

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Magisterská diplomová práce

Optimalizace proenzymoterapie nádorových onemocnění a studium jejího mechanismu

Bc. Hana Maršíková

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2010

Maršíková H., 2010: Optimalizace proenzymoterapie nádorových onemocnění a studium jejího mechanismu. [Optimization of proenzyme therapy of cancer diseases and the study of their mechanism. Mgr. Thesis, in Czech] – 58 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to optimize the proenzyme therapy of mice suffering of cancer and to study the mechanism of this therapy. We found the optimal way of application for proenzyme therapy. We studied the dynamics of metabolomic parameters during proenzyme therapy.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 30.10.2010

.....

Hana Maršíková

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za skvělé vedení, velké množství cenných rad a obrovskou trpělivost během vypracovávání této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD. za jejich vstřícnost, ochotu pomoci a poskytnutí prostředků a zázemí na Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Také děkuji RNDr. Petru Šimkovi, CSc. z Oddělení analytické biochemie Entomologického ústavu AV ČR za spoluúčast na této práci.

Mé velké díky patří rovněž všem kolegům z týmu, přátelům a rodině za všeobecnou podporu.

OBSAH

1. Úvod.....	1
1.1. Rakovina.....	1
1.1.1. Dělení rakoviny.....	1
1.1.1.1. Melanom.....	2
1.1.2. Kancerogeneze.....	3
1.1.2.1. Neomezený replikační potenciál.....	4
1.1.2.2. Independence na růstových signálech z okolí.....	4
1.1.2.3. Insensitivita vůči inhibujícím signálům.....	4
1.1.2.4. Rezistence vůči apoptóze.....	4
1.1.2.5. Angiogeneze.....	5
1.1.2.6. Invazivita a metastázování.....	5
1.1.3. Terapie.....	5
1.2. Nádorová imunologie.....	6
1.2.1. Buněční činitelé protinádorové imunity.....	7
1.2.2. Humorální činitelé protinádorové imunity.....	9
1.2.2.1. TGF- β	9
1.2.2.2. IL-10.....	10
1.3. Terapie maligních onemocnění založená na použití proteáz.....	10
1.3.1. Mechanismus proenzymové terapie.....	11
1.3.1.1. α -2-makroglobulin.....	12
1.3.1.2. α -1-antitrypsin.....	13
1.3.1.3. α -1-antichymotrypsin.....	13
1.3.1.4. Ostatní inhibitory proteáz	14
1.3.2. Aplikace (pro)enzymové terapie.....	14
1.3.2.1. Způsoby aplikace (pro)enzymové terapie.....	14
1.4. Terapie maligních onemocnění založená na stimulaci přirozené imunity.....	15
1.4.1. Mechanismus terapie.....	16
2. Cíle práce.....	21

3. Materiál a metody	22
3.1. Materiál	22
3.1.1. Chemikálie.....	22
3.1.2. Laboratorní zvířata a buněčné linie.....	22
3.2. Metody	23
3.2.1 Trypsinizace.....	23
3.2.2 Kontroly životnosti, počet buněk.....	23
3.2.3. Získávání makrofágů peritoneálním výplachem.....	23
3.2.4. Transplantace melanomu B16-F10.....	24
3.2.5. Měření velikosti nádorů.....	24
3.2.6. Cytotoxický test	24
3.2.8. Statistické zpracování dat.....	24
3.2.7. Uspořádání experimentů.....	24
3.2.7.1. Porovnání účinku proenzymoterapie při <i>s.c.</i> a <i>i.m.</i> podání.....	24
3.2.7.2. Dynamika průběhu účinku terapie.....	25
3.2.7.3. Porovnání účinku proenzymoterapie při <i>i.m.</i> a <i>i.p.</i> podání.....	25
3.2.7.4. Metabolomická analýza moči myší	25
3.2.7.5. Terapie nádorů za použití PAMPs – <i>in vitro</i>	26
3.2.7.5.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu.....	26
3.2.7.5.2. Sestrojení kalibrační křivky pro cytotoxický test.....	28
3.2.7.5.3 Terapie nádorů za použití LPS a FM – <i>in vitro</i>	28
3.2.7.6. Terapie nádorů za použití LPS a beta glukanu – <i>in vivo</i>	29
3.2.7.7. Terapie nádorů za použití sonikovaného Zymosanu A ve volné formě a po jeho svázání s polylysinem– <i>in vivo</i>	29
4. Výsledky	31
4.1. Porovnání účinku proenzymoterapie při <i>s.c.</i> a <i>i.m.</i> podání.....	31
4.2. Dynamika průběhu účinku terapie.....	31
4.3. Porovnání účinku proenzymoterapie při <i>i.m.</i> a <i>i.p.</i> podání.....	33
4.4. Dynamika proenzymoterapie z hlediska metabolomiky.....	34

4.5. Terapie nádorů za použití PAMPs – <i>in vitro</i>	35
4.5.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu.....	35
4.5.2. Sestrojení kalibrační křivky pro cytotoxický test.....	37
4.5.3. Terapie nádorů za použití LPS a FM – <i>in vitro</i>	37
4.6. Terapie nádorů za použití LPS a beta glukanu – <i>in vivo</i>	41
4.7. Terapie nádorů za použití volného sonikovaného ZymosanuA a Zymosanu A vázaného na nosič – <i>in vivo</i>	43
5. Diskuze	45
6. Souhrn.....	48
7. Seznam použité literatury.....	49

1. Úvod

1.1. Rakovina

Rakovina se ze zdravotního hlediska stává pro lidstvo velkou hrozbou. Hned po kardiovaskulárních onemocněních je to druhá nejčastější příčina úmrtí obyvatel vyspělých států. Ročně na ni zemře přes sedm milionů lidí a tendence této statistiky je stoupavá i navzdory značnému zlepšení diagnostických a terapeutických metod.

1.1.1. Dělení rakoviny

Rakovina je soubor více než 100 různých nádorových onemocnění, která se vyznačují nekontrolovaným buněčným dělením klonálního charakteru. Tento růst vytváří útvar – nádor, není v rovnovážném stavu s organismem a postihuje okolní orgány. Na základě invazivity dělíme nádory benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní útvary okolní tkáň pouze utlačují, většinou rostou pomalu a bývají opouzdřené, zatímco maligní nádory agresivně vrůstají do tkáně, jejich buňky narušují cévní stěnu a mohou se šířit krevním či lymfatickým řečištěm po celém těle. Tento proces se nazývá metastázování a jeho výsledkem bývají druhotná ložiska novotvarů, která se pro organismus stávají ohrožujícími na životě. Mezi nejčastější typy patří zhoubné novotvary kůže (především bazaliom), kolorektální karcinom, karcinomy plic a průdušnice, karcinom prsu u žen a nádor prostaty u mužů. Dále se může rakovina dělit podle druhu nádorové tkáně (histogeneze). Tak máme nádory tkáně krycí a výstelkové, pojivové, krve tvorné, žlázné či zárodečné (neuroektodermální) lišty a vzácné nádory ostatních tkání:

- **Epiteliální**

- benigní: epitelom, papilom

- maligní: karcinomy

- **Stromální**

- benigní: fibromy, chondromy, myomy

- maligní: sarkomy

- **Hematopoetické**

-maligní: leukémie, lymfomy

- **Neuroektodermální** (nádory centrální nervové soustavy a kůže)

-benigní (CNS): gliom, meningeom

-maligní (CNS): glioblastom, neuroblastom

-benigní (kůže): pigmentový névus

-maligní (kůže): melanom

- **Žlázových tkání**

-benigní: adenomy

-maligní: adenokarcinomy

- **Germinomy**

-benigní: teratomy

-maligní: teratokarcinomy, embryonální karcinom

- **Vzácné nádory z ostatních tkání**

1.1.1.1. Melanom

Maligní melanom vzniká zhoubným rakovinným bujením melanocytů (pigmentové buňky produkující melanin). Vyskytuje se převážně na kůži, ale může se objevit i na stěně střeva či v oku. Tento nádor má vysokou úroveň metastazibility, proto se řadí mezi nejagresivnější kožní nádory. Způsobuje 75% všech úmrtí spojených s rakovinou kůže. Každý rok je diagnostikováno přibližně 160 000 nových případů melanomu a okolo 48 000 lidí na něj zemře.

Lidské melanomy můžeme rozlišovat na 4 základní druhy (Čáp et al., 2005):

- **Povrchově se šířící melanom (SSM)**

SSM reprezentuje až 70 % všech maligních melanomů. U mužů jej obvykle najdeme v horních partiích trupu a u žen na bérkách nebo stehnech. Je charakterizován horizontálním růstem, jeho okraje jsou zpočátku relativně pravidelné, ale později získávají typické nepravidelné melanomové kontury.

- **Nodulární melanom (NM)**

NM tvoří až 20 % všech melanomů a řadí se tak na 2. místo v četnosti tohoto nádoru. Charakterizuje jej rychlý vertikální růst na podkladě melanocytárního névu nebo vzniká na klinicky intaktní kůži, zpravidla mívá přesné ohraničení.

- **Lentigo maligna melanom (LMM)**

LMM se tvoří na podkladě lentigo maligna, obvykle na obličeji u starších osob. Projev může dosahovat v průměru až 10 cm a k vertikálnímu růstu dochází až po mnoha letech.

- **Akrolentiginózní melanom (ALM)**

Klinicky se jedná o nodulární melanom nebo povrchově se šířící melanom v charakteristické lokalizaci bez přítomnosti vlasových folikulů, tedy na dlaních, ploskách nebo pod nehty. Prognosticky je tento typ nejrizikovější.

Myší melanomy se také dělí do čtyř kategorií. V této práci byl používán model B16-F10 na myších kmenu C57BL/6. Má spolu s modelem B16-BL6 vysokou schopnost metastazovat do plic. Dalšími modely jsou B16-F0 a B16-F6 (Nakamura et al., 2002).

1.1.2. Kancerogeneze

Existuje mnoho hypotéz o vzniku nádorového bujení. Dříve se uvažovalo o embryonální (Krebs, 1947), trofoblastové (Gurchot, 1975) či iritační teorii (Triolo, 1965). V dnešní době se považuje za nejschůdnější „mutační genová hypotéza“ (Fearon and Vogelstein, 1990), která označuje rakovinu za genetické onemocnění. Proces onkogeneze na buněčné úrovni úzce souvisí s kontrolou buněčné proliferace, diferenciaci a programované smrti buněk (apoptózy). Bylo popsáno mnoho karcinogenů a v molekulární biologii byly odhaleny desítky genů pro onkogeny a tumorové supresory (McBride et al., 1982). Mutační hypotéza předpokládá, že při maligní transformaci buňky dojde k sérii 4-7 mutací, díky kterým dojde k poruše v regulaci extracelulárních a intracelulárních kontrolních drah. Tato porucha kontroly umožňuje buňce získat následující vlastnosti (Hanahan and Weinberg, 2000):

1.1.2.1. Neomezený replikační potenciál

Somatické buňky mají omezený replikační potenciál. Každá populace plně diferenciovaných buněk se dělí cca 50x, poté hyne. Jedná se o tzv. Hayflickův limit (Hayflick, 1965). Během dělení dochází při replikaci DNA ke zkracování telomer. Po kritickém zkrácení je buňka směřována k apoptóze. Nádorové buňky však obsahují enzym telomerázu, který zkracování telomer zabraňuje. Takové buněčné linie získávají výhodu neomezeného počtu dělení a tím si zajistí nesmrtelnost.

1.1.2.2. Independence na růstových signálech z okolí

Aby se buňka dostala z klidového stadia do proliferačního, musí z okolí přijmout mitogenní růstový faktor přes transmembránové receptory. Nádorové buňky ovšem nevykazují přímou závislost na exogenních růstových signálech, čímž omezují možnost regulace okolní tkáně. Samy mají schopnost autokrinní produkce růstových signálů, mohou parakrinně indukovat tvorbu růstových signálů nebo se stanou hyperresponsivními k běžné hladině růstového faktoru, která by za běžných podmínek proliferaci nezpůsobila. Tímto obcházejí významný homeostatický mechanismus.

1.1.2.3. Insensitivita vůči inhibujícím signálům

Za normálních okolností je klidový stav buňky udržován spolu s homeostází četnými antiproliferativními signály. Ty jsou uloženy v extracelulární matrix a na povrchu přilehlých buněk. Jedná se o protein retinoblastoma (pRb), p107 a p130. Aby se mohla buňka stát nádorovou, nesmí být citlivá vůči těmto signálům. Užívá k tomu různých mechanismů, které ještě nebyly přesně popsány.

1.1.2.4. Rezistence vůči apoptóze

Rezistence vůči apoptóze je jednou z hlavních charakteristik nádorových buněk. Apoptóza je děj, kdy během 30 – 120 minut dojde k prasknutí buněčné membrány, cytoplasmatická a jaderná kostra jsou narušeny, cytosol vytlačen, chromozómy degradovány, jádro rozděleno a zbylé torzo je pohlceno jinou buňkou. Mnoho proapoptotických signálů směřuje na mitochondrie, které jsou zodpovědné za signály uvolněné cytochromem c (silným katalyzátorem apoptózy). Rezistence k apoptóze může být řízená různými mechanismy. Nejběžněji se vyskytuje ztráta proapoptotického regulátoru, které lze dosáhnout mutacemi zahrnujícími i tumor-supresorový gen p53. Mnoho regulačních a efektorových komponent je přítomno v nadbytkovém množství, na čemž se také nově zakládá vývojová větev terapie tumorů.

1.1.2.5 Angiogeneze

Aby se k buňkám dostalo dostatečné množství kyslíku a živin, musí být od kapilár uloženy v okruhu do 100 μm , což je zajištěno již během organogeneze. Ve zdravé tkáni je angiogeneze při zvýšené proliferaci buněk spíše potlačována, aby nedošlo k nekontrolovanému růstu. Vznik nádorové buňky je způsoben změnou rovnováhy angiogenních induktorů a vyrovnávajících inhibitorů. Běžnou strategií je změna v genové transkripci. Byla prokázána vyšší hladina induktorů VEGF a/nebo FGF vzhledem k okolní tkáni nebo snížená exprese endogenních inhibitorů, jako jsou thrombospondin-1 nebo β -interferon.

1.1.2.6 Invazivita a metastázování

Při úspěšném růstu maligního nádoru dochází k následné invazi a metastázování. Tak buňky opouštějí primární nádor. Invaze a metastázování jsou mimořádně komplexní procesy, které ještě nebyly detailně popsány. Oba využívají podobné mechanismy, kde se vyskytují změny fyzického spojení buňky s mikroprostředím a aktivace extracelulárních proteáz (Pandey et al., 2007). Tyto procesy jsou řízeny adhezivními molekulami (imunoglobuliny, cadheriny a integriny) a extracelulárními proteázami. Při současném vývoji technik bude již brzy možné objasnit expresi a funkční aktivitu proteáz a integrinů, což povede k lepším terapiím.

1.1.3. Terapie

V současné době neexistuje specifický test, který by umožnil detekovat nádorové bujení v raném stadiu, ale v některých případech se již uvažuje o Perp proteinu (Beaudry et al., 2010). V okamžiku diagnózy primárního nádoru jsou již v 30% případů vytvořeny metastázy. U těchto pacientů se predikuje pouze 10% šance na vyléčení. Úspěšnost vyléčení je charakterizována 5-ti letým přežitím od ukončení terapie. Je podmíněna chirurgickým odstraněním nádorové tkáně včetně potenciálně zasažených sousedních struktur (bezpečnostní lem). Po tomto zákroku většinou následuje adjuvantní léčba, kam řadíme radiochemoterapii či chemoterapii. Používaná cytostatika působí antiproliferativně nejen na nádorové, ale i na zdravé buňky. Je využíváno toho, že nádorové buňky mají mitotický cyklus přibližně dvakrát delší než buňky zdravé, které se dříve zregenerují, a je možno provést další aplikaci. Tak se postupně minimalizuje počet nádorových buněk.

1.2. Nádorová imunologie

Imunitní systém je součástí základních homeostatických mechanismů organismu, který rozpoznává a likviduje patologické elementy vnějšího i vnitřního původu. Zahrnuje dva mechanismy: nespecifickou (vrozenou) a specifickou (adaptivní) imunitu.

Nespecifické mechanismy jsou evolučně starší, buněčné i humorální složky jsou již v organismu připraveny, proto imunitní reakce probíhá rychle (řádově v minutách). To je ovšem vyváženo absencí imunologické paměti. Buněčná složka je reprezentována fagocytujícími buňkami a buňkami přirozeně cytotoxickými, humorální je tvořena komplementovým systémem, interferony, lektiny a pod.

Nejdůležitějším mechanismem pro funkci **specifické imunity** je vznik antigen specifických receptorů na B a T lymfocytech. Výsledkem náhodného přeskupování genových segmentů u genů pro T a B buněčné receptory je existence obrovského množství receptorů s přesně definovanou specifitou. Daní za tuto velkou zásobárnu antigen specifických lymfocytů je, že lymfocytů pro jeden určitý antigen je velmi malé množství. Po aktivaci specifického lymfocytu musí nejprve dojít ke klonální expanzi a teprve po vytvoření dostatečné populace efektorových buněk dojde k rozvoji primární specifické imunitní reakce. Na druhou stranu se při opakovaném setkání s daným patogenem tvoří imunologické paměťové buňky, díky kterým je následující imunologická odpověď daleko rychlejší.

Protinádorová imunoterapie se v posledních letech dostává do popředí zájmu díky značnému pokroku v porozumění kontrolních mechanismů imunitního systému a rozvoji celé vědy jako takové. Uvažuje se o využití adaptivní i vrozené imunity. Důležité je specifické rozpoznání tumoru a schopnost destruovat jej dříve, než se klinicky projeví jako závažné onemocnění. Pro spuštění imunologické reakce vůči nádorovým buňkám je nutná detekce nádorových antigenů. Tyto antigeny se dělí do dvou kategorií: antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA).

TAA se vyskytují nejen na nádorových, ale slabě také na normálních buňkách. U melanomu je tedy najdeme v buňkách melanomu i na běžných melanocytech. Mají nádorový antigen na genu MART-1/MelanA, vůči kterému se rozvíjí cytotoxická reaktivita (Cormier et al., 1998).

TSA se vyskytují pouze na nádorových buňkách jako důsledek produkce abnormálních proteinů díky mutačně pozměněnému genomu buňky. Jsou prezentovány v

komplexu s MHC I molekulami. TSA melanomu jsou transkribovány z genu MAGE či TRP2 (Coulie et al., 2001).

