

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

**Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění  
pomocí bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*.  
Optimalizace této terapie, vliv agonistů signálních  
receptorů.**

bakalářská práce

Autor práce: Petra Sváčková  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant  
Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.  
Datum odevzdání práce: 14. 8. 2013

## Abstrakt

Nádorové onemocnění neboli rakovina je velice obávaným onemocněním, které je staré jako lidstvo samo. Rakovina je obecný název pro celou skupinu onemocnění. Společným rysem je nekontrolovatelný růst abnormálních buněk. Za normálního stavu jsou buňky schopny rozpoznat, že jsou poškozené a následně mutaci opravit, popřípadě jsou zničeny apoptózou. U nádorových buněk tomu tak není. Nádorové buňky se těmto mechanismům umí vyhnout, rostou a vytvářejí buňky nové. Nádorové buňky posléze napadají tkáň i v jiné části těla a dojde k rozvoji tzv. metastáz.

Rakovina je chápána jako civilizační onemocnění, kterým je postiženo čím dál tím více lidí. Značný výskyt této choroby je způsoben nesprávným životním stylem, stresem, nedostatkem pohybu, nadbytkem příjmu potravy, kouřením, alkoholem a v neposlední řadě má velký vliv věk pacienta. Ze statistických průzkumů vyplývá, že jde o problém více než aktuální, kterému je třeba věnovat velkou pozornost.

Hlavními cíli této bakalářské práce je pochopení problematiky terapie nádorových onemocnění a ověření možnosti terapie za použití mikroorganismů. Bakalářská práce má část teoretickou a experimentální. V části experimentální byly ověřeny poznatky a hypotézy získané rešeršní prací v teoretické části.

Teoretická část je zaměřena na pochopení rozsáhlého tématu rakoviny, od definice co rakovina je, jak vzniká, až po možnosti terapie. Druhá část teoretické části je zaměřena na terapii nádorových onemocnění za použití mikroorganismů. Byla zpracována rešerše zabývající se použitím bakterií k léčbě rakoviny. Koncem 19. století se dr. William Colley pokoušel aplikovat pacientům s nádorovým onemocněním směs inaktivovaných bakterií, grampozitivní *Streptococcus pyogenes* a gramnegativní *Serratia marcescens*, tzv. Coleyho toxin. Tento způsob byl, střídavě úspěšně i neúspěšně, poměrně dlouhou dobu využíván. Toto testování pokračovalo ve formě syntetických agonistů TLR (toll like receptoru) až do současnosti. Použití bakterií bylo vždy spojeno s aktivací vrozené imunity, ale nikdy nebylo nic učiněno ve smyslu namíření imunitního ataku přímo proti nádorovým buňkám. Je možné říci, že dr. William Colley položil základní kámen imunoterapie. Dále bylo rešerší zjištěno, že

nádorové buňky mají při přirozeném pH náboj negativní. To znamená, že pokud se najde bakterie, která má náboj přirozeně pozitivní a aplikuje se do místa nádoru, dojde k navázání pozitivně nabité bakterie na negativně nabitou nádorovou buňku. Po navázání bude následovat imunitní reakce organismu bojující nejen proti zánětu, vytvořeném po aplikaci bakterie, ale současně i proti nádorovým buňkám. Jako pozitivně nabitou bakterií se jeví *Stenotrophomonas maltophilia*. K potvrzení této hypotézy bylo třeba nalézt bakterii s podobnými vlastnostmi, velikostí a schopností pohybu jako má *Stenotrophomonas maltophilia*, ale s nábojem záporným. Nejvíce vyhovující je bakterie *Serratia marcescens*, která byla také součástí Colleyho toxinu.

Pokusy byly prováděny na samicích myši inbredního kmene C57BL/6 od Charles River Laboratories. Byla použita buněčná linie myšního melanomu B16-F10. Nejprve byly připraveny buňky myšního melanomu B16-F10, které byly transplantovány 8 týdnů starým myším. Transplantace byla provedena pod kůži na oholené místo na pravé zadní části zad v množství 400 000 buněk melanomu B16-F10. Ve fázi prvního in vitro experimentu byla zavedena metoda kultivace bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*. Při prvním in vivo experimentu se ověřila hypotéza, že intratumorálním aplikováním vakcíny s inaktivovanou bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* došlo k ovlivnění melanomu. V druhém in vivo experimentu došlo k ověření hypotézy týkající se negativního náboje nádorové buňky a pozitivního náboje bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*. Jako kontrolní bakterie s negativním nábojem byla použita *Serratia marcescens*. V pokusech byl sledován růst a objem nádorů. Nádory byly měřeny jednou za dva dny pomocí kaliperu, čímž byla zjištěna velikost nádoru. Objem nádoru byl vypočítán. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel. Přežívání myši bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

Provedením in vitro experimentu byla zavedena kultivace obou bakterií na pracovišti. Byla zjištěna optimální koncentrace počtu bakterií v jedné vakcíně. Došlo k připravení dostatečného množství bakterií i pro budoucí experimenty.

Prvním in vivo experimentem, kde byla použita bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* byla potvrzena hypotéza příznivého vlivu intratumorální aplikace bakterie

na melanom. Sledovalo se ovlivnění růstu melanomu B16-F10 intratumorální aplikací bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* a aplikací kombinace této bakterie a LPS. Bakterie působí i sama o sobě velice dobře a další přídavek LPS je víceméně zbytečný, jelikož v bakteriální stěně je LPS dostatek. Statisticky nejvýznamnější bylo měření provedené ve 4. dni terapie, kdy je zřejmé, že bakterie má na objem nádoru velký vliv. Vyhodnotila se i doba přežití jednotlivých skupin. Ve skupině, kde byla podávána směs *Stenotrophomonas maltophilia* + LPS bylo dosaženo statisticky významného prodloužení přežití a doposud žije (k 10.8. 2013, 472 dní, po zahájení terapie dne 26.4. 2012) bez jakýchkoliv příznaků jedna myš.

Druhým in vivo experimentem byla potvrzena hypotéza o vlivu náboje bakterie na velikost nádoru. Testováním bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* bylo potvrzeno, že bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* působí na redukci nádorového růstu mnohem více, než bakterie *Serratia marcescens*. Zatímco redukce nádorového růstu působením bakterie *Serratia marcescens* nebylo statisticky významné, redukce vyvolaná *Stenotrophomonas maltophilia* byla statisticky významná s výjimkou posledního dne. Toto zjištění je v souladu s hypotézou, že působení dvou gramnegativních bakterií bude ovlivněno jejich nábojem. Kladně nabitě bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* více interagovaly se záporně nabitými nádorovými buňkami a navedly na ně tak imunitní odpověď. U podání samotné *Serratia marcescens* nedocházelo k tak dobrým interakcím jako v předchozím případě. Jako ověření byla použita bakterie *Serratia marcescens* + oligolysin. S pomocí kovalentně vázaného oligolysinu byl upraven povrchový náboj bakterie a to směrem k pozitivnímu náboji. Očekávalo se zvýšení jejich protinádorového účinku, což se potvrdilo. *Serratia marcescens* s povrchově navázaným oligolysinem vykazovala protinádorovou aktivitu jako *Stenotrophomonas maltophilia*, která má přirozeně pozitivní náboj. Ovlivnění doby přežití podáním *Stenotrophomonas maltophilia* v tomto experimentu nebylo statisticky významné.

Experimenty provedenými v bakalářské práci došlo k potvrzení hypotézy pozitivního vlivu náboje bakterií na jejich protinádorový účinek při léčbě melanomu B16-F10.

## Abstract

Cancerous disease or cancer is a very feared disease, old as the history of mankind itself. The name of cancer is a common name for the entire group of diseases. A common feature of those is an uncontrolled growth of abnormal cells. Under normal conditions the cells are able to recognize that they have been damaged and consequently they are able to repair this mutation or they are destroyed by apoptosis. However it doesn't work like this with cancerous cells. Tumor cells are able to avoid these mechanisms, they grow and create new cells. Eventually tumor cells attack even the tissues of other body parts and so called metastases are developed.

Cancer is understood as a lifestyle disease that affects increasing number of people. Considerable occurrence of this disease is caused by incorrect lifestyle, stress, lack of exercise, excess food intake, smoking, alcohol, and last but not least, the patient's age has a great influence. Statistical surveys show that the problem is more than current and should be paid close attention to.

The main objectives of this thesis are to understand the issue of tumor therapy and to verify the possibilities of using a microorganism therapy. The bachelor thesis has a theoretical and an experimental part. The findings were verified in the experimental part and the hypotheses obtained from the research paper were verified in the theoretical part.

The theoretical part is focused on understanding a broad topic of cancer, reaching from the definition of what cancer is, how it arises, up to the therapy options. The second section of the theoretical part is focused on tumorous disease therapy using microorganisms. A research has been made regarding the use of bacteria for cancer treatment. By the end of the 19th century dr. William Coley tried to apply a mixture of inactivated bacteria on patients with a tumorous disease, containing Gram-positive *Streptococcus pyogenes* and Gram-negative *Serratia marcescens*, so called Coley's toxin. This way was more or less successfully used for a relatively long time. This testing has continued in the form of synthetic TLR agonists (toll like receptor)

up to the present. The use of bacteria has always been related to innate immunity activation, but nothing has been ever done in the sense of aiming the immune attack directly against the tumor cells. It is possible to say that dr. William Colley laid the foundation stone of immunotherapy. Further research has shown that at natural pH the tumor cells are of a negative charge. That means that if there is a bacteria of naturally positive charge and it is applied on the place of tumor, the positively charged bacteria is bound to the negatively charged cell. After such binding an immune response of the organism is followed, fighting not only against the inflammation caused by the bacteria, but also against the tumor cells. The bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* seems to be positively charged. To confirm this hypothesis it was necessary to find a bacteria with similar features, size and ability to move like those of *S. maltophilia*, but charged negatively. The bacterium *Serratia marcescens* is the most convenient, also forming part of Colley's toxin.

Experiments were carried out in female mice of inbred strain C57BL/6 from Charles River Laboratories, using cell line of B16-F10 mice melanoma. First of all the cells of B16-F10 of mice melanoma were prepared and transplanted to 8 weeks old mice. The transplantation was carried out under skin on a shaved spot in the right back part of the back in the number of 400 000 cells of B16-F10 melanoma. The cultivation method of the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* was introduced in the phase of the in vitro experiment. In the first in vivo experiment a hypothesis was confirmed that by the intratumoral application of the vaccine with the inactivated bacterium *S. maltophilia* the melanoma was affected. The second in vivo experiment verified the hypothesis concerning the negative charge of the tumor cell and the positive charge of the bacterium *S. maltophilia*. *S. marcescens* was used as a control bacteria with a negative charge. The experiments monitored both, the growth and the volume of the tumor. The tumors were measured once in two days by means of caliper, which determined the size of the tumor. The volume of the tumor was calculated. Statistical analysis of data was done using Student's t-test in MS Excel program. The survival of mice was evaluated using the Kaplan-Meier test in the MedCalc program.

Performing the in vitro experiment the cultivation of both bacteria was introduced in the workplace. The optimal concentration of the bacteria number in one vaccine was detected. A sufficient number of bacteria was prepared even for future experiments.

The first in vivo experiment where the bacterium *S. maltophilia* was used confirmed the hypothesis of the positive impact of the intratumorous application of the bacteria on the melanoma. We observed the effect of the melanoma growth by means of the intratumorous application of the bacteria *S. maltophilia* and the application of the combination of this bacteria and LPS. It works very well even independently and other addition of LPS is more or less useless, since the bacterial cell wall has enough LPS. Statistically, the most important measurement was made on the 4th day of therapy, when it becomes obvious that the bacteria has a great influence on the tumor volume. The survival time of individual groups was also evaluated. The group which was given the mixture of *S. maltophilia* + LPS achieved a statistically significant prolongation of survival time and one mouse is still alive without any symptoms (reaching the number of 472 days on the 10.8.2013, after initiation of therapy – 26.4. 2012).

The second in vivo experiment confirmed the hypothesis of the effect of the bacteria charge on the size of the tumor. By means of testing the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* it was confirmed that the bacterium *S. maltophilia* affects the reduction of the tumor growth much more than the bacterium *S. marcescens*. While the reduction of tumor growth by bacteria *Serratia marcescens* was not statistically significant, the reduction caused by *S. maltophilia* was statistically significant except for the last day. This observation is compatible with the hypothesis that the interaction of two Gram-negative bacteria will be affected by their charge. Positively charged bacteria *S. maltophilia* interacted more with the negatively charged tumor cells and in this way they attracted to them an immune response. Applying *S. marcescens* by itself the interactions weren't so good as in the previous case. The bacterium *S. marcescens* + oligolysin were used as a confirmation. Using covalently bound oligolysin the surface charge of the bacteria was modified towards a positive charge. An increase of their antitumor effect was expected and this was also

confirmed. *S. marcescens* with surface bound oligolysin showed antitumor activity as *S. maltophilia*, which has naturally a positive charge. The effect on survival time using *S. maltophilia* in this experiment was not statistically significant.

The experiments carried out in the thesis confirmed the hypothesis of the positive impact of bacteria charges on their antitumor effect in the treatment of B16-F10melanoma.



## **Prohlášení**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – 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 dne 14. 8. 2013

.....

Petra Sváčková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi za skvělé vedení bakalářské práce, za jeho trpělivost a ochotu kdykoliv a s čímkoliv mi pomoci a za mnoho cenných rad a připomínek nejen při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Danielu Růžkovi, PhD. za pomoc při práci s bakteriemi *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*. Mé velké díky patří mé rodině, která mě podporovala a vytvořila mi dobré zázemí pro studium a také blízkým přátelům.

