

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra medicínské biologie**



**Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí  
proenzymoterapie**

Diplomová práce

**Autor práce:** Bc. Magda Čechová

**Vedoucí práce:** RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2010

Čechová M., 2010: Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie [Study of the possibility to influence the process of metastasize with the aid of proenzymotherapy. Mgr. Thesis, in Czech] – 83 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this thesis was to study the possibilities of influencing the metastasizing processes by means of proenzyme therapy. We accentuated the role of primary tumor excision. In the second part of the thesis we carried out our first screening experiments in the new area of cancer treatment based on tumour coupled PAMPs.

**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 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, 28. 12. 2010

.....  
Magda Čechová

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi za skvělé vedení diplomové práce, za jeho obrovskou trpělivost a ochotu kdykoliv a s čímkoliv pomoci a za velké množství cenných rad a připomínek nejen při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí, jmenovitě bych pak ráda poděkovala prof. doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a RNDr. Jiřímu Salátovi za jejich cenné rady a připomínky při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Danielu Růžkovi, PhD za pomoc při práci s bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*. Mé velké poděkování patří také rodině, která mě velice podporovala a vytvořila mi tolik potřebné zázemí pro studium, a také mým přátelům a známým, kteří mě také podporovali v mém snažení.

## **Obsah**

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Rakovina (nádorové onemocnění)</b>	<b>1</b>
1.1.1 Vznik nádoru	1
1.1.2 Rozdělení nádorů	4
<b>1.2 Melanom</b>	<b>6</b>
1.2.1 Od melanocytu po melanom	6
1.2.2 Etiologie	8
1.2.3 Klasifikace	8
1.2.4 Klinický obraz	9
1.2.5 Melanom B16-F10	10
<b>1.3 Metastázy (Proces metastázování)</b>	<b>10</b>
1.3.1 Proces metastázování obecně	10
1.3.1.1 Metastatická kaskáda	10
1.3.2 Metastázování melanomu B16-F10	12
<b>1.4 Nádorová imunologie</b>	<b>13</b>
1.4.1 Mechanismy obrany proti nádorům	13
1.4.1.1 Nádorové antigeny	13
1.4.1.2 Leukocyty	14
1.4.1.3 Cytokiny	17
1.4.2 Mechanismy, jimiž se nádory brání před rozpoznáním imunitním systémem	17
1.4.2.1 Imunosupresivní účinek mutagenů	17
1.4.2.2 Exprese inhibitorů komplementu	18
1.4.2.3 Ztráta exprese HLA molekul	18
1.4.2.4 Odlučování nádorových antigenů	18
1.4.2.5 Produkce imunosupresivních faktorů v prostředí nádorů	18
1.4.2.6 TGF-beta	19
1.4.2.7 Další mechanismy (Fas protiútok, hypoxie)	20
<b>1.5 Proenzymoterapie</b>	<b>20</b>
1.5.1 Mechanismus proenzymoterapie	20
1.5.2 Způsoby aplikace proenzymů	21
<b>1.6 Vrozená imunita</b>	<b>22</b>
1.6.1 Rozpoznávací mechanismy vrozené imunity	22

1.6.2	Vrozená imunita a rakovina	25
<b>2.</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikálie</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimentální zvířata</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Buněčná linie</b>	<b>29</b>
3.3.1	Příprava buněk B16-F10 pro <i>in vivo</i> pokusy	29
<b>3.4</b>	<b>Transplantace melanomu B16-F10</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>Transplantace metastáz melanomu B16-F10</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Izolace neutrofilů</b>	<b>30</b>
3.6.1	Příprava thioglykolátového média (TGM)	30
3.6.2	Aplikace TGM myším C57BL/6 a příprava neutrofilů	30
<b>3.7</b>	<b>Složení přípravků k léčbě</b>	<b>30</b>
<b>3.8</b>	<b>počítání metastáz</b>	<b>31</b>
<b>3.9</b>	<b>Měření velikosti nádorů a statistické zpracování dat</b>	<b>32</b>
<b>3.10</b>	<b>Pokus č. 1 – Metastázový model melanomu B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií (<i>i.m.</i> aplikace)</b>	<b>32</b>
<b>3.11</b>	<b>Pokus č. 2 – přirozeně metastazující melanom B16-F10 a ovlivnění metastáz pomocí proenzymoterapie (<i>i.m.</i> aplikace)</b>	<b>33</b>
<b>3.12</b>	<b>Pokus č. 3 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií aplikovanou <i>i.m.</i> a <i>i.p.</i></b>	<b>34</b>
<b>3.13</b>	<b>Pokus č. 4 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí LPS, TGM a BG podávaných <i>i.t.</i></b>	<b>34</b>
<b>3.14</b>	<b>Pokus č. 5 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí PAMPs – mrtvé bakterie <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, sonikované bakterie <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a N-formyl-Met-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>, vše <i>i.t</i> aplikace</b>	<b>35</b>
<b>3.15</b>	<b>Pokus č. 6 – Cytotoxický test</b>	<b>36</b>
3.15.1	Optimalizace cytotoxického testu, vytvoření kalibrační křivky	36
3.15.2	Ověření čistoty neutrofilů pomocí BD FACS CANTO II	36
3.15.3	Cytotoxický test s melanomovými buňkami s navázaným LPS a FM	37
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Pokus č. 1 – Metastázový model melanomu B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií (<i>i.m.</i> aplikace)</b>	<b>39</b>

<b>4.2 Pokus č. 2 – přirozeně metastazující melanom B16-F10 a ovlivnění metastáz pomocí proenzymoterapie (<i>i.m.</i> aplikace)</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Pokus č. 3 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií aplikovanou <i>i.m.</i> a <i>i.p.</i></b>	<b>43</b>
<b>4.4 Pokus č. 4 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí LPS, TGM a BG podávaných <i>i.t.</i></b>	<b>45</b>
<b>4.5 Pokus č. 5 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí PAMPs – mrtvé bakterie <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, sonikované bakterie <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a N-formyl-Met-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>, vše <i>i.t</i> aplikace</b>	<b>47</b>
<b>4.6 Pokus č. 6 – Cytotoxický test</b>	<b>50</b>
4.6.1 Optimalizace cytotoxického testu, vytvoření kalibrační křivky	50
4.6.2 Cytotoxický test s melanomovými buňkami s navázaným LPS a FM	54
4.6.3 Ověření čistoty neutrofilů pomocí BD FACS CANTO II	56
<b>5. Diskuze</b>	<b>60</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>65</b>
<b>7. Seznam použité literatury</b>	<b>66</b>
<b>8. Příloha</b>	<b>78</b>
<b>8.1 Příloha 1 – Cytotoxický test s naznačenými melanomovými buňkami s LPS a FM</b>	<b>78</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Rakovina (nádorové onemocnění)

Pojem rakovina lze definovat jako skupinu chorob, jejichž společným znakem je nekontrolovaný růst buněk, šířících se do okolí. Růst nádorové masy ničí normální tkáň a buňky primárního nádoru mají schopnost šířit se do nových tkání a zakládat nová ložiska (metastázy) (Dienstbier 1994).

První známky, svědčící o přítomnosti nádorového onemocnění, byly nalezeny u egyptských mumií. Zmínky o nádorech a jejich léčbě najdeme v egyptských papýrech, v písemnictví mezopotamském, čínském, indickém, japonském a arabském. Řecký lékař Hippokrates (460-377 př. Kr.) dokázal rozpoznat rozdíl mezi zhoubným a nezhoobným nádorem a použil jako první termín karcinom („karkinóma“) (Javier a Butel 2008, Petera et al. 2005). Tento název zvolil podle pokročilého karcinomu prsu, který mu připomínal siluetu pobřežního kraba (*Carcinides meanas*). Latinská obdoba tohoto termínu je „cancer“ neboli rak. Systematický zájem o problematiku onkologie přineslo 19. století. Pokroky v patologické anatomii, anestezii a chirurgické technice rozšířily léčebné možnosti. Přelom 19. a 20. století přinesl objev rentgenu a gama záření, začal rozvoj radioterapie, chemoterapie a dalších oborů podílejících se na léčbě nádorových onemocnění (Petera et al. 2005).

Rakovina je stále častější ve všech průmyslově vyspělých zemích. Udává se, že v těchto zemích v průběhu života (od narození po stáří) onemocní rakovinou každý třetí člověk a zemře každý čtvrtý. Nádorové onemocnění je druhá nejčastější příčina úmrtí po srdečně-cévních onemocněních u dospělých a druhá příčina úmrtí u dětí, která následuje za úrazy (Dienstbier 1994).

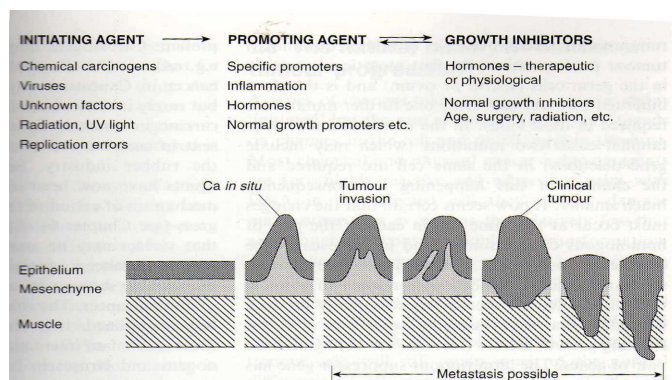
### 1.1.1 Vznik nádoru

Nádor může vzniknout v jakékoliv tkáni, ale nejčastěji vzniká v těch tkáních, kde se nejvíce množí buňky (dýchací soustava, trávicí soustava) anebo kde jsou buňky stimulovány hormony (prostata, vaječníky, prsy).

Proces vzniku a vývoje nádorů se označuje jako kancerogeneze. Je to vícestupňový proces, kdy jsou normální buňky transformovány v nádorové (Franks a

Teich 1999). Velikost buněčné populace uvnitř organismu je udržována komplexem signálů, které stimulují či inhibují proliferaci, diferenciaci a životnost jednotlivých buněk (Pusztai et al 1996). Porucha těchto signálů či aplikace rakovinotvorné látky (karcinogenu neboli kancerogenu) nemusí vždy vést ke vzniku nádoru (Franks a Teich 1999).

Současný model kancerogeneze zahrnuje 3 stádia (Obr. 1). První stádium se nazývá iniciační. V tomto stadiu dojde k mutaci kritického genu a ta je ireverzibilní. Tento primární krok je časově velmi krátký a přináší selekční výhodu pro buňky daného klonu. V tomto stadiu se může proces zastavit. Druhé stádium nazýváme promoční. Na rozdíl od iniciace probíhá tento proces dlouhodobě. Může trvat léta, desetiletí a někdy i celý život. Postižené buňky (latentní klon) jsou stimulovány k dalšímu dělení řadou látek a mechanismů, jež nemusí být samy o sobě kancerogenní. Působení těchto faktorů musí dosáhnout určité kritické intenzity. Jejich odstranění může proces rozvoje klonu zpomalit i zastavit. Mezi promoční faktory se řadí např. cigaretový kouř, tuky, hormonální vlivy, věk, atd. Některé promoční faktory zabraňují buňkám dosáhnout diferencovaného stadia, kdy se buňky nedělí, nebo se dělí minimálně. Třetí fází je progresse. V této fázi dochází ke změně fenotypu buněk klonu. Ty získávají schopnost invazivního růstu a metastazování, což je následek nahromadění mutací dalších genů. (Franks a Teich 1999, Hennings 1993, Pusztai et al.1996).



**Obr. 1:** Faktory ovlivňující vývoj nádoru – od normálního po invazní nádor (Franks a Teich 1999)

Kancerogenezi můžeme rozdělit podle typu kancerogenu na chemickou fyzikální a biologickou. Chemickou kancerogenezi rozumíme proces, ve kterém chemické rizikové faktory způsobí nekontrolovanou a nepravidelnou tvorbu nové tkáně. Mezi



tyto chemické rizikové faktory patří řada chemických látek jako jsou fenobarbitaly, tabákový kouř, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), azbest a další (Appel et al. 1990). Chemické kancerogeny můžeme rozdělit na solitární a podmíněčné (kancerogeny závislé na podmínkách prostředí). Solitární kancerogeny jsou rizikovými faktory, které způsobují rakovinu na podkladě metabolické změny. Tato změna je nevratná a její účinek je aditivní. Solitární kancerogeny mají často organotropní působení (působí na jednotlivé orgány v těle). Mezi takovéto kancerogeny patří především aromatické aminy, N-nitrosoaminy, benzpyren (kancerogenní složka dehtu, patří mezi PAU), vinylchlorid a další (Appel et al. 1990, Petruželka et al. 2003). Podmínečné kancerogeny mají reverzibilní primární účinek. Ke vzniku nádoru je nutné jejich dlouhodobé působení na danou tkáň (až chronické působení). Působení podmíněčných kancerogenů na cílové orgány nebo regulační systém je často ovlivňováno hormony. Mezi tyto kancerogeny patří thiourea, kyselina nitrilotrioctová a další (Appel et al. 1990).

Fyzikální kancerogenezi způsobují fyzikální kancerogeny. Mezi ně patří především ionizující (X a gama) a neionizující (UV) záření. Záření ionizující i UV je přirozenou součástí našeho životního prostředí (záření sluneční a kosmické, v zemském podlaží dochází k radioaktivnímu rozpadu). Existují však člověkem vytvářené zdroje záření (nukleární zbraně, jaderné elektrárny, léčebné a kosmetické zdroje, solária) (Petruželka et al. 2003). Kancerogenní účinek záření je vázán na poškození buněčné DNA vyvolané přenosem energie záření na tuto cílovou molekulu. Přenos energie může navodit excitaci nukleových bází v DNA a vést k jejímu přímému poškození, nejčastěji ve formě chromozomálních zlomů, nebo vede k ionizaci, což ve vodném prostředí buňky znamená tvorbu hydroxylových a vodíkových radikálů, které vyvolávají nepřímé poškození (mutace, zlomy) (Lodish et al. 2004, Nikjoo et al. 1994, Petruželka et al. 2003).

Biologická kancerogeneze zahrnuje hlavně kancerogenezi virovou, bakteriální a parazitární. Myšlenku, že infekční agens může být rizikový faktor pro vznik maligního onemocnění, poprvé vyslovil Rous (1910). Ve své práci prokázal, že kuřecí karcinom může být vyvolán infekčním agens (retrovirus, RVS = rous sarcoma virus) (Javier a Butel 2008, Rous 1910). Seznam dalších virů způsobujících rakovinu u člověka uvádí Tabulka 1 (Petera et al. 2005).

**Tabulka 1:** Viry, u kterých bylo prokázáno, že mohou vyvolat nádorová onemocnění u člověka (Petera et al. 2005)

Čeď	Virus	Kofaktor	Nádor
Herpesviry	Epstein-Barr virus (EBV)	Malarie Nitrosaminy v potravě	Burkittův lymfom Nasofaryngeální ca
Herpetické viry	Human Herpes virus (HHV-8)		Kaposiho sarkom
Retroviry	Human T-cell lymphotropis Viruses (HTLV) tap 1, 2		T-buněčná leukemie Leukemie z vlasatých buněk
Retroviry	HIV		Kaposiho sarkom
Papilomaviry	Human Papilomavirus (HPV) Subtyp 16, 18, 33, 39		Karcinom čípku děložního Karcinom vulvy Karcinom anu
Hepa DVA	Virus hepatitidy typu B (VHB)	Aflatoxiny, alkohol, orální kontraceptiva, kouření	Hepatocelulární Karcinom (HCC)
flavi	HCV	Alkohol	HCC

Bakteriální kancerogeneze vzniká tak, že dojde k chemické změně potraviny výhodné pro bakterie, které jsou při přemnožení organismu škodlivé. Metabolismus těchto bakterií pak vylučuje látky, které se můžou stát potencionálními kancerogeny pro organismus. Jako příklad můžeme uvést vznik cervikální intraepiteliální neoplasie. Při přemnožení vaginálních bakterií dojde k bakteriální infekci, při níž se začnou produkovat nitrosoaminy a uvolňovat volné radikály. Ty mohou způsobit cervikální intraepiteliální neoplasii, což je předstupeň rakoviny děložního čípku (Nam et al. 2009). Mezi další bakterie, které se podílejí na vzniku rakoviny, můžeme zahrnout bakterie *Salmonella typhi* (nádor žlučníku), *Streptococcus bovis* (kolorektální nádor), *Chlamydia pneumoniae* (rakovina plic), *Helicobacter pylori* (rakovina žaludku, MALT lymfom) a další (Egi et al. 2007, Mager 2006, Peter a Beglinger 2007).

### 1.1.2 Rozdělení nádorů

Nádory můžeme rozdělit podle několika hledisek. Jedním z těchto hledisek je rozdělení podle schopnosti nádoru tvořit metastázy a invadovat okolní tkáň. Nádory, které netvoří metastázy a nezpůsobují agresivní invaze nazýváme benigní. Nádory invadující a tvořící metastázy nazýváme maligní.

Benigní nádor je pomalu rostoucí nádor s neškodnou povahou. Tyto nádory jsou tvořeny dobře diferenciovanými buňkami, které se značně podobají buňkám normální tkáně. Jako příklad můžeme uvést lipom (tukový tumor), což je podkožní nádor

tvořený zralými tukovými buňkami. Dále pak můžeme uvést hemangiom kůže, který je tvořen krevními cévami s normálními endoteliálními buňkami atd. Mnoho benigních nádorů syntetizuje specifické produkty genů odpovědných za diferenciaci. Tyto nádory také vylučují proteiny, které jsou normálně produkovány plně diferenciovanou buňkou a mohou tak způsobit stav nebezpečný pro člověka. Např. benigní nádor Langerhansových ostrůvků pankreatu může vylučovat inzulin a zapříčinit tak hyperinzulinémií (předávkování inzulinem). Velký přísun inzulinu způsobí hypoglykémii a ta následně může vést ke smrti (McKinnell et al. 2006). Benigní nádor může také svým růstem utlačovat okolní normální tkáň, hlavně kapiláry. Ty pak nemohou vyživovat buňky parenchymu a dochází k atrofii tkáně. Jak normální buňky atrofují, zůstává z nich pouze pojivová tkáň (stroma), která je stlačována a tvoří kolem nádoru kapsuly (obal). Nádor je tedy ohraničený (McKinnell et al. 2006).

Maligní nádor má tendenci růst nekontrolovatelně, invaduje normální tkáň a má schopnost metastazovat. Buňky mají pleiomorfni tvar a nápadné jádro s nepravidelně uspořádaným chromatinem. Téměř vždy se liší jádro maligní buňky od jádra normální buňky. Maligní buňky jsou naprogramované k proliferaci a mají větší poměr jádra k plazmě než buňky normální. Jako příklad můžeme zmínit jaterní buňky. Normální jaterní buňky mají čtyřikrát více cytoplazmy než jaderného materiálu, kdežto maligní jaterní buňky mají poměr cytoplazmy a jaderné hmoty 1 : 1,5 (McKinnell et al. 2006).

Nádory můžeme také rozdělit podle toho, z jaké tkáně pocházejí (Sell 2004, Vorlíček et al. 2006):

- Epiteliální původ (krycí nebo výstelková tkáň)
  - benigní: epitelom, papilom
  - maligní: karcinom
- Stromální původ (pojivová tkáň)
  - benigní: fibrom – nádor vaziva  
myom – nádor hladkého svalu  
chondrom – nádor chrupavky
  - maligní: sarkom
- Neuroektodermální původ (CNS a kůže)
  - benigní (PNS): pigmentový névus
  - benigní (CNS): gliom, neurinom, meningeom
  - maligní (PNS): melanom

- maligní (CNS): glioblastom, neuroblastom
- Hematopoetický původ (krvetočná tkáň)
  - maligní: leukémie, lymfom
- Nádory ze žlázových tkání
  - benigní: adenom
  - maligní: adenokarcinom
- Nádory ze zárodečných tkání (germinomy)
  - benigní: teratom
  - maligní: teratokarcinom, embryonální karcinom
- Nádory z ostatních tkání

## **1.2 Melanom**

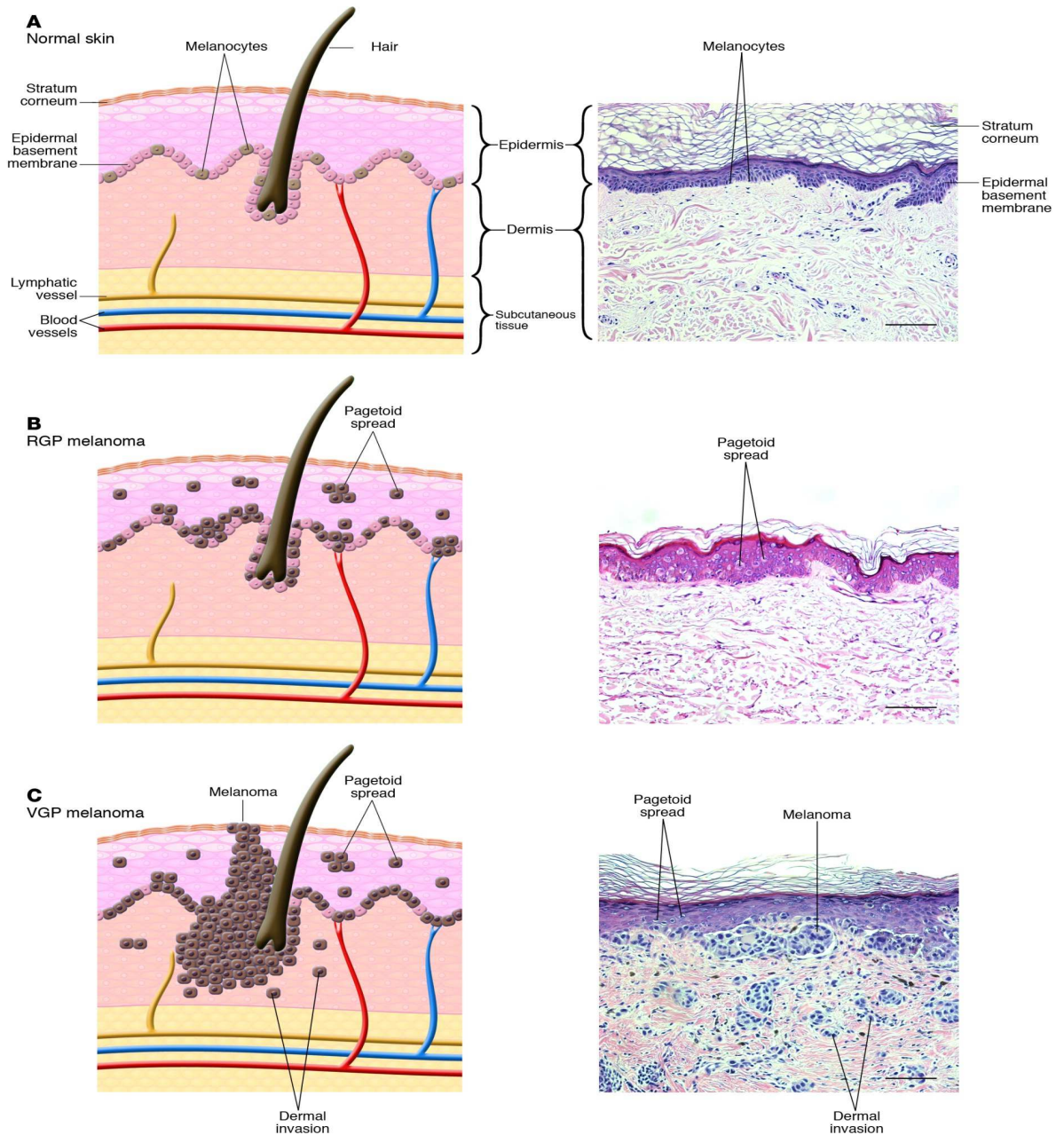
Maligní melanom je zhoubný nádor vycházející z buněk, kterým se říká melanocyty. Buňky jsou neuroektodermálního původu a jsou schopny tvořit melanin. Nádor není častý, ovšem jeho agresivní chování ho řadí mezi nejzávažnější zhoubné nádory. Vyskytuje se na kůži trupu, končetin, na dlaních, ploskách nohou atd. Nádor může vznikat primárně také v oku a játrech. Dvě třetiny úmrtí na kožní nádory jsou připisovány původu melanomu (Weinzweig 1999, Čáp et al. 2005).

V posledních 30 letech mají melanomy trvale vzestupný trend. Ve Spojených státech od roku 1992 se počet nových případů ročně zvýší o 3,1%. Ve Velké Británii je incidence 10/100 000 obyvatel, v České republice to bylo v roce 1998 12/100 000 obyvatel (Čáp et al. 2005).

### **1.2.1 Od melanocyty po melanom**

Původ melanocytů najdeme v neurální liště. Melanocyty jsou umístěny v bazální vrstvě epidermis a jak již bylo řečeno, obsahují pigment melanin (Bandarchi et al. 2010). Melanin je pak přenášen na receptor keratinocytů (PAR-2) (Hermanns et al. 2000). Takto přenesený melanin pak formuje čepičky na povrchu jádra mitoticky aktivních buněk bazální membrány a chrání jádro před poškozením UV zářením. Porucha tvorby melaninu vede k postupné transformaci melanocytů na melanomové buňky. Takto pozměněné buňky pak migrují k svrchní vrstvě epidermis a jsou rozptýleny mezi epiteliálními buňkami („pagetoid spread“). Ještě však nepronikají

bazální membránou (RGP stadium = radial growth phase). Buňky jsou již v tomto stadiu atypické. Mají hojně množství cytoplazmy, zvětšuje se jejich velikost včetně jádra, které je hyperchromatické. Melanomové buňky postupně začnou pronikat dermalně-epidermalním spojem (invadují buď jednotlivě a nebo ve shlucích) a vzniká tak melanom (VGP stadium = vertical growth phase) (Bandarchi et al. 2010, Chudnovsky et al. 2005). Tento proces můžeme vidět na Obr. 2.



**Obr. 2:** Transformace melanocyty – A) normální kůže B) RGP melanom C) VGP melanom (Chudnovsky et al. 2005)

### 1.2.2 Etiologie

Příčina vzniku melanomu není přesně známa. Za hlavní etiologické faktory jsou považovány kožní fototyp a sluneční záření. Dalšími rizikovými faktory jsou dysplastické névy, přibližně u 2-5% lze nalézt genetický podklad, dále RTG záření, imunosuprese, chronická iritace, chronické působení kancerogenů (Čáp et al. 2005).

