

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Bakalářská diplomová práce

Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA

Barbora Svobodová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2012

Svobodová, B., 2012: Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA. [Therapy of melanoma B16-F10 based on LTA application. Bc. Thesis, in Czech] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Therapy of melanoma B16-F10 based on i.t. application of lipoteichoic acid (LTA) was studied. Better results we obtained, when we used combination of LTA with LPS, then in case when LTA was used alone.

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. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 25. 4. 2012

.....

Barbora Svobodová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat svému vedoucímu školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc., za jeho podporu, vstřícný, motivující přístup, za cenné rady při vedení práce a za trpělivost a čas, který mi byl ochoten věnovat. Dále bych chtěla poděkovat rodině a svým přátelům za morální a finanční podporu a kolegyním za přátelskou spolupráci.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Historie	1
1.2 Co je rakovina	2
1.2.1 Příčiny a symptomy nádorových onemocnění	2
1.2.2 Hlavní znaky	3
1.2.3 Ovlivňující faktory	4
1.2.4 Rakovina v číslech	5
1.2.5 Prevence výskytu rakoviny	6
2 Kancerogeneze	7
2.1 Metastazování	8
2.2 Angiogeneze	9
3 Genetika nádorových onemocnění	10
3.1 Geny a rakovina	10
3.2 Nádorová cytogenetika	10
4 Imunitní systém	11
4.1 Vrozená imunita	11
4.1.1 Fagocyty	12
4.1.2 PAMPs	13
5 Látky aplikované v našich experimentech a jejich receptory	14
5.1 LTA	14
5.2 LPS	16
5.3 PAMPs	17
5.4 Toll-like receptory	18
5.5 Náš experimentální model, melanom B16-F10	18
6 Cíl práce	20
7 Materiál a metody	21
7.1 Chemikálie	21
7.2 Laboratorní zvířata	21
7.3 Buněčná linie B16-F10	21
7.4 Příprava melanomových buněk	21
7.5 Počítání metastáz	22
7.6 Měření teploty nádorů	22

7.7 Měření velikosti nádorů	23
7 Statistické vyhodnocování dat	23
8 Přehled experimentů	24
8.1 Pokus č. 1	24
8.2 Pokus č. 2	25
8 Výsledky	26
9.1 Pokus č. 1	27
9.2 Pokus č. 2	30
10 Diskuze	33
11 Souhrn	35
12 Přehled použité literatury	36

1 Úvod

1.1 Historie

„Všichni pronásledovatelé démona nádoru v minulém století museli být fascinováni předmětem svého pronásledování a zároveň museli cítit frustraci z jeho neuchopitelnosti. Se vstupem do nového milénia máme naději, že démon bude nakonec uchopen a že na základě tohoto uchopení najdeme způsob, jak ho přemoci.“ (Alfred GK, 2000).

První zmínky o rakovině pochází již z období starověkého Egypta. V té době ale nebyla medicína tak pokročilá jako v dnešní době, lidé tedy nedokázali toto onemocnění popsat a popsali ji jako nevléčitelnou. Příčina není přesně známá ani dnes, ale současní onkologové jsou schopni popsat příznaky a určit nejvhodnější léčbu.

Původ slova rakovina je připisován řeckému lékaři Hippokratovi (460 až 370 př. n. l.) (Olson, 1989). Hippokrates používal termíny „carcinoma“ nebo „carcinosa“ k popisu, jak se přetvářejí vředy v nádory. Tyto pojmy vznikly pravděpodobně na základě pozorování karcinomů prsu. Tento řecký termín rakoviny byl později přeložen do latinského slova pro raka či kraba (Celsus, 28 až 50 př. n. l.). Vysvětlení pro toto pojmenování vyplývá z popisu šíření nádorů, které svými dlouhými výběžky podobajícími se krabím nohám pronikají do zdravých tkání (Petružela a Konopásek, 2003).

Za dlouhá léta své existence tuto nemoc obklopila mystická aura (Tschuschke, 2004), stala se synonymem smrti, nevléčitelnosti a krutých bolestí. Pro pacienty se v mnohých případech stala zdrojem strachu a obav, přičemž ve spojení s nevědomostí a lhostejným přístupem okolí může vést k nepříjemnému vývoji nemoci (Adamec, 1970). Rakovina je chápána jako symbol zla, přestože existují i další těžká chronická onemocnění, která mohou končit smrtí a v současné době na ně v západních společnostech umírá více lidí než na nádorová onemocnění (Tschuschke, 2004). Přesto má pojem rakovina negativnější ohlasy než například mrtvice nebo infarkt, a tímto vnímáním může způsobit závažné a těžko zvládnutelné psychické stavy (Koutecký a Konopásek, 1999). Proto současní lékaři používají raději termín nádorové onemocnění, také zhoubné nádory a novotvary.

1.2 Co je rakovina

Rakovina je obecný laický pojem používaný pro rozsáhlou skupinu nádorových onemocnění vyskytující se především u starších lidí. Za diagnózou rakoviny se skrývá jeden velký vzor, který se může vyjadřovat v nespočtu obrazů nemocí (Dahlke, 1998). Vznik rakoviny je spojen již se změnou v jediné buňce a tuto změnu můžou vyvolat vnější činitelé i dědičné genetické faktory. V dnešní době je známo více než 100 druhů rakoviny, které jsou obvykle pojmenovány podle orgánu nebo tkáně, kde se vyskytují nebo podle typu buněk, které jsou napadeny. Jak se buňky stávají abnormálními, získávají nové schopnosti, jako je například dovednost uvolnit růstové faktory a trávicí enzymy. Dále pak ovlivňují ostatní normální buňky v okolí, což často vede k poruše funkce napadeného orgánu. Nádorová buňka se liší od normální tím, že se trvale a nekoordinovaně dělí (Sršeň a Sršňová, 1995). Buňka v těle mutuje díky sérii náhodných událostí a získává schopnost proliferovat bez normálních zábran. Potomstvo této buňky zdědí všechny tyto vlastnosti a vzniká z nich nádor, který může neomezeně růst (Alberts, 2005). Všechna zhoubná nádorová onemocnění mají společný charakteristický znak, a to je právě ono vytváření abnormálních buněk charakterizovaných nekoordinovaným růstem, s postupným šířením do okolních tkání, průnikem do mízního a krevního řečiště a postižením vzdálených orgánů (Petružela a Konopásek, 2003). Základním prvkem mutačního procesu je mutace. Látky, které indukují mutace, se označují jako mutageny (Ipser, 2006).

1.2.1 Příčiny a symptomy nádorových onemocnění

Příčiny vzniku rakoviny nelze zcela specifikovat, rakovina je multifaktoriální onemocnění, což znamená, že aby se nemoc rozvinula, potřebuje k tomu souhru různých faktorů. Důležitá je například úprava životního stylu včetně dietetických návyků. Úmrtnost na rakovinu by bylo možné podle odhadů snížit úpravou životního stylu a omezením expozice kancerogenů vnějšího prostředí až o 33 % (Petružela a Konopásek, 2003). Symptomy jsou závislé na tom, kde se rakovina vyskytuje, jak velká je a jak moc ovlivňuje další orgány nebo tkáně. Pokud se rakovina rozšíří, příznaky se mohou objevit v různých částech těla. Může se ale také stát, že se neprojeví žádné symptomy, i přes to, že rakovina roste velmi rychle. Zde se začnou projevovat symptomy až v době, kdy rakovina začne ovlivňovat okolní tkáně a orgány. Pro léčbu je důležité, aby byla diagnóza určena co nejdříve, před tím, než se rakovina rozšíří do

dalších částí těla. To je ale někdy velmi obtížné, poněvadž i přes rychlé rozvinutí příznaků, lidé nekladou důraz například bolesti hlavy, únavě nebo mohou dostat strach z toho, co příznaky mohou znamenat a návštěvu lékaře oddalují. Z tohoto důvodu byly různě ve světě zavedeny preventivní prohlídky, kde ve většině případů dojde k odhalení rakoviny již v brzkém stádiu nemoci, toto zavedla například American Cancer Society.

1.2.2 Hlavní znaky

- nevysvětlitelný úbytek hmotnosti
- horečka
- únava (může být spojená s tím, že některé druhy rakoviny způsobují ztrátu krve)
- bolesti
- kožní změny (například hyperpigmentace)
- žloutenka
- erytém
- svědění (pruritus)
- nadměrný růst vlasů
- změna vyprazdňování močového měchýře nebo jeho funkce
- nehojící se boláky
- bílé skvrny v ústech nebo na jazyku (ty jsou známkou leukoplakie, což je prekancerózní oblast způsobena častým podrážděním)
- neobvyklé krvácení nebo výtok
- tlak v různých částech těla
- špatné trávení nebo obtížné polykání
- kašel nebo chrapot

(Žaloudík, 2008)

1.2.3 Ovlivňující faktory

- **Kancerogeny**

Jsou to látky, které jsou schopny v buňce vyvolat změny vedoucí ke vzniku nádoru. Způsobují zejména změny ve struktuře DNA – tzv. mutace. Karcinogeny zahrnují látky chemické (např. různé mutageny), fyzikální (radionuklidy) či virové. V jiném případě může nádor vzniknout dlouhodobou opakovanou expozicí (například kouření). Do dnešního dne bylo objeveno na 3000 karcinogenních látek a neustále jich přibývá.

- **Věk**

S rostoucím věkem stoupá riziko výskytu rakoviny. Buňkám totiž nějakou dobu trvá, než zmutují a stanou se rakovinotvornými. Mnoho lidí se těchto změn ani „nestihne“ dožít. Dalším faktorem, proč se rakovina projevuje v pozdějším věku, je delší doba vystavení organismu karcinogenním látkám a čím déle člověk žije, tím je větší pravděpodobnost, že v buňkách nastane genetická změna, a nemoc se začne rozvíjet (Petružela a Konopásek, 2003).

- **Genetická výbava**

Genetické mutace jsou závislé na řadě faktorů. Lidé se mohou s genetickou mutací již narodit, to ale neznamená, že se musí projevit. Mnoho lidí to ani nikdy nezjistí, mají ale větší pravděpodobnost vzniku rakoviny. Tento fakt je lékaři nazýván jako genetická predispozice.

- **Viry**

Virové částice jsou komplexem bílkovin a nukleových kyselin, má tedy má svou vlastní genetickou informaci a jeho hlavní úkol je reprodukce. Viry mohou na buňkách působit genetické změny, které se nemusí projevit, mají ale větší pravděpodobnost, že se stanou rakovinotvornými. Například u žen je známý pappiloma virus, považovaný za hlavní příčinu rakoviny děložního čípku.