# Obsah

Úvod .....	14
1. Teoretická část .....	17
1.1 Rakovina .....	17
1.2 Kancerogeneze.....	17
1.2.1 Onkogeny .....	18
1.2.2 Tumorsupresorové geny .....	18
1.3 Imunologie nádorů.....	19
1.3.1 Nádorové antigeny.....	19
1.3.2 Tc – lymfocyty (cytotoxické lymfocyty, CD 8+).....	20
1.3.3 NK buňky (natural killer cell) .....	20
1.3.4 Dendritické buňky .....	21
1.3.5 Obranné mechanismy nádor. buněk před imunitním systémem .....	22
1.4 Melanom .....	22
1.4.1 Typy melanomu.....	24
1.4.2 Melanom u myši .....	25
1.5 Terapie .....	26
1.5.1 Typy terapie.....	26
1.6 Použití bakterií při nádorové terapii .....	32
1.7 Nádorová terapie s využitím kladně nabitých molekul .....	35
1.7.1 Adheze bakterií.....	35
1.8 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	36
1.9 <i>Serratia marcescens</i> .....	37
2. Cíle práce .....	38
3. Hypotézy .....	39
4. Metodika výzkumu.....	40

4.1	Chemikálie .....	40
4.2	Experimentální zvířata .....	40
4.3	Buněčná linie .....	41
4.4	Příprava buněk myšního melanomu B16-F10 pro <i>in vivo</i> použití.....	41
4.5	Transplantace nádorových buněk B16-F10 .....	42
4.6	Příprava <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> pro injikování do nádoru.....	42
4.7	Příprava <i>Serratia marcescens</i> pro injikování do nádoru .....	43
4.8	Měření velikosti nádoru .....	43
4.9	Statistické vyhodnocení dat .....	44
4.10	Pokus č. 1: In vitro: Kultivace bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Serratia marcescens</i> .....	44
4.11	Pokus č. 2: In vivo: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	44
4.12	Pokus č. 3: In vitro: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Serratia marcescens</i> .....	46
5.	Výsledky .....	49
5.1	Pokus č. 1: In vitro: Kultivace bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Serratia marcescens</i> .....	49
5.2	Pokus č. 2: In vivo: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	50
5.3	Pokus č. 3: In vivo: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Serratia marcescens</i> .....	52
6.	Diskuse .....	54
7.	Závěr .....	56
8.	Seznam literatury .....	57
9.	Klíčová slova.....	70

## Seznam použitých zkratek

- ADCC – antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách)
- CD – cluster of differentiation (diferenciační antigen)
- FCS – fetal calf serum (fetální telecí sérum)
- GM-CSF – granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů)
- IgG – imunoglobulin G
- IL – interleukin
- IFN – interferon
- LPS – lipopolysaccharides (lipopolysacharid)
- MHC – major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
- NK – natural killer cell (přirozený zabíječ)
- NOR – Národní onkologický registr ČR
- PBS – phosphate buffered saline (fosfátem pufovaný fyziologický roztok)
- RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium
- TAA – tumor associated antigen (s nádory asociované antigeny)
- Tc – cytotoxic T-cell (cytotoxický T-lymfocyt)
- TGF – transforming growth factor (transformující růstový faktor)
- Th – helper T-cell (pomocný T-lymfocyt)
- TLR – toll like receptors (receptory skupiny Toll)
- TNF – tumor necrosis factor (faktor nekrotizující nádory)
- TSA – tumor specific antigen (antigeny specifické pro nádory)

## Úvod

Nádorové onemocnění neboli rakovina není jedno onemocnění. Jde o různorodou skupinu chorob, která se vyznačuje jednou společnou charakteristikou, a to je schopnost abnormálních buněk dělit se a napadat okolní tkáň.

Slovo rakovina pochází z řeckého slova karkinos. Tímto slovem jako první popsal nádor Hippokrates (460-370 př. n. l.). Ovšem Hippokrates nebyl prvním člověkem, který objevil toto onemocnění. V mumii pocházející ze starověkého Egypta, období přibližně 1 600 př. n. l., byl nalezen nádor kostí. První zdokumentovaný nádor byl nádor prsu, z roku 1 500 př. n. l. v Egyptě. V této dokumentaci byla zmínka o tom, že neexistuje účinná léčba rakoviny. Šlo spíše o paliativní léčbu. Ovšem již v tomto období se lékaři pokoušeli nádor chirurgicky odstranit podobným postupem, jaký je používán doposud. (Sudhakar, 1999)

Z epidemiologického hlediska se mohou nádorová onemocnění řadit k civilizačním chorobám (Petruželka, 2009). I přes obrovské lékařské a laboratorní pokroky týkající se odhalení nádorových onemocnění je nejdůležitější včasná diagnostika a s ní související prevence počínající péčí praktického lékaře (Skála, 2009).

Hlavními rizikovými faktory způsobující rakovinné bujení v organismu je nesprávný životní styl zahrnující: kouření, špatné dietetické návyky a s nimi spojená nadváha, stres, nedostatek fyzické aktivity, nadměrné slunění a stále se zvyšující věk společnosti. Hlavní příčinou vzniku rakoviny ve vyšším věku je dlouhodobé vystavování organismu karcinogenům a hromadící se efekt endogenních procesů způsobujících poškození DNA. (Petruželka, 2009, Dušek et al., 2012)

V geografickém zaměření výskytu nádorových onemocnění má Evropa prvenství ve výskytu nádorových onemocnění gastrointestinálního traktu. Ročně je nahlášeno více než 600 000 nových případů. Přes 40% tvoří kolorektální karcinom. (Jemal et al., 2011)

Aktuálnost a potřebnost řešení problematiky nádorových onemocnění velice dobře ukazují statistiky Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky. Od roku 1976 existuje Národní onkologický registr ČR (NOR), do kterého musí být hlášeny

veškeré zaznamenané zhoubné novotvary (dg. C00 – D97) a novotvary in situ (dg. D00 – D09). Díky této směrnici jsou k dispozici podrobné rozborů epidemiologie onkologických onemocnění na území České republiky. V Národním onkologickém registru bylo do 31.12. 2010 zaevidováno 1 866 750 zhoubných novotvarů a novotvarů in situ, celkem u 1 612 976 pacientů. U 18 580 osob bylo zaznamenáno 22 836 novotvarů nejistého a neznámého původu. Jen za rok 2010 bylo do Národního onkologického registru nahlášeno celkem 82 606 případů. Výskyt nově zjištěných novotvarů se navýšil oproti roku 2009 o 4%. Incidence stoupla o 2,4%. U mužů byl výskyt novotvarů nepatrně vyšší než u žen. Tab. I uvádí celkový stav Národního onkologického registru k 31.12. 2010. V tab. č. II je zaznamenána incidence a úmrtnost na zhoubné novotvary u mužů a žen v roce 2009 a 2010. (Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 18.3. 2013)

Diagnóza MKN-10	Počet žijících osob	Počet novotvarů u žijících osob	Počet zemřelých osob	Počet novotvarů u již zemřelých osob	% zemřelých osob z celkového počtu hlášených v registru	% novotvarů u zemřelých osob z celkového počtu hlášených novotvarů
C00–D09	505 677	611 847	1 107 299	1 254 903	68,6%	67,2%
D37–D48	10 213	12 361	8 367	10 475	45,0%	45,9%

Tab. č. I : Stav Národního onkologického registru k 31.12. 2010  
(Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 18.3. 2013)

Incidence ZN a novotvary in situ dg. C00–C97 a D00–D09 dle MKN-10	2009			2010		
	muži	ženy	celkem	muži	ženy	celkem
absolutní počet	41 187	38 193	79 380	42 933	39 673	82 606
incidence na 100 000 obyv.	799,7	715,1	756,6	831,9	740,7	785,4
standardizovaná incidence na 100 000 (podle evropského standardu)	705,1	520,6	588,8	720,9	535,6	603,2
Úmrtnost na ZN dg. C00–C97 dle MKN-10	2009			2010		
	muži	ženy	celkem	muži	ženy	celkem
absolutní počet	15 498	12 182	27 680	15 667	12 167	27 834
úmrtnost na 100 000 obyv.	300,9	228,1	263,8	303,6	227,1	264,7
standardizovaná úmrtnost na 100 000 (podle evropského standardu)	265,8	148,4	197,4	263,4	147,5	195,6

Tab. č. II: Incidence a úmrtnost na zhoubné novotvary u mužů a žen v roce 2009 a 2010  
(Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 18.3. 2013)



# 1. Teoretická část

## 1.1 Rakovina

Existuje několik hypotéz, podle kterých může dojít ke vzniku mutací, které způsobují rakovinu. Prvním poznatkem je, že může dojít ke spontánní mutaci, která zapříčiní vznik novotvaru. Na organismus může působit látka měnící genom hostitele např. svou chemickou povahou a opět dojde k nádorovému bujení. V neposlední řadě je zde možnost dědičnosti iniciační mutace, která výrazně zvýší predispozici k rakovině (Knudson, 1985). Nádorové buňky se od normálních buněk liší velice málo, a z tohoto důvodu jsou schopné uniknout imunitnímu systému organismu (Hořejší et al. 2005).

## 1.2 Kancerogeneze

Jak již bylo zmíněno, vznik většiny nádorů má na svědomí primární mutace v jedné somatické buňce. Tato zmutovaná buňka je zakládající buňkou nádorového klonu. Průběh vzniku maligního klonu buňky je rozdělen do tří stádií. Buňka se účastní iniciačního stadia, promočního stadia a stadia progresu. V iniciačním stadiu dojde k nevratné mutaci určitého genu. V následujícím promočním stadiu je zintenzivněno buněčné dělení pomocí promočních faktorů. Promoční faktory nejsou samy o sobě kancerogenní, jen podporují dělení zmutované buňky. Pokud dojde k odstranění promočních faktorů, dojde ke zpomalení až zastavení dalšího vývoje klonu. Konečným stádiem kancerogeneze je stadium progresu. V tomto stadiu se nahromadí mutace dalších genů, vyskytujících se v buňkách nádorového klonu. Změní se fenotyp buněk. Změnou fenotypu dojde k invazivnímu růstu, popřípadě k metastázám. (Lukešová et al. 2006) Samotná invaze nádorových buněk do jiných částí organismu a následná tvorba metastáz je vícestupňový proces. Nejprve se maligní buňka odtrhne z původního

ložiska nádoru, prostoupí bazální membránou do krve nebo lymfatických cév (intravazace). Krví nebo lymfou jsou nádorové buňky zaneseny do vzdálených částí od místa vzniku. Poté maligní buňka projde přes endoteliální stěny kapilár do tkáně (extravazace), kde se zachytí a dojde ke vzniku metastáz (Hearing et al., 1988).

### **1.2.1 Onkogeny**

Jako onkogeny je možné označit všechny geny, které mohou způsobit nebo jen podpořit transformaci normálních buněk na buňky nádorové (Míčková et al. 2006). Onkogeny se vyskytují ve dvou formách. První formou je virový onkogen (součást genomů virů způsobujících nádory) a druhou formou je celulární onkogen (vznik aktivací protoonkogenu – chybná exprese normální buňky, např. mutace genu nebo přestavby chromozomů) (Fearon et al. 1990).

Některé druhy onkogenů a jejich funkce:

C-erbB-2: kódování receptoru pro růstový faktor (Lukes et al., 1994)

Bcl-2: inhibice apoptózy, prodloužení přežití buňky (Halperin et al., 2001)

K -ras: kódování signálních transduktorů (Lagarda et al., 2001)

### **1.2.2 Tumorsupresorové geny**

V každé somatické buňce v lidském genomu je přibližně 30 tumor supresorových genů (Lukešová et al., 2006). Produkty tumor supresorových genů – proteiny, potlačují proliferaci buněk, podporují diferenciaci buněk apoptózu. Pokud je tumor supresorový gen poškozen, dojde k úniku buněk před imunitním systémem a začnou na ni působit faktory podporující růst a vývoj nádoru. (Fearon et al., 1990)

Nejznámějším tumor supresorovým genem je p53, který se podílí hlavně na apoptóze. Tvoří se jako fyziologická odezva na buněčný stres. Nejprve dojde k zablokování buněčného cyklu z toho důvodu, aby mohl být zhodnocen stupeň poškození buněčné DNA. Pokud není možné poškození DNA opravit, dojde ke spuštění apoptózy pomocí p53 proteinu. (Cherchi et al., 2001)

## **1.3 Imunologie nádorů**

### **1.3.1 Nádorové antigeny**

Aby došlo k rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem, je nutná přítomnost povrchových antigenů. Existují dva typy antigenů, a to antigeny specifické pro nádory (TSA) a s nádory asociované antigeny (TAA). (Srivastava et al., 1988)

- Antigeny specifické pro nádory

Tyto antigeny se na buňkách za normálního stavu, tedy za stavu bez mutace, nevyskytují.

Např.: komplexy MHC I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (u chemicky indukovaných nádorů), komplexy MHC s fragmenty proteinů onkogenních virů atd.

- Antigeny asociované s nádory

Antigeny asociované s nádory nejsou přítomny pouze na nádorových buňkách, proto jsou využívány jako pomocné diagnostické markery. V tomto případě záleží na množství exprimovaných antigenů, popřípadě na místě exprese.

Např.: PSA (prostatický specifický antigen), onkofetální antigeny atd. (Hořejší et al. 2005)

### **1.3.2 Tc – lymfocyty (cytotoxické lymfocyty, CD 8+)**

Cytotoxické T-lymfocyty jsou velice důležití v protinádorové imunitě z toho důvodu, že rozpoznají prostřednictvím specifického buněčného T-receptoru peptidy vázané na molekuly MHC I (Becker et al., 2005). K aktivaci Tc-lymfocytů může dojít přímo nebo nepřímo. K nepřímé aktivaci dojde pomocí antigen prezentujících buněk (dendritické buňky, makrofágy, aktivované B-lymfocyty). (Schreiber, 1993)

V případě, že je komplex peptidu + MHC rozpoznán T-buněčným receptorem a CD 8+ přijde do kontaktu s antigen prezentující buňkou, dojde k proliferaci T-lymfocytu na Tc-lymfocyt. Tc-lymfocyt se naváže na nádorovou buňku a následuje lýza buňky, popřípadě apoptóza. (Ridge et al., 1998)

Ke konečnému usmrcení nádorových buněk dojde pomocí proteinu perforinu nebo granzimu (Schreiber, 1993).

### **1.3.3 NK buňky (natural killer cell)**

NK buňky se účastní obranných procesů zajišťovaných prostřednictvím přirozené imunity. NK buňky jsou namířeny proti virům, bakteriálním infekcím, parazitálním intracelulárním patogenům a v neposlední řadě proti nádorovým buňkám. Po setkání s poškozenou buňkou jsou NK buňky schopny rychlé odpovědi bez předchozí senzibilizace. Tato cytotoxická reakce není závislá na přítomnosti antigenů MHC komplexu (French et al., 2003).

NK buňky regulují přirozenou i získanou imunitní odpověď produkcí různých cytokinů a chemokinů. K nejdůležitějším cytokinům produkovaným NK buňkami patří INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$  a GM-CSF. (Biron et al., 1999, Taub et al., 1999)

Chemokiny řadíme do cytokinů. Klasifikace chemokinů je založená na počtu aminokyselin, které oddělují cysteinová rezidua na N-konci. (Rot et al., 2004) Chemokiny v organismu zastávají řadu funkcí: migrace antigen prezentujících buněk, regulace pohybu nezralých progenitorových lymfoidních buněk (Constantine et al., 200) a inhibiční efekt na růst nádorů (van Deventer et al., 2002). Pokud dojde k uvolnění chemokinů v místě nádoru, do nádoru začnou migrovat buňky podílející se na protinádorové odpovědi, tedy NK buňky, Tc – lymfocyty a dendritické buňky (Guo et al., 2003).

V několika studiích bylo prokázáno, že pokud jsou v nádorovém stromatu průkazné NK buňky, prognóza je příznivější (Jass, 1986, Sato et al., 2005, Zhang et al., 2003).

### **1.3.4 Dendritické buňky**

Dendritické buňky jsou součástí vrozené imunity. Jsou to klíčoví prostředníci pro prezentaci nádorových antigenů a zprostředkovávají specifické protinádorové imunitní reakce. Dendritické buňky zpracují antigen a ten poté prezentují T-lymfocytům. Pokud dojde k aktivaci dendritických buněk, jsou schopné zvýšit cytotoxickou aktivitu NK buněk tím, že zvýší expresi INF- $\alpha$  (Rutkowski et al., 2010).

