

**MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Identifikace a studium molekulárních biomarkerů
z hlediska individualizace léčebně-preventivních
strategií v onkologii**

HABILITAČNÍ PRÁCE
komentovaný soubor prací

Brno 2013

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

Poděkování

Děkuji všem svým současným i bývalým kolegům a spolupracovníkům za vynikající týmovou spolupráci, bez které by moje výzkumná činnost byla jen stěží možná. V této souvislosti bych konkrétně chtěl zmínit doc. RNDr. Ondřeje Slabého, Ph.D. Za vytvoření příznivých pracovních podmínek děkuji především prof. MUDr. Rostislavu Vyzulovi, CSc. a doc. MUDr. Lence Foretové, Ph.D. Za cenné rady a trvalé povzbuzování při „nekonečném“ psaní těchto několika stran děkuji prof. MUDr. Jiřímu Vorlíčkovi, CSc., dr.h.c.

OBSAH

1 Abstrakt (česky)	4
2 Abstract (English)	5
3 Úvod	6
3.1 Individualizovaná medicína a individualizovaný přístup	6
3.2 Biomarkery	7
3.2.1 Definice a klasifikace	7
3.2.2 Studium biomarkerů	12
4 Biomarkery v onkologii	16
4.1 Biomarkery rizika	18
4.1.1 Přehledová část	18
4.1.2 Vlastní příspěvek k problematice	23
4.2 Diagnostické biomarkery	27
4.2.1 Přehledová část	27
4.2.2 Vlastní příspěvek k problematice	33
4.3 Prognostické biomarkery	38
4.3.1 Přehledová část	38
4.3.2 Vlastní příspěvek k problematice	44
4.4 Prediktivní biomarkery	49
4.4.1 Přehledová část	49
4.4.2 Vlastní příspěvek k problematice	56
4.5 Studium biomarkerů v onkologii	61
4.5.1 Vlastní příspěvek k problematice	61
5 Závěr	67
6 Reference	68
7 Seznam zkratk	76
8 Seznam příloh	79
9 Přílohy	83

1 ABSTRAKT (česky)

Habilitační práce Marka Svobody na téma „Identifikace a studium molekulárních biomarkerů z hlediska individualizace léčebně-preventivních strategií v onkologii“ je zpracována formou komentovaného souboru vybraných vědeckých prací autora.

Úvodní kapitola přináší základní informace o principech individualizované medicíny a o uplatňování individualizovaného přístupu k pacientovi. Definuje biomarkery, jejich klasifikaci a biogenezi. Následují čtyři kapitoly věnované jednotlivým typům biomarkerů (biomarkery rizika, diagnostické biomarkery, prognostické biomarkery, prediktivní biomarkery) a významu, který z hlediska individualizace léčebně-preventivních strategií v onkologii mají. Na počátku každé kapitoly je vždy jejich stručný přehled se zaměřením na ty, které jsou klinicky relevantní, a poté vlastní příspěvek autora k dané problematice.

V kapitole „Biomarkery rizika“ je komentováno celkem 7 prací, které se zabývají jednak významem mikroRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a vybranými aspekty nutrigenomiky, a jednak monogenní dědičností nádorů, a to především ve vztahu k triple-negativnímu karcinomu prsu a mutacím BRCA1 genu.

V kapitole „Diagnostické biomarkery“ je komentováno celkem 12 prací, ve kterých je výzkum zaměřen zejména na identifikaci krátkých a dlouhých nekódujících RNA, jejichž exprese se liší mezi nádorovou a okolní zdravou tkání a dále mezi primárními nádory, které metastazovaly lymfogenně do regionálních uzlin nebo viscerálně hematogenní cestou. Naše publikace o významu miR-21, miR-31, miR-143 a miR-145 ve vztahu k metastazování kolorektálního karcinomu byla historicky šestou prací zabývající se vůbec analýzou mikroRNA u tohoto onemocnění. Její citovanost za 5 let dosáhla ohlasu 200 citací v databázi ISI WOS. Další práce v kapitole se zabývají molekulární klasifikací vybraných malignit.

V kapitole „Prognostické biomarkery“ je komentováno celkem 9 prací. Zabývají se validací stávajících a identifikací nových prognostických faktorů a biomarkerů. V případě triple-negativního karcinomu prsu potvrzujeme prognostický význam exprese cytokeratinů bazálního typu 5/6 a jako první i mikroRNA miR-34. U kolorektálního karcinomu potvrzujeme prognostický význam miR-21 a uc.73. U renálního karcinomu miR-106b, miR-127-3p, miR-145 a miR-126. Stejně tak potvrzujeme prognostický význam Hengova modelu aplikovaný na populaci našich pacientů s metastatickým renálním karcinomem. V případě pacientů s multifonním glioblastomem prokazujeme prognostický význam u miR-21 a miR-181c.

V kapitole „Prediktivní biomarkery“ je komentováno celkem 8 prací. Zabýváme se predikcí u cílené anti-Her-2 terapie u karcinomu prsu a potvrzujeme prediktivním významem pAkt a S6K kináz. U pacientů podstupujících neoadjuvantní chemoradioterapii pro karcinom rekta nalézáme profily exprese mikroRNA, které s vysokou senzitivitou a specificitou predikují odpověď na tuto léčbu. U pacientů s multifonním glioblastomem nacházíme mikroRNA a epigenetické modifikace vybraných genů asociované s odpovědí na léčbu chemoradioterapií s temozolomidem. U pacientů s neuroendokrinními tumory jsme identifikovali molekulární prediktory odpovědi na somatostatinová analoga.

V poslední kapitole „Studium biomarkerů v onkologii – význam funkčních studií“ jsou komentovány celkem 4 práce, které demonstrují význam funkční studií při hledání a validaci kauzálních vztahů mezi molekulárními biomarkery a nádorovým onemocněním. Jedna z prací se zabývá testováním účinnosti protinádorových léčiv in vitro.

2 ABSTRACT (English)

The habilitation thesis of Marek Svoboda on "Identification and study of molecular biomarkers from the perspective of personalized therapeutic and prevention strategies in oncology" is a set of author's selected scientific papers supplemented with further commentaries.

The introductory chapter defines the principles of personalized medicine and its implementation to everyday practice. The biomarkers, their classification as well as biogenesis are presented at this point. The following chapters deal with particular types of biomarkers (biomarkers of risk and exposure, diagnostic biomarkers, biomarkers in prognosis and prediction) and their significance in the personalized strategies in oncology. Every chapter is provided with a definition of the respective biomarker category in the beginning, followed by a concise review of the most clinically relevant biomarkers and supplemented by author's commentary on the topic. The investigation is focused mainly on colorectal cancer (CRC), breast cancer (BC), renal carcinoma (RC), as well as less common malignancies such as glioblastoma multiforme (GM) and neuroendocrine tumors (NET).

The chapter „Biomarkers of Risk and Exposure“ covers 7 scientific papers analyzing the role of microRNA in the pathogenesis of CRC, selected aspects of nutrigenomics, as well as monogenic heredity of tumors, especially in relation to BC and BRCA1 mutations.

The chapter „ Diagnostic Biomarkers“ encompasses 12 works investigating the short and long non-coding RNA structures with significant difference in its expression among various tissues (malignant vs. non-malignant tissue, primary tumors with lymphatic vs. hematologic spread). Our work evaluating the role of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 in metastatic CRC was historically the sixth analysis ever to deal with microRNA analysis within this diagnosis. There have been as many as 200 citations reported in last 5 years.

In the chapter „Prognostic Biomarkers“ the author compiles results of 9 works examining the validity of current biomarkers as well as identifying new potential prognostic factors. In the case of a triple-negative BC we managed to confirm the significance of cytokeratin expression and miR-34b as prognostic factors. Further, we proved the prognostic significance of miR-21 and uc.73 in CRC, whereas in RC it was miR-106b, miR-127-3p, miR-145 and miR-126. Moreover, we confirmed the prognostic value of Heng's model when applied on a population of domestic patients with metastatic RC. In case of GM we validated the prognostic importance of miR-21 and miR-181c.

The chapter „ Predictive Biomarkers“ addresses 8 works. Herein we are describing the predictive role of pAkt and S6K kinases in Her-2 therapy of BC. Likewise, in patients with rectal cancer undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy we reveal microRNA expression profiles that predict the therapy outcome with high sensitivity and specificity. In patients with GM we identify microRNA and epigenetic mutations of particular genes associated with a better treatment response to chemoradiotherapy with temozolomide. Similarly, for NET there were identified several predictors of somatostatin analogues treatment response.

In the last chapter called „ Biomarkers in oncology – the importance of functional studies“ the author addresses 3 works dealing with the role of function studies in the investigation and validation of causal relationship between the molecular biomarkers and a certain malignancy. Finally, one of the works refers to the assessment of anticancer drug efficacy.

Identifikace a studium molekulárních biomarkerů z hlediska individualizace léčebně-preventivních strategií v onkologii

3 ÚVOD

3.1 INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA A INDIVIDUALIZOVANÝ PŘÍSTUP

Jak dokazují dobové texty Hipokrata a Galéna z období starověkého Řecka a Říma, princip „správná léčba správnému pacientovi“ je v medicíně praktikován po milénia, byť vždy v kontextu znalostí, technických možností a filozofického smýšlení dané doby, případně i místa (1,2). Současná míra znalostí o etiopatogenezi lidských chorob a technická vyspělost, s nimiž úzce souvisí možnosti diagnostiky a léčby, nám umožňují individualizovat zdravotní péči ve vztahu k jednotlivým pacientům a jejich chorobám v takovém rozsahu, že pojem „individualizovaná (personalizovaná) medicína“* již představuje skutečný multidisciplinární přístup (3).

Individualizovaná medicína tedy přizpůsobuje preventivní a léčebné plány na základě objektivních parametrů charakterizujících biologickou individualitu jednotlivých pacientů a jejich onemocnění a dává větší předpoklady k dosažení lepších výsledků léčby, vyšší compliance a větší spokojenosti pacienta a k efektivnímu použití finančních prostředků vynaložených na danou péči.

Předložená definice individualizované medicíny vychází ze současného postavení medicíny, tj. aplikovaného biologického oboru. V případě člověka je však nezbytné uplatňovat i **individualizovaný přístup**, který zohledňuje řadu dalších faktorů. Jedná se především o faktory sociální (např. vzdělání, rodina, etnicita, kulturní příslušnost),

** V textu užívám pojmu „individualizovaná medicína“, který dle mého názoru vystihuje individualizovaný přístup nejenom k pacientovi, ale k vlastní nemoci, lépe než běžně užívaný pojem „personalizovaná medicína“, který vznikl jako volný překlad anglického označení „personalized medicine“.

socioekonomické, psychologické, spirituální a jeho osobnostní vlastnosti (inteligence, temperament, charakterové vlastnosti). Významné mohou být i faktory geopolitické (např. úroveň zdravotnictví a dostupnost zdravotní péče, stav životního prostředí) (4). Vztah mezi individualizovanou medicínou a individualizovaným přístupem k pacientovi a faktory, které je ovlivňují, znázorňuje **obrázek 1**.

V medicíně existuje ještě další pojem, který do jisté míry rovněž symbolizuje individualizovaný přístup lékaře k pacientovi, a to **lékařské umění** (5). V kontextu současné „západní medicíny“ představuje „lékařské umění“ v podstatě schopnost lékaře stanovit správně diagnózu, prognózu a možnosti léčby onemocnění, umět o těchto věcech s pacientem komunikovat a na základě toho pak individualizovat jeho léčbu a preventivní opatření.

3.2 BIOMARKERY

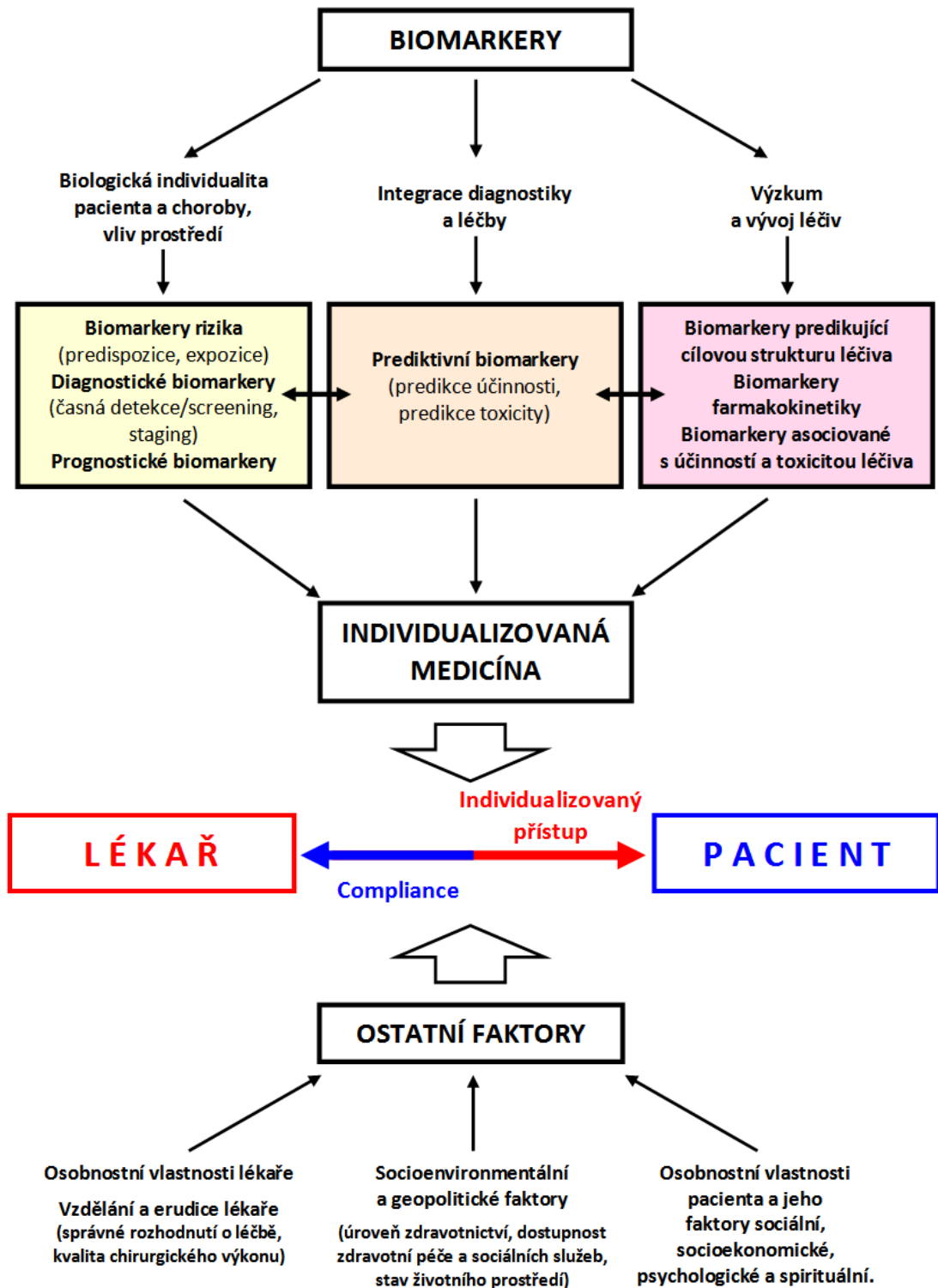
Biologickou individualitu pacientů a jejich onemocnění charakterizujeme pomocí objektivních parametrů, které označujeme pojmem „biomarkery“.

3.2.1 DEFINICE A KLASIFIKACE BIOMARKERŮ

Za **biomarker** lze v podstatě považovat jakýkoliv znak či vlastnost, které lze objektivně změřit a použít jako indikátor jak fyziologických, tak i patologických procesů. K měření lze použít metody fyzikální, chemické, biologické, genetické, zobrazovací nebo jejich kombinace (6). Tato definice dává v medicíně pojmu biomarker velmi široké uplatnění, na druhou stranu přináší problémy s jejich klasifikací.

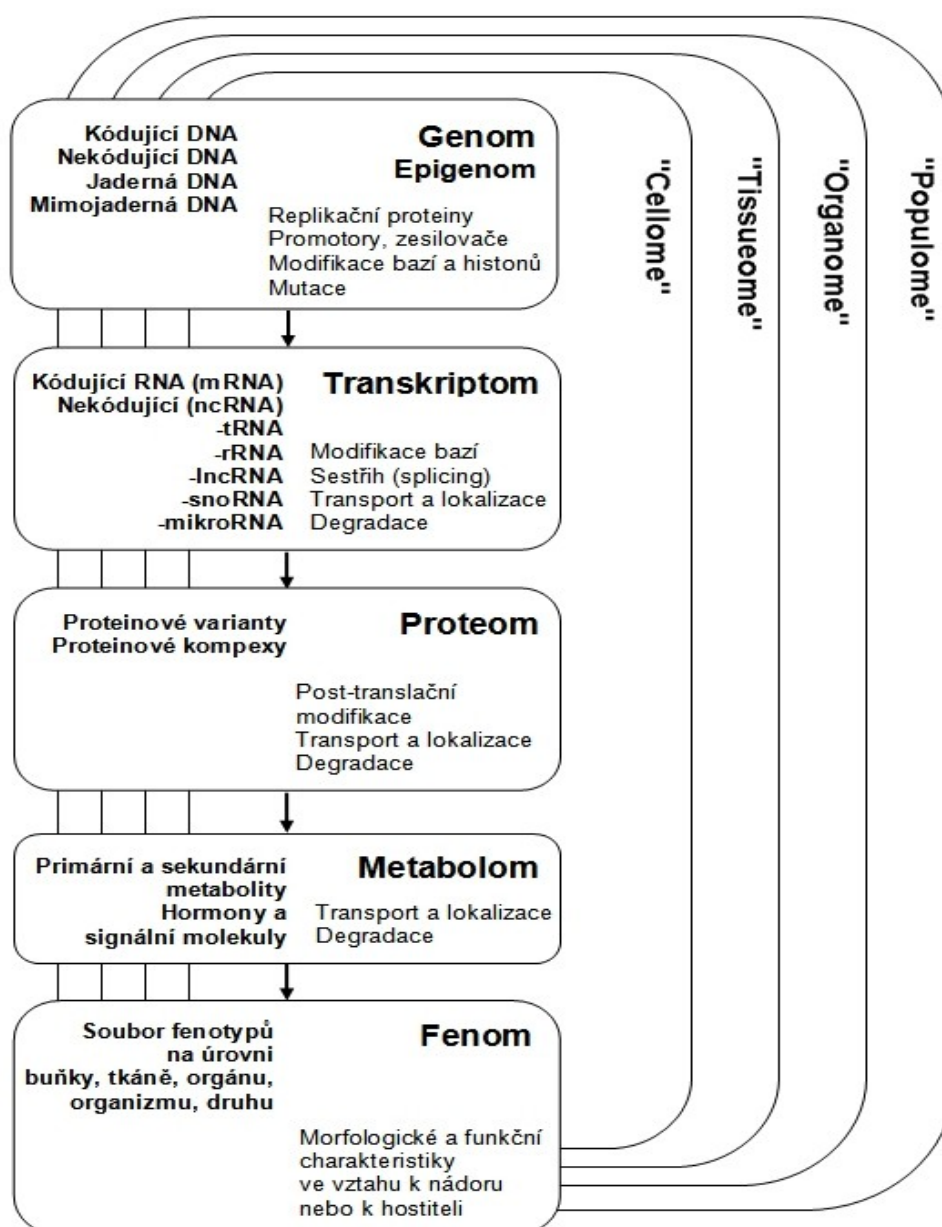
Obecně lze biomarkery dělit na základě jejich charakteru, původu nebo uplatnění (funkce).

Obrázek 1 - Vztah mezi individualizovanou medicínou a individualizovaným přístupem k pacientovi a faktory, které je ovlivňují



Podle **charakteru** můžeme biomarkery rozdělit na dvě hlavní skupiny: biomarkery molekulární a klasické. **Molekulární biomarkery** představují látky a biomolekuly utvářející genom, epigenom, transkriptom, proteom nebo metabolom a na základě toho mohou být dále klasifikovány (např. nukleové kyseliny, proteiny, hormony, atd.). Ostatní biomarkery tvoří skupinu **klasických biomarkerů**. Jedná se o morfologické a funkční charakteristiky fenomu (např. velikost, histologie a grading nádoru, přítomnost invaze, mitózy, metastázy; B-symptomy, výsledky funkčních zobrazovacích vyšetření; věk, pohlaví, komorbidity pacienta atd.) (3,4,7).

Obrázek 2 - Dělení biomarkerů podle charakteru a původu



Z hlediska **původu** lze biomarkery dělit podle biologických systémů, na jejichž úrovni bylo měření provedeno: **buněčné** („cellom“), **tkáňové** („tissueom“), **orgánové** („organom“), **organizmu** a **populační** („populome“), viz **obrázek 2**. V onkologii se dále rozlišuje, zda je původ biomarkeru v nádoru (**biomarkery asociované s nádorem, nádorové biomarkery**) nebo v jeho hostiteli (**biomarkery asociované s hostitelem**) (3,8-10).

V klinické praxi se nejčastěji používá klasifikace biomarkerů na základě jejich **funkce**. Z tohoto pohledu rozlišujeme ve vztahu k pacientovi a jeho onemocnění, tj. na úrovni organismu a populace, **biomarkery rizika, diagnostické, prognostické a prediktivní** (viz **tabulka 1**) Funkční dělení biomarkerů přitom může vycházet již od úrovně buněčné a podle toho rozlišujeme **biomarkery asociované s regulací buněčné diference, proliferace, apoptózy, migrace, metabolismu** (včetně biotransformace a regulace mnohočetné lékové rezistence), **signální transdukce a integrity genomu**. Na vyšších úrovních pak mohou být **biomarkery asociované s regulací imunity a humorálním řízením organismu** (3,10-15).

