

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění
pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na
povrch nádorových buněk**

Bakalářská práce

Štěpánka Čunátová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Čunátová, Š., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. [Verification of the possibility of cancer therapy based on formylmethionine derivatives anchored to the tumor cells surface. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: The therapeutic effect of formylmethionine derivatives on melanoma was studied. We found that this effect is dependent on the binding strength of these compounds to tumor cells surface. Synergy between formylmethionine derivatives and LPS was described as well.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na 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, 20. 4. 2012

.....
Štěpánka Čunátová

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi za vynikající vedení mé bakalářské práce, za ochotu mi s čímkoli a kdykoli pomoci a také za jeho trpělivost. Dále děkuji své rodině a mým přátelům, hlavně kolegyním, které byly mou obrovskou podporou při psaní této práce.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Vznik nádoru.....	1
1.2. Rozdělení nádorů.....	2
1.3. Melanom.....	3
1.3.1. Melanom B16-F10.....	4
1.4. Léčba nádorových onemocnění	4
1.4.1. Chirurgická léčba.....	5
1.4.2. Radioterapie (léčba ionizujícím zářením)	5
1.4.3. Chemoterapie	5
1.4.4. Biologická terapie.....	6
1.4.5. Léčba neionizujícím zářením	6
1.5. Nádor a imunita.....	6
1.5.1. Nádorové markery	8
1.6. Imunoterapie nádorů a vrozená imunita	9
1.6.1. Vrozená imunita	9
1.6.2. Mechanismy přirozené imunity.....	10
1.6.3. Imunoterapie rakoviny založená na vrozené imunitě	11
1.7. N-formylmethionové peptidy.....	13
1.8. Formyl peptidové receptory (FPRs)	13
1.8.1. Receptory spřažené s G-proteinem.....	13
1.8.2. Lidské FPRs	14
1.8.3. Myší FPRs.....	15
1.8.4. Ligandy pro FPRs.....	15
2. Cíle práce.....	17
3. Materiály a metody	18
3. 1. Chemikálie	18
3. 2. Experimentální zvířata a buněčné linie	18

3. 3. Transplantace melanomu B16-F10	18
3. 3. 1. Příprava buněk.....	18
3. 3. 2. Aplikace buněk.....	19
3. 4. Měření teploty a objemu nádoru	19
3. 5. Statistické zpracování dat	19
3. 6. Pokusy	20
3. 6. 1. Pokus č. 1: Vliv nábojově vázaného fMLF motivu (samotný i v kombinaci s LPS).....	20
3. 6. 2. Pokus č. 2: Nádorová terapie pomocí fMLF motivu kotveného prostřednictvím lipofilního řetězce (samotný i s LPS).....	20
3. 6. 3. Pokus č. 3: Ověření možnosti použití nízkých koncentrací fMLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce	21
4. Výsledky.....	22
4. 1. Pokus č. 1: Vliv nábojově vázaného fMLF motivu (samotný i v kombinaci s LPS). 22	
4. 2. Pokus č. 2: Nádorová terapie pomocí fMLF motivu kotveného prostřednictvím lipofilního řetězce (samotný i s LPS).....	25
4. 3. Pokus č. 3: Ověření možnosti použití nízkých koncentrací fMLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce.....	27
5. Diskuze.....	30
6. Souhrn	32
7. Literatura	33
8. Přílohy	36
8. 1. Pokus č. 1: Graf závislosti teploty na průběhu terapie	36
8. 2. Pokus č. 2: Graf závislosti teploty na průběhu terapie	37
8. 3. Pokus č. 3: Graf závislosti teploty na průběhu terapie	38

1. Úvod

Rakovina je souborný název pro více než 100 nejrůznějších nádorových onemocnění, jejichž výskyt stále roste (Zámečník 2002). V České Republice v roce 2009 bylo zaznamenáno celkem 78 846 případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ (Srb 2009), v roce 2004 byla Česká Republika (ve srovnání se světem) na prvním místě v incidenci novotvarů ledvin mimo pánevníku (Ajmová a kol. 2004).

V ekonomicky rozvinutých státech byly zhoubné nádory na druhé pozici příčin úmrtí (Zámečník 2002). V současné době se dostaly na první místo (Jemal a kol. 2011).

Kořeny poznatků o rakovině sahají až do roku okolo 2000 př. n. l., do indického eposu Ramájana, kde o této chorobě je zmínka. Hippocrates (460-375 př. n. l.) zavedl pojmenování rakovina. Roku 1531 Theophrastus B. von Hohenheim ve svých třech knihách poprvé popsal, jak vnější faktory mohou způsobit toto onemocnění, v tehdejších dobách se rakovině říkalo „hněv boží“ (Clarke a Macrae 1988).

1.1. Vznik nádoru

Jak vlastně nádorové onemocnění vzniká? Život každé buňky záleží na jejích genech, které jsou transkribovány (přepisovány) do RNA. Přepisu se účastní jen určité sekvence DNA. Ostatní sekvence mají některé cytosinové promotorové báze metylované. Pokud je promotor metylován, nemůže se na něj navázat regulační protein a výsledný gen není exprimován. Takže se zdá, že podstata vývojového buněčného plánu je právě v této metylaci. Geny pro buněčné dělení (proliferaci) jsou regulovány přesně tímto způsobem. Pokud dojde k poruše proliferačních genů, buněčné dělení se zastaví. Ale může nastat i opačný jev, kdy je narušena regulace, dochází k opakované expresi genů pro proliferaci a vzniká nádorová buňka. Ve zdravém organismu se stále dělí pouze kmenové buňky, ostatní jsou ve stádiu diferenciaci a počet jejich dělení je limitován (Jurga a kol. 2000).

Vzniklý nádor, podle jeho biologických a tvarových vlastností, rozdělujeme na benigní (nezhoubný, „neškodný“) a maligní (zhoubný). Benigní nádory jsou „neškodné“ tím, že mají svůj růst ohraničený, a tak nádorové buňky nemohou prostupovat nikam jinam mimo nádor. Zato maligní nádory jsou mnohem zákeřnější, dokážou pronikat do okolí, kde

zakládají nová nádorová ložiska. Tomuto procesu se říká metastázování a vnikajícím ložiskům metastáze (Pacovský 1993).

K maligní transformaci může docházet díky fyzikálním (ionizující záření), chemickým (kancerogenní látky - dehet, benzen, polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrozaminy, aflatoxiny) a biologickým činitelům (viry - virus Epstein-Barr, virus HTLV-1) (Klener a kol. 1996).

1.2. Rozdělení nádorů

Nádory rozdělujeme z histologického hlediska do šesti kategorií:

- Nádory mesenchymové, které se dále rozdělují podle toho, z jaké tkáně vznikají. Jejich společným základem je pojivo mezenchym.
Př.: nádor z tukové tkáně - benigní lipom, maligní liposarkom
nádor z tkáně chrupavky - benigní chondrom, maligní chondrosarkom
nádor z tkání krevních cév - benigní hemanგიom, maligní hemangiosarkom
(Bednář a kol. 1982)
- Nádory epitelové mají veliké buňky se značnými jádry. Buňky jsou mezi sebou pevně spojeny, je v nich mikroskopicky viditelný chromatin. Mohou vznikat z povrchového (krycího), kde maligní se jmenují karcinomy a benigní papilomy a žlázového epitelu, maligní se nazývají adenokarcinomy a benigní adenomy.
Př. dlaždicový karcinom, invertovaný papilom, adenom acidózní (Bednář a kol. 1982)
- Nádory neuroektodermové vznikají v periferní, centrální nervové soustavě a v evolučně příbuzných melanocytech (pigmentové buňky).
Př. maligní gangliocytom (zhoubný nádor z buněk ganglií), Neurinom (nádor ze schwannových buněk), melanom (nádor z melanocytů) (Bednář a kol. 1982)
- Nádory smíšené, germiální a teratom
Smíšené nádory jsou takové, které jsou tvořené alespoň dvěma odlišnými tkáněmi. Tím vznikají velmi rozdílné struktury nádorů (př. fibroadenom, adenosarkom).

Germinální nádory jsou nádory pohlavních žláz a buněk (seminom, embryonální karcinom). Teratom je tvořen z více tkání, které jsou různé a mohou být odlišně vyzrálé a rozlišené (př. solidní teratom, diferencovaný teratom, nediferencovaný teratom) (Bednář a kol. 1982).

- Choriokarcinom (chorioepiteliom) je zhoubný nádor využívající trofoblast. Metastazuje krevní cestou především do plic a mozku. Choriokarcinomové buňky vytváří hormon zvaný choriový gonádotropin, který je sledován v krevním séru, je podstatný ve stanovení diagnózy. Choriokarcinom může vznikat u žen po potratu, kdy není plod z těla odstraněn a vytvoří se z něj tuhá vazivová koule tzv. mola (Brychtová a Hlobilková 2008).
- Mezoteliom může vznikat z výstelky tělních dutin z: pohrudniční, osrdečnickové nebo břišní (př. adonomatiodní mezoeliom, fibromezoteliom) (Bednář a kol. 1982).

1.3. Melanom

Melanom patří mezi maligní nádory neuroektodermového typu. Vzniká maligní transformací melanocytů. Hlavními příznaky vyvíjejícího melanomu jsou jeho růst, tmavé zabarvení, svrbění, vyklenutí a především mokvání, krvácení nebo zvrhodatění (Bednář a kol. 1982).

Jeho vznik je zapříčiněn ultrafialovým zářením, které je obsaženo ve slunečních paprscích a dědičnými genetickými faktory. Nejčastěji se melanom vyskytuje u bílého obyvatelstva Evropy, severní Ameriky a Austrálie, nejméně pak u Afričanů, asijských, australských a amerických domorodců. Větší nebezpečí platí pro lidi s ryšavými vlasy a světlou pletí, kteří po vystavení slunci zrudnou a nevytváří si tak pigmentovou ochranu (Žaloudík 2008).

Melanom je většinou přítomný na kůži, vzácněji na konečnicku, pochvě, oku či sliznici úst. Jeho metastáze se mohou rozšiřovat do plic, mozku, jater a střev (Žaloudík 2008).

Růst melanomu se rozděluje do čtyř stádií. V prvním, nazývaném superficiální, roste povrchově, jeho výška je maximálně 2 milimetry. Druhé stádium (nodulární) melanom roste

hlouběji nebo tvoří uzlíky vyčnívající na povrchu. Již hrozí riziko metastáz, především do okolních lymfatických uzlin. Ve třetím stádiu jsou už patrné četné metastáze v uzlinách. V posledním, čtvrtém, stádiu jsou metastáze rozseté ve vnitřních orgánech v celém organismu (Žaloudík 2008).

Při zahlcení organismu metastázemi melanomu může docházet k vylučování melaninu močí, čemuž se říká melaninurie (Bednář a kol. 1982).

Benigní nádor tohoto typu se nazývá pigmentový névus. Může dojít k maligní transformaci z benigního pigmentového névu na melanom bez ohledu na věk nebo lokalizaci (Bednář a kol. 1982).

Kvůli častému vystavování kůže slunci je jeho rostoucí tendence incidence velmi vysoká (Becker a kol. 2005).

1.3.1. Melanom B16-F10

Melanom B16-F10 spolu s dalšími třemi (B16-F0, B16-F1, B16 -BL6) patří mezi myši modelové melanomové buněčné linie B16. Je vysoce agresivní v invazi do okolních tkání, kde zakládá metastáze. Metastazuje především do plic (Nakamura a kol. 2002).

Klíčovou roli v metastázování hrají krevní destičky aktivované nádorovými buňkami. Bylo zjištěno, že nádorové buňky rakoviny plic spouští in vitro agregaci krevních destiček. Tato vlastnost vzájemně souvisí s metastázováním melanomu in vivo. Právě inhibice agregace krevních destiček protisrážlivými léky (varfarin, heparin, atd.) by mohla být nadějí v prevenci a léčbě melanomových metastáz, jelikož krevní destičky nejspíše napomáhají nádorovým buňkám v ochraně před usmrcením NK-buňkami. Po infikování myši melanomem B16-F10 došlo během 2 týdnů k vysokému poklesu destiček v krvi. Tudíž je možné, že melanomové buňky využily krevní destičky k vlastní ochraně před NK-buňkami během metastázování (Nakamura a kol. 2002).

1.4. Léčba nádorových onemocnění

V dnešní době jsou zhoubné nádory léčitelné. Úspěšnost léčby ovšem závisí na velikosti nádoru (čím menší, tím lepší) a jeho stádiu. Při počátečních formách nádorů, kdy jsou pouze v jednom místě, nerozšířené do okolních tkání, má pacient šanci na úplné vyléčení. S postupným rozšířením nádorů v těle se léčba stává více nákladnou, náročnou,

bolestivou a hlavně mnohem méně pravděpodobně vyléčitelnou. Existuje několik metod, jak léčit rakovinu (Zámečník 2002).

