

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů
Katedra veterinárních disciplín

Experimentální léčba prasečího melanomu pomocí
devitalizace a možnosti jejího využití ve veterinární oblasti

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Jiří Rozinek, CSc.

Autor práce: Veronika Štětinová

2013

Poděkování:

Děkuji panu profesorovi inženýrovi Jiřímu Rozinkovi, CSc. za obrovskou podporu a povzbuzování během celého období tvoření bakalářské práce a za to, že mi umožnil psát toto téma. Panu doktorovi Vratislavovi Horákovi, CSc. děkuji za pomoc při shánění materiálů a obrázků. Rodině děkuji za intenzivní a nekončící podporu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Experimentální léčba prasečího melanomu pomocí devitalizace a možnosti jejího využití ve veterinární oblasti vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne 31. 3. 2013

SOUHRN

Devitalizace je chirurgicko-imunologická metoda používající se k léčbě solidních tumorů. Při operaci se podváže cévní zásobení nádoru (tepny i žíly) a nádor se ponechá v těle *in situ*, neodstraňuje se. Po přerušení krevního zásobení dochází v podvázané tkáni k nekróze. Rozpadající se tkáň vyvolá reakci imunitního systému, který zničí nejen původní nádor, ale i všechny metastázy. Je jedno, zda se podváže primární nádor nebo metastáza, imunitní systém reaguje vždy stejně. Jelikož je však každé nádorové onemocnění spojené s imunodeficiencí, je potřeba imunitní systém podpořit. Průkopníkem metody byl MUDr Karel Fortýn.

Devitalizace se zkoušela a stále zkouší hlavně v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd v Liběchově.

Nejprve probíhali experimenty zkoumající vliv devitalizace na zdravou tkáň. Jedna nebo více částí gastrointestinálního traktu, konkrétně části žaludku a tenkého nebo tlustého střeva, byly podvazovány a i se svým obsahem ponechány v těle. Vždy došlo v podvázané části k přeměně na vazivo a prokázalo se, že devitalizace nevede k sepsi a následné smrti organismu.

V Liběchově byl v roce 1989 vyvinutý nový zvířecí model – miniprasata MeLiM (Melanoma-Bearing-Liběchov-Minipig), tj. miniprasata mající predispozici k dědičnému melanomu. Tato miniprasata se využila k výzkumu účinků devitalizace na nádorovou tkáň. U MeLiM prasat jsou častá mnohačetná ložiska maligního melanomu s četnými metastázami. Nádory jsou tubero-nodulární formy a vystupují nad povrch těla. U části zvířat (i v rámci jednoho vrhu) nádory zanikají. Ložiska melanomu jsou přítomná od nízkého věku. Maligní melanom je jak u prasat, tak u lidí nebezpečný četným a brzkým rozsevem metastáz a navíc nereaguje dobře ani na konvenční chemoterapii a radioterapii. Jediným řešením tedy byla většinou radikální chirurgická excize (vyříznutí), která je ale díky velkému rozsevu buněk velmi obtížná a často bohužel i neúspěšná. Léčba maligního melanomu devitalizací ale přináší velmi dobré výsledky. U operovaných selat vymizely primární nádory i metastázy, upravila se jim váha i krevní parametry. Úspěšnost metody byla přes 90%.

Dalším zvířecím modelem léčeným devitalizací byly feny s prokazatelným karcinomem mléčné žlázy. Zde byla úspěšnost devitalizace nižší, mezi 40 a 80 %, a byla závislá na věku nemocných zvířat.

Po takto úspěšných výsledcích byla devitalizace použita jako bolest tišící zákrok u 8 pacientů (lidí) s nádory tračníku a 2 s kolorektálním tumorem. U všech nemocných došlo k dlouhodobému vymizení projevů nemoci, u některých dokonce vymizely i metastázy. Nicméně devitalizace v humánní medicíně zatím není tolik rozšířená a je předmětem dalšího intenzivního klinického výzkumu.

Klíčová slova: prase, sarkom, melanom, léčení, devitalizace

SUMMARY

Devitalisation is a surgical-immunological method used for the treatment of solid tumours. The blood supply to the tumour (both arteries and veins) is surgically ligated and the tumour is left *in situ* in the body. i.e. it is not removed. The blood supply interruption causes necrosis of the ligated tissue. The disintegrating tissue will induce a reaction of the immune system destroying not only the original tumour but also all metastases. It does not matter whether the primary tumour or metastasis is tied off, the immune system reaction is always the same. However, since every tumour disease is connected with immunodeficiency, the immune system needs some support. The pioneer of this method was Dr. Karel Fortýn.

Devitalisation has been tested primarily in the Institute of Animal Physiology and Genetics of the Academy of Sciences in Liběchov.

First, experiments exploring the influence of devitalisation on healthy tissues were conducted. One or more parts of the gastrointestinal tract, specifically parts of stomach and small intestine or colon, were tied off and left in the body together with their content. Transformation to ligament always occurred in the ligated part and it was proved that devitalisation does not lead to sepsis and consequent death of the organism.

In 1989, a new animal model was developed in Liběchov – so-called MeLiM minipigs (Melanoma-Bearing-Liběchov-Minipig), i.e. minipigs with a predisposition to hereditary melanoma. These minipigs were used for the research of effects of devitalisation on tumorous tissues. Multiple foci of malignant melanoma with numerous metastases are frequent in the MeLiM minipigs. The tumours are of a tubero-nodular form and protrude above the body surface. In some animals (even within one litter) the tumours perished. The melanoma foci are present from an early age. Malignant tumours are dangerous for both pigs and humans due to an early and multiple distribution of metastases and because they react badly to both conventional chemotherapy and radiotherapy. Thus, the only solution was usually a radical surgical excision, but it is rather difficult to perform and often, unfortunately, unsuccessful due to an extensive distribution of cells. However, the treatment of malignant melanoma by devitalisation has brought very positive results. Both primary tumours and metastases disappeared in piglets, which underwent a surgery, and the weight and blood parameters of the animals adjusted. The method success-rate was over 90 %.

Another animals treated by devitalisation were female dogs with detectable carcinoma of the mammary gland. The devitalisation success-rate in these cases was lower, between 40 and 80 %, and depended on the age of the animals.

With such successful results, devitalisation was used as a method of palliating the pain in eight patients (people) with colon tumours and in two patients with colorectal tumours. Long-term disappearance of illness symptoms occurred in all patients, in some of them even metastases perished. Nevertheless, devitalisation has not yet been used extensively in human medicine, it is a subject of a further intensive clinical research.

Key words: pig, sarcoma, melanoma, treatment, devitalisation

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	CÍL PRÁCE	2
3.	LITERÁRNÍ REŠERŽE.....	3
3.1	Devitalizace	3
3.1.1	Obecně o devitalizaci – charakteristika metody.....	3
3.1.2	Vliv devitalizace na zdravou tkáň.....	4
3.1.3	Vliv devitalizace na nádorovou tkáň.....	8
3.1.4	Objevitelé devitalizace.....	12
3.2	Buněčná smrt.....	14
3.2.1	Reverzibilní a ireverzibilní poškození buněk.....	14
3.2.2	Apoptóza.....	14
3.2.3	Nekróza	15
3.3	Imunitní systém.....	20
3.3.1	Makrofágy	20
3.3.2	Cytotoxické T – lymfocyty	21
3.3.3	Interferony	22
3.3.4	Interleukin 2	22
3.3.5	Proteiny teplotního šoku (heat shock proteins)	22
3.3.6	Tumor necrosis faktor α	23
3.4	Maligní melanom.....	23
3.5	Selata MeLiM.....	26
3.6	Provádění devitalizace u dalších druhů zvířat.....	27
4.	ZÁVĚR.....	30
5.	SEZNAM LITERATURY	31
6.	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	35

1. ÚVOD

Devitalizace je jednoduše a levně proveditelná imunochirurgická metoda užívající se k léčbě solidních tumorů.

Nádor, kterému se podvázají tepny, žíly i lymfatické cévy, se ponechává v těle *in situ* (na místě) a chirurgicky se neodstraňuje. Dochází k nekróze, která nabudí imunitní systém, jež zničí podvázaný nádor i všechny metastázy. Nádory se změní ve vazivovou tkáň. Tento proces probíhá bez ohledu na to, zda je podvázan primární nádor nebo některá z metastáz. K podvázání lze tedy využít nejlépe dosažitelný nádor.

Ohledně devitalizace probíhalo a probíhá mnoho experimentů na zvířatech a odoperováni byli i lidští pacienti.

Devitalizace by mohla být jednou z léčebných metod některých forem rakoviny.

2. CÍL PRÁCE

V této práci budou pomocí dostupné literatury zpracovány poznatky a zkušenosti o vlivu devitalizace na zdravou a nádorovou tkáň v provedených experimentech a výsledky devitalizace při léčbě prasat i dalších savců. Rovněž budou prezentovány i imunologické a buněčné aspekty této metody.

3. LITERÁRNÍ REŠERŽE

3.1 Devitalizace

3.1.1 Obecně o devitalizaci – charakteristika metody

Devitalizace je originální imunochirurgická metoda použitelná v léčbě solidních tumorů i chronických zánětů nereagujících na běžnou léčbu (26 - TV, 2002). Jde o úplnou ischemizaci nádoru tím, že se nádor nad svou bází podváže částečně se překrývajícími matracovými stehy. Podvázány jsou jak tepny, tak žíly patřící k nádoru. Podvázaný nádor se neodstraňuje, ale nechává se v organismu tzv. *in situ* a slouží jako zdroj antigenů pro stimulaci specifické imunitní reakce (Horák et al., 2009). Dochází k nekróze a rozpadající se tkáň aktivuje buňky imunitního systému, které nejen že zničí celý podvázaný nádor, ale rovněž i všechny metastázy. Je jedno, zda byl podvázán primární nádor nebo některá z metastáz, výsledek je vždy stejný. Podvázaný nádor se během dvou měsíců od podvázání vstřebá a je nahrazen vazivovou tkání (Hruban et al., 2004).