Nádorové buňky ale samy o sobě nefungují jako antigen prezentující buňky, neexprimují totiž kostimulační faktory. Navíc ovládají řadu mechanismů, jak uniknout před imunitním dohledem. Spuštění imunitního mechanismu vůči nádorům je tedy velmi komplikovaná reakce.

1.2.1. Buněční činitelé protinádorové imunity

Granulocyty jsou nejpočetnější populací leukocytů. Obsahují granula biologicky aktivních látek, které pak v průběhu zánětlivé reakce uvolňují, čímž dochází k eliminaci infekčních agens. Diferenciací granulocytů vzniká eosinofilní, neutrofilní či bazofilní větev. Obzvláště neutrofilny mají schopnost fagocytózy opsonizovaných patogenů a jiných cizorodých částic. Granulocyty jsou také důležitým zdrojem cytokinů, mohou regulovat funkce imunitního systému, tedy i protinádorovou imunitu.

Makrofágy jsou terminálním diferenciačním stádiem monocyto-makrofágové linie. Monocyty a makrofágy tvoří významnou skupinu fagocytů vrozené imunity, ovšem podílí se také na specifické imunitě jako profesionální APC (antigen-presenting cell) a jsou schopny sekrece řady důležitých proteinů. Rozpoznávají mikrobiální vzory asociované s patogenem (PAMPs, viz dále), aktivují se a produkují prozánětlivé cytokiny, např. TNF α . Zároveň mohou fagocytovat infekční agens, antigeny navázat na MHC II. třídy a prezentovat je T lymfocytům. Klasickým znakem monocytů je molekula CD14, která umožní rozpoznání komplexů mikrobiálního LPS. Po vstupu z krevního řečiště do tkáně začne makrofág na svých ribozomech (polynomech) produkovat CD68, dále také F4/80 u myši a lidské EMR1 (Khazen et al., 2005). Makrofágy různých orgánů mají typické cytomorfologické charakteristiky. Nejpočetnější skupinou jsou Kupfferovy buňky v játrech (70%). Významné efektorové funkce v obraně plicního kompartmentu zastávají plicní makrofágy. Ty pohlcují mikroorganismy včetně mikrobů se schopností intracelulárního parazitismu. Plicní makrofágy vytvářejí pomocí IFN γ spolu s CD4⁺ T lymfocyty subsetu TH1 granulom jako odpověď na mykobakteriální infekci (Krejsek and Kopecký, 2004).

Makrofágy asociované s nádory **TAM** (tumor associated macrophages) tvoří většinu leukocytů přítomných v nádoru. Při optimální aktivaci (IFN γ , LPS) dochází k cytotoxicitě vůči nádorovým buňkám. Může se jednat o makrofágy-zprostředkovanou nádorovou cytotoxicitu (MTC), která účinkuje pomocí TNF α (Urban et al., 1986) či oxidu dusného (Hibbs et al., 1988), nebo může jít o buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC).

Dendritické buňky jsou nejvýznamnějšími antigen prezentujícími buňkami, podílejí se tedy na specifické protinádorové imunitě. Po kontaktu s patogenem tyto buňky migrují do sekundárních lymfatických orgánů. Exprimují MHC I. i II. třídy, dochází ke klonální expanzi antigen-specifických T lymfocytů a následně k aktivaci B lymfocytů. Dendritické buňky mohou být aktivovány mikroorganismy, virovými partikulami, ale také molekulovými vzory apoptotických buněk.

NK (natural killers), přirozeně zabíječské buňky jsou významnou buněčnou součástí přirozené imunity. Vyznačují se schopností cytotoxicky likvidovat virem infikované a nádorové buňky. Mohou také regulovat zánětovou odpověď pomocí svých cytokinů ovlivňujících krvetvorbu a T lymfocytární systém. Mají na svém povrchu KAR (killer activation receptor) s aktivačním motivem v cytoplazmatické části povrchu a KIR (killer inhibition receptor) s inhibičním motivem. Celková suma těchto signálů vede NK buňky buď k vyhodnocení ověřované buňky jako normální, pak NK buňky ne zahájí cytolytický proces a odpoutají se od této buňky, nebo spustí cytotoxické reakce zprostředkované membránovými interakcemi a produkcí solubilních faktorů z cytoplazmatických granulí NK buněk (perforiny, granzymy). Tento proces je nezvratný a vede k indukci apoptózy (Krejsek and Kopecký, 2004).

Lymfocyty typu T se aktivují po rozpoznání antigenu pouze ve spojení s MHC molekulami. Rozlišujeme dvě základní subpopulace – Th a Tc.

Th (helper) buňky exprimují molekulu CD3 a CD4+, existují v subsetu Th1, které specificky rozpoznávají nádorové antigeny a produkují IFN γ , TNF a IL-2. Druhým subsetem jsou Th2 lymfocyty produkující IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Tyto dvě skupiny se vzájemně inhibují.

Tc (cytotoxické) buňky exprimují molekulu CD3 a CD8+. Ničí virem infikované a nádorové buňky, které detekuje po rozpoznání antigenu prezentovaného MHC molekulami I. třídy.

Treg (regulační) buňky působí imunosupresivně a tlumí zánětlivé reakce pomocí regulace Th1 lymfocytů. Produkují IL-4, IL-10 a TGF- β .

Lymfocyty typu B jsou odpovědné za protilátkovou imunitu. Exprimují MHC molekuly II. třídy, kostimulační molekuly a patří k základním antigen prezentujícím buňkám (Veselský et al., 2004).

1.2.2. Humorální činitelé protinádorové imunity

Cytokiny jsou v protinádorové imunitě velmi důležité. Regulují směr imunitní odpovědi. Celkovou charakteristiku prostředí nádoru určuje přítomnost leukocytů, ať již v okolí nádoru nebo přímo v jeho tkáni. Jedná se o nesourodou populaci lymfoidních buněk, značnou část tvoří T lymfocyty. Při chorobách dochází v organismu k narušení Th1/Th2 rovnováhy. Při zánětu převládá Th1 odpověď, v případě nádorového onemocnění Th2 odpověď. Th1 lymfocyty odpovídají za cytotoxickou reaktivitu namířenou proti nádoru, typická je tvorba cytokinů INF- γ , IL-2 a TNF- β (Onishi et al., 1999). Imunomodulační INF γ zesiluje expresi molekul MHC I na povrchu buněk nádoru, tudíž se stanou senzitivnějšími vůči nádorově specifickým cytotoxickým CD8+ T lymfocytům. Dochází také k účinnějšímu zpracování a prezenci nádorových antigenů a tím k rozvoji specifické T lymfocytární imunity (Krejsek and Kopecký, 2004).

V oblasti nádorů ovšem převládá populace Th2 lymfocytů (Shurin et al., 1999), která je charakterizována tvorbou IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 (Stevens et al., 1988). Také se zde nachází populace Treg lymfocytů, která produkuje IL-10 a TGF- β (Levings et al., 2002). Působení těchto uvedených cytokinů nevede k účinné reakci namířené proti nádoru, ale právě naopak – tlumí produkci vhodných cytokinů Th1 lymfocytů. Tyto pronádorové cytokiny jsou produkovány i samotnými nádorovými buňkami. Tím inhibují B-lymfocyty, dendritické buňky, monocyty/makrofágy i NK buňky.

1.2.2.1. TGF- β

TGF- β (transforming growth factor beta) je skupina cytokinů produkovaných převážně Treg lymfocyty, ale také nádorovými buňkami, monocyty, fibroblasty, chondrocyty, osteoblasty či trombocyty (Letterio and Roberts, 1998). Většina somatických buněk je na tento faktor také citlivá. Jedná se o homodimerní proteiny. V organismu se uplatňují různými způsoby. Podílí se na regulaci proliferace, diferenciaci, migrace, adheze, angiogeneze, apoptózy, hormonů a imunitního systému. Působením TGF- β na CD4+ lymfocyty dochází ke vzniku Treg lymfocytů, které přímo nebo produkcí TGF-beta potlačují aktivitu cytotoxických lymfocytů a tím napomáhají nádorové toleranci. Hladina TGF- β v séru koreluje s vývojem rakoviny a dobou přežití (Gold 1999). Nádorové buňky samy potlačují svou citlivost na TGF- β několika mechanismy: snížením exprese receptorů pro TGF- β (Paterson et al., 2001), inaktivujícími mutacemi receptoru TGF- β (Garigue-Antar et al., 1995) nebo změnami v postreceptorové signalizační dráze obsahující tzv. Smad proteiny (West et al., 2000).

Makrofágy jsou TGF- β ovlivňovány několika způsoby. Inhibuje proliferaci prekursorových buněk makrofágů v kostní dřeni i další vývojová stadia této buněčné linie, tudíž celkově tlumí produkci makrofágů (Strassman et al., 1988). Dále potlačuje proliferaci makrofágů indukovanou lipoproteinem_a (Sato et al., 1996), tlumí cytolytickou funkci aktivovaných makrofágů (lipopolysacharidem, IFN- γ) odvozených z kostní dřeni (Pinson et al., 1992).

TGF- β potlačuje aktivitu T lymfocytů. Specificky inhibuje expresi cytolytických genových produktů, zejména perforinu v periferních CD8+ T lymfocytech (Smyth et al., 1991), granzymu A, granzymu B, Fas ligandu a interferonu γ (Thomas and Massagué, 2005).

TGF- β má rovněž inhibiční vliv na NK buňky, snižuje jejich syntézu DNA a produkci cytokinů (Bellone et al., 1995).

Pokusy založené na inhibici produkce TGF- β antimediatórovou strategií, nebo neutralizací TGF- β protilátkami prokázaly jisté zvýšení imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám u zvířecích modelů. Ovšem dlouhotrvající účinek této terapie a aplikace u lidí je stále diskutabilní (Lauer et al., 2001).

1.2.2.2. IL-10

IL-10 také podporuje tumorigenezi různými mechanismy. Je produkován antigenem stimulovanými Th lymfocyty (Prete et al., 1993), B lymfocyty, monocyty, makrofágy či mastocyty. Imunitní systém ovlivňuje tak, že potlačuje produkci cytokinů (Waal et al., 1991), prostaglandinů (Berg et al., 2001) nebo oxidu dusnatého (Alleva et al., 1994). Může také snížit expresi MHC I (Terrazzano et al., 2000). Působení IL-10 ale není zcela jednosměrné, je pro i protinádorové. Někdy stimuluje produkci cytokinů NK buňkami (Carson et al., 1995), čímž se projeví i jeho protinádorová aktivita.

1.3. Terapie maligních onemocnění založená na použití proteáz

První zmínky o (pro)enzymoterapii pocházejí z počátku 20.století. Skotský embryolog John Beard (1857-1924) si během své práce povšiml jisté analogie mezi trofoblastem a nádorem. Pro zajištění správné výživy embrya musí trofoblast nidovat do stěny dělohy, což vyžaduje schopnost invazivity a agresivity. Zjistil, že u placentálních živočichů se pankreas vyvíjí právě v době, kdy dochází ke zpomalení růstu placenty. Předpokládal tedy, že nově vznikající pankreatická žláza již produkuje enzymy, které by mohly mít inhibiční efekt na

placentu. Nepotlačený trofoblast se může vyvinout v choriokarcinom. Beard se tedy pokusil zjistit, jak proteolytický enzym trypsin působí na nádorové buňky a své domněnky potvrdil (Beard, 1906; Beard, 1911). Nazval tuto léčbu trypsinovou terapií. Používal čerstvý extrakt z pankreatu, což naznačuje přítomnost spíše proenzymů než enzymů, ale existence neaktivních proenzymů nebyla v té době ještě známa. Na tuto skutečnost poprvé upozornili Novák s Trnkou (Novák and Trnka, 2005).

Beard měl mnoho následovníků (Cleaves, 1906; Golley, 1906; Campbell, 1907). Pokusy *in vitro* prokázaly inhibiční vliv na invazivitu a migraci nádorových buněk. *In vivo* byla použita směs amylázy a trypsinogenu, která také vykazovala terapeutický efekt, zejména na snížení množství metastáz melanomu B16-F10 (Novák and Trnka, 2005). Amyláza jako taková léčebný efekt nemá, spíše likviduje glykoproteiny vzniklé při rozpadu nádorových buněk. Dalším novodobým pokračovatelem je Wald (Wald et al., 2001). Využíval kombinaci trypsinu, papainu a chymotrypsinu, čímž bylo také dosaženo redukce počtu metastáz. My využíváme směs trypsinogenu, chymotrypsinogenu a podpůrné amylázy. Tato terapie byla použita na nádorové modely melanom B16-F10 (Kalferstová, 2008) a sarkom S-180 (Kaiserová, 2008, 2010), léčba byla statisticky významná.

1.3.1. Mechanismus proenzymové terapie

Proenzymy jako neaktivní forma nemají samy o sobě terapeutický účín. Teprve v přímé blízkosti nádoru se střetnou s tamějšími proteázami a dojde k jejich aktivaci. Může se jednat například o enterokinázu (Yamamoto et al., 2003), katepsin_B (Podgorski and Sloane, 2003) nebo o nádorem produkováný trypsin (Nyberg et al., 2002). Po aktivaci terapeutických enzymů dojde k jejich následnému vyloučení sérovými inhibičními proteázami (alfa-2-makroglobulin, alfa-1-antitrypsin, alfa-1-antichymotrypsin). Komplex alfa-2 makroglobulin – proteáza vylučuje různé cytokiny, přednostně však TGF- β , který se v prostředí vyskytuje ve zvýšené koncentraci. Tím se zamezí další indukci imunosuprese, neboť pod vlivem TGF- β se tvoří z CD4+ lymfocytů Treg lymfocyty. Ty produkcí TGF- β podporují svoji tvorbu (autokrinní smyčka). Treg pomocí TGF- β a kontaktem brzdí atak CTL. Vytvářejí tak stav nádorové tolerance. Působením komplexu alfa-2 makroglobulin-proteáza dochází k obnovení Th1/Th2 rovnováhy. Tento proces je považován za hlavní mechanismus enzymoterapie i proenzymoterapie (Becker et al., 2006).

1.3.1.1. α -2-makroglobulin

α -2-makroglobulin (α 2M) má ze všech sérových inhibičních proteáz nejširší spektrum uplatnění. Dokáže na sebe specificky navázat enzymy všech čtyř hlavních tříd - aspartátové proteázy, cysteinové proteázy, matrixové metaloproteázy a serinové proteázy. Jedná se tetramerický glykoprotein s relativní molekulovou hmotností 718 kDa. Dvě podjednotky jsou vždy mezi sebou spojeny disulfidickým můstkem. Dva tyto dimery se pak k sobě vážou nekovalentními vazbami v homotetramer (Swenson and Howard, 1979). α 2M má několik reaktivních míst (bait region, interní β -cysteinyl- γ -glutamyl thiolester, receptor-vázající oblast, transglutaminázová reaktivní oblast a metaloprotein), díky kterým získává různé funkce v organismu (jako vazebný, nosný či jiný protein).

Bait region je oblast 25 aminokyselin přibližně uprostřed každé podjednotky. Může se na ni navázat prakticky jakákoli proteáza, ať už vlastního či cizího původu. Nejedná se o kovalentní vazbu, při reakci α 2M s proteázou dochází k hydrolytickému štěpení peptidové vazby *bait regionu*, což vyvolá konformační změnu α 2M. Tato změna proteázu doslova uzavře uvnitř inhibitoru, tudíž se struktura stává ireversibilní a je možné navázání pouze jednoho enzymu. Enzym si však i nadále zachovává svou aktivitu a štěpí malé proteiny, které jsou schopny projít touto strukturou. Trypsin je na α 2M vázán čtyřikrát rychleji než chymotrypsin a stokrát rychleji než plasmin (Howell et al., 1983). α 2M je rozeznáván ve dvou konformacích. „Slow forma“ je aktivní proteázový inhibitor, není rozpoznávána LRP receptorem (nízko-denzitní lipoproteinový receptor vázající protein) a v krvi je stabilní. „Fast forma“ vzniká konformační změnou po navázání proteázy a je rozpoznávána LRP receptorem. Některé typy buněk mají tyto membránové LRP receptory pro α 2M-proteinázový komplex. Jedná se převážně o hepatocyty, makrofágy nebo fibroblasty (Pizzo and Gonias, 1984). Především makrofágy jsou zodpovědné za přednostné odstranění α 2M-proteinázových komplexů z cirkulace (Saksela et al., 1984).

Hlavním zdrojem α 2M jsou hepatocyty, v menší míře je produkován i jinými buňkami. Inhibitor je přítomný v séru ve vysokých koncentracích: 2-4 mg/ml (James, 1990), v průběhu života jeho hladina klesá. Tento jev má zřejmě souvislost s příchodem nemocí ve stáří, jako jsou infekce, degenerační nemoci či rakovina. Uvažuje se o jeho vlivu na imunitní reakce, protože může regulovat cytokinovou rovnováhu daného prostředí (Saksela et al., 1984).

Cytokiny a růstové faktory se na α 2M vážou jiným způsobem. K jejich pohlcení není potřebné štěpení peptidických vazeb, thiolesterových vazeb, ani konformační změna, ovšem k „fast“ formě (tedy ke komplexu α 2M-proteáza) mají zpravidla vyšší afinitu (Crookston et

al., 1993). Pro navázání TGF- β je významná stechiometrie komplexu α 2M a proteázy. Binární komplexy (1:1) α 2M s trypsinem a chymotrypsinem ukazují zvýšenou vazbu TGF- β ve srovnání s nativním α 2M. Když je α 2M nasycený proteázami do formy 2:1 (dvě molekuly proteáz na jednu molekulu α 2M) je TGF- β vazba stejná či nižší oproti nativnímu α 2M (Hall et al., 1992). Komplex α 2M-proteáza-cytokin je z krevního oběhu poměrně rychle rozpoznáván LRP receptory makrofágů a vychytáván (Lillis et al., 2005).

1.3.1.2. α -1-antitrypsin

α -1-antitrypsin (α 1AT) se také řadí mezi sérové inhibiční proteázy. Tento monomerní glykoprotein s relativní molekulovou hmotností 54 kDa inhibuje nejen trypsin, ale také chymotrypsin, elastázu, plazmin či trombin (Laurell and Jeppsson, 1975). Jeho hodnota bývá zvýšena při akutní fázi mnoha onemocnění, proto bývá jeho kvantifikace často využívána k diagnostickým účelům (Takahara and Sinahora, 1982).