### 1.3.5 Obranné mechanismy nádorových buněk před imunitním systémem

Nádorové buňky jsou schopné, se řadou různých mechanismů, vyhnout imunitnímu systému:

- značná variabilita nádorových buněk
- malé množství exprimovaných nádorových antigenů
- nepřítomnost kostimulačních molekul CD80 a CD86 (útlum Tc a Th lymfocytů)
- produkce např. IL – 10, TGF –  $\beta$  (inaktivace T lymfocytů)
- exprese FasL (apoptóza buňky v případě, že dojde k setkání FasL s Fas receptorem na lymfocytech)
- inhibice funkce nebo životnosti dendritických buněk (např. produkce oxidu dusnatého – apoptóza dendritických buněk, IL-10 – inhibice zrání dendritických buněk)
- ochrana nádorových buněk před imunitním atakem (Hořejší et al., 2005)

## 1.4 Melanom

Maligní melanom je maligním kožním nádorem, vznikajícím nádorovou proliferací melanocytů. Maligní melanom může metastazovat. Jde o jeden z nejzhoubnějších typů nádorů. (Fikrle et al., 2010).

Z epidemiologického hlediska jde o běžný nádor. Počet postižených pacientů stále stoupá. Incidence u žen se stabilizovala. U mužů, především ve vyšším věku, stále stoupá. (Pizinger, 2003) Melanom postihuje především lidi s bílou barvou kůže (Roesch et al., 2009). Melanom se vyskytuje spíše u pacientů středního a vyššího věku. Muži mají melanomem zasažen především trup, ženy dolní končetiny (Balch et al., 2001).

Vznik melanomu může být zapříčiněn chromozomovou mutací (hl. delece chromozomu 9 v oblasti 9p21), mutací tumor supresorového genu a působením UV záření (Langley et al., 1997). Potenciálním prekuzorem vzniku maligního melanomu mohou být také melanocytové névy. Pravděpodobnost vzniku melanomu z melanocytových név je asi 1/3 ze všech případů. (Tucker et al., 1997)

Etiologie vzniku melanomu v dětském věku není známá. Maligní transformace vznikne spontánně, ovšem u dětí se vyskytuje několik rizikových faktorů, které mohou vznik maligního melanomu způsobit (Bajčiová, 2013):

- familiární výskyt - jde o autozomálně dominantní onemocnění, pozitivní rodinná anamnéza nastane v případě výskytu maligního melanomu a tím pádem i genetické mutace → potřebnost genetického vyšetření (Paradela et al., 2010)
- sluneční záření – vyvarování kojenců do 6 měsíců věku slunečnímu záření, batolata do dvou let nutná ochrana oblečením, starší děti použití ochranných krémů s vysokým UV filtrem (Bajčiová, 2013)
- pigmentové névy – v průběhu dětství neustálé změny rozsahu, barvy i povrchu pigmentových név (Bajčiová, 2013), občas výskyt zvláštní formy névu – juvenilní Spitzové névus (většinou benigní, ale do malignity může přejít) – velmi obtížné rozlišení benigního a maligního projevu (Kirkwood et al., 2009)
- genetické faktory – několik geneticky podmíněných onemocnění, které zvyšují riziko vzniku melanomu, např.: xerodermapigmentosum (Réguerre et al., 2012), syndrom dysplastických névů (Paradel et al., 2010), Wernerův syndrom (Bajčiová, 2013)
- poruchy imunity – dlouhodobá imunosupresivní léčba, léčba jiné malignity, vrozené poruchy imunity → 2-6x vyšší riziko vzniku melanomu (Bajčiová, 2013)

Pro léčbu je velmi důležitá včasná diagnostika. Běžně používané vodítko pro diagnostiku melanomu je tzv. ABCD systém používaný dermatology. Jednotlivá písmena charakterizují vzhled melanomu: A – nesouměrnost (asymmetry), B – ohraničení (border), C – barva (color) a D – rozměr (dimension) (Bono et al., 1999). ABCD systém byl zaveden od roku 1985 (Friedman et al., 1985). Nejprve dojde

k vyšetření dermatologem, následuje chirurgická excize nádoru a histopatologické vyšetření. Excize je totální, včetně ochranného lemu melanomu. Základní léčebnou metodou je tedy kompletní chirurgická excize melanomu. Rozšiřující léčebnou metodou je léčba adjuvantní, jejímž cílem je likvidace případných mikrometastáz. Do adjuvantní léčby se řadí radioterapie po excizi rozsáhlých primárních melanomů a podání např. INF- $\alpha$ , jenž vykazuje protinádorové účinky. (Langley et al., 1997)

Prognosticky lepší je lokalizace melanomu na končetinách než na trupu. Lepší prognózu mají ženy, než muži a mladší lidé než starší lidé (Goldberg et al., 2007). K prognosticky nepříznivým histopatologickým ukazatelům je tloušťka primárního nádoru určená dle Breslawa, přítomnost ulcerace, vysoký počet mitóz a intravaskulární nebo intralymfatické šíření nádorových buněk (Pizinger et al., 2008).

### 1.4.1 Typy melanomu

Existuje několik klinických variant maligního melanomu: melanoma in situ, lentigo maligna melanoma, povrchově se šířící melanom, nodulární melanom a akrolentiginózní melanom (Fikrle et al., 2010).

- melanoma in situ – počínající vývojová fáze melanomu, nádorové melanocyty jen v epidermis, léze bez specifických klinických znaků → obtížné rozlišení od atypických melanocytových névů
- lentigo maligna melanoma – pacient vyššího věku, pomalu rostoucí, téměř výhradně na obličeji, vývoj tohoto typu melanomu může trvat i několik desetiletí, nestejně zbarvený, část léze se vyvyšuje nad úroveň kožního povrchu, velikost až několik cm v průměru
- povrchově se šířící melanom – nejběžnější, v počáteční fázi se obtížně odlišuje od névu, postupný vývoj nestejně zbarveného ložiska (odstíny hnědé, černé,



ale i šedomodré a bílé), nejprve jen horizontální růst, později vyvýšení nad úroveň okolní kůže, velikost od několika mm po několik cm v průměru

- nodulární melanom – druhá nejčastější varianta, poměrně rychlý růst papuly nebo hrbolu, barva hnědá, černá až narůžovělá, často dochází ke krvácení, horší prognóza
- akrolentiginózní melanom – od ostatních typů se odlišuje jen místem výskytu, tvoří se na dlaních, ploskách nohou a v podnehtové oblasti, velice častý u černochů a asiátů (Fikrle et al., 2010)

#### **1.4.2 Melanom u myši**

Pro snadnější pochopení maligních melanomů u člověka bylo potřebné vyvinout modelový mechanismus u myši. V naší laboratoři se využívá melanom B16-F10. Tento typ melanomu se využívá především proto, že je možné jej velice dobře použít v in vivo modelu (v myši) a mapovat tak průběh karcinogeneze velice podobný vývoji karcinogeneze v lidském organismu. Po transplantaci B16-F10 dojde k rychlému rozvoji maligního melanomu, který metastazuje především v plicích, játrech a ve slezině v době kratší než jeden měsíc. (Gheorgheosu et al., 2011)

## 1.5 Terapie

Při léčbě nádorových onemocnění se využívá především metody chirurgického odstranění nádoru, radiační terapie a chemoterapie. V posledních letech se přistupuje i k tzv. biologické terapii. Velice často je terapie kombinací několika metod, tzv. kombinovaná terapie. (Miller et al., 1981)

K tomu, aby byl zvolen správný typ terapie, je nutné znát stadium nádoru. Stadium, ve kterém se nádor nachází, se určuje pomocí tzv. TNM systému, ve kterém se hodnotí velikost nádoru, nodální přítomnost a schopnost metastazovat.

Rozlišují se 4 stadia:

Stádium I – nádor je malý a jasně lokalizovaný

Stádium II – rozšíření nádoru do lymfatické uzliny v blízkosti ložiska nádoru

Stádium III – nádor je velký, možné jeho rozšíření do vzdálenější lymfatické uzliny

Stádium IV – přítomnost metastáz (Franks et al., 1999)

### 1.5.1 Typy terapie

#### 1.5.1.1 Chirurgická terapie

Chirurgická terapie se řadí mezi nejstarší terapeutické metody nádorových onemocnění. Je ovšem zapotřebí porovnat benefity získané excizí nádoru, oproti možným rizikům, které nese chirurgický zásah do organismu (Klein, 2009). Při této terapii je nutné mít pečlivě zdokumentováno, zda došlo k lokální excizi nádoru s /bez vyříznutí regionální lymfatické uzliny, zda byl odstraněn nádor i s postiženým orgánem, zda byl nádor odstraněn jen částečně a zda došlo k excizi metastatických lézí. Při chirurgickém odstranění nádoru je nutné předejít rizikům jako je poškození okolních

orgánů, popřípadě negativní ovlivnění základních vitálních funkcí organismu. (Miller et al., 1981)

### **1.5.1.2 Radioterapie**

Samotná radioterapie se využívá k léčbě časného stadia nádoru. Při této terapii se využívá zacílení např. elektronů,  $\gamma$  záření, rentgenových paprsků přímo na nádorové buňky. Cílem tohoto typu terapie je poškodit strukturu DNA nádorových buněk a tím zamezit jejich dělení a růstu. Zároveň je zde snaha záření aplikovat co nejpřesněji, aby nedošlo k poškození buněk okolních tkání. (Vodička, 1998) V lékařské dokumentaci musí být zaznamenáno, jaký zdroj záření byl použit, o jaký typ záření šlo, jaká byla aplikace a v neposlední řadě dávkování záření (Miller et al., 1981). Radioterapie je často používána společně s chemoterapií a s biologickou léčbou (Hynková et al., 2008).

### **1.5.1.3 Chemoterapie**

Chemoterapie se začala používat k léčbě nádorových onemocnění od začátku 20. století (DeVita et al., 2008) a od poloviny 60. let je považována za jednu ze základních terapeutických metod (Klener, 2003). Do roku 1960 byla využívána především radioterapie v kombinaci s chirurgickým odstraněním nádoru. Poté bylo prokázáno, že je možné léčit i pokročilejší stádia onemocnění, a to za použití chemoterapie. Pokud již propuklo šíření mikrometastáz, došlo se k závěru, že je vhodné chirurgické odstranění nádoru nebo radioterapii kombinovat s chemoterapií. (DeVita, 1978)

Cílem chemoterapie, v tomto případě tzv. intracelulární chemoterapie, je použít sloučeniny s nízkomolekulární povahou a ovlivnit jimi pochody podporující vniknutí nádorových klonů, vyživování nádorů a metastazování. K tomu, aby došlo ke spuštění kaskády pochodů podporující tvorbu nádorových buněk je zapotřebí vazby růstového

faktoru na specifický receptor. Tato vazba zahájí sled dalších reakcí, které poté vyvrcholí inhibicí apoptózy, abnormální transkripcí buněk, podporou buněčné proliferace a metastazováním. V chemoterapii je tedy využíváno několika inhibitorů různých buněčných stádií a enzymů.

- Inhibice receptorů pro růstové faktory

K inhibici receptorů pro růstové faktory se používají hlavně monoklonální protilátky. Inhibovat receptory pro růstové faktory se zkouší především při léčbě rezistentního karcinomu, adenokarcinomu ledviny nebo nádorů prostaty.

- Inhibice signálního přenosu

Signální přenos je možné inhibovat pomocí: inhibitorů receptorových kináz, inhibice farnesyltransferáz, inhibitorů proteinkinázy m-TOR a inhibitorů proteasomu.

- Inhibitoři receptorových tyrozinkináz: účinkují dvojitým způsobem, prvním mechanismem je blokáce aktivace (fosforylace) proteinkináz, druhým a účinnějším mechanismem je jejich inaktivace (defosforylace)
- Inhibice farnesyltransferázy: hlavní roli zde hrají tzv. ras proteiny, v patogenezi většiny nádorů se uplatňuje mutace onkogenu ras, nukleární onkogeny jsou aktivovány pomocí ras onkogenu, po jejich aktivaci dojde k regulaci buněčné proliferace, aktivace onkogenu je závislá na lipidaci ras proteinu (lipidaci zajišťuje enzym farnesyltransferáza), pokud dojde k inhibici enzymu, bude následovat blokáce ras proteinu
- Inhibitoři proteinkinázy m-TOR: jelikož se proteinkináza m-TOR v buňce podílí na procesu transkripce a translace, po její inhibici nastane omezení proliferační aktivity nádorových buněk

- Inhibitoři proteasomu: proteasom je komplex proteáz vyskytující se ve všech eukaryotických buňkách, hlavní úlohu má v degradaci intracelulárních regulačních proteinů řídících buněčný cyklus (např. protein p53), aktivuje transkripční faktory, inhibuje transport buněk

- Induktoři apoptózy

Velký vliv na růst nádoru má ztráta schopnosti programované buněčné smrti. V apoptóze je důležité zaměřit pozornost na proces aktivace receptorů nesoucích smrtící domény (receptory např. TNF nebo fas), na aktivaci kaspáz a na omezení účinků bcl-2 proteinu (proapoptotické bcl-2 proteiny zvyšují propustnost mitochondriální membrány, vyloučí se tak cytochrom c, což je signál pro provedení apoptózy).

- Inhibice angiogeneze

Angiogeneze je proces, při kterém dochází k tvorbě nových krevních kapilár. Pro nádor větší než 1-2 mm<sup>3</sup> má tato skutečnost zásadní význam. Nádor ke svému růstu potřebuje výživu a kyslík. Pokud je nádor velký do 2mm<sup>3</sup>, výživa a kyslík do nádoru prostoupí prostou difuzí. Nádor větší potřebuje zajistit přísun živin a kyslíku cévami. Pokud se zabrání angiogenezi v oblasti nádoru, zabrání se tak i dalšímu růstu nádoru. Angiogenezi je možné omezit potlačením angiogenních faktorů, podpořením antiangiogenních faktorů, inhibováním proliferace buněk endotelu nebo potlačením syntézy enzymů s degradačním účinkem na bazální membránu. (Klener, 2003)

#### **1.5.1.4 Biologická terapie**

Výskyt zánětu nádorové bujení podporuje. Biologickou terapii je proto možné popsat jako protizánětlivou terapii, která k boji s nádorovým bujením využívá schopností imunitního systému postiženého organismu. Do skupiny biologických léčiv

lze řadit látky přirozené povahy nebo látky odvozené od těchto přirozeně se vyskytujících látek, která tlumí výskyt zánětu v organismu. (Bortlík et al., 2012)

V biologické terapii se využívají interferony a monoklonální protilátky. Použití interferonu  $\alpha$  je významné při léčbě hematologických malignit, u solidních tumorů je jeho aktivita omezená. (Foon, 1986)

Velkou výhodou pro použití monoklonálních protilátek je možnost přesného zaměření na cílovou strukturu, čímž se zamezí poškození zdravé okolní tkáně. V současné době je možné použití nekonjugovaných, ale i konjugovaných protilátek. Nekonjugované protilátky se zaměří proti cílovému proteinu. Konjugované protilátky se získají spojením monoklonální protilátky s efektorovou složkou, např. s cytokiny, cytostatiky atd. Takto konjugované protilátky se využívají jako transportní mechanismus k cílové buňce. (Cwierka et al., 2004)

Monoklonální protilátky vykazují cytotoxický účinek způsobený několika mechanismy. Prvním mechanismem je aktivace klasické dráhy komplementu a druhým ADCC reakce (Mian et al., 1991). K zahájení aktivace klasické dráhy komplementu dojde na povrchu buněk, na které se navázaly protilátky. Podstatou je přeměna první neaktivní složky komplementu C1 na aktivní proteolytický enzym. Aktivní proteolytický enzym rozštěpí molekuly další složky komplementu na dvě části. Jedna část zastává opět funkci proteolytickou, a štěpí další složky. Druhý fragment zastává funkce spojené např. s opsonizací a chemotaxí. V terminální fázi komplementové kaskády dojde ke spojení komplexu enzymů C5b, C6, C7, C8 a C9. Tento komplex vytvoří v membráně atakované buňky póry. Poruší se osmotická rovnováha a buňka může lyzovat (Hořejší et al., 2005). Další mechanismus využívá skutečnosti, že některé typy leukocytů exprimují Fc receptor. K rozpoznání a následné fagocytóze nádorových buněk se musí Fc konec protilátky navázat na Fc receptor leukocytu (Rosypal, 2000). K navázání dojde pomocí receptoru CD16. Tento typ reakce se nazývá ADCC reakce, tedy antibody - dependent cellular cytotoxicity (cytotoxická reakce závislá na protilátkách. K této reakci dochází po setkání NK – lymfocytu a opsonizované protilátky třídy IgG. Dojde k agregaci receptorů a přenosu signálů aktivujících cytotoxické mechanismy (Hořejší et al., 2005).

