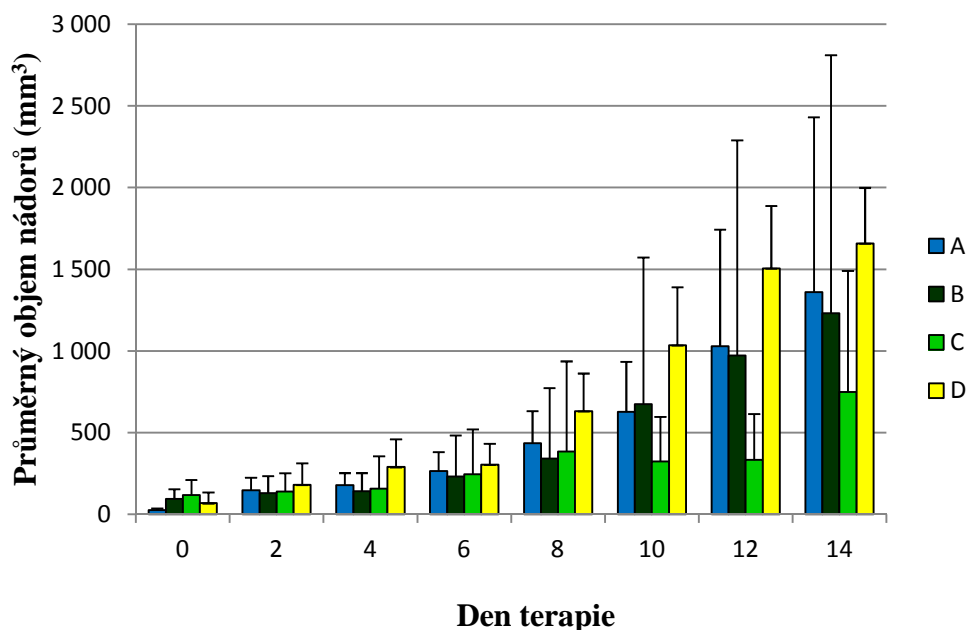
Dvanáctý a čtrnáctý den bylo provedeno pouze měření teploty a velikosti nádoru. Měření teplot probíhalo tedy ve dnech 0, ¼, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Následně byly myši usmrceny a byly spočítány metastázy na jejich plicích.

4. Výsledky

4.1 Pokus č. 1 –

Vliv nevázané manosy a její kombinace s LPS na růst melanomu

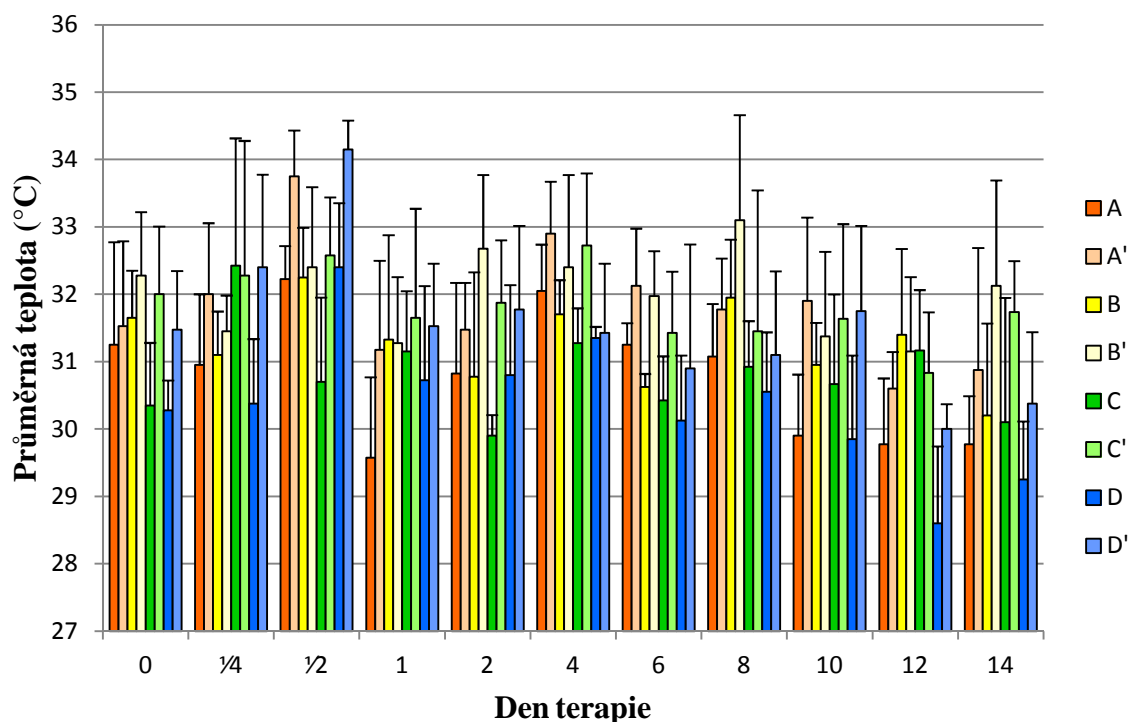
Obrázek 3 znázorňuje vliv terapie na průměrné velikosti nádorů v jednotlivých skupinách. Plyne z něho, že sama nevázaná manosa nemá terapeutický účinek, a také že nepůsobí protinádorově v synergii s LPS.



Obr. 3: Vliv terapie založené na volné manose na průměrnou velikost nádorů.