Všichni savci zřejmě produkují několik homologních inhibitorů trypsinu, které se ale druhově liší. V myším séru byly objeveny dva homology lidského α 1AT - myší α 1AT (53kDa) a contrapsin (55kDa). Bylo pozorováno, že myší sérum má daleko vyšší schopnost inhibice trypsinu než lidské sérum (Takahara a Sinohara, 1982). Při pokusech se zjistilo, že hodnoty těchto inhibitorů jsou rozdílné mezi samci (α 1-antitrypsin 5,2mg/ml, contrapsin 2,8mg/ml) a samicemi (α 1-antitrypsin 3,5mg/ml, contrapsin 2,1mg/ml).

Antiproteázy α 1AT a contrapsin si jsou velmi podobné v chemických a fyzikálně-chemických vlastnostech. Mají přibližně stejný obsah sacharidů: 10-15% (Wait et al., 2005) i podobnou sekundární strukturu: 24-29% α -helix, 31% β -sheet a 10-11% β -turn (Takahara et al., 1984). V terciální struktuře se ale liší, což má za následek rozdílnost v antigenicitě a inhibičním spektru těchto proteáz (Takahara et al., 1983). Lidský α 1AT má inhibiční spektrum podobné jako myší α 1AT a contrapsin dohromady. Spektra myšího α 1AT a contrapsinu se však nepřekrývají, nebyla prokázána zkřížená reaktivita. Contrapsin inhibuje jen trypsin a trypsin-like proteázy (Takahara a Sinohara, 1982), α 1-antitrypsin inhibuje navíc chymotrypsin a elastázu.

1.3.1.3. α -1-antichymotrypsin

α -1-antichymotrypsin (α 1AHT) rovněž patří do rodiny inhibitorů serinových proteáz. Byl objeven jako inhibitor proteáz akutní fáze (Dickson and Alper, 1974). Jeho produkci zajišťují hepatocyty, epiteliální buňky bronchů a neurony. Reguluje hladinu proteáz produkovaných lymfocyty v průběhu zánětlivé odpovědi (Travis et al., 1978).

Struktura je podobná jako u ostatních inhibitorů, stejně tak mechanismus vychytávání proteáz ze séra.

1.3.1.4.Ostatní inhibitory proteáz

Do této skupiny bychom mohli zařadit například α -2-antiplasmin, elastin a antithrombin III. Tyto inhibitory však nemají příliš důležitou roli v procesech (pro)enzymoterapie, proto jim nebudeme věnovat větší pozornost.

1.3.2. Aplikace (pro)enzymové terapie

Enzymoterapii v současné době chápeme jako imunomodulaci. Nejvíce využívanými enzymy v této terapii jsou: trypsin, chymotrypsin, bromelin a papain (např. Wobenzym, Wobe-Mugos). V krevním oběhu jsou proteázy vychytávány cirkulujícími inhibitory proteáz, jako např. α -2-makroglobulinem a α -1-proteázovými inhibitory. Z disociačních konstant těchto komplexů vyplývá, že tato vazba je velmi silná a tudíž nelze předpokládat, že by navázané proteázy mohly atakovat nádorové buňky. Toto tvrzení bylo experimentálně potvrzeno (Ženka, nepublikováno). Vychytávání přebytečného množství cytokinů vrací organismus do rovnovážného stavu ze stavů jako jsou zánět, chronický zánět, nádorová a autoimunitní onemocnění.

Použití proenzymů je daleko výhodnější, neboť ty se krevním řečištěm volně pohybují a jejich aktivace probíhá zřejmě až v místě nádoru. Můžeme se tak domnívat, že tato terapie je více cílená, v oblasti nádoru koncentrovanější a tedy i účinnější. Proto lze použít i menší množství proteáz (Novák and Trnka, 2005). Kaiserová a Ženka (in prep.) prokázali synergický účinek trypsinogenu a chymotrypsinogenu. Optimalizovali také množství amylázy, která má sice jen podpůrný vliv, ale v kombinaci s proenzymy zlepšuje průběh terapie.

1.3.2.1. Způsoby aplikace (pro)enzymové terapie

Otázka způsobu aplikace enzymů bývá velmi diskutována. Terapie u lidí upřednostňuje perorální podávání. Pacientovi je však nutno podat nadměrné množství (řádově v gramech na den) proteáz v kapslích ochraňujících proti degradaci žaludečními kyselinami. Někteří vědci říkají, že ani při tak vysokých koncentracích se proteázy do krevního oběhu nedostanou (Gevert et al., 2004). Jiní autoři tvrdí, že přes stěnu tenkého střeva jsou absorbovány alespoň dávky minimální (0,002-0,0025%), respektive mírně vyšší (0,01-0,001)

dávky (Ziv et al., 1987; Šťastný et al., 2002). Při podání proenzymů je možné dosáhnout stejného účinku terapie s desetinovými koncentracemi.

V experimentech na myších se využívá spíše perrektální aplikace. V kombinaci se směsí trypsinu, chymotrypsinu a papainu došlo k výraznému snížení výskytu metastáz melanomu (Wald et al., 2001). Také při *s.c.* podání trypsinogenu a amylázy byl pozorován terapeutický účín na organismus myši s melanomovým nádorovým onemocněním B16-F10 (Novák and Trnka, 2005).

Naše proenzymoterapie je založená na směsi trypsinogenu, chymotrypsinogenu a amylázy. Proteázy mají synergický vliv. Po optimalizaci koncentrace se směs podávala *i.m.* myším se sarkomovým modelem S-180 (Kaiserová, 2008). Byla prokázána účinnost v redukci růstu nádorů a byla prodloužena doba přežití oproti kontrolním skupinám. *I.m.* aplikace této směsi u myši s nádorovým modelem melanomu B16-F10 vedla nejen k redukci nádorového růstu, ale také bylo dosaženo snížení výskytu metastáz (Kalferstová, 2008).

Také při intraperitoneálním (*i.p.*) podání směsi trypsinogenu, chymotrypsinogenu a amylázy myším s nádorovým modelem B16-F10 docházelo k evidentnímu potlačení růstu nádorů (Kalferstová, 2010).

1.4. Terapie maligních onemocnění založená na stimulaci přirozené imunity

V rozvinutých zemích je léčitelnost rakoviny až 50 %, což souvisí mimo jiné i s včasnou diagnózou. Bez terapeutického zásahu se maligní útvary stávají pro hostitele smrtelnými, spontánní vyléčení nastává v jednom z přibližně 150 000 případů. Tyto vzácné případy „spontánní regrese“ bývají spojeny s výskytem prudké infekce organismu.

Od konce 19. století probíhaly pokusy využívající infekční agens v terapii nádorových onemocnění. V roce 1890 začal William Coley léčit pacienty s rakovinou pomocí preparátů z kultur streptokoků. Docházelo k celkové aktivaci imunitního systému, tudíž i jeho části namířené proti nádorovým buňkám. K těmto záležitostem bylo obecně vzhlíženo s velkou nadějí. Někteří badatelé si povšimli nižšího výskytu nádorů u pacientů s tuberkulózou. Během výzkumu léku proti tuberkulóze vznikl attenuovaný původce bovinní tuberkulózy *Mycobacterium bovis*, který byl pod označením BCG (*bacillus Calmette-Guerin*) poprvé použit u lidí při vakcinaci proti tuberkulóze v roce 1921. O pár let později byla ve Švédsku tato vakcína použita v terapii maligních onemocnění. Další pokusy léčby však nebyly dostatečně úspěšné, proto se od této terapie pomalu ustupovalo. V devadesátých letech minulého století byly objeveny PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Jedná se o

molekulární motivy, které lze najít u patogenních (i nepatogenních) mikroorganismů, virů či v buněčných stěnách hub. Tyto znaky jsou rozpoznávány receptory PRR (pattern-recognition receptors). Takové receptory lze nalézt na monocytech, makrofágách, neutrofilech či dendritických buňkách, tedy buňkách vrozené imunity, které spouštějí obrannou zánětlivou reakci následovanou aktivací složek získané imunity. S dalším rozvojem poznání v této oblasti přicházejí nové možnosti optimalizace terapie nádorových onemocnění. V současné době probíhá řada experimentů s použitím PAMPs pro stimulaci vrozené imunity s cílem dosáhnout nádorové regrese a to na úrovni preklinické i klinické. Tato terapie již nyní účinná je, ale ne natolik, aby mohla být sama o sobě plně funkční. Proto se používá jako podpůrná v kombinaci s jinými přístupy. Některé molekulární motivy se získávají izolováním a purifikací, jiné PAMPs se již vyrábějí uměle.

1.4.1. Mechanismus terapie

Po detekci PAMPs pomocí PRR receptorů nastává masivní infiltrace buněk vrozené imunity do místa interakce. Nejdříve namigrují neutrofilové, později monocyty, které diferencují do makrofágů, a dojde k aktivaci komplementu (alternativní, klasickou či lektinovou dráhou). Dojde ke klonální expanzi B-lymfocytů produkujících následně protilátky. Antigenprezentující buňky předkládají antigeny T-lymfocytům, které ovlivňují další průběh imunitní reakce.

V případě maligních onemocnění je však situace poněkud odlišná. Nádorové buňky neexprimují PAMPs, proto nejsou pro vrozenou imunitu detekovatelné. Navíc v místě zánětu se vytváří takové cytokinové mikroprostředí, které je pro maligní růst naopak výhodné. Vystává tedy otázka, jakým způsobem mohlo docházet a dochází k výše popsaným nádorovým regresím a to jak v případě přirozených infekcí, tak v případě aplikace attenuovaných mikroorganismů, nebo jejich částí. Mohlo by se jednat o nespecifickou reakci. Nádor bývá silně infiltrován neutrofilové a makrofágy. Zejména neutrofilové mají poměrně krátkou životnost, mohou v průběhu protizánětlivé reakce zahynout a obsah jejich granul s lytickým obsahem se uvolní do okolí. Svou roli může sehrát i fakt, že při aktivaci některých TLR (2,8) dochází k útlumu aktivity Treg lymfocytů.

Veškeré snahy o podpoření získané imunity narážejí na existenci široké palety imunosuprimujících prostředků, kterými se nádor brání. Proto jsme se rozhodli jít cestou vrozené imunity s cílem uměle instalovat na nádory PAMPs. Vrozená imunita nikdy neměla důvod nádorové buňky cíleně atakovat, protože na nich jakékoli PAMPs chybí a nemohly se

proto vyvinout žádné mechanismy protiakce. Dosud užívané metody celkového posílení vrozené imunity měly na nádory jen slabý vliv, neboť vždy chyběl targeting a zacílení ataku na nádorové buňky.

PAMPs jsou molekulární motivy rozpoznávané PRR receptory na monocytech, makrofágách, neutrofilech či dendritických buňkách. Jedná se o vysoce konzervované a životně důležité molekuly mikrobů, které u vyšších organismů nenajdeme. Pro účinnost terapie je důležité to, aby motivy (agonisté) byly exprimovány na povrchu targetové buňky. Momentálně se nabízejí tři cesty. Bylo by možné přes onkolytické viry vnést do nádorových buněk gen pro agonisty. Pak by se ale ještě muselo pomocí signálních sekvencí zajistit, aby byl motiv vnesen na povrch buňky. Druhá cesta vede také přes onkolytické viry, které by však tentokrát nesly gen pro avidin (Walker et al., 1996), či streptavidin. Na ně se specificky váže biotin, který by nesl motiv. Tato práce se zabývá třetí skupinou, což je možnost vázat agonistu na nosič, který bude interagovat pokud možno specificky s nádorovými buňkami. Tím by mohl být poly-L-lysin, který se díky výraznému kladnému náboji váže na značně záporný náboj nádorových buněk (Mehrishi, 1969).

PRR receptory je možné dělit do tří skupin: sekretované, signální a fagocytární. *Sekretované PRR* zastupuje např. CRP, který se váže na různé molekulární motivy, čímž spouští komplementovou kaskádu, opsonizaci a napomáhá fagocytoze. Druhým významným zástupcem je MBL (mannose-binding lectin), jenž se váže na manózové zbytky na povrchu bakterie či hub (spouští lektinovou dráhu aktivace komplementu).

Signální PRR mají důležitou funkci při spuštění systému vrozené imunity. Patří sem zejména TLR (Toll-like receptors). Momentálně je známo 13 TLR, některé jsou podrobně prozkoumány, jiné známe jen neúplně. TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou na povrchu buněk, TLR 3, 7, 8 a 9 jsou vnitřní, v membránách endosomů (fagolysosomů). Následuje tabulka s rozdělením známých PAMPs podle vazby na TLR:

TLR	PAMPs
TLR 1	bakteriální triacyl_lipopeptidy
TLR 2	peptidoglykan a LTA grampozitivních bakterií, různé bakteriální glyko- a lipoproteiny, zymosan (preparát z <i>S. cerevisiae</i> obsahující beta glukán), beta glukany hub, hostitelský HSP 70
TLR 3	virální dsRNA
TLR 4	LPS gramnegativních bakterií, některé HSP, fibrinogen a fragmenty hyaluronové kyseliny hostitelského původu
TLR 5	bakteriální flagelin
TLR 6	bakteriální diacyl_lipopeptidy
TLR 7	virální ssRNA, syntetické sloučeniny – imidazoquinolin, loxoribin, bropirimin
TLR 8	virální ssRNA, syntetické sloučeniny
TLR 9	DNA obsahující nemetylované sekvence CpG v bakteriální DNA

Tab.I Přehled TLR a na ně vázaných PAMPs

Navázáním PAMP na PRR vznikne signál, který je přenesen do jádra a spustí syntézu zánětových cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-alfa). Přenosu signálu se účastní různé adapterové molekuly, nejčastěji MyD88.

Druhou skupinou signálních PRR jsou receptory NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), které se nacházejí v cytoplasmě. NOD-1 a NOD-2 rozpoznávají bakteriální peptidoglykan na základě detekce různých muramyl dipeptidů.

Fagocytární PRR se nacházejí na povrchu fagocytujících buněk. Po navázání daného agonisty na receptor vznikne signál vedoucí buňku k fagocytoze detekovaného mikroorganismu. Pro přehled je uvedena tabulka receptorů a pro ně specifických agonistů.

fagocytární PRR	PAMPs
manózový receptor	akumulace terminálních manóz
scavengerové (úklidové) receptory	LPS, peptidoglykan, teichoová kyselina
N-formyl-Met receptory	N-formyl-methionin
dectin 1	beta glukán

Tab.II Přehled fagocytárních PRR a na ně vázaných PAMPs

Některé motivy mají schopnost vázat se na signální i fagocytární receptory.

Dosavadní použití PAMPs v terapii nádorů přináší rozporuplné výsledky. Bylo zjištěno, že intratumotální aplikace LPS a Zymosanu_A má výrazný terapeutický efekt na růst gliomu RG-2. Jedná se o maligní nádor mozku u krys. Tato nádorová linie byla subkutánně transplantovaná krysám a obě látky pozitivně ovlivňovaly dobu přežití jedinců. Při opakovaném podání bylo dosaženo lepších výsledků. Zajímavé je ovšem to, že LPS u athymického kmene krys nevykazoval žádný terapeutický účín, což naznačuje, že účast T-lymfocytů je nezbytná (Mariani et al., 2007).

Dalších úspěchů bylo dosaženo také v léčbě maligního gliomu, tentokrát však u myší. LPS byl aplikován *s.c.* a *i.t.* I zde docházelo ke zpomalení růstu nádorů, *s.c.* aplikace byla méně úspěšná (Chicoine et al., 2001).

V další práci byl myším aplikován lidský karcinom tlustého střeva. Do okolí nádorů byl injikován flagelin. I zde docházelo k redukcí růstu nádorů. Terapie působila u nu-nu myší, tudíž nevykazovala závislost na T-lymfocytech (Rhee et al., 2008). To je v rozporu se studií skupiny výše uvedené (Mariani et al., 2007).

Domníváme se, že uvedené výsledky s použitím PAMPs by mohly být výrazně lepší, kdyby se dosáhlo vazby PAMPs na nádorové buňky.

Na úrovni vrozené imunity v boji proti rakovině došlo nedávno k řadě zajímavých pozorování.. Jedná se o výzkum profesora Zhenga Cuiho, který zjistil, že tento systém nemusí být zastavitelný ani při plně probíhající imunopresi u nádorů. Vše začalo v roce 1999, kdy aplikoval myším kmene BALB/c po 200 000 buněk sarkomu S-180. U jedné z šestnácti myší nedošlo k rozvoji nádorového bujení, proto s kolegy aplikaci zopakovali a dávku sarkomu dokonce navýšili. Ani poté nebyl sarkom přijat. Tato myš dala vzniknout další generaci myší, u 40% z nich rezistence přetrvávala. Byla zjištěna dominantní mutace v genu, označili ji SR/CR (spontaneous regression / cancer resistant). Myši nepodlehly žádné testované nádorové linii (sarkomy, melanomy, karcinomy, lymfomy), odtud označení cancer resistant. . U myší starších než 4 měsíce k rozvoji nádorů sice docházelo, ale poté nastala spontánní regrese. Bylo zjištěno, že tato odolnost je dána buňkami vrozené imunity – při přenosu mutace na nu-nu myši se účinnost nezmenšila. Experimenty byly potvrzeny i *in vitro*. Leukocyty těchto myší byly početně v normě, vytvářely kolem nádorových buněk rozety a zabíjely je, ale buňky z normálních myší nádorové buňky ignorovaly (Cui et al., 2003). Tyto výtečné výsledky byly navíc vyzdvihnuty dalším pokusem: NK buňky, makrofágy nebo neutrofilů z SR/CR myší byly přeneseny do „normálních“ myší s rozvinutým nádorem. Do několika dnů byla viditelná nádorová regrese i u těchto jedinců! Následující protinádorová

ochrana pak ukázala na určitou spoluúčast získané imunity, bez které však primární odpověď funguje. Proti některým nádorovým liniím nebyl atak veden plnou silou kvůli nedostatečné infiltraci SR/CR leukocyty. Ale po přidání difusibilních faktorů jich již namigroval na místo nádoru dostatek a nádorové buňky byly také zabity. Zdá se, že chemoatrakce je v těchto procesech velmi důležitá (Hicks et al., 2006).

