

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Diplomová práce

2011

Iva Fornbaumová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Studium protinádorového působení viru Langat

Diplomová práce

Bc. Iva Fornbaumová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2011

Fornbaumová, I., 2011: Studium protinádorového působení viru Langat.

[Study of the anticancer efficacy of virus Langat. Mgr. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to study the efficacy of Langat virus as a oncolytic virus. Subsequently we tried to increase its anticancer influence on the basis of combination with same imunomodulators.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 15. 12. 2011

.....
Iva Fornbaumová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi za skvělé vedení diplomové práce, za jeho obrovskou trpělivost, za cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Oddělení imunologie parazitóz Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za umožnění provedení této práce, jmenovitě bych pak ráda poděkovala doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za jeho ochotu a vstřícnost. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Danielu Růžkovi, PhD za pomoc při práci s virem Langat a za cenné připomínky a rady. Mé velké poděkování patří také rodině, která mě velice podporovala po celou dobu mého studia, a také příteli, který byl mojí silnou oporou v mém snažení.

1. Úvod	1
1.1 Rakovina	1
1.1.1 Dělení nádorů podle typu tkáně	2
1.2 Melanom	2
1.3 Protinádorová imunita.....	3
1.3.1 Buněční činitelé protinádorové imunity	4
1.3.1.1 T-lymfocyty	4
1.3.1.2 NK buňky	5
1.3.1.3 Granulocyty	5
1.3.1.4 Makrofágy	5
1.3.1.5 Dendritické buňky	5
1.3.2 TGF- β v nádorové imunologii	6
1.3.3 IL-10 v nádorové imunologii	6
1.3.4 Obranný mechanismus nádorů před imunitní reakcí.....	7
1.4 Protivirová imunita	7
1.4.1 Obranný mechanismus virů před imunitní reakcí	9
1.5 Onkolytické viry	10
1.5.1 Historie	10
1.5.2 Strategie vytvoření tumor-selektivních virů.....	11
1.5.3 Geneticky modifikované onkolytické viry	13
1.5.3.1 Adenoviry	13

1.5.3.1.1 Replikační cyklus.....	14
1.5.3.1.2 Tumor-selektivní infekce adenovirů.....	14
1.5.3.1.3 Deleční mutanti adenovirů.....	15
1.5.3.1.4 Adenoviry s tumor-specifickým promotorem.....	16
1.5.3.2 Herpes viry (HSV).....	16
1.5.3.2.1 Deleční mutanti herpes virů.....	17
1.5.3.2.2 Herpes viry s tumor-specifickým promotorem.....	17
1.5.3.3 Poxviry	18
1.5.3.3.1 Vaccinia virus	18
1.5.3.4 Polioviry	18
1.5.4 Přirozeně onkolytické viry	19
1.5.4.1 Reoviry	19
1.5.4.2 Paramyxoviry	19
1.5.4.2.1 Virus newcastelské choroby (NDV).....	19
1.5.4.2.2 Virus příušnice (rod rubulavirus).....	20
1.5.4.2.3 Virus spalniček	20
1.5.4.3 Rabdoviry	21
1.5.4.3.1 Vezikulární vir stomatitidy (VSV)	21
1.6 Langat virus (LGT).....	21
2. Cíle práce.....	25
3. Materiál a metody.....	26

3.1 Chemikálie	26
3.2 Laboratorní zvířata.....	26
3.3 Virus.....	26
3.3.1 Vlastní příprava mozkové suspenze viru Langat TP21.....	26
3.4 Buněčné linie	27
3.4.1 Příprava melanomových buněk B16-F10 pro <i>in vivo</i> pokusy.....	27
3.4.2 Plaková titrace	27
3.5 Složení proenzymové směsi.....	28
3.6 Transplantace melanomových buněk B16-F10	28
3.7 Měření velikosti nádorů	28
3.8 Detekce metastáz	29
3.9 Experiment 1: Studium vlivu kombinace proenzymoterapie a viru Langat TP21 na růst nádorů.	29
3.10 Experiment 2: Studium vlivu podání viru Langat HyHK-18“3“ před transplantací nádoru s následným i. t. infikováním virem Langat TP21. Vliv na růst melanomů B16-F10.	29
3.11 Experiment 3: Vliv počtu inokulačních dávek viru Langat TP21 na nádorový růst. .	30
3.12 Experiment 4: Kombinace působení viru Langat HyHK-18“3“ a cyklofosfamidu na melanom B16-F10.	31
3.13 Experiment 5: Vliv infekce viru Langat TP21 na množství živých buněk melanomu B16-F10 <i>in vitro</i>	31
3.14 Vyhodnocení výsledků	32
4. Výsledky.....	33

4.1 Experiment 1 : Studium vlivu kombinace proenzymoterapie a viru Langat TP21 na růst nádorů.	33
4.2 Experiment 2: Studium vlivu podání viru Langat HyHK-18“3“ před transplantací nádoru s následným i. t. infikováním virem Langat TP21. Vliv na růst melanomu B16-F10.	34
4.3 Experiment 3: Vliv počtu inokulačních dávek viru Langat TP21 na nádorový růst. ...	37
4.4 Experiment 4: Kombinace působení viru Langat HyHK-18“3“ a cyklofosfamidu na melanom B16-F10.	38
4.5 Experiment 5: Vliv infekce viru Langat TP21 na množství živých buněk melanomu B16-F10 <i>in vitro</i>	40
5. Diskuze	41
6. Souhrn.....	44
7. Seznam použité literatury	45

1. Úvod

1.1 Rakovina

Rakovina vzniká nekontrolovatelným dělením zpravidla jedné buňky. Její název je odvozený z řeckého slova *karkínos* – rak. Rakovina svým klonálním dělením vytváří útvar – nádor, odborně tumor (z lat. *tumere* – nadouvat se), který nekontrolovaně přerůstá hranice napadené tkáně. Nádor může být buď ohraničený, a tudíž nezhoubný – benigní (z lat. *benignus* – dobrotivý), nebo zhoubný – maligní (z lat. *malignus* – zlý). Maligní nádor je velmi invazní. Vrstvá do tkáně, až narušuje cévní stěnu a může se šířit krevním řečištěm nebo lymfatickým systémem do dalších tkání organismu a zakládat druhotná ložiska nádorů tzv. metastáze.

U zdravých buněk je růst a dělení kontrolováno mezibuněčnými signály a jejich přenosem k regulátorům buněčného cyklu (Alberts a spol., 1998). Selhání této kontroly je příčinou nádorového bujení. Tento kolaps může nastat na úrovni produkce růstových faktorů (např. destičkový růstový faktor (PDGF), epitelový růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF)), jejich receptorů v membráně (např. transmembránový receptor s kinázovou aktivitou c – erb B receptor pro epidermální růstový faktor), na úrovni signálních molekul v cytoplasmě (např. src, ras) nebo transkripčních faktorů v jádře (např. jun, myb, c-myc, fos). Geny kódující důležité regulační mechanismy se nazývají protoonkogeny (např.: cycliny, E2F1, myc, fos, jun, erb) (Hanahan a Weinberg, 2000). Jejich produkty se podílejí na stimulaci růstu a množení buněk. Zmutováním těchto genů vznikají c-onkogeny (cell onkogeny), které mají zvýšenou aktivitu. Geny, jejichž produkty naopak tlumí proliferaci a řídí apoptózu, jsou známé jako tumor supresorové geny (např.: Rb (retinoblastoma), p53), nebo-li antionkogeny. Bylo prokázáno, že genetické změny protoonkogenů a tumor supresorových genů vedou k nádorovému bujení (Harrison a spol., 2003).

Imunitní systém odhalí a zničí většinu nádorových buněk včas. Jak se však některým nádorovým buňkám podaří uniknout imunitnímu systému, není ještě dostatečně objasněné. Ve většině případů dochází k selhání kontroly nad buněčnou proliferací až po 4 – 6 mutací. Přeměna normální buňky na nádorovou trvá přibližně 5 – 20 let, proto se onkologické onemocnění projevuje zpravidla u lidí ve vyšším věku. Nezanedbatelný vliv mají také rodinné genetické predispozice.

1.1.1 Dělení nádorů podle typu tkáně

1/ epitelální (z krycí a výstelkové tkáně)

benigní: epitelom, papilom

maligní: karcinomy

2/ stromální (z pojivové tkáně)

benigní: fibromy (vazivo), myomy (hladké svalstvo), chondromy (chrupavka)

maligní: sarkomy

3/ hematopoetické (z krvetvorných tkání)

maligní: leukémie a lymfomy

4/ germinomy (ze zárodečných tkání)

benigní: teratomy

maligní: seminom, embryonální karcinom

5/ neuroektodermu (z CNS a pigmentových buněk kůže)

CNS

benigní: gliom, meningeom

maligní: glioblastom, neuroblastom

kůže

benigní: pigmentový névus

maligní: melanom

6/ nádory ze žlázových tkání

benigní: adenomy

maligní: adenokarcinomy

7/ vzácné nádory ostatních tkání

1.2 Melanom

Je to maligní nádor pigmentových buněk melanocytů. Velkou roli při jeho vzniku hraje ultrafialové světlo ze slunečního záření nebo ze solárií. Melanom může vznikat z pigmentových névů nebo zcela *de novo*. Melanom se zprvu projevuje jako drobná, několik milimetrů velká pigmentová skvrna většinou hnědé barvy. Na rozdíl od běžných névů se zvětšuje, mění tvar a barvu a asi v 50 % případů se vyskytuje mírný pruritus. Vzácně se melanom vyskytuje na sliznicích a v oku. Existují i amelanotické formy, které mají

nestejnorodou barvu, nepravidelné okraje a mohou svědit či krvácet. Je-li zachycen včas, může se odstranit chirurgickým zákrokem. Pokročilý melanom dokáže zakládat metastáze a léčba je pak komplikovaná. K léčbě se využívá imunoterapie a podávání cytostatik. Lidské melanomy dělíme na 4 druhy: povrchově se šířící melanom, modulární melanom, lentigo maligna melanom a akrolentiginózní melanom (Čáp a spol., 2005). V myší populaci jsou rozeznávány 4 buněčné linie melanomů: B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. V této práci byl použit melanom B16-F10, který je charakterizován vysokou schopností metastazovat, a to zejména do plic (Nakamura a spol., 2002).

1.3 Protinádorová imunita

Imunitní systém organismu se dělí na dvě hlavní složky – nespecifickou (vrozenou) imunitu a specifickou (adaptivní) imunitu. Složky nespecifické imunity, ať již buněčné (makrofágy, NK buňky, granulocyty, dendritické buňky) nebo humorální (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny), jsou schopny rychlé detekce přítomnosti patogenu v organismu. Specifická imunita je zprostředkována imunokompetentními buňkami (především T-lymfocyty) nebo humorálními faktory (protilátky).

K vyvolání imunitní odpovědi proti tumoru je zapotřebí přítomnost specifických povrchových antigenů, které umožňují rozpoznat nádorové buňky. Tyto antigeny se dělí do dvou skupin: antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA). Do kategorie TSA se řadí proteinové antigeny, jejichž výskyt je specifický pouze pro nádorové buňky. TSA byly prokázány u nádorů indukovaných chemickými a fyzikálními karcinogeny a některými viry. Antigeny asociované s nádory (TAA) jsou typické svým výskytem jak na buňkách zdravých, tak na buňkách nádorových. Jejich rozlišení závisí na časové či místní expresi. Patří sem onkofetální antigeny, např. α -fetoprotein (AFP) sekretovaný hepatocyty a antigen karcinoembryonální (CEA) u karcinomu tlustého střeva, prsu a plicního adenokarcinomu. Další skupiny TAA antigenů jsou melanomové antigeny (MAGE-1 a Melan-A), prostatický specifický antigen (PSA) u karcinomu prostaty a mnoho jiných (Hořejší a Bartůňková, 2005).

1.3.1 Buněční činitelé protinádorové imunity

1.3.1.1 T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou složky specifické imunity. Můžeme je rozdělit na ty, které mají na svém povrchu molekulu CD8+ (koreceptor MHC I), a ty které nosí na svém povrchu molekulu CD4+ (koreceptor MHC II). V prvním případě se jedná o prekurzory **cytotoxických T-lymfocytů** (CTL). Cytotoxické T-lymfocyty rozeznávají buňky napadené virem nebo jiným intracelulárním parazitem, které jsou následně ničeny těsným kontaktem s CTL a nebo prostřednictvím sekretovaných toxinů (Ferenčík a spol., 2005). Druhá skupina, T-lymfocyty s molekulou CD4+, jsou prekurzory tzv. pomocných lymfocytů (TH). Pomocné lymfocyty lze dále dělit podle cytokinů, kterými regulují imunitní reakci. Dělíme je na TH1, TH2 a TH3 lymfocyty. **TH1** buňky vylučují hlavně cytokiny IL-2, IL-17, IFN γ a lymfotoxin. Jejich hlavní funkcí je aktivovat makrofágy pomocí IFN γ . Aktivovaný makrofág na svém povrchu exprimuje MHC II molekuly a vylučuje cytokin IL-12, který je diferenciacním faktorem pro TH1 buňky. Ty se změny na efektorové TH1 buňky, které po vazbě na MHC II receptory na makrofágu začnou produkovat IFN γ . Samotný IL-2 je využíván TH1 buňkami jako autokrinní růstový faktor nezbytný pro jejich dělení a proliferaci. Kromě těchto cytokinů makrofágy sekretují ještě IL-1 a TNF- α , které přispívají k další stimulaci T lymfocytů. Vzájemné působení TH1 a makrofágů je také základním mechanismem tzv. imunopatologické reakce opožděného typu (Hořejší a Bartůňková, 2005). Přeměna **TH2** buňky na efektorovou se děje setkáním TH2 prekurzoru s antigenem na APC za přítomnosti IL-4. Ideální APC je dendritická buňka, která nese velké množství MHC II molekul. Aktivované TH2 buňky produkují zejména IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Sekrecí IL-4, IL-5, IL-6 a přímým mezibuněčným kontaktem aktivují B-lymfocyty k tvorbě protilátek a diferenciaci na plazmatické buňky (Ferenčík a spol., 2005). Podstatné je, že cytokiny TH1 stimulují vývoj TH1 buněk a inhibují vývoj TH2 buněk. Naopak IL-4 a IL-10 stimulují vývoj TH2 buněk a inhibují vývoj TH1 buněk (Ferenčík a spol., 2005; Hořejší a Bartůňková, 2005). **TH3** sekretují hlavně transformující růstový faktor (TGF β), který se účastní regenerace tkání, buněčné diferenciaci, embryogeneze a regulace imunitního systému. Poměr TH1/TH2 ovlivňuje typ infekce. Extracelulární patogeny vyvolávají protilátkovou odpověď. Intracelulární agens vyžadují aktivaci makrofágů a dendritických

buněk (Hořejší a Bartůňková, 2005). V případě nádorového onemocnění převládnu TH2 lymfocyty (Shurin a spol., 1999). Nádory mohou ovlivnit rovnováhu TH1 a TH2 produkci TGF- β a cytokinu IL-10 (Asselin-Paturel a spol., 1998; Kim a spol., 1995).

1.3.1.2 NK buňky

NK buňky, neboli přirození zabíječi, jsou subpopulací lymfocytů, která bojuje proti poškozeným buňkám. Likvidují hlavně nádorové buňky a buňky napadené virem (viz Protivirová imunita). Jsou bohatým zdrojem cytokinů (např. INF γ , IL-4).

1.3.1.3 Granulocyty

Granulocyty jsou efektorové buňky nespecifické imunity. Neutrofilní subtyp granulocytů obsahuje granula s lytickými enzymy, které využívá při fagocytóze. Neutrofilní granulocyty nemají jen schopnost fagocytózy, ale také se účastní tvorby kyslíkových radikálů k obraně proti nádoru (Veselský a spol., 2004). Granulocyty jsou důležitým zdrojem cytokinů, díky nimž mohou ovlivnit funkce imunitního systému.

1.3.1.4 Makrofágy

Stimulací monocytů ve tkáních vznikají makrofágy. Tkáňový makrofág funguje vedle fagocytózy jako antigen prezentující buňka (APC) pro TH lymfocyty a sekreční buňka. Klasickým znakem monocytů je molekula CD14, která umožní rozpoznání komplexů mikrobiálního LPS. Mezi další funkce patří regulace zánětu a cytotoxický efekt makrofágů.

1.3.1.5 Dendritické buňky

Jsou nejvýznamnějšími antigen prezentujícími buňkami. Díky své migrační aktivitě putují z krevních orgánů do tkání, kde se setkávají s mikrobiálním agens. Poté dochází k migraci do sekundárních lymfatických uzlin, kde exprimují velké množství stabilních molekul HLA I. a II. třídy. Výsledkem interakcí je klonální expanze specifických T-lymfocytů a následně aktivace B-lymfocytů (Krejsek a Kopecký, 2005).