Použití monoklonálních protilátek má i několik nevýhod. Při porovnání rychlosti distribuční kinetiky jsou monoklonální protilátky pomalejší než klasická cytostatika. Tento fakt je dán velkou molekulovou hmotností monoklonální protilátky, která je přibližně 150x větší než molekulová hmotnost klasických cytostatik. Velikost ovlivňuje i průnik do nádorové tkáně. Ten je u monoklonálních protilátek také nižší. Další překážkou je např. zvýšený intersticiální tlak uvnitř nádoru, který znesnadňuje pasivní difuzi protilátek do nádoru. Tyto faktory nepříznivě ovlivňují použití monoklonálních protilátek u pacientů s objemnějšími tumory. (Shockley et al., 1991)

Relativně novým typem biologické léčby je radioimunoterapie. Radioimunokonjugát je schopný do místa nádoru zacílit 3x až 50x vyšší dávku záření než do nepoškozené tkáně. Výhodou je, že není nutné, aby se radioimunokonjugát vázal na každou nádorovou buňku. Záření má větší dosah záření než podání toxinů nebo cytostatik. K navázání na bílkovinnou část imunoglobulinu se používá vysokoenergetický  $\beta$ -zářič, který má relativně malý poločas rozpadu. (Cwiertka et al., 2004) Tato terapie je vysoce účinná u některých hematologických malignit (např. chemorezistentní lymfom) (Press et al., 2001).

#### **1.5.1.5 Kombinovaná terapie**

V kombinované terapii nádorových onemocnění je použita kombinace alespoň dvou typů terapií. Např. při léčbě nádorů hlavy a krku se využívá kombinace radioterapie s chemoterapií nebo s biologickou léčbou (Hynková et al., 2008). V tomto případě se podrobně popíší jednotlivě všechny způsoby léčby, zda byly aplikovány současně atd. (Miller et al., 1981)

## 1.6 Použití bakterií při nádorové terapii

Od konce 19. století dr. William Coley studoval vliv bakteriálních toxinů na velikost nádoru. Prvním impulsem ke studii souvislostí mezi bakteriálním onemocněním a rakovinou byl záznam léčby pacienta Freda Steina, jemuž nádor zmizel po prodělání vysoké horečky způsobené streptokokovou infekcí vyvolanou bakterií *Streptococcus pyogenes*. Tento fakt způsobil u Coleyho větší zájem a pokusil se najít i další lékařské záznamy s podobným tématem. (Coley, 1893)

Prvním Coleyho experimentem bylo úmyslné navození streptokokové infekce bakterií *Streptococcus pyogenes* u pacienta, muže, jménem Zola v roce 1891, který měl velký sarkom v krku a metastáze v pravé mandli. Po prodělání streptokokové infekce se jeho stav velice zlepšil. Nedošlo sice k úplnému vyléčení, ale k podstatnému zmenšení nádoru a pacient žil ještě 8,5 roku. (Coley, 1893)

Dle dostupných poznatků byla léčba zhoubných nádorů všech typů založena na prodělání streptokokové infekce. V mnoha případech se prokázalo, že inhibiční účinek je dostatečně silný na to, aby mohl způsobit úplné zmizení nádoru a nedocházelo k recidivě. (Coley - Nauts et al., 1945) Coley provedl ještě několik experimentů léčby neoperovatelného lymfosarkomu v krku vyvoláním streptokokové infekce. (Coley, 1891)

V prosinci roku 1892 se Coley dozvěděl o pokusech dr. Rogera, které byly založeny na spojení bakterie *Serratia marcescens* a jiných mikroorganismů. V tomto experimentu se prokázalo, že toxiny bakterie *Serratia marcescens* zvyšují virulenci jiných mikroorganismů, což mělo za následek silnější imunitní reakci postiženého organismu. To Coleyho inspirovalo k vytvoření tzv. Coleyho toxinu, tedy vakcíny obsahující *Serratia marcescens* a *Streptococcus pyogenes*. (Coley - Nauts et al., 1945) Tuto vakcínu Coley podával pacientům ve zvyšujících se dávkách, aby došlo k vyvolání horečky. Připustil, že je možné, že pokud organismu začne bojovat proti horečce, současně bude bojovat i proti nádorovým buňkám (Coley, 1893) Pozdější testy



provázené Shwartzmanem prokázaly, že toxiny *Serratia marcescens* jsou silnější, než toxiny různých druhů streptokoků, a mohou zničit nádorové buňky (Shwartzman, 1937).

První pacientem, kterému Coley podal tzv. Coleyho toxin byl 16-ti letý chlapec s masivním břišním nádorem. K prvnímu podání Coleyho toxinu došlo 24.1. 1893. Coley aplikoval intratumorálně toxin několik dní. V místě aplikace se vytvořil zánět. Po každé aplikaci došlo k výraznému zvýšení tělesné teploty. Po několika dnech již docházelo k postupnému zmenšování velikosti nádoru. V srpnu roku 1893 byl nádor sotva znatelný (Coley, 1893).

Velice důležité bylo i zajištění správné přípravy toxinu. První Coleyho toxin byl připraven Alexandrem Lambertem v New Yorku na College of Physicians and Surgeons. Alexandr Lambert vakcínu (typ IV) připravil tak, že obě kultury sterilizoval průchodem přes filtr a smíchal je dohromady až v okamžiku použití. U řady nádorů nedošlo po léčbě touto vakcínou k recidivě, zdálo se ale, že je vakcína poměrně slabá. Počátkem roku 1894 se pokusil Coleyho toxin připravit Buxton tím způsobem, že pěstoval obě dvě kultury dohromady. Tento přípravek se také sterilizoval filtrací. Ukázalo se, že takto vyrobená vakcína (typ V) je účinnější než vakcína vyrobená Lambertem (typ IV). V červnu 1894 Buxton připravil vakcínu (typ VI), ve které toxiny nebyly filtrovány. Kultury byly pěstovány společně, jako u vakcíny typ V, ale byly sterilizovány zahřátím na 50-60°C. Vakcína typu VI se zdá být nejsilnější (Coley-Nauts et al., 1945).

Sedm let po zavedení Coleyho toxinu byly publikovány dvě významné studie, které se zabývaly použitím streptokokových toxinů i u jiných onemocnění. Např. Moullin úspěšně použil streptokokový toxin při léčbě chronických vředů na kůži nebo vředů způsobených onemocněním syfilis (Moullin, 1898).

Bylo prokázáno, že např. obligátní a fakultativně anaerobní bakterie jsou schopny kolonizovat nádor a v něm se replikovat (Pawelek et al., 1997). Z tohoto důvodu je anaerobním bakteriím přisuzován velký potenciál při terapii nádorových onemocnění. Jejich protinádorový účinek spočívá v přímé toxicitě, v usnadnění nespecifických imunitních reakcí (Sukhan, 2000), jsou schopny vyčerpat základní živiny uvnitř nádoru a v důsledku kolonizace nádoru umí měnit jeho mikroprostředí (Thamm et al., 2005).

Předpokládá se, že anaerobní bakterie mohou mít i imunomodulační účinky, jako je stimulace dendritických buněk nebo vliv na Th lymfocyty (Wyant et al., 1999).

## 1.7 Nádorová terapie s využitím kladně nabitých molekul

### 1.7.1 Adheze bakterií

Všechny bakterie, jak grampozitivní, tak gramnegativní, mají na svém povrchu buď pozitivní, nebo negativní náboj. Díky náboji mohou bakterie snadno přilnout k povrchu nějaké jiné buňky nebo k jakémukoliv biomateriálu. Této skutečnosti se využívá např. při studiu antimikrobiálních účinků na některých površích. Bylo zjištěno, že všechny bakterie nejrychleji adherují na kladně nabitý povrch, ovšem na tomto kladně nabitém povrchu nedošlo k následnému růstu gramnegativních bakterií. Naproti tomu na negativně nabitě povrchy, i přes počáteční nižší přilnavost, došlo k exponencionálnímu růstu bakterií jak grampozitivních, tak i gramnegativních kmenů. Tyto výsledky naznačily, že kladně nabitě povrchy biomateriálů mohou mít antimikrobiální účinek jen pro gramnegativní bakterie (Gottenbosa et al., 2001).

Většina bakterií je nosičem náboje záporného. Jejich přilnavost je tedy směřována na povrchy kladně nabitě (van Loosdrecht et al., 1990).

#### 1.7.1.1 Adheze pozitivně nabitě bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*

Bakterie *Stenotromphomonas maltiphilia* je při fyziologickém pH kladně nabitá, přičemž její kladný náboj pochází zřejmě ze struktury uspořádání proteinů ve vnější membráně. Její povrchový isoelektrický bod je při pH 11. *S. maltophilia* velice dobře adheruje k negativně nabitým povrchům, jako je sklo nebo teflon. (Jucker et al., 1996) Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že bude dobře adherovat k negativně nabitým nádorovým buňkám.

Náboj na povrchu bakteriálních buněk je obvykle odvozen od jejich zeta elektrokinetického potenciálu, které je možné zjistit výpočtem bakteriální mobility v elektrickém poli (Rijnaarts, 1994).

## 1.8 *Stenotrophomonas maltophilia*

Bakterie v dnešní době známá pod názvem *Stenotrophomonas maltophilia* byla v roce 1961 začleněna do rodu *Pseudomonas* (od toho *Pseudomonas maltophilia*) (Hugh et al., 1961), později v roce 1983 do rodu *Xanthomonas* (od toho *Xanthomonas maltophilia*) a až v roce 1993 do rodu *Stenotrophomonas*, kde ji nalezneme doposud (Pinot et al., 2011).

*S. maltophilia* je gram negativní, aerobní, bičíkatá bakterie nevyvolávající fermentaci (Liu et al., 2012). Tvarem jsou bakterie rovné, až mírně zakřivené. Jednotlivé buňky jsou velké 0,5 – 1,5 μm (Denton et al., 1998). Pohyblivost je zajištěna pomocí několika polárních bičíků (Carmody et al. 2011). Mají schopnost tvořit kolonie při optimální teplotě 35°C (Denton et al., 1998). Kolonie je možné odlišit od ostatních bakteriálních kolonií poměrně dobře, díky jejich typickému vzhledu. *S. maltophilia* tvoří hladké kolonie, kulaté a zeleně zbarvené. Střed kolonie je olivově zelený, směrem k okrajům zelená barva slábne. Případně může být střed opět tmavě zelený, ale okraj do světlé modro – zelené barvy (Adjidé et al. 2010). Ke svému růstu potřebují aminokyseliny methionin a cystein (Denton et al., 1998).

Pro tento experiment je velice zásadní fakt, že *S. maltophilia* je ve fyziologickém pH pozitivně nabitá. Její pozitivní náboj je dán skladbou vnější membrány, ve které jsou přítomny proteiny. Většina bakterií má ve fyziologickém pH náboj záporný, pozitivní náboj byl kromě *S. maltophilia* nalezen pouze u *Streptococcus thermophilus*, a to jen při určitém způsobu kultivace. Její povrchový isoelektrický bod je při pH 11 (Jucker et al. 1996).

*S. maltophilia* způsobuje nozokomiální infekce, jako je zápal plic, endokarditidy, infekce centrálního nervového systému, zraku, močových cest, kostí a kloubů, kůže a měkkých tkání a gastrointestinální infekce. Občas je spojována s výskytem septického šoku u pacientů v kritickém stavu a u imunosuprimovaných pacientů. (Mehmet et al. 2011) *S. maltophilia* se vyskytuje všude kolem nás, je možné ji izolovat z vody, půdy, ale i z rostlinné tkáně (Ryan et al. 2009).

## 1.9 *Serratia marcescens*

Bakterie *Serratia marcescens* byla poprvé zaznamenána v roce 1819 v provincii Padova v Itálii, kde ji objevil lékárník Bartolomeo Bizio a pojmenoval ji podle italského fyzika jménem Serafino Serrati (Merlino 1924). V průběhu mnoha let se pojmenování této bakterie ještě několikrát změnilo, např. *Chronobacterium prodigiosum* (Gaughran 1968), 1980 došlo ke konečnému pojmenování bakterie na *Serratia marcescens* (Skerman et al. 1980).

*S. marcescens* se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jde o fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní bakterii, která nemá žádné speciální požadavky na živiny (Grimont et al. 1992). Bakterie je 0,9 – 2  $\mu\text{m}$  dlouhá, v průměru má přibližně 0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$  a je gram negativní. Tvarem je uspořádaná jako rovná tyčka se schopností pohybu díky přítomnosti bičků. (Van Houdt et al. 2007) Tyto bakterie tvoří kolonie charakteristické produkcí růžového, až červeného barviva prodigiosin, které bylo dříve používáno jako biologický indikátor (Grimont et al. 1992). Na agaru tvoří malé, kulaté a hladké kolonie s výraznou pigmentací (Alberti et al. 1990). *S. marcescens* může být kultivována v rozmezí teplot 5 – 40 °C, ovšem nejvhodnější teplota ke kultivaci je 37°C (Rjazantseva et al. 1994). *S. marcescens* se vyskytuje v životním prostředí naprosto běžně, především ve vlhkém prostředí jako je např. půda, voda, potraviny (Fox et al. 1981). Pro tento experiment je velice důležitý poznatek týkající se náboje bakteri. *S. marcescens* je záporně nabitou bakterií (Dickson et al., 1989). Její povrchový isoelektrický bod je při pH 2,5 (Van der Mei et al., 1992).

Až do roku 1950 byla *S. marcescens* považována za nepatogenní, saprofytický mikroorganismus (Wheat et al. 1951). Od roku 1960 byly hlášeny stále častější infekce způsobené touto bakterií (Dodson 1968). Šlo především o nozokomiální infekce, např. infekce močových a dýchacích cest (zápal plic) u dospělých, u dětí gastrointestinální infekce, infekce zasahující oko či rány po operačním výkonu (Hejazi et al. 1992).