Vzhledem k univerzálnosti použití je zřejmé, že základní část mechanismu je v rozpoznání. Vrozená imunita rozpozná u SR/CR myši rakovinu nejrůznějších druhů a začne s ní bojovat. To naznačuje, že je možná existence rozpoznatelného znaku společného pro nádorová bujení nejrůznějších druhů. Mohl by být detekován nějakým TLR reexprimovaného genu, který nebyl dosud objeven.

Zásadním předpokladem pro úspěšnou léčbu maligních onemocnění by tedy mohlo být rozpoznání nádorových buněk vrozenou imunitou. Prostřednictvím prakticky libovolného TLR by přes adapterovou molekulu (např. MyD88) vznikl základní signál pro akci (Tsan, 2006). Vhodné by bylo tuto iniciaci signalizace propojit i s vazbou motivu, ukazujícího na nádorovou buňku jako na předmět fagocytózy (agonisty fagocytárních receptorů).

Tato práce zvažuje možnosti navázání agonistů PRR vrozené imunity na nádorovou buňku. Jako agonisty pro *in vitro* a *in vivo* experimenty byly vybrány LPS (TLR4 agonist) a peptid začínající N-formyl-methioninem. N-formyl-methionin je první aminokyselina, kterou začíná proteosyntéza u prokaryontních organismů, stimuluje chemotaxi a fagocytózu. Dále jsme pracovali s Zymosanem A. Zymosan A je preparát připravený ze *Saccharomyces cerevisiae*, obsahuje účinnou složku beta glukan (agonist TLR2 a Dectinu 1, tedy fagocytárního receptoru) a mannan (agonist MBL a manozového receptoru makrofágů).

Co se týče vazebných principů, v případě LPS jsme se spolehli na jeho přirozenou schopnost integrovat se do membrán (Carr and 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. Jelikož je u Zymosanu A beta glukan i mannan vázán na proteiny, pokusili jsme se tyto molekuly pomocí glutaraldehydu navázat kovalentně na vysokomolekulární polylysin a použít tak rovněž nábojovou interakci s nádorovými buňkami.

2. Cíle práce

- Optimalizace proenzymové terapie

- Možnosti mechanismu proenzymové terapie

Po dohodě se školitelem byly určeny další úkoly:

- Možnosti imunoterapie nádorových onemocnění na úrovni vrozené imunity
 - provedení základních metodologických studií
 - provedení prvotních screeningových pokusů s použitím PAMPs proti nádorům a to jak na úrovni experimentů *in vitro* (zavedení cytotoxického testu), tak na úrovni *in vivo* experimentů

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

Všeobecně bylo používáno medium RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem, a antibiotiky (Sigma Aldrich), fosfátem pufovaný fyziologický roztok PBS (Sigma Aldrich) a trypanová modř (Sigma Aldrich).

Pro proenzymovou terapii byl použit bovinní trypsinogen 14 000 U/mg po aktivaci (Sigma Aldrich), bovinní alfa-chymotrypsinogen A 48 U/mg po aktivaci (Sigma Aldrich) a alfa-amyláza z *Bacillus sp.* 1780 maltózových jednotek/mg proteinu (Sigma Aldrich). Proenzymová směs měla následující složení: 0,56 mg trypsinogenu + 0,56 mg chymotrypsinogenu + 0,4 mg amylázy na 1 ml fyziologického roztoku, sterilizace proběhla metodou filtrace (filtr 0,22 μ m).

Pro terapii založenou na PAMPs byl použit Zymosan_A (Sigma Aldrich), poly-L-lysin HCl o Mw 43 600 (Sigma Aldrich), lipopolysacharid (LPS) ze *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* (Sigma-Aldrich), beta glukán (beta -1,3-D glucan ze *Saccharomyces cerevisiae*, dar firmy Transfer Point), glutaraldehyd (Sigma-Aldrich) a Formyl-Met-Leu-Phe (Lys)₁₂x (FM), syntetizovaný firmou Schafer-N.

Pro izolaci makrofágů byl používán proteose_pepton (Difco).

3.1.2. Laboratorní zvířata a buněčné linie

V pokusech byly použity samice myši kmene C57BL/6 (Charles River). Zvířata byla chována ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

Buněčná linie melanomu B16/F10 (dar od Prof. Říhové, Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha) byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky (Sigma Aldrich). Linie byla uložena v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

3.2. Metody

3.2.1 Trypsinizace

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

3.2.2 Kontroly životnosti, počet buněk

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

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

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

3.2.3. Získávání makrofágů peritoneálním výplachem

Peritoneální výplach slouží k získávání buněk imunity. Pro migraci makrofágů do peritoneální dutiny je třeba 3-4 dny předem intraperitoneálně aplikovat 1 ml 10% roztoku proteose peptonu. Po uplynutí doby byla myš uspána diethyletherem a usmrcena cervikální dislokací. Odstranila se kůže z oblasti břicha, ale samotná peritoneální blána musela zůstat neporušena. Výpach byl prováděn vychlazeným médiem RPMI 1640 bez séra.

Získané buňky bylo nutné uchovávat na ledu pro zabránění adherence. Byly promývány 1x10 minut ve 4°C při 170 G. Poté byly spočítány v Bürkerově komůrce a naředěny na požadovanou koncentraci. Kvalita buněčné suspenze byla určována pomocí průtokové cytometrie: makrofágy tvořily 58%.

3.2.4. Transplantace melanomu B16-F10

Po trypsinizaci a centrifugačním promytí byly buňky melanomu B16-F10 rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra a spočítány. V době transplantace byly myši ve věku pokud není uvedeno jinak 8-10 týdnů. Do předem oholeného místa v pravé zadní části zad myši C57BL/6 bylo *s.c.* injikováno 0,1 ml buněčné suspenze obsahující cca 400 000 buněk.

3.2.5. Měření velikosti nádorů

U transplantovaných nádorů byl pozorován a zaznamenáván jejich růst. Nádory byly měřeny vždy dvakrát týdně pomocí kaliperu. Z naměřených hodnot se vypočítal objem jednotlivých nádorů (Inaba et al., 1986). Byl užíván vzorec:

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

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

3.2.6. Cytotoxický test

Cytotoxický test byl proveden pomocí soupravy LIVE/DEAD® Cell-Mediated Cytotoxicity Kit (L7010) od *Molecular Probes*. Měření bylo prováděno na průtokovém cytometru FACSCanto II.

3.2.8. Statistické zpracování dat

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

3.2.7. Uspořádání experimentů

3.2.7.1. Porovnání účinku proenzymoterapie při *s.c.* a *i.m.* podání

Myším byl transplantován melanom B16-F10. 20. den byly nádory změřeny kaliperem a myši byly podle velikosti nádorů rovnoměrně rozděleny do tří skupin.

- Skupina I: jednou denně *s.c.* 0,1 ml roztoku proenzymové směsi pod kožní řasu za krkem (3 myši).
- Skupina II: jednou denně *i.m.* 0,1 ml roztoku proenzymové směsi do stehenního svalu levé zadní končetiny (3 myši).
- Skupina III: neléčená pozitivní kontrolní skupina (4 myši).

3.2.7.2. Dynamika průběhu účinku terapie

U probíhajících i minulých experimentů byla sledována vzájemná podobnost dynamiky účinků terapií. Jedná se nejen o terapii melanomu B16-F10 (Kalferstová, 2008; Maierová, 2010), ale také o léčbu sarkomu S-180 (Kaiserová, 2008, 2010).

3.2.7.3. Porovnání účinku proenzymoterapie při *i.m.* a *i.p.* podání

Myším 15 týdnů starým byl transplantován melanom B16-F10. 11. den byly nádory změřeny kaliperem a myši byly rovnoměrně rozděleny do čtyř skupin.

- Skupina I: neléčená negativní kontrolní skupina, které nebyl transplantován melanom (20 myši).
- Skupina II: neléčená pozitivní kontrolní skupina (20 myši).
- Skupina III: jednou denně aplikováno *i.p.* cestou 0,1ml proenzymové směsi (20 myši).
- Skupina IV: jednou denně aplikováno *i.m.* cestou 0,1ml proenzymové směsi (20 myši).

3.2.7.4. Metabolomická analýza moči myši

Vzorky moči myši z předchozího experimentu (Porovnání účinku proenzymoterapie při *i.m.* a *i.p.* podání) byly získávány v 18., 25. a 32. dnu pokusu. Získané vzorky od jedinců byly zakonzervovány roztokem azidu sodného (10mg NaN₃/ml destilované vody) v objemovém poměru 10 dílů moči + 1díl roztoku azidu a analyzovány v Laboratoři analytické biochemie (Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR) pod vedením RNDr. Petra Šimka, CSc. Objem 30 µl každého ze 180 vzorků byl přímo podroben derivatizaci ethylchlorformiátem/ethanolem za katalýzy pyridinu. Deriváty metabolitů byly současně extrahovány do chloroformu.

GC/MS analýza

1 µl organické fáze byl nadávkován do GC/MS spektrometru Thermo DSQ (plynová chromatografie + hmotnostní spektrometr) a na kapilární koloně VF 5 MS (Agilent) provedena analýza metabolitů, zejména aminokyselin, aminů a organických kyselin (především těch participujících v energetickém metabolismu).

LC/MS analýza

Druhý podíl extraktu byl rozpuštěn v mobilní fázi a provedeno analýza pozitivních a negativních iontů derivátů metabolitů získaných elektrosprejovou ionizací, které byly detekovány hmotnostním spektrometrem Thermo LTQ. LC (kapalinová chromatografie) separace metabolitů byla provedena na koloně 150 x 2 mm id Synergi (Phenomenex).

Zpracování dat

Akvizice data byla provedena pomocí SW platformy XCalibur™ (Thermo), která je součástí přístrojového vybavení spektrometrů Thermo. Zpracování dat, tj. identifikace metabolitů, tvorba matice metabolitů v naměřené sérii vzorků a export matic do tabulkového procesoru Microsoft Excel™, bylo realizováno pomocí SW nástroje Metabolite Mapper, vyvinutého na oddělení Analytické biochemie Biologického centra AV ČR. Statistické zpracování získaných dat o metabolitech bylo provedeno pomocí analýzy hlavních komponent (PCA, Statgraphics 13.0) a pomocí ortogonální projekce dat metodou OPLS programem Simca 13.0, včetně testování hladin významnosti.

3.2.7.5. Terapie nádorů za použití PAMPs – *in vitro*

3.2.7.5.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu

Na cytotoxický test byl použit LIVE/DEAD® Cell-Mediated Cytotoxicity Kit (L7010) od *Molecular Probes*. Tento kit obsahuje zelenou fluorescenční barvu DiOC₁₈(3) čili DiO, která se váže na membrány buněk (melanomové buňky B16-F10). Propidium_iodid PI je fluorescenční barva specifická pro nukleové kyseliny, ke kterým se ale dostane pouze přes porušené membrány (mrtvých) buněk.

Melanomové buňky B16-F10 byly připraveny (viz kap. 3.2.1 Trypsinizace), spočítány, naředěny na požadovanou koncentraci a část z nich byla obarvena fluorescenční barvou DiOC₁₈(3). Na 1 ml suspenze melanomových buněk o koncentraci 1 milion buněk/ml byly použity různé koncentrace fluorescenční barvy DiO i barvy PI. Při měření v průtokovém cytometru se sledovalo množství buněk, které byly přístrojem vyhodnoceny jako nenabarvené, a buněk, které tzv. přesvěcují. Takové buňky měly na sobě příliš mnoho fluorescenčních molekul.

Pro zjištění procentuálního zastoupení makrofágů v buněčné suspenzi byla použita metoda měření na průtokovém cytometru. Makrofágy byly izolovány, promyty a bylo

spočteno množství buněk v suspenzi (viz kap. 3.2.3. Získávání makrofágů peritoneálním výplachem). Byla použita specifická fluorescenční protilátka F4/80 (Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7, eBioscience). Do zkumavky bylo dáno 0,5 milionu buněk v 45 μ l buněčné suspenze, přidáno 5 μ l krysího séra pro vysycení případných nescifických vazeb na Fc receptorech a po jedné minutě byla přidána protilátka F4/80 v množství 0,2 μ l. Následně proběhla inkubace ve tmě po dobu 20 minut. Poté byly do zkumavky přidány 4 ml PBS s 2%FCS, proběhla centrifugace (10 minut při 170g). Slili jsme supernatant, pelet rozsuspendovali v 0,5 ml PBS s 2% FCS a vzorek byl změřen na průtokovém cytometru.

Při zavádění cytotoxického testu jsme si připravili melanomové buňky B16-F10 (viz kap. 3.2.1. Trypsinizace) a makrofágy (viz kap. 3.2.3. Získávání makrofágů peritoneálním výplachem). Melanomové buňky byly naředěny na koncentraci 1 000 000 buněk/ml. 1ml této suspenze byl obarven 5 μ l DiO a inkubován 30 minut při 37°C. Poté bylo dvakrát provedeno centrifugační promytí v PBS po dobu 10 minut při 170g. Následně byly buňky rozsuspendovány v 1 ml RPMI 1640 s 10% FCS.

Suspenze obarvených i neobarvených buněk byly vkládány v množství 10'000 buněk do jednotlivých jamek ve 24 jamkovém panelu. Některé jsme takto ponechali, k jiným byly přidávány efektorové buňky o koncentraci 100'000 buněk na jamku. Jamky byly následně doplněny médiem RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkptoethanolem a antibiotiky na 1,5 ml a kultivační panel byl vložen do termostatu s 37°C a atmosférou nasycenou vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého. Po 24 hodinové inkubaci se z jamek pipetou odsálo medium do zkumavek (pro sběr absolutního množství buněk), jamky byly 3x promyty 1 ml PBS, přidalo se 300 μ l trypsinizační směsi na jamku a buňky byly vloženy do termostatu. Po 5 minutách byl k buňkám přidán 1 ml RPMI 1640 s 10% FCS, buňky byly důkladně rozsuspendovány a suspenze byla přidána do příslušných zkumavek, které již obsahovaly buňky uvolněné bez trypsinizace. Buňky ze zkumavek byly centrifugovány při 150 g po dobu 10 minut, rozsuspendovány v 1 ml RPMI 1640 s 10% FCS a obarveny barvou propidium iodide (PI) (LIVE/DEAD Cell-Mediated Cytotoxicity Kit) v poměru 1:1 (tj. 200 μ l barvy a 200 μ l buněčné suspenze), která byla připravena rozpuštěním 20 μ l barvy PI v 1ml PBS. Takto obarvené buňky byly inkubovány 5 min při 37°C. Takto připravené vzorky byly poté změřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto II za nejrychlejšího průtoku (3 μ l/s) a po dobu 60 vteřin. Výsledky byly zaznamenány včetně počtu buněk.

3.2.7.5.2. Sestrojení kalibrační křivky pro cytotoxický test

Pro určení počtu buněk procházejících průtokovým cytometrem (BD FACSCanto II) byla sestavena kalibrační křivka. Byly použity melanomové buňky naznačené fluorescenční barvou DiO. Na přístroji byly zaznamenány „počty událostí“ při měření buněčných suspenzí o známé koncentraci za dané rychlosti průtoku měřené kapaliny (3 μ l/s) a v konstantním časovém úseku jedné minuty. Z vypočtených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka.

3.2.7.5.3 Terapie nádorů za použití LPS a FM – *in vitro*

Makrofágy byly izolovány (3.2.3. Získávání makrofágů peritoneálním výplachem) a bylo ověřeno jejich procentuální množství (3.2.7.4.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu). Melanomové buňky byly po trypsinizaci rozděleny na tři části. Každý díl obsahoval 5'000'000 buněk B16-F10 v 2 ml RPMI 1640. První díl představoval kontrolní skupinu, k původnímu objemu byly přidány 2 ml RPMI 1640. K druhému dílu byly přidány 2 ml roztoku LPS (o koncentraci 1 mg LPS/ml RPMI). K třetímu dílu byly přidány 2 ml roztoku formylmethioninu F-Met-Leu-Phe (Lys)₁₂ (1 mg FM/ml RPMI). Vše bylo inkubováno jednu hodinu při 37°C a následně 4x centrifugačně promyto vždy 40 ml RPMI 1640. Po poslední centrifugaci byl supernatant také slit, ale pelet byl tentokrát již rozsuspendován v RPMI 1640 s 10% FCS. Část takto připravených buněk byla obarvena fluorescenční barvou DiO. Suspenze obarvených i neobarvených buněk s LPS a FM či bez nich byly vkládány v množství 10'000 buněk do jednotlivých jamek ve 24 jamkovém panelu. Některé jsme takto ponechali, k jiným byly přidávány efektorové buňky o koncentraci 100'000 buněk na jamku. Jamky byly následně doplněny médiem RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky na 1,5 ml a kultivační panel byl vložen na 24 hodin do termostatu s 37°C a atmosférou nasycenou vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého. Následující den byly buňky uvolněny z jednotlivých jamek, zakoncentrovány centrifugací, naznačeny pomocí PI a změřeny na průtokovém cytometru, jak bylo popsáno v kapitole 3.2.7.5.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu.

3.2.7.6. Terapie nádorů za použití LPS a beta glukanu – *in vivo*

Myším byl transplantován melanom B16-F10. 14. den byly nádory změřeny kaliperem a myši byly podle velikosti nádorů rovnoměrně rozděleny do čtyř skupin.

- Skupina I: obden *i.t.* 0,1 ml roztoku lipopolysacharidu - 3mg/ml fyziologického roztoku (2 myši).
- Skupina II: obden *i.t.* 0,1 ml roztoku lipopolysacharidu - 3mg/ml fyziologického roztoku a denně *p.o.* 50 µl suspenze beta glukanu – 60 mg/ml vody (3 myši).
- Skupina III: denně *p.o.* 50 µl suspenze beta glukanu, 60 mg/ml vody - (2 myši).
- Skupina IV: neléčená pozitivní kontrolní skupina (2 myši).

Myším byla léčba aplikována 14.-24.den, poté byly nádory jen měřeny. Intratumorální podání probíhalo jednou za dva dny, perorální každý den.

3.2.7.7. Terapie nádorů za použití volného sonikovaného Zymosanu A a Zymosanu A vázaného na nosič – *in vivo*

Myším byl transplantován melanom B16-F10. 13. den byly nádory změřeny kaliperem a myši byly podle velikosti nádorů rovnoměrně rozděleny do čtyř skupin.

- Skupina I: ob dva dny *i.t.* 50 µl roztoku sonikovaného Zymosanu A –svázaného s polylysinem (8 myší).
- Skupina II: ob dva dny *i.t.* 50 µl suspenze Zymosanu A (8 myší).
- Skupina III: ob dva dny *i.t.* 50 µl polylysinu (8 myší).
- Skupina IV: ob dva dny *i.t.* 50 µl PBS - neléčená pozitivní kontrolní skupina (8 myší).

