

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí
bakterií *Stenotrophomonas maltophilia***

Bakalářská práce

Julie Fáberová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Fáberová, J., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*. [Verification of the possibility of cancer therapy using bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. Bc. Thesis, in Czech.]-48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

We studied therapeutical effect of intratumoral injections of *Stenotrophomonas maltophilia* on melanoma B16-F10 bearing mice alone or in combination with another immunostimulatory compounds. Tumor size, temperature, serum level of CRP and survival were monitored.

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.

České Budějovice, 28. 4. 2012

.....
Julie Fáberová

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi za výborné vedení mé bakalářské práce, za jeho velkou trpělivost a ochotu kdykoliv a s čímkoliv mi pomoci a za cenné rady a připomínky nejen při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí, jmenovitě bych pak ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Salátovi, Ph.D. za jeho pomoc při vyhodnocování myšího CRP a RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za pomoc při kultivaci bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*. Mé poděkování patří také rodině, která mě podporovala a vytvořila mi dobré zázemí pro studium, a také mým přátelům a známým.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Rakovina (nádorová onemocnění)	1
1.1.1 Vznik nádoru.....	1
1.1.2 Rozdělení nádorů	2
1.1.3 Výskyt nádorů.....	2
1.2 Melanom.....	3
1.2.1 Vznik melanomu	3
1.2.2 Hlavní druhy melanomu	4
1.2.3 Klinické projevy melanomu.....	5
1.2.4 Melanom u myší.....	5
1.2.5 Melanom B16-F10	5
1.3 Terapie nádorů	6
1.3.1 Chirurgická terapie nádorů	6
1.3.2 Radioterapie	6
1.3.3 Chemoterapie	7
1.3.4 Biologická terapie	8
1.4 Imunologie nádorů	9
1.4.1 Únik nádorů před imunitním systémem	10
1.5 Imunoterapie	11
1.5.1 Imunoterapie zprostředkovaná monoklonálními protilátkami.....	11
1.5.2 Imunoterapie založená na komplementu	12
1.5.3 Imunoterapie pomocí buněčných mechanismů.....	12

1.6 Imunoterapie založená na vrozené imunitě	13
1.6.1 Uplatnění vrozené imunity – fagocytóza.....	14
1.6.2 Uplatnění vrozené imunity – cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC reakce).....	15
1.6.3 Nádorové onemocnění a vrozené imunita	16
1.7 Nádorová terapie založená na použití bakterií.....	17
1.7.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
1.8 Nádorová terapie s použitím beta glukanu	18
1.9 Nádorová terapie s použitím kladně nabitých molekul.....	18
2. Cíle práce.....	19
3. Materiál a metody	20
3.1 Chemikálie	20
3.2 Experimentální zvířata	20
3.3 Buněčná linie	20
3.3.1 Příprava buněk myšního melanomu B16-F10 pro <i>in vivo</i> použití	20
3.4 Transplantace nádorových buněk B16-F10.....	21
3.5 Perorální aplikace beta glukanu	21
3.6 Příprava <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> pro injikování do nádoru.....	21
3.7 Měření velikosti nádoru.....	21
3.8 Měření teploty nádoru	22
3.9 Vyhodnocení počtu metastází.....	22
3.10 Stanovení množství CRP v myším séru	22
3.11 Statistické vyhodnocení dat	23

3.12 Pokus č. 1: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	23
3.13 Pokus č. 2: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a perorálním podáváním beta glukanu	24
3.14 Pokus č. 3: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a PalKGGK	25
4. Výsledky	27
4.1 Pokus č. 1: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	27
4.2 Pokus č. 2: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a perorálním podáváním beta glukanu	32
4.3 Pokus č. 3: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a PalKGGK	34
5. Diskuse	37
6. Závěr	40
7. Seznam literatury	41
8. Přílohy	46
8.1 Příloha 1: Grafické znázornění naměřených průměrných povrchových teplot nádoru (P) a průměrných teplot kontrolního bodu na druhém boku (L) – pokus č. 1 (Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	46
8.2 Příloha 2: Grafické znázornění naměřených průměrných povrchových teplot nádoru (P) a průměrných teplot kontrolního bodu na druhém boku (L) – pokus č. 2 (Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a beta glukanu)	47
8.3 Příloha 3: Grafické znázornění naměřených průměrných povrchových teplot nádoru (P) a průměrných teplot kontrolního bodu na druhém boku (L) – pokus č. 3 (Přirozeně	

metastázující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a PalKGGK)	48
---	----

1. Úvod

1.1 Rakovina (nádorová onemocnění)

Rakovina je poruchou buněk, které se většinou vyskytují jako tumor, viditelný tumor je výsledkem mnoha různých změn, které se mohou vyvíjet mnoho let (Franks a Teich 1999).

I když se povědomí o rakovině zvýšilo až v moderní době, rakovina není novým onemocněním. Maligní onemocnění byly popsány na obrazech a v dokumentech mnoha starověkých civilizací, rakovina kosti (osteosarkom) byla diagnostikována u Egyptské mumie (Tannock a kol. 2005).

1.1.1 Vznik nádoru

Pro děj, který vede ke vzniku nádoru, se používá označení kancerogeneze. Kancerogeneze je vícestupňový proces. Působení látek, které rakovinu způsobují – kancerogenů – nemusí vést vždy ke vzniku nádoru (Franks a Teich 1999).

Kancerogeneze je třístupňový proces zahrnující iniciační, promoční a progresivní fázi. Iniciace, první fáze vzniku nádoru, je velmi rychlá. Nejpravděpodobnější místo pro iniciaci je DNA, ale mohou být poškozeny i jiné oblasti buňky. Kancerogen poškodí specifické geny kmenové buňky určité tkáně, dojde tak k nezvratné změně v genomu. Druhá fáze je nazývána promoční. Iniciované buňky zůstávají latentní, dokud na ně nepůsobí promoční látka (chemikálie, růstové faktory). Promoční látka není kancerogenní látkou, ale podporuje iniciované buňky v dělení. Některé promoční faktory souvisí s diferenciací buněk, kdy buňky přechází z dělicích se buněk na buňky s určitou funkcí, které se většinou nedělí. Třetí fáze je progresivní. Pro progresi je charakteristické získávání maligních fenotypových změn, jako jsou invazivita, metastazování, snaha o autonomní růst a často zvýšená nestabilita karyotypu. Faktory progresu nejsou dobře definované a mohou být odlišné od faktorů, které byly zahrnuty v iniciaci a promoci (Pusztai a kol. 1996, Franks a Teich 1999).

Kancerogeny můžeme rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Také různé viry mohou způsobovat rakovinotvorné onemocnění - Papillomavirus byl objeven v 90 % případů rakoviny děložního čípku (Franks a Teich 1999).

1.1.2 Rozdělení nádorů

Primárně můžeme nádory rozdělit na maligní a benigní. Maligní nádory jsou nádory, které invadují okolní tkáň, metastazují a vykazují buněčné abnormality (dyskaryosa). Invazivita se projevuje tak, že nádorové buňky napadají okolní buňky, ničí a nahrazují. Metastazování je proces, kdy nádorové buňky se dostávají krví či lymfou do dalších částí těla a jsou tak základem pro další, sekundární nádory, tzv. metastáze. Benigní nádory neinvadují okolní tkáň, jsou obvykle oddělené pomocí kapsule z pojivové tkáně. Mohou způsobovat problémy, pokud dosáhnou určité velikosti, pak mohou tláčit na okolní tkáň, ale nemetastazují (Franks a Teich 1999).

Dalším dělením nádorů je rozdělení podle tkání, ve kterých se nádory vyskytují. Benigní nádory epiteliálních tkání se nazývají adenomy a papilomy, maligní nádory pak karcinomy. Benigní nádory mesenchymu (pojivové tkáň) jsou pojmenovány podle výskytu v jednotlivých pojivových tkáních například: osteomy – nádory kosti, angiomy – nádory krevních cév, fibromy – nádory vazivové tkáň. Maligní nádory mesenchymu označujeme jako sarkomy. Leukemie a lymfomy jsou nádory retikuloendoteliárního systému. Mezi benigní nádory nervové soustavy řadíme meningiomy a neurofibromy, mezi malignity pak patří neuroblastomy a retinoblastomy. Další skupinou jsou nádory zárodečných tkání (benigní teratomy, maligní seminom, embryonální karcinom). Nádory ostatních tkání jsou poslední, méně četnou skupinou (Franks a Teich 1999).

1.1.3 Výskyt nádorů

Nádory se vyskytují v různých tkáních organismů. V posledních letech je výskyt nádorů stále vyšší.

V roce 2009 bylo oznámeno v České republice 78 846 nových případů zhoubných nádorů, 40 903 případů u mužů a 37 943 případů u žen. Trend výskytu zhoubných nádorů se u mužů oproti roku 2008 zvedl o 4 % a u žen klesl o 1 %. Od roku 1976 do roku 2009 bylo v České republice ohlášeno celkem 1 783 009 novotvarů. Z dlouhodobého pohledu výskyt novotvarů v České republice roste, naopak množství úmrtí na zhoubné nádory klesá. Výskyt nádorů je převážně ve starším věku, ale výskyt je různý také vzhledem k pohlaví (Srb 2012).

1.2 Melanom

Melanom je neuroektodermální nádor, který vzniká z melanocytů a může vzniknout v jakékoliv tkáni. Většinou se vyskytuje na kůži, může se vyskytovat i na sliznicích, v jiných tkáních se téměř nevyskytuje (Marek a kol. 2010).

Melanomy jsou charakteristické pro opakující se cytogenetickou delecí a/nebo ztrátu heterozygotnosti. Nejprve a nejčastěji jsou postiženy geny 9p (57 %), 10q (32%) a 6q (31 %) (Walker a kol. 1995). Delece v genu 11q (26 %) je obvyklá pro metastazování melanomu. Gen CDKN2 je mutován postupně a umožňuje dědičný přenos melanomu. Prozatím se neví, zda gen MTS1 je také postižen při vzniku melanomu (Franks a Teich 1999).

1.2.1 Vznik melanomu

Melanocyty jsou buňky, které produkují pigment. Nachází se v kůži, vnitřním uchu a oku obratlovců. Melanocyty jsou diferenciovány do různých stadií z pluripotentní buňky v závislosti na tkáni a produkci různých markerů. Nejprve probíhá specifikace neurálních buněčných lišt (pás neuroektodermálních buněk), následuje pak jejich migrace z neuroepiteliární tkáně. Poté jedna skupina buněk je specificky určena jako prekursor pro melanocyty, neboli melanoblasty, které migrují podél dorzálně – laterální dráhy pod ektodermem. Dochází k diferenciaci melanoblastů, proliferaci a migraci do celého embrya (Hearing a kol. 2006).

Melanocyty obsahují pigment melanin, který může být různě zbarvený, například savčí vlasy mohou mít barvu od hnědé až po světlou. Typ pigmentace závisí na genetické výbavě. Pigment hraje důležitou roli pro maskování u živočichů, u člověka je důležitý pro ochranu proti škodlivému slunečnímu záření. Je možné, že melaniny hrají roli v sálavých tepelných ztrátách, detoxikaci kyslíkatých radikálů a kovů a v zánětlivé odpovědi. Jsou popsány dva druhy melaninu: eumelanin a pheomelanin. Eumelanin je hnědý až černý a nerozpustný. Eumelaniny jsou směsí velkých molekul, které obsahují převážně 5,6 – dihydroxyindolové jednotky, které vznikají při enzymatických i neenzymatických reakcích. Pheomelanin je červeno žluté barvy a je rozpustný v zásaditém prostředí. Je to polymer, který se formuje přes cysteinyldopa pomocí reakce dopaquinonu s cysteinem nebo glutationu. Je více fotolabilní, než eumelanin. Ozáření pheomelaninu může vést k vytvoření toxických hydroxyl radikálů, které mohou působit v karcinogenezi (Barnhill a kol. 2004).

Faktory, které vyvolávají vznik melanomu, nejsou zcela objasněny, ale mezi dva nejhlavnější patří UV záření a genetické předpoklady člověka. UV záření funguje jako iniciátor kancerogeneze. Nejrizikovější skupinou jsou osoby, které byly vystavené opakovanému a dlouhodobému vystavení UV záření v mládí. Melanom může vzniknout na nedotčené kůži, ale pravděpodobnost vzniku melanomu je vyšší pokud je přítomná tzv. prekursorová afekce. Mezi prekursorové afekce patří pigmentové a dysplastické névy a lentigo maligna (Vorlíček a kol. 2006).

1.2.2 Hlavní druhy melanomu

Máme popsány hlavních 5 druhů melanomu u lidí – lentigo maligní melanom, povrchově šířící se melanom, nodulární melanom, akrolentiginózní melanom, subunguální melanom:

1) Lentigo maligní melanom (LMM): Je nejméně běžný melanom (4 – 15 %), objevuje se pouze na pokožce hlavy a krku, která přichází do kontaktu se slunečním zářením. Někdy bývá na zadní straně nohou a rukou a vzácně i na jiných místech těla. Většinou postihuje starší lidi. Lentigo maligní nádor může vyrůst z lentigo maligna, který může setrávat v organismu mnoho let, to je důvod, proč je tento nádor často fatálním. Jeho léze jsou velké, ploché, barva léze je různá od hnědé až černé po světlou až bílou.

2) Povrchově šířící se melanom (SSM): Je nejvíce rozšířeným typem kožních melanomů (70 % melanomů). Vyskytuje se převážně u lidí se světlou kůží. Často vyrůstá z pigmentové nebo dysplastické névy. Obvykle bývá diagnostikován ve středním věku. Jeho léze jsou menší než u LMM, jsou pro něj typické nepravidelné postranní okraje, nepravidelná mnohonásobná centrální pigmentace a historie růstu léze. Nejdříve nádor roste povrchově a později proniká do hlubších vrstev. Objevuje se centrální tmavě zbarvená skvrna, která se může rozšiřovat a měnit zbarvení až do světle šedivé barvy. Místa regrese mohou být rozpoznána díky snižujícímu se množství nebo vymizení pigmentu – hypopigmentovaná místa.

3) Nodulární melanom (NM): Je druhým nejčastějším typem melanomu (15 – 30 %). Trup, hlava a krk jsou nejčastěji postižená místa, nejčastěji je odhalen ve středních letech. V průměru má 1 – 2 cm, ale může být i větší, je to modročerná, modročervená nebo amelanotická (bez pigmentu melaninu) symetrická papula nebo nodule.

4) Akrolentiginózní melanom (ALM): Nevyskytuje se příliš u lidí se světlou pokožkou (2 – 8 %), ale u lidí s tmavší pokožkou je více běžný (60 – 72 % u černochů, 29 –

46 % u Asiatů). Objevuje se na dlaních, chodidlech a pod nehty, u starších pacientů kolem 60tého roku. V průměru dosahuje 2 cm, léze jsou tmavé s nepravidelnými okraji, povrch léze může být hyperkeratotický (červené ložisky se stříbrnými šupinkami).

5) Subunguální melanom: Je velmi podobný melanomu ALM. Vyskytuje se u lidí se světlou pokožkou (2 – 3 %), větší výskyt je však u lidí s pokožkou tmavou. Nejčastěji se objevuje na palci či na hrudníku. Je diagnostikován převážně u starších pacientů (Borden a kol. 2002).