### 1.2.3 Klasifikace

Rozlišujeme 5 základních typů melanomu u lidí:

#### **a) Lentigo maligna melanoma (LMM)**

Tento typ vzniká na podkladě lentigo maligna, což je nestejně hnědé pigmentové ložisko na kůži, které má histologický obraz melanomu in situ. Tato léze se objevuje více než 10-15 let před maligním stavem. Léze dosahuje průměru 3-6 cm. Maligní degradace je pak charakterizována uzlíky v lézi. LMM odpovídá za 4-10% kožních melanomů. Je typicky lokalizován na krku, hlavě, pažích, má nepravidelné hranice a proměnlivou barvu od šedé až po tmavě hnědou (Bast et al. 2000, Weinzweig 1999).

#### **b) Povrchově se šířící melanom (SSM - superficial spreading melanoma)**

SSM je běžná forma kožního melanomu, zahrnuje zhruba 70% všech maligních melanomů. Vzniká obecně z dřívějších lézí, je plochý a má nepravidelné hranice. Léze jsou obvykle vícebarevné se stíny šedé, hnědé, černé, červené a bílé. Amelanotické oblasti zobrazují regresi (Bast et al. 2000). Může se vyskytnout na jakémkoliv místě a v jakémkoliv věku (Bandarchi et al. 2010).

#### **c) Nodulární melanom (NM - nodular malignant melanoma) –**

NM odpovídá za 10-15% kožních melanomů. Může se objevit na celém povrchu těla, nejčastěji se ale objevuje na trupu mužů. Léze je tmavá a barva je většinou jednotná. NM neroste radiálně, jako to bylo u ostatních typů, ale vertikálně, tj. roste jako hrbol (Weinzweig 1999, Bast et al. 2000).

**d) Akrolentiginózní melanom (ALM - acral-lentiginous melanoma)**

Reprezentuje 3-5% všech kožních melanomů. Typicky se objevuje na dlaních, patě či za nehty. Většina lézí ALM má v průměru 3 cm, jsou světlehnědé až tmavohnědé s nepravidelnými hranicemi. Tento typ se objevuje ve starším věku (Bandarchi et al. 2010, Bast et al 2000, Weinzweig 1999).

**e) Mukolentiginózní melanom (MLM = mucosal lentiginous melanoma)**

Má podobný vzhled jako ALM. Tyto léze vznikají na mukózních místech jako je dutina ústní, jícen, vagína a další (Bast et al. 2000).

#### **1.2.4 Klinický obraz**

Čtyřicet až padesát procent melanomů vzniká z pigmentových névů, zbytek vzniká ve zdravé kůži. Melanom začíná jako drobná pigmentová skvrna převážně hnědé barvy. Na rozdíl od névu se zvětšuje, mění barvu a tvar (Čáp et al. 2005, Weinzweig 1999). Pro rozpoznání maligního melanomu byl vytvořen pomocný akronym ABCDE (Čáp et al. 2005, Zalaudek et al. 2009).

A – (asymetry) - melanom vytváří od počátku lehce nepravidelná ložiska, s trvalým růstem se asymetrie stále zvyrazňuje

B – (border) – okraje melanomu jsou nepravidelné se zářezy a výběžky

C - (color) – barva bývá skvrnitá s různými odstíny hnědé a černé barvy, časté jsou i šedé, až šedomodré plošky

D – (diameter) – velikost bývá větší než u běžných névů, melanom by měl být alespoň v jednom rozměru větší než 5-6 mm

E – (enlargement) – melanom se na rozdíl od névu trvale zvětšuje

Mezi další objektivní známky malignizace névu patří krvácení, zánětlivá reakce v okolí névu, v pozdních formách začíná mokvání a nodulární růst. Generalizované formy se projevují symptomy v závislosti na lokalizaci metastatického poškození (Čáp et al. 2005). Při špatném odnětí melanomu se mohou vytvořit lokální metastázy v jizvě či v jejím blízkém okolí. Projevují se hnědými či amelanotickými uzlíky v podkoží. Jako první se při metastazování melanomu objeví metastázy v regionálních spádových uzlinách, pak se objeví metastázy v různých orgánech (hlavně v plicích) (Petruželka et al. 2003).

### 1.2.5 Melanom B16-F10

V této práci je využíván jeden z modelů myšního (C57BL/6) melanomu. Je to melanom B16-F10, který je charakteristický svou vysokou schopností metastazovat a to hlavně do plic. Dalšími myšními modely jsou B16-F0, B16-F1, B16-BL (Nakamura et al. 2002).

### 1.3 Metastázy (Proces metastázování)

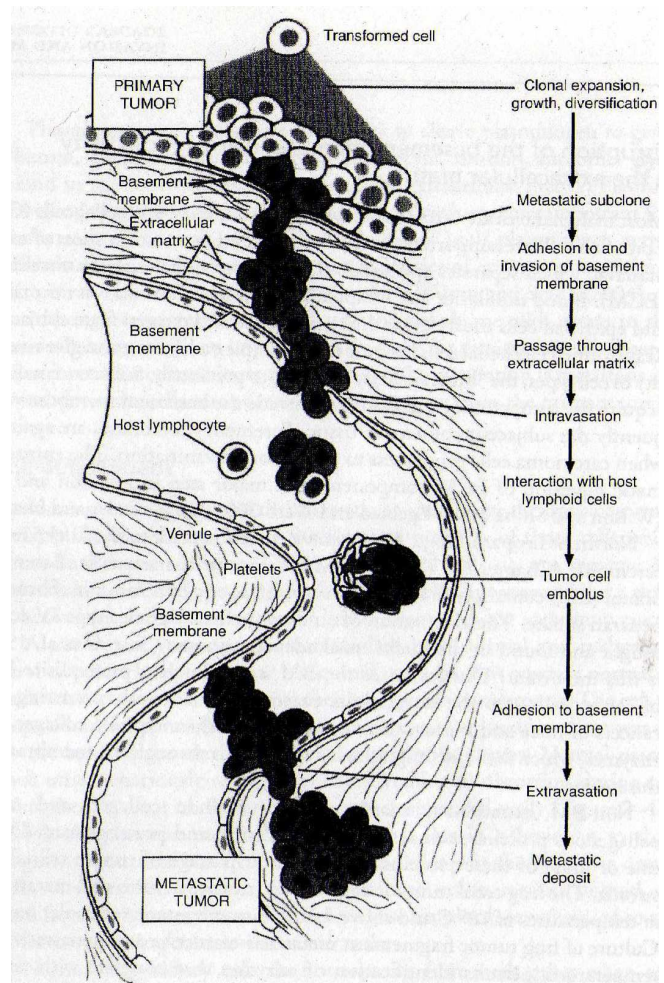
Metastázování je proces, ve kterém nádorové buňky zakládají nový růst na odlišných místech od primárního nádoru.

#### 1.3.1 Proces metastázování obecně

Vývoj metastáz je nenahodilý proces, kde usazení, invaze, přežití a růst jedné buňky či malého množství buněk může vést k morbiditě a mortalitě (Nicolson 1995). Proces metastázování zahrnuje několik kroků, které budou postupně probrány. Tyto kroky můžeme vidět na Obr. 3.

##### 1.3.1.1 Metastatická kaskáda

První fází vzniku metastázy je oddělení buňky od primárního nádoru. Uvolnění nádorové buňky od primárního nádoru je charakterizováno ztrátou cell-cell adheze, v epiteliálních



*Obr. 3: Metastatická kaskáda (McKinell et al. 2006)*



buňkách dochází k dysfunkci vazby kadherin-katenin. Kadheriny jsou transmembránové proteiny, jejich funkce závisí na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, zprostředkovávají asociaci s aktinovými filamenty prostřednictvím kateninů. Vazba kadherin-katenin hraje podstatnou roli v první fázi vzniku metastáz (Beavon 2000, Shiozaki et al. 1996). Subtyp kadherinů, E-kadherin (adhezivní molekula v buňkách savců), v rakovinných buňkách částečně nebo úplně chybí. To umožňuje rakovinným buňkám oddělit se jedna od druhé. Velká řada prací se zaměřuje na proces, jak zastavit metastázování ovlivněním E-kadherinu (Beavon 2000, Kowalski et al. 2003, Onder et al. 2008).

Takto uvolněná buňka musí proniknout bazální membránou do extracelulární matrix (ECM) a pak opět bazální membránou do krevních cév. ECM je tvořena složkami pojivové tkáně jako je kolagen a elastin, které interagují s vysoce nerozpustným materiálem. ECM neváže jen buňky k sobě, ale také dovoluje buňkám přežít a proliferovat (McKinnell et al. 2006). Proliferace je možná jen tehdy, když jsou buňky přichyceny k povrchu. Toto přichycení je zprostředkováno pomocí povrchových molekul nazývaných integriny (Mizejewski 1999, McKinnell et al. 2006). Buňky obsahují také jaderný protein E-CDK2, který reguluje růst a buněčné dělení. Pokud buňka není přichycena pomocí integrinu k povrchu, tak inhibiční substance zastaví produkci E-CDK2, buňka přestane růst a začne její apoptóza (buněčná programovaná smrt). Rakovinné buňky nemusí být přichyceny, aby se mohly rozmnožovat. Jejich E-CDK2 je aktivní i bez připojení integriny (Mizejewski 1999, Fang et al. 1996, McKinnell et al. 2006). Vědci se domnívají, že za toto jsou zodpovědné onkogeny jako je Ras nebo Neu/ErbB2 (Gladden a Diehl 2003, Lloyd et al. 1997, Musgrove 2006).

Aby došlo k narušení bazální membrány a degradaci ECM, tak rakovinné buňky uvolňují proteolytické enzymy (proteázy). Tyto proteázy si můžeme rozdělit do několika skupin. První skupinou jsou matrix-metaloproteázy (MMPs), které zahrnují 24 enzymů. Další skupinou jsou serinové proteázy, mezi něž patří katepsin G, chymotrypsin, plazmin, aktivátory plazminogenu, trypsin a kalikreiny. Dále následuje skupina aspartátových proteáz jako jsou katepsin D a E, cysteinové proteázy jako jsou katepsin B, H, K, L, M, N, Q, O, S, kaspázy a treoninové proteázy (Pandey et al. 2007). Proteázy rozruší bazální membránu, částečně ji natráví a vytvoří tak místo, které přitáhne rakovinné buňky, a ty tak proniknou do krevních cév. Příkladem je jeden typ MMPs a to MMP2. MMP2 natráví laminin v bazální membráně, dojde

k vytvoření místa, které přitáhne rakovinné buňky a ty pak projdou membránou. Tomuto procesu se říká intravasace (McKinnell et al. 2006, Pirila et al. 2003).

Rakovinné buňky jsou šířeny kapilárami a lymfatickým řečištěm (artérií proniknou vzácně) (McKinnell et al. 2006). Kapiláry jsou hlavní cestou pro vstup rakovinné buňky do cévního systému (Bosari et al. 1992). Buňky v krevním řečišti adherují ke všemu možnému včetně lymfocytů a destiček, formují embolus, který může přilnout k povrchu kapilár. Embolus je stabilizován fibrinem a vytváří tzv. trombus. Růst nádorových buněk v rámci trombu, pak může způsobit uzavření kapiláry (McKinnell et al. 2006). Takto stabilizované rakovinné buňky interagují s endoteliálními buňkami kapilár a pronikají bazální membránou díky aktivní migraci – buňky vstoupí mezi endoteliální buňky skrz porušenou bazální membránu (diapedéza). Vzniklé ohnisko rakovinných buněk je omezeno v růstu a to díky výživě a kyslíku dodávaného difuzí z krve. Nově vzniklé ložisko začne získávat a tvořit nové cévy, aby zvýšilo přežívání buněk a zamezilo jejich nekrotizaci. Toto se děje díky aktivaci faktorů angiogeneze. Vaskularizace nové nádorové kolonie umožňuje získávat dostatečné množství živin, kyslíku a vylučovat toxické metabolity. Metastatický růst dále pokračuje (McKinnell et al. 2006).

### **1.3.2 Metastázování melanomu B16-F10**

Hledání mechanismů, které zodpovídají za proces metastázování, začalo již v roce 1889, když Stephen Paget analyzoval 735 vzorků rakoviny plic z pitvaných žen. Nenáhodné vzory metastáz v plicích naznačovaly, že proces není náhodný, ale že jisté rakovinné buňky („seed“) mají specifickou afinitu k mikroprostředí určitých orgánů („soil“) (Paget 1889). Paget vytvořil tzv. „seed and soil“ hypotézu.

Experimentální data podporující „seed and soil“ hypotézu byly odvozeny od studií invaze a růstu metastáz myšího melanomu B16-F10 (Hart a Fidler 1980). Fidler a Hart pozorovali, že intravenózně aplikovaný myší melanom B16-F10 převážně kolonizuje plíce (Fidler a Hart 1982) a vytváří významně více metastáz než jiné typy myšího melanomu jako je třeba B16-F1 (Fidler 1973).

Mechanismus invaze těchto nádorových buněk zahrnuje intravasaci z místa primárního nádoru do krevního řečiště, zachycení embolu na sekundárním místě, extravasaci skrz endotel a bazální membránu spojující cévy s cílovým orgánem,

proliferaci. Každý z těchto kroků má svou specifitu, která v závěru vede ke vzniku metastáz (Fidler 1995). Všechny tyto kroky byly již popsány výše v kapitole 1.3.1.1.

## **1.4 Nádorová imunologie**

Imunologické mechanismy jsou důležitou součástí pochodů, jimiž se organismus brání vzniku zhoubného nádoru. Tyto mechanismy jsou zajišťovány celým komplexem specifických i nespecifických reakcí, jejichž cílem je zničení nádorové buňky (Lukešová et al. 2007). Do nespecifické imunitní odpovědi řadíme komplement, granulocyty (polymorfonukleáry), monocyty/makrofágy a NK buňky („*nature killers*“). Do specifické odpovědi zahrnujeme pochody, které souvisí s funkcí a změnami v T a B lymfocytech (přímé působení i tvorba protilátek) (Krejsek a Kopecký 2004).

### **1.4.1 Mechanismy obrany proti nádorům**

#### **1.4.1.1 Nádorové antigeny**

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických povrchových antigenů, které by umožnily imunitnímu systému jejich rozpoznání (Hořejší a Bartůňková 2005). O existenci těchto nádorových antigenů se opírá získaná imunita. Nádorové buňky jsou tělu vlastní, ale vlivem mutací dochází k tomu, že některé proteiny jsou produkovány v jiné formě a jsou tedy antigenně odlišné.

Nádorové antigeny můžeme rozdělit do dvou velkých skupin: Antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA).

TSA se vyskytují pouze na nádorových buňkách. Do této kategorie patří komplexy MHC I s abnormálními fragmenty buněčných faktorů (typické pro chemicky indukované nádory a pro některé leukémie asociované s chromozomálními translokacemi, které produkují specifický abnormální protein), komplexy MHC I s fragmenty proteinů onkogenních virů (u nádorů vyvolaných viry, jako je polyoma virus, SV40, EBV), abnormální formy glykoproteidů (glykosylace, zejména sialylace), idiotypy myelomů a lymfomů (Hořejší a Bartůňková 2005).

TAA se vyskytují nejen na nádorových buňkách ale i na normálních buňkách. Odlišnost spočívá v kvantitě exprese nebo v abnormální časové či místní expresi (Hořejší a Bartůňková 2005). Mezi nejznámější TAA patří onkofetální antigeny, melanomové antigeny, antigen HER2/neu (receptor růstového faktoru epiteliálních buněk), PSA, EPCAM (adhezivní molekula epiteliálních buněk, která exprimuje na metastázách karcinomů) a diferenciacní antigeny leukemických buněk. Onkofetální antigeny jsou přítomné v normálních embryonálních buňkách. V postnatálním období mizí a objevují se pouze na některých nádorových buňkách. Příkladem je  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) sekretovaný hematomy nebo karcioembryonální antigen (CEA) produkováný např. buňkami karcinomu tlustého střeva (Hořejší a Bartůňková 2005, Krejsek a Kopecký 2004). Mezi melanomové antigeny řadíme MAGE-1 a Melan-A, které jsou silně exprimovány na melanomových buňkách. V menším množství se mohou také vyskytovat na normálních melanocytech. PSA je prostatický antigen. Stanovení jeho množství v krvi se využívá k monitorování léčby a ke screeningu karcinomu prostaty (Hořejší a Bartůňková 2005).

#### **1.4.1.2 Leukocyty**

Leukocyty jsou efektoři protinádorové imunitní odpovědi. V průběhu nádorového onemocnění dochází k jejich modifikaci jak ve struktuře, tak i funkci. Uplatňují se monocyty/makrofágy, granulocyty, dendritické buňky a lymfocyty (Veselský et al. 2004).

Makrofágy vznikají vycestováním monocytů do tkáně, kde jsou stimulovány. Obsahují molekulu CD 14, CD11b, F4/80 (myši)/EMR1 (člověk), lysozym M a HLA molekuly II třídy, což umožňuje rozpoznání a fagocytózu apoptických buněk (Khazen et al. 2005, Veselský et al. 2004). Makrofágy také exprimují molekuly CD 80 a CD 86 a mají cytostatický i cytotoxický efekt (Veselský et al. 2004). Makrofágy jsou nejpočetnější skupinou leukocytů infiltrující nádor. S nádorem asociované makrofágy po aktivaci nádorovými buňkami mohou působit jak proti nádoru tak mohou podporovat proliferaci nádoru (Al-Sarireh a Eremin 2000). U makrofágů není rozpoznávání cílových buněk závislé na MHC molekulách, protože mají Fc receptor, který jim umožňuje vázat se k protilátkám specifickým pro nádorové buňky a zprostředkovávat tak ADCC odpověď (antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Clynes et al. 1998).

Neutrofilly se řadí do skupiny granulocytů (PMN, polymorfonukleáry) společně s eosinofily a bazofily. Patří do efektorové složky přirozené imunity (Veselský et al. 2004). Neutrofilly jsou vysoce destruktivní buňky, které jsou esenciální pro obranu hostitele, ale také přispívají k různým zánětlivým onemocněním (Smith 1994). Neutrofilly, ale i zbytek PMN, mohou spustit progresi nádoru díky degradaci ECM a zvýšení angiogeneze. Naproti tomu PMN mohou také působit jako přímé efekторы buněk v obraně proti nádoru díky uvolňování cytotoxických mediátorů jako jsou kyslíkové radikály, proteolytické enzymy a další (Buonocore et al. 2008).

Dendritické buňky jsou nejvýznamnějšími antigen prezentujícími buňkami (APC). Dendritické buňky (DC) exprimují velké množství MHC molekul 1. a 2. třídy, kostimulačních a adhezivních molekul. Tyto molekuly jsou důležité pro stimulaci tzv. naivních T lymfocytů (lymfocyty, které se ještě nesetkaly s antigeny). Jejich fenotypické a funkční vlastnosti jsou těsně svázány s jejich stupněm zralosti. (Šedivá a Stříž 2002, Veselský et al. 2004). U nezralé DC indukuje antigen fenotypické a funkční změny, které vedou ke změně z antigen vázající buňky na antigen prezentující buňku. Dozrávání DC se děje současně s její migrací z periferní tkáně do lymfatického orgánu. Tento děj je kontrolován chemokiny C6kine a MIP-3b. Tyto dva chemokiny přitahují zralé DC a naivní T lymfocyty (Sozzani et al. 2000, Šedivá a Stříž 2002). Nativní T lymfocyty se působením kostimulačních molekul a cytokinového prostředí diferencují buď na efektorové T lymfocyty nebo tzv. „helper“ T lymfocyty (TH lymfocyty). TH lymfocyty se pak mohou dále diferenciovat působením různých cytokinů do dvou subpopulací a to TH1 či TH2 (Feili-Hariri et al. 2005, Reid et al. 2000). Jako příklad můžeme uvést to, že DC po interakci s T lymfocyty produkuje IL-12, který určuje vyžrávání TH0 lymfocytu do subpopulace TH1, která je zodpovědná za cytotoxickou buněčnou odpověď. Tato odpověď hraje roli v obraně proti nádorovému bujení (Veselský et al. 2004).

NK buňky („přirození zabíječi“) jsou důležitou složkou protinádorové imunity. Dokáží spontánně usmrcovat nádorové buňky a buňky infikované virem. K tomuto účelu využívají Fc receptory na svém povrchu. NK buňky napadnou cílovou buňku a usmrtí ji mechanismem ADCC nebo buňku usmrtí přímo bez protilátky (Ferenčík et al. 2005). NK buňky se od ostatních lymfocytů liší tím, že v cytoplazmě mají dobře zřetelná granula (lyzozomy). Tyto granula obsahují dva typy cytotoxických látek (specifické perforiny a granzymy), které zabíjí cílovou buňku. NK buňky využívají dvou typů receptorů, podle kterých rozeznávají, zda mají cílovou buňku napadnout

nebo ne. Prvním typem jsou inhibiční receptory, které rozpoznávají HLA antigeny I. třídy. Těchto receptorů je několik druhů. NK buňka rozpozná na cílové buňce HLA antigen I. třídy a zastaví svou smrtenosnou aktivitu. Nádorově transformované či viry infikované buňky ztrácejí tyto HLA antigeny a proto se stávají terčí NK buněk. Druhým typem receptorů jsou aktivační receptory. Tyto receptory spouštějí smrtenosnou aktivitu NK buněk. Pro usmrcení cílové buňky musí tedy NK buňka současně dostat aktivační signál a inhibiční receptory nesmí rozpoznat HLA antigen (Ferenčík et al. 2005). Nejvýznamnějším kritériem je tedy absence molekul HLA I. třídy, která je běžná u nádorových buněk (Finke a Bukowski 2004).

T lymfocyty jsou základními buňkami získané imunity. T lymfocyty můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinou jsou CD4+ T lymfocyty označované jako pomocné („helper, TH“). Tyto T lymfocyty exprimují na svém povrchu molekulu CD3 a CD4 a rozeznávají antigeny prezentované pomocí MHC II molekul. Mezi jejich nejdůležitější funkci patří regulace imunitních reakcí. Imunitní systém ovlivňují produkcí cytokinů. Podle produkce cytokinů můžeme TH lymfocyty rozdělit do dalších subpopulací (TH1, TH2 a TH3). TH1 lymfocyty produkují hlavně cytokiny IL-2, IL-17, INF-gama a TNF-alfa. Tyto cytokiny mění např. neaktivovaný makrofág na aktivovaný nebo přímo působí na nádorové a infikované buňky (Ferenčík et al. 2005, Hořejší a Bartůňková 2005, Krejsek a Kopecký 2004). Jejich hlavní funkcí je však poskytnutí signálu cytotoxickým lymfocytům (CTL), NK buňkám a makrofágům (Mosman a Sad 1996). TH2 lymfocyty produkují zejména IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Tyto buňky pomáhají aktivovat B lymfocyty k tvorbě protilátek a to přímým mezibuněčným kontaktem a uvolňováním cytokinů, které regulují vývoj a diferenciaci B lymfocytů na plazmatické buňky (Ferenčík et al. 2005). TH1 a TH2 buňky se svými produkty navzájem ovlivňují. Cytokiny uvolňované TH1 buňkami stimulují vývoj TH1 buněk a inhibují vývoj TH2 buněk (zvláště INF-gama). IL-4 a IL-10 zase stimulují vývoj TH2 buněk a inhibují vývoj TH1 buněk. Udržování poměru TH1/TH2 je jedním z důležitých imunoregulačních mechanismů (Ferenčík et al. 2005, Hořejší a Bartůňková 2005, Krejsek a Kopecký 2004). TH3 buňky uvolňují hlavně transformující růstový faktor (TGF-beta), který se účastní procesů hojení poškozené tkáně (Ferenčík et al. 2005). Druhou skupinou jsou CD 8+ T lymfocyty neboli cytotoxické (CTL). Na svém povrchu exprimují molekulu CD3 a CD8. CTL rozpoznávají antigeny prezentované pomocí MHC I molekul. Buňky usmrcují přímým kontaktem s cílovou (nádorovou) buňkou nebo prostřednictvím extracelulárně

uvolněných toxinů. Při přímém kontaktu může reagovat Fas-ligand (FasL), který je na povrchu CTL, a Fas-receptorem (FasR), který je na povrchu cílové (nádorové) buňky. Tato interakce spustí apoptózu, která zahubí danou buňku (Ferenčík et al. 2005, Hořejší a Bartůňková 2005).

### **1.4.1.3 Cytokiny**

Cytokiny hrají v nádorové imunologii velikou roli. Rozhodují o tom, kterým směrem se bude vyvíjet protinádorová imunitní odpověď. U nádorového onemocnění se posouvá rovnováha mezi TH1 a TH2 odpovědí směrem k TH2 (Shurin et al. 1999). Nerovnováha je způsobena jak produkcí cytokinů T lymfocyty tak produkcí cytokinů nádorovými buňkami.

Jak již bylo zmíněno, TH1 lymfocyty produkují hlavně cytokiny IL-2, IL-17, INF-gama a TNF-alfa. TH2 lymfocyty produkují hlavně IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 (Ferenčík et al. 2005. Hořejší a Bartůňková 2005).

Mezi hlavní faktory, které jsou produkovány nádory a ohrožují rovnováhu cytokinů, patří TGF-beta, IL-10 a prostaglandiny (Ferenčík et al. 2005, Petera et al. 2005).

## **1.4.2 Mechanismy, jimiž se nádory brání před rozpoznáním imunitním systémem**

### **1.4.2.1 Imunosupresivní účinek mutagenů**

Řada mutagenů, ať už jsou to mutageny chemické, fyzikální či biologické, působí současně imunosupresi, což může vést k úniku nádoru imunitnímu systému. Mechanismem imunosuprese je poškození určitých populací leukocytů. Mechanismy imunosuprese vyvolané účinkem mutagenů na leukocyty mohou být komplexnější než úbytek leukocytů. Jako příklad můžeme uvést UV záření. UV záření je nejen mutagen zodpovědný za vznik kožních nádorů, ale vyvolává rovněž významnou imunosupresi (Petera et al. 2005).

#### **1.4.2.2 Exprese inhibitorů komplementu**

Pro nádorové buňky je důležitá vysoká exprese inhibitorů komplementu a to hlavně molekul CD 55 a CD 59. Nádorové buňky jsou takto chráněny před poškozením komplementem aktivovaným specificky (vazba antigen – protilátka) a nespecificky (alternativní cesta) (Petera et al. 2005).

#### **1.4.2.3 Ztráta exprese HLA molekul**

Nádorové buňky se ztrátou exprese (MHC I) HLA I molekul se stávají nedetekovatelnými pro buněčnou imunitu. Na druhé straně by měly být nádorové buňky HLA molekuly rozpoznatelné NK buňkami, ale není tomu tak (Petera et al. 2005). Nádor začne produkovat MHCIIb (u lidí HLA-G). Tyto molekuly sice nedokáží prezentovat antigen, ale úspěšně zabrání ataku NK buněk (Finke a Bukowski 2004).