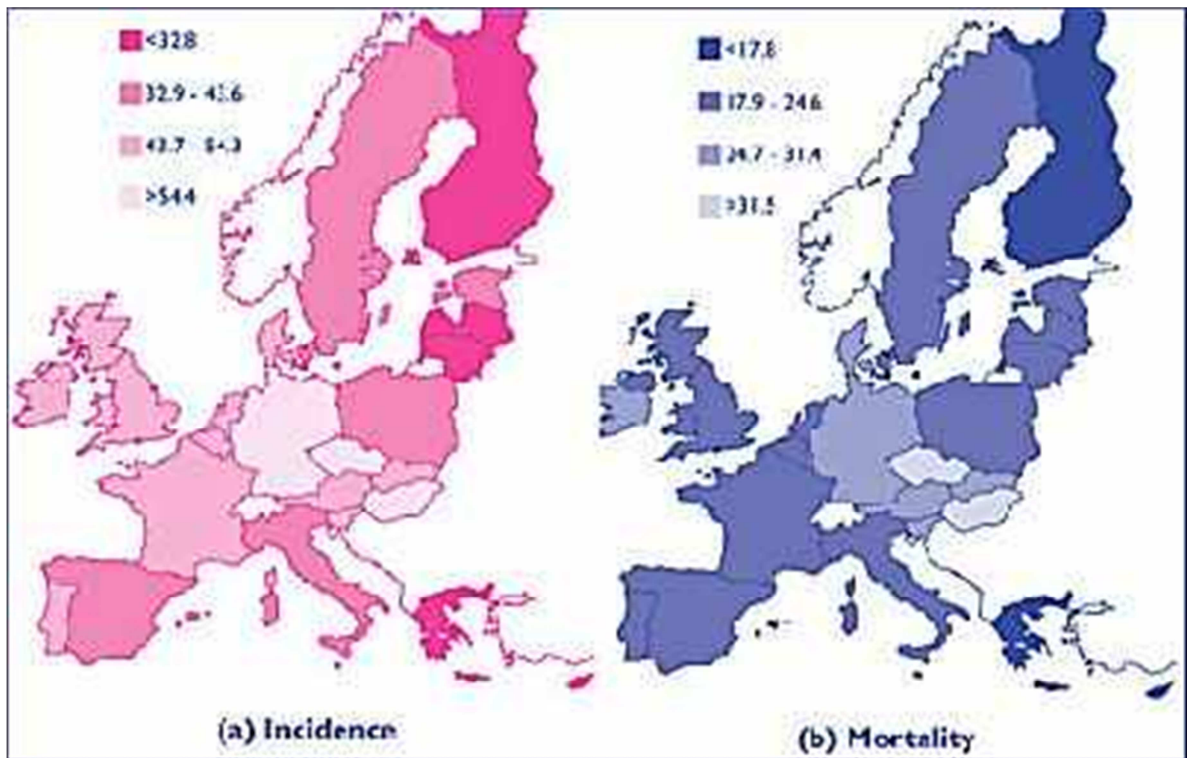
- **Bakteriální infekce**

Infekce tohoto typu nejsou považovány za hlavní příčinu rakoviny. Nicméně nedávné studie ukázaly, že gastritidy žaludku vyvolané *Helicobacter pylori* mohou u lidí vést ke vzniku žaludečních vředů i ke vzniku rakoviny žaludku.

Bakteriální infekce lze léčit antibiotiky, proto by objasnění bakteriální příčiny mělo velký význam pro prevenci rakoviny (Parsonnet, 1995).

1.3 Rakovina v číslech

Rakovina je spolu s kardiovaskulárními chorobami jednou z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace zemře v letech 2005 až 2015 na rakovinu 84 milionů lidí, zhruba 20 milionů nových případů ročně, 70 procent všech onkologických pacientů bude žít v zemích, disponujících pouze 5 % světových prostředků na zvládnutí této choroby. Je dokázáno, že infekce, z nichž mnohým lze potenciálně předejít, způsobují 15 % (22 % v rozvojových zemích) všech nádorových onemocnění. Obdobně kouření působí ročně miliony nových případů onemocnění rakovinou a úmrtí, a to jak v rozvinutých, tak v rozvojových zemích. Podle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR zemřelo v roce 2009 v České republice na rakovinu 28 064 lidí – 15 673 mužů a 12 391 žen. Zabránit lze více než 30 % všech úmrtí (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR). V roce 2011 byly zveřejněny následující údaje výskytu rakoviny ve světě: 12 662 554 případů rakoviny, z toho 6 092 359 v Asii, 3 208 882 v Evropě včetně Ruska, 1 603 870 v Severní Americe, 906 008 v Latinské Americe a 681 094 v Africe. I přes ohromné finanční náklady věnované výzkumu a možnostem léčby rakoviny, globálně až 900 miliard dolarů ročně, její vyhlídka do roku 2030 nejsou nijak růžové, ve všech oblastech se odhaduje se zvýšeným počtem případů (celosvětově až 69 %) (Kotyk, 2011). Rakovinou u nás onemocní každý třetí obyvatel. Například Česká republika je mezi zeměmi Evropské unie na prvním místě co se týče onemocnění rakovinou tlustého střeva, jak je patrné z obrázku (Grossmanová, 2008). Údaje o výskytu nádorů v ČR se nacházejí na internetových stránkách NOR (www.linkos.cz/odbornici/onkologie/nor.php), jsou každý měsíc aktualizovány. Zatím co incidence novotvarů neustále stoupá, úmrtnost se od druhé poloviny 90. let stále snižuje.



Obr. 1: Výskyt a úmrtnost rakoviny tlustého střeva v zemích Evropské unie, čím světlejší barva, tím větší výskyt a mortalita (Grossmanová, 2008).

1.3.1 Prevence výskytu rakoviny

- omezit množství červeného masa, dát přednost převážně masu bílému a rybám
 - omezit přísun tuků, hlavně živočišných
 - vyhnout se obezitě a snížit příjem potravy
 - pravidelně se věnovat sportu
 - podpora nekuřáctví
 - omezovat nadměrné požívání alkoholu
 - zvýšit příjem vlákniny, jíst více zeleniny, ovoce, luštěnin, celozrnných výrobků
- (Walker, 1998)

2 Kancerogeneze

Nádor vzniká a vyvíjí se procesem zvaným kancerogeneze (Adam et al., 2003). Jedná se o vícestupňový proces, jehož podstatou je postupné hromadění genetických změn. Podle odhadů je, pro vývoj nádoru, nezbytných 4 - 7 těchto změn a genů, které těmto změnám mohou podlehnout, jsou desítky. Obecně existuje asi šest základních vlastností plně maligního (zhoubného) nádoru:

- neomezený replikační potenciál
- poškození apoptózy
- posílení abiogeneze
- tvorba metastáz
- necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
- soběstačnost v produkci růstových signálů

(Weinberg, 2000).

Jednotlivé fáze kancerogeneze:

- **Iniciace** - představuje prvotní změnu v genetické informaci
- **Promoce** - v této fázi jsou buňky stimulovány k intenzivnější proliferaci tzv. proliferacími faktory, které ale nejsou samy o sobě schopny vyvolat v buňkách nádorovou transformaci, pouze ji podpoří. Při odstranění těchto faktorů může dojít i k úplnému potlačení kancerogeneze.
- **Progrese** - v této fázi již dochází k formování samotného nádoru z důvodu dalšího postupného nahromadění genetických změn. Nádor zůstává nejprve v místě svého vzniku, do okolních tkání a orgánů se dostává pomocí invaze a metastazování

Jako podmínka akumulace veškerých nutných změn je nestabilita genomu. Genetická nestabilita nádorových buněk způsobuje významné zvýšení mutační rychlosti, která potom zvyšuje pravděpodobnost akumulace všech mutací souvisejících s kancerogenezí. Genetická nestabilita je výsledkem mutací, které:

- snižují přesnost replikace genomu, a tak zvyšují frekvenci vzniku mutací
- snižují účinnost mechanismů opravujících DNA nebo
- zvyšují výskyt chromozomálních zlomů a přestaveb, což navozuje nestabilitu karyotypu.

I když nebylo prokázáno, že by genetická nestabilita byla nezbytnou podmínkou kancerogeneze, je nepochybné, že se objevuje u velkého počtu nádorů a nepřímo se na jejich vzniku významně podílí. Právě genetická nestabilita nádorů může navíc způsobit značnou heterogenitu buněčných klonů v rámci jediného nádoru. Nejzávažnějším důsledkem této heterogenity jsou komplikace pro terapii, protože heterogenní buněčná populace nádoru nemůže na danou terapii odpovídat uniformně. To znamená, že zvolená terapie může být účinná na některé nebo i na většinu buněčných populací v nádoru, ale ponechává bez účinku i třeba minoritní klon nádorových buněk, který je v důsledku terapie selektován, zvýhodněn a může se stát počátkem nové nádorové masy, která je agresivnější a odolnější vůči působení terapeutik (Šmardová, 2010).

2.1 Metastazování

Rakovina může způsobit velmi vážné onemocnění a v nejhorším případě i smrt. Naše tělo se skládá z miliónů živých buněk, které rostou, dělí se a zemřou. V raném věku se buňky dělí rychleji, aby docházelo k růstu osoby, v pozdějším věku, kdy je člověk již plně vyvinutý, se buňky dělí pouze v případě potřeby obnovení starých či mrtvých buněk nebo pro regeneraci zranění. Růst rakovinných buněk se od normálních liší, místo toho, aby buňky umřely, dále rostou a formují nové buňky, které později mohou napadat i jiné tkáně, což normální buňky nemohou. Takto se dokáže šířit do různých částí těla a vytvářet nádory, které pak napadají normální tkáně. Tento proces se nazývá metastazování.

Jedná se o složitý proces, který sestává z mnoha stadií a závisí na řadě interakcí mezi nádorovými buňkami, mimobuněčnou matricí a cílovou tkání. Podařilo se dokázat, že poruchy těchto interakcí mezi nádorovou buňkou a ECM jsou důležitým faktorem pro vznik karcinomu. Obnovením těchto interakcí bylo naopak možné zvrátit fenotyp nádorové buňky na normální fenotyp. Prvním krokem v procesu metastazování je oddělení jednotlivých buněk nebo populací z nádorové tkáně, a to z důvodu ztráty buněčné interakce (Gabbert et al., 1992). Klíčový význam mají adhezivní vlastnosti nádorových buněk. Invaze nádorových buněk z primárního nádoru závisí na tom, zda je nádor schopný aktivovat proteolytické enzymy, které rozpouští bazální membrány a vazivovou tkáň (Liotta et al., 1980). Po úspěšné invazi pronikají buňky do okolních tkání a orgánů pomocí krevního a lymfatického systému. Jimi buď cestují s proudem tekutin, nebo se usadí a množí se (Horst, 2005).