1.2.3 Klinické projevy melanomu

Melanom vzniká prvotně jako kožní léze, která se rozšiřuje po pokožce, pokud je odhalen v tomto stádiu, je dobře léčitelný. Poté dochází k tzv. vertikálnímu růstu, dochází k prorůstání do dalších vrstev a tím se nádor stává maligním (Vorlíček a kol. 2006).

Pro určení diagnózy maligního melanomu jsou důležité změny vzhledu ložiska, které jsou definované pravidlem ABCD:

A – asymetrie – nepravidelný a nesymetrický tvar ložiska

B – borderline – nepravidelnost ohraničení

C – colour – nepravidelnost barvy

D – diameter – průměr ložiska je nad 5 mm a zvětšuje se (Vorlíček a kol. 2006).

1.2.4 Melanom u myši

Modelový mechanismus u myši je velmi důležitý pro pochopení vzniku maligních melanomů u člověka a dále jsou zde zkoumány nové možnosti léčby.

Existují tři způsoby, jak může melanom vzniknout u myši: transplantace lidských melanomových buněk do imunodeficientní myši, transplantace myších nádorových buněk do syngenní imunokompetentní myši a geneticky pro rakovinu modifikované myši modely (Bosserhoff 2011).

1.2.5 Melanom B16-F10

Při práci v naší laboratoři využíváme buňky melanomu B16-F10, které jsou implantovány myším C57BL/6N.

Melanom se u myši objevuje velmi vzácně, v roce 1954 v Jackson Laboratories se na myši C57BL/6 melanom objevil, tento melanom byl transplantován a poté byl in vitro stanoven jako melanom B16 Isaiahem Fidlerem v 70. letech 20. století (Bosserhoff 2011).

Melanom B16-F10 vykazuje metastazování převážně do plic (Bossert 2011). Existují další tři linie melanomu a to B16-F0, B16-F1 a B16-BL6.

1.3 Terapie nádorů

Terapii nádorů můžeme rozdělit na 3 hlavní odvětví – operativní odstranění nádoru, radiace (léčba zářením) a chemoterapie. Dále může být použita i biologická terapie, ve které se využívá imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2009).

Aby byla vybrána správná metoda pro léčbu nádorů, rozdělujeme nádory na stádia. Hlavní mezinárodní klasifikace se nazývá TNM systém, porovnává velikost tumoru, nodální status a přítomnost či nepřítomnost metastáz:

- Stádium I – malý lokalizovaný nádor
- Stádium II – nádor rozšířen do místní lymfatické uzliny
- Stádium III – velký místní nádor a/nebo rozšířen do vzdálenější lymfatické uzliny
- Stádium IV – přítomnost vzdálených metastáz (Franks a Teich 1999).

1.3.1 Chirurgická terapie nádorů

Chirurgická terapie nádorů je nejstarší lékařskou metodou používanou pro léčbu nádorů. Dojde k vyříznutí nádoru a tím se zmenší šance pro opětovný návrat nádoru. Nádor ale musí splňovat dvě podmínky: musí být lokalizován na jednom místě a chirurg ho musí být schopný vyjmout, aniž by při tom poškodil vnitřní orgán či důležité vitální funkce (Rosenbaum a kol. 2002).

1.3.2 Radioterapie

S radioterapií se setkává 60 % pacientů v průběhu léčby nádorů. Radiace se většinou používá u případů, kdy rakovina je odhalena v brzkém stádiu (Yabro a kol. 2011).

Radiace způsobuje poškození struktury DNA v nádorových buňkách a díky tomu se poté nemohou dělit či růst. Radioterapie využívá rentgenových paprsků, gama záření nebo elektronů, které jsou zacíleny na nádorové buňky. Radioterapie není bolestivá. Tato terapie může být použita samostatně nebo v kombinaci s jinými způsoby léčení nádorů (Rosenbaum a kol. 2002).

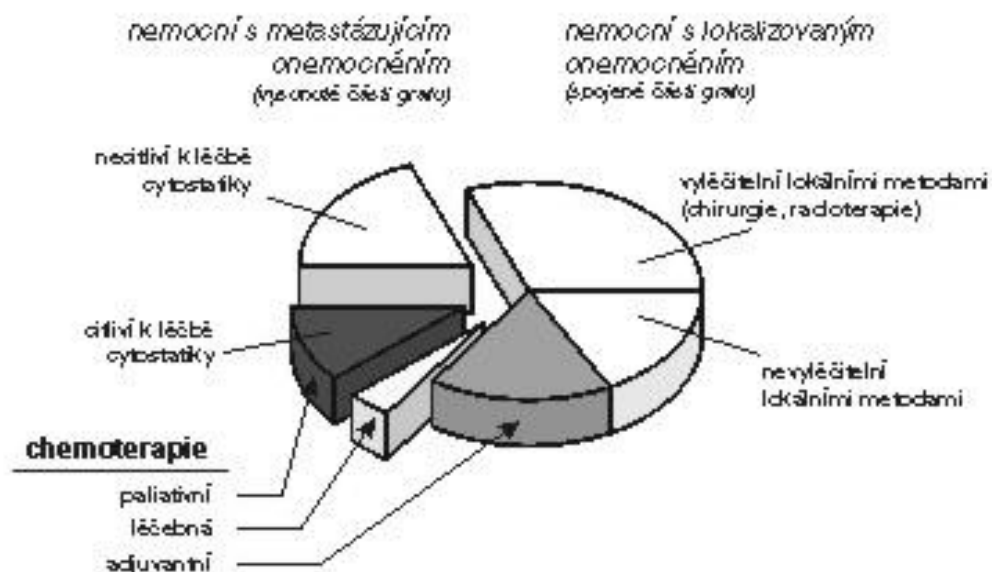
1.3.3 Chemoterapie

Chemoterapie je poměrně nová metoda léčby nádorových onemocnění. Chemické látky, které se při chemoterapii používají, mohou být rovnou toxické pro nádorové buňky, jiné látky se musí aktivovat pomocí metabolismu v nádorových buňkách nebo ve specializovaných orgánech, např. játra (Franks a Teich 1999).

Chemoterapie působí tak, že inhibuje buněčnou proliferaci, popřípadě stimuluje apoptózu buněk. Chemoterapie není selektivní, což znamená, že působí jak na nádorové buňky, tak na normální buňky a tím způsobuje různé nežádoucí účinky. Chemoterapie využívá toho, že buněčný cyklus u nádorových buněk je delší než u buněk normálních, díky tomu se normální buňky po chemoterapii mohou obnovit za určité časové období, zatímco nádorových buněk zůstává méně, po dalších kolech chemoterapií dochází k výrazné eliminaci nádorových buněk, zatímco normální buňky jsou schopné se obnovit na dostatečné množství (Klener 1999).

Použití chemoterapie je omezeno především citlivostí nádoru k chemoterapii. Grafické znázornění uplatnění chemoterapie vzhledem k pokročilosti rakoviny je na obrázku č. 1. Nádory rozdělujeme do 4 skupin podle senzitivity nádorů k chemoterapii:

- 1. skupina – Chemoterapie má léčebné účinky. Nádory vyskytující se u dětí a mladých lidí, méně časté nádory (7 – 8 % incidence nádorů), např.: Burkittův nádor, ovariální karcinomy, retinoblastom.
- 2. skupina – Chemoterapie má paliativní, avšak velmi významný, účinek. Snižuje se riziko opětovného objevení se nádoru a prodlužuje se doba přežití. Incidence nádorů 2. skupiny je 25 – 28 %, např.: mnohočetný myelom, lymfocytární lymfom, karcinom prostaty.
- 3. skupina – Citlivost k chemoterapii u těchto nádorů není jasná a výsledky jsou nespolehlivé. Chemoterapie se zde uplatňuje jako doplňková metoda. Incidence těchto nádorů je 30 – 35 %, např.: nádory CNS, karcinomy trávicí soustavy, sarkomy měkkých tkání.
- 4. skupina – Citlivost k chemoterapii je velmi malá. Incidence nádorů ze 4. skupiny je 20 %, např.: karcinom močového měchýře, karcinom jícnu, karcinom štítné žlázy (Klener 1996).



Obr. 1: Grafické znázornění uplatnění chemoterapie k pokročilosti onemocnění (Klener 1996).

1.3.4 Biologická terapie

Biologická terapie je založená na vlastním imunitním systému. Imunitní systém může bojovat buď pomocí specifické, nebo nespecifické imunitní odpovědi:

- 1) Nespecifická imunitní odpověď: Nespecifická odpověď slouží k předcházení vstupu patogenů do organismu. Zahrnuje kůži, mukózní membrány, řasy a mukózní výstelku respiračního traktu. Z buněk sem patří zejména makrofágy, monocyty, dendritické buňky, polymorfonukleární buňky a NK buňky (David 1995).
- 2) Specifická imunitní odpověď: Specifická imunitní odpověď je založená na rozpoznávání cizorodých látek lymfocyty. Lymfocyty rozdělujeme na T a B lymfocyty (David 1995).

Při biologické léčbě se používají např. vysoce purifikované proteiny: interferony, interleukin 2 (David 1995). Interferony jsou proteiny, které buňky produkují jako odpověď na virovou infekci, dvoušroubovici RNA, antigeny a mitogeny. Interferony působí na makrofágy, NK buňky i T a B lymfocyty a mají antiproliferativní účinky (Foon 1986). IL – 2

je růstovým faktorem pro T – lymfocyty, aktivují dělení a klonování T specifických buněk. I další buňky mají receptory pro IL – 2: NK buňky, LAK buňky, makrofágy, B lymfocyty a oligodendridy. Navázání IL – 2 na T – lymfocyty také stimuluje produkci tumor necrosis faktoru (TNF), INF a lymfotoxinů (David 1995).

Dále se používají monoklonální protilátky zacílené na nádorové proteiny jako je Rituximab, který se váže na buněčný makrer CD20 a spustí v buňce apoptózu (Sharkey a Goldenberg 2006).

K léčbě nádorů se také využívají imunokonjugáty, protilátky, které slouží k přenosu toxických látek, jako jsou radioisotopy, léky či toxiny (Sharkey a Goldenberg 2006).

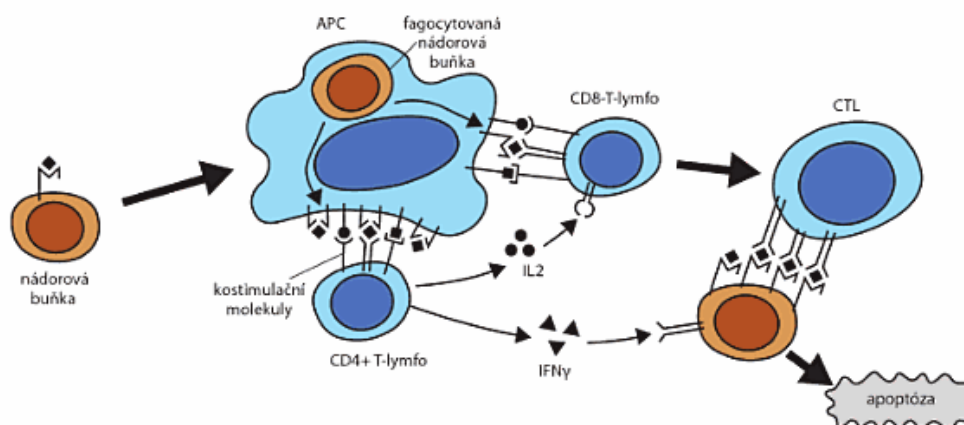
1.4 Imunologie nádorů

Imunitní systém rozpoznává nádory podle nádorových antigenů. Nádorové antigeny rozdělujeme na dvě skupiny:

- Nádorově specifické antigeny – Tyto proteiny se vyskytují pouze na nádorových buňkách.
- S nádory spojené antigeny – Tyto proteiny nejsou pouze na nádorových buňkách. Odlišnost mezi nádory a normálními buňkami je v množství antigenů či v abnormální místní nebo časové expresi (Hořejší a Bartůňková 2009).

Imunitní reakce proti nádorům vznikne, pokud nádorové antigeny jsou prezentovány T lymfocytům pomocí aktivovaných dendritických buněk v nefyziologickém (zánětlivém) prostředí. Pokud jsou abnormality nádorových buněk rozpoznány imunitním systémem, může proti nim působit specifická i nespecifická imunita (Hořejší a Bartůňková 2009).

Převážně cytotoxické T lymfocyty (CD8+) eliminují nádorové buňky. Rozpoznávají ovšem nádorové antigenní epitopy pouze ve formě peptidů, které jsou na povrchu buňky prezentovány MHC I molekulami. Mechanismus protinádorové imunity je znázorněn na obrázku 2 (Klener a Klener jr. 2010).



Obr. 2: Mechanismus protinádorové imunity (Klener a Klener jr. 2010).

Dalším obranným mechanismem jsou NK buňky (přirození zabíječi). Nádorové buňky se kryjí před působení cytotoxických T lymfocytů absencí MHC molekul (u člověka HLA), právě tato absence umožňuje NK buňkám rozpoznávat nádorové buňky a ničit je. NK buňky na svém povrchu mají receptory pro MHC (HLA) molekuly, pokud jsou receptory obsazeny MHC (HLA) molekulou, působení NK buněk se inhibuje. Pokud receptor není ligandem obsazen, NK buňky způsobí destrukci postižené buňky (Jílek 2005).

1.4.1 Únik nádorů před imunitním systémem

Síla imunitního systému proti nádorovým onemocněním je obvykle nedostatečná, protože nádory mají obranné mechanismy před imunitním systémem:

- Antigenní variabilita – během růstu nádoru vznikají formy nádoru, které antigeny ztratily anebo je pozměnily
- Absence kostimulačních faktorů CD80 a CD86 – slouží k utlumení cytotoxických a pomocných T lymfocytů.
- Snížená exprese MHC I (HLA I) – únik před cytotoxickými T lymfocyty.
- Produkce faktorů inhibujících T lymfocyty a jiných blokujících faktorů – např.: IL – 10, TNF – β .
- Exprese FasL – FasL pokud se dostane do kontaktu s Fas způsobuje apoptózu buňky s Fas receptorem. Fas receptory jsou přítomny na lymfocytech (Bartůňková 2002).

1.5 Imunoterapie

Imunoterapie je postup léčby nádorů, který je založený na indukci protinádorové imunity nebo využití imunitních mechanismů k zacílení léčby. V současné době se imunoterapie používá především při léčbě tzv. minimální reziduální nemoci, po významném snížení velikosti nádoru jiným terapeutickým přístupem (Hořejší a Bartůňková 2009).

Protilátková imunoterapie pracuje na principu protinádorových protilátek, které se naváží selektivně na nádor a tím ho ničí, nebo dochází ke stimulaci přírodních obranných mechanismů pacienta. Protilátky mohou potlačovat nádory čtyřmi možnými způsoby:

- Přímá inhibice růstu: některé protilátky přímo narušují proliferaci nádorů.
- Cytotoxicita zprostředkovaná komplementem.
- Stimulace fagocytózy prostřednictvím opsonizace.
- Na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (Franks a Teich 1999).