1.3.2 TGF- β v nádorové imunologii

Transformující růstový faktor β je cytokin, který je exprimovaný buňkami ve všech savčích tkáních. Je členem rodiny růstových a diferenciacních faktorů, které se velkou mírou podílí na morfologických procesech, na histogenezi a organogenezi (Krejsek a Kopecký, 2005). Mezi jeho hlavní funkce patří indukce apoptózy a regulace buněčného cyklu. Ovlivňuje proliferaci a diferenciaci různých buněčných typů v těle a může sloužit jako růstový aktivátor i růstový inhibitor.

V nádorové imunologii má TGF- β dvojí roli. V raných stádiích nádorového bujení funguje jako supresor a inhibitor buněčné proliferace. V pozdější fázi vývoje tumoru se jeho role obrátí a působí jako nádorový promotor. Hlavním krokem v nádorové progresi je ztráta citlivosti buňky k účinku TGF- β . TGF- β je silný supresor imunitního systému, který přímo inhibuje proliferaci a aktivaci T-lymfocytů a také snižuje prezentaci antigenů na povrchu APC. TGF- β může také redukovat přilnutí T-lymfocytů k nádorovým buňkám, což zabraňuje infiltraci lymfocytů do nádoru. Buňky nádoru, které vytvářejí aktivní TGF- β , suprimují CD8+ lymfocyty a NK buňky, které pak nejsou schopny exprimovat perforiny, granzymy, FasL a IFN γ (Thomas a Massagué, 2005).

1.3.3 IL-10 v nádorové imunologii

IL-10 je produkován T regulačními lymfocyty, TH2 lymfocyty, B buňkami, monocyty, makrofágy či mastocyty. Má pleiotropní účinky v imunoregulaci a protizánětlivé reakci. IL-10 má imunosupresivní účinky. Výrazně tlumí aktivitu TH1, inhibuje sekreci IL-1, IL-2, IL-12 a IFN γ . V makrofázích tlumí produkci prozánětlivých cytokinů TNF α , IL1, IL6 a oxidu dusnatého, snižuje schopnost makrofágů prezentovat MHC molekuly druhé třídy. Snižuje aktivaci a funkce neutrofilních a eosinofilních granuloctů (Krejsek a Kopecký, 2005). V nádorové imunologii IL-10 působí pro i protinádorově. Jeho protinádorové účinky se projeví ve stimulaci produkce cytokinů NK buňkami (Carson a spol., 1995). Na druhé straně, jeho overexprese byla detekována u nádorů melanomu a lymfomu (Asadullah a spol., 2003).

1.3.4 Obranný mechanismus nádorů před imunitní reakcí

Existuje celá řada mechanismů úniku nádorových buněk před imunitou. Některé z nich jsou uvedeny v následujícím přehledu (Hořejší a Bartůňková, 2005).

- variabilita nádorů v čase
- nízká hustota exprese nádorových antigenů
- sialylace povrchu nádorových buněk, která vede k zamaskování některých epitopů nádorových antigenů
- stimulační účinek růstu nádorů pomocí protinádorové protilátky
- produkce faktorů blokujících T-lymfocyty (jako např. TGF- β , IL-10)
- produkce FasL na povrchu nádorové buňky – indukují apoptózu CTL
- produkce oxidu dusného, IL-10 a TGF- β – inhibují funkci nebo životnost dendritických buněk
- působení regulačních T-lymfocytů

1.4 Protivirová imunita

Protivirovou imunitu lze členit do čtyř fází: zabránění penetrace virů, zabránění replikace, eliminace virem infikovaných buněk a eliminace volných virionů. Účinným způsobem zabránění penetrace viru je absence virových receptorů. Mnohem větší význam má plně funkční slizniční či kožní imunitní systém. Největší potenciál zabránit replikaci viru mají **interferony** typu I (INF α , IFN β a IFN ω) a nepřímo pak IFN γ . Virová infekce je nejsilnějším induktorem tvorby interferonů. Interferony se účastní vedle antivirového působení regulace hematopoézy, podílejí se na koordinaci humorální a buněčné odpovědi (např. zvyšují expresi histokompatibilního antigenu), inhibují buněčný růst a uplatňují se v protinádorové imunitě (zesilují funkci NK buněk). Interferony virem infikovaných buněk buď indukují antivirový stav neinfikovaných buněk, nebo vedou k programované buněčné smrti infikované buňky.

Antivirové působení interferonů je zprostředkováno několika mechanismy:

- Aktivace RNAázy L – působením interferonů dochází k indukci exprese 2', 5' oligoadenylát syntézy, která po navázání dsRNA aktivuje RNAázu L, která je schopna degradovat virovou ribonukleovou kyselinu.

- Indukce syntézy PKR (proteinová kináza R), která v přítomnosti virové RNA fosforyluje elongační faktor II (ELF2), jehož fosforylací se zabrání translaci virové mRNA.
- IFN γ a další cytokiny stimulují expresi NO syntázy a produkci NO, který inhibuje ribonukleotid reduktázu, nepostradatelnou pro syntézu DNA, a brání tak růstu viru na úrovni syntézy DNA.

Další fází v protivirové imunitě je eliminace virem infikované buňky. Pro viry je typické ukrytí před imunitním systémem uvnitř infikovaných buněk. V eliminační reakci virem napadené buňky je zapojena jak vrozená imunita (NK buňky), tak mechanismy specifické imunity (cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty). **NK buňky** svým cytotoxickým účinkem ničí buňky, které mají pozměněné povrchové vlastnosti. Identifikace takovéto buňky probíhá mnohočetnými interakcemi mezi membránovými molekulami NK buňky a virem infikované buňky. NK buňky mají dvě skupiny receptorů. Receptory KAR (Killer Activating Receptors) patří do rodiny C-lektinů. Tyto receptory interakcí s cukernými zbytky na cílové buňce přinášejí pro NK buňku aktivační podněty. Mohutný proaktivační podnět poskytují také receptory na povrchu NK buněk pro imunoglobulin třídy IgG (CD16), které reagují s virovými antigeny na virem napadené buňce. Tyto receptory jsou odpovědné za tzv. na protilátce závislou cytotoxickou reakci (ADCC). Druhou skupinou receptorů jsou KIR receptory (Killer Inhibitory Receptors), které reagují s HLA I systémem. Ty poskytují pro NK buňky inhibiční signály. Pak už jen záleží na poměru signálů. Převažují-li proaktivační podněty, nastává zničení virem napadené buňky vypuštěním cytolytických granulí obsahujících perforin a granzymy. Obdobnými mechanismy jako NK buňky usmrcují virem infikované buňky i **CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty** s tím rozdílem, že T-lymfocyty specificky rozpoznávají molekuly I. třídy HLA s navázanými virovými antigeny na povrchu buněk prezentujících antigen (APC). Po stimulaci antigen prezentující buňkou se prekurzor cytotoxických buněk začne proliferovat a diferencovat na klon zralých efektorových cytotoxických buněk (CTL). Expanze CTL je regulována sekrecí IL-2 TH1 lymfocytů. CTL využívají tři druhy cytotoxických mechanismů:

- Podobně jako NK buňky, CTL buňky degranulují své perforiny a granzymy při těsném kontaktu do cílové buňky, které způsobí její apoptickou smrt.

- Jiné spojení nastává při spojení Fas-ligandu (FasL), který se nachází na povrchu CTL a apoptického receptoru Fas přítomného na povrchu cílové buňky. Tato interakce vyvolá apoptózu zasažené buňky.
- Další možností jsou cytokiny, zejména lymfotoxin a TNF- β , které působí jako FasL. Tento způsob není tak specifický, a proto může dojít k poškození velkého počtu zdravých buněk s následnou poruchou funkce daného orgánu.

Eliminace volných virionů v tělní tekutině je kontrolována prostřednictvím specifických protilátek B-lymfocytů indukovaných TH2 lymfocyty. Mohutný protivirový potenciál mají protilátky třídy IgM a podtřídy IgG₁ a IgG₃. Vazba protilátky na virový antigen aktivuje komplementový systém. Virové částice opsonizované komplementem a protilátkami jsou fagocytovány. V případě antigen prezentujících buněk jsou jejich antigeny navázané na molekuly HLA systému prezentovány T-lymfocytům.

1.4.1 Obranný mechanismus virů před imunitní reakcí

Viry proti imunitnímu systému nejsou bezbranné. Mezi hlavní protiimunitní nástroje virů patří:

- potlačení mechanismů tlumících replikaci virů
- únik účinkům IFN α a IFN β
- omezení prezentace virových antigenů na infikovaných buňkách
- omezení exprese buněčných MHC I a MHC II
- deregulace aktivit komplementu
- schopnost proměňovat svoji antigenní výbavu
- schopnost potlačovat imunitu
- vytváření imunosupresivních cytokinů

a mnoho dalších (Krejsek a Kopecký, 2005)

1.5 Onkolytické viry

1.5.1 Historie

K používání virů k léčbě rakoviny přispěla náhoda. Nebyl to nápad vycházející z propracované teorie, nýbrž pramenil z pozorování pacientů s rakovinou, kteří přešli do krátké regrese v důsledku přirozených virových infekcí. Záměrné používání virů začalo na začátku druhé poloviny 20. století. Tehdy proběhly velmi hazardní klinické testy. V testech byly často použity neoslabené virové izoláty od pacientů prodávajících těžké infekce, např. virus západonilské horečky a virus hepatitidy. Jelikož neexistovaly technologie pro tvoření rekombinantních virů, obrátily se všechny snahy k hledání přirozených onkolytických virů. Především se začaly používat polioviry, adenoviry, coxsackie virus a jiné. Bohužel se terapie neobešly bez komplikací. Propuknutí nekontrolované infekce přispělo k zvýšené morbiditě i mortalitě pacientů. Často se stávalo, že viry byly zneškodněny imunitním systémem dříve než stačily značně poškodit nádor. Jejich kompetence sahala jen na určité druhy rakoviny a regrese jimi způsobená byla většinou zaznamenána u mladších imunosupresivních osob trpících například leukemií nebo lymfomem. Bohužel regrese byla obvykle krátkodobá a neúplná.

S pozdějším rozvojem genového inženýrství se objevily nové možnosti pro manipulaci s viry. Vědci nyní mohli modifikovat existující viry tak, aby byly více specifikované na nádorové buňky, snížit jejich odstraňování imunitním systémem nebo je přimět k expresi nádor potlačujících genů. Tak vznikly nové modifikované onkolytické viry selektivně napadající nádorové buňky. Převážně se využívá virus vakcinie, adenovirus, herpes simplex virus, případně reovirus. Výhodou je jejich přirozená schopnost napadat nádorové buňky a jednoduchost genetické manipulace.

Jeden z prvních geneticky modifikovaných virů byl adenovirus Onyx-015, vyvinutý firmou Pharmaceuticals. Klinické testy prokázaly dostatečnou bezpečnost a pokračovaly s velkou úspěšností až do třetí fáze. Bohužel poté byl vývoj a testování Onyx-015 z finančních důvodů zastaven. První komerčně vyráběný onkolytický virus, uznaný čínskou správou SFDA (China's State Food and Drug Administration) je adenovirus H101 nazvaný podle biotechnologa Shanghai Sunway (Garber, 2006). Virus H101 byl zkoušen u rakoviny

jícnu a karcinomu dlaždicového epitelu hlavy a krku. H101, ani velmi podobný Onyx-015 nejsou specifické přímo na buňky rakoviny, ale ničí je přednostně a jejich působení se znásobuje při užití chemoterapie.

1.5.2 Strategie vytvoření tumor-selektivních virů

Onkolytické viry dělíme do dvou skupin, na ty, které se množí preferenčně v nádorových buňkách, a na ty, které byly geneticky modifikované pro tento účel. V prvním případě jde převážně o oslabené kmeny viru používané jako vakcíny. Pro vstup do buňky přednostně využívají receptory nacházející se v nadměrném množství na povrchu nádorových buněk (coxsackievirus A21, poliovirus PV1) nebo se dokážou množit pouze v buňkách s narušenou antivirovou odpovědí (virus průšnic). Často jde o viry normálně neinfikující člověka (virus newcastelské choroby, virus vezikulární stomatitidy). Někdy využívají pro svou replikaci defekt v buněčné signalizaci nádorové buňky (reovirus). Většinu přirozeně onkolytických virů tvoří viry s RNA genomem (virus newcastelské choroby, virus vezikulární stomatitidy a reovirus) (Španielová, 2010). Ty jsou pro viroterapii jen málokdy geneticky upravovány. Na druhé straně DNA viry jsou většinou využívány v genové terapii. V tabulce 1 jsou vybrané přirozeně onkolytické viry, které byly používány pro testování v klinických studiích a preklinických testech.

Tab. 1 Přirozeně onkolytické viry testované v klinických studiích a preklinických testech.

čeleď	druh	klinické testy	cílenost	reference
Reoviridae	Reovirus	I – II	buňky epitelu hlavy a krku	Oncolytics Biotech
Paramyxoviridae	virus spalniček	I	gliom, nádor vaječníků, mnohočetný myelom	Phuong (2003)
	virus příušnic	preklinické testy	vykazuje stejný potenciál jako virus spalniček	Russell (2002)
	onkolyzát 73-T	II	melanom	Batliwalla (1998)
	NDV/MTH-68	preklinické testy	glioblastom	Csatary (2004)
	PV701	I	pokročilé solidní tumory	Pecora (2002)
	NDV-HUJ	I - II	mnohočetný myelom	Freeman (2006)
Rabdoviridae	VSV	preklinické testy	gliom, melanom	Stojdl (2003)

Genová terapie onkolytických virů se zaměřila na dvě metody pro navození selektivní virové replikace: transdukční a netransdukční. Transdukční metody usilují o využití specifických receptorů, čehož se docíluje upravením proteinů virového obalu tak, aby virus pro svůj vstup do buňky přednostně rozeznával receptory na nádorových buňkách. To se nejčastěji využívá u viru spalniček a adenovirů (Španielová, 2010). Netransdukční přístupy zahrnují změny v genomu virů pomocí delece genů důležitých pro replikaci viru v normálních buňkách, ale postradatelných pro množení viru v nádorových buňkách (aplikováno u adenoviru, viru herpes simplex 1, polioviru a viru vakcinie). Druhý netransdukční přístup využívá cílenou transkripci genů nutných pro replikaci vložením specifického regulačního promotoru, který je rozpoznán pouze v nádorové buňce (adenoviry a viry herpes simplex 1). U některých virů jsou kombinované všechny přístupy. Onkolytický potenciál je ještě umocněn vložením dalších terapeutických genů pro imunostimulační faktory, které podporují protinádorovou imunitu, nebo vložením sebevražedných genů, jejichž produkty mění některé jinak neškodné substance v látky vysoce cytotoxické. Buňka, která sebevražedný gen exprimuje, ničí tak sama sebe (aplikováno u adenovirů, viru herpes

simplex 1 a viru vakcinie) (Španielová, 2010). V tabulce 2 jsou vybrané geneticky modifikované onkolytické viry, které byly používány pro testování v klinických studiích a preklinických testech.

Tab. 2: Geneticky modifikované onkolytické viry testované v klinických studiích a preklinických testech.

čeleď	druh	genetická modifikace	klinické testy	reference
Adenoviridae	ONYX-015	delece E1B genu	I – III	Nemunaitis (2001)
	Ad Δ24	delece E1A genu	preklinické testy	Fueyo (2000)
	CV706	vložení PSA promotoru	I	DeWeese (2001)
	CV787	vložení rat probasin promotoru, PSA promotoru a genu E3	I – II	Cell Genesys
Herpesviridae	G207	delece ICP34,5, ICP6	I – II	Markert (2000)
	NV1020	delece ICP34,5, delece v TK genu	I	Geevarghese (2010)
	HSV1761	delece ICP34,5	I	Papanastassiou (2002)
Poxviridae	JX-594	delece genů	I – II	Liu (2008)
Polioviridae	poliovirus	IRES element nahrazen IRES rinovirů 2	preklinické testy	Gromeier (2000)

1.5.3 Geneticky modifikované onkolytické viry

1.5.3.1 Adenoviry

Využití adenovirů jako rekombinantních virů je výhodné z několika důvodů. Nerekombinovaný typ adenoviru přirozeně blokuje aktivitu proteinu p53. Toto je velmi výhodná vlastnost, jelikož u značné části nádorů dochází k mutaci p53 (viz úvod). Dále mají

vysokou efektivitu v průniku do nádorových buněk a vyznačují se velkou afinitou k epitelovým buňkám, ze kterých vzniká až 50 % nádorů. Adenoviry jsou v populaci velmi rozšířené, jsou málo patogenní, způsobují pouze mírné respirační infekce.