#### **1.4.2.4 Odlučování nádorových antigenů**

Dalším mechanismem, jakým se nádor snaží uniknout imunitnímu systému, je odlučování antigenů do mikroprostředí nádoru i do systémové cirkulace, kdy dojde k bloádě imunokompetentních buněk (T-lymfocytů) přebytkem antigenu, což zabrání vazbě na tento antigen na povrchu buněk (Petera et al. 2005).

#### **1.4.2.5 Produkce imunosupresivních faktorů v prostředí nádoru**

Schopnost nádorových buněk vytvářet různé typy cytokinů, chemokinů, angiogenních a růstových faktorů je podstatná pro proliferaci nádorových buněk, formování stromatu a vytváření nových cév pro výživu nádoru. Nádorové buňky produkují chemokiny, cytokiny a další faktory jako jsou IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ , MCP-1 („monocyte chemotactic protein-1“) a RANTES, které působí na nádor parakrinně a autokrinně (Levina et al. 2008).

IL-6 je pleiotropní prozánětlivý cytokin, který ovlivňuje diferenciaci B a T lymfocytů, stimuluje hematopoezu a další. IL-6 také může přímo stimulovat proliferaci nádorových buněk a podpořit angiogenezi nádoru (Nilsson et al. 2005,



Ravoet et al. 1994, Dankbar et al. 2000). Hladina IL-6 koreluje s velikostí nádoru a inverzně koreluje s odpovědí na léčbu a přežití (Salgado et al. 2003).

IL-8 stimuluje migraci neutrofilů, monocytů, lymfocytů a podporuje nádorový růst včetně metastáz. Má také prozánětlivý účinek. Chemokiny jako je RANTES a MCP-1 stimuluje migraci normálních a maligních buněk a podílí se na nádorové angiogenezi (Levina et al. 2008).

IL-10 a TGF- $\beta$  jsou důležité imunopresivní faktory, které hrají významnou roli v obraně nádoru proti imunitnímu systému (Gorelik a Flavell 2002, Salazar-Onfray 1999). Podrobněji se v následující kapitole budeme zabývat TGF- $\beta$ .

#### **1.4.2.6 TGF-beta**

Transformující růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ) je cytokin, který kontroluje proliferaci, buněčnou diferenciaci a jiné funkce ve většině buněk včetně T a B lymfocytů, dendritických buněk a mikrofágů. TGF- $\beta$  je prototyp velké rodiny, která zahrnuje nejméně pět isoform (TGF- $\beta$ -1, TGF- $\beta$ -2, TGF- $\beta$ -3, TGF- $\beta$ -4, TGF- $\beta$ -5), které nejsou příbuzné TGF- $\alpha$  (Clark a Coker 1998, Wakefield a Roberts 2002). TGF- $\beta$  může působit jak autokrinně, tak parakrinně (Moustakas et al. 2002).

TGF- $\beta$  má v kancerogenezi dvojí roli. Může působit jako supresor nebo bude mít pro-nádorový účinek. Supresorová aktivita dominuje převážně v normálních, nepoškozených tkáních, kde buňky odpovídají efektům růstových inhibitorů. V transformovaných tkáních má zase opačný účinek. V nádorových buňkách dojde k nadprodukci TGF- $\beta$ , což vede ke snížení imunitní odpovědi a k úniku nádoru před imunologickým atakem (Beck et al. 2001, De Visser a Kast 1999, Moustakas et al. 2002). Můžeme tedy říct, že díky produkci TGF- $\beta$  imunitní systém nádor toleruje. TGF- $\beta$  působí jako supresor na T-lymfocyty a NK buňky, vlivem TGF- $\beta$  dochází také k tvorbě Treg (T regulační lymfocyty) z TH lymfocytů. Treg lymfocyty produkují TGF- $\beta$  (autokrinní smyčka) a zároveň přímým kontaktem suprimují CTL a tím tak přispívají k nádorové toleranci (Becker et al. 2006).

#### **1.4.2.7 Další mechanismy (Fas protiútok, hypoxie)**

Ve srovnání s normálními tkáněmi je pro nádory často charakteristická hypoxie. Hypoxie je významná pro tvorbu kapilár a nižší hladina kyslíku může ovlivnit i schopnost odpovědi leukocytů na nádorové buňky (Peters et al. 2005).

Dalším mechanismem je exprese molekuly Fas ligandu na povrchu nádorových buněk. Vazba Fas ligandu na Fas (CD95/APO-1) na povrchu lymfocytu, vede k jeho apoptóze. Tímto mechanismem se také nádory brání před imunitním systémem (O'Connell et al. 1999).

### **1.5 Proenzymoterapie**

Základy (pro)enzymové terapie, tj. používání pankreatických proteolytických enzymů k léčbě rakoviny, byly položeny skotským embryologem Dr. Johnem Beardem již před sto lety (Beard 1902). Beard si všiml, že se nádor podobá trofoblastu. Také zpozoroval, že u většiny obratlovců, v době kdy zpomaluje růst placenty, se začíná vyvíjet pankreas a v něm se objevují zymogenní granula. To ho přimělo zabývat se otázkou, jestli rakovinné buňky, které vypadají jako trofoblast (mladé, vitální, nespecializované), by nemohly být tlumeny enzymy z pankreatu (Beard 1905). Beard používal čerstvé extrakty z telecích pankreatů, které obsahovaly enzymy spíše v neaktivní formě (hlavně trypsinogen a chymotrypsinogen), což ve své době nevěděl. Cestou použití aktivních enzymů šla řada pokračovatelů Beardova výzkumu, bohužel však marně. Pozitivních výsledků dosáhl nicméně zejména Wald et al. na modelu Lewisova plicního karcinomu (Wald et al. 1998) a melanomu (Wald et al. 2001). V těchto pracích bylo však třeba použít vysokých koncentrací proteáz a účinné perrektální aplikace, která umožňuje vstřebání mlekul enzymů. Proenzymy byly popsány mnohem později a jejich cílené užití v léčbě rakoviny bylo poprvé popsáno Trnkou (Trnka et al. 1999).

#### **1.5.1 Mechanismus proenzymoterapie**

Proenzymy jsou neaktivní a mohou v krvi nerušeně putovat. Předpokládá se, že v místě nádoru jsou aktivovány nádorovými proteázami, jako je s membránou asociovaný katepsin B (Kobayashi et al. 1993, Figarella et al. 1988), nádorový trypsin

(Koivunen et al. 1991, Nyberg et al. 2006), urokinázový inhibitor plasminogenu (Uchima et al. 2003) a je zvažována i účast enterokinázy (Miyata et al. 1999) nebo enzymu podobného enterokináze (Nyberg et al. 2002). U proenzymů můžeme také pozorovat autoaktivaci – trypsinogen je aktivován nově vznikajícím tryptinem (Kay a Kassell 1971).

Po aktivaci proenzymů (používá se směs trypsinogenu a chymotrypsinogenu) se vzniklý trypsin a chymotrypsin spojují se sérovými inhibitory proteáz včetně s alfa-2-makroglobulinem. Vzniklý komplex alfa-2-makroglobulinu s proteázami má schopnost vázat celou řadu cytokinů, včetně cytokinů, kterými nádory navozují stav, kdy jsou tolerovány. Těmito cytokiny jsou TGF –beta, IL-4, IL-6 a IL-10 (Krasagakis et al. 1998, Pawelec 1999). Alfa-2-makroglobulin (a2M) je obsažen v séru ve velké koncentraci, ale díky své vysoké molekulové hmotnosti (a rezultující nízké molaritě) je schopen vázat jen omezené množství proteáz (Borth 1992). Tím je schopnost zmíněných komplexů vázat imunopresivní cytokiny limitována.

Proteázy mohou také interakovat s aktivovaným receptorem proteáz (PARs) (Bohm et al. 1998). Vedle běžných proteáz typu trombinu, aktivuje tento receptor i trávicí proteáza trypsin (Nouza et al. 1999). Subnanomolární a nanomolární koncentrace trypsinu mohou aktivovat tyto receptory, což ve výsledku vede proliferaci rakovinných buněk a k jejich migraci (Darmoul et al. 2004, Ge et al. 2004, Yada et al. 2005). Novák a Trnka ve svých experimentech používali výrazně větší hladiny (pro)enzymů, což mohlo vést k přesycení či poškození těchto receptorů, které pak neplní svojí funkci nebo je výsledkem opačná reakce (Novak a Trnka 2005, Trnka et al. 1999).

### **1.5.2 Způsoby aplikace proenzymů**

Proenzymy byly aplikovány v pokusech několika způsoby. Prvním způsobem je subkutánní neboli podkožní aplikace (*s.c.*). Takto byla podávána směs trypsinogenu a amylázy (amyláza má jen podpůrný účinek) v pokusech Nováka a Trnky (Novák a Trnka 2005, Trnka et al. 1999). Úspěch terapie zaznamenali u metastázového modelu melanomu B16-F10.

Další cesta aplikace, která byla zkoušena, byla intramuskulární (*i.m.*) neboli do svalu. Byla využita směs trypsinogenu, chemotrypsinogenu a amylázy (opět podpůrný účinek amylázy). Tato terapie byla použita na modelu myšího sarkomu

S 180, kde měla vliv na redukci nádorového růstu a prodloužení přežití (Kaiserová 2008). Aplikace stejné směsi u myšího modelu melanomu B16-F10 vedla ke stejnému efektu včetně redukce výskytu metastáz (Kalferstová 2008). *I.m.* aplikace bude ještě dále rozvedena v této diplomové práci a v diplomové práci Maršíkové (*in prep*).

Byla také zkoušena aplikace proenzymů intraperitoneálně (*i.p.*) neboli do břišní dutiny. Byla použita stejná směs proenzymů včetně podpůrné amylázy jako u *i.m.* aplikace. Terapie byla použita na myším modelu melanomu B16-F10. Působení takto použitých proenzymů na velikost nádorů a počet metastáz bude rozvedeno v této práci a v práci Maršíkové (*in prep*).

Další cesty aplikace nebyly zkoušeny.

## **1.6 Vrozená imunita**

Přirozená (vrozená neboli nespecifická) imunita je fylogeneticky starší složka sebekontroly a obranyschopnosti organismu, jež je nezávislá na předchozím setkání s antigeny, projevuje se okamžitě po jejich rozpoznání, postrádá „paměť“ a ve srovnání se získanou imunitou jeví ve vztahu k antigenům nespecifické rysy (Nouza 2001).

Vrozená imunita zahrnuje jak buněčnou, tak látkovou (humorální imunitu). Princip této imunity spočívá v tom, že bakterie (a nejen ty) mají na povrchu různé typické molekuly PAMPs, které mohou být rozeznány imunitním systémem pomocí PRR. Jako příklad můžeme uvést toll like receptory (Hořejší a Bartůňková 2005, Kindt et al. 2007).

Buněčné nespecifické systémy zahrnují fagocytující buňky (hlavně neutrofilů a makrofágy) a cytotoxické buňky (NK buňky) (Hořejší a Bartůňková 2005). Nesmíme však také zapomínat na roli sliznic a pokožky, které mechanicky zabraňují vstupu infekce (Kindt et al. 2007).

### **1.6.1 Rozpoznávací mechanismy vrozené imunity**

Buňky vrozené imunity jsou schopné rozpoznat struktury, které se nacházejí na povrchu mikroorganismů (patogenních i nepatogenních), ale již je nenajdeme na nepoškozených buňkách organismu vlastní. Tyto struktury se označují jako PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) nebo MAMPs (*mikrobe associated*

*molecular patterns*) (Hořejší a Bartůňková 2005). PAMPs můžeme rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou PAMPs stimulující fagocytózu, další skupinou jsou PAMPs, které dokáží aktivovat zánětlivé mechanismy (agonisti signálních receptorů). Mikrobiální PAMPs jsou identifikovány prostřednictvím membránově vázaných či solubilních molekul přirozené imunity, viz. Tabulka 2. Tyto molekuly se označují jako PPRs (*pathogen pattern receptors*) a nachází se především na fagocytárních buňkách. PAMPs jsou tedy rozpoznávány hlavně fagocytárními buňkami, ale receptory nacházíme i na NK buňkách. Rozpoznávají je však také humorální složky nespecifické imunity, jako je komplement, proteiny akutní fáze (CRP) a další (Krejsek a Kopecký 2004, Hořejší a Bartůňková 2005).

**Tabulka 2:** Solubilní a membránové receptory pro nebezpečné vzory mikroorganismů (Krejsek a Kopecký 2004).

	<b>Receptor</b>	<b>Ligand</b>	<b>Účinek</b>
<b>S O L U B I L N Í</b>	CRP	Fosforylcholin, povrch mikrobů	Prozáněťové působení, opsonizace
	MBP	Složky povrchu mikrobů obsahující manózu	Lektinová dráha, aktivace komplementu
	C1q	Komplex Ab-Ag (mikrobů)	Klasická dráha aktivace komplementu
	C3b	Povrchy mikrobů chudé na kyselinu sialovou	Alternativní dráha aktivace komplementu
	LBP	LPS	Prozáněťové působení
	sCD14	Komplex LPS-LBP, LPS	Prozáněťové působení
	Specifické Ab	Mikrobiální antigeny	Neutralizace toxinů, odstraňování mikrobů, opsonizace
<b>M E M B R Á N O V É</b>	CD14	LPS-LBP	Prozáněťové účinky
	TLR 1-10	Rozmanité povrchové i nitrobuněčné molekuly mikrobů	Prozáněťové účinky
	Vychytávací receptory	Rozmanité povrchové i nitrobuněčné molekuly mikrobů	Prozáněťové účinky
	Receptory pro FcIg (FcR)	Komplexy antigen – protilátka	Opsonizace
	Receptory pro komplement (CR)	Komplexy antigen – protilátka	Opsonizace
	Adhezní molekuly $\beta_2$ -integriny L-selektiny	LPS	Prozáněťové účinky

Jedním z nejvýznamnějších PAMPs je LPS. LPS je molekula složená z lipidů a polysacharidů, které jsou spojeny kovalentní vrstvou. Lipopolysacharidy jsou hlavní složkou membrány gramnegativních bakterií. LPS představují významný endotoxin, proti němuž organismus zahájí imunitní systém obranu. Z bakterií uvolňovaný LPS se nejprve naváže na LPB (lipopolysacharide binding protein). LPB je produkován hepatocyty jako protein akutní fáze zánětu. Komplex LPS-LPB se specificky dále váže na povrchovou molekulu CD14, která se vyskytuje na povrchu monocytů a neutrofilů. Vazba LPS-LPB-CD14 vede k aktivaci fosfolipázy A2 a k aktivaci transkripce, která je následována produkcí prozánětlivých cytokinů jako je TNF $\alpha$  a IL-1 (Bednář et al. 1996, Krejsek a Kopecký 2004). Další PAMPs a jejich receptory jsou uvedeny v následující Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Molekulové vzory patogenních mikroorganismů a jejich buněčné receptory (Krejsek a Kopecký 2004).

<b>PAMP</b>	<b>Zdroj</b>	<b>PRR</b>
LPS	G- bakterie	LBP, CD14, TLR-4,
Peptidoglykan	G+, G- bakterie	CD14, TLR-2
Lipoproteiny	Bakterie	TLR-2
k. lipoteichová	G+ bakterie	TLR-2, TLR-4
Flagelin	G- bakterie	TLR-5
Lipoarabidomanan	Mykobakterie	TLR-2, CD1
CpG	Bakterie	TLR-9
N-formylmethionin peptidy	Bakterie	f-MetR 1,2
Manany, manoproteiny	Kvasinky	Manózový receptor MBP
Stresové proteiny	Prokaryota, eukaryota	?

Jedním z nejvýznamnějších PRRs je skupina receptorů, které byly prvně objeveny u drozofily. Tyto receptory nazýváme Toll-Like Receptors (TLR). TLR rozeznávají řadu chemických struktur charakteristických pro jednotlivé patogeny jako jsou lipopolysacharidy, lipoproteiny, nukleové kyseliny a další (viz. Tabulka 4). Pro TLR je charakteristická jejich extracelulární část, která je bohatá na přítomnost leucinu a váže jednotlivé PAMPs. Výsledkem vazby PAMPs na TLR je aktivace transkripčního faktoru, který stimuluje transkripci genů pro IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 a kostimulační molekuly CD 80 a CD86 (Hořejší a Bartůňková 2005, Krejsek a Kopecký 2004).

**Tabulka 4: Toll like receptory a jejich ligandy (Hořejší a Bartůňková 2005)**

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

## 1.6.2 Vrozená imunita a rakovina

Až do nedávné doby byla za účinnou složku protinádorové imunity považována specifická imunita a to především mechanismus ADCC. Vycházelo se totiž z předpokladu, že nádorové buňky nesou na svém povrchu nebo mají v nitrobuněčných strukturách přítomny nádorové antigeny, které rozpoznává specifická imunita jako cizí a indukují tak imunitní reakci (Krejsek a Kopecký 2004). Jak již bylo v této práci zmíněno, tak nádor má mechanismy, kterými dokáže tyto antigeny zamaskovat a unikne tak specifické imunitě.

Vrozená imunita by na nádory neměla vůbec reagovat, protože se na nich nenachází žádné PAMPs (buňky jsou organismu vlastní). Prof. Cui ale zjistil, že vrozená imunita dokáže zlikvidovat rakovinu a to i v pokročilém stádiu (Cui et al. 2003, Hicks et al. 2006). Jeho práce vychází z objevu dominantní mutace v jednom

genu u myši. Tuto mutaci objevil původně u myši BALB/c, ale dokázal ji přenést i na další myši - kmen BALB/c, C57BL/6, athymic C57BL/6<sup>foxn1/foxn1</sup> nude myši a další. Myši s touto mutací mají dvě zajímavé vlastnosti. První vlastností je spontánní regrese (SR) a druhou je kompletní rezistence (CR). Zmíněná mutace se tedy označuje SR/CR mutace. Myši, které jsou mladší než 4 měsíce, jsou kompletně rezistentní vůči transplantaci nádorů. U myši, jejichž stáří přesahuje 4 měsíce, dojde nejprve k rychlému nárůstu nádoru, poté se růst zastaví a dojde k jeho spontánnímu vymizení. Tato schopnost likvidace nádorů se může přenášet na jiné myši s nádory, kde opět dojde k úplnému vymizení nádoru. Efektu úplného vyléčení se dosáhne přenesením NK buněk, makrofágů nebo PMN (hlavně neutrofilů) z SR/CR myši (Hicks et al. 2006).

Práce prof. Cui ukazují na to, že když vrozená imunita nádory rozezná, má dostatek sil na to je zlikvidovat. K tomu však běžně nedochází. Předmětem našeho dalšího výzkumu bude tuto skutečnost obejít umělým navázáním PAMPs (LPS, N-formyl-methionin-leucin-phenylalanin-lysin (12x), bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*) na nádorové buňky. Co se týče vazebných principů, v případě LPS jsme se spolehli na jeho přirozenou schopnost integrovat se do membrán (Carr a Morrison 1984). Peptid obsahující 15 aminokyselin: N-formyl-methionin-leucin-phenylalanin-lysin (12x) měl díky dvanácti lysinům výrazný kladný náboj a spoléhali jsme tedy na jeho interakci se záporným nábojem nádorových buněk (Huang et al. 2010, Marquez et al. 2004). Nábojovou interakci jsme předpokládali i u *Stenotrophomonas maltophilia*. Tato bakterie je totiž jedinou bakterií s výrazně pozitivním povrchovým nábojem (pI je 11) a je schopna se na negativně nabitě povrchy velmi silně vázat (Jucker et al. 1996).

Dosavadní výzkum ukazuje, že i celková stimulace vrozené imunity pomocí nejrozličnějších PAMPs brzdí nádorový růst. Vzhledem k tomu, že chybí zacílení vrozené imunity na nádorové buňky, vede tento přístup jen k částečným a rozporuplným výsledkům (Chicoine et al. 2001, Mariani et al. 2007, Rhee et al. 2008).



## 2. Cíle práce

- Zavést myší metastázový model založený na *i.v.* aplikaci melanomových buněk
- Studovat možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymů. Optimalizace této metody
- Po ukončení této studie bylo se školitelem dohodnuto, že bude proveden orientační, především metodický průzkum nové oblasti, kterou je studium možnosti využití přirozené imunity pro cílený protinádorový útok. V rámci tohoto studia bude:
  - zaveden a optimalizován cytotoxický test pro studium vlivu neutrofilů na melanomové buňky
  - provedeny orientační experimenty *in vivo*

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1 Chemikálie**

V pokusech byly použity tyto chemikálie: **RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky** na přípravu buněk, **fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)** na přípravu buněk, proplachování, **RPMI 1640 bez séra** na přípravu buněk, **trypanová modř** na počítání buněk v Bürkerově komůrce, **bovinní trypsinogen** (11 300 BAEE jednotek/mg proteinu po aktivaci), **bovinní alfa-chymotrypsinogen A** (56 BTEE jednotek/mg lyofilizovaného preparátu po aktivaci), **alfa-amyláza z *Bacillus sp.*** (2050 maltózových U/mg proteinu). Všechny tyto chemikálie byly od firmy Sigma-Aldrich. Dále byl použit **4% formaldehyd** na konzervaci myších plic, **Difco Fluid Thioglycollate Medium** (Difco) (TGM) pro izolaci neutrofilů z myšího peritonea a další aplikace, **Lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*** (Sigma-Aldrich) (LPS), **Beta – 1,3 D Glucan** (BG) (ze *Sacharomyces cerevisiae*) (A.J. Lanigan) – dar od dodavatelské firmy Transfer Point, Columbia, South Carolina, USA, **N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)12** (FM) (syntetizovaný firmou Schafer-N), ***Stenotrophomonas maltophilia*** (Hugh 1980) Palleroni and Bradbury 1993 (kmen CCM 1640 z České sbírky mikroorganismů, Brno), **Alexa Fluor 700 Conjugated Anti-mouse Ly-6G (GR-1) Clone RBG-8C5** od firmy eBioscience na určení čistoty neutrofilů, **Neu - Rat anti Mouse Neutrophils: RPE** od firmy ABD Serotec na určení čistoty neutrofilů

#### **3.2 Experimentální zvířata**

Při pokusech byly používány myši inbredního kmene C57BL/6 od firmy Charles River Laboratories. Myši byly samičího pohlaví. Váha myší při dodání se pohybovala mezi 18-20g, stáří myší bylo 8 týdnů. Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích. Experimenty byly zahajovány nejdříve při dosažení imunologické zralosti, tj. když byly myši 10 týdnů staré.

### **3.3 Buněčná linie**

Při pokusech byla používána buněčná linie myšního melanomu B16-F10. Buňky byly darem od prof. Říhové, ÚMG Praha.

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

#### **3.3.1 Příprava buněk B16-F10 pro *in vivo* pokusy**

Z buněk bylo nejprve odstraněno médium. Buňky byly 3x propláchnuty sterilním PBS. Po propláchnutí (PBS) byla provedena trypsinizace (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Poté bylo přilito médium (RPMI 1640 s 10% FCS), ve kterém byly buňky rozvolněny protahováním Pasteurovou pipetou. Oddělené buňky byly dány do zkumavky, která byla doplněna pomocí RPMI 1640 s 10% FCS na objem 20 ml. Vše bylo centrifugováno (150g, 10 min.). Po centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra (asi v 2 ml) a to pomocí Pasteurovy pipety. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce pomocí trypanové modři a podle počtu byl buněčný roztok zředěn nebo naopak stočen na centrifuze (150g, 10 minut) a znovu naředěn na příslušnou potřebnou koncentraci.

#### **3.4 Transplantace melanomu B16-F10**

Myši byly nejprve oholeny na pravé zadní části zad. Poté bylo do oholeného místa *s.c.* (pod kůží) aplikováno 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

#### **3.5 Transplantace metastáz melanomu B16-F10**

Myši byly zafixovány tak aby se nehýbaly. Do ocasní žíly jim pak bylo injikováno 100 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 s 5% FCS.

### **3.6 Izolace neutrofilů**

#### **3.6.1 Příprava thioglykolátového média (TGM)**

TGM médium se užívá hlavně k izolaci neutrofilů z myšního peritonea, ale může být užito i pro izolaci makrofágů či k jinému účelu.

Na analytických vahách bylo naváženo 300 mg Difco Fluid Thioglycollate Medium. Navážka byla převedena do Erlenmayerovy baňky o objemu 50 ml a byla rozpuštěna v 10 ml deion. H<sub>2</sub>O. Vznikl 3 % roztok modré barvy. Roztok byl povařen v mikrovlnce po dobu 1 - 2 min. Po povaření roztok zrudověl a stal se homogenním. Roztok byl pak ihned zchlazen pod tekoucí vodou a přefiltrován přes 0,22 µm filtr do uzavíratelné nádoby (k médiu se nesmí dostat vzduch). Nádoba pak byla obalena alobalem (k médiu nesmí světlo). Takto obalená nádoba byla dána do lednice a ponechána tam přes noc. Do druhého dne se vytvořily dvě vrstvy (růžová nahoře, pod ní žlutá). Používá se žlutá vrstva.

#### **3.6.2 Aplikace TGM myším C57BL/6 a příprava neutrofilů.**

**2 ml 3% TGM média** bylo injikováno *i.p.* myši kmene C57BL/6. Médium se nechalo působit **4,5 – 5 hodin**. Po uplynutí inkubační doby byla myš vykrvena (lepší kvůli možné kontaminaci buněk) a poté byl proveden peritoneální výplach tj. 20 ml chlazeného PBS bylo postupně propláchnuto peritoneum. Získané buňky byly převedeny do zkumavky, která byla doplněna na 50 ml chlazeným PBS. Buňky byly stočeny na centrifuze při 250g, 20 minut, 4°C. Když byl pelet neohrazený, tak se opatrně odsál supernatant, přidalo se 50 ml PBS a byla znovu provedena centrifugace za stejných podmínek. Buňky (pelet) byly pak převedeny do 1 ml RPMI 1640 s 10% FCS (či PBS nebo RPMI 1640) a spočítány v Bürkerově komůrce pomocí trypanové modři.

### **3.7 Složení přípravků k léčbě**

Používaná proenzymová směs byla o následujícím složení: 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy na 1 ml fyziologického roztoku, sterilizované filtrací.

Složení a výroba thioglykolátového média užívaného k terapii je zmíněna v kapitole 3.6.1.

Složení používaného LPS bylo následující: 3 mg LPS rozpuštěno v 1 ml fyziologického roztoku, sterilizované filtrací. LPS bylo používáno při *i.t.* léčbě, aplikováno 0,1 ml.