1.4.1. Chirurgická léčba

Až do 20. let 20. století byla jedinou protinádorovou léčbou (Klener a Klener jr. 2010). Operace je neúčinnější léčbou v případě malých nádorů. Tento druh terapie je praktikován u všech maligních nádorů (Zámečník 2002).

1.4.2. Radioterapie (léčba ionizujícím zářením)

Někdy se radioterapii dává přednost před operací, pokud si to pacient vysloveně přeje nebo pokud by jeho zdravotní stav chirurgický zákrok nezvládl (riziko narkózy, další choroby, pacientův věk). Na rozdíl od chirurgické léčby, kdy se někdy odstraňuje celý poškozený orgán, při radioterapii je tento orgán pacientovi ponechán a může být ještě funkční (Zámečník 2002).

Obvykle se radioterapie kombinuje s operací. Před zákrokem se pacient ozařuje (na postiženém místě), aby se docílilo zmenšení nádoru a snížení životaschopnosti nádorových buněk. Nebo naopak, k radiační terapii dochází až po operaci. Kvůli odstranění možných zbylých nádorových buněk v místě chirurgického zákroku, ve spádových uzlinách a okolních ložiscích (Zámečník 2002).

Do této kategorie ještě patří novější metoda zvaná intraoperativní radioterapie, při níž se chirurgicky dostaneme k nádorovému ložisku a přímo ho ozáříme. Výhodou je nepoškození okolních orgánů. Intraoperativní radioterapie se například využívá při léčbě rakoviny slinivky břišní (Zámečník 2002).

1.4.3. Chemoterapie

V chemoterapii je léčbou podávání léků cytostatik. Jsou to přírodní nebo chemické sloučeniny. Fungují na principu snížení buněčného dělení. Jejich nevýhodou ale je, že jejich cytostatický účinek (omezení dělení buněk) působí na veškeré dělící se buňky v těle. To znamená inhibici nejen nádorových ale i zdravých buněk. Další nevýhodou je její toxicita, je důležité stanovit vhodnou dávku (Klener a kol. 1996).

To, že chemoterapie postihuje celé tělo, má i určitý přínos. Dokáže ničit i ty nejmenší a nejvzdálenější nádorová ložiska (Klener a kol. 1996).

Využívá se hlavně k léčbě nádorových onemocnění krevetvorných tkání (Klener a kol. 1996).

1.4.4. Biologická terapie

Bioterapie je stále vyvíjející se vědní obor, který již opouští klinické studie a proniká do běžné praxe. Rozvoj této metody je jen díky vývoji dnešních biotechnologií. Patří sem hlavně imunoterapie. Imunoterapie působí aktivně (pomocí přirozené obranyschopnosti organismu) nebo pasivně (přenosem buněk imunitního systému z jiného organismu) (Zámečnick 2002).

1.4.5. Léčba neionizujícím zářením

Jsou to novější léčebné postupy. Radíme sem hypertermii a fotodynamickou terapii. Principem hypertermie je zahřívání nádoru po stanovenou dobu na teplotu 42°- 43C°. Používá se jako doplněk radioterapie a chemoterapie (Zámečnick 2002).

Fotodynamická terapie funguje na základě interakce speciálních látek (fotosenzibilátorů). Tyto látky se kumulují v některých nádorových buňkách. Pokud nádorovými buňkami s fotosenzibilátory projde červený laserový paprsek, dojde k vyloučení molekulárního kyslíku, který dokáže ničit nádorové buňky, aniž by narušil buňky zdravé (Zámečnick 2002).

1.5. Nádor a imunita

Nádorové buňky vznikly přeměnou buněk zdravých, to znamená, že na svém povrchu mají antigeny, které mohou být rozpoznávané imunitou (Klener a Klener jr. 2010).

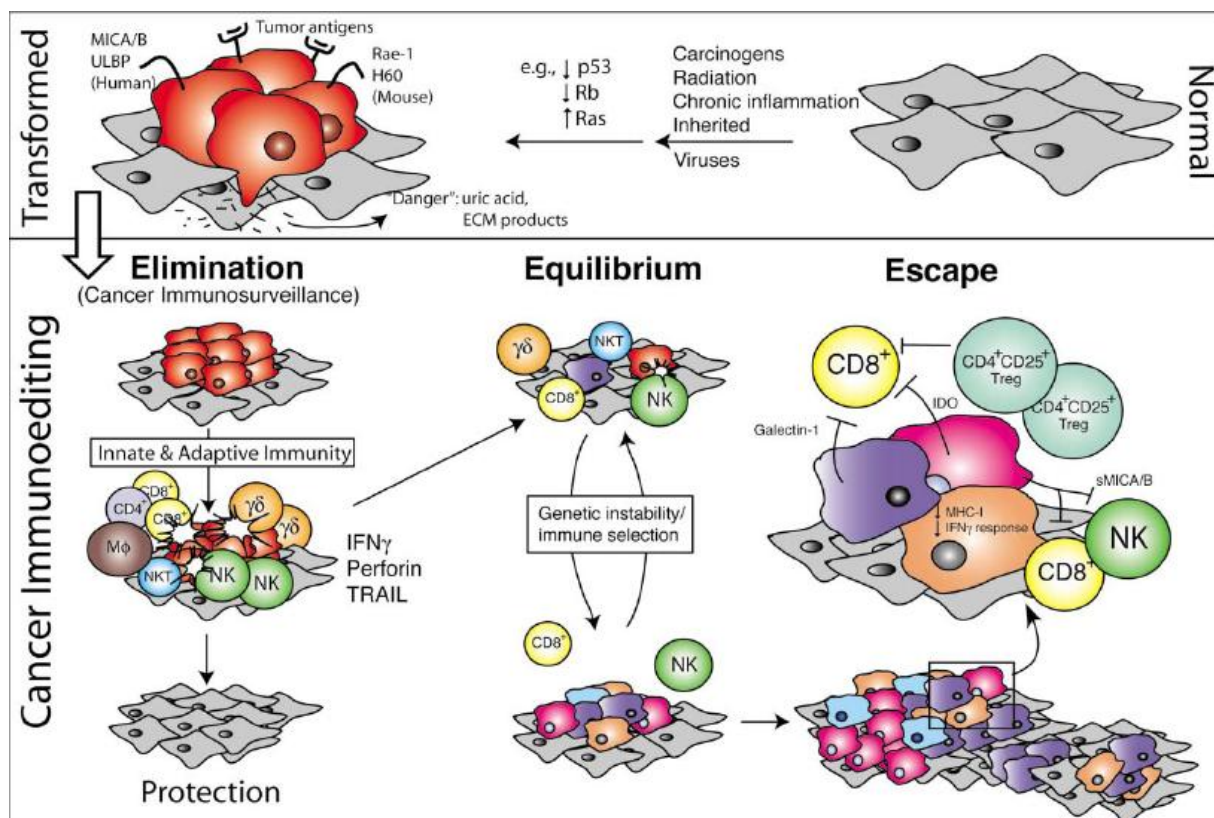
S rozvojem techniky v 90. letech, díky pokusům s geneticky upravenými myšmi a monoklonálními protilátkami, se potvrdil koncept imunitního dohledu nad rakovinou, který zahrnuje získanou a vrozenou imunitu (Dunn a kol. 2004).

Nedávno zveřejněné výzkumy také uvedly, že imunitní systém může podporovat vznik primárního nádoru. Čímž dojde ke snížení produkce protilátek a nádorové buňky jsou schopné uniknout imunitnímu rozpoznání a zničení. To vše vedlo k vytvoření hypotézy nazvané imunoeditace rakoviny (cancer immunoediting). Imunoeditace je děj složený z 3 fází: eliminace, rovnováha a únik (Dunn a kol. 2004).

- **Eliminace:**
Zde se projevuje imunitní dohled, kdy transformované buňky, z kterých ještě nevznikl nádor, jsou eliminované jak buňkami vrozené, tak buňkami adaptivní imunity (Hatina 2005).

 - **Rovnováha:**
V této fázi jsou buňky v klidu, neproliferují, jsou v konstantním malém počtu, který není klinicky zjištělný. Z toho důvodu je nemůže imunitní systém eliminovat. Teorii rovnováhy potvrzují případy, kdy příjemci byl transplantován orgán (od dárce „vyléčeného“ z nádorového onemocnění) a po nějaké době se u něho vyvinul v samotném orgánu nádor (Hatina 2005).

 - **Únik:**
Protinádorová imunitní reakce začíná jen tehdy, když je antigen prezentován T lymfocytům aktivovanými dendritickými buňkami. Nádorové buňky využívají různé mechanismy, kterými unikají imunitní kontrole. Příklady některých z nich:
 - Zmutují a ztratí antigen.
 - Slabě exprimují nádorové antigeny.
 - Schovají nádorové epitopy díky sialyzaci povrchu.
 - Produkuje blokující látky (TGF- β) a inhibují T lymfocyty.
 - Na svém povrchu vyjadřují Fas ligandy, které v protinádorových T lymfocytech vyvolávají apoptózu.
 - Produkuje látky, které inaktivují a někdy usmrcují dendritické buňky. Patří sem oxid dusnatý, TGF- β a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF).
 - V nádoru jsou Treg lymfocyty, které považují nádorové buňky za buňky tělu vlastní. Ochraňují nádorové buňky před (auto)imunitními odezvou, jelikož účinně blokují nádorově specifické cytotoxické T-lymfocyty. Odstranění Treg lymfocytů vede sice k zesílení protinádorových mechanismů, ale hrozí zde nebezpečí vzniku autoimunitního onemocnění (Hořejší a Bartůňková 2009).
- Po uniknutí nádorových buněk imunitě dochází k jejich progresi. Celá imunoeditace nádoru je na Obr. 1 (Dunn a kol. 2004).



Obr. 1: Schéma imunitního dohledu a celé imunoeditace (Dunn a kol. 2004).

1.5.1. Nádorové markery

Nádorové markery jsou látky obsažené v krevním séru pacienta s nádorovým onemocněním, které nám mohou říci o biologických vlastnostech nádoru (Abrahámová a kol. 2008).

Rozdělení nádorových markerů:

- **Onkofetální antigeny**
Tyto antigeny jsou exprimovány na buňkách během fetálního vývoje. Díky tomu, že jejich produkce je po porodu velmi slabá, nadměrná tvorba v dospělosti naznačuje přítomnost nemoci (většinou nádorové). Patří sem alfa1-fetoprotein (AFP), lidský choriový gonádotropin (HCG), dále pak karcinoembryonální antigen (CAE) a nakonec placentární alkalická fosfatáza (PLAP) (Abrahámová a kol. 2008).
- **Tkáňové a orgánové specifické antigeny**
Jsou to látky obsažené ve zdravých tkáních a orgánech. Mimo ně jsou jen v malé míře, ale pokud je člověk nemocný, zpravidla zhoubnou chorobou, jsou uvolňovány.

Do této skupiny zařazujeme prostatický specifický antigen (PSA), prostatickou kyselou fosfatázu (PAP), neuron specifickou enolázu (NSE), mozkový S-100 protein, rozpustné části citokeratinů (TPA, TPS, CYFRA21-1), antigen karcinomu z skvamózních buněk (SCC) a tyreoglobulin (TG) (Abrahámová a kol. 2008).

- Nespecifické antigeny a nádorové markery

Sem zařazujeme například laktát dehydrogenázu (LDH), ferritin, thymidinkinázu (TK), beta-2-mikroglobulin (β -2-m), na tuky vázanou sialovou kyselinu, adhezní molekuly (fibronektin, kadherin, selektin, integriny), C-reaktivní protein (CRP), DNA v krevním séru (Abrahámová a kol. 2008).

- Genetické nádorové markery

Genetické markery nám dokazují přítomnost genů, které mohou vést ke vzniku nádoru. Mezi tyto geny řadíme BRCA-1 a BRCA-2 (nádor prsu a ovaria) a také gen PC1 (nádor prostaty) (Abrahámová a kol. 2008).

1.6. Imunoterapie nádorů a vrozená imunita

1.6.1. Vrozená imunita

Buňky vrozené imunity jsou v podstatě takoví „hlídači“, kteří jako první upozorní na vniknutí patogenních látek do organismu a poté je začnou eliminovat. Dále dokážou identifikovat buňky těla vlastní, které jsou určeny k zániku. K rozpoznání využívají receptory na svém povrchu. Geny těchto receptorů jsou kódovány již v zárodečné DNA, což znamená, že jsou děděny (Krejsek a Kopecký 2004).