Tabulka č. 1 - Klasifikace biomarkerů na základě jejich funkce

Typ	Charakteristika	Použití
Biomarkery rizika	Biomarkery predikující vznik onemocnění u dosud zdravého jedince.	Identifikace osob/populací s genetickou predispozicí ke vzniku nádorových onemocnění. Identifikace osob/populací exponovaných fyzikálním, chemickým a biologickým karcinogenům.
Diagnostické biomarkery	Biomarkery asociované s přítomností onemocnění a/nebo jeho rozsahem a/nebo jeho klasifikací.	Diagnostika a staging nádorového onemocnění. Diagnostika minimální reziduální choroby a její monitorování. Diagnostika a monitorování nežádoucích účinků léčby. Vývoj cílených léčiv.
Prognostické biomarkery	Biomarkery asociované s parametry přežití.	Stanovení prognózy pacienta ve vztahu k nádorovému onemocnění nebo ke komplikacím léčby.
Prediktivní biomarkery	Biomarkery predikující odpověď onemocnění na léčbu, metabolismus a toxicitu léčiv.	Predikce účinnosti konkrétního léčiva. Predikce odpovědi nádoru na léčbu. Predikce toxicity léčby.

V případě klasifikování biomarkerů na základě jejich funkce je nutné mít vždy na zřeteli, že se jedná o charakteristiku biomarkeru, kterou nabývá za určité situace a která se tak může i měnit, případně biomarker může nabývat více funkcí, jenž si mohou být i ve vzájemném rozporu (např. pozitivní prognostický význam mikrosatelitní instability u pacientů s nemetastatickým kolorektálním karcinomem, při současné negativní predikci odpovědi na léčbu 5-FU). Podrobně se těmto stavům věnujeme v jednotlivých kapitolách 4.1 – 4.4).

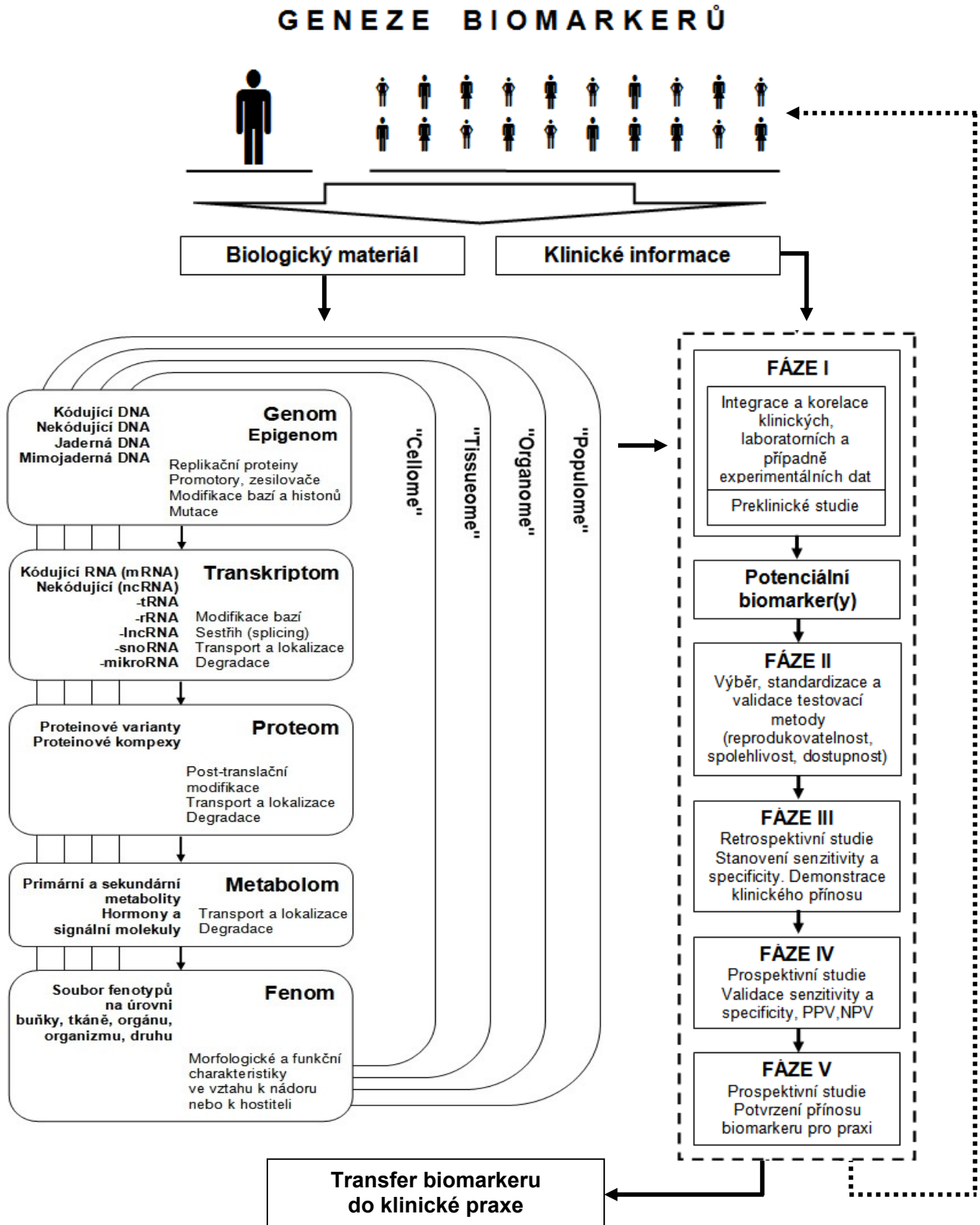
Biomarkery můžeme dále dělit na **jednoduché**, nebo **komplexní** (složené) (3,10). Z klasických biomarkerů je typickým příkladem komplexního biomarkeru klinické stadium nemoci definované na základě TNM klasifikace (16). Komplexní biomarkery ale mohou být složené jak z jednotlivých klasických, tak i molekulárních biomarkerů. Příkladem je Hengův prognostický model určený pro pacienty s metastatickým renálním karcinomem (mRCC), který zahrnuje: hladinu hemoglobinu, trombocytů a neutrofilů, hladinu korigovaného vápníku, Karnofsky performance status a interval od diagnózy do léčby mRCC (17). V době existence metod pro vysokokapacitní měření (např. hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, DNA čipy, sekvenování nové generace) se přitom stále častěji setkáváme s **komplexními molekulárními biomarkery**, kterými označujeme definovaná spektra (komplexní profily) genů, proteinů nebo jiných biomolekul. Jako příklad lze uvést molekulární klasifikaci difuzního velkobuněčného B-lymfomu a karcinomu prsu na základě definovaných profilů genové exprese o rozsahu až stovky genů (18,19).

3.2.2 STUDIUM BIOMARKERŮ

Studium biomarkerů je jednou z hlavních oblastí aplikovaného a translačního výzkumu v onkologii. Až do 90. let minulého století umožňovaly dostupné technologie analyzovat pouze jednotlivé proteiny či geny, případně jejich početně velmi omezené skupiny. Rozvoj technologií v současnosti nabízí možnosti vysokokapacitních měření kvantitativních a kvalitativních změn různých typů biomolekul (např. nukleové kyseliny, proteiny, metabolity), což významným způsobem urychlilo **výzkum molekulárních biomarkerů** (9,11,20,21). Každoročně jsou tak publikovány tisíce prací popisujících zcela nové potenciální biomarkery nebo nové asociace již objevených biomarkerů, a to nejčastěji s parametry přežití nebo s odpovědí na léčbu. S tímto rozsahem však ostře kontrastuje relativně **nízký počet těch, které se skutečně používají** v klinické praxi. Příčin tohoto stavu je několik, z větší části však tkví ve vlastním procesu vývoje biomarkerů (7,22).

Lze rozlišit **pět fází vývoje biomarkerů**. Výsledkem první fáze jsou potenciální biomarkery, které byly identifikovány na základě integrací a korelací klinických, laboratorních a případně i experimentálních dat, zejména funkčních studií. Ve druhé fázi dochází k výběru, standardizaci a validaci testovacích metod. Vybraná metoda by měla být nejenom spolehlivá a zaručující dostatečnou reprodukovatelnost měření, ale s ohledem na pozdější použití musí být dostupná a použitelná i pro rutinní klinickou praxi. Ve třetí fázi se na retrospektivním souboru stanovuje senzitivita a specifita biomarkeru a demonstruje se jeho klinický přínos. Čtvrtá fáze spočívá ve validaci biomarkeru na prospektivním souboru dat. Kromě opětovného hodnocení senzitivity a specifity se dále stanovuje jeho pozitivní a negativní prediktivní hodnota. Pátá fáze má za cíl potvrdit v prospektivní studii, zda biomarker znamená pro klinickou praxi skutečný přínos. Biomarker je považován za validní tehdy, pokud existuje k jeho měření dostatečně senzitivní metoda (nebo více metod) s reprodukovatelnými výsledky a zároveň byl podán důkaz o jeho klinické významnosti (14,23). Proces biogeneze biomarkerů znázorňuje **obrázek 3**.

Obrázek 3 - Geneze biomarkerů



Bohužel, i přes pokroky, které významně urychlují výzkum biomarkerů, zůstává **proces jejich validace** v rámci retrospektivního (fáze III) a prospektivního klinického hodnocení (fáze IV a V) stále stejně pracný a časově i finančně náročný. Z tohoto pohledu se jedná o kritickou část v genezi biomarkerů, která navíc často končí neúspěchem, neboť se v jejím průběhu zjistí, že biomarker nedosahuje předpokládaných kvalit nebo nelze zajistit dostupnost vhodné analytické metody. Nemusí se přitom jednat o nedostatečnou senzitivitu či specifitu, ale může jít o neúspěch stran prokázání jeho přínosu pro klinickou praxi (např. u biomarkeru PSA pro účely screeningu karcinomu prostaty nebo biomarkeru CA-125 pro účely časně detekce relapsu ovariálního karcinomu) (24,25). Řada potenciálních biomarkerů navíc ani nepostoupí do fází prospektivní validace (fáze IV a V), protože k tomu chybí potřebné finanční prostředky. Výzkum a vývoj biomarkerů je totiž z velké části realizován v rámci akademického prostředí a výrobci léčiv a zdravotnických technologií tuto činnost podporují nebo sami realizují spíše jen v případech, kdy je na ně vyvíjen tlak ze strany plátců zdravotní péče nebo na tom mají primární ekonomický zájem. Do budoucna jsou určitou nadějí společná konsorcia, která za účelem výzkumu a vývoje biomarkerů vznikají mezi akademickým prostředím, neziskovými organizacemi a komerční sférou.

Další příčinou, která omezuje transfer biomarkerů do klinické praxe, je nemožnost zajistit široce dostupnou testovací metodu a/nebo standardizaci podmínek pro stanovení biomarkeru. V prvním případě se přitom často jedná o finanční náklady, které brání širšímu použití nových biomarkerů, obzvláště jsou-li k jejich stanovení potřebné molekulárně genetické metody a nebo jsou-li tyto metody a testovací algoritmy patentově chráněny. Ceny technologií v průběhu času klesají, a proto lze předpokládat, že stejně tak, jako se dnes v našich podmínkách nejeví nikomu nic zvláštního na vybavení laboratoří molekulární patologie metodami FISH nebo PCR či onkologických center přístroji PET/CT, budeme schopni v relativně blízké budoucnosti vybavit uvedené laboratoře např. technologiemi pro celogenomové

sekvenování nové generace a získaných výsledků využít v individualizaci léčebně-preventivních programů našich pacientů. Ve druhém případě se jedná o nemožnost zajistit standardizaci podmínek pro stanovení biomarkeru nebo o problémy spojené s odběrem, zpracováním a skladováním biologického materiálu, který pak nedosahuje kvality potřebné pro jeho analýzu metodami molekulární genetiky, biologie či proteomiky. I zde je řešení situace opět částečně vázané na další vývoj technologií, zejména na jejich standardizaci a automatizaci. Z části se pak jedná o organizační a ekonomický problém (např. standardizace řídicích a laboratorních postupů, vznik a podpora bank biologického materiálu).

Některé další otázky související s vývojem jednotlivých typů biomarkerů, např. o pozitivních a negativních prediktivních hodnotách testů, jsou rozvedeny v následujících kapitolách 4.1 až 4.4.

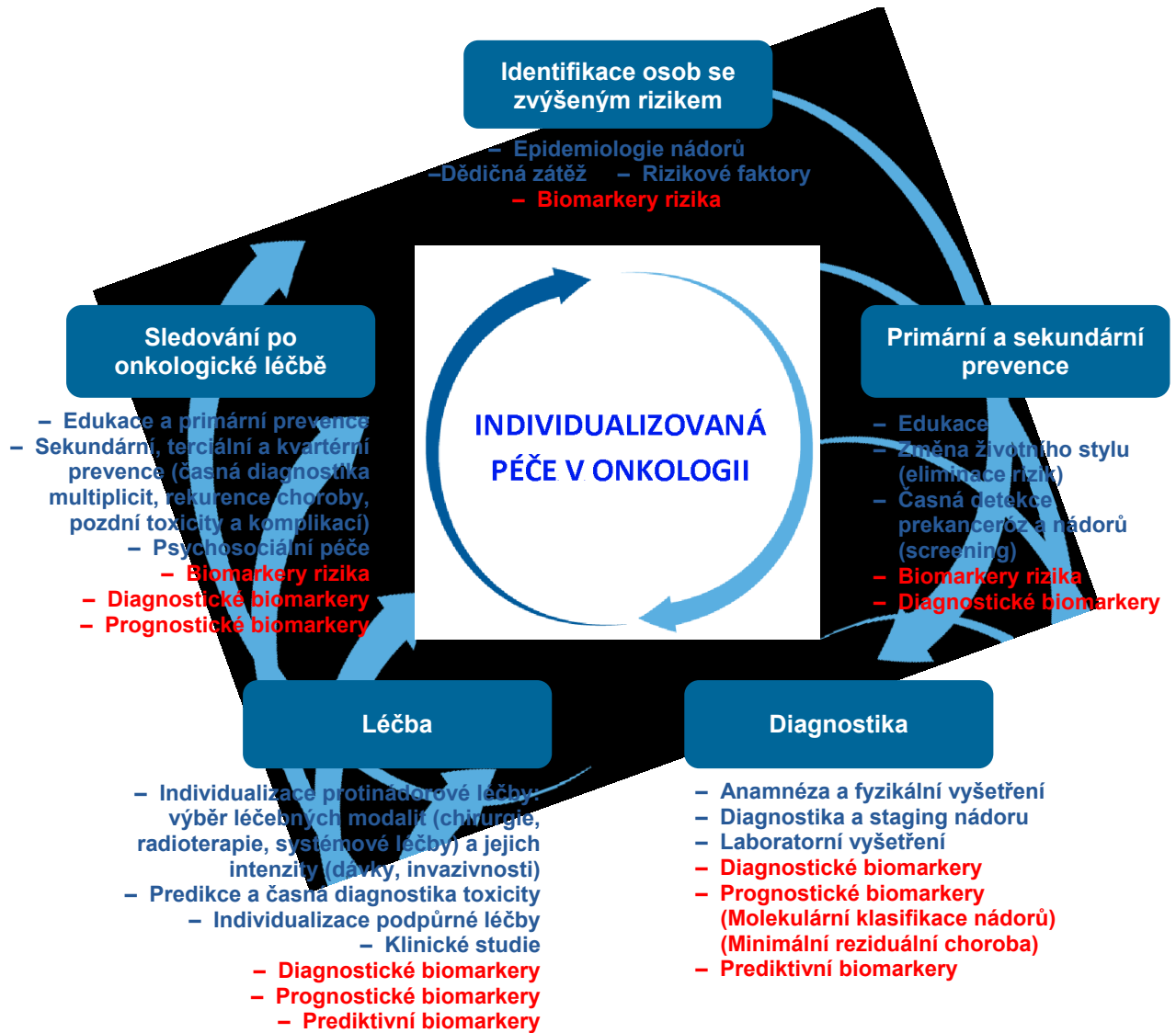
4 BIOMARKERY V ONKOLOGII

Přestože pojem biomarker vstoupil do medicínské literatury v 60. letech minulého století, rozšíření jeho užívání v onkologické praxi nastalo až po objevení molekulárního biomarkeru CEA (karcinoembryonální antigen) v 70. letech. Z historického pohledu přitom nelze opomenout, že v souvislosti s nádory začala éra využívání molekulárních biomarkerů mnohem dříve (Bence-Jonesův protein, stanovení v moči popsáno v roce 1847; objev filadelfského chromozomu, počátek 50. let minulého století) (14).

V onkologii jsme schopni využít biomarkerů k uplatnění možností individualizované medicíny ve všech oblastech zdravotní péče: **v prevenci** (identifikace osob a populací se zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění, ať již na základě genetické predispozice nebo zvýšené expozice kancerogenům; eliminace faktorů přispívajících ke vzniku nádorových onemocnění; časná detekce prekanceróz a nádorů), **v diagnostice** (diagnostika a staging nádorů, diagnostika toxicity léčby, diagnostika a monitorování minimální reziduální choroby) i **v léčbě** (individualizace protinádorové léčby na základě rozsahu a fenotypu nádorového onemocnění a prognózy pacienta dává prostor pro: využití méně zatěžujících chirurgických výkonů a redukci radioterapie u lokalizovaných onemocnění; cílenou farmakoterapii s vyšší protinádorovou efektivitou a případně i menším spektrem a závažností nežádoucích účinků; k individualizaci **podpůrné léčby**) (schematicky viz **obrázek 4**) (3,10,14,15).

Výsledky léčby jednoznačně potvrzují, že uplatnění principů individualizované medicíny v kontextu pokroků dosažených v biologii, diagnostice, léčbě a prevenci nádorových onemocnění zvyšuje šance na dlouhodobé přežití a lepší kvalitu života onkologických pacientů. Jako názorný příklad lze uvést zhoubné nádory prsu. Zatímco v první třetině 20. století přežívalo 5 let od chirurgické léčby 40 % patientek, na počátku 21. století se jednalo již o více než dvojnásobný počet, 87 % patientek. Přitom pacientky s karcinomy exprimujícími estrogenové receptory mají v průměru o 10 % lepší výsledky 5-letého přežívání (26-29).

Obrázek 4 - Možnosti využití biomarkerů v individualizaci léčebně-preventivních strategií v onkologii



4.1 BIOMARKERY RIZIKA

4.1.1 PŘEHLEDOVÁ ČÁST

Jedná se o biomarkery predikující vznik onemocnění u dosud zdravého jedince.

Maligní nádory vznikají a vyvíjí se procesem kancerogeneze. Podstatou tohoto procesu jsou změny vedoucí k maligní transformaci normální buňky na buňku nádorovou. Primární příčinou kancerogeneze jsou mutace ve třech typech genů: protoonkogenech, tumor-supresorových genech a reparačních (mutátorových) genech. Mutace mohou vznikat v průběhu genové transkripce spontánně, nebo v důsledku působení endogenních (např. oxidativní stres) či zevních faktorů (fyzikální, chemické a biologické kancerogeny). Udává se, že z hlediska procesu kancerogeneze hraje zásadní roli přibližně 1 % lidských genů. Futreal et al. publikovali seznam 291 takových genů, přičemž u 90 % z nich detekovali pouze somatické mutace, u 20 % zárodečné mutace a u 10 % těchto genů se vyskytovaly jak somatické, tak i zárodečné mutace. K iniciaci a promoci kancerogeneze nestačí jediná mutace, jedná se o proces vícestupňový. Kromě mutací může být funkce genů ovlivněna i epigenetickými mechanismy (např. metylace DNA, mikroRNA) (3,10,30,31).

Každý jedinec má různé riziko vzniku nádorového onemocnění. Toto riziko určuje zejména jeho genetická výbava a expozice kancerogenům (8). Obě složky lze, byť stále v omezeném rozsahu, charakterizovat pomocí biomarkerů (např. mutační stav vybraných genů, míra expozice ionizujícímu záření, dioxinům, HCV, HBV a další). Dědičná dispozice k nádorům může být výsledkem mendelovské dědičnosti alel jednoho genetického lokusu (**monogenní dědičnost**) nebo ovlivněna několika genetickými lokusy (**polygenní dědičnost**). Protože manifestaci dědičné dispozice do určité míry ovlivňují i faktory zevního prostředí, hovoříme pak o **nemocech komplexních, dříve multifaktoriálních** (31-33).

Monogenní dědičnost nádorů vychází ze zárodečných mutací postihujících především jednotlivé tumor-supresorové a reparační geny, vzácně i protoonkogeny (např. MET, RET, CDK4). Mutované geny mají obecně vysokou penetranci, její míra se však mezi jednotlivými orgány a typy tkání může výrazně lišit. Vzhledem k jejich vysoké penetranci a závažnosti vzniklých onemocnění přirozený výběr způsobuje, že se tyto mutace vyskytují v lidské populaci vzácně (< 1 %). K jejich úplné eliminaci ale nedochází, neboť mohou vznikat i „de novo“, přičemž se předpokládá výskyt v poměru 10^{-6} na gen a generaci (na jedno buněčné dělení). **Monogenní dědičnost podmiňuje vznik tzv. „hereditárních“ forem nádorů, které tvoří přibližně 5 % všech nádorových onemocnění (31,32).** Z klinického pohledu často hovoříme o hereditárních nádorových syndromech, které lze definovat na základě formy mendelovské dědičnosti a charakteristického spektra nádorů, jenž se častěji vyskytují v mladším věku a vícečetně (32). Jejich základní přehled obsahuje **tabulka 3**.

Genetická predispozice se uplatňuje i v případě výskytu tzv. **sporadických nádorů**, které představují přibližně 95 % všech nádorových onemocnění. Z výsledků epidemiologických studií je zřejmé, že příbuzní prvního stupně pacientů se sporadickými nádory mají většinou 2-3krát vyšší celoživotní riziko vzniku stejného nádorového onemocnění ve srovnání s kontrolní skupinou (**tabulka 2**) (32). U monozygotních dvojčat je toto riziko mnohem vyšší. Tuto skutečnost lze z části vysvětlit stejným životním prostředím, případně i životním stylem mezi příbuznými, bezesporu se však na ní podílí i jejich podobný genetický základ. Uvedená genetická predispozice je polygenní, založená především na sdílení určitého spektra mutací v genech s nízkou penetrancí a genetického polymorfizmu.