2.2 Angiogeneze

Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení, tzv. angiogenezí. Tímto termínem rozumíme proces tvorby cév, angiogeneze má mimořádný význam pro správný rozvoj embrya, uplatňuje se při hojení zlomenin nebo v průběhu menstruačního cyklu. V posledním desetiletí je středem zvýšené pozornosti v onkologii, neboť se jí připisuje významná úloha v patogenezi nádorového procesu a metastazování. První doklady podporující hypotézu o závislosti nádorového růstu a metastazování na stupni angiogeneze pocházejí již z 80. let minulého století (Folkman a Klagsburn, 1987). Teprve v posledních letech však byly podrobněji popsány mechanismy, kterými je angiogeneze regulována (Klener, 2002).

Zmutované buňky mají schopnost přinutit okolní tkáň k růstu cév. K poškozeným buňkám pomocí cév takto proudí krev bohatá na živiny a kyslík. Čím více je nádor zásobován živinami nezbytnými pro růst, tím se stává agresivnějším, bude více metastazovat a pacient má menší šanci na přežití.

3 Genetika nádorových onemocnění

3.1 Geny a rakovina

Geny hrají dvě hlavní role v rakovině. Onkogeny, které rakovinu mohou způsobit, jsou geny, které za normálních okolností nezpůsobují buněčnou maligní transformaci. V normální buňce kódují bílkoviny regulující normální růst buňky a teprve jejich mutace nebo atypická aktivace vedou ke ztrátě kontroly růstu a k přeměně normálních buněk na buňky nádorové. Oproti tomu supresorové nádorové geny (antionkogeny) jsou stejně jako onkogeny normální buněčné geny, jejichž ontogenicita se ale projeví při jejich ztrátě, nikoliv při jejich aktivaci (Weinberg, 1991). Jsou to geny, které zpomalují buněčné dělení, opravují chyby DNA, nebo řídí, kdy buňka zemře (proces známý jako apoptóza). Pokud tyto geny nepracují správně, růst buněk se vymyká kontrole.

Jako kancerogen nebo karcinogen jsou označovány látky, které mohou v buňkách vyvolávat změny vedoucí v důsledku ke vzniku nádorů. Mohou buď změnit genetické informace, to pak buňka produkuje bílkovinu, které má odlišné vlastnosti, nebo jde o poruchu regulačních mechanismů. V takové buňce se aktivují geny, které jsou v normální buňce neaktivní. Buňka pak získává například schopnost neomezeného dělení nebo neschopnost apoptózy.

3.2 Nádorová cytogenetika

Věda, která se zabývá mechanismy vzniku nádorových onemocnění. Její kořeny můžeme nalézt už na konci minulého století. Za jejího zakladatele je považován Boveri. Podle Boveriho jsou nádorové buňky defektní, protože ztratily vlastnosti normálních buněk, mají jiný obsah chromatinu a každý nádor je založen jen jednou (Heim, 1995). Boveriho hypotéza nemohla být ale z důvodu nedostatečné techniky po více než 40 let testována (Michalová, 1999). V nádorových buňkách nacházíme mnohé změny týkající se chromozomů, jedná se například o změny počtu chromozomů, translokace, delece, amplifikace nebo jiné přestavby. Rakovina je v 5–10 % případech dědičným onemocněním, kdy se předává jeden abnormální gen (ne rakovina jako taková) z generace na generaci. Některé druhy rakoviny se vyskytují u více členů jedné rodiny, a to z důvodu, že v rodině se vyskytují stejné návyky, co se týče stravování, kouření, životního stylu apod.

4 Imunitní systém

Imunitní systém je síť specializovaných buněk a orgánů, které slouží k obraně organismu proti napadení cizími antigeny a patogeny. Jde o komplikovanou soustavu různých orgánů – kostní dřeň, sleziny, mandlí, brzlíku, kůže, lymfatických uzlin a plic – které vzájemně spolupracují (Schindler, 1991). Každý orgán má svou vlastní ochrannou funkci. Imunitní odpověď je podle mechanismů svého působení dělena na vrozenou a získanou, které spolu úzce spolupracují (Hořejší, 2009).

Vrozená imunita zahrnuje fagocyty, NK buňky, žírné buňky, dendritické buňky a humorální látky, jako je MBL, CRP a komplement, adaptivní imunita zahrnuje T a B lymfocyty a protilátkovou humorální složku. Vrozená imunita úzce spolupracuje s adaptivní a je schopna odlišit vlastní tkáň od infekčních agens, které jsou odstraňovány bez poškození vlastní tkáň. Dalším úkolem je odstraňování viry napadených, starých nebo poškozených vlastních buněk (Janeway, 1997).

4.1 Vrozená imunita

Mezi humorální složky vrozené imunity řadíme několik typů cytokinů, MBL, CRP a komplementový systém. Komplement je soubor asi 30 sérových a membránových proteinů, které slouží jako humorální složka nespecifické imunity spolu s interferony a dalšími plazmatickými proteiny (Krejsek a Kopecký, 2004). Cytokiny jsou produkovány aktivovanými fagocyty a jsou zprostředkovately následné aktivace T-lymfocytů vazbou na jejich specifický receptor (Murphy, 2011). Komplementový systém má na rozdíl od cytokinů schopnost sám vyvolat smrt dané buňky.

Vrozená imunita je velmi účinný obranný systém před mnoha patogeny. Zahrnuje přirozené mechanismy, jimiž tělo disponuje již od narození. Jedná se o první vlnu obrany při napadení patogenem a není ovlivněna předchozím setkáním s daným patogenem. Rozpoznání patogenu vrozenou imunitou spočívá ve vazbě jejich molekulárních struktur (PAMPs = pathogen-associated molecular patterns) na receptory, které je rozpoznávají (PRRs = pattern-

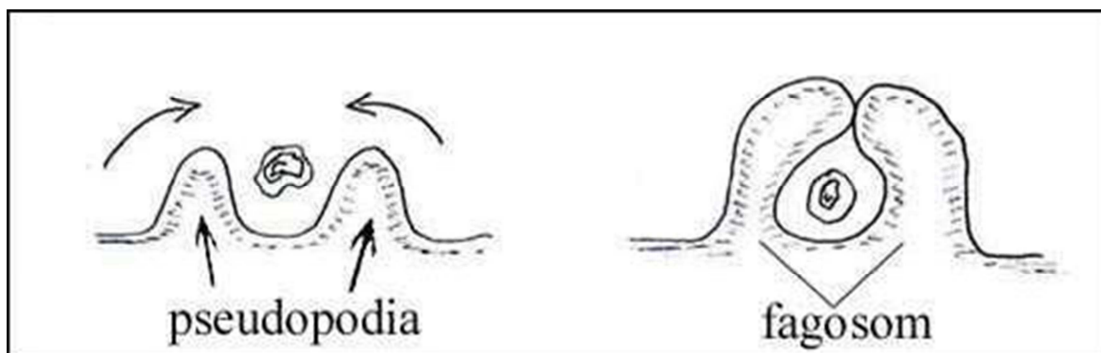
recognition receptors). Tyto receptory se vyskytují zejména na makrofázích, dendritických buňkách a neutrofilech.

Mezi mechanismy vrozené imunity se řadí z buněk především fagocyty a tzv. natural killers buňky – NK buňky, přirození zabijáci. NK buňky jsou morfologicky řazeny mezi lymfocyty. Na svém povrchu vystavují dva typy receptorů, inhibiční a stimulační. Mezi stimulační receptory řadíme například Fc receptory, které díky interakci s Fc částí komplexu antigen-protilátka aktivují cytotoxické mechanismy. Tento proces je označován jako cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC antibody-dependent cellular cytotoxicity). Inhibičními receptory jsou zejména povrchové struktury, které rozpoznávají HLA I glykoproteiny na povrchu buněk a blokuje tak aktivaci NK buněk. Tak absence HLA I glykoproteinů výrazně podporuje aktivaci cytotoxických mechanismů. Aktivovaná NK buňka je schopna vyvolat řízenou smrt nejen infikovaných buněk, ale i buněk nádorových (Hořejší, 2009).

Imunitní reakci proti nádorovým buňkám lze vyvolat aplikací směsi LAK buněk (lymfokine activated killers) do těla pacienta. Jedná se o směs T-lymfocytů a NK-buněk, které byly izolovány z periferní krve pacienta, a aktivují in vitro cytosiny, například IL-2. Takto lze aktivovat i lymfocyty, které byly odebrané přímo z nádorové tkáně tzv. tumor infiltrated lymphocyte (TIL). Ty jsou stejně jako LAK buňky injikovány zpět do organismu, ale jsou více specifické, tudíž vykazují vyšší účinnost (Michálek, 2004).

4.2 Fagocyty

Fagocyty jsou buňky, které mají schopnost pohlcovat (fagocytovat) cizorodé patogeny, tak i nefunkční nebo infikované buňky a pomocí svých vnitřních pochodů je zničit (viz obrázek 2). Škodliviny identifikují pomocí membránových receptorů, které se váží buď přímo na struktury cizorodé částice (např. Toll-like receptory, lektinové receptory) nebo nepřímo za pomoci komplementu či protilátek. Fagocytující buňka částici obklopí výběžky své cytoplazmy, tzv. pseudopodii, a ty ji uzavrou do svého nitra, vzniká tzv. fagosom. Mezi buňky s touto schopností řadíme monocyty, makrofágy, neutrofile, eosinofily a dendritické buňky. Každý typ buněk se svou funkcí mírně liší. V protinádorové imunitní odpovědi hrají důležitou roli monocyty a jejich tkáňové formy makrofágy, které fagocytují kromě intracelulárních patogenů uhynulé nebo poškozené vlastní buňky (Hořejší, 2009).



Obr. 2: Schéma fagocytózy (Sládek, 2006).

4.3 PAMPs

V poslední dekádě minulého století bylo zjištěno, jakým způsobem vrozená imunita rozpoznává cizorodé mikroorganismy a struktury. Byly popsány Pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Jedná se o molekulární motivy, které se vyskytují na povrchu virů či patogenních, ale i nepatogenních mikroorganismů. Jsou tvořeny částmi bakteriální stěny, např. peptidoglykenem, kyselinou lipoteichoovou, lipopolysacharidem, bakteriálními manany, glukany, bakteriální DNA a dvoušroubovicovou RNA. PAMPs představují pro mikroorganismy struktury, které jsou esenciální pro jejich životní funkce, a zásah vrozené imunity vůči těmto strukturám představuje pro mikrobiální patogeny zásah, který nemohou obejít aktivací kolaterálních metabolických drah, jako je tomu například u antibiotik (Krejsek a Kopecký, 2004). Tyto molekulární znaky jsou rozpoznávány pomocí PRR (pattern-recognition receptors), které jsou přítomny na buňkách vrozené imunity, tedy makrofágách, neutrofilech, monocitech či dendritických buňkách.