Složení používaného BG (beta glukanu) bylo: 10 mg beta glukanu (sterilizován 20 min. ozářením UV) rozsuspendován v 1 ml sterilního fyziologického roztoku. BG byl používán k *i.t.* léčbě, aplikováno 0,1 ml.

Složení používané suspenze *Stenotrophomonas maltophilia*: Nejprve byl lyofilizát *S. maltophilia* rekonstituován ve sterilním PBS. Materiál by vyset na krevní agar (P-Lab, Česká republika) a kultivován přes noc při 37 °C. Sklizené kolonie byly zamrazeny v PBS (celkem 20 ml) při teplotě -70°C. Jeden ml suspenze obsahoval 17 milionů bakterií. Před prvním použitím byly bakterie zabity ozářením UV po dobu 1 h, poté byl zbytek suspenze opět zamražen a využíván dál k *i.t.* léčbě (aplikováno 50 mikrolitrů).

Příprava a složení sonikované suspenze *Stenotrophomonas maltophilia*: suspenze bakterií připravená z předchozího kroku (asi 5 ml) byla sonikována v sonikátoru HIELSCHER VP200S a to tím způsobem, že suspenze byla 10x 10 s ozvučována. Po každém ozvučení proběhlo 20 s chlazení. Kůli zahřívání probíhalo vše v ledové lázni. Po sonifikaci byla suspenze zamrazena a byla pak používána k *i.t.* léčbě (aplikováno 50 mikrolitrů).

Příprava roztoku N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>: 8 mg N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub> bylo rozpuštěno v 1 ml sterilního PBS, poté byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm filtr a zamražen. Roztok byl používán k *i.t.* léčbě (aplikováno 50 mikrolitrů).

### **3.8 Počítání metastáz**

Všechny plíce byly prohlédnuty pod binolupou po nějaké době po zakonzervování a byla spočítána metastatická ložiska. Na plicích se jeví jako černé tečky (Větvička et al. 2007).

### **3.9 Měření velikosti nádorů a statistické zpracování dat**

V pokusech, kde byl sledován růst a objem nádorů, byly nádory minimálně dvakrát týdně měřeny. Měření probíhalo metodou podle Inaba (Inaba et al. 1986), měřícím zařízením byl kaliper.

Poté byl pro výpočet objemu nádoru použit vzorec  $V = \pi/6 AB^2$ , kde A je největší rozměr nádoru a B je nejmenší rozměr nádoru.

Statistické vyhodnocení dat pak bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel.

### **3.10 Pokus č. 1 – metastázový model melanomu B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií (i.m. aplikace)**

V tomto pokusu bylo použito 40 samic myši kmene C57BL/6, které byly 10 týdnů staré. Myši byly rozděleny do 4 skupin (A, B, C, D). U všech skupin byl simulován proces metastázování (Teicher 2002). V každé skupině bylo 10 myší.

Při transplantaci metastáz bylo použito 100 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 s 5% FCS (viz. kapitola 3.5). Tato dávka byla aplikována *i.v.* každé myši ve skupině A, B, C, D do laterální ocasní žíly pomocí tuberkulinové stříkačky s jehlou 30G.

Skupina A byla kontrolní a nebyla léčena. Myši ve skupině B, C a D byly léčeny směsí proenzymů (trypsinogen, chymotrypsinogen a amyláza). Byla jim podávána denně dávka 0,1ml směsi *i.m.* (do svaloviny levé zadní nohy). Léčba myší ve skupině B, C, D probíhala v různých schématech:

Skupina B – proenzymy se začaly podávat dva dny před transplantací metastáz melanomu B16-F10

Skupina C – proenzymy se začaly podávat bezprostředně po transplantaci metastáz melanomu B16-F10 (den 0)

Skupina D – proenzymy se začaly podávat 7 den po transplantaci metastáz melanomu B16- F10

Po 24 dnech od transplantace melanomu byly myši zabity. Poté byly myším vyjmuty plíce, které byly zakonzervovány 4% roztokem formaldehydu do doby počítání metastáz.

### **3.11 Pokus č. 2 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a ovlivnění metastáz pomocí proenzymoterapie (i.m. aplikace)**

V tomto pokusu bylo použito 59 samic myši kmene C57BL/6, které byly 10 týdnů staré. Myši byly oholeny na pravé zadní části zad. Poté bylo vytvořeno 6 skupin (A až F).

Skupina A byla kontrolní skupina pouze s transplantovanými nádory (bez léčby). Na začátku pokusu bylo ve skupině A až E 10 myší ve skupině F jen 9 myší. Skupiny B-F byly skupiny léčené.

Při transplantaci nádoru bylo použito 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na jednu myš. Buňky byly aplikovány do oholeného místa *s.c.* (pod kůži).

Myši ve skupině B až F byly léčeny směsí proenzymů (trypsinogen, chymotrypsinogen a amyláza). Skupinám B až E byla podávána denně dávka 0,1ml směsi *i.m.* (do svaloviny levé zadní nohy). Skupině F byla podávána denně dávka 0,1 ml směsi *i.p.* (do peritoneální dutiny). Léčba myší ve skupině B až F probíhala v různých schématech, viz. níže. Celkové uspořádání pokusu bylo tedy následující:

Skupina A (10) – neléčená kontrola

Skupina B (10) - proenzymy se začaly podávat *i.m.* dva dny před transplantací melanomu B16-F10

Skupina C (10) - proenzymy se začaly podávat *i.m.* 1 hodinu po transplantaci melanomu B16-F10 (den 0)

Skupina D (10) - proenzymy se začaly podávat *i.m.* 7 den po transplantaci melanomu B16-F10

Skupina E (10) – proenzymy se začaly podávat *i.m.* 14 den po transplantaci melanomu B16-F10

Skupina F (9) – proenzymy se začaly podávat *i.p.* 1 hodinu po transplantaci melanomu B16-F10

Všem skupinám byly měřeny nádory v intervalu po 3 dnech. První měření proběhlo 11 den po transplantaci nádoru a poslední měření proběhlo 3 dny po ukončení léčby.

Myši byly zabity v poslední den měření nádoru (tj. 21 den po transplantaci). Poté jim byly vypitvány plíce, které byly zakonzervovány 4% roztokem formaldehydu do doby počítání metastáz.

### **3.12 Pokus č. 3 – Přirozeně metastázuující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií aplikovanou *i.m.* a *i.p.***

V tomto pokusu bylo použito 60 samic myši kmene C57BL/6, které byly 15 týdnů staré. Myši byly oholeny na pravé zadní části zad.

Při transplantaci nádoru bylo použito 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na jednu myš. Buňky byly aplikovány do oholeného místa *s.c.* (pod kůží).

11 den po transplantaci melanomu B16-F10 byly myši rozděleny do tří skupin (A až C). Na začátku pokusu bylo ve skupině A, B, C po 20 myších. Skupina A byla kontrolní skupina pouze s transplantovanými nádory (bez léčby).

Skupiny B a C byly léčené směsí proenzymů (chymotrypsinogen, trypsinogen a amyláza). Skupině B byla podávána denně dávka 0,1ml směsi *i.m.* (do svaloviny levé zadní nohy). Skupině C byla podávána denně dávka 0,1 ml směsi *i.p.* (do peritoneální dutiny). Léčba začala 11 den po transplantaci melanomu B16-F10.

Všem skupinám byly měřeny nádory v intervalu po 4 dnech. První měření proběhlo 11 den od transplantace nádoru.

Myši byly zabity v poslední den měření nádoru (tj. 33 den po transplantaci). Poté jim byly vypitvány plíce, které byly zakonzervovány 4% roztokem formaldehydu do doby počítání metastáz.

### **3.13 Pokus č. 4 - Přirozeně metastázuující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí LPS, TGM a BG podávaných *i.t.***

V tomto pokusu bylo použito 7 samic myši kmene C57BL/6. Myši byly oholeny na pravé zadní části zad.

Při transplantaci nádoru bylo použito 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na jednu myš. Buňky byly aplikovány do oholeného místa *s.c.* (pod kůží).

Po 15 dnech od transplantace nádoru byly myši rozděleny jednotlivě a označeny do skupin (Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb a IV).

Léčba myši ve skupinách začala 15 den po transplantaci melanomu B16-F10. Všechny používané látky byly podávány *i.t.* (intratumorálně). K léčbě bylo používáno



TGM médium, jehož výroba je uvedena v kapitole 3.6.1., roztok LPS a suspenze BG (složení je uvedeno výše – kapitola 3.7.). Schéma dávek a doby aplikace je:

myš Ia – aplikovalo se *i.t.* 0,1 ml thioglykolátového média, které bylo podáváno obden

myš Ib - aplikovalo se *i.t.* 0,1 ml thioglykolátového média, které bylo podáváno obden

myš IIa - aplikovalo se *i.t.* 0,1 ml roztoku LPS, který byl podáván obden

myš IIb - aplikovalo se *i.t.* 0,1 ml roztoku LPS, který byl podáván obden

myš IIIa – aplikovalo se *i.t.* 0,1 ml suspenze BG, který byl podáván obden

myš IIIb - aplikovalo se *i.t.* 0,1 ml suspenze BG, který byl podáván obden

myš IV – první den léčby se *i.t.* aplikovalo 0,1 ml roztoku LPS, poté za 2 hodiny bylo aplikováno *i.t.* 0,1 ml thioglykolátového média, které se poté užívalo obden

Kontrolní skupina – jako kontrolní neléčená skupina byla použita skupina A myši z pokusu č. 3, neboť experiment probíhal synchronně za identických podmínek.

Po proběhnutí pokusu byly myši zabity, plíce vypitvány a zakonzervovány do 4% roztoku formaldehydu do doby počítání metastáz.

### **3.14 Pokus č. 5 – Přirozeně metastázuující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí PAMPs – mrtvé bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, sonikované bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* a N-formyl-Met-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>, vše *i.t* aplikace**

V tomto pokusu bylo použito 40 samic myši kmene C57BL/6, které byly 10 týdnů staré. Myši byly oholeny na pravé zadní části zad.

Při transplantaci nádoru bylo použito 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na jednu myš. Buňky byly aplikovány do oholeného místa *s.c.* (pod kůží).

13 den po transplantaci melanomu B16-F10 byly myši rozděleny do čtyř skupin (A až C a K). Myši byly chovány jednotlivě, v každé skupině bylo 8 myši. U osmi myši nedošlo k tomuto dni k vyvinutí nádorů, nebyly proto do experimentu zařazeny. Skupina K byla kontrolní neléčená, ostatní skupiny byly léčené.

Léčba myši ve skupinách začala 13 den po transplantaci melanomu B16-F10. Všechny používané látky byly podávány *i.t.* (intratumorálně). K léčbě byla používaná suspenze *Stenotrophomonas maltophilia* (umrtvené pomocí UV záření), sonikovaná

suspenze *Stenotrophomonas maltophilia* a roztok N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub> (složení je uvedeno výše – kapitola 3.7). Schéma dávek a doby aplikace je:

Skupina A (8) – každý třetí den se aplikovalo i.t. 0,05 ml suspenze

*Stenotrophomonas maltophilia*

Skupina B (8) - každý třetí den se aplikovalo i.t. 0,05 ml sonikované suspenze

*Stenotrophomonas maltophilia*

Skupina C (8) - každý třetí den se aplikovalo i.t. 0,05 ml roztoku N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>

Skupina K (8) – kontrolní, neléčená – každý třetí den se aplikovalo i.t. 0,05 ml sterilního PBS

Všem skupinám byly měřeny nádory v intervalu po 3 dnech. První měření proběhlo 13 den od transplantace nádoru.

V den posledního měření nádoru, byly myši zabity. Poté jim byly vypitvány plíce, které byly zakonzervovány 4% roztokem formaldehydu do doby počítání metastáz.

### **3.15 Pokus č. 6 – cytotoxický test**

#### **3.15.1 Optimalizace cytotoxického testu, vytvoření kalibrační křivky**

Byl použit standardní kit LIVE/DEAD Cell-Mediated Cytotoxicity Kit od firmy Molecular Probes, který jsme optimalizovali pro naše experimentální podmínky.

Pro získání absolutních počtů melanomových buněk B16-F10 byla sestrojena kalibrační křivka.

Veškerá měření byla prováděna na průtokovém cytometru BD FACS CANTO II.

#### **3.15.2 Ověření čistoty neutrofilů pomocí BD FACS CANTO II**

Čistota izolovaných neutrofilů byla ověřována na průtokovém cytometru BD FACS CANTO II.

Po provedené izolaci neutrofilů bylo zjišťováno pomocí specifických protilátek, kolik daný peritoneální výplach obsahoval neutrofilů. Byly použity dvě protilátky a to GR1 (Alexa Fluor 700 Conjugated Anti-mouse Ly-6G (GR-1) Clone RBG-8C5 od

firmy eBioscience) a NEU (Neu - Rat anti Mouse Neutrophils: RPE od firmy ABD Serotec).

Do dvou zkumavek bylo napipetováno 45  $\mu$ l buněčné suspenze, která byla připravená podle kapitoly 3.6.2. K suspenzi bylo přidáno 5  $\mu$ l krysího séra (dojde k blokaci Fc receptoru cílových buněk). Poté bylo přidáno do jedné zkumavky 5  $\mu$ l NEU a do druhé 1  $\mu$ l GR1. Vše bylo opatrně několik vteřin vortexováno. Zkumavky byly pak inkubovány ve tmě po dobu 15 – 30 minut. Po inkubaci byly přidány do každé zkumavky 3 ml chlazeného PBS s 2% FCS. Poté byla provedena centrifugace při 250g po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl ze zkumavek opatrně odstraněn supernatant a pelet byl rozsuspendován v 0,5 ml PBS s 2% FCS. Vzorky byly poté změřeny na průtokovém cytometru a výsledek byl zaznamenán.

### **3.15.3 Cytotoxický test s melanomovými buňkami s navázaným LPS a FM**

Nejprve byly připraveny neutrofilů podle kapitoly 3.6 (izolace neutrofilů). Jejich čistota byla ověřena postupem z kapitoly 3.15.2. Poté byly připraveny nádorové buňky (melanom B16-F10) a to čisté a s navázaným LPS respektive FM (formyl-methionin-Leu\_Phe-(Lys)<sub>12</sub>). Příprava probíhala tak, že nejprve byly buňky B16-F10 trypsinizovány (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Poté bylo přilito médium (RPMI 1640 s 10% FCS), ve kterém byly buňky rozvolněny. Oddělené buňky byly centrifugovány (150g, 10 min.). Po centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra a spočítány v Bürkerově komůrce s kontrolou životnosti pomocí trypanové modři. Byly připraveny 3 zkumavky (zk. 1, zk. 2, zk. 3). V každé bylo 5 mil. buněk B16-F10, které byly doplněny na objem 2 ml pomocí RPMI 1640. Poté bylo do jednotlivých zkumavek přidáno:

Zk. 1 (kontrola) - 2 ml sterilního RPMI

Zk. 2 - 2 ml LPS ve sterilním RPMI 1640 (koncentrace byla 1 mg LPS/ml)

Zk. 3 - 2 ml F-Met-Leu-Phe (Lys)<sub>12</sub> ve sterilním RPMI 1640 (koncentrace 1 mg FM/ml)

Poté bylo vše inkubováno 60 minut při 37°C (vždy po 10 min. byly zkumavky jemně promíchány). Pak byly buňky 4x centrifugačně promyty (150g, 10 min.) vždy velkým množstvím RPMI 1640 bez séra (40 ml). Po centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v 1 ml RPMI s 10 % FCS.

Část takto připravených nádorových buněk byla obarvena barvou DiOC<sub>18</sub> a část byla nechána čistých. Barvení barvou DiOC<sub>18</sub> probíhalo jako v předchozí kapitole. Schéma 24 jamkového panelu, do kterého byly buňky napipetovány, vidíme v Tabulce 5. K takto připraveným buňkám byly přidávány buď buňky efektorové (neutrofilů) nebo připravené buňky zůstaly v jamce samotné. Počet jednotlivých buněk a jejich kombinaci vidíme v Tabulce 6.

**Tabulka 5 :** Rozvržení na 24 jamkovém panelu – nádorové buňky (v závorce jsou uvedeny počty buněk na jamku; T – neznačené nádorové buňky, TD – nádorové buňky + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub>, LPS – nádorové buňky s navázaným LPS, LPSD – nádorové buňky s navázaným LPS + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub>, FM – nádorové buňky s navázaným F-Met-Leu-Phe (Lys)12, FMD – nádorové buňky s navázaným F-Met-Leu-Phe (Lys)12 + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub>)

T (100 000)	T (100 000)		
TD (100 000)	TD (100 000)	TD(100 000)	TD (100 000)
LPS (100 000)	LPS (100 000)	LPSD (100 000)	LPSD (100 000)
FM (100 000)	FM (100 000)	FMD (100 000)	FMD (100 000)
LPSD (100 000)	LPSD (100 000)	FMD (100 000)	FMD (100 000)

**Tabulka 6 :** Rozvržení na 24 jamkovém panelu – nádorové buňky + efektorů (v závorce jsou uvedeny počty buněk na jamku; T – neznačené nádorové buňky, N – nebarvené neutrofilů, TD – nádorové buňky + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub>, LPS – nádorové buňky s navázaným LPS, LPSD – nádorové buňky s navázaným LPS + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub>, FM – nádorové buňky s navázaným F-Met-Leu-Phe (Lys)12, FMD – F-Met-Leu-Phe (Lys)12 + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub>)

T (100 000)	T (100 000)	N (1 000 000)	N (1 000 000)
TD (100 000)	TD (100 000)	TD(100 000) + N (1 000 000)	TD (100 000)+ N (1 000 000)
LPS (100 000)	LPS (100 000)	LPSD (100 000)	LPSD (100 000)
FM (100 000)	FM (100 000)	FMD (100 000)	FMD (100 000)
LPSD (100 000) + N (1 000 000)	LPSD (100 000) + N (1 000 000)	FMD (100 000) + N (1 000 000)	FMD (100 000) + N (1 000 000)

Každá jamka pak byla doplněna do objemu 1,5 ml pomocí RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptioethanolem a antibiotiky. Destička pak byla dána do termostatu o 37°C a atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého. Za těchto podmínek se nechala inkubovat 24 hodin.

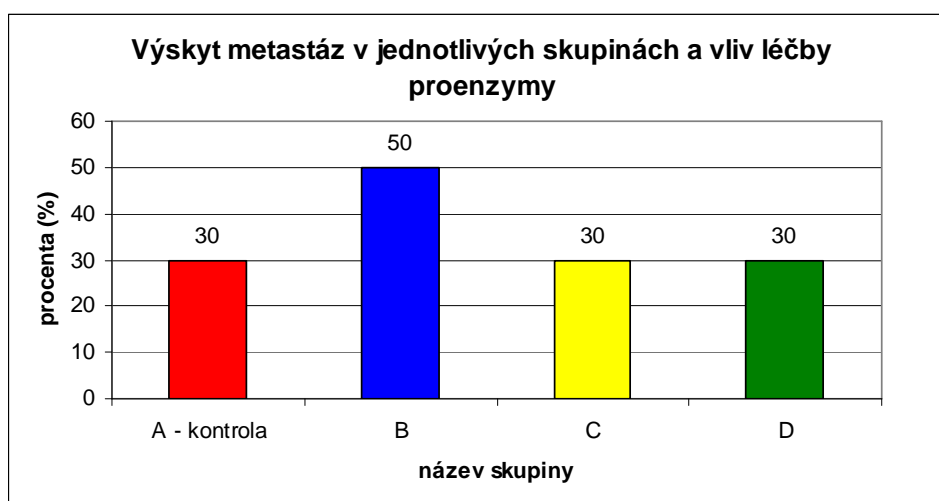
Po 24 hodinové inkubaci bylo postupováno jako v předchozí kapitole (3.15.3) a to včetně barvení PI. Připravené vzorky byly poté změřeny na průtokovém cytometru BD FACS CANTO II za největšího průtoku a doby 60 vteřin. Výsledky byly zaznamenány včetně počtu buněk.

## 4. Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1 – metastázový model melanomu B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií (*i.m.* aplikace)

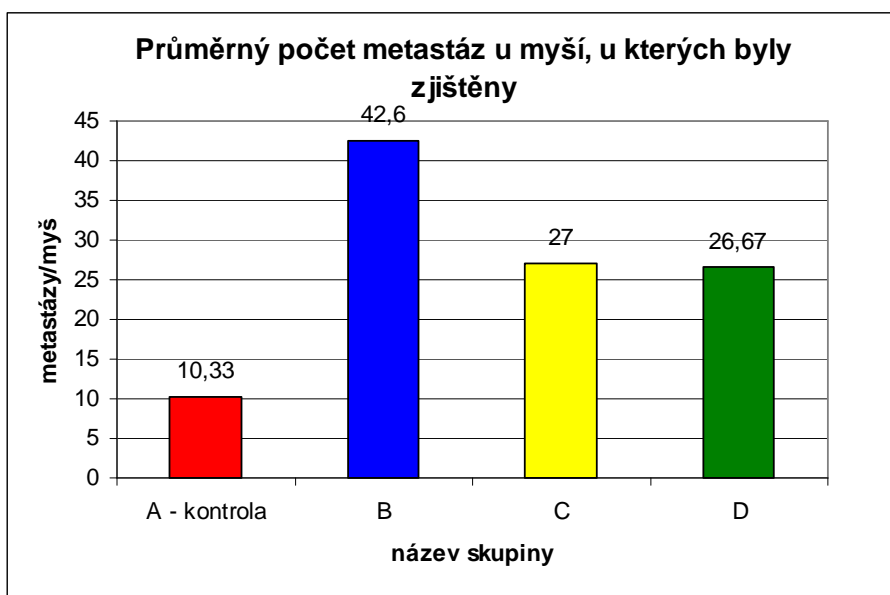
V tomto pokusu jsme se snažili o vytvoření metastatického modelu myšního melanomu B16-F10 a sledovali jsme jeho ovlivnění proenzymoterapií, která byla podávána *i.m.* Schéma pokusu je popsáno v kapitole 3.8.

Na Obrázku 4 vidíme, že ve skupinách A C, a D byl 30% výskyt metastáz. Ve skupině B byl výskyt metastáz 50%. U této skupiny byla léčba zahjena 2 dny před transplantací metastáz.



**Obr. 4:** Vliv proenzymoterapie na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách (A - kontrola, B - léčba proenzymy započatá 2 dny před transplantací metastáz, C - léčba proenzymy započatá v den transplantace metastáz, D – léčba proenzymy započatá 7 dní po transplantaci metastáz)

Na dalším obrázku (Obr. 5) vidíme vliv proenzymoterapie na průměrný počet výskytu metastáz u myší, u kterých byly prokázány. V kontrolní skupině (skupina A) je průměr metastáz na myš 10,33%, což je nejmíň ze všech sledovaných skupin. Ve skupinách léčených proenzymy můžeme vidět, že průměrný počet metastáz na myš je ve skupině C a D zhruba 2,6x větší než v kontrolní skupině a ve skupině B je průměrný počet 4,1x větší než u kontrolní skupiny.



**Obr. 5:** Vliv proenzymoterapie na průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly zjištěny (A - kontrola, B - léčba proenzymy započatá 2 dny před transplantací metastáz, C - léčba proenzymy započatá v den transplantace metastáz, D - léčba proenzymy započatá 7 dní po transplantaci metastáz)

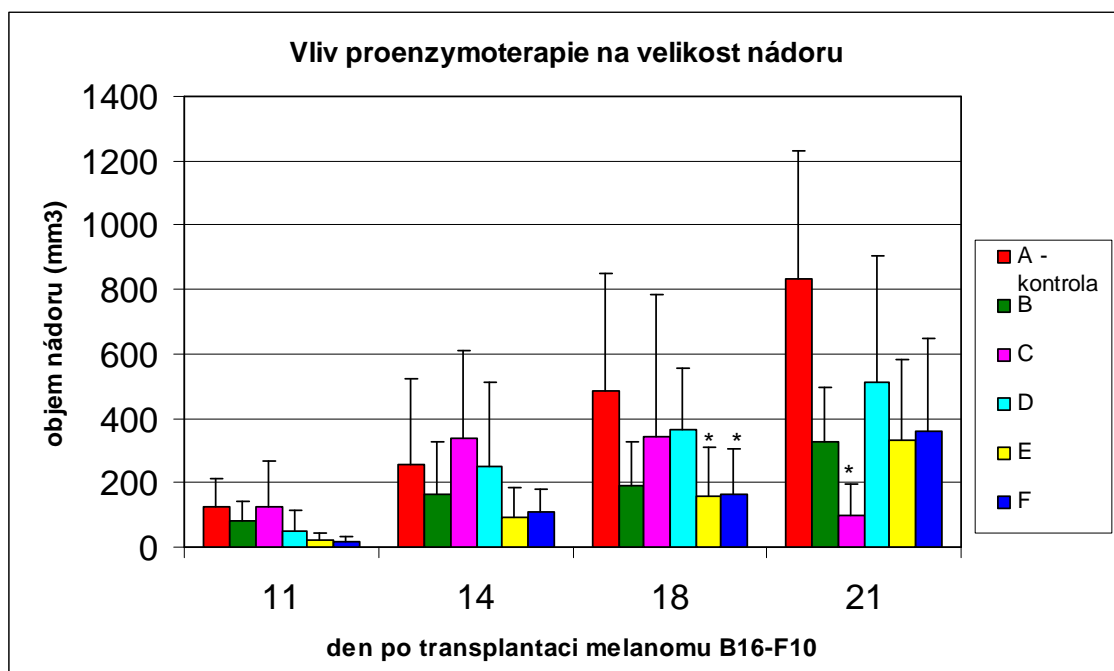
Můžeme tedy konstatovat, že proenzymoterapie v tomto modelu výskyt a četnost metastáz buď neovlivňovala anebo její vliv byl podpůrný, nikoli terapeutický.

#### **4.2 Pokus č. 2 – Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a ovlivnění metastáz pomocí proenzymoterapie (i.m. aplikace)**

V tomto pokusu jsme se zabývali přirozeně metastazujícím melanomem B16-F10 a vlivem proenzymoterapie podávané *i.m.* (skupina B až E) a *i.p.* (skupina F) na velikost transplantovaného nádoru a na počet metastáz.