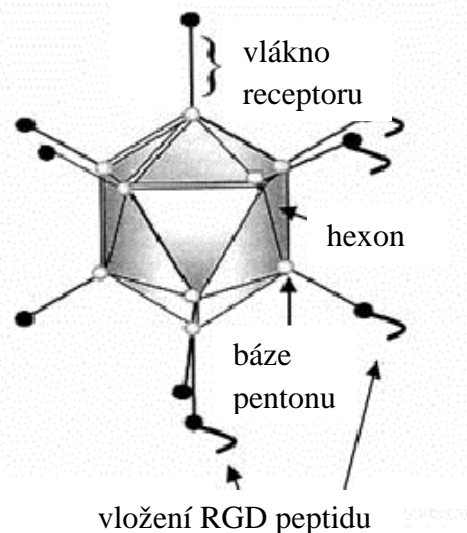
1.5.3.1.1 Replikační cyklus

Průnik do buňky probíhá receptorem zprostředkovanou endocytózou. Nejprve dochází ke spojení s primárním coxsackie-adenovir receptorem (CAR), po němž následuje spojení buněčných integrinů $\alpha_v\beta$ a $\alpha_v\beta_5$ s bází pentonu virového obalu pomocí arginin-glycin-asparagové kyseliny (RGD peptid). Virus poté vstupuje do buňky ve vezikulu, který fúzuje s endosomem. Endosom po okyselení praská a uvolňuje vir do cytoplazmy, který je přemísťován do jádra. Po vstupu do jádra buňky dochází nejdříve k expresi časných genů E1 – E4 (E – early). Proteiny genu E1A slouží jako kontrolní proteiny pro aktivaci dalších genů pozdní fáze exprese. Proteiny vzniklé přepisem genu E1B slouží k zastavení translace mRNA hostitelské buňky a společně s produkty genu E4 slouží pro transport virové mRNA z jádra do cytoplazmy. Produkty genu E3 blokují apoptózu infikovaných buněk. V pozdější rané fázi exprese je přepisován gen E2B, který kóduje proteiny sloužící k replikaci virové DNA. Regulace transkripce jednotlivých genových skupin je kaskádová. Transkripce raných genů E1 – E4 je navíc regulována promotory. V pozdní fázi exprese dochází k syntéze pozdních genů, které se označují jako L1 – L5. Ty kódují strukturální proteiny sloužící k sestavování nových virionů. Na druhé straně nestrukturální proteiny inaktivují proteiny v hostitelské buňce, které by bránily ve virové replikaci. Mezi tyto proteiny patří p53 a pRb.

1.5.3.1.2 Tumor-selektivní infekce adenovirů

Selektivní infekce nádorových buněk může být dosaženo pomocí bi-specifické molekuly. Tato molekula je tvořena protilátkou, která váže vlákno receptoru adenovirů na vysoce exprimované molekuly (např. receptor pro epidermální růstový faktor) na nádorové buňce. Tato modifikace byla úspěšně testována u buněk gliomu (Shinoura a spol., 1999; Yoshida a spol., 1998). Podobně, umístění RGD peptidu na konci vlákna adenovirového

Obrázek 1 : Adenovirus RGD



receptoru (obr. 1) dramaticky zvýšilo onkolytickou účinnost adenovirů u plicního karcinomu myši (Suzuki a spol., 2001). Velký potenciál v onkolytické terapii má výměna proteinů virového kapsidu mezi více než 50-ti různými serotypy lidských adenovirů a několika zvířecích. Metoda selektivní infekce má velmi dobré výsledky. Bohužel u jiných DNA virů než jsou adenoviry, nebylo dosaženo takových úspěchů.

1.5.3.1.3 Deleční mutanti adenovirů

Příkladem je výše zmíněný adenovirus **ONYX-015**, což je modifikovaný adenovirus s delecí genu pro virový protein E1B (Nemunaitis a spol., 2000). Bez proteinu E1B není adenovirus schopný replikovat se v buňkách s intaktní dráhou proteinu p53. Až 50 – 70 % nádorů má však dráhu p53 poškozenou, což umožňuje viru napadání pouze buňky nádorové a destruuje je navozením programované buněčné smrti. V klinických testech I. a II. fáze prošel ONYX-015 s povzbudivými výsledky. Vir byl podán několika různými způsoby (intratumorálně, intravenózně, intraperitoneálně, intraarteriálně). Při intratumorálním podání vysoké dávky viru (10^{11} PFU) pacientům trpícím karcinomem hlavy a krku, byl vir dobře snášen bez vážných symptomů (Ganly a spol., 2000). Zvláště pak v kombinaci s chemoterapií bylo zaznamenáno u poloviny zkoumaných pacientů částečné nebo úplné vymizení nádorů, které přetrvávalo více než 6 měsíců. Bohužel testy na rakovinu pankreatu a ovaríí už nebyly tak nadějně (Mulvihill a spol., 2001; Vasey a spol., 2002). Klinické testy I. a II. fáze viru ONYX-015, podávaného intraarteriálně pacientům s primární i sekundární rakovinou jater a tlustého střeva, byly dobře tolerovány, ale nedocházelo k regresi nádorů.

Ad $\Delta 24$ je další E1 modifikovaný adenovirus. Vznikl delecí proteinu E1A, který je zodpovědný za vazbu k retinoblastomu a regulaci buněčného cyklu. E1A adenoviru soupeří o navázání na retinoblast s E2F, jedním z transkripčních faktorů eukaryotických buněk. E2F, který přirozeně váže retinoblast, je uvolněn z vazby, naváže se na E2 promotor a následně aktivuje fázi S buněčného cyklu, čímž přispěje k aktivaci replikace viru. V buňkách s deficientem retinoblastomu, což jsou hlavně rakovinové buňky, je velké množství volného E2F. V takovéto buňce se po infekci Ad $\Delta 24$ nastartuje replikace viru s následnou lýzou nádorové buňky. Naopak ve zdravé buňce je tento mutant neschopný vázat retinoblast, proto vir nedostane potřebný E2F faktor a nedochází k replikaci viru. Mutant viru v E1A genu nebyl ještě testován v žádných klinických testech. Nyní probíhají pokusy s mutantem **CB1**,

který má delecii v obou genech E1. Prozatím byly úspěšně testovány jeho onkolytické vlastnosti proti gliomu (Gomez-Manzano a spol., 2004).

1.5.3.1.4 Adenoviry s tumor-specifickým promotorem

Takto upravené onkolytické adenoviry vznikly vložením orgánově nebo nádorově specifického promotoru před geny rané fáze replikace E1 – E4. Například mutant **CV706** s vloženým prostaticky specifickým antigenem (PSA) před E1A oblast omezí transkripci viru jen na nádorové buňky prostaty, které jsou schopny tento promotor aktivovat. DeWeese a jeho skupina v první fázi klinických testů prokázali bezpečnost CV706 i při intraprostatickém podání vysoké dávky viru. Infekce se prokazovala slabými chřipkovými symptomy a hematurií. Hladina PSA, který se mimo jiné používá v diagnostice jako nádorový marker, se snížila o 30 – 50% (DeWeese a spol., 2001). Jiný prostaticky specifický adenovirus **CV787** s rat probasin promotorem pro E1A geny, PSA promotorem v oblasti E1B a s genem E3, je nyní testován v I. a II. fázi klinických testů (www.cellgenesys.com). Jiným promotorem, který řídí expresi E1 genů, je α -fetoprotein (AFP). AFP je exprimován během vývoje tkání. V dospělém jedinci je exprese omezena pouze na nádory vzniklé z hepatocytů nebo enterocytů (Hallenbeck a spol., 1999).

1.5.3.2 Herpes viry (HSV)

Virus hepatitidy byl mezi prvními, který se používal k léčbě rakoviny. Modifikovaní mutanti viru herpes simplex byli prvotně vyvíjeni pro léčbu neurologických malignit, jelikož wild-typ HSV je přirozeně neurotropní (Mineta a spol., 1995). Později se ukázalo, že mají schopnost působit i na mnoho jiných typů nádorů (Yoon a spol., 1998; Carroll a spol., 1996). Již v roce 1991 byl vyvinut mutant viru herpes simplex **dlsp_{tk}** s delecí pro gen thymidin kinasu (TK) a později mutanti s delecí ribonukleotid-reduktázy (ICP6). To výrazně snížilo jejich schopnost replikovat se v normálních buňkách a nezabránilo jejich efektivnímu množení v nádorových buňkách, jež jim oba enzymy poskytují v nadbytku. (Martuza a spol., 1991).

1.5.3.2.1 Deleční mutanti herpes virů

V dnešních testech se využívají tzv. mutanti druhé generace, kteří jsou zbaveni genu pro neurotropismus viru, $\gamma_{34,5}$ (ICP34,5). To velmi omezilo množení viru v buňkách centrálního nervového systému a zvýšila se tím bezpečnost používání mutantů HSV. ICP34,5 hraje velmi zásadní roli v průběhu virové infekce, protože svou vazbou na proteinfosfatázu^o1 α dokáže vyvolat defosforylaci translačního iniciačního faktoru eIF2 α , což vede k potlačení antivirové aktivity PKR (Leib, 2000). Většina virů obsahuje mutace ve více než jen v jednom genu. Na rozdíl od mutace jednoho genu to má velkou výhodu v tom, že se zmutované viry nevrátí do virulentního stavu.

G207, NV1020 jsou názvy nejlépe prostudovaných onkolytických herpes virů. Mutant herpes virus typ 1 **G207** obsahuje delecii v obou alelách $\gamma_{34,5}$ a delecii ICP6 (ribonukleoid reduktáza). V první fázi klinických testů, kde bylo testováno 21 pacientů s maligními gliomy, byl G207 velmi dobře snášen. Nebyly zjištěny žádné vedlejší účinky, u žádného pacienta se nevyvinula encefalitida a u několika pacientů byla pozorována na rentgenových snímcích protinádorová odpověď (Markert a spol., 2000). Mutant HSV1 a HSV2 s delecí v jedné alele $\gamma_{34,5}$ genu a delecí v genu pro thymidin kinázu, **NV1020** vykazuje výborné výsledky v léčbě jaterních malignit a kolorektálních nádorů. Onkolytické viroterapeutikum OncoVEX firmy BioVex odvozené z herpetického viru NV1020 je testováno proti několika typům nádorů. Slibné jsou výsledky léčby zhoubného melanomu a dalších typů nádorů. Další onkolytický herpes virus **HSV1716** byl dobře tolerován u pacientů s maligním gliomem po intratumorálním podání dávky 10^5 PFU (Rampling a spol., 2000). Nebyly zaznamenány žádné známky encefalitidy. HSV 1716 byl také zkoušen u pěti pacientů s melanomem (MacKie a spol., 2001). Došlo k zploštění melanomových bulek a byla mikroskopicky detekovaná nekróza rakovinových buněk. Bohužel studie byly prováděny na malém počtu respondentů, proto z výsledků nelze vyvodit jednoznačné závěry.

1.5.3.2.2 Herpes viry s tumor-specifickým promotorem

Mutant herpes simplex viru 1 **d120**, který má delecii v obou alelách ICP4 genu, nese vektor G92A, který obsahuje albumin promotor. Expresí raných ICP4 genů herpes virů, které jsou pod kontrolou albumin promotoru, omezí replikaci HSV na karcinom hepatocytů, protože albumin je exprimován výhradně v játrech. Vir d120 byl zatím zkoušen na nu-nu

myších, kde měl inhibiční účinky na hepatom. Jiný promotor calponin, typický pro svalové buňky, byl úspěšný v léčbě sarkomů měkkých tkání, např. synoviálního sarkomu (nádor kloubů), leiomyosarkomu (nádor hladké svaloviny trávicí trubice), osteosarkomu (nádor kostí). Testování je zatím v preklinické fázi.

1.5.3.3 Poxviry

1.5.3.3.1 Vakcinia virus

Virus vakcinie je nejznámější poxvirus od doby, kdy se používal k očkování proti variole (pravé neštovice). Rovněž se užívá experimentálně v rekombinantní podobě jako onkolytický virus atenuovaný odstraněním thymidin kinasy (Puhmann a spol., 2000) a jiných genů jako například růstový faktor GM-CSF pro zvýšení selektivity (McCart a spol., 2001). Nejdále postoupily klinické zkoušky onkolytického viroterapeutika JX-594 pro léčbu hepatocelulárního karcinomu a melanomu. Až 80 % pacientů s nádory žaludku a 71 % pacientů s melanomy reagovalo na léčbu JX-594 (Španielová, 2010; Merrick a spol., 2009).

1.5.3.4 Polioviry

Neurovirulentní polioviry, způsobující dětskou obrnu, jsou jedni z dalších potenciálních onkolytických virů. Atenuované polioviry musely být geneticky upraveny, aby byly bezpečné pro virovou terapii. K rekombinaci se využil mechanismus, který reguluje replikaci viru v hostitelské buňce. Všechny nové virové proteiny vznikají translací virových informačních RNA na ribosomech v cytoplazmě. Tento proces je v poliovirech a rinovirech iniciován působením tzv. IRES (internal ribosomal entry sites). Zatímco IRES poliovirů jsou aktivní v buňkách gliomů i v motorických neuronech, tak u rinovirů typu 2 jsou aktivní pouze v buňkách gliomů. Výměnou regulačních jednotek mezi těmito viry lze získat mutanty, kteří ničí nádorové buňky gliomu a nepoškozují motorické neurony (Gromeier a spol., 2000).

1.5.4 Přirozeně onkolytické viry

1.5.4.1 Reoviry

Reoviry patří k nejběžnějším virům vyskytujícím se v populaci. Téměř každý dospělý byl vystaven jejich účinkům. Nevyvolávají žádné závažné onemocnění. K jejich zvláštnostem patří schopnost replikace v buňkách s narušenou signální dráhou proteinu Ras. Asi třetina nádorů je způsobena aktivací proteinem Ras. Aktivace onkogenu Ras potlačuje v buňkách mechanismy, které jsou jinak zodpovědné za intracelulární protivirovou odpověď zajištěnou kinázou PKR. Zatímco zdravé buňky nemají aktivovaný onkogen Ras a jsou proti reovirům velmi odolné, v nádorových buňkách se reoviry množí a jsou schopny vyvolat lýzu hostitelských buněk. Signální dráha tohoto onkogenu však může být aktivována u mnohem širšího spektra nádorů, protože v nádorových buňkách bývají aktivovány i ty části signální kaskády, jež jsou onkogenu Ras nadřizeny nebo podřizeny (Petr, 2011). Bylo prokázáno, že reovirus může zničit nádorové buňky tlustého střeva, prsu, ovarií, lymfoidní malignity a potlačit růst metastáz (Norman a spol., 2002; Coffey a spol., 1998; Kinzler a spol., 1996). Účinek byl ještě zvýšen, když byla zároveň provedena imunosuprese. Kanadská firma Oncolytics Biotech testuje lék Reolysin odvozený z přirozeně se vyskytujícího reoviru. Reolysin se zkouší pro léčbu různých typů nádorů i v kombinované léčbě. První výsledky potvrdily, že léčbou lze dosáhnout výraznějšího zmenšení nádorů na podstatně delší dobu bez toho, že by se prohloubily nežádoucí účinky léčby.

1.5.4.2 Paramyxoviry

1.5.4.2.1 Virus newcastelské choroby (NDV)

NDV (Newcastle disease virus), dříve též označovaný jako pseudomor drůbeže, je vysoce nakažlivá infekce přenosná na člověka, u kterého vyvolává symptomy podobné chřipce. NDV je podobně jako reovirus senzitivní k overexpresi onkogenu Ras (Lorence a spol., 1994). NDV senzitivní mohou být také buňky s defektem interferonu. Použití NDV jako onkolytického agens začalo v roce 1965, kdy se použil atenuovaný kmen **73-T** k léčbě cervikálního karcinomu (Cassel a Garret, 1965). Kmen 73-T jako onkolyzát byl v pozdějších letech zkoušen pro léčbu melanomu (Cassel a Murray, 1992, 1977 a,b). Následně byl použit atenuovaný kmen **MTH-68** pro léčbu pacientů s pokročilým glioblastomem (Csatary a spol.,

2004). Během osmi let bylo léčeno 14 pacientů, z toho pět pacientů zemřelo na následky rakoviny, dva zemřeli na jiné komplikace a 7 pacientů bylo stabilizovaných. Dalším virem v řadě byl **PV701**. Ten byl použit k léčbě pacientů s mnohočetným nádorovým bujením (Pecora a spol., 2002). Přes veškeré komplikace s virovou infekcí, která u pacientů vyvolávala horečnaté stavy a hypotensi, nebyly pozorovány vážnější vedlejší efekty. Chřipkové příznaky postupně opadly. Nádorové bujení bylo stabilní u 14 pacientů z 62 pacientů po dobu 4 – 30 měsíců, u sedmi pacientů bylo pozorováno zlepšení a u dvou pacientů se stav zlepšil částečně. V roce 2006 skupina vědců z Hebrejské univerzity izolovala nový lentogenní kmen NDV, neurotropní **NDV-HUJ** (Freeman a spol., 2006). Virus byl lépe přijímán, u pacientů nevyvolával horečnaté stavy. U 14 pacientů trpících mnohočetným glioblastomem prokázal jednoznačné zlepšení.

1.5.4.2.2 Virus příušnice (rod rubulavirus)

Tento virus byl používán k léčbě různých malignit. Od doby kdy živá vakcína kmene Urabe způsobila u 1 % očkovaných nervové problémy, se vyvíjí nové atenuované kmeny (Saika a spol., 2006), například atenuovaný kmen S79 vykazuje slibné výsledky v *in vitro* pokusech (Yan a spol., 2005).