## 2. Cíle práce

1. Rešerše zahrnující obecnou problematiku nádorových onemocnění.
2. Rešerše se zaměřením na terapii nádorů založenou na použití mikroorganismů.
3. Zavedení metody kultivace bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*.
4. In vivo studium vlivu bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* na melanom B16-F10.

### 3. Hypotézy

- Intratumorální aplikace bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* vyvolá redukci nádorového růstu.

Aplikování bakterií vyvolá zánět a zánětlivý infiltrát poškodí nádorové buňky.

- Díky kladnému náboji vykáže bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* lepší protinádorový účinek než srovnatelná gramnegativní bakterie *Serratia marcescens*

Aplikování stejných množství obou bakterií intratumorálně vyvolá srovnatelný zánět, přičemž v případě *S. maltophilia*, které nábojově interagují s nádorovými buňkami, se účinek buněčného infiltrátu projeví větší likvidací nádorových buněk a větší inhibicí nádorového růstu.

- Umělou instalací kladného náboje na bakterii *S. marcescens* bude dosaženo zvýšení protinádorového účinku, což bude dalším potvrzením významu náboje při použití bakterií v léčbě rakoviny.

Bakterie takto upravené budou interagovat lépe s nádorovými buňkami, což podpoří protinádorový účinek zánětlivého infiltrátu.

## 4. Metodika výzkumu

### 4.1 Chemikálie

**RPMI 1640** s 10% FCS, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky (příprava buněk) (Sigma-Aldrich)

**Fosfátem pufovaný fyziologický roztok** (PBS) (příprava buněk, proplachování)

**Trypanová modř** (počítání buněk v Bürkerově komůrce)

**Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4** purified by phenolextraction, L2630 Sigma (Sigma) (LPS)

**Oligolysin**, Mw 500-2000 (Sigma-Aldrich)

***Stenotrophomonas maltophilia*** (Hugh 1980, Palleroni and Bradbury 1993) (kmen CCM 1640 z České sbírky mikroorganismů, Brno)

***Serratia marcescens subsp. Marcescens*** (Bizio 1823) (kmen CCM 303 z České sbírky mikroorganismů, Brno)

**Krevní agar s 5% defibrinované beraní krve** (KAC, Dulab)(kultivace)

### 4.2 Experimentální zvířata

Při pokusech byly použity myši inbredního kmene C57BL/6 od Charles River Laboratories, samice. Při dodání byly myši 8 týdnů staré. Myši byly chovány ve zvěřinci na Parazitologickém ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích. Myši byly chovány s fotoperiodou 12/12, při neomezeném přístupu k vodě a standardní potravě.



### **4.3 Buněčná linie**

Při pokusech byla použita buněčná linie myšního melanomu B16-F10, které byly darem od prof. Říhové (MBÚ, Praha). Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10 % bovinním fetálním sérem, antibiotiky (Sigma-Aldrich), glutaminem a merkaptoethanolem. Kultivace buněk probíhala v termostatu při teplotě 37°C. Atmosféra termostatu byla nasycena vodními parami obsahujícími 5 % oxidu uhličitého.

### **4.4 Příprava buněk myšního melanomu B16-F10 pro *in vivo* použití**

Nejprve bylo z buněk odstraněno médium. Buňky byly propláchnuty sterilním PBS (celkem 2x). Po propláchnutí buněk pomocí PBS byla provedena trypsinizace (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS) a následně se buňky vložily na 1 – 5 min. do termostatu při 37°C. Trypsinizace byla zastavena přidáním malého množství média (RPMI 1640 s 10% FCS). V mediu byly buňky rozvolněny protahováním Pasteurovou pipetou. Centrifugací oddělené buňky byly přelity do zkumavky. Zkumavka byla doplněna RPMI 1640 s 10% FCS na objem 20 ml. Vše bylo centrifugováno (10min., 150g) a poté bylo medium vylito. Buňky byly opět rozsuspendovány v RPMI 1640 (2 – 3 ml) pomocí Pasteurovy pipety. Následně se buňky obarvily trypanovou modří a jejich počet byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky. Dle výsledného počtu buněk byla suspenze naředěna na potřebnou koncentraci.

## 4.5 Transplantace nádorových buněk B16-F10

Ve stáří 8 týdnů byly myši oholeny na pravé zadní části zad. Následně bylo pod kůži na oholené místo transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10 v 0,1ml RPMI 1640 bez séra.

## 4.6 Příprava *Stenotrophomonas maltophilia* pro injikování do nádoru

Sbírkový kmen dodaný v lyofilizované formě byl rozsuspendovaný v 1ml sterilního PBS. Materiál byl inokulován na krevní agar typu KAC (spol. Dulab). Inokulace byla provedena principem křížového roztěru pomocí mikrobiologické očkovací kličky. Kultivace probíhala 24 hodin v termostatu při teplotě 37°C. Poté byly bakteriální kolonie sklizeny do zkumavky s kónickým dnem obsahující 30ml sterilního PBS.

Po sklizení kolonií byl zjištěn počet bakterií v 1ml suspenze. Z připravené a řádně promíchané bakteriální suspenze bylo odebráno 10 µl do zkumavky s kónickým dnem. Do této zkumavky bylo přidáno 990 µl PBS a opět bylo vše promícháno. Z takto zředěné suspenze bylo odpipetováno 50 µl do mikrozkušavky. K odpipetované suspenzi bylo přidáno 50 µl trypanové modři. Pomocí trypanové modři došlo k rozlišení živých a mrtvých bakterií. Počet bakterií byl zjištěn v Bürkerově komůrce. Živá *S. maltophilia* má bílou, až průhlednou barvu a je pohyblivá. Naopak mrtvá *S. maltophilia* je tmavě modrá a není pohyblivá.

Po zjištění koncentrace byla suspenze zamražena při teplotě -70°C. Před použitím byly bakterie zabity působením UV záření po dobu 1 hodiny. Jedna terapeutická dávka obsahovala 50 µl suspenze a byla podána intra tumorálně.

## 4.7 Příprava *Serratia marcescens* pro injikování do nádoru

Sbírkový kmen dodaný v lyofilizované formě byl rozsuspendovaný v 1ml sterilního PBS. Materiál byl vyset na krevní agar typu KAC (spol. Dulab). Inokulace byla provedena pomocí mikrobiologické očkovací kličky principem křížového roztěru. Bakterie byly kultivovány po dobu 24 hodin v termostatu při stálé teplotě 37 °C. Po 24 hodinách došlo ke sterilnímu sklizení kolonií do kónické zkumavky se 30ml sterilního PBS.

Následně se určila koncentrace suspenze, čili počet bakterií v 1ml suspenze. Připravená bakteriální suspenze byla promíchána a bylo z ní odpipetováno 10 $\mu$ l suspenze. 10 $\mu$ l suspenze bylo sterilně převedeno do kónické zkumavky a bylo přidáno 990 $\mu$ l PBS. Takto vzniklá suspenze byla opět promíchána. Ze zředěné bakteriální suspenze bylo odpipetováno 50 $\mu$ l do mikrozkušavky. Pro odlišení mrtvých a živých bakterií bylo k suspenzi přidáno 50 $\mu$ l trypanové modři. Bakterie byly počítány pomocí Bürkerovy komůrky. Základní rozdíl mezi živými a mrtvými bakteriemi byl v barvě a pohyblivosti. Živá *S. marcescens* je díky bičíku pohyblivá a má bílou barvu. Mrtvá *S. marcescens* je nepohyblivá a barva je tmavě modrá.

Po spočítání byly sklizené kolonie v PBS zamrazeny při teplotě -70°C. Před prvním použitím byly bakterie zabity ozářením UV po dobu 1 hodiny. Dávka se podávala intra tumorálně v množství 50 $\mu$ l.

## 4.8 Měření velikosti nádoru

V obou pokusech byl sledován růst a objem nádorů. Nádory byly měřeny jednou za dva dny pomocí kaliperu, tím byla zjištěna velikost nádoru. Objem nádoru byl vypočítán pomocí vzorce  $V = \pi/6 AB^2$ , kde A je délka nádoru (největší rozměr nádoru) a B je výška nádoru (nejmenší rozměr nádoru) (Inaba et al., 1986).

## 4.9 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu MS Excel pomocí Studentova t-testu. Přežívání myši bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

## 4.10 Pokus č. 1: In vitro: Kultivace bakterií

### *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*

V tomto in vitro experimentu byl pro kultivaci v obou případech bakterií použit krevní agar typu KAC, obsahující 5% defibrilované beraní krve. Inokulace bakterií na KAC byla provedena pomocí sterilní mikrobiologické očkovací kličky. Kultivace trvala 24 hodin v termostatu při teplotě 37°C. Druhý den byly bakteriální kolonie sklizeny a rozsuspendovány v PBS. Počet bakterií v 1 ml byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky, kdy byl spočítán počet bakterií ve 25-ti čtvercích. Pro snazší orientaci a rozpoznatelnost bakterií byly bakterie obarveny trypanovou modří.

Podrobný popis přípravy bakterií viz. Příprava *Stenotrophomonas maltophilia* pro injikování do nádoru a Příprava *Serratia marcescens* pro injikování do nádoru.

## 4.11 Pokus č. 2: In vivo: Přirozeně metastazující melanom

### **B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií**

### *Stenotrophomonas maltophilia*

V tomto experimentu bylo použito 20 samic myši kmene C57BL/6, které byly 8 týdnů staré. Myším bylo transplantováno podkožně po 400 000 buněk melanomu

B16-F10. 12. den po transplantaci byly myši randomizovány do 4 skupin (A, B, C, K) po 5-ti myších a došlo k zahájení nádorové terapie. Myši byly dány do akvárek po jedné.

Skupina K byla kontrolní a nebyla léčena vůbec. Skupiny A, B a C byly léčeny pomocí bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* a LPS.

Skupina A – *Stenotrophomonas maltophilia*

Skupina B – *Stenotrophomonas maltophilia* + LPS

Skupina C – LPS

Skupina K – PBS (kontrola)

V tomto experimentu byla velikost nádoru měřena obden a sledována doba přežití. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí Studentova t- testu a přežívání bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier.

Schéma dávkování:

- Skupina A – obden aplikace intratumorálně 50 $\mu$ l suspenze bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*, celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10)
- Skupina B – obden aplikace intratumorálně 50 $\mu$ l suspenze bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* + LPS, celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10)
- Skupina C – obden aplikace intratumorálně 50 $\mu$ l LPS, celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10)
- Skupina K – obden aplikace intratumorálně 50 $\mu$ l PBS (kontrola), celkem 6 dávek (den 0, 2, 4, 6, 8, 10)

Příprava preparátů

- Skupina A – *Stenotrophomonas maltophilia*: připravená suspenze (410mil. bakterií *S. maltophilia*/ ml PBS) byla rozplněna do 6-ti zkumavek po 330 $\mu$ l

- Skupina B – *Stenotrophomonas maltophilia* + LPS: 2ml připravené suspenze (410mil. bakterií *S. maltophilia*/ ml PBS) bylo smícháno s 1mg LPS a rozplněno do 6-ti zkumavek po 330μl
- Skupina C – LPS: 1mg LPS byl rozpuštěn ve 2ml PBS a rozplněn do 6-ti zkumavek po 330μl
- Skupina K – PBS: 2ml PBS bylo rozplněno do 6-ti zkumavek po 330μl

#### **4.12 Pokus č. 3: In vitro: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens***

V tomto pokusu bylo použito 24 samic myši kmene C57BL/6, 8 týdnů starých. Myším bylo transplantováno 400 000 buněk melanomu B16-F10. 13. den po transplantaci byly myši randomizovány do 4 skupin (A, B, C, K) po 6-ti myších a zahájila se nádorová terapie. Myši byly dány do akvárek po jedné.

Skupina K byla kontrolní, proto jí nebyl podáván žádný typ terapie. Skupiny A, B a C byly léčeny pomocí bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*.

Skupina A – *Stenotrophomonas maltophilia*

Skupina B – *Serratia marcescens*

Skupina C – *Serratia marcescens* + oligolysin

Skupina K – PBS (kontrola)

V tomto experimentu byla velikost nádoru měřena také obden a sledována doba přežití. Stejně jako v prvním pokusu byla data statisticky vyhodnocena pomocí Studentova testu a přežívání bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier.

#### Schéma dávkování:

- Skupina A – pulzní aplikace intratumorálně 50  $\mu$ l suspenze bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*, dávkování 3 dny za sebou a poté 5 dní pauza, celkem 12 dávek (den 0,1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26)
- Skupina B – pulzní aplikace intratumorálně 50  $\mu$ l suspenze bakterií *Serratia marcescens*, dávkování 3 dny za sebou a poté 5 dní pauza, celkem 12 dávek (den 0,1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26)
- Skupina C – pulzní aplikace intratumorálně 50  $\mu$ l suspenze bakterií *Serratia marcescens* + oligolysin, dávkování 3 dny za sebou a poté 5 dní pauza, celkem 12 dávek (den 0,1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26)
- Skupina K – pulzní aplikace intratumorálně 50  $\mu$ l PBS, dávkování 3 dny za sebou a poté 5 dní pauza, celkem 12 dávek (den 0,1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26)

#### Příprava preparátů

- Skupina A – *Stenotrophomonas maltophilia*: bakterie v připravené suspenzi (*S. maltophilia* + PBS, 1 456 mil. bakterií/ml) byly zabity působením UV záření po dobu 1 hodiny, byla upravena koncentrace bakterií v suspenzi na 500 mil. bakterií/ml, suspenze byla rozplněna do 12-ti zkumavek po 400 $\mu$ l
- Skupina B – *Serratia marcescens*: bakterie v připravené suspenzi (*S. marcescens* + PBS, 1 040 mil. bakterií/ml) byly také zabity ozářením UV po dobu 1 hodiny, došlo k upravení koncentrace bakterií v suspenzi na 500 mil. bakterií/ml, suspenze byla rozplněna do 12-ti zkumavek po 400 $\mu$ l
- Skupina C – *Serratia marcescens* + oligolysin: ke 3ml připravené suspenze (*S. marcescens* + PBS, 1 000 mil. bakterií/ml) bylo přidáno 12 ml 10 mM DTT, zkumavka se suspenzí a DTT byla na 1 hodinu uložena na led a poté byla centrifugována (10 min, 10 000 G, 4°C). Ve druhé zkumavce bylo smícháno 9ml 1mM oligolysinu s 9ml 1 mM SMCC a ponecháno reagovat 1 hodinu při

pokožové teplotě. Ke zcentrifugovaným bakteriím byl přidán oligolysin + SMCC a po rozsuspendování byla provedena kultivace po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Bakteriální suspenze s přidáním oligolysin-SMCC byla opět centrifugována (10 min, 10 000 G, 4°C), supernatant byl slit, bakteriální sediment byl přidáním PBS rozsuspendován na 6ml (koncentrace 500 mil/ml) a rozplněn do 12-ti zkumavek po 400 $\mu$ l

- Skupina K – PBS (kontrola): PBS bylo rozplněno do 12-ti zkumavek po 400 $\mu$ l