Na Obrázku 6 vidíme, že ve skupině A (kontrolní skupina), velikost nádoru s dobou výrazně rostla. Tato skupina nebyla léčena. V léčených skupinách vidíme, že léčba proenzymoterapií snižuje růst nádoru a to v některých skupinách statisticky významně. 11 den po transplantaci nádoru vidíme, že u skupiny B, D, F došlo ke zmenšení velikosti nádoru. Velikost nádoru u skupiny C je srovnatelná s kontrolou. 14 den po transplantaci nádoru vidíme zlepšení už jen u skupiny B, F. Další dny již pozorujeme zlepšení u všech skupin, přičemž nejmenší objem nádorů v průběhu terapie měly skupiny E a F a viditelného zlepšení dosáhla skupina C 21. den od transplantace nádoru. 18. a 21. den od transplantace nádoru došlo k dosažení statistické

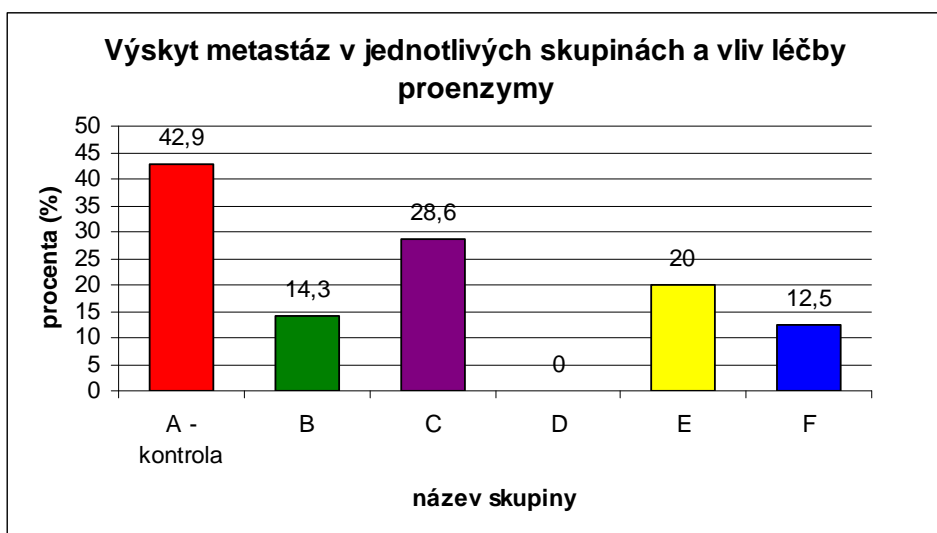
významnosti ( $P < 0,05$ ) rozdílů velikosti mezi skupinou E a kontrolou, F a kontrolou a C a kontrolou, jak je vidět na Obrázku 6.



**Obr 6:** Vliv proenzymoterapie na velikost nádoru (skupina A – kontrola, B - léčba proenzymy podávanými i.m. započatá 2 dny před transplantací nádoru, C - léčba proenzymy podávanými i.m. započatá v den transplantace nádoru, D – léčba proenzymy podávanými i.m. započatá 7 dní po transplantaci nádoru, E – léčba proenzymy podávanými i.m. započatá 14 dní po transplantaci nádoru, F léčba proenzymy podávanými i.p. započatá v den transplantace nádoru)

\* =  $P \leq 0,05$

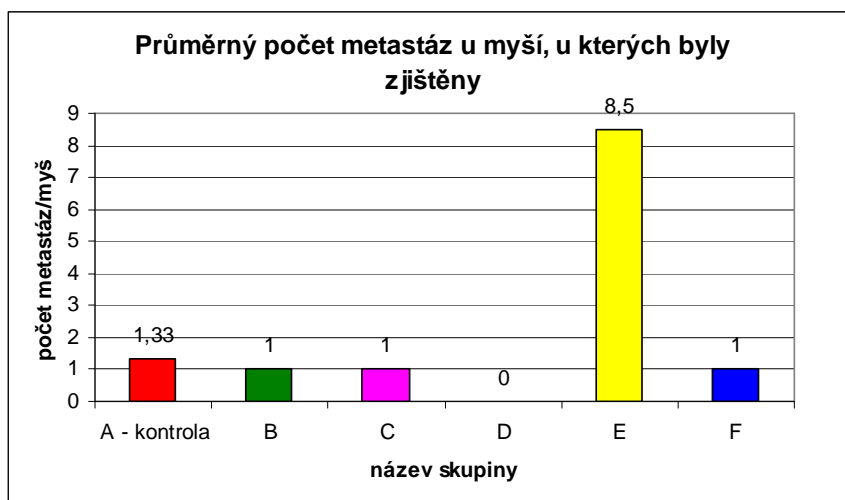
Na Obrázku 7 vidíme, že výskyt metastáz v jednotlivých skupinách je menší než v kontrole. Ve skupině D si můžeme všimnout nulového výskytu metastáz. Mohly bychom tedy říct, že proenzymoterapie na výskyt metastáz v tomto pokusu se zdá být účinná.



**Obr. 7:** Vliv proenzymoterapie na výskyt metastáz (skupina A – kontrola, B - léčba proenzymy podávanými i.m. započatá 2 dny před transplantací nádoru, C - léčba proenzymy podávanými i.m. započatá v den transplantace nádoru, D – léčba proenzymy podávanými i.m. započatá 7 dní po transplantaci nádoru, E – léčba proenzymy podávanými i.m. započatá 14 dní po transplantaci nádoru, F léčba proenzymy podávanými i.p. započatá v den transplantace nádoru)

Na Obrázku 8 vidíme vliv proenzymoterapie na průměrný počet výskytu metastáz u myší, u kterých byly prokázány. U kontroly je průměrný počet metastáz 1,33 na myš. U ostatních skupin je tento počet menší mimo skupiny E. U této skupiny vidíme největší průměrný počet metastáz na myš a to 8,5. Z toho můžeme vyvozovat, že u skupiny E ač proenzymy zmenšují výskyt metastáz (viz. předchozí Obr. 7), tak nezmenšují jejich počet. U skupiny D opět můžeme všimnout nulové hodnoty.



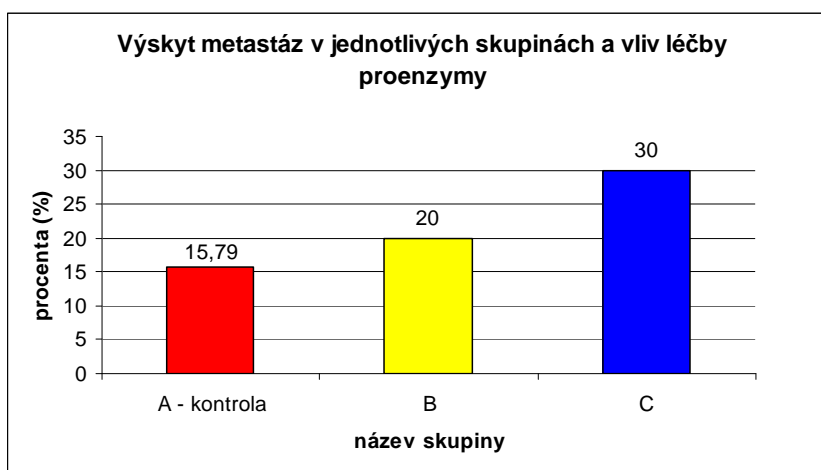


**Obr. 8:** Vliv proenzymoterapie na průměrný počet metastáz na myš, u které byly prokázány (skupina A – kontrola, B - léčba proenzymy podávanými *i.m.* započatá 2 dny před transplantací nádoru, C - léčba proenzymy podávanými *i.m.* započatá v den transplantace nádoru, D – léčba proenzymy podávanými *i.m.* započatá 7 dní po transplantaci nádoru, E – léčba proenzymy podávanými *i.m.* započatá 14 dní po transplantaci nádoru, F léčba proenzymy podávanými *i.p.* započatá v den transplantace nádoru)

#### **4.3 Pokus č. 3 – Přirozeně metastázuující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění proenzymoterapií aplikovanou *i.m.* a *i.p.***

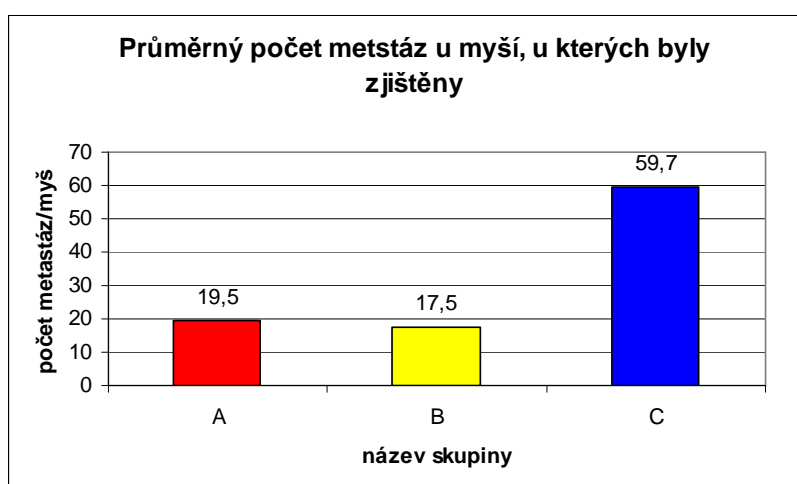
V tomto pokusu jsme se s použitím větších souborů zvířat zabývali přirozeně metastazujícím melanomem B16-F10 a vlivem proenzymoterapie podávané *i.m.* (skupina B) a *i.p.* (skupina C) na velikost transplantovaného nádoru a na počet metastáz. Vliv této terapie na velikost nádoru je rozpracován v práci Maršíkové (*in prep.*) a vliv terapie na výskyt metastáz je uveden v této práci. Schéma pokusu je uvedeno v kapitole 3.12.

Na Obrázku 9 vidíme, že výskyt metastáz je v jednotlivých skupinách větší než v kontrole (skupina A). Ve skupině B je 20% metastáz a ve skupině C je 30% metastáz. Přestože, jak je uvedeno v práci Maršíkové (*in prep.*) *i.m.* a zejména *i.p.* aplikace proenzymů velmi významně zmenšuje růst primárních nádorů, proces metastázování inhibován není.



**Obr. 9:** Vliv proenzymoterapie podávané i.m. a i.p. na výskyt metastáz (A- kontrola, B- léčba proenzymy i.m., C- léčba proenzymy i.p.)

Na Obrázku 10 vidíme, že průměrný počet metastáz na myš, u kterých byly prokázány, je v kontrole 19,5. Ve skupině B je počet metastáz 0,9x menší než v kontrole a u skupiny C je počet metastáz 3,1x větší než v kontrole.



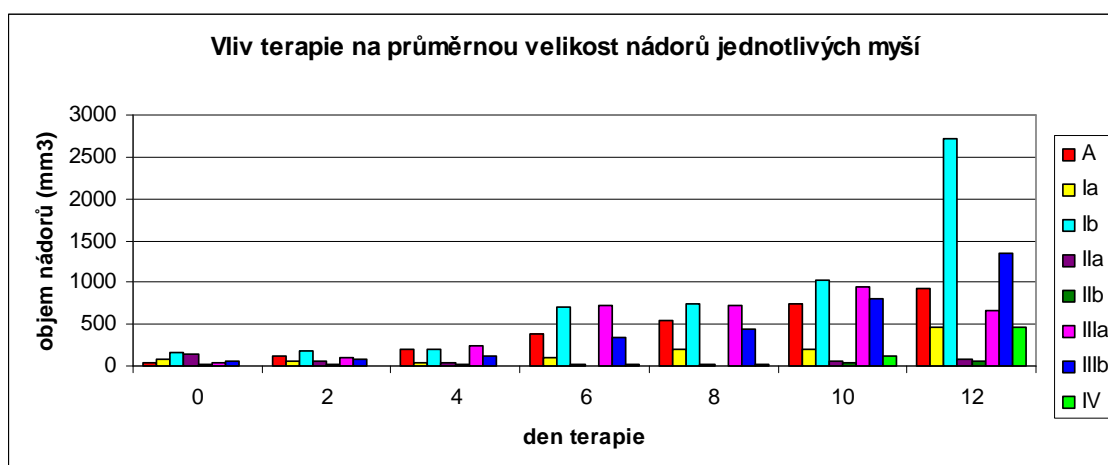
**Obr. 10:** Vliv proenzymoterapie podávané i.m. a i.p. na průměrný počet metastáz na myš, u které byly prokázány (A- kontrola, B- léčba proenzymy i.m., C- léčba proenzymy i.p.)

Závěrem můžeme říci, že ve skupině C (léčena proenzymy i.p.) je největší výskyt metastáz a největší počet metastáz na myš, u které byly metastázy prokázány. Takto podávané proenzymy v tomto pokusu nemají na léčbu metastáz vliv, spíše bychom mohli říct, že výskyt a počet metastáz urychlují. Proenzymy podávané i.m. v tomto pokusu nemají vliv na výskyt metastáz, ale mají nepatrný vliv na jejich počet.

#### **4.4 Pokus č. 4 Přirozeně metastázující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí LPS, TGM a BG podávaných i.t.**

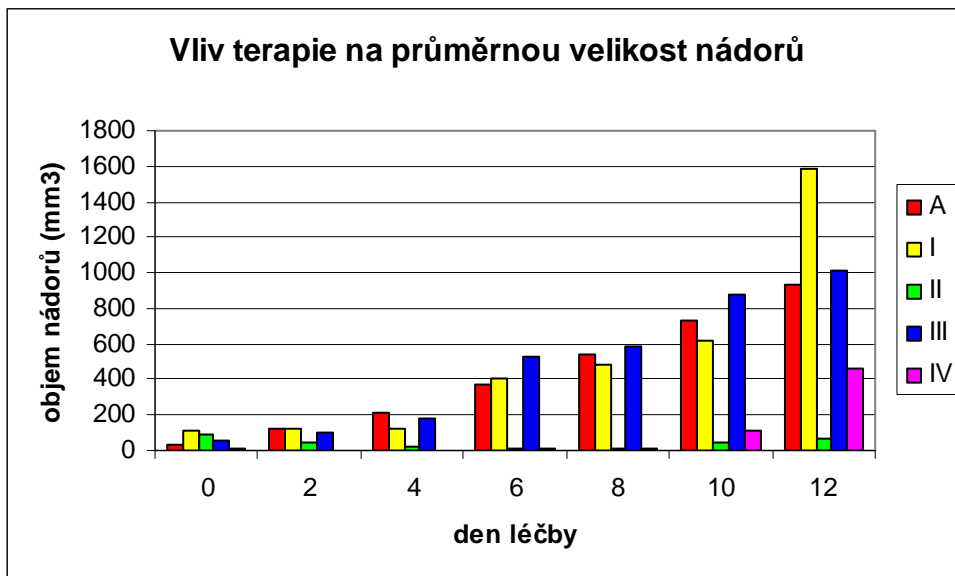
V tomto pokusu jsme se zabývali přirozeně metastázujícím melanomem B16-F10 a jeho ovlivněním pomocí LPS, TGM a BG, podávaných *i.t.* Schéma pokusu je uvedeno v kapitole 3.13.

Na Obrázku 11 vidíme vliv terapie na velikost nádorů jednotlivých myší. Můžeme si všimnout, že léčba zabrala nejméně na myš Ib (léčena TGM) a naopak nejvíce zabrala léčba myší IIa a IIb (léčeny jen LPS). U těchto myší pod vlivem LPS došlo dokonce k rapidnímu zmenšení velikosti nádorů, což jsme nikdy u žádné dosud testované terapie velmi agresivního a rychle rostoucího melanomu nepozorovali. Dál si také můžeme také všimnout, že stejná léčba může zabrat u dvou myší různě. Důkazem je toho myš Ib a Ia.



**Obr. 11:** Vliv terapie na velikost nádorů jednotlivých myší (A – kontrola, myši Ia a Ib – léčba TGM, myši IIa a IIb – léčba LPS, myši IIIa a IIIb – léčba BG, myš IV – podání jednorázově LPS a pak léčba TGM)

Na Obrázku 12 vidíme, jaký má vliv námi používaná terapie na průměrnou velikost nádorů. Nejlepší vliv má na skupinu II (léčena LPS) a IV (jednorázová aplikace LPS, pak léčena TGM). Nejhuř dopadla skupina I (léčena TGM) a hned za ní je skupina III (léčena BG).



**Obr. 12:** Vliv terapie na průměrnou velikost nádorů (A – kontrola, skupina I – léčba TGM, skupina II – léčba LPS, skupina III – léčba BG, skupina IV – podání jednorázově LPS a pak léčba TGM)

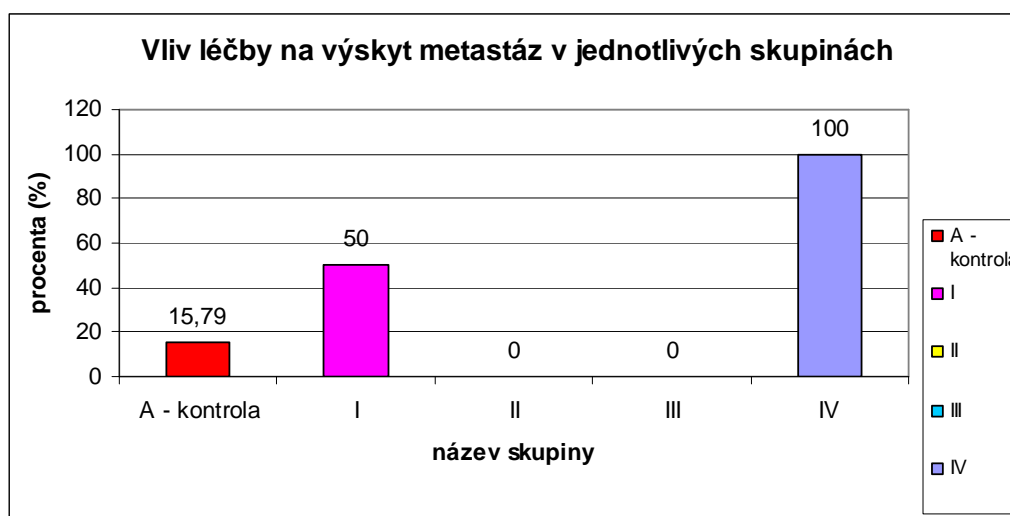
Na Obrázku 13 vidíme, jaký vliv měla terapie na počet metastáz u myší, u kterých došlo k jejich vzniku. Největší počet metastáz vidíme u kontroly (19,5), dále pak u myši Ib (18) a pak u myši IV (2). U ostatních myší se metastázy neprokázaly.



**Obr. 13:** Vliv terapie na počet metastáz u jednotlivých myší (A – kontrola, myši Ia a Ib – léčba TGM, myši IIA a IIB – léčba LPS, myši IIIa a IIIb – léčba BG, myš IV – podání jednorázově LPS a pak léčba TGM)

Na Obrázku 14 vidíme, jaký vliv měla terapie na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách. Největší výskyt metastáz byl ve skupině IV (100%), pak ve skupině I (50%) a v kontrole (15,8%). V dalších skupinách se metastázy nevyskytly.

Je zřejmé, že výskyt metastáz se způsobem terapie a jeho účinností souvisí, vzhledem však k tomu, že studie byla především zaměřena metodicky a jako pilotní průzkum možností použití PAMPs, nelze tyto výsledky získané na velmi malých skupinách, které jsou srovnávané s neúměrně velkou kontrolní skupinou, přeceňovat a je třeba se k takto zaměřeným experimentům vrátit.

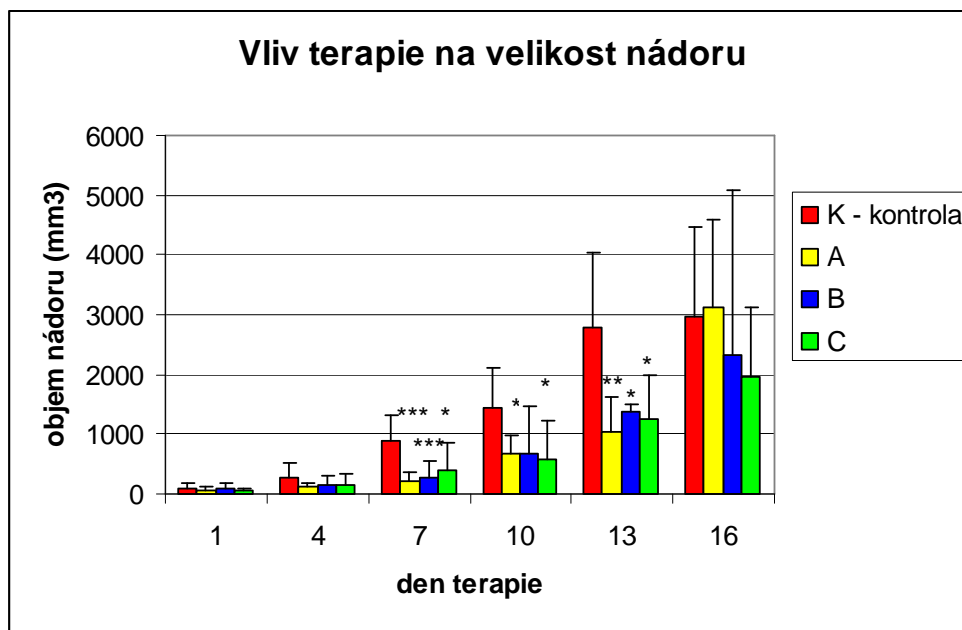


**Obr. 14:** Vliv terapie na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách (A – kontrola, skupina I – léčba TGM, skupina II – léčba LPS, skupina III – léčba BG, skupina IV – podání jednorázově LPS a pak léčba TGM)

#### **4.5 Pokus č. 5 – Přirozeně metastázující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění pomocí PAMPs – mrtvé bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, sonikované bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* a N-formyl-Met-Leu-Phe-(Lys)12, vše *i.t* aplikace**

V tomto pokusu jsme se zabývali přirozeně metastazujícím melanomem B16-F10 a jeho ovlivněním pomocí PAMPs podávaných *i.t*. Jako PAMPs byly používány usmrcené a sonikované bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* (jako jediné mají výrazný kladný náboj) a N-formyl-methionin-leucin-phenylalanin- lysin (12x). N-formyl-methionin je první aminokyselina, kterou začíná proteosyntéza u prokaryontních organismů, stimuluje chemotaxi a fagocytozu. Přípravu a složení těchto látek najdeme v kapitole 3.7. Schéma pokusu je uvedeno v kapitole 3.14.

Z Obrázku 15 vyplývá, že všechny tři preparáty vykazovaly vysokou statisticky významnou účinnost v období mezi sedmým a třináctým dnem terapie. Později se účinnost zmenšila.



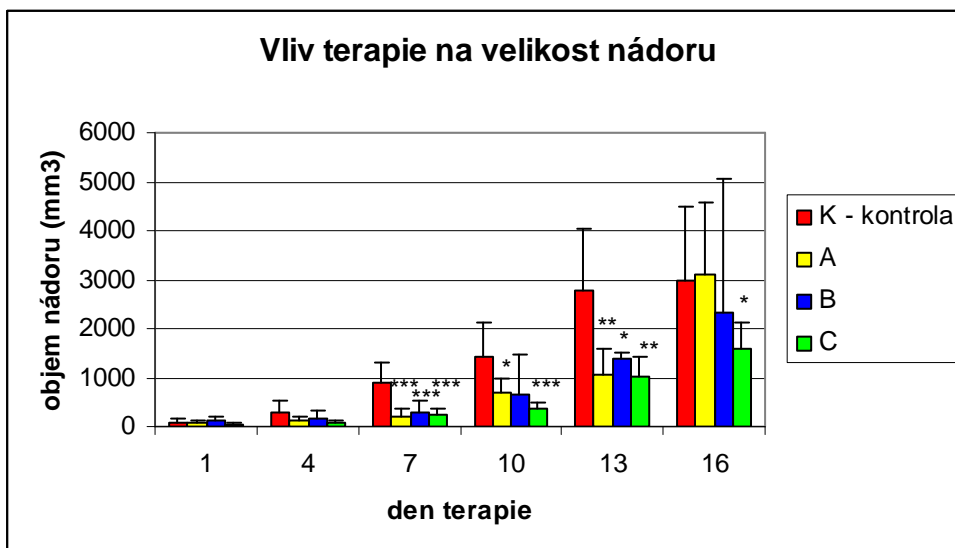
**Obr. 15:** Vliv terapie na velikost nádoru. Skupina K – neléčená kontrola, skupina A – léčena suspenzí mrtvých bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčena sonikovanou suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina C – léčena roztokem N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>

\* =  $P \leq 0,05$

\*\* =  $P \leq 0,01$

\*\*\* =  $P \leq 0,005$

Jelikož myš C7 od počátku projevovala neodpovídavost vůči léčbě, vyloučili jsme ji ze statistického hodnocení experimentu. Obr. 16 udává výsledek této úpravy. Vyplývá z něho, že největšího účinku dosahovala terapie u skupiny C.



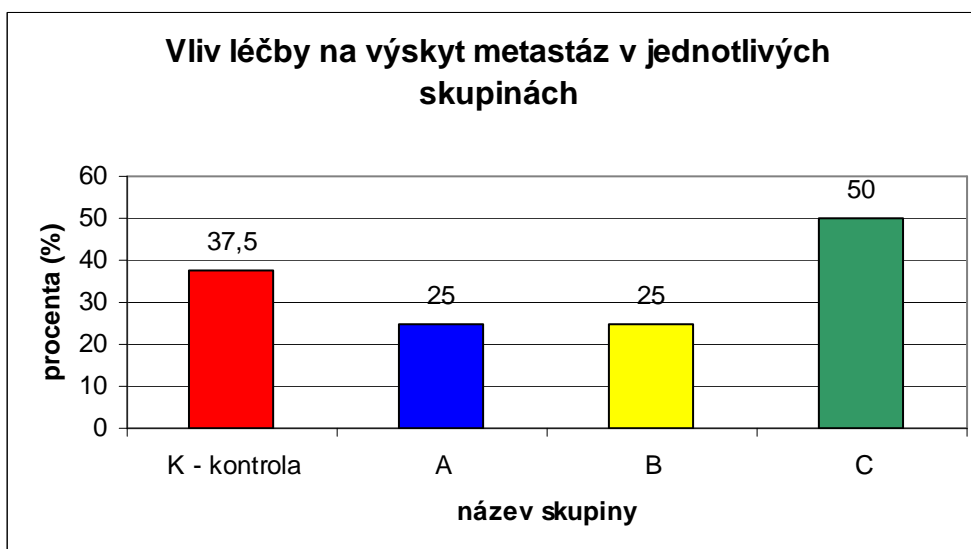
**Obr. 16:** Vliv terapie na velikost nádoru (skupina K – neléčená kontrola, skupina A – léčena suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčena sonikovanou suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina C – léčena roztokem *N*-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>)

\* =  $P \leq 0,05$

\*\* =  $P \leq 0,01$

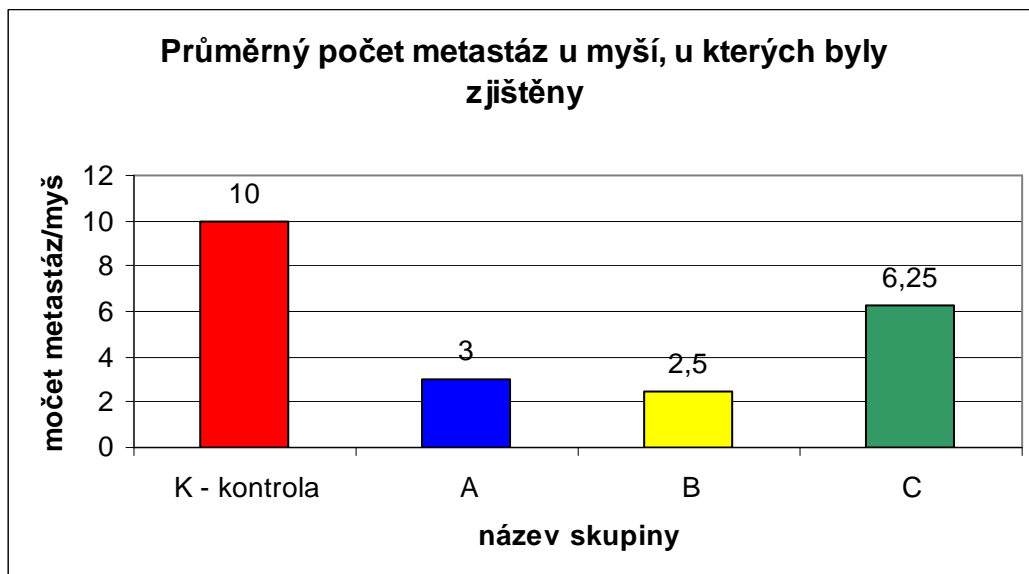
\*\*\* =  $P \leq 0,005$

Na Obrázku 17 vidíme, jaký měla vliv léčba na výskyt metastáz. Ve skupině A a B je výskyt metastáz menší než v kontrole, naproti tomu u skupiny C je větší výskyt metastáz než v kontrole.