K imunoterapii se rovněž používají tzv. imunomodulační látky, které ovlivňují působení imunitního systému. Podle ovlivnění aktivity imunitního systému rozdělujeme imunomodulační látky na antigen specifické a na antigen nespecifické látky (Végh a Végh 2008).

1.5.1 Imunoterapie zprostředkovaná monoklonálními protilátkami

Monoklonální protilátky se používají jako nosiče pro léčiva nebo toxiny, nebo se využívá jejich fyziologických funkcí (opsonizace, ADCC) (Hořejší a Bartůňková 2009).

- Použití humanizovaných monoklonálních protilátek: Na protilátky se naváže příslušný toxin, protilátka pak zanesou toxin do nádoru a vazbou na nádorový antigen způsobí nekrózu tkáně. Problém je v působení na okolní zdravou tkáň a vytvoření rezistence u nádorových buněk. Dalším využitím je případ, kdy se používá samotná protilátka, která je zacílená proti nádorovým antigenům. Vazba protilátky na antigen vyvolá apoptózu příslušné buňky, nebo opsonizací aktivuje efektorové buňky imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2002). Humanizované monoklonální látky nesou variabilní úsek, který pochází z myší monoklonální protilátky pro daný nádorový antigen, a konstantní úseky jsou z lidského imunoglobulinu. Tyto protilátky mají požadovanou specifitu pro nádorový antigen a při tom jsou málo imunogenní (Cwiertka a kol. 2004).

- Použití umělých bispecifických protilátek: Bispecifické protilátky mají dvě vazebná místa, jedno se váže na nádorový antigen, druhé na efektorovou buňku – T lymfocyt, NK buňku. Fc část protilátky může aktivovat Fc receptory na fagocytech a NK buňkách (Hořejší a Bartůňková 2002).
- Čištění suspenze buněk kostní dřeně pro autotransplantaci: Kostní dřeň odebraná pacientovi se vyčistí pomocí protilátek proti nádorovým antigenům, tím se odstraní nádorové buňky a po chemoterapii dojde k autotransplantaci vyčištěné kostní dřeně (Hořejší a Bartůňková 2002).

1.5.2 Imunoterapie založená na komplementu

Imunoterapie založená na komplementu je imunoterapie, která využívá cytotoxicity spojené s komplementem. Komplement tvoří několik proteinů (C1 – C9), které jsou v plasmě přítomné v neaktivní formě. Složka C1q komplementu se váže na Fc místo na protilátce a spouští kaskádu reakcí, ve které jsou aktivovány zbývající proteiny komplementu. Proteiny C5b – C9 vytváří komplex poškozující membránu, který je schopný se vmezeřit do buňky a způsobit lýzu buňky (Franks a Teich 1999).

1.5.3 Imunoterapie pomocí buněčných mechanismů

Do imunoterapie pomocí buněčných mechanismů patří:

- Nespecifická stimulace zánětu: Pomocí bakteriální vakcíny je vyvolán v místě nádoru zánět (Hořejší a Bartůňková 2002).
- Stimulace LAK a TIL buněk – LAK (lymfokiny aktivovaní zabíječi) buňky jsou získávány stimulací směsí NK buněk a T lymfocytů pomocí cytokinů *in vitro*. Takto stimulované buňky se navrátí do pacienta a svým působením potlačují růst nádoru. TIL (tumor infiltruující lymfocyty) buňky se připravují z buněk, které se vmezeřili do nádoru, aktivují se *in vitro* pomocí cytokinů a infiltruují se zpět do pacienta. Takové buňky by měly být nádorově specifické i bez působení kostimulačních faktorů (Hořejší a Bartůňková 2002).
- Zlepšení antigen – prezentující funkce nádoru: Nádorová buňka se *in vitro* pozmění tak, aby se z ní stala antigen-prezentující buňka. Na tu působí cytokiny nebo ozáření a způsobí, že buňky není schopná se dělit. Takto pozměněné buňky se vrátí do jedince, kde napadají nemodifikované nádorové buňky. Další možností je hybridizovat nádorové buňky s antigen-prezentujícími buňkami, vzniklý hybrid

prezentuje pak nádorové antigeny na svém povrchu a úspěšně aktivuje T lymfocyty (Hořejší a Bartůňková 2002).

- Použití dendritických buněk: Dendritické buňky se připravují *in vitro* pomocí cytokinů z periferních monocytů. Ty se kultivují s nádorovými antigeny (lyzát, apoptické nádorové buňky, izolované nádorové antigeny) a injikují se do pacienta (Hořejší a Bartůňková 2002).
- Nádorové vakcíny: Cílem vakcinace je zvýšení množství protinádorových cytotoxických T lymfocytů zvýšením exprese nádorových antigenů nebo MHC a kostimulačních faktorů (Klener a Klener jr. 2010).
- Použití alogenní transplantace: Používá se při alogenních transplantacích převážně u pacientů s leukemií (Hořejší a Bartůňková 2002).
- Použití produktů imunitního systému: Využívají se interleukiny (IL – 2), interferony (INF- γ) a faktory stimulující kolonie (GM-SCF) (Hořejší a Bartůňková 2002). Využívá se rekombinovaných buněk, které jsou připraveny tak, že příslušná genová sekvence z lidské buňky, která kóduje cytosin, se vyjme, působením restriční endonukleázy, a vloží se do genomu jiné buňky, např. kvasinky. Z budoucího nositele genu pro cytokin se izoluje plazmid, pomocí restriční endonukleázy se naruší, působením ligázy dojde k začlenění genu pro cytokin do plazmidu. Plazmid se poté vloží zpět do bakterie. Takto upravená buňka produkuje příslušný cytokin. Produkty takto připravených bakterií jsou izolovány a čištěny. Výsledný produkt má stejné vlastnosti jako přirozeně vzniklé cytokiny (Lukešová a kol. 2006).

1.6 Imunoterapie založená na vrozené imunitě

Imunitní systém lze rozdělit na imunitu vrozenou (nespecifickou) a imunitu získanou (specifickou). Imunita vrozená je evolučně starší (Hořejší a Bartůňková 2002).

S vrozenou imunitou se můžeme setkat už u hlístic (*Caenorhabditis*) nebo drosofil. Je v ní zahrnuta obrana fyzikální a chemická na vnějším i na vnitřním povrchu těla. Patří sem buňky, které jsou schopné internalizovat mikroorganismy (granulocyty, makrofágy, dendritické buňky), buňky, které uvolňují prozánětlivé látky (žírné buňky), buňky, které jsou schopné cytotoxického působení (NK buňky) a dále komplementový a interferonový systém (Krejsek a kol. 2005).

1.6.1 Uplatnění vrozené imunity – fagocytóza

Schopnost fagocytózy mají specializované buňky vrozené imunity, jako eozinofily a neutrofil, makrofágy a monocyty, dále dendritické buňky (Hořejší a Bartůňková 2009).

Proces fagocytózy se skládá z několika jednotlivých kroků – přichycení částice na povrch buňky, tvorba fagosomu, spojení fagosomu s lysozomem, degradace obsahu fagosomu. Pro přichycení částice na povrch buňky je důležité vzájemné spojení specifických membránových receptorů fagocytů s ligandy na povrchu invadující částice (Andělová 2004). Pohyb fagocytů do místa poškození tkáně je řízen chemotakticky, látkami uvolněnými v místě poškození (zánětu) (Hořejší a Bartůňková 2009).

Fagocyty rozpoznávají struktury na povrchu mikroorganismů, ale ne na vlastních nepoškozených buňkách. Tyto struktury, evolučně zakonzervované, sdílené různými organismy a nezbytné pro jejich přežití, jsou nazývány PAMP (Pathogen associated molecular pattern), jsou na povrchu fagocytů rozpoznávány receptory PRR (Pattern recognition receptor). Některé jsou exprimovány geneticky na buňce, jiné se objevují až po působení určitého podmětu. Fagocytóza je umožněna především díky spojení povrchových lektinů na povrchu fagocytů se sacharidy, které jsou složkou mikrobiálních glykoproteinů a polysacharidů – nejvýznamnější je mannosový a galaktosový receptor. Lipopolysacharidy jsou rozpoznávány receptorem CD14 na povrchu fagocytů. Dalším druhem receptorů jsou TLR (Toll – like receptor), které rozpoznávají různé struktury charakteristické pro patogeny, tyto receptory mohou být také exprimovány na povrchu buňky jako odpověď na stres nebo nekrotické poškození tkáně a mají podobnou povahu jako PAMP, viz tabulka 1. V cytoplasmě fagocytů se objevují Nod receptory (nukleotid – binding oligomerization domain), které jsou přítomné nejenom ve fagocytujících buňkách (např. i v epitepiálních buňkách). Nod fungují podobně jako TLR. Polyanionické struktury na površích buněk a negativně nabitě fosfolipidy jsou rozpoznávány pomocí receptorů (Hořejší a Bartůňková 2009).

Na povrchu fagocytů jsou speciální receptory, které rozpoznávají patogeny, které jsou obalené buď protilátkami (Fc – receptory) či C3b – fragmentem komplementu (komplementové receptory CR1 a CR3). Částice, které jsou takto obalené, pak umožňují zesílení působení fagocytózy, tzv. opsonizaci (Ferenčík a kol. 2005).

Jako opsoniny vystupují také lektiny vážící manosu (Hořejší a Bartůňková 2009). Usmrčení pohlcených patogenů a jejich následná destrukce může být prováděna různými způsoby. Důležitou roli zde hrají lysozomální enzymy a změna pH. Usmrčení bakterií, které

jsou závislé na kyslíku, se provádí pomocí respiračního vzplanutí, tzn. vznik superoxidového aniontu a dalších toxických kyslíkatých sloučenin. Kombinace degranulace lysozomů a respiračního vzplanutí usmrtí a degraduje téměř všechny pohlcené patogeny (Trojan a kol. 2003).

Tabulka 1: Receptory skupiny TLR a jimi rozpoznávané struktury (Hořejší a Bartůňková 2009).

Receptor	Ligand	Původ ligandu
TLR1/TLR6 (heterodimer)	Triacylové lipopeptidy Solubilní faktory	Bakterie a mykobakterie <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2/TLR1 (heterodimer)	Lipoprotein/lipopeptidy Peptidoglykan Lipoteichová kyselina Lipoarabinomannan Glykoinositolfosfolipidy Glykolipidy Poriny Atypický lipopolysacharid Atypický lipopolysacharid Zymosan HSP 70	Různé patogeny grampozitivní bakterie grampozitivní bakterie Mykobakterie <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Plísně Hostitel
TLR3	dvojvláknová RNA Poly (I-C)	Viry Syntetické sloučeniny
TLR4 (homodimer + MD2, CD14)	Lipopolysacharid Taxol Fúzní protein HSP 60 HSP 70 Fibronektin Oligosacharidové fragmenty kyseliny hyaluronové Fragmenty heparan sulfátu Fibrinogen	gramnegativní bakterie Rostliny RSV virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Hostitel Hostitel Hostitel Hostitel Hostitel
TLR5	Flagellin	Bakterie
TLR6/TLR1 (heterodimer)	Diacylové lipopeptidy Lipoteichová kyselina Zymosan	Mykoplazmata grampozitivní bakterie Plísně
TLR7	Imidazochinolin, loxoribin, broprimin Jednovláknová RNA	Syntetické sloučeniny Viry
TLR8	Imidazochinolin Jednovláknová RNA	Syntetické sloučeniny Viry
TLR9	Nemethylované CpG sekvence prokaryotické DNA	Bakterie a viry
TLR10	Neznámý	Neznámý
TLR11	Neznámý	Uropatogenní bakterie

1.6.2 Uplatnění vrozené imunity – cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC reakce)

Buňky vrozené imunity (eozinofily, neutrofilny, bazofily, makrofágy, NK buňky) na svém povrchu exprimují Fc receptor, pomocí Fc konce protilátky rozpoznávají a poté fagocytyjí cizorodé částice, např. nádorové buňky. Protilátka zde nemá přímou cytotoxickou

funkci, slouží pouze ke zprostředkování vazby mezi částicí a příslušnými buňkami. Rozpoznávání protilátky na částicích je různé, makrofágy rozpoznávají změny v lipidické struktuře membrány, NK buňky rozpoznávají částice pomocí chybějící exprese antigenů hlavního histokompatibilního komplexu (Cwierka a kol. 2004).

1.6.3 Nádorové onemocnění a vrozené imunita

Myši se schopností spontánní regrese nebo kompletní rezistence (SR/CR) jsou schopné odolat i vysokým dávkám rakovinných buněk, které i v malé míře jsou letální pro divoký typ (WT) myši. Tato schopnost je díky velmi rychlé infiltraci leukocytů při prvním i při opakovaných vystaveních rakovinným buňkám. Leukocyty při rychlé infiltraci vytváří rosety okolo rakovinných buněk a ty jsou pak ničeny pomocí cytolyzy. Tento kmen myši rezistentních proti rakovině vznikl z jediné BALB/c myši, která se objevila s tímto autozomálně dominantním znakem v roce 1999, dnes se dělí do tří C57BL/6, CAST/Ei a C3H. To, že SR/CR myši mohou vypořádat s rakovinnými buňkami bez předešlého vystavení, poukazuje, že protirakovinná odpověď vychází z vnitřní imunity (Hicks a kol. 2006).

Objev SR/CR mutace je spojen s pracemi prof. Cui, který ji objevil u jedné myši BALB/c. Na tuto myš nebylo možno transplantovat sarkom S180 ani za použití vysokých dávek. Tuto rezistenci dokázal přenést i na myši jiných linií. Na základě křížení myši zjistil, že schopnost spontánní regrese či kompletní rezistence vůči nádorům SR/CR mutace je dominantní znak v jednom lokusu (Cui a kol. 2003).

Myši s SR/CR mutací vykazují v mladším věku rezistenci vůči transplantaci nádorů (CR), jsou – li starší, než 4 měsíce transplantát se ujme, ale je následně odvržen (SR) (Cui a kol. 2003).

Byla také provedena studie, zda leukocyty z SR/CR myši jsou schopné léčit rakovinu u myši divokého typu očkované nádorem S180, který vytváří jak solidní tumory, tak ascites. Leukocyty byly extrahovány z SR/CR BALB/c myších slezin a kostní dřeně a od WT dárců. Myši byly rozděleny na tři skupiny: první s injekcí leukocytů z SR/CR, druhá s injekcí leukocytů u WT myši a třetí bez injekce leukocytů, druhá a třetí skupiny byly kontrolní. V obou kontrolních skupinách se vyvinuly nádory, myši začaly umírat a byly zabity. Ve skupině, které byly vpíchnuty leukocyty ze SR/CR myši, byly tumory v prvních čtyřech týdnech větší než v kontrolních skupinách, poté menší a po dalších sedmi dnech se buď

stabilizovaly, nebo kompletně zmizely (9 ze 14 nádorů). Myši s kompletní regresí zůstaly zdravé a bez tumoru 10 měsíců po provedeném testu (Hicks a kol. 2006).

Tyto výsledky ukazují, že mechanismus rezistence spočívá v rozeznání určitých vlastností a rysů společných všem nádorovým buňkám buňkami vrozené imunity, což vede k jejich následné likvidaci (Hicks a kol. 2006).

