

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**STUDIUM MOŽNOSTI POUŽITÍ
FORMYLMETHIONINOVÝCH PEPTIDŮ
V PROTINÁDOROVÉ TERAPII**

Bakalářská práce

Nikol Vácová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2013

Vácová, N., 2013: Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. [The study of the possibility to use formylmethionine peptides in cancer therapy.] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Binding of formylmethionine peptides on surface of tumor cells caused significant reduction of tumor growth. This reduction was enhanced by LPS (strong synergy). Levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines were monitored in cancer environment.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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, 25. dubna 2013

.....

Nikol Vácová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou vyjádřila svůj dík RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho cenné připomínky a ochotu při vedení mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD., který mi vyšel maximálně vstříc a umožnil mi přístup ke všem potřebným informacím. V neposlední řadě děkuji prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za vzácné rady a poskytnutí prostředků a prostor v laboratořích Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

OBSAH:

1. ÚVOD.....	1
1.1. Zhoubné bujení.....	1
1.1.1. Příčiny vzniku nádorů	2
1.1.2. Vlastnosti a rozdělení nádorů	3
1.1.3. Vznik nádorového bujení	4
1.1.4. Invazivita a metastazování zhoubných nádorů.....	5
1.1.5. Melanom.....	6
1.1.6. Myší melanom B16-F10.....	8
1.2. Imunitní systém a nádorová onemocnění.....	9
1.2.1. Vrozená a získaná imunita	9
1.2.2. Imunologický dozor a imunologická tolerance	11
1.2.3. Mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému.....	12
1.2.4. Cytokiny a nádorový růst	13
1.3. Diagnostika a léčba nádorových onemocnění.....	16
1.3.1. Primární diagnostika nádorových onemocnění	16
1.3.2. Laboratorní diagnostika nádorových onemocnění.....	16
1.3.2. Možnosti léčby nádorových onemocnění.....	18
1.4. Imunoterapie nádorových onemocnění založená na vrozené imunitě.....	21
1.4.1. N-formylmethioninové peptidy a formylpeptidové receptory (FPRs).....	23
1.4.2. Lidské a myší formylpeptidové receptory.....	23
2. CÍLE PRÁCE	25
3. MATERIÁL A METODY	26
3.1. Chemikálie	26
3.2. Laboratorní zvířata a nádorové buněčné linie	26
3.3. Příprava melanomových buněk pro <i>in vivo</i> pokusy.....	27
3.4. Transplantace melanomových buněk.....	27
3.5. Zjišťování koncentrace různých cytokinů v nádoru	27
3.6. Měření velikosti nádorů	28
3.7. Statistické vyhodnocení dat.....	28
3.8. Příprava terapeutických látek	28
3.8.1. Příprava f-MLFKK-BAM	28

3.8.2. Příprava f-MLFKK-SMCC a jeho použití.....	28
3.8.3. Příprava fMLFKK-SM(PEG) ₁₂ a jeho použití.....	29
3.8.4. Manan-SMCC a jeho použití.....	29
3.9. Pokusy.....	29
3.9.1. Produkce cytokinů leukocytární infiltrací v melanomu B16-F10	29
3.9.2. Působení f-MLFKK-SMCC samotného i ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10.....	30
3.9.3. Působení f-MLFKK-SMCC/LPS ve směsi s manan-SMCC/LPS a působení f-MLFKK-SMCC/LPS v kombinaci s manan-SMCC/LPS (střídavě) na růst melanomu B16-F10.....	31
3.9.4. Působení f-MLFKK-SMCC ve směsi s LPS versus působení f-MLFKK-SM(PEG) ₁₂ ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10.....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY	33
4.1. Produkce cytokinů leukocytární infiltrací v melanomu B16-F10	33
4.1.1. Interleukin-1 beta (IL-1 β).....	33
4.1.2. Tumor necrosis factor- α (TNF- α).....	34
4.1.3. Interleukin-6 (IL-6).....	36
4.1.5. Interleukin-8 (IL-8).....	37
4.1.6. Tumor growth factor- β (TGF- β).....	38
4.2. Působení f-MLFKK-SMCC samotného i ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10.....	39
4.3. Působení f-MLFKK-SMCC/LPS ve směsi s manan-SMCC/LPS a působení f-MLFKK-SMCC/LPS v kombinaci s manan-SMCC/LPS (střídavě) na růst melanomu B16-F10.....	41
4.4. Působení f-MLFKK-SMCC ve směsi s LPS versus působení f-MLFKK-SM(PEG) ₁₂ ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10	44
5. DISKUZE.....	45
6. ZÁVĚR	48
7. SEZNAM ZKRATEK	49
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51

1. ÚVOD

V roce 1953 bylo v ČSSR zavedeno povinné hlášení nemocných zhoubným novotvarem a v roce 1976 hlášení kontrolní, které zahrnuje i příčinu úmrtí. Mezi lety 1965 a 1985 se celková incidence všech zhoubných onemocnění v ČSSR zvedla o 57 % a úmrtnost se během těchto 20 let udržela mezi 20,5 – 19,7 %. Tehdy náležela ČSSR mezi ty evropské státy, jejichž hodnoty incidence i mortality byly vysoké (Bek, 1989).

Vysoký výskyt zhoubných nádorů v České republice v celosvětovém měřítku potvrzuje Zámečník ve své publikaci z roku 2002 (Zámečník, 2002).

Trend mortality z 60. až 80. let můžeme považovat za stacionární, od 90. let mírně klesá. Zato trend incidence vykazuje stále stejný vývoj, rostoucí. Zhoubné novotvary jsou více než 40 let druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR po kardiovaskulárních chorobách, a to u obou pohlaví (Srb, 2012).

Lauren Pecorino začíná svou knihu větou o tom, že statistiky výskytu maligních onemocnění jsou šokující, a pokračuje tím, že jeden člověk ze tří během života trpí nějakým onkologickým onemocněním (Pecorino, 2012).

Zmiňuji se o datech týkajících se převážně našeho území, ale výskyt maligních onemocnění je závažný globální problém.

1.1. Zhoubné bujení

Velikost jakékoliv buněčné populace v mnohobuněčném organismu je přísně kontrolována rovnováhou mezi signály, které stimulují nebo inhibují proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Narušení intracelulárních a extracelulárních dějů, které regulují buněčné funkce, může mít za následek změny v počtu buněk v určité tkáni. Takové změny jsou často základem patologického vývoje (Pusztai a Cooper, 1996).

Dějem zvaným nádorová transformace buňky dochází k přeměně normální buňky v buňku nádorovou, a jejím dělením pak vzniká celý nádor, který tedy představuje klonální proliferaci. Podstatou transformace je mutace určitých genů (Fakan, 2005).

Za nádor je považován shluk abnormálních buněk, které rostou odlišně od buněk normálních, a tento růst přetrvává v těle i v době, kdy přestala působit příčina vyvolávající-

cí nádor. Typické pro nádory je, že se vymykají z kontrolních mechanismů, které řídí růst normálních tkání (Mačák a Mačáková, 2004).

1.1.1. Příčiny vzniku nádorů

Základní příčina vzniku onkologického onemocnění je změna genetické výbavy buňky. Změna se projeví výpadkem určitých funkcí jako je regulace buněčného růstu. Genetické změny související se vznikem neoplazmy mohou vzniknout náhodnou chybou při dělení buňky, ale častěji jsou způsobeny vnějšími vlivy (Zámečník, 2002).

Faktory, které se podílejí na vzniku nádorů, jsou chemické látky zevního prostředí, fyzikální vlivy, viry, hormony, dědičnost a dietetické zvyklosti. Chemické látky, které při působení na organismus vedou ke vzniku zhoubného bujení, se nazývají kancerogeny. Ze zevních fyzikálních vlivů majících vliv na vznik nádorů je nejvýznamnější záření. Rentgenové záření a obecně záření s krátkou vlnovou délkou jsou prokazatelnými příčinami zhoubných nádorů. Určité dávky záření mohou nádor sice léčit, ale jde jen o obdobu situace, kdy některé prudké jedy působí příznivě s léčebným účinkem, jestliže jsou použity v malém množství. Větší dávky a zejména opakovaná ozařování mohou vést ve vzniku nádoru. Zvýšená expozice slunečnímu ultrafialovému záření (zvláště UV-B, $\lambda = 290 - 320$ nm) vede ke zvýšené četnosti kožních nádorů (např. melanomů). Papilomaviry, herpes viry nebo Epstein-Baarové virus jsou příklady virů, které mohou vyvolat nádorové onemocnění. Hormony mohou ovlivnit vznik nádorů, působí-li v nadměrném množství, a příkladem jsou zejména estrogény. Zvýšené hladiny estrogenů se dávají do vztahu se vznikem řady karcinomů u žen, např. prsu, děložní sliznice a vaječníků. Přímá dědičnost nebyla u nádorů prokázána, ale potomek může mít predispozice ke vzniku nádoru určené dědičnými vnitřními podmínkami. Zkoumání větších souborů lidí v různých oblastech světa ukazuje, že jsou rozdíly v kvalitě potravy a jejích způsobech úpravy a současně ve výskytu zhoubných nádorů (Krejčí a Dvořáček 1978, Mačák a Mačáková, 2004).

Ve více než 20 % smrtelných onkologických onemocnění hraje roli strava. Svůj vliv může mít strava, která obsahuje mnoho nasycených tuků a zároveň málo vlákniny a antioxidantů, které lze získat ze zeleniny a ovoce. Tento vliv zůstává diskutabilní, nicméně obezita je stále hlavním rizikovým faktorem pro diabetes a některá nádorová onemocnění jako karcinom prsu nebo tlustého střeva (Pelengaris a Khan, 2006).

Dědičné je například autozomálně dominantní onemocnění familiární polypóza tlustého střeva, která je prekancerózou kolorektálního karcinomu. U členů rodin

s familiární polypózou tlustého střeva je téměř 100% riziko vzniku karcinomu (Bek a kol., 1989).

Nelze striktně říci, že působení jednoho rizikového faktoru vždy vyvolá nádorové bujení. Rizikové faktory působí v kombinaci, a to ještě stále nemusí znamenat vznik nádoru, avšak působení škodlivého faktoru zvyšuje naše riziko na toto onemocnění (Pelengaris a Khan, 2006).

1.1.2. Vlastnosti a rozdělení nádorů

Biologické vlastnosti nádorů se vyjadřují pojmy benignita (nezhoubnost) a malignita (zhoubnost). Důležité je pojmy „benigní“ a „maligní“ chápat ve vztahu k nádoru, nikoliv ve vztahu k postiženému nádorem. Ačkoliv obecně platí, že benigní nádor má lepší prognózu než maligní nádor, i benigní nádor může způsobit vážné až smrtelné komplikace utlačováním cév a důležitých vývodů. Existují mezistupně označované jako semimalignita, potenciální malignita a nízká malignita (Jirásek a Klener, 1989).

Základní charakteristika obou typů je dána několika vlastnostmi. Za vlastnost nezhoubných nádorů je považován pomalý expanzivní růst, což vypadá tak, že nádor je obvykle ohraničený, zvětšuje svůj objem, tím utlačuje okolní tkáň, ale neprorůstá jimi. Především netvoří metastázy a po vyoperování se neopakuje. Naopak růst zhoubného nádoru je rychlý a infiltrativní – neohraničený, nádor prorůstá do tkáně, a tím ji destruuje. Maligní nádory se špatně odstraňují a recidivují (Mačák a Mačáková, 2004).

Výhradní vlastností maligních nádorů je schopnost šířit se po organismu a zakládat druhotná ložiska zvaná metastázy. Nádorové buňky se mohou dostat do lymfatických cév a touto cestou do lymfatických uzlin, kde se buňka zachytí a založí nové nádorové ložisko. Další možností je krevní cesta, kdy vznikají metastázy i v jiných orgánech, než se vyskytuje primární ložisko (Zámečník, 2002).

Dalším parametrem rozdělení nádorů je jejich tkáňový původ. Nádory mohou patřit k několika histologicky odlišným typům: mezenchymální, epitelové, neuroektodermové, smíšené a germinální nádory (germinomy). Do mezenchymálních nádorů patří nádory vaziva, chrupavky, kosti, cév a tukových, svalových a krevních buněk. Epitelové nádory postihují krycí a žláznový epitel. Nádory CNS, periferního nervstva, kůže a sliznic řadíme do skupiny neuroektodermových nádorů. Označení smíšené nádory nesou takové nádory, jež vznikly z dvou tkání různého původu, například fibroleiomyom je nádor z hladké svaloviny s příměsí vaziva. Germinomy jsou nádory z buněk účastnicích se

vzniku a vývoje jedince, tj. z nezralých pohlavních buněk, nezralé tkáně embrya, pupečníku, placenty a plodových obalů, ale i ze zralých tkání dospělého (Stříteský a Halberstadt, 1995).

Stříteský a Halberstadt ještě uvádějí dva extra případy nádorů, které nemohou být zařazeny k žádnému ze zmiňovaných typů tkání, v nichž mají nádory svůj původ a jejichž strukturu napodobují. Prvním případem je vysoce maligní choriokarcinom, který odpovídá trofoblastu. Zároveň zmiňuje fakt, že choriokarcinom může vzniknout jako zvláštní typ germinálního nádoru pohlavních žláz u mužů i u žen. Druhým případem je skupina nádorů hromadně nazývána mezoteliom, což jsou benigní i maligní nádory z výstelky tělních dutin, tedy z pohrudniční, břišní a osrdečnickové (Stříteský a Halberstadt, 1995).

1.1.3. Vznik nádorového bujení

Genetická nestabilita se zdá být zásadní vlastností nádorových buněk. Celý proces vzniku nádorového onemocnění začíná počátečními mutacemi, na které se během vývoje nádoru nabalují další a další mutace, jež umožňují nádorům dále růst, poškozovat okolní tkáň, metastazovat, narušovat obranné mechanismy organismu, celkově se přizpůsobovat a ovlivňovat okolní podmínky (Zámečník, 2002).

Výzkum ukazuje, že zhoubné bujení je onemocnění genomu na buněčné úrovni. Důkazem pro toto tvrzení je fakt, že DNA nádorových buněk obsahuje mnoho změn zahrnujících bodové mutace, ale i rozsáhlé chromozómové dalece a translokace (Pecorino, 2012).

Nahromadění mutací v buňkách během života představuje vícestupňový proces kancerogeneze. Podmínka nahromadění mutací v čase vysvětluje to, proč je vyšší riziko onemocnění zhoubným nádorem ve vyšším věku a proč se zvýšil výskyt zhoubných onemocnění napříč stoletími tak, jak se prodloužil průměrný věk. Čím déle člověk žije, tím má teoreticky větší šanci na to, že v jeho DNA proběhne právě tolik změn, které vedou k výskytu nádorového onemocnění (Pecorino, 2012).

Narůstající odchylky v genech jsou příčinou vzniku onkogenů, genů dávaných do souvislosti s nádorovou transformací buňky. Onkogeny vznikají aktivací protoonkogenů, což jsou běžně vyskytující se geny v organismu s vlivem na vznik, růst a diferenciaci buněk. Aktivace onkogenů kromě vloženou mutagenezí je možno dosáhnout virovou transdukcí, translokací, genovou amplifikací a bodovou mutací (Mačák a Mačáková, 2004).

K protoonkogenům patří ještě další 3 skupiny genů s regulačním vlivem na růst buňky a tkáně. Jsou to tumor supresorové geny, geny regulující apoptózy a geny účastníci se reparací DNA. Mutace v protoonkogenech jsou dominantní a mutace v tumor supresorových genech se projevují recesivně. Jenže i mutace v jedné alele tumor supresorového genu se může projevit. Nedojde k úplné ztrátě funkce, ale množství nebo aktivita proteinu bude snížena natolik, že proliferace a přežití buněk nebude bržděno, protože k normální down-regulaci růstu jsou vyžadovány dvě funkční kopie genu. Geny pro regulaci apoptózy se mohou chovat jako protoonkogeny i jako tumor supresorové geny. Za spouštěč kancerogeneze je považováno neletální genetické poškození. Mutace v genech podílejících se na opravě DNA nepřímo vyvolávají nádorové bujení, protože jestliže nejsou schopny vykonávat svoji funkci stoprocentně, pak nejsou opravovány chyby v jiných genech včetně již zmíněných protoonkogenech, tumor supresorových genech a regulačních genech apoptózy (Robbins a kol., 2010).

1.1.4. Invazivita a metastazování zhoubných nádorů

Invazivita je typickým rysem maligních nádorů, avšak v jistých situacích je běžná i fyziologicky (1. v těhotenství, kdy trofoblast narušuje stěnu dělohy a napojuje se na matčin cévní systém, 2. při fyziologické tvorbě cév, kdy endotelové buňky nově tvořených cév musí prorážet bazální membránu). Proces metastazování se děje v následujících krocích; uvolnění nádorové buňky z primárního ložiska, vstup do cévy (mízní nebo krevní), opuštění cévního řečiště a uchycení v sekundární lokalizaci (Buc, 1997).