Patogenů je celé řada, ale receptorů není tolik. Rozpoznávají pouze specifické struktury, které se nacházejí na určitých skupinách patogenů. Tyto skupiny molekulárních motivů označujeme jako PAMPs (pathogen associated molecular patterns) a receptory, které je rozpoznávají jako PRRs (pattern recognition receptors) (Krejsek a Kopecký 2004).

1.6.1.1. PRRs

Jsou exprimovány na makrofágách, monocitech, dendritických buňkách, NK buňkách, PNN a i na některých B lymfocytech. Nejdůležitější funkcí receptorů je odlišení

mikroorganismů škodlivých od neškodlivých. Rozdělují se z hlediska funkčnosti do 3 skupin (Krejsek a Kopecký 2004).

- **Sekretované PRRs**
Zesilují fagocytózu navázáním na patogenní buněčné stěny. Tuto vazbu rozpoznávají jak fagocyty, tak komplement (Krejsek a Kopecký 2004).
- **Endocytární PRRs**
Jsou exprimovány na buňkách schopných fagocytózy. Endocytární receptory rozpoznají PAMPs v organismu a naváží je na fagocytující buňky (Krejsek a Kopecký 2004).
- **Signální PRRs**
Po rozpoznání PAMPs aktivují další systém, který následně reguluje imunitní systém (Krejsek a Kopecký 2004).

1.6.1.2. PAMPs

PAMPs jsou látky obsažené na povrchu nebo uvnitř buněk mikroorganismů, nikdy se přirozeně nevyskytují v hostiteli. Jsou velmi důležité pro životaschopnost mikroorganismů, ztráta nebo mutace PAMPs je smrtelná. Mezi PAMPs patří například lipopolysacharid (LPS), lipoproteiny, peptidoglykany, kyselina lipoteichová (LTAs). LPS obsahují skoro všechny Gram-negativní bakterie (Medzhitov 2001).

1.6.2. Mechanismy přirozené imunity

Mechanismy přirozené imunity můžeme rozdělit do 2 hlavních tříd: buněčné mechanismy (fagocyty, NK buňky) a humorální mechanismy (komplement) (Ferenčík a kol. 2005).

1.6.2.1. Komplement

Byl objeven už v 19. století belgickým vědcem Jules Bordetem, ale název mu udělil Paul Ehrlich. Komplement je tvořen asi 40 glykoproteiny, které jsou na povrchu buněk a v krevním séru. Glykoproteiny kolující v krvi jsou v neaktivní formě. Po jejich aktivaci dochází ke kaskádě reakcí, které nakonec vedou k cytolýze cílené buňky. Jeho hlavní funkce jsou obrana proti škodlivým mikroorganismům, nádorovým buňkám, podílí se na zánětlivých reakcích a napomáhá fagocytóze (některými svými složkami) (Ferenčík a kol. 2005).

1.6.2.2. Fagocytóza

Slovo fagocytóza pochází z řeckého slova *phagein* a znamená doslova „jíst buňku“. Fagocytózou jsou z těla likvidovány patogenní mikroorganismy, inertní částice (prachové), vlastní poškozené tkáně a buňky. Při fagocytóze dochází k pohlcování partikul (větších než 0,1 μ m) buňkou a následné eliminaci. Vlastnost fagocytózy mají všechny jaderné buňky v těle, ale pouze profesionální fagocyty (neutrofilů, tkáňové makrofágy, monocytů, eozinofilů) mají schopnost obranné fagocytózy před škodlivými mikroby, která je velmi silná a rychlá (Ferenčík a kol. 2005).

Pokud jsou částice pokryté složkou komplementu (C3b) nebo protilátkami, je fagocytóza mnohem rychlejší. Tento jev se nazývá opsonizace a látky, díky kterým nastává, opsoniny. Fagocytózu využívají i bakterie, hlavně k získávání potravy (Ferenčík a kol. 2005).

1.6.2.3. NK buňky

NK buňky mají hned několik označení: přirození zabíječi (natural killer cells), buňky spontánní cytotoxicity nebo lymfocyty s velkými granuly-LGL (large granular lymphocytes). Jak již názvy naznačují, NK buňky dokážou zabít jiné buňky, kterými jsou buňky nádorové a buňky infikované virem. Jejich schopnost usmrcovat může a nemusí být závislá na protilátkách. Obsahují granula, v kterých mají 2 druhy cytotoxických látek perforiny a granzymy. Při styku s cílovou buňkou NK buňky tyto látky uvolní. Perforin vytvoří v terčově buňce otvor a poté do ní vstoupí granzymy, které vyvolají její apoptózu (buněčnou smrt) (Ferenčík a kol. 2005).

1.6.3. Imunoterapie rakoviny založená na vrozené imunitě

Léčba rakoviny pomocí vrozené imunity už není mýtus, bylo dokázáno vyléčení pokročilé fáze sarkomu 180 na myších modelech. Vědci z Wake Forestské univerzity injikovali myši kmene BALB/c nádorovými buňkami sarkomu 180 (S180) do břišní dutiny. Růst S180 buněk během 2 týdnů upal veškeré lymfatické cesty, což vedlo k chorobnému nahromadění tekutiny v břišní dutině (ascites). U všech testovaných myší, až na jednu, se ascites vyvinul. Tato myš (samice BALB/c) i po opakovaných injekcích S180 zůstala zdravá bez ascitu. Původně si vědci mysleli, že myš není kompletně odolná vůči S180, že jde pouze o chybu, jelikož myším BALB/c se typicky vytváří ascites. Proto ji začali podávat 200x větší dávku buněk S180 než kontrolním skupinám, přesto myš zůstala zdravá, bez vytvoření nádoru a ascitu (Cui a kol. 2003).

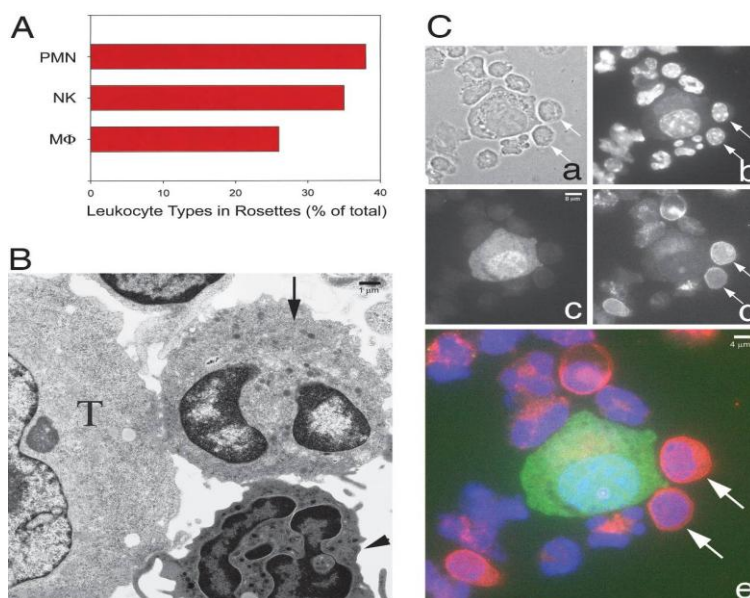
Poté provedli experiment, zdali je tato odolnost, rezistence přenosná geneticky z rodičů na potomky a zjistili, že tomu tak je. Vlastnost rezistence je přenášena jedním z 19 myších autozomů. Mutace zodpovědná za rezistenci vůči nádorům byla označena jako SR/CR (Cui a kol. 2003).

Infekce nádorovými buňkami spustí rychlou a silnou infiltraci leukocytů, které se akumulují okolo nádorových buněk a vytváří jakousi růžici (Obr.2C). Po kontaktu leukocytu s nádorovou buňkou nastane její cytolýza (Hicks a kol. 2006).

Další otázkou bylo, jaké typy leukocytů jsou důležité při protinádorové reakci. Zastoupení leukocytů bylo zjištěno průtokovou cytometrií viz Obr. 2 (A), kde PNN jsou neutrofilů, M makrofágů a NK NK buňky (Hicks a kol. 2006).

Následující experiment měl prozkoumat, jestli leukocyty z odolných myší budou působit i na myši na nádor citlivé. Odebrali leukocyty z rezistentních myší a infikovali s nimi myši s nádory, které nebyly odolné. Po 3 týdnech 9 z 14 nerezistentních myší se zcela uzdravilo a 5 ze 14 se zastavil růst nádoru. Léčebný účinek měly jak NK buňky, tak makrofágy i neutrofilů (Hicks a kol. 2006).

100% také vyloučili nápomoc získané imunity, kdy myším odstranili T a B lymfocyty pomocí anti-T a anti-B lymfocytárních protilátek. Myši se i přes absenci adaptivní imunity vyléčily (Hicks a kol. 2006).



Obr. 2: (A) Zastoupení typů leukocytů v růžici, (B) zobrazení kontaktního místa leukocytů s nádorovou buňkou, (C) snímky růžice imuno fluorescenčním mikroskopem (Hicks a kol. 2006).

1.7. N-formylmethionové peptidy

N-formylmethionové peptidy jsou v přírodě vytvářeny pouze bakteriemi a mitochondriálními geny. Vznikají díky proteosyntéze bakterií a mitochondrií, kterou v obou případech zahajuje N-formylmethionin. Z toho vyplývá, že bakteriální produkty mohou obsahovat formylmethioniny. Živočišné buňky začínají syntézu bílkovin methioninem (S.Aswanikur a kol. 1976).

Fagocyty využívají N-formylmethionin (fMet) jako chemický signál k vystopování bakterií (Schiffmann a kol. 1975).

Di - a tripeptidy obsahující formylmethionin jsou chemoatraktanty, které velice silně přitahují neutrofile a makrofágy (Schiffmann a kol. 1975). Samotný N- formylmethionin a neformylované peptidy mají velice nízkou nebo žádnou aktivitu chemotaxe vůči neutrofilům a makrofágům. Chemoatraktanty jsou látky, jež dokáží přitahovat buňky, které mají na svém povrchu receptory k těmto látkám, ve směru zvyšujícího se chemického gradientu. Děj probíhající mezi nimi se nazývá chemotaxe (Showell a kol. 1976).

Pokusem bylo také objeveno, že zbytky aminokyselin v peptidovém řetězci udávají míru účinnosti chemotaxe. Nepolární zbytky typu Leu (leucin), Phe (phenylalanin) nebo Trp (tryptofan) navázané na počáteční fMet poskytují peptidu největší sílu chemotaxe (Schiffmann a kol. 1975).

1.8. Formyl peptidové receptory (FPRs)

Mezi formyl peptidové receptory se řadí 7 transmembránových receptorů, které jsou exprimovány na fagocytujících leukocytech a patří do skupiny GPCRs (receptory spřažené s G-proteiny). Jsou důležité v imunitní odpovědi a ochraně proti zánětu. Dokážou rozeznat jakékoli formylové peptidy, tj. od jakékoli bakterie a mitochondrie (Ye 2009). Aktivace formylpeptidových receptorů vede k zesílení buněčné migrace, fagocytózy a uvolnění prozánětlivých mediátorů (Le a kol. 2002).

1.8.1. Receptory spřažené s G-proteinem

Jsou tvořené 7 aminokyselinovými řetězci uspořádaných do konformace α -šroubovice. V této formě jsou zabudovány v buněčné membráně. Aminokyselinové podjednotky jsou podle všeho cyklicky uspořádané. Pokud se doprostřed naváže transmitter

nebo agonista, dojde ke změně konformace podjednotek. Tato změna umožní navázání G-proteinu na spodní stranu receptorů. G-protein je složen z dalších 3 podjednotek (Lüllmann a kol. 2001).

1.8.2. Lidské FPRs

Lidské FPRs byly poprvé objeveny a popsány v roce 1976. Všechny receptory mají afinitu k fMLF (fMet- Leu- Phe). Dají se od roku 1990 připravit pomocí klonování (Le a kol. 2002).

U lidí se vyskytují 3 FPRs a to FPR1, FPR2/ALX a FPR3. Receptor FPR2/ALX se také označuje jako FPRL-1 (FPR-like receptor 1) nebo ALXR a receptor FPR3 jako FPRL-2. Při navázání formylovaných peptidů na FPRs dochází k migraci leukocytů viz Obr. 3 (Dufton a Perretti 2010).