1.7 Nádorová terapie založená na použití bakterií

Již z 18. století pocházejí pozorování, že výskyt prudkých bakteriálních infekcí (byť tehdy obtížně chápaných, světlo přinesla až pozdější bakteriologie) je v určitých případech spojen s regresí onemocnění nádorových. Systematicky se této záležitosti začal věnovat až Dr. Coley (Bickels a kol. 2002). Ten v roce 1891 aplikoval nádorovým pacientům směs inaktivovaných bakterií, grampozitivní *S. pyogenes* a gramnegativní *S. marcescens*, tzv. Coley toxin. Tato směs byla se střídavými úspěchy a neúspěchy používána mnoho desetiletí. Přestože není její používání v současnosti doporučeno FDA, je Dr. Coley právem nazýván „otcem nádorové imunoterapie“ (Cann a Netten 2003).

Na obdobném principu (stimulace nespecifické imunitní odpovědi) funguje i nádorová terapie založená na použití BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), což je kmen *Mycobacterium bovis*, který se používá atenuovaný (Tokunaga a kol. 1984).

Uvedené příklady použití bakterií v protinádorové léčbě fungují na principu stimulace imunitního systému. Bakterie však mohou působit proti nádorům i přímo.

Vědci objevili, že určité druhy anaerobních bakterií, např. *Clostridia* se množí a terapeuticky působí v oblastech nádoru, kde není kyslík, ale umírá, pokud se dostane do dobře okysličené oblasti tkáně, což by znamenalo, že by nebyly škodlivé pro zbytek těla. Bakterie nezničí celý nádor, musí se kombinovat s chemoterapií (Patyar a kol. 2010). Využívá se divoký např. bakterie *Salmonella*, především *Salmonella typhimurium*, která může být jednoduše upravena, aby nesla terapeutické geny. *S. typhimurium* je fakultativně anaerobní, což umožňuje žít bakterii v oblasti bez i s kyslíkem a tak může kolonizovat jak malé metastázy, tak velké tumory (Thamm a kol. 2005).

Produkty bakterií – bakteriální toxiny jsou také využívány v léčbě nádorů (Patyar a kol. 2010).

1.7.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia je gram – negativní bakterie. Je to jediný zástupce rodu *Stenotrophomonas*. Kmen těchto bakterií izoloval Hugh v roce 1958 z orofaryngeálního výtěru pacienta s karcinomem úst, tato bakterie byla poprvé pojmenována jako *Pseudomonas maltophilia* (Denton a Kerr 1998).

Buňky *S. maltophilia* jsou rovné nebo mírně zakřivené, netvoří spóry. Jejich velikost je od 0,5 až 1,5 nm. Tvoří kolonie, které mají hladké okraje, bílou až světle nažloutlou barvu. Optimální teplota pro růst těchto bakterií je 35°C. Pro většinu těchto bakterií je zásadní methionin a cystein, který potřebují k růstu (Denton a Kerr 1998).

Stenotrophomonas maltophilia má polární bičík, který ji pohání (De La Maza a kol. 2004). *Stenotrophomonas maltophilia* je ve fyziologickém pH pozitivně nabitá, což je dáno skladbou z proteinů umístěných ve vnější membráně, zatímco ostatní bakterie jsou negativně nabitě. *S. maltophilia* tedy tvoří výjimku v této oblasti (Jucker a kol. 1996).

1.8 Nádorová terapie s použitím beta glukanu

Pokusili jsme se kombinovat terapii, založenou na stimulaci vrozené imunity pomocí *S. maltophilia*, s jinými protinádorovými přístupy s cílem ověřit možnost dosažení synergického působení. Jednou z těchto terapií je použití beta glukanu.

Glukany jsou přírodní polysacharidy, které se skládají z D-glukopyranózových podjednotek. Beta glukany mají schopnost pozitivní stimulace lidské imunity, protizánětlivý, antimikrobiální i antitumorální účinek (Zenkovič a kol. 2005).

1.9 Nádorová terapie s použitím kladně nabitých molekul

Dalším terapeutickým přístupem, který jsme zkoušeli v kombinaci s použitím *S. maltophilia* bylo použití PaKGGK. Je známo, že molekuly obsahující kladně nabitou část a hydrofobní úsek atakují často bakterie. Příkladem jsou CAP, kationické antimikrobiální peptidy (Doležilková a kol. 2011).

Kladný náboj slouží při interakci se záporně nabitými bakteriemi, hydrofobní část pro „proděravění“ bakterie. Tyto látky jsou často používány i proti nádorům, neboť i nádory jsou charakteristické výskytem záporného náboje (Marquez a kol. 2004). PaKGGK je sice molekulou malou, ale splňuje výše uvedené předpoklady. Bylo popsáno její výrazné protibakteriální působení (Makovitzki a kol. 2006).

2. Cíle práce

- In vivo studium vlivu bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* na melanom B16-F10.
- Testování akutní fáze zánětu v nádoru pomocí stanovení hladiny CRP.
- Ověření možnosti zesílení účinku *S. maltophilia* kombinací s některými jinými protinádorovými přípravky.

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

V pokusech byly použity tyto chemikálie:

- BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane, Mw 4000) (NOF Corporation),
- β -1,3D-glukan (Transfer Point)
- ELISA TEST KIT (Life Diagnostics, Inc., West Chester)
- Krevní agar (P-Lab a.s., Česká republika)
- Lysin (Sigma-Aldrich)
- PalKGGK (K = D-lysiny, Pal = palmitoyl) (Schafer-N)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich)

3.2 Experimentální zvířata

Pro pokusy byly používány myši C57BL/6N od Charles River Laboratories, samice, 8 týdnů staré, váha 18 – 20 g. Byly chovány s fotoperiodou 12/12 a při neomezeném přístupu k vodě a standardní potravě.

3.3 Buněčná linie

Pro pokusy byly použity buňky myšního melanomu B16-F10 dar prof. Říhové (MBÚ, Praha).

Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10 % bovinním fetálním sérem, antibiotiky (Sigma-Aldrich), glutaminem a merkaptoetanol. Kultivace buněk probíhala v termostatu při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami, která obsahovala 5 % oxidu uhličitého.

3.3.1 Příprava buněk myšního melanomu B16-F10 pro *in vivo* použití

Nejprve jsme odstranili medium. Buňky byly propláchnuty sterilním PBS celkově 2x. Po propláchnutí došlo k trypsinizaci (0,02 % trypsin a 0,02 % EDTA v PBS), buňky byly vloženy na 1 – 5 minut do termostatu na 37°C. Poté se do buněk přidalo malé množství media (RPMI 1640 s 10 % FCS) a buňky v mediu byly rozvolněny pomocí Pasteurovy pipety. Buňky byly přelity do zkumavky a doplněny na 20 ml objemu, centrifugovány (10

min, 150 G). Po centrifugaci došlo k vylití média. Zcentrifugované buňky jsme naředili pomocí média RPMI 1640 na 3 ml a pomocí Pasteurovy pipety je rozvolnily. Do zkumavky jsme napipetovali 30 μ l suspenze buněk a 30 μ l trypanové modři, promíchalo se a nechalo asi 1 minutu kultivovat. Počet buněk byl spočítán pomocí Bürknerovi komůrky. Podle počtu buněk pak byla suspenze naředěna na potřebnou koncentraci.

3.4 Transplantace nádorových buněk B16-F10

Myši byly nejprve oholeny na levé i pravé půlce zad. Poté bylo pod kůži na oholené místo aplikováno 400 000 buněk melanomu B16-F10 v 0,1ml RPMI 1640 bez séra.

3.5 Perorální aplikace beta glukanu

Byla připravena suspenze 60 mg β -1,3D-glukanu/ml pitné vody. Tato suspenze byla stále míchána a pomocí špičky s širokým otvorem bylo myším perorálně aplikováno 50 μ l této suspenze (= 3 mg beta glukanu).

3.6 Příprava *Stenotrophomonas maltophilia* pro injikování do nádoru

Složení použité suspenze *Stenotrophomonas maltophilia*: Nejprve byl lyofilizát *S. maltophilia* rekonstituován ve sterilním PBS. Materiál by vyšet na krevní agar a kultivován přes noc při 37 °C. Sklizené kolonie byly zamrazeny v PBS při teplotě -70°C. Před prvním použitím byly bakterie zabity ozářením UV po dobu 1 hod. Aplikační *i.t.* dávka byla 50 mikrolitrů. Kromě suspenze mrtvých bakterií byl připraven i sonikovaný preparát. Pro tento účel byla suspenze připravená v předchozím kroku (asi 5 ml) sonikována v sonikátoru HELSCHER VP200S (deset desetivteřinových pulzů střídaných dvacetivteřinovým chlazením, vše prováděno v ledové lázni). Po sonifikaci byla suspenze zamrazena a byla pak používána k intratumorální léčbě (aplikační dávka 50 mikrolitrů).

3.7 Měření velikosti nádoru

Nádory byly měřeny během probíhání pokusu jednou za dva dny, během sledování myši po proběhnuté léčbě nejméně jednou za týden. Měřila se velikost nádoru pomocí kaliperu. Poté byl vypočítán objem nádoru použitím vzorce $V = \pi/6 AB^2$, kde A je délka nádoru a B je výška nádoru (Inaba a kol. 1986).

3.8 Měření teploty nádoru

Teplota se měřila na vyholeném místě myši, na levé i pravé straně zad, přiložením teploměru 2 mm od kůže. Měření probíhalo pomocí teploměru pro myši IR RODENT THERMOMETER 153 IRB od firmy BIOSEB. Na pravé straně byl aplikován nádor, proto se zde změřila teplota nádoru, na levé straně nádor aplikován nebyl, proto se tam změřila teplota myši.

3.9 Vyhodnocení počtu metastáz

Plíce myši naložené v 4 % formaldehydu nejméně týden byly prohlédnuty pod binolupou a byly na nich spočítány metastázy, které sejevily jako černé tečky (Větvicka a kol. 2007).

3.10 Stanovení množství CRP v myším séru

Množství CRP se stanovovalo ze vzorků myšního séra, které bylo připraveno ze vzorků krve, odebíraných v čase 0 (před terapií) a 6, 12 a 24 hodin od zahájení léčby. Krev byla odebírána inzulinovými stříkačkami z ocasní žíly po krátkodobém nahřátí infralampou. Po odebrání byly vzorky uloženy přes noc při 4°C. Vzorky byly poté centrifugovány 10 minut při 600 G. Pro stanovení CRP byl použit ELISA TEST KIT pro myši C-reaktivní protein (Life Diagnostics, Inc., West Chester).

Z každého vzorku séra jsme odebrali 3 μ l a napipetovali ho do 297 μ l diluentu (součást soupravy). Do připravené destičky (součást soupravy) jsme napipetovali 100 μ l standartu i připravených vzorků s diluentem, nechali inkubovat na míchačce za mírného míchání 45 minut při pokojové teplotě. Po 45 minutách jsme vyklepli tekutinu z destičky a 6x vymyli pomocí promývacího roztoku, který jsme připravili z 50 ml Wash Buffer, který byl součástí soupravy, a z 950 ml destilované vody. Poté jsme z destičky vyklepali veškerou tekutinu. Do jamek jsme přidali 100 μ l Enzym Conjugant Reagent připravený v soupravě a nechali inkubovat na míchačce při mírném míchání 45 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme vyklepli tekutinu a znovu 6x promyli promývacím roztokem (50 ml Wash Buffer ze soupravy KITu a 950 ml destilované vody) a vyklepali veškerou tekutinu z destičky. Do každé jamky jsme přidali 100 μ l TMB Reaktant ze soupravy, a nechali na 20 minut inkubovat při mírném míchání při pokojové teplotě. Reakci jsme zastavili přidáním 100 μ l Stop Solution do každé jamky a jemně zamíchali. To, že jsme opravdu reakci

zastavili, se projevilo jako změna barvy z modré na žlutou. Množství CRP jsme vyhodnotili opticky pomocí ELISA Readeru Bio Tek při 450 nm do 15 minut.

3.11 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení výsledků velikosti nádorů bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel. Přežívání myši bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

3.12 Pokus č. 1: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*

V tomto pokusu bylo použito 30 samic myši C57BL/6N, každé z nich bylo transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. 12. den po transplantaci byly myši rozděleny do 4 skupin po 6 myších: A, B, C, K. Tentýž den začala nádorová terapie.

Schéma dávkování a doby aplikace:

- Skupina A – obden aplikace intratumorálně 50 μ l suspenze sonikovaných *S. maltophilia*-BAM, celkem 6 dávek (den 0,2,4,6,8,10)
- Skupina B – obden aplikace intratumorálně 50 μ l lysin-BAM, celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10)
- Skupina C – obden aplikace 50 μ l sonikovaných bakterií *S. maltophilia*, celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10)
- Skupina K – obden aplikace intratumorálně 50 μ l PBS, celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10). Skupina I sloužila jako kontrolní, neléčená skupina.

V séru byla stanovena hladina CRP v čase 0 (před terapií) a 6, 12 a 24 hodin od zahájení léčby. V těch samých intervalech byla před odběrem krve změřena teplota nádoru a referenčního bodu na druhém boku myši.

Všem skupinám byla následně měřena velikost nádoru a teplota nádoru + referenčního bodu na druhém boku každý druhý den po dobu 14 dnů od počátku terapie. Poslední den pokusu byly myši zabity, poté jim byly vypitvány plíce, které byly vloženy do 4 % formaldehydu až do doby spočítání metastáz.

Příprava preparátů A, B a C pro *i.t.* aplikaci (Kato 2004):

A) Sonikované *S. maltophilia* – BAM:

2 ml sonikovaných bakterií (17 mil/ml PBS) se smíchalo se 100 mikrolitry 15 mM BAM (BAM rozpuštěno v DMSO). Suspenze byla promíchána a nechala se inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l 1 M TRIS/HCl (pH 8,0). Následovala dialýza přes noc ve střevě s MWCO 12 – 14000 proti PBS při 4°C za stálého míchání.

B) Lysin – BAM:

Bylo smícháno 0,45 ml 30 mM lysinu v DMSO (rozpuštěn primárně ve 20 μ l vody) a 0,45 ml 10 mM BAM (BAM rozpuštěno v DMSO). Nechalo se inkubovat při pokojové teplotě 1 hodinu, pro zastavení reakce bylo po inkubaci přidáno 75 μ l TRIS/HCl (pH 8,0). Poté bylo přidáno 5,625 ml PBS a tím vznikl 0,68 mM lysin – BAM, což odpovídá koncentraci BAM u *S. maltophilia* – BAM).

C) Sonikované *S. maltophilia*:

Sonikované bakterie (identická suspenze jako v bodě A) byla dialyzována přes noc ve střevě s MWCO 12 – 14000 proti PBS při 4°C za stálého míchání.

3.13 Pokus č. 2: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a perorálním podáváním beta glukanu

Pro tento pokus bylo použito 30 samic myši C57BL/6N, každé bylo transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10.

12. den po transplantaci melanomu byly myši rozděleny do 6 skupin po 5 myších: A, B, C, D, E, K. Tentýž den začala léčba.

Schéma dávkování a doby aplikace:

- Skupina A – každý druhý den aplikace intratumorálně 50 μ l sonikované suspenze *S. maltophilia*, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.
- Skupina B – každý druhý den aplikace intratumorálně 50 μ l suspenze *S. maltophilia* v PBS, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.