Na počátku metastazování je oddělení samotné metastatické buňky od celého nádoru. Spojení buněk je zajišťováno kadheriny a integriny. Nádorové buňky snižují stavy těchto adhezivních molekul na svém povrchu. Zvýšením exprese E-katherinu docílíme tumor supresivního účinku (Pecorino, 2012).

Bazální membrána jasně vymezuje hranice orgánu. Skládá se převážně z lamininu, kolagenu a fibronektinu (Pecorino, 2012). Nádorové buňky k lamininu receptory mají (Klener, 1997). Po přilnutí nádorové metastatické buňky k bazální membráně dojde k jejímu narušení proteolytickými enzymy uvolněnými z nádorových buněk. Nádorová buňka proniká do mízní nebo krevní cévy. V mízním systému se často nádorová buňka zachytí v mízní uzlině. V krevním oběhu se vytváří agregáty krevních destiček s nádorovými buňkami. Takové minitromby se zachytávají v kapilárách, destičky adherují ke stěně cévy a uvolňují svůj biologicky aktivní obsah. Metastatické nádorové buňky vy-

tvářejí cestu skrz cévu do orgánu proteázami, nejvíce metaloproteázami. Následuje růst mikrometastázy v novém prostředí podporovaný PDGF uvolněným z krevních destiček (Klener, 1997).

Metastazování do orgánů je specifický proces. Děje se na základě interginů a adhezivních molekul. Při studiu melanomu bylo zjištěno, že melanomové buňky expri-mují antigen VLA-4, jehož partnerskou molekulou je VCAM-1 na endotelových buňkách plic. Interakcí VLA-4 x VCAM-1 je dána selektivnost metastatického procesu melanomu právě do plic (Buc, 1997).

1.1.5. Melanom

Mezi neuroektodermové nádory patří i lidský maligní melanom. Ačkoliv 95 % melanomů se vyskytne na kůži, nejde výlučně o kožní nádor. Melanocyty, buňky, z nichž maligní melanom pochází, mají původ v neurální trubici. Prekurzory melanocytů v prvních týdnech embryogeneze procházejí diferenciací a migrují z neurální trubice do různých tkání, včetně kůže. Z toho vyplývá, že maligní melanom může postihnout i oční tkáň a sliznice rekta, vagíny a nosu. Vzácný je například v jícnu (Hercogová, 2007).

To, že maligní melanom postihuje převážně kůži, je dáno rizikovými faktory, jež jsou s maligním melanomem spojovány. Hlavním vnějším faktorem, který lze ovlivnit, je expozice slunečnímu ultrafialovému záření. Dermatologové tvrdí, že používání ochranných opalovacích prostředků nestačí, ale že mezi zásady prevence patří zbytečně se nevystavovat slunci. Dalšími rizikovými faktory jsou světlá kůže, syndrom dysplastických névů, kdy nositelé syndromu mají na těle desítky až stovky pigmentových névů, a výskyt maligního melanomu v rodinné anamnéze (Hercogová, 2007).

Podkladem maligního melanomu je obvykle pigmentový névus. Maligní zvrát névu se projevuje rozpitím okrajů, celkovou asymetrií, změnou barvy, svěděním a v pokročilém stádiu krvácením (Komárek, 2000). Někdy vznikne maligní melanom „de novo“ na kůži bez névu (Mačák a Mačáková, 2004).

Buňky melanomu často tvoří velké množství melaninu, a proto nádor i metastázy bývají černé. Existují však i amelanotické melanomy (Mačák a Mačáková, 2004).

V klinické praxi jsou rozlišovány 4 základní subtypy melanomu (lentigo maligna melanoma, superficiálně se šířící melanom, nodulární melanom a akrolentiginózní melanom) a sekundárně jejich kombinace. Pro stanovení obecné prognózy je důležitý vývoj

vzhledu. Plošný tenký růst naznačuje dobrou prognózu, ale navazující vertikální růst prognózu značně zhoršuje o metastázy (Bek, 1989).

Maligní metastazující melanom je agresivní a obtížně léčitelné onkologické onemocnění. Je-li melanom zachycen v primárním stádiu, kdy ještě neroste vertikálně, je dobře odstranitelný chirurgicky. S nádorem se odebírání i část okolní zdravé tkáně případně se provádí i disekce zvětšených regionálních uzlin. Užívání adjuvantní terapie prozatím zlepšuje výsledky pouze nevýrazně. U pokročilých a recidivujících nádorů se přikračuje k chemoterapii nebo radioterapii (Hercogová, 2007; Bek, 1989). Maligní melanom se řadí mezi nejvíce odolné nádory vůči radioterapii i chemoterapii. Dacarbazin je nejčastěji používaný lék pro toto onemocnění, ale medián přežití je pouze 6-8 měsíců, přesto se pak metastázy objeví bez ohledu na aplikovanou léčbu. Je značný zájem o použití imunoterapie interferonem, interleukinem-2 a různými dalšími vakcínami, ale bohužel naděje zatím nebyly následovány významným zlepšením doby přežití (Pelengaris a Khan, 2006).

Výskyt maligního melanomu v celosvětovém měřítku ustavičně roste, což z něj činí stále závažnější problém veřejného zdravotnictví. V České republice v 80. letech 20. století nepařil maligní melanom mezi častá zhoubná onemocnění (asi 2 % všech zhoubných nádorů), ale za dalších 10 let se jeho incidence zvedla o 50 % (Bek, 1989). Do roku 2000 byla incidence maligního melanomu v ČR 11 mužů a 13 žen na 100 000 obyvatel (Komárek, 2000) a v roce 2003 dosáhla 16,9 na 100 000 obyvatel. Nárůst incidence mezi roky 1970 a 2000 je 447 %. Uvádí se, že v USA je melanom pátý nejčastější nádor u mužů a šestý nejčastější u žen. Nejvyšší incidence a mortalita maligního melanomu je v Austrálii a zemích severní Evropy (Hercogová, 2007).

Díky zvýšenému zájmu o melanom roste četnost záchytu jeho časných stádií. V roce 2000 se čeští dermatovenerologové připojili k Evropskému dnu melanomu, pořádanému Evropskou akademií dermatovenerologie. Díky této akci se podařilo v posledních letech odhalit během jednoho dne v roce 20-30 melanomů (Hercogová, 2007).

1.1.6. Myší melanom B16-F10

Melanom B16 zahrnuje skupinu 4 typů melanomů (B16-F0, B16-F1, B16-BL/6 a B16-F10). Melanom B16-F10 je spontánní melanom odvozený od melanomu myší C57BL/6 (Overwijk, 2001). Tento typ spontánního melanomu byl dobře transplantovatelný do kongenních myší nebo použitelný *in vitro*. Vzhledem k těmto parametrům je často používán k objasnění otázek týkajících se biologie melanomu (Damsky, 2010).

Pro studium vlivu léčby nádoru se experimentálně používají dva modely navození melanomu u myší. Jednak model aplikace nádorových buněk intravenózně, jednak spontánní metastazující model subkutánního podání (Nakamura, 2002).

Typ melanomu B16-F10 exprimuje jen malé množství MHC I molekul, na rozdíl od jiných nádorů myší C57BL/6. Nízká exprese MHC I je pravděpodobně důvodem žádné nebo nízké imunogenicity melanomu B16. Tyto podmínky vytvářejí velmi těžkou zkoušku pro jakoukoliv formu imunoterapie (Overwijk, 2001).

1.2. Imunitní systém a nádorová onemocnění

Hlavní funkcí imunitního systému jako celku je udržování integrity organismu. Rozpoznáváním „škodlivého“ od „neškodného“ chrání organismus před škodlivinami vnějšího i vnitřního původu (Hořejší a Bartůňková, 2009). První linii obrany vůči patogenům tvoří epiteliální bariéry. Jestliže je patogen úspěšný a překoná tyto bariéry, je rozpoznán komponenty imunitního systému (Pathak a Palan, 2005).

1.2.1. Vrozená a získaná imunita

Vrozená i získaná imunita má svou humorální i buněčnou složku. Mechanismy vrozené (nespecifické) imunity, jaké využívá v boji, jsou fagocytóza, opsonizace a neutralizace mikroorganismů a jejich produktů a jsou vykonávány fagocytujícími a přirozeně cytotoxickými buňkami za buněčnou část a za humorální frakci je to komplementový systém, interferony, lektiny a sérové proteiny (Buc, 1997). Charakteristické pro nespecifickou imunitu je, že nemá imunologickou paměť, a tudíž její působení není ovlivněno předchozím setkáním se škodlivinou. Imunitní reakce proti patogenům je založena na strukturálních nebo funkčních odlišnostech (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Získaná (specifická) imunita operuje s antigeně specifickými mechanismy. Imunitní reakce vzniká po rozeznání antigenu. Antigen je substance, která má potenciál indukovat specifickou imunitní odpověď, tzn. produkci protilátek, vyvolání efektorů a regulačních buněk imunitního systému (Ferenčík a kol., 2000). Humorální sekce specifické imunity stojí na protilátkách produkovaných B lymfocyty a buněčná především na T lymfocytech. Charakteristickým rysem reakcí vrozené imunity je imunologická paměť (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Fagocyty rozpoznávají struktury na povrchu organismů, které jsou označovány jako molekulární vzory (motivy) spojené s patogenitou (pathogen associated molecular pattern, PAMPs). Jsou evolučně velmi konzervované a sdílené mnoho mikroorganismy. Jsou životně nezbytné a nevyskytují se na hostitelských buňkách. Výskyt PAMPs v těle jasně poukazuje na něco cizího. Příkladem takových cizorodých motivů jsou lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, kyselina lipoteichová grampozitivních bakterií nebo glukany a manany typické pro kvasinky a plísňe. PAMPs jsou rozpoznávány receptory fagocytů uváděné pod zkratkou PRRs z anglického názvu pathogen recognition receptors.

Patogenů je celá řada, ale díky výskytu PAMPs fagocytární buňky vystačí jen s několika desítkami PRRs (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Podle funkce se PRRs dělí na sekretované, fagocytární a signální receptory.

Sekretované fungují jako opsoniny pro fagocyty a aktivují komplementovou kaskádu. Navázání těchto PRRs na mikrobiální buněčnou stěnu vytváří značku pro imunitní systém, což vyústí v lýzy takto označených buněk. Příkladem je C-reaktivní protein. Endocytární (fagocytární) PRRs se nacházejí na fagocytech. Rozpoznávají PAMPs, vychytávají je a předávají do lysosomů. Příkladem je formylpeptidový receptor. Signální receptory se vyskytují jako cytoplazmatické i jako membránové buněčné receptory. Aktivují signální cesty, které vedou k tvorbě kostimulačních molekul. Signálními receptory jsou Toll-like receptory (TLRs). U člověka bylo zjištěno 10 TLRs a například lipopolysacharid je ligandem TLR4 (Pathak a Palan, 2005).

PRRs jsou rozmístěny převážně na buňkách, které jako první přicházejí do styku s patogeny, epitelové buňky na sliznicích a buňky přirozené imunity. Rozpoznání PAMPs může vyvolat reakce dvojího typu, fagocytózu a zánět (Ferenčík, 2005).

1.2.1.1. Fagocytóza

Fagocytóza představuje nejstarší obranný a účinný mechanismus přirozené imunity. Dějem fagocytózy jsou odstraňovány z těla patogeny, inertní vdechnuté částice a poškozené vlastní buňky. Při fagocytóze je externí částice pohlcena a degradována. Schopnost fagocytózy mají všechny jaderné buňky těla, ale obranou funkci mohou prostřednictvím fagocytózy vykonávat pouze profesionální fagocyty (neutrofily, makrofágy a eozinofily). Fagocytózu významně urychluje opsonizace částice komplementem nebo protilátkami.

Fagocyty migrují za objekty pohlcení na základě chemotaktických signálů (ve směru jejich největší koncentrace), pro které mají receptory na svém povrchu. Chemokiny mohou pocházet přímo od bakterií, které vnikly do organismu (malé peptidy obsahující aminokyselinu N-formylmethionin), nebo vznikají v organismu (při aktivaci komplementu) (Ferenčík, 2005).

1.2.1.2. Zánět

Zánět je komplex dějů a morfologických změn vyvolaný působením škodlivého činitele a má funkci obrannou a opravnou (Stříteský a Halberstadt, 1995).

Zánět je velmi účinný nástroj vrozené imunity. Zánětlivé reakce se účastní buňky imunitního systému (zejména neutrofilů a makrofágy, také T lymfocyty, endotelové buňky, eosinofily, žírné buňky a krevní destičky), enzymový systém krevní plazmy, prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny a některé další mediátory zánětu (proteiny akutní fáze, metabolity kyseliny arachidonové, aj.). Hlavní buňky, které regulují akutní zánět a objevují se v místě zánětu jako první, jsou neutrofilů. U chronického zánětu převládají makrofágy a T lymfocyty (Ferenčík a kol., 2000). Jako chemokiny jsou nazývány látky, které do místa zánětu „pozvou“ buňky imunitního systému. Dále zvyšují adhezi buněk a aktivují leukocyty (Pathak a Palan, 2005).

Zájmem nádoru je neustálý růst, ale jak zvětšuje svůj objem, naráží na „problémy“. Stejně jako normální buňky potřebují i nádorové buňky nutrienty. Normálním buňkám je zajišťuje hustá síť kapilár. V nádoru však cévy nejsou a prostá difúze již při velikosti 1-2 mm³ nestačí. Nastává stav hypoxie. Jestliže je nádor schopen započít proces neovaskularizace, růst nádoru pokračuje dál (Pusztai a Cooper, 1996).

Hypoxie může navodit zánětlivou reakci. Tuto reakci konkrétně vyvolává protein HIF-1a produkovaný buňkami, jež trpí nedostatkem kyslíku, a který aktivuje transkripci genu zodpovědného za produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) zvyšujícího cévní permeabilitu (Robbins a kol., 2010).

1.2.2. Imunologický dozor a imunologická tolerance

Imunologický dozor je funkce imunitního systému, prostřednictvím které rozpoznává a likviduje poškozené, staré a antigenně pozměněné buňky vlastního těla. Je to spontánní mechanismus, kterým dochází k odstraňování nádorových buněk. Hlavními „aktéry“ imunologického protinádorového dohledu jsou NK buňky, aktivované makrofágy a cytotoxické T lymfocyty (Ferenčík a kol., 2000).

Z koncepce imunologického dozoru vyplývá, že organismus by měl být schopen rozpoznat nádorově transformovanou buňku a zlikvidovat ji. Ovšem podle klinických zkušeností, pokud jde o lidské nádory, je zřejmé, že imunologický dozor selhává. Jde o to, že antigenní odlišnost spontánních nádorů je velmi malá až žádná (Koutecký, 1989).

Podle současných názorů může být proti nádorové buňce zahájena imunitní reakce pouze v případě, jsou-li nádorové antigeny prezentovány T lymfocytů dendritickými buňkami, aktivovaných v zánětlivém prostředí. Porucha prezentace nádorových antigenů je zřejmě hlavní příčinnou neúčinnosti protinádorové imunity (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Imunologická tolerance fyziologicky míří na vlastní buňky (tzn. vlastní antigeny), aby nedocházelo k škodlivé autoimunitě. Patologicky se jedná o vyvolaný blok funkce lymfocytů a ve výsledku se projeví jako snížená imunitní odpověď nebo její absence na konkrétní antigen (Pathak a Palan, 2005). Nádorové buňky vylučují TGF- β , který vyvolává přeměnu CD4 lymfocytů na tzv. regulační lymfocyty a regulační lymfocyty tím, že také produkují TGF- β , vytvářejí autokrinní smyčku (Chen a Wahl, 2003). Regulační lymfocyty mají supresivní účinek na T lymfocyty, a tím navozují imunologickou toleranci (Sakaguchi a kol., 2007). Regulační T lymfocyty jsou pro organismus nepostradatelné. Bez nich by docházelo k rozsáhlým autoimunitním reakcím, avšak v případě výskytu nádoru představují závažnou překážku v eliminaci nádorových buněk (Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.2.3. Mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému

- nízká hustota exprese nádorových antigenů
- vznik mutantních forem a selekce kolonií s nižším výskytem nádorových antigenů
- maskování epitopů antigenů sialylací nebo fibrinovou sítí
- špatná prezentace nádorových antigenů snižováním exprese MHC I
- produkce faktorů omezující funkci T lymfocytů (TGF- β , IL-10)
- snižování exprese kostimulačních molekul nutných pro aktivaci T lymfocytů
- produkce faktorů omezující funkci dendritických buněk (TGF- β , IL-10, VEGF, oxid dusnatý)
- únik z apoptózy sníženou expresí Fas receptoru
- zvýšená produkce Fas ligandu a indukce apoptózy efektorových buněk interakcí Fas-FasL
- podpora neovaskularizace nádoru a proliferace nádorových buněk produkcí MIF (Migration Inhibitory Factor)
- únik perforinovou cestou pomocí inhibitoru proteáz PI-9, který inaktivuje granzym B, a tím je zablokována funkce buňkami zprostředkované cytotoxicity (Hořejší a Bartůňková, 2009; Pathak a Palan, 2005).