**Obr. 17:** Vliv terapie na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách. Skupina K – neléčená kontrola, skupina A – léčena suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčena sonikovanou suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina C – léčena roztokem *N*-formylMet-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub>

Na dalším obrázku (Obr. 18) vidíme průměrný počet metastáz u myši, u kterých byly zjištěny. Ve skupině A je počet metastáz 3,3x menší než v kontrole, ve skupině B je počet metastáz 4,0x menší než v kontrole a ve skupině C je počet metastáz 1,6x menší než v kontrole.



**Obr. 18:** Průměrný počet metastáz u myši, u kterých byly zjištěny. Skupina K – neléčená kontrola, skupina A – léčena suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina B – léčena sonikovanou suspenzí *Stenotrophomonas maltophilia*, skupina C – léčena roztokem *N-formylMet-Leu-Phe-(Lys)*<sub>12</sub>

Závěrem můžeme říci, že na výskyt metastáz a jejich průměrný počet nejvíce zabrala léčba používaná u skupiny A a B, u skupiny C nemá léčba na metastázy vliv. Stejně jako zabrala léčba u skupiny A a B na metastázy, tak zabrala i na velikost nádoru. Na velikost nádoru zabrala i léčba u skupiny C.

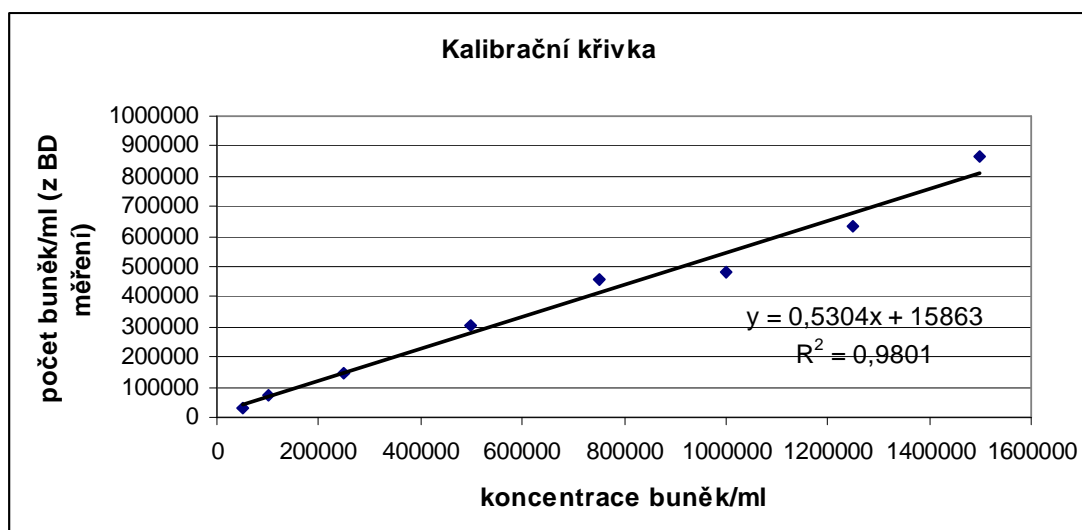
## 4.6 Pokus č. 6 – Cytotoxický test

### 4.6.1 Optimalizace cytotoxického testu, vytvoření kalibrační křivky

Byla vytvořena kalibrační křivka na používané melanomové buňky. Naměřené hodnoty při známé koncentraci buněk jsou vidět v tabulce 7. Měření probíhalo za konstantního času (60 s) a průtoku (3  $\mu$ l/s). Z počtu událostí (proteklých buněk) naměřených průtokovým cytometrem byl pak vypočítán počet buněk v 1ml (Tabulka 7).



Vynesením absolutního počtu nádorových buněk (první sloupec Tabulky 7 proti naměřeným a přepočteným hodnotám (poslední sloupec) byla sestrojena kalibrační křivka (Obr. 19). Metodou lineární regrese byla vypočtena rovnice přímky  $y = 0,53x + 15863$ , kde  $y$  je počet buněk/ml (BD měření) a  $x$  je koncentrace buněk/ml. Korelační koeficient byl 0,99.



Obr. 19: Kalibrační křivka

Tabulka 7: Počet buněk naměřených průtokovým cytometrem

Koncentrace měřených nád. buněk/ml	BD měření 1 (počet událostí)	BD měření 2 (počet událostí)	BD měření průměr (počet událostí)	BD měření 1 (počet buněk/ml)	BD měření 2 (počet buněk/ml)	BD měření průměr (počet buněk/ml)
50 000	6986	4200	5593	38811	23333	31072
100 000	14070	12404	13237	78166	68911	73538,5
250 000	33390	19250	26320	185500	106944	146222
500 000	54768	55244	55006	304267	306911	305589
750 000	77812	86688	82250	432289	481600	456944,5
1 000 000	81312	91560	86463	451733	508667	480200
1 250 000	146188	164724	155456	697900	569722	633811
1 500 000	125622	102550	114086	812155	915133	86364

Dále bylo optimalizováno užití LIVE/DEAD Cell Mediated Cytotoxicity Kitu (Molecular Probes) na cytotoxický test s melanomovými buňkami B16-F10. Membránově aktivní fluorescenční barva DiOC<sub>18</sub> umožní rozlišit nádorové (barvené) od nenádorových (efektorových, neznačených) buněk. Přídavek PI rozliší mrtvé (naznačené) od živých buněk.

Nejprve bylo zkoušeno množství PI a to v poloviční koncentraci (20 $\mu$ l) než v původním protokolu (40 $\mu$ l). Byla také upravena doba inkubace při přípravě této barvy. Optimální doba inkubace pro naše použití byla stanovena na 5 min. při 37°C. Dále byla upravena koncentrace barvy DiOC<sub>18</sub>. V původním protokolu byla užívaná koncentrace 10 $\mu$ l, ale jelikož nebyla optimální pro naše barvení („přesvicovala“ do jiných oblastí v grafu než bylo vhodné), tak byly vyzkoušeny další koncentrace (5 a 2,5  $\mu$ l). Bylo zjištěno, že jako optimální se jeví koncentrace 5 $\mu$ l.

Od původního protokolu od firmy Molecular Probes se ten současný tedy liší v některých množstvích fluorescenčních barev a dalšími parametry (viz. Tabulka 8). Užívaný poměr cílů a efektorů byl zvolen 1:10, stejný jako v práci Hicks et al. (2006). Množství nádorových buněk dávaných do 24 jamkové destičky by se mělo pohybovat mezi 80 000 a 160 000. Před 24 hodinovou inkubací by měla být jamka doplněná na objem 1 – 1,5 ml RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky.

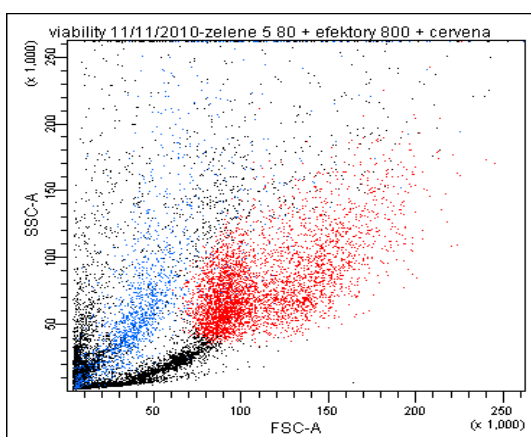
**Tabulka 8:** Srovnání původního a současného protokolu

	Původní stav	Současný stav
DiOC <sub>18</sub>	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
PI	40 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Doba inkubace PI	30 min.	5 min.

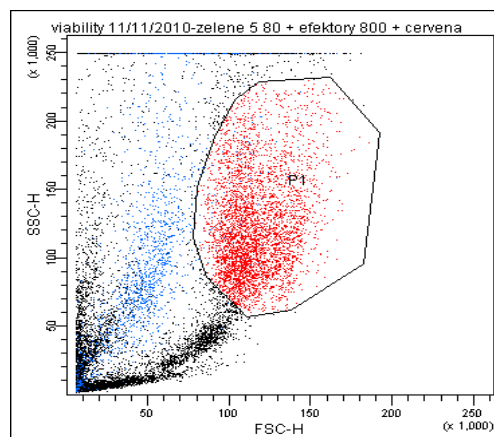
Buňky připravené takto optimalizovaným cytotoxickým testem pak byly měřeny na průtokovém cytometru. Výstupem měření jsou pak výsledky v grafické a číselné formě.

Jako kontrola byly vždy užívány nebarvené nádorové buňky. Všechny vzorky v pokusu byly vždy měřeny za stejných podmínek, tj. buňky jsou měřené po 24 h. od počátku cytotoxického testu, nastavení průtokového cytometru se pro jednotlivé vzorky v daném pokusu nemění atd.

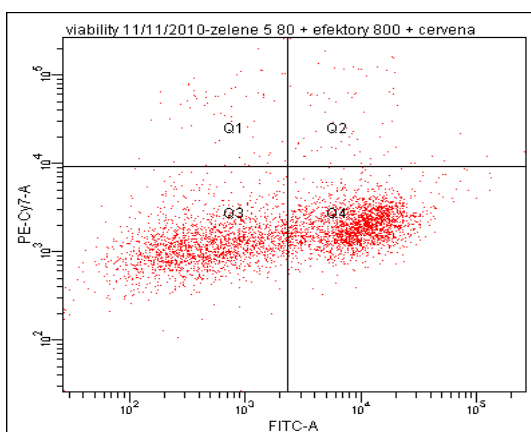
Výsledné grafy optimalizovaného cytotoxického testu vidíme níže. Na scattergramech (Obr. 20, 21) vidíme nádorové buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI společně s efektorovými buňkami (na neutrofilu bohatá populace buněk) naznačenými PI. Používaná hodnota byla plocha peaku nebo výška. Z těchto grafů byla vybrána populace nádorových buněk (P1 oblast), která byla analyzována dál. Výsledkem je pak Obr. 22, kde v oblasti Q3 jsou neznačené efektorové buňky, v oblasti Q1 jsou efektorové buňky naznačené PI (mrtvé efektorové buňky), v oblasti Q4 jsou buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> (živé buňky) a v oblasti Q2 jsou buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI (mrtvé buňky).



**Obr. 20:** scattergram nád. buněk obarvených DiOC<sub>18</sub> a PI + efekt. buňky obarvené PI (SSC-A x FSC-A)



**Obr. 21:** scattergram nád. buněk obarvených DiOC<sub>18</sub> a PI + efekt. buňky obarvené PI (SSC-H x FSC-H)



**Obr. 22:** nádorové buňky obarvené DiOC<sub>18</sub> a PI + efektorové buňky obarvené PI

#### **4.6.2 Cytotoxický test s melanomovými buňkami s navázaným LPS a FM**

Postup cytotoxického testu s naznačenými melanomovými buňkami je popsán v kapitole 3.15.4. Pomocí efektorů (na neutrofilily bohatá populace buněk, příprava viz. kap. 3.6, kontrola čistoty viz. kap. 3.15.2) se působilo jak na samotné nádorové buňky, tak na nádorové buňky, na jejichž povrch jsme se pokusili instalovat PAMPs.

Po zjištění počtu neutrofilů v efektorové suspenzi (76,5%) byl započat vlastní cytotoxický test, z něhož bylo zjišťováno několik parametrů a to: základní charakteristika nádorových buněk, vliv DiOC<sub>18</sub>, vliv LPS a FM; základní charakteristika efektorů, barvení efektorů pomocí PI a jako stěžejní byl pak sledován vliv efektorů na nádorové buňky bez LPS resp. FM versus na nádorové buňky s těmito PAMPs (viz kap. 3.15.4 metodiky).

Jednotlivá měření jsou doložena základními charakteristikami (scattergramy, histogramy, atd. (viz. Příloha 1). Z obrázků vyplývá, že rozlišení populací nádorových i efektorových buněk je někdy obtížné. Jako největší problém se jeví, že fagocytyující buňky se částečně barví markerem nádorových buněk.

Výsledky veškerých měření cytotoxického testu po přepočtu z kalibrační rovnice jsou uvedeny v Tabulce 9. U nádorových buněk bylo vzhledem ke kalibraci možno určit absolutní počty, u efektorů se jedná o počty relativní, absolutní hodnoty nebylo nutné stanovovat. Z tabulky dále vyplývá, že DiO na nádorové buňky působí tak, že částečně potlačuje schopnost proliferace. K proliferaci efektorů nedochází vůbec. V tabulce dále můžeme po porovnání s kontrolou (TDN1 a 2) vidět, že neutrofilily nepůsobí na melanomové buňky s navázaným LPS a FM (modře označené čísla v Tabulce 9).

**Tabulka 9: Počet buněk z cytotoxického testu** (v tabulce jsou uvedeny počty buněk/ml; T – neznačené nádorové buňky, TD – nádorové buňky + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> + PI, TDN – nádorové buňky + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> + PI + efektorové buňky + PI, LPS – nádorové buňky s navázaným LPS + PI, LPSD – nádorové buňky s navázaným LPS + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> + PI, FM – nádorové buňky s navázaným F-Met-Leu-Phe (Lys)12 + PI, FMD – F-Met-Leu-Phe (Lys)12 + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> + PI, LPSDN – nádorové buňky s navázaným LPS + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> + PI + efektorové buňky + PI, FMDN – F-Met-Leu-Phe (Lys)12 + 5  $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> + P + efektorové buňky + PI)

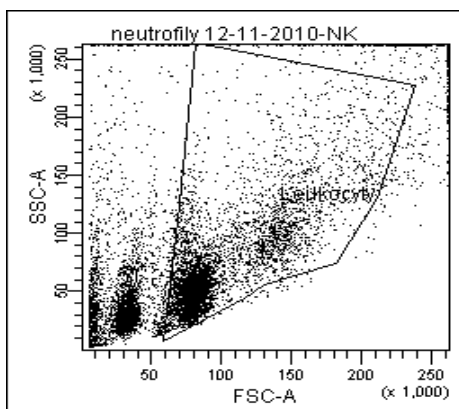
	Počet buněk na začátku cytotox. testu	Počet všech buněk získaných z průtokového cytometru	Počet buněk z vybrané populace	Počet singletů z vybrané populace	Počet mrtvých buněk (nabarvené PI) Q1 OBLAST	Počet mrtvých buněk (nabarvené PI a DiOC <sub>18</sub> ) Q2 OBLAST	Počet nebarvených buněk Q3 OBLAST	Počet živých buněk nabarvených DiOC <sub>18</sub> Q4 OBLAST
Ciste T	100 000	467 072	33 915	31 985	0	0	31 545	439
T1	100 000	405 0923	110 538	106 342	15 567	296	90 228	251
T2	100 000	267 036	44 532	41 615	12 862	189	28 355	209
TD1	100 000	348 696	101 223	97 236	2413	11 309	18 295	65 218
TD2	100 000	401 274	117 736	113 328	3566	17415	18924	73423
<b>TDN1</b>	100 000 + 1 000 000	1 073 636	115 491	108 294	5098	14436	45675	43085
<b>TDN2</b>	100 000 + 1 000 000	915 606	109 300	103 406	4343	13576	40053	45434
LPS1	100 000	536 098	217 604	211 332	22 030	62	189 240	0
LPS2	100 000	660 936	288 542	277 423	26940	147	250 147	189
LPSD1	100 000	268 798	44 092	42 160	336	9085	755	61915
LPSD2	100 000	254 994	39 032	35 385	902	6274	5057	53083
FM1	100 000	607 183	232 059	220 942	32395	294	218037	147
FM2	100 000	437111	131 960	124 555	25911	315	128195	62
FMD1	100 000	311 977	54 518	51 477	2098	9211	8455	61644
FMD2	100 000	270 855	43 338	40 734	1762	8643	6777	53481
<b>LPSDN1</b>	100 000 + 1 000 000	677 972	62 640	58 442	1323	9400	14917	62734
<b>LPSDN2</b>	100 000 + 1 000 000	1 156 764	83 704	76 611	2098	13030	23855	67559
<b>FMDN1</b>	100 000 + 1 000 000	986 983	68 847	62 828	2979	11645	24444	53691
<b>FMDN2</b>	100 000 + 1 000 000	1 226 081	72 142	65 743	5351	13155	29247	48551

### 4.6.3 Ověření čistoty neutrofilů pomocí BD FACS CANTO II

V in vitro pokusech, kde byly používány neutrofilů (peritoneální výplach z izolace neutrofilů – kap. 3.6), bylo zjišťováno, jaké procento neutrofilů obsahují získané buňky z myšního peritonea. Protokol na ověření čistoty neutrofilů je v kapitole 3.15.2.

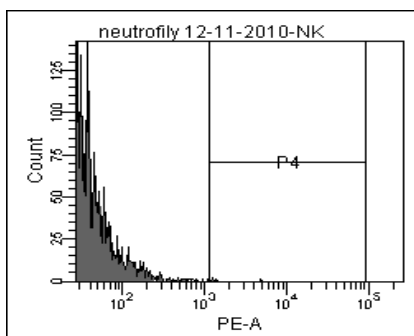
Buňky byly měřené na průtokovém cytometru BD FACS CANTO II. Byly získány jak vizuální tak statistické výstupy.

Na scattergramu (Obr. 43) je zobrazena negativní kontrola (nenaznačené buňky). Z tohoto obrázku byla vybrána oblast leukocytů, která byla pak analyzována dál. Byly vybrány „singlety“, ze kterých byly vytvořeny jednoparametrové histogramy, které vidíme níže.

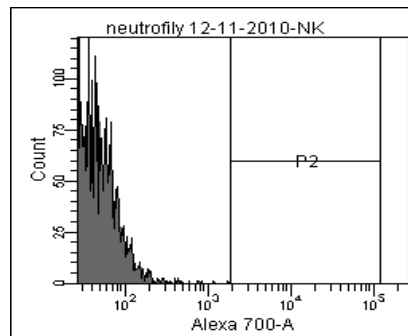


**Obr. 43:** scattergram neznačených buněk (SSC-A x FSC-A)

Neznačené melanomové buňky byly nastaveny tak, aby intenzita jejich autofluorescence daného fluorochromu nepřesahovala hodnotu  $10^3$  (viz. Obr. 44, 45). Buňky mimo tuto oblast byly vyhodnoceny jako pozitivní v dané fluorescenci (markeru), viz. Obr. 47.



**Obr. 44:** jednoparametrový histogram (PE-A) - neznačené buňky



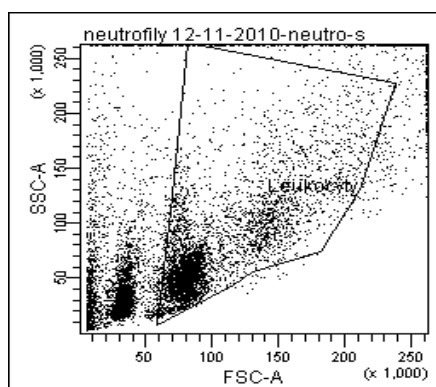
**Obr. 45:** jednoparametrový histogram (Alexa 700-A) – neznačené buňky

Statistické vyhodnocení neznačených buněk vidíme v Tab. 10.

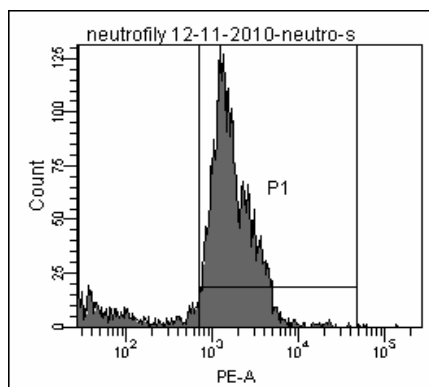
**Tabulka 10:** Statistika z průtokového cytometru – neznačené buňky

Tube: NK			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
Leukocyty	5,198	52.0	52.0
Singlets	5,151	99.1	51.5
P1	1	0.0	0.0
P3	0	0.0	0.0
P2	0	0.0	0.0
P4	4	0.1	0.0

Na dalším scattergramu (Obr. 46) jsou zobrazeny buňky, které byly naznačeny protilátkou proti neutrofilům: NEU (Neu - Rat anti Mouse Neutrophils: RPE od firmy ABD Serotec), kterou je možno analyzovat pomocí parametru fluorescence PE-A. Z tohoto obrázku byla vybrána oblast leukocytů, z níž byly vybrány „singlety“, ze kterých byl vytvořen jednoparametrový histogram, který vidíme níže (Obr. 47).



**Obr. 46:** scattergram buněk značených NEU protilátkou (SSC-A x FSC-A)



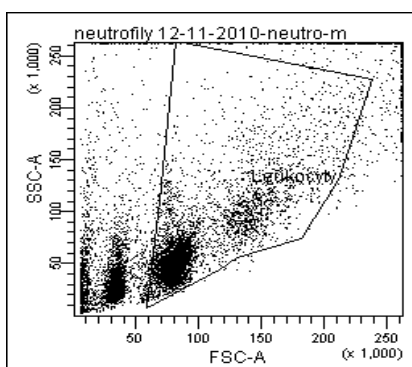
**Obr. 47:** jednoparametrový histogram (PE-A) – buňky naznačene NEU protilátkou

Výstupem z průtokového cytometru je také statistická tabulka (Tab. 11), ze které můžeme vyčíst, že ve vybrané populaci bylo 76,5% neutrofilů (naznačené NEU protilátkou).

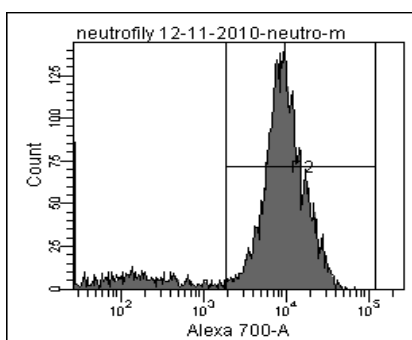
**Tabulka 11:** Statistika z průtokového cytometru – buňky naznačené NEU protilátkou

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
Leukocyty	4,534	45.3	45.3
Singlets	4,495	99.1	45.0
P1	3,439	76.5	34.4
P3	5	0.1	0.0
P2	3	0.1	0.0
P4	3,230	71.9	32.3

Další testovanou protilátkou, která značí neutrofilů, byla GR1 (Alexa Fluor 700 Conjugated Anti-mouse Ly-6G (GR-1) Clone RBG-8C5 od firmy eBioscience). Na scattergramu (Obr. 48) jsou buňky naznačené touto protilátkou. Opět byla vybrána populace leukocytů, ze které byly vybrány „singlety“. Ze singletů byl pak vytvořen jednoparametrový histogram, který vidíme níže (Obr. 49).



**Obr. 48:** scattergram buněk značených GR1 protilátkou (SSC-A x FSC-A)



**Obr. 49:** jednoparametrový histogram (Alexa 700-A) – buňky značené GR1 protilátkou



Výstupem z průtokového cytometru byla také statistická tabulka (Tab. 12), ze které můžeme vyčíst, že ve vybrané populaci bylo 87,2% granulocytů (naznačené GR1 protilátkou).

**Tabulka 12:** Statistika z průtokového cytometru – buňky naznačené GR1 protilátkou

Tube: neutro-m			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	10,000	####	100.0
■ Leukocyty	5,091	50.9	50.9
■ Singlets	5,050	99.2	50.5
■ P1	0	0.0	0.0
■ P3	0	0.0	0.0
■ P2	4,404	87.2	44.0
■ P4	1	0.0	0.0

## 5. Diskuze

Pokusy, ve kterých se zabýváme proenzymoterapií, navazují na výsledky Nováka a Trnky (2005), jejichž práce pojednává o protimetastázovém účinku proenzymoterapie. Zde byl transplantován melanom B16-F10 myším. Desátý den po transplantaci byl nádor vyjmut a bezprostředně bylo započato s proenzymoterapií založenou na směsi trypsinogenu a amylázy, která byla aplikována s.c. Hranici 100 denního přežití překonalo 60% myší (Novak a Trnka 2005).

V prvním pokusu jsme se zabývali vytvořením umělého modelu metastázování. Provedený experiment byl založen na aplikaci 100 000 buněk melanomu B16-F10 do ocasní žíly. Poté se podávala denně směs trypsinogenu, chymotrypsinogenu a amylázy, která neovlivnila výskyt metastáz a to v žádném časovém režimu (počátek ode dne -2 před transplantací, v den transplantace, 7 dní po transplantaci). Ukazuje to, že metastázový model založený na injikaci nádorových buněk melanomu do žíly, ač široce používaný (Clynes et al. 2000, Mazumder a Rosenberg 1984, Schmiegl et al. 2003, Teicher 2002), není se skutečným procesem metastázování shodný. V čem je tedy rozdíl mezi přirozeně metastazujícími buňkami a použitou metodou? Intravenózní aplikace buněk B16-F10 je aplikací buněk, které nemají vyvinutý systém invazivity (komplex proteáz). Dále nefunguje (aspoň na počátku) systém ochrany proti imunitě. Jde tedy, alespoň v kritickém rozhodujícím počátku, o pasivní uvíznutí melanomových buněk, které nelze proenzymy nijak ovlivnit. Proenzymová terapie, jak bylo zmíněno v úvodu, předpokládá primární aktivaci proenzymů pomocí nádorových proteáz a sekundární odstraňování TGF-beta. U přirozeně metastazujícího melanomu jsou plně exprimovány proteázy spojené s invazí, u modelu spojeného s injikací melanomových buněk do žíly toto chybí. Naše poznatky tedy neodporují práci Nováka a Trnky (2005), ale jsou příspěvkem k diskuzi o plnohodnotnosti zmíněného modelu.