- Skupina C – každý druhý den aplikace intratumorálně 50 µl sonikované suspenze *S. maltophilia*, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10, a k tomu každý den perorální aplikace 50 µl beta glukanu.
- Skupina D – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl suspenze *S. maltophilia* v PBS, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10, a k tomu každý den perorální aplikace 50 µl beta glukanu.
- Skupina E – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl PBS, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10, a k tomu každý den perorální aplikace 50 µl beta glukanu.
- Skupina K – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl PBS (kontrola), celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Pozn: Suspenze *S. maltophilia* měla v tomto experimentu 410 mil. bakterií /ml PBS, sonikovaná suspenze byla připravena jejím ozvučením.

Před terapií (čas 0) a pak po 6, 12 a 24 hodinách byla měřena teplota nádoru + referenčního bodu na druhém boku.

Všem skupinám byla následně měřena velikost nádoru a teplota nádoru + referenčního bodu na druhém boku každý druhý den po dobu 14 dnů od počátku terapie.

3. 14 Pokus č. 3: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a PalKGGK

Pro tento pokus bylo použito 20 samic myši C57BL/6N, každé bylo transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10.

12. den po transplantaci melanomu byly myši rozděleny do 4 skupin po 5 myších: A, B, C a K. Tentýž den byla zahájena léčba.

Schéma dávkování a doby aplikace:

- Skupina A – každý druhý den aplikace intratumorálně 50 µl sonikované suspenze *S. maltophilia*, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.
- Skupina B – každý druhý den aplikace intratumorálně 50 µl suspenze *S. maltophilia* v PBS, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.

- Skupina C – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl 3mM PaIKGGK v PBS, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.
- Skupina D – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl 3 mM PaIKGGK v sonikované suspenzi *S. maltophilia*, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.
- Skupina E – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl PaIKGGK v suspenzi *S. maltophilia* v PBS, celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.
- Skupina K – každý druhý den intratumorálně aplikace 50 µl PBS (kontrola), celkem 6x, dny 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Pozn: Suspenze *S. maltophilia* měla v tomto experimentu 410 mil. bakterií /ml PBS, sonikovaná suspenze byla připravena jejím ozvučením.

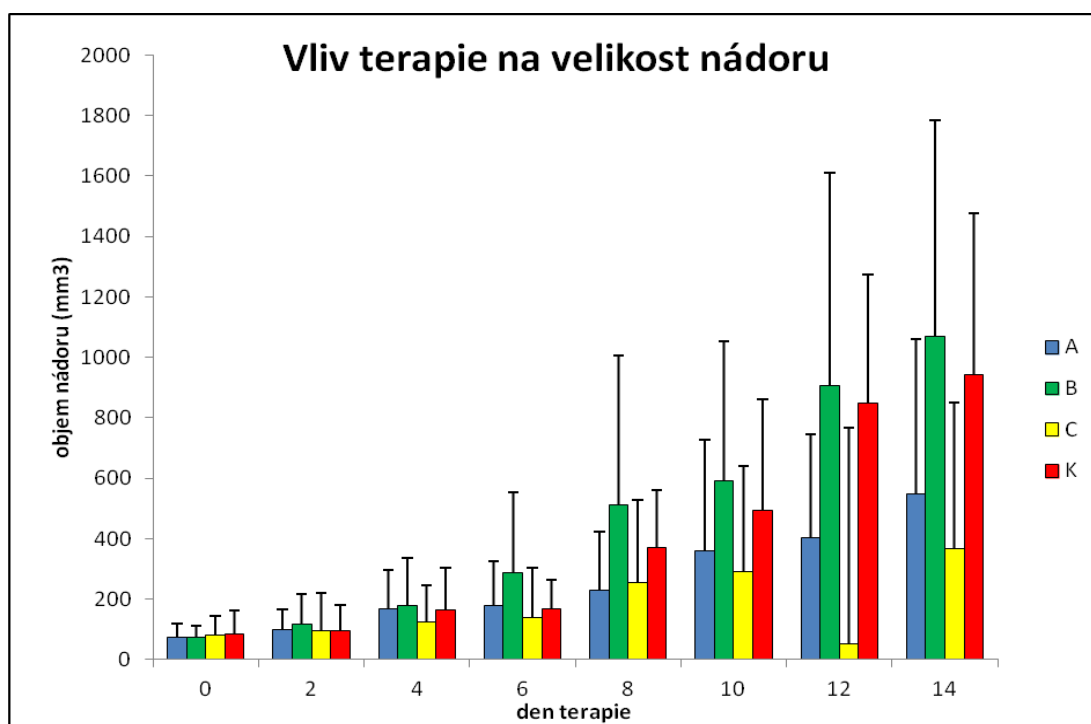
Před terapií (čas 0) a pak po 6,12 a 24 hodinách byla měřena teplota nádoru + referenčního bodu na druhém boku.

Všem skupinám byla následně měřena velikost nádoru a teplota nádoru + referenčního bodu na druhém boku každý druhý den po dobu 14 dnů od počátku terapie.

4. Výsledky

4.1 Pokus č. 1: Přírozně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*

Výsledky jsou uvedeny na obrázku 3. Vyplývá z něj, že sonikované bakterie *S. maltophilia* vykazovaly statisticky nevýznamnou redukci nádorového růstu, přičemž na ni přítomnost kotvení pomocí BAM nemělo vliv. Samotné kotvení (lysin – BAM) růst nádorů neovlivňuje.

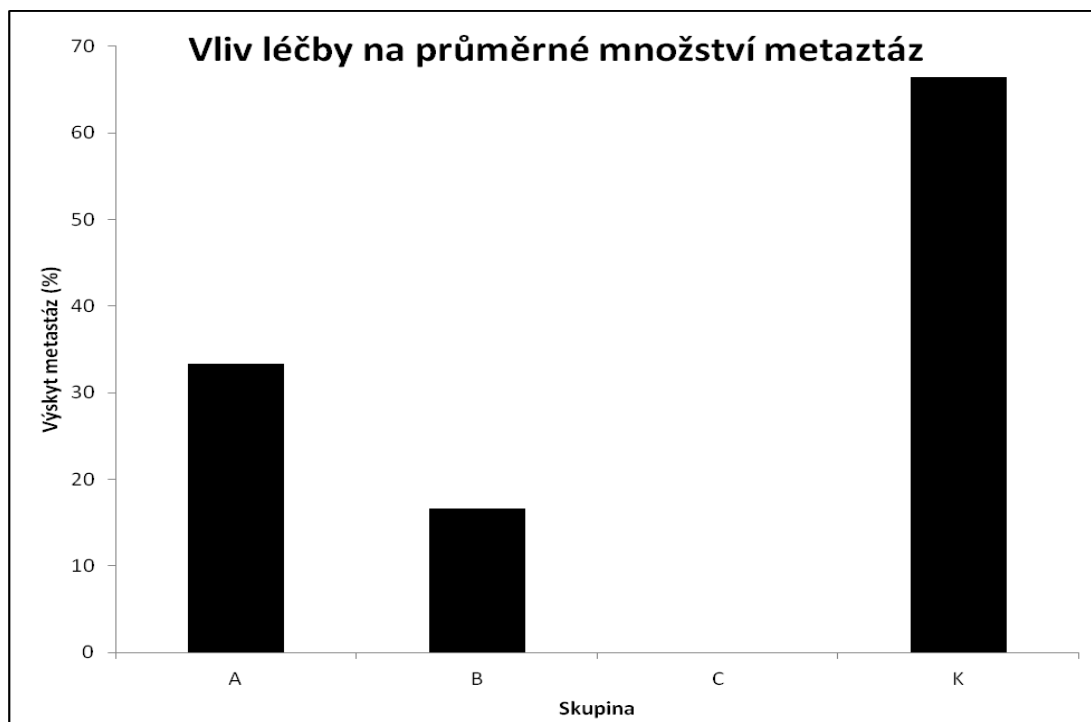


Obr. 3: Vliv terapie na velikost nádoru: Skupina A – léčena *S. maltophilia* – BAM, skupina B – léčena lysin – BAM, skupina C – léčena sonikovanými *S. maltophilia* a skupina K je kontrolní (PBS).

V příloze 1, obrázek 12 je graficky znázorněna povrchová teplota nádorů (P) a teplota kontrolního bodu na druhém boku myši (L). Teploty během experimentu stále klesaly a neodrážely tak průběh terapie.

Na obrázku 4 je znázorněn vliv léčby na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách. U kontrolní skupiny K mělo 66,4 % myší metastáze, oproti tomu se ve skupině C neobjevily metastáze u žádné z myší.

Na obrázku 5 je pak znázorněn vliv léčby na intenzitu metastazování ve skupinách (průměrný počet metastáz na myš s metastázemi). Ve skupině A je intenzita metastazování vyšší než u kontrolní skupiny K, naopak ve skupinách B a C je výskyt metastáz oproti kontrole nižší. U skupiny C nebyly dokonce nalezeny metastáze žádné.

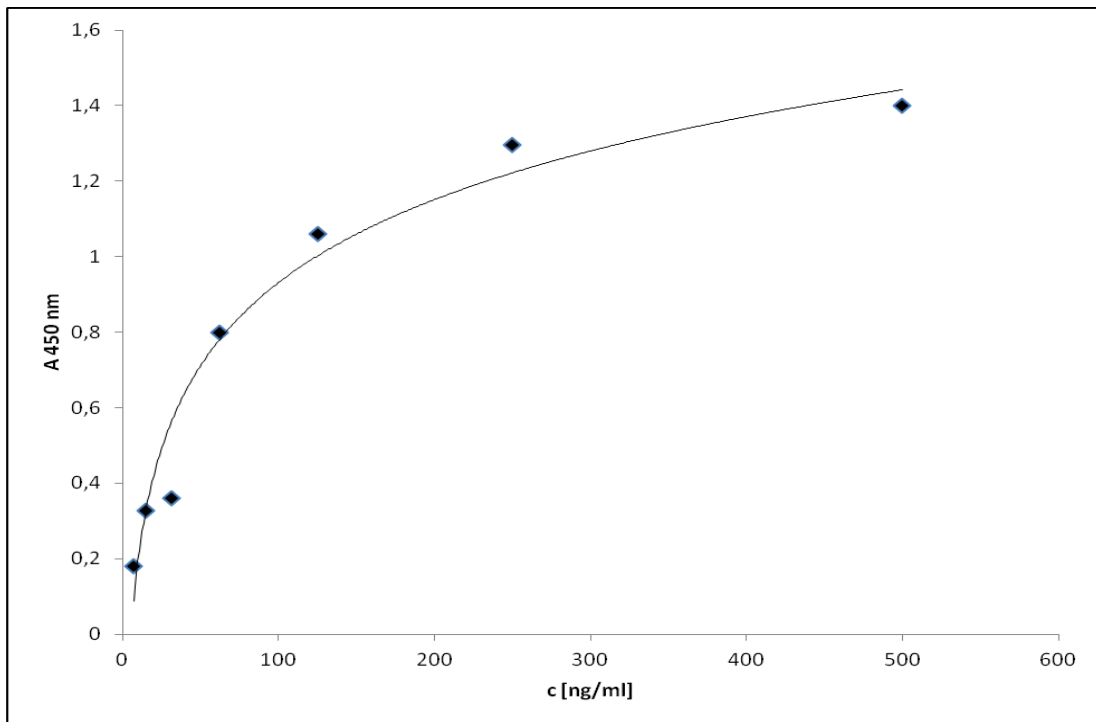


Obr. 4: Vliv léčby na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách: Skupina A – léčená *S. maltophilia* – BAM, skupina B – léčená lysin – BAM, skupina C – léčená sonikovanými *S. maltophilia* a skupina K je kontrolní (PBS).



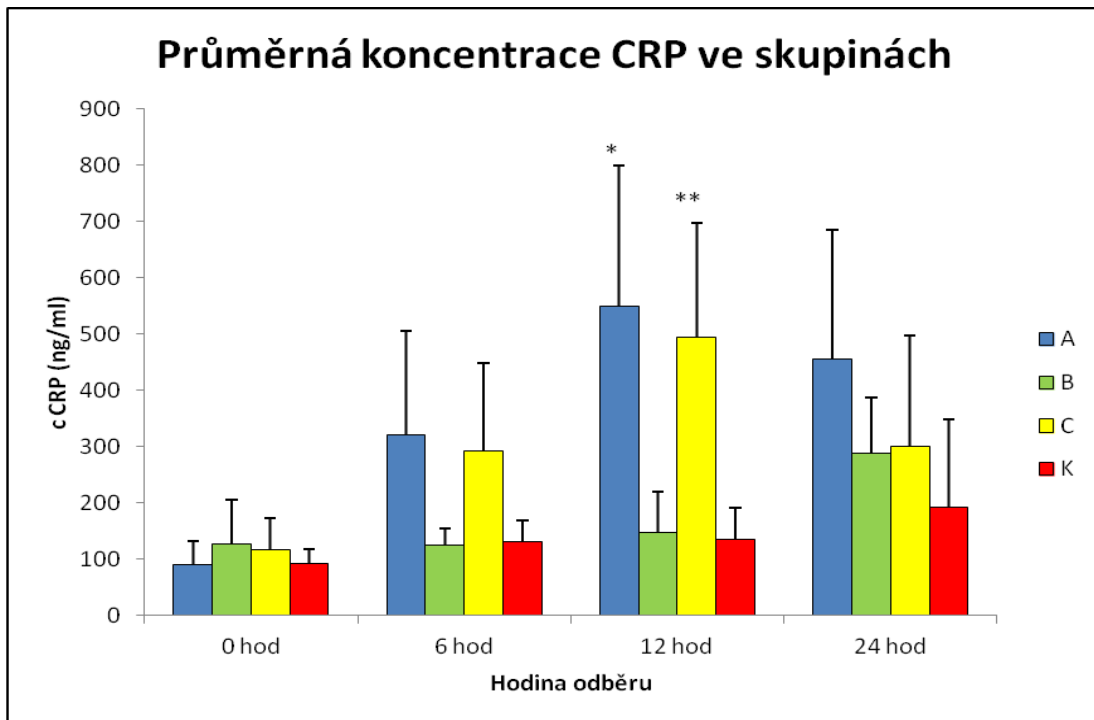
Obr. 5: Vliv léčby na intenzitu metastazování: Skupina A – léčena *S. maltophilia* – BAM, skupina B – léčena lysin – BAM, skupina C – léčena sonikovanými *S. maltophilia* a skupina K je kontrolní (PBS).

Při stanovování CRP v séru myší byla nejprve sestrojena kalibrační křivka – obrázek 6. Byla vypočtena rovnice regrese $y = 0.3171 \cdot \ln x - 0.5289$, kde y je zjištěná absorbance při 450 nm a x je koncentrace CRP.



Obr. 6: Kalibrační křivka pro zjištění koncentrace myšního CRP.