Myším byla léčba aplikována 13.-22.den, poté byly nádory jen měřeny. Intratumorální podání probíhalo jednou za tři dny (po měření).

Příprava terapeutika pro skupinu I: 1 ml suspenze 32 mg sonikovaného Zymosanu A/ml PBS + 1 ml roztoku 16 mg polylysinu HCl Mw 43 600/ml PBS + po kapkách 1 ml 8×10^{-3} M glutaraldehydu v PBS, následná inkubace 1 hodinu při 37°C, pak zastaveno 1 ml 0,1 M glycinu.

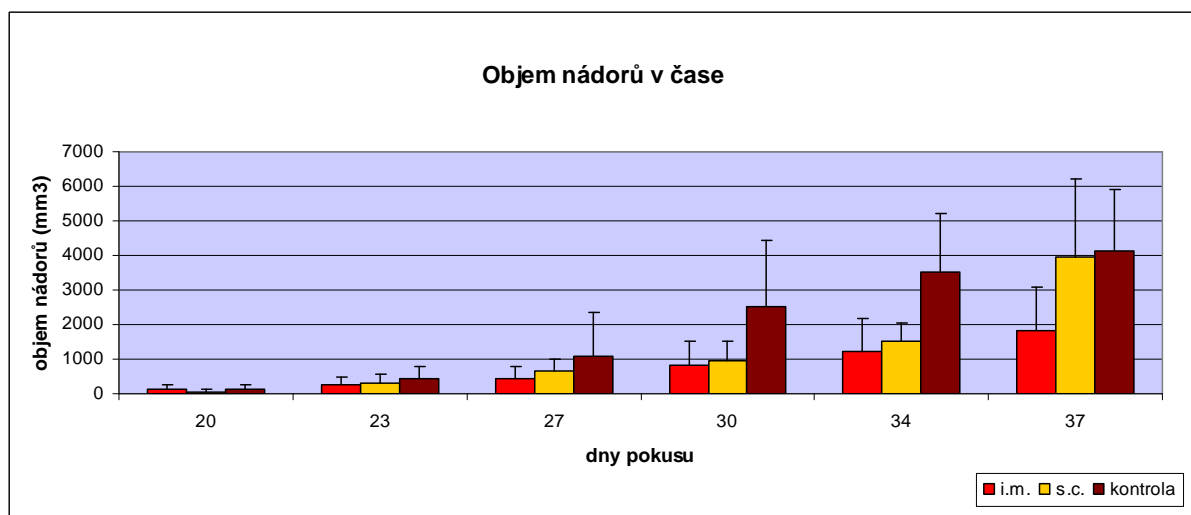
Příprava terapeutika pro skupinu II: 1 ml 32 mg sonikovaného Zymosanu A/ml PBS + 2 ml PBS + 1 ml 0,1 M glycinu.

Příprava terapeutika pro skupinu III: 1 ml PBS + 1 ml roztoku 16 mg polylysinu HCl Mw 43 600/ml PBS + po kapkách 1 ml 8×10^{-3} M glutaraldehydu v PBS, následná inkubace 1 hodinu při 37°C, pak zastaveno 1 ml 0,1 M glycinu.

4. Výsledky

4.1. Porovnání účinku proenzymoterapie při *s.c.* a *i.m.* podání

Hlavním sledovaným parametrem tohoto pokusu byla velikost objemu nádorů u jednotlivých myši kmene C57BL/6. Myši byly měřeny vždy dvakrát týdně, léčba byla aplikována denně. Objemy nádorů ve skupinách byly poté k danému dni měření zprůměrovány (Obr.1). Je patrné, že oba způsoby aplikace proenzymové terapie vedly k viditelnému snížení růstu nádorů oproti kontrole. Mezi *i.m.* a *s.c.* podáním nebylo sice oproti kontrolní skupině dosaženo statisticky významného rozdílu, přesto je účinnost *i.m.* podání evidentně vyšší.

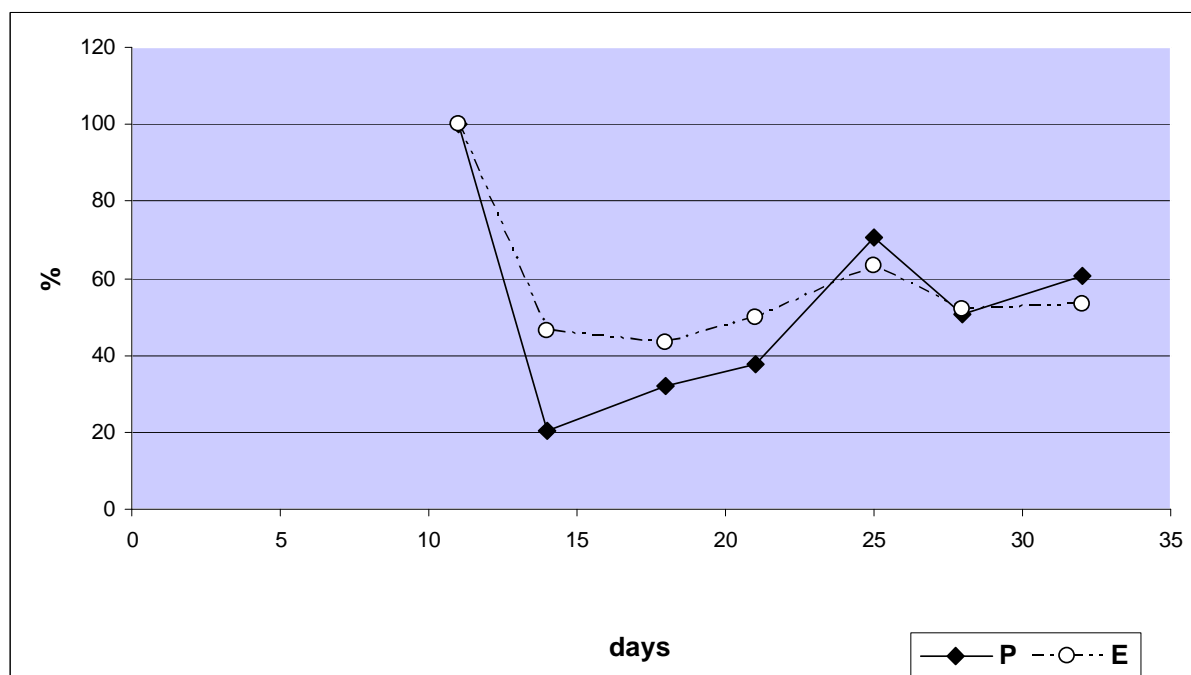


Obr.1 Vliv různých aplikačních způsobů proenzymoterapie (*s.c.* a *i.m.*) na růst nádorů

4.2. Dynamika průběhu účinku terapie

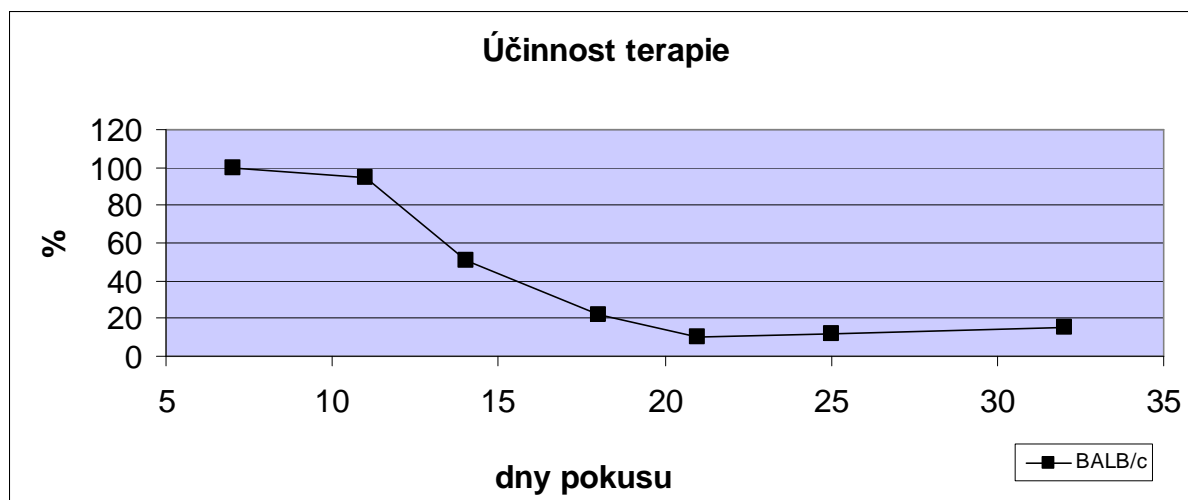
Při vyhodnocování pokusů zabývajících se proenzymovou i enzymovou terapií v mých experimentech a v experimentech ostatních členů naší pracovní skupině docházelo vždy k podobnému trendu ve vývoji účinnosti léčby (Obr.2). Terapie byla zpočátku velmi účinná, docházelo ke značnému zpomalení růstu nádorů oproti kontrolám. Po určité době však přicházela perioda se slabším efektem léčby. Po jejím odeznění nastoupila opět účinná fáze, která se udržela až do bodu, po jehož překročení docházelo ke značné proliferaci nádorů. Tato

dynamika byla pozorována v experimentech u kolegyně Kalferstové (Kalferstová, 2008), Maierové (Maierová, 2010) a Živné (Živná, 2010) během proenzymové terapie melanomu B16-F10. Graf (Obr.2) znázorňuje snížení růstu objemu nádorů v porovnání s kontrolní skupinou, která byla vždy považována za základ (tedy 100%). Stejná charakteristika průběhu léčby byla nalezena i u proenzymové terapie sarkomu S-180 (Kaiserová, 2008).



Obr.2 Obecná dynamika účinku průběhu proenzymové terapie: P – proenzymová terapie E-enzymová terapie

Dále jsem si všimla, že obecně byla proenzymoterapie vždy účinnější, když byly použity myši starší, i když rozmezí jejich stáří, kdy bylo započato s experimentech nebylo příliš široké (8-10 týdnů). Na základě tohoto pozorování byly v experimentu kolegyně Kaiserové (Kaiserová, 2010) úmyslně použity starší myši.. V době transplantace sarkomu S-180 byly myši (BALB/c) ve stáří 18 týdnů. Terapie vykazovala rozdílnou dynamiku a měla daleko vyšší efektivitu (Obr.3). Spojitost věku léčeného subjektu a dynamikou léčby nás velmi zaujala, proto byl tento jev zohledněn v další optimalizaci proenzymové terapie (viz dále).

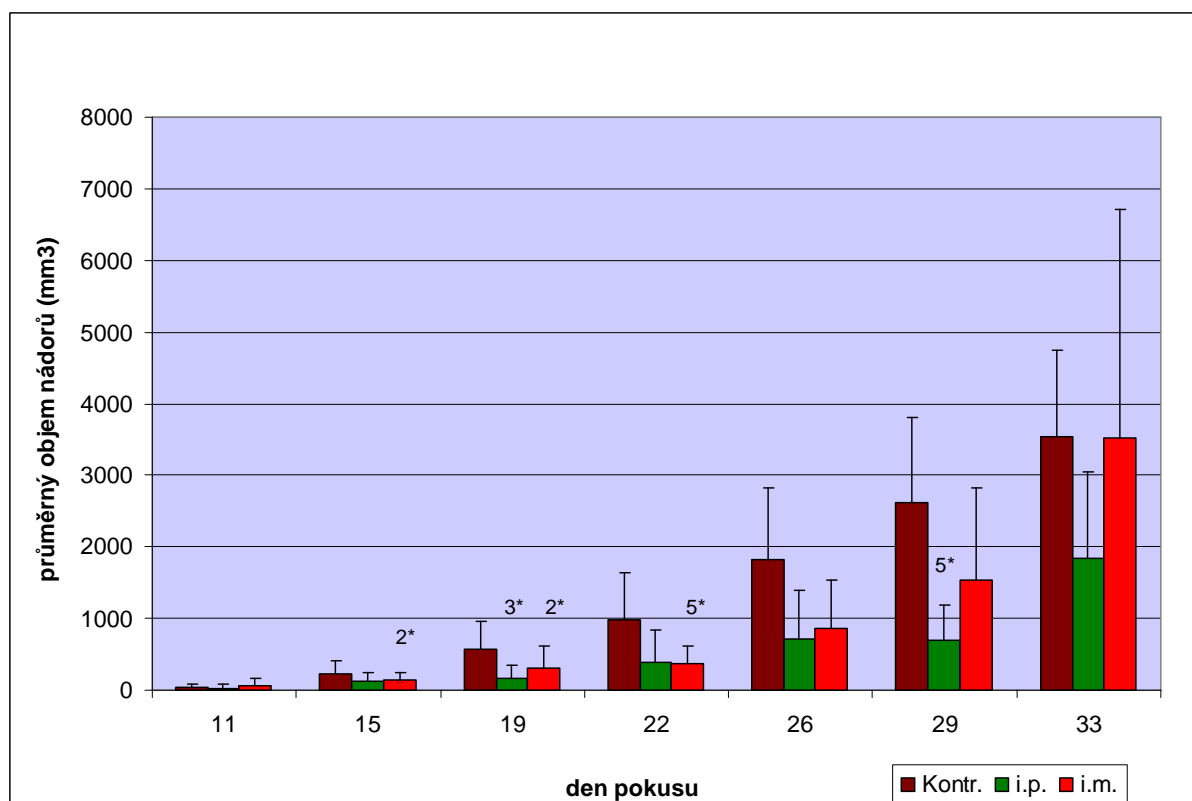


Obr.3 Dynamika účinku průběhu terapie sarkomu u myši s vyzrálým imunitním systémem

Z imunologického hlediska je zřejmé, že proenzymová terapie vyžaduje k plnohodnotné efektivitě léčby zcela vyzrálý a plně funkční imunitní systém. Toto tvrzení bylo dále podpořeno pozorováním Kaiserové (Kaiserová, 2010), kdy i u SCID myši, tedy myši bez získané imunity, proenzymoterapie naprosto selhala. Terapie tedy nebude vhodná pro imunologicky nezralé či imunosuprimované myši subjekty a analogicky zřejmě ani pro obdobné lidské pacienty.

4.3. Porovnání účinku proenzymoterapie při *i.m.* a *i.p.* podání

V tomto optimalizačním experimentu byl sledován vliv různých způsobů aplikace proenzymoterapie na růst objemu nádorů u myši C57BL/6. Poučili jsme se z předchozí studie a v době transplantace melanomu B16-F10 byly myši ve věku 15 týdnů. Nádory byly měřeny vždy dvakrát týdně, léčba byla aplikována denně. Objemy nádorů ve skupinách byly poté k danému dni měření zprůměrovány (Obr.4). Je patrné, že oba způsoby aplikace proenzymové terapie vedly k viditelnému snížení růstu nádorů. Zpomalení proliferace léčených nádorů bylo i v obou způsobech aplikace proenzymů oproti kontrolním statisticky významné (Obr.4). Aplikace proenzymů *i.p.* se ukázala jako celkově účinnější.



Obr.4 Vliv různých aplikačních způsobů proenzymoterapie (i.m. a i.p.) na růst nádorů:

2*: $P \leq 0,01$; 3*: $P \leq 0,005$; 5*: $P \leq 0,0005$

4.4. Dynamika proenzymoterapie z hlediska metabolomiky

GC/MS analýza ukázala evidentní změny ve složení moči mezi porovnávanými skupinami: zdravé kontroly, myši s melanomem a myši s melanomem, léčené. Významné zvýšení hladin metabolitů bylo pozorováno v souladu s předpokladem zejména u kyseliny mléčné a kyselin participujících v citrátovém cyklu. Statisticky významné korelace mezi velikostí nádoru a koncentrací metabolitů v moči byly pozorovány zejména u organických kyselin - jablečné, maleinové a citronové.

Analýza hlavních komponent (PCA) u významně ovlivněných metabolitů, detekovaných technikou LC/MS ukázala ještě výraznější korelaci mezi nádorovou a kontrolní skupinou zhruba u 20 metabolitů (korelační koeficient $F > 1.5$). Nejedná se ale o běžné metabolity metabolických drah a jejich identifikace je předmětem dalšího studia.

Pilotní pokusy nám ukázaly, že změny hladin některých metabolitů (kyselina citronová, jablečná, maleinová i mléčná) velmi dobře koreluje s velikostí nádorů. Jelikož naše terapie redukuje velikost růstu nádorů, došlo i k adekvátním změnám v hladinách metabolitů.

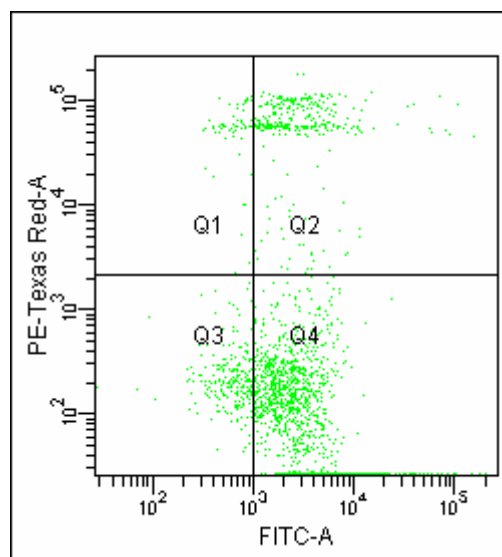
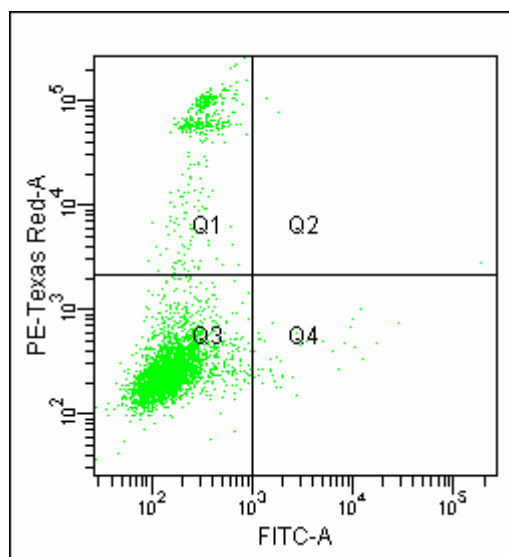
4.5. Terapie nádorů za použití PAMPs – *in vitro*

4.5.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu

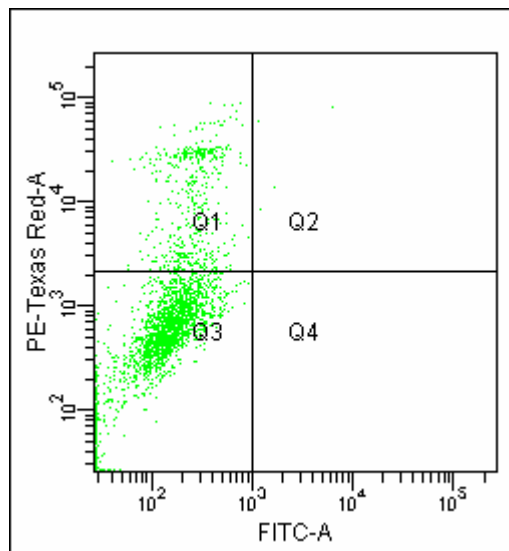
Po vyzkoušení různých koncentrací fluorescenčních barev DiO a PI jsme pro naše účely měření navrhli přidávat 5 μ l DiOC₁₈(3) místo původních 10 μ l k testem stanovenému objemu buněčné suspenze pro inkubaci přes noc (1'000'000 buněk v 1 ml). PI jsme přidávali o objemu 20 μ l místo původních 40 μ l. Také terminální inkubace s touto fluorescenční barvou se snížila z 30 minut na pouhých 5.