Ve druhém pokusu jsme se zabývali přirozeně metastazujícím melanom B16-F10 a ovlivněním metastáz pomocí proenzymoterapie, která byla podávána *i.m.* Terapie nám redukovala objem nádoru, což ostatně dokazuje řada prací (Maršíková *in prep.*, Kalferstová 2008, Kaiserová 2010, Živná 2010, Maierová 2010, Kalferstová 2010). Na úrovni metastázování a to jak na úrovni výskytu, ale i četnosti můžeme spatřovat určitý terapeutický vliv až na výjimky. Tyto výsledky ohledně metastáz však nebyly

moc přesvědčivé a proto byl proveden další pokus (třetí pokus), který byl proveden na větším množství myší (20 v jedné skupině). Měl tedy větší výpovědní hodnotu.

Ve třetím pokusu jsme se tedy zabývali také přirozeně metastazujícím melanomem B16-F10 a ovlivněním metastáz pomocí proenzymoterapie, která byla aplikovaná *i.m.* a *i.p.* Bylo zjištěno, že proenzymy nemají na metastázování terapeutický vliv. To popírá zásadním způsobem literaturu (Novak a Trnka 2005, Wald et al. 1998, Wald et al. 2001) o použití proenzymů respektive enzymů jako léčby metastáz. Tento rozpor je však pochopitelný. Všichni ostatní autoři používali ve svých studiích jednorázový metastázový pulz. Odejmuli vždy primární nádor a pak začali terapii, která tak dosahovala 50 - 60% redukce výskytu metastáz. Je tedy evidentní, že při této účinnosti bude organismus vykazovat jiné výsledky, než byly prokázány v našich experimentech, kde nebyl odejmut primární nádor a metastázy tak byly produkovány po celou dobu terapie. Závěrem můžeme říct, že pokud bychom chtěli léčit metastázy proenzymy, tak musíme nejprve odstranit primární nádor, aby byla terapie účinná.

Přestože jsme zjistili určité omezení v použitelnosti proenzymové terapie v boji proti metastázám, výsledky ostatních (Kaiserová 2010, Kalferstová 2008, Kalferstová 2010, Maršíková *in prep.*, Maierová 2010, Živná 2010) ukazují na značnou redukci nádorového růstu a užitečnost této metody.

Po uvedeném vymezení účinnosti proenzymoterapie jsme se rozhodli pokusit se najít účinnější protinádorový prostředek, než byla proenzymoterapie. Rozhodli jsme se pro oblast vrozené imunity, kde nejsou známe tak rozsáhlé protiimunitní aktivity nádoru. Celá myšlenka spočívá v instalaci PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) na nádorové buňky s cílem vyvolat cílený atak. Prvním orientačním pokusem byl pokus čtyři.

V tomto pokusu šlo o zjištění vlivu LPS (lipopolysacharid), TGM (thioglykolátové médium) a BG (beta glukan) na přirozeně metastazující melanom B16-F10. TGM je užíváno k natažení neutrofilů do dané oblasti (nejčastěji do peritoneální), LPS by se měl zaintegrovat do membrány buněk svým lipofilním koncem (funguje to tak u bakterií a tento jev je popsán i u membrán jiných buněk (Carr a Morrison 1984)) a svým druhým koncem tvořeným polysacharidy se stává antigenní pro buňky imunitního systému. Tento konec může přispívat také k adhezi a aktivovat komplement. Beta glukan aplikovaný *i.t.* měl do nádoru přilákat fagocytující buňky, které by nádor zničily. Pokusili jsme se tedy *i.t.* aplikací TGM do nádoru namigrovat neutrofilily, které by nádor zcela či částečně zničily. Bohužel tento přístup zklamal,

k redukci nádorového růstu nedošlo. Rovněž tak aplikace betaglukanu i.t. byla neúčinná, což potvrdila i ve své práci Maierová (2010). Zajímavé je, že *p.o.* aplikace na tomto modelu melanomu funguje výborně, což dokazují práce Kalferstová (2008) a Maierová (2010). Výborně funguje LPS, který způsobil výraznou redukci růstu jinak vysoce agresivního a rychle rostoucího melanomu B16-F10. Přechodně jsme dokonce pozorovali zmenšení nádoru, což je jev u tohoto nádoru nevídaný a překvapivý (melanom B16-F10 nám zdvojnásobuje objem za tři dny) Jak je známo, LPS způsobuje aktivaci komplementového systému (alternativní cesty). Důsledkem této aktivace je cytolýza buněk, zvýšení chemotaxe a opsonizace. Neutrofilny jsou do ložiska přitahovány fragmentem C5a. LPS se váže na receptory CD 14 na povrchu buněk monocytomakrofágové řady a za spoluúčasti LBP, MD-2 a TLR-4 dochází ke stimulaci produkce lyzozomálních enzymů, rychlosti fagocytózy a uvolňování hydrolytických enzymů a prostřednictvím cytokinů dochází k natahování dalších buněk a vyvolání prudké zánětlivé reakce. Aktivované makrofágy rovněž mohou snáze likvidovat nádorové buňky, a to přímo vazbou nebo zprostředkovaně uvolňovaným TNF. Předpokládáme, že díky těmto mechanismům došlo k výrazné redukci objemu nádoru, kterou jsme zatím u žádného námi prováděných pokusů nepozorovali. LPS je samozřejmě nebezpečný (možnost septického šoku). Přestože jsme používali značné dávky LPS, nikdy jsme nepozorovali u myši žádné potíže. Je možné si představit, že rychle se ukotvující LPS se v nádorech váže a nezatěžuje organismus. Po likvidaci buněk imunitním systémem se zřejmě LPS inaktivuje. Je možné si představit použití i větších dávek LPS úměrných objemu nádoru a jeho vazebné kapacitě.

Dalším experimentem (pokus 5) bylo studium vlivu mrtvých a sonikovaných bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a N- formyl-methionin-Leu-Phe-(Lys)<sub>12</sub> (=FM) na přirozeně metastazující melanom B16-F10. *Stenotrophomonas maltophilia* je flagelární gramnegativní bakterie nesoucí PAMPs jako je LPS, flagelin a další. Tato bakterie je jedinou bakterií s výrazně pozitivním povrchovým nábojem (pI je 11) a je schopna se na negativně nabitě povrchy velmi silně vázat, což právě nádor je (Jucker et al. 1996). N-formyl-methionin-leucin-phenylalanin-lysin (12x) měl díky dvanácti lysinům výrazný kladný náboj. Spoléhalí jsme tedy také na jeho interakci se záporným nábojem nádorových buněk. Jak mrtvé tak sonikované bakterie *S. maltophilia* redukovaly růst nádoru výrazným způsobem a měly i pozitivní vliv na výskyt metastáz a jejich četnost. Předpokládaným mechanismem byla právě elektrostatická interakce

kladně nabitě bakterie se záporně nabitým nádorem, jak již bylo zmíněno. Význam samotné elektrostatické interakce pro účinek bakterie je obtížné prokázat. Nicméně pro další studium bude vhodné tento pokus zopakovat s jinou bičíkatou gramnegativní bakterií jako určitou kontrolou, byť neplnohodnotnou. Velmi dobrých výsledků na redukci primárních nádorů jsme dosáhli pomocí FM, který obsahuje formyl-methioninový motiv (chemotaktický i fagocytární ligand). Formyl-methioninem začínají bakterie a nejen ty proteosyntézu. Syntetizovaný 12 lysinový konec formyl-methionin-Leu-Phe nám měl zaručit vysoce kladný náboj a měl se tedy vázat na nádor (záporný náboj) pomocí elektrostatické interakce. Pro další studium by bylo pokus vhodné zopakovat a to za použití samotného formyl-methioninu nebo formyl-Met-Leu-Phe jako kontroly bez vazebné schopnosti.

Vzhledem k tomu, že jsme použili jen malé dávky jak *S. maltophilia* tak FM v režimu ob dva dny a jen 4x, lze se domnívat, že zintenzivnění terapie by mohlo přinést výrazné zlepšení. Jak z grafů vyplývá, nepodchytí-li se dostatečně růst nádorů, je nemožné pak s velkými nádory bojovat.

V šestém pokusu jsme se zabývali optimalizací komerčního cytotoxického testu, která byla nutností, jelikož tento test nebyl plně vyhovující na používané melanomové buňky B16-F10. Využívali jsme metodu průtokové cytometrie, která nám na základě barvení buněk pomohla odlišit buňky nádorové od nenádorových a živé od mrtvých. Provedli jsme dále kvantifikaci metody. Počty buněk byly vyjadřovány v absolutních počtech díky sestavené kalibrační křivce s dobrým korelačním koeficientem. Při optimalizaci se nám podařilo dosáhnout výrazného odlišení populace živých a mrtvých nádorových a efektorových buněk. Bylo zjištěno, že DiOC<sub>18</sub> a navázané PAMPs na nádorové buňky zásadním způsobem nepůsobí a že tedy je cytotoxický test dobře použitelný pro studium vlivu efektorů na nádorové buňky s a bez PAMPs. V našem experimentu neutrofily nevykázaly cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám. Vysvětlení může být mnoho. Jedním z těchto vysvětlení může být, že LPS je signálním a scavengerovým ligandem a je otázkou, do jaké míry může iniciovat fagocytózu. FM je fagocytární ligand, a přestože fagocytóza nádorových buněk je často popisována (Caruso et al. 2002, Dale et al 2008), je obtížné si představit, jak malé neutrofily fagocytují tyto obrovské melanomové buňky. Jedním z dalších důvodů může být to, že nebyla dostatečná simulace přirozeného prostředí (přítomnost správných cytokinů ve správném množství) pro podporu efektorových buněk (v přirozeném prostředí tyto látky jako LPS a FM fungovaly, viz. pokus 4 a 5). Také si

můžeme všimnout na jednotlivých dot plotech v tomto testu, že odlišení populací není vždy jednoduché. Ne vždy se nádorové buňky chovají stejně. Příkladem může být Obrázek 38 v příloze, kde v oblasti Q1 a Q2 jsou buňky, které by se tam vyskytovat neměly. Toto může být dáno chybou v barvení nebo nedostatečnou inkorporací barvy do buněk. V dalších pokusech, které budou na tento navazovat, bude potřeba pro studium in vitro připravit efektorovým buňkám (neutrofilům) prostředí co nejbližší jejich přirozenému a to přidáváním prozánětlivých cytokinů případně směsi cytokinů z prostředí zánětlivého exudátu.

## 6. Závěr

- Byl zaveden umělý metastázový model založený na i.v. aplikaci melanomových buněk B16-F10. Bylo zjištěno, že tento jinak široce používaný model není identický s přirozeným metastazováním a je přinejmenším pro studium proenzymoterapie nevhodný.
- Proenzymy proti metastázám selhávají v případě permanentní existence primárního nádoru, což zdůrazňuje nutnost operace primárního nádoru.
- Zjistili jsme velmi výrazný účinek *i.t.* aplikace LPS proti melanomu B16-F10 (redukce objemu nádoru).
- Zjistili jsme výrazný efekt sonikovaných a mrtvých bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* aplikovaných *i.t.* vedoucí k redukci růstu nádorů a k částečnému potlačení metastáz
- Zjistili jsme výrazný vliv *i.t.* aplikovaného fagocytárního ligandu N-formyl-Met-Leu-Phe-Lys(12) na redukci růstu nádorů.
- Zavedli jsme, postupně optimalizovali a kvantifikovali cytotoxický test pro studium vlivů efektorů (neutrofilů) na melanomové buňky B16-F10 a to samotné nebo s navázanými PAMPs. Tato metoda bude vyžadovat další optimalizaci z hlediska prostředí (cytokiny)

## 7. Seznam použité literatury

- AL-SARIREH, B.; EREMIN, O. *Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth.* J.R.Coll.Surg.Edinb.. 2000, 45, s. 1-16.
- APPEL, K.E.; FÜRSTENBERGER, G.; HALME, H.J.; HECKER, E.; HILDEBRANDT, A.G.; KORANSKY, W.; MARKS, F.; NEUMANN, H.G.; OHNESORGE, F.K.; SCHULTE-HERMANN, R. *Chemical Cancerogenesis: definitions of frequently used terms.* Journal of Cancer Research Clinical Oncology. 1990, 116, s. 232-236.
- BANDARCHI, B.; MA, L.; NAVAB, R.; SETH, A.; RASTY, G. *From melanocyte to metastatic malignant melanoma.* Dermatology Research and Practise. 2010, 7, s. 1-8.
- BAST, R.C.; DONALD, W.K; POLLOCK, R.E.; WEICHSELBAUM, R.R.; HOLLAND, J.F.; FREI, E. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 5th edition [online]. 5th. Hamilton (ON) : BC Decker, 2000 [cit. 2010-11-03]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed>>.
- BEARD, J. *Embryological aspects and etiology of carcinoma.* Lancet. 1902, 21, s. 1758-1761.
- BEARD, J. *The cancer problem.* Lancet. 1905, 4, s. 281-283.
- BEAVON, I.R. *The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation.* Eur J Cancer. 2000, 36, 13, s. 1607-1620.
- BECK, C.; SCHREIBER, H.; ROWLEY, D.A. *Role of TGF- $\beta$  in immune-evasion of cancer.* Microscopy Research and Technique. 2001, 52, 4, s. 387-395.
- BECKER, C.; FANTINI, M.C.; NEURATH, M.F. *TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer.* Cytokine and growth factor reviews. 2006, 17, s. 97-106.
- BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; SOUČEK, A.; VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie.* Praha : Marvil , 1996. 558 s.
- BOHM, S.K; MCCONALOGUE, K.; KONG, W.; BUNNETT, W.K. *Proteinase-activated receptors: New function for old enzymes.* News Physiol Sci . 1998, 13, s. 231-240.



- BORTH, W. *Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics*. The FASEB Journal. 1992, 6, 15
- BOSARI, S.; LEE, A.K.; DELELLIS, R.A.; WILEY, B.D.; HEATLEY, G.J.; SILVERMAN, M.L. *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma*. Hum Pathol. 1992, 23, s. 755-761.
- BUONOCORE, S.; HADDOU, N.O.; MOORE, F.; FLORQUIN, S.; PAULART, F.; HEIRMAN, C., THIELEMANS, K.; GOLDMAN, M.; FLAMAND, V. *Neutrophil-dependent tumor rejection and priming of tumoricidal CD8<sup>+</sup> T cell response induced by dendritic cells overexpressing CD95L*. Journal of Leukocyte Biology. 2008, 84, s. 713-720.
- CARR, C.; MORRISON, D.C. *Lipopolysaccharide interaction with rabbit erythrocyte membranes*. Infection and Immunity. 1984, 10, s. 600-606.
- CARUSO, R.A.; MUDA, A.O.; BERSIGA, A.; RIGOLI, R.; INFERRERA, C. *Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas*. Ultrastruct Pathol. 2002, 26, 5, S. 315-321.
- CLARK, D.A.; COKER, R. *Molecules in focus transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1998, 30, 3, s. 293-298.
- CLYNES, R.; TAKECHI, Y.; MOROI, Y.; HOUGHTON, A.; RAVETCH, J.V. *Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma*. PNAS. 1998, 95, 2, s. 652-656.
- CLYNES, R.A.; TOWERS, T.L.; PRESTA, L.G.; RAVETCH, J.V. *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nature Medicine. 2000, 6, s. 443-446.
- CUI, Z.; WILLINGHAM, M.C.; HICKS, A.M.; ALEXANDER-MILLER, M.A.; HOWARD, T.D.; HAWKINS, G.; MILLER, M.S.; WEIR, H.M.; DU, W.; DELONG, C.J. *Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice*. PNAS. 2003, 100, s. 6682-6687.
- ČÁP, R.; DOBEŠ, D.; HOŠEK, F.; HYŽA, P. *Maligní melanom*. Vojenské zdravotnické listy. 2005, 74, 1, s. 4-8.
- DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. *The phagocytes: neutrophils and monocytes*. Blood. 2008, 112, 4, s. 935-945.

- DANKBAR, B.; PADRÓ, T.; LEO, R.; FELDMANN, B.; KROPFF, M.; MESTERS, R.M.; SERVE, H.; BERDEL, W.E.; KIENAST, J. *Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma*. Blood. 2000, 95, s. 2630-2636.
- DARMOUL, D.; GRATIO, V.; DEVAUD, H.; LABURTHER, M. *Protease-activated receptor 2 in colon Cancer*. J Biol Chem. 2004, 279, s. 20927-20934.
- DE VISSER, K.E.; KAST, W.M. *Effects of TGF- $\beta$  on the immune system: Implications for cancer immunotherapy*. Leukemia. 1999, 13, 8, s. 1188-1199.
- DIENSTBIER, Z. *Rakovina. Co o ní víme a jak s ní žít*. Praha : Victoria Publishing a.s., 1994. 63 s.
- EGI, Y.; ITO, M.; TAKNAKA, S.; IMAGAWAL, S.; TAKATA, S.; YOSHIHARA, M.; HARUMA, K.; CHAYAMA, K. *Role of Helicobacter pylori infection and chronic inflammation in gastric cancer in the cardia*. Jpn. J. Clin. Oncol.. 2007, 37, 5, s. 365–369.
- FANG, F.; OREND, G.; WATANABE, N.; HUNTER, T.; RUOSLAHTI, E. *Dependence of Cyclin E-CDK2 Kinase Activity on Cell Anchorage*. Science. 1996, 271, 5248, s. 499-502.
- FEILI-HARIRI, M.; FALKNER, D.H.; MOREL, P.A. *Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy*. Journal of Leukocyte Biology. 2005, 78, s. 656-664.
- FERENČÍK, M.; ROVENSKÝ, J.; SHOENFELD, Y.; MAŤHA, V. *Imunitní systém*. Praha : Grada Publishing, 2005. 236 s.
- FIDLER, I.J. *Selection of successive tumor lines for metastasis*. Nature (New Biology). 1973, 242, s. 148-149.
- FIDLER, I.J.; HART, I.R. *Biologic diversity in metastatic neoplasm: origins and implications*. Science. 1982, 217, s. 998-1002.
- FIDLER, I.J. *Melanoma Metastasis*. Cancer Control Journal. 1995, 2, 5, s. 0.
- FIGARELLA, C.; MISZCZUK-JAMSKA, B.; BARRETT, A.J. *Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogen by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen I*. Biol Chem Hoppe-Seyle. 1988, 369, s. 293-298.

- FINKE, J.H.; BUKOWSKI, R.M. *Cancer immunotherapy at the crossroads how tumors evade immunity and what can be done*. Towora, New Jersey : Humana Press, 2004. 386 s.
- FRANKS, L.M. ; TEICH, N.M. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Third edition. Oxford : Oxford University Press, 1999. 458 s.
- GE, L.; SHENOY K.S.; LEFKOWITZ, R.J.; DeFEA K.. *Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both alpha-arrestin-1 and -2*. J Biol Chem. 2004, 279, s. 55419-55424.
- GLADDEN, A.B.; DIEHL, J.A. *Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: Breaking down the walls of dogma*. Cancer cell. 2003, 3, 4, s. 160-162.
- GORELIK, L.; FLAVELL, R.A. *Transforming growth factor-beta in T-cell biology*. Nat Rev Immunol. 2002, 2, s. 46-53.
- HART, I.R.; FIDLER, I.J. *Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma*. Cancer Res. 1980, 40, s. 2281-2287.
- HENNINGS , H.; GLICK, A.B.; GREENHALGH, D.A.; MORGAN, D.L., STRICKLAND, J.E.; TENNENBAUM, T.; YUSPA, S.H. *Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine . 1993, 202, s. 1-8.
- HERMANNNS, J.F.; PETIT, L.; MARTALO, O.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; CAUWENBERGH, G.; PIÉRARD, G.E. *Unraveling the patterns of subclinical pheomelanin-enriched facial hyperpigmentation: effect of depigmenting agents*. Dermatology. 2000, 201, 2, s. 118-122.
- HICKS, A.M.; RIEDLINGER, G.; WILLINGHAM, M.C.; ALEXANDER-MILLER, M.A.; VON KAP-HERR, C.; PETTENATI, M.J.; SANDERS, A.M.; WEIR, H.M.; DU, W.; KIM, J.; SIMPSON, A.J.G.; OLD, L.J.; CUI, Z. *Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/komplete resistance mice*. PNAS. 2006, 103, s. 7753-7758.
- HOŘEJŠÍ, V.; BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 3.vydání. Praha : Nakladatelství Triton s.r.o., 2005. 279 s.
- HUANG, W.; LU, L.; SHAO, X. *Anti-melanoma activity of hybrid peptide P18 and its mechanism of action*. Biotech Lett. 2010, 32, s. 463-469

- CHICOINE, M.R.; WON, E.K.; ZAHNER, M.C.; PARSA, A.T.; BRUCE, J.N.; PIEPMEIER, J.M.; ROCK, J.P.; SAWAYA, R. *Intratumoral injection of lipopolysaccharide causes regression of subcutaneously implanted mouse glioblastoma multiforme*. *Neurosurgery*. 2001, 48, 3, s. 607-615.
- CHUDNOVSKY, Y; KHAVARI, P.A.; ADAMS, A.E. *Melanoma genetics and the development of rational therapeutics*. *J Clin Invest.* 2005, 115, 4, s. 813–824.
- INABA, M.; TAZUKO, T.; FUJIMOTO, S.; SAKURAIY, M.K.; OHNISHI, Y. *Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse*. *Jpn J Cancer Res* 1986, 77, s. 190-196.
- JAVIER, R.T.; BUTEL, J.S. *The History of Tumour Virology*. *Cancer research*. 2008, 68:(19), 10, s. 7693-7706.
- JUCKER, B.A.; HARMS, H.; ZEHNDER, A.J.B. *Adhesion of positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70410 to glass and teflon*. *J of Bacteriol* 1996, 178, 18, s. 5472-5479.
- KAISEROVÁ, P. *Proenzymová terapie sarkomu S-180*. České Budějovice, 2008. 45 s. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.
- KAISEROVÁ, P. *Imunologické aspekty proenzymoterapie nádorového onemocnění*. České Budějovice, 2010. 51 s. Diplomová práce práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.
- KALFERSTOVÁ, L. *Proenzymoterapie melanomu B16F10*. České Budějovice, 2008. 48 s. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.
- KALFERSTOVÁ, L. *Optimalizace (pro)enzymové terapie rakoviny*. České Budějovice, 2010. 65 s. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.
- KAY, J.; KASSEL, B. *The autoactivation of trypsinogen*. *J Biol Chem*. 1971, 246, 21, s. 6661-6665.
- KHAZEN, W.; M'BIKAB, J.P.; TOMKIEWICZC, C.; BENELLIA, CH.; CHANYB, CH.; ACHOURB, A.; FORESTA, C. *Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes*. *FEBS letters*. 2005, 25, 579, s. :5631-5634.

- KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. *Kuby immunology*. 6th. New York : W.H. Freeman, 2007. 574 s.
- KOBAYASHI, H., MONIWA, N.; SUGIMURA, M.; SHINOHARA, H.; OHI, H.; TERAOKA, T. *Effect of membrane-associated cathepsin B on their activation of receptor-bound pro-urokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes*. *Biochem Biophys Acta*. 1993, 1178, s. 55-62.
- KOIVUNEN, E.; RISTIMÄKI, A.; ITKONEN, O.; OSMAN, S.; VUENTO, M.; STENMAN, U.H. *Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix*. *Cancer Res* . 1991, 51, 8, s. 2107-2112.
- KOWALSKI, P.J.; RUBIN, M.A.; KLEER, C.G. *E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases*. *Breast Cancer Res*. 2003, 5, s. 217-222.
- KRASAGAKIS, K.; THOLKE, D.; FARTHMAN, B.; EBERLE, J.; MANSMANN, U.; ORFANOS, C.E. *Elevated plasma levels of and in patients with disseminated malignant melanoma*. *Br J cancer*. 1998, 77, s. 1492-1494.
- KREJSEK, J.; KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2004. 941 s.
- LEVINA, V.; SU, Y.; NOLEN, B.; LIU, X.; GORDIN, Y.; LEE, M.; LOKSHIN, A.; GORELIK, E. *Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network*. *Int. J. Cancer*. 2008, 123, s. 2031-2040.
- LLOYD, A.C., OBERMÜLLER, F.; STADDON, S.; BARTH, C.F.; MCMAHON, M.; LAND, H. *Cooperating oncogenes to regulate cyclin/CDK complexes*. *Genes and Development* . 1997, 11, s. 663-677.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKYS.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York : WH Freeman: New York, 2004. 963 s.
- LUKEŠOVÁ, Š.; KOPECKÝ, O.; HLÁVKOVÁ, D.; VROBLOVÁ, V.; *Protinádorová imunitní odpověď*. *Alergie*. 2007, 3, s. 241-244.
- MAGER, D.L. *Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review*. *J Transl Med* . 2006, 14, 4, s. 1-18.
- MAIEROVÁ, V. *Studium možnosti kombinace proenzymoterapie s cílenou chemoterapií a s metabolickým ovlivněním nádorů*. České Budějovice, 2008. 49 s.

Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

- MARIANI, C.J.; RAJON, D.; BOVA, F.J.; STREIT, W.J. *Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas.* J Neurooncol. 2007, 85, s. 231-240.
- MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; LENNARTSSON, L.; LIU, Z.; TAMMELA, T.; RAITANEN, M.; HOLMBERG, A.R. *Charge-dependent targeting: result in six tumor cell lines.* Anticancer Research. 2004, 24, 1347-1352.
- MAZUMDER, A.; ROSENBERG, S.A. *Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin 2.* JEM. 1984, 159,2, s. 495-507.
- MCKINNELL, R.G.; PARCHMENT, R.E.; PERANTONI, A.O.; PIERCE, G.B. *Biological basis of cancer.* Second Edition. Cambridge : Cambridge University Press, 2006. 475 s.
- MIYATA, S.; KOSHIKAWA, N.; HIGASHI, S.; MIYAGI, Y.; NAGASHIMA, Y.; YANOMA, S.; KATO, Y.; YASUMITSU, H.; MIYAZAKI, K. *Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture.* J Biochem. 1999, 125, s. 1067-1076.
- MIZEJEWSKI, G.J. *Role of integrins in cancer: survey of expression patterns.* Proc Soc Exp Biol Med. 1999, 222, 2, s. 124-138.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.* Immunol Today. 1996, 17, s. 138–146.
- MOUSTAKAS, A.; PARDALI, K.; GAAL, A.; HELDIN, C.H. *Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling in regulation of cell growth and differentiation.* Immunology Letters. 2002, 82, 1-2, s. 85-91.
- MUSGROVE, E.A. *Cyclins: Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation* Mini Review. Growth Factors. 2006, 27, 1, s. 13-19.
- 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, s. 791-798.