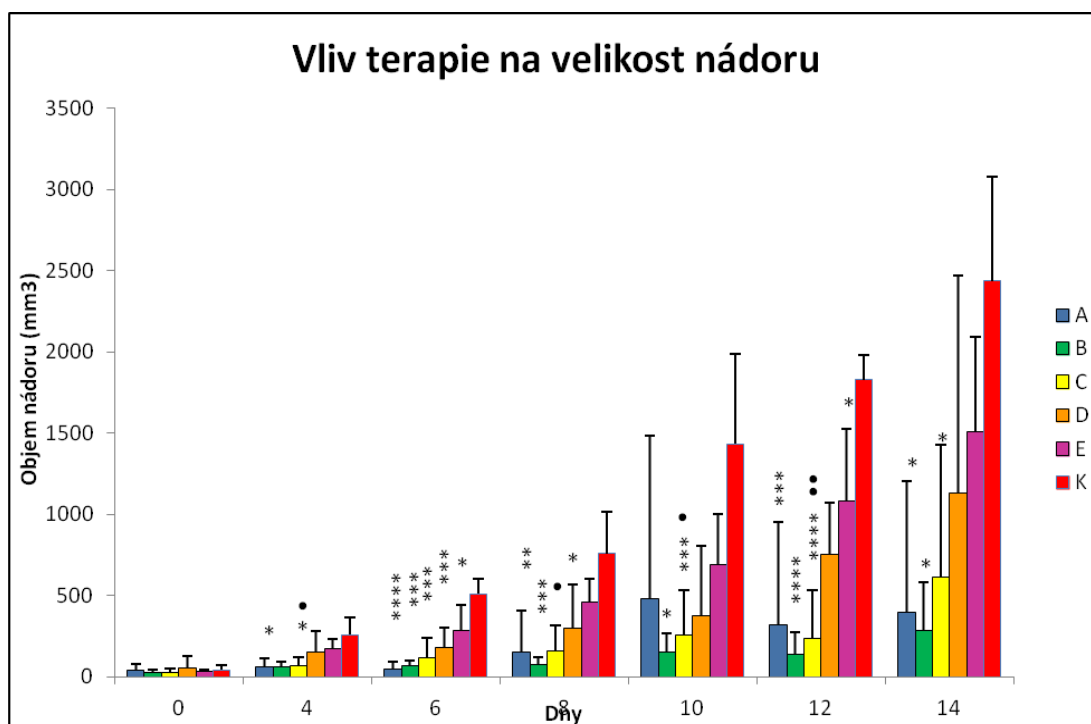
S použitím této kalibrace byly stanoveny hladiny CRP ve vzorcích séra. Výsledek je uveden na obrázku 7. Vyplývá z něj, že oba preparáty se *S. maltophilia* zvýšily během 12 hodin hladinu CRP.



Obr. 7: Průměrná koncentrace CRP ve skupinách: Skupina A – léčená *S. maltophilia* – BAM, skupina B – léčená lysin – BAM, skupina C – léčená sonikovanými *S. maltophilia* a skupina K je kontrolní (PBS). Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou K: * = $P \leq 0,05$ ** = $P \leq 0,01$.

4.2 Pokus č. 2: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a perorálním podáváním beta glukanu

V tomto pokusu jsme sledovali přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí *Stenotrophomonas maltophilia* a beta glukanu.



Obr. 8: Vliv terapie na velikost nádoru: Skupina A – léčená sonikovanými *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčená celými *S. maltophilia*, skupina C – léčená sonikovanými *S. maltophilia* a perorálně podáván beta glukau, skupina D – léčená celými *S. maltophilia* a perorálně podáván beta glukau, skupina E – *i.t.* aplikováno PBS a perorálně podáván beta glukau, skupina K – kontrolní (PBS). Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou K: * = $P \leq 0,05$ ** = $P \leq 0,01$ *** = $P \leq 0,005$ **** = $P \leq 0,0001$. Statistická významnost pro skupiny léčené beta glukauem vztahovaná ke kontrolní skupině E: • = $P \leq 0,5$ •• = $P \leq 0,01$.

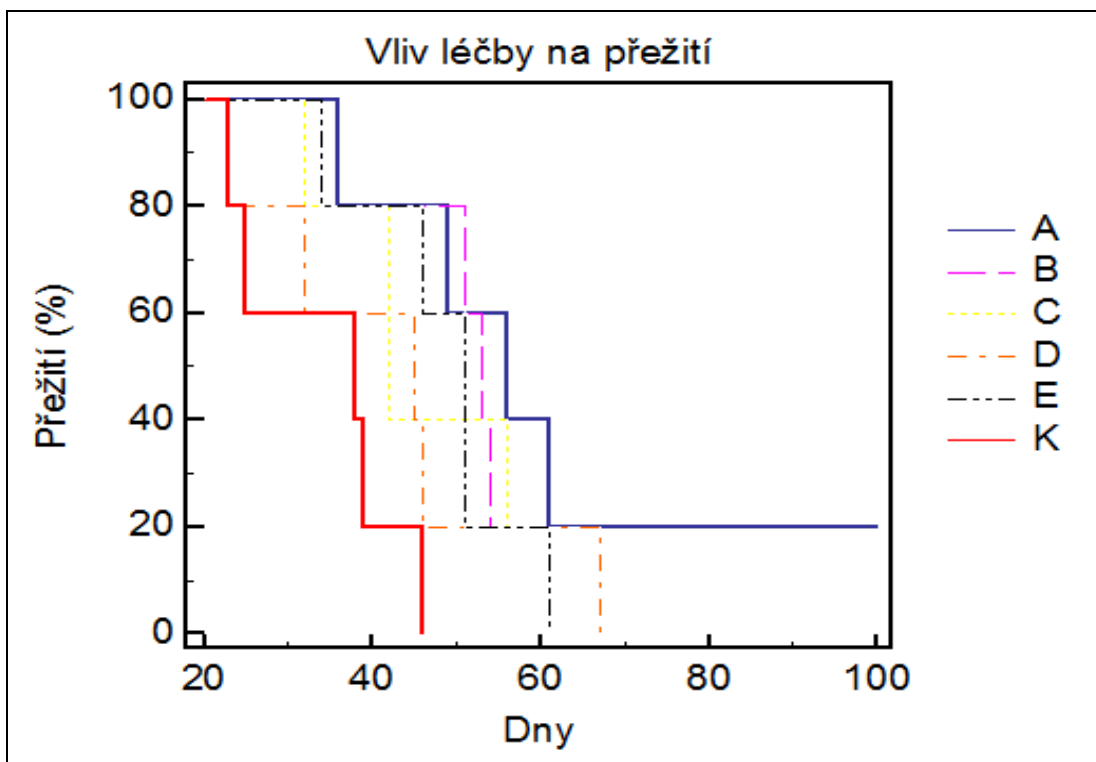
Suspenze sonikovaných i celých bakterií statisticky významně redukovaly růst nádorů, účinek celých bakterií byl zejména v druhé části experimentu vyšší, tento rozdíl však nebyl statisticky významný. Nižšího, nicméně stabilně statisticky významného snížení růstu nádorů bylo rovněž dosaženo perorální aplikací beta glukau. Spojení terapie založené na perorální aplikaci beta glukau s terapiemi založenými na *i.t.* aplikaci sonikovaných resp.

celých bakteriích *S. maltophilia* nepřineslo očekávaný účinek, výrazný účinek bakterií se nepodařilo dále prohloubit.

Naměřené průměrné povrchové teploty nádoru (P) a průměrné teploty kontrolního bodu na druhém boku (L) jsou uvedeny v příloze 2 na obrázku 13. Rozdíly mezi teplotou v místě nádoru a v místě bez nádoru nejsou markantní. Všechny hodnoty se pohybují na přibližně stejné úrovni. Stejně tak rozdíly v teplotě při zahájení léčby a při konci léčby jsou malé, teploty jsou velmi vyrovnané.

Myši byly ponechány na pozorování pro zjištění doby přežití.

Vliv léčby na přežití je znázorněn na obrázku 9. Kontrolní skupina uhynula jako první, nejlepších výsledků dosahovala skupina A, léčená sonikovanými *S. maltophilia*. Jedna myš z této skupiny žije již 165 dní ode dne transplantace bez nádoru.

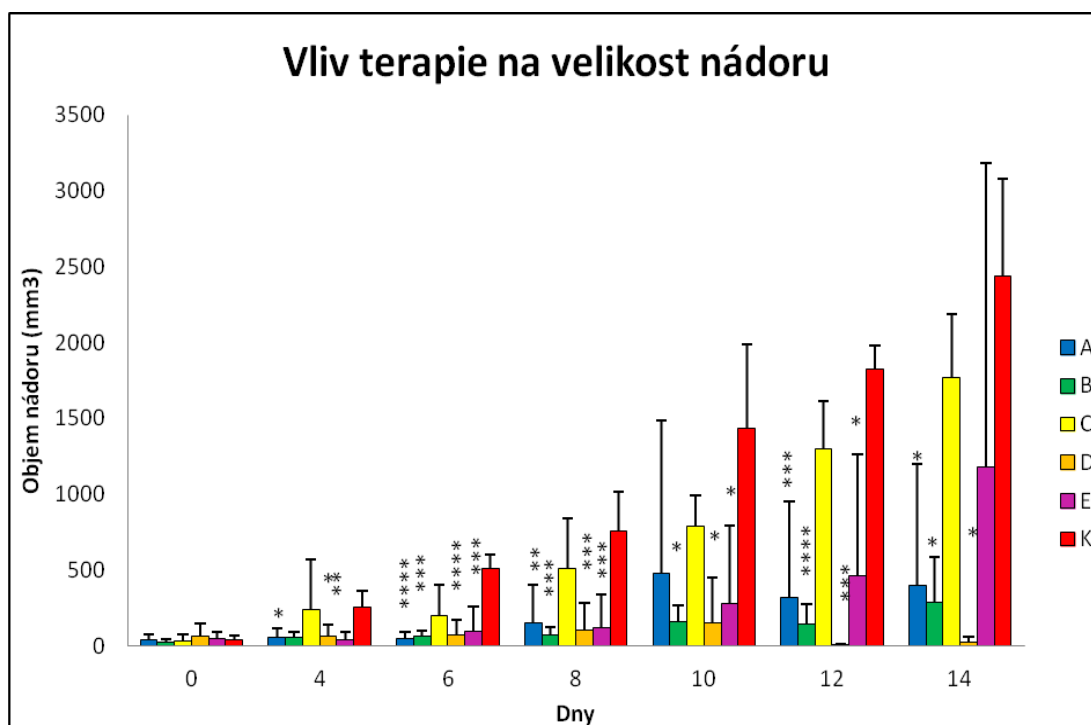


Obr. 9: Vliv léčby na přežití: Skupina A – léčená sonikovanými *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčená celými *S. maltophilia*, skupina C – léčená sonikovanými *S. maltophilia* a perorálně podáván beta glukan, skupina D – léčená celými *S. maltophilia* a perorálně podáván beta glukan, skupina E – *i.t.* aplikováno PBS a perorálně podáván beta glukan, skupina K – kontrolní (PBS).

Statistické významnosti při přežití ve srovnání s kontrolní skupinou K dosáhla kromě zmíněné skupiny A i skupina E, kde byl perorálně podáván beta glukan. Obě dvě skupiny se statistickou významností $P \leq 0,05$.

4.3 Pokus č. 3: Přírozně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a PalKGGK

Sledovali jsme ovlivnění růstu melanomu B16-F10 pomocí PalKGGK (skupina C) a suspenze sonikovaných a celých *S. maltophilia* v kombinaci s PalKGGK (skupiny D, E). Toto sledování probíhalo současně s předchozím pokusem a skupiny C, D, E byly srovnávány se skupinami A, B a K uvedenými v předešlém pokuse. Rozdělení výsledků do dvou grafů bylo provedeno v zájmu přehlednosti grafů.



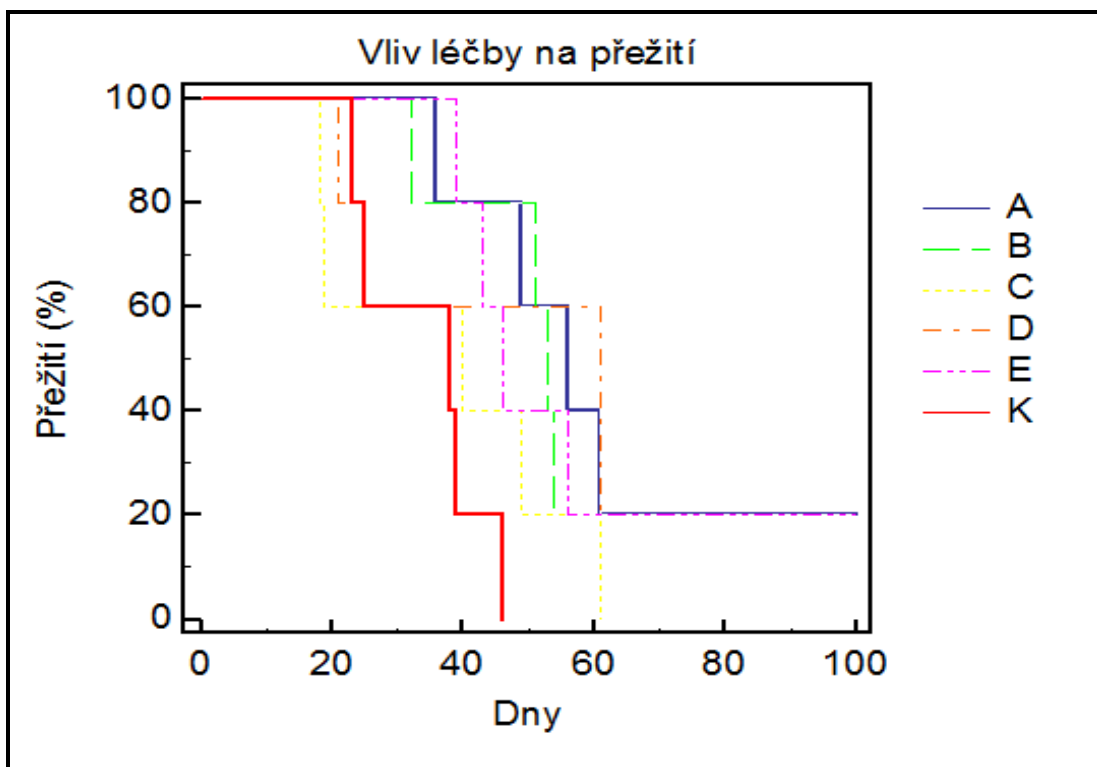
Obr. 10: Vliv terapie na velikost nádoru: Skupina A – léčená sonikovanými *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčená celými *S. maltophilia*, C – léčená PalKGGK v PBS, skupina D – léčená PalKGGK v sonikované suspenzi *S. maltophilia*, skupina E – léčená PalKGGK v suspenzi celých *S. maltophilia*, skupina K – kontrolní (PBS). * = $P \leq 0,05$ ** = $P \leq 0,01$ *** = $P \leq 0,005$ **** = $P \leq 0,0001$

PalKGGK vykazoval poměrně slabý vliv na růst nádorů. Jeho přidání zvýšilo zejména ke konci experimentu výrazně protinádorový účinek sonikovaných bakterií *S. maltophilia*. Přidání PalKGGK do suspenze celých bakterií k dalšímu prohloubení účinku celých bakterií však nepřispělo.