Po získání makrofágů pomocí peritoneálního výplachu bylo ověřeno jejich procentuální zastoupení. U jednotlivých myší kmene C57BL/6 bylo dosahováno výtěžnosti 57-59%.

V rámci optimalizace cytotoxického testu byly provedeny kontrolní testy, kde se sledovala případná cytotoxicita makrofágů k targetovým buňkám bez jakéhokoli atraktans. Poměr efektorových a targetových buněk byl 10:1 (převzato od skupiny Dr. Cui – Hicks et al., 2006), to jest 100 000 efektorových buněk (makrofágy) + 10 000 targetů (nádorové buňky) v 1,5 ml RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky v jedné jamce 24 jamkového kultivačního panelu. Měřené skupiny tvořily (Obr.5-8): čisté targetové buňky (T), targetové buňky značené barvou DiO (TD), makrofágy (M) a targetové buňky značené fluorescenční barvou DiO s makrofágy (TDM). V oblasti Q2 a Q4 najdeme buňky značené fluorescenční barvou DiO, v oblastech Q1 a Q2 buňky naznačené PI (tedy mrtvé).

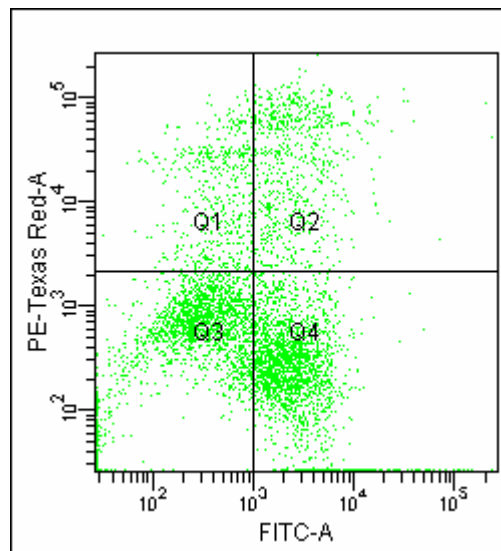


Obr.5 Targetové buňky barvené PI v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



Obr.7 Makrofágy barvené PI v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A

Obr.6 Targetové buňky barvené PI a DiO v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



Obr.8 Targetové buňky barvené PI a DiO s makrofágy v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A

Z množství jednotlivých událostí v daných kvadrantech byly vypočítány absolutní počty buněk v oblastech. Následující tabulka (Tab.III) zobrazuje množství buněk v 1 ml suspenze u každé skupiny v daném kvadrantu.

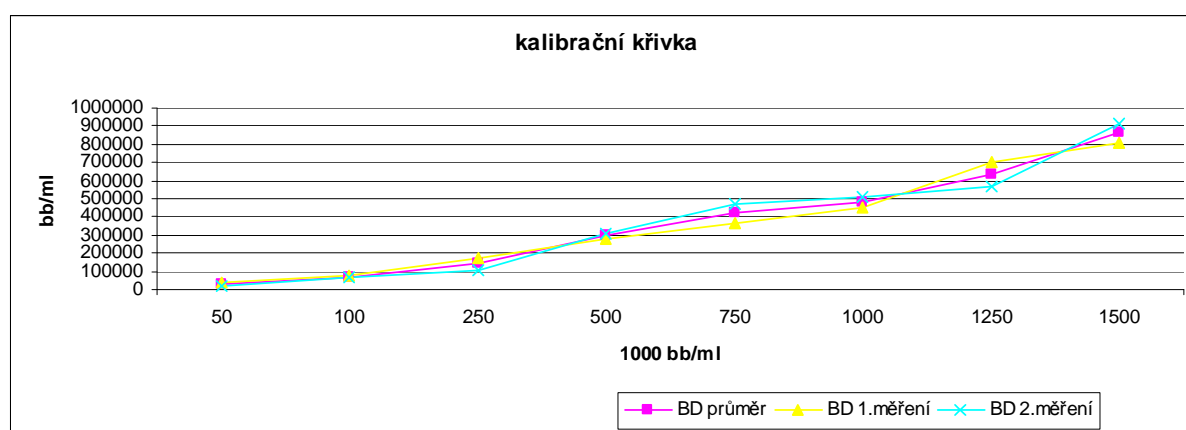
	Q1	Q2	Q3	Q4
T	4436	34	34450	434
TD	1334	6728	5048	28278
M	15212	133	68955	0
TDM	8423	11910	34678	35128

Tab. III Absolutní počty buněk daných skupin v jednotlivých kvadrantech (počet buněk udáván v 1 ml suspenze)

Z výsledků vyplynulo, že 24 hodinová kultivace nádorových buněk za přítomnosti barvy DiO neovlivňuje proliferaci targetových buněk. Dále jsme zjistili, že do druhého dne samovolně zahyne 18% makrofágů a že během kultivace makrofágů s melanomovými buňkami bez přítomnosti PAMPs nedochází k úbytku targetových buněk.

4.5.2. Sestrojení kalibrační křivky pro cytotoxický test

Pro určení počtu buněk procházejících průtokovým cytometrem (BD FACSCanto II) byla sestavena kalibrační křivka. Na přístroji byly zaznamenány „počty událostí“ při měření buněčných suspenzí o známé koncentraci označených fluorescenční barvou DiO za nejvyšší možné rychlosti průtoku měřené kapaliny (3 μ l/s) a v konstantním časovém úseku jedné minuty. Z vypočtených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka, díky které bylo možné získat absolutní počet melanomových buněk (Obr.9). Sestrojením rovnice kalibrační křivky se zabývala má kolegyně Magda Čechová (Čechová, 2010)



Obr.9 Kalibrační křivka pro cytotoxický test

4.5.3. Terapie nádorů za použití LPS a FM – *in vitro*

Buňky byly připraveny podle kapitoly 3.2.7.5.3 Terapie nádorů za použití LPS a FM – *in vitro*. Buněčné suspenze jednotlivých skupin byly vyjmuty z kultivačních jamek, obarveny PI a změřeny na průtokovém cytometru. Tentokrát však byla část melanomových buněk navíc naznačena LPS nebo FM. Postupováno bylo dle optimalizované metody 4.5.1. Zavedení a optimalizace cytotoxického testu.

U lipopolysacharidu se předpokládalo, že se integruje do membrán melanomových buněk (Diks et al., 2001).

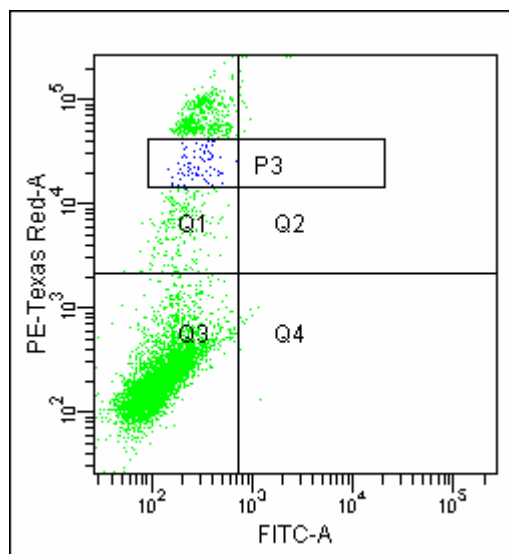
F-Met-Leu-Phe (Lys)¹² se díky kladnému náboji lysinů váže k záporně nabitému povrchu nádorových buněk.

Pro inkubaci buněk byla použita 24 jamková destička. Poměr efektorových a targetových buněk byl 10:1 (převzato od skupiny Dr. Cui – Hicks et al., 2006), to jest 100 000 efektorových buněk (makrofágy) + 10 000 targetů (nádorové buňky) v 1,5 ml RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky v jedné jamce 24 jamkového

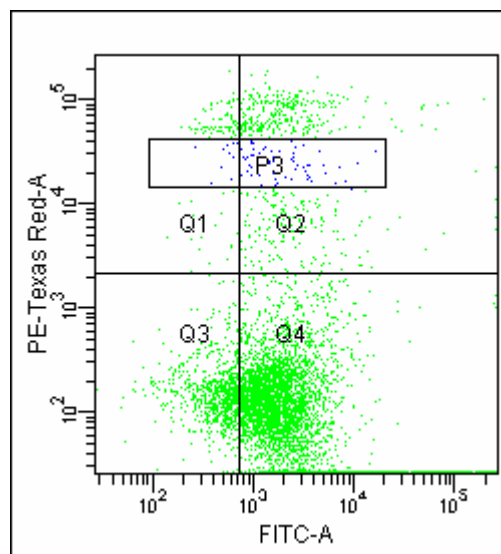
kultivačního panelu. Měřené skupiny tvořily: čisté targetové buňky (T), targetové buňky značené barvou DiO (TD), makrofágy (M), targetové buňky značené fluorescenční barvou DiO s makrofágy (TDM), targetové buňky s LPS (TLPS), targetové buňky s LPS značené fluorescenční barvou DiO (TLPSD), targetové buňky s FM (TFM), targetové buňky s FM značené fluorescenční barvou DiO (TFMD), targetové buňky s LPS značené fluorescenční barvou DiO s makrofágy (TLPSDM) a targetové buňky s FM značené fluorescenční barvou DiO s makrofágy (TFMDM). Vizuální výstupy histogramů jednotlivých skupin uvádějí Obr.10-19. Tab.IV udává absolutní počty buněk v daných skupinách. V oblasti Q2 a Q4 najdeme buňky značené fluorescenční barvou DiO, v oblastech Q1 a Q2 buňky naznačené PI (tedy mrtvé).

	Q1	Q2	Q3	Q4
T	4126	78	31842	67
TD	639	2997	4848	26215
M	4176	17	66186	2591
TDM	1785	5954	28569	39415
TLPS	4139	39	34220	867
TLPSD	89	2407	200	16407
TFM	4585	78	37780	39
TFMD	467	2291	1798	14172
TLPSDM	3382	10864	65062	82532
TFMDM	4570	7673	65885	61060

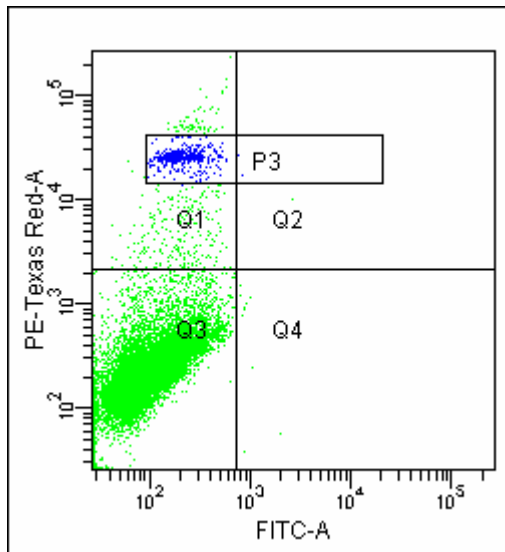
Tab. IV Absolutní počty buněk daných skupin v jednotlivých kvadrantech (počet buněk udáván v 1 ml suspenze)



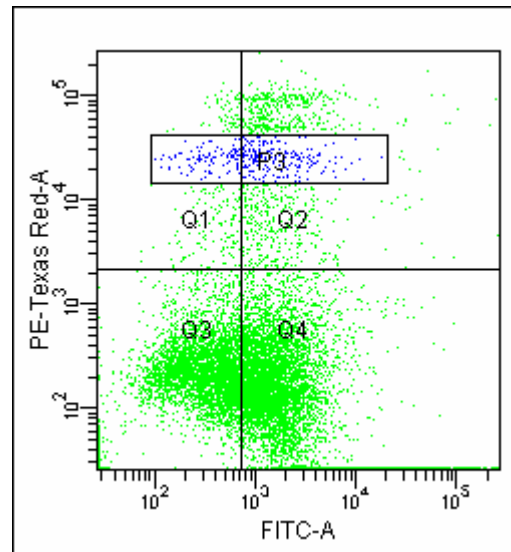
Obr.10 Targetové buňky barvené PI v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



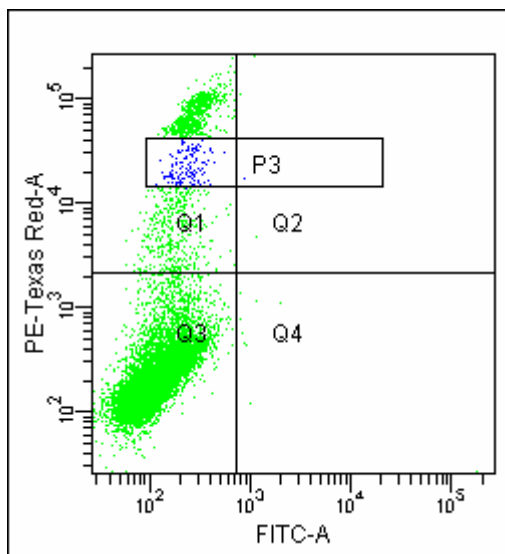
Obr.11 Targetové buňky barvené PI a DiO v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



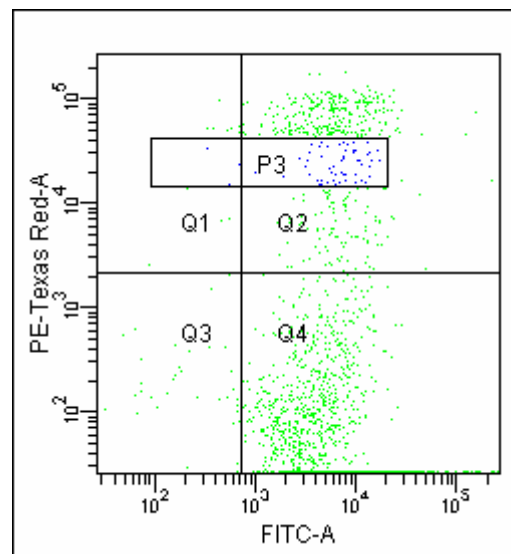
Obr.12 Makrofágy barvené PI v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



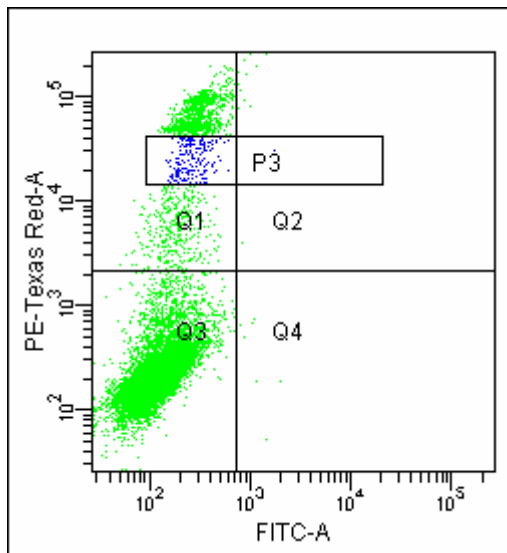
Obr.13 Targetové buňky barvené PI a DiO s makrofágy v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



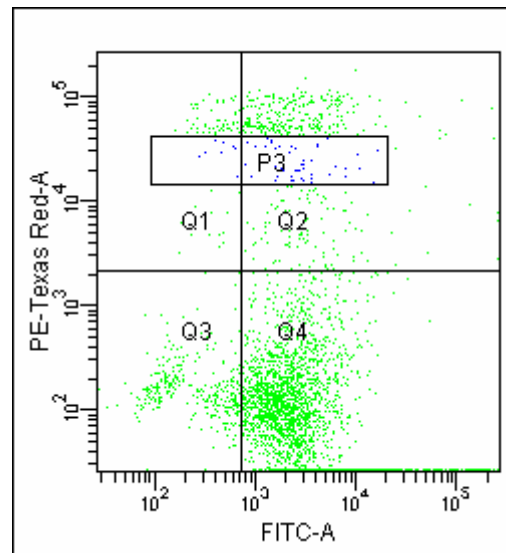
Obr.14 Targetové buňky s LPS barvené PI v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



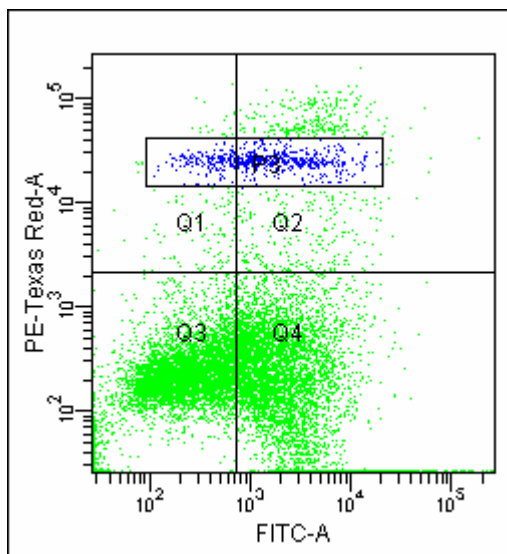
Obr.15 Targetové buňky s LPS barvené PI a DiO v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