Vzhledem k tomu, že u devitalizace hraje imunitní systém klíčovou úlohu, je třeba, aby pacient buď před devitalizací neabsolvoval chemoterapii vůbec, nebo jí absolvoval před dostatečně dlouhou dobou. Z toho důvodu, aby byl imunitní systém zachovaný nebo se před zákrokem dostatečně obnovil. Je rovněž důležité imunitní systém podpořit v každém případě, neboť každé nádorové onemocnění je spojeno s imunodeficitem (26 - TV, 2002).

Obecně přijímané chirurgické dogma, totiž že nádor zbavený své výživy a ponechaný *in situ* vede k sepsi a následně ke smrti léčeného, se nikdy u devitalizace nepotvrdilo (27 - Ro, 2002).

Devitalizace se provádí především v ÚŽFG v Liběchově na miniprasatech s vrozenými melanoblastomy a metastázami, dále pak na tomtéž místě na laboratorních potkanech a byla zkoušena rovněž na nízkém počtu králíků (4 kusy). Dále jsou s ní často ošetřovány feny s rozsáhlými karcinomy mléčné žlázy (Joachimová a Svoboda, 2002; 25 -

TV, 2002). Někdy je používána, byť tajně, i u lidí, především s pokročilými stádii rakoviny (Joachimová a Svoboda, 2002).

Na závěr této podkapitoly uvádím citaci doktora Fortýna: „Je to jednoduchá, ale účinná léčba některých druhů rakoviny. Podvázaný nádor zbavený výživných cév se změní v útvar, který podnítl funkci buněk v imunitním systému a ty odbourají nejen samotný nádor, ale i druhotná metastatická ložiska.“ (26 - TV, 2002).

3.1.2 Vliv devitalizace na zdravou tkáň

Vliv devitalizace na zdravou tkáň byl posuzován v experimentu, kdy se podvazovaly cévy různých částí gastrointestinálního traktu zásobující zvolený segment. Vždy byla provedena vhodná anastomóza, aby nedošlo k přerušení kontinuity GITu (gastrointestinálního traktu). Vybraný segment bez vaskularizace byl ponechán i se svým obsahem *in situ* a nebyl odstraněn. Celkem bylo operováno 84 prasat, v 66 případech se podvazovalo tenké nebo tlusté střevo, ve 12 žaludek a u 6 zvířat byla podvazována část rekta nebo rektosigmoidea. Žádné zvíře neuhynulo z důvodu nekrózy devaskularizovaného segmentu (Fortýn a kol., 1989a). Docházelo k postupné nekróze, absorpci a nahrazení devitalizované tkáně tkání vazivovou, to vše bez zdravotních komplikací jako je horečka či sepse a bez úmrtí zvířat (Horák et al., 2009).

V experimentální části bylo tedy odoperováno celkem 84 zdravých prasat různého věku (od 3 měsíců do dospělosti) a různé hmotnosti (od 10 do 40 kg) (Fortýn a kol., 1989a).

Technika devaskularizace: Co se týká operací střev, byly podvazovány mezenteriální případně kolické cévy a úseky takto izolovaného střeva (délka podvazovaného tenkého střeva byla od 30 cm do 160 cm; sigmoidea 10 cm a slepého střeva 12 cm) od mesenteria nebo mesocolon byly na obou koncích dvojnásobně podvázaný a přešity seromuskulárním stehem. Celý podvázaný izolovaný úsek byl včetně svého obsahu ponechán na původním místě. Spojení krevního zásobení bylo provedeno pomocí anastomóz. Operované části střeva byly lačnick, kyčelník, slepé střevo, tračnick, vše zvlášť. Dále současně na slepém střevu a kyčelníku a také zároveň na kyčelníku a slepém střevu a tračnicku (zde byl nejkratší podvázaný úsek 140 cm a nejdelší 180 cm). U žaludku bylo podvázáno 60-75% kraniální nebo kaudální části. Podvázáli se hlavní žaludeční cévy (*vasa gastrica dextra et sinistra* a *vasa gastroepiploica*

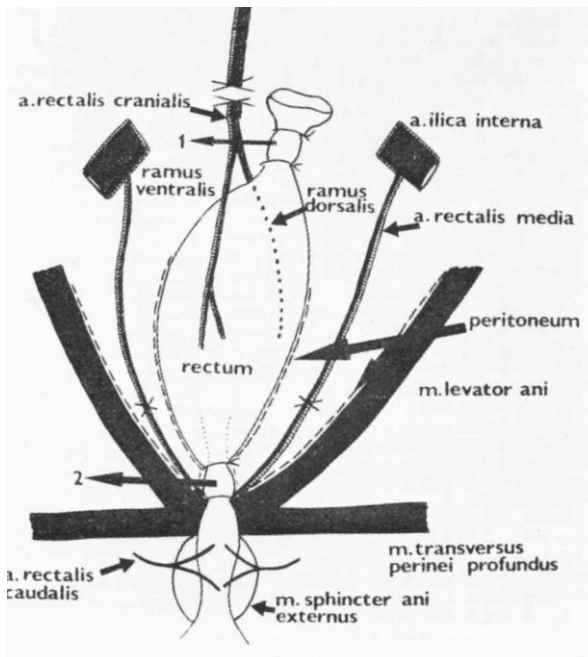
dextra et sinistra) (Fortýn et al., 2001). Byla provedena anastomóza nepodvázané části žaludku se střešní kličkou (Fortýn a kol., 1989a). Operace konečníku, rektosigmoidea a provedené anastomózy, viz obrázky na konci podkapitoly.

Nekrotické změny v devaskularizované tkáni byly sledovány morfologicky a pomocí laparoskopie byly v různých časových intervalech odebírány vzorky na histologické vyšetření. Po operacích tenkého a tlustého střeva byly intervaly 1. -7. den po operaci a dále 2.,3.,4.,6.,8. a 12. týden. Zvířata, která měla operovaný žaludek, byla utracena 3-5 měsíců po provedení zákroku a vzorky byly získány vzápětí. Tam, kde byla provedena devaskularizace rekta a rektosigmoidea, došlo k odebrání vzorků při rušení kolostomie, po 12 týdnech (Fortýn a kol., 1989a).

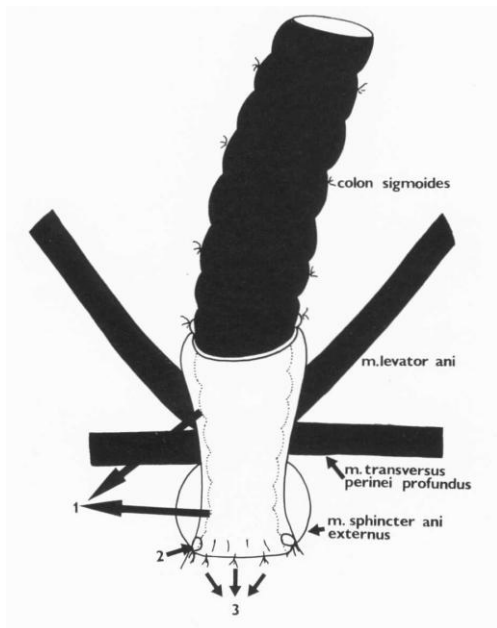
Výsledky: žádné ze zvířat neuhynulo na následky devaskularizace. 4 úhyny zvířat, ke kterým došlo, nesouvisely s devaskularizací. Pooperační období zvládala všechna zvířata dobře, byla bez významných klinických projevů. U zvířat, kterým byl podváznán žaludek, došlo k výraznému snížení hmotnosti (Fortýn et al., 2001). Z operovaných částí gastrointestinálního traktu bylo po 3 týdnech vidět pouze několika centimetrový vazivový útvar a za 5-6 týdnů po operaci se tkáň proměnila v těžko rozeznatelné vazivové ztlustění (Fortýn et al., 1989b). První týden po operaci byl v břišní dutině přítomný serosně-fibrinosní exsudát a během dalšího týdne se zcela vstřebal. Při zániku nekrotického střeva nebyla přítomna infekce a zánik probíhal v přesně vymizených anatomických hranicích (Fortýn a kol., 1989a).

Histologicky byla v prvních 5 dnech pozorována polymorfonukleární infiltrace (pronikání) od serózy směrem do lumina a intenzivní autolýza sliznice. Okolo 6. dne byla infiltrace polymorfonukleáry ukončena a nastoupila infiltrace lymfocyty a makrofágy. Nekrotická tkáň se začala měnit ve vazivo. Později nekróza úplně zmizela, stejně tak se snížil i počet lymfocytů a postupně se dokončila přeměna podvázaného úseku trávicího traktu ve vazivo. Ve vzorcích podvázaných žaludků byly nalezeny ostrůvky vaziva s novotvořenými kapilárami. U všech prasat s provedenými proctosigmoideo-anastomózami byla zachována kontinence. Co se týká biochemických výsledků, bylo během prvního týdne po devaskularizaci zjištěno snížení aktivity aminotransferáz (GOT, GPT) a laktátdehydrogenázy (LDH) (Fortýn a kol., 1989a).