V příloze 3 na obrázku 14 jsou znázorněny naměřené průměrné povrchové teploty nádoru (P) a průměrné teploty kontrolního bodu na druhém boku (L). Rozdíly mezi teplotou v místě nádoru a v místě bez nádoru nejsou markantní. Všechny hodnoty se pohybují na přibližně stejné úrovni. Stejně tak rozdíly v teplotě při zahájení léčby a při konci léčby jsou malé, teploty jsou velmi vyrovnané.

Myši byly ponechány na pozorování na přežití.

Vliv léčby na přežití je znázorněn na obrázku 11. Kontrolní skupina uhynula jako první, nejlepších výsledků kromě skupiny A, již diskutované v minulém pokuse a uvedené zde jen kvůli srovnání, dosahovala skupina D a E, tedy skupiny s PalKGGK. Z každé z těchto skupin jedna myš žije již déle než 100 dní.



Obr. 11: Vliv léčby na přežití: Skupina A – léčená sonikovanými *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčená celými *S. maltophilia*, C – léčená PaKGGK v PBS, skupina D – léčená PaKGGK v sonikované suspenzi *S. maltophilia*, skupina E – léčená PaKGGK v suspenzi celých *S. maltophilia*, skupina K – kontrolní (PBS).

Statistické významnosti při přežití ve srovnání s kontrolní skupinou K dosáhla kromě skupiny A i skupina E, kde byla podávána suspenze celých *S. maltophilia* s PaKGGK. Obě dvě skupiny se statistickou významností $P \leq 0,05$.

5. Diskuse

Bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* byly zkoumány proto, že mají pozitivní náboj, který jim umožňuje adhezi na negativně nabitě povrchy (Jucker a kol. 1996). Nádor má náboj negativní (Okuyama a kol. 1984). Proto jsme předpokládali, že se bakterie díky pozitivnímu náboji naváže na nádorové buňky a bude proti nim směřovat útok na úrovni vrozené imunity. Její terapeutické působení se projevilo velmi výrazně ve všech pokusech. Potvrdila se tím teorie, že bakterie pomáhají při terapii nádorů (Sznol a kol. 2000, Coley 1906).

Bakterie se v léčbě nádorů používají převážně ve formě tzv. Coley toxinu (inaktivovaná směs *S. erysipelas* a *B. prodigiosus*), který byl testován v mnoha pracích. Ve většině z nich měl prokazatelné účinky na eradikování nádoru (Johnston a Novales 1962, Johnston 1962, Coley 1906). Účinky *S. maltophilia* je obtížné srovnávat s účinností léčby, kterou prováděl Dr. Coley, protože ten prováděl léčbu na karcinomech a sarkomech, kde u sarkomu dosáhl lepších výsledků, u karcinomů dosáhl pouze částečného zlepšení (Nauts a kol. 1945). Johnston a Novales testovali použití Coleyho toxinu i u pacientů s melanomem, kde měly prokazatelnou odezvu na léčbu, ale injikovali látku intravenózně a s vedlejšími následky (Johnston a Novales 1962) V našem případě při intratumornální aplikaci *S. maltophilia* nedocházelo ke zřetelnému zhoršení zdravotního stavu testovaných myší.

Dále se v léčbě rakoviny používá BCG – Bacillus Calmette – Guérin (atenuované *Mycobacterium bovis*). Aplikace BCG na buňky melanomu B16 u myší nevykazovala dobré výsledky. BCG snižoval růst nádoru velmi málo, neposiloval protinádorovou imunitu a ani neovlivnil snížení počtu metastáz (Kreider a kol. 1976).

Účinky *S. maltophilia* byly ve srovnání s BCG daleko příznivější a to jak na úrovni redukce nádorového růstu až eliminace nádorů, tak na úrovni potlačení metastazování a prodloužení přežití včetně úplného dlouhodobého vyléčení. V prvním pokusu jsme se zabývali tím, zda připojení molekul BAM na sonikovanou suspenzi *S. maltophilia* zvýší účinnost léčby či nikoliv. Předpokládalo se, že *S. maltophilia* spojené s BAM budou mít větší účinek, protože BAM je ukotví k nádoru (Kato a kol. 2004) Tento předpoklad se však nepotvrdil, z pokusu vyplývá, že navázané molekuly BAM na částice *S. maltophilia* neměla na eradikování nádoru vliv BAM je sice schopen ukotvit i celé buňky, v případě *S.*

maltophilia je však zřejmě toto kotvení nadbytečné a o funkční a účinné ukotvení se plně postará jejich kladný náboj.

Jaká je skutečná role náboje je však otázkou, neboť tento náboj nelze od unikátního povrchu odseparovat a použitím jiné, byť gramnegativní bakterie, nelze zase zaručit identitu s těmito unikátními povrchy. Dle práce Underhilla a Gantnera (2004) je pro účinnou imunitní odpověď nutná synergie signálních a kotvených fagocytárních motivů. Celé *S. maltophilia* i jejich sonikované části jsou zřejmě dostatečnými, co se týče nabídky PAMPs pro obě skupiny receptorů. *S. maltophilia* jakožto gramnegativní bičíkaté bakterie obsahují jak LPS, tak flagellin, tak nepochybně řadu dalších stimulů pro TLR. Proto zřejmě další přidání beta glukanu v druhém experimentu již nemělo žádný efekt. Terapeutický efekt se však projevil při podávání samotného beta glukanu, což potvrdilo tvrzení, že beta glukán má terapeutický účinek v protinádorové imunitě, aktivuje neutrofilů, makrofágy a NK buňky (Větvička a kol. 1996).

Na rozdíl od experimentů s kotvením laminarinu (Auerová, *in prep.*), mannanu (Bruzlová, *in prep.*), formylmethioninových peptidů (Čunátová a Vlčková, *in prep.*), kde byl prokázán výrazný pozitivní účinek kotvení na protinádorovou aktivitu těchto látek, v případě *S. maltophilia* tomu tak není. Je to dáno pravděpodobně kotvením *S. maltophilia* elektrostaticky na nádorové buňky, ale i tím, že *S. maltophilia* i jeho fragmenty jsou dostatečně velkými komplexními strukturami, vyhovujícími uvedenému požadavku na kotvení fagocytárních motivů.

Zdá se tedy, že při použití *S. maltophilia* lze jen obtížně hledat další vylepšení na úrovni imunologické kostimulace. Proto jsme pozornost obrátili na použití jiného protinádorového prostředku, přímo na imunitě nezávisle působícího, a tím se stal PalKGGK.

Tento velmi krátký lipopeptid, který účinně ničí bakterie (Makovitzki a kol. 2006), působil jen částečnou statisticky nevýznamnou redukcí nádorového růstu. V kombinaci se sonikovanými bakteriemi *S. maltophilia* však došlo k žádanému a výraznému synergickému působení. Na druhou stranu jeho kombinace s celými bakteriemi *S. maltophilia* měla opačný efekt. Jaké jsou příčiny tohoto antagonismu, je obtížné posoudit. Snad jimi mohla být kompetice ve vazbě na záporně nabitě nádorové buňky.

Ve skupinách, kde byly celé i sonikované bakterie *S. maltophilia* s PalKGGK, došlo k tomu, že z každé skupiny vždy u jedné myši úplně zmizel melanom a tyto myši se jeví jako úplně vyléčené. Jelikož totéž jsme pozorovali i ve skupině se sonikovanými *S. maltophilia*,

je pravděpodobné, že tento pozoruhodný jev souvisí spíše s terapeutickým efektem bakterií samotných.

Sledování hladiny CRP jakožto proteinu akutní fáze umožnilo sledovat aktivaci zánětu v první části experimentu. Pro dlouhodobější sledování však toto stanovení díky traumatickému odběru krve u myši není příliš vhodné. Zrovna tak sledování teploty nádoru a okolí se pro monitorování tohoto typu experimentů neosvědčilo.

6. Závěr

- Zjistili jsme velmi výrazný terapeutický účinek při intratumorálním podávání sonikovaných i celých mrtvých bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* projevující se výraznou redukcí růstu melanomů, redukcí metastázování, prodloužením přežívání myši s těmito nádory i eradikací nádorů vedoucí k úplnému uzdravení.
- Zjistili jsme, že v nádoru dochází po zahájení léčby suspenzí sonikovaných bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* k zánětu, který jsme prokázali testováním hladiny CRP v myším séru.
- Snaha o zlepšení účinnosti terapie založená na kotvení fragmentů *S. maltophilia* k nádorovým buňkám, případně kombinací s imunostimulujícím prostředkem (beta glukan) se ukázala jako marná.
- Zjistili jsme, že výpovědní hodnota teplot v místě nádoru a mimo nádor je neprůkazná a neodpovídá způsobu ani průběhu léčby.

7. Seznam literatury

- ANDĚLOVÁ, H. *Infekce Francisella Tularensis, aneb chytrý způsob jak uniknout jisté smrti*. ACTA MEDICA (Hradec Králové) SUPPL. 2004, 47(1), s. 13-17 .
- BARNHILL, R. L.; PIEPKORN, M.; BUSAM, K. J. *Phatology of Melanocytic Nevi and Malingnant Melanoma*. Springer-Verlag New York. 2004, 406 s.
- BARTUŇKOVÁ, J. *Imunodeficiency*. Grada Publishing a.s. 2002, 228 s.
- BICKELS, J. B.; KOLLENDER, Y.; MERINSKI, O.; MELLER, I. *Coley's Toxin: Historical Perspective*. Isr Med Assoc J. 2002, 4(6), str. 471-472.
- BORDEN, E. C.; BAILIN, P. J.; MEINE, J. S.; a kol. *Melanoma Biologically Targeted Therapeutics*. Humana Press. 2002, 389 s.
- BOSSERHOFF, A.; STRIZZI, L.; ABDEL-MALEK, Z. A.; a kol. *Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*. Springer Wien New York. 2011, 376 s.
- CANN, S. A. H.; NETTEN, J. P. *Dr William Coley and Tumour Regression: A Place in History or in the Future*. Postgrad Med J. 2003, 79, s. 672-680.
- COLEY, W. B. *Late Results of the Treatment of Inoperable sarkoma by the Mixed Toxins of Erysipelas and Bacillus prodigiosus*. AJMS. 1906, 131(3), s. 375-430.
- CUI, Z. *The Winding Road to the Discovery of the SR/CR Mice*. Cancer Immun. 2003, 3 (14), s. 1-10.
- 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 Unixe Genetically Determined, Age-depend Trait in Mice*. PNAS. 2003, 100(11), s. 6682-6687.
- CWIERTKA, K.; TROJANEC, R.; ŠPAČKOVÁ, K.; HAJDÚCH, H. *Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii*. Klin Farmakol Farm. 2004, 18, s. 165-170.
- DAVID, J. *Cancer Care: Prevention, Treatment and Palliation*. Chapman & Hall. 1995, 433 s.
- DE LA MAZA, L. M.; PEZZLO, M. T.; SHIGEI, J. T.; a kol. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. ASM Press. 2004, 326 s.
- DENTON, M.; KERR, K. G. *Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with Stenotrophomonas maltophilia*. CMR. 1998, 11(1), s. 57-80.

- DOLEŽÍLKOVÁ, I.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T. *Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou*. Chem. Listy. 2011, 105, s. 346-355.
- FERENČÍK, M.; ROVENSKÝ, J.; SHOENFELD, Y.; a kol. *Imunitní systém: informace pro každého*. Grada Publishing a.s. 2005, 236 s.
- FOON, K. A. *Biological Therapy of Cancer*. Breast Cancer Res Treat. 1986, 7(1), s. 5-14.
- FRANKS, L. M.; TEICH, N. M. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press. 1999, 458 s.
- HEARING, V. J.; LEONG, S. P.; SILVER, D. L.; a kol. *From Melanocytes to Melanoma: The Progression to Malignancy*. Humana Press. 2006, 678 s.
- HICKS, A. M.; RIEDLINGER, G.; WILLINGHAM, M. C.; ALEXANDER-MILLER, M. A.; KAP-HERR, C. V.; PETTENATI, M. J.; SANDERS, A. M.; WEIR, H. M.; KIM, J.; SIMPSON, A. J. G.; OLD, L. J.; CUI, Z. *Transferable Anticancer Innate immunity in Spontaneous Regression/ Complete Resistance Mice*. PNAS. 2006, 103 (20), s. 7753-7758.
- HOŘEJŠÍ, V.; BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. TRITON. 2009, 320 s.
- 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 Tumors Implanted in Nude Mouse*. Jpn Cancer Res. 1986, 77(2), s. 190-196.
- JÍLEK, P. *Základy imunologie*. Ewopharma s.r.o. 2005, 75 s.
- JOHNSTON, B. J. *Clinical Effect of Coley's Toxin. I. A Controlled Study*. Canc Chemother Rep. 1962, 21, s. 19-41.
- JOHNSTON, B. J.; NOVALES, T. *Clinical Effect of Coley's Toxin. II. A Seven-year Study*. Canc Chemother Rep. 1962, 21, s. 43-68.
- JUCKER, B. A.; HARMS, H.; ZEHNDER, J. B. *Adhesion of the Positively Charged Bacterium Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia 70401 to Glass and Teflon*. JB. 1996. 178(18), s. 5472-5479.
- KATO, K.; ITOH, CH.; YASUKOUCHI, T.; NAGAMUNE, T. *Rapid Protein Anchoring into the Membrnes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly(rthylene glykol) Derivatives*. Biotechnol Prog. 2004, 20, s. 897-904.
- KLENER, P. *Chemoterapie, minimum pro praxi*. TRITON. 1999, 114 s.