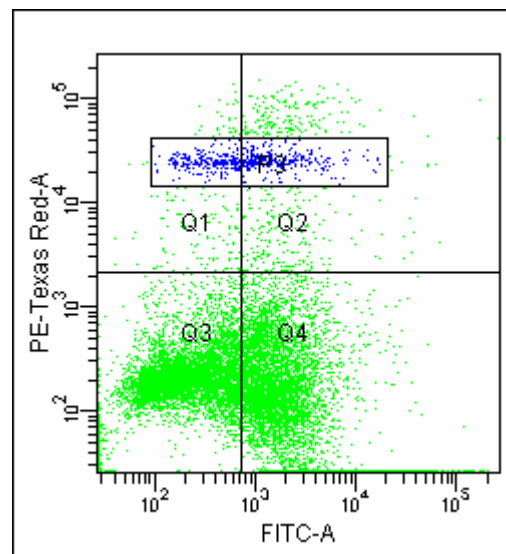
Obr.16 Targetové buňky s FM barvené PI v oblasti PE-Texas Red -A a FITC-A



Obr.17 Targetové buňky s FM barvené PI a DiO v oblastii PE-Texas Red -A a FITC-A



Obr.18 Targetové buňky s LPS barvené PI a DiO s makrofágy v oblasti PE-Texas Red-A a FITC-A



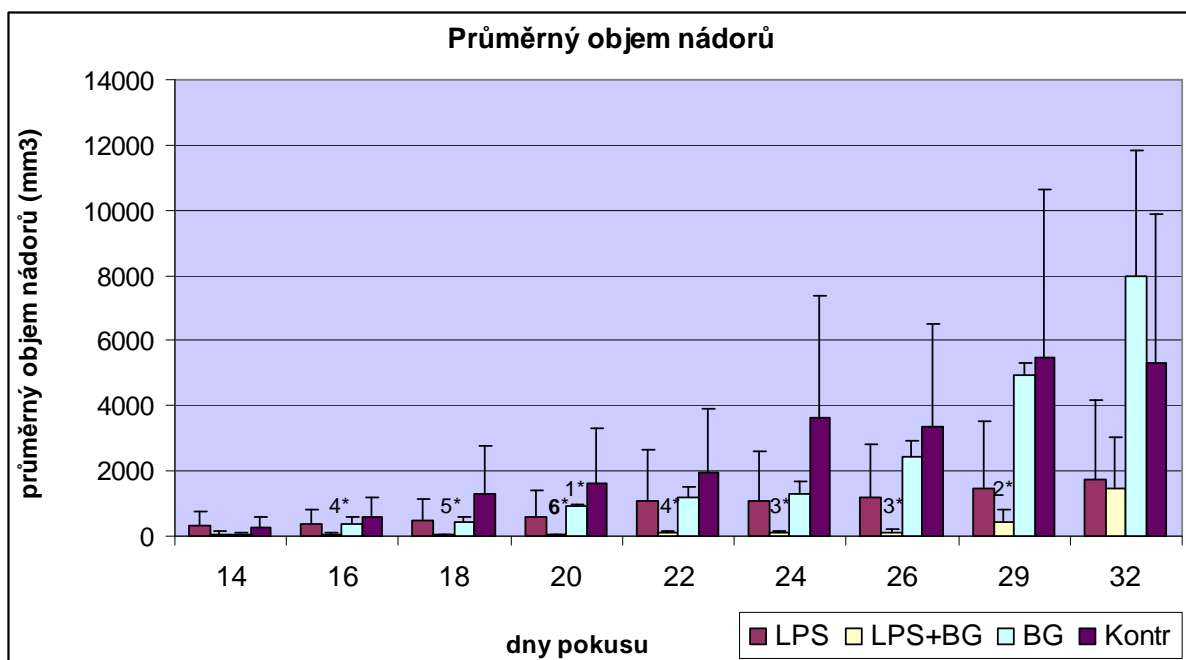
Obr.19 Targetové buňky s FM barvené PI a DiO s makrofágy v oblastii PE-Texas Red-A a FITC-A

Z histogramů je očividné, že výsledky nejsou jednoznačně čitelné, jednotlivé populace buněk se překrývají až splývají. Přestože po 24 hodinové kultivaci zahynulo pouze necelých 6% makrofágů, nepodařilo se prokázat jejich atak na melanomové buňky s instalovanými PAMPs. Tuto metodu bude třeba i nadále doladovat.

4.6. Terapie nádorů za použití LPS a beta glukanu – *in vivo*

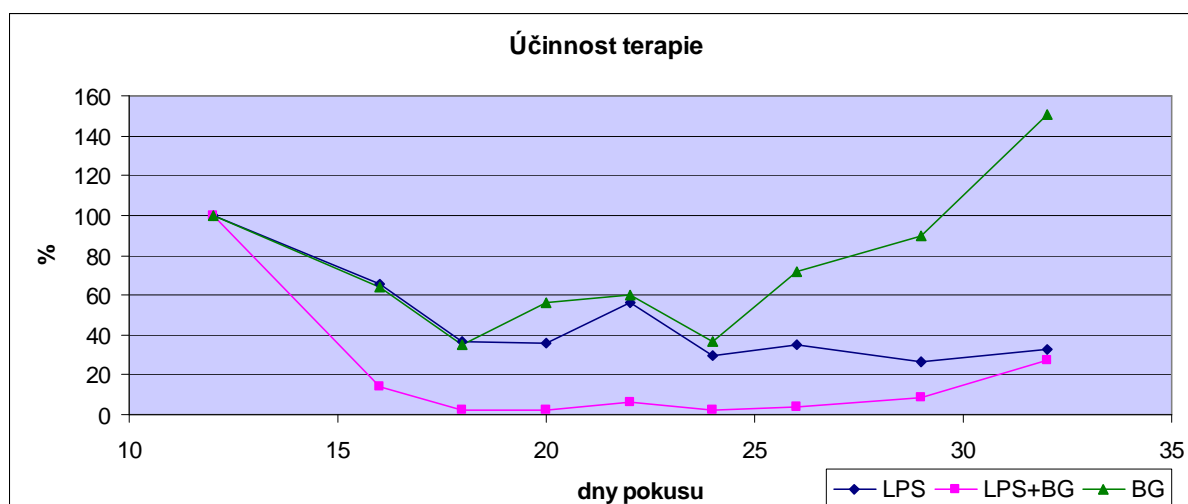
Tento screeningový pokus zvažuje použití silného motivu PAMP k terapii maligních onemocnění za přítomnosti elementů vrozené imunity. Makrofágy, neutrofilů a dendritické buňky mají na svém povrchu exprimovány PRR receptory. Pro lipopolysacharid je specifický TLR4 a scavenger-receptor, pro beta glukán TLR2 a dectin 1. Pro lepší cílení terapie byl lipopolysacharid podáván intratumorálně. Předpokládáme jeho kotvení do nádorových buněk (Carr and Morrison, 1984).

Z grafu (Obr.20) lze vidět, že všechny tři léčené skupiny vykazovaly na danou léčbu citlivost. Zpočátku terapie ve všech případech snižovala nádorovou proliferaci. U myší ve skupině léčené pouze perorálním podáváním beta glukanu ihned po přerušení terapie (všechny terapie byly ukončeny 24. den) začaly nádory rapidně narůstat, objemově dokonce předčily kontrolu. Daleko úspěšnější byla léčba intratumorálním podáváním lipopolysacharidu. Její účinky dokonce přetrvávaly i po přerušení terapie, přesto nebylo dosaženo statistické významnosti. Jako zcela nejlepší se jeví kombinace těchto dvou látek a cest aplikací. Zpomalení proliferace léčených nádorů v této skupině bylo oproti kontrolní statisticky velmi významné.



Obr.20 Vliv lipopolysacharidu a beta glukanu na růst velikosti nádorů; Hladiny statisticky významného rozdílu: 1*: $P \leq 0,05$; 2*: $P \leq 0,01$; 3*: $P \leq 0,005$; 4*: $P \leq 0,001$; 5*: $P \leq 0,0005$; 6*: $P \leq 0,0001$

Dynamika jednotlivých terapií - lipopolysacharidové a beta glukanové léčby byla po dobu podávání terapeutik velmi obdobná (Obr.21). Po téměř identickém nástupu účinnosti léčby docházelo následně jen k malým odchylkám v celkové účinnosti. Tyto dvě terapie snížily rychlost nádorového růstu pod 40%.



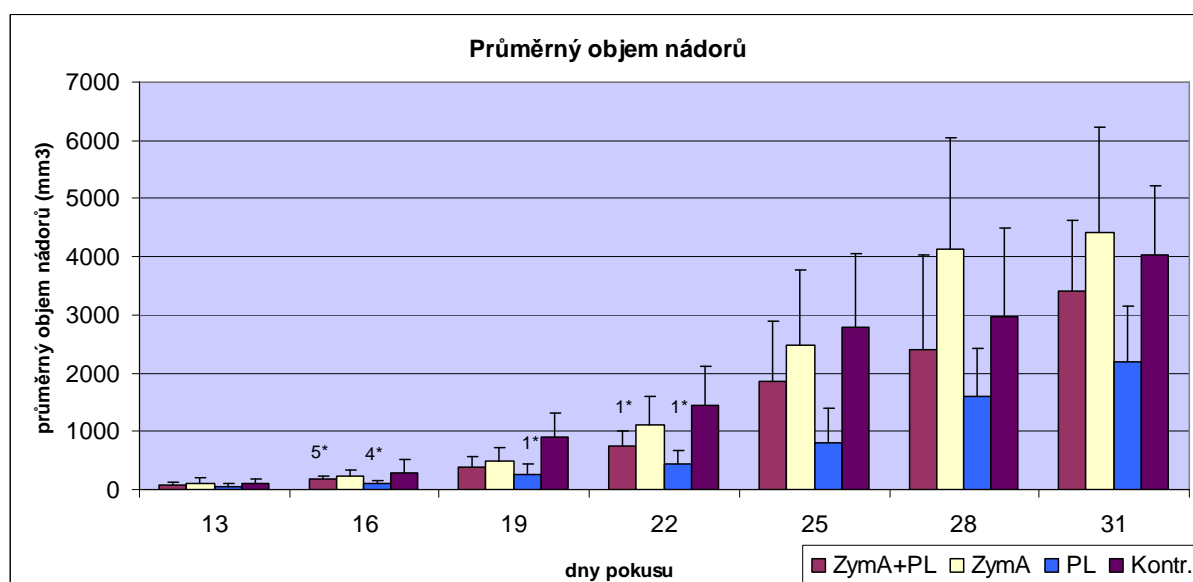
Obr.21 Dynamika účinku v průběhu terapie pomocí LPS a beta glukanu

Kombinovaná terapie lipopolysacharidu s beta-glukanem byla přímo excelentně účinná. V 18., 20. a 24. dnu terapie byl růst nádorů snížen na pouhá 2,47-2,67%! Ale ani ve 22., 26. či 28. dnu terapie růst nádorů v této skupině nepřesáhl 10% kontrolních hodnot!

4.7. Terapie nádorů za použití volného sonikovaného ZymosanuA a Zymosanu A vázaného na nosič – *in vivo*

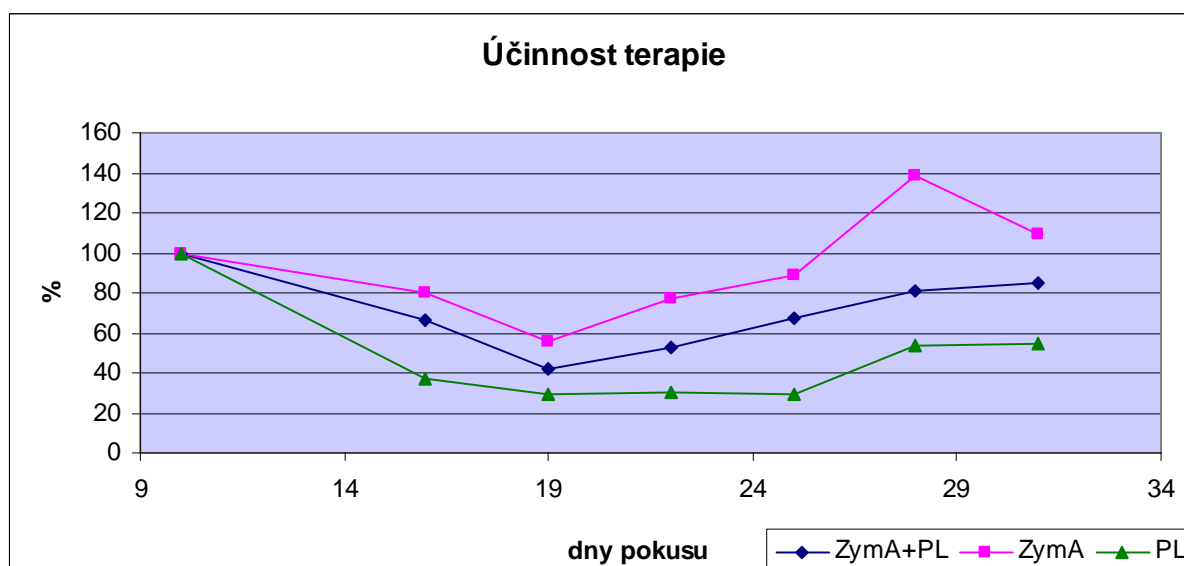
Následující screeningový pokus se zabývá možností efektivnějšího využití motivu PAMP k terapii maligních onemocnění pomocí vrozené imunity. Zymosan A obsahuje účinnou složku beta glukan (agonist TLR2 a dectinu 1) a mannan (agonist MBL a manozového receptoru makrofágů). Beta glukan i mannan jsou vázány na proteiny, proto jsme se pokusili tyto molekuly pomocí glutaraldehydu navázat kovalentně na vysokomolekulární polylysin (za fyziologického pH výrazně kladně nabitý) a použít tak nábojovou interakci s nádorovými buňkami.

Myším v jednotlivých skupinách byla léčba aplikována intratumorálně. Sonikovaný volný Zymosan A měl na léčbu pouze minimální vliv, poměrně brzy přestal být účinný. Sonikovaný Zymosan A navázaný přes glutaraldehyd na polylysin vykazoval lepší léčebné účinky, v 16. a 22. dnu pokusu se tato terapie dostala na uvedené hladiny statistické významnosti (Obr.22).



Obr.22 Vliv volného sonikovaného ZymosanuA a Zymosanu A vázaného na nosič na růst nádorů: 1*: $P \leq 0,05$; 4*: $P \leq 0,001$; 5*: $P \leq 0,0005$

Polylysin snížil růst nádorů oproti kontrole o 70% (Obr.23). Po ukončení terapie (22.den pokusu) ještě následující tři dny udržel svou terapeutickou stabilitu. Je zřejmé, že výsledky skupiny se Zymosanem A vázaným na nosič jsou mezi působením Zymosanu A a samotného nosiče a je možné se domnívat, že jsou dány pouze působením nosiče – polylysinu.



Obr.23 Dynamika účinku v průběhu terapie pomocí volného sonikovaného ZymosanuA (ZymA), Zymosanu A vázaného na nosič (ZymA+PL) a samotný nosič (PL)

5. Diskuze

První experiment prokázal, že dosud používaná cesta *i.m.* aplikace proenzymoterapie je vhodnější, než *s.c.* Tyto výsledky úzce korelují s poznatky o vstřebávání proteáz aplikovaných různými cestami (Kalferstová, 2010). S výsledky Nováka a Trnky, 2005 je obtížné provést srovnání, protože používali *s.c.* aplikaci preparátu bez chymotrypsinogenu, jehož synergický účinek prokázala Kaiserová, 2008. Navíc použitý model byl vhodný pro sledování metastáz, nikoli pro měření vlivu na nádorový růst.

Přechodné změny účinnosti proenzymoterapie v čase je obtížné vzhledem k složitosti systému interpretovat. Prokázalo se však, že u imunologicky plně vyvrážděných organismů je účinnost terapie nejen výrazně vyšší, ale také mnohem stabilnější a bez výkyvů. Optimalizaci metody sice v tomto případě nelze chápat jako doporučení k prodlevě v terapii, ale vymezuje její použitelnost pro organismy s plně vyvrážděnou imunitou (odpovídá i poznatkům Kaiserová, 2010).

V dalším experimentu se prokázalo, že nejlepší způsobem aplikace proenzymové terapie je *i.p.* aplikace. Tyto výsledky opět odpovídají poznatkům o vstřebávání proteáz, které učinila Kalferstová, 2010.

Jelikož se mechanismem působení proenzymů na úrovni imunologické zabývala Kaiserová, 2010, Kalferstová, 2010 a Bartoňová, 2010, rozhodla jsem se přispět k řešení těchto otázek z jiného úhlu. V úzké spolupráci s Laboratoří analytické biochemie RNDr. Petra Šimka, CSc. byl účinek proenzymoterapie řešen na úrovni metabolické. Toto nové proude se rozvíjející odvětví přináší mnoho zajímavých výsledků na nejrůznějších úrovních, dokáže např. přispět k řešení otázky nekrózy versus apoptozy (Pyo et al., 2008) apod. Bylo získáno 180 000 údajů a v současné době stále probíhá jejich zpracování. Zatím je možno konstatovat, že hladiny kyseliny mléčné a kyselin participujících v citrátovém cyklu byly zvýšené a korelovaly s velikostí nádorů. Zvýšení hladiny kyseliny mléčné odpovídá znalostem o nádorovém metabolismu (Warburgův efekt), interpretace zvýšených hladin kyselin z citrátového cyklu je však obtížnější.

Výraznější korelace mezi nádorovou a kontrolní skupinou bylo dosaženo zhruba u dalších 20 metabolitů (dosud neidentifikovaných). Jestli terapie některé metabolity ovlivňuje přímo, bez vztahu k objemu nádoru, bude předmětem dalšího studia, rovněž tak bude řešena interpretace získaných dat ve vztahu k mechanismu působení proenzymoterapie. Věříme, že

zpracování výsledků analýz, které zdaleka není ukončeno, přinese ještě další poznatky s přímou relevancí k léčbě a jejím mechanismům.