1.8.2.1. Stručný popis jednotlivých lidských FPRs

- **FPR1**

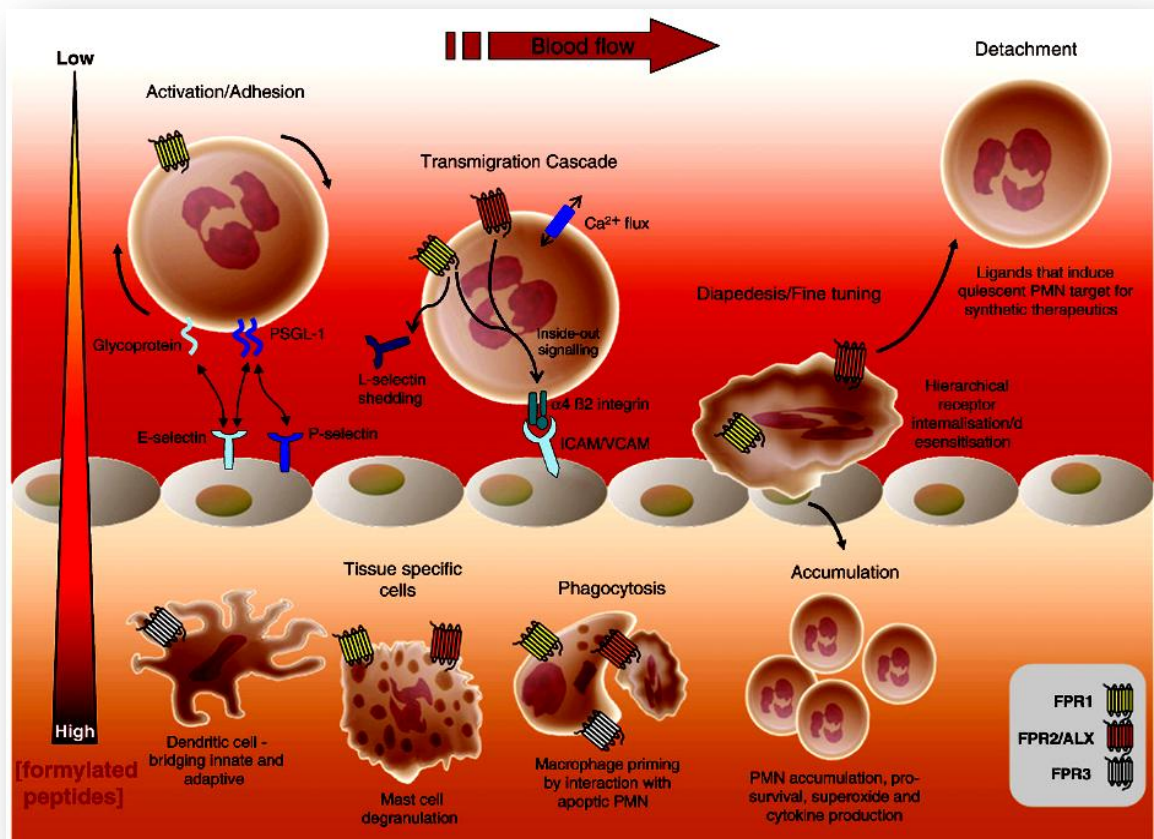
FPR1 je první objevený chemotaktický receptor. Jak už bylo zmíněno, tento receptor váže fMLF. Methionin má záporný náboj a reaguje tedy s kladnými oblastmi receptoru, leucin a phenylalanin interagují s hydrofobními částmi receptoru. Díky odpovědi na fMLF dochází k rychlé mobilizaci Ca^{2+} . Jeho funkce se stává především v imunitní obraně. Byly u něho zjištěny 3 izoformy FPR1-26, FPR1-98 a FPR-G6 (Dufton a Perretti 2010).

- **FPR2/ALX**

Má nízkou afinitu k fMLF asi 1000 krát menší než FPR1. Původně byl tento receptor spojován s ALX, což je lipoxin A4 odvozený od arachidonové kyseliny. Ale brzy se zjistilo, že neváže pouze ALX a fMLF. Jeho exprese závisí jak na prozánětlivých ($TNF\alpha$, PAMPs) tak na protizánětlivých podnětech. S autoimunitními nemocemi (alergie dýchacích cest, artritida nebo Alzheimerova choroba) tvoří nejsilnější vazby. Také se účastní imunitní obrany (Dufton a Perretti 2010).

- **FPR3**

Na rozdíl od FPR1 a FPR2 není exprimován na povrchu neutrofilů, ale nachází se na monocitech, makrofágách a zralých dendritických buňkách. Reaguje na jakékoli formylované peptidy. Jako jediný má vysokou afinitu k endogenním peptidům (Dufton a Perretti 2010).



Obr. 3: Migrace leukocytů a jejich FPRs (Dufton a Perretti 2010).

Pomocí radioaktivního označení fMLF se zjistila jeho přesná vazebná místa (FPRs) na lidských neutrofilech. Navázání tohoto peptidu na FPRs je poměrně rychlé (méně než 2 minuty) a vratné. Na erythrocytech (červených krvinkách) nebyla zjištěna žádná vazebná místa (Williams a Snyderman 1977).

1.8.3. Myší FPRs

U myši se vyskytuje 7 receptorů fpr1, fpr2, fpr-rs3, fpr-rs4, fpr-rs5, fpr-rs6 a fpr-rs7. Myší FRPs jsou vývojově odlišné od ostatních savčích druhů (Dufton a Perretti 2010).

LPS (u myši) dokáže mnohonásobně zvýšit transkripci a stabilizaci mRNA, tím dochází k vyšší expresi genů FPRs na myších neutrofilech a makrofágách. To vyvolá mnohem silnější imunitní odpověď (Mandal a kol. 2005).

1.8.4. Ligandy pro FPRs

1.8.4.1. Agonisté FPRs

- N-formylované peptidy
 - fMLF – synteticky připravitelný tripeptid s původem v *E. coli*, vůbec první

charakterizovaný chemotaktický faktor

- MMWLL- syntetický peptid vázající se hlavně na FPR1
 - Humanin – endogenní peptid vázající FPR2/ALX a FPR3
 - fMMYALF – váže FRP3, ale má velmi nízkou afinitu (Ye a kol. 2009)
- Neformylované peptidy pocházející z mikrobů
 - Hp(2-20) – pochází z *Helicobacter pylori*, přitahuje hlavně monocyty a bazofily, je agonistou pro FPR2/ALX a FPR3
 - Specifické sekvence peptidů kapsidu viru HIV-1 - váží se na FPR1 a FPR2/ALX (Ye a kol. 2009)
 - Hostitelské peptidy
 - SAA – první objevený savčí hostitelský ligand pro FPR2/ALX, chemotaktický faktor pro monocyty, žírné buňky, neutrofile a T lymfocyty
 - LL-37 – peptid uvnitř neutrofilních granul, agonista pro FPR2/ALX
 - ANXA1 – hraje důležitou roli v aktivaci FPR1
 - F2L – aktivuje a váže se na FPR3 (Ye a kol. 2009)
 - Hostitelské nepeptidy
 - LXA4 – vysoká afinita k FPR2/ALX, zastavuje infiltraci neutrofilů (Ye a kol. 2009)

1.8.4.2. Antagonisté FPRs

- Boc1 a Boc2 – antagonisté pro FPR1, Boc2 částečně inhibuje i FPR2
- WRWWWW – vysoce inhibuje FPR2
- Cyklosporin H – cyklický peptid vytvářený houbami, antagonistá pro FPR1
- Spinorphin – endogenní peptid inhibující FPR1
- CHIPS – protein z bakterie *S.aureus*, antagonistá pro FPR1
- Quin-C7 – syntetický nepeptid pro FPR2 (Ye a kol. 2009)

2. Cíle práce

In vivo studium vlivu ukotvených formylmethioninových derivátů na melanom B16-F10.

3. Materiály a metody

3. 1. Chemikálie

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich)
- f-MLF-(G)5-(K)12 (Schafer-N)
- LPS (Sigma-Aldrich)
- f-MLF-(G)5-(K)10-STE (Schafer-N)
- H-MLF-(G)5-(K)10-STE (Schafer-N)

3. 2. Experimentální zvířata a buněčné linie

V pokusech byly použity samice myšního kmene C57BL/6N zakoupené od firmy Charles River Laboratories. Při převzetí vážily okolo 18 – 20 g a byly 8 týdnů staré. Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

Při experimentech byla využívána buněčná linie myšního melanomu B16-F10, která byla darem od prof. Říhové z Mikrobiologického ústavu AV v Praze. Melanomové buňky byly kultivovány v RPMI 1640 obsahujícím 10% fetálního bovinního séra a antibiotika, v termostatu při 37°C, v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

3. 3. Transplantace melanomu B16-F10

3. 3. 1. Příprava buněk

Veškeré médium RPMI s 10% FCS bylo slito a buňky dvakrát promyty PBS. Buňky, které adherovaly, byly krátce opláchnuty trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,5 mM EDTA v PBS). Dále se k buňkám přidalo cca 0,5 ml trypsinizační směsi.

Následovala 1-5 minutová inkubace při 37°C, dokud nedošlo k zakulacení a uvolnění buněk. Následně se k buňkám přidalo 5 ml RPMI s 10% FCS a buňky byly centrifugovány

10 min při 4 °C a přetížení 150g. Dále pak byly dvakrát centrifugačně promyty s RPMI 1640 bez séra za stejných podmínek centrifugace. Promyté buňky byly rozsuspendovány v 5 ml RPMI 1640 a následně spočítány v Bürknerově komůrce (Trypanová modř, 1:1). Konečná koncentrace buněk byla upravena na 4 mil/ml.

3. 3. 2. Aplikace buněk

Všechny myši C57BL/6N byly oholeny na zádech na pravé a levé straně. Druhý den bylo transplantováno do pravé, oholené strany s.c. (pod kůži) 400 000 buněk melanomu B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra do každé myši. Dvanáctý den po transplantaci se začalo s terapií.

3. 4. Měření teploty a objemu nádoru

Měření teplot bylo prováděno pomocí teploměru IR RODENT THERMOMETER 153 IRB (BIOSEB). Byla měřena jak povrchová teplota nádoru, tak pro srovnání i strana druhá v oholených partiích. Čidlo teploměru bylo přiloženo těsně k pokožce myši tak, aby se jí nedotýkalo a hodnota byla odečtena z displeje. Teplota byla měřena zpočátku po 6 hodinách, později obden (během terapie).

Velikost nádorů byla měřena pomocí metody podle Inaba (Inaba a kol. 1986), měřicím zařízením byl kaliper. Následně byl pro výpočet objemu nádoru použit vzorec $V = \pi /6 \cdot A \cdot B^2$, kde A je největší rozměr nádoru a B je nejmenší rozměr nádoru. Velikost byla měřena také obden.

3. 5. Statistické zpracování dat

Statistické vyhodnocení objemů nádorů bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel, vyhodnocení přežívání pak pomocí Kaplan Meier Survival Analysis v programu MedCalc.

3. 6. Pokusy

3. 6. 1. Pokus č. 1: Vliv nábojově vázaného fMLF motivu (samotný i v kombinaci s LPS)

Pokus byl proveden s 36 myšmi C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci melanomových nádorových buněk B16-F10 rozděleny po 6 myších do 6 skupin (A, B, C, D, E, K). Ihned po rozdělení se začalo s terapií aplikací jednotlivých látek podle Tab.I.. Všechny látky sterilizované filtrací byly injikovány intratumorálně po 50 μ l/myš.

Tab. I.: Schéma aplikace látek v 1. pokusu.

<u>SKUPINA</u>	<u>INJIKOVANÁ LÁTKA</u>	<u>PERIODA APLIKACE</u>
A	3 mM f-MLF-(G)5-(K)12 v PBS	6x obden
B	LPS (0,5 mg/ml PBS)	6x obden
C	LPS (10mg/ml PBS)	1x
	pak PBS	5x obden
D	3 mM f-MLF-(G)5-(K)12 v PBS in LPS (0,5mg/ml PBS)	6x obden
E	3mM f-MLF-(G)5-(K)12 v PBS in LPS (10mg/ml PBS)	1x
	pak 3 Mm f-MLF-(G)5-(K)12 v PBS in LPS (0,5mg/ml PBS)	5x obden
K - kontrola	PBS	6x obden

Po první aplikaci byla v čase 0, 6h, 12h, 24h měřena teplota, dále pak každý druhý den. Obden byla též měřena velikost nádoru. Celá terapie trvala 14 dní. Po skončení se sledovalo a zaznamenávalo úmrtí jednotlivých myší.

3. 6. 2. Pokus č. 2: Nádorová terapie pomocí fMLF motivu kotveného prostřednictvím lipofilního řetězce (samotný i s LPS)

V tomto pokusu bylo použito 32 myší C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci melanomových nádorových buněk B16-F10 rozděleny do 4 skupin (A, C, E, K) po 6 myších a do 2 skupin (B, D) po 4 myších. Ihned po rozdělení se začalo s terapií aplikací jednotlivých látek podle Tab. II.. Všechny látky, sterilizované filtrací, byly injikovány intratumorálně po 50 μ l/myš.