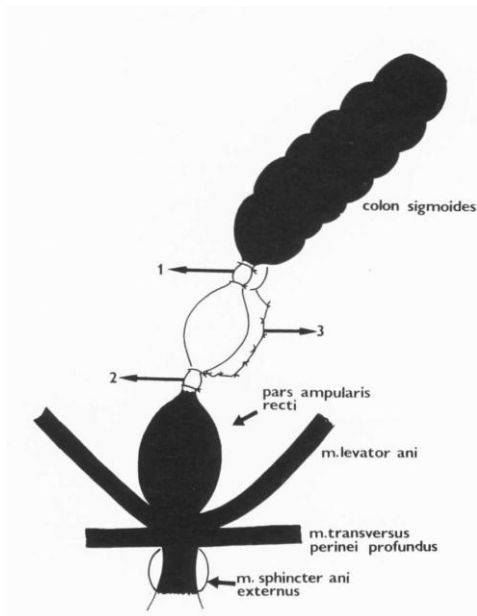
Vzhledem k úspěšným výsledkům byla potom provedena devitalizace jako bolest zmírňující zákrok v lidské onkochirurgii u 8 pacientů s nádory levé nebo pravé části tračníku a dalších 2 pacientů, kteří měli kolorektální tumor. U všech nemocných došlo k dlouhodobému vymizení projevů nemoci (remisi), u některých dokonce vymizely metastázy. Pokud do doby vydání článku nastalo úmrtí, nebylo nikdy z důvodu následků propagace nádoru (Fortýn a kol., 1989a).



Devaskularizace rekta: **1** – místo stehů v kranální části rekta; **2** – místo stehů v kaudální části rekta (Fortýn et al., 1989b).



Proktosigmoideo-anastomóza: **1** - sigmoideum bylo protáhnuto rektem a **2** - jeho seromuskulární vrstva byla přišita k mukóze anální části **3** - Koncová část mukózy sigmoidea pak byla přišita ke kůži análního otvoru (Fortýn et al., 1989b).



Devitalizace rektosigmoidea: **1** - přerušení rektosigmoidea v kranální a **2** - kaudální části **3** – sešité cévy v devaskularizovaném úseku (Fortýn et al., 1989b).

3.1.3 Vliv devitalizace na nádorovou tkáň

Po ověření toho, že devitalizace nevyvolá v těle operovaného sepsi a smrtelné komplikace se mohlo přistoupit k experimentům na zvířatech, které sledovaly vliv devitalizace na nádorovou tkáň. Nejvíce pokusů bylo provedeno na miniprasatech MeLiM vyšlechtěných ve výzkumném pracovišti Akademie věd v Liběchově. Zkoušela se především devitalizace maligního melanomu.

U všech zvířat byl pozorován různý počet kožních tumorů charakteru maligního melanomu tubero – nodulární formy (*melanoma nodulare*), které většinou silně vystupovaly nad povrch okolní kůže jako hrbolovité útvary. Zasahovaly až ke svalové povázce (fascii). Obvykle byly mnohačetné. U všech zvířat byly navíc pozorovány povrchově se šířící formy melanomů (*melanoma superficiale, lentigo maligna melanoma*), které ale vzhledem k velké variabilitě, co se týká rozsahu, velikosti a tvaru nemohly být zahrnuty do studie. U všech zvířat byly zaznamenány rozsáhlé metastázy v regionálních lymfatických uzlinách, na játrech a na slezině. Ojedinele pak byly metastázy na ledvině, na tenkém střevě, na tlustém střevě a na žaludku. Nádorové změny byly obvykle viditelné na kůži selat od dvou měsíců s tím, že se s rostoucím věkem rostlo množství nádorů. Rozměry nádorů byly velmi variabilní (Fortýn a kol., 1994b). Velmi vzácně byly pozorovány i metastázy v srdci, aortě a na bránici (Fortýn et al., 1998).

Devitalizace jednoho kožního tumoru, která se provedla sérií částečně se překrývajících matracových stehů v řetězech vedenými kolem báze nádoru, a ponechání tohoto nádoru *in situ* v těle bez následné excize (vyříznutí) vedla k totální destrukci všech melanomových buněk v kožních nádorech i metastázách (Fortýn a kol., 1995; Horák et al., 2003). Směrem do hloubky (3 – 4 cm) (Fortýn et al., 1994a) stehy dosahovaly pod vrstvu podkoží (*tela subcutanea*). Po pevném dotažení série stahů následovalo jejich zauzlování, což vedlo k mírnému zvednutí nádoru nad povrch, přerušení cévního zásobení z podkoží a tím k devitalizaci tumoru cestou ischemizace (devaskularizace) (Fortýn a kol., 1995).

V případě hmatatelných metastáz v lymfatických uzlinách byl proveden povrchový řez, preparace uzliny při zachování hilové oblasti a následně podvázání tepen, žil i lymfatických cév. Uzlina se ponechala *in situ* a chirurgický řez byl zašit. Pokud byly přítomny orgánové či peritoneální metastázy, byly ponechány intaktní, pouze byl z 1-2

metastáz z každého orgánu odebrán kousek tkáně na histologické vyšetření (Fortýn a kol., 1995).

Histologicky byly před devitalizací v tkáni zasažené melanomem pozorovány husté provazcovité útvary melanoblastů jdoucí od bazální membrány přes pokožku (*epidermis*) až po škáru (*korium*). Na periferii byly viditelné formace melanoblastů okrouhlého tvaru se světlými jádry a zřetelnými jadérky. V nádorových buňkách byl melanin hustě nakupen. Pokožka byla úplně dezintegrována a ztenčená. Směrem do periferie tumoru se vracela normální podoba škáry a kolagenní vazivo bylo uspořádáno do snopců. Vrstva podkoží (*tela subcutanea*) byla ztenčená a melanoblasty obsahovala jen ojediněle (Fortýn a kol., 1995).

Za 4 – 8 týdnů po devitalizaci byla škára ztenčená a tvořila tuhý pruh jizevnaté vazivové tkáně, melanoblasty nebyly přítomny. Nádorové buňky nebyly prokazatelné (Fortýn a kol., 1995). U lymfatických uzlin nebylo možné díky hustě nakupeným melanoblastomům rozeznat normální strukturu lymfonodů, bylo vidět pouze fibrózní pouzdro uzliny a řídké pojivo v okolí. 4 týdny po devitalizaci zbyl z uzlin pouze sotva rozeznatelný vazivový útvar, v jehož podkoží nebyly známky nádorových buněk (Fortýn a kol., 1995).

Játra v místě metastáz pod vazivovým pouzdem obsahovala shluky melanoblastů, které se rozšiřovaly do interlobulárního pojiva. Směrem do centra jaterního parenchymu známky metastáz chyběly. Po devitalizaci byla nalezena vazivová ložiska s atypickými jaterními buňkami bez přítomnosti melanoblastů. Vazivové změny a vymizení nádorových buněk bylo pozorováno i v případě metastáz na slezině, ledvinách a gastrointestinálním traktu (Fortýn a kol., 1995).

Ve všech kožních nádorech i ve všech lymfatických uzlinách napadených metastázami byl histologicky pozorována postupná přestavba nádorové tkáně ve vazivovou, ačkoliv nádorová regrese není obvyklá (Fortýn et al., 1994a; Horák et al., 2008). Přeměna metastáz ve vazivovou tkáň byla pozorována při druhé nebo třetí laparotomické revizi (4. -8. týden) (Fortýn a kol., 1995). Laparotomie i devitalizace byly vždy prováděny v celkové anestézii (Horák et al., 2009). Přeměna na vazivo byla ukončena 4-6 měsíců po devitalizaci (Horák et al., 2008) a po jejím dokončení se hodnoty hematokritu vrátily k normálu a upravil se i váhový úbytek (Holubová et al., 2009).

Byly zjištěny normální hodnoty IgA, IgM, IgG1 a IgG2 imunoglobulinů v séru a zvýšené hodnoty T-lymfocytů. To napovídá, že devitalizace nádoru vyvolá v těle T-buněčnou protimelanomovou imunitní reakci, která zodpovídá za destrukci nádoru (Horák et al., 2003).

Devitalizační léčba miniprasat měla úspěšnost kolem 80% a žádné recidivy nebyly pozorovány (Horák et al., 2008).

Jediným postranním efektem léčby bylo to, že po jejím dokončení došlo k variabilnímu zbělení štetin a kůže nad operovanými místy (Holubová et al., 2009). Okolní kůže a ochlupení mělo zachováno normální tmavou pigmentaci (Fortýn a kol., 1995).

Sledování účinku devitalizační techniky u miniaturních prasat (souhrn experimentálních výsledků), viz tabulka.

SLEDOVÁNÍ ÚČINKU DEVITALIZAČNÍ TECHNIKY U MINIATURNÍCH PRASAT
(SOUHRN EXPERIMENTÁLNÍCH VÝSLEDKŮ)

DEVITALIZOVANÁ TKÁŇ nebo ORGÁN	POČET ZVÍŘAT (ks)	ÚHYN (ks)	PŘÍČINA	ÚSPĚŠNOST (%)	POZNÁMKA
jejunum	14	---		100	jedinci bez nádorů
ileum	14	1	1x pneumonie (6.den)	93	jedinci bez nádorů; uhynul nebyl důsledkem devital
colon	7	---		100	jedinci bez nádorů
coecum	10	1	1x ileosní stav (masivní askariida)	90	jedinci bez nádorů; uhynul nebyl důsledkem devital.
ileum + coecum	7	---		100	jedinci bez nádorů
ileum + coecum + colon	4	---		100	jedinci bez nádorů
sigmoideum	8	---		100	jedinci bez nádorů
rectum	6	---		100	jedinci bez nádorů
žaludek	25	2	1x peritonitida (6.den - netěsnost anastomózy) 1x flegmona jazyka (10.den)	92	jedinci bez nádorů; žádný z uhynul nebyl způsoben devitalizací
1/2žaludku+slezina+2/3sliniv.	1	---		(jen 1 jedinec)	jedinec bez nádorů
slezina	1	---		(jen 1 jedinec)	jedinec bez nádorů
ledvina - celá	18	---		100	jedinci bez nádorů
- segmentální	29	---		100	jedinci bez nádorů
játra	1	---		(jen 1 jedinec)	jedinec bez nádorů
plice	5	---		100	jedinci bez nádorů
melanom -jeden z kožních nádorů	59	6	1x dehydratace (2.den), 1x histamin. šok (1.den), 1x pneumonie (2 měsíce po devit.), 2x progresse melanomu	90	pouze 3 z uhynul byly způsobeny progresí melanomu !; přežívání až 10 měs. (ukončení pokusu) nebo až 6 let (v chovu) bez recidivy nádoru
-část sleziny s metastáz.	13	---		100	přežívání až 10 měs. (ukončení pokusu) nebo až 6 let (v chovu) bez recidivy nádoru
-uzlina s metastázami	7	---		100	přežívání až 10 měs. (ukončení pokusu) nebo až 6 let (v chovu) bez recidivy nádoru

3.1.4 Objevitelé devitalizace

Karel Fortýn se narodil v Praze 17. dubna 1930, jeho rodina pocházela z Florencie a do Čech přišla v roce 1760 (Joachimová a Svoboda, 2002).