In vitro studium vlivu makrofágů na nádorové buňky s instalovanými PAMPs mělo především metodologický význam. Byl optimalizován cytotoxický test (nutné úpravy), test byl kvantifikován a bylo prokázáno, že vliv barvení a PAMPs na nádory je zanedbatelný, systém tedy lze využít pro měření vlivu makrofágů i jiných buněk vrozené imunity. V našich podmínkách buněčná frakce bohatá na makrofágy sice cytotoxický vliv nevykázala, ale to je otázkou dalšího odlaďování pro konkrétní aplikace (nalezení vhodné směsi buď přidaných cytokinů, nebo směsi obsažené v zánětlivém exsudátu apod.) *In vivo* experimenty s LPS a BG přinesly informace o jejich působení na melanomové buňky. LPS byl dosud *i.t.* aplikován v případě gliomů (Mariani et al., 2007; Chicoine et al., 2001). Zde rovněž působil tumor supresivně, ale je třeba zdůraznit, že náš model s nádorem v přirozeném prostředí a to nádorem nesmírně agresivním a rychle rostoucím (doba mitotického cyklu je kolem 12 hodin) byl mnohem náročnější a z potlačení jeho růstu pocítujeme uspokojení. Výsledky s beta glukánem na melanomovém modelu odpovídají našim dosavadním zkušenostem (Kaiserová, 2008, Maierová, 2010). Nejcennější je však zjištění, že LPS a beta glukán působí synergicky. U LPS předpokládáme, že se integruje do membrán nádorových buněk a působí na TLR-4 a scavengerové fagocytární receptory. Beta glukán působí přes TLR-2 a Dectin 1 a účinně stimuluje makrofágy. V dalším studiu bude vhodné pokračovat s léčbou bez ohledu na cenu LPS déle. U LPS sice hrozí nebezpečí septického šoku, ale my jsme se při dosavadních experimentech s žádnými potížemi nesetkali. Vysvětlení spatřujeme v tom, že se LPS integruje velmi aktivně do membrán (Carr and Morrison, 1984) a tudíž při *i.t.* aplikaci zůstane navázán v nádoru. Po fagocytární likvidaci zřejmě přestanou být jeho fragmenty nebezpečné.

Výsledky s použitím samotného Zymosanu A odpovídají našim zkušenostem s *i.t.* aplikací beta glukánu, která se u melanomového modelu ukazuje jako neúspěšná (Maierová, 2010; Čechová, 2010). V případě Zymosanu A se kromě betaglukanproteinu zapojuje i mannanprotein (možná aktivace MR makrofágů a sérového MBL), efekt však nebyl velký. Pokusili jsme se zesíťovat pomocí glutaraldehydu mannanprotein a betaglukanprotein s polylysinem tak, aby vzniklý komplex díky pozitivnímu náboji byl zachycován na výrazně záporných površích nádorových buněk. Vznikaly sice rovněž polymery samotného mannanproteinu, betaglukanproteinu a polylysinu, ke vzniku žádoucích komplexů však nemohlo dojít. Preparát vykazoval sice proti samotnému Zymosanu výrazně vyšší účín, otázkou však zůstává, zda to nebylo jen důsledkem působení přítomných agregátů polylysinu, jako tomu bylo v kontrole. Je možné, že velké komplexy mannan- a betaglukanproteinu (se

zbytky stěn *S. cerevisiae*) není možné pouze elektrostaticky ukotvit, že jsou příliš velké a těžké. Tento experiment však přinesl neméně zajímavé zjištění – velký účín síťovaného vysokomolekulárního polylysinu na nádory. Je sice známo, že vysokomolekulární polylysin na nádorové buňky působí (Arnold et al., 1979), tato studie však sledovala pouze určité brzdění nádorové proliferace. Jak bylo *in vitro* zjištěno (Ženka, ústní sdělení), účín polylysinu o Mw nad 40 000 na nádorové buňky je překvapivě značný. Ukazuje se to jako možný směr dalšího výzkumu, neboť polylysin se na vysoce záporně nabitých nádorových buňkách při *i.t.* vychytává a v *in vivo* experimentech nepůsobí žádné vedlejší účinky ani při vysokých koncentracích (Ženka, ústní sdělení). Navíc působí povrchově, jeho účinek je vysvětlován přemostěním většího membránového úseku (Arnold et al., 1979). Tím se stává ideálním chemoterapeutikem nezávislým na multi-drug rezistenci. Jeho degradační produkty, polylyliny o menší molekulové váze jsou zcela neškodné (Arnold et al., 1979), totéž ověřil *in vitro* Ženka, ústní sdělení.

6. Souhrn

1/ Byl optimalizován způsob aplikace proenzymoterapie. Jako nejúčinnější je *i.p.* aplikace, pak *i.m.* a nejhorší způsob je *s.c.* aplikace.

2/ Byl prokázán pozitivní vliv vyzrálé imunity na účinnost proenzymoterapie.

3/ Metabolomická studie melanomů a jejich proenzymové terapie přinesla zjištění korelace velikostí nádorů s hladinami kyseliny mléčné a kyselin participujících v citrátovém cyklu.

4/ Byla zavedena, optimalizována a kvantifikována metoda *in vitro* studia vlivu buněk vrozené imunity na nádorové buňky s použitím průtokového cytometru.

5/ Byl zjištěn velmi výrazný vliv *i.t.* aplikovaného LPS na redukci nádorového růstu melanomů. Tento účín byl výrazně zesílen synergickým působením perorálně aplikovaného beta glukanu.

6/ Byl studován vliv *i.t.* aplikovaného sonikovaného Zymosanu A na melanomové buňky, a to volného i vázaného na kladně nabitý nosič. Experiment ukázal nutnost lepšího kotvení Zymosanu A na nádorové buňky. Bylo též zjištěno, že polylysin působí na nádorové buňky velmi účinně a je diskutována otázka jeho použití jako chemoterapeutika.

7. Seznam použité literatury

Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD, 1994: Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *The Journal of Immunology* 153(4): 1674-1686.

Arnold LJ, Dagan A, Gutheil J, Kaplan NO, 1979: Antineoplastic activity of poly(L-lysine) with some ascites tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3246-3250.

Bartoňová I, 2010: Dynamika sérových antiproteáz při (pro)enzymoterapii nádorových onemocnění. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce.

Beard J, 1905: The cancer problem. *Lancet* 4: 281-283.

Beard J, 1911: The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis. *Chatto and Windus*.

Beaudry VG, Jiang D, Dusek RL, Park EJ, Knezevich S, Ridd K, Vogel H, Bastian BC, Attardi LD, 2010: Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis. *Public Library of Science Genetics* 6(10): e1001168.

Becker Ch, Fantini MC, Neurath MF, 2006: TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine and growth factor reviews* 17: 97-106.

Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U, 1995: Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *The Journal of Immunology* 155(3): 1066-1073.

Berg DJ, Zhang J, Lauricella DM, Moore SA, 2001: Il-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *J Immunol.* 166(4): 2674-2680.

Campbell JT, 1907: Trypsin treatment of a case of malignant disease, involving the left

tonsil, base of tongue and epiglottis. *JAMA* 48: 225-226.

Carr C and Morrison DC, 1984: Lipopolysaccharide interaction with rabbit erythrocyte membranes. *Infect Immun.* 43(2): 600–606.

Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, Narula S, Caligiuri MA: The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 85(12): 3577-3585.

Chicoine MR, Eun Kyung Won, Zahner MC, Parsa AT, Bruce JN, Piepmeier JM, Rock JP, Sawaya R, 2001: Intratumoral injection of lipopolysaccharide causes regression of subcutaneously implanted mouse glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 48(3): 607-615.

Cleaves MA, 1906: Pancreatic ferments in the treatment of cancer and their role in prophylaxis. *Med. Record* 70: 918-919.

Cormier JN, Hijazi YM, Abati A, Fetsch P, Bettinotti M, Steinberg SM, Rosenberg SA, Marincola FM, 1998: Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma *in vivo*. *International Journal of Cancer* 75(5): 517-524.

Coulie PG, Hanagiri T, Takenoyama M, 2001: From tumor antigens to immunotherapy. *Int J Clin Oncol* 6: 163-170.

Crookston KP, Webb DJ, Wolf BB, Gonias SL, 1994: Classification of α 2-macroglobulin-Cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J. Biol. Chem.* 269: 1533-1540.

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

Čáp R, Dobeš D, Hošek F, Hyža P, 2005: Maligní melanom, *Vojenské zdravotnické listy* 74(1): 4-8.

Čechová M, 2010: Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce.

Diks SH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP, 2001: Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. *J Endotoxin Res* 7(5): 335-348.

Dickson I and Alper CA, 1974: Changes in serum proteinase inhibitor levels following bone surgery. *Clin. Chim. Acta* 54(3): 381–385.

Fearon ER and Vogelstein B, 1990: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

Garigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Velluci VF, Reiss M, 1995: Missence mutations of transforming growth factor β type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 55: 3982-3987.

Gewert K, Holowachuk SA, Rippe C, Gregory PC, Erlanson-Albertsson C, Olivecrona G, Kruszewska D, Piedra JV, Weström B, Pierzynowski SG, 2004: The enzyme levels in blood are not affected by oral administration of a pancreatic enzyme preparation (Creon 10,000) in pancreas-insufficient pigs. *Pancreas* 28: 80-88.

Gold LI, 1999: The role for transforming growth factor beta (TGF- β) in human cancer. *Crit. Rev. Oncogenes* 10(4): 303-360.

Golley FB, 1906: Two cases of cancer treated by the injection of pancreatic extract. *Med. Record* 70: 918-919.

Gurchot C, 1975: The trophoblast theory of cancer (*John Beard, 1857–1924*) Revisited, *Oncology* 31:310-333.

Hanahan D and Weinberg RA, 2000: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hall SW, LaMarre J, Marshall LB, Hayes MA, Gonias L, 1992: Binding of transforming growth factor- β 1 to methylamine-modified α 2-macroglobulin and to binary and ternary α 2-macroglobulin-proteinase complexes. *Biochem. J.* 281: 569-575.

Hayflick L, 1965: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37:614-636.

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM, 1988: Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157(1): 87-94.

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

Howell JB, Beck T, Bates B, Hunter MJ, 1983: Interaction of α 2-macroglobulin with trypsin, chymotrypsin, plasmin and papain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 221(1): 261-270.

Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakuraiy MK, Ohnishi Y, Ueyama Y, Nomura T, 1986: Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn J Cancer Res* 77: 190-196.

James K, 1990: Interactions between cytokines and alpha 2-macroglobulin. *Immunol Today* 11: 163-166.

Kaiserová P, 2008: Proenzymoterapie sarkomu S-180. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce.

Kaiserová P, 2010: Imunologické aspekty proenzymoterapie maligních onemocnění. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce.

Kalferstová L, 2008: Proenzymoterapie melanomu B16-F10. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce.

Kalferstová L, 2010: Optimalizace (pro)enzymové terapie rakoviny. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce.

Khazen W, M'Bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C, 2005: Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters* 579(25): 5631-5634.

Krebs E, 1947: Cancer and the embryonal hypothesis, *California Medicine* 66(4): 270–271.

Krejsek J and Kopecký O, 2004: Klinická imunologie. *Nucleus HK®*: 87-121, 541-566.

Lauer D, Müller R, Cott C, Otto A, Naumann M, Birkenmeier G, 2001: Modulation of growth factor binding properties of α 2-macroglobulin by enzyme therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47(1): 4-9.

Laurell CB and Jeppsson JO, 1975: Protease inhibitors in plasma. The Plasma Proteins 1 (Edited by Putnam F.W.), *Academic Press*, New York: 229-264.

Letterio JJ and Roberts AB, 1998: Regulation of immune responses by TGF β . *Annu Rev. Immunol.* 16: 137-161.

Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG, 2002: The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129(4):263-276.

Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK, 2005: Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost* 3: 1884-1893.

Maierová V, 2010: Studium možnosti kombinace proenzymoterapie s cílenou chemoterapií a s metabolickým ovlivněním nádorů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce.

Mariani CL, Rajon D, Bova FJ, Streit WJ, 2007: 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* 85: 231-240.

McBride OW, Swan DC, Santos E, Barbacid M, Tronick SR, Aaronson SA, 1982: Localization of the normal allele of T24 human bladder carcinoma oncogene to chromosome 11. *Nature* 300: 773-774.

Mehrishi JN, 1969: Effect of lysine polypeptides on the surface charge of normal and cancer cells. *European Journal of Cancer* 5(5): 427-435.

Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M, 2002: Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences* 70: 791-798.

Novák JF and Trnka F, 2005: Proenzyme Therapy of Cancer. *Anticancer Research* 25: 1157-1177.

Nyberg P, Moilanen M, Paju A, Sarin A, Stenman UH, Sorsa T, Salo T, 2002: MMP-9 Activation by Tumor Trypsin-2 Enhances *in vivo* Invasion of Human Tongue Carcinoma Cells. *Journal of Dental Research* 81(12): 831-835.

Onishi T, Onishi Y, Imagava K, Ohmoto Y, Murata K, 1999: An assessment of immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. *British Journal of Urol Int* 83(4): 488-492.

Pandey R, Patil N, Rao M, 2007: Proteases and protease inhibitors: Implication in antitumorogenesis and drug development. *International Journal of Human Genetics* 7(1): 67-82.

Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK, Prime SS, 2001: Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology* 193(4): 458-467.

Pinson DM, LeClaire RD, Lorsbach RB, Parmely MJ, Russell SW, 1992: Regulation by transforming growth factor-beta 1 of expression and function of the receptor for IFN-gamma on mouse macrophages. *The Journal of Immunology* 149(6): 2028-2034.

Pizzo SV and Gonias SL, 1984: Receptor – mediated protease regulation. *The receptors 1*, Academic press, New York: 178-221.

Podgorski I and Sloane BF, 2003: Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp* 70: 263-276.

Prete G, Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S, 1993: Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *The Journal of Immunology* 150(2): 353-360.

Pyo JS, Ju HK, Park JH, Kwon SW, 2008: Determination of volatile biomarkers for apoptosis and necrosis by solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry: a pharmacometabolomic approach to cisplatin's cytotoxicity to human lung cancer cell lines. *Journal of Chromatography B* 876(2): 170-174.

Rhee SH, Eunok IM, Pothoulakis C, 2008: Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* 135: 518-528.

Saksela O, Wahlström T, Meyer B, Vaheri A, 1984: Presence of α -2-Macroglobulin in Normal but not in Malignant Cervical Epithelium. *Cancer research* 44: 2942-2946.

Sato Y, Kobori S, Sakai M, Yano T, Higashi T, Matsumura T, Morikawa W, Terano T, Miyazaki A, Horiuchi S, Shichiri M, 1996: Lipoprotein(a) induces cell growth in rat peritoneal macrophages through inhibition of transforming growth factor-beta activation. *Atherosclerosis* 125(1):15-26.

Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT, 1999: Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 21: 339-359.

Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC, 1991: Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *The Journal of Immunology* 146(10): 3289-3297.

Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Cofman RL, Mosmann TR, Vitetta ES, 1988: Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334: 255-258.

Strassmann G, Cole MD, Newman W, 1988: Regulation of colony-stimulating factor 1-dependent macrophage precursor proliferation by type beta transforming growth factor. *The Journal of Immunology* 140(8): 2645-2651.

Swenson RP and Howard JB, 1979: Structural characterization of human alpha-2-macroglobulin subunits. *J Biol Chem* 254: 4452-4456.

Šťastný F, Pliss L, Höschl C, 2002: Interaction between proteases and blood-brain barrier: Possible sequelae for clinical praxis. *Psychiatrie* 4: 230-241.

Takahara H and Sinohara H, 1982: Mouse plasma trypsin inhibitors: Isolation and characterization of α -1-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor. *J. biol. Chem.* 257: 2438-2446.

Takahara H, Nakamura Y, Yamamoto K, Sinohara H, 1983: Comparative studies on the serum levels of α -1-antitrypsin and α -macroglobulin in several mammals. *J. exp. Med.* 139: 265-270.

Takahara H, Sibata S, Sinohara H, 1984: Conformational Differences between Mouse Contrapsin and α -1-Antitrypsin as Studied by Ultraviolet Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy. *Tohoku J. exp. Med.* 142 (3): 261-273.

Terrazzano G, Romano MF, Turco MC, Salzano S, Ottaiano A, Venuta S, 2000: HLA class I antigen downregulation by interleukin (IL)-10 is predominantly governed by NK-kappaB in the short term and by TAP1+2 in the long term. *Tissue Antigens* 55(4): 326–332.

Thomas DA and Massagué J, 2005: TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8(5): 369-380.

Travis J, Bowen J, Baugh R, 1978: Human α -1-antichymotrypsin: interaction with chymotrypsin-like proteinases. *Biochemistry* 17(26): 5651–5656.

Triolo V, 1965: Nineteenth century foundations of cancer research advances in tumor pathology, nomenclature, and theories of oncogenesis. *Cancer Research* 25(2): 75-106.

Tsan MF, 2006: Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Seminars in Cancer Biology* 16(1): 32–37.

Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ, Schreiber H, 1986: Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5233-5237.

Veselský Z, Macek P, Morávek P, Mat'ha V, Fröstl M, Višňovský P, Prošvic P, Odrátka K, Vaculíková M, Holub L, 2004: Základy imunologie nádorových onemocnění. Urologie pro praxi 1, www.urologiepropraxi.cz.

Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE, 1991: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174(5): 1209-1220.

Wait R, Chiesa G, Parolini C, Miller I, Begum S, Brambilla D, Galluccio L, Ballerio R, Eberini I, Gianazza E, 2005: Reference maps of mouse serum acute-phase proteins: Changes with LPS-induced inflammation and apolipoprotein A-I and A-II transgenes. *Proteomics* 5: 4245–4253.

Wald M, Olejář T, Šebková V, Zadinová M, Boubelík M, Poučková P, 2001: Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C17B16 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 47(7): 16-22.

Walker L, Kulomaa MS, Bebok Z, Parker WB, Allan P, Logan J, Huang Z, Reynolds RC, King S, Sorscher EJ, 1996: Development of drug targeting based on recombinant expression of the chicken avidin gene. *J Drug Targeting* 4(1): 41-49.

West J, Munoz-Antonia T, Johnson JG, Klotch D, Muro-Cacho CA, 2000: Transforming growth β type II receptors and smad proteins in follicular thyroid tumors. *Laryngoscope* 110(8): 1323-1327.

Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, Imsumran A, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, Horiuchi S, Yoshida M, Itoh F, Imai K, 2003: Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer. *The Journal of Pathology* 199(2): 176-184.

Ziv E, Lior O, Kidron M, 1987: Absorption of protein *via* the intestinal wall. A quantitative model. *Bioch Pharmacol* 36: 1035-1039.

Živná V, 2010: Kombinovatelnost proenzymoterapie s látkami přímo atakujícími maligní nádory. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce.