



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zdravotně sociální
Ústav laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví

Bakalářská práce

Použití formylmethioninových derivátů pro imunoterapii
nádorových onemocnění (Model melanom B16-F10)

Vypracovala: Zuzana Vlčková
Vedoucí práce: Jan Ženka, RNDr. CSc.

České Budějovice 2016

Abstrakt

Nádorová onemocnění a možnosti jejich terapie patří k jednomu z nejdiskutovanějších problémů současnosti. Jedná se o jednu z nejvíce rozšířených civilizačních chorob. Je odhadováno, že vnější faktory způsobují vznik až 75% všech nádorových onemocnění. Mezi nejvlivnější zevní faktory patří nesprávný a hektický životní styl, obezita, špatné stravovací návyky, kouření, nadměrné užívání alkoholu, sexuální chování a špatné návyky vůči preventivním prohlídkám a stále se zvyšující věk populace.

Největším problémem je výskyt maligních nádorů, které jsou často diagnostikovány příliš pozdě, a tudíž se přistupuje k agresivní terapii, která bohužel velmi často nenávratně poškodí zdraví pacienta. Moderní medicína se stále snaží najít nové směry v možnostech léčby. Jedním z nich je i léčba nádorů pomocí cílené imunoterapie s použitím přirozeně se vyskytujících látek. Hlavním cílem této bakalářské práce je popsat a ověřit možnost léčby maligního melanomu pomocí formylmethioninových derivátů. Bakalářská práce má část teoretickou, která je zaměřena na popsání problematiky nádorových onemocnění, jejich vzniku, klasifikace se zaměřením na kožní nádory, diagnostiky a možnosti terapie se zaměřením na imunoterapii pomocí vrozené imunity.

V praktické části je popsána kultivace buněčné linie nádorových buněk melanomu B16-F10 pro *in vivo* pokusy a jejich transplantace syngenním myším kmene C57BL/6 od Charles River Laboratories. Buňky melanomu B16-F10 byly v množství 400 000/myš transplantovány myším, které byly 8 týdnů staré a vážily 18-20 g. Dále je zde popsána metodika měření velikosti nádorů a porovnávání jejich teplot s teplotou těla.

Při prvním experimentu jsem došla k výsledku, že terapie nádoru B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF-(K)12 motivu nefunguje, protože nevyvolává fagocytární atak. Při druhém experimentu jsem zjistila, že terapie nádoru B16-F10 pomocí samotného 3mM f-MLF nefunguje, protože bez kombinace s LPS nevyvolává redukci nádorů. Ve třetím pokusu jsem použila f-MLF motiv kotvený pomocí

lipofilního řetězce s kyselinou stearovou v kombinaci s LPS i samostatně. Zde došlo k téměř úplné přechodné eliminaci nádorů, avšak po ukončení terapie téměř okamžitě došlo k nádorovému bujení. Myš léčená touto látkou přežila oproti myším z kontrolní skupiny o 52 dní.

Díky experimentům provedeným v bakalářské práci došlo k významnému zjištění, že kotvení formylmethionioných peptidů na nádorové buňky má pozitivní účinek na zmenšení objemu nádorů v úspěšné imunoterapii.

Klíčová slova: rakovina, maligní nádor, LPS, formylmethioninové deriváty, přežití

Abstract

Cancerous diseases and alternatives of their therapy belong to one of the most discussed issues of present day. Cancer is one of the most common lifestyle diseases. It is estimated that external factors cause the origin of 75 % of all cancerous diseases. The most influential external factors are hectic lifestyle, obesity, wrong eating habits, smoking, excess of alcohol intake, inappropriate sexual behaviour and negative approach to preventive check-ups and at last the permanently increasing lifespan of the population.

The most serious problem is the occurrence of malignant tumors that are diagnosed so late. Therefore, the aggressive therapy is often the choice of treatment. But this kind of therapy often irretrievably damage the health of the patient. Modern medicine tries to find some new ways of cancer therapy. One of them is treatment of tumors by targeted immunotherapy using the naturally occurring matters.

The main aim of this bachelor thesis is to describe and verify the possibility of treatment of malignant melanoma by formylmethionin derivates. The bachelor theses consists of two parts. Theoretical part is focused on describing the issue of cancerous diseases, tumor formation and classification. It focuses on tumors of skin, their diagnostics and possibilities of the therapy, especially of the immunotherapy by innate immunity activation.

In experimental part of thesis is described the cultivation of melanoma cell line B16-F10 for in vitro experiments and the transplantation of cells into syngeneic mice strain C57BL/6 from Charles River Laboratories. Melanoma cells B16-F10 in the number of 400 000 cells were transplanted to 8 weeks old mice, which had a weight of 18 - 20 grams. The methods of measuring tumor size and comparing tumor temperature versus mouse body temperature is also described.

The result of the first experiment concludes, that therapy of B16--F10 tumor by f-MLF-(K)12 motif bound by charge do not work, because it does not cause phagocytic attack. In second experiment it was found out that B16-F10 tumor therapy by 3mM f-MLF alone does not work, because it does not cause tumor reduction without the LPS in

combination. In the third experiment f-MLF motif was used. It was anchored by lipophilic chain with stearic acid, it was used alone or in combination with LPS. In this experiment the complete temporary elimination of tumors occurred, but after therapy termination the tumor growth appeared almost immediately. The mouse treated by this compound survive for more than 52 days than control mice.

Due to experiments performed in this bachelor thesis was found out, that anchoring of formylmethionin peptides to tumor cell have positive effect to decrease of tumor volume in successful immunotherapy.

Keyword: cancer, malignant tumor, LPS, formylmethionin derivates, survival

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) 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 15.8.2016

.....

Zuzana Vlčková

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho ochotu při vedení této bakalářské práce a za všechny čas, který s námi trávil během příprav a sledování jednotlivých pokusů. Velké poděkování též patří pracovníkům Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za pomoc při péči o zvěřinec. A v neposlední řadě děkuji své rodině a hlavně své sestře, která mi byla během studia a vyhodnocování výsledků velkou oporou.

Obsah:

Seznam použitých zkratk.....	10
Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	12
1.1. Nádorová onemocnění.....	12
1.1.1. Příčina a vznik nádorových onemocnění.....	12
1.1.2. Základní klasifikace nádorů a její terminologie.....	14
1.1.3. Kožní nádory.....	15
1.1.3.1. Melanom a jeho diagnostika.....	15
1.1.3.2 Melanom B16-F10.....	16
1.2 Léčba nádorových onemocnění a jejich diagnostika.....	16
1.2.1 Primární diagnostika.....	16
1.2.2 Laboratorní diagnostika.....	17
1.2.2.1 Nádorové markery.....	17
1.2.2.2 Nádorové antigeny.....	18
1.2.3 Léčba nádorových onemocnění.....	19
Chirurgická terapie.....	19
Chemoterapie.....	20
Radioterapie.....	20
Bioterapie.....	21
Paliativní medicína.....	22
1.3 Vrozená imunita.....	25
1.3.1 PRRs.....	25
1.3.1.1 Sekretované.....	25
1.3.1.2 Endocytární.....	26
1.3.1.3 Signální.....	26
1.3.2 Formylpeptidové receptory a N-formylpetidové receptory (FPRs).....	29
1.3.2.1 Lidské FPRs a jejich agonisté.....	29
FPR1.....	29
FPR2.....	29

FPR3.....	30
1.3.2.2 Myší FPRs a jejich agonisté	30
FPR1.....	30
FPR2.....	30
FPR-rs1	30
2. Cíle práce.....	31
3. Experimentální část.....	32
3.1. Chemikálie.....	32
3.2 Nádorová buněčná linie	32
3.3 Experimentální laboratorní zvířata	32
3.4 Metoda přípravy kultivace nádorových buněk melanomu B16-F10 pro in vivo pokusy ..	33
3.5 Metoda transplantace nádorových buněk syngenním myším.....	33
3.6 Měření teploty nádorů.....	33
3.7 Měření objemu nádorů.....	34
3.8 Vyhodnocení dat	34
3.9 Příprava roztoků.....	34
3.10 Pokusy	36
4. Výsledky	39
4.1 Pokus č. 1: Terapie melanomu B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF (K)12 motivu	40
4.2 Pokus č.2: Nádorová terapie pomocí f-MLF samotného a v kombinaci s LPS	43
4.3 Pokus č.3: Nádorová terapie pomocí použití nízkých koncentrací f-MLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce	46
5. Diskuze	54
6. Závěr.....	56
7. Použitá literatura.....	57

Seznam použitých zkratek

PAMPs – (z angl. *pathogen-associated molecular patterns*) jsou molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenních (mikro)organismů

PRRs – (z angl. *pattern recognition receptors*) membránové receptory

TLRs – (z angl. *Toll-like receptors*) membránové receptory savců

EBV – Epstein-Barrové virus

WHO – (z angl. *World Health Organisation*) světová zdravotnická organizace

CEA – (z angl. *carcinoembryonic antigen*) karcinoembryonální antigen

hCG – (z angl. *human chorionic gonadotropin*) lidský chorionový gonadotropin

PSA – (z angl. *prostatic systematic antigen*) prostatický systematický antigen

MHC – (z angl. *major histocompatibility komplex*) hlavní histokompatibilní komplex

NK buňky – (z angl. *natural killer cells*) – přirození zabíječi

DAMPs – (z angl. *damage (danger)-associated molecular patterns*) - molekuly, které iniciují a zároveň udržují neinfekční zánětlivou odpověď

CRP – (z angl. *c-reactive protein*) – C-reaktivní protein

MBL – (z angl. *mannose-binding lectin*) – manosu vážící lektin

FPRs – (z angl. *formyl-methionin receptors*) - formylpeptidové receptory

ATCC – (z angl. *American Type Culture Collection*)

Úvod

Rakovina se v současnosti řadí k jednomu z nejzávažnějších a nejnebezpečnějších onemocnění, jejichž výskyt se stále zvyšuje. Oproti jiným nemocem však není terapie tak účinná, jak by se současnými vědeckými pokroky měla být. Na vině je i fakt, že s prodlužujícím se věkem a pohodlím života rapidně stoupá počet nádorových onemocnění, která jsou způsobena vnějšími faktory, případně tyto faktory ke vzniku rakoviny výrazně přispívají.

Maligní onemocnění není v současnosti nijak vzácné. V průběhu života onemocní maligním nádorem každý třetí člověk v České Republice a každý čtvrtý na tuto chorobu zemře. Nehledě na to, že nemalé procento vyléčených prodělá později relaps. Maligní nádory jsou nebezpečné právě proto, že ve spoustě případů jsou diagnostikovány v pokročilém stádiu, často již neléčitelném.

Klasická chirurgie a radioterapie na vyřešení problému v současnosti již nestačí a tak věda stále hledá nové směry v možnostech léčby. Jedním z nich je i léčba maligních nádorů pomocí imunoterapie. Toto je směr, kterým se zabývám ve své bakalářské práci a svém výzkumu. Jednou z možností je stimulace vrozené imunity pomocí molekulárních motivů, které rozpoznávají specifické struktury vyskytující se na určitých skupinách patogenů. Tuto skupinu molekulárních motivů označujeme jako PAMPs (pathogen associated molecular partners) a receptory, které jsou schopny rozpoznávat jako PRRs (pattern recognition receptors). Pomocí ukotvení formylpeptidových receptorů na PRRs by bylo možné injikovat v budoucnosti terapii cíleně, bez poškozování okolní tkáně a organismu.

Cílem mé bakalářské práce je studium významu ukotvení různých formylmethioninových peptidů na nádorové buňky pro úspěšnou imunoterapii a řešení otázky synergie této terapie se současnou stimulací TLR receptorů.

1. Teoretická část

1.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou souborným názvem pro velkou různorodou skupinou onemocnění, při kterém dochází k netytickému dělení buněk určitého typu tkáně (Siegel a kol. 2013). Nárůst těchto onemocnění každým rokem rapidně nabývá, a to jak v České Republice, tak i ve světě (Zámečník 2002). Maligní onemocnění není v současnosti nijak vzácné. V průběhu života onemocní maligním nádorem každý třetí člověk v ČR a každý čtvrtý na tuto chorobu zemře. Od roku 1976 jsou v ČR zhoubné novotvary a novotvary in situ povinně hlášeny do Národního onkologického registru. V roce 2005 bylo do Národního onkologického registru ČR nově nahlášeno celkem 71 449 nových případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ (Úzis 2007). V roce 2009 to bylo 78 846 případů (Úzis 2012) a v roce 2011 83 581 případů. (Úzis 2014).

Největším problémovým typem nádorových onemocnění jsou zhoubné novotvary (Fidler 1990), které velmi často metastazují (Pecorino 2012). Ačkoliv za několik posledních let výzkum, chirurgické ošetření a účinnost preparátů pro léčbu zhoubných novotvarů stoupá, stále se u spousty druhů rakoviny nedaří najít účinné léčebné postupy, které by zároveň byly šetrné a neinvazivní.

1.1.1. Příčina a vznik nádorových onemocnění

Faktory vyvolávající národové bujení dělíme na dvě skupiny, faktory zevní a faktory vnitřní (Adam 2004).