Tabulka 2 – Relativní celoživotní riziko vybraných malignit v závislosti na jejich výskytu v rodině

	Kolorektální karcinom	Karcinom prsu
Běžná populace	1 : 50	1 : 9 (žen)
Populace příbuzných	Relativní riziko	
1 příbuzný 1. stupně	x 2,9 (1 : 17)	x 1,8 (1 : 5)*
1 příbuzný 1. stupně ve věku < 45 let	x 5,0 (1 : 10)	x 2,8 (1 : 3,2)
2 příbuzní 1. stupně	x 8,3 (1 : 6)	x 2,9 (1 : 3,1)*
3 příbuzní 1. stupně	x 16,6 (1 : 3)	x 3,9 (1 : 2,3)*
Poznámky: * platí pro situaci, kdy příbuzná 1. stupně je starší než 54 let. S klesajícím věkem příbuzné 1. stupně se riziko malignity zvyšuje 2 až 4x. Ref. č. 32.		

Genetický polymorfismus, na rozdíl od genových mutací, představuje přirozeně se vyskytující změny v sekvenci DNA, které lze detekovat u více než 1 % populace. Asi 90 % z nich jsou polymorfizmy se záměnou jednoho nukleotidu (SNPs – single nucleotide polymorphisms), zbytek tvoří variace v počtu kopií tzv. tandemových repetitivních sekvencí), které označujeme jako mikrosatelitní polymorfizmy, jsou-li do 100 párů bazí, nebo minisatelitní polymorfizmy, pokud tento počet překračují. Odhaduje se, že lidský genofond obsahuje okolo 50 milionů SNPs a jednotlivé osoby se liší přibližně ve 3 milionech SNPs. Naprostá většina SNPs není funkčních, neboť se nachází v nekódující části DNA nebo dosud nemá identifikovaný fenotyp. Na druhou stranu již známe některé funkční polymorfizmy, nacházející se v genech regulujících procesy biotransformace látek, včetně xenobiotik, reparace DNA, buněčného cyklu a apoptózy, které jsou významně asociovány nejenom s výskytem nádorů (**viz tabulka 3**), ale i s predikcí jejich prognózy nebo s odpovědí na léčbu. Přítomnost polymorfismu může riziko vzniku nádorů ovlivnit jak negativně (zvyšovat), tak pozitivně (snižovat). To lze demonstrovat na relativně běžné situaci, kdy pozorujeme rozdíly ve výskytu sporadických nádorových onemocnění u osob, které jsou ve stejném rozsahu vystaveny nadměrné expozici určitým kancerogenům nebo sdílí podobné rizikové faktory pro vznik nádorů. Za tyto rozdíly mohou být zodpovědné např. polymorfizmy v genech regulujících metabolismus xenobiotik (8,33-35).

Nástup DNA čipů (microarrays) umožnil realizaci celogenomových asociačních studií (Genome-wide association studies, GWAS), což významně urychlilo identifikaci polymorfismů podmiňujících vznik nemocí. S příchodem metod celogenomového sekvenování nové generace lze očekávat další pokrok v tomto procesu, a to dává příslib, že v blízké budoucnosti budeme schopni identifikovat většinu polymorfismů asociovaných se vznikem nádorů a těchto výsledků, v podobě biomarkerů, pak využít v rámci individualizovaného přístupu k pacientovi a jeho příbuzným (35).

Přehled nejznámějších molekulárních biomarkerů rizika vzniku nádorů přináší **tabulka 3**.

Tabulka 3 -Přehled nejvýznamnějších autosomálních genů, jejichž mutace a polymorfizmy asociované se zvýšeným rizikem nádorů lze využít jako biomarkery rizika		
Vysoká penetrance* (relativní riziko > 10) / Nízká frekvence (≤ 1 % populace)		
Gen	Syndrom	Asociované nádory
APC	Familiární adenomatózní polypóza (FAP)	Adenomatózní polypóza, karcinomy v tlustém střevě, žaludku, duodenu, tenkém střevě. Osteomy, desmoidy. Papilární karcinom štítnice.
APC, PMS2	Turcotův syndrom	Adenomatózní polypóza tračnicku a současný záchyt nádorů CNS (meduloblastom, glioblastom).
BRCA1, BRCA2	Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií	Karcinom prsu, ovariální karcinom, karcinom prostaty. S nižší penetrancí: kolorektální karcinom, karcinom žaludku, slinivky a u BRCA2 i nádory žlučových cest, melanom.
CDH1 (E-cadherin)	Hereditární difuzní karcinom žaludku a lobulární karcinom prsu	Difuzní adenokarcinom žaludku, lobulární karcinom prsu.
CDKN2A (p16), CDK4, p14ARF	Familiární typ maligního melanomu	Melanom kůže a oka, adenokarcinom pankreatu.
FANCA-FANCM, BACH1, BRIP1, PALB2	Fanconioho anémie	Akutní myeloidní leukemie, MDS, solidní tumory (karcinomy jater, spinocelulární karcinomy jícnu, orofaryngu, vulvy).
KIT	Familiární forma GIST	Gastrointestinální stromální tumory (GIST).
LKB1/STK11	Peutz- Jeghersův syndrom	Hamartomy a karcinomy gastrointestinálního traktu, karcinomy prsu, pankreatu. Gonadální tumory (z buněk granulózy).
MEN1	Mnohočetná endokrinní neoplazie typ1 – MEN1	Nádory (adenomy) hypofýzy a příštítných tělísek, PNET (pankreatické neuroendokrinní tumory), karcinoid, adrenokortikální nádory.
MET	Familiární forma papilárního renálního karcinomu	Papilární renální karcinom.
MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2	Lynchův syndrom - HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer)	Adenomy a následně karcinomy tlustého střeva a dalších částí trávicí trubice. Karcinomy dělohy, žlučových cest, pankreatu, močového měchýře, ovarií, renální pánvičky. Gliomy. Sebaceózní karcinom.
MYH	MYH -Associated Polyposis	Adenomatózní polypóza, karcinomy v tlustém střevě a horním GIT.
NF1 a NF2	Neurofibromatóza (Neurofibromatosis von Recklinghausen) 1 a 2	NF1: mnohočetné neurofibromy, gliomy optiku a mozku, astrocytomy, neurofibrosarkomy /MPNST/, feochromocytom, karcinoid, leukemie, maligní tumory dětského věku (rhabdomyosarkom, Wilmsův tumor,...) NF2: neurinomy akustiku, meningeomy, gliomy, schwannomy, astrocytomy, ependimomy a další tumory CNS a PNS.
TP53	Li-Fraumeni syndrom	Sarkomy, karcinom prsu, mozkové nádory, leukemie/lymfomy, adrenokortikální nádory, karcinomy žaludku a řadu dalších nádorů.
PTCH	Gorlinův syndrom	Bazaliomy kůže, nádory CNS (meduloblastom).
PTEN	Cowdenův syndrom	Mnohočetný výskyt trichilemmomů a papilomů v oblasti kůže a sliznic. Polypy-hamartomy v GIT. Karcinom prsu, štítné žlázy (folikulární, papilární), endometria, meningeom. Světlobuněčný renální karcinom.
RB1	Retinoblastom	Retinoblastom, osteosarkom a další sarkomy, melanom.
RET1	Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 – MEN2(A/B)	A: medulární karcinom štítné žlázy, adenomy příštítných tělísek, feochromocytom. B: kožní, slizniční neurinomy, intestinální ganglioneuromatóza, medulární karcinom štítnice, feochromocytom.
SDHD, SDHAF2, SDHC, SDHB, SDHA	Syndrom paragangliomu (typ 1 až 5)	Paragangliomy a feochromocytom. Riziko malignizace nízké, kromě SDHB (typ 4), kde je střední až vysoké.
SMAD4, BMPR1A	Juvenilní polypóza	Polypy a následně karcinomy v tlustém a tenkém střevě, žaludku.
TSC1, TSC2	Tuberózní skleróza	Angiofibromy a fibromy kůže, hamartomy retiny a optického nervu, astrocytomy, angiomyolipomy ledviny, polypy v zažívacím traktu, rhabdomyomy srdce.
VHL	Von Hippel-Lindauova choroba	Angiomy, hemangiomy a hemangioblastomy retiny, mozečku, mozkového kmene, míchy, světlobuněčný karcinom ledvin (RCC), feochromocytom a další.
WT1	Hereditární forma Wilmsova tumoru	Wilmsův tumor.
XPA-XPG	Xeroderma pigmentosum	Keratomy, keratoacantomy, fibromy a další benigní tumory kůže. Bazocelulární a spinocelulární karcinomy a melanomy kůže. Karcinomy, sarkomy, melanom oka. Spinocelulární karcinomy hlavy a krku. Dále nádory plic, dělohy, prsu, mozku, varlat.

Tabulka 3 - Přehled nejvýznamnějších autosomálních genů, jejichž mutace a polymorfizmy asociované se zvýšeným rizikem nádorů lze využít jako biomarkery rizika (pokračování tabulky)		
Střední penetrance* (relativní riziko 2 – 5) / Nízká frekvence (≤ 1 % populace)		
Gen	Syndrom	Asociované nádory
ATM	Ataxia teleangiectasia	Lymfomy, lymfoidní leukemie, meduloblastom, karcinomy žaludku, slinných žláz, jater, kůže, prsu. Leiomyomy dělohy, dysgerminomy ovarií.
CHEK2 1100delC, del 5567		Karcinom prsu, štítnice, plic, ovarií, prostaty. Nádory mozku, osteosarkomy.
FLNC	Syndrom Birt-Hogg-Dubé	Fibrofolikulomy a trichodiskomy kůže a na sliznici dutiny ústní. Nádory ledvin (onkocytomy, chromofobní, smíšené, světlouněčné).
Nízká penetrance* (relativní riziko < 2) / Vysoká frekvence (> 1 % populace)		
Gen	SNP / popis variace	Asociované nádory
ADH3	Ile349Val	Adenomy tlustého střeva.
BMPR1B	rs1434536/vazebné místo pro miRNA-125b	Karcinom prsu.
CD86	rs17281995/vazebné místo pro 5 miRNA	Kolorektální karcinom.
CYP1A1	3' nekódující region 6235 T > C	Karcinomy prsu, dělohy / metabolismus estrogenů.
CYP1A1	Kodon 462 Exon 7 (Ile-Val)	Karcinom plic / kuřáci.
CYP1A2	5347 T > C	Karcinom plic / kuřáci.
FGFR2	rs2981582	Karcinom prsu.
GEMIN3	rs197412, rs197414 / biogeneze miRNA	Renální karcinom, karcinom močového měchýře.
GSTM1 a GSTT1	Delece	Karcinomy plic, močového měchýře, prsu, hlavy a krku, tlustého střeva, dělohy, žaludku / kuřáci.
INSR	rs1051690/vazebné místo pro miRNA-612	Kolorektální karcinom.
KRAS	rs61764370/vazebné místo pro let-7	Nemalobuněčný karcinom plic.
LSP1	rs3817198	Karcinom prsu.
MAP3K1	rs889312	Karcinom prsu.
MDM2	SNP309	Karcinomy prsu, hlavy a krku, žaludku, tlustého střeva, dělohy, vaječnicků, plic, močového měchýře, gliomy, lymfomy, leukemie, sarkomy.
miR-124-1	rs531564/pri-miRNA	Karcinom močového měchýře.
miR-146a	rs2910164/pre-miRNA	Karcinom jícnu, hepatocelulární karcinom.
miR-196-a2	rs11614913/pre-miRNA	Karcinomy hlavy a krku, žaludku, jícnu, prsu, plic, hepatocelulární karcinom.
miR-219-1	rs213210/pri-miRNA	Karcinom jícnu.
miR-423	rs6505162/pre-miRNA	Karcinomy prsu, ovarií, močového měchýře.
NAT2	C282T a T341C	Karcinomy močového měchýře, tlustého střeva, jater /kuřáci.
RAN	rs14035 / biogeneze miRNA	Karcinom jícnu.
SET8	rs16917496/vazebné místo pro miR-502	Karcinom prsu.
SULT1A1	Arg213His	Karcinom prsu / metabolismus estrogenů. Karcinom močového měchýře / kuřáci.
TP53	Kodon 72 (Arg-Pro)	Karcinom plic / kuřáci.
XPO5	rs11077 / biogeneze miRNA	Renální karcinom, karcinom jícnu.
XRCCI	Arg399Gln, Arg194Trp	Karcinomy prsu, jícnu, hlavy a krku / kuřáci.
<p>Poznámky a vysvětlivky:* výše relativního rizika pro nosiče patogenní mutace nebo rizikového polymorfizmu. Zařazení do kategorie „vysoká“, „střední“ nebo „nízká“ penetrance je na základě nejvyšší hodnoty relativního rizika vzniku jakéhokoliv nádoru ze skupiny nádorů, jejichž výskyt je s danou genovou mutací/polymorfizmem asociován.</p> <p><i>Další genetické polymorfizmy, které jsou asociovány s rizikem vzniku nádorů, jsou uvedeny v „Genetic Association Database“ na internetové adrese http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi.</i></p> <p>Reference pro tabulku: 31-38.</p>		

4.1.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE

V rámci našeho výzkumu zaměřeného na identifikaci nových rizikových biomarkerů solidních nádorů jsme studovali především jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) spojené s biologií mikroRNA (miRNA). Jednalo se buď o SNP ve vlastních sekvencích miRNA, nebo o SNP v jejich vazebných regiorech, tj. 3'UTR oblastech cílových genů. Touto problematikou jsme se zabývali již v přehledové práci z roku 2009, kde jsme jako první souhrnně popsali zapojení miRNA do Vogelsteinova modelu kolorektální kancerogeneze [1]. Uvedená práce K 31.5.2013 byla ze stránek časopisu *Molecular Cancer* stažena plná verze článku 15 614krát. Práce je v první padesátce nejnavštěvovanějších článků za celou historii časopisu. Za tuto práci jsme obdrželi v roce 2010 cenu České onkologické společnosti. Danou oblast jsme komplexně zpracovali pro všechny solidní nádory v jiné přehledové práci, která vyšla v roce 2012 časopise *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [2].

Data z recentních asociačních studií prokázala souvislost SNPrs11614913 v sekvenci miR-196a2, rs895819 v miR-27a a rs2910164 v miR-146a s rizikem vzniku nádorového onemocnění prsu, plic, prostaty, ovarií a dalších solidních tumorů. Asociační studie u rs895819 a rs2910164 v souvislosti se vznikem kolorektálního karcinomu (CRC) nebyly dosud provedeny. SNP rs11614913 byl již studován v souvislosti s kolorektálním karcinomem u čínské populace. Provedli jsme asociační studii těchto tří polymorfizmů a rizika vzniku sporadického kolorektálního karcinomu na české populaci. Z periferní krve 197 pacientů s CRC a 212 zdravých kontrol jsme izolovali DNA a pomocí TaqMan Real-Time PCR jsme provedli alelickou discriminaci. Následně jsme porovnali genotyp a frekvenci alel SNP u pacientů a kontrol. Žádná z provedených analýz neprokázala statisticky signifikantní výsledek. Naše data nenasvědčují tomu, že by existoval vztah mezi SNP rs11614913, rs895819 a rs2910164 a rizikem kolorektálního karcinomu [3].

Další velice progresivní přístup ke studiu rizikových faktorů kolorektálního karcinomu představuje nutrigenomika. Rozhodli jsme se proto zabývat molekulárními mechanismy zapojenými do chemoprotektivního účinku rostlinného rodu *Brassica*,

který je součástí řádu rostlin křížatých (Cruciferae), do kterého spadá např. hlávkové zelí, čínské zelí, kapusta, květák či brokolice. Důkazy o chemoprotektivním efektu těchto rostlin potvrzují epidemiologické studie z celého světa, ve kterých byl potvrzen pozitivní vztah mezi konzumací tohoto druhu zeleniny a sníženým rizikem nádorových onemocnění různých lokalizací včetně tlustého střeva a konečníku. Předpokládá se, že za chemoprotektivní účinek těchto rostlin jsou zodpovědné především isothiokyanáty (např. sulforafan, erucin, iberin), které jsou v nich hojně obsaženy. V naší studii, která právě vychází v prestižním nutričním časopise *Nutrition and Cancer*, jsme se zaměřili na identifikaci miRNA, které jsou regulovány účinkem isothiokyanátů (ITC), a asociaci SNP uvnitř vazebných míst těchto miRNA s rizikem sporadického kolorektálního karcinomu. Za použití globálního expresního profilování pomocí TaqMan Low-Density Array jsme identifikovali 3 miRNA (miR-155, miR-23b, miR-27b) regulované na buněčných liniích střevního epitelu NCM460 a NCM356 účinkem sulforafanu a iberinu. Pomocí *in silico* analýzy jsme našli 9 relevantních SNP umístěných uvnitř 3'UTRs cílových genů (AGTR1, TNFAIP2, PRKCB, HSPA9, RABGAP1, DICER1, ADAM19, VWA5A a SIRT5) těchto miRNA. Homozygotní CC varianta genu pro DICER1, rs1057035, byla významně spojena se sníženým rizikem CRC (OR 0,49, 95% CI: 0,25 - 0,95, $p = 0,036$) ve srovnání s TT homozygotním genotypem, přičemž alela C má tendenci poskytovat protektivní účinek ($p = 0,072$). Tato studie ukázala, že miRNA by mohly být zapojeny do chemoprotektivních účinků přírodních látek a s nimi spojené SNP tak mohou představovat novou skupinu kandidátních rizikových faktorů nádorových onemocnění [4].

Do podobného kontextu lze zařadit i naši studii zaměřenou na stanovení polymorfizmů v genech pro glutathion-S-transferázy v souvislosti s chemoprotektivním účinkem fytochemikálií zeleniny rodu Brassica a analýzou jejich vlivu na riziko kolorektálního karcinomu. Polymorfizmy v biotransformačních enzymech druhé fáze - glutathion-S-transferázách (GSTA1, GTSM1, GSTT1, GSTP1) vedoucí k jejich snížené aktivitě mohou být dalšími genetickými faktory, které utváří schopnost jedince mít prospěch z potenciálně chemoprotektivního účinku fotochemikálií (isothiokyanátů) obsažených v zelenině rodu Brassica a sníženému riziku vzniku kolorektálního karcinomu. V naší práci jsme na souboru 197 pacientů

s kolorektálním karcinomem a 212 zdravých kontrol stanovili polymorfizmy glutathion-S-transferázách (GSTA1 C69T, del GSTM1, del GSTT1, GSTP1 A105G) k riziku vzniku kolorektálního karcinomu. Polymorfismus A105G jsme stanovili pomocí alelické discriminace metodou TaqMan Real-Time PCR, GSTA1 C69T metodou PCR-RFLP a delece v GSTM1 a GSTT1 jsme určili pomocí multiplex PCR, přičemž primery byly navrženy do oblasti delece. Jako interní pozitivní kontrolu jsme použili gen pro albumin. Prokázali jsme statisticky signifikantní asociaci mezi AA a AG genotypem v GSTP1 A105G A>G a snížené riziko vzniku kolorektálního karcinomu pro heterozygotní genotyp (OR 0,64; 95% CI; 0,42 - 0,98, p = 0,043). U ostatních stanovovaných genotypů jsme nenalezli statisticky významný výsledek. Naše data naznačují, že genotyp AG u A105G v GSTP1 může mít za následek snížené odbourávání chemoprotektivních fytochemikálií zeleniny rodu Brassica, a snižovat tak riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Dle našich dosavadních poznatků představují SNP spojené s miRNA, především ve vazebných oblastech jejich cílových genů, velice slibné kandidátní geny ovlivňující riziko nádorových onemocnění. Nutrigenomika potom představuje velice slibný přístup umožňující identifikovat tyto SNP u nádorů gastrointestinálního traktu [5].

V Masarykově onkologickém ústavu jsme v rámci genetického poradenství vyšetřili více než 6 000 probandů a jejich příbuzných, kteří jsou do naší poradny odesíláni s podezřením na vrozenou predispozici k nádorům. Pravidelně publikujeme i výsledky naší klinické práce. Z průběžných údajů vyplývá, že ve skupině 2 100 testovaných rodin bylo nosičství mutace v genu BRCA1 nebo BRCA2 (dále jen BRCA1/2), potvrzeno ve 26,2 % případů (551 rodin), z toho více než 2/3 byly mutace BRCA1 genu (392 rodin, 71,1 %). Výskyt mutací se však různil v závislosti na kritériích, která vedla k indikaci testování. Nejvyšší byl u pacientek s nádorovou duplicitou, které měly diagnostikován jak karcinom prsu, tak i ovarií (73,7 %), nebo bilaterální karcinom prsu (31 %), a dále v rodinách splňujících kritéria syndromu hereditárního karcinomu prsu a ovarií, ve kterých bylo diagnostikováno tři a více případů souvisejících nádorů (61 %), přičemž se zde vyskytovaly jak nádory prsu, tak ovarií. Pokud se mezi příbuznými vyskytovaly pouze nádory prsu, pak jsme nosičství BRCA1/2 mutace zachytili u 32,5 % testovaných jedinců. Záchyt mutací klesal

v závislosti na snižujícím se počtu onkologických pacientů v rodině. Ve skupině testovaných mužů, kteří onemocněli karcinomem prsu, byla BRCA1/2 mutace zachycena ve 37,5 % případů. V rámci české populace tvoří 8 nejčastěji detekovaných mutací v genu BRCA1 66,6% podíl na všech 78 u nás detekovaných BRCA1 patogenních mutacích [6].

Více než 70 % nádorů prsu diagnostikovaných u nosiček BRCA1 mutace má triple-negativní fenotyp (TNBC). Tyto karcinomy neexprimující estrogenový receptor alfa, progesteronový receptor ani nevykazují HER-2 pozitivitu, tj. expresi receptoru HER-2 nebo amplifikaci HER-2/neu genu. Na druhou stranu, u pacientek s TNBC je mnohem častěji diagnostikován vícečetný výskyt nádorů a nosičství mutace v BRCA1 genu ve srovnání s jinými fenotypy. V našem souboru 335 pacientek s TNBC mělo 21,5 % pacientek diagnostikováno více než jeden zhoubný novotvar, a to je dvojnásobně vyšší výskyt než v populaci všech českých pacientek s karcinomem prsu z let 1998 – 2007. Pokud tyto pacientky byly na základě platných indikačních kritérií testovány na nosičství BRCA1/2 mutace, pak patogenní BRCA1 mutace byla zjištěna u 48,7 % případů a BRCA2 mutace u 5,8 % [7]. Tato skutečnost je důležitá nejenom pro sledování pacientek s TNBC po léčbě, ale i pro případnou indikaci genetického testování, která je v jejich případě posunuta až ke hranici 50 let, a to včetně případů sporadického výskytu TNBC. Výše uvedené souvislosti nás vedly k hledání biomarkerů použitelných pro rychlé - „screeningové“ - vyhledávání nosiček BRCA1 mutace mezi pacientkami s TNBC v rámci výzkumného projektu IGA MZ ČR. Z tohoto projektu v současnosti připravujeme publikační výstupy.