Malý Karel chodil do přírodopisného kroužku a byl i členem veslařského klubu Vltavan. Po svých předcích zdědil i svoji muzikálnost, od mládí psal skladby pro klavír, zpěv i orchestr. Po absolvování vinohradského gymnázia nastoupil na lékařskou fakultu. Již od prvního semestru věděl, že se chce věnovat chirurgii. Z toho důvodu pracoval v anatomickém ústavu profesora Borovanského v několika funkcích, od volontéra až po asistenta (Joachimová a Svoboda, 2002).

V březnu 1955 v Praze promoval, a protože trval na chirurgické specializaci, odešel do nemocnice v Aši, kde bylo jediné volné místo. Tam se také seznámil s mladou lékařkou, kterou si o rok později vzal. Narodili se jim dva synové a Karel Fortýn během života pracoval na chirurgickém oddělení ve více nemocnicích (Joachimová a Svoboda, 2002).

V roce 1957 se mu na operační stůl sokolovské nemocnice dostal pacient s průstřelem břicha. Po otevření břišní dutiny spatřil trávicí soustavu zasaženou rozsáhlým nádorem včetně několika metastáz. Rozhodl se k nestandardní metodě – podvázal cévy, které nádor vyživovaly a to jak tepny, tak žíly. Udělal to kvůli tomu, aby si trochu zpřehlednil operační pole a muž tolik nekrvácel. S tím, že pokud by pacient přežil, zkusil by se znovu podívat, jestli jde s nádorem něco dělat. Pacient průstřel nakonec skutečně přežil. Jaké však bylo překvapení mladého lékaře, když se ukázalo, že bez zásobení živinami a kyslíkem podvázaný nádor nejen odumřel, vstřebal se a byl nahrazený vazivovou tkání, ale zmizely rovněž všechny metastázy (Joachimová a Svoboda, 2002).

Když chtěl MUDr. Fortýn touto metodou odoperovat i další pacienty, kteří měli inoperabilní nádory, setkal se s naprostým odmítnutím ve všech nemocnicích kromě jeho posledního pracoviště, kterým byla nemocnice v Semilech, kde mohl úspěšně odoperovat několik pacientů (Joachimová a Svoboda, 2002).

Své myšlenky se ale doktor Fortýn nevzdal a devitalizaci a její účinky na zdravou a později i nádorovou tkáň začal od roku 1971 zkoumat v ÚŽFG v Liběchově. Zkoumanými objekty byla ve většině případů miniprasata s vrozeným melanoblastomem, v menší míře pak

byly testy prováděny na laboratorních potkanech a na králících. Úspěšnost devitalizace byla 95% (Joachimová a Svoboda, 2002).

Ačkoliv se nikdy nepotvrdilo chirurgické dogma, že nádor bez cévního zásobení ponechaný v organismu, způsobí sepsi a následnou smrt jedince, devitalizace byla stále zavrhována. Zoufalý Fortýn se rozhodl publikovat výsledky liběchovského výzkumného týmu prostřednictvím laických medií, neboť naprostá většina lékařské veřejnosti metodu stále zavrhovala. To vedlo aspoň k nějaké diskusi, neboť nyní odborná veřejnost již musela zareagovat. Do Liběchova se začali sjíždět i zájemci z řad lékařů, které metoda zaujala. Námitky oponentů však byly nyní vedeny v tom smyslu, že výzkum je příliš jednostranně zaměřený. Proto byl vybrán další objekt, na kterém se devitalizace testovala. Šlo o feny s prokázaným (verifikovaným) karcinomem mléčné žlázy. Opět s velmi dobrými výsledky. Ovšem ani toto odpůrce nepřesvědčilo (Joachimová a Svoboda, 2002).

Laická veřejnost byla ale po odvysílání pořadu Klekánice na ČT na podzim 2000 v entuziasmu. Do Liběchova volalo denně mnoho lidí, kteří chtěli devitalizaci vyzkoušet. Autoři měli hodně práce s tím, vysvětlovat, že ani tato metoda není spásou pro všechny nemocné. Konečně se také začalo přemýšlet nad metodikou prvních klinických zkoušek. Vypadalo to, že se všechno zlepší (Joachimová a Svoboda, 2002).

Jednání už ale probíhala bez doktora Fortýna, který zemřel na plicní embolii 4. ledna 2001 (Joachimová a Svoboda, 2002).

V testech na miniprasatech i jiných živočišných modelech se pokračuje i nadále, několik lidí bylo pomocí devitalizace operováno a ač šlo podle klasické medicíny o beznadějné případy, uzdravili se. Nyní výzkum v Liběchově vede dlouholetý spolupracovník MUDr. Karla Fortýna, RNDr. Vratislav Horák z Akademie věd ČR (Joachimová a Svoboda, 2002). (Obrázky MUDr. Karla Fortýna a RNDr. Vratislava Horáka, viz příloha číslo 1 a 2.)

Ještě je třeba zmínit, že druhý kořen výzkumu devitalizace pochází ze 60. let minulého století, kdy v Československé Akademii věd prováděli pokusy Dr. Holdovský a Dr. Svoboda. Používali vždy dvě identické myši a u jedné z nich vyvolali chemickou cestou nádor. Ten potom přenesli do kůže druhé myšky. Jestliže se potom tento nádor přihojil a oni ho pomalu podvazovali, tak nádor pochopitelně zmizel, ale ve chvíli kdy znovu té samé myšce přenesli tentýž nádor, tak ona už ho okamžitě odhojila. Tím tito pánové dokázali, že podvazováním lze

vyvolat ochrannou imunitu proti nádoru. V těchto pokusech už se potom dále nepokračovalo (27 - Ro, 2002).

3.2 *Buněčná smrt*

3.2.1 Reverzibilní a ireverzibilní poškození buněk

Buňka může být poškozená nejrůznějšími vlivy, například infekcemi, toxiny nebo ischemií. K vlivům, které buňku poškozují, můžeme dále zařadit třeba hypoxii (nedostatek kyslíku), fyzikální a chemické příčiny, genetické poruchy a nutriční nerovnováhu. Poškození buňky může být reverzibilní (vratné) nebo ireverzibilní (nevratné) (Daum, 2010).

Základními znaky reverzibilního poškození jsou edém (otok) a ztukovatění buňky. Edém nastává z toho důvodu, že buňka není díky poškození plasmatických iontových pump schopna udržet iontovou homeostázu. Tuková degenerace (steatóza) obvykle vzniká při hypoxickém, toxickém nebo metabolickém poškození buňky (Daum, 2010).

Ireverzibilní poškození (buněčná smrt) provází výrazné morfologické změny - je zde rozsáhlé poškození buněčných membrán, edém lysozomů a vakuolizace mitochondrií. Klíčová je právě ztráta funkce buněčných membrán a neschopnost buňky opravit poškození mitochondrií - není možné fosforylací vytvářet ATP a tedy přenášet energii v buňce. Dva základní způsoby buněčné smrti jsou apoptóza a nekróza (Daum, 2010).

3.2.2 Apoptóza

Apoptóza je typ buněčné smrti, která postihuje izolované buňky. Je to aktivní proces, při kterém se spotřebovává energie. Říká se jí buněčná sebevražda nebo programovaná buněčná smrt, protože je to řízený proces. Je spojena s aktivací genů a proteosyntézou. Inhibici apoptózy způsobuje bcl2-onkoprotein, který tím přispívá k buněčnému přežití.

Onkoprotein p53 apoptózu normálně stimuluje, ale pokud dojde k jeho mutaci, podporuje přežívání nádorů. Tento protein nacházíme v řadě maligních nádorů (Daum, 2010).

Apoptóza je přirozenou součástí embryogeneze, účastní se také při normální buněčné a tkáňové obnově, například v enterocytech a při hormonálně stimulované atrofii (atrofie mléčné žlázy v menopauze a prostaty při snížení hormonální stimulace). Patologicky se vyskytuje u buněk napadených viry nebo při regresi nádorových buněk (Daum, 2010). Některé současné terapeutické postupy v léčbě nádorů se snaží růst nádoru zastavit využitím látek, které navozují proces apoptózy (Mačák, 2002).

V mikroskopu je pozorovatelná nápadná redukce objemu buňky, která vzniká velmi rychle. Tuto změnu způsobuje vylití původně intracelulárního vápníku. Fragmentace DNA endonukleázou způsobí, že se kondenzuje plazma i jádro. Vznikají apoptická tělíska, která jsou fagocytována okolními buňkami a makrofágy. Tělíska jsou složená buď pouze z fragmentů jádra s kondenzovaným chromatinem, nebo z části jádra a z plazmy se zachovalými organelami (Daum, 2010). Apoptická tělíska morfologicky odlišují nekrózu od apoptózy (Mačák, 2002).

3.2.3 Nekróza

Nekróza je intravitální odumření tkáně. V okolních buňkách dochází k zánětlivým reakcím a autolytickým sekundárním změnám. Tímto se nekróza liší od apoptózy. Morfologické změny ve tkáni jsou důsledkem autolýzy a heterolýzy. Autolýza je degradace tkáně katalytickými enzymy uvolněnými z nekrotických buněk a heterolýza je degradace tkáně způsobená leukocyty, makrofágy a enzymy uvolněnými přímo z poškozené buňky (Daum, 2010).