## 5. Výsledky

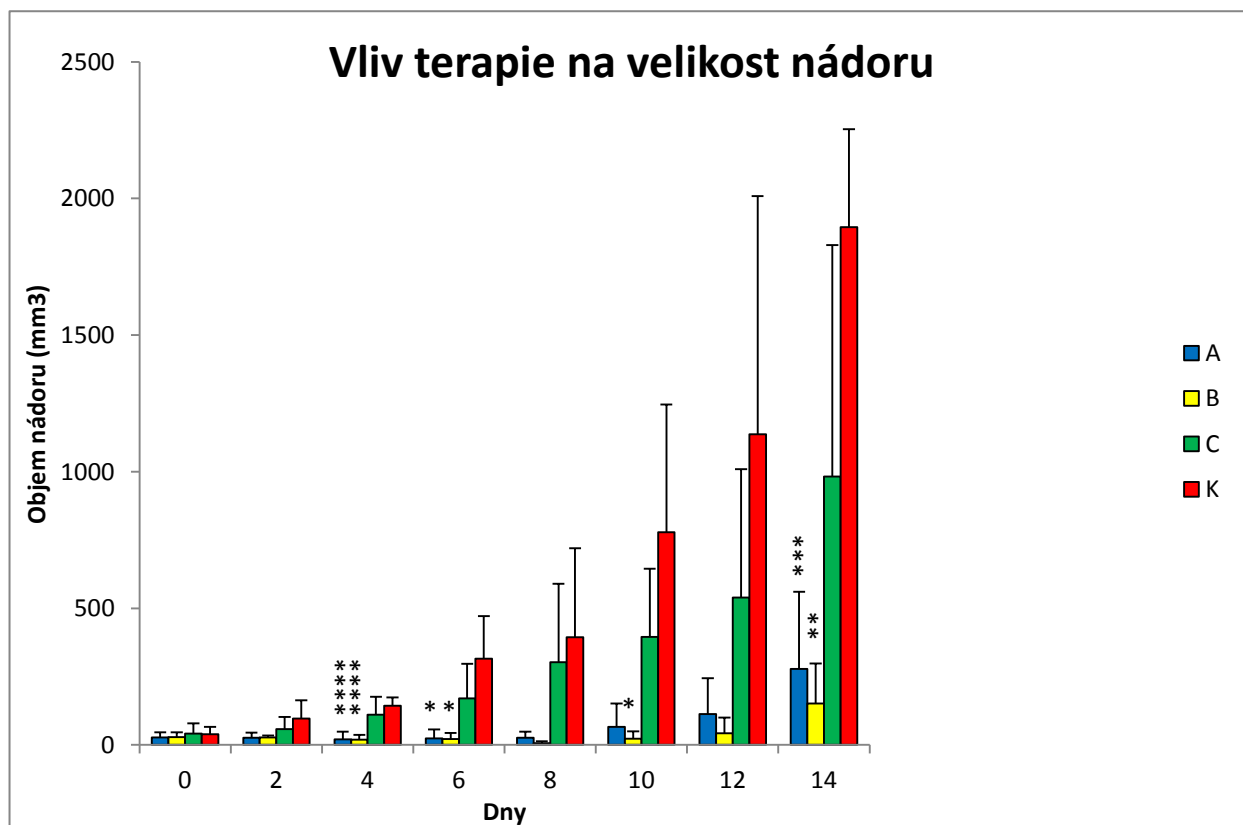
V části s výsledky je uvedeno množství a koncentrace získané bakteriální suspenze *S. maltophilia* a *S. marcescens*. V přehledných grafech je znázorněn vliv terapie na velikost nádoru, viz. Obr. 1 a Obr. 3. Grafy na Obr. 1 a Obr. 3 byly provedeny statistickým vyhodnocením pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel. Obr. 2 a Obr. 4 znázorňují vliv léčby na přežití. Grafy na Obr. 2 a Obr. 4 byly provedeny pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

### 5.1 Pokus č. 1: In vitro: Kultivace bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*

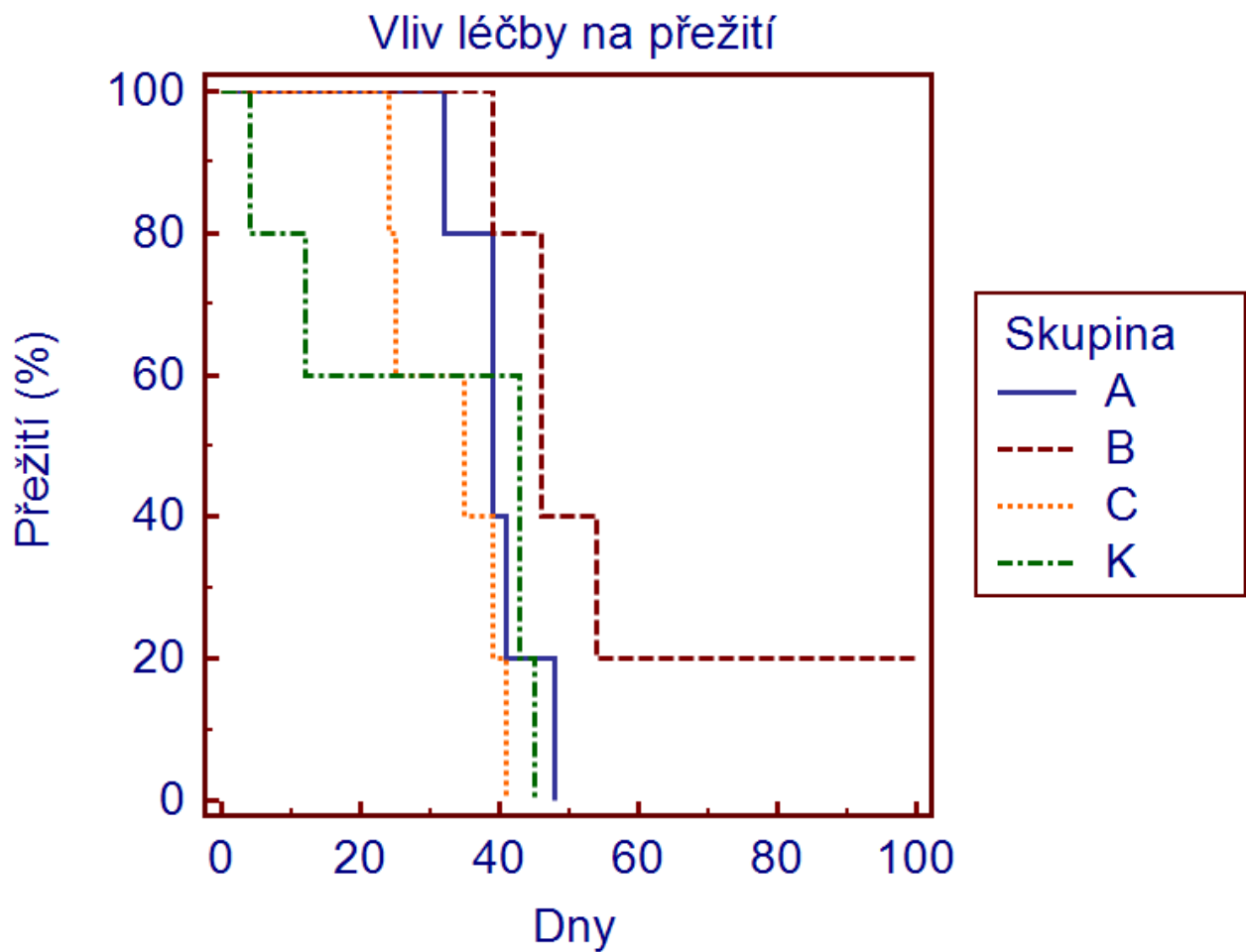
Kultivací bakterie *S. maltophilia* bylo pro pokus č. 2 získáno celkem 80ml bakteriální suspenze o koncentraci 410mil. bakterií/ml, pro pokus č. 3 bylo získáno celkem 80ml suspenze bakterií o koncentraci 1 456 mil. bakterií/ml.

Kultivací bakterie *S. marcescens* bylo pro pokus č. 3 získáno celkem 80ml suspenze bakterií o koncentraci 1 040 mil. bakterií/ml.

## 5.2 Pokus č. 2: In vivo: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*

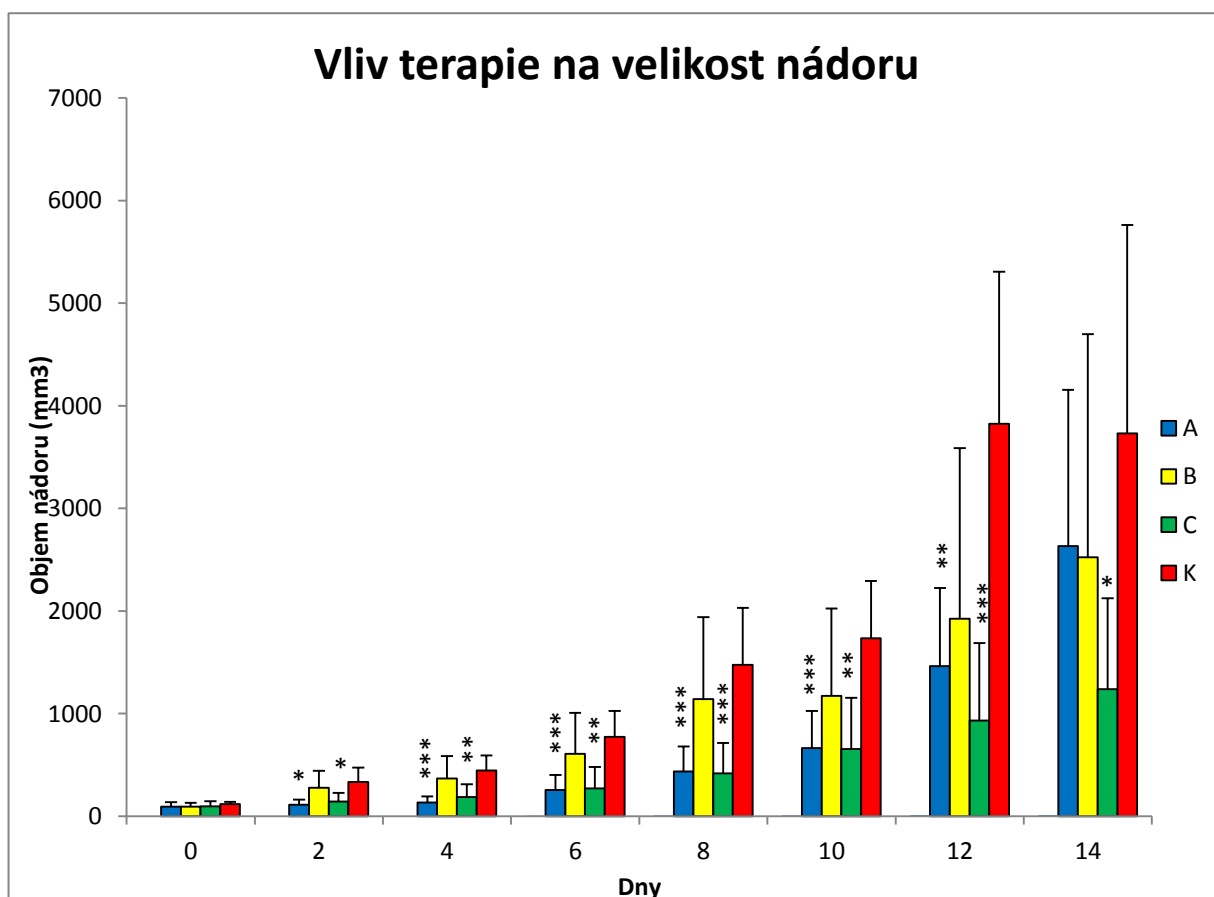


Obr. 1: Vliv terapie na velikost nádoru: Skupina A - léčená *S. maltophilia* (410mil. bakterií/ml PBS), skupina B - léčená *S. maltophilia* + LPS (410mil. bakterií + 0,5 mg LPS/ml PBS), skupina C – léčená LPS (0,5 mg/ml PBS) a skupina K je kontrolní (PBS).  
 Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou K : \* =  $P \leq 0,05$  \*\* =  $P \leq 0,01$   
 \*\*\* =  $P \leq 0,005$  \*\*\*\*\* =  $P \leq 0,001$ .



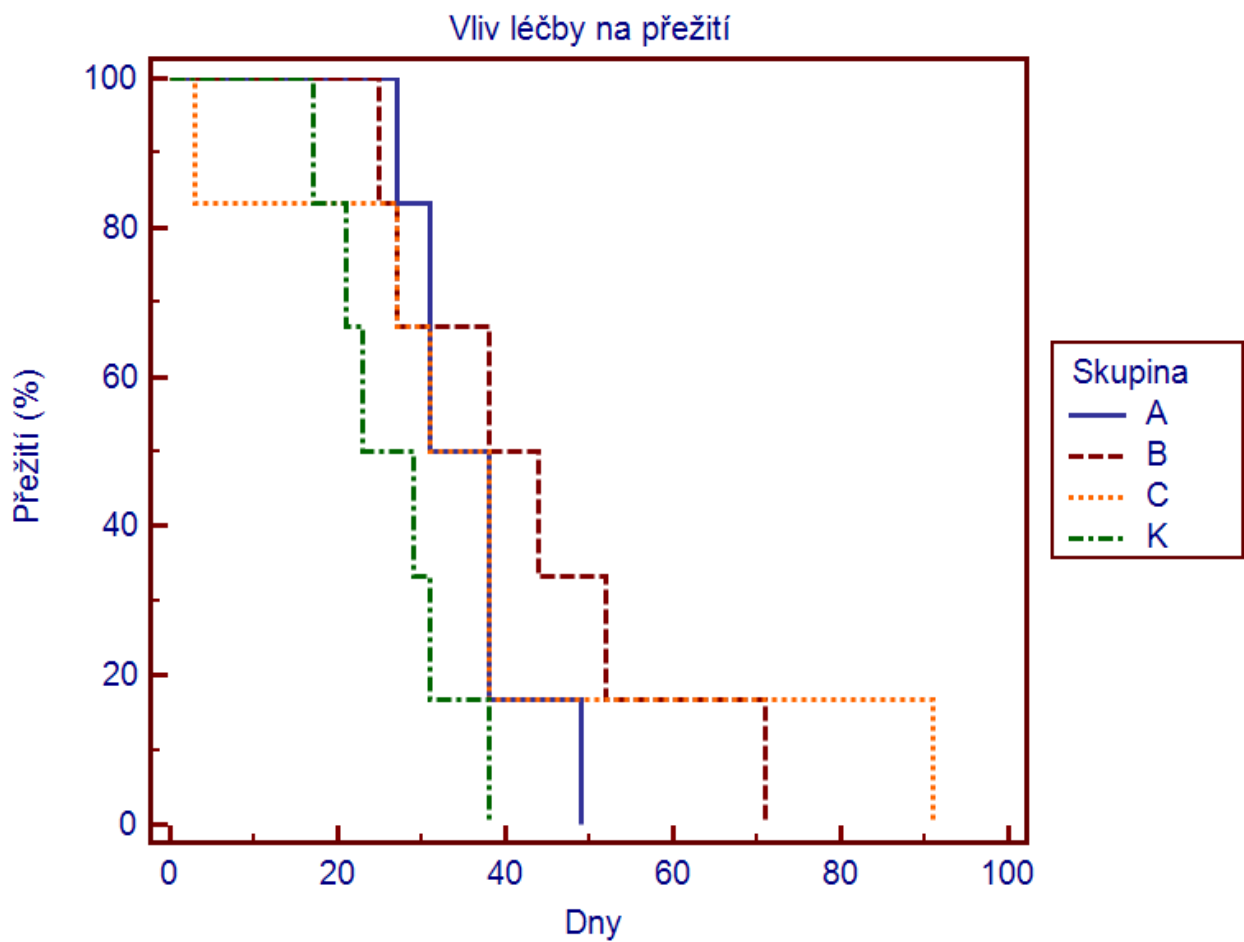
Obr. 2: Vliv léčby na přežití: Skupina A - léčená *S. maltophilia* (410 mil. bakterií/ml PBS), skupina B - léčená *S. maltophilia* + LPS ( 410mil. bakterií + 0,5 mg LPS/ml PBS), skupina C – léčená LPS (0,5 mg/ml PBS) a skupina K je kontrolní (PBS). U skupiny B bylo ve srovnání se skupinou K dosaženo statisticky významného prodloužení přežití ( $P \leq 0,05$ ).