Skupina A – 3mM manosa v PBS, skupina B – 3mM manosa v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D - PBS.

Obrázek 4 znázorňuje vliv léčby na průměrnou teplotu nádorů. Vyplývá z něj, že teplota maligního melanomu je vždy všeobecně nižší než teplota zdravé kůže.



Obr. 4: Vliv terapie založené na volné manose na průměrnou teplotu nádorů.

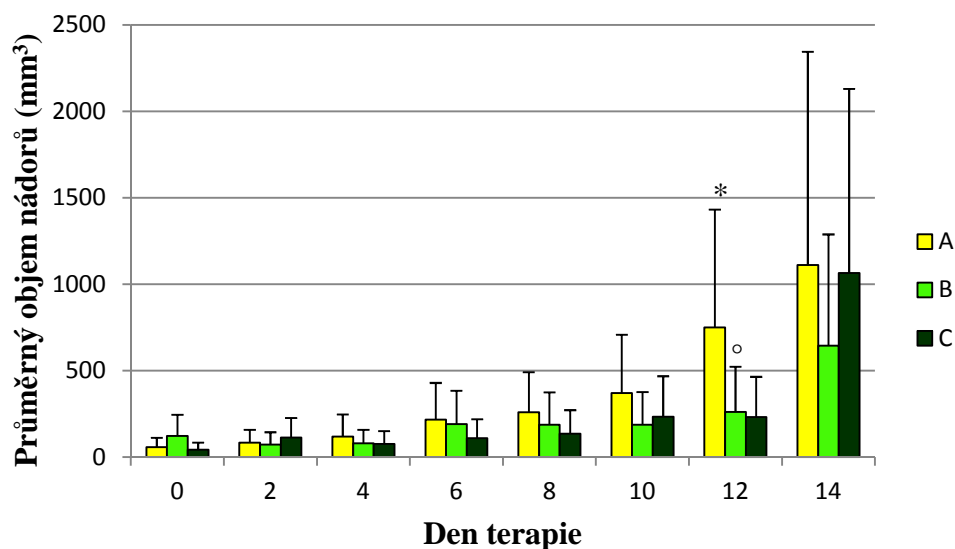
Skupina A, A' – 3mM manosa v PBS, skupina B, B' – 3mM manosa v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C, C' – LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D, D' - PBS.

Skupiny A, B a C – teploty nádorů, skupiny A', B' a C' – teploty kontrolního boku.

4.2 Pokus č. 2 –

Vliv monomanosyldekalysinu na melanomový růst

Na Obrázku 5 je znázorněn vliv terapie na velikost nádorů jednotlivých skupin. Vyplývá z něj, že monomanosyldekalysin ani dekalysin nevykazují žádný terapeutický vliv na melanom B16-F10.



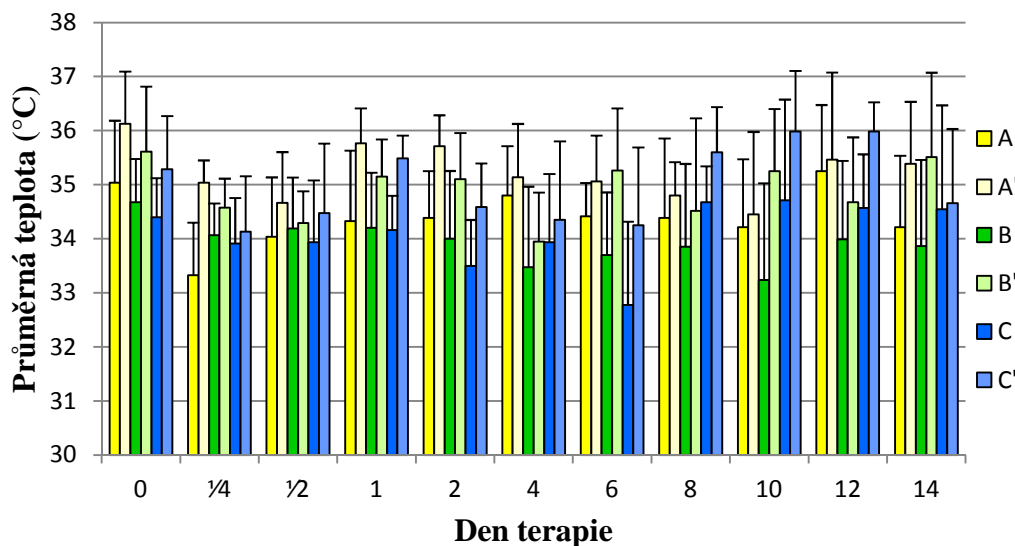
Obr. 5: Vliv terapie pomocí monomanosyldekalysinu na průměrnou velikost nádorů.

Skupina A – 3mM monomanosyldekalysin v PBS, skupina B – 3mM dekalysin v PBS, skupina C – PBS.

* = $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (C)

° = $P \leq 0,05$ vztaženo k monomanosyldekalysinu (A)

Obrázek 6 znázorňuje vliv léčby na průměrnou teplotu nádorů.



Obr. 6: Vliv terapie pomocí monomanosyldekalysinu na průměrnou teplotu nádorů.

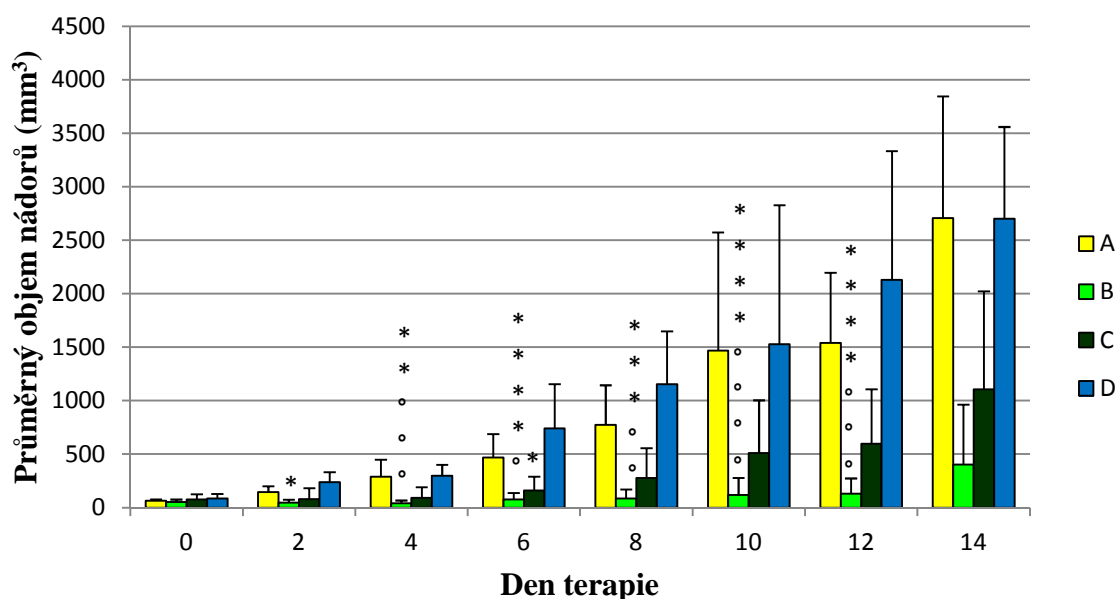
Skupina A, A' – 3mM monomanosyldekalysin v PBS, skupina B, B' – 3mM dekalysin v PBS, skupina C, C' – PBS.

Skupiny A, B a C – teploty nádorů, skupiny A', B' a C' – teploty druhého boku.

4.3 Pokus č. 3 –

Pokus o stimulaci účinku monomanosyldekalysinu na nádorový růst pomocí LPS

Na Obrázku 7 je znázorněn vliv terapie na průměrnou velikost nádorů jednotlivých skupin. Plyne z něj, že monomanosyldekalysin nepůsobí synergicky s LPS.



Obr. 7: Vliv terapie pomocí monomanosyldekalysinu v kombinaci s LPS na průměrnou velikost nádorů.

Skupina A – 3mM monomanosyldekalysin v PBS, skupina B – LPS (0,5 mg/ml), skupina C – 3mM monomanosyldekalysin v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – PBS.

* = $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (D)

*** = $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (D)

**** = $P \leq 0,001$ vztaženo ke kontrole (D)

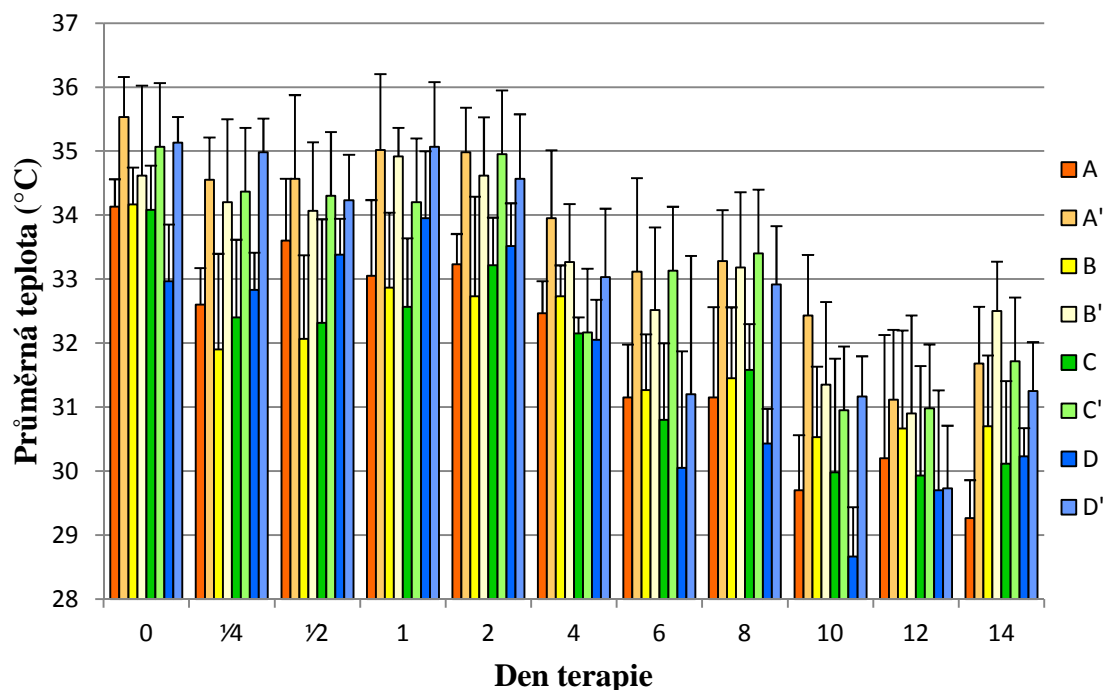
° = $P \leq 0,05$ vztaženo k monomanosyldekalysinu (A)

°° = $P \leq 0,01$ vztaženo k monomanosyldekalysinu (A)

°°° = $P \leq 0,005$ vztaženo k monomanosyldekalysinu (A)

°°°° = $P \leq 0,001$ vztaženo k monomanosyldekalysinu (A)

Obrázek 8 znázorňuje vliv léčby pomocí monomanosyldekalysinu v kombinaci s LPS na průměrnou teplotu nádorů. Kromě nižší teploty nádoru ve srovnání s kontrolním bodem vidíme i celkový na terapii nezávislý pokles teplot.