1.2.4. Cytokiny a nádorový růst

Cytokiny jsou polypeptidické komunikátory imunitního systému, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému (Hořejší a Bartůňková, 2009). Cytokiny mají výraznou úlohu v nádorové buněčné proliferaci. Ovlivňují růst nádoru, angiogenezi a metastazování (Klener a Tesař, 1997).

U mnoha zkoumaných nádorů byla zjištěna zvýšená exprese TGF- α (transformující růstový faktor). Působky, které aktivují geny pro TGF- α , zároveň spustí i větší expresi jeho receptoru. Secernován je převážně transformovanými buňkami. Má angiogenní účinky a podobné vlastnosti jako EGF (epidermální růstový faktor), s ním má společné receptory.

Imunitní dozor je oslabován prostřednictvím TGF- β . Potlačuje produkci imunoglobulinů a aktivitu NK a LAK buněk. Je uvolňován v biologicky neaktivní formě, k jeho aktivaci vede např. acidifikace. U většiny nádorových linií byla zjištěna jeho vyšší sekrece. Obecně má TGF- β antiproliferační účinek, ale je běžné, že u některých nádorů dochází ke stahování receptorů pro TGF- β , tím nádorový růst není tlumen. Svou úlohu TGF- β uplatňuje i v angiogenezi. Stimuluje tvorbu bazální membrány, inhibuje migraci endotelií, indukuje expresi integrinu a některých dalších cytokinů (IL-1, TNF- α). Nádorový růst je dále podporován vznikem regulačních lymfocytů pod vlivem TGF- β (Klener, 1997). TGF- β reguluje buněčné funkce, především T buňky. Indukuje apoptózu periferních T lymfocytů a inhibuje činnost cytotoxických T lymfocytů (CTL). Imunosuprese T lymfocytů zprostředkovaná TGF- β má zvláštní význam v nádorové progresi, protože tento cytokin oslabuje schopnost CTL rozeznat a odstranit nádor (Siegel a Massagué, 2003).

TNF (tumor necrosis factor, faktor nekrotizující tumory) se vyskytuje ve dvou formách (α a β) a obě mají společný receptor. Je produkován aktivovanými lymfocyty, makrofágy, granulocyty a fibroblasty. TNF- α (kachektin) je mediátorem zánětlivé reakce, způsobuje lokální nekrózu nádorových buněk. Má silný katabolický účinek a je zodpovědný za nádorovou kachexii, působí zvýšení tělesné teploty. Má silné angiogenní účinky. TNF- β (lymfotoxin) má především cytotoxické a cytolytické vlastnosti.

Interferon gama (IFN- γ) je cytokinem vytvářeným T lymfocyty a NK buňkami. Jeho účinky jsou antiproliferační a antiangiogenní. Vytváří podporu pro diferenciaci do Th1 subpopulace, imunosuprimuje akce Th2 subpopulací. Má vliv na účinnost fagocytózy tím, že podporuje vznik kyslíkových radikálů. IFN- γ je účinný v synergii s TNF (aktivace

makrofágů, granulocytů a cytotoxicity vůči infikovaným nebo maligním buňkám). Má terapeutické využití.

Interleukin-1 má dvě varianty (IL-1 α a IL-1 β). Každá z nich je produktem jiného genu, ale biologický účinek mají podobný, a to stimulace růstu a aktivace T lymfocytů, indukce TNF- α a IL-8. O receptor soutěží ještě s antagonistou receptoru, tzv. IL-1ra. Zdrojem IL-1 jsou makrofágy. Z pohledu nádorových onemocnění může mít účinky jak stimulační (aktivace některých růstových faktorů), tak inhibiční (přímo antiproliferačním účinkem, nepřímo podporou imunitních mechanismů). Má angiogenní potenciál (Klener, 1997).

Interleukin-2 je růstovým faktorem pomocných T lymfocytů, částečně i B buněk a NK buněk. Vzniká v T lymfocytech a NK buňkách na podněty od monocytů a makrofágů a následně autokrinně podporuje T buňky. Vyjadřuje podporu množení cytotoxických lymfocytů, NK buněk a LAK buněk, které pak reagují s nádorovými buňkami. Ovlivňuje sekreci IL-3, IL-5, GM-CSF, TNF a IFN- γ . Má rozsáhlé terapeutické využití.

Interleukin-3 je produkován aktivními lymfocyty, má účinky na hemopoézu a může se účastnit angiogeneze svým stimulačním vlivem na žírné buňky.

Interleukin-6 je cytokin, který působí stimulaci a diferenciaci T i B buněk, vliv má i na hepatocyty a megakarocyty. Inhibuje proliferaci endotelových buněk. IL-6 je považován za autokrinní stimulační faktor růstu myelomových buněk. Spolu s TNF zapříčiňuje vznik nechutenství a kachexie při nádorových onemocnění. U karcinomu prsu vykazuje antiproliferativní účinek na nádorové buňky.

Interleukin-7 je produkován stromálními buňkami kostní dřeně, sleziny a thymu. Má vliv na proliferaci B lymfocytů, diferenciaci T lymfocytů, indukuje vznik LAK buněk, stimuluje výdej cytokinů z monocytů (IL-1, IL-6, TNF- α). Je autokrinním růstovým faktorem lymfoblastové leukémie a lymfomů.

Interleukin-8 je chemotaktickým a aktivačním signálem pro neutrofilů, zároveň inhibuje migraci buněk ze zánětlivého ložiska, podporuje degranulaci neutrofilů a má angiogenní účinky. Buňky, které produkují IL-8, jsou monocyty, T lymfocyty, fibroblasty, endotelie, hepatocyty a NK buňky.

Interleukin-10 je produkován T lymfocyty, granulocyty a makrofágy. Má protizánětlivý účinek. Inhibuje cytotoxické reakce, blokuje aktivitu makrofágů a produkci reaktivního kyslíku indukovanou IFN- γ . Také má IL-10 inhibiční vliv na syntézu a účinky cytokinů. Podporuje transformaci normálních B buněk virem Epstein-Barrové.

Interleukin-11 je produkovaný fibroblasty. Má podobné trombopoetické účinky jako IL-6 a působí v synergii s IL-3. Významně snižuje výskyt mukozitidy po chemoterapii.

Interleukin-12 vzniká v makrofágách, NK buňkách a B lymfocytech. Umožňuje diferenciaci T lymfocytů na Th1 lymfocyty, aktivuje a stimuluje cytotoxické lymfocyty a NK buňky v synergii s IL-2. Ovlivňuje uvolňování IFN- γ a působí jako inhibitor angiogeneze.

Interleukin-15 má některé shodné účinky s IL-2. Je růstovým faktorem T lymfocytů, stimuluje LAK, NK a B buňky. Lze jej využít ke stimulaci protinádorové odpovědi po transplantaci kostní dřeně. Je autokrinním růstovým faktorem Burkittova lymfomu. Produkují ho fagocytující buňky.

GM-CSF (růstový faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů) stimuluje zralé granulocyty a makrofágy k produkci angiogenních cytokinů, ovlivňuje expresi povrchových adhezních molekul, díky nimž pronikají neutrofilové do zánětlivého ložiska. Zvyšuje oxidační metabolismus granulocytů a makrofágů a jejich fagocytární schopnosti. Působí na protinádorovou cytotoxicitu. Receptory pro GM-CSF byly prokázány u kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu a plic.

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor) má schopnost indukovat angiogenezi, děj důležitý pro přežití nádoru ve chvíli, kdy již nestačí příjem nutričních difúzí.

Destičkový růstový faktor (PDGF, platelet derived growth factor) se uvolňuje z granulí krevních destiček. Buňky jako makrofágy, endotelie nebo některé nádorové buňky (sarkomové, gliomové) vytváří identický produkt PDGF-like. PDGF je významný angiogenní faktor. Také zvyšuje senzitivitu buněk na ostatní cytokiny. Přisuzuje se mu úloha v urychlení růstu sarkomů, melanomů a karcinomů.

Fibroblastový růstový faktor (FGF, fibroblast growth factor) se vyskytuje v několika formách a všechny mají silný mitogenní vliv na buňky neuroektodermálního a mezenchymálního původu, indukují angiogenezi a uplatňují se při metastatickém procesu. FGF je exprimován jako produkt onkogenů transformovaných buněk.

Epidermální růstový faktor (EGF, epidermal growth factor) má také silný mitogenní vliv na buňky neuroektodermálního a mezenchymálního původu. Receptor pro EGF byl nalezen na mnoha maligních buňkách, zvláště u epitelových nádorů (Klener, 1997).

K prozánětlivým cytokinům se řadí IL-1, IL-6, IL-8, IL-12. Mezi protizánětlivé cytokiny patří IL-1ra, IL-10, TGF- β (Klener, 1997).

1.3. Diagnostika a léčba nádorových onemocnění

1.3.1. Primární diagnostika nádorových onemocnění

Základní onkologické vyšetření se odehrává v ordinaci praktického lékaře. Při vyšetřování obtíží pacienta by praktický lékař měl vždy myslet na možnost nádorového onemocnění. Jako prevence některých častých a závažných onkologických nemocí (kolorektální karcinom, karcinom prsu, karcinom cervixu) probíhají screeningové programy u praktických lékařů a gynekologů (Bartoňková, 2002).

Při podezření na nádor je pacient vyšetřován několika základními metodami a to rentgenovým vyšetřením, počítačovou tomografií (CT) nebo je pacient odeslán na magnetickou rezonanci. Při nádorech trávicí trubice je možno provést endoskopii. Vyšetřovanému je odebrán vzorek a histologické metody určí jeho klasifikaci (Adam a kol., 2004).

1.3.2. Laboratorní diagnostika nádorových onemocnění

Včasná a správná diagnostika určuje strategii léčby a rozhoduje o celkových výsledcích léčby. Diagnostický proces představuje nejen významný vstup do zahájení protinádorové terapie, ale je i předpokladem dosažení úspěchu, jelikož jsou pacienti rozdělováni do rizikových a terapeutických skupin i podle laboratorního vyšetření (Abrahámová, 2004).

1.3.1.1. Nádorové antigeny

Studie odhalily dvě skupiny nádorových antigenů: antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA).

Do TSA patří proteiny, které se na normálních zralých buňkách nevyskytují. Jako příklady lze uvést komplexy MHC s fragmenty proteinů (produkty mutovaných genů, onkogenních virů), abnormální formy glykoproteinů a idiotopy nádorů odvozených od B nebo T buněk (Hořejší a Bartůňková, 2009). TSA se zpravidla vyskytují u nádorů chemicky či fyzikálně indukovaných při experimentech. U lidí vznikají nádory spontánně a tyto spontánní nádory nemívají žádný nádorově specifický antigen (Buc, 1997).

K TAA řadíme takové antigeny, které nejsou výlučně specifické pro nádorovou buňku a které se mohou vyskytovat i na normální buňce. Rozdíl je v kvantitě exprese.

TAA jsou využívány jako diagnostické nádorové markery. Příkladem je karcinoembryonální antigen nebo prostatický specifický antigen (Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.3.1.2. Nádorové markery

Nádorovým markerem je myšlena látka přítomná v nádoru, produkovaná nádorem nebo produkovaná hostitelem jako reakce na nádor. Jestliže je tato látka zjištěna při rozboru tělních tekutin, vzniká podezření na přítomnost nádoru, ovšem v určité nízké koncentraci se látka označovaná jako tumor marker produkuje v organismu i fyziologicky. Tumorové markery se zjišťují metodami chemickými, imunologickými a metodami molekulární biologie (Zima a kol., 2008).

Většina biomarkerů nádorového růstu není využitelná pro prevenci nebo jednoznačnou diagnostiku maligního nádoru, jejich sledování se ovšem vyplatí jako monitoring probíhající léčby, jestli léčba má nebo nemá vliv na růst nádoru a tím i na koncentraci tumor markeru. Bohužel nádorové markery zatím nemohou být spásou laboratorní diagnostiky a léčby. Neexistuje univerzální nádorový marker, jehož přítomnost by jasně určovala výskyt nádoru. Nezvýšená hladina markeru ještě neznamená nepřítomnost nádoru. Naopak pozitivní nebo vyšší výsledek koncentrace nádorového markeru nemusí nutně znamenat výskyt zhoubného nádoru (Diamandis, 2002).

Přehled často vyšetřovaných nádorových markerů, jejich fyziologický a patologický výskyt uvádí Tab I.

Nádorový marker	Fyziologický výskyt	Patologický výskyt
CEA karcinoembryonální antigen	ve vyvíjejícím embryu, v dospělosti je produkován epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů	karcinomy a adenokarcinomy plic, zažívacího traktu, mléčné žlázy, ženských pohlavních orgánů, prostaty)
AFP alfa1-fetoprotein	v embryonálním žloutkovém vaku a fetálních játrech, v séru matky	hepatocelulární karcinom, nádory embrya
hCG lidský choriový gonadotropin	v těhotenství	nádory varlat, choriokarcinomy
PSA prostatický specifický antigen	v seminální tekutině, v séru	karcinom prostaty
CA 19-9	v mucinu v séru	adenokarcinom pankreatu, žaludku, kolorektální karcinom

Tab I.: Přehled vybraných nádorových markerů (Zima a kol., 2008).

1.3.2. Možnosti léčby nádorových onemocnění

Je několik možností, jak přistoupit k léčbě onkologického onemocnění, a je nutné dobře posoudit, jaká léčba bude vhodná pro daného pacienta. Je všeobecně známo, že čím dříve pacient s nádorem přijde k lékaři, tím větší šanci na vyléčení má. Hlavními metodami léčby zhoubných nádorů jsou chirurgická léčba, radioterapie, chemoterapie a čím dál tím více se prosazuje biologická léčba (Zámečník, 2002).

1.3.2.1. Chirurgická terapie

Chirurgická léčba je efektivní v případě odstranění prekancerózních stavů a malých časných nádorů. Chirurgie se využívá u všech maligních nádorů bez ohledu na stádium onemocnění, a to za účelem získání biologického materiálu, řešení problému (vyjmutí nádoru) nebo odstranění potíží a bolestí vyvolaných nádorem (Zámečník, 2000).

1.3.2.2. Radioterapie

Léčba ionizujícím zářením je též účinná u málo pokročilých nádorů a u velkých nádorů se aplikuje s cílem zmenšit nádor před chirurgickým zásahem, anebo po operaci jako zlikvidování nádorových buněk, které mohly případně zůstat v operační ráně, přilehlém okolí nebo v regionální uzlině. Radioterapie je stejně jako chemoterapie cílená na dělící se buňky. Radiosenzitivita nádorové buňky je dána radiosenzitivitou tkáně, ze které nádorová buňka vzešla. Přesto je její citlivost na záření zvýšena tím, že většina buněk uvnitř nádoru je ve fázi těsně před dělením, dělí se, nebo právě dělení dokončila, zatímco zdravá tkáň je z větší míry tvořena vyzrálými buňkami. Biologicky účinná radiace neboli dávka je ta část záření, která je buňkou pohlcena a v buňce způsobí ionizaci, jež narušuje buněčné struktury. Poškozená buňka se může reparovat, ale obvykle poškození buňky znamená zánik buňky (Thomas a kol., 2006).

1.3.2.3. Chemoterapie

Souborný název pro léky podávané v rámci chemoterapie je cystostatika, která působí na proliferující buňky. Efekt cytostatik spočívá v tom, že generační čas nádorové buňky je delší než buňky normální, tedy k regeneraci zdravé tkáně dojde dříve než k regeneraci nádoru (Klener, 1999). Chemoterapie se uplatňuje jako navazující terapie po radioterapii

nebo chirurgickém zákroku a jako kurativní léčba u nádorových onemocnění v pokročilé fázi, u kterých jsou pravděpodobná sekundární ložiska (Zámečník, 2002).

1.3.2.4. Bioterapie

Chemoterapie nebo radioterapie, jsou možnosti léčby zaměřené na struktury společné všem buňkám. Biologická léčba umožňuje lepší zacílení, má méně vedlejších účinků, a tak je lépe snášena.

Do biologické léčby se řadí i *hormonální terapie*. Jsou nádory, jejichž růst je částečně závislý na hormonální stimulaci, jako například karcinom prsu nebo prostaty. Buňky těchto karcinomů mají receptory pro hormony pohlavních žláz. Cílem hormonální terapie je ztlumit růstové stimuly snížením produkce hormonů nebo pomocí antihormonů, chemicky podobných látek, které obsadí receptory pro hormony, nebo použitím antagonistů (Thomas a kol., 2006).

Nefunkční tumor supresorové geny jsou nejčastějším nálezem v lidských nádorových buňkách. *Genovou terapií* může být účinek těchto genů obnoven vnesením funkčních tumor supresorových genů do nádorové buňky pomocí virového vektoru. Genová terapie vyvolává obavy spojené s rizikem mutace viru a vážného poškození genomu pacienta, proto ještě není běžnou součástí klinické praxe, a je vyžadován další výzkum v této oblasti (Thomas a kol., 2006).