Je odhadováno, že celkově vnější faktory způsobují vznik 75% (dle některých studií až 87%) všech nádorových onemocnění (Montesano 2001, Heath 2001). (Viz Tab.I)

Mezi nejvlivnější specifické zevní faktory patří užívání tabákových výrobků, obezita a s ní spojené stravovací návyky a reprodukční faktory (sexuální chování) (Heath 2001). Dále k malignímu bujení dochází díky biologickým (virová onemocnění – hepatitidy, EBV), chemickým (vliv karcinogenních látek – benzen, azbest, isopropanol, formaldehyd, dioxiny) a fyzikálním činitelům (ionizující a UV záření) (Klener a kol. 1996).

Tab.I: Podíl nádorové mortality, přisuzovaný vlivu specifických faktorů dle různých pramenů.

Faktor	Podíl jednotlivých zevních příčin na nádorové mortalitě (%)		
	Montesano, 2011	Doll, 1981	Heath, 2001
lékařské procedury	1	0,5-3	1
tabák	30	25-40	0,2-5
strava a výživa, včetně obezity	35	10-70	25-40
alkohol	5	2-4	20-60
nízká pohybová aktivita	5	nehodnoceno	2-4
infekce	5	1-20	nehodnoceno
profesionální expozice	35	2-8	2-8
reprodukční faktory (sexuální chování)	3	1-13	nehodnoceno
ionizující UV záření	2	nehodnoceno	1-13
znečištění životního prostředí	2	1-5	1-5
geografické vlivy	nehodnoceno	2-4	nehodnoceno
přírodní fyzikální vlivy	nehodnoceno	nehodnoceno	2-4
potravinářská aditiva	nehodnoceno	nehodnoceno	0,2-5

Faktory vnitřní, genetického původu, tvoří 20-30% všech nádorových onemocnění. Každé nádorové bujení je způsobeno změnami na genetické úrovni, V ČR je ročně diagnostikováno více jak 40 000 nových pacientů. 5-10% nádorů je hereditálního původu. Podstatou zvýšené predispozice k tvorbě nádorů je mutace alely určitého genu, které poškozují její správnou funkci. Pro normální funkci buňky během dělení jsou důležité tyto geny, které ovlivňují buněčný cyklus a opravy chyb DNA, jedná se o protoonkogeny, nádorové supresorové geny a DNA reparační geny. Mutace v těchto genech způsobují bujení sporadických i dědičných forem nádorových

onemocnění. Vznik nádorového bujení je mnohastupňovitý proces kumulace mutačních změn genů (Adam 2002).

V průběhu vývoje zhoubných novotvarů dochází ke vzniku dalších mutací a metastazování, což je důvodem, proč se nádor chová ke konci života pacienta agresivněji a proč často nereaguje na léčbu.

1.1.2. Základní klasifikace nádorů a její terminologie

Nádory lze dělit z několika různých hledisek. Jedním z nich je dělení na nádory nepravé a pravé. Nepravý nádor je místně ohraničené zvětšení objemu tkáňových struktur s růstem mimo hranice tkáně, ve které vznikl a se sklonem k šíření do okolí. Je zjistitelný makroskopicky a patří mezi ně některá patogenicky různorodá zduření vyvolaná otokem či zánětem, poruchy embryonálního vývoje či cysty (Rejthar 2002).

Pravý nádor dělíme na nádory maligní (zhoubné) a benigní (nezhoubné). Benigní nádory nemají buněčný povrch oproti jiným proliferačním buňkám výrazně pozměněn, a proto je jejich růst spíše expanzivní, bez většího porušení okolních tkáňových struktur. Často jsou lokálně ohraničené, a na okolí působí většinou tlakem. Maligní nádory rostou vůči okolní tkáni agresivně a invazivně a jsou schopny metastazování. Jsou nepřesně ohraničené a chirurgicky obtížně odstranitelné. Změny na povrchu buněk způsobují, že je pro imunitní systém obtížné tyto buňky samovolně odstranit z organismu (Stříteský 2001).

Z histologického hlediska je platná klasifikace nádorů dle Vichrova na 5 základních kategorií, které v současnosti využívá WHO.

- epitelové
- mezenchymové
- hematopoetické
- nádory s víceliniovou proliferací (zárodečné nádory, teratomy)
- neklasifikované nádory a zvláštní formy (Adam 2004)

1.1.3. Kožní nádory

Kožní nádory patří mezi jedny z nejčastějších nádorů vůbec a jejich incidence stoupá navzdory tomu, že jim lze vhodnou prevencí předcházet. Vždyť kde jinde můžete zpozorovat změnu tkáně pouhým okem?

Celá řada kožních nádorů patří k benigním, které jsou snadno chirurgicky odstranitelné a neohrožují lidský život. Obvykle rostou pomalu, jsou ohraničené, oproti okolí i spodně jsou pohyblivé, nerozpadávají se, nemetastazují. V histologické stavbě se příliš neliší od původní tkáně. Některé nádory jsou biologickou povahou maligní, a včasná diagnóza v těchto případech hraje klíčovou roli. Přesnou diagnózu povahy nádoru lze stanovit pouze histologickým vyšetřením. Maligní nádory rostou rychleji, metastazují, někdy krvácejí. Histologická stavba se výrazně mění od původní tkáně (Krajsová 2000).

Mezi nejčastější maligní kožní nádory patří bazocelulární a spinocelulární karcinom.

V ČR bylo v roce 1989 nahlášeno 7 039 zhoubných novotvarů kůže. V roce 1998 11 081. V roce 2008 97 554 a čísla stále rostou.

1.1.3.1. Melanom a jeho diagnostika

Maligní melanom tvoří asi jen 4% všech kožních nádorů, ale způsobuje 2/3 úmrtí na kožní nádory (Bandarchi a kol. 2010).

Maligní melanom je neuroektodermální nádor, vznikající z melanocytů (Clarc a kol. 1969). Může tedy vzniknout v kterékoli tkáni, nejčastěji se však vyskytuje na kůži, dále může vzniknout v oku a vzácně na sliznici. U velké části případů se bohužel objeví metastázy v lymfatických uzlinách bez nálezu primárního ložiska na kůži (Hercogová 2007).

Kožní maligní melanom se stává kosmopolitním problémem. V současné době se jedná o typ nádoru s nejrychlejším vzestupem incidence. Velký podíl na tomto má stále se zvyšující záliba ve slunění během letních měsíců. Incidence melanomu je závislá na geografické poloze a typu kůže obyvatel. Mezi nejrizikovější skupiny patří běloši severního typu žijící v zemích s intenzivním slunečním svitem, tj. Nový Zéland,

USA a Austrálie. V poslední době se připojuje i severní Evropa. Např. v USA je incidence 30-50/100 000 (Adam 2002).

Z hlediska včasné diagnostiky mezi ohrožené osoby tedy patří jedinci starší 20 let (preventivní vyšetření každé 3 roky) a osoby ve věku 40 let (preventivní vyšetření každý rok) bílé rasy, světlé pleti a osoby, které si jsou vědomi přítomnosti pigmentových ložisek (dysplastické a atypické névy) (Fakan 2005). Screening kožních nádorů celého pacientova těla trvá pouze 3-5 minut, přesto jej v současnosti využívá jen minimum pacientů.

Mezi znaky časného růstu melanomu patří změna barvy, změna velikosti, změna povrchu, asymetrie a změna povrchu na kůži (Krajsová 2000).

1.1.3.2 Melanom B16-F10

Melanom B16-F10 je jedním ze čtyř podtypů myší melanomové linie B16 (B16-F10, B16-F0, B16-F1, B16-BL6) (Nakamura a kol. 2002).

Tato linie byla roku 1983 schválena Národním institutem pro rakovinu v Marylandu, USA (Teleher a kol. 2002).

Pro pokus jsme použili buněčnou myší linii typu B16-F10 pro svoji vlastnost agresivní invaze do okolních tkání a vysoké schopnosti metastazování, především do plic (Bataille 2000, Nakamura a kol. 2002). Tento typ melanomu je velice dobře transplantovatelný do syngenních myší, exprimuje jen malé množství MHC I molekul (Overwijk a kol. 2001).

1.2 Léčba nádorových onemocnění a jejich diagnostika

1.2.1 Primární diagnostika

Primární diagnostika vždy začíná u obvodního lékaře. Pokud má lékař podezření na onkologický problém, provede potřebné krevní testy a pacienta pošle na specializované vyšetření (Adam 2002). Mezi ně patří rentgen, magnetická rezonance,

ultrazvuk, endoskopie či počítačová tomografie. Pacientovi je poté odebrán biopticky vzorek a pomocí histologického vyšetření se určí přesná povaha nádoru (Adam 2004).

1.2.2 Laboratorní diagnostika

Pro co nejpřesnější stanovení diagnostického léčebného postupu je třeba určit závažnost a typ onemocnění. Toho se dosahuje laboratorně stanovením nádorových markerů a nádorových antigenů.

1.2.2.1 Nádorové markery

Nádorové markery jsou definovány jako látky, které jsou produkovány přímo nádorovými buňkami nebo jsou synteticky indukovány v normálních buňkách za přítomnosti nádorových buněk. Nejčastěji se identifikují v plazmě, ale mohou být i na povrchu nádorových buněk či se jedná o cytoplazmatické nebo jaderné struktury nádorových buněk. Díky hladině nádorových markerů lze určit rozsah a závažnost nádorového onemocnění. (Zima 2008)

Tumorové markery lze stanovit hlavně specifickými monoklonálními protilátkami či zobrazovacími technikami. Samotné nádorové markery pro svou specifitu v současnosti neslouží k prevenci, ale spíše ke sledování průběhu onemocnění. Viz Tab.II.

Tab.II: Přehled vybraných nádorových markerů (Krejsek 2004)

nádorový marker	výskyt
CEA karcinoembryonální antigen	karcinomy plic, mléčné žlázy, prsu, zažívacího traktu
hCG lidský choriový gonadotropin	tumory ze zárodečných buněk, tumory

	trofoblastů
AFP alfa – 1-fetoprotein	hepatocelulární karcinom, nádory embrya
CA 125	karcinom ovarií
CA 19-9	tumor pankreatu
CA 72-4	rakovina žaludku, karcinom žaludku
CA 15-3	karcinom prsu
PSA prostatický specifický antigen	karcinom prostaty
KALCITONIN	tumor štítné žlázy

Indikace k vyšetření markeru

Vzhledem k tomu, že všechny markery s výjimkou PSA jsou v časném stadiu maligních chorob málo senzitivní a specifické, nejsou indikovány s výjimkou PSA k preventivním vyšetřením zdravých lidí.

Nádorové markery jsou ale velkými pomocníky při kontrole rizikových skupin pacientů. Např. u pacienta s chronickým onemocněním jater, u něhož je pravděpodobný vznik primárního hematomu lze vyšetřit alfa fetoprotein. U pacienta s bolestí epigastria a hubnutím je vhodné vyšetřit CA 19-9, neboť symptomy budí podezření na karcinom pankreatu. (Adam 2002)

Ke zjištění lokalizace nádoru jsou cirkulující nádorové markery nevhodné, protože nejsou specifické pro orgán, kde nádor vznikl.

Zásadní indikací nádorových markerů je kontrola pacientů po léčbě. Při opakovaných vyšetření nádorových markerů, je možno rozeznat ve více než 50% relaps, a to v průměru o 6 měsíců dříve, než za použití pouze zobrazovacích metod. (Zámečník 2002)

1.2.2.2 Nádorové antigeny

Nádorové antigeny dělíme na antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA).

Do TSA patří proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují, tedy vyskytují se pouze na nádorových buňkách.

- komplexy MHC I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (produkty chemicky indukovaných nádorů)
- komplexy MHC s fragmenty proteinů onkogenních virů
- abnormální formy glykoproteinů (sialylace povrchových proteinů nádorových buněk je odlišná od normálních buněk) (Hořejší 2009, Krejsek 2004)

Do TAA patří proteiny, které se přirozeně vyskytují i na normálních buňkách.

- onkofetální antigeny přítomné v normálních embryonálních buňkách (AFP, CEA)
- melanomové antigeny
- antigen HER2/neu – receptor růstového faktoru epitelálních buněk
- PSA – prostatický specifický antigen
- diferenciační antigeny leukemických buněk (Hořejší 2009, Krejsek 2004)

1.2.3 Léčba nádorových onemocnění

Léčení nádorových onemocnění znamená pro pacienta oproti jiným chorobám velkou psychickou a fyzickou zátěž. Je tedy nezbytné stanovit co nejpřesnější diagnostiku a terapeutický plán. Obecně platí, že čím dříve se nádor objeví, tím větší má pacient šanci na vyléčení (Zámečník 2002).

Chirurgická terapie

V samotných počátcích byla chirurgie jedinou možností léčby. V současnosti se používá hlavně k odstranění primárních a jasně ohraničených nádorů bez ohledu na jejich stadium (Glass a kol. 1985).

Výhodou je, že se velmi často povede odstranit celý nádor, avšak ne všechny nádory jsou chirurgicky odstranit. V současnosti se využívá kombinované léčby, kdy se nádor pomocí chemoterapie či radioterapie zmenší a teprve potom se odstraní (Adam 2004).

Chemoterapie

Principem chemoterapie je nitrožilní podávání látek, které narušují či inhibují buněčné dělení – cytostatika. Zde se využívá hlavně toho, že normální buňky mají oproti nádorovým buňkám rychlejší cyklus regenerace, a tedy zdravá tkáň se zregeneruje dříve než tkáň nádorová. Problémem je, že buňky jsou v rámci mitotického cyklu vnímavé k těmto látkám především v syntetické periodě a při vlastní mitóze. Citlivost ve fázi klidové (G0) a ve fázích presyntetické (G1) a postsyntetické (G2) je výrazně nižší. Takto „schované“ buňky chemoterapii přežijí a později dají základ pro další růst nádorů. Dalším problémem je fakt, že cytostatika jsou pro zdravé buňky stejně toxické jako pro buňky nádorové (Klener a kol. 1996).