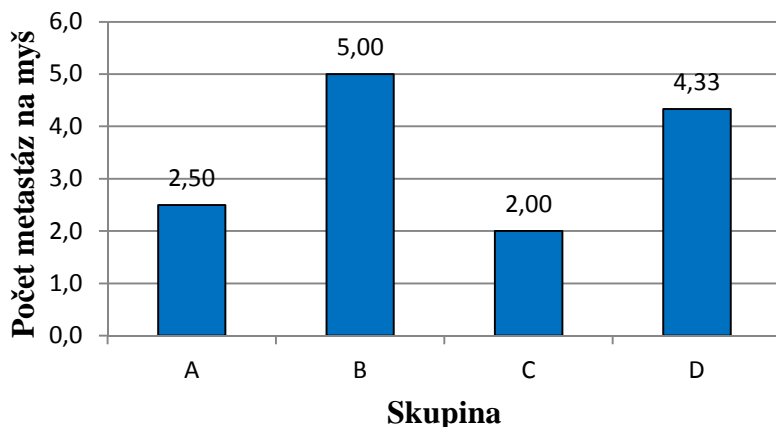


Obr. 8: Vliv terapie pomocí monomanosyldekalysinu v kombinaci s LPS na průměrnou teplotu nádorů.

Skupina A, A' – 3mM monomanosyldekalysin v PBS, skupina B, B' – LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C, C' – 3mM monomanosyldekalysin v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D, D' – PBS.

Skupiny A, B, C a D – teploty nádorů, skupiny A', B', C' a D' – teploty druhého boku.

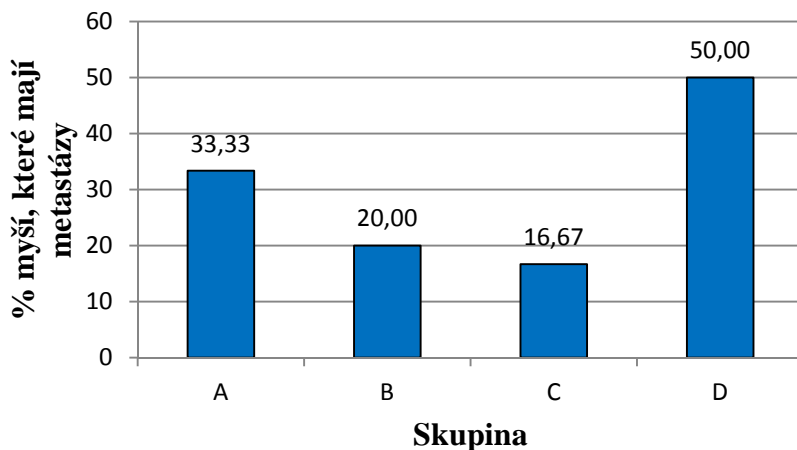
Na Obrázku 10 je znázorněna intenzita metastázování (tedy průměrný počet metastáz na myš s metastázami).



Obr. 10: Vliv léčby pomocí monomanosyldekalysinu v kombinaci s LPS na intenzitu metastázování v jednotlivých skupinách.

Skupina A – 3mM monomanosyldekalysin v PBS, skupina B – LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – 3mM monomanosyldekalysin v PBS in LPS (0,5 mg/ml LPS), skupina D – PBS.

Obrázek 11 znázorňuje, kolik procent myší v daných skupinách mělo metastázy. Z obrázku 10 a 11 vyplývá, že došlo k určité redukci metastazování, a to nejen ve skupinách s LPS, ale i ve skupině se samostatným monomanosyldekalyzinem, který nevykazoval vliv na růst nádorů.



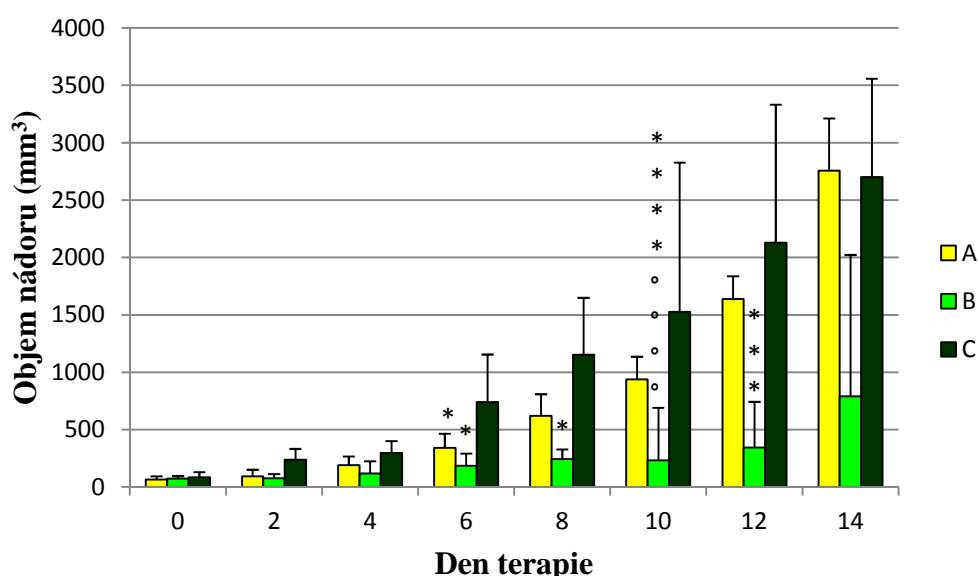
Obr. 11: Vliv léčby pomocí monomanosyldekalysinu v kombinaci s LPS na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách.