Významnou součástí bioterapie je *imunoterapie*. Imunoterapie je metoda založená na indukci protinádorové imunity nebo na využití imunitních mechanismů k cílenému směřování léčiv do míst nádoru. Své místo má imunoterapie v léčbě minimální reziduální nemoci po odstranění nádoru, kdy už maligní nádorové buňky nejsou běžnými cytologickými metodami prokazatelné, ale je možné, že se v organismu nacházejí, a to v počtu až 10^{10} (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Nové přístupy k léčbě malignit zahrnují rozvoj imunoterapeutických strategií, které umožňují selektivní zacílení pouze na nádorové buňky. Nádorové buňky mají schopnost uniknout z imunitního dohledu imunosupresivním účinkem na komponenty imunitního systému. Nеспецифické imunostimulační léčebné postupy jsou založeny na aktivaci makrofágů a NK buněk a podpoře zánětlivého prostředí v nádoru. Stimulace specifické imunitní odpovědi vyžaduje znalosti nádorových antigenů. Nádorové antigeny jsou exprimovány jako součást cytoplazmy, membránové proteiny nebo secernované do vnějšího prostředí (Pathak a Palan, 2005).

Imunoterapie poskytuje několik možností aplikací. Jednou z nich jsou protilátky, které slouží jako nosiče léčiv, případně aktivují nějaký další mechanismus imunitní odpovědi (funkce opsonizace, indukce ADCC, aktivace komplementu). Protilátky jsou zpravidla zaměřeny proti antigenům asociovaných s nádorem (TAA). Druhou variantou je imunoterapie založená na celulárně zprostředkovaných mechanismech. Následující výčet dává přehled o buněčně zprostředkovaných terapeutických mechanismech (Hořejší a Bartůňková, 2009; Buc, 1997; Pathak a Palan, 2005):

- Nespecifická imunitní reakce vůči nádoru navozením zánětu v místě nádoru. Zánět je vyvolán aplikací vakcíny mykobakteriální suspenze. Zahájením imunitní odpovědi buňky imunitního systému nepřímo útočí i na nádor. Tato metoda je využívána u pacientů s karcinomem močového měchýře, částečných úspěchů bylo dosaženo i u melanomu.
- Adoptivní terapie zahrnuje stimulaci LAK buněk nebo TIL buněk. LAK buňky jsou pacientovy T lymfocyty a NK buňky stimulované IL-2. Stimulované buňky se vrátí zpět do pacientova těla s vysokou dávkou IL-2. Účinnost této léčby se pozoruje u $\frac{1}{3}$ pacientů s maligním melanomem a karcinomem ledvin. Tzv. TILs jsou izolované lymfocyty, které infiltrovaly nádor. Takové buňky jsou již nádorově specifické, ale utlumené kontaktem s nádorovými buňkami. V laboratoři se *in vitro* aktivují cytokiny a vrátí zpět pacientovy. TILs dosahují o něco lepších výsledků než LAK buňky.
- Zlepšení antigen-prezentující funkce nádorových buněk genetickou modifikací. Obecně nádorové buňky jsou slabé v prezentaci antigenu. *In vitro* se změní tak, aby exprimovaly kostimulační molekuly nebo produkovaly cytokiny, zároveň se utlumí jejich schopnost dělení a vrátí se pacientovi nebo se ještě kultivují s T lymfocyty pacienta, čímž se nastimulují nádorově specifické klony. Místo stimulace je možné zvýšit prezentaci antigenů i hybridizací s B lymfocyty nebo jinými APC.
- Imunoterapie dendritickými buňkami. Nejprve se izolují pacientovy monocyty z periferní krve a poté je *in vitro* působením cytokinů vyvolána přeměna na makrofágy. Makrofágy v pacientově těle podporují T lymfocyty k protinádorové reakci. Tato varianta imunoterapie je ve fázi klinických testů u pacientů s maligním melanomem nebo karcinomem ledvin či prostaty.
- Imunoterapie T lymfocyty dárce. Tento postup je již zavedený v praxi. Používá se po transplantaci kostní dřeně u pacientů s leukémií, kdy je potřeba suprimovat re-

akci vlastní imunity vůči štěpu, ale zároveň působit proti leukemickým buňkám, a to zajistí infuze malého množství periferních lymfocytů dárce v určitých intervalech po transplantaci.

- Využití rekombinantních cytokinů k posílení buněčných mechanismů imunity. Aplikace například IL-2, INF α nebo γ nebo faktorů stimulujících kolonie je omezena toxicitou vyšší dávky.
- Použití imunolipozómů. Lipozómy jsou tvořeny lipidickou dvojvrstvou, které při formování vytváří kapsli. Chemoterapeutikum uzavřené v lipozómu je již zavedené do klinické praxe. Imunolipozómy by uvnitř nesly fragmenty protilátek.
- Zacílení na nádorovou angiogenezi. Použití monoklonálních protilátek proti VEGF nebo jeho receptorům má potenciální antinádorový účinek.

Pokud je nádorová masa dostatečně odlišná od vlastní tkáně, mohou proti nádoru probíhat imunitní nespecifické reakce i antigenně specifické. Problémem ovšem je fakt, že nádory vycházejí z tkáně vlastního těla a mají mnoho mechanismů odolnosti vůči imunitě, tedy někdy dochází k situaci jako by je imunita „neviděla“ (Hořejší a Bartůňková, 2009).

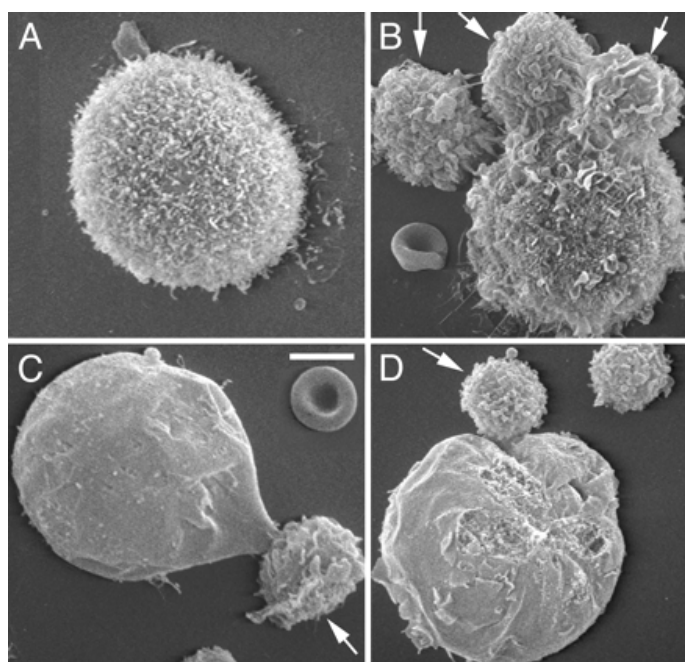
Nutnou součástí protinádorové terapie je podpurná léčba zahrnující psychologickou péči, speciální dietní režim i léky pomáhající od potíží, které vyvolala vlastní léčba. Podpurná léčba má odstraňovat nežádoucí účinky léčby, zlepšit celkový stav nemocného, zvýšit jeho obranyschopnost a kvalitu života (Zámečník, 2002).

1.4. Imunoterapie nádorových onemocnění založená na vrozené imunitě

Cui a jeho spolupracovníci se ve své práci z roku 2003 zabývali imunitním dozorem. Jak rychle a efektivně zlikvidovat nádorové buňky. Pracovali s myším modelem BALB/c a sarkomem 180. Nalezli přitom speciální dědičnou mutaci SR/CR propůjčující myším schopnost spontánní regrese (SR), případně úplné rezistence vůči nádorům (CR). Při *in vitro* studiu interakce leukocytů z těchto mutantních myší se sarkomovými buňkami zjistili tvorbu rozet. Nádorové buňky podlely cytolytickým zbráním leukocytů, jak je vidět na obrázku (Obr. 1). Normální buňky zůstaly nepoškozené (Cui, 2003).

Vyskytl se případ myši, které nebylo možno transplantovat sarkom. Odolnost způsobila dominantní mutace v myším genu. Bylo zjištěno, že rezistence vůči sarkomu je dědičná (Cui, 2003).

K potvrzení teze, že nádor byl zlikvidován vrozenou imunitou, došlo po provedení pokusu na tzv. nahých myších (nude mouse), které nemají thymus, ve kterém se „školí“ T-lymfocyty, buňky získané imunity. U těchto myši se projevila stejná rezistence na základě mutovaného genu (Cui, 2003).



Obr. 1: Tvorba rozet z nádorových buněk a leukocytů na obrázku ze skenovacího elektronového mikroskopu. A – sarkomová buňka izolovaná z peritonea myši, B – shluk leukocytů okolo nádorové buňky, C, D – lýza nádorové buňky (Cui, 2003).

V další práci tým prof. Cui pomocí průtokové cytometrie dokázal, že ataku na nádor se u SR/CR myši účastní pouze buňky vrozené imunity. Nejpočetnější skupinou byly neutrofily, dále NK buňky a makrofágy. Přenosem těchto buněk se podařilo zlikvidovat i nádory na normálních myších, které tuto mutaci neměly. Práce byla uzavřena tím, že vrozená imunita je schopna zlikvidovat i pokročilé nádory s neobyčejně vysokou účinností (Hicks, 2006).

1.4.1. N-formylmethioninové peptidy a formylpeptidové receptory (FPRs)

Lidské neutrofilie představují 50-60 % leukocytů v cirkulaci a jsou vysoce specializované pro svoji primární funkci a to fagocytózu a odstranění mikroorganismů z lidského těla. Jejich celková aktivita v procesu zánětu nebo boji proti infekci je dána lokální produkcí chemotaktických faktorů. Takovým vysoce potentním chemoatraktantem pro leukocyty jsou peptidové řetězce začínající bakteriálním tripeptidem N-formylmethionyl-leucyl-fenylalanin (f-MLF). N-formylmethioninové peptidy vznikají při proteosyntéze v mitochondriích a u bakterií, které na počátek peptidového řetězce umisťují N-formylmethionin (Hayashi a kol., 2013). Fagocytující buňky registrují N-formylmethionin jako označení místa výskytu bakterií, jež je potřeba odstranit. Intenzita chemotaktického signálu je dána aminokyselinovými zbytky v N-formylmethionin peptidovém řetězci. Nejvýraznější chemotaktický účinek mají nepolární zbytky leucinu, fenylalaninu nebo tryptofanu následující za N-formylmethioninem (Schiffmann a kol., 1975).

Formylpeptidové receptory jsou schopné vázat vysoce konzervované sekvence založené na N-formylmethioninovém motivu. Jsou exprimovány na fagocytujících leukocytech a na lidských buňkách se nalézají 3 typy FPRs (Dufton a Perretti, 2010).

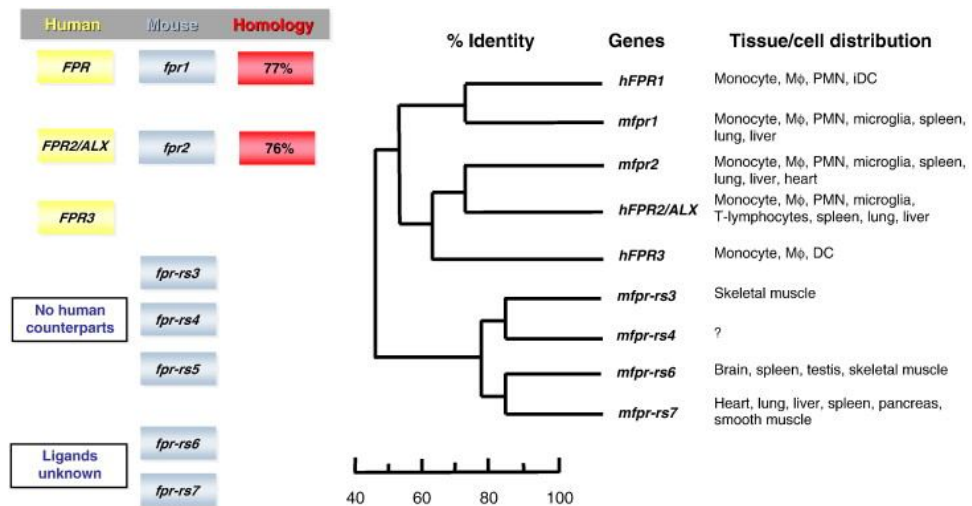
Neutrofilie jsou aktivovány prostřednictvím G-proteinů (Hayashi a kol., 2013). G-proteiny jsou s GTP spojené proteiny důležité ve vnitrobuněčné signalizaci (Ferenčík a kol., 2000). Navázání f-MLF na receptor znamená mnoho možností imunitní odpovědi, převážně ale produkci peroxidu vodíku a chemokinů (Hayashi a kol., 2013).

1.4.2. Lidské a myší formylpeptidové receptory

Na lidských buňkách je možno naleznout 3 typy formylpeptidových receptorů (FPRs), na myších buňkách sedm. Mezi vybranými lidskými a myšími formylpeptidovými receptory je více než 70% homologie (Dufton a Perretti, 2010).

He se ve své práci s kolegy zabývali třemi myšími formylpeptidovými receptory a porovnávali je s lidskými FPR. Evoluční a funkční korelace mezi lidskými formylpeptidovými receptory a jejich myšími protějšky zůstává ne zcela pochopena. Ovšem bylo zjištěno, že mají odlišné peptidové preference a buněčné distribuce. FPR 1 a 2 jsou exprimovány ve stejném množství, ale vykazovaly různou afinitu k formylovaným peptidům. K N-formyl-Met-Leu-Phe-Ile-Ile-Lys-fluoresceinisokyanátu měl FPR1 více

než 1000 silnější afinitu než FPR2. Ortologem lidského FPR1 je mFpr1 (tedy evolučně jsou příbuzní) s určitými farmakologickými vlastnostmi lidského genu FPR2/ALX, mF-pr2 má velmi malou afinitu k formylovaným peptidům. Vnitrobuněčná distribuce mFpr-rs1 na evoluční vztah k lidskému FPR3 (He, 2013).



Obr. 2: Schématické znázornění homologie a zastoupení lidských a myších FPRs (Dufton a Perretti, 2010).

2. CÍLE PRÁCE

Úkolem této bakalářské práce bylo prostudovat a prověřit možnosti léčby nádorových onemocnění, konkrétně na modelu myšního melanomu B16-F10, pomocí kotvení formyl-methioninových peptidů na povrch nádorové buňky. A to prováděním pokusů *in vivo* a laboratorní diagnostikou pomocí ELISA testu. V práci jsem se zaměřovala na vliv různých terapeutických přístupů na růst nádoru a sekreci cytokinů v prostředí nádoru.

Zaměřila jsem se na tyto hlavní cíle:

- Prostudovat změny hladin základních prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů v průběhu terapie melanomu B16-F10 pomocí f-MLFKK-BAM, LPS a jejich směsí.
- Vyzkoušet možnost nádorové terapie pomocí f-MLF motivu kotveného kovalentně.
- Ověřit možnosti terapie melanomu B16-F10 pomocí kombinace kovalentně vázaného f-MLF motivu s kovalentně vázaným mananem.
- Zjistit vliv spaceru na účinnost nádorové terapie pomocí f-MLF motivu kotveného kovalentně.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Chemikálie

- Biocompatible Anchor for cell membrane (BAM), Mw 4000 (NOF Corporation)
- DNase I (Roche Diagnostics)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich)
- f-MLF (N-formyl-methioninyl-leucyl-phenylalanin) (Fluka)
- Liberase DL (Roche Diagnostics)
- Lipopolysacharid z *Escherichia coli* (LPS) (Sigma-Aldrich)
- Manan (Sigma-Aldrich)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Sety pro ELISA testy (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TGF- β , TNF- α – eBioscience, IL-8 - R&D systems)
- Succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol]ester (SM(PEG)₁₂) (Thermo Scientific)
- Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (Thermo Scientific)
- Tris(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP) (Sigma-Aldrich)
- Trypanová modř
- Trypsin
- EDTA v PBS

3.2. Laboratorní zvířata a nádorové buněčné linie

Pokusným myším modelem byly samice kmene C57BL/6N zakoupených od Charles River Laboratories. Na počátku pokusu byly 8 týdnů staré a vážily mezi 18 a 20 g. Pokusné myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v podmínkách, jež zahrnovaly fotoperiodu 12/12 hodin, stálou teplotu 22 °C, relativní vlhkost 65 % a neomezený přístup ke sterilní vodě a krmivu ve formě pelet.

Pokusy byly porováděny na melanomu B16-F10. Buňky melanomu byly zakoupeny u American Type Culture Collection. Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10 % FCS, antibiotiky, glutaminem a merkaptoethanolem při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami s oxidem uhličitým v koncentraci 5 %.