### 5.3 Pokus č. 3: In vivo: Přirozeně metastazující melanom B16-F10 a jeho ovlivnění intratumorální aplikací bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens*



Obr. 3: Vliv terapie na velikost nádorů. Skupina A - léčená *S. maltophilia* (500 mil. bakterií/ml PBS), skupina B - léčená *S. marcescens* (500 mil. bakterií/ml PBS), skupina C – léčená *S. marcescens* + oligolysin (500 mil. bakterií/ml PBS) a skupina K je kontrolní (PBS).

Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou K : \* =  $P \leq 0,05$ , \*\* =  $P \leq 0,01$ , \*\*\* =  $P \leq 0,005$  , \*\*\*\* =  $P \leq 0,001$ .



Obr. 4: Vliv terapie na přežití. Skupina A - léčená *S. maltophilia* (500 mil. bakterií/ml PBS), skupina B - léčená *S. marcescens* (500 mil. bakterií/ml PBS), skupina C – léčená *S. marcescens* + oligolysin (500 mil. bakterií/ml PBS) a skupina K je kontrolní (PBS). Mezi skupinami nebyly detekovány statisticky významné rozdíly v přežití.

## 6. Diskuse

V prvním in vitro experimentu, ve kterém byla použita bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* byla potvrzena hypotéza příznivého vlivu intratumorální aplikace bakterie na melanom. Tato hypotéza je v souladu s tvrzeními dr. Coleyho (Coley, 1893). Sledovalo se ovlivnění růstu melanomu B16-F10 intratumorální aplikací bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* a aplikací kombinace této bakterie a LPS. *Stenotrophomonas maltophilia* působila i sama o sobě velice dobře a další přídavek LPS byl víceméně zbytečný, jelikož v bakteriální stěně se nachází LPS v dostatečném množství. Statisticky nejvýznamnější bylo měření provedené ve 4. dni terapie, kdy je zřejmé, že bakterie má na objem nádoru velký vliv. Vyhodnotila se i doba přežití jednotlivých skupin. Ve skupině, kde byla podávána směs *Stenotrophomonas maltophilia* + LPS bylo dosaženo statisticky významného prodloužení přežití a doposud žije (k 10. 8. 2013 472 dní, po zahájení terapie dne 26. 4. 2012) bez jakýchkoliv příznaků jedna myš.

Druhým in vivo experimentem byla potvrzena druhá a třetí hypotéza. A to hypotéza o vlivu náboje bakterie na velikost nádoru. Testováním bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* bylo potvrzeno, že bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* vyvolala statisticky významnou redukci nádorového růstu. Naproti tomu účinek bakterie *Serratia marcescens* byl výrazně nižší a statisticky nevýznamný. Toto zjištění bylo v souladu s hypotézou, že působení dvou gramnegativních bakterií bude ovlivněno jejich nábojem. Kladně nabité bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* více interagovaly se záporně nabitými nádorovými buňkami a navedly na ně tak imunitní odpověď. Toto tvrzení je v souladu s poznatky dr. Jucker, která potvrdila, že kladně nabitá *Stenotrophomonas maltophilia* dobře adhezuje na záporně nabitý povrch (Jucker et al., 1996). Záporný náboj nádorových buněk je dán přítomností většího množství fosfatidylserinu a kyseliny sialové (Marquez et al., 2004, Riedl et al., 2011). Jako ověření byla v souladu s třetí hypotézou použita bakterie *Serratia marcescens* + oligolysin. S pomocí kovalentně vázaného oligolysinu došlo k úpravě povrchového náboje původně negativně nabité bakterie, na bakterii s povrchovým nábojem kladným

Očekávalo se zvýšení jejich protinádorového účinku, což se potvrdilo. *Serratia marcescens* s povrchově navázaným oligolysinem vykazovala protinádorovou aktivitu jako *Stenotrophomonas maltophilia*, která má přirozeně pozitivní náboj. V druhém in vivo experimentu prodloužení přežití nebylo statisticky významné.

Ze srovnání účinku *S. maltophilia* v obou in vivo experimentech vyplývá výrazně vyšší redukce nádorového růstu v případě prvního pokusu. Vzhledem k tomu, že byly injikovány srovnatelné dávky bakterií, domníváme se, že důležitý je režim podávání. Jako lepší se jeví režim obden, nikoli pulzní.

Hlavní výsledek, a to tvrzení, že pro dobré protinádorové působení zánět vyvolávajícího přípravku je důležité zajistit jeho interakci s nádorovými buňkami, odpovídá poznatkům Kovářové, 2013 (viz níže). Kovářová použila jako prostředek proti melanomu B16-F10 intratumorální aplikaci Zymosanu A, tedy fragmentů stěny *Saccharomyces cerevisiae* kostimulovanou LPS. Kovalentní ukotvení těchto fragmentů na nádorové buňky vedlo k dramatickému zvýšení účinnosti terapie tímto biologickým přípravkem (Kovářová, 2013).

## 7. Závěr

- Byla vypracována rešerše týkající se problematiky nádorových onemocnění a jejich terapie, včetně terapie pomocí mikroorganismů.
- Prostudováním vědeckých publikací byla nalezena bakterie vykazující ve fyziologickém pH (7,34 – 7,44) kladný náboj (pI=11), a to bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* a kontrolní bakterie s negativním nábojem, tedy bakterie *Serratia marcescens*.
- Byla zavedena kultivace bakterií *S. maltophilia* a *S. marcescens*.
- Byla potvrzena hypotéza vlivu intratumorální aplikace bakterie *S. maltophilia* vedoucí k redukci nádorového růstu. Zánětlivý infiltrát poškozoval nádorové buňky a docházelo k výrazné redukci nádorového růstu. Přídavek LPS tento efekt prohloubil jen minimálně.
- Druhým in vivo experimentem se potvrdila hypotéza o rozhodující úloze náboje bakterie na redukci nádorového růstu. Navázáním kladně nabitých bakterií *S. maltophilia* na záporně nabitou nádorovou buňku došlo k nasměrování ataku zánětlivého infiltrátu na nádorové buňky, což se projevilo statisticky výraznou redukcí nádorového růstu. Účinek srovnatelného množství obdobné bakterie *S. marcescens* nesoucí však záporný náboj nebyl statisticky významný.
- Jako ověření hypotézy o rozhodující úloze pozitivního náboje při působení *S. maltophilia* byla použita bakterie *S. marcescens* s kovalentně navázaným oligolysinem, tedy látkou výrazně pozitivním nábojem. Tím byl upraven přirozeně negativní náboj *S. marcescens* na náboj pozitivní. Dle očekávání se protinádorový účinek zvýšil. Pro protinádorové působení zánět vyvolávajících biopreparátů je tedy důležité zajistit jejich interakci s nádorovými buňkami.



## 8. Seznam literatury

Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky: *Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010*. Praha 18. 3. 2013.

ADJIDÉ, C. C., DE MEYER, A., WEYER, M., OBIN, O., LAMORA, F., LESUEUR, C., TROUILLET, L., BIENDO, M., GANRY, O., EB, F. *A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for Stenotrophomonas maltophilia study in health care settings*. Pathologie Biologie. 2010, roč. 58 (1), s. 11 – 17.

ALBERT, L., HARSHEY, R. M. *Differentiation of Serratia marcescens 274 into Swimmer and Swarmer Cells*. Journal of Bacteriology. 1990, roč. 172 (8), s. 4322 - 4328.

BAJČIOVÁ, V. *Maligní melanom u dětí a adolescentů*. Onkologie. 2013, roč. 7 (2), s. 69 – 73.

BALCH, C. M., SOONG, S. J., GERSHENWALD, J. E., THOMPSON, J. F., REINTGEN, D. S., CASCINELLI, N., URIST, M., MCMASTERS, K. M., ROSS, M. I., KIRKWOOD, J. M., ATKINS, M. B., THOMPSON, J. A., COIT, D. G., BYRD, D., DESMOND, R., ZHANG, Y., LIU, P., LYMAN, G. H., MORABITO, A. *Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Point Committee on Cancer staging system*. Journal of Clinical Oncology. 2001, roč. 19 (16), s. 3622.

BECKER, H. D., Hohenberger, W., JUNGINGER, T., SCHLAG, P. M. *Chirurgická onkologie*. Grada. 2005. ISBN-10: 80-247-0720-9.

BIRON, C. A., NGUYEN, K. B., PIEN, G. C., COUSENS, L. P., SALAZAR-MATHER, T. P. *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annual Review of Immunology. 1999, roč. 7, s. 189 – 220.

BONO, A., TOMATIS, S., BARTOLI, C., TRAGNI, G., RADAELLI, G., MAURICHI, A., MARCHESINI, R. *The ABCD system of melanoma detection: a spectrophotometric analysis of the Asymmetry, Border, Color, and Dimension*. Cancer. 1999, roč. 85 (1), s. 72-77.

BORTLÍK, M., ĎURICOVÁ, D., KOHOUT, P., KONEČNÝ, M., KOŽELUHOVÁ, J., NOVOTNÝ, A., ZBOŘIL, V., PROKOPOVÁ, L., DOUDA, T., STEHLÍK, J., SHONOVÁ, O., MAREŠ, K., HRDLIČKA, L., MATĚJKOVÁ, P., ŠERCLOVÁ, Z., NEDBALOVÁ, L., TOMANOVÁ, M., LIBERDA, M., BRONSKÝ, J., MITROVÁ, K., DRASTICH, P., LUKÁŠ, M. za Pracovní skupinu IBD ČGS: *Doporučení pro podávání biologické terapie u idiopatických střevních zánětů: 2. vydání*. Gastroenterologie a hepatologie. 2012, roč. 66 (1), s. 12 – 22.

CARMODY, L. A., SPILKER, T., LIPUMA, J. J. *Reassessment of Stenotrophomonas maltophilia phenotype*. Journal of Clinical Microbiology. 2011, roč. 49 (3), s. 1101 – 1103

CHERCHI, P. L., MARRAS, V., CAPOBIANCO, G., AMBROSINI G., PIGA, M. D., FADDA, G. M., ROSAS, N., DESSOLE S. *Prognostic value of p53, c-erb-B2 and MIB-1 in endometrial carcinoma*. European Journal of Gynaecological Oncology. 2001, roč. 22 (6), s. 451-453.

COLEY, W. B. *Contribution to the Knowledge of Sarcoma*. Annals of Surgery. 1891, roč. 14 (3), s. 199 - 220.

COLEY, W. B. *The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases.* American Journal of the Medical Sciences. 1893, roč. 105 (5), s. 487 – 511.

COLEY NAUTS, H., SWIFT, W. E., COLEY, B. B. L. *The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M. D., reviewed in the light of modern research.* Cancer Research. 1946, roč. 6, s. 205-16.

CONSTANTIN, G., MAJEED, M., GIAGULLI, C., PICCIO, L., KIM, J. Y., BUTCHER, E. C., LAUDANNA, C. *Chemokine strigger immediate  $\beta$ 2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow.* Immunity. 2000, roč. 13 (6), s. 759 – 769.

CWIERTKA, K., TROJANEC, R., ŠPAČKOVÁ, K., HAJDÚCH, M. *Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii.* Klinická farmakologie a farmacie. 2004, roč. 18 (3), s. 165 – 170.

DENTON, M., KERR, K. G. *Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with Stenotrophomonas maltophilia.* Clinical Microbiology Review. 1998, roč. 11 (1), s. 57 - 80.

DEVITA, V. T. *The evolution of therapeutic research in cancer.* The New England Journal of Medicine. 1978, roč. 298 (16), s. 907 – 910.

DEVITA, V. T., CHU, E. *A History of Cancer Chemotherapy.* Cancer Research. 2008, roč. 68 (21), s. 8643-8653.

DICKSON, J. S., KOOHMARAIE, M. *Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces.* Applied and Environmental Microbiology. 1989, roč. 55 (4), s. 832 – 836.

DODSON, W. H. *Serratia marcescens septicaemia*. International Archives of Medicine. 1968, roč. 121 (2), s. 145 - 150.

DUŠEK, L., MUŽÍK, J., PAVLÍK, T., MÁJEK, O., KOPTÍKOVÁ, J. *Epidemiologie zhoubných nádorů trávicího traktu v České republice – současný stav a predikce*. Gastroenterologie a hepatologie. 2012, roč. 66 (5), s. 331 – 339.

FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell. 1990, roč. 61 (5), s. 759-767.

FIKRLÉ, T., PIZINGER, T. *Maligní melanom*. Onkologie. 2010, roč. 4 (4), s. 225 – 228.

FOON, K. A. *Biological therapy of cancer*. Breast Cancer Research and Treatment. 1986, roč. 7 (1), s. 5 – 14.

FOX, J. G., BEAUCAGE, C. M., FOLTA, C. A., THORNTON, G. W. *Nosocomial transmission of Serratia marcescens in a veterinary hospital due to contamination by benzalkonium chloride*. Journal of Clinical Microbiology. 1981, roč. 14 (2), s. 157 - 160.

FRANKS, L. M., TEICH, N. M. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, 3. vyd., 1999, 458 s.

FRENCH, A. R., YOKOYAMA, W. M. *Natural killer cells and viral infections*. Curr Current Opinion in Immunology. 2003, roč. 15 (1), s. 45– 51.

FRIEDMAN, R. J., RIGEL, D. S., KOPF, A. W. *Early detection of malignant melanoma: the role of the physician examination and self examination of the skin*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 1985, roč. 35 (3), s. 130 – 51.

GAUGHRAN, E. R. L. *From superstition to science: the history of a bacterium.* Transactions of the New York Academy of Sciences 1969, roč. 31 (1), s. 3 – 24.

GHEORGHEOSU, D., DEHELEAN, C., CRISTEA, M., MUNTEAN, D. *Development of the B16 Murine Melanoma Model.* Annals of the Romanian Society for Cell Biology. 2011, roč. 16 (2), s. 148 – 152.

GOLDBERG, M. S., DOUCETTE, J. T., LIM, H. W., SPENCER, J., CARUCCI, J. A., RIGEL, D. S. *Risk factors for presumptive melanoma in skin cancer screening: American Academy of Dermatology National Melanoma/Skin cancer screening program experience 2001–2005.* Journal of the American Academy of Dermatology. 2007, roč. 57 (1), s. 60 – 66.