4.2 DIAGNOSTICKÉ BIOMARKERY

4.2.1 PŘEHLEDOVÁ ČÁST

Diagnostické biomarkery jsou biomarkery asociované s přítomností onemocnění a/nebo jeho rozsahem a/nebo jeho klasifikací. V onkologii se uplatňují především v **diagnostice a stagingu** nádorových onemocnění a v **diagnostice a monitorování minimální reziduální choroby a nežádoucích účinků léčby**. Jejich význam narůstá v souvislosti s **vývojem cílené protinádorové léčby**, pro kterou je nádorově specifická molekulární struktura ideálním terčem, a dále s příchodem nových technologií, jejichž vysoká citlivost a rozlišovací schopnost umožňují detekovat až stopová množství molekulárních biomarkerů, případně stanovit jejich jednotlivé molekuly. Toho lze využít pro časnou diagnostiku nádorů (3,38).

I přesto, že je současná diagnostika a klasifikace nádorových onemocnění založena zejména na určení místa vzniku nádoru a jeho histologického původu, stanovení biomarkerů, ať již klasických nebo molekulárních (viz **tabulka 4**), se u několika nádorů již stalo nedílnou součástí tohoto procesu (např. hematologické malignity, sarkomy, testikulární nádory, neuroendokrinní tumory, nádory CNS) a u dalších se v klinické praxi běžně používá, ačkoliv dosud nedošlo k jejich integraci do oficiálních klasifikačních schémat (např. molekulární klasifikace karcinom prsu) (18,38).

Epidemiologické a intervenční studie prokazují, že **časná detekce nádorů** zvyšuje šanci na kurativní léčbu a snižuje výskyt komplikací, které pokročilé nádorové onemocnění a jeho léčba přináší. U většiny nádorů trvá několik let, než se svým růstem klinicky projeví a začnou ohrožovat svého nositele na životě. To poskytuje relativně dostatečný časový prostor k časně detekci nádoru a zvyšuje šanci na jeho eradikaci (**obrázek 5**). Lze tedy předpokládat, že použití molekulárních diagnostických biomarkerů k časně detekci nádorů může přispět k dalšímu snížení morbidity a mortality spojené s těmito chorobami. Ideální diagnostický molekulární nádorový biomarker by měl být přítomen výhradně v nádorové tkáni a nejlépe by měl být produkován přímo nádorovými buňkami. Jeho měření by mělo být

realizovatelné metodami dostupnými pro klinickou praxi a analyzovaný biologický materiál by mělo být možné získat za použití co nejméně invazivních technik (3,7,38).

Tabulka 4 -Příklady diagnostických molekulárních biomarkerů používaných k diagnostice a klasifikaci vybraných malignit

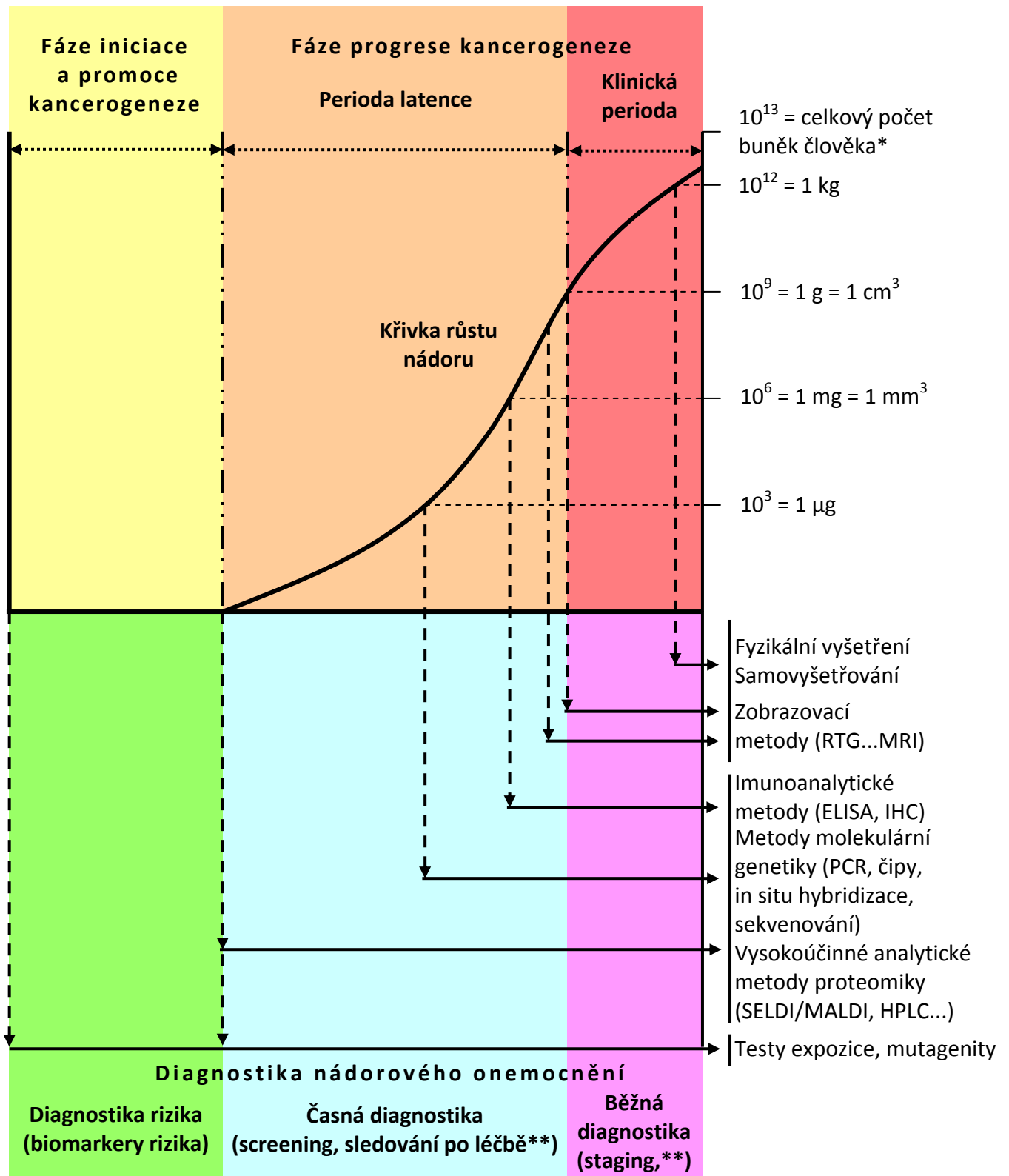
Skupina malignit	Molekulární biomarker	Malignita	
Akutní leukemie	<i>PML-RARA</i>	Akutní promyelocytární leukemie	
	<i>CBFB-MYH11</i>	AML s t(16;16)(p13;q22) nebo inv(16)(p13;q22)	
	<i>RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)</i>	AML s t(8;21)(q22;q22)	
	<i>MLL-rearranged</i>	AML s abnormalitami v MLL genu	
	<i>RBM15-MKL1</i>	Akutní megakaryocytární leukemie	
	<i>ETV6(TEL)-RUNX1(AML1)</i>	ALL	
	<i>PBX1-E2A(TCF3)</i>		
Chronické leukémie	<i>BCR-ABL1</i>	CML	
	<i>ETV6(TEL)-PDGFRb</i>	Chronická myelomonocytární leukemie	
Lymfomy	<i>BCL2-IgH, t(14;18)(q32;q21)</i>	Folikulární lymfom	
	<i>CCND1-IgH, t(11;14)(q13;32)</i>	Lymfom pláštové zóny (Mantle cell lymphoma)	
	<i>BCL6-rearranged</i>	DLBCL	
	<i>MYC-IgH, t(8;14)(q24;q32)</i>	Burkitův lymfom	
	<i>ALK-rearranged</i>	Anaplastický velkobuněčný T lymfom	
Myeloproliferativní choroby	<i>JAK2(V617F)</i>	Ph-negativní chronická myeloproliferativní onemocnění	
Sarkomy	<i>SS18(SYT)-SSX1</i>	Synoviální sarkom	
	<i>SS18(SYT)-SSX2</i>		
	<i>PAX3-FOXO1A(FKHR)</i>	Alveolární rabdomyosarkom	
	<i>PAX7-FOXO1A(FKHR)</i>		
	<i>PAX3-AFX</i>		
	<i>EWSR1(EWS)-FLI1</i>	Ewingův sarkom	
	<i>EWSR1(EWS)-ERG</i>		
	<i>EWSR1(EWS)-ETV1</i>		
	<i>EWSR1(EWS)-ETV4</i>		
	<i>EWSR1(EWS)-FEV</i>		
	<i>FUS-FEV</i>		
	<i>FUS-ERG</i>		
	<i>EWSR1(EWS)-NR4A3</i>		Myxoidní chondrosarkom extraskeletální
	<i>TAF15-NR4A3</i>		
	<i>EWSR1(EWS)-ATF1</i>		Světlobuněčný sarkom (Clear cell sarcoma)
	<i>EWSR1(EWS)-CREB1</i>	Alveolární sarkom měkkých tkání	
	<i>ASPSCR1-TFE3</i>		
	<i>FUS-DDIT3(CHOP)</i>	Myxoidní liposarkom	
	<i>EWSR1(EWS)-DDIT3(CHOP)</i>		
	<i>FUS-CREB3L2</i>	Low-grade fibromyxoidní sarkom	
	<i>JAZF1-SUZ12</i>	Endometriální stromální sarkom	
	<i>ETV6-NTRK3</i>	Kongenitální (infantilní) fibrosarkom	
	<i>EWSR1(EWS)-WT1</i>	Desmoplastický SRCT	
<i>COL1A1-PDGFB</i>	Dermatofibrosarkoma protuberans		
GIST	Nadměrná exprese KIT (CD117) a/nebo mutace c-KIT nebo PDGFRA	Zejména GIST u dospělých	
	Mutace SDH	Zejména GIST u dětí	

Tabulka 4, ref.: 3, 39, 40.

Je žádoucí, aby **diagnostický biomarker dosahoval co nejvyšší senzitivity a specificity**. Bohužel, kromě strukturních chromozomových aberací, genových mutací a charakteristických přestaveb genů pro imunoglobuliny (viz **tabulka 4**) není naprostá většina dosud identifikovaných diagnostických molekulárních biomarkerů 100% specifická pouze pro nádorovou tkáň/nádorovou buňku. V případě, že potenciální diagnostický molekulární biomarker může být detekovatelný i ve zdravé tkáni nebo za jiných patologických stavů, přichází jeho použití za účelem časně detekce nádorů v úvahu pouze tehdy, pokud testovací metody nebo jejich kombinace s relativně nenákladným a nezatěžujícím klinickým vyšetřením dokážou poskytnout výsledky s vysokou pozitivní prediktivní hodnotou. V opačném případě bychom zbytečně zatěžovali jak testované jedince, tak zdravotní systém, neboť vysoká falešná pozitivita testu by vedla k dalším vyšetřovacím metodám i u zdravých jedinců. Podobně vysoká falešná negativita testu by zvyšovala náklady na léčbu pokročilých stadií a ve svém důsledku by vedla ke ztrátě důvěry odborné i laické veřejnosti k programům časněho záchytu nádorů, které by na detekci molekulárních biomarkerů byly založené (3,7,13).

Příkladem vhodným pro ilustraci složitosti uvedené situace je testování biomarkeru PSA za účelem časně detekce karcinomu prostaty. Ze 100 testovaných mužů ve věku nad 50 let bude zvýšená hodnota PSA ($> 4,0$) detekována u 10, z nichž pouze u tří bude biopsicky prokázán karcinom prostaty, u ostatních bude zjištěna jiná příčina (nejčastěji benigní hyperplazie). U zbývajících 90 jedinců s normální hladinou PSA se u 1 až 2 v budoucnosti rozvine život ohrožující karcinom prostaty. Přitom ze 100 pacientů s karcinomem prostaty je zvýšená hodnota PSA detekována u 70 z nich. Z výše uvedených čísel vyplývá, že **pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV)** činí 30 %, senzitivita 70 % a **negativní prediktivní hodnota (NPV)** je přibližně 98 %. Většina mužů tak biopsii prostaty podstoupí zbytečně. Přitom za nepodkročitelné, klinicky akceptovatelné minimum PPV biomarkeru je považováno 10 % (alespoň jedna z 10 biopsií prokáže malignitu), případně senzitivita a specificita 80 % a vyšší (13,24,41). Hodnota PPV může významně narůst v případě, že se testování omezí na populaci s vyšším rizikem. Jako příklad může posloužit měření biomarkeru CA-125 a současné

Obrázek 5 – Vztah mezi růstem a detekovatelností nádoru



provádění transvaginální ultrasonografie u nosiček mutace v BRCA1 nebo BRCA2 genu. Pokud budeme v budoucnosti schopni identifikovat jedince s vyšším rizikem vzniku nádorů, můžeme v těchto populacích využít i biomarkery s nižší PPV (25,38).

Klinické použití diagnostického molekulárního biomarkeru pro časnou detekci nádorů mohou komplikovat další, dosud ne zcela vyřešené situace. Při stárnutí organismu dochází ke vzniku dysplazií a jiných pre-maligních lézí na řadě míst, a to i v rámci jedné orgánové soustavy, přičemž pouze minimum z nich získá potenciál další progresu. Použitím velmi citlivé analytické metody pak budeme detekovat i molekulární biomarkery produkované buňkami i těchto lézí a otázkou bude, jak určíme, které z nich by měly být odstraněny a které ne, obzvláště v případě, kdy daný diagnostický biomarker nebude mít žádný prognostický význam (42). Stejně tak nevíme, jak budeme postupovat v případech, kdy budeme schopni detekovat nádorově specifické molekulární biomarkery (např. pro nádory plic) v krvi člověka v době, kdy svým rozsahem nedosáhnou rozlišovací schopnosti současných zobrazovacích metod (< 5 mm)? I tyto situace nejspíše vyústí v nadměrnou zátěž pacienta a zdravotního systému opakováním diagnostických metod při jeho sledování nebo provedením léčebných zákroků, které však mohou být naprosto zbytečné. Vývoj diagnostických molekulárních biomarkerů by proto měl být doprovázen vývojem biomarkerů prognostických. Ideální by bylo, kdyby molekulární biomarker nabýval obou významů. Výsledky klinického testování nového biomarkeru by měly prokazovat, že jeho použití ovlivní rozhodování lékařů a bude mít pozitivní dopad na léčbu detekovaného onemocnění (6).

Diagnostické biomarkery se dále využívají i při **monitorování minimální reziduální choroby**. Za tímto účelem lze použít: a) molekulární biomarkery jedinečné pro konkrétní nádorové onemocnění u daného jedince (např. identifikace specifické přestavby genu pro imunoglobuliny u pacienta s leukémií a monitorování tohoto genového transkriptu), b) molekulární biomarkery specifické pro nádorové onemocnění bez ohledu na jedince, u kterého vzniklo (např. identifikace fúzního genu PML-RARA charakteristického pro akutní promyleocytární leukemii a sledování jeho genového transkriptu), c) molekulární biomarkery asociované s morfolofií

a/nebo funkcí buněk/tkáně, z nichž nádorové onemocnění maligní transformací vzniklo (např. monitorace PSA, kalcitoninu, AFP, CEA a dalších enzymů, hormonů, diferenciačních antigenů a biomolekul). Tkáňově „specifických“ biomarkerů se v klinické praxi používá při snaze o identifikaci původu nádorů neznámého origa (viz **tabulka 5**) (3, 13, 43).

Tabulka 5 - Příklady diagnostických molekulárních biomarkerů používaných k monitoraci onemocnění a v diferenciální diagnostice nádorů neznámého origa

Skupina malignit	Malignita	Diferenciální diagnostika původu	Monitorace onemocnění	
Melanom		S-100 (+), HMB-45 (+)	S-100	
Lymfom		LCA (+)		
Leukemie	CML		BCR-ABL1	
	APML		PML-RARA	
	ALL		specifická přeskupení IgHV-TCR	
Myelom			Paraprotein	
Sarkom		Vimentin (+), desmin (+)		
Karcinom	Kolorektální	CK 7 (-); CK 20 (+); CDX-2 (+)	CEA, CA19-9	
	Žaludku	CK 7 (-); CK 20 (+ mucinózní/-serózní)	CEA, CA72-4	
	Pankreatu	CA19-9 (+), CK 7 (+)	CA19-9, CEA	
	Hepatocelulární	CK 7 (-), CK 20 (-), AFP (+)	AFP	
	Bronchogenní			
	Adenokarcinom	TTF-1 (+)	CEA	
	Ostatní NSCLC	CK 7 (+), CK 20 (-), TTF-1 (-)	CEA	
	Malobuněčný	TTF-1 (+), chromogranin A (+), NSE (+)	NSE	
	Neuroendokrinní	Chromogranin A (+), synaptofyzin (+)	Chromogranin A, 5-HIOK	
	Štítné žlázy			
	Diferencovaný	Tyreoglobulin (+)	Tyreoglobulin	
	Medulární	Kalcitonin (+)	Kalcitonin	
	Příštítná tělíska	Parathormon (+)	Parathormon	
	Močového měchýře	CK 7 (+)	NMP22, BTA	
	Prostaty	PSA (+), CK 7 (-), CK 20 (-)	PSA	
	Prsu	CK 7 (+), CK 20 (-), ER (+), HER-2 (-/+),	CEA, CA15-3	
	Endometriální	CK 7 (+), CK 20 (-), ER (+)	CEA	
	Ovarií	CK 7 (+), CK 20 (+ mucinózní/-serózní)	CA-125, HE4	
	Germinativní tumory			
	Embryonální karc.	AFP (+), OCT4 (+)	AFP, LDH	
	„Yolk sac“ tumor	AFP (+), OCT4 (-)	AFP, LDH	
	Choriokarcinom	β-HCG (+), OCT4 (-)	β-HCG, LDH	
	Seminom	PLAP - placentární alkalická fosfatáza (+), OCT4 (+/-)	LDH	

4.2.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE

Problematiku potenciálního využití miRNA pro diagnostické účely u kolorektálního karcinomu jsme zpracovali v naší přehledové práci, která vyšla v roce 2009 v časopise *Molecular Cancer*, za kterou jsme obdrželi cenu České onkologické společnosti (viz Biomarkery rizika) [1].

Naše první originální práce zabývající se problematikou miRNA, která vyšla v roce 2007 v časopise *Oncology*, byla historicky šestou prací zabývající se analýzou miRNA u kolorektálního karcinomu (dnes jich je více než 550) a první prací na téma miRNA v onkologii v České republice. Analyzovali jsme vztah hladin miR-21, miR-31, miR-143 a miR-145 s klinicko-patologickými charakteristikami kolorektálního karcinomu a jako první jsme zde našli pozitivní korelaci mezi hladinami miR-21 a klinickým stadiem CRC ($p=0.03$). MiR-21 je jednou z nejstudovanějších onkogenních miRNA a naše pozorování bylo následně mnohokrát potvrzeno. Tato práce má dnes na ISI WOS indexovaných více než 200 citací [8]. Na ni jsme navázali další studií, ve které jsme na rozsáhlejší a nezávislém souboru potvrdili některá dřívější pozorování a navíc jsme popsali negativní korelaci hladin miR-21 s celkovým přežíváním pacientů s kolorektálním karcinomem (viz Prognostické biomarkery) [9]. MiR-21 jsme zde studovali rovněž z funkčního hlediska na buněčných modelech (viz Funkční studie).

Doposud nejrozsáhlejší studii zabývající se významem miRNA u kolorektálního karcinomu jsme publikovali v roce 2012 v časopise *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Hlavním cílem studie bylo analyzovat expresní profily 667 miRNA metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays u důkladně klinicky charakterizovaných pacientů s kolorektálním karcinomem. S použitím moderních biostatistických metod jsme identifikovali 25 miRNA s rozdílnou expresí mezi nádorovou tkání a nenádorovým střevním epitelem ($P < 0,0001$), dále bylo nalezeno 5 miRNA schopných odlišit nádory II a III klinického stadia ($P < 0,01$). Takto identifikované miRNA byly následně validovány na nezávislém souboru 125 pacientů s kolorektálním karcinomem pomocí individuálních qRT-PCR, přičemž byla analyzována jejich nádorová a paralelní nenádorová tkáň. Validační část studie potvrdila významně snížené hladiny miR-378

($P < 0,0001$), miR-422a ($P < 0,0001$), miR-375 ($P < 0,0001$), miR-451 ($P < 0,0001$), miR-378* ($P < 0,0001$), miR-215 ($P < 0,0001$), miR-145 ($P = 0,037$), miR-195 ($P = 0,0032$) a miR-139-5p ($P = 0,0002$) a významně zvýšenou hladinu miR-135b ($P < 0,0001$) a miR-31 ($P < 0,0001$) v nádorové tkáni. Zároveň byla pozorována rozdílná exprese miR-422a ($P = 0,0117$), miR-135b ($P = 0,0303$) a miR-215 ($P = 0,0188$) u pacientů bez postižení a s postižením regionálních lymfatických uzlin. Vliv těchto miRNA na viabilitu buněk, apoptózu, buněčný cyklus a migraci byl testován *in vitro* s využitím tranzientní transfekce syntetického prekursoru či inhibitoru příslušné miRNA do buněčné linie HCT-116 a DLD1 (viz Fukční studie) [10].