3.3. Příprava melanomových buněk pro *in vivo* pokusy

Buňky byly zbaveny média promytím sterilním fyziologickým roztokem (3×). Následovala pětiminutová trypsinizace při 37 °C. Trypsinizační směs obsahovala 0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS. Konec trypsinizace znamenalo přidání malého množství média RPMI 1640 s 10% FCS. Pasteurovou pipetou byly buňky rozvolněny a dále centrifugovány (10 minut, při 150G, 4°C). Po centrifugaci bylo k buňkám v peletu přidáno RPMI 1640 bez séra na celkový objem 3 ml. Rozvolnění buněk bylo opět vykonáno pomocí Pasteurovy pipety. Buňky byly, po obarvení mrtvých buněk trypanovou modří (30 µl buněčné suspenze + 30 µl trypanové modří), spočítány v Bürknerově komůrce a případně rozředěny na požadovanou koncentraci.

3.4. Transplantace melanomových buněk

Buněčná suspenze s $4 \cdot 10^5$ buněk melanomu B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra v jedné dávce byla myším injikována subkutánně do pravé dolní části zad. Tato část byla před aplikací oholena, aby byl nádor patrnější. Myši byly v době aplikace 8 týdnů staré.

3.5. Zjišťování koncentrace různých cytokinů v nádoru

Laboratorní metodou použitou pro stanovení koncentrace určitého cytokinu v nádoru byl ELISA test (z anglického *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Dodavatelem setu pro ELISA test byla firma eBioscience (pro cytokiny IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF- α). Set pro interleukin-8 dodala společnost R&D systems.

Použitá metoda umožnila zjistit přítomnost antigenu (cytokinu) ve vzorku pomocí vazebných a detekčních protilátek.

Bylo postupováno podle manuálů od výrobců.

3.6. Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů byla měřena pomocí kaliperu. Z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádoru podle vzorce $V = \pi/6AB^2$, přičemž A je nejdelší rozměr nádoru v milimetrech (odpovídá šířce) a B nejkratší rozměr nádoru v milimetrech (odpovídá výšce).

3.7. Statistické vyhodnocení dat

Z naměřených hodnot byla provedena statistická analýza pomocí *MO Excel* (dvouvýběrový t-test) a programu *Statistica 10* (Survival Analysis).

3.8. Příprava terapeutických látek

3.8.1. Příprava f-MLFKK-BAM

Navázání molekuly BAM na aminoskupinu f-MLFKK bylo provedeno při pH 7,3 metodou podle Kato a kol., 2004. Během jedné hodiny při pokojové teplotě došlo k reakci skupiny NHS vázané na BAM s ϵ -aminoskupinou lysinu v f-MLFKK. Získaný roztok (v PBS) byl až do doby použití uchováván v zamraženém stavu při mínus 20 °C.

3.8.2. Příprava f-MLFKK-SMCC a jeho použití

Při přípravě terapeutických roztoků byly dodrženy pokyny od výrobce (Thermo Scientific). NHS skupina SMCC reagovala s ϵ -aminoskupinou lysinu v f-MLFKK.

Aby se ligandy SMCC udržely na nádorové buňce, bylo třeba redukovat cystiny na povrchu nádorových buněk na cysteiny. To bylo provedeno podle Christiaansen a kol., 1984. Jako redukovací roztok byl použit 50mM roztok TCEP v PBS a byl aplikován 1 hodinu před podáním f-MLFKK-SMCC. Poté se f-MLFKK-SMCC prostřednictvím meleinimindu navázal na povrchové –SH skupiny buněk.

3.8.3. Příprava fMLFKK-SM(PEG)₁₂ a jeho použití

Příprava byla identická jako v předchozím bodě. Rovněž hodinu před použitím této látky bylo potřeba zredukovat cystiny na cysteiny. Následovala vazba f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ na cysteiny na povrchu buněk.

3.8.4. Manan-SMCC a jeho použití

Nejprve byl připraven aminovaný manan a to redukční aminací mananu podle Torosantucci a kol., 2005.

Podle firemních návodů (Thermo Scientific, Pierce Protein Biology Products) obdobným způsobem jako v předešlém pokusu zreagovala v prostředí PBS NHS skupina SMCC s aminoskupinou aminovaného mananu. Vazba na –SH skupiny byla zajištěna stejně jako v předchozích dvou pokusech.

3.9. Pokusy

3.9.1. Produkce cytokinů leukocytární infiltrací v melanomu B16-F10

Bylo použito 39 myší (samice, C57BL/6N). Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do 4 terapeutických skupin podle podané látky. Každá skupina čítala 9 myší. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Myším bylo jednorázově intratumorálně podáno 50 µl následujících sterilních roztoků v PBS:

- Skupina A – LPS (0,5 mg/ml),
- Skupina B – 0,5mM f-MLFKK-BAM,
- Skupina C – 0,5mM f-MLFKK-BAM obsahující LPS (0,5 mg/ml),
- Skupina K (kontrola) – PBS.

Před léčbou (v 0 hodin) byly změřeny objemy nádorů. Po 12, 24 a 48 hodinách pokusu byl 3 myším ze skupiny vyjmut nádor.

Nádor byl vyjmut z usmrcené myši (zlomením vazy), opláchnut studeným médiem RPMI 1640 a malé kousky nádoru byly umístěny do zkumavky se studeným RPMI 1640

(1 ml) s obsahem Liberase DL ($c = 0,33 \text{ mg/ml}$) a DNase I ($c = 0,2 \text{ mg/ml}$). Obsah zku-
mavky byl na třepačce 1 hodinu při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně probíhala centrifugace při
160 g po dobu 10 minut při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro ELISA test byly použity supernatanty. Buň-
ky, které byly v peletě, byly analyzovány průtokovou cytometrií (Veronika Caisová).

3.9.2. Působení f-MLFKK-SMCC samotného i ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10

Pokus byl prováděn se 30 samicemi C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši rozděleny do pěti skupin (A až E). Každá skupina čítala 6 myší. Každá myš byla ve svém boxu. Ještě týž den byla započata terapie. Před aplikací terapeutických roztoků byly změřeny počáteční objemy nádorů.

Schéma terapie (skupina a podaná látka):

- Skupina A – 50 μl redukovačoho roztoku, po hodině 50 μl 0,5mM f- MLFKK-SMCC,
- Skupina B – 50 μl redukovačoho roztoku, po hodině 50 μl 0,5mM f- MLFKK-SMCC ve směsi s LPS (0,5 mg/ml),
- Skupina C – 50 μl redukovačoho roztoku, po hodině 50 μl roztoku LPS,
- Skupina D – 50 μl redukovačoho roztoku,
- Skupina K (kontrola) – 50 μl PBS.

Režim aplikace byl 0., 1., 2. den terapie pro všechny skupiny. Měření objemu nádoru bylo prováděno každý druhý den terapie. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

3.9.3. Působení f-MLFKK-SMCC/LPS ve směsi s manan-SMCC/LPS a působení f-MLFKK-SMCC/LPS v kombinaci s manan-SMCC/LPS (střídavě) na růst melanomu B16-F10

Pokus byl prováděn s 12 samicemi C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci byly myši rozděleny do tří skupin (A-C). Každá skupina čítala 4 myši, každá myš byla ve svém boxu. Ještě týž den byla započata terapie. Před aplikací terapeutických roztoků byly změřeny počáteční objemy nádorů.

Přehled terapie (skupina, podaná látka, terapeutický režim):

- Skupina A - 50 μ l redukovačného roztoku a po hodině 50 μ l 0,5mM roztoku f-MLFKK-SMCC/LPS v pulzním režimu 0., 1., 2., 8., 9., 10., 16., 17., 18., 24., 25., 26. den terapie.
- Skupina B - 50 μ l redukovačného roztoku a po hodině 50 μ l 0,5mM roztoku f-MLFKK-SMCC/LPS v režimu 0., 1., 2., 16., 17. a 18. den terapie. V 8., 9., 10., 24., 25. a 26. dnu terapie byl nejprve podáván redukovač roztok v množství 50 μ l a po hodině 50 μ l roztoku 0,2mM manan-SMCC/LPS.
- Skupina C - 50 μ l redukovačného roztoku a po hodině 50 μ l 0,5mM roztoku f-MLFKK-SMCC/LPS ve směsi s 0,2mM manan-SMCC/LPS v pulzním režimu 0., 1., 2., 8., 9., 10., 16., 17., 18., 24., 25., 26. den terapie.

Všechny látky, sterilizované filtrací, byly injikovány intratumorálně. Výše uvedené roztoky (f-MLFKK-SMCC, manan-SMCC a směs f-MLFKK-SMCC a manan-SMCC) byly v PBS a obsahovaly LPS (0,5 mg/ml). Vliv na růst nádoru byl zjišťován měřením objemu nádoru každý druhý den. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

3.9.4. Působení f-MLFKK-SMCC ve směsi s LPS versus působení f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10

Pokus byl prováděn s 10 samicemi C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci byly myši rozděleny do dvou skupin (A a B). Každá skupina čítala 5 myši, každá myš byla ve svém boxu. Ještě týž den byla započata terapie. Před aplikací terapeutických roztoků byly změřeny počáteční objemy nádorů.

Schéma terapie (skupina, podaná látka a terapeutický režim):

- Skupina A - 50 μ l redukovačoho roztoku a po hodině 50 μ l 0,5mM roztoku f-MLFKK-SMCC ve směsi s LPS v 0., 1., 2., 8., 9., 10., 16., 17., 18., 24., 25., 26. den terapie.
- Skupina B - redukovací roztok (50 μ l) a po hodině 0,5mM roztok f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ ve směsi s LPS v množství 50 μ l ve stejném terapeutickém režimu, jaký měla skupina A.

Všechny látky, sterilizované filtrací, byly injikovány intratumorálně. Vliv na růst nádoru byl zjišťován měřením objemu nádoru každý druhý den terapie. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

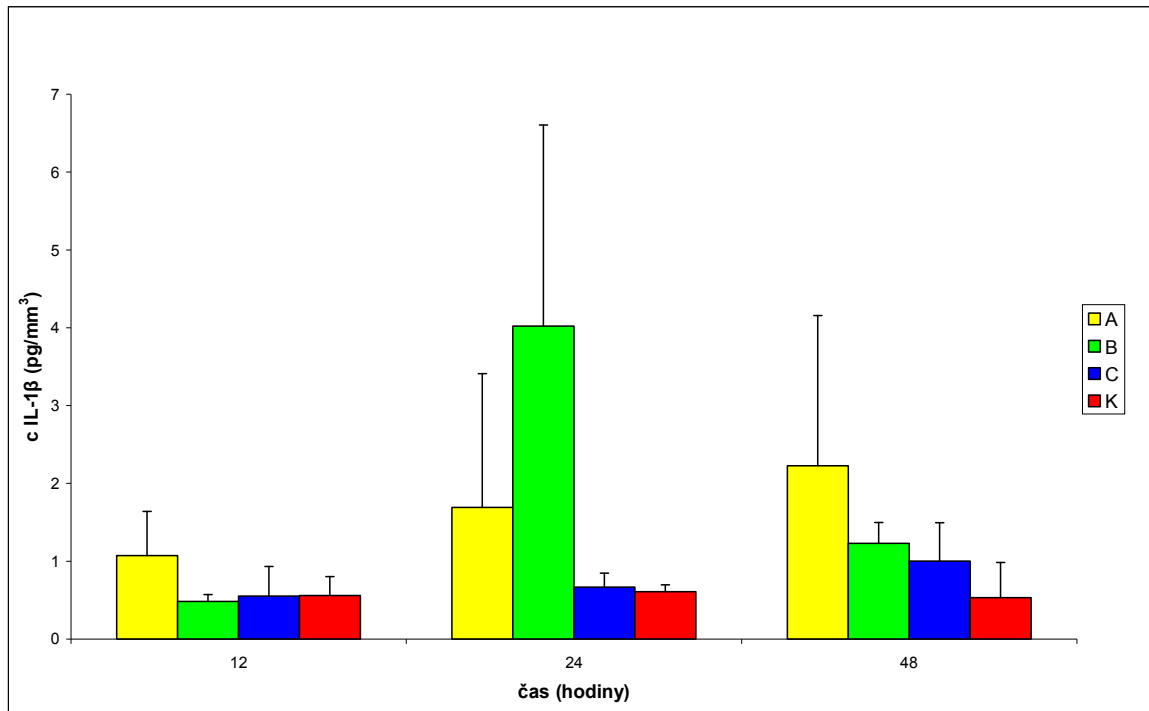
4. EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

4.1. Produkce cytokinů leukocytární infiltrací v melanomu B16-F10

Tento experiment byl zaměřen na sledování produkce cytokinů v oblasti nádoru. Bylo zjišťováno, zda se produkce cytokinů (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 a TGF- β) mění v čase a v závislosti na použité terapeutické látce. Celkově bylo testováno 5 cytokinů. Naměřené koncentrace byly přepočteny na 1 mm³ nádoru.

4.1.1. Interleukin-1 beta (IL-1 β)

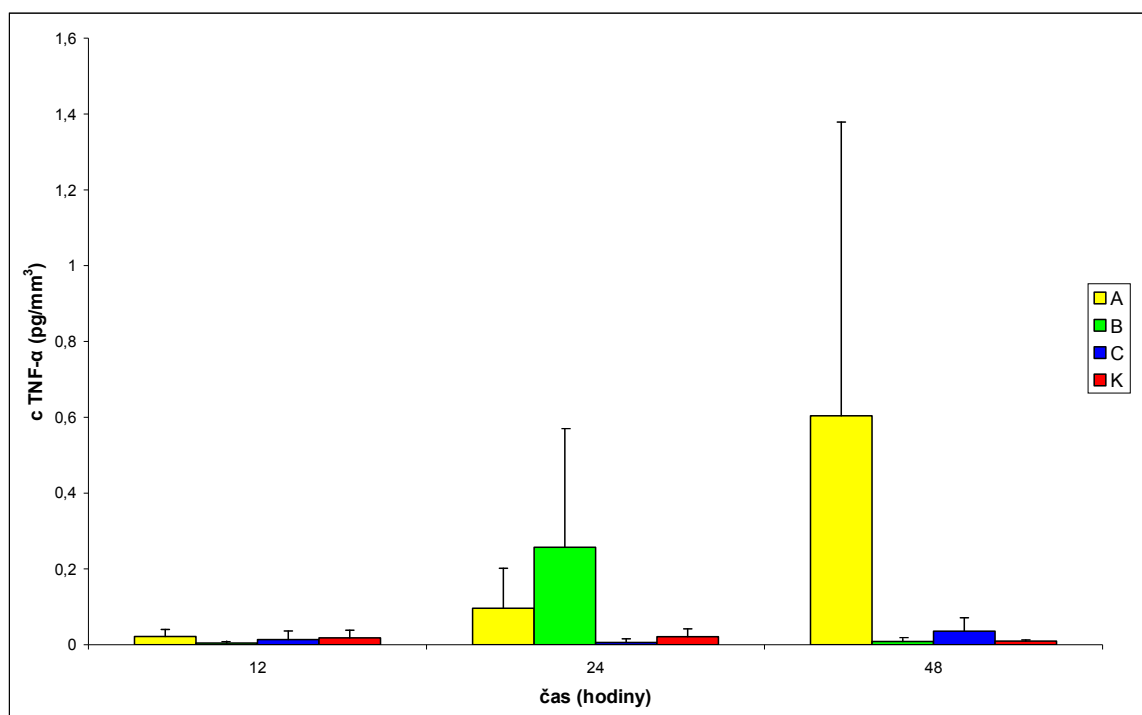
Aplikace LPS (skupina A) vyvolává zvýšenou produkci interleukinu-1 β . Nevyšší hodnoty koncentrace IL-1 β byly zjištěny při podávání f-MLFKK-BAM (skupina B) ve 24 hodinách od začátku terapie. Podávání LPS v kombinaci s f-MLFKK-BAM (skupina C) nemělo na množství produkovaného IL-1 β téměř žádný vliv. Nebylo dosaženo žádné statisticky významné změny oproti skupině K (PBS). Vývoj koncentrace IL-1 β na 1 mm³ nádoru je zachycen na Obr. 3.



Obr. 3: Koncentrace IL-1 β během 48 hodin od počátku terapie v oblasti nádoru. Skupina A – LPS, skupina B – f-MLFKK-BAM, skupina C – f-MLFKK-BAM s LPS, skupina K (kontrola) – PBS.