Radioterapie

Radioterapie využívá k léčbě zejména fotonové záření a elektronové záření. Ionizující záření při průchodu látkovým prostředím předává svou energii molekulám, které ionizuje a excituje. Pokud tento proces probíhá v citlivých objemech DNA, může dojít k závažnému biologickému poškození buněk, které je při dostatečné dávce letální. Jedná se o tzv. determinační účinky záření, kterých může být využito k destrukci zhoubné tkáně (Zima 2008). Radioterapie je kompromisem mezi dávkou nezbytnou k vyléčení nádoru a dávkou vedoucí k poškození zdravých tkání. Čím je rozmezí mezi těmito ukazateli větší, tím je větší šance na vyléčení tumoru bez poškození zdravé tkáně. V současnosti jsou hledány různé cesty k rozšíření terapeutického rozmezí, teda zvýšit radiosenzitivitu tumoru a snížit radiosenzitivitu zdravých tkání (Jurga 2000).

Radioterapie se využívá především u nádorů v počátečním stádiu či u zbytkových nádorů. Často se používá v kombinaci s chirurgickou terapií, kdy se před operací nádor cíleně ozařuje, aby se zmenšil. Při radioterapii bohužel často dochází

k poškození zdravé tkáně či vzniku nového nádoru právě z důvodu poškození zdravé tkáně (Zámečník 2002) (Sebag-Montefiore a kol. 2009).

Komplikace spojené s radioterapií mohou způsobit i smrt pacienta, podobně jako je to při chemoterapii či při chirurgickém zákroku. Nejvíce užívanou metodou ke zvýšení účinku radioterapie je kombinace s chemoterapií. Mechanismus potenciace je komplexní, nejspíše dochází k inhibici reparace radiačního poškození DNA. Chemoterapie prokázala vyšší účinek oproti samotné radioterapii, ale i intenzivnější nežádoucí účinky (Adam 2004) (Jurga 2000).

Bioterapie

Bioterapie je poměrně mladým vědním oborem, který se vydává cestou cílené léčby bez vážnějších vedlejších účinků.

Důležitou součástí bioterapie je imunoterapie, ta představuje léčebný postup založený na indukci protinádorové imunity nebo k využití imunitních mechanismů k cílenému směřování účinné látky do místa nádoru bez poškození okolní zdravé tkáně (Krejsová 2009).

Dalším typem léčby je hormonální terapie. Té se využívá hlavně při léčbě karcinomu prsu, prostaty či vaječnicků. Dále do této oblasti patří genová terapie, která však v současnosti není běžnou součástí klinické praxe a spíše vyvolává více otázek než odpovědí (Jurga 2000).

Přítomnost hormonů je důležitá pro růst tzv. hormon-senzitivních nádorů. Nejvýraznější je tato závislost na hormonech u karcinomu prsu a karcinomu prostaty. Z toho plyne snaha zamezit proliferaci těchto hormon-senzitivních nádorových buněk potlačením fyziologické produkce těchto hormonů v těle, nebo zablokováním návázání těchto hormonů na jejich receptory (Krejsek 2009).

Míra potřebné odpovědi a počet dosažených remisí závisí hlavně na množství hormonálních receptorů exprimovaných nádorovou buňkou, méně již na formě použité léčby. V případě karcinomu prsu tedy na počtu estrogenových a progesteronových receptorů v maligních buňkách a také na věku a případné menopauze (Adam 2004).

Bioterapie zahrnuje podávání takových molekul, které jsou tělu vlastní a které jsou pro farmakologickou aplikaci připravovány rekombinační technologií. To znamená, že dojde ke vložení příslušné genetické informace z lidského genomu do bakterií nebo buněčných kultur, které pak ve své zvýšené míře produkují požadovanou látku. Avšak tento proces není zatím ještě dobře znám (Jurga 2000).

V současné době zažívá boom bioterapie pomocí monoklonálních protilátek. Léčebně používané monoklonální protilátky jsou cílené proti některému antigenu, typickému pro maligní buňku. Jsou obvykle chimérického původu, variabilní část zaměřená proti antigenní determinantě je obvykle myšího původu a zbytek molekuly je původu humánního, což zamezuje vzniku reakce proti cizí bílkovině (Adam 2002).

Paliativní medicína

Nedílnou součástí léčby nádorových onemocnění je odvětví paliativní medicíny. Pod pojmem paliativní medicína, se rozumí aktivní komplexní péče o pacienty, jejichž onemocnění nereaguje na kurativní léčbu. Tento termín má velmi blízko k termínu podpůrná péče. Ta usiluje o co nejkvalitnější život pacienta a jeho blízkých v průběhu onkologického léčení. Podpůrná léčba tedy není zaměřena na likvidaci nádorových buněk, ale na zmírnění obtíží vyvolaných buď přímo nádorem, nebo aplikovanou léčbou. Cílem této paliativní léčby je prodloužení přežití a mírnění či prevence některých symptomů vyvolaných nádorem (Jurga 2000). V rámci komplexní onkologické léčby se postupy protinádorové a podpůrné léčby vzájemně doplňují. I ve velmi pokročilých či terminálních stádiích nádorových onemocněních mohou některé postupy paliativní protinádorové léčby výrazně zlepšit kvalitu života pacientů (Adam 2002).

V současné době 50 % pacientů, u nichž je zhoubný nádor diagnostikován, na něj také zemře. Na rozdíl od kardiovaskulárních chorob jsou spojeny většinou s delším umíráním. Pokud není onemocnění vyléčitelné radikálně, poskytujeme nemocnému paliativní onkologickou léčbu, jejímž cílem je maximální prodloužení jeho života v co nejlepší kvalitě. Pokud však onkologická léčba již nemůže plnit tyto cíle, je třeba ji opustit a nezatěžovat pacienta zbytečnými nežádoucími účinky. Nastává pak období,

kdy bychom měli nemocnému poskytovat nejlepší podpůrnou léčbu (best supportive care) a ulehčit mu jeho umírání. Optimální model léčby je pravděpodobně integrovaná paliativní péče, ve které postupně ustupujeme od léčby zaměřené na ovlivnění nádoru (kauzální) a akcentujeme léčbu podpůrnou (Kalvach 2010).

Cílem péče v terminální fázi nádorového onemocnění je:

- zmírnit bolest a další tělesné a duševní obtíže (symptomatická léčba)
- zachovat pacientovu důstojnost
- poskytnout podporu jeho blízkým

Pacient v terminální fázi nádorového onemocnění stojí před obtížným úkolem vyrovnat se s blížícím se koncem života. Tento aspekt si většina zdravotníků i příbuzných v zásadě uvědomuje a chápe. Dalším zdrojem obav a úzkostí pacientů je však také strach ze zcela konkrétních obtíží, které mohou poslední období života provázet. Jsou to obtíže tělesné (především bolest a mnoho dalších), duševní (úzkost, deprese), ale také sociální – strach z osamění, izolace („sociální smrt“), a velmi často také obavy ze ztráty důstojnosti. Naléhavost těchto obav si zdraví laici, ale mnohdy ani zdravotníci, v plné míře neuvědomují. Pro pacienty je nesmírně důležité, aby lékař po těchto (mnohdy nevyslovených) obavách pacientů pátral a aby opakovaně poskytl ujištění, že většinu obtíží lze účinně zmírnit. Je třeba aktivně překonávat izolaci umírajících nemocných. Vzhledem k neléčitelnosti jejich onemocnění mohou tito pacienti stát trochu stranou hlavního zájmu lékařů, jejich kognitivní funkce jsou často narušeny postupem nemoci, což ovlivňuje negativně kontakt s ošetřujícím personálem i příbuznými

V pojetí péče o nemocné lidi se prolínají dva přístupy:

přístup humanistický

- usiluje o optimální péči a podporu pacientů a jejich rodin

- vychází z vědomí celkového utrpení pacientů, některých specifických potřeb a ohrožení umírajících lidí i jejich rodin a také z vědomí neuspokojivosti běžného nemocničního umírání
- usiluje o smysluplnost zbývajících času

přístup fiskální

- usiluje o stabilitu veřejných rozpočtů včetně zdravotní péče a o její zlevnění
- usiluje o snížení neúčelných nákladů na marnou léčbu v posledních měsících života
- vychází z vědomí, že nejvyšší náklady na zdravotní péči se obvykle vynakládají v posledním roce pacientova života – zdánlivě tedy marně (Kalvach 2010)

Jako celá medicína má i paliativní péče své prvky formalizované, jakési milníky, a prvky variabilní, reagující na konkrétní situace a události, reflektující přání a chování pacientů i zvyklosti zdravotníků. Oba spoluvytvářejí dobrou klinickou praxi a kvalitu péče.

1.3 Vrozená imunita

Vrozená (přirozená imunita) je fylogeneticky nejstarší součástí imunity. Jejím původem byly buněčné elementy, které byly schopné pohlcovat a usmrcovat mikroorganismy. Další znakem je fakt, buňky přirozené imunity jsou schopné rozpoznat vlastní struktury od struktur mikroorganismů. Tedy pro toto rozlišení obsahují receptory. Tyto receptory jsou zakódované v zárodečné DNA, na rozdíl od receptorů na buňkách specifické imunity, které u každého jedince vznikají individuálně a nedají se dědit. Nevýhodou je, že tyto buňky nejsou schopny tvořit paměťové buňky (Krejsek 2004, Kopecký 2000).

Mezi mechanismy vrozené imunity patří anatomická bariéra, která vyvolává obranné funkce pomocí chemických látek, např. kyselina mléčná. Dále sem patří řasinkové buňky, sliny, slzy a mukózní sekret, ty tvoří první obrannou linii. Po jejím proniknutí nastupují buňky vrozené imunity – neutrofily, monocyty – makrofágy, granulocyty, NK buňky a dendritické buňky (Kopecký 2000). Ty mají na svém povrchu receptory, které rozpoznávají specifické struktury, které se vyskytují na určitých skupinách patogenů. Tuto skupinu molekulárních motivů označujeme jako PAMPs a receptory, které jsou schopny rozpoznávat jako PRRs (Hořejší 2009).

PRRs jsou dále schopny rozpoznat tzv. DAMPs, což jsou endogenní molekulární struktury, které se uvolňují při nekrotizaci buněk. Pokud PRRs rozpoznají v organismu DAMPs nebo PAMPs, dojde ke vzniku zánětlivé reakce. Vrozený imunitní systém má tedy za úkol předcházet vzniku onemocnění (Krejsek 2004, Kopecký 2000).

1.3.1 PRRs

Funkčně jsou receptory PRRs rozděleny do tří tříd:

1.3.1.1 Sekretované

Slouží jako opsoniny, které se váží na mikrobiální stěny, kde zajistí rozpoznání mikrobiálních povrchů fagocytujícími buňkami a komplementem. Patří jsem molekula PRRs vázající manan (MBL), která je součástí aktivace komplementu lektinovou

cestou. Dále jsem patří C-reaktivní protein (CRP) (Chang a kol. 2002), který po navázání na PAPMs aktivuje klasickou cestu komplementu (Krejsek 2004, Beutler 2004)

1.3.1.2 Endocytární

Nacházejí se na povrchu fagocytujících buněk. Po rozpoznání PAMPs dochází k vazbě mikroorganismů na povrch fagocytujících buněk, jejich následné pohlcení a směřování do lysosomálních kompartmentů, kde dojde k jejich rozložení. (Krejsek 2004, Beutler 2004). Příkladem je PRRs makrofágový receptor pro manosu. Dectin – 1 (Girardin 2003).

1.3.1.3 Signální

K rozpoznání PAPMs používají aktivaci signálního systému, který následně indukuje expresi genů, jejichž produkty regulují imunitní odpověď (Krejsek 2004) (Beutler 2004).

TLRs

Jedná se o první a nejlépe popsané receptory mezi PRRs . První údaje o existenci byly získány genomickou anlyzou *Drosophila melanogaster*, tzv. systém Toll (Medzhitov a kol. 2003).

V současnosti je u člověka objeveno 10 receptorů (Akira a kol. 2006). Buňky vrozené imunity jsou schopné rozpoznat i molekulové vzorce, které jsou endogenního původu a vznikají v těle např. při apoptóze. Jsou exprimovány na imunitních i neimunitních buňkách (Zamember 2002.) TLRs 1,2,4,5,6 a 10 jsou obsaženy na buněčném povrchu, kde primárně rozpoznávají bakteriální lipoproteiny. TLRs 3,7,8 a 9 (Viz Tab.III) jsou obsaženy v endotelu, kde rozpoznávají nukleové kyseliny a antivirální molekuly (Matsushima a kol. 2007).