Naše práce ukázaly nejen využitelnost miRNA pro diagnostické účely ve smyslu specifických změn na úrovni nádorové tkáně, ale naznačily také možnost využití miRNA v diagnostice postižení regionálních lymfatických uzlin z tkáně primárního nádoru, což představuje u kolorektálního karcinomu jednu z možností, jak docílit snížení downstagingu postižení uzlin, ke kterému dochází přibližně v 15 až 20% případů. Jednou ze tříd dlouhých nekódujících RNA (lncRNA), které jsou dnes velice frekventně studovány ve vztahu s nádorovou biologií, jsou přepisované vysoce konzervované oblasti (transcribed-ultraconserved regions; T-UCR) vyznačující se vysokou homologií mezi ortologními oblastmi lidského, potkaního a myšního genomu. V současné době je známo 481 takových sekvencí. Z funkčního hlediska se T-UCR jeví jako inhibitory kódujících genů a některých nekódujících RNA, včetně mikroRNA. Nedávné studie naznačily, že exprese T-UCR je u vybraných nádorových onemocnění deregulována. V naší studii jsme se zaměřili na analýzu exprese uc.43, uc.73, uc.134, uc.230, uc.339, uc.388 a uc. 399 v nádorové a příslušné nenádorové tkáni a jejich korelaci s klinicko-patologickými charakteristikami pacientů s kolorektálním karcinomem. Identifikovali jsme signifikantně snížené hladiny uc.73 ($p = 0,014$) a uc.388 ($p = 0,03$) v nádorové tkáni. Nižší hladina uc.388 byla navíc nižší u distálně lokalizovaných nádorů ($p = 0,018$) a hladina uc.73 korelovala s celkovým přežíváním (viz Prognostické biomarkery). Naše data byla v tomto případě v rozporu s jedinou doposud publikovanou prací na toto téma, kdy u daných miRNA pozorovali autoři za použití hybridizačních arrays opačné trendy ve změnách jejich exprese. Naše

dosavadní data určitě svědčí pro možné diagnostické využití T-UCR u nádorových onemocnění [11].

Kromě studia miRNA jsme za účelem identifikace molekulárních biomarkerů predikujících postižení regionálních lymfatických uzlin analyzovaly i genovou expresi, a to pomocí DNA čipové technologie. V naší práci publikované v roce 2009 v *Oncology Reports* jsme analyzovali expresi celkem 440 genů, u nichž byla popsána asociace s patogenezí nádorů. Na pilotním souboru 20 pacientů s různým stagingem onemocnění jsme identifikovali 3 geny (Hsp110, HYOU1 a TCTP), jejichž exprese se významně lišila mezi nádory, které byly omezeny pouze na střevo a těmi, u které již metastazovaly do regionálních lymfatických uzlin. V případě Hsp110 byl rozdíl 2,4x. Hladina Hsp110 byla rovněž statisticky významně odlišná mezi nádorovou a nenádorovou tkání ($p < 0,0003$). Pacienti s vysokou nádorovou expresí Hsp110 měli horší přežití, byť toto pozorování nebylo statisticky signifikantní ($p = 0,1457$) [12].

Již v roce 2009 jsme publikovali přehledovou práci v časopisu *Klinická onkologie* zabývající se problematikou možného zapojení miRNA do patogeneze renálního karcinomu a rovněž možností jejich diagnostického využití [13]. Tento přehled se stal podkladem pro naši první studii zabývající se analýzou miRNA u renálního karcinomu. Provedli jsme srovnávací analýzu profilů exprese vybraných miRNA (miR-155, miR-141, miR-210, miR-200c, miR-106a, miR-106b, miR-200b, miR-182) v tumorech 38 pacientů s lokalizovaným světlobuněčným renálním karcinomem (ccRCC) vzhledem k nenádorovému ledvinovému parenchymu pro diagnostické účely a vzhledem k bezpříznakovému přežití pacientů za účelem identifikace miRNA, které by byly využitelné jako prognostické markery (viz Prognostické biomarkery). V nádorech jsme pozorovali statisticky významně vyšší hladiny miR-155 ($p < 0,0001$), miR-210 ($p < 0,0001$), miR-106a ($p < 0,0001$) a miR-106b ($p < 0,0001$). Hladiny miR-141 ($p = 0,0015$) a miR-200c ($p < 0,0001$) byly v nádorech statisticky významně nižší. Tato pozorování jsme publikovali v časopise *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* [14].

V roce 2011 jsme publikovali v časopise *Biochemical and Biophysical Research Communications* aktualizovaný přehled na dané téma, který se stal východiskem naší další práce [15]. Tentokrát jsme se detailněji zaměřili na studium miR-210, což je miRNA velice dobře popsána ve vztahu k procesům hypoxie. Potvrdili jsme naše dřívější pozorování na nezávislém souboru pacientů a tuto miRNA navíc úspěšně studovali z funkčního hlediska na buněčných modelech renálního karcinomu (viz Funkční studie) [16].

Velice progresivní oblastí současné molekulární diagnostiky je analýza miRNA v tělních tekutinách. Bylo opakovaně prokázáno, že miRNA se vyskytují například v krevním séru a plazmě ve vysokých hladinách a jsou zde vysoce stabilní. Specifické sérové profily miRNA byly již identifikovány u většiny solidních i hematologických malignit. Cílem naší studie bylo identifikovat sérové miRNA umožňující diagnostiku pacientů s renálním karcinomem. Pomocí expresního profilování založeného na principu qRT-PCR (TaqMan Low Density Arrays, TLDA) jsme identifikovali 30 miRNA, které byly rozdílně exprimované v séru pacientů s renálním karcinomem a zdravých dárců. Na nezávislém souboru pacientů ($n = 90$) a zdravých dárců ($n = 35$) jsme potvrdili zvýšenou hladinu miR-378 ($p = 0,0003$, $AUC = 0,71$) a sníženou hladinu miR-451 ($p < 0,0001$, $AUC = 0,77$) v krevním séru pacientů s RCC. Kombinace těchto 2 miRNA umožnila identifikovat sérum pacientů s renálním karcinomem s 83% senzitivitou při 81% specifitě a $AUC 0,86$. Cirkulující sérové miRNA se proto zdají být slibnými diagnostickými biomarkery renálního karcinomu. V současné době provádíme rozsáhlou validační studii na několikanásobném a nezávislém souboru pacientů a kontrol [17].

V roce 2012 jsem na souboru 335 pacientek diagnostikovaných a/nebo léčených v MOÚ v letech 2004–2009 s triple-negativním karcinomem prsu (TNBC) provedli validaci publikovaných diagnostických schémat určených k identifikaci „basal-like“ podskupiny TNBC. Z diagnostického hlediska se jako nejvýhodnější ukázalo použití modifikovaného Nielsenova algoritmu, tj. stanovení fenotypu basal-like -TNBC na základě prokázání exprese cytokeratinu 5/6 a/nebo cytokeratinu 14 a/nebo EGFR na nádorových buňkách TNBC. Basal-like TNBC představovaly v naší kohortě 75 % všech

TNBC při použití uvedeného postupu. Tento počet odpovídá prevalenci TNBC v populacích evropských žen [7].

Z hlediska možné translace diagnostiky do klinické praxe považujeme za nejpodstatnější studii, ve které jsme identifikovali miRNA umožňující diagnostikovat postižení lymfatických uzlin z tkáně primárního nádoru u kolorektálního karcinomu, a dále sérové miRNA u renálního karcinomu s vysokým potenciálem v rámci sledování pacientů po nefrektomii a časném zachytu relapsu.

4.3 PROGNOTICKÉ BIOMARKERY

4.3.1 PŘEHLEDOVÁ ČÁST

Pacienti a jejich blízcí se vždy zajímali o to, jakou mají naději na uzdravení, stejně tak i lékaři vždy chtěli mít co nejvíce podkladů při svém rozhodování. Z dochovaných pramenů víme, že již v dobách starého Egypta a starověkého Řecka byly klinickým pozorováním rozeznávány příznaky, které měly predikovat dobrou nebo špatnou prognózu nemocného (1,2). **Z tohoto pohledu lze stanovení prognózy považovat za nejstarší část pracovní náplně lékaře.** V současnosti, kdy je možné úspěšně léčit celou řadu nemocí, lékař otázku prognózy tak často samostatně neřeší, ostatně ani pacient ji tak často již nepokládá. To lze demonstrovat na příkladu nekomplikované bakteriální infekce dýchacích cest, kde při existenci kauzální léčby je otázka prognózy v podstatě součástí diagnózy a ani lékař, ani pacient se jí více nezabývají (45).

Onkologie je však oborem, ve kterém stanovení diagnózy zůstává nadále dosti abstraktním pojmem, a teprve určení prognózy zohledňuje faktory charakterizující konkrétní případ a dává předpoklady pro racionální rozhodování lékaře o správném postupu léčby. V souvislosti s rozvojem technologií v oblasti diagnostiky narůstá i množství biomarkerů, které lze objektivně měřit a které mají určitý prognostický význam. Jejich použitím a kombinací může lékař snižovat míru nejistoty, kterou se sebou každá prognóza nese, nicméně, a to vyplývá nejen z vlastní podstaty nádorů, 100% jistoty nebude možné nikdy dosáhnout. Navíc, zatímco diagnóza se nemění, prognóza onkologického pacienta se s časem může vyvíjet a do značné míry se na ní mohou podílet i zevní faktory (3,4,45).

V klinické praxi se při odhadu prognózy onkologických pacientů nejčastěji vychází z určení rozsahu nemoci, tzv. **stagingu**. Mezinárodně akceptovaný a pro svou univerzálnost i nejčastěji používaný je **TNM stagingový systém** (16). Je založen na parametrizaci anatomického rozsahu nádorového onemocnění v místě vzniku, jeho bezprostředním okolí a na ostatních místech organismu hostitele. Slouží již od roku 1958 jako základní nástroj pro stratifikaci pacientů se solidními tumory. Jeho

zavedení umožnilo monitorovat a srovnávat průběh onemocnění a výsledky léčebných postupů, a to jak mezi pacienty uvnitř jednoznačně definovaných skupin, klinických stadií, tak i napříč těmito skupinami. Takto získaná data poskytují lékařům důležitou informaci pro stanovení prognózy onemocnění a postupu léčby daného pacienta (4,16,45)

Kromě základní TNM klasifikace, a v rámci ní utvářených prognostických skupin, existují pro specifické diagnózy i jiné stagingové nebo prognostické systémy, které v sobě integrují další **prognostické faktory**. Může se jednat jak o klasické, tak i molekulární biomarkery **asociované s nádorem** (např. Gleason skóre u karcinomu prostaty, histologický grading u sarkomů, měření sérových nádorových markerů u nádorů varlat, stanovení výskytu izolovaných nádorových buněk v lymfatických uzlinách u karcinomu prsu při imunohistochemickém nebo molekulárně genetickém vyšetření, stanovení gradingu tumoru na základě imunohistochemického vyšetření antigenu Ki-67 u neuroendokrinních tumorů), **s jeho hostitelem** (např. věk, stav fyzické výkonnosti, hladina hemoglobinu, vápníku, počet trombocytů u pacientů s renálním karcinomem) nebo o prognostické faktory **asociované se zevním prostředím** (např. vzdálenost tumoru od resekcčního okraje u DCIS). Příklady vybraných prognostických systémů jsou uvedeny v **tabulce 6** (4,16,17,38,45,51,52).

Je však otázkou, zda je výhodnější získat přesnější informace o prognóze nádorového onemocnění cestou integrace nových prognostických biomarkerů do klasických stagingových systémů, nebo za tímto účelem analyzovat biomarkery odděleně. Výše uvedené příklady ukazují, že „zdokonalovat“ stagingové systémy lze. Tento postup má však několik zásadních limitací. Především vede ke ztrátě kontinuity dat a z toho plynoucích problémů při srovnávání výsledků v delším časovém období, kdy platily různé verze příslušné klasifikace. Doplnění jednoho či několika málo prognostických biomarkerů do stagingového systému navíc nemůže plně odrážet biologickou povahu konkrétního nádorového onemocnění, a proto uvnitř takto definovaných kategorií budou vždy existovat značné rozdíly v klinickém vývoji jednotlivých případů.

Tabulka 6 - Přehled klinicky relevantních prognostických biomarkerů a faktorů u vybraných malignit

	Asociované s nádorem	Asociované s hostitelem	Zevní faktory
Kolorektální karcinom	T, N, M kategorie / staging Histologický typ nádoru Grading Venózní, lymfatická nebo perineurální invaze	Věk Stav fyzické výkonnosti Obstrukce střevní pasáže Perforace střeva	Kvalita chirurgického zákroku (TME, 12 a více odebraných uzlin, R0 resekce) Radikální metastazektomie Indikované podání cílené léčby
Karcinom prsu	T, N, M kategorie / staging Histologický typ nádoru Grading	Věk Stav fyzické výkonnosti	Kvalita chirurgického výkonu Indikované podání cílené léčby
	St. Gallen prognostická kritéria (T,N, grading, ER α ,PR, Her-2, věk)		
	Nottinghamský prognostický index - NPI (Velikost nádoru, počet postižených uzlin, grading)		
	Modifikovaný Van Nuys DCIS prognostický index (Velikost DCIS, vzdálenost od resekčního okraje, grading, věk)		
Renální karcinom	T, N, M kategorie / staging Histologický typ nádoru Grading Venózní invaze Invaze do sběrných kanálků	Věk Stav fyzické výkonnosti (Karnofského index, ECOG)	Provedení nefrektomie Radikální metastazektomie Indikované podání cílené léčby
	Hengův prognostický model (Hemoglobin, vápník, neutrofilie, trombocyty, Karnofského index, diseminace \leq 1 rok)		Diseminovaní pacienti
	MSKCC prognostický model (Hemoglobin, vápník, Karnofského index, nefrektomie, laktát dehydrogenáza)		
	UISS prognostický model (TNM, grading, stav fyzické výkonnosti – ECOG)		
High-grade gliomy*	Grading Přítomnost nekrózy v nádoru	Věk Stav fyzické výkonnosti	Radikalita chirurgického výkonu Aplikace chemoradioterapie
Vysvětlivky: * anaplastický atrocytom a glioblastom, DCIS – ductální karcinom in situ, ER- α – Estrogenový receptor alfa, ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group, Her-2 – receptor Her-2, PR – progesteronový receptor, TME – totální mesorektální excize u karcinomu rekta, MSKCC – Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, UISS – UCLA (University of California Los Angeles) Integrated Staging System. Tabulka reference č. 4,16,17,38,45,51,52.			

A nutné je si rovněž uvědomit, že prognóza pacienta se s časem může měnit, a i proto je důležité, aby prognostické systémy a biomarkery byly nezávislé na stagingových systémech. Existence stabilních a jednoduchých stagingových systémů, jejichž použití nebude limitovat ekonomická náročnost nebo dostupnost vyšetření molekulárních prognostických biomarkerů, které budou analyzovány odděleně, tak bude zřejmě výhodnější.

Výčet všech klasických i molekulárních prognostických biomarkerů, jež v souvislosti s nádory byly popsány, by významně přesáhl rámec tohoto úvodu. **Tabulka 7** proto přináší pouze přehled nejčastěji citovaných molekulárních prognostických biomarkerů u malignit, které jsou předmětem našeho výzkumu (kolorektální karcinom, karcinom prsu, renální karcinom, high-grade gliomy). Za podrobnější zmínku však stojí klinické použití prognostických systémů Oncotype Dx[®] u karcinomu prsu a Oncotype Dx[®] Colon Cancer u kolorektálního karcinomu, které představují systémy založené pouze na analýze molekulárních biomarkerů, a dále MSKCC a Hengova prognostického systému u pacientů s diseminovaným renálním karcinomem, které integrují různé typy prognostických faktorů.

Prognostický systém Oncotype Dx[®] je založen na stanovení exprese 21 genů a ze získaných výsledků je specifickým algoritmem vypočítáno RS skóre (Recurrence score), jehož hodnota koreluje s rizikem relapsu onemocnění v 10 letech od diagnózy. Toto riziko je nejvyšší u pacientek s RS > 30 (30,5 %; 95% CI 23,6 - 37,4 %), naopak pacientky s RS < 18 mají riziko nízké (6,8 %; 95% CI 4 - 9,6). Uvedené výsledky platí pro pacientky s karcinomem prsu exprimujícím estrogenový receptor alfa nebo progesteronový receptor, jejichž onemocnění bylo diagnostikováno ve stadiu lokalizovaném na vlastní žlázu. Pro tuto skupinu pacientek je v současnosti test doporučován. Jeho použití mění strategii léčby, která by jinak byla stanovena na základě výsledků klinických studií využívajících stávajících stagingových systémů, přibližně u 30 až 40 % testovaných pacientek, aniž by to významně ovlivnilo jejich prognózu. Přitom se dominantně jedná o změnu ve smyslu nepodání chemoterapie v rámci adjuvantní léčby onemocnění. Pacientky jsou tak ušetřeny toxicity chemoterapie a plátcům zdravotní péče se snižují ekonomické náklady na adjuvantní léčbu. Do roku 2011 byl test celosvětově proveden u více než 200 000 pacientek s karcinomem prsu. Na základě výsledků dalších validačních studií se přitom očekává rozšíření indikačního spektra pro použití testu o skupinu pacientek diagnostikovaných s postiženými lymfatickými uzlinami nebo o pacientky s DCIS (46-49).

Podobné využití má test **Oncotype Dx[®] Colon Cancer** u pacientů s kolorektálním karcinomem diagnostikovaným v klinickém stadiu II, kde jich pětiletého celkového přežití (OS) dosahuje přibližně 70 – 75 %. RS skóre, které test udává, zde vychází z měření exprese 12 genů, a na jeho základě je možné stanovit pravděpodobnost relapsu onemocnění u těchto pacientů, a to nezávisle na hodnotě T (TNM klasifikace), gradingu karcinomu a funkčnosti systému oprav jednonukleotidových záměn DNA (Mismatch repair deficiency – MMRd). Podání adjuvantní léčby by mělo být vyhrazeno pro pacienty se zvýšeným rizikem relapsu onemocnění. U pacientů s RS < 30 nastává relaps onemocnění do tří let od stanovení diagnózy v 8 % případů, RS 31 – 40 v 11 % a při RS > 40 ve 25 % případů. Pětileté riziko je o 4 až 8 % vyšší pro každou kategorii (50).

Ke stanovení prognózy u pacientů s renálním karcinomem lze využít několika prognostických systémů, a to v závislosti na pokročilosti onemocnění. Zatímco pro onemocnění diagnostikované v I. – III. klinickém stadiu je k dispozici prognostický systém UISS (UCLA /University of California Los Angeles/ Integrated Staging System), u pacientů s diseminovaným karcinomem je možné prognózu stanovit na základě MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) nebo Hengova prognostického modelu. Ve vztahu k cílené terapii je prognóza pacientů nejčastěji určována pomocí Hengova prognostického modelu, který na základě přítomnosti jednotlivých rizikových faktorů stratifikuje pacienty do 3 prognostických skupin: s dobrou prognózou (žádný rizikový faktor, 2-leté celkové OS – 75 %), se střední prognózou (1 - 2 rizikové faktory, 2-leté OS – 53 %) a se špatnou prognózou (3 až 6 rizikových faktorů, 2-leté OS 7 %) (17,51,52). Podrobně viz **tabulky 6 a 7**.

Tabulka 7 – Přehled nejčastěji citovaných molekulárních biomarkerů u vybraných malignit.

Malignita	Biomarker	Prognostický význam	Prediktivní význam	Metoda
Kolorektální karcinom	CEA /elevace/	Negat	-	ELISA (sérum)
	MSI-High /vysoká instabilita/	Pozit	Negat / ChT (5-FU)	PCR
	MMRd /defektní exprese/	Pozit	Negat / ChT (5-FU)	IHC
	18q /LOH/	Negat	-	PCR
	p53 /vysoká exprese/	Negat	Negat / ChT	IHC
	KRAS /mutace/	Negat	Negat / anti-EGFR	PCR/sekvenování
	NRAS /mutace/	-	Negat / anti-EGFR	PCR/sekvenování
	BRAF /mutace/	Negat	Negat / anti-EGFR	PCR/sekvenování
	EGFR /amplifikace/	-	Pozit / anti-EGFR	FISH
	PIK3AC /mutace/	-	Negat / anti-EGFR	PCR/sekvenování
	Oncotype DX Colon Recurrence score (RS), (pro II. klin. stadium)	RS > 30 Negat RS ≤ 30 Pozit	-	Oncotype DX Colon Cancer, 12 genů, PCR
	ColoPrint Risk Profile (pro II. klin. stadium)	„Low-risk“ Pozit „High-risk“ Negat	-	ColoPrint, 18 genů, DNA čip
	Cirkulující nádorové buňky /pozitivní záchyt/	Negat	-	PCR, IHC, magnetická separace + protilátky; (krev, kostní dřeň)
Karcinom prsu	ER-α /exprese/	Pozit	Pozit / HT	IHC
	PR /exprese/	Pozit	Pozit / HT	IHC
	Ki-67 (MIB-1) /vysoká exprese/	Negat	Pozit / ChT	IHC
	Her-2 /vysoká exprese, amplifikace/	Negat	Pozit / anti-Her-2	IHC, FISH, SISH
	Bcl-2 /zvýšená exprese/	-	Negat / ChT	IHC
	Cirkulující nádorové buňky /pozitivní nález/	Negat	-	PCR, IHC, magnetická separace + protilátky; (krev, kostní dřeň)
	CCNE1 /zvýšená exprese/	Negat (NO)	Negat / HT	IHC
	CCND1 /amplifikace, vysoká exprese/	Negat (ER/PR +)	Negat / HT	FISH, PCR
	TP53 /mutace/	Negat (ER/PR +)	Negat / HT	PCR, sekvenování
	uPA, PAI-1 /vysoká exprese/	Negat (ER/PR +, NO)	-	ELISA (extrakt z tumoru)
	PAM50 – genový profil	Luminal A Luminal B Her-2 Basal-like	Luminal A -Pozit/HT Luminal B-Pozit/ChT,HT Her-2 - Pozit/anti-Her-2 Basal-like - Pozit/ChT	NanoString Tech. PAM50 – 50 genů určujících molekulární subtyp karcinomu, PCR
	Oncotype DX Recurrence score (RS) (ER/PR+, I-IIIa klin. stadium)	RS < 18 Pozit RS ≥ 18 Negat	RS > 30 Pozit / ChT RS ≤ 30 Pozit / HT	Oncotype DX, 21 genů, PCR
	DCIS Score (DS) (pouze DCIS)	DS < 39 Pozit DS ≥ 39 Negat	-	Oncotype DX, 21 genů, PCR
MammaPrint - genový profil (T1-2, NO-1, MO, ER+ i ER-)	„Low risk“ Pozit „High risk“ Negat	-	MammaPrint, 70 genů DNA čip	
Renální karcinom	Ki-67 /vysoká exprese/	Negat	-	IHC
	CAIX /vysoká exprese/	Pozit	Pozit / IL-2	IHC
	HIF-1 /vysoká exprese/	Negat	-	IHC
	IMP3 /vysoká exprese/	Negat	-	IHC / PCR
	B7-H1 /pozitivní exprese/	Negat*	-	IHC
	B7-H4 /pozitivní exprese/	Negat	-	IHC
Gliomy – Oligodendrogliomy	1p/19q /kodelece/	Pozit	Pozit	FISH
	10q /LOH/	Negat	Negat (ChT, ChRT)	PCR / Cytogenetika
	IDH1 /mutace/	Pozit	-	Seq / PCR
Gliomy - Anaplastický astrocytom/ Glioblastom	EGFR /amplifikace/	Pozit	-	FISH
	MDM2 /amplifikace/	Negat	-	FISH
	PTEN /mutace/	Negat	-	Seq / PCR
	IDH1 /mutace/	Pozit	-	Seq / PCR
	MGMT /hypermetylace/	Pozit	Pozit (ChT, ChRT, RT)	PCR

* Pacienti po nefrektomii. Reference k tabulce: kolorektální karcinom, ref. č. 50, 54-62, 93, 94; karcinom prsu, ref. č. 46-49, 63-76, 98; renální karcinom, ref. č. 77-82; oligodendrogliomy, ref. č. 83-86; glioblastom, ref. 87-88.