GOTTENBOSA, B., GRIJPMAB, D. W., VAN DER MEIA, H. C., FEIJENB, J., BUSSCHERA, H. J. *Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001, roč. 48 (1), s. 7 - 13.

GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. D. *The genus Serratia.* The Prokaryotes. 1992, roč. 3, s. 2822 – 2848.

GUO, J., CHEN, T., WANG, B., ZHANG, M., AN, H., GUO, Z., YU, Y., QIN, Z., CAO, X. *Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine CX3CL1.* Immunology Letters. 2003, roč. 89 (1), s. 1 – 7.

HALPERIN, R., ZEHAVI, S., HABLER, L., HADAS, E., BUKOVSKY, I., SCHNEIDER, D. *Comparative immunohistochemical study of endometrioid and serous papillary carcinoma of endometrium.* European journal of gynaecological oncology. 2001, roč. 22 (2), s. 122-126.

HEARING J. V., LAW, L. W., CORTI, A., APPELLA, E., BLASI, F. *Modulation of Metastatic Potential by Cell Surface Urokinase of Murine Melanoma Cells*. *Cancer Research*. 1988, roč. 48 (5), s. 1270-1278.

HEJAZI, A., FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* 1997, roč. 46 (11), s. 903 – 912.

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha: Triton, 3. vyd., 2005. 280 s.

HUGH, R., RYSCHENKOW, E. *Pseudomonas maltophilia, an Alcaligenes-like Species*. *Journal of General Microbiology* 1961, roč. 26, s. 123 – 132.

HYNKOVÁ, L., DOLEŽALOVÁ, H. *Nežádoucí účinky radioterapie a podpůrná léčba u radioterapie nádorů hlavy a krku*. *Onkologie*. 2008, roč. 2 (2), s. 88 – 90.

INABA M., TASHIRO T., KOBAYASHI T., FUJIMOTO, S., SAKURAI, Y., MARUO, K., OHNISHI, Y., UEYAMA, Y., NOMURA, T. *Evaluation of Response Rates to Various Antitumor Agents of Human Gastric Tumors Implanted in Nude Mouse*. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1986, roč. 77 (2), s. 190-196.

JASS, J. R. *Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer*. *Journal of Clinical Pathology*. 1986, roč. 39 (6), s. 585 – 589.

JEMAL, A., BRAY, F., MELISSA, M. CENTER MPH, FERLAY, J., WARD, E., FORMAN, D. *Global cancer statistics*. 2011, roč. 61 (2), s. 69 – 90.

JUCKER, B. A., HARMS, H., ZEHNDER, J. B. *Adhesion of the Positively Charged Bacterium Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia 70401 to Glass and Teflon*. *Journal of Bacteriology*. 1996, roč. 178 (18), s. 5472 - 5479.

KIRKWOOD, J. M., KULIC, D., AVERBOOK, B. J., SENDER, L. S. *Melanoma in pediatric, adolescent and young adult patients*. *Seminars in Oncology* 2009, roč. 36 (5), s. 419 – 431.

KLEIN, J. *Chirurgická léčba rakoviny plic*. *Onkologie*. 2009, roč. 3 (5), s. 277 – 280

KLENER, P.: *Protinádorová chemoterapie pro 21. století*. *Klinická onkologie*. 2003, roč. 16 (6), s. 243 - 248.

KNUDSON, A. G., Jr. *Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes*. *Cancer Research*. 1985, roč. 45 (4), s. 1437-1443

KOVÁŘOVÁ, M. *Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu. [Study of the possibility of using anchored Zymosan A for immunotherapy of melanoma. Bc. Thesis, in Czech] – 45p., 2013*. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

LAGARDA, H., CATASUS, L., ARGUELLES, R., MATIAS - GUIU, X., PRAT, J. *K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability*. *The Journal of Pathology*. 2001, roč. 193 (2), s. 193-199.

LANGLEY, R. G. B., SOBER, A. J. *A clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma*. *Cancer Investigation*. 1997, roč. 15 (6), s. 561.

LIU, W., ZOU, D., WANG, X., LI, X., ZHU, L., YIN, Z., YANG, Z., WEI, X., HAN, L., WANG, Y., SHAO, C., WANG, S., HE, X., LIU, D., LIU, F., WANG, J., HUANG, L., YUAN, J. *Proteomic Analysis of Clinical Isolate of Stenotrophomonas maltophilia with bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>L1</sub> and bla<sub>L2</sub>  $\beta$ -Lactamase Genes under Imipenem Treatment*. *Journal of Proteome Research*. 2012, roč. 11 (8), s. 4024 – 4033.

LUKES, A. S., KOHLER, M. F., PIEPER, C. F., KERNS, B. J., BENTLEY, R., RODRIGUEZ, G. C., SOPER, J. T., CLARKE-PEARSON, D. L., BAST, R. C. Jr., BERCHUCK, A. *Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer.* Cancer. 1994, roč. 73 (9), s. 2380-2385.

LUKEŠOVÁ, Š., KOPECKÝ, O., DVOŘÁK, J., MORÁVEK, P., ŠAFRÁNEK, H., FRICHRICHOVÁ, P., HLÁVKOVÁ, D. *Význam genetických mutací a podstata poruchy angiogeneze u světlobuněčného karcinomu ledviny.* Klinická onkologie. 2006, roč. 19 (6), s. 290 –292.

MARQUEZ, M., NILSSON, S., LENNARTSSON, L., LIU, Z., TAMMELA, T., RAITANEN, M., HOLMBERG, A. R. *Charge-dependent targeting: Results in six tumor cell lines.* Anticancer Research. 2004, roč. 24 (3a), s. 1347 - 1352.

MERLINO, C. P. *Bartolomeo Bizio's letter to the most eminent priest, Angelo Bellani, concerning the phenomenon of the red-colored polenta.* Journal of Bacteriology. 1924, roč. 9 (6), s. 527 – 543.

MIAN, I. S., BRADWELL, A. R., OLSON, A. J. *Structure, function and properties of antibody binding sites.* Journal of Molecular Biology 1991, roč. 217 (1), s. 133 – 151.

MÍČKOVÁ, I., PILKA, R., LUBUŠKÝ, M., KUDELA, M.: *Molekulární prognostické faktory a patogeneze endometriálního karcinomu.* Česká gynekologie. 2006, roč. 71 (4), s. 355-360.

MILLER, A. B., HOOGSTRATEN, B., STAQUET, M., WINKLER, A. *Reporting Results of Cancer Treatment.* Cancer. 1981, roč. 47 (1), s. 207 - 47214.

MOULLIN, C. M. *The Treatment of Sarcoma and Carcinoma by Injections of Mixed Toxins.* London: JohnBale, Sons & Danielsson, 1898. 66 s.



PARADELA, S., FONCESA, E., PIT-FERNANDÉZ, S., KANTROW, S. M., DIWAN, A. H., HERZOG, C., PRIETO, V. G. *Prognostic factors for melanoma in children and adolescents*. *Cancer*. 2010, roč. 116 (18), s. 4334 – 4344.

PAWELEK, J. M., LOW, K. B., BERMUDEZ, D. *Tumor – targeted Salmonella as a novel anticancer vector*. *Cancer Research*. 1997, roč. 57 (20), s. 4537 - 4544.

PETRUŽELKA, L. *Pohled na vývoj onkologie ve 3. tisíciletí*. *Klinická onkologie*. 2009, roč. 22 (5), s. 243 – 244.

PINOT, C., DEREDJIAN, A., NAZARET, S., BROTHIER, E., COURNOYER, B., SEGONDS, C., FAVRE-BONTE, S. *Identification of Stenotrophomonas maltophilia strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, roč. 111 (5), s. 1185 – 1193.

PIZINGER, K. *Kožní pigmentové projevy*. Praha: Grada, 2003. 124 s.

PIZINGER, K., FIKRLE, T. *Stanovení významu některých rizikových faktorů při vzniku maligního melanomu*. Závěrečná zpráva grantového projektu IGA MZ ČR: NR8790-3, 2006 –2008.

PRESS, O. W., LEONARD, J. P., COIFFIER, B., LEVY, R., TIMMERMA, J. *Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas*. *Hematology*. American Society of Hematology Education Program. 2001, s. 221 – 240.

RÉGUERRE, Y., AFRIK, M. F., FRAITAG, S., BODEMER, C. *Melanoma in children: diagnosis and treatment specificities*. *Bull Cancer*. 2012, roč. 99 (9), s. 881 – 888.

RIDGE, J. P., DI ROSA, F., MATZINGER, P. *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4 + T-helper and a T-killer cell*. *Nature*. 1998, roč. 393 (6684), s. 474 - 478.

RIEDL, S., RINNER, B., ASSLABER, M., SCHAIDER, H., WALZER, S., NOVAK, A., LOHNER, K., ZWEYTICK, D. *In search of novel target – Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy.* Biochimica et Biophysica Acta. 2011, roč. 1808 (11), s. 2638 - 2645.

RIJNAARTS, H. H. M. Interaction between bacteria and solid surfaces in relation to bacterial transport in porous media. Ph.D. thesis – 154p., 1994. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

RJAZANTSEVA, I. N., ANDREEVA, I. N., OGORODNIKOVA, T. I. *Effect of various growth conditions on pigmentation of Serratia marcescens.* Microbios. 1994, roč. 79 (320), s. 155 - 161.

ROESCH, A., VOLKENANDT, M. *Melanoma.* V publikaci: Braun-Falco' Dermatology. 3rd Edition, Heidelberg: Springer, 2009, s. 1416–1432.

ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie. Díl II - Molekulární biologie eukaryot.* Brno: S. Rosypal, 3. Vyd, 2000. 300 s.

ROT, A., VON ANDRIAN, U. H. *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells.* Annual Review of Immunology. 2004, roč. 22, s. 891 – 928.

RUTKOWSKI, M. J., SUGHRUE, M. E., KANE, A. J. et al. *Cancer and the complement cascade.* Molecular Cancer Research. 2010, roč. 8 (11), s. 1453 – 1465.

SATO, E., OLSON, S. H., AHN, J., BUNDY, B., NISHIKAWA, H., QIAN, F., JUNGBLUTH, A. A., FROSINA, D., GNJATIC, S., AMBROSONE, C., KEPNER, J., ODUNSI, T., RITTER, G., LELE, S., CHEN, Y. T., OHTANI, H., OLD, L. J., ODUNSI, K. *Intraepithelial CD8 + tumor -infiltrating lymphocytes and a high CD8+/- regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.*

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005, roč. 102 (51), s. 18538 – 18543.

SCHREIBER, H. *Tumor immunology*. V publikaci: *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, 3. Vyd., 1993, s. 1143–1178.

SHOCKLEY, T. R., LIN, K., NAGY, J. A., TOMPKINS, R. G., DVORAK, H. F., YARMUSH, M. L. *Penetration of tumor tissue by antibodies and other immunoproteins*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991, roč. 618 (1), s. 367 – 382.

SHWARTZMAN, G. *The Phenomenon of Local Tissue Reactivity and Its Immunological, Pathological and Clinical Significance*. New York: Paul E. Hoeber, Inc., 1937. 461 s.

SKÁLA, B. *Problematika základní prevence a screeningu nádorových onemocnění v praxi praktického lékaře*. *Onkologie*. 2009, roč. 3 (6), S. 365 – 368.

SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V., SNEATH, P. H. A. *Approved lists of bacterial names*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1980, roč. 30 (1), s. 225 – 420.

SRIVASTAVA, P. K., OLD, L. J. *Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors*. *Immunology Today*. 1988, roč. 9 (3), s. 78-83.

SUDHAKAR, A. *History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods*. *Journal of Cancer Science & Therapy* 2009, roč. 1 (2), s. 1 – 4.

SUKHAN, A. *The invasion – associated type III secretion system of Salmonella typhimurium: common and unique features*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000, roč. 57 (7), s. 1033 - 1049.

TAUB, D. D. *Natural killer cell-chemokine interactions. Biologic effects on natural killer cell trafficking and cytotoxicity.* V publikaci: Rollins, B. J. Chemokines and cancer. Totowa: Humana Press Inc. 1999. s. 73– 93.

TUCKER, M. A., HALPERN, A., HOLLY, E. A., HARTAGE, P., ELDER, D. E., SAGEBIEL, R. W., GUERRY, D., CLARK, W. H. Jr. *Clinically recognized dysplastic nevi: A central risk factor for cutaneous melanoma.* The Journal of the American Medical Association. 1997, roč. 277 (18), s. 1439 – 1444.

THAMM, D. H., KURZMAN, I. D., KING, I., LI, Z., SZNOL, M., DUBIELZIG, R. R., VAIL, D. M., MACEWEN, E. G. *Systemic Administration of an Attenuated, Tumor – Targeting Salmonella typhimurium to Dogs with Spontaneous Neoplasia: Phase I Evaluation.* Clinical Cancer Research 2005, roč. 11 (13), s. 4827 - 4834.

VAN DER MEI, H. C., COWAN, M. M., GENET, M. J., ROUXHET, P. G., BUSSCHER, H. J. *Structural and physicochemical surface properties of Serratia marcescens strains.* Canadian Journal of Microbiology. 1992, roč. 38 (10), s. 1033 – 1041.

VAN DEVENTER, H. W., SERODY, J. S., MCKINNON, K. P., CLEMENTS, C., BRICKEY, W. J., TING, J. P. *Transfection of macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  into B16,F10 melanoma cells inhibits growth of pulmonary metastases but not subcutaneous tumors.* The Journal of Immunology 2002, roč. 169 (3), s. 1634 – 1639.

VAN HOUDT, R., GIVSKOV, M., MICHIELS, C. W. *Quorum sensing in Serratia.* FEMS Microbiology Reviews. 2007, roč. 31 (4), s. 407 - 424.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M., LYKLEMA, J., NORDE, W., ZEHNDER, A. J. B. *Influence of interfaces on microbial activity.* Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1990, roč. 54 (1), s. 75 87.

VODIČKA, I. *Biofyzikální základy radioterapie zhoubných nádorů*. Acta Medica (Hradec Králové) SUPPLEMENTUM. 1998, roč. 41 (2), s. 105 - 163.

WHEAT, R. P., ZUCKERMAN, A., RANK, L. A. *Infection due to Chromobacteria: report of eleven cases*. Archives of Internal Medicine. 1951, roč. 88 (4), s. 461 - 466.

WYANT, T. L., TANNER, M. K., SZTEIN, M. B. *Salmonella typhi flagella are potent inducers of pro inflammatory cytokine secretion by human monocytes*. Infection and Immunity. 1999, roč. 67 (7), s. 3619 - 3624.

ZHANG, L., CONEJO-GARCIA, J. R., KATSAROS, D., GIMOTTY, P. A., MASSOBRIO, M., REGNANI, G., MAKRIGIANNAKIS, A., GRAY, H., SCHLIENGER, K., LIEBMAN, M. N., RUBIN, S. C., COUKOS, G. *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. The New England Journal of Medicine. 2003, roč. 348 (3), s. 203 – 213.

## 9. Klíčová slova

Rakovina

Melanom

Terapie nádorových onemocnění

*Stenotrophomonas maltophilia*

*Serratia marcescens*

## Key words

Cancer

Melanoma

Cancer Therapy

*Stenotrophomonas maltophilia*

*Serratia marcescens*