Tab.III:Přehled TLRs a jejich základních vlastností

(<http://www.invivogen.com/review-tlr>)

TLR	Immune Cell Expression	PAMPs	DAMPs	Signal Adaptor	Production
TLR1+ TLR2	Cell surface Mo, MΦ, DC, B	Triacylated lipoproteins (<u>Pam3CSK4</u>) <u>Peptidoglycans</u> , <u>Lipopolysaccharides</u>	(TLR2 DAMPs listed below)	TIRAP, MyD88, Mal	IC
TLR2+ TLR6	Cell surface Mo, MΦ, MC, B	Diacylated lipoproteins (<u>FSL-1</u>)	Heat Shock Proteins (HSP 60, 70, Gp96) High mobility group proteins (HMGB1) Proteoglycans (Versican, Hyaluronic Acid fragments)	TIRAP, MyD88, Mal	IC
TLR3	Endosomes B, T, NK, DC	<u>dsRNA (poly (I:C))</u> tRNA, siRNA	mRNA tRNA	TRIF	IC, type1 IFN
TLR4	Cell surface/ endosomes Mo, MΦ, DC, MC, IE	<u>Lipopolysaccharides (LPS)</u> Paclitaxel	Heat Shock Proteins (HSP22, 60, 70,72, Gp96) High mobility group proteins (HMGB1) Proteoglycans (Versican, Heparin sulfate, Hyaluronic Acid)	TRAM, TRIF TIRAP, MyD88 Mal	IC, type1 IFN

			fragments) Fibronectin, Tenascin-C		
TLR5	Cell surface Mo, MΦ, DC, IE	<u>Flagellin</u>		MyD88	IC
TLR7	Endosomes Mo, MΦ, DC, B	ssRNA Imidazoquinolines (R848) Guanosine analogs (Loxoribine)	ssRNA	MyD88	IC, type1 IFN
TLR8	Endosomes Mo, MΦ, DC, MC	ssRNA, Imidazoquinolines (R848)	ssRNA	MyD88	IC, type1 IFN
TLR9	Endosomes Mo, MΦ, DC, B, T	CpG DNA <u>CpG ODNs</u>	Chromatin IgG complex	MyD88	IC, type1 IFN
TLR10	Endosomes Mo, MΦ, DC	profilin-like proteins		MyD88	IC

Mo: monocytes, MΦ: macrophages, DC: dendritic cells, MC: Mast cells, B: B cells, T: T cells, IE: Intestinal epithelium, IC: Inflammatory cytokines.

1.3.2 Formylpeptidové receptory a N-formylpeptidové receptory (FPRs)

FPRs patří do transmembránových proteinů, které jsou spřažené s G-proteiny (Fu a kol. 2006). Jsou tvořeny pomocí 7 transmembránových domén, které obsahují cca 350 AA (Dufton a kol. 2010). Předpokládá se, že molekula argininu v poloze 84 a aspartát v poloze 284 jsou důvodem afinity k f-MLF. Po navázání f-MLF na receptor dojde ke konformační změně receptoru a k aktivaci G-proteinu, tedy dojde ke spuštění signální kaskády, jejímž výsledkem je imunitní odpověď (Le a kol. 2002).

Bylo zjištěno, že bakteriální produkty obsahují formylmethioniny a fagocyty využívají f-Met jako chemický signál k nalezení bakterií (Schiffmanna kol. 1975).

1.3.2.1 Lidské FPRs a jejich agonisté

V lidském organismu se vyskytují 3 typy FPRs (FPR1, FPR2 a FPR3), všechny jsou známy svojí afinitou k f-MLF (Migeotte a kol. 2006).

FPR1

Jedná se o první objevený chemotaktický receptor, který váže f-MLF (Dorward a kol. 2015). Methionin má záporný náboj a reaguje s kladnou oblastí receptoru. Rozpoznávají exogenní i endogenní ligandy (Sun a kol. 2004). Slouží především k imunitní obraně (Prevete a kol. 2015). Je exprimován převážně na neutrofilech (Hayashi a kol. 2011) (Becker a kol. 1998).

FPR2

FPR2 jsou schopny vázat jak proteiny a peptidy, tak i syntetické molekuly. Mezi hlavní ligandy patří formylové peptidy z mitochondrií (Ye a kol. 1992). K f-MLF má asi 1000x menší afinitu než FPR1. Převážně je exprimován na neutrofilech (He a kol. 2013). FPR2 spřažený s G proteinem reguluje signalizační kaskádu (Cattaneo a kol. 2016).

FPR3

FPR3 jsou receptory, které se nachází na monocytech, dendritických buňkách a makrofázích (Durstin 1994). Jako jediný má vysokou afinitu k endogenním peptidům (Forsman a kol. 2011). Jeho přesná fyziologická funkce není prozatím známa (Rabiet a kol. 2011).

1.3.2.2 Myší FPRs a jejich agonisté

U myší bylo popsáno 8 typů FPRs. FPR1, FPR2, FPR-rs3, FPR-rs4, FPR-rs5, FPR-rs6 a FPR-rs7 (Gao a kol. 1998). Mezi vybranými 3 myšími a lidskými formylmethioninovými receptory byla objevena homologie více než 70% (Dufton a kol. 2010).

FPR1

FPR1 receptory mají mnohem vyšší afinitu k delším ligandům, to znamená, že přidání AK na C-terminální konec peptidu zvyšuje afinitu k receptoru (He a kol. 2003).

FPR2

FPR2 receptory vykazují též vyšší afinitu k delším ligandům (Chen a kol. 2010).

FPR-rs1

FPR-rs1 má podobnou strukturu jako FPR1 a FPR2, ale liší se svým umístěním v buňce, neboť se nachází uvnitř buněk (He a kol. 2013).

2. Cíle práce

- 1) Rešerše na téma imunoterapie nádorových onemocnění se zaměřením na úlohu vrozené imunity.
- 2) Zavedení metody kultivace nádorových buněk a in vitro analýzy cytotoxického efektu sledovaných látek.
- 3) Zavedení metody transplantace nádorových buněk syngenním myším.
- 4) Aplikace metody sledování nádorové proliferace, měření objemů nádorů, sledování teploty nádorů. Statistické vyhodnocení naměřených parametrů včetně analýzy přežití.
- 5) Studium významu kotvení formylmethionioných peptidů na nádorové buňky pro úspěšnou imunoterapii.
- 6) Řešení otázky synergie této terapie se současnou stimulací TLR receptorů.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

FCS (Sigma-Aldrich)

EDTA (Sigma-Aldrich)

f-MLF- (K)12 (Schafer-N)

f-MLF-(G)5-(K)12 (Schafer-N)

f-MLF-(G)5-(K)12-STE (Schafer-N)

PBS (Sigma-Aldrich)

LPS (Sigma-Aldrich)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

Trypanová modř (Sigma-Aldrich)

3.2 Nádorová buněčná linie

Pro pokusy byla použita nádorová buněčná linie myšního melanomu B16-F10 (American Type Culture Collection/ATCC, Manassas, VA), kterou nám darovala prof. Říhová z Mikroskopického ústavu AV ČR v Praze. Buněčná linie byla kultivována v RPMI 1640 (10% FCS, glutanim, ATB, merkaptoethanol) v termostatu při 37°C, v atmosféře nasycené vodními parami a oxidem uhličitým o koncentraci 5%.

3.3 Experimentální laboratorní zvířata

Pro pokusy byly použity samice myši SPF C57BL/6N zakoupené u firmy Charles River Laboratories – Sulzfeld, Germany. Myši byly chovány v plastických boxech s podestýlkou ze dřevěných hoblin, s celodenním přístupem k vodě a krmivu (pelety), v prostorách zvěřince Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR

v Českých Budějovicích. Zvěřinec měl konstantní teplotu 22°C, vzdušnou vlhkost 65% a fotoperiodickou buňku nastavenou na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Na začátku pokusu byly myši 8 týdnů staré a vážily 18-20 g.

3.4 Metoda přípravy kultivace nádorových buněk melanomu B16-F10 pro in vivo pokusy

Buňky melanomu B16-F10 byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% FCS a ATB v termostatu při 37 °C. Po dosažení dostatečné koncentrace buněk, bylo slito kultivační medium a buňky byly 3x promyty sterilním roztokem PBS. Následně bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,02 trypsin, 0,02% EDTA v PBS) a buňky se daly inkubovat na 5 minut při 37 °C. Po mikroskopické kontrole, zda jsou buňky rozvolněné, bylo přidáno malé množství RPMI 1640 s 10% FCS a směs byla centrifugována (10 min/4°C/150G). Po centrifugaci byly k peletu s buňkami přidány 3 ml čistého RPMI 1640 a pomocí Pausterovy pipety byla směs řádně rozsuspendována. Poté byly buňky spočítány v Búrknerově komůrce (30 μ l trypanové modři + 30 μ l buněčné suspenze) a upraveny na požadovanou koncentraci $4 \cdot 10^6$ /ml.

3.5 Metoda transplantace nádorových buněk syngenním myším

Myši C57BL/6N byly před aplikací nádorových buněk vyholeny na zádech na pravé straně v dolní části (aby byl nádor patrnější) a zde jim bylo aplikováno subkutánně injekcí 400 000 buněk melanomu B16-F10 rozsuspendovaných v 0,1 ml čistého RPMI 1640. V době aplikace byly myši 8 týdnů staré a vážily 18-20 g. Dvanáctý den po transplantaci buněk byla zahájena terapie.

3.6 Měření teploty nádorů

Teplota byla měřena pomocí bezdotykového teploměru IR Rodent Thermometer 153 IRB (Bioset). U každé myši byla změřena teplota nádoru a poté teplota těla (druhý bok). Teploměr se přikládá na vzdálenost 2 mm od měřeného místa.

Teplota byla 1. den terapie měřena v rozmezí 0,6,12,24 hod. a poté vždy obden (během terapie).

3.7 Měření objemu nádorů

Velikost nádorů byla měřena každý druhý den pomocí kaliperu, podle Inaba (Inaba a kol. 1986) s přesností na jedno desetinné místo. Pro výpočet objemu nádorové masy byl použit vzorec $V = (\pi/6) * A * B^2$, kde A = největší rozměr nádoru, tedy jeho délka (mm) a B = nejmenší rozměr nádoru, tedy jeho výška (mm). Velikost nádoru byla měřena obden (během terapie).

3.8 Vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení vlivu terapie na teplotu subjektu a vliv terapie na velikost nádoru bylo provedeno pomocí MS Excel. Rozptyl dat byl porovnán pomocí F-testu, data byla následně zhodnocena pomocí dvouvýběrového T-testu. Grafy byly zpracovány v programu SigmaPlot 10.0. Statistická analýza přežití byla provedena pomocí programu MedCal metodou Kaplan Meier Survival Analysis.

3.9 Příprava roztoků

3mM fMLF-(K)12

- 12194 mg f-MLF-(K)12 jsme rozpustili ve 2 ml PBS

3mM f-MLF

- 2,62 mg f-MLF jsme rozpustili ve 2 ml PBS

3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS)

- 2,62 mg f-MLF a 1 mg LPS jsme rozpustili ve 2 ml PBS

LPS (0,5 mg/ml PBS)

- 1 mg LPS jsme rozpustili ve 2 ml PBS

f-MLF-(G)5-(K)12 v PBS

- 13,55 mg f-MLF-(G)5-(K)12 jsme rozpustili ve 2 ml PBS

f-MLF-(G)5-(K)12-STE v PBS

- 13,6 mg f-MLF-(G)5-(K)12-STE jsme rozpustili ve 2 ml PBS

LPS (10 mg/ml PBS)

- 4 mg LPS L2630 Sigma jsme rozpustili v 0,4 ml PBS

f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS)

- 11,33 mg f-MLF-(G)5-(K)12-STE a 4 mg LPS L2630 Sigma jsme rozpustili v 1,66 ml PBS

f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS)

- 2,71 mg f-MLF-(G)5-K(12) a 4 mg Lps L2630 Sigma jsme rozpustili v 0,4 ml PBS

f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS)

- 2,72 mg f-MLF-(G)5-(K)12-STE a 4 mg LPS L2630 jsme rozpustili v 0,4 ml PBS

3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS)

- 11,3 mg f-MLF-(G)5-(K)12 a 0,83 mg LPS L2630 Sigma jsme rozpustili v 1,66 ml PBS

PBS = kontrola

- 2 ml PBS

3.10 Pokusy

3.10.1 Pokus č. 1: Terapie melanomu B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF (K)12 motivu

Pokus byl proveden s 12 myšmi C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci nádorových buněk melanomu B16-F10 rozděleny do dvou skupin po šesti myších (A, K).

Po rozdělení a oholení myši (holení se provádělo před transplantací) byla zahájena terapie jednotlivých látek (Tab.IV). Všechny látky byly aplikované intratumorálně po 50 μ l/myš.

Tab.IV: Přehled aplikace látek v pokusu č.1.

Skupina	Aplikovaná látka	Perioda aplikace
A	3mM fMLF-(K)12	6x obden
K – kontrola	PBS	6x obden

Před první aplikací, tedy v čase 0 hod, byla změřena teplota jednotlivých nádorů. Teplota byla 1. den terapie měřena v rozmezí 0,6,12,24 hod. a poté vždy obden (během terapie).

Terapie trvala 14 dní. Po ukončení aplikace jednotlivých látek se sledovala doba přežití jednotlivých myší.

3.10.2 Pokus č.2: Nádorová terapie pomocí f-MLF samotného a v kombinaci s LPS

Pokus byl proveden s 16 myšmi C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci nádorových buněk melanomu B16-F10 rozděleny do čtyř skupin po čtyřech myších (A, B, C, K).

Po rozdělení myši byla zahájena terapie jednotlivých látek (Tab.V). Všechny látky byly aplikované intratumorálně po 50 μ l/myš.