Skupina A – 3mM monomanosyldekalysin v PBS, skupina B – LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – 3mM monomanosyldekalysin v PBS in LPS (0,5 mg/ml LPS), skupina D – PBS.

4.4 Pokus č. 4 –

Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na terapii maligního melanomu

Na Obrázku 12 je znázorněn vliv terapie na průměrnou velikost nádorů jednotlivých skupin. Vyplývá z něj, že kromě posledního měření měl spacer (5 molekul glycinu) vliv na snížení nádorového růstu, které bylo šestý den statisticky významné. Molekuly se spacerem a terminálním hydrofobním řetězcem kyseliny stearové vykazovaly velmi silný inhibiční vliv na růst nádorů (od šestého do dvanáctého dne statisticky signifikantní).



Obr. 12: Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na průměrnou velikost nádorů.

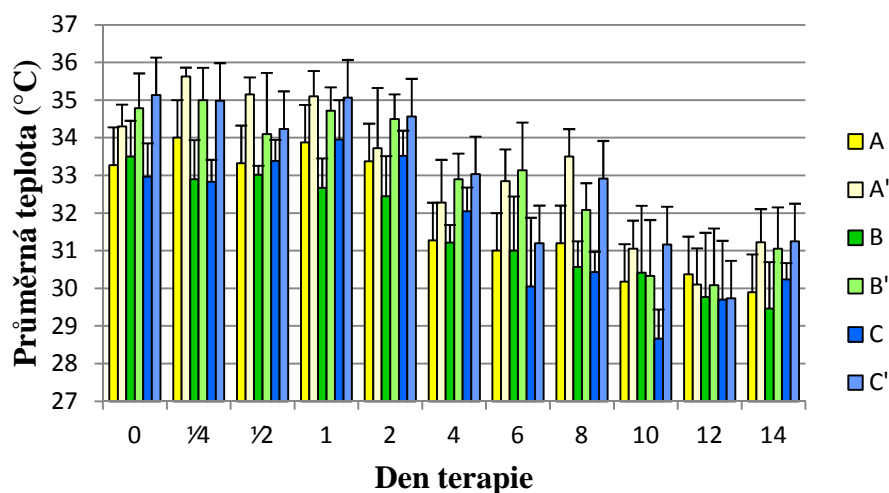
Skupina A – 3mM manosa (G)5 - (K)12, skupina B – manosa (G)5 - (K)10 - STE, skupina C – PBS.

* = $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrole (C)

*** = $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrole (C)

°°° = $P \leq 0,001$ vztaženo k manose (G)5 – (K)12 (A)

Obrázek 13 znázorňuje vliv léčby na průměrnou teplotu nádorů. Opět můžeme konstatovat nižší teplotu nádorů ve srovnání s kontrolním bodem a na terapii nezávislý pokles všech teplot během experimentu.

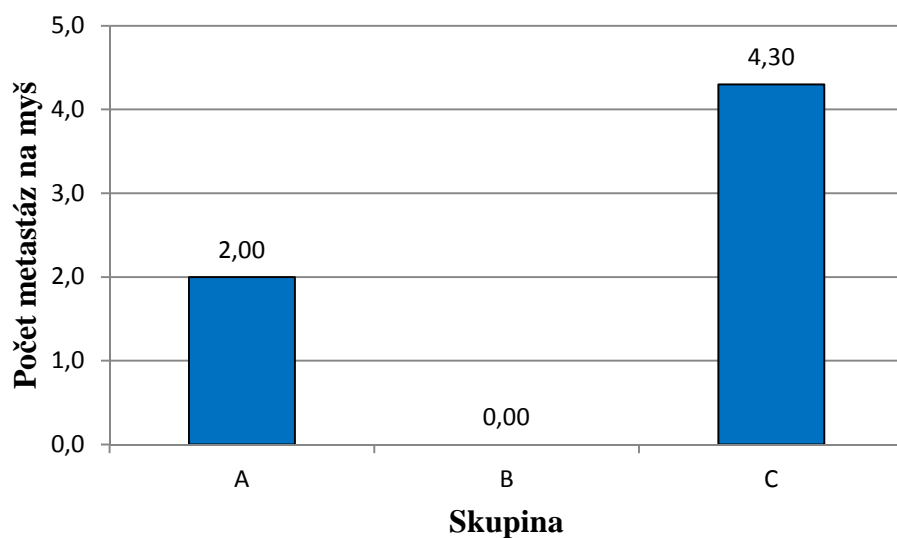


Obr. 13: Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na průměrnou teplotu nádorů.

Skupina A, A' – 3mM manosa (G)5 - (K)12, skupina B, B' – manosa (G)5 - (K)10 - STE, skupina C, C' – PBS.