PAMPs aktivují imunitní odpověď, která chrání hostitele před infekcí. Typickým členem této skupiny molekul je endotoxin, bakteriální lipopolysacharid (Ausubel, 2005).

Mezi ně patří například oligosacharidy bohaté na manózu, peptidoglykany nebo lipopolysacharidy přítomné v bakteriální stěně (Murphy, 2011).

Po detekci PAMPs receptory PRR, dochází k masivní infiltraci buněk vrozené imunity, nejprve neutrofilů, poté monocytů, které se diferencují na makrofágy a k aktivaci komplementu. Jeho aktivací dochází ke klonální expanzi B lymfocytů produkujících protilátky. Následný průběh imunitní odpovědi je stimulován T lymfocyty, které díky antigen-prezentujícím buňkám rozpoznávají antigeny. Tento mechanismus je velmi dobře znám, problémem nádorové terapie ale je, že nádorové buňky tyto PAMPs na svém povrchu nemají, a tudíž je vrozená imunita není schopna detekovat a následně atakovat.

Z funkčního hlediska lze PRR rozdělit do tří skupin:

- **Sekretované** – fungují jako opsoniny, naváží se na stěnu patogenů a označí je tak pro působení komplementu a fagocytů. Příkladem je MBL (mananvázající lektin), který reakcí s mannanem na povrchu různých mikroorganismů spouští tzv. lektinovou dráhu aktivace komplementu (Votava, 2001).
- **Endocytární** – nachází se na povrchu fagocytů, po rozpoznání PAMPs na povrchu mikroorganismů zajistí vazbu mikroorganismu na povrchy fagocytujících buněk, kde je následně patogen usmrcen. Příkladem těchto PRR je makrofágový receptor pro manózu (Krejsek a Kopecký, 2004).
- **Signální** – tato skupina receptorů je schopna reagovat na přítomnost PAMPs spuštěním drah, které v buňce aktivují zejména geny pro prozánětlivé cytokiny. Tyto receptory byly poprvé popsány u *Drosophily* a označeny jako Toll (Votava, 2001), později byly označeny u savců jako Toll-like receptor (TLR).

5 Látky aplikované v našich experimentech a jejich receptory

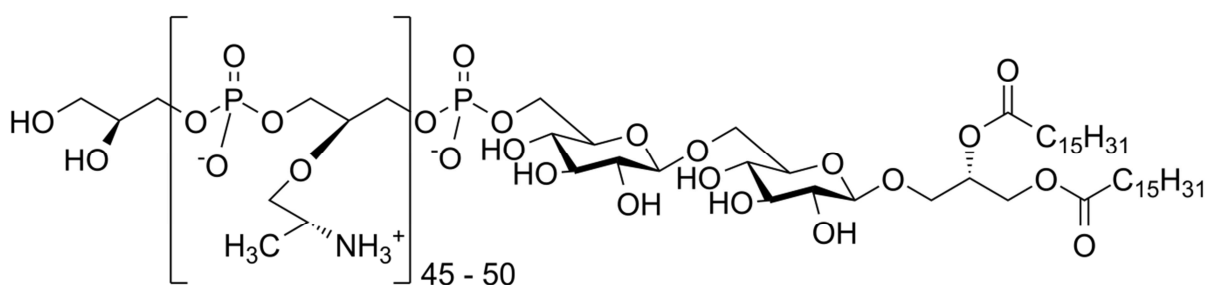
5.1 LTA

LTA (lipoteichoic acid) je klíčovou složkou buněčné stěny Gram-pozitivních bakterií. Chemický vzorec je uveden na obrázku 3. Funguje jako aktivátor imunitního systému s vlastnostmi velmi podobnými lipopolysacharidu z Gram-negativních bakterií. Bylo prokázáno, že LTA váže CD14 a spouští aktivaci přes Toll-like receptory 2, ale to, zda je ke spuštění signalizace nutná aktivace na povrchu buňky nebo internalizace musí být nejprve prokázáno. V průzkumu vázání LTA a internalizace bylo zjištěno, že LTA a jeho receptorové molekuly se hromadí v lipidových vrstvách a jsou následně cíleny do Golgiho aparátu. Zdá se, že tato internalizace je závislá na lipidové vrstvě, protože tato léky narušovaná vrstva inhibuje LTA/Toll-like receptor 2 (Triantafilou, 2004).

LTA se uvolňuje z bakterií především po bakteriolyze vyvolané lysosomem, peptidy z leukocytů nebo beta-laktamovými antibiotiky. Je schopna se vázat na cílové buňky

nespecificky prostřednictvím membránových fosfolipidů jako je CD14 a Toll-like receptory. LTA vázaná na cíl je schopna komunikovat s cirkulujícími protilátkami a aktivovat kaskádu komplementu. Aktivací komplementu dochází k protilátkové odpovědi B-lymfocytů, k uvolňování neutrofilů a makrofágů z reaktivního kyslíku a dusíku, hydroláz, proteináz, růstových faktorů a cytokinů.

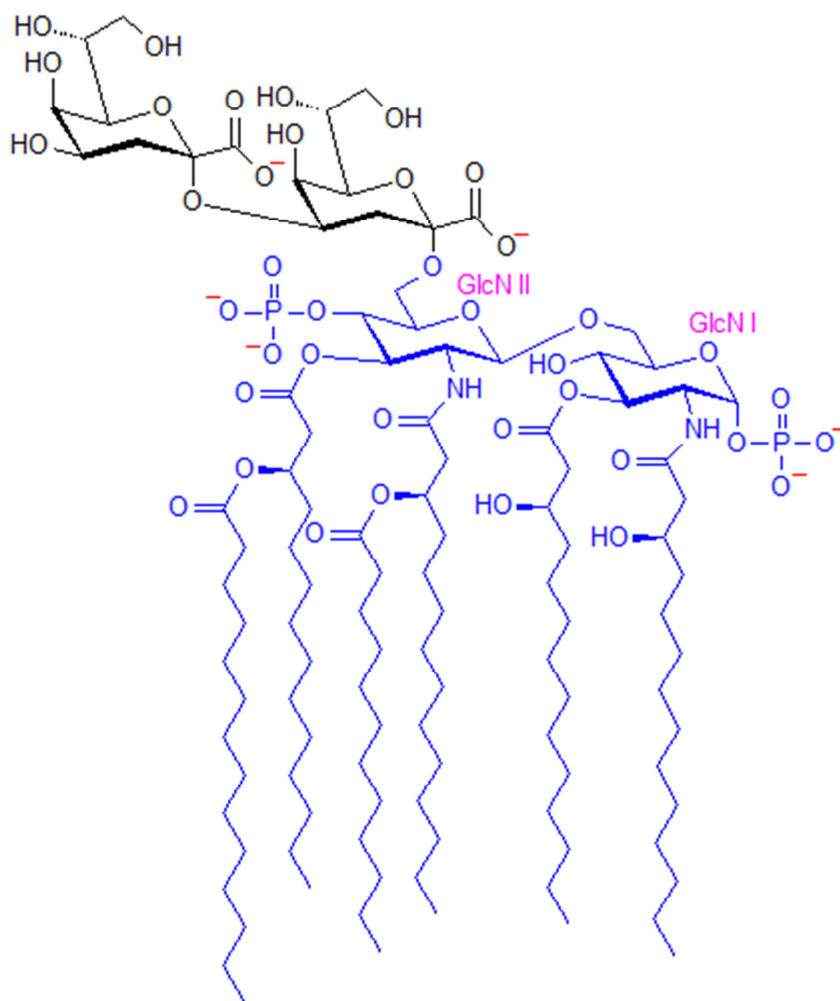
V současné době je používáno označení TA (teichoic acid) jako obecné označení pro podobné aniontové molekuly, především wall teichoic acid (WTA) a lipoteichoic acid (LTA). WTA i LTA mají ve své struktuře jako hlavní nosný bod polymerní řetězec, složený ze střídajících se jednotek polyhydroxylových alkanů, jako je glycerol, ribitol nebo sacharid a kyselinu fosforečnou. Ty jsou spojeny s hlavním řetězcem fosfodiesterovými vazbami. TA jsou aniontové polymery (Morath et al., 2002). LTA se liší podle struktury, rozeznáváme čtyři druhy LTA, jako základní je označena struktura, která obsahuje společný polyglycerolfosfátový základ. Mnoho druhů kmenů *Bacillus*, *Staphylococcus* a *Lactobacillus* obsahuje právě tento typ LTA (Fischer, 1996). *Streptococcus pneumoniae* vykazuje výrazně odlišný typ LTA od obecného, obsahující opakující se jednotky tetrasacharidových ribitolfosfátů (Behr, 1992).



Obr. 3: Chemický vzorec LTA (<http://www.en.wikipedia.org>, 2007).

5.2 LPS

Lipopolysacharid je hlavní složkou buněčných membrán Gram-negativních bakterií. Je složen ze tří samostatných oblastí – lipidu A, korové oblasti a polysacharidového řetězce (O-řetězec), který nemusí být přítomen u všech strukturních variant (viz obrázek 4). Lipidická a cukerná složka se liší nejen odlišnou chemickou strukturou, ale také biologickou aktivitou. LPS působí jako endotoxin, protože v lidském těle váže lipid binding protein (LBP) v séru, které ho přenese na CD14 receptor na buněčné membráně, ten ho postupně přenáší na další neukotvený protein, MD2, který spolupracuje s Toll-like receptorem 4 (TLR4). CD14 a TLR4 jsou přítomny v různých buňkách imunitního systému (včetně makrofágů a dendritických buněk), spouští signalizační kaskádu pro makrofágy (endoteliální buňky vyvolávající sekreci zánětlivých cytokinů a oxidu dusitého) a to má za následek „endotoxický šok“. LPS jsou považovány za jedny z nejtoxičtějších mikrobiálních produktů, díky své schopnosti vyvolat patofyziologické změny, především horečku a změny v oběhu bílých krvinek. Jen čtyři nanogramy čistého LPS na kilogram tělesné hmotnosti u lidí vyvolávají zvýšení teploty o 2°C v průběhu několika hodin (Weckesser et al., 1979).



Obr. 4: Obecný vzorec lipopolysacharidu *E. coli* (Christie 2011).