Tab. II.: Schéma aplikace látek v 2. pokusu.

<u>SKUPINA</u>	<u>INJIKOVANÁ LÁTKA</u>	<u>PERIODA APLIKACE</u>
A	3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE v PBS	6x obden
B	3mM H-MLF-(G)5-(K)10-STE v PBS	6x obden
C	LPS (0,5 mg/ml PBS)	6x obden
D	LPS (0,5 mg/ml PBS) in 3 mM H-MLF-(G)5-(K)10-STE	6x obden
E	LPS (0,5 mg / ml PBS) in 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE	6x obden
K- kontrola	PBS	6x obden

Po první aplikaci byla v čase 0, 6h, 12h, 24h měřena teplota, dále pak každý druhý den. Obden byla též měřena velikost nádoru. Celá terapie trvala 14 dní. Po skončení se sledovalo a zaznamenávalo úmrtí jednotlivých myši.

3. 6. 3. Pokus č. 3: Ověření možnosti použití nízkých koncentrací fMLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce

Při pokusu bylo použito 36 myši C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci melanomových nádorových buněk B16-F10 rozděleny do 6 skupin (A, B, C, D, E, K) po 6 myších. Ihned po rozdělení se začalo s terapií aplikací jednotlivých látek podle Tab.III.. Všechny sterilizací filtrované roztoky byly injikovány intratumorálně po 50 μ l/myš.

Tab. III.: Schéma aplikace látek v 3. pokusu.

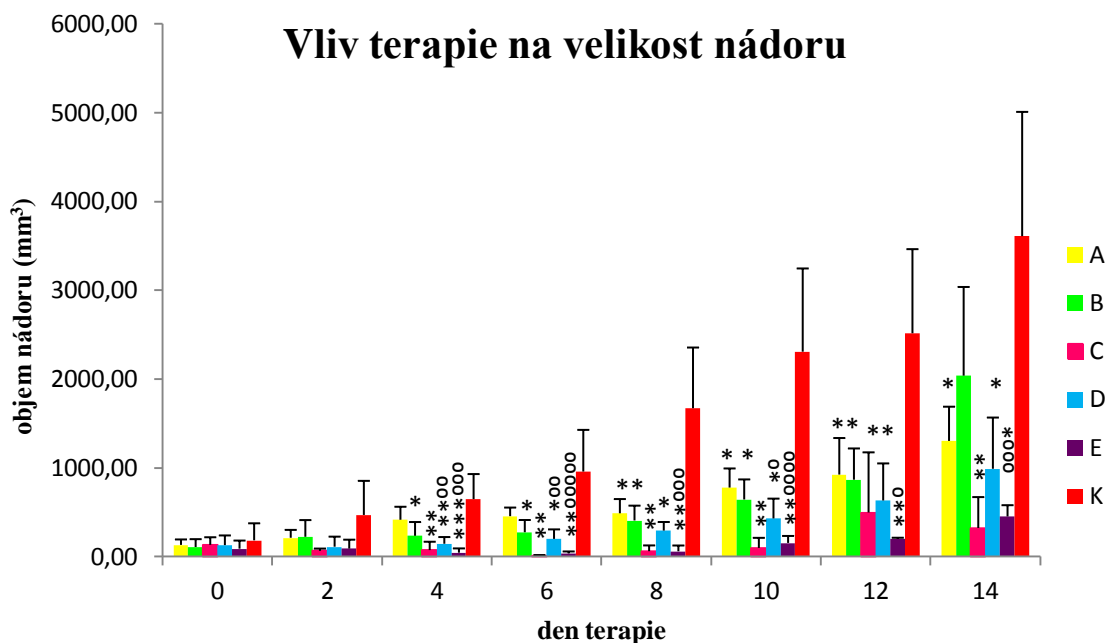
<u>SKUPINA</u>	<u>INJIKOVANÁ LÁTKA</u>	<u>PERIODA APLIKACE</u>
A	3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE v PBS	6x obden
B	LPS (0,5 mg/ml PBS) in 3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE	6x obden
C	LPS (0,5 mg /ml PBS) in 0,3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE,	6x obden
D	0,3 mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE	6x obden
E	LPS (0,5 mg /ml PBS)	6x obden
K	PBS	6x obden

Po první aplikaci byla v čase 0, 6h, 12h, 24h měřena teplota, dále pak každý druhý den. Obden byla též měřena velikost nádoru. Celá terapie trvala 14 dní. Po skončení se sledovalo a zaznamenávalo úmrtí jednotlivých myší.

4. Výsledky

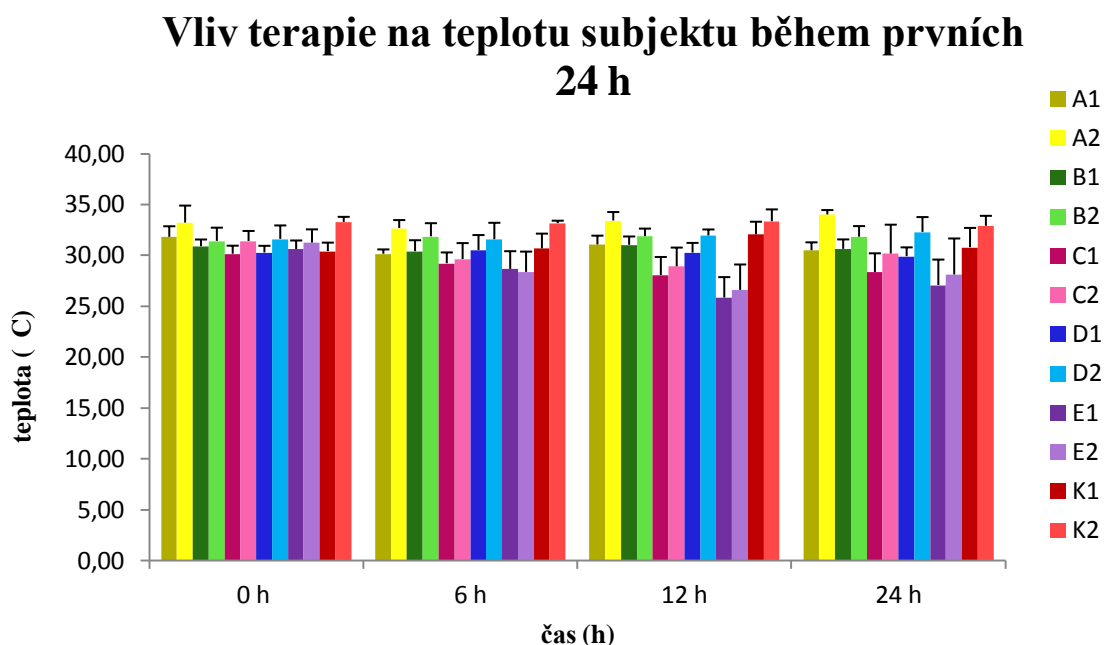
4. 1. Pokus č. 1: Vliv nábojově vázaného fMLF motivu (samotný i v kombinaci s LPS)

Z grafu na Obr. 4 je velmi dobře zřejmé, že všechny aplikované látky měly účinek inhibující růst nádoru. Největší rozdíly ve velikostech oproti kontrole (K) jsou viditelné u skupin C a E, kterým bylo injikováno LPS (10) v první dávce. Derivát formylmethioninu sám způsoboval statisticky významnou redukci nádorového růstu. Jeho směs s LPS (0,5) vykazovala statisticky významné synergické zesílení účinku.



Obr. 4: Vliv terapie na velikost nádoru: skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12, skupina B – léčena LPS (0,5), skupina C – 1x LPS (10) pak 5xPBS , skupina D – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina E – léčena 1x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (10) pak 5x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina K - kontrola
 * = $P \leq 0,05$ ** = $P \leq 0,01$ *** = $P \leq 0,005$ **** = $P \leq 0,001$ **** = $P \leq 0,0005$ - vztaženo k K
 ° = $P \leq 0,05$ °° = $P \leq 0,01$ °°° = $P \leq 0,005$ °°°° = $P \leq 0,001$ °°°°° = $P \leq 0,0005$ - vztaženo k A

Teploty nádorů (1) a těl (2) subjektů se během prvního dne terapie příliš nelišily, viz Obr. 5.

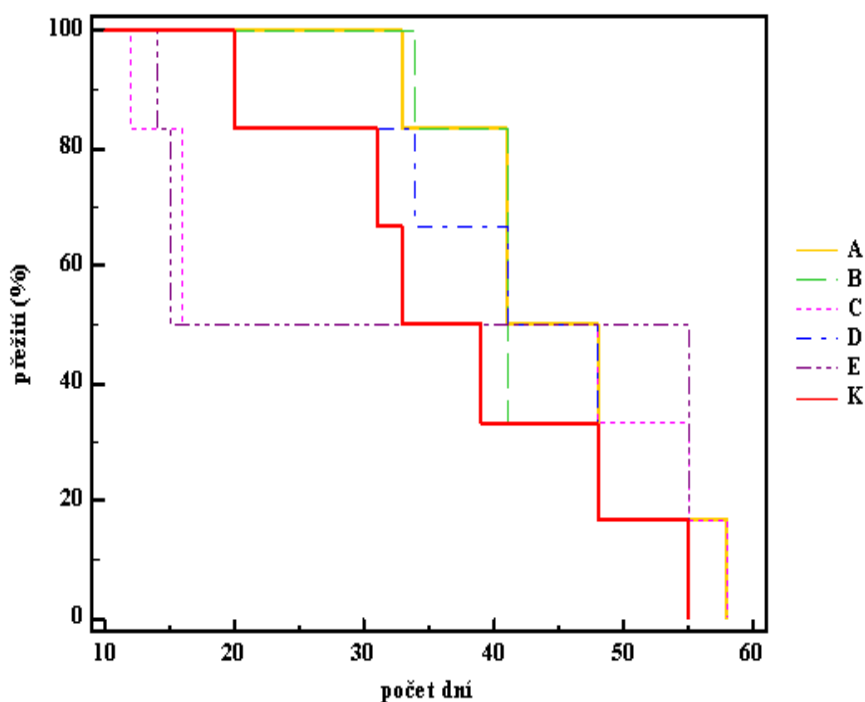


Obr. 5: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvního dne: 1- teplota nádoru, 2- teplota těla: skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12, skupina B – léčena LPS (0,5), skupina C – 1x LPS (10) pak 5xPBS , skupina D – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina E – léčena 1x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (10) pak 5x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina K - kontrola

Teploty (1,2) během dalšího pokračování pokusu velice kolísaly. Skoro u všech skupin byla teplota nádoru (1) nižší než teplota těla viz příloha 8. 1., Obr. 6. Teploty žádným způsobem neodrážely druh a průběh terapie.

Během terapie bylo dosaženo zmenšení velikostí nádorů, ale po jejím ukončení to nemělo výraznější vliv na přežití myši. Grafické znázornění přežití je na Obr. 7. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. Použití vysokých dávek LPS (aplikace roztoku o koncentraci 10 mg/ml – LPS) způsobilo bezprostřední úhyny myši.