Mikroskopicky jsou patrné změny v jádře buňky a v buněčné cytoplazmě. V jádře dochází nejprve ke kondenzaci jaderného chromatinu a tím ke zmenšení jádra. Následuje rozpad jádra a fragmentace jaderného chromatinu (Daum, 2010). Výsledkem nekrózy je nepřítomnost jader v buňkách (Mačák, 2002). V cytoplazmě dochází poklesem proteosyntézy ke ztrátě přirozené basofilie, plasma se stává eozinofilní (Daum, 2010).

Sekundárně modifikovanou nekrózou je gangréna. Ta se rozlišuje suchá, vlhká a plynatá (Daum, 2010).

Typy nekróz a jejich charakteristiky.

typ nekrózy	makroskopický vzhled	patogeneza	mikroskopický vzhled	výskyt	hojení
n. prostá	žádné podstatnější změny		jádra ztrácí barvitelnost, plazma se oxyfiluje	kůže a příčně pruhované svaly (barva je světle hnědočerná), tkáň má vzhled vařeného masa, často se trhá a vznikají hemorhagie	
n. koagulační	tkáň je tuhá konsistence, suchá a zkalená (je prostoupena bílkovinami z cév, které ve tkáni koagulují → tkáň ztrácí vodu), rozvinutá nekróza má jílovitou barvu; v okolí vyvinuté nekrózy je výrazné překrvení (úzký proužek tmavočervené barvy)	způsobená nejspíše buněčnou acidosou-ta blokuje enzymy a procesy heterolýzy a autolýzy jsou opožděné	jádra se nebarví, tkáňové a buněčné obrysy jsou vidět dlouho; tvorba nespecifické granulární tkáně, výrazná reakce makrofágů	typický je <i>infarkt</i> , tj. koagulační nekróza při uzávěru cévy; vyskytuje se v parenchymových orgánech (myokard, játra, ledviny, slezina)	jizvou
n. kolikvační	ložisko rozměklé, rychlé zkapalnění nekrotické tkáně	zkapalnění výsledkem autolýzy (působení enzymů ze zanikajících buněk), heterolýzy (enzymy okolních tkání, hlavně		mozek (encefalomalacie), mícha (myelomalacie), pankreas, ledvina	pseudocystou – dutina vzniká postupným odbouráváním nekrotické tkáně fagocytujícími

			leukocytů) a prosakováním tkáňového moku		elementy	
n. kaseózní(=kaseifikační)	konzistence křehká, sýrový vzhled, bělavě-žlutá barva, homogenizace tkáně, absolutní ztráta původní struktury tkáně			fragmenty chromatinu jsou barvitelné dlouhou dobu (šedomodrá barva); kolem je specifická granulární tkáň- vícejaderné Langhansovy buňky, lymfocyty, epiteloidní histiocyty, plasmocyty	<i>tuberkulóza</i> , pozdní stadium syfilis, tzv. gumata	kalcifikací
n. hemorrhagická(=druh koagulační nebo kolikvační nekrózy, v případě, že nekrotické ložisko je sekundárně prostoupeno větším množstvím erytrocytů)	výrazné prokrvácení nekrotické tkáně		-erytrocyty mohou prosakovat poškozenými cévami z kolaterál do nekrotické tkáně(častější) - vzniká při nekróze ve tkáni, která byla předem překrvená		hemorrhagický infarkt mozku, hemorrhagická nekróza pankreatu	
Zenkerova vosková n.				trhání a hrudkovité rozpadání cytoplazmy	postihuje zejména přičně pruhované svaly; vyskyt při některých infekčních onemocněních (tetanus, tyfus, chřipka, Weilova žloutenka	

fibrinoidní n.			červenější než okolí, granulomatózní zánětlivá reakce (vzniká reakcí okolní tkáně a buněk)	<i>autoimunitní onemocnění</i> (polyarteritis nodosa, revmatická onemocnění), spodina vředů žaludku a duodena	
----------------	--	--	--	---	--

3.3 Imunitní systém

Devitalizace je vlastně chirurgický zákrok, který má nastartovat imunitní reakci organismu. Imunitní systém reaguje jinak v klidovém stádiu a jinak v ohrožující situaci. Podvázané umírající nádorové buňky začnou vysílat signál, že jsou ohrožením pro celý organismus a na to imunitní systém reaguje (26 - TV, 2002).

Imunitní systém je potřeba při léčbě podpořit neboť každé nádorové onemocnění, ať už s aplikací cytostatik nebo bez ní, vede k imunodeficienci (oslabení imunitního systému) (26 - TV, 2002).

Co se týká chemoterapie, není pravda, že je úplnou kontraindikací devitalizace. Musí ale probíhat dostatečně dlouho dopředu, aspoň 3 – 6 měsíců, aby se mohl imunitní systém regenerovat a zároveň je samozřejmě třeba ještě větší podpora imunitního systému (26 - TV, 2002).

Níže jsou uvedeny buňky imunitního systému podílející se na devitalizaci a jejich význam.

3.3.1 Makrofágy

Makrofágy jsou konečným stádiem při vývoji monocyto-makrofágové linie. Monocyto-makrofágové buňky se diferencují v kostní dřeni z myeloidního prekursoru, který vzniká z pluripotentní kmenové buňky (CD 34). Zralé monocyty jsou průběžně vyplavovány do periferní krve, přilnou k cévní stěně, následně se protáhnou mezi buňkami cévního endotelu a přecházejí z cév do tkání, kde je zánět. Tam se mění na makrofágy. Do místa zánětu jsou monocyty směřovány chemokiny. Obvykle se v periferní krvi nachází 7% monocytů a zbytek je v kostní dřeni. Tento poměr se ale mění vlivem cytosinů a bakteriálních produktů (Hořejší a Bartůňková, 2005). Podle lokalizace rozeznáváme makrofágy jaterní (Kupferovy buňky), plicní (alveolární), v CNS (mikroglie), v pojivové tkáni (histiocyty), v lymfatických uzlinách (interdigitující dendritické buňky) a v kostní tkáni (osteoklasty) (Ochotná, 20. 10. 2010). Vývoj makrofágů je ovlivňován cytokiny. Makrofágy jsou tkáňovou

formou monocytů. Jsou to vlastně základní buňky nespecifické imunity – tzv. fagocyty. Patří k antigen prezentujícím buňkám, to jsou buňky, které prezentují antigen v časně fázi specifické imunitní odpovědi. Makrofágy fagocytují pozůstatky vlastních buněk, které prodělaly apoptózu. Plně funkční jsou až po své aktivaci interferonem γ . Makrofágy vykonávají fagocytózu, produkují cytokiny, enzymy, složky komplementu, mikrobicidních, cytotoxických a tumoricidních látek a bioaktivních lipidů. Dále také prezentují antigenní peptidy v komplexu s MHC glykoproteiny I. a II. třídy a produkují cytokiny (Hořejší a Bartůňková, 2005).

3.3.2 Cytotoxické T – lymfocyty

T-lymfocyty obecně patří k buněčné složce specifické imunity. Vyvíjejí se z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky v kostní dřeni, kterou později opouští a migrují do brzlíku (thymu), kde dozrávají. Pomáhají třeba při likvidaci buněk napadených virem nebo nádorem. Dělí se na $\alpha\beta$ subpopulaci a $\gamma\delta$ subpopulaci. $\alpha\beta$ subpopulace T-lymfocytů je většina, 95%. Tyto lymfocyty ke svému vývoji potřebují thymus a rozeznávají antigeny v komplexu s MHC glykoproteiny (glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu). Podle toho, jaký koreceptor vylučují na svém povrchu, se tato populace dělí na dvě základní skupiny – na pomocné T-lymfocyty-Th-lymfocyty (T-helper lymfocyty; exprimují na svém povrchu molekulu CD4), které produkují cytokiny a pomáhají B-lymfocytům nebo makrofágům a na cytotoxické T-lymfocyty-Tc-lymfocyty (exprimují na svém povrchu molekulu CD 8), které rozeznávají buňky napadené virem nebo jinými intracelulárními parazity a některé nádorové buňky. $\gamma\delta$ subpopulace T-lymfocytů tvoří přibližně 5% ze všech T-lymfocytů a může se vyvíjet i mimo brzlík. Některé lymfocyty z této subpopulace jsou schopny rozeznat nativní antigen a uplatňují se při obraně kůže a sliznic (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Hodnoty cytotoxických T-lymfocytů i pomocných T-lymfocytů byly 1. -3. týden po operaci výrazně zvýšené. A to jak v neléčených kožních nádorech, tak v periferní krvi (Horák et al., 2008).

3.3.3 Interferony

Interferony jsou jednou velkou skupinou cytokinů a jde o glykoproteiny s přímým protivirovým a imunomodulačním účinkem. Protivirový účinek spočívá v omezení (inhibici) dělení buněk – nejde tedy přímo o specifický protinádorový účinek, neboť dochází k tlumení růstu buněk nádorových, ale i například buněk kostní dřeně. Kvůli výše zmíněnému má ale v protinádorové imunitní reakci své místo. Imunomodulační účinek se pak projevuje v aktivaci fagocytujících buněk (makrofágů), tzv. přirozených zabíječů (NK buněk) a cytotoxických T-lymfocytů (Ochotná, 29. 9. 2010).

Velký protinádorový vliv má především interferon α , který má účinky společné všem interferonům a zároveň zvyšuje v tkáních množství znaků typických pro tu kterou buňku, a které jsou přítomné na povrchových membránách té buňky. Nádorové buňky se tímto procesem stávají lépe rozpoznatelnými pro buňky imunitního systému (Hořejší a Bartůňková, 2005).