Tab.V: Přehled aplikace látek v pokusu č.2.

Skupina	Aplikovaná látka	Perioda aplikace
A	3mM f-MLF	6x obden
B	3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS)	6x obden
C	LPS (0,5 mg/ml PBS)	6x obden
K - kontrola	PBS	6x obden

Před první aplikací, tedy v čase 0 hod, byla změřena teplota jednotlivých nádorů. Teplota byla 1. den terapie měřena v rozmezí 0,6,12,24 hod. a poté vždy obden (během terapie).

Terapie trvala 14 dní. U tohoto pokusu jsme nesledovali dobu přežití jednotlivých myší, jelikož f-MLF v kombinaci s LPS netvoří synergii.

3.10.3 Pokus č.3: Nádorová terapie pomocí použití nízkých koncentrací f-MLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce

Pokus byl proveden s 54 myšmi C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci nádorových buněk melanomu B16-F10 rozděleny do devíti skupin po šesti myších (A, B, C, D, E, F, G, H, K).

Po rozdělení myší byla zahájena terapie jednotlivých látek (Tab.VI). Všechny látky byly aplikované intratumorálně po 50 μ l/myš.

Tab.VI: Přehled aplikace látek v pokusu č.3.

Skupina	Aplikovaná látka	Perioda aplikace
A	f-MLF-(G)5-(K)12	6x obden
B	f-MLF-(G)5-(K)12-STE	6x obden
C	LPS (0,5 mg/ml PBS)	6x obden
D	LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS	1x 5x obden
E	f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS	6x obden

	(0,5 mg/ml PBS)	
F	f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS)	6x obden
G	f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5- (K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS)	1x 5x obden
H	f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12- STE in LPS(0,5 mg/ml PBS)	1x 5x obden
K	PBS	6x obden

Před první aplikací, tedy v čase 0 hod, byla změřena teplota jednotlivých nádorů. Teplota byla 1. den terapie měřena v rozmezí 0,6,12,24 hod. a poté vždy obden (během terapie).

Terapie trvala 14 dní. Po ukončení aplikace jednotlivých látek se sledovala doba přežití jednotlivých myší.

4. Výsledky

U každého pokusu byly naměřené hodnoty zpracovány pomocí několika statistických programů. Pomocí programu MS Excel jsem zpravovala data měření vlivu závislosti terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin. Data měření vlivu závislosti terapie na teplotu subjektu během terapie (14 dní) a vliv terapie na velikost nádoru během terapie. Vytvořila jsem zde tabulky s údaji o teplotě, velikosti nádoru, směrodatných odchylkách a rozptylu dat jako podklad pro program SigmaPlot 10.0 pomocí kterého jsem vytvořila k jednotlivým tabulkám grafy.

Dále jsem u pokusu č. 1 a č. 3 pomocí programu MedCal metodou Kaplan Meier Survival Analysis vytvořila grafy se statistickým zhodnocením vlivu terapie na délku přežití jednotlivých myší. U pokusu č.2, jsem již vliv terapie na délku přežití myší nesledovala, neboť při prvním pokusu jsem zjistila, že f-MLF v kombinaci s LPS netvoří synergii.

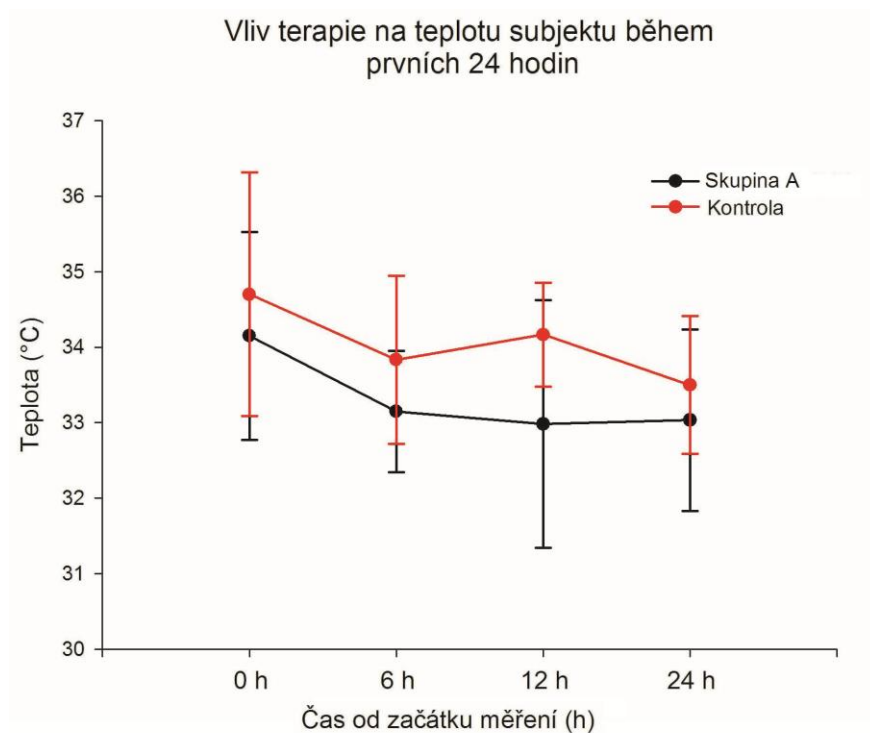
V rámci lepšího vyhodnocení dat jsem ze statistických údajů vyřadila myši uhynulé během vlastní terapie a v celkovém zhodnocení vlivu terapie na velikost nádorů jsem u vyléčených myší (velikost nádoru 0×0 či 6×0) kvůli statistickým výpočtům zavedla místo 0 velikost nádoru $0,01 \times 0,01$ mm. Tyto změny jsem provedla pro lepší statistické zhodnocení získaných dat.

U grafů Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin, Vliv terapie na teplotu subjektu jsem vytvořila 2 typy grafů ze shodných dat pro lepší přehlednost získaných výsledků. Na sloupcových grafech je lépe vidět velikost směrodatných odchylek a na křivkových grafech je zase lépe vidět rozdíl údajů mezi jednotlivými měřeními.

U pokusu č.3 jsem statistické zhodnocení vlivu terapie na délku přežití myší musela rozdělit do dvou grafů (vztaženo u obou ke kontrole), protože program MedCal metoda Kaplan Meier Survival Analysis zhodnotí najednou pouze max. 5 skupin.

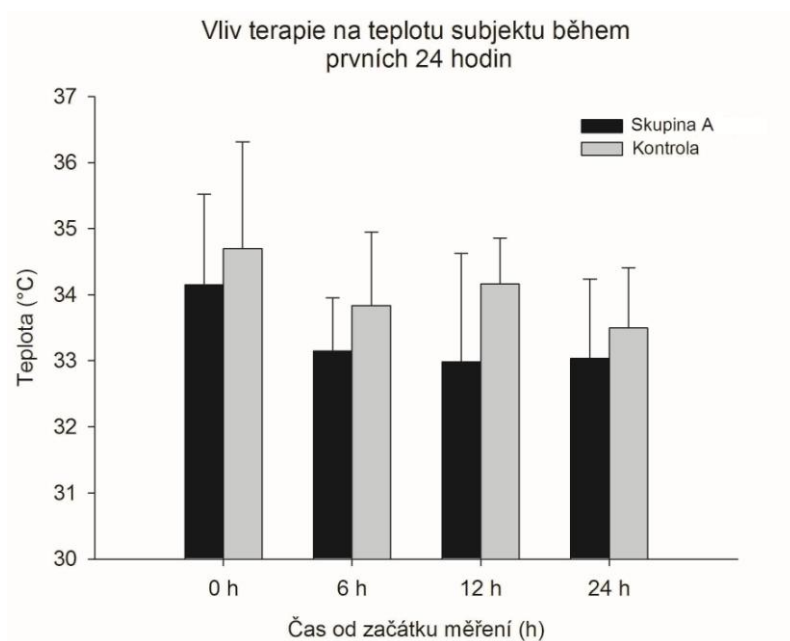
4.1 Pokus č. 1: Terapie melanomu B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF (K)12 motivu

Z grafu na Obr.1 a Obr.2 je vidět, že během prvního dne terapie se teploty nádorů jinak dramaticky nelišily. Údaje v průběhu terapie Obr. 3 a Obr.4 ukazují, že teplota žádným způsobem neodrážela průběh a typ terapie. Skoro u všech skupin byla teplota nádorů menší než teplota těla.



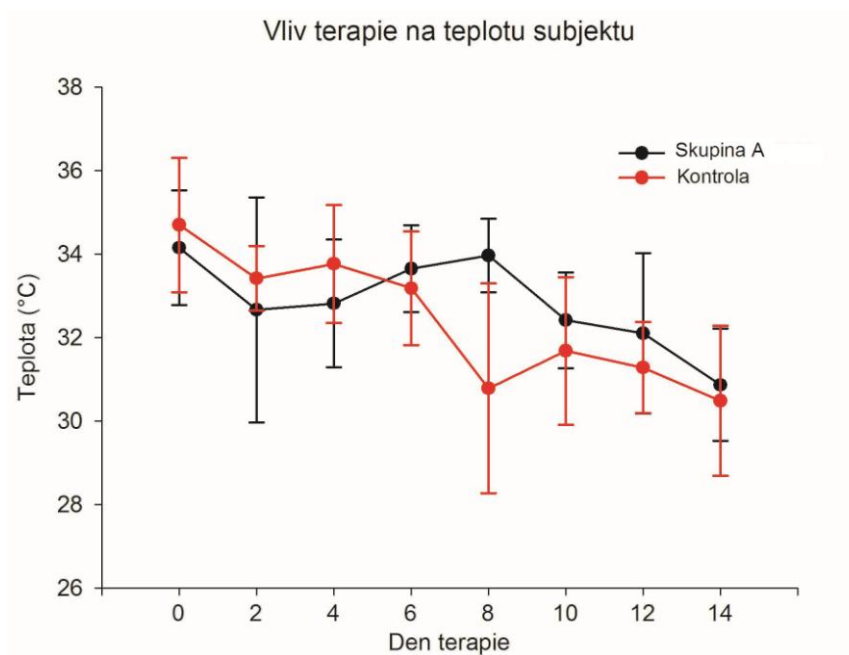
Obr.1: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin.

skupina A – léčena 3mM fMLF-(K)12, skupina K – kontrola PBS



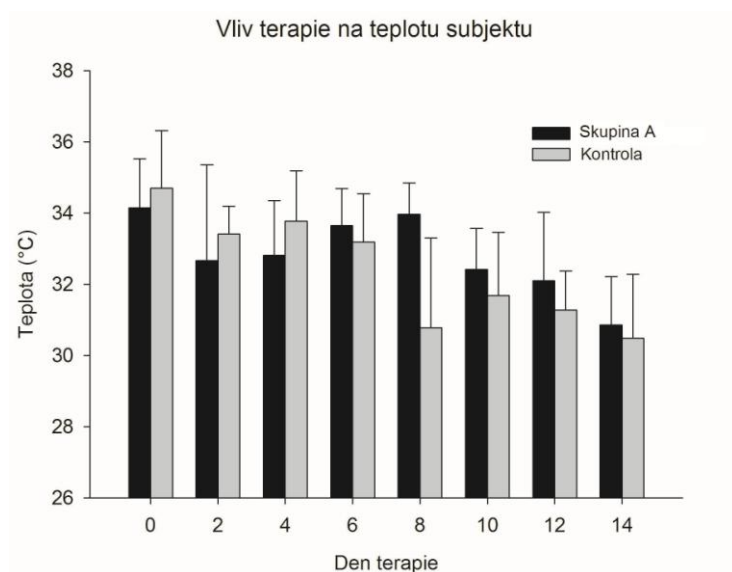
Obr.2: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin.

skupina A – léčena 3mM fMLF-(K)12, skupina K – kontrola PBS



Obr.3: Vliv terapie na teplotu subjektu.

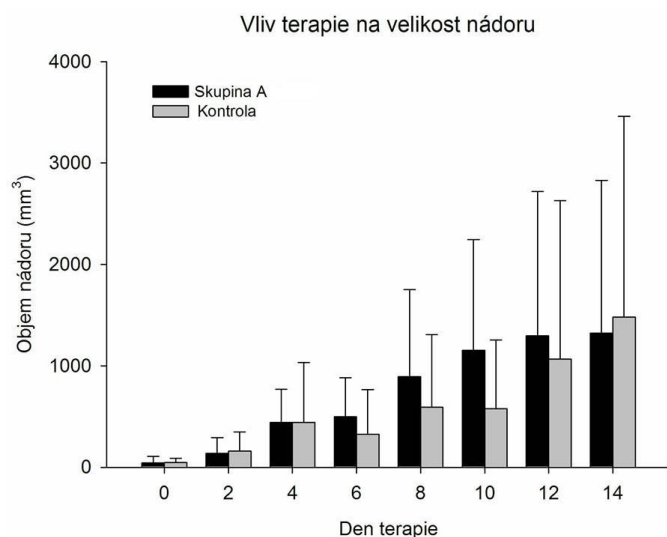
skupina A – léčena 3mM fMLF-(K)12, skupina K – kontrola PBS



Obr.4: Vliv terapie na teplotu subjektu.

skupina A – léčena 3mM fMLF-(K)12, skupina K – kontrola PBS

Z grafu na Obr.5 je velmi dobře patrné, že terapie nádoru B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF-(K)12 motivu nefunguje, jelikož kromě posledního dne terapie byly velikosti nádorů vyšší než velikosti kontroly.