5.3 PAMPs

Jedná se o molekulární motivy, které se vyskytují na povrchu virů či patogenních, ale i nepatogenních mikroorganismů. Tyto molekulární znaky jsou rozpoznávány pomocí PRR (pattern-recognition receptors), které jsou přítomny na buňkách vrozené imunity, tedy makrofágách, neutrofilech, monocytech či dendritických buňkách. PAMPs aktivují imunitní odpověď, která chrání hostitele před infekcí. Typickým členem této skupiny molekul je molekul je považován endotoxin, bakteriální lipopolysacharid (Ausubel, 2005). Mezi ně patří například oligosacharidy bohaté na manózu, peptidoglykany nebo lipopolysacharidy přítomné v bakteriální stěně (Murphy, 2011).

5.4 Toll-like receptory

Jedná se o třídu proteinů, které hrají hlavní roli v imunitní odpovědi proti infekci. Pomocí TLR proteinů, je hostitel schopen rozpoznat molekulární struktury nalezené na patogenech nazývané patogen-associated molecular patterns (PAMPs). Nedávné pokroky ve výzkumu TLRs poukazují na léčebný potenciál proti nemocem, jako jsou autoimunitní onemocnění nebo rakovina (So a Ouchi, 2010).

Do současnosti bylo objeveno 10 receptorů TLR, které jsou zahrnuty do identifikace PAMPs (Krejsek a Kopecký, 2004). TLRs jsou vázány a aktivovány různými ligandy. Jejich aktivátory se nachází někdy na povrchu buněk, někdy na vnitřních buněčných komponentech (Takeda, 2003). Molekuly mikrobů, které naruší překážky jako kůže nebo sliznice, jsou rozeznány TLR receptory a ty aktivují buněčnou imunitní odpověď. Jejich název je odvozen od jim podobného proteinu kódujícího Toll gen, který byl popsán v *Drosophila* v roce 1985 Christiane Nusslein-Volhardovou (Hansson, 2005). Toll-like receptor je tedy homologem Toll proteinu *Drosophily* (So a Ouchi, 2010). Jejich objevení identifikovalo receptory vrozené imunity, které jsou zodpovědné za mnoho imunitních funkcí studované po mnoho let. Zajímavé je, že TLRs se zdají být zapojeny pouze v produkci cytokinů a v buněčné aktivaci v odpovědi na mikroby, a nehrají tedy významnou roli při adhezi a fagocytóze mikroorganismů. Po aktivaci TLRs s jejich ligandy, buď přímo jimi, nebo s pomocí příslušných proteinů, jako CD14 a MD2 (popřípadě TLR2/4), buňky evokují zánětlivou reakci, koordinují imunitní systém v celém organismu a nakonec chrání hostitele před masivním rozšířením patogenů po infekci (Takeda, 2005). Zatímco TLR-2 funguje jako receptor pro Gram-pozitivní bakterie, TLR-4 slouží jako receptor pro Gram-negativní bakterie (Mitchell et al., 2010). Signalizace TLRs byla rozsáhle zkoumána v posledních několika letech (Takeda, 2004).

5.5 Náš experimentální model, melanom B16-F10

Myší melanom typu B16 se používá ve výzkumu již od roku 1970 (Fidler, 1970). Existují čtyři druhy této buněčné myší linie: B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. Nejčastěji se využívá B16-F10, poněvadž tento myší melanom je velmi stabilním modelem pro experimentální studie nádorové terapie. Používají se také z důvodu, že velmi dobře tvoří nádory v myších liniích C57BL/6 (Wang et al., 2006).

Tyto melanomy jsou schopny exprese rozdílných tumor-asociovaných antigenů, které jsou potenciálními nosiči pro výrobu terapeutických nádorových vakcín. Myší melanom linie B16-F10 jsme pro naše studium zvolili i my. Jedná se o linii, která je více agresivní a mnohem silněji metastazuje do plic, než zbylé linie (Nakumara et al., 2001).

6 Cíle práce

In vivo studium vlivu kyseliny lipoteichoové (samotné i v kombinaci s LPS) na melanom B16-F10.

7 Materiál a metody

7.1 Chemikálie

RPMI 1640 – Sigma-Aldrich

Fetal Calf Serum (FCS) – Sigma-Aldrich

LTA z *B. subtilis* – Sigma-Aldrich

LPS z *E. coli* 0111.B4 – Sigma-Aldrich

7.2 Laboratorní zvířata

Při pokusech byly použity myši samičího pohlaví kmene C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories staré 8 týdnů o váze 18-20g. Byly chovány ve standardních podmínkách ve zvířinci Parazitologického ústavu Akademie věd ČR. Měly bez omezení přístup ke granulované potravě a vodě.

7.3 Buněčná linie B16-F10

Byla použita buněčná linie nádorových buněk B16-F10, dar od prof. Říhové z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze. Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% fetálního bovinního séra a antibiotiky (Sigma) v termostatu při teplotě 37°C v atmosféře obsahující nasycené vodní páry a 5% oxidu uhličitého.

7.4 Příprava melanomových buněk

- **Trypsinizace**

Médium z falkonek se slije a kultivační nádobka se třikrát důsledně promyje dostatečným množstvím PBS. Po posledním slití se přidá 0,5 ml trypsinizační směsi (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS) a ihned se vylije (pro dokonalé odstranění případných zbytků média se sérem). Opět se přilije 0,5 ml trypsinu a nechá trypsinizovat při 37°C po dobu 3-5 minut. Trypsinizace se zastaví pomocí média RPMI 1640 se sérem, buňky se sklídí z falkonky do zkumavky a jsou připraveny k dalšímu použití.

- **Kontroly životnosti, počet buněk**

K určení životnosti a počtu buněk se užívala Bürkerova komůrka a trypanová modř. Z výsledné suspenze se odebere 20 μ l, smíchá se s 20 μ l trypanové modře, čímž dosáhneme ředění 1:1, a naaplikuje se do Bürkerovy komůrky. U suspenzí s očekávanou vyšší koncentrací buněk se používalo ředění 1:10. Počítalo se vždy dvakrát 25 čtverců, z čehož se udělal průměr, a potom se stanovil počet buněk podle vzorce:

$$\text{počet buněk ve 25 polích} \times \text{ředění} \times 10^4 = \text{počet buněk / ml}$$

Životnost se určila podle procenta živých (tedy neobarvených) buněk.

- **Transplantace melanomu B16-F10**

Po trypsinizaci a centrifugačním promytí byly buňky melanomu B16-F10 rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra a spočítány. V době transplantace byly myši ve věku 8 týdnů. Do předem oholeného místa v pravé zadní části zad myši C57BL/6N bylo *s.c.* injikováno 0,1 ml buněčné suspenze obsahující 400 000 buněk.

7.5 Počítání metastáz

Metastázy byly počítány v prvním pokusu. Byla spočítána metastatická ložiska (černé tečky) na plicích pomocí binolupy.

7.6 Měření teploty nádorů

Teplota nádorů byla měřena pomocí bezdotykového teploměru IR RODENT THERMOMETER 153 IRB od firmy BIOSEB. Pro srovnání byla teplota také měřena na levém boku, kde nebyl nádor a které bylo rovněž vyholeno.

7.7 Měření velikosti nádorů

V obou pokusech byl sledován a zaznamenáván růst nádorů. Nádory byly měřeny pomocí kaliperu. Jejich objem byl vypočten pomocí vzorce:

$$V = \pi/6 AB^2$$

kde A je největší a B nejmenší rozměr nádoru (zpravidla je nejmenší výška).

7.8 Statistické vyhodnocování dat

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

Analýza dat přežití byla provedena v programu MedCalc (survival analysis, Kaplan-Meier).

8 Přehled experimentů

8.1 Pokus č. 1

Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA.

Myším bylo s.c. napíchno po 400 000 nádorových buněk linie B16-F10. 12. den po transplantaci melanomu byly myši rozděleny do 4 skupin po 6 a byla zahájena terapie. Byl sledován nárůst nádorů a měřeny teploty. Nádory byly měřeny kaliperem obden od zahájení terapie, tedy 0, 2., 4., 6., 8., 10., 12. a 14 den. Teploty byly měřeny v den napíchní nádorových buněk po 6, 12 a 24 hodinách, poté vždy v den měření nádorů. Myším v jednotlivých skupinách bylo intratumorálně aplikováno obden vždy po 50 μ l dané látky, celkem 6x a to v den 0,2,4,6,8,10. Roztoky byly sterilní (sterilizace filtrací).

Schema pokusu:

Skupina A: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoku LTA 6 mg/ml PBS

Skupina B: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoku LPS 10 mg/ml PBS

Skupina C: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoku LPS 1 mg/ml PBS

Skupina D: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů PBS – kontrola

8.2 Pokus č. 2

Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA v kombinaci s LPS.

12. den po transplantaci nádorových buněk byly myši rozděleny do 4 skupin po 5 myších a byla zahájena terapie stejně, jako v předchozím pokuse, tedy vždy 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoků v den 0,2,4,6,8,10.

Schema pokusu:

Skupina A: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoku LTA 3 mg/ml PBS

Skupina B: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoku LPS 0,5 mg/ml PBS

Skupina C: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů roztoku LPS 0,5 mg/ml PBS in 3 mg/ml LTA

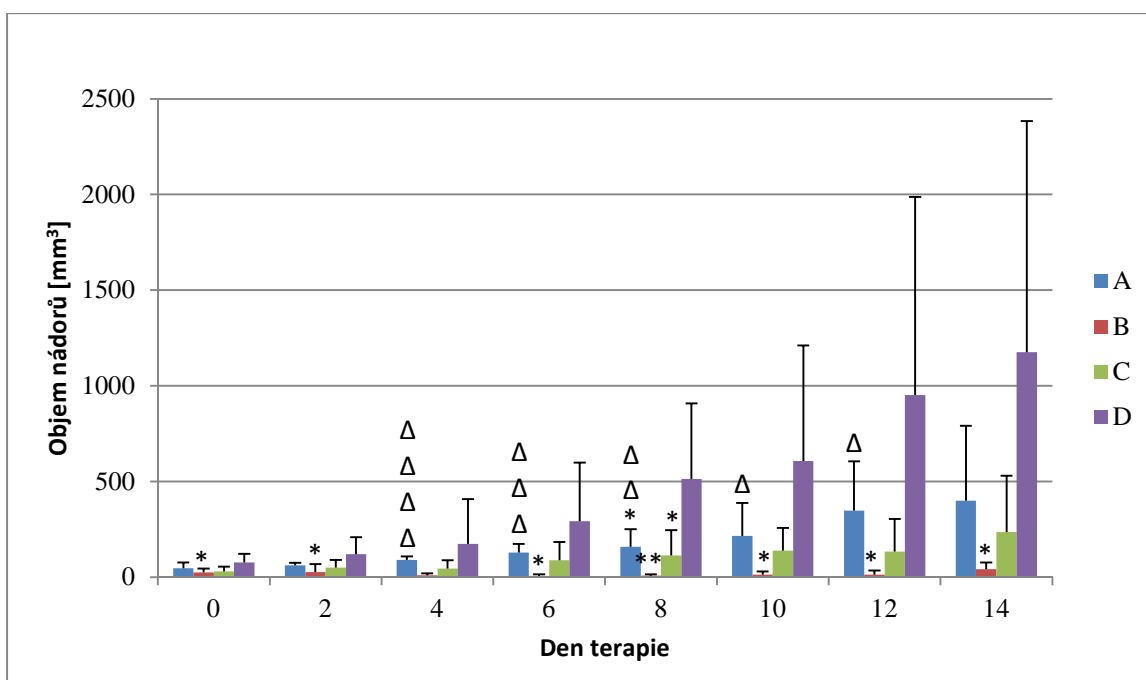
Skupina D: 6 i.t. aplikací 50 mikrolitrů PBS – kontrola

9 Výsledky

9.1 Pokus č. 1

Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA.