4.1.2. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

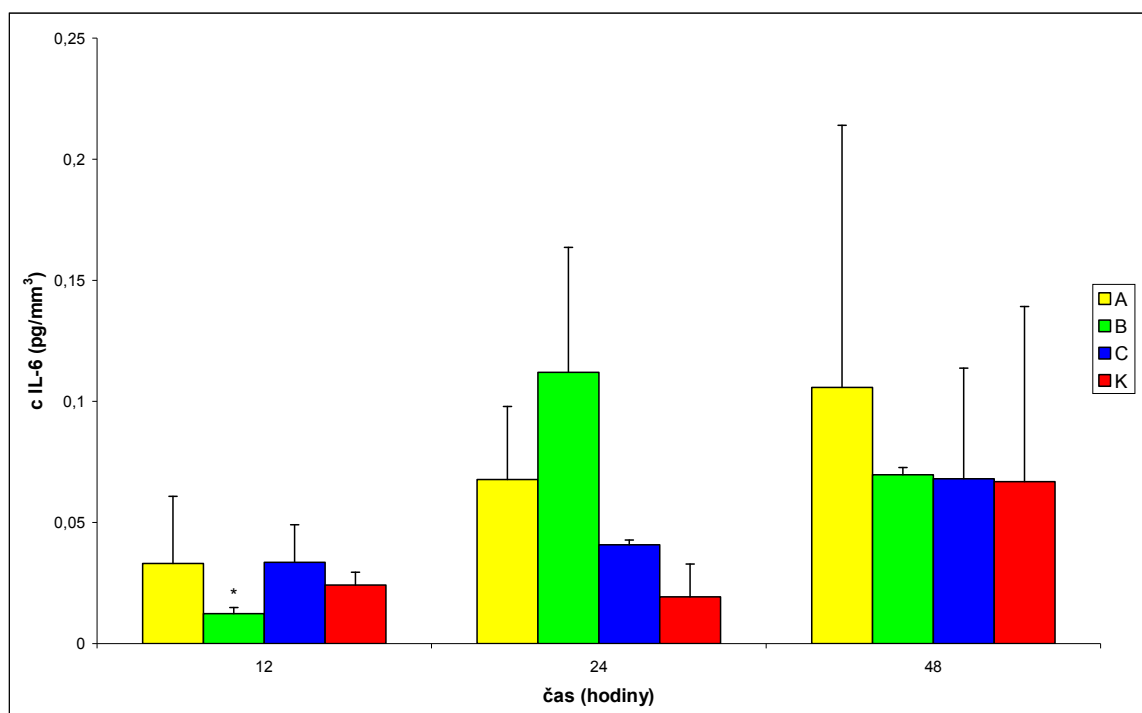
V případě produkce TNF- α byl pozorován podobný trend jako u IL-1 β . Hodnoty koncentrace TNF- α u skupiny, které byl podáván LPS, během 48 hodin rostly, zatímco u skupiny B (f-MLFKK-BAM) dosáhly vrcholu ve 24 hodinách od počátku terapie a následně poklesly. Skupina C se výrazně neodlišovala od kontroly. Nebylo dosaženo žádné statisticky významné změny oproti skupině K (PBS). Vliv terapie na produkci TNF- α je zaznamenán na Obr. 4.



Obr. 4: Koncentrace TNF- α během 48 hodin od počátku terapie v oblasti nádoru. Skupina A – LPS, skupina B – f-MLFKK-BAM, skupina C – f-MLFKK-BAM s LPS, skupina K (kontrola) – PBS.

4.1.3. Interleukin-6 (IL-6)

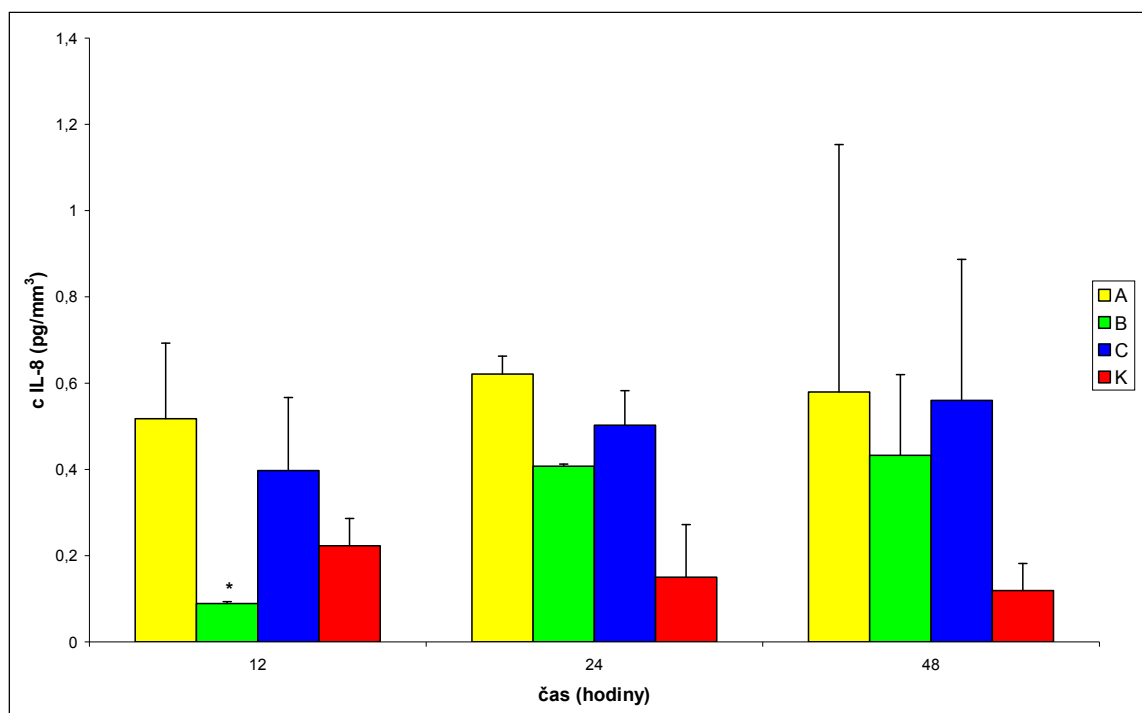
Naměřené koncentrace IL-6 v 1 mm³ nádoru byly nízké. U skupiny, které bylo podáváno LPS, je možno pozorovat postupný nárůst produkce IL-6. U skupiny B bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace IL-6 bylo dosaženo po 24 hodinách. U skupiny C hodnoty koncentrace IL-6 během 48 hodin rostly, neodlišovaly se však výrazně od kontroly. Množství IL-6 po 12 hodinách terapie bylo statisticky významně menší u skupiny léčené f-MLFKK-BAM (Obr. 5).



Obr. 5: Koncentrace IL-6 během 48 hodin od počátku terapie v oblasti nádoru. Skupina A – LPS, skupina B – f-MLFKK-BAM, skupina C – f-MLFKK-BAM s LPS, skupina K (kontrola) – PBS. **P ≤ 0.05 vztaženo ke kontrole*

4.1.5. Interleukin-8 (IL-8)

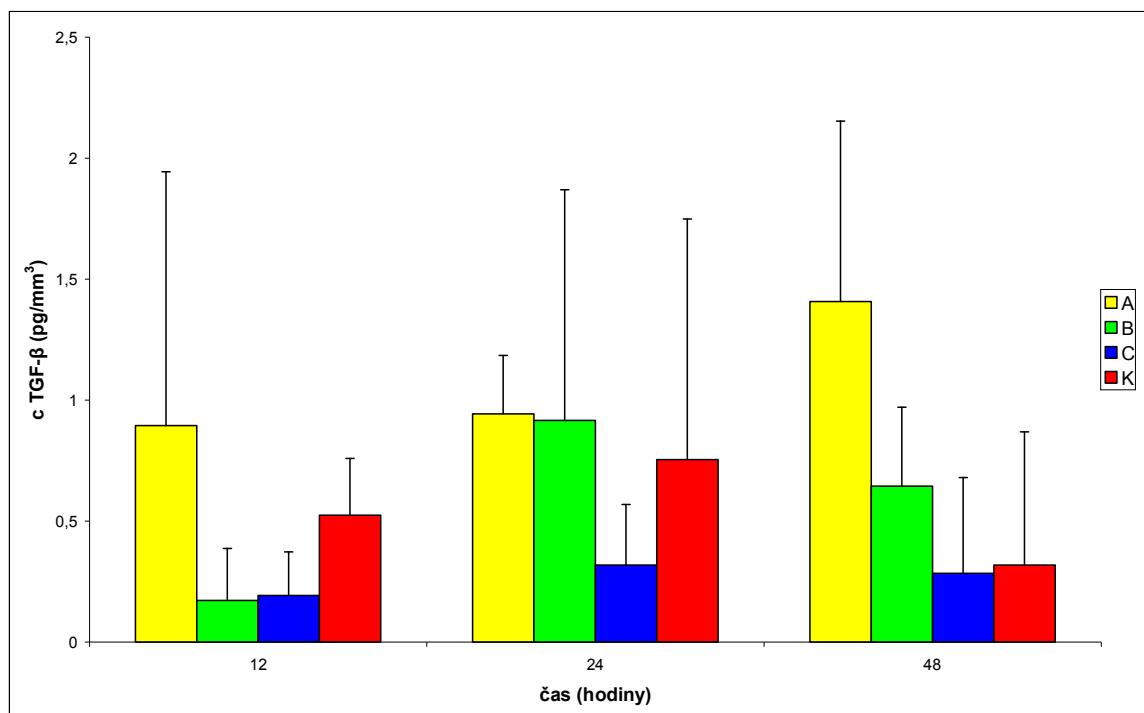
Největší koncentrace IL-8, byly zjištěny ve skupině myší, které byl podáván LPS. U skupiny B došlo po 12 hodinách terapie ke statisticky významnému poklesu hladiny IL-8 v nádoru, celkový trend vývoje koncentrace IL-8 u této skupiny je rostoucí, stejně jako u skupiny C (Obr. 6).



Obr. 6: Koncentrace IL-8 během 48 hodin od počátku terapie v oblasti nádoru. Skupina A – LPS, skupina B – f-MLFKK-BAM, skupina C – f-MLFKK-BAM s LPS, skupina K (kontrola) – PBS. **P ≤ 0.05 vztaženo ke kontrole*

4.1.6. Tumor growth factor- β (TGF- β)

Naměřené koncentrace TGF- β v oblasti nádoru u skupiny A (LPS) mají rostoucí trend a převyšují hladiny tohoto cytokinu u kontroly. Nevyšší koncentrace dosáhl TGF- β u skupiny B (f-MLFKK-BAM) po 24 hodinách od začátku terapie, a pak jeho koncentrace poklesla. Hladiny testovaného cytokinu se držely pod úrovní kontroly v případě skupiny léčené f-MLFKK-BAM ve směsi s LPS (Obr. 7).

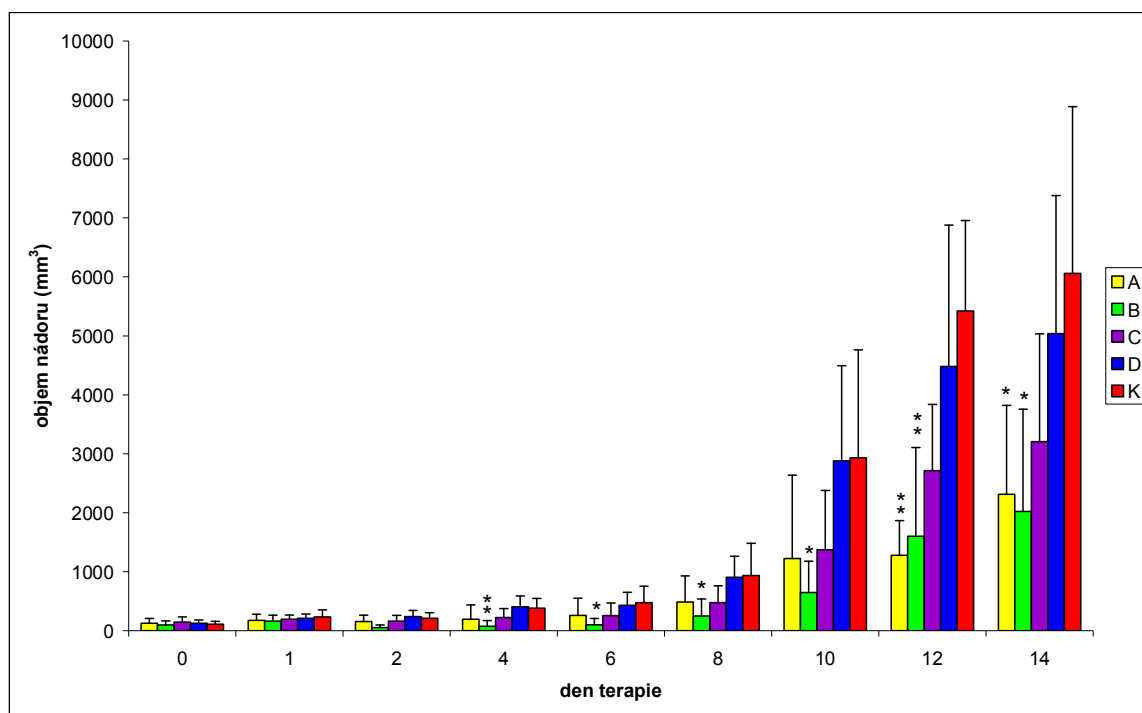


Obr. 7: Koncentrace TGF- β během 48 hodin od počátku terapie v oblasti nádoru. Skupina A – LPS, skupina B – f-MLFKK-BAM, skupina C – f-MLFKK-BAM s LPS, skupina K (kontrola) – PBS.

4.2. Působení f-MLFKK-SMCC samotného i ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10

V experimentu byl vliv terapie sledován pomocí objemů nádorů a délky přežití myši. Zde použité kotvení formylmethioninového motivu do nádoru bylo kovalentní.

U skupiny A (f-MLFKK-SMCC) došlo ke statisticky významné redukci 12. den od počátku terapie. Účinek formylmethioninového motivu kotveného kovalentně byl zesílen LPS (skupina B). Směs vyvolala statisticky významnou redukci nádorového objemu vůči kontrole (skupina K) již 4. den terapie. Samotný LPS (skupina C) nevyvolal statisticky významnou redukci nádorového růstu (Obr. 8).

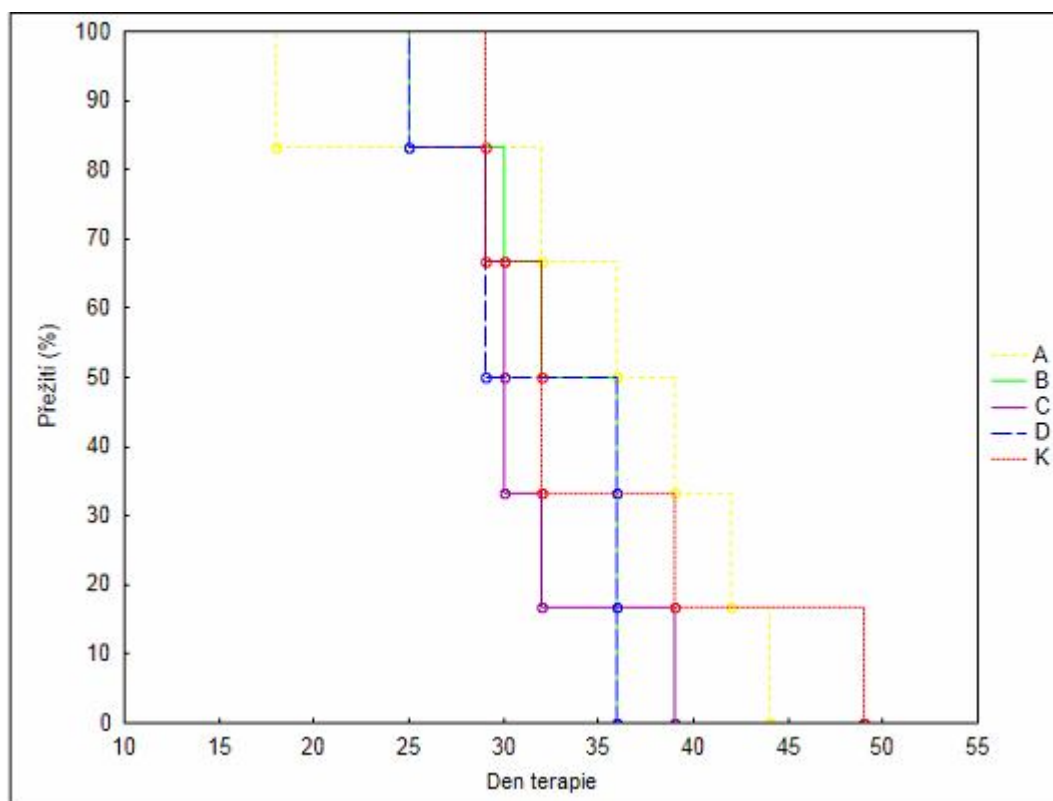


Obr. 8: Vliv terapie na velikost nádoru.

Skupina A – f-MLFKK-SMCC, skupina B – f-MLFKK-SMCC s LPS, skupina C – LPS, skupina D – pouze redukovací roztok, skupina K (kontrola) – PBS.

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ vztaheno ke kontrole

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši. Nebylo dosaženo statisticky významně delšího přežití proti kontrole (skupina K). Vliv formylmethioninového motivu kotveného kovalentně je na Obr. 9.