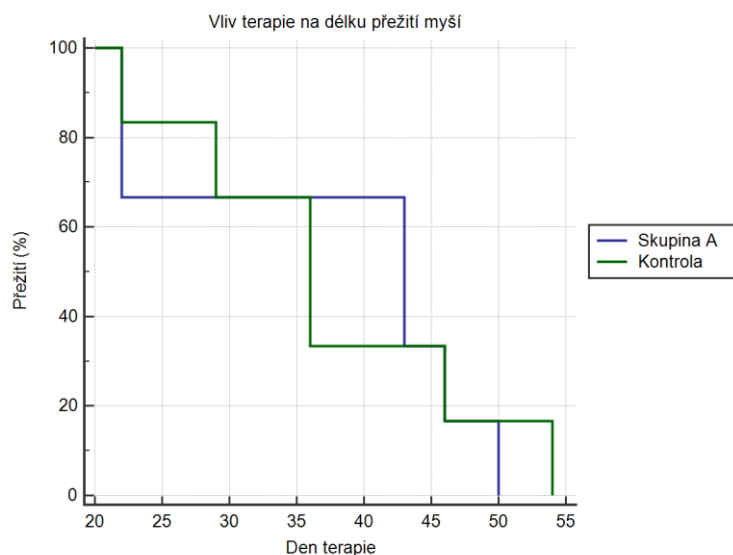


Obr.5. Vliv terapie na velikost nádoru.

skupina A – léčena 3mM fMLF-(K)12, skupina K – kontrola PBS

* $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ – vztaženo ke kontrole

V průběhu tohoto pokusu nebylo dosaženo zmenšení velikosti nádorů a po ukončení terapie toto nemělo výraznější vliv na přežití jednotlivých myší. Z grafu na Obr.6, je patrné, že rozdíly ve velikosti nádorů nebyly statisticky významné.

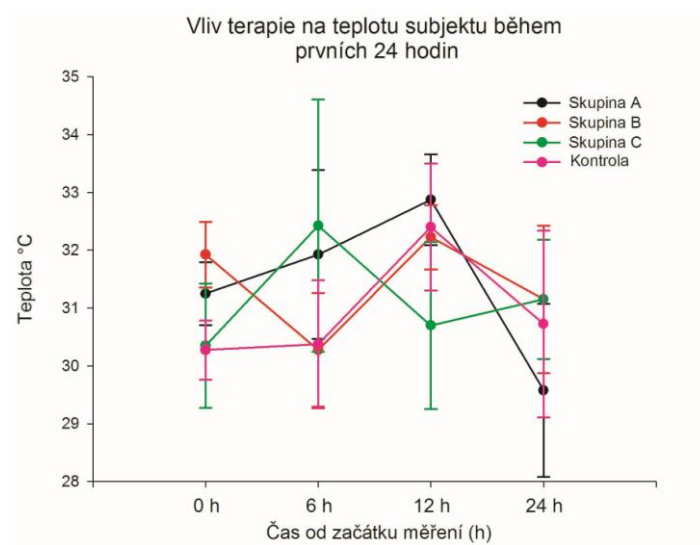


Obr.6: Vliv terapie na délku přežití myší.

skupina A – léčena 3mM fMLF-(K)12, skupina K – kontrola PBS

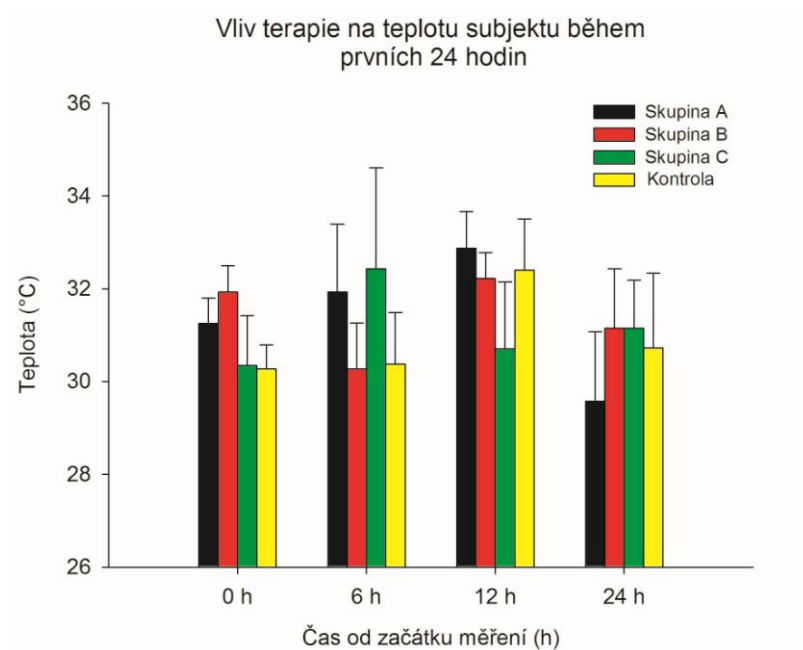
4.2 Pokus č.2: Nádorová terapie pomocí f-MLF samotného a v kombinaci s LPS

Z grafu na Obr.7 a Obr.8 je vidět, že během prvního dne terapie se teploty nádorů mírně lišily. Údaje v průběhu terapie Obr. 9 a Obr.10 ukazují, že teplota však rovněž žádným způsobem neodrážela průběh a typ terapie. Skoro u všech skupin byla teplota nádorů menší než teplota těla.



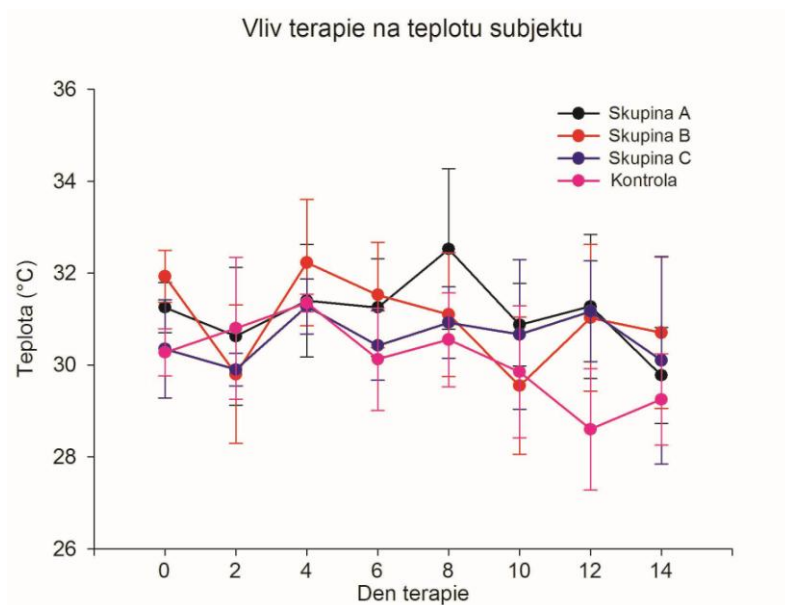
Obr.7: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin.

skupina A – léčena 3mM f-MLF, skupina B – léčena 3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina K – kontrola PBS



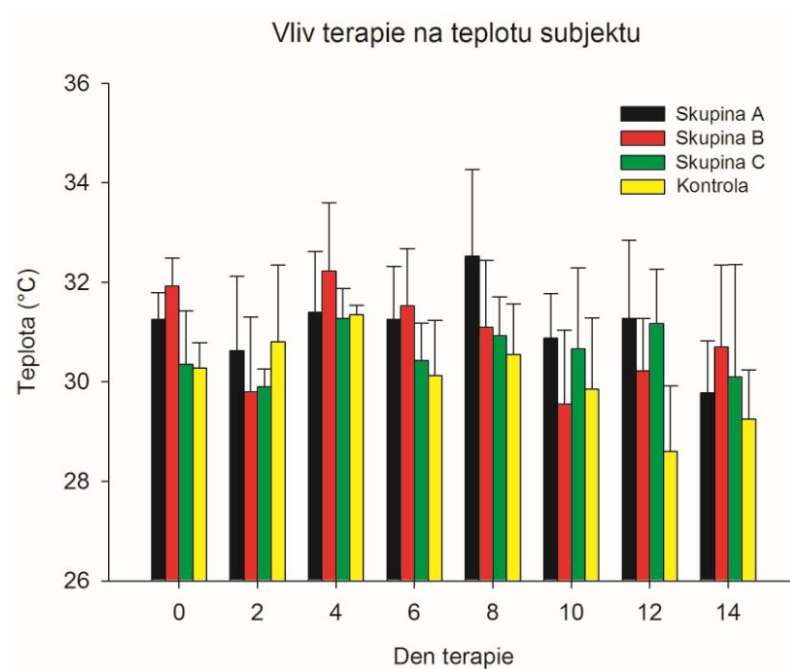
Obr.8: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin.

skupina A – léčena 3mM f-MLF, skupina B – léčena 3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina K – kontrola PBS



Obr.9: Vliv terapie na teplotu subjektu.

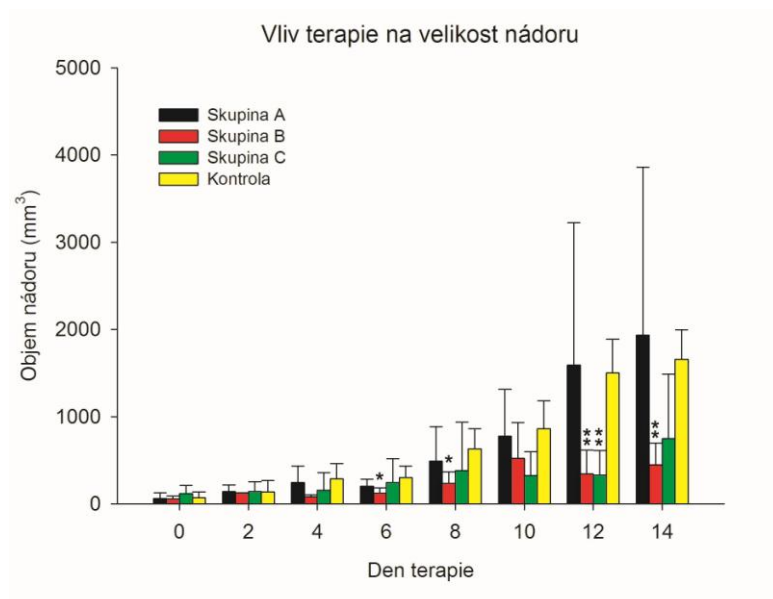
skupina A – léčena 3mM f-MLF, skupina B – léčena 3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina K – kontrola PBS



Obr.10: Vliv terapie na teplotu subjektu.

skupina A – léčena 3mM f-MLF, skupina B – léčena 3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS) skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – kontrola PBS

Z grafu na Obr.11 je patrné, že terapie nádoru B16-F10 pomocí samotného 3mM f-MLF nefunguje, protože nevyvolává oproti kontrole žádoucí redukci nádorů. Ke statisticky významnému poklesu redukce nádorů došlo u skupiny B a skupiny C. Ovšem směs působí pouze kvůli kombinaci s LPS. K žádné synergii nedocházelo.

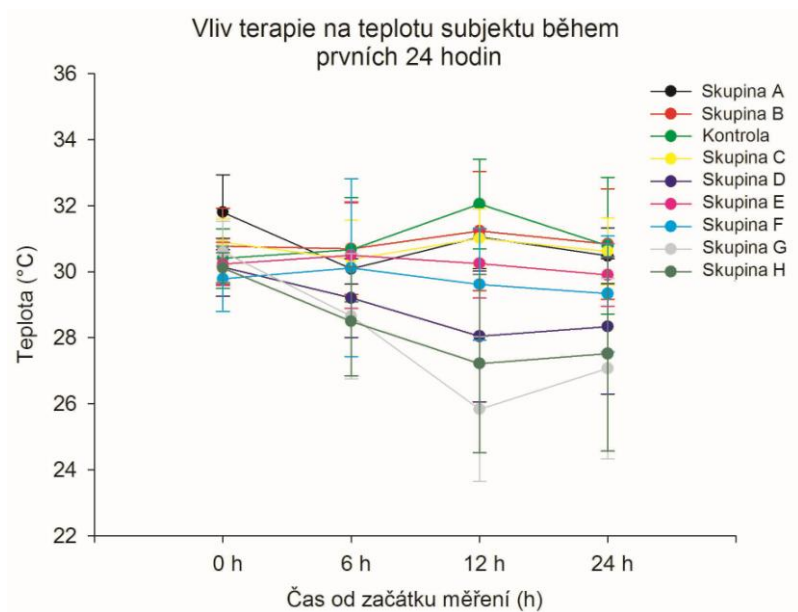


Obr.11: Vliv terapie na velikost nádoru.

skupina A – léčena 3mM f-MLF, skupina B – léčena 3mM f-MLF v PBS in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina K – kontrola PBS, * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ – vztaženo ke kontrole