4.3.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE

Jednu z nejrozsáhlejších oblastí našeho výzkumu jednoznačně představují práce zaměřené na identifikaci prognostických biomarkerů různých kategorií u různých typů solidních nádorů, přičemž možná aplikace těchto biomarkerů do klinického rozhodování se různí dle diagnózy, ale obecně má samozřejmě směřovat k vyšší míře individualizace léčby. Agresivita nádoru a míra rizika relapsu onemocnění může ovlivnit nejen typ a intenzitu podávané léčby, ale taky režim dispenzarizace daného pacienta.

U karcinomu prsu jsme se zaměřili především na jeho molekulární podtyp označovaný jako triple-negativní. Triple-negativní karcinom prsu představuje heterogenní skupinu karcinomů prsu, které neexprimují estrogenový receptor, progesteronový receptor a receptor Her-2. Obecně se jedná o nádory s agresivním chováním, které se častěji vyskytují u mladších žen a u kterých je zdokumentována spojitost s mutací v genu *BRCA1*. Cílem naší práce, kterou jsme publikovali v časopise *Klinická onkologie*, bylo vytvořit dostatečně reprezentativní soubor pacientek s TNBC, který by bylo možné analyzovat, a na základě získaných údajů sestavit základní epidemiologickou, molekulární a klinickou charakteristiku populace českých pacientek s TNBC. Na souboru 335 pacientek diagnostikovaných a/nebo léčených v MOÚ v letech 2004–2009 s triple-negativním karcinomem prsu jsme provedli základní klinicko-patologické korelace, včetně identifikace basal-like podskupiny tohoto karcinomu. Medián věku pacientek s triple-negativním karcinomem prsu v našem souboru byl 56 let, rozpětí 25–88 let. Ve věkové skupině do 34 let bylo diagnostikováno 9,25 % případů a ve skupině 35–44 let 15,22 % případů. Basal-like karcinomy představovaly 75 % všech triple-negativních karcinomů. Potvrdili jsme agresivní charakter tohoto onemocnění, ve sledovaném období jsme zaznamenali relaps u 25 % pacientek, do dvou let od diagnózy onemocnění nastalo 55 % z úmrtí v důsledku progresu choroby. Strategie léčby v naprosté většině případů (88,4 %) zahrnovala chemoterapii. Nejčastěji se jednalo o režimy založené na antracyclinech, případně v kombinaci s taxany. Mezi nejvýznamnější negativní prognostické faktory ve vztahu k OS patřily: vyšší klinické stadium ($p < 0,0001$), pozitivní pN status

($p < 0,0001$), vysoká proliferativní aktivita dle Ki-67 (cut-off 50 %, HR = 0,4740; $p = 0,0411$), pozitivní exprese CK5/6 (HR = 0,4274; $p = 0,0338$). Ve vztahu k DFS měly negativní prognostický význam faktory: vyšší klinické stadium ($p < 0,0001$), pozitivní pN status ($p < 0,0001$), vysoká proliferativní aktivita dle Ki-67 (cut-off 50 %, HR = 0,04993; $p = 0,0240$). Delší DFS dosahovaly pacientky s počtem aplikovaných cyklů chemoterapie na bázi antracyklinů > 4 (HR = 1,7273; $p = 0,0467$). V této studii jsme na reprezentativním souboru pacientek s TNBC z české populace potvrdili platnost některých dobře známých prognostických biomarkerů TNBC a popsali některé nové [7].

Na části této kohorty jsme provedli rovněž analýzu hladin vybraných miRNA. Vzhledem k tomu, že TNBC jsou charakteristické vyšší frekvencí mutací v genu pro p53, rozhodli jsme se analyzovat expresi rodiny miR-34 (a-c), které jsou pod přímou regulační kontrolou právě proteinu p53 a byly opakovaně popsány jako slibné nádorové supresory. U pacientek s TNBC jsme pozorovali signifikantní korelaci miR-34b s časem do progresu ($p = 0,002$) a celkovým přežíváním ($p = 0,0008$). Tuto práci, ve které jsme identifikovali nové prognostické biomarkery TNBC, jsme publikovali v časopise *Diagnostic Pathology* [18].

Také u kolorektálního karcinomu jsme se zabývali problematikou identifikace nových prognostických biomarkerů, především pak na úrovni miRNA. V naší průlomové práci publikované v roce 2007 v časopise *Oncology* jsme popsali pozitivní korelaci mezi hladinami miR-21 a klinickým stadiem CRC ($p = 0,03$). MiR-21 je jednou z nejstudovanějších onkogenních miRNA a naše pozorování bylo následně mnohokrát potvrzeno. Na tuto práci jsme navázali další studií, ve které jsme na rozsáhlejší a nezávislém souboru potvrdili některá dřívější pozorování, ale především jsme popsali negativní korelaci hladin miR-21 s celkovým přežíváním pacientů s kolorektálním karcinomem ($p = 0,03$) [19]. MiR-21 jsme zde studovali rovněž z funkčního hlediska na buněčných modelech (viz Funkční studie). Prognostický potenciál miR-21 byl dnes již úspěšně validován v metaanalýzách napříč celým spektrem solidních nádorů.

Recentní studie naznačují, že exprese T-UCR (transcribed-ultraconserved regions) je

u vybraných nádorových onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu, deregulována. V naší studii jsme se proto zaměřili na analýzu exprese uc.43, uc.73, uc.134, uc.230, uc.339, uc.388 a uc. 399 v nádorové a příslušné nenádorové tkáni a jejich korelaci s klinicko-patologickými charakteristikami pacientů s kolorektálním karcinomem. Kromě identifikace signifikantně snížené hladiny uc.73 ($p = 0,014$) a uc.388 ($p = 0,03$) v nádorové tkáni, jsme pozorovali korelaci hladin uc.73 s celkovým přežíváním ($p = 0,03$). Naše pilotní data zcela poprvé naznačily možné využití T-UCR jako prognostických biomarkerů u nádorových onemocnění [11].

Velký prostor jsme věnovali prognostickým faktorům u renálního karcinomu (RCC), jehož incidence je v České republice jedna z nejvyšších ve světě. Cílem naší práce bylo ověřit platnost vybraných prognostických faktorů na konsekutivním souboru pacientů české populace. Za tímto účelem jsme sestavili soubor čítající 544 pacientů s RCC diagnostikovaných a/nebo léčených v našem ústavu v letech 2003 až 2010. Validovány byly jednotlivé klinické a histologické prognostické faktory a Hengův prognostický model. Median času sledování našeho souboru byl 42 měsíců (rozpětí 0,3–326 měsíců), median věku pacientů v době diagnózy byl 62 let a téměř v 64 % se jednalo o muže. Zastoupení klinických stadií bylo následující: I 46,5 %, II 10,7 %, III 13,1 %, IV 20 %. U 26,4 % pacientů stadia I–III nastal relaps onemocnění. Diagnostikován byl zejména světlobuněčný (84,6 %) a papilární karcinom (9,2 %). Chirurgickou léčbu inicialně podstoupilo 95,8 % pacientů, systémová adjuvantní a paliativní léčba byla aplikována u 3,7 resp. 37,7 % pacientů. Paliativní cílenou terapii obdrželo celkem 163 pacientů (30 %). K nejvýznamnějším prognostickým faktorům patřily: stadium onemocnění (HR = 9,61), velikost primárního tumoru (HR = 5,83), postižení lymfatických uzlin (HR = 8,26), přítomnost sarkomatoidních úseků v nádoru (HR = 7,29) a grading tumoru (HR = 4,0). Vše s $p < 0,00001$. Kromě nich jsme potvrdili i prognosticky význam přítomnosti eozinofilních granulací v nádoru (HR = 1,91; $p = 0,02$). Při aplikaci Hengova prognostického modelu jsme u pacientů léčených cílenou terapií dosahli podobných výsledků. Naše práce prokázala, že uvedené prognostické faktory lze využít k diferencovanému přístupu k pacientům s RCC, a to jak pro stanovení plánu sledování pacienta po chirurgické léčbě, tak i k indikaci cílené léčby [20].

Výše uvedený soubor byl pro nás základem k realizaci molekulárních analýz, které jsme realizovali se snahou identifikovat pacienty s renálním karcinomem s vysokým rizikem relapsu po nefrektomii. V naší práci, kterou jsme publikovali v *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, jsme provedli analýzu profilů exprese vybraných miRNA (miR-155, miR-141, miR-210, miR-200c, miR-106a, miR-106b, miR-200b, miR-182) v tumorech pacientů s lokalizovaným světlobuněčným renálním karcinomem (ccRCC) vzhledem k bezpříznakovému přežití pacientů za účelem identifikace miRNA, které by byly využitelné jako prognostické biomarkery. Pozorovali jsme signifikantně nižší hladiny miR-106b v primárních nádorech pacientů, u kterých došlo k relapsu onemocnění do 12 měsíců po nefrektomii ($p = 0.03$). MiR-106b rovněž negativně korelovala s bezpříznakovým přežíváním ($p = 0.03$). Naše práce tedy poukázala na možné využití miR-106b jako prognostického biomarkeru umožňujícího identifikaci pacientů s vysokým rizikem relapsu po nefrektomii [14].

Na tuto naši pilotní studii jsme navázali rozsáhlejší studií, ve které jsme k identifikaci potenciálních prognostických biomarkerů využili vysokokapacitního měření umožňujícího paralelní analýzu 768 miRNA v každém vzorku. Na základě expresního profilování založeného na principu qRT-PCR (TLDA) jsme na souboru 31 pacientů identifikovali 64 miRNA, pomocí kterých bylo možné odlišit pacienty se špatnou prognózou ($p < 0.05$): 20 miRNA vykazovalo zvýšenou expresi a 44 miRNA naopak sníženou expresi. Mezi významně deregulovanými miRNA byla i miR-106b popsaná v naší předchozí studii, ale rozdíly v hladinách miRNA, které jsme se rozhodli dále studovat ve validační fázi projektu, dosahovali vyšší statistické významnosti. Následně jsme na nezávislém souboru 46 pacientů validovali 9 vybraných miRNA (miR-409-3p, miR-127-3p, miR-143, miR-26a, miR-145, miR-10b, miR-136*, miR-195 a miR-126), přičemž u 6 jsme potvrdili sníženou hladinu u pacientů s horší prognózou. Pomocí Kaplan-Meierovy analýzy a long-rank testu jsme prokázali signifikantní korelaci mezi miR-127-3p ($p = 0,014$), miR-145 ($p = 0,05$) a miR-126 ($p = 0,015$) a přežíváním bez relapsu. Tuto práci jsme publikovali v časopise *Genes Chromosomes and Cancer* [19].

Nalezení vhodných prognostických biomarkerů začíná být stále aktuálnější i v případě gliálních nádorů, a to především z důvodů zavádění nových léčebných modalit do klinické praxe (bevacizumab, cilengitid). Nalezení pacientů s vysoce agresivním onemocněním by tak umožnilo nejen přizpůsobení léčebného plánu, ale také režimu sledování. Zaměřili jsme se proto na identifikaci prognostických biomarkerů u pacientů s multiforním glioblastomem (GBM). GBM je řazen mezi nejčastější a nejagresivnější primární mozkové nádory s velmi špatnou prognózou a dobou přežívání. Cílem naší studie publikované v časopise Cancer Science bylo nalézt mezi 8 miRNA (miR-21, miR-128a, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221 a miR-222) takové, které vykazují prognostický potenciál u pacientů s GBM. Zjistili jsme, že exprese miR-181c v kombinaci s miR-21 umožňuje predikovat čas do progresu kratší než 6 měsíců se senzitivitou 92 % a specificitou 81 % ($P < 0,0001$). Hladiny miR-195 ($p = 0,01$) a miR-196b ($p = 0,05$) zase pozitivně korelovaly s celkovým přežíváním. Dle našich výsledků se zdá, že velice užitečným prognostickým biomarkerem aplikovatelným do klinického rozhodování by mohla být především kombinovaná analýza miR-21 a miR-181c umožňující s vysokou citlivostí nalézt pacienty s glioblastomem s vysokým rizikem časného relapsu [21,22].

Většinu ze slibných výsledků, kterých jsme dosáhli v rámci výzkumu prognostických biomarkerů u karcinomu prsu, kolorekta, renálního karcinomu a glioblastomu v současné době validujeme na nezávislých a rozsáhlejších kohortách, v některých případech i v rámci multicentrických prospektivních studií nutných pro implementaci našich pozorování do klinické praxe.

4.4 PREDIKTIVNÍ BIOMARKERY

4.4.1 PŘEHLEDOVÁ ČÁST

Prediktivní biomarkery se v onkologii využívají za účelem predikce odpovědi nádoru na léčbu a predikce toxicity léčby.

V současné klinické praxi onkolog indikuje protinádorovou léčbu zejména na základě zvážení přínosu a rizika plynoucího z její aplikace pro konkrétního pacienta. Svůj úsudek přitom zakládá především na informacích, které získal z výsledků klinických hodnocení léčiv probíhajících v rámci mnohem širší populace. **Ve srovnání s jinými chorobami je heterogenita mezi pacienty se stejnou onkologickou diagnózou natolik vysoká, že používaná léčiva dosahují v průměru léčebné odpovědi pouze v 25–30 % případů.** Bohužel, výrazně větší efektivity nemají ani v případech, kdy cíleně zasahují do patogenetických mechanismů kancerogeneze. U neonkologických diagnóz se přitom účinnost léčiv pohybuje v průměru okolo 60 %, přičemž lze přepokládat, že interpersonální genetická variabilita ovlivňující metabolismus léčiv zde hraje přinejmenším podobnou roli (3,89). Na rozdíl od neonkologických diagnóz může mít **toxická protinádorové léčby mnohem závažnější důsledky.** Tento problém lze demonstrovat na příkladu aplikace adjuvantní chemoterapie pacientům s kolorektálním karcinomem diagnostikovaných ve II. klinickém stadiu. Abychom předešli jednomu případu úmrtí v důsledku progresu choroby, je nutné podat adjuvantní chemoterapii 30 pacientům. Na straně druhé, toxicita související s chemoterapií postihuje každého šestého pacienta a jeden z 200 takto léčených pacientů v důsledku toxicity chemoterapie umírá (90). Identifikace biomarkerů predikujících účinnost a toxicitu protinádorových léčiv je proto v onkologii prioritou aplikovaného výzkumu.

Přestože se v dnešní době o prediktivních biomarkerech hovoří především v souvislosti s vývojem a použitím cílených protinádorových léčiv, o možnosti predikovat odpověď nádoru na aplikovanou léčbu se usiluje již od počátku klinického použití cytostatik. Jako reakce na narůstající počet objevených látek s cytotoxickým

účinkem vhodných k terapii nádorů vznikl v 80. letech v NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA) program využívající panel více než 60 nádorových buněčných linií k ***in vitro* testování** jejich **chemosenzitivity/chemorezistence** k těmto látkám (91). Cílem programu bylo určit, zda u některých nádorů, a to zejména s ohledem na jejich tkáňový původ, existuje selektivně vyšší vnímavost vůči testovaným látkám, a tuto informaci využít při plánování klinických studií hodnotících účinnost daného léčiva. K testování chemosenzitivity/chemorezistence se v programu používá MTT test, který byl jako metoda k hodnocení buněčné vitality popsán ve stejné době (92). Bohužel, i přes slibné výsledky z *in vitro* testování se tuto metodu z řady důvodů nepodařilo etablovat do běžné klinické praxe.

Výzkum prediktivních biomarkerů nyní pokračuje především cestou molekulárních analýz procesů souvisejících **s mechanismem účinku a metabolismem protinádorových léčiv. Ve vztahu ke klasické chemoterapii** bylo identifikováno několik prediktivních molekulárních biomarkerů, které jsou v klinické praxi používány. Výčet všech by významně přesáhl rámec tohoto úvodu. **Tabulka 7** proto přináší pouze přehled těch, které jsou relevantní k malignitám, jež jsou předmětem našeho výzkumu (kolorektální karcinom, karcinom prsu, renální karcinom, high-grade gliomy). Za podrobnější zmínku stojí několik z nich: MMRd/MSI, Ki-67, BRCA1, MGMT.

Přibližně 15 až 20 % pacientů s kolorektálním karcinomem má sporadickou nebo vrozenou (Lynchův syndrom) poruchu v systému oprav jednonukleotidových záměn DNA (**Mismatch repair deficiency – MMRd**). Geny kódující proteiny zodpovědné za uvedené opravy (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) mohou být buď poškozeny mutací, nebo může být snížena jejich exprese hypermetylací jejich promotorů (např. u sporadické formy). Přítomnost MMRd je možné prokázat buď přímo, a to na úrovni uvedených genů (mutační analýza, stanovení hypermetylace) či proteinů (imunohistochemické vyšetření), nebo nepřímo, průkazem mikrosatelitní instability (**MSI, microsatellite instability**) v nádoru, jejíž zvýšená míra (MSI-H, high level) je právě projevem MMRd. Pacienti s CRC II. a III. klinického stadia, u kterých byla prokázána MMRd, mají přitom signifikantně lepší prognózu pro přežití ve srovnání

s kontrolní skupinou, zároveň však u nich nebyl prokázán žádný přínos adjuvantní chemoterapie založené na aplikaci 5-fluorouracilu (55,93,94).

V roce 2000 vznikla molekulární klasifikace karcinomu prsu, která ve své modifikované podobě definuje pomocí imunohistochemického vyšetření 3 molekulárních biomarkerů (ER- α , PR a Her-2 receptor) jednotku „triple-negativní“ karcinom prsu (TNBC). Tyto karcinomy jsou charakteristické tím, že ani jeden z uvedených biomarkerů neexprimují, nejčastěji jsou špatně diferencované (G3) a mají vysokou proliferační aktivitu. Jejich prevalence v populaci pacientek diagnostikovaných v MOÚ v roce 2007 činí přibližně 15 %, což odpovídá průměru v evropské populaci (95). Přestože se ve srovnání s ostatními fenotypy karcinomu prsu jedná o jedno z nejagresivnějších onemocnění, obecně je považováno za chemosenzitivní, což bylo opakovaně doloženo nejvyšším výskytem odpovědi na léčbu („response rate“ dosahuje až 86 %) a patologických kompletních remisí (pCR) (až 62 % v závislosti na cytostaticích) po neoadjuvanci (96). Ukazuje se, že chemosenzitivita TNBC vyplývá nejenom z jeho vysoké proliferační aktivity, kterou lze kvantifikovat na základě **exprese biomarkeru Ki-67**, ale současně i z poškození DNA, které si tyto nádory nejsou schopny opravit (65,96). Často totiž postrádají funkční BRCA1 gen, což může být důsledkem jeho mutace nebo hypermetylace jeho promotoru. Jak expresi Ki-67, tak mutaci a hypermetylací BRCA1 genu lze vyšetřit.

Posledním příkladem molekulárního prediktoru účinnosti chemoterapie je gen **MGMT**, jehož protein se účastní reparačních mechanismů při opravách poškozené DNA. Metylace promotoru tohoto genu v nádoru, a tedy snížená schopnost indukce jeho exprese, je prediktorem zvýšené léčebné odpovědi na alkylační látky (např. temozolomidu) u pacientů s glioblastoma multiforme. Protože výběr cytostatik vhodných k terapii tohoto onemocnění je značně limitován a biomarker predikuje vyšší účinnost, nikoliv neúčinnost alkylačních látek, v klinické praxi se stanovení metylace MGMT příliš nevyužívá. Mezi výjimky patří situace, kdy se o podání cytostatika rozhoduje u pacientů, kteří jsou v důsledku své nemoci v celkově horším stavu fyzické výkonnosti a informace o tom, že nelze předpokládat vyšší účinnost léčby, by mohla pomoci lékaři v rozhodování o jeho indikaci (88,97).

Ve vztahu k cílené léčbě lze u nádorů, které jsou předmětem našeho výzkumu, uvést rovněž několik příkladů prediktivních biomarkerů. Historicky nejdelší zkušenost s aplikací cílené léčby je u pacientek s karcinomem prsu. Pomineme-li chirurgickou kastraci, kde první publikačně doložené pozorování regrese nádoru prsu po oboustranné adnexektomii pochází z roku 1896 (Beatson), tak minimálně použití modulátoru estrogenového receptoru tamoxifenu lze již za cílenou léčbu považovat (1971 paliativní podání, 1982 adjuvantní podání). Stanovení nádorové exprese **estrogenového receptoru (ER)** je nejsilnějším prediktivním biomarkerem efektivity tamoxifenu a antiestrogenové terapie vůbec (63,98). Avšak i mezi pacientkami stejného klinického stadia, které jsou na základě pozitivní nádorové exprese ER indikovány k uvedené léčbě, existuje variabilita ve vývoji onemocnění. K selhání hormonální terapie dochází častěji u nádorů s prokázanou zvýšenou expresí cyklinu E1, amplifikací genu pro cyklin D1 a mutací v genu TP53. Výsledky některých studií ukazují, že selhání léčby tamoxifenem může být způsobeno i jeho zvýšeným odbouráváním v důsledku polymorfizmu genu CYP2D6, která vede k vyšší aktivitě tohoto enzymu (10,69,98).