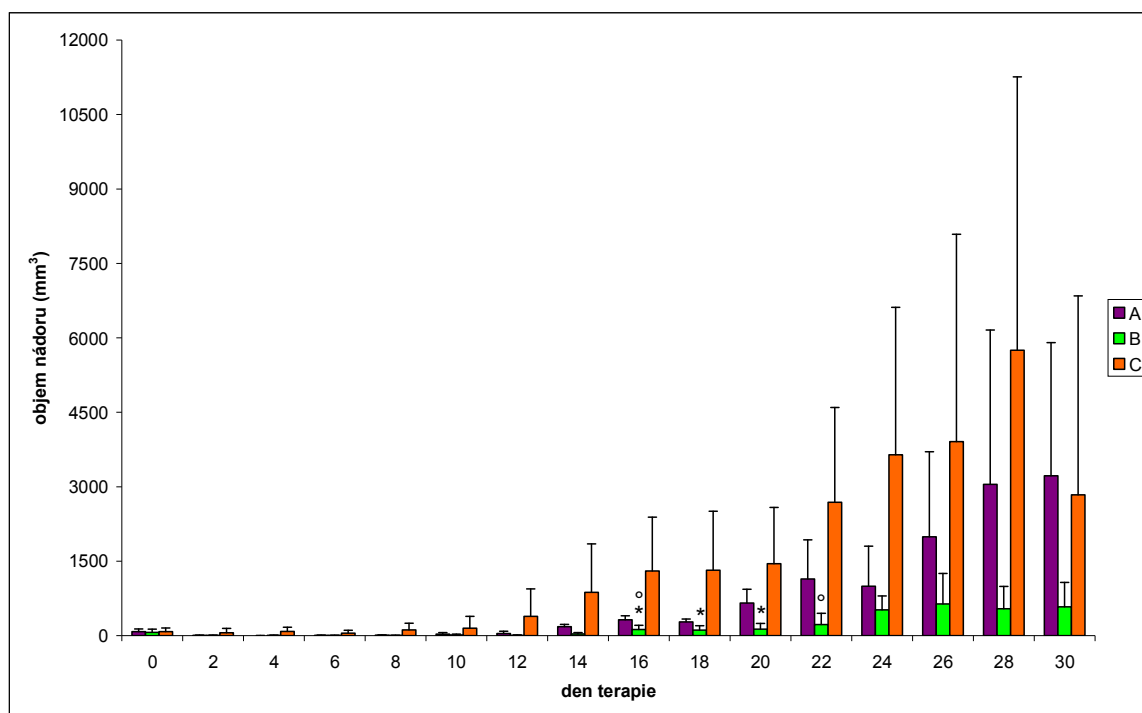
Obr. 9: Vliv terapie na délku přežití myši.

Skupina A – f-MLFKK-SMCC, skupina B – f-MLFKK-SMCC s LPS, skupina C – LPS, skupina D – pouze redukovací roztok, skupina K (kontrola) – PBS.

4.3. Působení f-MLFKK-SMCC/LPS ve směsi s manan-SMCC/LPS a působení f-MLFKK-SMCC/LPS v kombinaci s manan-SMCC/LPS (střídavě) na růst melanomu B16-F10

V experimentu byly testovány terapeutické směsi f-MLF a mananu (obojí kotveno kovalentně pomocí SMCC) s LPS.

Významné redukce nádorového objemu ve srovnání se skupinou f-MLFKK-SMCC bylo dosaženo pouze u skupiny léčené f-MLFKK-SMCC/LPS střídavě s manan-SMCC/LPS (skupina B). Podávání směsi f-MLFKK-SMCC/LPS s manan-SMCC/LPS se ukázalo jako nevhodné (Obr. 10).

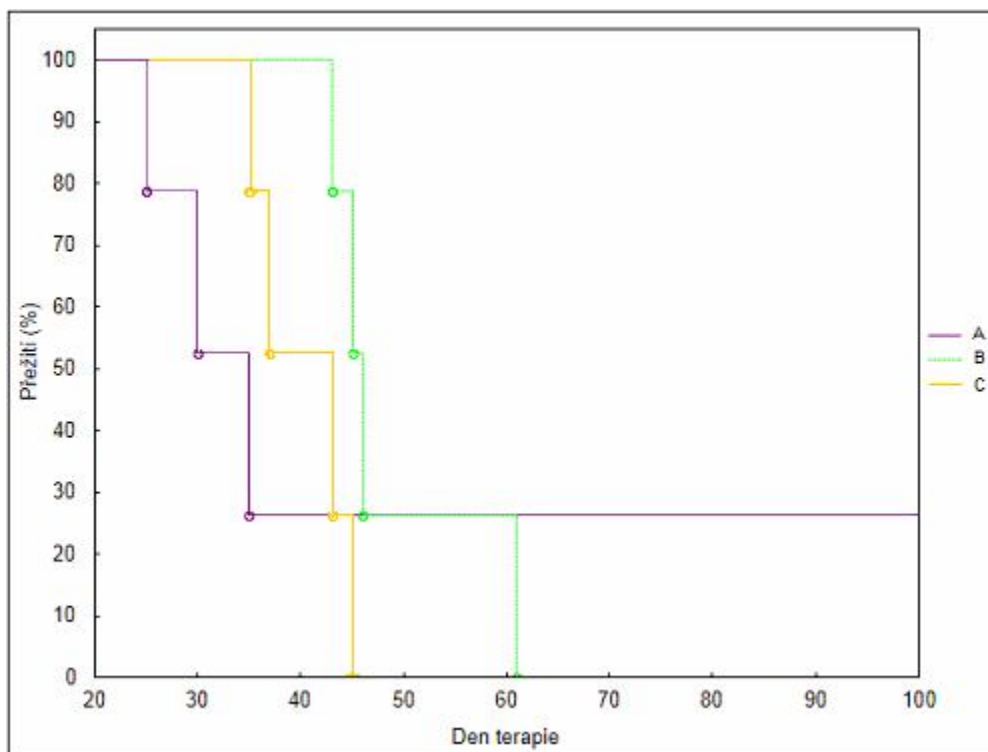


Obr. 10: Vliv terapie na velikost nádoru.

Skupina A – f-MLFKK-SMCC/LPS, skupina B – f-MLFKK-SMCC/LPS a manan-SMCC/LPS střídavě, skupina C – f-MLFKK-SMCC/LPS a manan-SMCC/LPS ve směsi.

* $P \leq 0.05$ vztaheno ke skupině A, ° $P \leq 0.05$ vztaheno ke skupině C

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši. Nebylo dosaženo statisticky významně delšího přežití v porovnání skupin B a C ku A ani ve srovnání skupin B a C navzájem, ačkoliv ve skupině A jedna myš přežila více než 100 dní a do doby sepisování bakalářské práce bez jakýchkoli známek nádoru stále žila (Obr. 11).

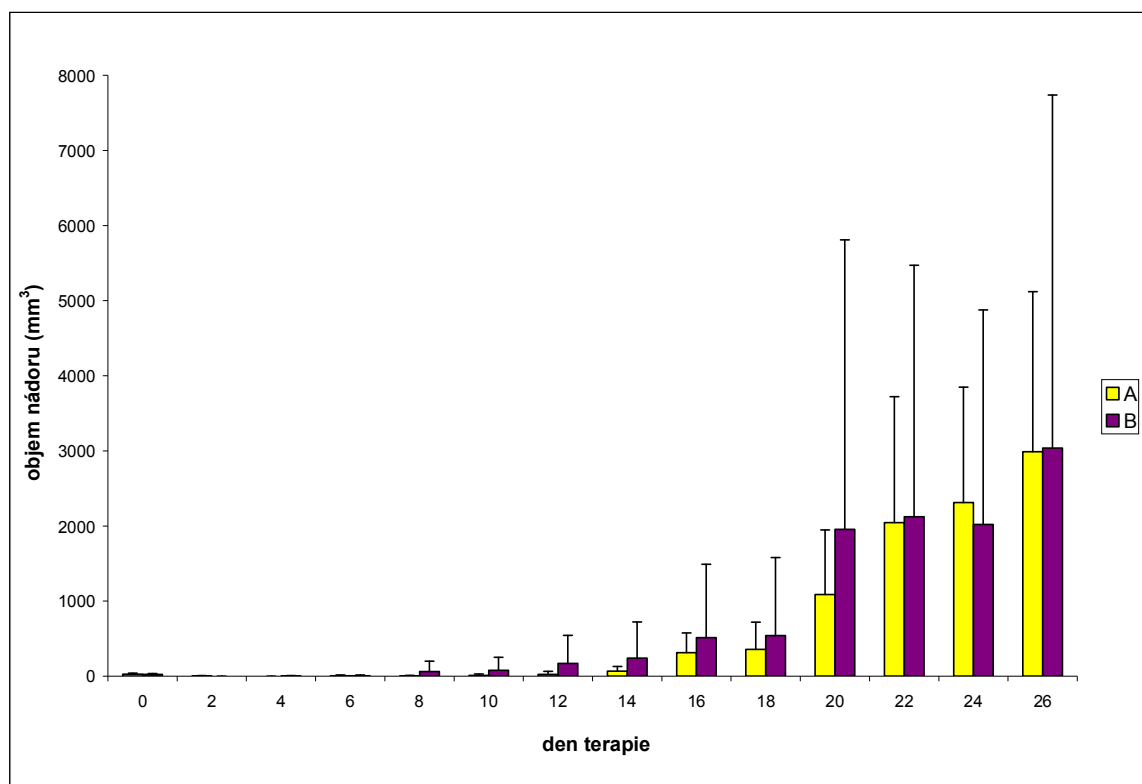


Obr. 11: Vliv terapie na délku přežití myši.

Skupina A – f-MLFKK-SMCC/LPS, skupina B – f-MLFKK-SMCC/LPS a manan-SMCC/LPS střídavě, skupina C – f-MLFKK-SMCC/LPS a manan-SMCC/LPS ve směsi.

4.4. Působení f-MLFKK-SMCC ve směsi s LPS versus působení f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ ve směsi s LPS na růst melanomu B16-F10

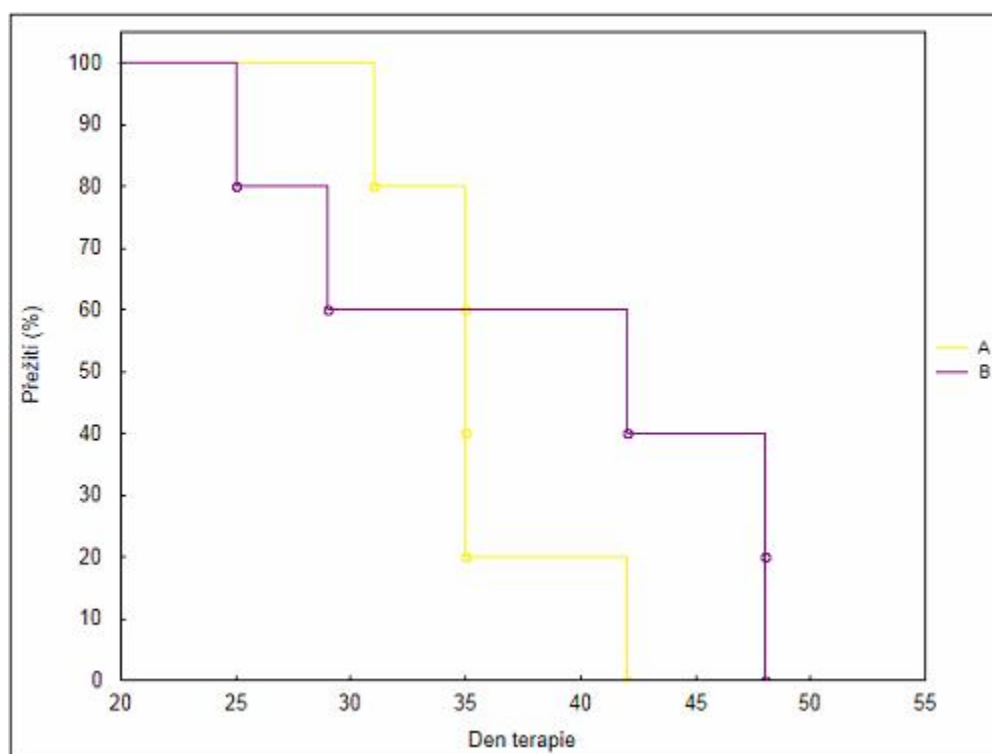
V pokusu byl zjišťován vliv formylmethioninového motivu kotveného kovalentně SMCC a SM(PEG)₁₂. Výsledky terapie prezentuje graf (Obr. 12). Nebyl téměř zjištěn rozdíl v terapii založené na aplikaci f-MLFKK-SMCC a f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ (obojí v kombinaci s LPS).



Obr. 12: Vliv terapie na velikost nádoru.

Skupina A – f-MLFKK-SMCC s LPS, skupina B – f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ s LPS.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši. Nebylo dosaženo statisticky významně delšího přežití mezi skupinami A a B (Obr. 12).



Obr. 12: Vliv terapie na délku přežití myši.

Skupina A – f-MLFKK-SMCC s LPS, skupina B – f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ s LPS.

5. DISKUZE

Jak již bylo uvedeno, formylmethioninový motiv působí chemotakticky na buňky imunitního systému. Fagocyty proti místu označenému f-MLF rozvinou imunitní odpověď (Hayashi a kol., 2013, Schiffmann a kol., 1975). Čunátová ve své práci (2012) zmiňuje, že nekotvený f-MLF nemá výrazný terapeutický účinek. Formylmethioninový motiv kotvený do nádorů stimuluje imunitní reakci a vyvolává redukci nádorového růstu. Tuto redukci lze velmi výrazně zvýšit současnou aplikací ligandů signálních receptorů, zejména LPS, přičemž byla pozorována mohutná synergie (Čunátová, 2012).

Použití f-MLF společně s LPS představuje terapeutický model založený na kombinaci fagocytárních a signálních motivů pro receptory fagocytů. Formylpeptidové receptory jako zástupci fagocytárních receptorů pro aktivaci potřebují prezenci vázaných ligandů, zatímco signální receptory reagují na volné agonisty (Underhill a Gantner, 2004).

Motivy pro fagocytární receptory jsou běžně vázané na povrchu cizorodých mikroorganismů. V práci byly použity dva druhy kotvení f-MLF. Kotvení do buněčné membrány alifatickým řetězcem olejové kyseliny (BAM) a pevné kovalentní kotvení (SMCC, SM(PEG)₁₂). Díky intratumorální aplikaci byl cílem kotev převážně povrch nádorových buněk.

Cílem prvního experimentu bylo charakterizovat probíhající děje uvnitř nádoru na základě stanovení hladin vybraných prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Otázkou bylo to, zda se na úrovni stanovení cytokinových koncentrací projeví dříve pozorovaná synergie signálních a fagocytárních ligandů.

Cytokiny v organismu fungují jako mezibuněčné mediátory. Ovlivňují růst a funkci imunokompetentních buněk, aktivují a regulují imunitní protinádorové reakce. Zároveň můžou oslabovat imunitní dozor ve prospěch nádoru (Nicolini a kol., 2006).

Zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF- α a IL-6) po 24 hodinách od začátku terapie byly zjištěny u skupiny léčené LPS a u skupiny, které bylo aplikováno f-MLFKK-BAM. Směs f-MLFKK-BAM s LPS nepůsobila změny v hladinách testovaných cytokinů oproti kontrole.

Lipopolysacharid, ale i jiné látky, které aktivují Toll-like receptory na povrchu efektorových buněk, jsou dobré stimuly k produkci cytokinů. Aktivace TLRs vyvolá kaskádu intracelulárních signálů, jež vyústí v uvolnění časných cytokinů jako IL-1, TNF- α a IL-6 (Hopkins, 2003). Výrazně zvýšených hladin TNF- α a IL-6 po 24 hodinách po podání

LPS dosáhl i Bobrowski a kol. (2005). Těž koncentrace IL-1 β byla signifikantně zvýšená (Bobrowski a kol., 2005). Uvolněné cytokiny TNF- α a IL-1 β jsou schopné aktivovat podobné signální dráhy jako LPS (Hopkins, 2003). IL-1 β je typický zástupce prozánětlivých cytokinů. Téměř všechny typy buněk ovlivňuje svými účinky, zpravidla zároveň s TNF- α (Dinarelo, 1997). TNF- α je výrazný prozánětlivý cytokin, který se uplatňuje při iniciaci zánětlivé odpovědi a indukci akutní zánětlivé fáze. Účinkuje především v rámci přirozené imunity, avšak tvoří i pojítko mezi zánětlivou reakcí a specifickou imunitní reakcí (Gallová, 2006). Dále je sekretován IL-6 často jako reakce na LPS nebo působení TNF- α nebo IL-1 β (Gallová, 2006; Hopkins, 2003). IL-6 a IL-8 jsou produkovány hlavně makrofágy, avšak jejich producenty mohou být i endoteliální buňky a fibroblasty (Hopkins, 2003).