Skupiny A, B a C – teploty nádorů, skupiny A', B' a C' – teploty druhého boku.

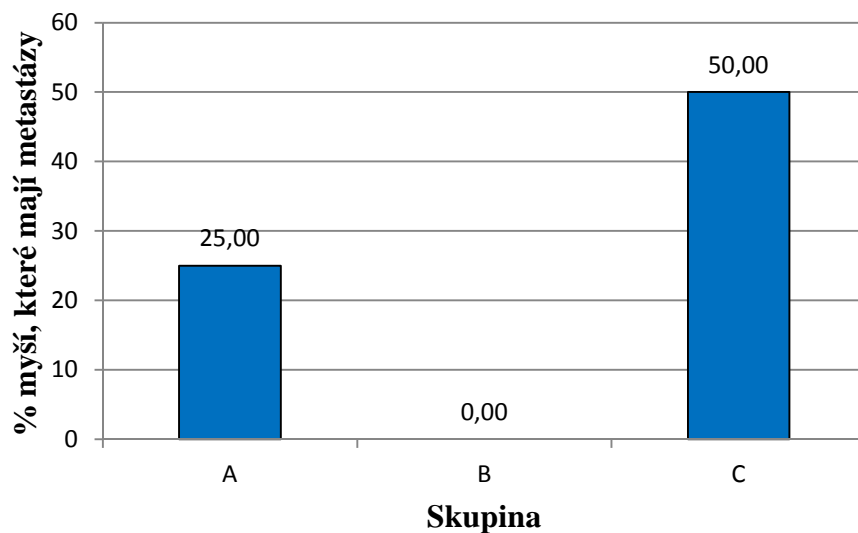
Na obrázku 14 je znázorněna intenzita metastazování (průměrný počet metastáz na myš s metastázemi).



Obr. 14: Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na intenzitu metastazování v jednotlivých skupinách.

Skupina A – 3mM manosa (G)5 - (K)12, skupina F – manosa (G)5 - (K)10 - STE, skupina C PBS.

Obrázek 15 znázorňuje, kolik procent myší v daných skupinách mělo metastázy. Z Obrázků 14 a 15 vyplývá značný vliv nejen spaceru, ale především dobrého kotvení molekul s manosou na redukci metastazování.



Obr. 15: Vliv spacerů a kvality kotvení molekul s terminální manosou na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách.

Skupina A – 3mM manosa (G)5 - (K)12, skupina B – manosa (G)5 - (K)10-STE, skupina C – PBS.

5. Diskuse

Společným jmenovatelem všech našich pokusů byla manosa – zabývali jsme se zkoumáním jejího účinku proti přirozeně metastazujícímu melanomu B16 – F10. Aplikovali jsme ji i. t. jak samotnou volnou, tak i navázanou na další ligandy. Pokud je nám známo, tímto tématem se dosud nikdo nezabýval, nebo alespoň dosud nepublikoval výsledky svého snažení.

Cílem prvního pokusu bylo otestovat vliv nevázané manosy a její kombinace s LPS na terapii maligního melanomu B16 – F10.

Co se týče rozpoznání daných ligandů jedním či druhým typem manosových receptorů, rozhodujícími faktory jsou nejen velikost ligandů, ale i jejich konfigurace, počet a hustota (Opanasopit et al. 2001). Zatímco takovým „ideálním“ ligandem pro MBL je bovinní sérový albumin (BSA), jehož molekulová hmotnost činí 67 kDa a na svém povrchu nese 25 – 30 manosových residuí (Opanasopit et al. 2001), MR rozpoznává ligand, jenž má na svém povrchu ideálně 6 manosových zbytků (Kinzel et al. 2003).

V případě volné manosy nedošlo zřejmě k žádné interakci s povrchem nádorových buněk, což by pravděpodobně mohlo být důvodem, proč samotná volná manosa nevykazuje žádný významný terapeutický účinek proti malignímu melanomu.

Již dříve bylo prokázáno, že samotný LPS velmi výrazně inhibuje nádorový růst (Čechová 2010). Má však nesporné cytotoxické účinky, proto bylo nutno optimalizovat dávkování tak, že používaná dávka (0,5 mg/ml PBS, aplikována po 50 μ l) již působí jen jako TLR4 agonista, nikoli však cytotoxicky (Glaserová *in prep.*). V ostatních experimentech, kde byla použita kombinace LPS a fagocytárních ligandů, jako laminarin (Auerová, *in prep.*) a formylmethioninové peptidy (Čunátová *in prep.*, Vlčková *in prep.*), došlo k mohutné synergii. Proto jsme se pokusili o podobnou synergii i v tomto případě. LPS samotný působí výraznou, byť v tomto pokusu statisticky nevýznamnou (malé skupiny) redukci nádorového růstu, ale k žádné synergii či aditivě s působením manosy nedošlo.

Ve druhém a třetím pokusu jsme testovali účinky monomanosyldekalysinu na terapii melanomu B16 – F10, a to jak samotného, tak i v kombinaci s LPS.

Tentokrát jsme manosu navázali na dekalysin s tím, že nádorové buňky jsou záporně nabitě (Marquez et al. 2004). Tohoto faktu lze terapeuticky využít – na stejném principu se váží například kationické antimikrobiální peptidy na nádorové buňky (Marquez et al. 2004)

Samotný dekalysin sloužil jako kontrola případného nespecifického účinku. Nicméně jsme zjistili, že monomanosyldekalysin žádný účinek nevyvolává, a to ani samotný, ani v kombinaci s LPS.