3.3.4 Interleukin 2

Interleukiny obecně jsou cytokiny, produkované TH0 a TH1 lymfocyty. Lymfocyty produkcí těchto cytokinů odpovídají na zánět probíhající v těle. V protinádorové imunitě má význam především Interleukin 2, jež vede ke zmnožení B-lymfocytů i T-lymfocytů v těle nemocného (Hořejší a Bartůňková, 2005; Ochotná, 29. 9. 2010).

3.3.5 Proteiny teplotního šoku (heat shock proteins)

Důležité při devitalizaci jsou HSP70 a gp 96, které se zjišťují průtokovou cytometrií a Western-blotem (Horák et al., 2003). Jejich hodnoty byly zvýšené již první den po operaci a během dvou týdnů se vrátili k normálu. Uvolnění proteinů teplotního šoku vyvolává buněčně zprostředkovanou protinádorovou imunitní odpověď (Horák et al., 2008).

3.3.6 Tumor necrosis faktor α

Uvolňuje ho nekrotizující tkáň a jeho vyplavování je jedním ze spouštěčů zánětlivého procesu (Daum, 2010). Jeho hodnoty po devitalizaci jsou tedy zvýšené (Fortýn et al., 1994a).

Dále se zjišťovaly i hodnoty leukocytů, které nádor produkoval (metodou byla průtoková cytometrie) a sérových imunoglobulinů (metoda SANDWICH – Elisa). Počet leukocytů byl kvůli zánětu zvýšený, počet imunoglobulinů byl v normě (Horák et al., 2003).

3.4 Maligní melanom

Maligní melanom je jedním z nejzhoubnějších nádorů (Štork a kol., 2008). Jde o vysoce maligní nádor vycházející z melanocytů (Povýšil a kol., 2007). Nejčastěji vzniká invazivní neoplastickou proliferací melanocytů v kůži (Štork a kol., 2008). Vzhledem k tomu, že se melanocyty nacházejí také v oku, oční spojivce, močovém měchýři, orgánech trávicí soustavy, plicích, vaječníku, srdeční svalovině a žlučníku, může se maligní melanom vyskytnout i v těchto orgánech (Povýšil a kol., 2007; Štork a kol., 2008). Jeho výskyt zde je ale mnohem vzácnější než v kůži. K podpůrným faktorům vzniku tohoto nádoru se řadí imunosupresivní a kancerogenní efekt slunečního záření (především jeho UV složka), familiární výskyt atypických névů (nahromadění melanocytů) nebo melanomu a geneticky podmíněné fototypy I a II (Štork a kol., 2008). To, že UV záření není jediným rizikovým faktorem je vidět i z toho, že maligní melanom se objevil i u 4 novorozenců selat a všechna pokusná zvířata byla trvale držena ve stáji bez dosahu přímého slunečního záření (Fortýn a kol., 1994b). Zpočátku může melanom vypadat u lidí jako nepravidelně zbarvené mateřské znaménko s nepravidelnými okraji, které se postupně zvětšuje a někdy může bolet. Později tvoří vředy (ulceruje) a je to obvykle tmavě zbarvený nádor (Povýšil a kol., 2007). Špatně reaguje na chemoterapii a konvenční radioterapii a hlavní léčbou bývá radikální chirurgické odstranění (excize) (Fortýn et al., 1994a). Jeho frekvence byla dříve udávána výskytem 5 případů z 100 000, podle některých zdrojů, je ale jeho nárůst až dvojnásobný. Z molekulárně genetických poznatků vyplývá, že by jeho vznik mohl souviset se ztrátou funkce tzv. tumor-

supresorového genu. Nebezpečný je vysokým počtem regionálních a systémových metastáz (Fortýn a kol., 1994b).

Důkazem jasné homologie mezi lidským a prasečím melanocytem by bylo srovnání DNA sekvence zodpovědného genu u prasat s lidským genem. Toto je však mimo současné vědecké možnosti. Schůdnější se jeví porovnání aktivity většinou monoklonálních protilátek reagujících s membránově specifickými a cytoskeletálními antigeny melanomů člověka a prasete (Fortýn a kol., 1994b).

Rozlišujeme 3 fáze růstu nádoru:

1. Melanom *in situ*: (intraepidermální fáze) (Povýšil a kol., 2007)

2. Fáze horizontálně radiálního růstu: v této fázi atypické melanocyty pronikají do vyšších vrstev pokožky (epidermis) a epidermálních oblastí, které jsou vzdálené od místa primární proliferace melanocytů. Během této fáze vznikají klony s různou rychlostí růstu a tvorby melaninu (Štork a kol., 2008).

3. Fáze vertikálního růstu: buňky jednoho z klonů, vzniklých v předchozí fázi, pronikají do škáry a tam se dále množí. Histologicky se v milimetrech měří hloubka invaze melanocytů od zrnité vrstvy (stratum granulosum) po nejhluběji uloženou nádorovou buňku. (Tento postup je známý pod názvem mikroskopické hodnocení podle Breslowa.) Toto měření je nezbytné k určení prognózy onemocnění. U hodnoty menší než 1,0 je riziko vzniku metastáz velmi nízké, méně než 10%, naopak u nádorů nad 4 mm je až 80%. S fází horizontálně radiálního růstu nádoru se pojí jeho biologicky nepříznivé vlastnosti (Štork a kol., 2008).

V současné době se rozlišují 4 základní typy maligního melanomu. Jsou to *lentigo maligna melanom*, *superficiálně se šířící melanom*, *nodulární melanom* a *akrolentigózní melanom* (Štork a kol., 2008). Kromě těchto typů melanomu rozlišujeme ještě *amelanotický melanom* (neobsahuje pigment) a další typy melanomu, např. *desmoplastický*, *neuroidní* atd.) (Povýšil a kol., 2007).

Průběh a prognóza u všech melanomů závisí na stupni diferenciaci primárního nádoru. Hodnotí se především tloušťka nádoru, hloubka invaze, povrchový vřed, mitotický index a stav sentinelových uzlin (Štork a kol., 2008).

Nodulární melanom tvoří 15 – 30% všech melanomů, a patří proto ke 2. nejčastěji se vyskytujícímu malignímu melanomu. Vzniká během několika měsíců na klinicky nezměněné kůži nebo v získaném, atypickém či kongenitálním névu (Štork a kol., 2008).

Makroskopicky jde o nepravidelný, obvykle polokruhovitý hrbol různé velikosti. Je nepravidelně pigmentovaný a ve většině případů široce přisedá ke kůži. Povrch je buď hladký, nebo se olupuje, dochází ale k rychlé erozi, krvácení a pokrytí hemoragickou krustou (Povýšil a kol., 2007). U nodulárního melanomu se obvykle brzy objevují metastázy v regionálních uzlinách, plicích, mozku, játrech, a kostech (Štork a kol., 2008). U nodulárního melanomu neprobíhá 2. fáze růstu, tj. nemá horizontální růstovou fázi a jeho prognóza je nepříznivá (Povýšil a kol., 2007).

V mikroskopu vidíme v pokožce nepravidelně roztroušené melanocyty různě hluboko. Melanocyty jsou atypické s velkými jádry a výraznými jadérky. V cytoplazmě se nacházejí zrnka melaninu (Povýšil a kol., 2007). Melanocyty jsou světlé a později pronikají do šikry (Štork a kol., 2008). O okrajích nádoru platí, že spíše než z celých hnízd jsou z jednotlivých melanocytů (4). V okolí nádorových čepů bývá výrazná zánětlivá reakce (Štork a kol., 2008). V melanomových buňkách je vysoká koncentrace eumelaninu a nízká koncentrace fəlomelaninu a extrémně vysoký počet melanosomů (ty tvoří až polovinu hmotnosti melanomu). Z enzymů se zde nachází tyrozináza, α - manosidáza a γ – glutamyltransferáza (Borovanský et al., 2003).

Co se týká maligního melanomu u miniprasat, do hloubi zasahoval nejdále po podkoží. Znamky infiltrace do povázky a svalové vrstvy nebyly makroskopicky pozorovatelné. Všechny tumory byly šedě černé barvy, dobře ohraničené a hlavně ve slabínách a dolní břišní polovině těla místy přecházely v černě pigmentované plochy vypadající jako pigmentové névy (Fortýn a kol., 1995).

Melanom, stejně jako další karcinomy by se strukturálně dal rozdělit na 2 části. Na část stromatickou, kterou procházejí cévy, a můžeme tedy říci, že jde o „kostru nádoru“ a na část epitelovou, která zodpovídá za růstovou a agresivní potenci nádoru. Pokud například díky trombóze, ohybu stopky nebo přerušení přívodu živin může dojít buď k dystrofii, atrofii nebo nekróze nádoru a to v různém rozsahu. Právě toho se využívá v devitalizaci (Fortýn a kol., 1989a).

(Obrázky maligního melanomu před a po devitalizaci, viz příloha číslo 3.)

3.5 Selata MeLiM

Od roku 1967 chovají v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR miniaturní prasata importovaná z USA (černý Hormel) a Německa (Göttingen-bílé s černými skvrnami). Tato prasata byla kvůli výzkumu krevních skupin křížena s několika dalšími kmeny (kanadské Landrace, Cornwall, velké bílé prase a vietnamské prase) (Fortýn et al., 1998). Původně pochází z šedočerných až černých prasat kmene Minnesota (Fortýn a kol., 1994b). Po křížení jednoho kance s třemi prasnicemi se v roce 1989 objevilo několik tmavě zbarvených miniprasátek s kožními tumory. Postupně tak křížením těchto jedinců se zdravými zvířaty a po částečném inbreedingu vznikl kmen MeLiM s vrozenými melanoblastomy. Název MeLiM znamená Melanoma Bearing Liběchov Minipig, tedy melanom nesoucí liběchovská miniprasata (Horák et al., 1999). U prasat kmene Sinclair se predispozice k malignímu melanomu dědí jednoduše s holotypy hlavního histokompatibilního komplexu, zatímco u MeLiM prasátek je dědičnost složitější a je předmětem dalšího zkoumání (Fortýn a kol., 1995). U prasat kmene Sinclair navíc nemusí mít průběh nemoci vždy fatální následky a byla zde pozorována dlouhodobá spontánní regrese nádoru končící někdy rozsáhlou depigmentací kůže i štětín. Dvě dlouhodobě sledovaná a léčená zvířata MeLiM obou pohlaví bez jakýchkoliv recidiv nemoci nicméně zplodila potomstvo, u kterého byl pozorován výskyt melanoblastomu při narození se zvýšenou frekvencí. V jiných kombinacích páření pigmentové névy ani tumory nalezeny nebyly. Toto svědčí pro autozomálně recesivní způsob dědičnosti predispozice k výskytu nádoru (Fortýn a kol., 1994b).