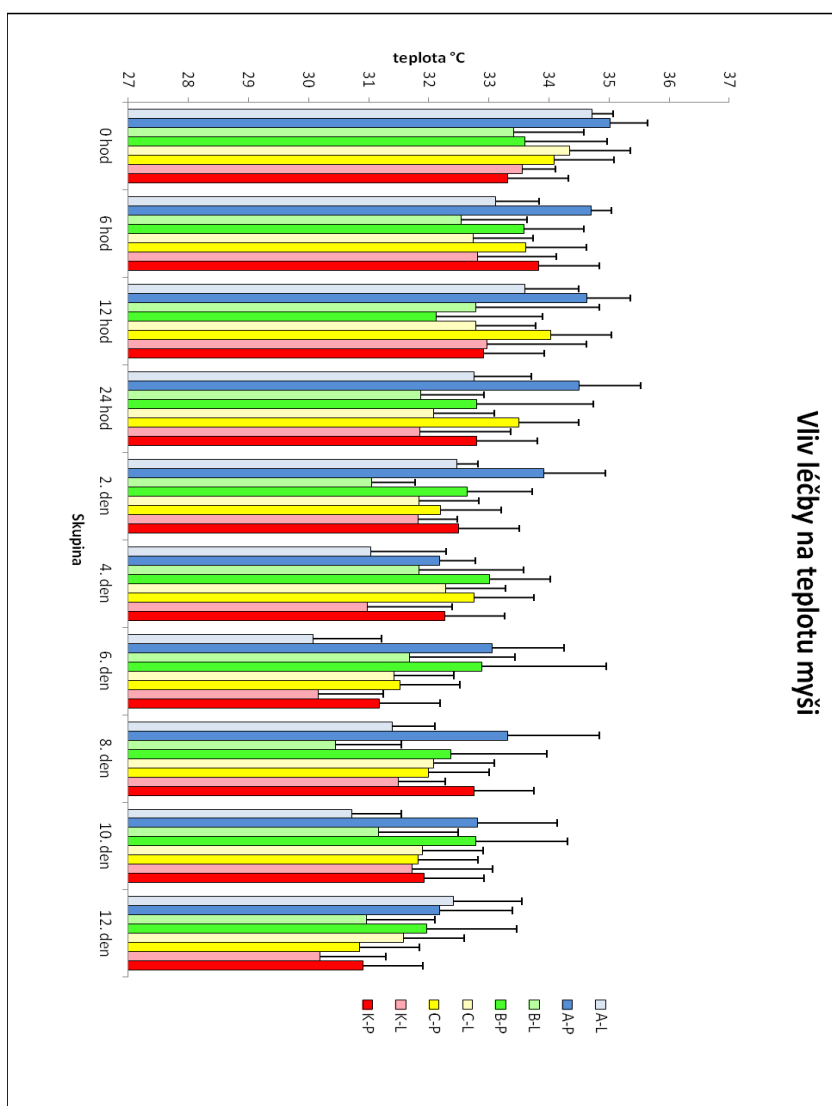
- KLENER, P. *Protinádorová Chemoterapie*. Galén. 1996, 614 s.
- KLENER, P.; KLENER jr., P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada Publishing. 2010, 209 s.
- KREIDER, J. W.; BARTLETT, G. L.; PURNELL, D. M. *Inconsistent Response of B16 Melanoma to BCG Immunotherapy*. J Natl Cancer Inst. 1976, 56(4), s. 803-810.
- KREJSEK, J.; KUDLOVÁ, M.; KOLÁČKOVÁ, M. *Imunitní systém a stárnutí*. Čes Ger Rev. 2005, 3(4), s. 36-42.
- LUKEŠOVÁ, Š.; KOPECKÝ, O.; DVOŘÁK, J.; ŠPRIŇAR, Z.; HLÁVKOVÁ, D. *Interferon alfa v léčbě metastazujícího renálního karcinomu*. Interní Med. 2006, 10, s. 432-438.
- MAKOVITZKI, A.; AVRAHAMI, D.; SHAI, Y. *Ultrashort Antibacterial and Antifungal Lipopeptides*. PNAS. 2006, 103(43), s. 15997-16002.
- MAREK, J.; BARŮŇKOVÁ, J.; BROULÍK, P.; a kol. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. Grada Publishing a.s. 2010, 777 s.
- MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; LENNARSSON, L.; TAMMELA, T.; RAITANEN, M.; HOLMBERG, A. R. *Charge-dependent Targeting: Results in Six Tumor Cell Lines*. Anticancer Res. 2004, 24, s. 1347-1352.
- NAUTS, H. C.; SWIFT, W. E.; COLEY, B. L. *The Treatment of Malignant Tumors by Bacterial Toxins as Developed by the Late William B. Coley, M. D., Rewiewed in the Light of Modern Research*. Cancer Res. 1946, 6, s. 205-216.
- OKUYAMA, S.; AWANO, T.; TAKEDA, S.; YAMADA-YOKOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; MATSUZAWA, T. *Gallium Induces Reduction of Negative Charge of the Cell Membrane and Redifferentiation of Cancer Cells*. Tohoku J Exp Med. 1984, 142(3), s. 347-348.
- PATYAR, S.; JOSHI, R.; BYRAV, D. S. P.; PRAKASH, A.; MEDHI, B.; DAS, B. K. *Bacteria in Cancer Therapy: A Novel Experimental Strategy*. J Biomed Sci. 2010, 17(21), s. 1-9.
- PUSZTAI, L.; LEWIS, C. E.; YAP, E. *Cell Proliferation in Cancer, Regulatory Mechanisms of Neoplastic Cell Growth*. Oxford University Press. 1996, 397 s.
- ROSSENBAUM, E. H.; DOLLINGER, M.; KO, A. H. *Everyone's Guide to Cancer Therapy, How Cancer Is Diagnosed, Treated and Managed Day to Day*. Revised 5th Edition. 2002, 927 s.

- SHARKEY, R. M.; GOLDENBERG, D. M. *Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates*. *Cancer J Clin*. 2006, 56(4), s. 226-243.
- SRB, T. *Zhoubné nádory v roce 2009*. ÚZIS. 2012, s. 1-10.
- SZNOL, M.; LIN, S. L.; BERMUDEZ, D.; ZHENG, L.; KING, I. *Use of Preferentially Replicating Bacteria for the Treatment of Cancer*. *JCI*. 2000, 105(8), s. 1027-1030.
- TANNOCK, I. F.; HILL, R. P.; BRISTOW, R. G.; a kol. *The basic Science of Oncology*. Mc Graw Hill, Medical Publishing Division. 2005, 555 s.
- THAMM, D. H.; KURZMAN, I. D.; KING, I.; LI, Z.; SZNOL, M.; DUBILZIG, R. R.; VAIL, D. M.; MACEWN, E. G. *Systemic Administration of an Attenuated, Tumor-Targeting Salmonella typhimurium to Dogs with Spontaneous Neoplasia: Phase I. Evaluation*. *Clin Cancer Res*. 2005, 11(13), s. 4827 – 4834.
- TOKUNAGA, T.; YAMAMOTO, H.; SHIMADA, S.; ABE, H.; FUKUDA, T.; FUJISAWA, Y.; FURUTANI, Y.; YANO, O.; KATAOKA, T.; SUDO, T. *Antitumor Activity of Deoxyribonucleic Acid Fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, Physicochemical Characterization, and Antitumor Activity*. *J Natl Cancer Inst*. 1984, 72(4), s. 955 – 962.
- TROJAN, S.; LANGMEIER, M.; HRACHOVINA, V.; a kol. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a.s. 2003, 771 s.
- UNDERHILL, D. M.; GANTNER, B. *Integration of Toll – like Receptor and Phagocytic Signaling for Tailored Immunity*. *Microb Infect*. 2004, 6(15), s. 1368–1373.
- VÉGH, V.; VÉGH, T. *Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii*. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(6), s. 388-392.
- VĚTVIČKA, V.; DVOŘÁK, B.; VĚTVIČKOVÁ, J.; RICHTER, J.; KRIZAN, J. *Orally Administered Marine (1→3)-β-D-glucan phycarine Stimulans Both Humoral and Cellular Immunity*. *Int J Biol Macrom* 2007, 40, s. 291-298.
- VĚTVIČKA, V.; THORNTON, B. P.; ROSS, G. D. *Soluble Beta-glucan Polysaccharide Binding to the Lectin Site of Neutrophil or Natural Killer Cell Complement Receptor Type 3 (CD11b/CD 18) Generates a Primed State of the Receptor Capable of Mediating Cytotoxicity of C3b-opsonized Target Cells*. *J Clin Invest*. 1996, 98(1), s. 50-61.

- VORLÍČEK, J.; ABRAHÁMOVÁ, H.; VORLÍČKOVÁ, H.; a kol. *Klinická onkologie pro sestry*. Grada Publishing a.s. 2006, 328 s.
- YABRO, C. H.; VUJCIK, D.; GOBEL, B. H. *Cancer Nursing: Principles and Practice*. Jones and Bartlett Publishers, LLC. 2011, 1940 s.
- ZENKOVIČ, D. B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIČ, M. M.; JAKOVIJEVIČ, D.; MORAN, C. A. *Natural and Modified (1>3)-[beta]-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation*. Crit Rev Biotechnol. 2005, 25(4), s. 205-230.

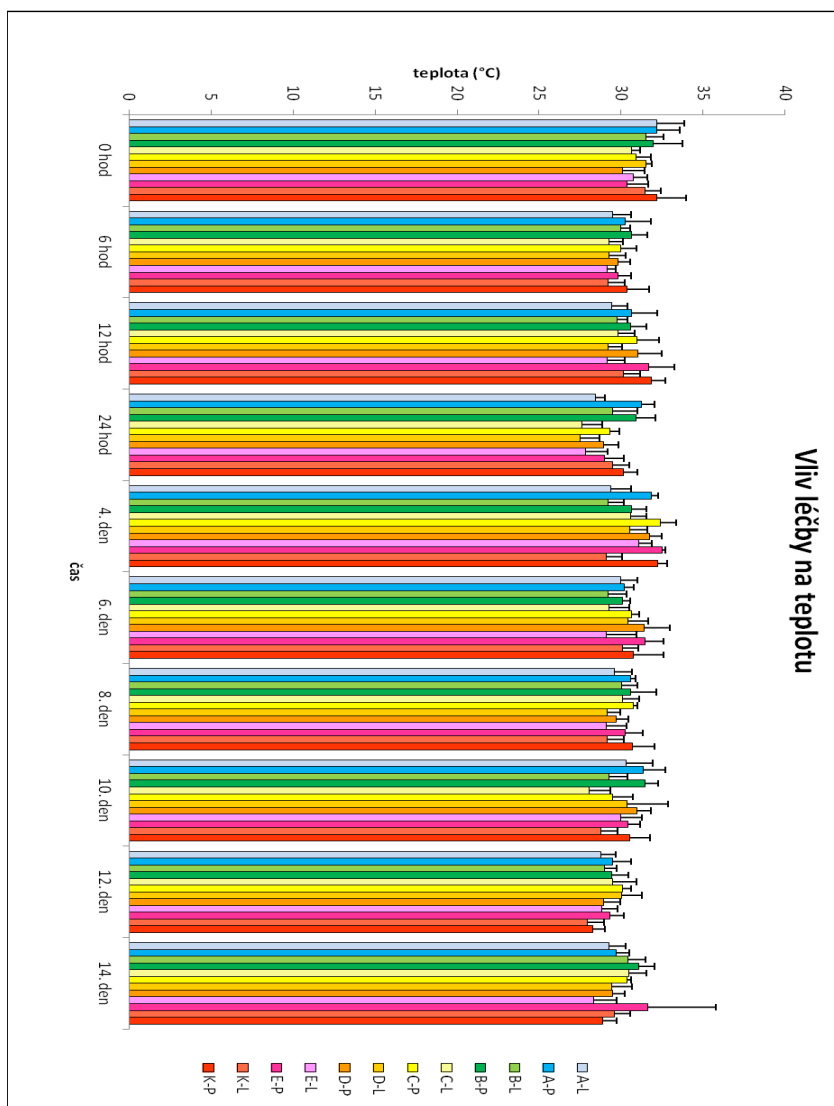
8. Přílohy

8.1 Příloha 1: Grafické znázornění naměřených průměrných povrchových teplot nádoru (P) a průměrných teplot kontrolního bodu na druhém boku (L) – pokus č. 1 (Přirozeně metaztázující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*)



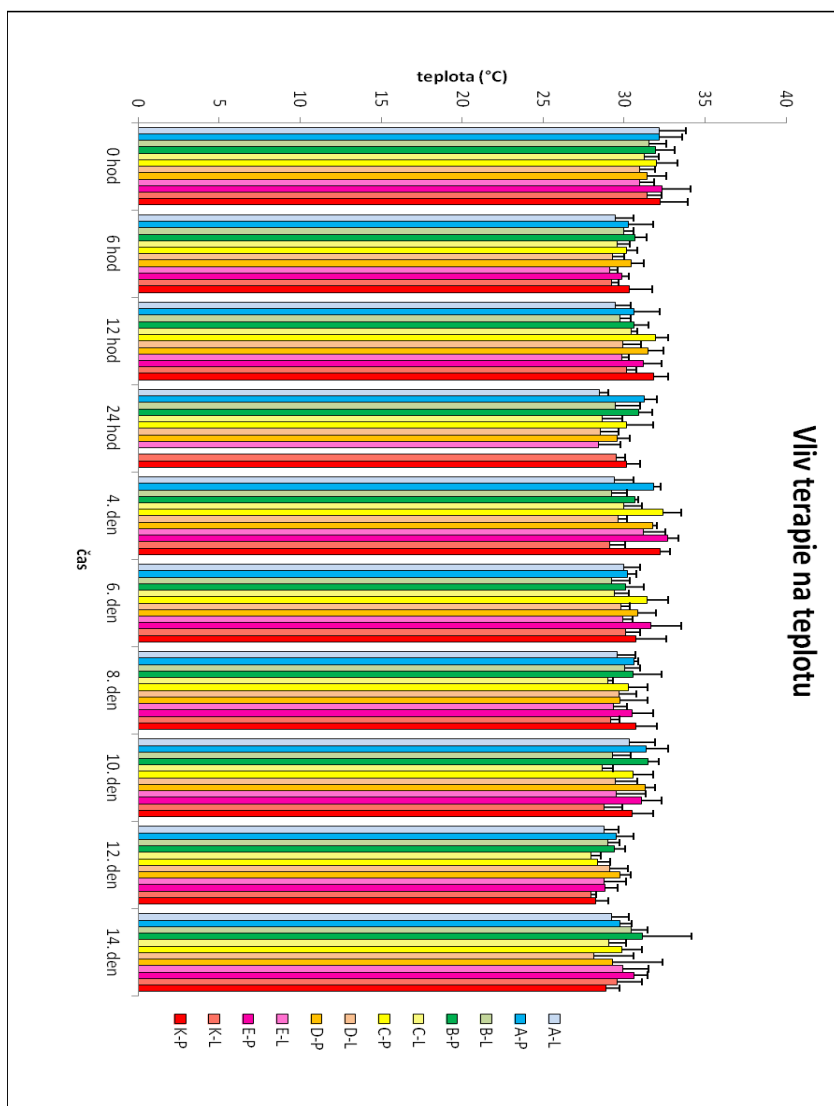
Obr. 12: Vliv léčby na teplotu myši – L- levá strana myši bez nádoru, P-povrchová teplota. Skupina A – léčená *S. maltophilia*-BAM, skupina B – léčená lysin-BAM, skupina C – léčená sonifikovanými *S. maltophilia* a skupina K je kontrolní (PBS).

8.2 Příloha 2: Grafické znázornění naměřených průměrných povrchových teplot nádoru (P) a průměrných teplot kontrolního bodu na druhém boku (L) – pokus č. 2 (Přirozeně metaztázující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a beta glukanu)



Obr. 13: Vliv léčby na teplotu myši - L – levá strana myši bez nádoru, P – povrchová teplota: Skupina A – léčená sonikovanými *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčená celými *S. maltophilia*, skupina C – léčená sonikovanými *S. maltophilia* a perorálně podáván beta glukau, skupina D – léčená celými *S. maltophilia* a perorálně podáván beta glukau, skupina E – *i.t.* aplikováno PBS a perorálně podáván beta glukau, skupina K – kontrolní (PBS).

8.3 Příloha 3: Grafické znázornění naměřených průměrných povrchových teplot nádoru (P) a průměrných teplot kontrolního bodu na druhém boku (L) – pokus č. 3 (Přirozeně metaztázující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a PaKGGK)



Obr. 14: Vliv terapie na teplotu L – levá strana myši bez nádoru, P – povrchová teplota: Skupina A – léčená sonikovavanými *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčená celými *S. maltophilia*, C – léčená PaKGGK v PBS, skupina D – léčená PaKGGK v sonikované suspenzi *S. maltophilia*, skupina E – léčená PaKGGK v suspenzi celých *S. maltophilia*, skupina K – kontrolní (PBS).