Čtvrtý pokus zkoumal protinádorový účinek manosy (G)5 – (K)12 a manosy (G)5 – (K)12 – STE. Pozitivně se projevil jak spacer, který zřejmě umožnil lepší dostupnost manosy pro receptory, tak zejména dlouhý hydrofobní řetězec kyseliny stearové, který rozpuštěním v lipidické mezivrstvě buněčné membrány výrazně přispěl k imobilizaci molekul (obecně používaný princip). Došlo nejen k výrazné inhibici nádorového růstu, ale i k redukci tvorby metastáz.

Pro účinnou imunitní odpověď na úrovni vrozené imunity je zdůrazňována úzká spolupráce signálních stimulů a jejich receptorů se stimulací fagocytárních receptorů, což odpovídá i našim poznatkům (LPS – laminarin, LPS – formylmethioninové peptidy, viz výše). Signální motivy přitom bývají rozpustné, u motivů fagocytárních je zdůrazňována jejich vazba na (mikrobiální) povrchy (Underhill a Gantner 2004). Co se týče fagocytárních ligandů, jejich ukotvením se nám podařilo vyprovokovat imunitní atak vedoucí k potlačení nádorového růstu i metastazování. Žádoucí synergie s LPS jsme však nedosáhli. Zajímavé je, že se tato synergie velmi dobře zdařila pro použití kotveného mananu (Bruzlová, in prep.). Tento fakt by mohla vysvětlovat práce pana Shepherda a kolektivu – zaznamenali sníženou aktivitu makrofágových MR pod vlivem LPS. Z jejich pokusů plyne, že po 48 hodinách byla v důsledku podání LPS aktivita MR snížena o 70 – 80%, přičemž toto snížení aktivity je procesem nevratným. Dokonce i po vysazení léčby se aktivita MR dále snižuje, nedochází však ke snížení exprese zmiňovaných receptorů (Shepherd et al. 1990). To by tedy mohlo vysvětlit, proč jsme v našich experimentech synergii s LPS nepozorovali. V případě mananu dochází zřejmě k tomu, že je aktivován především manose binding lectin (MBL), čemuž jeho alternativní označení manan binding lectin odpovídá. Stimulovaná lektinová dráha aktivace komplementu zřejmě LPS inhibovaná není. Na úrovni C3b se synergie LPS stimulovaných fagocytů s mananem aktivovanou komplementovou dráhou může plně uplatnit.

V případě našich experimentů ukotvená manosa zřejmě stimuluje především manosové receptory makrofágů, a má tudíž dvojitý účinek LPS (stimulace TLR4 na jedné straně, ale inhibice MR na straně druhé). V úhrnu nevede ani k aditivitě, tím méně synergii. Přesný mechanismus je však třeba prokázat.

Co se týče sledování teplot, toto měření se ukázalo jako neefektivní. Nádory mají nižší teplotu, než okolí, zřejmě kvůli nižší vaskularizaci a tuto teplotu nedokáže zvýšit ani LPS. Celkově teploty během pokusu klesají a nijak neodrážejí terapii. Velký poměr povrchu těla k objemu myši, jejich nepříliš dobře fungující termoregulace a problémy s vaskularizací nádorů celkově vedou k tomu, že se měření teploty ukázalo pro sledování nádorové imunoterapie jako nevhodná metoda.

6. Závěr

- Postupnou modifikací molekul nesoucích manosu byl vytvořen fagocytární ligand, který dokázal v in vivo experimentu vyvolat výraznou redukci nádorového růstu i metastázování.
- Jako důležitý moment vytvoření funkčního fagocytárního ligandu se jeví flexibilita terminální manosy a zejména jeho výrazné kotvení na nádorových buňkách, dané především alifatickým řetězcem kyseliny stearové.
- Na rozdíl od jiných fagocytárních ligandů, kotvená manosa nefunguje aditivně ani synergicky s LPS. Bylo navrženo vysvětlení tohoto jevu.
- Sledování povrchové teploty nádoru a myši se ukázalo jako nevhodné pro monitorování průběhu terapie.

7. Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998) Essential Cell Biology. New York: Garland Publishing. 630 s.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998) Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem: Espero Publishing. 630 s.
- Apostolopoulos, V., McKenzie I. F. C. (2001) Role of the Mannose Receptor in the Immune Response. Current Molecular Medicine 1: 469 – 474.
- Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A., Rasty, G. (2010) From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. Dermatology Research 7: 1 – 8.
- Cann, S. A. H., Netten, J. P., Netten, C. (2003) Dr. William Coley and Tumour Regression: A Place in History or in the Future. Postgraduate Medical Journal 79: 672 – 680.
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, T. D., Hawkins, G., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W., Delong, C. J. (2003) Spontaneous Regression of Advanced Cancer: Identification of a Unlike Genetically determined, age-dependent trait in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 6682 – 6687.
- Čechová, M. (2010) Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie. České Budějovice, diplomová práce PřF JU. 89 s.
- Čáp, R., Dobeš, D., Hošek, F., Hyža, P. (2005) Maligní melanom. Vojenské zdravotnické listy. 74: 4 – 8.
- DeFranco, A. L., Locksley, R. M., Robertson, M. (2007) Immunity – the Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. London: New Science Press Ltd. 387 s.