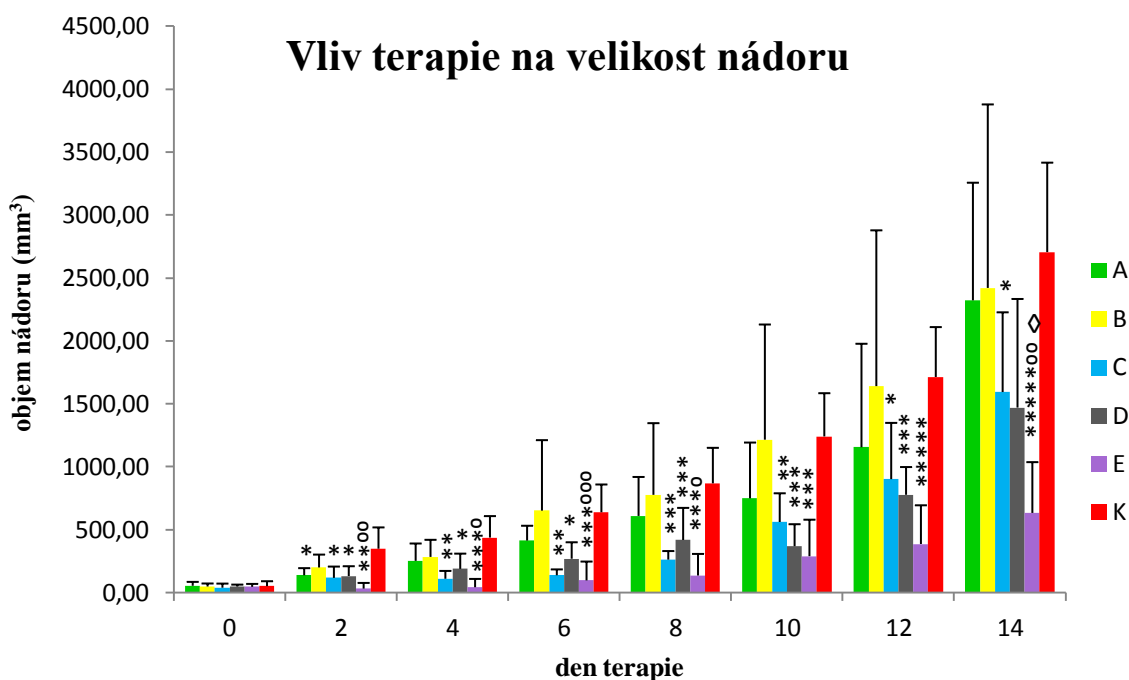
Vliv terapie na přežití



Obr. 7: Vliv terapie na délku přežití: skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12, skupina B – léčena LPS (0,5), skupina C – 1x LPS (10) pak 5xPBS , skupina D – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina E – léčena 1x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (10) pak 5x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina K - kontrola

4. 2. Pokus č. 2: Nádorová terapie pomocí fMLF motivu kotveného prostřednictvím lipofilního řetězce (samotný i s LPS)

Formylmethioninový derivát opatřený alifatickým řetězcem kyseliny stearové působil mírnou, ojediněle statisticky významnou redukcí nádorového růstu. Jeho kombinace s LPS vede k velmi vysoké synergii statisticky významné vůči formylmethioninovému derivátu i samotnému LPS. Analog formylmethioninového derivátu, který však formylovou skupinu neobsahoval, nezpůsobil sám žádnou redukcí nádorového růstu a ani jeho kombinace s LPS nevykazovala žádné rysy aktivity či synergie. Vliv terapie na velikost nádoru je zobrazen na Obr. 8.

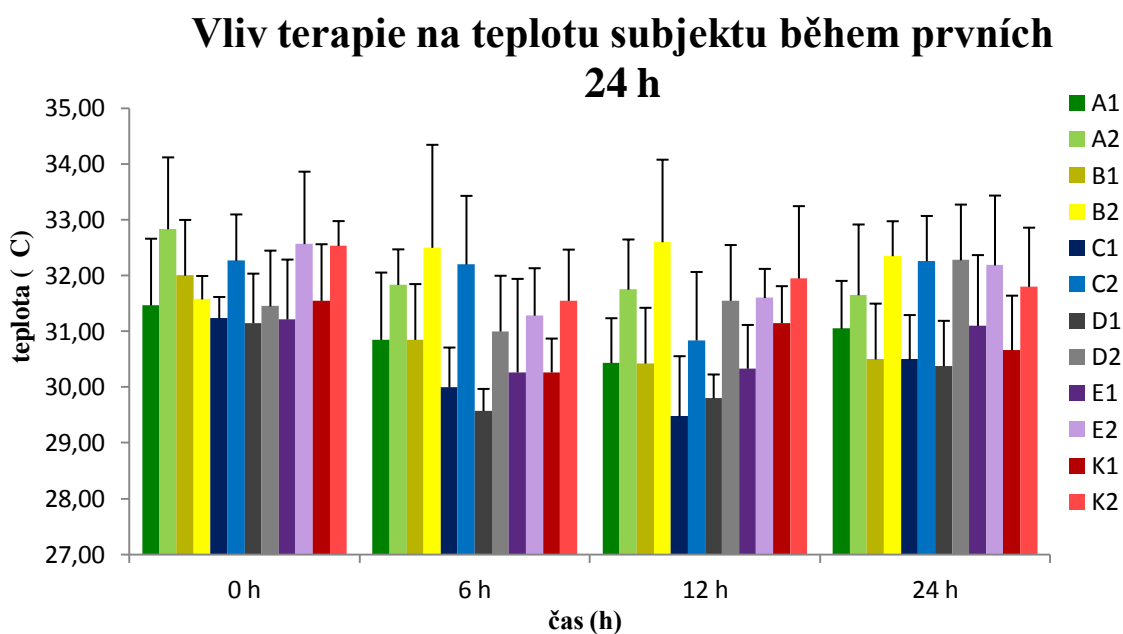


Obr. 8: Vliv terapie na velikost nádoru: skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5), skupina D – léčena LPS (0,5) in H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5) in f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina K - kontrola
 * = $P \leq 0,05$ ** = $P \leq 0,01$ *** = $P \leq 0,005$ **** = $P \leq 0,001$ ***** = $P \leq 0,0005$ - vztaženo k K
 ° = $P \leq 0,05$ °° = $P \leq 0,01$ °°° = $P \leq 0,005$ - vztaženo k A ◇ = $P \leq 0,05$ - vztaženo k C

Teploty po první aplikaci se velmi měnily. Byly naměřené i značné rozdíly mezi teplotami těla (1) a nádoru (2) viz Obr. 9.

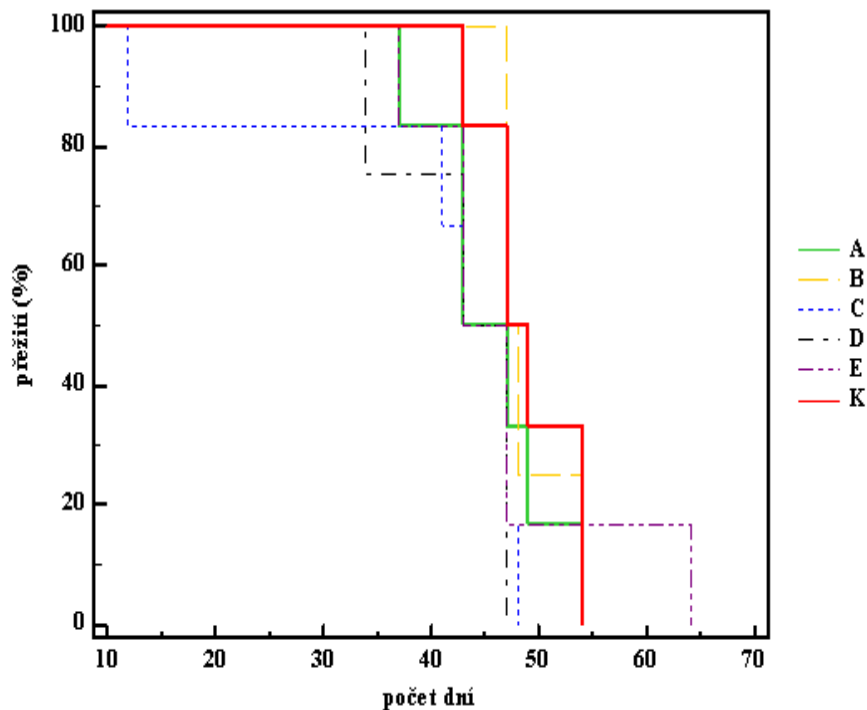
Během celé terapie teploty fluktovaly. Až na skupinu B v 0h a 4. dni byla teplota nádoru vždy menší než teplota těla (příloha 8. 2., Obr. 10). Celkově opět možno konstatovat nezávislost průběhu terapie na typu a výsledcích jednotlivých terapií.

Terapie neměla tak dobrý vliv na přežívání (Obr. 11). Kontrolní skupinu přežily pouze některé myši ze skupiny E, což výsledkům redukce nádorového růstu odpovídá, nicméně tento rozdíl v přežití nebyl statisticky významný.



Obr. 9: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvního dne: 1- teplota nádoru, 2- teplota těla, skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5), skupina D – léčena LPS (0,5) in H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5) in f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina K – kontrola

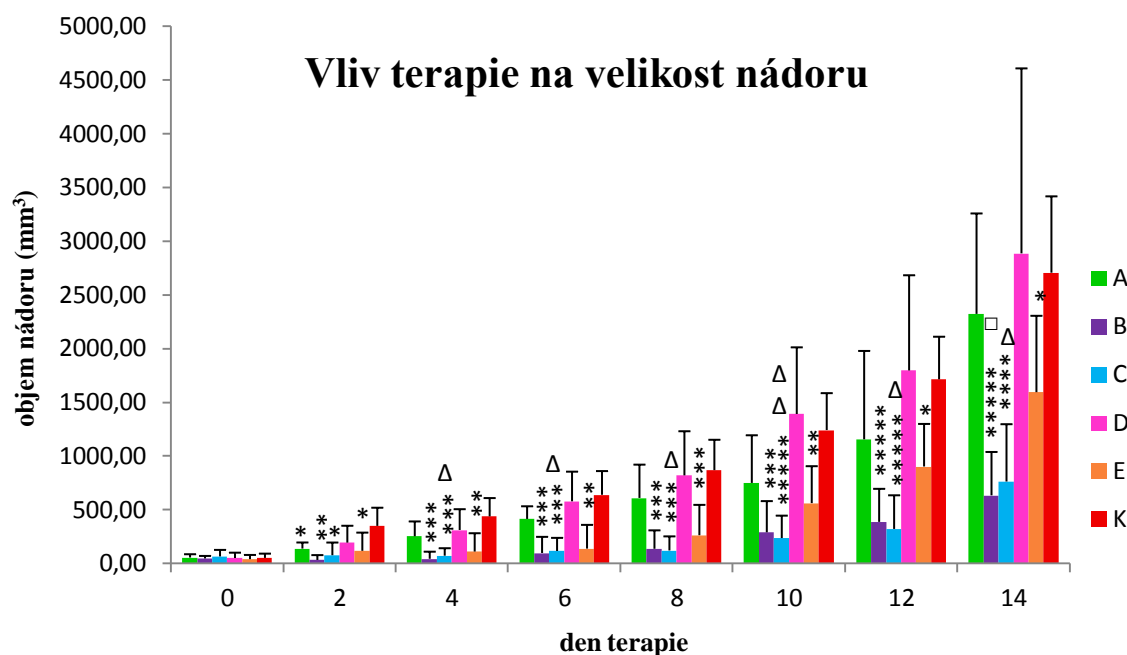
Vliv terapie na přežití



Obr. 11: Vliv terapie na délku přežití: skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5), skupina D – léčena LPS (0,5) in H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5) in f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina K - kontrola

4. 3. Pokus č. 3: Ověření možnosti použití nízkých koncentrací fMLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce

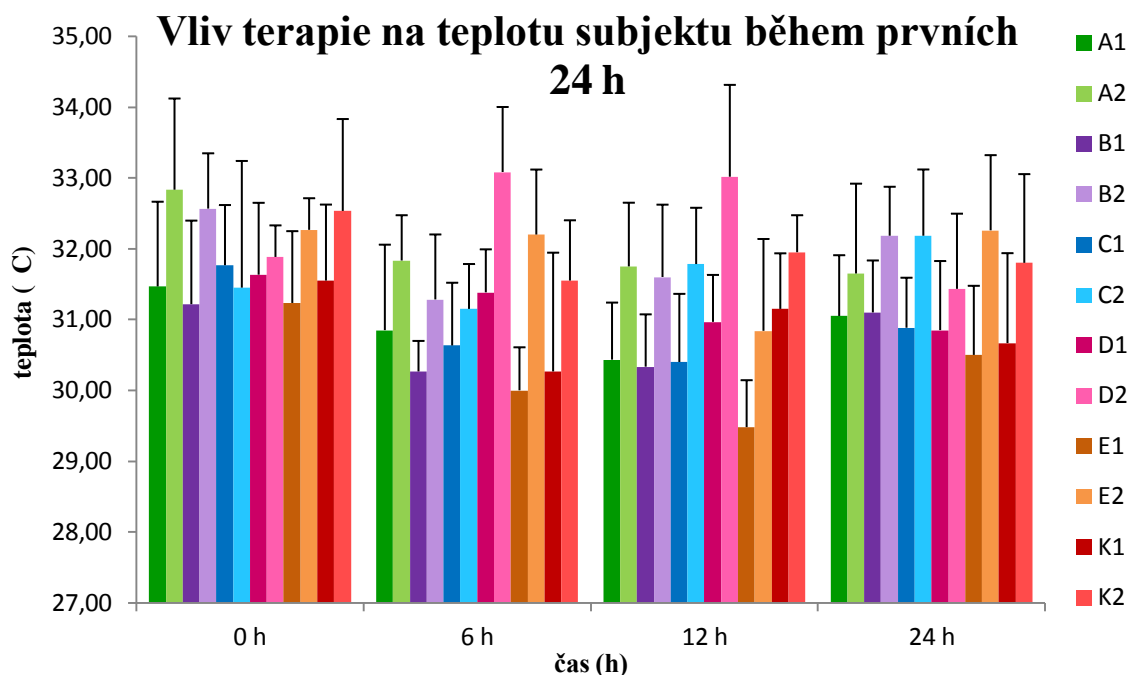
Jak vyplývá z Obr. 12, použití 10x zředěného formylmethioninového derivátu kotveného řetězcem kyseliny stearové nádorový růst vůbec neovlivnilo. Přesto v kombinaci s LPS bylo dosaženo stejně vysokého synergického účinku jako při použití nezředěného derivátu.