V pokusu byl sledován růst transplantovaného melanomu B16-F10 po opakovaných aplikacích LTA. Jako porovnávací skupina byla zvolena terapie pomocí LPS, a to malou dávkou (1 mg/ml) a velkou dávkou (10 mg/ml) LPS. Výsledné hodnoty udává obrázek 5. Vyplývá z něj, že LTA nedosáhl tak výrazné redukce nádorového růstu jako LPS obou koncentrací. Vůči LPS o vyšší koncentraci byl účinn LTA statisticky velmi významně nižší. Nicméně v porovnání s kontrolou LTA nádorový růst výrazně brzdil a bylo dosaženo statistické významnosti.



Obr. 5: Průměrné objemy nádorů jednotlivých terapií. A – LTA, B – LPS (10 mg/ml), C – LPS (1 mg/ml), D – kontrola.

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

** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (D)

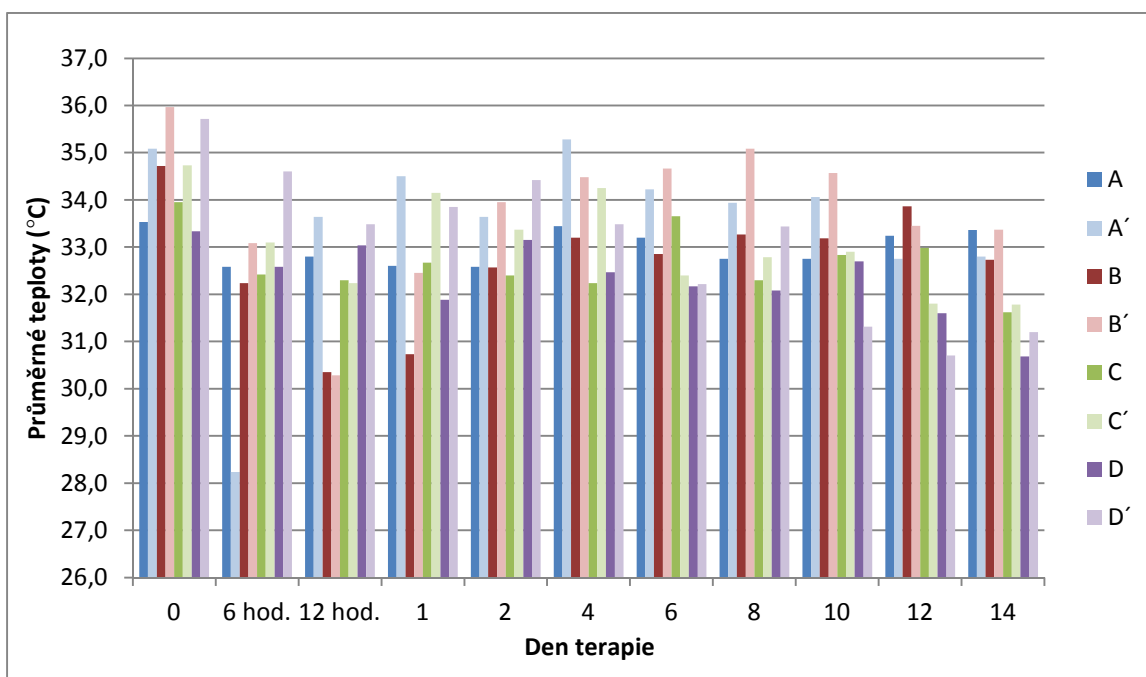
Δ $P \leq 0,05$ vztaženo k LPS 10 mg/ml (B)

$\Delta\Delta$ $P \leq 0,01$ vztaženo k B

$\Delta\Delta\Delta$ $P \leq 0,001$ vztaženo k B

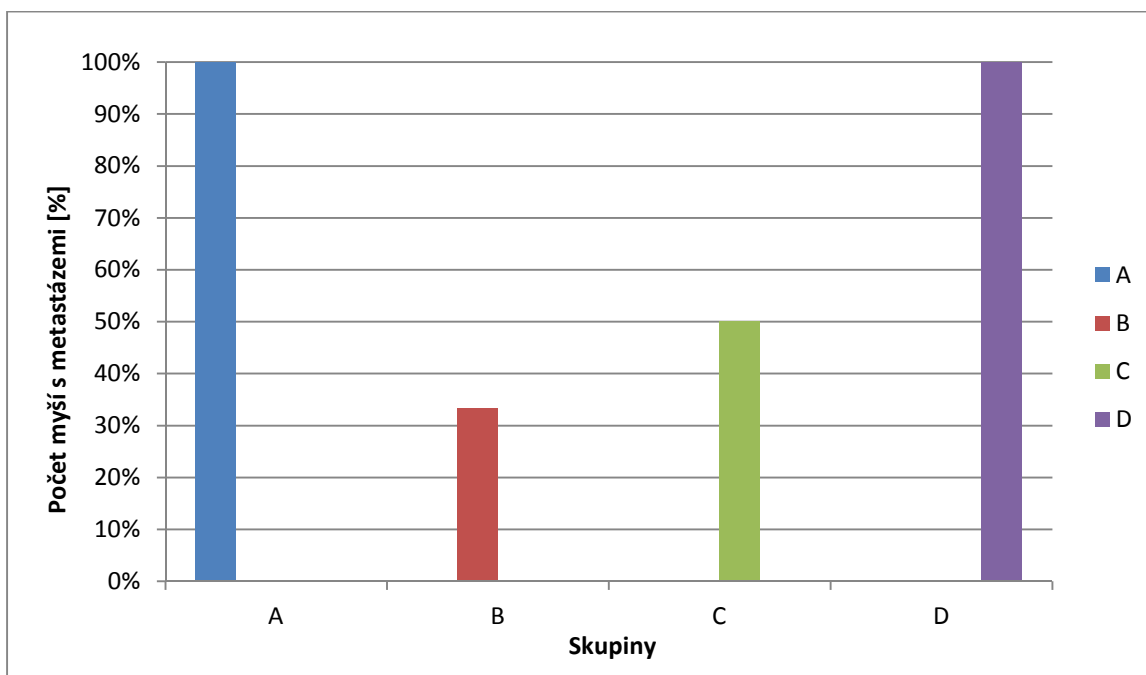
$\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P \leq 0,0001$ vztaženo k B

Na obrázku 6 je uveden průběh teplot nádoru a kontrolního místa na druhém boku. Je zřejmé, že teploty žádným způsobem neodrážejí druh a účinek terapie.



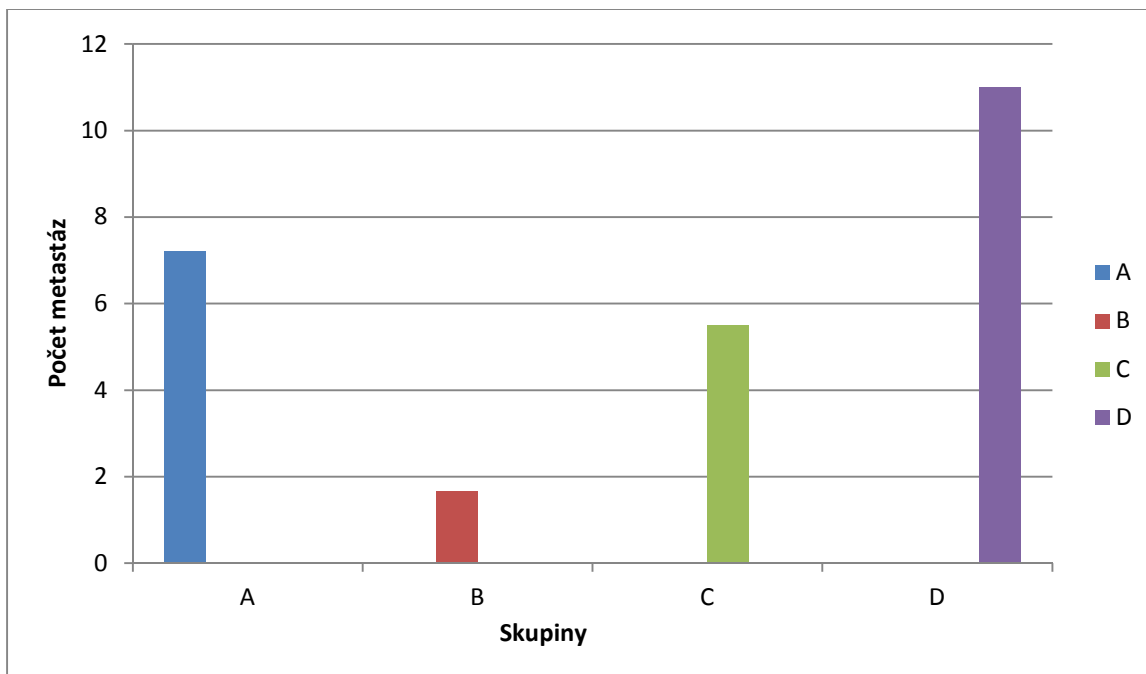
Obr. 6: Průměrné teploty naměřené v jednotlivých skupinách. (A/A' - nádoru/bok).

Na obrázku 7 je uveden výskyt metastáz (procento myši s metastázemi v dané skupině). Vyplyvá z něj, že LTA neovlivnilo výskyt metastáz, ty byly nalezeny u každé myši.



Obr. 7: Počet myši v % s metastázemi v jednotlivých skupinách (A – LTA, B – LPS 10 mg/ml, C – LPS 1 mg/ml, D – kontrola).

Na obrázku 8 je uvedena intenzita metastazování (průměrný počet metafázových ložisek na myš s metastázemi). Vyplývá z něj, že nejmenšího průměrného počtu metafázových ložisek na myš dosáhlo LPS ve vyšší koncentraci, vliv LTA byl nevýrazný.



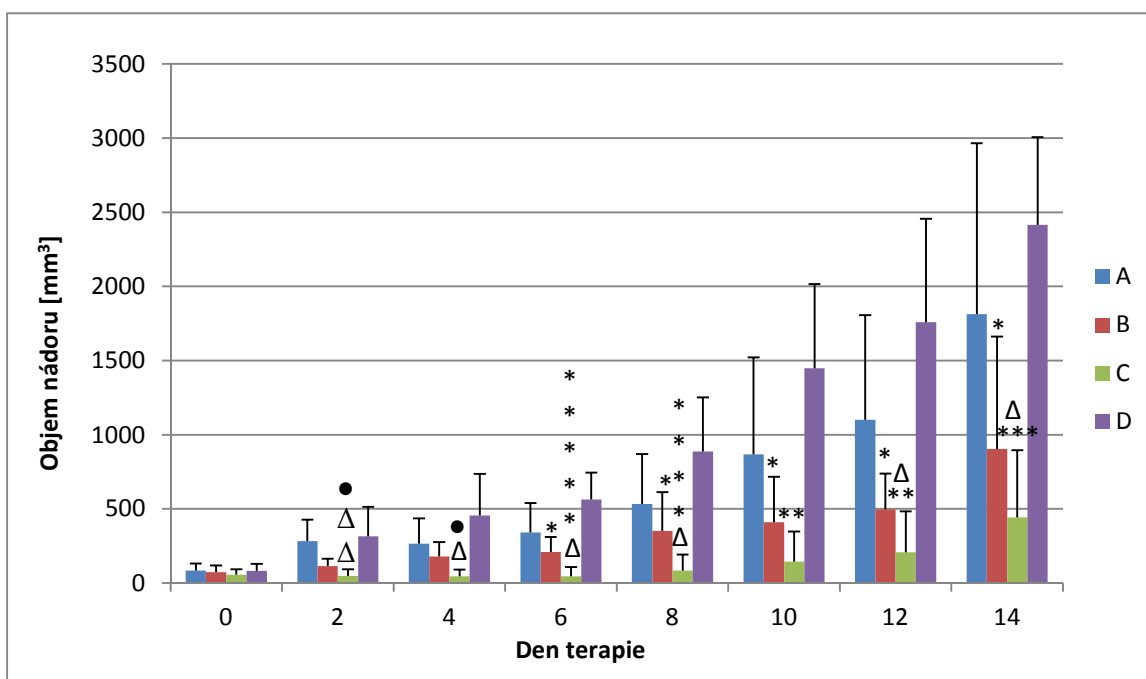
Obr. 8: Průměrné počty metafázových ložisek na myš s metastázemi v jednotlivých skupinách (A – LTA, B – LPS 10 mg/ml, C – LPS 1 mg/ml, D – kontrola).

9.2 Pokus č. 2

Terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LTA v kombinaci s LPS.

V pokusu byl sledován růst transplantovaného melanomu B16-F10 po opakovaných aplikacích LTA, LPS a jejich kombinace. Výsledné hodnoty udává obrázek 9.

LTA opět nedosáhla tak výrazné redukce nádorového růstu jako LPS, ovšem v kombinaci s LPS byla redukce nádorového růstu velmi vysoká a statisticky velmi významná. Synergie dosažená kombinací LPS a LTA vedla ke snížení růstu statisticky významnému vůči oběma jednotlivým složkám.



Obr. 9: Průměrné naměřené objemy nádorů v jednotlivých skupinách. A – LTA, B – LPS, C – LPS + LTA, D – kontrola.

* $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (D)

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

*** $P \leq 0,0005$ vztaženo ke kontrole (D)

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

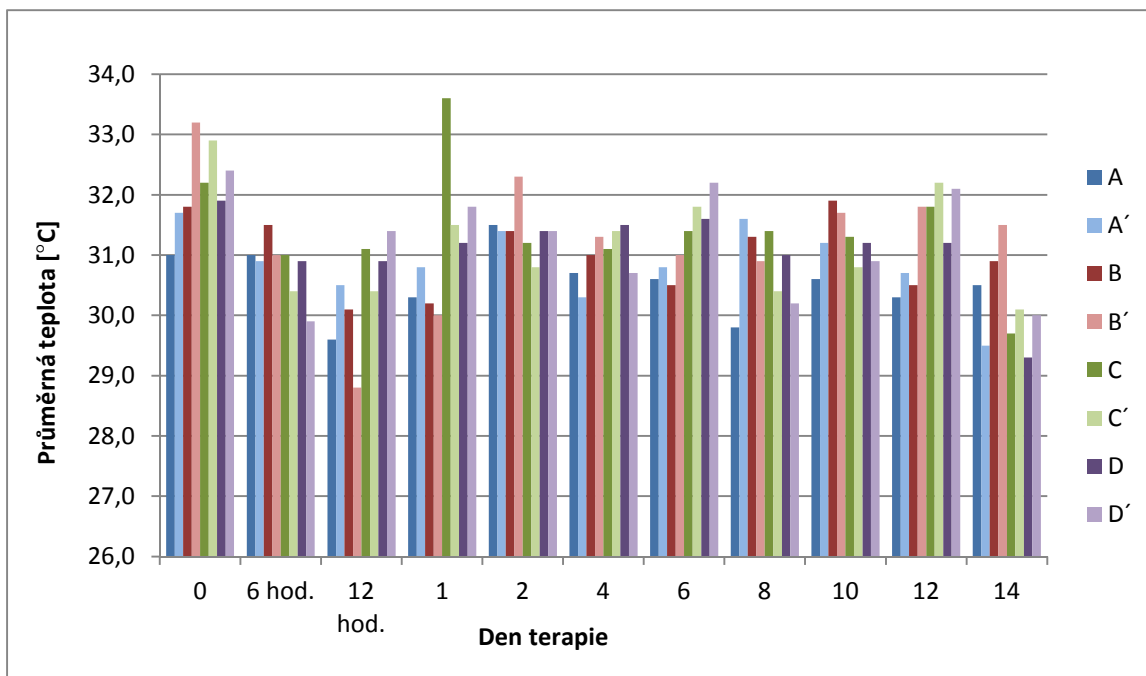
***** $P \leq 0,001$ vztaženo ke kontrole (D)

Δ $P \leq 0,05$ vztaženo k LTA (A)

$\Delta\Delta$ $P \leq 0,01$ vztaženo k LTA (A)

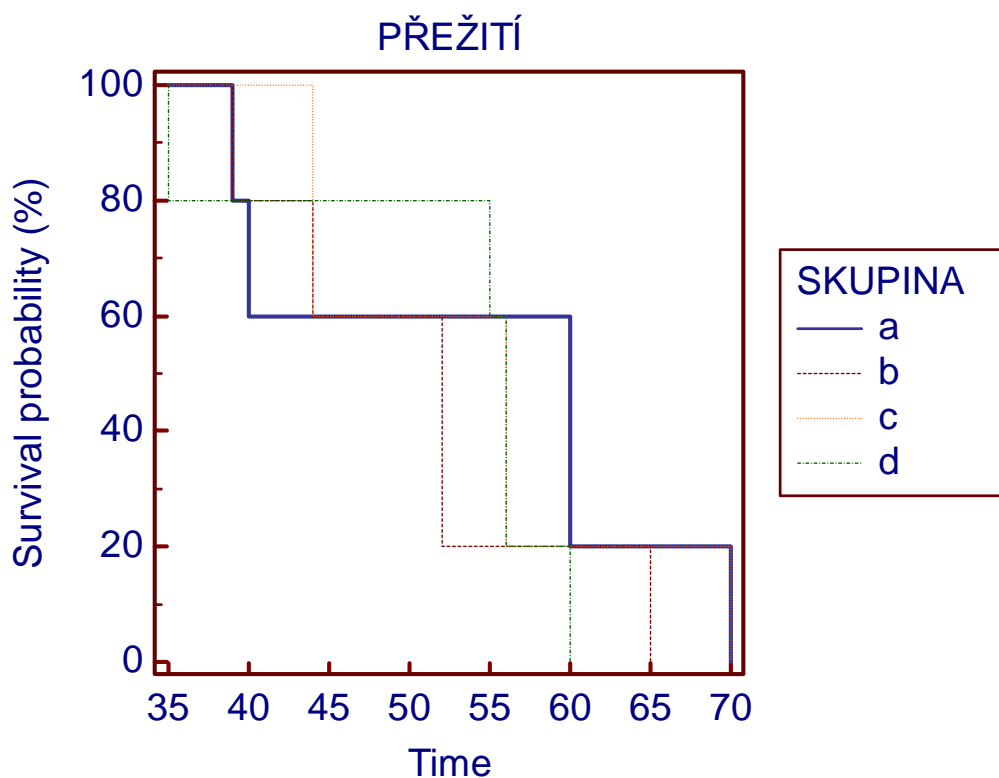
● $P \leq 0,05$ vztaženo k LPS (B)

Na obrázku 10 je uveden průběh teplot nádoru a kontrolního místa na druhém boku. Je zřejmé, že teploty žádným způsobem neodrážejí druh a účinek terapie, v průměru jsou ale nižší než teploty v prvním pokuse.



Obr. 10: Průměrné naměřené teploty nádorů v jednotlivých skupinách. A/A' – nádoru/druhý bok.

Na obrázku 11 jsou uvedeny doby přežití jednotlivých myší ve skupinách. Vyplývá z něj, že jednotlivé terapie neměly na délku přežití vliv.



Obr. 11: Survival analysis jednotlivých skupin – metoda Kaplan-Meier)

10 Diskuze

I přes velký rozvoj léčebných postupů stále existují nemoci, se kterými si medicína umí poradit jen částečně. Mezi tyto nemoci patří i přes dlouholeté výzkumy právě nádorová onemocnění. Odhalení nádorového onemocnění v časném stadiu zvyšuje šance jedince na přežití, to je ale velmi obtížné, protože rakovina se ne vždy projeví stejně a stejnou silou. Ustavičně se pracuje na postupech, které by objevily rakovinu v raném stadiu jejího vývoje. Dlouholeté výzkumy imunitních reakcí *in vitro* na potkanech a myších vedly k poznání principů protinádorových imunitních mechanismů. Odpověď imunitního systému je podmíněna přítomností specifických antigenů prezentujících na nádorových buňkách, kde je imunitní systém rozpozná. Jak, bude imunitní reakce probíhat, závisí na typu nádoru a způsobu jeho vzniku (Male et al., 2006).

Velkým přínosem pro vědu bylo studium myši s unikátním znakem, s odolností vůči rakovině. Při pokusech v roce 1999 došlo k nalezení SR/CR mutace u jedné z BALB/c myši (spontaneous regression / cancer resistant (Cui et al., 2003). Tato mutace byla záhy přenesena na myši různých linií. Projevem tohoto znaku je, na věku závislá (od 4 měsíců) spontánní regrese již rozvinuté rakoviny a odolnost mladších myši vůči transplantaci libovolného druhu rakoviny. Zajímavým zjištěním bylo, že T lymfocyty jsou dlouho považovány za hlavní efektorové buňky v hostitelské imunitě proti rakovině, u SR/CR myši nejsou ale zapojeny v ničení nádorových buněk (Hicks et al., 2006). Veškerá odolnost vůči rakovině je spojena pouze s buňkami vrozené imunity a je jimi přenositelná na divoké, vůči nádorům citlivé, myši (Hicks et al., 2006). Pozoruhodné možnosti vrozené imunity v protinádorové obraně se staly východiskem pro tuto a další naše práce.

Co se týče LTA, detailní informace o Gram-pozitivních bakteriích interagujících s vrozeným imunitním systémem stále chybí. V předchozích studiích byly pozorovány nepřímé zánětlivé odpovědi v hostiteli. LTA představuje třídu amfifilních molekul ukotvených na vnějším povrchu cytoplazmatické membrány v Gram pozitivních bakterií a běžně se uvolňuje během buněčného růstu, zejména v rámci antibiotické léčby. To způsobuje větší míru uvolňování cytokinů. Po identifikaci molekul TLR, byla publikována řada kontroverzních zpráv o zapojení těchto molekul (TLR-2, TLR-4 a MD-2) v buněčné aktivaci vyvolané LTA. LTA je považován za důležitého prostředníka zánětu, ale mechanismus navázání na receptory není

zcela jasný, poněvadž pokusy byly prováděny s komerčně vyráběnými přípravky LTA, které jsou kontaminovány značným množstvím LPS. Byla již vyvinuta metoda čištění na základě butanolové extrakce (Lotz et al., 2004). Mechanismus působení LTA je poměrně složitý, ale hlavní roli v něm hraje TLR-2 (Knapp et al., 2008). Vliv LTA na nádorový růst dosud nebyl studován.

V prvním pokusu jsme sledovali účinek LTA na redukci transplantovaného melanomu. LTA nádorový růst redukoval sice méně, než LPS, ale přesto byl tento účín statisticky významný.

LPS v prvním pokusu vyvolal značnou redukci nádorového růstu. Tyto výsledky odpovídají studii Chicoine et al., 2001. Nicméně, jak jsme zjistili (Glaserová, *in prep.*), koncentrace LPS, které použil Chicoine et al. v zmíněné práci i naše koncentrace LPS jsou příliš vysoké a působí na nádorové buňky přímou cytotoxicitou.

V druhém pokuse jsme použili takovou koncentraci LPS, o které jsme věděli, že není cytotoxická, ale že bude působit jen na úrovni imunitní jako TLR-4 agonist. I tato koncentrace vyvolávala redukci nádorového růstu a to vyšší, než LTA.

Kombinace LPS a LTA vedla k výraznému potlačení nádorového růstu. To odpovídá poznatkům o synergii LPS a LTA (Chapekar et al., 1996).

V dalších studiích jsme pak na tuto výraznou synergii navázali a úspěšně ji rozšířili kombinací s fagocytárními ligandy, mananem a laminarinem (Bruzlová, Auerová, *in prep.*).

11 Souhrn

- LTA i LPS způsobilo redukci nádorového růstu melanomu B16-F10.
- Účinek LPS byl větší než účinek LTA.
- Byla ověřena synergie mezi působením LTA a LPS na růst melanomu B16-F10 na myším modelu. Aplikace obou látek dosáhla velmi výrazného snížení nádorového růstu.
- Sledování povrchové teploty nádoru i myši se ukázalo jako nevhodné pro tento druh studií.

12 Seznam použité literatury

Adam Z, Vorlíček J, Koptíková J (2003): Obecná onkologie a podpůrná léčba. GRADA Publishing, 787 str.

Adamec Č (1970): Veřejné mínění a rakovina. Ústav pro výzkum veřejného mínění ČSAV.

Albert B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005): Základy buněčné biologie. Praha: Espero Publishing, 777 str.

Ausubel FM (2005): Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immun* 6(10):973-9.

Behr T, Fischer W, Peter-Katalinic J, Egge H (1992): The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur J Biochem* 207(3): 1063-75.

Chapekar MS, Zaremba TG, Kuester RK, Hitchins VM (1996): Synergistic induction of tumor necrosis factor α by bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid in combination with polytetrafluoroethylene particles in a murine macrophage cell line RAW. *J Biomed Mater Res* 31(2): 251-256.

Chicoine MR, Eun KW, Zahner MC, Parsa AT, Bruce JN, Piepmeier JM, Rock JP, Sawaya R (2001): Intratumoral injection of lipopolysaccharide causes regression of subcutaneously implanted mouse glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 48: 607-615.

Christie WW (1982): Lipid analysis. Pergamon Press, 207 str.

Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ (2003): Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *PNAS* 100(11): 6682–6687.

Czerniecki BJ, Koski GK (2005): Combining innate immunity with radiation therapy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 11:7.

Dahlke R, Frick P, Höl P (1998): *Nemoc jako řeč duše*. Pragma, 416 str.

Fidler I (1970): Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-782.

Fischer W, Greenberg JW, Joiner KA (1996): Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect Immun* 64(8): 3318-25.

Folkman J, Klagsburn M (1987): Angiogenic factors. *Science* 235:442 – 47.

Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G (1992): Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 50: 202-207.

Grossmanová I (2008): ČR vede v onemocnění rakovinou tlustého střeva. *Britské listy*: <http://blisty.cz/art/40286.html>. ISSN 1213-1792.

Hansson GK, Edfeldt K (2005): Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6): 1085-7.

Heim S, Mitelman F (1995): *Cancer cytogenetics*. New York: Wiley-Liss, 752 str.

Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, Simpson AJG, Old LJ, Cui Z (2006): Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression-complete resistance mice. *PNAS* 103(20): 7753-7758.

Horst D. Becker, Hohenberger W, Schlag PM, Junginger T (2005): *Chirurgická onkologie*, GRADA Publishing, 854 str.

Hořejší V, Bartůňková J (2009): *Základy imunologie*. TRITON 4 vyd., 320 str.

Ipsier J (2006): Genetika. Distanční opora pro kombinované studium biologie: <http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Genetika.pdf>.

Janeway CA (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-7.

Klener P (2002): Angiogeneze a nádorová onemocnění. Editorial, 209 str.

Knapp S, Aulock S, Leendertse M, Haslinger I, Draing C, Golenbock DT, Poll T (2008): Lipoteichoic Acid-Induced Lung Inflammation Depends on TLR2 and the Concerted Action of TLR4 and the Platelet-Activating Factor Receptor. *J Immunol* 180: 3478 -3484.

Knudson AG (2002): Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111(1):96-102.

Koop S, Schimdt EE, McDonald IC et al. (1996): Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and kontrol fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11080-11084.

Kotyk A (2011): Výskyt rakoviny ve světě: <http://www.veda.cz/article.do?articleId=68486>.

Koutecký J, Konopásek B (1999): Nevhodné slovo rakovina. Praha: Makropulos, 143 str.

Krejsek J, Kopecký O (2004): Klinická imunologie. Nucleus HK, 941 str.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67-68.

Lotz S, Aga E, Wilde I, Zandbergen, van G, Hartung T, Solbach W and Laskay T (2004): Highly purified lipoteichoic acid activates neutrofil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol* 75: 467 – 477.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I (2006): Immunology 7th ed., Canada: Mosby Elsevier, 552 str.

Medzhitov R, Janeway CA (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune system. *Curr Opin Immunol* 9: 4-9.

Michálek J, Büchler T, Hájek R (2004): T-lymphocyte therapy of cancer. *Physiol Res.* 53:463-469.

Michalová K (1999): Úvod do lidské cytogenetiky. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví.

Mitchell JA, Sorrentino R, Cartwright N, Paul-Clark M (2010): Toll-like receptor 2 as therapeutic target in lung disease. *Prog Respir Res* 39:69–72.

Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T (2002): Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations. *Infect Immun* 70(2): 938-44.

Murphy K, Travers P, Walport M (2008): Janeway's immunobiology. GARLAND Science, 888 str.

Nakumara K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M (2001): Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci* 70:791-798.

Olson JS (1989): The history of cancer: an annotated bibliography. Connecticut: Greenwood Press.

Parsonnet J (1995): The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 9(2):45-51.

Petruželka L, Konopásek B (2003): Klinická onkologie. Praha: Nakladatelství Karolinum.

Schindler LW (1991): Understanding the Immune System. Diane Publishing, 40 str.

Sládek Z (2006): Cytologie – studijní text na universitní internetové síti:
<http://www.mendelu.cz/af/fyziologie/cytologie/index.html>.

So EY, Ouchi T (2010): The application of Toll like receptors for cancer therapy. Int J Biol Sci 6(7): 675-681.

Sršeň Š, Sršňová K (1995): Základy klinické genetiky. Osveta, 259 str.

Šmardová J, Koptíková J, Sabó A, Špajdelová J (2010): Nádorové onemocnění. Klinická a radiační onkologie. OSVETA, 126 str.

Štefánek J (2012): Medicína, nemoci: <http://www.stefajir.cz>.

Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003): Toll-like receptors. Annu Rev Immunology 21: 335-376.

Takeda K, Akira S (2004): TLR signaling pathways. Semin Immunol 16: 3-9.

Takeda K, Akira S (2005): Toll like receptors in innate immunity. Int Immunol 17:1-14.

Triantafilou M, Manukyan M, Mackie A, Morath S, Hartung T, Heine H, Triantafilou K (2004): Lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi is lipid raft dependent. J Biol Chem 279(39) 40882-40889.

Tschuschke V (2004): Psychoonkologie. Praha: Portál, 215 str.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (2012): <http://uzis.cz>.

Votava M (2001): Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, 247 str.

Walker NW, Zentrich JA, Žižková B (1998): Prevence rakoviny tlustého střeva. Fontána, 186 str.

Weckesser J, Drews G, Mayer H (1979): Lipopolysaccharides of photosynthetic Prokaryotes. Annu Rev Microbiol 33:215-239.

Weinberg RA (1991): Tumor suppressor genes. Science 254(5035):1138-46.

Weinberg RA, Hanahan D (2000): The Hallmarks of Cancer. Cell Press 100:57-70.

Weinberg RA (2002): Taking the Study of Cancer Survival to a New Dimension. Cell Press 111(7):923-925.

Xia S, Lu Y, Wang J, He C, Hong S, Serhan CN, Kang JX (2006): Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: Impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. PNAS 103(33) 12499-12504.

Žaloudík J (2008): Vyhněte se rakovině - aneb prevence zhoubných nádorů pro každého. GRADA Publishing, 189 str.