Histopatologii tohoto modelu charakterizují mnohačetné kožní nádory, metastázy v různých orgánech a vysoký výskyt (incidence) nádoru (Holubová et al., 2009). U části zvířat (i v rámci jednoho vrhu) nádory spontánně zanikají. Na tuto vlastnost je možno pohlížet spíše pozitivně, neboť lze sledovat rozdíly mezi prasátky, například to, jaké geny jsou za spontánní regresi nádorů odpovědné (Rytina, 2007). V biochemických, imunohistochemických a molekulárně biologických vlastnostech si je prasečí melanom hodně podobný s lidským maligním melanomem (Holubová et al., 2009). Při šlechtění byl kladen důraz na nízkou hmotnost (zvířata v 1 roce dosahují hmotnosti 35 kg a jejich maximální hmotnost bývá o 10 kg větší) a brzkou pohlavní dospělost zvířat (dochází k ní ve 4 měsících věku). K experimentům byla vybrána miniprasata 8-10 měsíců stará s primárními četnými kožními melanomy tubero – nodulárního tvaru (Fortýn a kol., 1994b) a

metastázami ve slezině, játrech, ledvinách a lymfatických uzlinách (Horák et al., 1999). Některá z nich měla snížený hematokrit pod 10% a byla kachektická (Horák et al., 2008).

Prase bylo zvoleno z toho důvodu, že je blízké člověku vývojově a lze ho tedy použít pro transplantaci tkání i zkoušení různých metod léčby. Miniaturní prase, které dosahuje velikosti asi jedné poloviny prasete klasického, potom z důvodů finančních, neboť tato prasátka mají samozřejmě nižší spotřebu krmiva (Rytina, 2007).

Vedoucím výzkumu je RNDr. Vratislav Horák, CSc. (Rytina, 2007).

(Obrázky MeLiM miniprasat, viz příloha číslo 4.)

3.6 Provádění devitalizace u dalších druhů zvířat

Devitalizace se zkoušela rovněž na Lewisových krysách, kterým byl naočkován sarkom. Během dvou týdnů po očkování se vyvinuly dva podkožní nádory. Zde byly výsledky trochu jiné než u miniprasat: devitalizace jednoho nádoru jen zřídka vyvolala regresi nádoru druhého. HSP proteiny teplotního šoku přechodně vzrostly jen během prvních 3 dnů po léčbě, a T – lymfocyty nijak výrazně nestoupily (Horák et al., 2009). Jednou vyléčené krysy po novém naočkování již neonemocněly, to svědčí o rozvoji imunologické paměti. Na tomto zvířecím modelu byla účinnost devitalizace poměrně nízká – okolo 20% (Horák et al., 2008).

Kvůli důkazu obecnější platnosti devitalizace bylo do roku 2009 ošetřeno i přibližně 90 fen s histologicky prokázaným nádorem mléčné žlázy. I zde byl prokázán pozitivní účinek devitalizace. Účinnost léčby závisela i na věku operovaných zvířat. Ve věku 5- 8 let byla 85%, v 10 letech 60%, u jedinců starších 12 let cca 45%. V některých případech musely být zákroky po 3 – 4 týdnech opakovány, zde pak úspěšnost klesala (Joachimová a Svoboda, 2002).

Co se týká zkušeností veterinářů provádějících devitalizaci a majitelů operovaných fenek s karcinomem mléčné žlázy, lze u zvířat po vypuknutí nemoci pozorovat snížený zájem o jídlo a o hračky, což se po operaci velmi rychle upravilo. Na psech po zákroku nejsou vidět bolesti a jsou výrazně vitální (25 – TV, 2002).

Snad určitou nevýhodou by mohl být průběh hojení. Rána je totiž nezakrytá, 1. den může prosakovat krev, 2. – 3. den páchnoucí serózní tekutina, která je přítomná z toho důvodu, že odumírající tkáň zapáchá. Tkáň bývá zarudlá a oteklejší, k lepšímu zahojení pomáhají masti. Hojení probíhá 14 dnů až 3 týdny, přičemž platí, že čím déle se podvazovaná tkáň rozpadá, tím větší je imunitní odpověď (25 – TV, 2002).

Dále uvádím výsledky operací MVDr. Zedka, který se devitalizacemi také zabývá. (Časové údaje odpovídají roku 1995, kdy byly tyto zkušenosti pana MVDr. Zedka publikovány na 7. Konferenci o devitalizaci nádorů):

1. Pes plemene Čau – čau: stáří 6 let, melanom na temeni hlavy, kulovitěho tvaru velikosti 2 – 3 centimetry. Do 3 týdnů došlo k regresi nádoru doprovázené zápachem rozkládající se tkáně. Od té doby (březen 1995) se pes těší dobrému zdraví bez jakýchkoliv dalších komplikací (Zedek, 2009).

2. Pes plemene NO: stáří 4 roky, nádor dásně (gingivy) s podobným průběhem. Kvůli značné vzdálenosti ztíženo pozorování a kontrola, i tento pacient však žije již několik let bez problémů (Zedek, 2009).

3. Teplokrevná kobyly: stáří 4 roky, sarkom ve vnitřní stehenní oblasti. Kobyly byla v době konference již 3 roky bez komplikací (Zedek, 2009).

4. Býk: stáří 14 měsíců, nádor měkkých tkání dolní čelisti. Pozorování bylo po 6 měsících ukončeno jatečným využitím zvířete (Zedek, 2009).

Celková statistika devitalizace u jiných zvířat než miniprasat viz tabulka.

**SLEDOVÁNÍ ÚČINKU DEVITALIZAČNÍ TECHNIKY U DALŠÍCH DRUHŮ ZVÍŘAT
(SOUHRN EXPERIMENTÁLNÍCH VÝSLEDKŮ)**

DRUH	DEVITALIZOVANÁ TKÁŇ nebo ORGÁN	POČET ZVÍŘAT (ks)	ÚHYN (ks)	PŘÍČINA	ÚSPĚŠNOST (%)	POZNÁMKA
laboratorní potkan	tenké střevo (ileum)	10	---		100	jedinci bez nádorů
	ledvina - celá	20	---		100	jedinci bez nádorů
	- segmentální	117	3	uremie (3.den)	97	jedinci bez nádorů
	játra	16	---		100	jedinci bez nádorů
králík	tenké střevo (jejunum)	2	---		(jen 2 případy)	jedinci bez nádorů
	ledvina - celá	2	---		(jen 2 případy)	jedinci bez nádorů
pes- různá plemena	karcinom mléčné žlázy	19	11	recidiva nádoru 2-4 měsíce po devitalizaci (úhyn nebo opětovná devitalizace dalšího nádoru)	42	přezívající feny zatím 3- 14 měsíců po devit. zatím 3 měsíce po devit.
	lymfom	1	---		(jen 1 případ)	zatím 1 měsíc po devit.
	melanom	1	---		(jen 1 případ)	zatím 1 měsíc po devit.
kočka	fibrosarkom	1	---		(jen 1 případ)	zatím 3 měsíce po devit.

4.ZÁVĚR

Z dostupné vědecké a odborné literatury, včetně odborných diskuzí, byly shrnuty poznatky o procesu devitalizace a vlivu devitalizace na zdravou nebo nádorovou tkáň zvířat.

V práci je popsán vliv devitalizované (devaskularizované) tkáně na imunitní systém pokusného zvířete a proces přeměny této tkáně na vazivo.

Jsou popsány pokusy s devitalizací nádorové tkáně kožního maligního melanomu u pokusných miniprasat MeLiM s uvedením procenta uzdravených zvířat.

Podrobně je popsán kožní maligní melanom a jeho typy.

V práci jsou také uvedeny pokusy s devitalizací zhoubného nádoru mléčné žlázy fen s úspěšností jejich vyléčení.

Jsou zde uvedeny i pokusy s devitalizací zhoubných nádorů u dalších druhů zvířat.