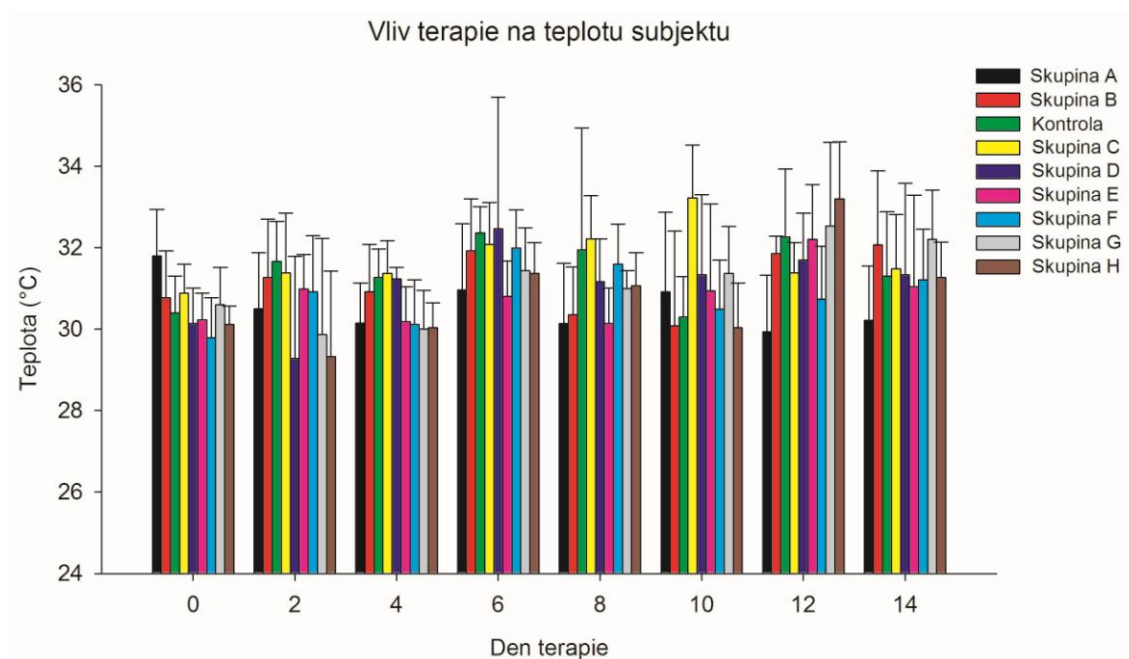
4.3 Pokus č.3: Národová terapie pomocí použití nízkých koncentrací f-MLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce

Z grafu na Obr.12 a Obr.13 je vidět, že během prvního dne terapie se teploty nádorů velmi lišily. Údaje v průběhu terapie Obr.14 a Obr.15 ukazují, že teplota však rovněž žádným způsobem neodrážela průběh a typ terapie. Skoro u všech skupin byla teplota nádorů menší než teplota těla.



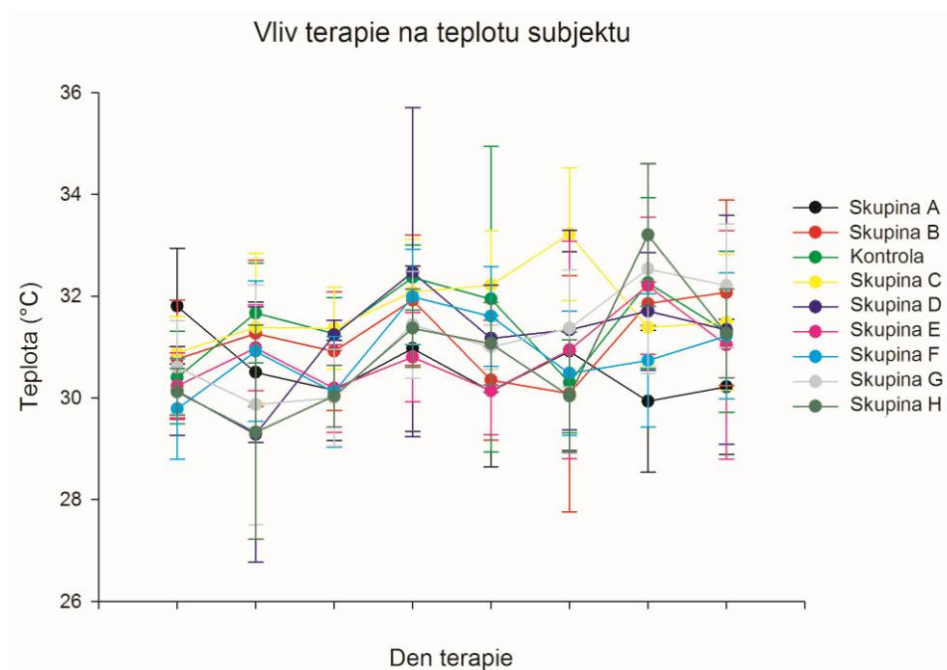
Obr12: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin.

skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 ,skupina B – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE, skupina K – léčena PBS = kontrola, skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – léčena LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS, skupina E – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina F – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina G – léčena f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina H – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(0,5 mg/ml PBS)



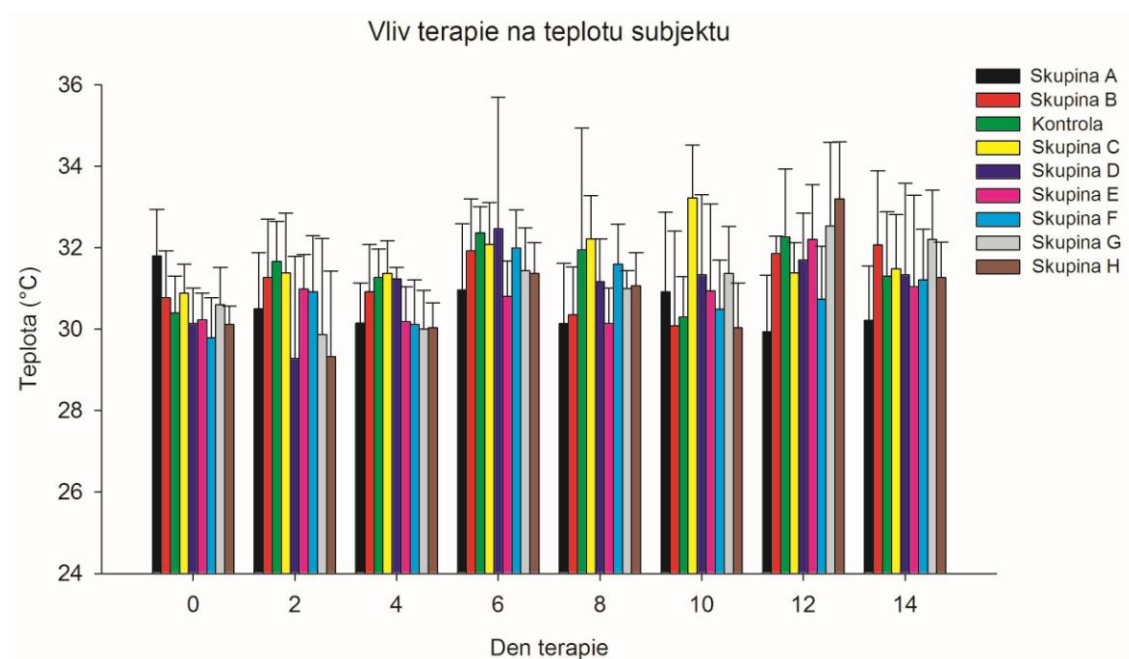
Obr.13: Vliv terapie na teplotu subjektu během prvních 24 hodin.

skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 ,skupina B – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE, skupina K – léčena PBS = kontrola, skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – léčena LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS, skupina E – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina F – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina G – léčena f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina H – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(0,5 mg/ml PBS)



Obr.14: Vliv terapie na teplotu subjektu.

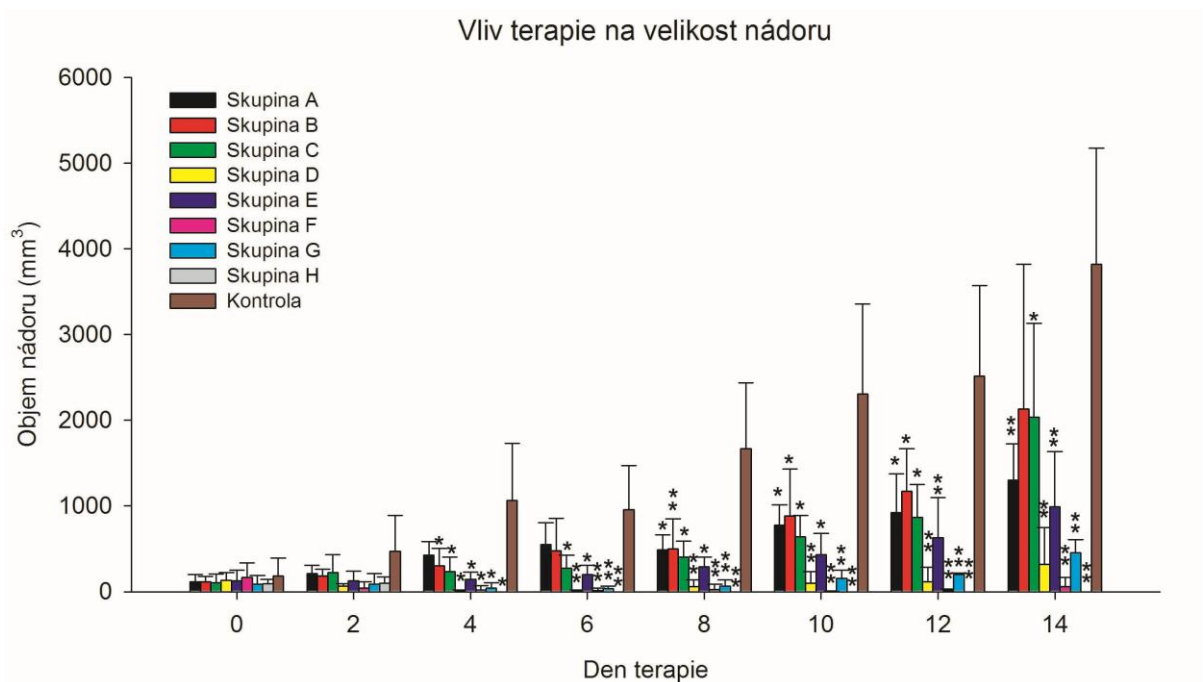
skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 ,skupina B – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE, skupina K – léčena PBS = kontrola, skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – léčena LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS, skupina E – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina F – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina G – léčena f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina H – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(0,5 mg/ml PBS)



Obr.15: Vliv terapie na teplotu subjektu.

skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 ,skupina B – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE, skupina K – léčena PBS = kontrola, skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – léčena LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS, skupina E – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina F – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina G – léčena f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina H – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(0,5 mg/ml PBS)

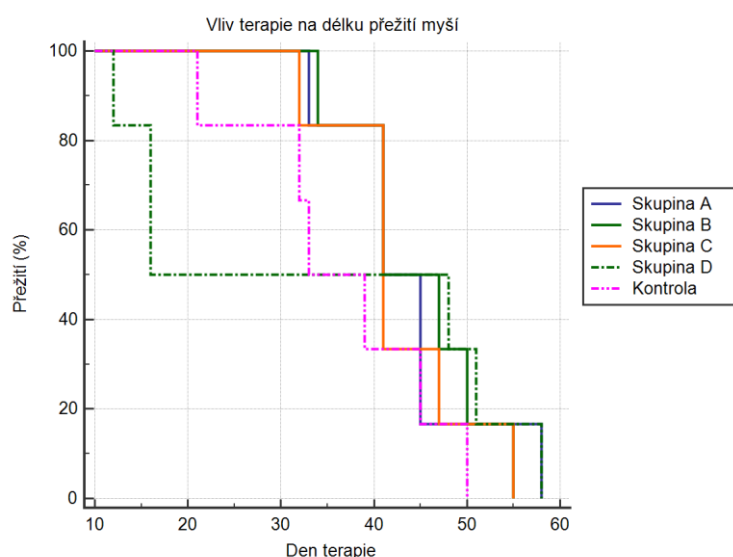
Z grafu na Obr.č. 16 je velmi patrné, pokus byl úspěšný. Nejúspěšnější byl formylmethioninový derivát s alifatickým řetězcem kyseliny stearové s kombinací s LPS (0,5 mg/ml v PBS), kromě jednoho subjektu způsobil kompletní vyléčení celé skupiny. Velmi úspěšný byl i derivát s alifatickým řetězcem kyseliny stearové s kombinací s LPS (10 mg/ml v PBS), avšak tato látka během prvním 4 dnů terapie usmrtila pro svou vysokou toxicitu 3 subjekty.



Obr.16: Vliv terapie na velikost nádoru.