Produkce cytokinů může být vyvolána sekrecí jiných cytokinů. Zvýšené hladiny IL-1 β indukují produkci TNF- α , IL-6 a IL-8 (Kasza, 2013; Liu a kol., 2004). Hladiny IL-8 byly u všech tří skupin zvýšené během 48 hodin. V prvních osmi hodinách je produkce IL-8 reakcí na podané LPS a v dalších hodinách odezva na působení IL-1 β a TNF- α . IL-8 je řazen k cytokinům pozdní fáze zánětu (Gallová, 2006). Interleukin 8 působí jako chemokin pro neutrofilů, avšak jeho účinky mohou být i pronádorové. Stimuluje proliferaci a metastazování melanomových buněk (Liu a kol., 2004; Bar-Eli, 1999; Schadendorf a kol., 1993). IL-1 β , IL-8 a TGF- β jsou také produkovány nádorovými buňkami (Schadendorf a kol., 1993).

Jediným testovaným protizánětlivým cytokinem byl TGF- β . Jeho hladiny se u skupin léčených LPS a f-MLF-BAM držely mírně nad kontrolou. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že nádor produkuje TGF- β , avšak podávanou látkou je tato produkce tlumena. TGF- β u skupiny léčené směsí f-MLFKK-BAM s LPS se drželo na nižších hladinách (oproti kontrole). TGF- β může mít v maligním procesu dvě různé úlohy. V počáteční fázi kancerogeneze působí jako nádorový supresor svými antiproliferačním účinky, avšak později se nádor stává rezistentní vůči jeho působení. Samy maligní buňky jsou hlavním zdrojem tohoto cytokinu v nádorovém mikroprostředí a supresivní vliv TGF- β se přesouvá na imunitní reakce (Bierie a Mores, 2006; Reiss, 1999; Lui a kol., 2004).

Na úrovni cytokinů jsme žádnou výraznou synergii signálních a fagocytárních motivů nepozorovali. Mohutná synergie signálních a fagocytárních ligandů není tedy odražena na úrovni cytokinů během prvních 48 hodin. Je dána tím, že infiltrace leukocytů vedena signálními ligandy je následována cíleným atakem nádorových struktur, na kte-

rých jsou ukotvené fagocytární motivy. Těmto jevům může napomoci fakt, že LPS po vazbě na TLR4 zvyšuje expresi formylpeptidových receptorů na makrofágách a neutrofilech (Mandal a kol. 2005).

V následujícím experimentu jsme studovali možnost ukotvit f-MLF motiv ještě pevněji pomocí kovalentní vazby, a jaký bude mít tento přístup vliv na redukci nádorového růstu a přežití myši. Kovalentní kotvení dosáhlo velmi dobrých výsledků. Přidáním LPS došlo k mohutné synergii a první signifikantní výsledek se dostavil již 4. den terapie. Vliv terapie na délku doby přežití myši byl malý. To odpovídá i poznatkům s kovalentním kotvením jiných fagocytárních ligandů, jako je laminarin a mannan (Ženka, ústní sdělení).

Dále nás zajímala otázka, zda bude možné zvýšit efektivitu imunitního ataku na základě umístění 2 bakteriálních motivů kotvených kovalentně na povrch nádorových buněk za současné stimulace LPS. Experiment měl charakter screeningu a řešil to, jestli je vhodné kombinovat formylmethioninový motiv s jiným ligandem (manan) a jestli tato kombinace bude vykazovat lepší výsledky, pokud budou f-MLFKK-SMCC a manan-SMCC podávané střídavě nebo ve směsi. Ukázalo se, že k signifikantní redukci nádorového růstu u kombinace f-MLFKK-SMCC s manan-SMCC došlo, pokud byl režim aplikace těchto dvou látek střídavý a tento režim dosáhl lepších výsledků v porovnání se samotným f-MLF motivem i se směsí f-MLFKK-SMCC a manan-SMCC. Tato směs se neukázala jako terapeuticky vhodná.

Závěrečný experiment měl také design screeningu a měl podat odpověď na otázku, zda je vhodné f-MLF skupinu oddělit od vazebné části molekuly spacerem či nikoliv. Nebyl zjištěn rozdíl v terapii založené na aplikaci f-MLFKK-SMCC a f-MLFKK-SM(PEG)₁₂ (obojí v kombinaci s LPS).

Jednotlivé experimenty byly prováděny s cílem nalezení nejúčinnější likvidace nádorů a nejlepšího prodloužení přežití. Spojením fagocytárních a signálních motivů bylo dosaženo významné redukce nádorového růstu, avšak významného prodloužení přežití myši jsme nedosáhli. Další pokračování by mělo být založeno na optimalizaci terapie, dávek i režimu podání, aby došlo k úplné likvidaci nádoru a později se neobjevil.

6. ZÁVĚR

Léčba LPS a f-MLFKK-BAM způsobila zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů, zatímco u směsi f-MLFKK-BAM s LPS se koncentrace držely na úrovni kontroly. Z protizánětlivých cytokinů byl testován TGF- β . Na jeho koncentraci v oblasti nádoru měla vliv jeho produkce nádorem a zároveň léčba, která působila spíše proti. Na úrovni stanovení hladiny cytokinů není možné vysvětlit dříve pozorovanou mohutnou protinádorovou synergii signálních a fagocytárních ligandů.

Pevné kovalentní kotvení formylmethioninového motivu vede k redukci nádorového růstu a s LPS působí synergicky.

Kombinace s kovalentně vázaným mananem se ukázala být účinná (vliv na velikost nádoru), jestliže je režim podávání střídavý.

Dále bylo zjištěno, že spacer nemá vliv na účinnost terapie kovalentně kotveným f-MLF motivem.

Testované možnosti terapeutických přístupů významně neprodloužily délku přežití myši.

7. SEZNAM ZKRATEK

λ	vlnová délka
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (z anglického <i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
APC	antigen-prezentující buňka (z anglického <i>antigen-presenting cell</i>)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (z anglického <i>cluster of differentiation</i>)
CNS	centrální nervový systém
CTL	cytotoxické T lymfocyty
EGF	epidermální růstový faktor (z anglického <i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	metoda (z anglického <i>Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
Fas	receptor Fas ligandu, transmembránový protein
FasL	ligand Fas receptoru, transmembránový protein
FCS	fetální telecí sérum (z anglického <i>Fetal Calf Serum</i>)
FGF	fibroblastový růstový faktor (z anglického <i>fibroblast growth factor</i>)
GTP	guanosintrifosfát
HIF-1 α	hypoxií vyvolaný faktor 1 α (z anglického <i>hypoxia-induced factor 1α</i>)
GM-CSF	růstový faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (z anglického <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>)
IL	interleukin (např. IL-2 – interleukin-2)
IL-1ra	receptorový antagonist IL-1
INF	interferon (např. INF α – interferon alfa)
LAK buňky	lymfokiny stimulovaní zabíječi (z anglického <i>lymphokine activated killers</i>)
LPS	lipopolysacharid
MHC I	hlavní histokompatibilní komplex třídy I (z anglického <i>major histocompatibility complex</i>)
MIF	faktor inhibující migraci (z anglického <i>migration inhibitory factor</i>)
NK buňky	přirození zabíječi (z anglického <i>natural killer</i>)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (z anglického <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDGF	destičkový růstový faktor (z anglického <i>platelet derived growth factor</i>)
TAA	antigen asociovaný s nádorem (z anglického <i>tumor associated antigen</i>)
TGF	transformující růstový faktor (z anglického <i>transforming growth factor</i>)
TIL	lymfocyty infiltrující nádor (z anglického <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TLR	Toll-like receptor
TNF	faktor nekrotizující tumory (z anglického <i>tumor necrosis factor</i>)

UV-B	ultrafialové záření, typ B
VCAM-1	adhezni molekula endotelových buněk plic (z anglického <i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z anglického <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4	diferenciační antigen melanomu (z anglického <i>very late antigen</i>)

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABRAHÁMOVÁ, J., 2004: Správná diagnostika bez prodlev je základním předpokladem včasné a správné léčby onkologických onemocnění. *Klinická onkologie* 17: 49–50.

ADAM, Z. VOLRLÍČEK, J. VANÍČEK, J., 2004: Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2. vyd. Praha: Grada, 696 s.

BAR-ELI, M., 1999: Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 67: 12–18.

BARTOŇKOVÁ, H., 2002: Manuál prevence a časně detekce nádorových onemocnění: prevence nádorových onemocnění ve 21. století; národní program zdraví. 1.vyd. Brno: Masarykův onkologický ústav, 92 s.

BEK, V., 1989: Epidemiologie nádorových onemocnění. In: KOUTECKÝ, J. a kol. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 318 s.

BEK, V., 1989: Nádory kůže. In: KOUTECKÝ, J. a kol. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 318 s.

BEK, V., HAUSNER, P., PETRÁKOVÁ, A., 1989: Etiopatogeneze nádorů. In: KOUTECKÝ, J. a kol. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 318 s.

BIERIE, B., MOSES, H.L., 2006: TGF- β and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17: 29–40.

BOBROWSKI, W.F., MCDUFFIE, J.E., SOBOCINSKI, G., CHUPKA, J., OLLE, E., BOWMAN, A., ALBASSAM, M., 2005: Comparative methods for multiplex analysis of cytokine protein expression in plasma of lipopolysaccharide-treated mice. *Cytokine* 32: 194-198.

BUC, M., 1997: *Klinická imunológia*. 1. vyd. Bratislava: Veda, 363 s.

CUI, Z., WILLINGHAM, M.C., HICKS, A.M., ALEXANDER-MILLER, M.A., HOWARD, D., HAWKINS, G.A., MILLER, M.S., WEIR, H.M., DU, W., DELONG, C.J., 2003: Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Science* 100(11): 6682-6687.

ČUNÁTOVÁ, Š., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 38 s.

DAMSKY, J.R., WILLIAM, E., BOSENBERG, M., 2010: Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell* 23: 853–859.

DIAMANDIS, E. P., 2002: Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications. Washington, DC: AACC Press, 541 s.

DINARELLO, CH.A., 1997: Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8: 253-265.

- DUFTON, N., PERRETTI, M., 2010: Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacology* 127: 175–188.
- FAKAN, F., 2005: Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova. 112 s.
- FERENČÍK, M., 2005: Imunitní systém: informace pro každého. 1. vyd. Praha: Grada, 236 s.
- FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., MAŤHA, V., 2000: Dictionary of immunology. Bratislava: Slovak Academic Press, 258 s.
- GALLOVÁ, L., 2006: Modulační funkční aktivity fagocytů látkami s prozánětlivými, protizánětlivými a antioxidačními účinky. Brno: Masarykova univerzita v Brně. 123 s.
- HAYASHI, R., MIYAZAKI, M., OSADA, S., KAWASAKI, H., FUJITA, I., HAMASAKI, Y., KODAMA, H., 2013: A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils. *Bioorganic* 21: 688–675.
- HE, H.Q., LIAO, D., WANG, Z.G., WANG, Z-L., ZHOU, H.C., WANG, M.W., YE, R.D., 2013: Functional Characterization of Three Mouse Formyl Peptide Receptors. *Molecular Pharmacology* 83(2): 389–398.
- HERCOGOVÁ, J., 2007: Maligní melanom ve 21. století - epidemiologie, rizikové faktory, screening, prevence a diagnostika. *Medicína po promoci = Postgraduate Medicine Czech: časopis postgraduálního vzdělávání lékařů* 5: 38.
- HICKS, A.M., RIEDLINGER, G., WILLINGHAM, M.C., ALEXANDER-MILLER, M.A., VON KAP-HERR, C., PETTENATI, M.J., SANDERS, A.M., WEIR, H.M., DU, W., KIM, J., SIMPSON, A.J.G., OLD, L.J., CUI, Z., 2006: Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Science* 103(20): 7753-7758.
- HOPKINS, S.J., 2003: The pathophysiological role of cytokinem. *Legal Medicine* 5: 45–57.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., 2009: *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 316 s.
- CHEN, W.J., WAHL, S.M., 2003: TGF- β : the missing link in CD4 CD25 regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14(2): 85-89.
- CHRISTIAANSEN, J. E., GALLARDO, D., BURNSIDE, S.S., NELSON, A.A., SEARS, D.W., 1984: Rapid covalent coupling of proteins to cell surfaces: Immunological characterization of viable protein-cell conjugates. *Journal of Immunological Methods* 74(2): 229–239.
- JIRÁSEK, A., KLENER, P., 1989: Biologie nádorové buňky a nádorové tkáně. In: KOUTECKÝ, J. a kol. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 318 s.
- KASZA, A., 2013: IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine* 62: 22–33.

- KATO, K., ITOH, C., YASUKOUCHI, T., NAGAMUNE, T., 2004: Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glykol) derivatives. *Biotechnology Progress* 20: 897-904.
- KLENER, P., 1999: Chemoterapie: minimum pro praxi. 1. vyd. Praha: Triton, 114 s.
- KLENER, P., 1997: Bližší charakteristika některých cytokinů. In: KLENER, P., TESAŘ, V., Cytokiny ve vnitřním lékařství. 1. vyd. Praha: Grada, 260 s.
- KLENER, P., TESAŘ, V., 1997: Cytokiny ve vnitřním lékařství. 1. vyd. Praha: Grada, 260 s.
- KOMÁREK, L., 2000: Prevence nádorových onemocnění v primární péči. 3. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 39 s.
- KOUTECKÝ, J. a kol., 1989: Klinická onkologie. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 318 s.
- KREJČÍ, J., DVOŘÁČEK, A., 1978: Patologie: Učebnice pro zdravotnické školy. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 240 s.
- LIU, G., ZHANG, F., LEE, J., DONG, Z., 2005: Selective induction of interleukin-8 expression in metastatic melanoma cells by transforming growth factor- β 1. *Cytokine* 31: 241–249.
- MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., 2004: Patologie. 1. vyd. Praha: Grada, 347 s.
- MANDAL, P., NOVOTNY, M., HAMILTON, T., 2005: Lipopolysaccharide Induces Formyl Peptide Receptor 1 Gene Expression in Macrophages and Neutrophils via Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *The Journal of Immunology* 175: 6085–6091.
- 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(7): 791-798.
- NICOLINI, A., CARPI, A., ROSSI, G., 2006: Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17: 325–337.
- OVERWIJK, W.W., RESTIFO, N.P., 2001: B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology* 39:20.1.1–20.1.29.
- PATHAK, S., PALAN, U., 2005: Immunology. 2. vyd. Enfield (N.H.): Science Publishers, 411 s.
- PECORINO, L., 2012: Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. 3. vyd. New York, NY: Oxford University Press, 360 s.
- PELENGARIS, S., KHAN, M., 2006: The Molecular Biology of Cancer. Chichester: John Wiley, 544 s.
- PUSZTAI, L., COOPER, K., 1996: Introduction: cell proliferation and carcinogenesis. In: PUSZTAI, L., LEWIS, C.E., YAP, E. Cell proliferation in cancer: regulatory mechanisms of neoplastic cell growth. New York: Oxford University Press, 397 s.

- PUSZTAI, L., LEWIS, C.E., YAP, E. Cell proliferation in cancer: regulatory mechanisms of neoplastic cell growth. New York: Oxford University Press, 397 s.
- REISS, M., 1999: TGF- β and cancer. *Microbes and Infection* 1: 1327–1347.
- ROBBINS, S. L., KUMAR, V., COTRAN, R. S., 2010: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8. vyd. Philadelphia, PA: Sanders/Elsevier, 1464 s.
- SCHADENDORF, D., MOILER, A., ALGERMISSEN, B., WORM, M., STICHERLING, M., CZARNETZKI, B.M., 1993: IL-8 Produced by Human Malignant Melanoma Cells in vitro Is an Essential Autocrine Growth Factor. *The Journal of Immunology* 151: 2667-2675.
- SAKAGUCHI, S., WING, K., MIYARA, M., 2007: Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European Journal of Immunology* 37: 116–123.
- SCHIFFMANN, E., CORCORAN, B. A., WAHL, S. A. M., 1975: N-Formylmethionyl Peptides as Chemoattractants for Leucocytes. *Proceedings of the National Academy* 72(3): 1059-1062.
- SIEGEL, P. M., MASSAGUÉ, P., 2003: Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer* 3(11): 807-821.
- SRB, T., 2012: Novotvary 2009. *Zdravotnická statistika*. Praha: ÚZIS ČR 2/12: 1-10.
- STRÍTESKÝ, J., HALBERSTADT, P., 1995: Patologie pro 2. ročník středních zdravotnických škol. 1. vyd. Praha: Scientia medica, 91 s.
- THOMAS, A.L., SHARMA, R.A., STEWARD, W.P., 2006: Treatment of Cancer: Chemotherapy and Radiotherapy. In: PELENGARIS, S., KHAN, M. a kol., *The Molecular Biology of Cancer*. Chichester: John Wiley, 544 s.
- TOROSANTUCCI, A., BROMURO, C., CHIARI, P., BERNARDIS, F., 2005: A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine* 202: 597–606.
- UNDERHILL, D.M., GANTNER, B., 2004: Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection* 6: 1368-1373.
- ZÁMEČNÍK, J., 2002: Nemocný se zhoubným nádorem. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 63 s.
- ZIMA, T., VORLÍČEK, J., TOPOLČAN, O., 2008: Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *ČSKB* [online, cit. 2013-02-12].