1.5.4.2.3 Virus spalniček

Používání spalniček jako onkolytických virů se rozvinulo po vyléčení pacienta s Hodgkinovo chorobou po náhodné infekci spalniček (Taqi a spol., 1981). To inspirovalo mnohé výzkumy, které použily virus spalničkové vakcíny (kmen Edmonston-B) k léčbě lymfomů. Jak původní virus, tak i rekombinantní kmen byli schopny zastavit růst maligního lymfomu u SCID myši (Grote a spol., 2001). Virus byl injikován přímo do nádoru nebo podán intravenózně. V prvním případě došlo k regresi nádoru, ve druhém k zpomalení jeho růstu. O rok později byly provedeny úspěšné studie působení viru spalničkové vakcíny na rakovinu epitelu ovaríí (Peng a spol., 2002). Výsledky dalších experimentů, které zkoumají účinnost léčby nejagresivnějšího typu gliomu, glioblastoma multiforme, už pokročily do fáze I klinických studií (Phuong a spol., 2003). Při hledání mechanismů onkolytického působení viru bylo zjištěno, že po podání viru je v buňkách lymfomu silně zvýšena tvorba tzv. proteinů tepelného šoku hsp70 (heat shock proteins) a gp96. Tím je výrazně zesilována imunogenita nádoru a následně indukována intenzivní protinádorová imunitní odpověď.

1.5.4.3 Rabdoviry

1.5.4.3.1 Vezikulární vir stomatitidy (VSV)

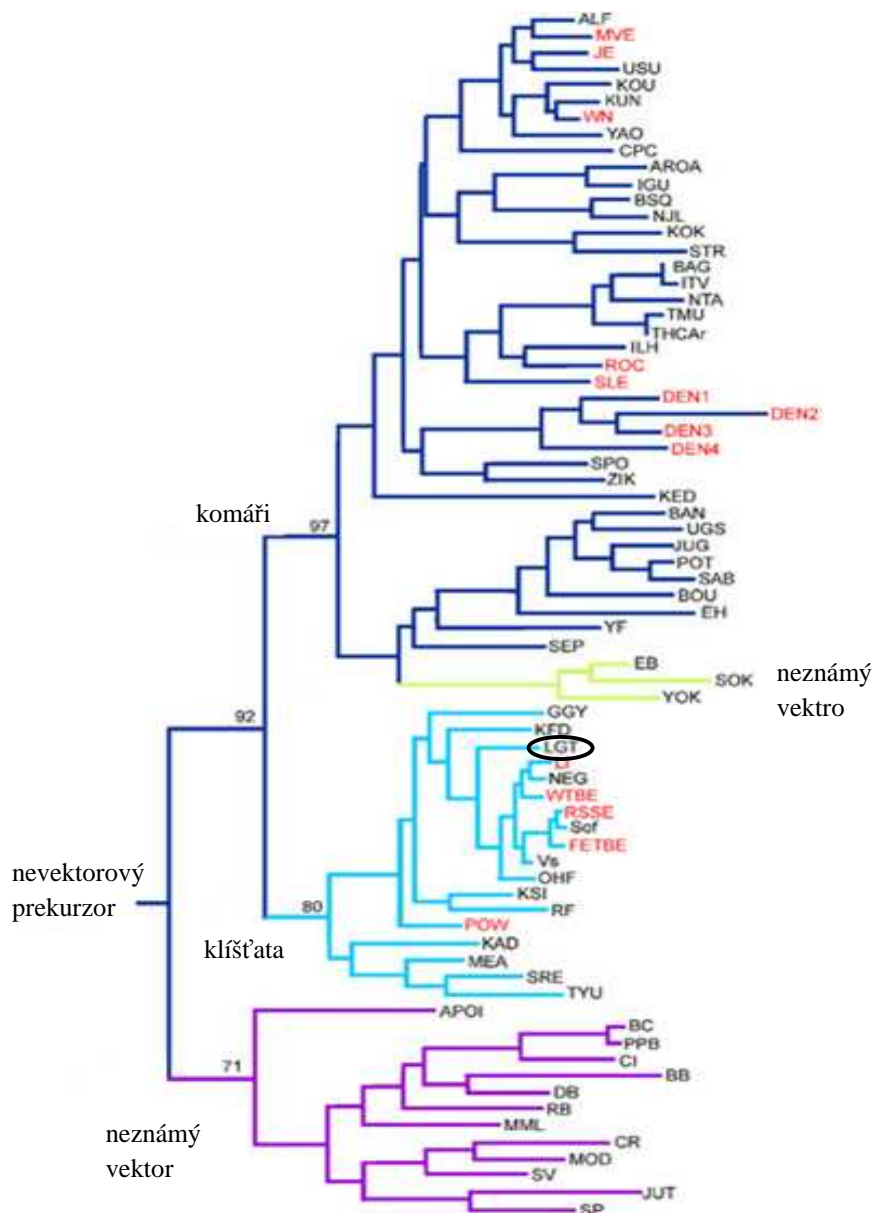
Virus, který je příbuzný vzteklině, způsobuje u koní, dobytka a vysoké zvěře onemocnění připomínající svými příznaky slintavku a kulhavku. U lidí se pak obvykle projevuje pouze příznaky podobné chřipce, vzácně pak třeba i puchýři v ústní dutině. VSV zatím ukázal úspěšné výsledky při léčbě metastazujících gliomů, melanomů a nádorů prsu v myších modelech (Fernandez a spol., 2002; Russell, 2002). Vědcům z Yale univerzity se úspěšně podařilo testovat VSV u myší se sarkomem měkkých tkání (Paglino a Van den Pol, 2011). Během experimentů se viru VSV podařilo zacílit a zlikvidovat 12 ze 13 typů sarkomů a přitom specificky účinkovat pouze na nádorovou tkáň.

1.6 Langat virus (LGT)

Virus Langat je obalený virus s jedno-vláknovým ssRNA (single stranded) genomem patřící do rodu *Flavivirus*, čeledi Flaviviridae, kam vedle typických arbovirů, jako je například původce horečky Dengué, virus japonské encefalitidy a virus žluté zimnice, patří také celý komplex virů klíšťové encefalitidy (TBEV): virus nemoci Kyasanurského lesa, virus Omské hemoragické horečky, virus vrtivky (Louping ill), virus Powassan a viry Středoevropské klíšťové encefalitidy a Dálného Východu. Evoluční vztahy flavivirů jsou ukázány na fylogenetickém stromu (Obr. 2), ve kterém byly zvýrazněny flaviviry napadající nervovou soustavu člověka a Langat virus. Tyto viry přenášené klíšťaty jsou endemicky rozšířené téměř na celé severní hemisféře, vyjma viru Langat. Virus Langat, kmen TP21, byl poprvé izolován z klíšťat druhu *Ixodes granulatus* blízko Kuala Lumpur v Malajsii (Smith, 1956). Na rozdíl od typických virů přenášených klíšťaty, LGT virus nepředstavuje žádnou epidemiologickou hrozbu pro člověka. V přirozených podmínkách nebyla hlášena žádná závažná onemocnění spojené s infekcí virem Langat u člověka, ačkoliv protilátky proti LGT byly detekovány v séru (Smith, 1956). Ve srovnání s virulentními encefalitickými viry LGT je méně neuropatogenní, proto bylo provedeno velké množství pokusů, kde se testovaly vakcinační schopnosti Langat viru proti TBEV. Ukázalo se, že neutralizační protilátky vyvolané infekcí LGT zkříženě reagují proti TBEV a zamezují propuknutí encefalitidy u experimentálních zvířat (Pletnev a spol., 2000; Thind, 1981; Price a Thind, 1973; Smith,

1967; Thind a Price, 1966 b). Mírné klinické známky encefalidity byly zaznamenány u myší po intraperitoneální inokulaci a poškození centrální nervové soustavy bylo zaznamenáno u makaků po intracerebrálním vpíchnutí (Price a spol., 1963). Krátce po izolaci Langat viru TP21 byl vytvořen oslabený kmen E5, který byl atenuován opakovaným pasážováním v kuřecích embryích (Thind a Price, 1966a). Kmen E5 u myší nevyvolával žádné klinické příznaky a u makaků byl mnohem lépe snášen. Následně byl LGT TP21 rozsáhle testován jako živá atenuovaná vakcína na lidech proti TBEV (Gritsun a spol., 2003; Mandl a spol., 1991; Smorodincev a Dubov, 1986). Testování LGT jako vakcíny bylo však náhle zastaveno kvůli vzácnému případu výskytu postvakcinační neurologické nemoci (1/20000 vakcinací). Na druhou stranu virus Langat má výhodné vlastnosti pro vakcinaci (už po jedné imunizaci vyvolá trvalou imunitní odpověď), a proto se všechny snahy obrátily k vytvoření více atenuovaného kmene viru Langat ve snaze omezit nebo redukovat jeho neuropatogenitu. Neuropatogenita virů je stanovena jejich schopností virulence a invazivity do centrální nervové soustavy. K ovlivnění neuropatogenních vlastností flavivirů se využívají molekulární mechanismy, které dokážou zasáhnout do replikace viru. Jedná se o tři konkrétní mutace, které zasahují různé části buněčného cyklu: přichycení se na povrch napadené buňky, replikace RNA a kompletace virových částic. Mutace III. domény povrchového proteinu E, mezi jehož funkce patří interakce viru s buněčnými receptory, fúze viru s membránou endosomu a také indukce tvorby virus neutralizujících protilátek, potvrdila snížení neuroinvazivity Langat viru (Campbell a Pletnev, 2000). Při replikaci flavivirů se podílejí obě koncové nekódující oblasti čtecího rámce viru na regulaci replikace, translace a balení viru. Delecí části nekódujících oblastí má vliv na neuroinvazivitu (Pletnev, 2001). Posledním mechanismem ovlivnění neuropatogenity je mutace proteinu C. O jeho funkci je zatím málo informací, ale měl by se podílet na kompletaci virových částic. Dále se pro oslabení viru může využívat chimerizace dvou jakýchkoliv heterogenních flavivirů. Pletnev a spol. (1998, 2001) provedli chimerizaci Langat viru TP21 s virem horečky Dengue typ 4 (DEN4). Vytvořená chiméra LGT/DEN4, která obsahovala premembránový protein M a obalový protein E z Langat viru a ostatní sekvence pocházeli z DEN4, prokazovala zmírněnou neurovirulenci i neuroinvazivitu a to jak u myší tak i u makaků (Rumyantsev a spol., 2006).

Webb a spol. (1966) ve své studii léčili virem Langat TP21 (7 pasáží na myších mozcích) 33 pacientů s leukémií a jinými druhy neoplazie, nejčastěji s bronchogenním karcinomem. Z epidemiologického hlediska infekce způsobila u dvou třetin pacientů jen mírné horečnaté stavy a pouze u dvou se vyvinula encefalitida. Z terapeutického efektu na malignity bylo možno odvodit čtyři skupiny pacientů. 1. skupina – virus jednoznačně pomohl, 2. skupina – virus vyvolal vyloženě nepříznivé účinky, 3. skupina – pacienti na virovou infekci nereagovali, 4. skupina – nešlo jednoznačně posoudit, zda bylo zlepšení způsobeno virem nebo šlo o jiné přirozené virové infekce nebo díky simultánní léčbě. Pozitivní výsledky infekce Langat virem byly demonstrovány u čtyř pacientů s pokročilým stádiem malignity (dva pacienti s leukémií a dva pacienti s karcinomem). Všichni čtyři pacienti přešli do krátké regrese po inokulaci LGT. Bohužel pacienti měli tak pokročilé stádium nemoci, že se nestačil úplně prošetřit vliv LGT na vývoj nádorového onemocnění, neboť pacienti dříve či později zemřeli na důsledky zapříčiněné maligním onemocněním.



Obr 2: Genetické vztahy mezi flaviviry.

Červeně vyznačené druhy jsou viry způsobující nervové onemocnění člověka.

Zkratky: ALF, Alfuy; MVE, Murray Valley encefalitida; JE, Japonská encefalitida; USU, Usutu; KOU, Koutango; KUN, Kunjin; WN, West Nil; YAO, Yaounde; CPC, Cacipacore; ARO, Aroa; IGU, Iguape; NJL, Naranjal; KOK, Kokobera; STR, Stratford; BAG, Bagaza; IT, Izrael-turecká meningoencefalomyelitida virus; TMU, Tembusu; THCAr, kmen Tembusu; ILH, Ilheus; ROC, Rocio; SLE, encefalitida svatého Louise; DEN, dengue; SPO, Spondweni; ZIK, lesní virus Zika; KED, Kedougou; UGS, Uganda; JUG, Jugra; POT, Potiskum; SAB, Saboya; BOU, Bouboui; EH, Edge Hill; YF, Žlutá zimnice; SEP, Sepik; EB, Entebbe bat; SOK, Sokoluk; YOK, Yokose; GGY, Gadgets Gully; KFD, virus nemoci Kyasanurského lesa; LGT, Langat; LI, Louping ill (vrtivka); NEG, Negishi; Sof, Sofjin; FETBE, TBE Dálného Východu; Vs, Vasilchenko; OHF, Omská hemoragická horečka; KSI, Karshi; RF, Royal Farm; POW, Powassan; KAD, Kadam; MEA, Meaban; SRE, Saumarez Reef; TYU, Tyuleni; APOI, Apoi; BC, Batu Cave; PPB, Phnom Penh Bat; CI, Carey Island; BB, Bukalasa bat; DB, Dakar bat; RB, Rio Bravo; MML, Montana myotis leukoencefalitida; CR, Cowbone Ridge; MOD, Modoc; SV, Sal Vieja; JUT, Jutiapa; SP, San Perlita; TBE, klíšťaty přenášená encefalitida; WTBE, TBE Západní Evropy; RSSE, Virus ruské jaro-letní encefalitidy.

Převzato z článku Neuroinvasive flavivirus infections (Sips a spol., 2011).

2. Cíle práce

1. Vytvořit souhrn základních poznatků o onkolytických virech.
2. Na modelu myšího melanomu studovat protinádorové účinky viru Langat.
3. Pokusit se zesílit protinádorový účinek viru Langat kombinací s některými imunomodulačními přístupy a na základě různých aplikačních režimů.

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Na přípravu proenzymové směsi byl použit bovinní trypsinogen (14 000 BAEE jednotek/mg proteinu po aktivaci), bovinní α -chymotrypsinogen A (48 BTEE jednotek/mg lyofilizovaného preparátu po aktivaci) a α -amyláza z *Bacillus* sp. (1780 maltózových jednotek /mg proteinu) – vše dodáno firmou Sigma Aldrich. Cyklofosfamid byl dodán firmou Baxter pod názvem Endoxan[®] 1 g.

3.2 Laboratorní zvířata

V pokusech byly použity inbrední kmeny myši C57BL/6 od firmy Charles River Laboratories. Jednalo se výhradně o samice, jejichž váha při dodání se pohybovalo kolem 18 – 20 g. Myši byly infikovány nejdříve ve stáří 10 týdnů, aby bylo dosaženo imunologické zralosti.

3.3 Virus

V pokusech byla použita 20% mozková suspenze viru Langat TP21. Tento kmen byl izolován v roce 1956 v Malajsii z klíštěte druhu *Ixodes granulatus*. Dále byl použit Langat virus kmen HyHK-18“3“ (Růžek a spol., 2006). Oba viry jsou uchovávány ve zmrazené podobě (-70 °C). Obě suspenze virů byly dar od doc. RNDr. Kopeckého, PAÚ AV ČR, České Budějovice.

3.3.1 Vlastní příprava mozkové suspenze viru Langat TP21

Mozky sajících myšek byly infikovány aplikací 0,01 ml původní suspenze viru Langat TP21 (100 PFU/ml). Pátý den jsme z infikovaných myšek vypitvali mozky a dali je zmrazit. Po sedmi dnech jsme mozky rozmrazili a zvážili. Vše bylo prováděno sterilně. Podle hmotnosti mozků jsme připravili dané množství kultivačního media L15, aby výsledná koncentrace mozkové suspenze byla 20%. Mozky jsme pinzetou přenesli do třecí misky, kde jsme je za postupného přilévání media rozetřeli na kaši. Vzniklou suspenzi jsme 10 min.

centrifugovali (7000 g, -3°C). Supernatant jsme rozdělili do zkumavek a dali zamrazit (-70°C). Titr viru byl určen pomocí plakové titrace (viz kapitola 3.4.2).

3.4 Buněčné linie

Buněčné linie melanomu B16-F10, dar od prof. Říhové, ÚMG AV ČR, Praha, byly kultivovány v RPMI 1640 s přidavkem 10% bovinního fetálního séra a antibiotik (Sigma). Kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

Pro plakovou titraci byla použita buněčná linie PS z prasečí ledviny („porcinekidneystable”) (Inoue a spol., 1962). Tyto buňky byly kultivovány v médiu L15 (Leibowitz) obsahujícím 3% prekolostrálního telecího séra (PTS), 1% směsi antibiotik a antimykotik (Sigma; penicilin, streptomycin, amphotericin B) a 1% glutamin.

3.4.1 Příprava melanomových buněk B16-F10 pro *in vivo* pokusy

Melanomové buňky B16-F10 jsou adhezivní buňky. Pro jejich uvolnění se používá trypsinizační směs (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Nejprve se slije kultivační medium z kultivační nádoby a třikrát se buňky důkladně promyjí fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). Na poslední promytí se použije 0,5 ml trypsinizační směsi, která se ihned slije. Poté se ještě jednou přidá 0,5 ml trypsinizační směsi a provede se trypsinizace při 37 °C. Po 3 – 5 minutách se trypsinizace zastaví přilítím kultivačního media RPMI 1640 s 10% FCS, ve kterém se buňky rozvolní pomocí Pasterovy pipety. Oddělené buňky se přelijí do zkumavky a doplní se médiem RPMI s 10% sérem na 10 ml. Poté se buňky nechají centrifugovat (150g, 10 min.). Po centrifugačním promytí se buňky rozsuspendují v RPMI bez séra. Vzorek se obarví trypanovou modří a spočítají se živé buňky v Bürkerově komůrce. Podle potřeby jsme pak zředovali buněčnou suspenzi kultivačním médiem, abychom dostali koncentraci 4 mil. buněk /ml.

3.4.2 Plaková titrace

Tato metoda se používá pro stanovení koncentrace virových částic ve vzorku. Tzv. titr viru se vyjadřuje v plakotvorných jednotkách PFU (angl. Plaque forming units) na 1 ml virové suspenze. Plaková titrace byla prováděna v 24jamkovém panelu na buňkách PS. Virová

suspenze byla naředěna desítkovou řadou v kultivačním mediu pro PS buňky (De Madrid a Porterfield, 1969). Poté se k naředěným vzorkům viru přidalo 300 µl suspenze savčích PS buněk o koncentraci $4 - 5 \times 10^5$ buněk/ml a obsah panelu byl řádně promíchán. Takto připravené buňky byly inkubovány v atmosféře 0,5% CO₂ při 37 °C. Po 4 hodinách byly buňky převrstveny 400 µl přelivu (roztok 3% karboxymethylcelulózy a 2x koncentrovaného kultivačního média L15 v poměru 1:1). Vše bylo znovu inkubováno při 37 °C v atmosféře 0,5% CO₂ po dobu 5 dní. Poté byly buňky promyty fyziologickým roztokem a obarveny naftalenovou černí (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilovanou vodou). Neživé buňky se neobarvily a tvořily ložiska zlyzovaných buněk, které se nám jeví jako plaky.

3.5 Složení proenzymové směsi

Byla použita směs o následujícím složení: 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy na ml fyziologického roztoku, sterilizované filtrací.

3.6 Transplantace melanomových buněk B16-F10

Myším byl oholen pravý bok, kam jim bylo aplikováno *s.c.* (pod kůží) 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra/myš.

3.7 Měření velikosti nádorů

Pro porovnávání růstu nádorů se měřila jejich velikost pomocí kaliperu. Z naměřených hodnot se vypočítal objem jednotlivých nádorů podle následujícího vzorce (Inaba a spol., 1986):

$$V = \pi/6 * A * B^2$$

A je největší naměřený rozměr nádoru a *B* je nejmenší naměřený rozměr nádoru.

Nádory byly měřeny nejméně dvakrát týdně a naměřené objemy byly statisticky vyhodnocovány.

3.8 Detekce metastáz

Pro detekci metastáz byly myším vypitvány plíce. Plíce byly zakonzervovány 4% roztokem formaldehydu. Po zakonzervování jsme plíce prohlédli pod binolupou a spočítali metastatická ložiska, která se jeví jako černé tečky (Větvička a spol., 2007).

3.9 Experiment 1: Studium vlivu kombinace proenzymoterapie a viru Langat TP21 na růst nádorů.

Byly použity 9 týdnů staré samice myší kmene C57BL/6. Třináctý den po aplikaci melanomových buněk B16-F10 byly myši, s detekovatelnými nádory, rozděleny podle velikosti nádorů do čtyř skupin (viz níže). Bylo dbáno na to, aby průměrná velikost nádoru byla v jednotlivých skupinách srovnatelná. Téhož dne byla započata terapie.

Skupina I – virus Langat TP21 (10 myší)

0,1 ml viru Langat TP21 (10^6 PFU/ml) injikováno intratumorálně první den terapie.

Skupina II – proenzymoterapie + virus Langat TP21 (10 myší)

První den terapie bylo myším injikováno intratumorálně 0,1 ml virus Langat TP21 (10^6 PFU/ml). Tentýž den byla zahájena proenzymoterapie – aplikace 0,1 ml proenzymové směsi denně do svaloviny levé zadní nohy.

Skupina III – proenzymoterapie (10 myší)

Od prvního dne terapie bylo aplikováno 0,1 ml proenzymové směsi denně do svaloviny levé zadní nohy.

Skupina IV – kontrolní skupina s nádory (10 myší)

Byl sledován vliv terapie na objem nádorů a přežití myší.

3.10 Experiment 2: Studium vlivu podání viru Langat HyHK-18“3“ před transplantací nádoru s následným i. t. infikováním virem Langat TP21.

Vliv na růst melanomů B16-F10.

V tomto experimentu byly použity 8-týdenní samice myší kmene C57BL/6, které jsme rozdělili do čtyř skupin po osmi (viz níže). Samice ve skupině II a skupině III byly inokulovány 0,2 ml viru HyHK-18“3“ (10^5 PFU/ml). Po týdnu byl samicím ve všech

skupinách transplantován nádor B16-F10. 12. den po transplantaci nádoru byl myším ve skupině I a II injikován virus Langat TP21 (intratumorálně 0,1 ml (10^4 PFU/ml)). Charakteristika skupin byla tedy následující:

	8-týdenní samice	9-týdenní samice	11-týdenní samice
Skupina I		melanom B16-F10	virus Langat TP21
Skupina II	virus HyHK-18 ³	melanom B16-F10	virus Langat TP21
Skupina III	virus HyHK-18 ³	melanom B16-F10	
Skupina IV		melanom B16-F10	

Byl sledován vliv terapie na objem nádorů a tvorbu metastáz. Sedmnáctý den po zahájení terapie byly myši zabity za účelem vyhodnocení metastáz.

3.11 Experiment 3: Vliv počtu inokulačních dávek viru Langat TP21 na nádorový růst.

Byly použity 10-týdenní samice myší C57BL/6. Dvanáctý den po aplikaci melanomových buněk B16-F10 byly myši rozděleny do čtyř skupin (viz níže) podle velikosti nádorů. Bylo dbáno na to, aby průměrná velikost nádoru byla v jednotlivých skupinách srovnatelná. Skupině I, II a III byl aplikován virus Langat TP21 v různém časovém rozmezí a počtu dávek.

Skupina I – virus Langat TP21 podán 1x (8 myší)

0,1 ml viru Langat TP21 (10^4 PFU/ml) podáno intratumorálně dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk

Skupina II – virus Langat TP21 podán 2x (8 myší)

0,1 ml viru Langat TP21 (10^4 PFU/ml) podáno intratumorálně 12. den a 17. den po aplikaci melanomových buněk.

Skupina III – virus Langat TP21 podán 3x (8 myší)

0,1 ml viru Langat TP21 (10^4 PFU/ml) podáno intratumorálně 12. den, 17. den a 22. den po transplantaci melanomových buněk.

Skupina IV – kontrolní skupina s nádory (8 myší)

Byl sledován vliv terapie na objem nádorů a přežití myší.

3.12 Experiment 4: Kombinace působení viru Langat HyHK-18“3“ a cyklofosfamidu na melanom B16-F10.

Byly použity 10-týdenní samice myši kmene C57BL/6. Dvanáctý den po aplikaci melanomových buněk B16-F10 byly myši, s detekovatelnými nádory, rozděleny do čtyř skupin (viz níže). Bylo dbáno na to, aby průměrná velikost nádorů byla v jednotlivých skupinách srovnatelná. Tentýž den byla započata terapie.

Skupina I – virus Langat HyHK-18“3“ + cyklofosfamid (6 myší)

0,1 ml viru Langat HyHK-18“3“ (10^5 PFU/ml) podáno intratumorálně první den terapie. Po dvou hodinách bylo podáno intraperitoneálně 0,1 ml cyklofosfamidu (100 mg/kg).

Skupina II – virus HyHK-18“3“ (5 myší)

0,1 ml viru Langat HyHK-18“3“ (10^5 PFU/ml) podán intratumorálně první den terapie.

Skupina III – cyklofosfamid (5 myší)

0,1 ml cyklofosfamidu (100 mg/kg) podáno intraperitoneálně první den terapie.

Skupina IV – kontrolní skupina s nádory (6 myší)

Byl sledován vliv terapie na objem nádorů a přežití myší.

3.13 Experiment 5: Vliv infekce viru Langat TP21 na množství živých buněk melanomu B16-F10 *in vitro*.

V 96jamkovém panelu jsme do 8 jamek napipetovali po 200 μ l suspenze melanomových buněk B16-F10 v mediu RPMI 1640 s 10% FCS (25000 buněk/ml). Buňky jsme nechali 24 hodin kultivovat v inkubátoru s 5% CO₂. Poté jsme opatrně odsáli medium a nainfikovali narostlé buňky 200 μ l suspenze viru Langat TP21 v mediu RPMI 1640 s 10 % FCS. Použili jsem suspenze o různé koncentraci: $5 \cdot 10^4$ PFU/ml, $1 \cdot 10^4$ PFU/ml, $2 \cdot 10^3$ PFU/ml, $4 \cdot 10^2$ PFU/ml. Poté jsme ponechali buňky s virovou suspenzí 24 hodin v inkubátoru s 5% CO₂. Abychom mohli spočítat živé buňky v Bürkerově komůrce, museli jsme je uvolnit za použití trypsinizační směsi (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Nejprve jsme pipetou opatrně odsáli medium a 2x promyli 200 μ l PBS. K promytým buňkám jsme přidali 50 μ l trypsinizační směsi a inkubovali jsme buňky 5 minut při 37°C. Po

inkubaci jsme přidali do jamek 150 μ l media RPMI s 10% FCS a prudčeji promíchali pipetou, aby se uvolnily všechny buňky. Buňky jsme obarvili trypanovou modří a spočítali v Bürkerově komůrce. Vše jsme prováděli v duplikaci. První den jsme spočítali vždy dvě jamky od každé koncentrace. Zbylé buňky s virem jsme nechali kultivovat do druhého dne. Druhý den jsme spočítali buňky ve zbylých jamkách obdobným způsobem jako den první.

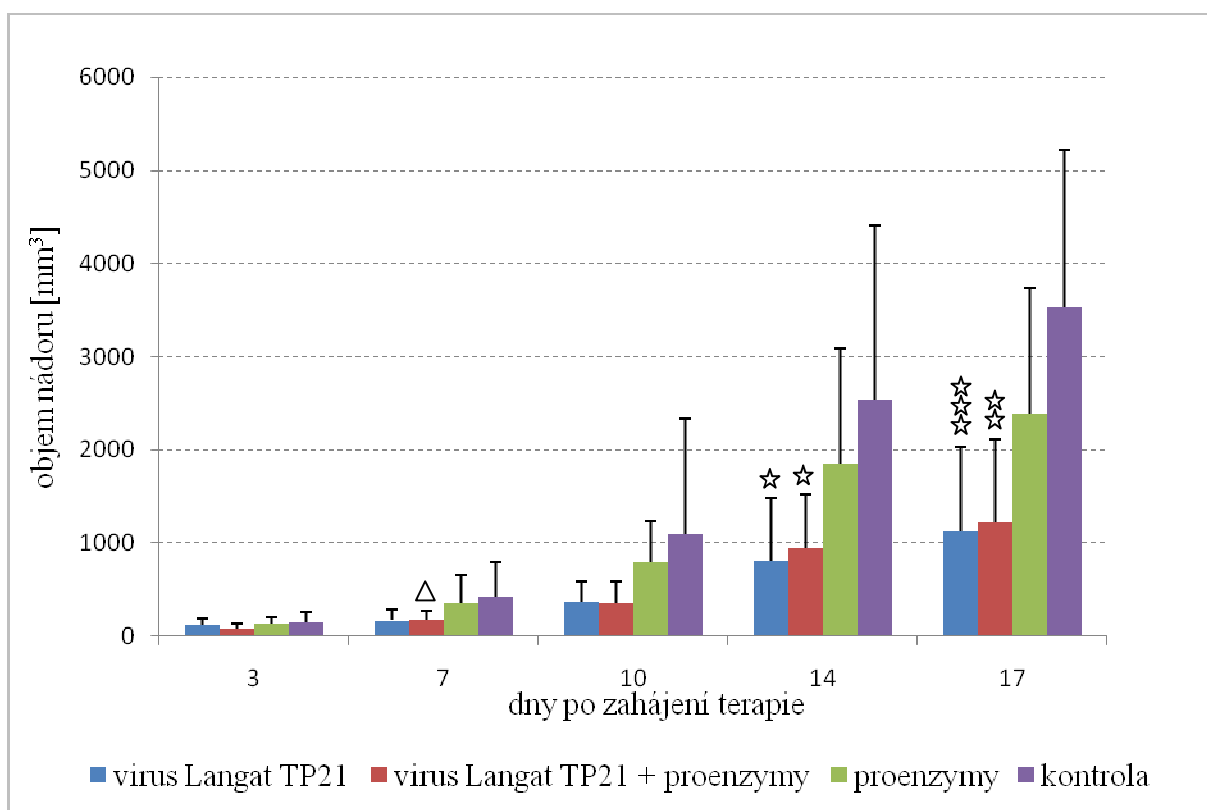
3.14 Vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení růstu nádorů bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel. Statistické vyhodnocení doby přežití myší bylo provedeno v programu MedCalc pomocí testu „Survival Analysis“. Výsledky, jejichž hladina významnosti P byla menší nebo rovna 0,05 byly považovány za signifikantní a jsou v grafech označeny symbolem (hvězdička, trojúhelníček).

4. Výsledky

4.1 Experiment 1 : Studium vlivu kombinace proenzymoterapie a viru Langat TP21 na růst nádorů.

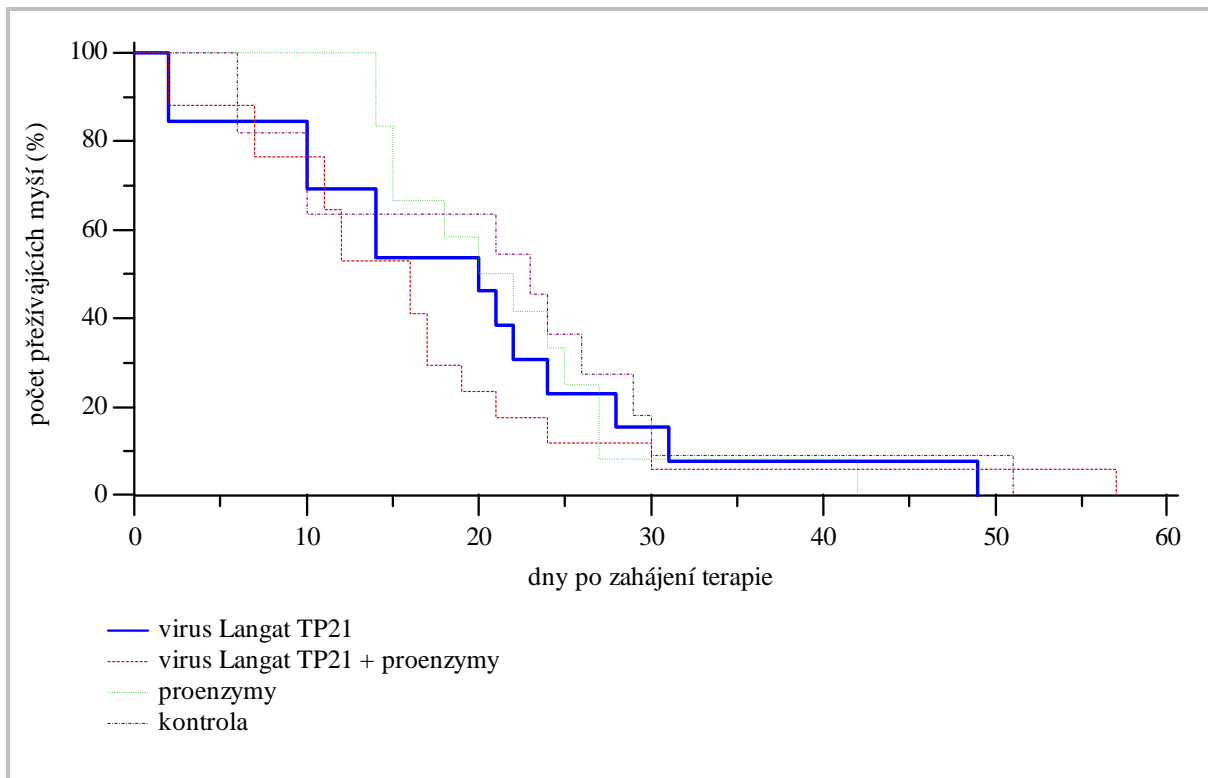
V tomto experimentu byl sledován vliv proenzymoterapie, viru Langat TP21 a jejich kombinace na růst nádorů. Jak vyplývá z Obr. 3, virus samotný způsoboval výraznou redukci nádorového růstu. Proenzymy působily rovněž redukci nádorového růstu, ale méně výraznou. Kombinace viru a proenzymů byla srovnatelná s působením samotného viru, nedošlo tedy k aditivitě ani synergii.



Obr. 3: Vliv proenzymoterapie, viru Langat TP21 a jejich kombinace na růst nádorů. Hladina statisticky významného rozdílu P vůči kontrole: ☆ = $P \leq 0,05$;

☆☆ = $P \leq 0,01$; ☆☆☆ = $P \leq 0,005$. Hladina statisticky významného rozdílu P vůči skupině proenzymy: Δ = $P \leq 0,05$.

Následující graf (Obr.4) znázorňuje mortalitu myši v závislosti na dnech po začátku terapie. Z grafu je patrné, že žádná z terapií neměla na přežívání myši význačný vliv. Statistické vyhodnocení tento fakt potvrdilo.



Obr. 4: Vliv proenzymoterapie, viru Langat TP21 a jejich kombinace na růst nádorů. Vliv jednotlivých terapií na přežívání myši.

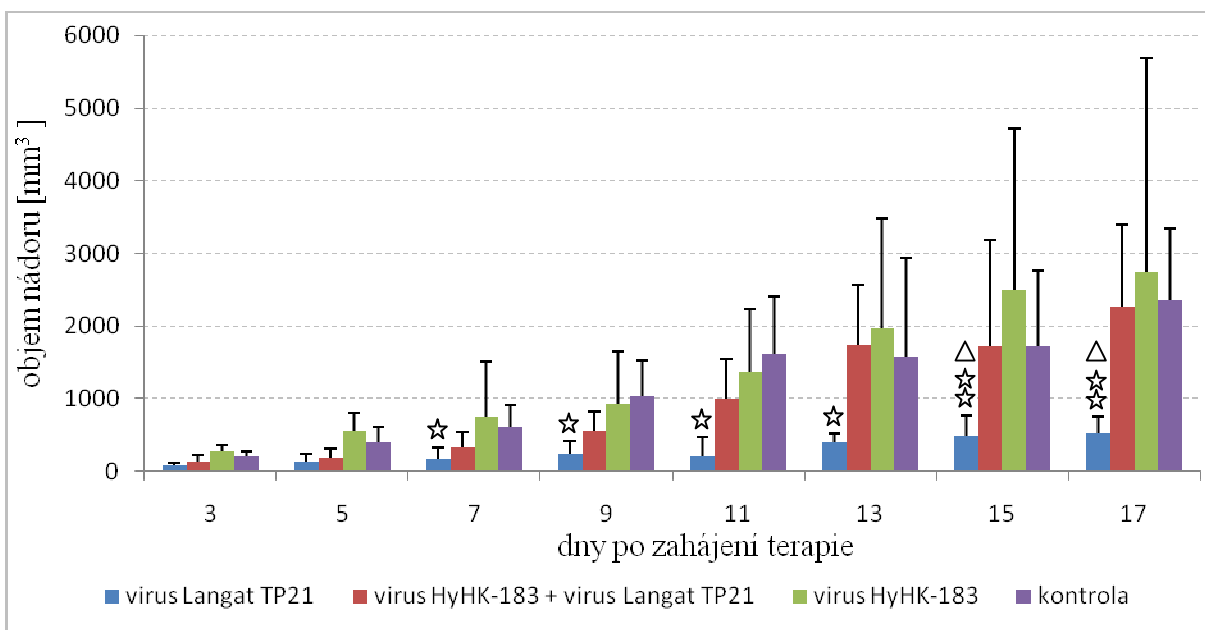
4.2 Experiment 2: Studium vlivu podání viru Langat HyHK-18“3“ před transplantací nádoru s následným i. t. infikováním virem Langat TP21.

Vliv na růst melanomu B16-F10.

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda vakcinace virem HyHK-18“3“ s následnou aplikací viru Langat TP21 ovlivňuje růst nádorů. Z Obr. 5 je patrné, že inokulace samotným virem HyHK-18“3“ měla spíše opačný než terapeutický účinek. Od 13. dne terapie je růst nádorů dokonce vyšší než u kontrolní skupiny. Ani kombinace vakcinace virem HyHK-18“3“ s podáním viru Langat TP21 nebyla úspěšná, vakcinace účinek viru Langat TP21 výrazně potlačila. Signifikantní snížení růstu nádorů je vidět u skupiny, kde byl podán samotný virus Langat TP21. Sedmý den od zahájení terapie byla dosažena statistická významnost rozdílu velikosti nádorů mezi kontrolní skupinou a skupinou, kde byl aplikován

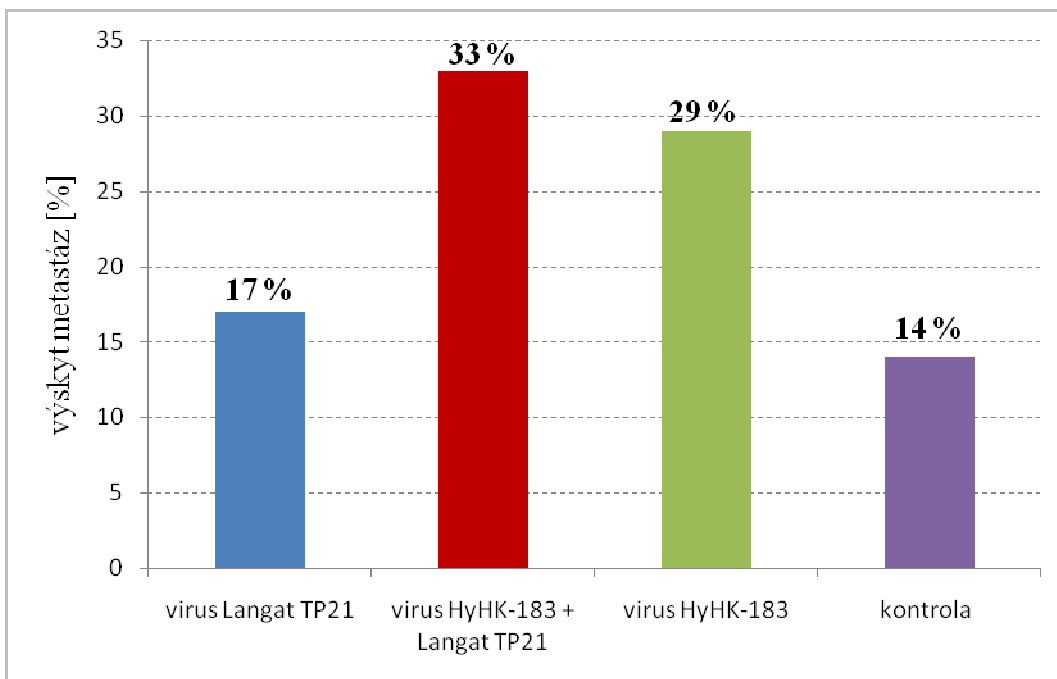
samotný virus Langat TP21. Tato hladina významnosti P se zachovala do konce experimentu.

Obr. 6 a Obr. 7 udávají výskyt a intenzitu metastáz. Na obr. 6 je uvedeno procento myší s výskytem metastáz. Obr. 7 zobrazuje průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly metastázy detekovány. Ve všech skupinách byl zaznamenán řídký výskyt metastáz. Vliv jednotlivých terapií je sporný.

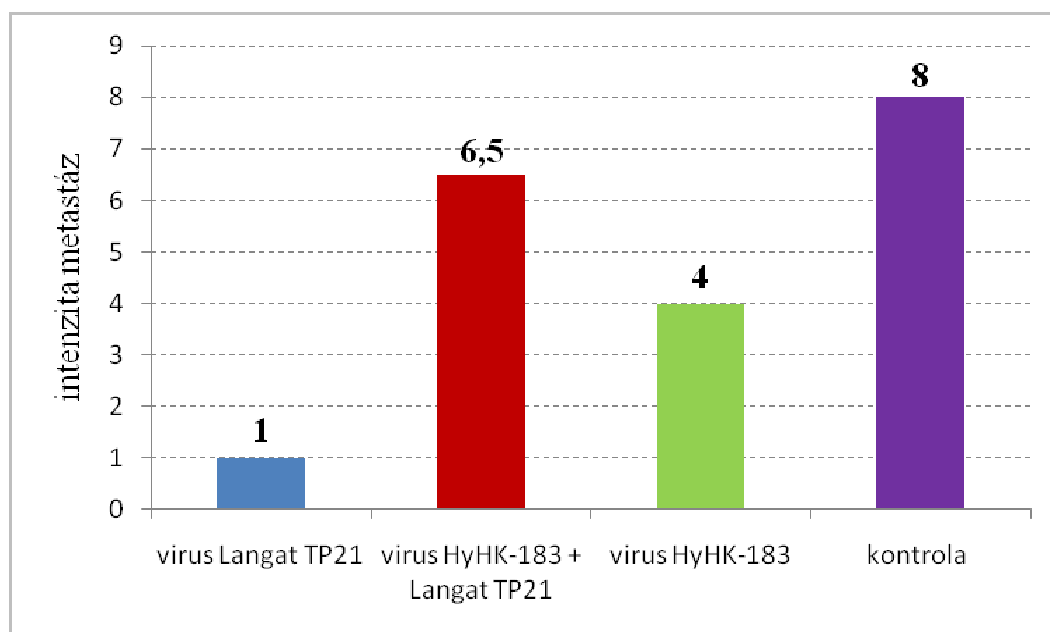


Obr. 5: Inokulace virem HyHK-18“3“ s následným podáním viru Langat TP21. Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: ☆ = $P \leq 0,05$;

☆☆ = $P \leq 0,01$. Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině virus Langat TP21 + virus HyHK-18“3“: Δ = $P \leq 0,05$.



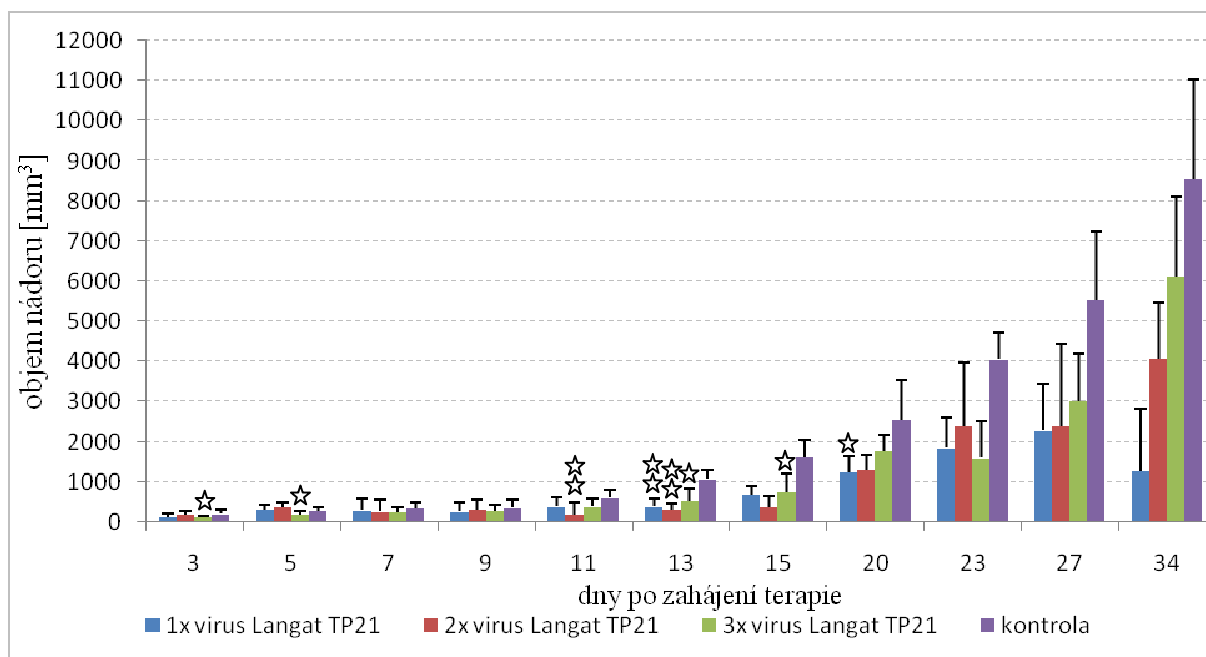
Obr. 6: Inokulace virem HyHK-18“3“ s následným podání viru Langat TP21. Procentuální incidence metastáz v jednotlivých skupinách.



Obr. 7: Inokulace virem HyHK-18“3“ s následným podání viru Langat TP21. Vliv jednotlivých terapií na průměrný počet metastáz u myši, u kterých byly metastázy zjištěny.

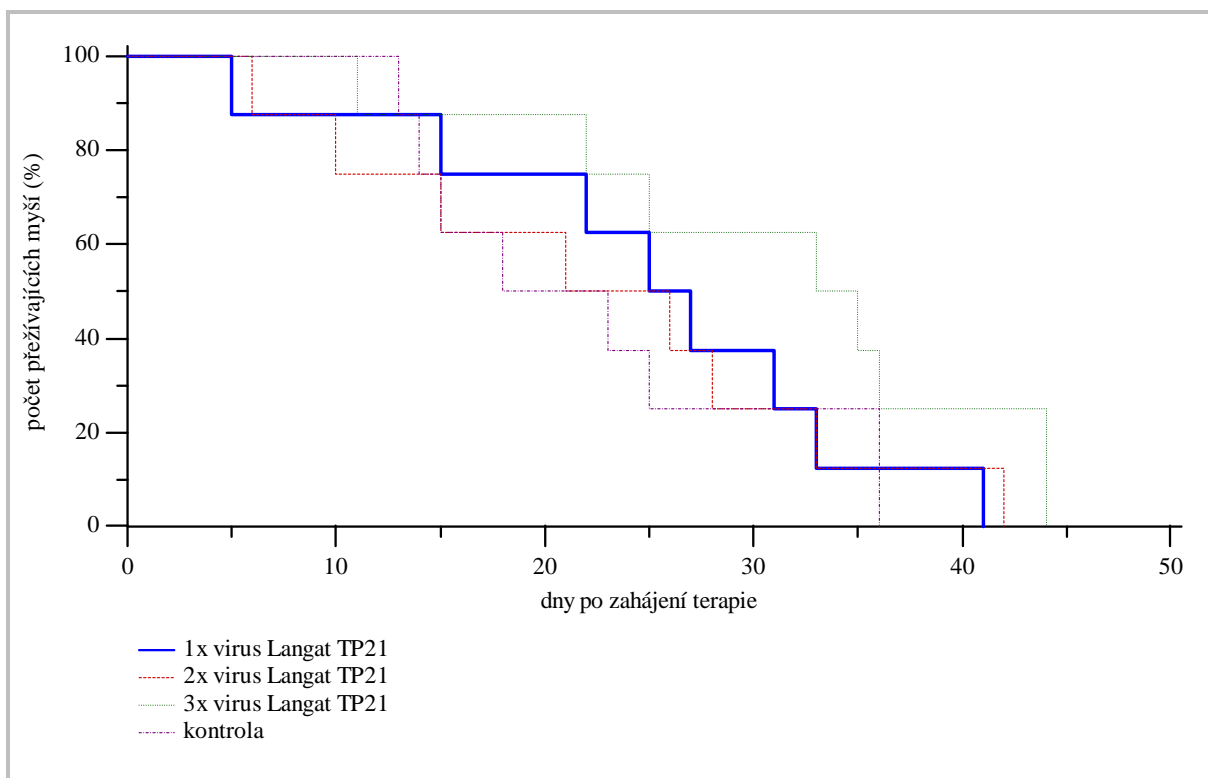
4.3 Experiment 3: Vliv počtu inokulačních dávek viru Langat TP21 na nádorový růst.

Zajímalo nás, jaký bude mít opakované podávání viru Langat TP21 vliv na růst melanomů. Jak vyplývá z Obr. 8, s výjimkou 34. dne nebyly výrazné rozdíly mezi jednou, dvojit či trojit aplikací viru Langat TP21.



Obr. 8: Podávání viru Langat TP21 v různých časových rozmezích. Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: ☆ = $P \leq 0,05$; ☆☆ = $P \leq 0,005$.

Následující graf (Obr. 9) znázorňuje mortalitu myší v závislosti na dnech po začátku terapie. Z grafu je patrné, že žádná z terapií neměla na přežívání myší vliv, statistické vyhodnocení to potvrzuje.

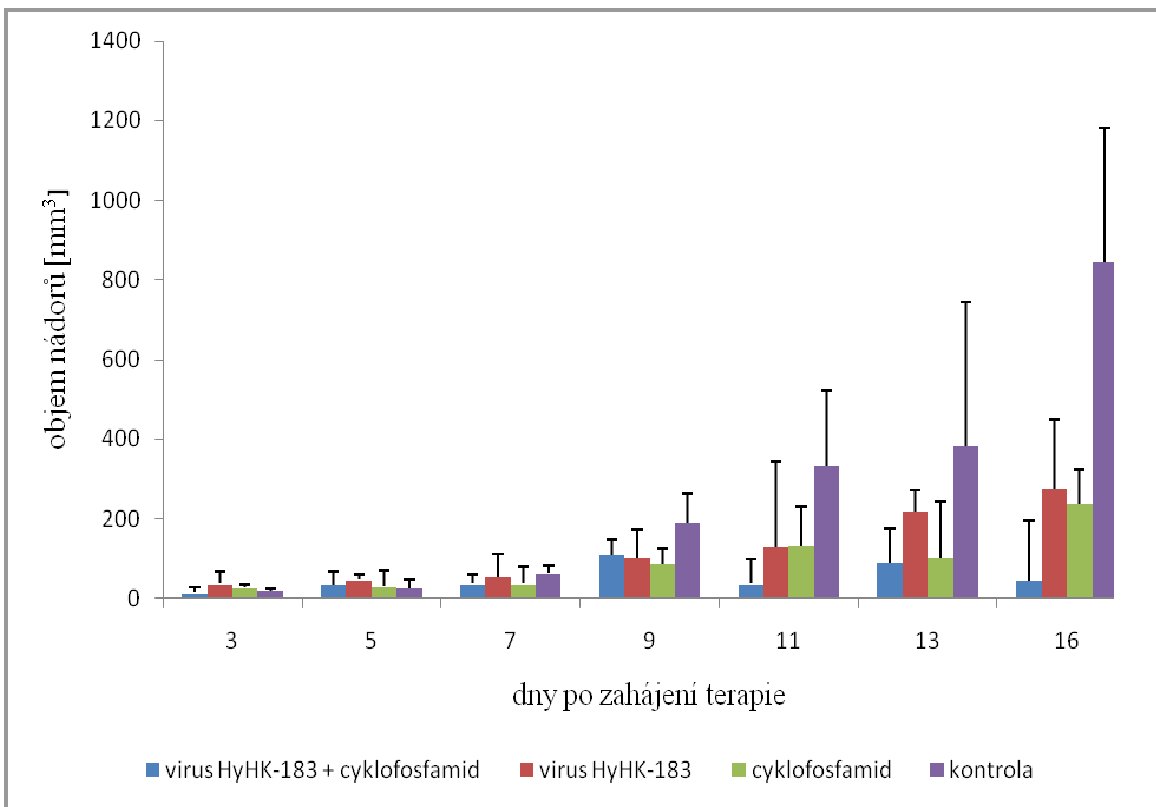


Obr. 9 Podávání viru Langat TP21 v různých časových rozmezích. Vliv jednotlivých terapií na přežívání myší.

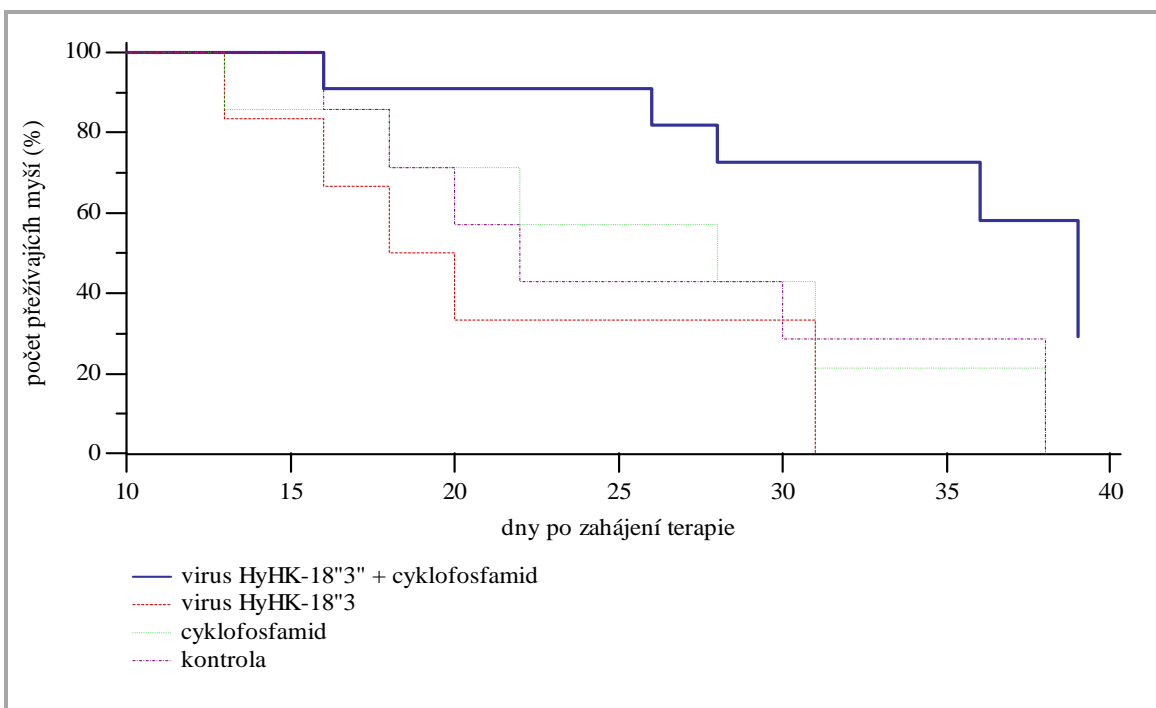
4.4 Experiment 4: Kombinace působení viru Langat HyHK-18“3“ a cyklofosfamidu na melanom B16-F10.

Z Obr. 10 vyplývá, že samotný virus HyHK-18“3“ působí účinnou inhibicí nádorového růstu srovnatelnou s působením cyklofosfamidu. Kombinace viru s cyklofosfamidem vykazovala výrazné známky synergie, zejména koncem experimentu.

Obr. 11 znázorňuje vymírání myší v jednotlivých skupinách. Pomalejší průběh mortality byl zaznamenán u skupin, kde byl podán cyklofosfamid, především pak v kombinaci s virem HyHK-18“3“. Pokus není uzavřen, bude trvat ještě nejméně měsíc. K dnešnímu dni (39. den terapie) se hodnota statisticky významného rozdílu mezi skupinou virus HyHK-18“3“ + cyklofosfamid přiblížila statistické významnosti ($P = 0,06$).



Obrázek 10: Kombinace viru HyHK-18"3" s cyklofosfamidem.



Obr. 11. Kombinace viru HyHK-18"3" s cyklofosfamidem. Vliv jednotlivých terapií na přežívání myši.

4.5 Experiment 5: Vliv infekce viru Langat TP21 na množství živých buněk melanomu B16-F10 *in vitro*.

Tímto jednoduchým pokusem jsme se snažili dokázat lytický efekt viru Langat TP21 na melanomové buňky B16-F10. Výsledky shrnuté v Tab. 3 ukazují na částečnou redukci počtu nádorových buněk vlivem viru. Na rozdíl od kontroly, kdy dostatek živin v mediu a místa (nedošlo k vytvoření konfluentní kultury) způsobil výrazný nárůst počtu buněk, pod vlivem viru byl tento nárůst brzděn.

Tab. 3 : Počet živých buněk melanomu B16-F10 pod vlivem viru Langat TP21 *in vitro*.

koncentrace viru	1. den	2. den
	průměrný počet buněk	průměrný počet buněk
5*10 ⁴ PFU/ml	1,4	2,6
1*10 ⁴ PFU/ml	1,6	2,6
2*10 ³ PFU/ml	2,6	3,2
4*10 ² PFU/ml	2,8	3,6
kontrola	3,2	6,6

5. Diskuze

První experiment ukázal velmi výrazný vliv viru Langat na redukcí nádorového růstu, ale bohužel se neprojevil prodloužením života. Tento závěr odpovídá práci vědců z lékařské univerzity nemocnice Sv. Tomáše v Londýně, která je shrnuta v kapitole 1.6 (Webb a spol., 1966). Kombinace viru Langat s proenzymoterapií nepřinesla žádné výsledky ani na úrovni přežití ani na úrovni nádorového růstu. Význam použití proteáz (proenzymoterapie a enzymoterapie) je spatřován v odstraňování růstového faktoru TGF- β s následným zeslabením maskování nádorů před imunitním atakem. Snižování TGF- β pomocí proteáz bylo několikrát prokázáno (Desser, 2001, Lauer a spol., 2001). Byl prokázán i vliv proenzymoterapie na snižování růstu melanomu (Kalferstová 2008). Možný mechanismus proenzymoterapie na snižování růstu nádorů spočívá v aktivaci alfa-2-makroglobulinu, který změnou své konformace vychytá cytokiny v krvi (Webb 1996). Tímto mechanismem se vychytají i cytokiny tvořené nádory (TGF- β , IL-10). Takto odhalené virem napadené nádorové buňky by mohly být dostatečným stimulem pro imunitní atak. Na základě výsledků se domníváme, že nádorové buňky pravděpodobně napadené virem nejsou schopny produkovat dostatečné množství TGF- β k obraně proti atakům imunitního systému a tudíž aditivní užití proenzymoterapie nemělo vliv. Jedná se samozřejmě o spekulaci. Přesné pochopení mechanismu by vyžadovalo další studium.

Druhý experiment potvrdil vysokou účinnost viru Langat TP21 i při snížené koncentraci. Virus HyHK-18“3“ podávaný před transplantací nádoru neměl na uchycení a ani na rozvoj nádorů vliv. Imunitní odpověď vyvolaná tímto virem na nádory evidentně nepůsobila, ale velmi výrazně eliminovala účinky následně podaného viru Langat TP21 (pravděpodobně stimulovaný imunitní systém účinně likvidoval virus Langat TP21).

Třetí experiment potvrdil předchozí úvahy. Opakované podávání viru nemělo žádný protinádorový účinek, což si vysvětlujeme tak, že vyvolaná a zesilovaná imunitní odpověď se zaměřovala především proti virům. To se shoduje s výsledky práce Biesecker a spol. (2010). V jeho rozsáhlé práci popsal vliv optimální dávky, počtu dávek a načasování viroterapie na efektivnost protinádorové terapie. Ohledně optimalizace počtu dávek jeho tým zjistil, že podáním dvou rozdílných dávek viru má lepší účinky než podání jedné dávky, či pravidelné injikování viru. Zajímavé výsledky byly získány při testování načasování

viroterapie. Tyto výsledky potvrdily můj závěr z druhého pokusu. Když je dávka daná předčasně, kdy myši ještě nedosáhly imunologické zralosti, tak podání druhé dávky bude snižovat účinnost viroterapie, která by jinak byla dosažena podáním jedné dávky viru. Biesecker a spol. (2010) zjistili, že podáním druhé dávky v největším rozmachu tumoru, viroterapie dosáhne maximálního účinku.

Poslední experiment in vivo ukázal srovnatelný vliv viru HyHK-18“3“ s virem Langat TP21, z čehož usuzujeme, že přímá destrukce napadených buněk virem není až tak podstatná.

Cyklofosfamid má dvojitý účinek a to cytotoxicky protinádorový a imunosuprimační.

Celkovým efektem tohoto dvojího působení byla redukce nádoru srovnatelná s působením viru HyHK (evidentně převládl toxický vliv na nádor), což odpovídá práci Ikeda a spol. (1999).

Kombinace cyclofosfamidu a viru HyHK-18“3“ byla velmi účinná. Toto působení si vysvětlujeme tak, že suprimovaná imunita nebránila prudkému pomnožování, expanzi a působení viru HyHK-18“3“. Opak jsme pozorovali v předchozích experimentech, zejména u experimentu 2, kdy stimulovaná imunita protinádorové působení virů účinně potlačovala. Je třeba také zmínit vliv kombinace viru HyHK-18“3“ a cyclofosfamidu na pomalejší průběh mortality. V práci Fulci spol. (2006) dospěli ke stejnému výsledku používáním viru herpes simplex a podáním cyclofosfamidu před samotnou injekcí onkolytického viru. V jejich práci je popsán možný mechanismus imunosupresivního účinku cyclofosfamidu na snížení odstraňování viru imunitním systémem. Z jejich pokusů vyplývá, že zvýšenou expresi viru zapříčiňuje imunosupresivní působení cyclofosfamidu na mikroglie v mozku, makrofágy a IFN γ . Zlepšení viroterapie pomocí imunosupresivního účinku cyclofosfamidu potvrzují mnohé další studie (Wakimoto a spol., 2004; Kambara a spol., 2005; Friedman a spol., 2006).

Experiment in vitro ukázal určité přímé protinádorové účinky viru Langat TP21. Otázku, zda je to výsledkem antiproliferativního či cytotoxického působení viru, je v tomto případě obtížné rozhodnout, neboť pracujeme s rychle adherujícími buňkami jejichž nutná trypsinizace znemožňuje spočítání mrtvých buněk. Protinádorový účinek ale není tak velký, abychom jím mohli vysvětlit značné efekty v in vivo experimentech, kde se zřejmě spoluúčastní imunitní systém a likviduje buňky exprimující na svém povrchu fragmenty virových antigenů s komplexi MHC I.

Ve všech pokusech se nám virus Langat TP21 jevil jako účinný protinádorový agens. I jeho atenuovaná forma projevuje srovnatelné výsledky a mohla by být použitelná jako protinádorový činitel. Langat TP21 i jeho atenuovaná forma zřejmě vyvolávají prudkou imunitní odpověď, která je poškozuje a zabíjí. Proto se jeví jako nezbytné jejich kombinování s přechodnou (i jednorázovou) aplikací imunosupresiv.

Z hlediska mechanismu působení viru Langat TP21 se zřejmě jedná o kombinaci částečného přímého efektu na nádorové buňky se zvýšením antigenicity virem napadených nádorových buněk (exprese fragmentu virových antigenů na povrchu virem napadených nádorových buněk). Druhý mechanismus je zřejmě podpořen sníženou schopností virem napadených nádorových buněk se bránit imunitnímu ataku na základě produkce supresivních cytokinů.

6. Souhrn

- ❖ Byl potvrzen statisticky významný účinek i. t. aplikovaného viru Langat TP21 na snížení růstu nádorů melanomu B16-F10 u myší.
- ❖ Virus Langat TP21 neovlivňoval dobu přežití myší nesoucích melanom B16-F10.
- ❖ Kombinace viru Langat TP21 s proenzymoterapií nevykazovala žádné rysy aktivity nebo synergie.
- ❖ Vakcinace virem HyHK-18“3“ měla negativní vliv na protinádorový účinek následně aplikovaného viru Langat TP21. Vakcinace virem HyHK-18“3“ neměla vliv na přijetí následně transplantovaných buněk melanomu B16-F10 a růst nádoru.
- ❖ Ani vakcinace HyHK-18“3“ ani samotný virus Langat TP21 neovlivňovali výskyt metastáz.
- ❖ Opakovaná i. t. aplikace viru Langat TP21 nezvyšovala jeho protinádorový účinek, ten byl srovnatelný v případě jedné, dvojí i trojí aplikace tohoto viru.
- ❖ Opakované podávání viru nemělo žádný dopad na přežívání myší.
- ❖ Virus HyHK-18“3“ aplikovaný i.t. prokázal terapeutický účinek na růst nádorů srovnatelný s působením viru Langat TP21.
- ❖ Kombinace viru HyHK-18“3“ s cyklofosfamidem prokázal terapeutický účinek na růst nádorů.
- ❖ Kombinace viru HyHK-18“3“ a cyklofosfamidu výrazně ovlivňovala přežívání myší.
- ❖ V *in vitro* pokusu byl prokázán přímý protinádorový účinek viru Langat TP21.

7. Seznam použité literatury

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s. r. o. 1998.
- Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacological Reviews*. 2003; 55(2): 241-69.
- Asselin-Paturel C., Echchakir H., Carayol G., Gay F., Opolon P., Grunenwald D., Chouaib S., Mami-Chouaib F. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *International Journal of Cancer*. 1998; 77(1): 7-12.
- Batliwalla F.M., Bateman B.A., Serrano D. A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8T cell repertoire. *Mol Med*. 1998; 4: 783-794.
- Biesecker M., Kimm J. H., Lu H., Dingli D., Bajzer Ž. Optimization of Virotherapy for Cancer. *Bulletin of Mathematical Biology*. 2010; 72: 469-489.
- Campbell M.S., Pletnev A.G. Infectious cDNA clones of Langkat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. *Virology*. 2000; 269(1): 225-37.
- Carroll N .M., Chiocca E.A., Takahashi K., Tanabe K.K. Enhancement of gene therapy specificity fordiffuse colon carcinoma liver metastasesw ith recombinant herpes simplex virus. *Annals of Surgery*. 1996; 224(3): 323-9.
- Carson W.E., Lindemann M.J., Baiocchi R., Linett M., Tan J.C., Chou C.C., Narula S., Caligiuri M.A. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*. 1995; 85(12): 3577-85.
- Cassel W.A., Garrett R.E. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer*. 1965; 18: 863-8.

- Cassel W.A., Murray D.R. A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus oncolysate. *Medical Oncology & Tumor Pharmacotherapy*. 1992; 9(4): 169-71.
- Cassel W.A., Murray D.R., Torbin A.H., Olkowski Z.L., Moore M.E. Viral oncolysate in the management of malignant melanoma. I. Preparation of the oncolysate and measurement of immunologic responses. *Cancer*. 1977; 40(2): 672-9.
- Cassel W.A., Murray D.R., Torbin A.H., Olkowski Z.L., Moore M.E. Viral oncolysate in the management of malignant melanoma. II. Clinical studies. *Cancer*. 1977; 40(2): 680-6.
- Coffey M.C., Strong J.E., Forsyth P.A., Lee P.W. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science*. 1998; 282(5392): 1332-4.
- Csatary L.K., Gosztanyi G., Szeberenyi J., Fabian Z., Liszka V., Bodey B., Csatary C.M. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004; 67(1-2): 83-93.
- Čáp R., Dobeš. D., Hošek F., Hyža P. Maligní melanom. *Vojenské zdravotnické listy*. 2005; 74(1): 4-8.
- De Madrid A.T., Porterfield J.S. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization*. 1969; 40(1): 113-21.
- DeWeese T.L., van der Poel H., Li S., Mikhak B., Drew R., Goemann M., Hamper U., DeJong R., Detorie N., Rodriguez R., Haulk T., DeMarzo A.M., Piantadosi S., Yu D.C., Chen Y., Henderson D.R., Carducci M.A., Nelson W.G., Simons J.W. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Research*. 2001; 61(20): 7464-72.
- Dresser L., Holomanova D., Zavadova E., Pavelka K., Mohr T., Herbacek I. 2001: Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47: 10-15.

Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mařha V. Imunitní systém. Praha: Grada Publishing. 2005; 236 s.

Fernandez M., Porosnicu M., Markovic D., Barber G.N. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *Journal of Virology*. 2002; 76(2): 895-904.

Freeman A.I., Zakay-Rones Z., Gomori J.M., Linetsky E., Rasooly L., Greenbaum E., Rozenman-Yair S., Panet A., Libson E., Irving C.S., Galun E., Siegal T. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Molecular Therapy*. 2006; 13(1): 221-8.

Friedman A., Tian J.P., Fulci G., Chiocca E.A. Glioma virotherapy: effects of innate immune suppression and increased viral replication Capacity. *Cancer Research*. 2006. 66 (2): 2314.

Fueyo J., Gomez-Manzano C., Alemany R., Lee P.S., McDonnell T.J., Mitlianga P., Shi Y.X., Levin V.A., Yung W.K., Kyritsis A.P. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*. 2000; 19(1): 2-12.

Fulci G., Breymann L., Gianni D., Kurozomi K., Rhee S., Yu J., Kaur B., Louis D. N., Weissleder R., Caligiuri M. A., Chiocca E. A. Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Dardinger Center for Neuro-Communicated by Avner Friedman, Proceedings of the National Academy of science of the USA*. 2006; 103(34): 12873 – 8.

Ganly I., Kirn D., Eckhardt S.G., Rodriguez G.I., Soutar D.S., Otto R., Robertson A.G., Park O., Gulley M.L., Heise C., Von Hoff D.D., Kaye S.B. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6(3): 798-806.

Garber, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *The Journal of the National Cancer Institute*. 2006; 98(5): 298-300.

Geevarghese S.K., Geller D.A., de Haan H.A., Hörer M., Knoll A.E., Mescheder A., Nemunaitis J., Reid T.R., Sze D.Y., Tanabe K.K., Tawfik H. Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Human Gene Therapy*. 2010; 21(9): 1119-28.

Gomez-Manzano C., Balague C., Alemany R., Lemoine M.G., Mitlianga P., Jiang H., Khan A., Alonso M., Lang F.F., Conrad C.A., Liu T.J., Bekele B.N., Yung W.K., Fueyo J. A novel E1A-E1B mutant adenovirus induces glioma regression in vivo. *Oncogene*. 2004; 23(10): 1821-8.

Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*. 2000; 57(1-2): 129-46.

Gromeier M., Lachmann S., Rosenfeld M.R., Gutin P.H., Wimmer E. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97(12): 6803-8.

Grote D., Russell S.J., Cornu T.I., Cattaneo R., Vile R., Poland G.A., Fielding A.K. Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood*. 2001; 97(12): 3746-54.

Hallenbeck P.L., Chang Y.N., Hay C., Golightly D., Stewart D., Lin J., Phipps S., Chiang Y.L. A novel tumorspecific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Human Gene Therapy*. 1999; 10(10): 1721-33.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.

Harrison C.J., Mazzullo H., Cheung K.L., Gerrard G., Jalali G.R., Mehta A., Osier D.G., Orchard K.H. Cytogenetics of multiple myeloma: interpretation of fluorescence in situ hybridization results. *British Journal of Haematology*. 2003; 120(6): 944-52.

Hořejší V., Bartůňková J. Základy imunologie. 3.vydání. Praha: Triton s.r.o. 2005; 279 s.

Ikeda K., Ichikawa T., Wakimoto H., Silver J.S., Deisboeck T.S., Finkelstein D., Harsh G.R. 4th, Louis D.N., Bartus R.T., Hochberg F.H., Chiocca E.A. Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nature Medicine*. 1999; 5(8): 881-7.

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 gastrin tumours implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1986; 77(2): 190-6.

Inoue Y. K., Ogura R. Studies on Japanese B encephalitis virus. III. Propagation and assay of Japanese B encephalitis virus in a stable line of porcine kidney cells. *Virology*. 1962; 16: 205-207.

Kalferstová L: Proenzymoterapie melanomu B16F10; bakalářská práce; Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity; 2008

Kambara H., Saeki Y., Chiocca E.A. Cyclophosphamide Allows for *In vivo* Dose Reduction of a Potent Oncolytic Virus. *Cancer Research*. 2005; 65(12). 11255 – 8.

Kim J., Modlin R.L., Moy R.L., Dubinett S.M., McHugh T., Nickoloff B.J., Uyemura K. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *The Journal of Immunology*. 1995; 155(4): 2240-7.

Kinzler K.W., Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996; 87(2): 159-70.

Krejsek J., Kopecký O. Klinická imunologie. NUCLEUS HK. 2004; 941 str.

Lauer D., Müller R., Cott C., Otto A., Naumann M., Birkenmeier G. Modulation of growth factor binding properties of alpha2-macroglobulin by enzyme therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2001; 47: 4-9.

- Leib, D. A., Machalek, M. A., Williams, B. R., Silverman, R. H. Virgin, H. W. Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000; 97, 6097–6101.
- Liu T., Hwang T., Park B., Bell J., Kim D.H. The Targeted Oncolytic Poxvirus JX-594 Demonstrates Antitumoral, Antivascular, and Anti-HBV Activities in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Therapy*. 2008; 16(9): 1637-1642.
- Lorence R.M., Katubig B.B., Reichard K.W., Reyes H.M., Phuangsab A., Sasseti M.D., Walter R.J., Peoples M.E. Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Research*. 1994; 54(23): 6017-21.
- MacKie R.M., Stewart B., Brown S.M. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. *The Lancet*. 2001; 357(9255): 525-6.
- Mandl C.W., Iacono-Connors L., Wallner G., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X. Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence tick-borne flaviviruses Langat TP21 and Yelantsev. *Virology*. 1991; 185(2): 891-5.
- Markert J.M., Medlock M.D., Rabkin S.D., Gillespie G.Y., Todo T., Hunter W.D., Palmer C.A., Feigenbaum F., Tornatore C., Tufaro F., Martuza R.L. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a Phase I trial. *Gene Therapy*. 2000; 7(10): 867-74.
- Martuza R.L., Malick A., Markert J.M., Ruffner K.L., Coen D.M. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*. 1991; 252(5007): 854-6.
- McCart J.A., Ward J.M., Lee J., Hu Y., Alexander H.R., Libutti S.K., Moss B., Bartlett D.L. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Research*. 2001; 61(24): 8751-7.

- Merrick A.E., Ilett E.J., Melcher A.A. JX-594, a targeted oncolytic poxvirus for the treatment of cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2009; 10(12): 1372-82.
- Mineta T., Rabkin S.D., Yazaki T., Hunter W.D., Martuza R.L. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature Medicine*. 1995; 1(9): 938-43.
- Mulvihill S., Warren R., Venook A., Adler A., Randlev B., Heise C., Kirn D. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Therapy*. 2001; 8(4): 308-15.
- Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*. 2002; 70(7): 791-8.
- Nemunaitis J., Ganly I., Khuri F., Arseneau J., Kuhn J., McCarty T., Landers S., Maples P., Rome L., Randlev B., Reid T., Kaye S., Kirn D. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Research*. 2000; 60(22): 6359-66.
- Nemunaitis J., Khuri F., Ganly I., Arseneau J., Posner M., Vokes E., Kuhn J., McCarty T., Landers S., Blackburn A., Romel L., Randlev B., Kaye S., Kirn D. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19(2): 289-98.
- Norman K.L., Coffey M.C., Hirasawa K., Demetrick D.J., Nishikawa S.G., DiFrancesco L.M., Strong J.E., Lee P.W. Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Human Gene Therapy*. 2002; 13(5): 641-52.

Paglino J.C., van den Pol A.N. Vesicular stomatitis virus has extensive oncolytic activity against human sarcomas: rare resistance is overcome by blocking interferon pathways. *Journal of Virology*. 2011; 85(18): 9346-58.

Papanastassiou V., Rampling R., Fraser M., Petty R., Hadley D., Nicoll J., Harland J., Mabbs R., Brown M. The potential for efficacy of the modified [ICP 34.5(-)] herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Therapy*. 2002; 9(6): 398-406.

Pecora A.L., Rizvi N., Cohen G.I., Meropol N.J., Stermann D., Marshall J.L., Goldberg S., Gross P., O'Neil J.D., Groene W.S., Roberts M.S., Rabin H., Bamat M.K., Lorence R.M., Lorence R. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20(9): 2251-66.

Peng K.W., TenEyck C.J., Galanis E., Kalli K.R., Hartmann L.C., Russell S.J. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Research*. 2002; 62(16): 4656-62.

Petr J. Patří onkolytickým reovirům budoucnost? *Medical Tribune* (www.tribune.cz). 2011 (2).

Phuong L.K., Allen C., Peng K.W., Giannini C., Greiner S., TenEyck C.J., Mishra P.K., Macura S.I., Russell S.J., Galanis E.C. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Research*. 2003; 63(10): 2462-9.

Pletnev A.G. Infectious cDNA clone of attenuated Langkat tick-borne flavivirus (strain E5) and a 3 deletion mutant constructed from it exhibit decreased neuroinvasiveness in immunodeficient mice. *Virology*. 2001; 282(2): 288-300.

- Pletnev A.G., Bray M., Hanley K.A., Speicher J., Elkins R. Tick-borne Langat/mosquito-borne dengue flavivirus chimera, a candidate live attenuated vaccine for protection against disease caused by members of the tick-borne encephalitis virus complex: evaluation in rhesus monkeys and in mosquitoes. *Journal of Virology*. 2001; 75(17): 8259-67.
- Pletnev A.G., Karganova G.G., Dzhivanyan T.I., Lashkevich V.A., Bray M. Chimeric Langat/Dengue viruses protect mice from heterologous challenge with the highly virulent strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2000; 274(1): 26-31.
- Pletnev A.G., Men R. Attenuation of the Langat tick-borne flavivirus by chimerization with mosquito-borne flavivirus dengue type 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(4): 1746-51.
- Price W.H., Parks J.J., Ganaway J., O'Leary W., Lee R. The ability of an attenuated isolate of Langat virus to protect primates and mice against other members of the Russian spring-summer virus complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1963; 12: 787-99.
- Price W.H., Thind I.S. Immunization of mice against Russian spring-summer virus complex and monkeys against Powassan virus with attenuated Langat E5 virus. Duration of protection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1973; 22(1): 100-8.
- Puhlmann M., Brown C.K., Gnant M., Huang J., Libutti S.K., Alexander H.R., Bartlett D.L. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Therapy*. 2000; 7(1): 66-73.
- Rampling R., Cruickshank G., Papanastassiou V., Nicoll J., Hadley D., Brennan D., Petty R., MacLean A., Harland J., McKie E., Mabbs R., Brown M. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Therapy*. 2000; 7(10): 859-66.

- Rumyantsev A.A., Chanock R.M., Murphy B.R., Pletnev A.G. Comparison of live and inactivated tick-borne encephalitis virus vaccines for safety, immunogenicity and efficacy in rhesus monkeys. *Vaccine*. 2006; 24(2): 133-43.
- Russell S.J. RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Therapy*. 2002; 9(12): 961-6.
- Růžek D., Štěřba J., Kopecký J., Grubhoffer L. The supposedly attenuated hy-HK variant of highly virulent Hypr strain of tick-borne encephalitis virus is obviously a strain of Langat virus. *Acta Virologica*. 2006; 50(4): 277-8.
- Saika S., Kidokoro M., Kubonoya H., Ito K., Ohkawa T., Aoki A., Nagata N., Suzuki K. Development and biological properties of a new live attenuated mumps vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2006; 29(2-3): 89-99.
- Shinoura N., Yoshida Y., Tsunoda R., Ohashi M., Zhang W., Asai A., Kirino T., Hamada H. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Research*. 1999; 59(14): 3411-6.
- Shurin M.R., Lu L., Kalinski P., Stewart-Akers A.M., Lotze M.T. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Seminars in Immunopathology*. 1999; 21(3): 339-59.
- Sips G.J., Wilschut J., Smit J.M. Neuroinvasive flavivirus infections. *Reviews in Medical Virology*. 2011; Nov 16 published online
- Smith C.E. A virus resembling Russian spring-summer encephalitis virus from an ixodid tick in Malaya. *Nature*. 1956; 178(4533): 581-2.
- Smith C.E. Langat virus and vaccination against infections by the tick-borne complex of group B arboviruses. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*. 1967; 20 Suppl: 130-2.
- Smorodincev A.A., Dubov A.V. Tick-borne encephalitis and its vaccine prophylaxis. *Meditcina*. 1986; p. 172–211.

- Stojdl D.F., Lichty B.D., tenOever B.R., Paterson J.M., Power A.T., Knowles S., Marius R., Reynard J., Poliquin L., Atkins H., Brown E.G., Durbin R.K., Durbin J.E., Hiscott J., Bell J.C. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*. 2003; 4(4): 263-75.
- Suzuki K., Fueyo J., Krasnykh V., Reynolds P.N., Curiel D.T., Alemany R. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clinical Cancer Research*. 2001; 7(1): 120-6.
- Španielová H. Viry, které uzdravují. *Vesmír*. 2010; 89(3): 180-3.
- Taqi A.M., Abdurrahman M.B., Yakubu A.M., Fleming A.F. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet*. 1981; 1(8229): 1112.
- Thind I.S. Potential use of attenuated langat E5 virus as a live vaccine -- long term protection against Russian spring-summer encephalitis virus in mice. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology & Immunology*. 1981; 25(2): 155-62.
- Thind I.S., Price W.H. A chick embryo attenuated strain (TP21 E5) of Langat virus. I. Virulence of the virus for mice and monkeys. *American Journal of Epidemiology*. 1966 a; 84(2): 193-213.
- Thind I.S., Price W.H. A chick embryo attenuated strain (TP21 E5) of Langat virus. 3. The ability to protect against homologous virus and Powassan virus in cross-challenge experiments. *American Journal of Epidemiology*. 1966 b; 84(2): 225-33.
- Thomas D.A., Massagué J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 2005; 8(5): 369-80.
- Vasey P.A., Shulman L.N., Campos S., Davis J., Gore M., Johnston S., Kirn D.H., O'Neill V., Siddiqui N., Seiden M.V., Kaye S.B. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20(6): 1562-9.

- Veselský Z., Macek P., Morávek P., Mařha V., Fröstl M., Višňovský P., Prošvic P., Odrátka K., Vaculíková M., Holub L. Základy imunologie nádorových onemocnění. Urologie pro praxi 1. 2004; 1:
- Větvička V., Dvořák B., Větvičková J., Richter J., Křížan J., Šíma P., Yvin J.C. Orally administered marine (1-->3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. International Journal of Biological Macromolecules. 2007; 40(4): 291-8.
- Wakimoto, H., Fulci G., Tyminski E., Chiocca E. A. Altered expression of antiviral cytokine mRNAs associated with cyclophosphamide's enhancement of viral oncolysis. Cancer Research. 2006; 11(2): 214-223.
- Webb H.E., Wetherley-Mein G., Smith C.E., McMahon D. Leukaemia and neoplastic processes treated with Langat and Kyasanur Forest disease viruses: a clinical and laboratory study of 28 patients. British Medical Journal. 1966; 1(5482): 258-66.
- Webb J. D., Wen J., Lysiak J.J., Umans L., Leucen F.V. a Gonias S.L. Murine α 2-macroglobulins demonstrate divertigent activities as neutralizers of transforming growth factor- β and as inducers of nitric oxide syntesis. Journal of Biological Chemistry. 1996; 271: 24982-24988.
- Yan Y.F., Chen X., Zhu Y., Wu J.G., Dong C.Y. Selective cytolysis of tumor cells by mumps virus S79. Intervirology. 2005; 48(5): 292-6.
- Yoon S.S., Carroll N.M., Chiocca E.A., Tanabe K.K. Cancer gene therapy using a replication-competent herpes simplex virus type 1 vector. Annals of Surgery. 1998; 228(3): 366-74.
- Yoshida Y., Sadata A., Zhang W., Saito K., Shinoura N., Hamada H. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. Human Gene Therapy. 1998; 9(17): 2503-15.