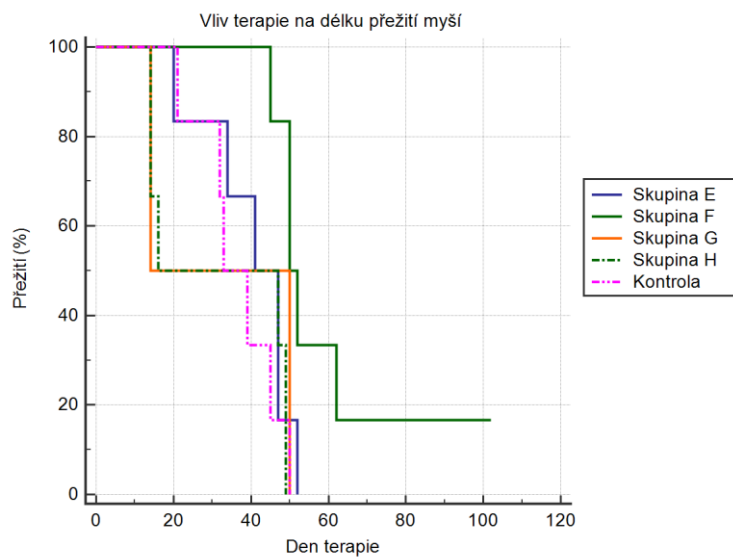
skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12, skupina B – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE, skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – léčena LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS, skupina E – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina F – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina G – léčena f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina H – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina I – léčena PBS = kontrola, * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ – vztaženo ke kontrole

U tohoto pokusu jsem statistické zhodnocení vlivu terapie na délku přežití myši musela rozdělit do dvou grafů Obr. 17 a Obr.18 (vztaženo u obou ke kontrole), protože program MedCal metoda Kaplan Meier Survival Analysis zhodnotí najednou pouze max. 5 skupin. Terapie měla dobrý vliv na přežití jednotlivých myši. Subjekt ze skupiny F se dožil 102 dní, nicméně prodloužení přežití myši v této skupině nebylo ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky významné. Kontrolní skupinu dále přežili 2 subjekty ze skupiny D.



Obr.17: Vliv terapie na délku přežití myši

skupina A – léčena f-MLF-(G)5-(K)12, skupina B – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE, skupina C – léčena LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina D – léčena LPS (10 mg/ml PBS) poté PBS, skupina K – léčena PBS = kontrola



Obr.18: Vliv terapie na délku přežití myší

skupina E – léčena f-MLF-(G)5-(K)12 in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina F – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS (0,5 mg/ml PBS), skupina G – léčena f-MLF-(G)5-K(12) in LPS(10 mg/ml PBS) poté 3mM f-MLF-(G)5-(K)12 a LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina H – léčena f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(10 mg/ml PBS) poté f-MLF-(G)5-(K)12-STE in LPS(0,5 mg/ml PBS), skupina K – léčena PBS = kontrola

5. Diskuze

Léčení nádorových onemocnění pomocí imunoterapie je v současnosti považováno za jedno z nejslibnějších, neboť léčba pomocí vrozené imunity nepoškozuje imunitní systém pacienta a neničí zdravé buňky. Ve své bakalářské práci se zabývám použitím formylmethioninových derivátů pro imunoterapii melanomu B16-F10, což je jeden z nejagresivnějších melanomů vůbec.

Formylmethioninové deriváty působí chemotakticky na buňky vrozené imunity. Dále jsou schopny stimulovat vzplanutí a fagocytozu (Janotová a kol. 2014). Jsou rozpoznávány FPRs receptory. Jedná se o tzv. membránové proteiny. Předpokládá se, že molekula argininu v poloze 84 a aspartát v poloze 284 jsou důvodem afinity k f-MLF. Po navázání f-MLF na receptor dojde ke konformační změně receptoru a k aktivaci G-proteinu, tedy dojde ke spuštění signální kaskády, jejímž výsledkem je imunitní odpověď (Le a kol. 2002).

V prvním pokusu bylo zjištěno, že terapie melanomu B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF-(K)12 motivu nefunguje. To ostatně potvrzuje i studie z roku 2004 (Underhill a Gentner 2004). Nenavázané motivy f-MLF nemají žádný účinek na redukci růstu nádorů a jen nábojová interakce byla zřejmě nedostatečnou.

V druhém pokusu bylo zjištěno, terapie melanomu B16-F10 pomocí samotného 3mM f-MLF nefunguje, protože nevyvolává žádoucí redukci nádorů. Kombinace 3mM f-MLF s LPS vyvolala redukci nádorového růstu, ale ta byla vyvolána jen přítomností nádorového růstu (Mandal a kol. 2005).

Ve třetím pokusu bylo zjištěno, že nejúspěšnější byl formylmethioninový derivát s alifatickým řetězcem kyseliny stearové s kombinací s LPS (0,5 mg/ml v PBS), což odpovídá výsledkům (Čunátové 2012), studující obdobnou problematiku. Velmi úspěšný byl i derivát s alifatickým řetězcem kyseliny stearové s kombinací s LPS (10 mg/ml v PBS). Takto vysoká koncentrace LPS však vykazuje vysokou cytotoxicitu a během pokusu uhynula většina myši. (Glaserová 2012). Avšak jedna myš z této skupiny přežila pozorovanou hranici 100 dní.

Jednotlivé experimenty byly prováděny s cílem nalézt vhodnou kombinaci signálních a vázajících se fagocytárních motivů, které by zredukovali či úplně zlikvidovali nádorové bujení a významně prodloužili dobu přežití jednotlivých myší. Pro signalizaci byl použit LPS, jako fagocytární motiv se osvědčil vhodně kotvený (pomocí kyseliny stearové) f-MLF, jejichž kombinace vedla k sylné synergii. V některých případech jsme dosáhli významné redukce nádorového růstu, avšak významné prodloužení doby přežití jednotlivých myší úspěšné nebylo, což odpovídá poznatkům kolegyň, studujících obdobné systémy (Auerová 2012, Fáberová 2012, Waldmanová 2012).

Taktéž jsme došli ke zjištění, že sledování teploty nádoru oproti teplotě těla není vhodným ukazatelem při této terapii. Vliv terapie neměl vliv na teplotu těla myší během samotné terapie. Pouze v případě skupiny léčené pomocí LPS (10 mg/ml v PBS) bylo vidět, že se myším výrazně snižovala teplota v důsledku cytotoxického účinku příliš vysoké koncentrace použitého LPS, které ve většině případů vedlo k úmrtí myší. LPS jako takové, výborně zvyšuje synergii kotvení formylmethionioných peptidů na nádorové buňky, avšak pro člověka je velmi toxické a tudíž klinicky nepoužitelné (Visintin a kol. 2005) (Rozsypalová 2012). Jako jeho náhrada připadá v úvahu TLR7 či TLR8 (Janotová a kol. 2014)

6. Závěr

Terapie melanomu B16-F10 pomocí nábojově vázaného f-MLF-(K)12 motivu nefunguje, protože nevyvolává fagocytární atak.

Terapie melanomu B16-F10 pomocí samotného 3mM f-MLF nefunguje, protože bez kombinace s LPS nevyvolává redukci nádorů a dostatečnou synergii.

Použitím f-MLF motivu kotveného pomocí lipofilního řetězce s kyselinou stearovou v kombinaci s LPS i samostatně bylo prokázáno, že synergie je zde velice účinná. Došlo k téměř úplné eliminaci nádorů a myš léčená touto látkou přežila oproti myším z kontrolní skupiny o 52 dní.

Díky experimentům provedeným v bakalářské práci došlo ke zjištění, že kotvení formylmethionických peptidů na nádorové buňky má pozitivní účinek na zmenšení objemu nádorů v úspěšné imunoterapii a že kombinace s LPS výrazně zvyšuje synergii.

7. Použitá literatura

Adam, Z., et al., *Obecná onkologie*. Brno 2004, 439.

Adam, Z., et al., *Speciální onkologie*. Brno 2002, 542.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Auerová, M. (2012). Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A., & Rasty, G. (2010). From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatology research and practice*, 2010.

Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300(5625), 1524-1525.

Bataille, V. (2000). Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clinical and experimental dermatology*, 25(6), 464-470.

Becker, E. L., Forouhar, F. A., Grunnet, M. L., Boulay, F., Tardif, M., Bormann, B. J., ... & Murphy, P. M. (1998). Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell and tissue research*, 292(1), 129-135.

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40, 845-859.

Cattaneo, F., Parisi, M., Fioretti, T., Sarnataro, D., Esposito, G., & Ammendola, R. (2016). Nuclear localization of Formyl-Peptide Receptor 2 in human cancer cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 603, 10-19.

Clark, W. H., From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research*, 29(3), 705-727.

Čunátová, Š. (2012). Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Divoká, P. (2012). Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů. Bakalářská práce, Jihočeské univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

Dorward, D. A., Lucas, C. D., Chapman, G. B., Haslett, C., Dhaliwal, K., & Rossi, A. G. (2015). The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *The American journal of pathology*, 185(5), 1172-1184.

Dufton, N., & Perretti, M. (2010). Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacology & therapeutics*, 127(2), 175-188.

Dufton, N., & Perretti, M. (2010). Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacology & therapeutics*, 127(2), 175-188.

Fáberová, J. (2012). Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*. Bakalářská práce, Jihočeské univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

Fakan, F., Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory. Nakladatelství Karolinum Praha 2005, 112.

Fidler, I. J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer research*, 50(19), 6130-6138.

Forsman, H., Kalderén, C., Nordin, A., Nordling, E., Jensen, A. J., & Dahlgren, C. (2011). Stable formyl peptide receptor agonists that activate the neutrophil NADPH-oxidase identified through screening of a compound library. *Biochemical pharmacology*, 81(3), 402-411.

Frenčík, M., et al., Imunitní systém informace pro každého. Grada publishing a.s. 2005, 236.

Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 79(2), 247-256.

Gao, J. L., Chen, H., Filie, J. D., Kozak, C. A., & Murphy, P. M. (1998). Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics*, 51(2), 270-276.

Glaserová, S. (2012). Studium terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LPS. Bakalářská práce, Jihočeské univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

Glass, R. E., Ritchie, J. K., Thompson, H. R., & Mann, C. V. (1985). The results of surgical treatment of cancer of the rectum by radical resection and extended abdomino-iliac lymphadenectomy. *British journal of surgery*, 72(8), 599-601.

Hayashi, R., Miyazaki, M., Osada, S., Kawasaki, H., Fujita, I., Hamasaki, Y., & Kodama, H. (2013). A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(3), 668-675.

He, R., Sang, H., & Richard, D. Y. (2003). Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood*, 101(4), 1572-1581.

Hořejší, V., et al., *Základy imunologie*. Triton 2009, 316.

Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M., & Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 13043-13048.

Chen, K., Le, Y., Liu, Y., Gong, W., Ying, G., Huang, J., ... & Wang, J. M. (2010). Cutting edge: a critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3331-3335.

Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T., Fujimoto, S., Sakurai, Y., Maruo, K., ... & NoMuRA, T. (1986). Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumors implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research GANN*, 77(2), 190-196.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., ... & Rozsypalová, P. (2014). The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PloS one*, 9(1), e85222.

Jurga, L., et al., *Klinická onkología a rádioterapia*. Slovak Academic Press s.r.o., Bratislava 2000, 1030.

Klener, P., et al., *Základy vnitřního lékařství pro bakalářské studium*. Univerzita Karlova vydavatelství Karolinum 1996, 170.

Klener, P., *Protinádorová chemoterapie*. Galén 1996, 614.

Krajsová, I., et al., *Kožní nádory Prevence a včasná diagnostika*. Jessenius 2000, 64.

Krejsek, J., et al., *Klinická imunologie*. Nucleus HK, 2004, 941.

Le, Y., Gong, W., Tiffany, H. L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., ... & Wang, J. M. (2001). Amyloid β 42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J. Neurosci*, 21(1).

Mandal, P., Novotny, M., & Hamilton, T. A. (2005). Lipopolysaccharide induces formyl peptide receptor 1 gene expression in macrophages and neutrophils via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The Journal of Immunology*, 175(9), 6085-6091.

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., & Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC genomics*, 8(1), 1.

Migeotte, I., Communi, D., & Parmentier, M. (2006). Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(6), 501-519.

Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life sciences*, 70(7), 791-798.

Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*, 20-1.

Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford university press.

Prevete, N., Liotti, F., Marone, G., Melillo, R. M., & de Paulis, A. (2015). Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacological research*, *102*, 184-191.

Rabiet, M. J., Huet, E., & Boulay, F. (2007). The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie*, *89*(9), 1089-1106.

Rejthar, A., et al., *Obecná patologie nádorového růstu*. Grada publishing, spol. s.r.o. 2002, 206.

Richard, D. Y., Cavanagh, S. L., Quehenberger, O., Prossnitz, E. R., & Cochrane, C. G. (1992). Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte N-formyl peptide receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, *184*(2), 582-589.

Sebag-Montefiore, D., Stephens, R. J., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., ... & Bessell, E. (2009). Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *The Lancet*, *373*(9666), 811-820.

Schiffmann, E., Showell, H. V., Corcoran, B. A., Ward, P. A., Smith, E., & Becker, E. L. (1975). The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *The Journal of Immunology*, *114*(6), 1831-1837.

Siegel, P. M., & Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *3*(11), 807-820.

Střítecký, J., Patologie Učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium. Evapa Olomouc 2001, 338.

Sun, R., Iribarren, P., Zhang, N., Zhou, Y., Gong, W., Cho, E. H., ... & Oppenheim, J. J. (2004). Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor. *The Journal of Immunology*, 173(1), 428-436.

Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infection*, 6(15), 1368-1373.

Visintin, A., Halmen, K. A., Latz, E., Monks, B. G., & Golenbock, D. T. (2005). Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR4 coreceptor, MD-2. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6465-6472.

Waldmannová, E. (2012). Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A . Bakalářská práce, Jihočeské univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

Zámečník, J., Nemocný se zhoubným nádorem. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zdravotně sociální fakulta 2002, 63.

Internetové zdroje:

Toll-Like Receptors Review. In: *InvivoGen* [online]. 2012 [cit. 2016-08-15]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-tlr>