Obr. 12: Vliv terapie na velikost nádoru: A – léčena 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena LPS (0,5) in 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5) in 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina D – léčena 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5), skupina K - kontrola
 * = $P \leq 0,05$ ** = $P \leq 0,01$ *** = $P \leq 0,005$ **** = $P \leq 0,001$ ***** = $P \leq 0,0005$ - vztaženo k K
 ° = $P \leq 0,05$ °° = $P \leq 0,01$ °°° = $P \leq 0,005$ - vztaženo k A □ = $P \leq 0,05$ - vztaženo k E
 Δ = $P \leq 0,05$ ΔΔ = $P \leq 0,01$ – vztaženo D

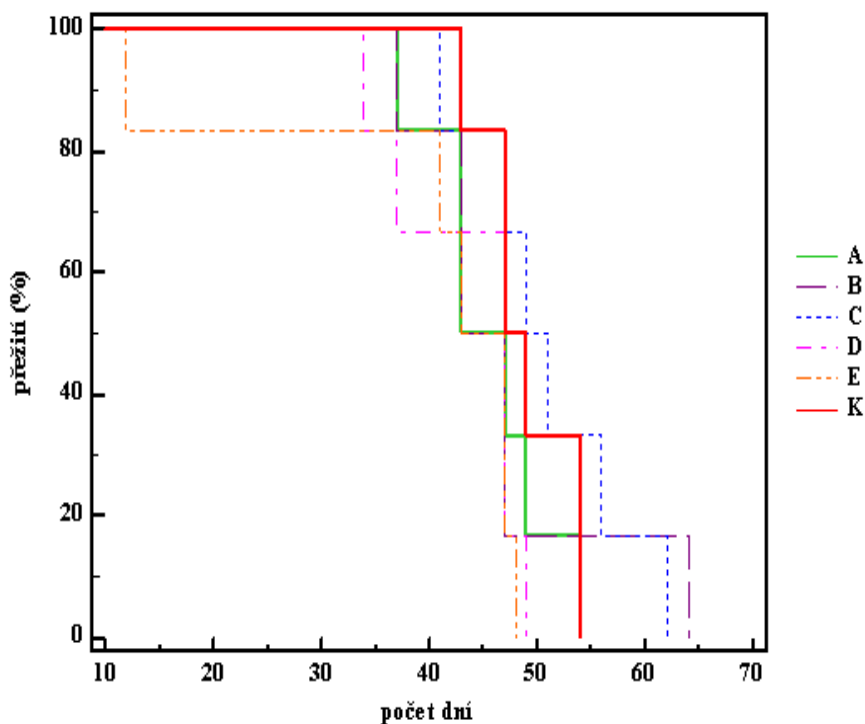
Teploty během prvního dne kolísaly, největší rozdíly mezi hodnotami teplot byly zaznamenány u skupiny E (Obr. 13). Teploty během celé terapie se velmi měnily. Nejmenších hodnot dosáhly skupiny C a D. Teplota nádorů (1) byla většinou nižší než teplota těla (2) viz příloha 8. 3. Obr. 14. Celkově opět měření teplot žádným způsobem jednotlivé terapie neodráželo.

Vliv terapie na přežití myší nebyl moc dobrý. Pouze skupiny C a B dosáhly lepších výsledků přežívání oproti kontrole, což sice koreluje s redukcí nádorových objemů, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. (Obr. 15).



Obr. 13: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvního dne: 1- teplota nádoru, 2- teplota těla, A – léčena 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena LPS (0,5) in 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5) in 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina D – léčena 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5), skupina K - kontrola

Vliv terapie na přežití



Obr. 15: Vliv terapie na délku přežití: A – léčena 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena LPS (0,5) in 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5) in 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina D – léčena 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5), skupina K - kontrola

5. Diskuze

Samotný f-MLF je silným chemotaktickým faktorem (Schiffmann 1975). Jeho i.t. aplikace se však ukázala neúčinná, neovlivňovala nádorový růst. Ani v kombinaci s LPS nedošlo k aditivě ani synergii (data neukázána). Rozhodli jsme se proto f-MLF motiv kotvit k nádorovým buňkám, protože jeho receptory, formylpeptidové receptory, patří do skupiny fagocytárních receptorů a ty pro dobrou aktivaci vyžadují přítomnost vázaných, nesolubilních ligandů (Underhill a Gantner 2004).

Nejprve jsme vyzkoušeli kotvení pomocí kladného náboje. Ten za fyziologického pH byl dán přítomností oligolysinu (12K). Nádorové buňky jsou nabity záporně, což je dáno přítomností sialové kyseliny a fosfatidylserinu (Marquez a kol. 2004). Bylo dosaženo statisticky významné redukce nádorového růstu. Redukce nádorového růstu se velmi výrazně prohloubila kombinací s LPS. To plně odpovídá poznatkům Mandala a kol. (2005), popisujícím výraznou stimulaci exprese FPR1 makrofágů a neutrofilů v důsledku působení LPS. V širších souvislostech působení LPS podporuje názor Underhilla a Gantnera (2004), kteří zdůrazňují nutnost spolupráce signálních receptorů aktivovaných solubilními agonisty a fagocytárními receptory, aktivovanými kontaktem s imobilizovanými ligandy (většinou na povrchu mikroorganismu).

Výše uvedené poznatky byly dále podpořeny použitím formylmethioninového derivátu, který navíc obsahoval alifatický nepolární řetězec kyseliny stearové, tedy obecný princip kotvení do membrány. Byla dosažena ještě výraznější synergie s LPS. Desetinásobné snížení koncentrace tohoto ligandu neovlivnilo mohutnou synergii s LPS. Kontrolní skupiny s H-MLF motivem potvrdily, že základem těchto pozorování je skutečně specifická stimulace FPR receptorů.

Použití jednorázové vysoké dávky LPS sice vyvolalo silnou redukci nádorového růstu, ať už byl použit samotný, nebo s formylmethioninovým derivátem, ale jeho použití bylo spojeno s bezprostředním úhynem poloviny zvířat ve skupinách. LPS při těchto koncentracích vykazuje přímou cytotoxicitu (Glaserová, *in prep.*).

Přestože jsme aplikací zejména kombinace signálních a vázajících se fagocytárních motivů dosáhli značné redukce nádorového růstu, bylo sice dosaženo určitého prodloužení života u těchto myší, ale nebylo statisticky významné. K tomu je třeba dosáhnout úplné eliminace nádorových buněk. Toho již bylo byt' s nízkou frekvencí dosaženo v jiných experimentech založených na kombinaci signálních a fagocytárních motivů (Auerová,

Bruzlová, Fáberová, Waldmannová, *in prep.*). Cesta je především v optimalizaci dávek, ale především časového režimu jejich podávání (Ženka, *ústní sdělení*).

Měření teploty nádoru a myši se ukázalo jako nevhodné pro monitorování tohoto druhu terapie.

6. Souhrn

- Bylo zjištěno, že kotvením formylmethioninových derivátů na stěnu nádorových buněk lze *in vivo* dosáhnout redukce růstu melanomů.
- Tato redukce je specifická a závislá na přítomnosti formylmethioninu.
- Kombinace formylmethioninových derivátů s LPS vede k mohutné synergii v potlačení nádorového růstu, kterou pozitivně ovlivňuje kvalita kotvení těchto derivátů.
- Měření teploty nádoru nebo myši není vhodné pro monitorování tohoto druhu terapie.

7. Literatura

- **Abrahámová J., Povýšil C., Dušek L. a kol.**, Nádory varlat. Grada Publishing. a. s.. 2008, 307s.
- **Ajmanová J., Daňková Š., Kamberská Z.**, Zhoubný novotvar ledviny mimo pánvičku ČR. Ústav zdravotnických informací a statistiky České Republiky. 2004, 1: 1–6.
- **Aswanikumar S., Schiffmann E., Corcoran B. A., Wahlo S. M.**, Role of a peptidase in phagocyte chemotaxis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1976, 73(7): 2439 – 2442.
- **Becker H. D., Hohenberger W., Schlag P. M. a kol.**, Chirurgická onkologie. Grada Publishing. a. s.. 2005, 854s.
- **Bednář B.**, Patologie: učebnice pro lékařské fakulty. Avicenum. 1982, 682s.
- **Brychtová S., Hlobilková A.**, Histopatologický atlas. Grada Publishing. a. s.. 2008, 112s.
- **Clarke R. J., Macrea R.**, Coffe: Volume 3 Physiology. Elsevier applied science publishers LTD. 1988, 388s.
- **Cui Z., Willingham M. C., Hicks A. M., Alexander-Miller M. A., Howard T. D., Hawkins G. A., Miller M. S., Weir H. M., Du W., DeLong C. J.**, Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003, 100(11): 6682–6687.
- **Dufton N., Perretti M.**, Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl - peptide receptor agonists. Pharmacology & Therapeutics. 2010, 127:175–188.
- **Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D.**, The Immunobiology Review of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting . Immunity. 2004, 21: 137–148.
- **Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y. a kol.**, Imunitní systém: informace pro každého. Grada Publishing a.s.. 2005, 236s.
- **Hatina J.**, Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část I – interakce nádoru a imunitního systému. Klinická onkologie. 2005, 18: 119 – 125.
- **Hicks A. M., Riedlinger G., Willingham M.C., Alexander-Miller M.A., 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.**, Transferable anticancer innate immunity inspontaneous

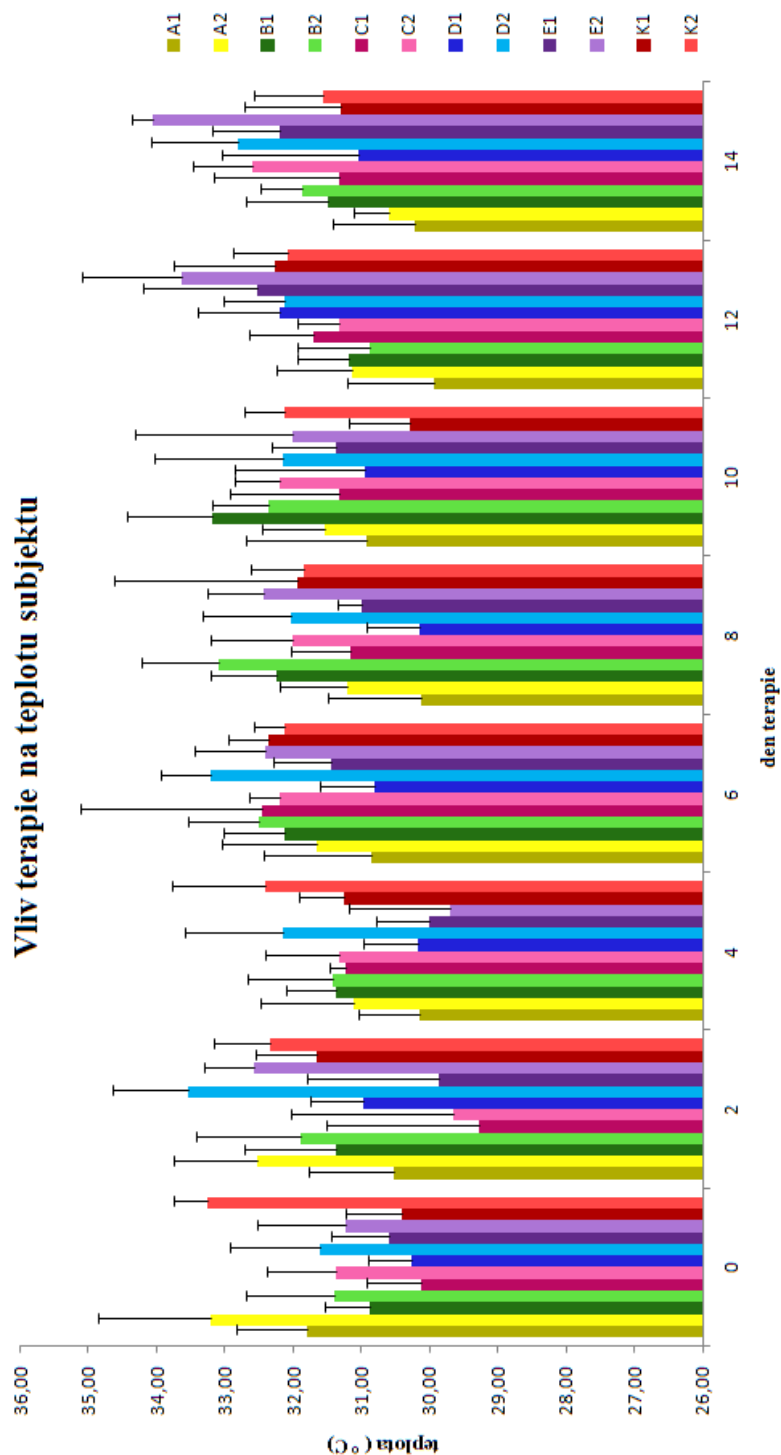
regression_complete resistance mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006, 103(20): 7753 – 7758.