5. SEZNAM LITERATURY

Knihy:

- 1 – Hořejší, V., Bartůňková, J. 2005. Základy imunologie (3. vydání). TRITON. Praha. s. 275. ISBN: 80-7254-686-4
- 2 – Joachimová, E., Svoboda, R. 2002. Devitalizace – oživená naděje. Nakladatelství RE. s. 258. ISBN: 809030690X
- 3 – Mačák, J. 2002. Obecná patologie. Olomouc. s. 189. ISBN: 80-244-0436-2
- 4 – Povýšil, C., Šteiner, I., Ciprová, V., Dušek, J., Dušková, J., Dvořák, K., Feit, J., Honsová, E., Kodet, R., Kolář, Z., Ludvíková, M., Lukáš, Z., Mačák, J., Mandys, V., Pastrňák, A., Povýšilová, V., Ryška, A., Stříteský, J., Tichý, M. 2007. Speciální patologie (2. vydání). Galén. Praha. s. 430. ISBN: 978-80-7262-494-2
- 5 – Štork, J., Arenberger, P., Pizinger, K., Semrádová, V., Vosmík, F., Dermatovenerologie. 2008. Galén. Karolinum. s. 502. ISBN: 978-80-7262-371-6

Články v časopisech:

- 6 - Borovanský, J., Horák, V., Elleder, M., Fortýn, K., Smit, N.P.M., Kolb, A. M. 2003 Biochemical characterization of a new melanoma model – the minipig MeLiM strain. Melanoma Reserach. 13 (5). 1 - 6
- 7 - Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V. (1994a) Treatment of malignant melanoma. British Journal of Surgery. 81. 146 – 147
- 8 - Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Hradecký, J., Tichý, J. (1994b) Melanoblastomová nemoc u laboratorních miniprasat: model pro studium lidských maligních melanomů. Veterinární medicína. 39 (10). 597 – 604

- 9 - Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Hradecký, J., Tichý, J. (1998) Exceptional occurrence and extent of malignant melanoma in pig. *Veterinární medicína* 3. 87 - 91
- 10 - Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Tichý, J. (2001) Artificial perforations of the stomach in pigs and rats and their covering by the abdominal wall. *Veterinární medicína* 3. 75 - 77
- 11- Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Tichý, J. (1995) Experimentální léčba zhoubného melanomu pomocí ischemizace (devitalizace). *Klinická onkologie*. č.1. 11 – 15
- 12 - Fortýn, K., Hruban, V., Hradecký, J., Tichý, J. (1989a) Ischemizace zhoubných nádorů gastrointestinálního traktu jako pokus o paliativní léčebný zákrok v onkochirurgii. *Klinická onkologie*. č. 1. 7 – 10
- 13 - Fortýn, K., Hruban, V., Hradecký, J., Tichý, J., Dvořák, P., Horák, V. (1989b) Experimental Devascularization (Devitalization) of the Rectum and Sigmoidum. *Z. exp. Chir. Transplant. künstl. Organe*. 22. 173 – 179
- 14 - Holubová, M., Strnade, J., Planská, D., Vannucci, L., Usvald, D., Burocziová, M., Vure, M., Klaudy, J., Horák, V. (2009) The Melanoma-bearing Libechov Minipigs as a Model in Experimental Oncology. *Mechanism models of cancer*
- 15 - Horák, V., Fortýn, K., Hruban, V., Klaudy, J. (1999) Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique. *Cellular and Molecular Biology*. 45 (7). 1119 – 1129
- 16 - Horák, V., Morávková, A., Strnadel, J., Hradecký, J., Usvald, D., Vannucci, L. (2008) Devitalization as a special surgical tumour treatment inducing anti-cancer response – an experimental study in two animal models. *Cancer Immunotherapy*. 65
- 17 - Horák, V., Soukupová, P., Šinkora, J., Řeháková, Z., Veselský, L., Málek, O., Hradecký, J., Klaudy, J. (2003) Melanoma devitalization induces T cell anti-tumour immunity in the MeLiM miniature pigs. *Pigment Cell Res*. 16

- 18 - Horák, V., Vannucci, L., Morávková, A., Strnade, J., Holubová, M., Hradecký, J., Klaudy, J., Pokorná, E., Usvald, D., Planská, D., Burocziová, M., Vure, M. (2009) Tumour Devitalization as a Tool for Cancer Immunotherapy Experiences from Animal Models. Abstracts book – 5th World Congress of Cellular and Molecular Biology. 3
- 19 - Hruban, V. , Horak, V., Fortyn, K., Hradecky, J., Klaudy, J., Smith, D. M., Reisnerova, H., Majzlik, I. (2004) Inheritance of malignant melanoma in the MeLiM strain of miniature pigs. Veterinary Medicine 12. 453 – 459
- 20 – Rytina, L. (2007) Prasata jako biomedicínský model. Zemědělec. 18. 40

Články na internetu:

- 21 – Daum, O.: Apoptóza, nekróza, gangréna. 20. 12. 2011. Dostupné z <http://www.siklucv-ustav-patologie.patologie.cz/vyuka/prednasky-vseob.html>
- 22 – Ochotná, J.: Imunitní systém a jeho význam pro homeostázu organismu, složky imunitního systému a jejich vzájemná spolupráce. 29. 9. 2010. Dostupné z http://www.lfp.cuni.cz/imunologie/Prednasky/VSEOB2010_2011/vseob_prednasky.php
- 23 – Ochotná, J.: Makrofágy, T – lymfocyty, primární a sekundární imunitní orgány. 20.10.2010. Dostupné z http://www.lfp.cuni.cz/imunologie/Prednasky/VSEOB2010_2011/vseob_prednasky.php
- 24 - Zedek, R.: Metoda devitalizace ve veterinární praxi. 15. března 2009. Dostupné z <http://www.devitalizace.euweb.cz/dc/dcZedek7.htm>

Rozhlasové a televizní pořady:

- 25 – Devitalizace a zvířata. Klekánice. ČT1. TV. 2002. Dostupné z <http://www.devitalizace.info/>
- 26 - Devitalizace dle imunologa. Přesčas. ČT2. TV. 2002. Dostupné z <http://www.devitalizace.info/>

27 - Devitalizace z pohledu chirurga a imunologa. Český rozhlas 1 – Radiožurnál. Ro. 2002.
Dostupné z <http://www.devitalizace.info/>

6. SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Příloha číslo 1:



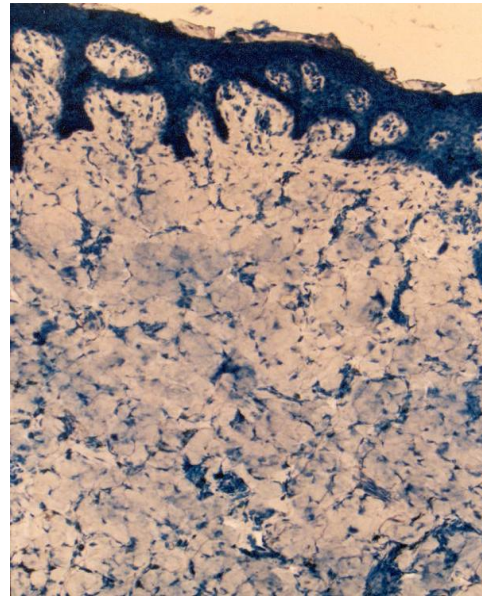
MUDr Karel Fortýn, objevitel devitalizace (použito s laskavým svolením RNDr. Vratislava Horáka)

Příloha číslo 2:



RNDr. Vratislav Horák, nyní vedoucí devitalizačních výzkumů; zdroj
http://www.iapg.cas.cz/uzfg/index.php?p=kontakty_zamestnanci&site=default&id=58

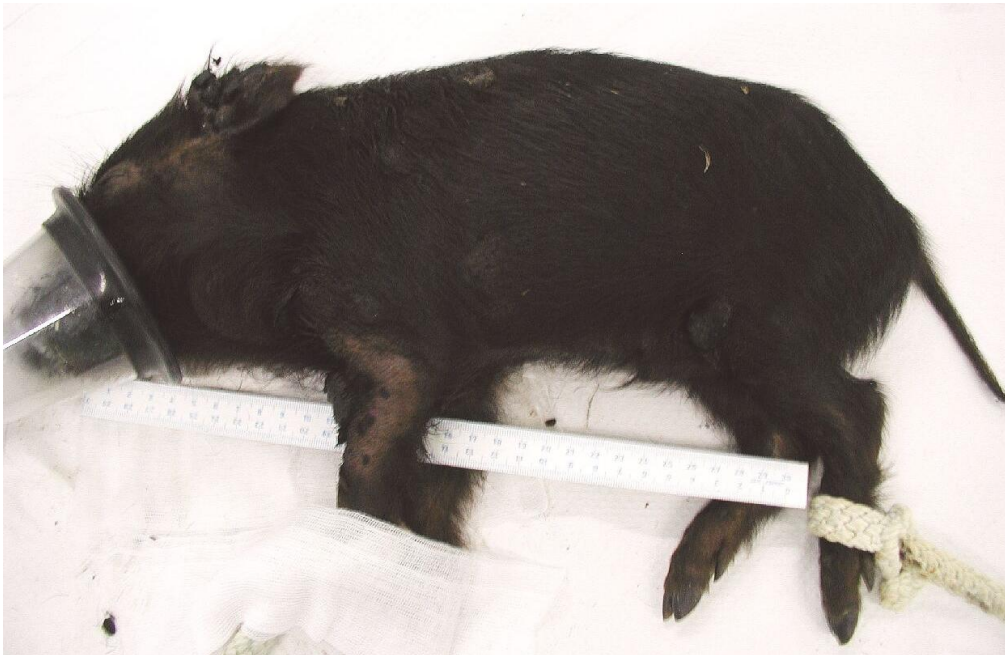
Příloha číslo 3:



Kožní melanom miniprasat linie MeLiM (parafinové řezy obarvené hematoxylin-eozinem)

(melanomové buňky jsou snadno detekovatelné podle černé barvy způsobené vysokou koncentrací melaninu v melanosomech): na obrázku vlevo je melanom před devitalizací, vpravo potom úplné vymizení melanomových buněk a přeměna ve vazivo (cca 6 měsíců po devitalizaci); (použito s laskavým svolením RNDr. Vratislava Horáka)

Příloha číslo 4:



Kaneček linie MeLiM před devitalizací (stáří 7 týdnů) (s mnohočetnými melanomy; patrný známky kachexie); (použito s laskavým svolením RNDr. Vratislava Horáka)



Tentýž jedinec 12 měsíců po devitalizaci (dosažena normální hmotnost; v místě původních větších melanomů je patrné vybělení štětin, což je jediný vedlejší efekt devitalizace – imunitní buňky indukované devitalizací proti protinádorovým buňkám likvidují kromě melanomových buněk i melanocyty, které jsou zodpovědné za pigmentaci štětin a kůže; někdy dochází i k vybělování kůže); (použito s laskavým svolením RNDr. Vratislava Horáka).