- Dienstbier, Z. (1994) Rakovina. Co o ní víme a jak s ní žít. Praha: Victoria Publishing. 63 s.
- Ezekowitz, R. A. (2003) Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *The Journal of Infectious Diseases* 187: 335 – 339.
- Fraser, I. P., Koziel, H., Ezekowitz A. B. (1998) The Serum Mannose-binding Protein and the Macrophage Mannose Receptor are Pattern Recognition Molecules That Link Innate and Adaptive Immunity. *Immunology* 10: 363 – 372.
- Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Hiller, M. A., Von Kap-Herr, C., Pettenati, M. J., Sanders, A. M., Weir, H. M., Du, W., Kim, J., Simpson, A. J. G., Old, L. J., Cui, Z. (2006) Transferable Anticancer Innate Immunity in spontaneous Regression/Complete Resistance Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 7753 – 7758.
- Inaba, M., Tazuko, T., Fujimoto, S., Sakuraiy, M. K., Ohnishi, Y. (1986) Evaluation of Response Rates to Various Antitumor Agents of Human Gastric Tumours Implanted in Nude Mouse. *Japanese Journal of Cancer Research* 77: 190 – 196.
- Javier R. T., Butel J. S. (2008) The History of Tumour Virology. *Cancer Research* 10: 7693 – 7706.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011) Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 61: 69 – 90.
- Kinzel, O., Fattori, D., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A. (2003) Synthesis of a Functionaled High Affinity Mannose Receptor Ligand and Its Application in the Construction of Peptide Polyamide and PNA Conjugates. *Journal of Peptide Science* 9: 375 – 385.

- Ko, K., Steplewski, Z., Glogowska, M., Koprovski, H (2005) Inhibition of Tumour Growth by Plant-Derived mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7026 – 7030.
- Krejsek, J., Kopecký, O. (2004) *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. 941 s.
- Le Cabec, V., Emorine L. J., Toesca, I., Cougoule, C., Maridonneau-Parini, I. (2005) The Human Macrophage Mannose Receptor is not a Professional Phagocytic Receptor. *Journal of Leukocyte Biology* 77: 934 – 943.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006) *Brock Biology of Microorganisms*. New Jersey: Pearson Prentice Hall. 991 s.
- Maierová, V. (2010) Studium možnosti kombinace proenzymoterapie s cílenou chemoterapií a s metabolickým ovlivněním nádoru. České Budějovice, bakalářská práce PřF JU. 49 s.
- Marquez, M., Nilsson, S., Lennartsson, L., Liu, Z., Tammela, T., Raitanen, M., Holmberg, A. (2004) Charge-Dependent Targeting: Results in Six Tumor Cell Lines. *Anticancer Research* 24: 1347 – 1352.
- Medzhitov, R., Janeway Jr. C. A. (2002) Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science, New Series* 296: 298 – 300.
- Mushegian, A., Medzhitov, R. (2001) Evolutionary Perspective on Innate Immune Recognition. *The Journal of Cell Biology* 155: 705 – 710.
- Novák, J. (1980) *Periproktální hlízy a flegmóny*. Praha: Avicenum. 44 s.

- Opanasopit, P., Shirashi, K., Nishikawa, M., Yamashita, Y. T., Hashida, M. (2001) In Vivo Recognition of Mannosylated Proteins by Hepatic Mannose Receptors and Mannan-Binding protein. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: G879 – G889.
- Pawelek, J. M., Körner, A. M. (1982) The Biosynthesis of Mammalian Melanin: The Regulation of Pigment Formation, the Key to Disorders such as Albinism and Piebaldism, May Also Offer Some Clues for the Treatment of Melanoma. *American Scientist* 70: 136 – 140.
- Petera, J., Bláha, V., Červinka, M., Doležel, M., Dvořák, J., Eliáš, P., Filip, S., Geryk, E., Jandík, P., Jílková, V., Melichar, B., Odrážka, K., Papík, Z., Petera, J., Ryška, A., Svoboda, V., Vidža, J. (2005) *Obecná onkologie – učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Nakladatelství Karolinum. 205 s.
- Pizinger, K. (2003) *Kožní pigmentové projevy*. Praha: Grada Publishing. 124 s.
- Rejthar, A., Vojtěšek, B. (2002) *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha: Grada Publishing. 206 s.
- Shepherd, V. L., AbdoIrasulnia, R., Garrett, M., Cowan, H. B. (1990) Down-Regulation of Mannose Receptor Activity in Macrophages after Treatment with Lipopolysaccharide and Phorbol Esters. *The Journal of Immunology* 145: 1530 – 1536.
- Silverstein, M. J., Morton, D. L. (1973) Cancer Immunotherapy. *The American Journal of Nursing* 73: 1178 – 1181.
- Takahashi, K., Ezekowitz, R. A. B. (2005) The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *Clinical Infectious Diseases* 41, 7: 440 – 444.
- Underhill, D. M., Gantner, B. (2004) Integration of Toll-like Receptors and Phagocytic Signaling for Tailor Immunity. *Microbes and Infection* 6: 1368 – 1374.

- Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. (2006) Klinická onkologie pro sestry. Praha: Grada Publishing. 328 s.

- Weinberg, R. A. (2003) Jediná odrodilá buňka: jak vzniká rakovina. Praha: Academia. 156 s.

- Yeeprae, W., Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M. (2006) Effect of Mannose Density on Mannose Receptor-Mediated Cellular Uptake of Manosylated O/W Emulsions by Macrophages. Journal of Controlled Release 114: 193 – 201.