- **Hořejší V., Bartůňková J.,** Základy imunologie. Triton. 2009, 307s.
- **Inaba M., Tashiro T., Kobayashi T., Fujimoto S., Sakurai Y., Maruo K., Ohnishi Y., Ueyama Y., Nomura T.,** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. Japanese Journal of Cancer Research. 1986, 77(2): 190-196.
- **Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D.,** Global cancer statistics. A Cancer Journal for Clinicians. 2011, 61: 69–90.
- **Jurga E. a kol.,** Klinická onkológia a rádioterapia. Slovak Academic Press. 2000, 1030s.
- **Klener P. a kol.,** Základy vnitřního lékařství pro bakalářské studium. Karolium. 1996, 170s.
- **Klener P., Klener P.jr.,** Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Grada Publishing. a. s.. 2010, 209s.
- **Krejsek J., Kopecký O.,** Klinická imunologie. Nucleus HK. 2004, 941 s.
- **Le Y., Murphy P. M., Wang J. M.,** Formyl-peptide receptors revisited. Trends in Immunology. 2002, 23(11): 541-548.
- **Le Y., Yang Y., Cui Y., Yazawa H., Gong W., Qiu C., Wang J. M.,** Receptors for chemotactic formylpeptides as pharmacological targets. International Immunopharmacology. 2002, 2: 1-13.
- **Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A. a kol.,** Barevný atlas farmakologie. Grada Publishing. a. s.. 2001, 382s.
- **Mandal P., Novotny M., Hamilton T. A.,** Lipopolysaccharide Induces Formyl Peptide Receptor 1 Gene Expression in Macrophages and Neutrophils via Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. The American Association Immunologists. 2005, 175: 6085-6091.
- **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: 1347-1352.
- **Medzhitov R.,** Toll like receptors and innate immunity. Nature. 2001, 1: 135 - 145.
- **Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M.,** Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal

- malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*. 2002, 70: 791-798.
- **Pacovský V.**, *Vnitřní lékařství – učebnice pro střední zdravotnické školy*. Osvěta, 1993, 343s.
 - **Showell H.J., Freer R.J., Zigmond S.H., Schiffmann E., Aswanikumar S., Corcoran B., Becker E.L.**, The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*. 1976, 143: 1154 – 1169.
 - **Schiffmann E., Corcoran B. A., Wahl S. M.**, N-Formylmethionyl Peptides as Chemoattractants for Leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975, 72(3): 1059-1062.
 - **Srb T.**, Zhoubné nádory v roce 2009. Ústav zdravotnických informací a statistiky České Republiky. 2012, 2: 1-10.
 - **Underhill D. M., Gantner B.**, Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*. 2004, 6: 1368-1373.
 - **Williams L. T., Snyderman R., Pickett M. C., Lefkowitz R. J.**, Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977, 74(3): 1204-1208.
 - **Ye R. D., Boulay F., Wang J. M., Dahlgren C., Gerard C., Parmentier M., Serhan Ch. N., Murphy P. M.**, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*. 2009, 61: 119-161.
 - **Zámečník J.**, *Nemocný se zhoubným nádorem*. Jihočeská Univerzita. 2002, 63s.
 - **Žaloudík J.**, *Vyhněte se rakovině aneb prevence zhoubných nádorů pro každého*. Grada Publishing. a. s.. 2008, 189s.

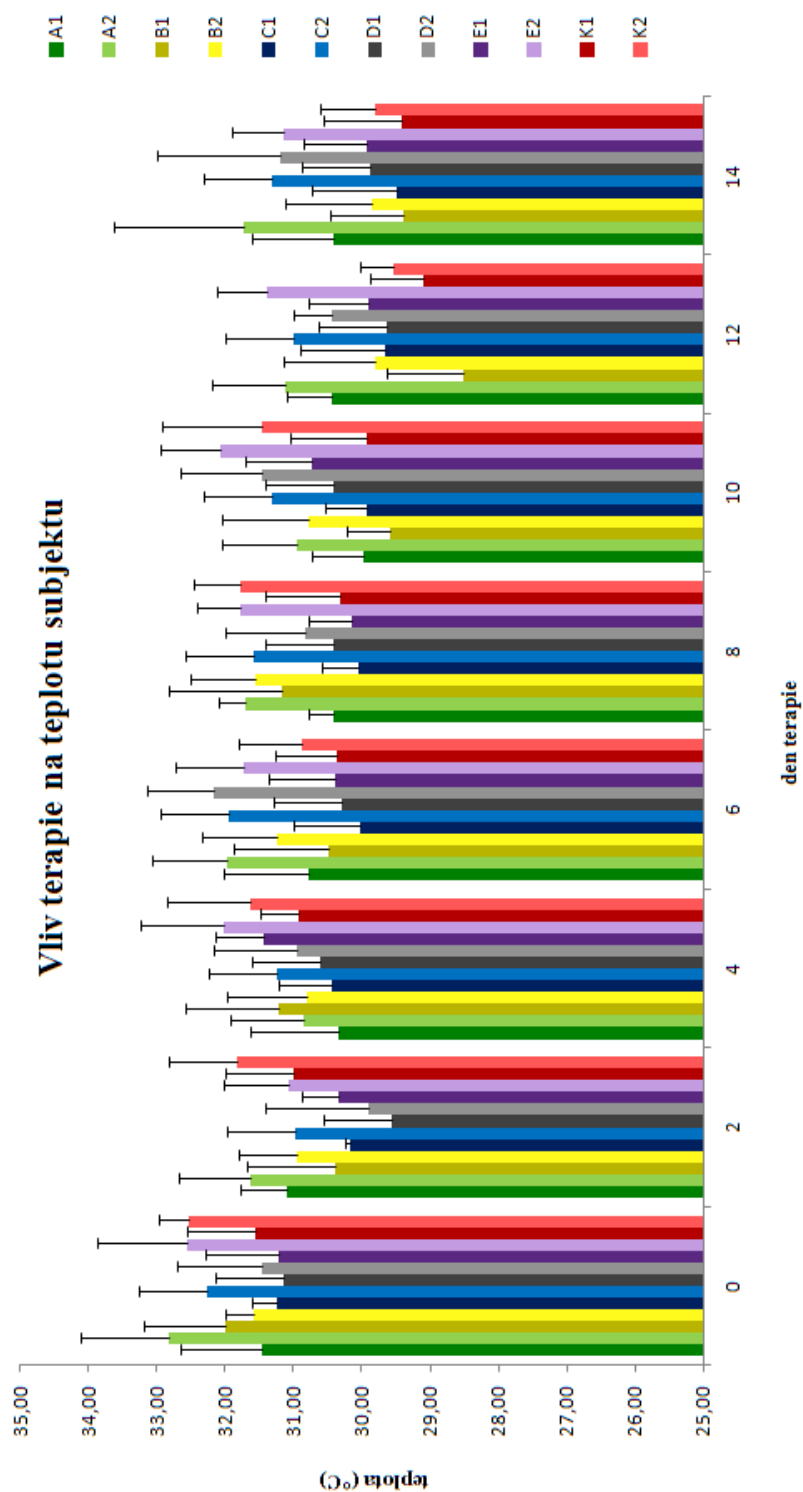
8. Přílohy

8. 1. Pokus č. 1: Graf závislosti teploty na průběhu terapie



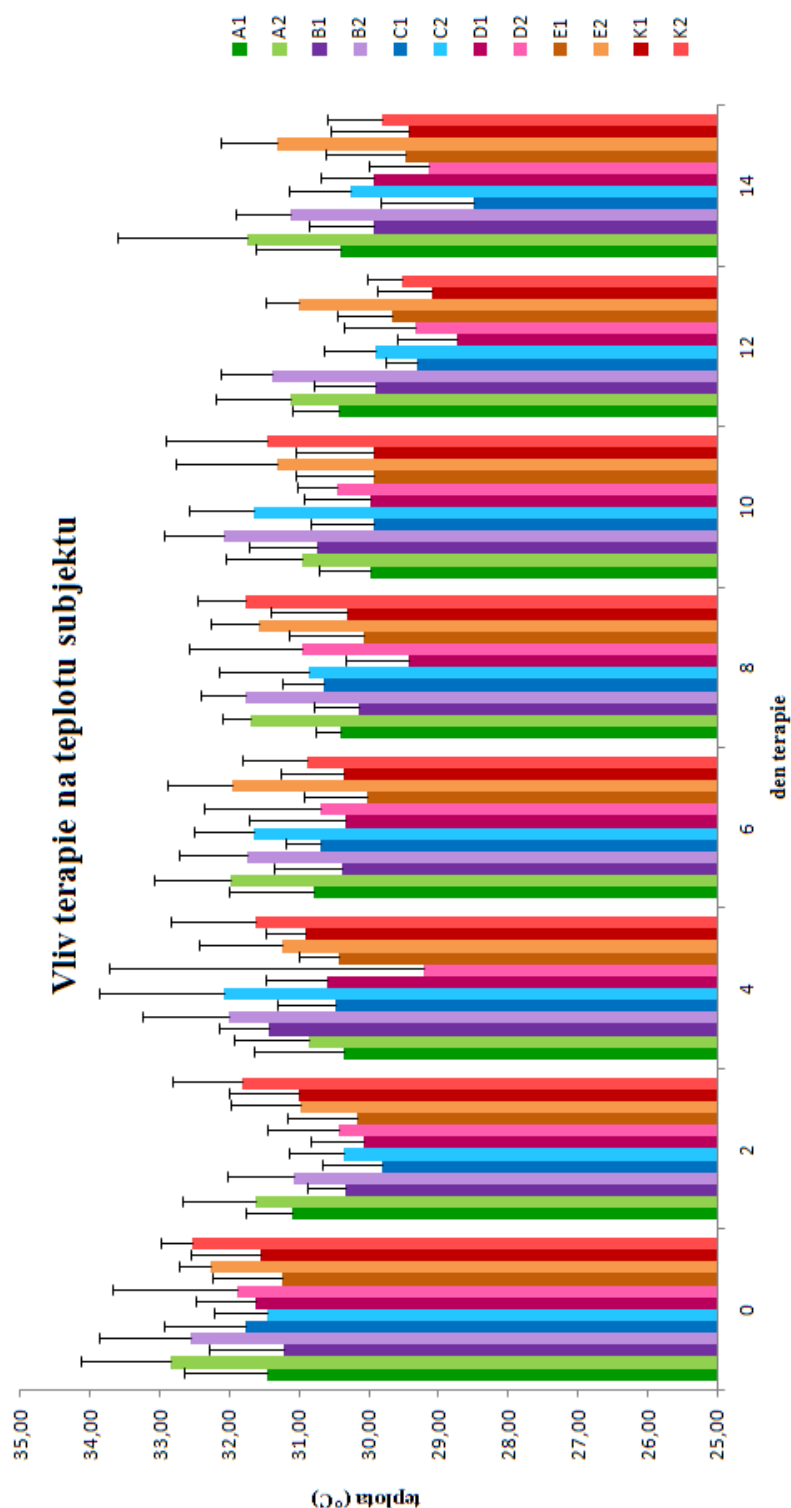
Obr. 6: Vliv terapie na teplotu subjektu: 1- teplota nádoru, 2- teplota těla: skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12, skupina B – léčena LPS (0,5), skupina C – 1x LPS (10) pak 5xPBS , skupina D – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina E – léčena 1x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (10) pak 5x f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5), skupina K - kontrola

8. 2. Pokus č. 2: Graf závislosti teploty na průběhu terapie



Obr. 10: Vliv terapie na teplotu subjektu: 1- teplota nádoru, 2- teplota těla, skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5), skupina D – léčena LPS (0,5) in H-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5) in f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina K – kontrola

8.3. Pokus č. 3: Graf závislosti teploty na průběhu terapie



Obr. 14: Vliv terapie na teplotu subjektu: 1- teplota nádoru, 2- teplota těla, skupina A – léčena 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina B – léčena LPS (0,5) in 3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina C – LPS (0,5) in 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina D – léčena 0,3mM f-MLF-(G)5-(K)10-STE, skupina E – léčena LPS (0,5) skupina K - kontrola