U karcinomu prsu se v klinické praxi používá další molekulární prediktivní biomarker, a to k indikaci anti-Her-2 terapie, která je založená buď na aplikaci monoklonálních protilátek cílených proti epitopům extracelulární části tohoto membránového receptoru nebo nízkomolekulárních inhibitorů blokujících jeho tyrozinkinázovou aktivitou. Nadměrná exprese **Her-2 receptoru a amplifikace Her-2/neu genu** jsou považovány za hlavní molekulární prediktory účinnosti anti-Her-2 terapie. Přestože se jedná o cílenou léčbu, její účinnost se pohybuje mezi 30 a 50 %, přitom může být doprovázena toxicitou (nejčastěji kardiotoxicitou) a nezanedbatelné jsou i finanční náklady, které s sebou přináší. Hledány jsou proto další molekulární prediktory, a to jak pro efektivitu, tak pro toxicitu anti-Her-2 cílené léčby (63,65,69). Naš tým se uvedené problematice věnuje i po výzkumné stránce. Výsledkem řešení grantového projektu byla identifikace dvou nových molekulárních prediktorů anti-HER-2 terapie, a to Akt a S6K kinázy. Poslední z nich byl úspěšně patentován (100,101).

Prediktivní biomarkery se používají i u metastatického kolorektálního karcinomu, kde je stanovení mutačního stavu **genu KRAS** zásadním kritériem pro určení algoritmu paliativní léčby. U pacientů, jejichž tumory nesou nemutovaný gen KRAS je indikována cílená anti-EGFR terapie spočívající v aplikaci monoklonálních protilátek zaměřených proti různým epitopům tohoto receptoru. Kromě mutovaného genu KRAS (přibližně 40 až 45 % nádorů) je negativním prediktorem odpovědi na anti-EGFR terapii i nález mutovaného genu BRAF (5-15 % nádorů), PIK3AC (přibližně 15 % metastatických karcinomů) a NRAS (2-5 % nádorů) , nebo ztráta exprese PTEN v nádoru (12 % metastáz). Naopak prediktorem její vyšší účinnosti je průkaz amplifikace EGFR genu v nádoru s nemutovaným genem KRAS (30 % nádorů). I mezi pacienty s nemutovanými RAS, BRAF a PIK3AC geny je však značná heterogenita v odpovědi na léčbu (57,59). I tato oblast je předmětem našeho zájmu, viz dále.

Mimo výše uvedených příkladů se molekulární prediktivní biomarkery využívají i u dalších solidních tumorů: maligní melanom (mutace **BRAF**), nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC) (mutace **EGFR, ALK**), GIST - gastrointestinální stromální tumor (mutace **C-KIT, PDGFR-alfa**) a medulární karcinom štítné žlázy (**C-MET**). U jiných diagnóz však stále na jejich identifikaci čekáme (např. renální karcinom) (3).

Kromě predikce účinnosti protinádorové léčby mají prediktivní biomarkery uplatnění i v odhadu vzniku její toxicity. Příkladem je gen **UGT1A1** zodpovědný za metabolismus irinotekanu, který se vyskytuje ve více než 60 genotypových variantách (polymorfizmech). Přibližně každý desátý jedinec bílé rasy je homozygotem pro genotyp (polymorfizmus) *28/*28, který se oproti wild-type sekvenci liší jednou repetici TA navíc. Nositelé tohoto genotypu mají až 3,5 krát vyšší riziko vzniku závažné G3/4 neutropenie a 1,6 krát vyšší riziko vzniku závažných (G3/4) průjmů po podání irinotekanu v dávce standardní pro léčbu pacientů s nádory zažívacího traktu (102). V klinické praxi se však rutinní stanovení genotypu UGT1A1 u pacientů před zahájením léčby irinotekanem nepoužívá, neboť riziko ze vzniku trvalého závažného poškození zdravotního stavu takto léčených pacientů v důsledku nežádoucích účinků, které jsme v současnosti schopni kompenzovat podpůrnou

léčbou (např. růstovými faktory myelopoézy) je relativně nevýznamné ve srovnání s důsledky agresivního růstu nádorového onemocnění.

Dalším příkladem může být vznik život ohrožující těžké leukopenie a jaterní toxicity jako důsledek podání merkaptopurinu leukemickým pacientům, kteří jsou současně nosiči vybraných polymorfizmů v **genu TPMT** (thiopurine methyltransferase) nebo ITPA (inosine triphosphate pyrophosphatase), které vedou ke snížení jejich enzymatické aktivity (103). Podobně některé polymorfizmy v genu kódujícím enzym **glutathion-S transferázu** (GSTP1-105) korelují se zvýšeným rizikem rozvoje neurotoxicity G3 po aplikaci oxaliplatinu a v **genu TCL1A** s výskytem muskuloskeletální bolesti u pacientek užívajících inhibitory aromatázy (nejspíše v důsledku zvýšené tvorby cytokinů IL-17 a IL-12, které jsou genem TCL1A regulovány) (104). Lze předpokládat, že s narůstajícím počtem GWAS (Genome Wide Association Studies) bude podobných výsledků prokazujících souvislost mezi nosičstvím určitých genetických polymorfizmů a rizikem toxicity protinádorové léčby přibývat (105).

S rozvojem individualizované medicíny a cílené léčby se otvírá řada otázek. Například z pohledu **genetické heterogenity nádoru** (106,107) vyvstává otázka, zda vyšetření biomarkerů v limitovaném materiálu z **biopsie nádoru v době jeho diagnózy** poskytuje dostatečné množství validních informací pro léčbu případného relapsu onemocnění v odstupu několika let. Jak dokazují výsledky analýz zkoumajících molekulární heterogenitu primárních nádorů a jejich metastáz, naprostou většinu mutací v klíčových genech sdílí metastatické buňky s nádorovými buňkami původního origa (108). Tuto skutečnost ostatně potvrzují i výsledky řady klinických studií, ve kterých pacienti s metastatickým onemocněním mají benefit z cílené léčby, ačkoliv ta byla indikována na základě prediktivního biomarkeru vzešlého z analýzy primárního tumoru (109). Odlišná situace však nastává v případě **pacientů již předléčených**, u kterých dochází k opakované progresi onemocnění. Např. je známo, že u signifikantní části pacientů s NSCLC, kteří velmi dobře odpovídají na cílenou anti-EGFR terapii, jsou v nádoru již iniciálně přítomny subpopulace buněk nesoucích mutaci T790M v kinázové doméně EGFR, jež je příčinou rezistence nádoru

na uvedenou léčbu. Po zničení majoritní populace nádoru senzitivní k aplikované léčbě pak nastává relaps onemocnění z původně subklinického, naprosto minoritního nádorového klonu (110). Kromě toho může v průběhu léčby docházet ke vzniku nových mutací i u dosud vnímavé populace nádorových buněk, jež následně způsobí rezistenci k léčbě.

V souvislosti s případnými požadavky kliniků na opakované biopsie pak vyvstává další otázka, a to zda při zvyšující se senzitivě metod molekulární genetiky lze **minimalizovat invazivní procedury a množství biologického materiálu** nezbytného ke stanovení molekulárních biomarkerů. Ideální by bylo využívat za tímto účelem pouze odběrů krve, ze které lze izolovat cirkulující nádorové buňky nebo volné biomolekuly (proteiny, DNA, RNA, atd.), a ty následně podrobit laboratorní analýze. Minimálně v případě pacientů, u kterých již bylo onemocnění diagnostikované, se do budoucna jedná o velice slibný postup.

Narůstající počet cílených protinádorových léčiv, výsledky jejich klinických studií a nové poznatky nádorové biologie ukazují, že indikace cílené léčby se bude v budoucnosti opírat o větší spektrum molekulárních prediktorů, které budou lépe charakterizovat vlastní nádorové onemocnění a predikovat jeho odpověď na zvažované možnosti léčby. Je pravděpodobné, že každé nádorové onemocnění bude mít doporučený panel molekulárních prediktorů, které bude nutné vyšetřit a na jejich základě bude indikována nejvhodnější cílená léčba. Lze předpokládat, že se zde uplatní metody sekvenování nové generace.

4.4.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE

Z hlediska klinického rozhodování jsou jednoznačně nejvíce potřebnou a současně nejvíce nedostatečnou a neuspokojivou třídou biomarkerů, biomarkery prediktivní, tj. biomarkery umožňující predikovat léčebnou odpověď, případně nežádoucí účinky léčby. Touto problematikou jsme se zabývali jak teoreticky v rámci přehledových prací tak v rámci původního výzkumu. V roce 2012 jsme publikovali v časopise *Cardiovascular Toxicology* rozsáhlou přehledovou práci zaměřenou na kardiotoxicitu cílené léčby u solidních nádorů, ve které diskutujeme jak patofyziologické mechanismy, tak diagnostiku, léčbu, rizikové faktory a možnosti prevence těchto nežádoucích účinků [23,24].

Jedním z historicky nejdéle podávaných preparátů, který má charakter cílené léčby, je u karcinomu prsu trastuzumab (monoklonální protilátka proti Her-2 receptoru). Trastuzumab je ovšem účinný zhruba u poloviny Her-2-pozitivních pacientek s karcinomem prsu. Důležitou roli v procesu primární a sekundární rezistence k cílené anti-Her-2 terapii hraje signální dráha PI3K/Akt. V naší studii jsme hodnotili vztah mezi expresí, aktivací a subcelulární lokalizací vybraných izoform Akt a odpovědí na cílenou léčbu trastuzumabem u 74 pacientek s Her-2-pozitivním metastazujícím karcinomem prsu. Pro stanovení hladin Akt1, Akt2, pAkt-Thr308 a pAkt-Ser473 byla použita imunohistochemie, přičemž pAkt, cytoplazmatické a jaderné frakce byly hodnoceny samostatně. I přesto, že izoformy Akt byly exprimovány ve většině nádorů, aktivovaný Akt (pAKT) byl přítomen v cytoplazmě a nikoli v jádře u > 20 % tumorů, u 7-13 % tumorů nedocházelo k expresi pAKT vůbec. Pacientky s vysokou mírou exprese Akt2 a detekovatelnou hladinou pAkt (pAkt-Thr308 a / nebo pAkt-Ser473) v cytoplazmě i v jádře (j + c), vykazovaly lepší čas do progresu onemocnění (TTP) a celkové přežití od zahájení terapie trastuzumabem (OST). Pacientky s vysokou mírou exprese Akt2 a pAkt Thr308 (j + c) měly signifikantně delší TTP (17,0 vs 7,6 měsíců, $p = 0,024$; HR 0,52) a OST (51,8 vs 16,8 měsíců, $p = 0,0009$; HR 0,34). Podobné výsledky jsme získali pro silnou expresi Akt2 a pAkt Ser473 (j + c): TTP 13,1 vs. 7,2 měsíce ($p = 0,085$, HR 0,62) a OST 50,8 vs 17,0 měsíce ($p = 0,009$; HR 0,45). Tato studie, publikovaná v časopise *International Journal of Oncology*, jako první

prokázala význam jednotlivých izoform kinázy Akt, její aktivace a subcelulární lokalizace, v predikci odpovědi na cílenou léčbu trastuzumabem u pacientek s HER2-pozitivním metastazujícím karcinomem prsu [24, 25].

Velké úsilí jsme věnovali rovněž snahám o identifikaci biomarkerů umožňujících predikovat léčebnou odpověď na neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapii u pacientů s karcinomem rekta. Na toto téma jsme publikovali přehledovou práci v Klinické onkologii, přičemž cílem našeho článku bylo souhrnně zpracovat dosavadní klinické studie zabývající se neoadjuvantní léčbou karcinomu rekta a potenciální klinicko-patologické, ale také molekulární prediktory léčebné odpovědi. V této souvislosti byly nejčastěji studované sérové nádorové markery, počty postižených uzlin, vybrané onkogeny, nádorové supresory, mikrosatelitní nestabilita, biomarkery apoptózy, proliferace, angiogeneze, nádorové invazivity a metastazování a také enzymy, které souvisejí s metabolismem fluoropyrimidinů.

Naši první originální práci na toto téma jsme publikovali v témže roce v Časopise lékařů českých. Do naší studie jsme zařadili 17 pacientů s histologicky potvrzeným karcinomem rekta v klinickém stadiu II a III podle TNM klasifikace. Odpověď na léčbu byla hodnocená klinicky pomocí transrektální ultrasonografie a CT/MRI před a po léčbě a dále histopatologicky pomocí TRG (Tumor Regression Grade) podle Mandarda. Nádory s TRG 1-2 patřily skupině pacientů s dobrou odpovědí na léčbu, zatímco TRG 4-5 byl typický pro nádory pacientů bez odpovědi. Pro všech 17 vzorků jsme zpracovali nízkohustotní oligonukleotidové čipy, které umožňovaly paralelní detekci exprese 440 genů dříve asociovaných s různými znaky maligního nádoru. Za účelem identifikace rozdílně vyjádřených genů jsme použili t-test a metodu SAM (Significance Analysis of Microarrays) a našli jsme 8 genů (RB1, RBBP4, HYOU1, JUNB, MDM4, CANX, MMP2, TCF7L2), jejichž hladiny byly statisticky významně zvýšené u skupiny pacientů neodpovídajících na léčbu. Tyto geny představují po další nezávislé validaci potenciální prediktivní biomarkery léčebné odpovědi na neoadjuvantní chemoradioterapii u pacientů s karcinomem rekta [26].

Poté, co jsme se v rámci našeho týmu začali zabývat problematikou miRNA, jsme provedli analýzu jejich exprese i u pacientů s karcinomem rekta, kteří podstupují

neoadjuvantní léčbu chemoradioterapií. Zajímalo nás, zda podobně jako u genové exprese (viz výše) bude i v případě miRNA nalezen vztah mezi odpovědí na léčbu a expresí partikulárních miRNA. Do studie jsme zařadili 20 pacientů, kteří byli léčeni neoadjuvantní chemoradioterapií pro pokročilý karcinom rekta a jejichž tumory po uvedené léčbě dosáhly maximální možné regrese (TRG 1-2) nebo byly naopak zcela rezistentní (TRG 4-5). Tyto dvě skupiny byly následně porovnány pomocí vysokokapacitního profilování miRNA. Nalezli jsme 8 miRNA, jejichž hladiny se signifikantně lišily mezi studovanými skupinami. Hladiny MiR-215 a miR-190b a miR-29b-2* byly u pacientů neodpovídajících na léčbu zvýšené, zatímco let-7e, miR-196b, miR-450a, miR-450b-5p a miR-99a* byly zvýšené u pacientů s dobrou odpovědí ($p < 0.05$). Za použití exprese těchto 8 miRNA bylo správně zařazeno 9 z 10 pacientů s dobrou odpovědí a 9 z 10 se špatnou odpovědí na léčbu. Navíc u většiny z identifikovaných miRNA byla již v minulosti popsána jejich souvislost s radiorezistencí nebo chemorezistencí na inhibitory tymidylát syntázy. Naše výsledky jsme publikovali v roce 2012 v časopise Radiation Oncology [27].

Nalezení vhodných prediktivních biomarkerů začíná být stále aktuálnější i v případě glioblastomu, a to především z důvodů klinického testování nových protinádorových léčiv (např. bevacizumab, cilengitid) vhodných k léčbě tohoto agresivního onemocnění. V současnosti zahrnuje standardní léčebný protokol konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem (TMZ) následovanou adjuvantní aplikací TMZ, přičemž za prediktivní biomarker léčebné odpovědi na TMZ je dnes považován metylační status promotorové oblasti genu pro MGMT. Nicméně tento biomarker má svoje limitace dané především popsanou intratumorální heterogenitou tohoto biomarkeru a dále špatnou standardizovatelností metodiky pro stanovení metylace. Navíc, dosavadní omezené možnosti léčby glioblastomu vedou k tomu, že je léčba TMZ podávána i v případech, kde stav metylace MGMT nepredikuje zvýšenou citlivost nádoru k alkylačním látkám. V roce 2009 jsme proto publikovali pilotní studii v časopise Neoplasma, ve které jsme popsali signifikantní snížení hladin miR-181a ($p = 0,016$) a miR-181b ($p = 0,047$) v tumorech pacientů s dobrou odpovědí na léčbu ve srovnání s pacienty s progredujícím onemocněním [28].

Na tuto práci jsme navázali studií publikovanou v časopise Cancer Science, ve které jsme analyzovali nádorovou expresi 8 miRNA (miR-21, miR-128a, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221 a miR-222) a získané výsledky následně korelovali s MGMT statusem a klinickými charakteristikami pacientů s glioblastemem podstupujících konkomitantní chemoradioterapii s TMZ. Podařilo se nám potvrdit prognosticko-prediktivní potenciál metylačního stavu pro MGMT. Kromě toho jsme našli pozitivní korelaci mezi expresí miR-195 a miR-196b a OS pacientů. Navíc, kombinací exprese miR-181c a miR-21 jsme byli schopni identifikovat skupinu pacientů s časnou progresí onemocnění do 6 měsíců od diagnózy, a to s 92% senzitivitou a 81% specificitou ($p < 0,0001$). Tyto miRNA se tak jeví jako potenciální biomarkery pro identifikaci pacientů ve vysokém riziku selhání léčby a progresi onemocnění [21].

Zabývali jsme se rovněž identifikací prediktivních biomarkerů u metastatických neuroendokrinních tumorů (NET) léčených somatostatinovými analogy (SA). Somatostatinových analog je s úspěchem využíváno k léčbě pacientů s NET, které svou hormonální hypersekrecí způsobují klinicky závažný karcinoidový syndrom. Účinek somatostatinu a současně i SA je ovlivněn především typem receptoru, přes který je uskutečňován. Pro somatostatin bylo doposud identifikováno pět typů specifických membránových receptorů SSTR1 až SSTR5. Geny pro jednotlivé typy receptorů jsou lokalizovány na různých chromozomech, což naznačuje nejen individuální transkripční kontrolu každého z nich, ale i jejich rozdílnou funkčnost. V naší studii jsme se rozhodli stanovit hladiny mRNA pro všech pět typů somatostatinových receptorů metodou Real-Time PCR na souboru 25 pacientů s NET s klinicky vyjádřenou hormonální hypersekrecí. Odpověď byla vyhodnocována po šesti měsících léčby, a to jak na úrovni biochemické (pokles nebo stabilizace chromograninu A v séru a 5-HIOK v moči, pozorován u 80 % případů), symptomatické (efekt na vyjádřené symptomy, pozorován u 83 % případů), tak radiologické (efekt na měřitelné léze, v 48 % pozorována odpověď na léčbu v podobě SD, PR, CR). Medián terapie analogy činil 14 měsíců (2-82 měsíců). Exprese receptorů SSTR2 a SSTR5 byla detekovatelná ve všech studovaných NET, SSTR1 a SSTR4 ve všech až na tři případy, SSTR3 pouze v polovině případů. Ve vztahu k radiologické odpovědi

vykazoval silný prediktivní potenciál podtyp receptoru SSTR4, jehož hladiny byly signifikantně sníženy v nádorech pacientů se stabilizací onemocnění ($p = 0,036$) a negativně korelovaly s časem do progresu ($p = 0,0015$) a celkovým přežíváním ($p = 0,0017$) pacientů s metastatickým NET [29].

4.5 STUDIUM BIOMARKERŮ V ONKOLOGII – VÝZNAM FUNKČNÍCH STUDIÍ

Genezi biomarkerů se věnuje jedna z úvodních kapitol této práce. Chceme-li prokázat kauzální vztah konkrétního biomarkeru s nádorovým onemocněním, je nutné provést několika-úrovňové funkční studie na buněčných (*in vitro*) případně zvířecích (*in vivo*) modelech. Tyto studie nejenže umožní rozšířit poznání v oblasti molekulární patologie daného nádorového onemocnění, ale také naznačí možné využití diagnostického nástroje (biomarkeru) jako potenciálního terapeutického cíle. Kromě toho lze v onkologii využít funkčních studií i k testování účinnosti protinádorových léčiv.

4.5.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE

Funkční charakteristika miRNA jako kandidátních biomarkerů u solidních tumorů

Náš tým se začal zabývat problematikou miRNA a významem těchto nekódujících RNA v patogenezi nádorů jako vůbec první v České republice. Důvodů, které nás k tomu vedly, bylo několik, jedním z nich byla i naše předchozí zkušenost s použitím DNA čipů. Zatímco na úrovni genové exprese se nám dařilo identifikovat desítky až stovky genů s rozdílnou expresí mezi studovanými systémy, validace těchto změn na úrovni proteinů nebyla vždy úspěšná. Objev RNA interference řízené fragmenty RNA o délce 21 až 23 nukleotidů, který vysvětloval pozorované rozdíly mezi genovou a proteinovou expresí, nás vedl k hlubšímu studiu miRNA u solidních tumorů. Zabývali jsme se jak identifikací mikroRNA, ať již na úrovni jednotlivých genů nebo celých genových profilů, tak i jejich funkční charakterizací, neboť u řady z těch, které jsme v našich experimentech určili jako významné a potenciálně použitelné jako biomarkery v klinické praxi, nebyla známá jejich biologická funkce.

V našem výzkumu provádíme funkční studie nejčastěji na úrovni buněčných *in vitro* modelů, většinou založených na použití stabilních buněčných linií odvozených od studovaného nádorového onemocnění. Principem těchto *in vitro* analýz je studovat efekty umělého utlumení či navýšení konkrétní miRNA na viabilitu, buněčný cyklus,

apoptózu, migraci či invazivitu nádorových buněk. Další úrovní těchto studií je podrobnější molekulární charakterizace sledovaného efektu.