- NAM, K.H.; KIM, Y.T.; KIM, S.R.; KIM, S.W.; KIM, J.W.; LEE, M.K.; NAM, E.J.; JUNG, Y.W. *Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia.* J Gynecol Oncol.. 2009, 20, 1, s. 39–43.
- NICOLSON, G-L. *Tumor cell interactions with the vascular endothelium and their role in cancer metastasis.* EXS. 1995, 74, s- 123-156.
- NIKJOO, H.; O'NEILL, P.; TERRISON, M.; GOODHEAD, D.T. *Modelling of radiation-induced DNA Damage: the early physical and chemical event.* International Journal of Radiation Biology. 1994, 66, 5, s. 453-457.
- NILSSON, M.B.; LANGLEY, R.R.; FIDLER, I.J. *Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine.* Cancer Res. 2005, 65, s. 10794-10800.
- NOUZA, K., OLEÁR, T.; NOUZA, M. *Systémová enzymoterapie.* Medicína. 1999, 6, 9, s. 21.
- NOUZA, K. *Přirozená (nespecifická, vrozená) imunita I.* Medicína. 2001, 8, 9, s. 22-23.
- NOVAK, J.F.; TRNKA, F. *Proenzyme therapy of cancer.* Anticancer res. 2005, 25, s. 1157-1178.
- NYBERG, P.; MOILANEN, M.; PAJU, A.; SARIN, A.; STENMAN, U.H.; SORSA, T.; SALO, T. et al. *MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasion of human tongue carcinoma cells.* J Dent Res. 2002, 81, 12, s. 831-835.
- NYBERG, P.; NYBERGA, P.; YIPALOSAARIA, M.; SORSAC, T.; SALO, T. *Trypsins and their role in carcinoma growth.* Exp Cell Res . 2006, 312, 8, s. 1219-1228.
- O'CONNELL, J.; BENNETT, W.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN, F. *Fas counter-attack—the best form of tumor defense?.* Nature Medicine. 1999, 5, 3, s. 267-268.
- ONDER, T.T.; GUPTA, P.B.; MANI, S.A.; YANG, J.; LANDER, E.S.; WEINBERG, R.A. *Loss of E-Cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways.* Cancer Research. 2008, 10, 68, s. 3645-3654.

- PAGET, S. *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. Lancet. 1889, 1, s. 571-573.
- PALLERONI, N.J.; BRADBURY, J.F. *Stenotrophomonas, a new bacterial genus for maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. Xanthomonas 1983*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1993, 43, 3, s. 606-609.
- PANDEY, R.; PATIL, N.; RAO, M. *Proteases and protease inhibitors: Implication in antitumorogenesis and drug development*. Int J Hum Genet. 2007, 1, 7, s. 67-82.
- PAWELEC, G. *Tumour escape from the immune response: the last hurdle for successful immunotherapy of cancer?*. Cancer Immunol Immunother. 1999, 48, s. 343-345.
- PETER, S.; BEGLINGER, C. *Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship*. Digestion. 2007, 75, 1, s. 25–35.
- PETERA, J.; BLÁHA, V.; ČERVINKA, M.; DOLEŽEL, M.; DVOŘÁK, J.; ELIÁŠ, P.; FILIP, S.; GERYK, E.; JANDÍK, P.; JÍLOKVÁ, V.; MELICHAR, B.; ODRÁŽKA, K.; PAPÍK, Z.; PETERA, J.; RYŠKA, A.; SVOBODA, V.; VÍŽDA, J.; VOŠMIK, M.; ZOUL, Z. *Obecná onkologie - učebnice pro lékařské fakulty*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2005. 205 s.
- PETRUŽELKA, L.; KONOPÁSEK, B.; ASCHERMANNOVÁ, A.; HELMICOVÁ, E.; JANKŮ, F.; KLEIBL, Z.; MALIŠ, J.; MAREŠ, P.; NOVOTNÝ, J.; PŘIBYLOVÁ, O.; ŠPIČKA, I.; TESAŘOVÁ, P. *Klinická onkologie*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2003. 274 s.
- PIRILA, E.; SHARABI, A.; SALO, T.; QUARANTA, V.; TU, H.; HELJASVAARA, R. KOSHIKAWA, N.; SORSA, T.; MAISI, P. *Matrix metalloproteinases process the laminin-5 gamma 2-chain and regulate epithelial cell migration*. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 303, s. 1012-1017.
- PUSZTAI, L.; CLAIRE, E.; YAP, E. *Cell proliferation in cancer*. Oxford : Oxford University Press, 1996. 397 s.
- RAVOET, C.; DE GREVE, J.; VAENDEWOUDE, K.; KERGER, J.; SCULIER, J.P.; LACOR, P.; STRYCKMANS, P.; PICCART, M. *Tumour stimulating effects of recombinant human interleukin-6*. Lancet. 1994, 344, s. 1576-1577.
- REID, S.D.; PENNA, G.; ADORINI, L. *The control of T cell responses by dendritic cell subsets*. Current Opinion in Immunology. 2000, 12, 1, s. 114-121.



- RHEE, S.H.; EUNOK, I.M.; POTHOUKAKIS, C. *Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer*. Gastroenterology. 2008, 135, s. 518-528
- ROUS, P. *A transmissible avian neoplasm . (Sarcoma of the common fowl.)*. J Exp Med.. 1910, 7, s. 696–705.
- SALAZAR-ONFRAY, F. *Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance*. Med Oncol. 1999, 16, s. 86-94.
- SALGADO, R.; JUNIUS, S.; BENOY, I.; DAM, V.; VERMEULEN, P.; VAN MARCK, E.; HUGET, P.; DIRIX, L.Y. *Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer*. Int J Cancer. 2003, 103, s. 642-646.
- SELL, S. *Stem cell origin of cancer and differentiation therapy*. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2004, 51, s. 1-28.
- SHIOZAKI, H.; OKA, H.; INOUE, M.; TAMURA, S.; MONDEN, M. *E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells*. Cancer. 1996,15;77(8 Suppl), s.1605–1613.
- SHURIN, M.R.; LU, L.; KALINAMI, P.; STEWART-AKERS, A.M.; LOTZE, M.T. *Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy*. Springer Semin Immunopathol 1999, 21, s. 339-359.
- SMIEG, J.; YANG, G.; FRANCK, R.W.; TSUJI, M. *Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide*. JEM. 2003, 198, 11, s. 1631-1641.
- SMITH, J.A. *Neutrophils, host defence, and inflammation: a double-edged sword*. Journal of Leukocyte Biology. 1994, 56, s. 672-686.
- SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A. *Chemokines and dendritic cell traffic*. J Clin Immunol. 2000, 20, 3, s. 151-160.
- ŠEDIVÁ, D.; STŘÍŽ, I. *Dendritické buňky a jejich úloha v imunitních reakcích*. Alergie. 2002, 4, 2, s. 0
- TEICHER, B.A. *Tumor models in Cancer research*. Humana Press Totowa, New Jersey. 2002, 690s.
- TRNKA, F.; RYBAK, M.; MAREK, R.; VAVRA, L. *Pharmaceutical composition containing an isolated protease proenzyme, amylase and aprotinin*. United States Patent. 1999, 5,858,375

- UCHIMA, Y.; SAWADA, T.; NISHIHARA, T.; UMEKAWA, T.; OHIRA, M.; ISHIKAWA, T.; NISHINO, H.; HIRAKAWA, K. *Identification of a trypsinogen activity stimulating factor produced by pancreatic cancer cells : Its role in tumor invasion and metastasis*. Int J Mol Med . 2003, 12, s. 871-878.
- VESELSKÝ, Z.; MACEK, P.; MORÁVEK, P.; MAŤHA, V.; FRÖSTL, M.; VIŠŇOVSKÝ, P.; PROŠVIC, P.; ODRÁŽKA, K.; VACULÍKOVÁ, M.; HOLUB, L. *Základy imunologie nádorových onemocnění*. Urologie pro praxi. 2004, 1, s. 17-19.
- VETVICKA, V.; DVORAK, B.; VETVICKOVA, J; RICHTER, J.; KRIZAN, J. *Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan phycarine stimulates both humoral and cellular immunity*. Int J Biol Macrom 2007, 40, s 291-298.
- VETVICKA, J.; VETVICKOVA, J. *An evaluation of the immunological activities of commercially available β1, 3-glucans*. Jana. 2007, 10, s. 25-31.
- VORLÍČEK, J.; ABRAHÁMOVÁ, J.; VORLÍČKOVÁ, H. *Klinická onkologie pro sestry*. První. Praha : Grada Publishing, 2006. 328 s.
- WALD, M.; OLEJÁR, T.; POUCKOVÁ, P.; ZADINOVÁ, M. *Proteinase reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with Lewis lung carcinoma* . Life Sci . 1998, 63, s. 237-243.
- WALD, M.; SEBKOVÁ, V.; ZADINOVÁ, M.; BOUBELÍK, M.; POUCKOVÁ, P. *Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extend survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16*. Cancer Chemother Pharmacol . 2001, 47, s. 16-22.
- WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B. *TGF-β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*. Current Opinion in Genetics & Development. 2002, 12, 1, s. 22-29.
- WEINZWEIG, J. *Plastic surgery secrets*. Philadelphia : Philadelphia : Hanley & Belfus, 1999. 645 s.
- YADA, K.; SHIBATA, K.; MATSUMOTO, T.; OHTA, M.; YOKOYAMA, S.; KITANO, S. *Protease-activated receptor-2 regulates cell proliferation and enhance cyclooxygenase-2 mRNA expression in human pancreatic cancer cells* . J Surg Oncol. 2005, 89, s. 79-85.

- ZALAUDEK, I; DOCIMO, G; ARGENZIANO, G. *Using dermoscopic criteria and patient-related factors for the management of pigmented melanocytic nevi.* Arch Dermatol.. 2009, 145, 7, s. 816-826.
- ŽIVNÁ, V. *Kombinovatelnost proenzymoterapie s látkami přímo atakujícími maligní nádory.* České Budějovice, 2008. 30 s. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

## 8. Příloha

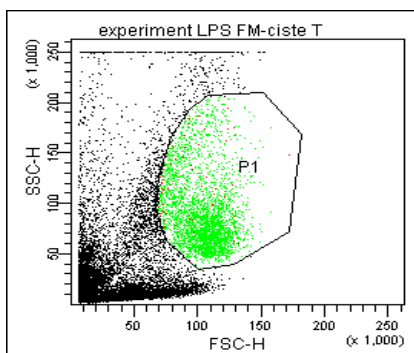
### 8.1 Příloha 1 - Cytotoxický test s melanomovými buňkami s navázaným LPS a FM

Příloha 1 ukazuje typické průběhy měření cytotoxického testu s naznačenými melanomovými buňkami. Tato měření byla prováděna na průtokovém cytometru za shodných podmínek (stejný průtok, stejné nastavení průtokového cytometru atd.). Grafické výsledky vidíme níže, postup je uveden v kapitole 3.15.4.

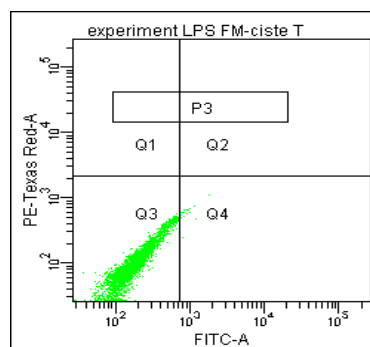
Na Obrázku 23 vidíme scattergram s neznačenými nádorovými buňkami, ze kterého byla vybrána populace buněk (P1) pro další analýzu. Scattergram zobrazuje závislost mezi velikostí parametru FSC (forward scatter) a SSC (side scatter). Hodnoty jsou relativní. Na základě morfologických vlastností, jako je velikost (FSC) a granularita (SSC) buněk můžeme ve scattergramu rozlišit různé typy buněk. Vybraná P1 oblast (populace nádorových buněk) zůstává pro všechny scattergramy v pokusu stejná. Z P1 populace byly pak vždy vybrány „singlety“ (jednotlivé buňky), ze kterých byl sestaven dvouparametrický dot plot, kde jsou na osách analyzovány jednotlivé fluorochromy (PE-Texas-Red a FITC), které odpovídají použitým fluorescenčním barvám v tomto pokusu (DiOC<sub>18</sub> a PE-Texas-Red). DiOC<sub>18</sub> odpovídá fluorochromu FITC a PI odpovídá fluorochromu PE-Texas-Red, viz. Obr. 24.

Dvouparametrický dot plot s neznačenými nádorovými buňkami (Obr. 24) byl rozdělen na 4 oblasti (Q1 – Q4). Buňky jsou do těchto oblastí rozděleny podle toho, jak jsou značeny (bude vysvětleno u jednotlivých histogramů).

Na dvouparametrickém dot plotu (Obr. 24) s neznačenými buňkami vidíme, že buňky jsou v oblasti Q3. V této oblasti se vyskytují buňky, které nejsou obarvené žádnou fluorescenční barvou. Na dvouparametrickém dot plotu (Obr. 24) můžeme vidět zobrazenou oblast P3, kterou se zde nebudeme zabývat. Slouží k odlišení makrofágů v obdobném pokusu v práci Maršíkové (*in. prep.*).

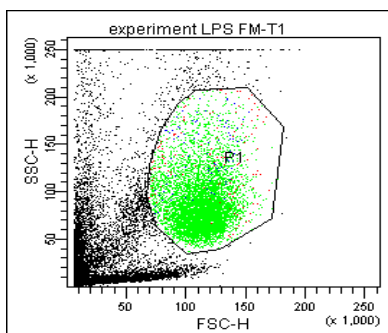


**Obr. 23:** scattergram neznač. nád. buněk v oblasti (SSC-H x FSC-H)

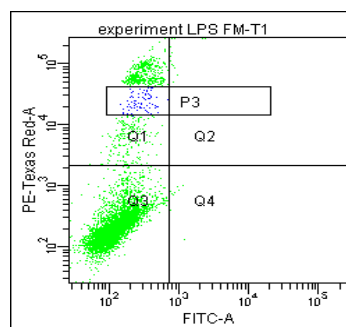


**Obr. 24:** neznač. nád. buňky PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 25 vidíme scattergram nádorových buněk nabarvených PI, na dalším obrázku (Obr. 26) vidíme dvouparametrický dot plot, kde se v oblasti Q3 vyskytují neznačené buňky (= živé) a v oblasti Q1 se vyskytují nádorové buňky naznačené PI (= mrtvé buňky).

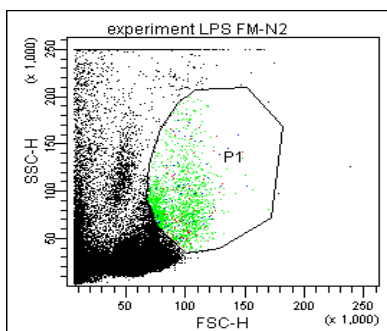


**Obr. 25:** scattergram nád. buněk naznačených PI (SSC-H x FSC-H)

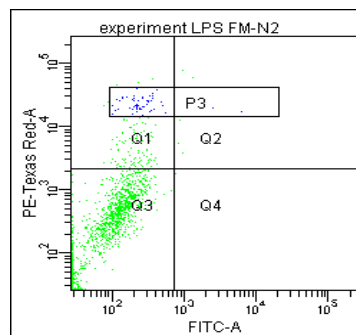


**Obr. 26:** nád. buňky naznačené PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 27 vidíme scattergram efektorových buněk (na neutrofilů bohatá populace buněk) nabarvených PI, na dalším obrázku (Obr. 28) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q3 vidíme neznačené buňky (živé buňky) a v oblasti Q1 vidíme efektorové buňky naznačené PI (mrtvé buňky).

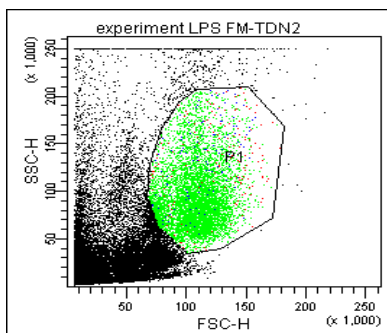


**Obr. 27:** scattergram efekt. buněk naznačených PI (SSC-H x FSC-H)

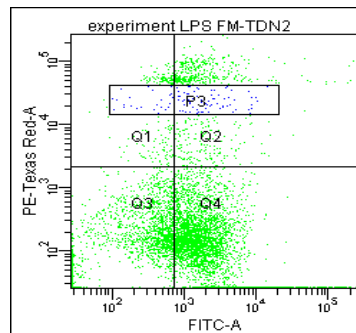


**Obr. 28:** efekt. buňky naznačené PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 29 vidíme scattergram nádorových buněk naznačených PI a DiOC<sub>18</sub> a efektorů (neutrofilů) naznačených PI, na dalším obrázku (Obr. 30) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q3 vidíme neznačené buňky (především živé neutrofilů) a v oblasti Q1 vidíme buňky naznačené PI (především mrtvé neutrofilů). V oblasti Q4 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> (především živé nádorové buňky) a v oblasti Q2 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI (především mrtvé nádorové buňky).

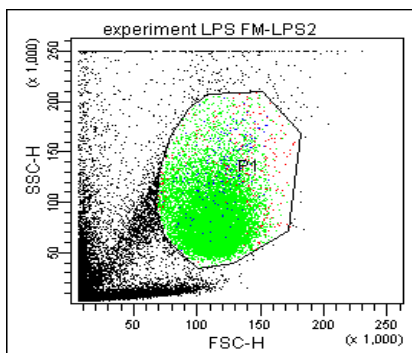


**Obr. 29:** scattergram nád. buněk naznačených PI a DiOC<sub>18</sub> + efekt. buňky naznačené PI (SSC-H x FSC-H)

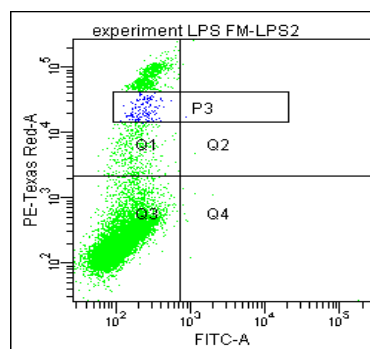


**Obr. 30:** nád. buňky naznačené PI a DiOC<sub>18</sub> + efekt. buňky naznačené PI v oblasti PE Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 31 vidíme scattergram nádorových buněk s navázaným LPS naznačených PI, na dalším obrázku (Obr. 32) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q3 vidíme neznačené buňky (živé buňky) a v oblasti Q1 vidíme buňky naznačené PI (mrtvé buňky).

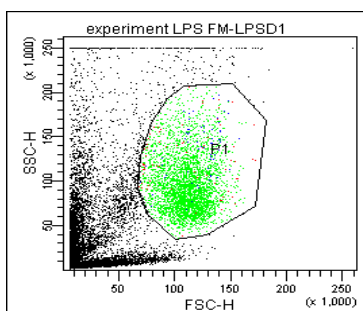


**Obr. 31:** scattergram nád. buněk s navázaným LPS a naznačených PI (SSC-H x FSC-H)

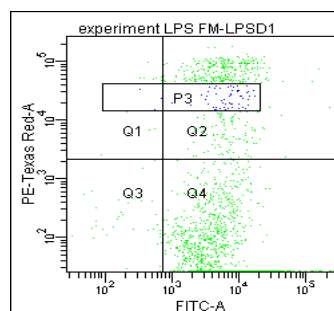


**Obr. 32:** nád. buňky s navázaným LPS a naznačené PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 33 vidíme scattergram nádorových buněk s navázaným LPS naznačených PI a DiOC<sub>18</sub>, na dalším obrázku (Obr. 34) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q4 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> (živé buňky) a v oblasti Q2 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI (mrtvé buňky).

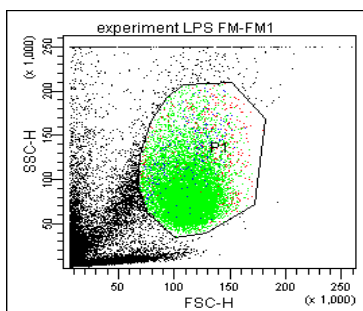


**Obr. 33:** scattergram nád. buněk s navázaným LPS a naznačených PI + DiOC<sub>18</sub> (SSC-H x FSC-H)

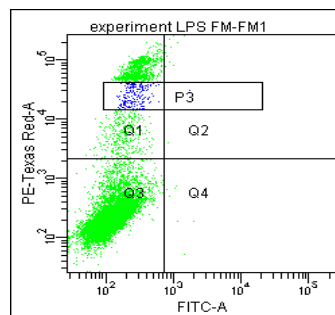


**Obr. 34:** nád. buňky s navázaným LPS a naznačené DiOC<sub>18</sub> + PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 35 vidíme scattergram nádorových buněk s navázaným FM (F-Met-Leu-Phe (Lys)12) naznačených PI, na dalším obrázku (Obr. 36) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q3 vidíme neznačené buňky (živé buňky) a v oblasti Q1 vidíme buňky naznačené PI (mrtvé buňky).

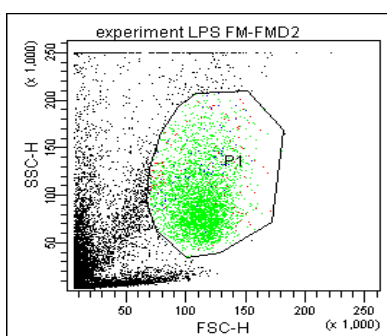


**Obr. 35:** scattergram nád. buněk s navázaným FM a naznačených PI (SSC-H x FSC-H)

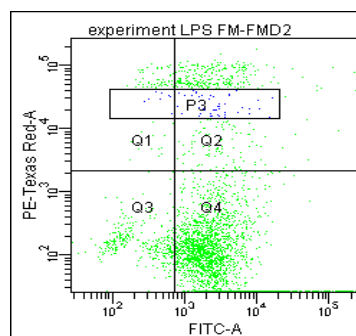


**Obr. 36:** nád. buňky s navázaným FM a naznačené PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 37 vidíme scattergram nádorových buněk s navázaným FM naznačených PI a DiOC<sub>18</sub>, na dalším obrázku (Obr. 38) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q4 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> (živé buňky) a v oblasti Q2 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI (mrtvé buňky).



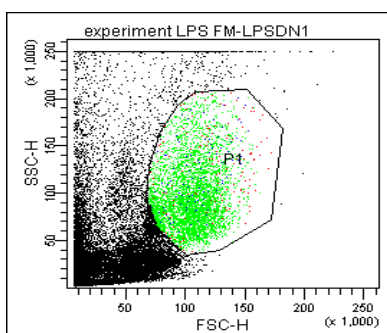
**Obr. 37:** scattergram nád. buněk s navázaným FM a naznačených PI + DiOC<sub>18</sub> (SSC-H x FSC-H)



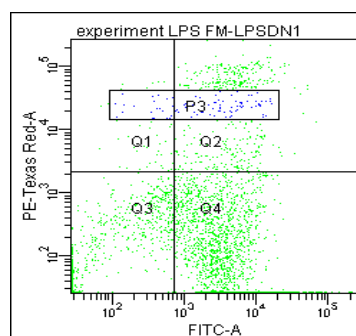
**Obr. 38:** nád. buňky s navázaným FM a naznačené DiOC<sub>18</sub> + PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 39 vidíme scattergram nádorových buněk s navázaným LPS naznačených PI a DiOC<sub>18</sub> a efektorů (neutrofilů) naznačených PI, na dalším obrázku (Obr. 40) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q3 vidíme neznačené buňky (především živé neutrofilů) a v oblasti Q1 vidíme buňky naznačené PI (především mrtvé neutrofilů). V oblasti Q4 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> (především živé nádorové buňky) a v oblasti Q2 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI (především mrtvé nádorové buňky). Toto jsou hlavní grafy cytotoxického testu s navázaným LPS.



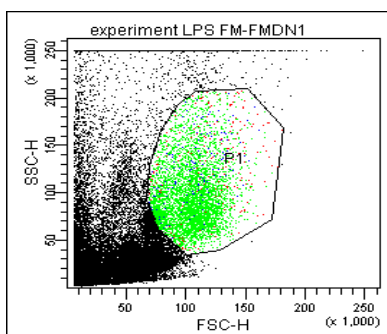


**Obr. 39:** scattergram nád. buněk s navázaným LPS a naznačených PI + DiOC<sub>18</sub> + efekt. buňky naznačené PI (SSC-H x FSC-H)

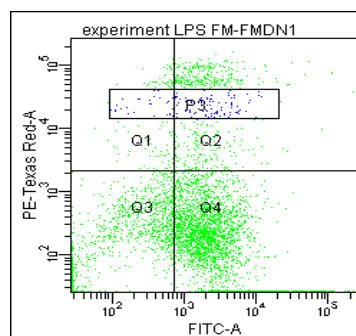


**Obr. 40:** nád. buňky s navázaným LPS a naznačené DiOC<sub>18</sub> + PI + efekt. buňky naznačené PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A

Na Obr. 41 vidíme scattergram nádorových buněk s navázaným FM naznačených PI a DiOC<sub>18</sub> a efektorů (neutrofilů) naznačených PI, na dalším obrázku (Obr. 42) vidíme dvouparametrický dot plot, kde v oblasti Q3 vidíme neznačené buňky (především živé neutrofilů) a v oblasti Q1 vidíme buňky naznačené PI (především mrtvé neutrofilů). V oblasti Q4 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> (především živé nádorové buňky) a v oblasti Q2 vidíme buňky naznačené DiOC<sub>18</sub> a PI (především mrtvé nádorové buňky). Toto jsou hlavní grafy cytotoxického testu s navázaným FM.



**Obr. 41:** scattergram nád. buněk s navázaným FM a naznačených PI + DiOC<sub>18</sub> + efekt. buňky naznačené PI (SSC-H x FSC-H)



**Obr. 42:** nád. buňky s navázaným FM a naznačené DiOC<sub>18</sub> + PI + efekt. buňky naznačené PI v oblasti PE-Texas-Red -A a FITC-A