Jednou z nejvíce studovaných miRNA v nádorové biologii je onkogenní miR-21. V naší práci z roku 2007 jsme popsali mnohonásobně zvýšené hladiny miR-21 v tkáni kolorektálního karcinomu a jako první jsme korelovali její expresi s klinickým stadiem tohoto onemocnění [8]. V další studii na nezávislém souboru jsme popsali rovněž negativní korelaci miR-21 s celkovým přežíváním pacientů s kolorektálním karcinomem, a naznačili tak její možné využití jako prognostického biomarkeru. Na základě těchto pozorování jsme rozhodli studovat miR-21 i z funkčního hlediska *in vitro*. Pomocí inhibitoru miR-21 (anti-miR-21) jsme byli schopni efektivně tlumit hladiny uvnitř buněk stabilní buněčné linie DLD1 odvozené od kolorektálního karcinomu. Nepozorovali jsme žádný efekt vlastního tlumení pomocí anti-miR-21 na viabilitu buněk, nicméně při použití v kombinaci s cytostatiky (5-FU, L-OHP a SN38) docházelo k významnému poklesu viability ve srovnání s kontrolními buňkami. Nejvýznamnějšího výsledku jsme ovšem dosáhli v rámci studie buněčné migrace, kdy utlumení miR-21 vedlo k téměř 30% snížení migrační kapacity nádorových buněk ($p = 0,016$). Výsledky jsou tak v souladu s pozorováním získaném na klinickém materiálu, kdy s narůstajícím klinickým stadiem rostou také hladiny miR-21 v primárním nádoru. Tato naše pozorování jsme publikovali v časopise *International Journal of Colorectal Disease* [9].

Další, doposud nejrozsáhlejší studii *in vitro* jsme provedli rovněž na modelu kolorektálního karcinomu. Pomocí vysokokapacitního měření umožňujícího globální profilování exprese miRNA jsme identifikovali 42 miRNA s rozdílnou expresí mezi nádorovou tkání a zdravou střevní sliznicí ($p < 0,0005$). Na základě těchto výsledků, předchozích pozorování a biologické významnosti bylo vybráno 14 miRNA pro další validaci, která potvrdila významně snížené hladiny miR-378 ($p < 0,0001$), miR-422a ($p < 0,0001$), miR-375 ($p < 0,0001$), miR-451 ($p < 0,0001$), miR-378* ($p < 0,0001$), miR-215 ($p < 0,0001$), miR-145 ($p = 0,0370$), miR-195 ($p = 0,0032$) a miR-139-5p ($p = 0,0002$) a významně zvýšenou hladinu miR-135b ($p < 0,0001$), miR-21 ($p < 0,0001$) a miR-31 ($p < 0,0001$) v nádorové tkáni. V rámci následných *in vitro* analýz jsme

pozorovali, že zvýšená exprese miR-215 vedla k poklesu ve viabilitě buněk HCT-116 o $21,7 \pm 0,3$ % ($p = 0,05$) a DLD-1 buněk o $19,7 \pm 7,1$ % ($p = 0,05$) 48 h po transfekci 10nM pre-miR-215 (prekurzor vedoucí k navýšení hladin dané miRNA v buněčné linii). Podobně také navýšení hladin miR-375 způsobilo pokles v počtu živých HCT-116 buněk o $32,9 \pm 6,9$ % ($p = 0,005$). V případě miR-378 vedla zvýšená exprese k snížení viability DLD-1 buněk o $14,4 \pm 12,4$ % ($p = 0,05$) 48 h po transfekci 10nM pre-miR-378. Viabilitu buněk rovněž ovlivnila miR-135b, kdy nižší hladiny této miRNA vedly k snížení životnosti DLD-1 buněk o $27,4 \pm 19,2$ % ($p = 0,005$) a HCT-116 buněk o $16,0 \pm 11,7$ % ($p = 0,05$) 48 h po transfekci 30nM anti-miR-135b. Tato pozorování jsou v souladu s naším předpokladem, že miR-215, miR-375 a miR-378 fungují jako nádorové supresory, zatímco miR-135b plní funkci onkogenu. Analýzy buněčného cyklu prokázaly, že miR-215, miR-375, miR-378 a miR-422a významně zvyšují podíl buněk v G₀-G1 fázi a snižují počet buněk v S fázi u buněčné linie HCT-116 (ve všech případech $p = 0,01$), nikoliv však u buněčné linie DLD-1. Podobně zvýšené hladiny miR-215 vedly k vzestupu počtu apoptotických HCT-116 buněk z $14,6 \pm 2,1$ % na $36,2 \pm 5,1$ % ($p = 0,005$). Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s mutací p53 u buněk DLD-1. Pomocí migrační assaye bylo dále zjištěno, že zvýšená exprese miR-215 snižuje migraci DLD-1 buněk o $46,1 \pm 20,5$ % ($p = 0,05$) a HCT-116 buněk o $26,6 \pm 35,2$ % ($p > 0,05$). Závěrem lze shrnout, že byla prokázána nádorově supresorová funkce miR-378, miR-422a, miR-375 a miR-215, zatímco miR-135b lze označit za onkogen. Výsledky této studie dále naznačují případné využití validovaných miRNA jako nových biomarkerů u kolorektálního karcinomu a funkční screening potvrdil, že některé z nich, především však miR-215, představují potenciálně významné cíle při léčbě tohoto onemocnění. Přesné molekulární mechanismy však nejsou dosud známy a bude jim porozuměno teprve v případě, že se podaří identifikovat a experimentálně validovat cílové molekuly těchto miRNA. Tato studie byla publikována v časopise Journal of Cellular and Molecular Medicine [10].

Další funkční studii, tentokrát s miR-210, jsme provedli na modelu renálního karcinomu (RCC). *In vitro* experimenty byly prováděny na buněčných liniích renálního karcinomu ACHN a CAKI-2, kde jsme analyzovali vliv transfekce anti-miR-210 na viabilitu buněk, apoptózu, buněčný cyklus, migraci a invazivitu. Pomocí analýzy

expresních profilů 667 miRNA získaných metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays jsme identifikovali zvýšenou expresi miR-210 v nádorové tkáni ($p = 0,0008$). Na nezávislém souboru jsme toto pozorování potvrdili ($p < 0,0001$). *In vitro* jsme po experimentálním snížení hladiny miR-210 v buněčných liniích ACHN a CAKI-2 pozorovali sníženou viabilitu a u buněčné linie CAKI-2 hromadění buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Po snížení exprese miR-210 jsme pozorovali také sníženou schopnost migrace a snížený invazivní potenciál buněčné linie ACHN odvozené z metastatického RCC. Prokázali jsme rovněž sníženou expresi proteinu HIF1 α v obou buněčných liniích po umlčení miR-210, což naznačuje účast miR-210 v regulaci hypoxických procesů u RCC nejen prostřednictvím regulace svých cílových mRNA, ale také nepřímo pomocí regulace HIF1 α . V současnosti se jedná o první důkaz naznačující, že miR-210 má schopnost regulovat jak buněčnou migraci a invazivní potenciál, tak i hladinu proteinu HIF1 α v buňkách RCC. Zvýšená exprese miR-210 již byla zjištěna u různých typů nádorů, což poukazuje na její zapojení do obecných procesů maligní transformace a vytváří předpoklad, že může být v budoucnu využita jako terapeutický cíl v léčbě nádorových onemocnění [16].

V rámci našich dosavadních funkčních *in vitro* studiích u kolorektálního a renálního karcinomu jsme u vybraných miRNA poukázali na jejich možné využití jako terapeutických cílů. Dalším logickým krokem v takto započatém výzkumu je ověření vlastností těchto miRNA také v rámci *in vivo* modelu. V současnosti zahajujeme výzkumný projekt zaměřený na studium vlastností miR-215 na myším modelu kolorektálního karcinomu.

Využití *in vitro* funkčních studií v predikci nádorové chemosenzitivity/chemorezistence.

Již jsme zmínili o programu *in vitro* testování chemosenzitivity/chemorezistence nádorů vůči novým látkám s cytotoxickým účinkem, který vznikl v 80. letech v NCI (USA). Program je stále aktivní a využívá panel více než 60 nádorových buněčných linií (91). Cílem testování je zjistit, zda u některých nádorů, a to zejména s ohledem

na jejich tkáňový původ, existuje selektivně vyšší vnímavost vůči testovaným látkám, a tuto informaci využít při plánování klinických studií hodnotících účinnost daného léčiva. K *in vitro* testování chemosenzitivity/chemorezistence je využíván zejména MTT test pojmenovaný podle používaného MTT barviva (3-[4,5-dimethyl(thiazol-2-yl)-3,5-difeny] tetrazolium bromid), které je v mitochondriích za pomoci enzymu sukcinyl dehydrogenázy redukováno na fialové krystaly formazánu. Tyto krystaly se po ukončení testu chemicky rozpustí a intenzita zbarvení je spektrofotometricky vyhodnocena, přičemž hodnota absorbance koreluje s počtem přežívajících buněk, které byly schopny v mitochondriích MTT metabolizovat (92).

V roce 2006 jsme publikovali práci, ve které jsme testovali vliv lithia na chemorezistenci primárních tumorů [30]. Do uvedené doby bylo lithium v onkologii využíváno v podpůrné léčbě chemoterapií indikované leukopenie, neboť vedlejším účinkem lithia je benigní a reverzibilní leukocytóza. Přestože bylo používání lithia za účelem stimulace hematopoézy považováno za relativně bezpečné, a tato zkušenost onkologů byla potencována více než 50-letou historií s používáním lithia v psychiatrii, podávalo se lithium onkologickým pacientům i přesto, že nebyly dostatečně vysvětleny molekulární mechanismy jeho účinku na lymfocyty a granulocyty, resp. na lymfopoézu a myelopoézu. Poté, co jsme zaznamenali informace z neuropsychiatrických literárních zdrojů o neuroprotektivním účinku lithia, jehož podstatou měla být schopnost lithia přímo regulovat aktivitu Akt/PKB a GSK-3 β kinázy, tj. jedné z nejdůležitějších signálních drah regulujících přežívání buněk a v případě nádorů jejich chemorezistenci, provedli jsme klinicko-experimentální studii, jejímž cílem bylo prokázat, zda je použití lithia u onkologických pacientů bezpečné. V rámci uvedené studie jsme, mimo jiné, hodnotili vliv lithia na chemorezistenci primárních tumorů. Na 53 vzorcích primárních tumorů bylo *in vitro* provedeno 151 MTT testů chemorezistence, přičemž jsme prokázali enormní nárůst chemorezistence vůči doxorubicinu a paklitaxelu, pokud byly nádorové buňky kultivovány v prostřední s lithiem. Kromě *in vitro* testování chemorezistence měla studie i klinickou část, v rámci které bylo provedeno retrospektivní hodnocení vlivu lithia na odpověď nádoru na chemoterapii. I tato část přinesla nepříznivé výsledky. Závěrem studie bylo konstatování, že užití lithia k profylaxi a k léčbě chemoterapií

navozené myelotoxicity je spjato s rizikem indukce chemorezistence nádoru. Tento závěr měl i reálný dopad na klinickou praxi, neboť lithium se v dané indikaci skutečně přestalo používat.

5 ZÁVĚR

Onkologie je oborem, ve kterém se možná více než jinde potvrzuje, že uplatnění principů individualizované medicíny v kontextu pokroků dosažených v biologii, diagnostice, léčbě a prevenci nádorových onemocnění, zvyšuje šance na dlouhodobé přežití a lepší kvalitu života onkologických pacientů. Molekulární biomarkery budou v tomto směru hrát stále významnější roli. Jejich budoucnost spočívá nejenom v rámci *in vitro* diagnostiky, ale rovněž v jejich propojení se zobrazovacími metodami za účelem *in vivo* diagnostiky, včetně celotělového zobrazování. Vývoj biomarkerů je proto obrovskou výzvou pro aplikovaný a translační výzkum v onkologii.

6 REFERENCE

1. Donegan WL: History of Breast Cancer. In: Winchester DJ, Winchester DP, Hudis C, Norton L, eds. Breast Cancer. New York: BC Dacker Inc, 2006: 1-14.
2. McManus JFA. The fundamentals of medicine: a brief history of medicine. Springfield, USA. 1963. Charles C. Thomas.
3. Gonzalez de Castro D, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. Clin Pharmacol Ther. 2013 Mar;93(3):252-9.
4. Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Koh E. Prognostic Factors: Principles and Applications. In: Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Sobin LH (eds). Prognostic Factors in Cancer. Third Edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, USA. 2006. pp 23-38.
5. Gibson AG. The physician's art: an attempt to expand John Locke's fragment de arte medica. Oxford. Clarendon Press, 1933.
6. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001 Mar;69(3):89-95.
7. Brooks JD. Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers. Genome Res. 2012 Feb;22(2):183-7.
8. Omics.org. [homepage on the Internet]. Open free site for omes and omics in Biotechnology and Bioscience; page: The omics pathway or omics map. [updated 2007 December 31; cited 2002 June 7]. Available from: http://omics.org/index.php/The_Omics_Pathway.
9. Fischer HP. Towards quantitative biology: integration of biological information to elucidate disease pathways and to guide drug discovery. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:1-68.
10. Maruvada P, Wang W, Wagner PD, Srivastava S. Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis. Biotechniques. 2005 Apr;Suppl:9-15.
11. Paik YK, Hancock WS. Uniting ENCODE with genome-wide proteomics. Nat Biotechnol. 2012 Nov;30(11):1065-7.
12. Šimíčková M, Nekulová M. Nádorové markery. MedProGO, 2004.
13. Šimíčková M, Nekulová M, Pecen L. Sérové nádorové markery a jejich význam v éře rozvoje molekulárně-biologických technik. Labor Aktuell Czech, 2003, 7-9.
14. Jan KK. The handbook of biomarkers. Springer, 2010. New York. 1st ed., pp 1-13, 189-325.
15. Svobodová Š, Pešta M, Topolčan O, Kinkorová J. Biomarkery v onkologii. Lékařská fakulta UK Plzeň, Plzeň 2012. 40 stran.
16. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC cancer staging manual. 7th ed, Springer, New York, 2010.

17. Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J. Clin. Oncol.* 2009, 5794-9.
18. Svoboda M, Grell P, Fabian P, Palácová M, et al. Molekulární taxonomie a prediktivní systémy karcinomu prsu definované na základě profilů genové exprese. *Klinická onkologie* 2006;19(Supplement2);373-381.
19. Svoboda M, Vášová I, Kotašková J, et al. Aplikace DNA čipů u lymfoidních malignit. *Klinická onkologie* 006;19(Supplement2);389-396.
20. Dahlman KB, Xia J, Hutchinson K, et al. BRAF(L597) mutations in melanoma are associated with sensitivity to MEK inhibitors. *Cancer Discov.* 2012 Sep;2(9):791-7.
21. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. (February 2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome". *Nature* 409 (6822): 860–921.
22. Brigitte BM. Personalized Cancer Therapy Coming of Age: Clinical Highlights in 2009 and Future Directions. *Personalized Medicine.* 2010;7(2):121-124.
23. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Acad Sci.* 2001;(18)93:1054–1061.
24. Mistry K, Cable G. Meta-Analysis of Prostate-Specific Antigen and Digital Rectal Examination as Screening Tests for Prostate Carcinoma. *J Am Board Fam Med.* 2003;16(2).
25. Buchen L. Cancer: Missing the mark. *Nature.* 2011 Mar 24;471(7339):428-32.
26. Baclesse F. Five-year results in 431 breast cancers treated solely by roentgen rays. *Ann Surg* 1965;61:103–4.
27. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, et al. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *NEngl J Med.* 1995;333:1456–61.
28. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, et al. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Ann Oncol.* 2003 Jun;14(6):833-42.
29. American Cancer Society 2004 statistics. Available at: <http://www.cancer.org/downloads/MED/Page4.pdf> (accessed Jan 11, 2005).
30. Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004. Mar;4(3):177-83.
31. Frank SA. Genetic predisposition to cancer - insights from population genetics. *Nat Rev Genet.* 2004 Oct;5(10):764-72.

32. Hodgson SV, Foulkes WD, Eng C, Mather ER. A practical Guide to Human Cancer Genetics (3rd Ed). Cambridge University Press, 2007, New York.
33. Kotnis A, Sarin R, Mulherkar R. Genotype, phenotype and cancer: role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility. *J Biosci.* 2005. Feb;30(1):93-102.
34. Freisinger F, Domchek SM. Clinical implications of low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Curr Oncol Rep.* 2009 Jan;11(1):8-14.
35. Margie LC. Genetic Polymorphism and Cancer Risk, *Current Oncology Reports* 2000, 2:251–256.
36. Hirshfield KM, Rebbeck TR, Levine AJ. Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. *J Oncol.* 2010;2010:297671.
37. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med.* 2012 Jan;16(1):8-21.
38. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection *Medscape Oncology, Journal Article.* 2005. Published on-line: <http://www.medscape.com/viewarticle/516243>.
39. Bajčiová V. Sarkomy mäkkých tkání u adolescentů. *Onkológia (Bratisl.)*, 2008, roč. 3 (6): 367–371.
40. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. IARC, World Health Organization; 4 edition (October 2008).
41. Ries, LAG, Melbert, D, Krapcho, M, et al (Eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute, Bethesda, USA. 2007. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/ (Accessed on October 16, 2009).
42. Henson DE, Albores-Saavedra J. Pathology of incipient neoplasia. Oxford University Press, New York, 2001.
43. Svoboda M, Fabian P, Slabý O. Nádory neznámé primární lokalizace. In *Klinická a radiačná onkologia*. Jurga L.M. a kolektív. První. Martin: Vydavateľstvo Osveta, 2010. s. 1246-1255, 10 s. ISBN 978-80-8063-302-8.
44. Greco FA, Hainsworth JD. Cancer of Unknown Primary site. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 8th edition, DeVita, VT, Lawrence, TS, Rosenberg, SA (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2008.
45. Mackillop WJ. The importance of Prognosis in Cancer Medicine. In: *Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Sobin LH (eds). Prognostic Factors in Cancer.* Third Edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, USA. 2006. pp 3-22.
46. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:2817.

47. Mamounas EP, Tang G, Fisher B, et al. Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *J Clin Oncol* 2010; 28:1677.
48. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol* 2010; 28:1829.
49. Solin LJ, Gray R, Baehner FL, et al. A multigene expression assay to predict local recurrence risk for ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst.* 2013 May 15;105(10):701-10.
50. Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, Beaumont C, Clark-Langone KM, Yoshizawa CN, Lee M, Watson D, Shak S, Kerr DJ. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Dec 10;29(35):4611-9.
51. Patard JJ, Kim HL, Lam JS, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol.* 2004 Aug 15;22(16):3316-22.
52. Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 454-63.
53. Poprach A, Lakomý R, Selingerová I, Dolečková B, Bílek O, Slabý O, Héžová R, Fabián P, Staník M, Pavlík T, Bortlíček Z, Mlčochová H, Tkáč D, Vyzula R, Kiss I, Kocák I, Kocáková I., Svoboda M. Epidemiologická a klinicko-patologická charakteristika pacientů s renálním karcinomem: analýza 544 případů z jednoho centra. *Klin Onkol* 2013; 26(2): 114– 123.
54. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(8):689-97.
55. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 1;13(13):3831-9.
56. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, et al. K-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res.* 1998; 58:1149–58.
57. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1261-70.
58. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2001 Apr 19;344(16):1196-206.

59. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013 Feb 2;13:49.
60. Maak M, Simon I, Nitsche U, et al. Independent Validation of a Prognostic Genomic Signature (ColoPrint) for Patients With Stage II Colon Cancer. *Ann Surg*. 2013 Jun;257(6):1053-8.
61. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, et al. Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1547-55.
62. Vardakis N, Messaritakis I, Papadaki C, et al. Prognostic significance of the detection of peripheral blood CEACAM5mRNA-positive cells by real-time polymerase chain reaction in operable colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 1;17(1):165-73.
63. Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, et al. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer*. 2007 Feb 26;7:36.
64. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007 May 21;96(10):1504-13.
65. von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, et al. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R30.
66. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5701-10.
67. Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, et al. Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene*. 2003;22:4898-04.
68. Lundgren K, Brown M, Pineda S, et al. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Breast Cancer Res*. 2012 Apr 4;14(2):R57.
69. Taneja P, Maglic D, Kai F, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol*. 2010 Apr 20;4:15-34.
70. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2069-76.
71. Askmalm MS, Carstensen J, Nordenskjöld B, et al. Mutation and accumulation of p53 related to results of adjuvant therapy of postmenopausal breast cancer patients. *Acta Oncol*. 2004;43(3):235-44.

72. Konduri SD, Medisetty R, Liu W, et al. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 24;107(34):15081-6.
73. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:913.
74. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 15;18(16):4465-72.
75. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
76. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9.
77. Atkins M, Regan M, McDermott D, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3714-21.
78. Bui MH, Visapaa H, Seligson D, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171:2.
79. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13:7388.
80. Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2006; 7:556.
81. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3381-5.
82. Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, et al. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 5;103(27):10391-6.
83. Lassman AB, Iwamoto FM, Cloughesy TF, et al. International retrospective study of over 1000 adults with anaplastic oligodendroglial tumors. *Neuro Oncol* 2011; 13:649.
84. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2707-14.
85. Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, et al. GICNO. Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 10;24(29):4746-53.

86. Ramirez C, Bowman C, Maura CA, et al. Loss of 1p, 19q, and 10q heterozygosity prospectively predicts prognosis of oligodendroglial tumors--towards individualized tumor treatment? *Neuro Oncol.* 2010 May;12(5):490-9.
87. Wick W, Hartmann C, Engel C, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5874-80.
88. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, et al. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer.* 2006 May 15;106(10):2218-23.
89. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. 2001. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends in Molecular Medicine* 7:201-204.
90. Buyse M, Piedbois P. Should Dukes' B patients receive adjuvant therapy? A statistical perspective. *Semin Oncol.* 2001 Feb;28(1 Suppl 1):20-4.
91. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al.. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 1988, 589–601.
92. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, pp. 55-63.
93. Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, et al. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1;23(10):2318-24.
94. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 20;23(3):609-18.
95. Svoboda M, Navrátil J, Fabian P, et al. Triple-negativní karcinom prsu: analýza souboru pacientek diagnostikovaných a/nebo léčených v Masarykově onkologickém ústavu v letech 2004 až 2009. *Klin Onkol.* 2012;25(3):188-98.
96. Silver DP, Richardson A, Eklund AC et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7): 1145–1153.
97. Hegi ME, Liu L, Herman JG, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26:4189.
98. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:1531.
99. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:118.

100. Grell P, Fabian P, Khoylou M, Radova L, Slaby O, Hrstka R, Vyzula R, Hajduch M, Svoboda M. Akt expression and compartmentalization in prediction of clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Int J Oncol.* 2012 Oct;41(4):1204-12.
101. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta; Masarykův onkologický ústav, Brno. Způsob zjištění senzitivity pacientů s nádorovým onemocněním na léčbu inhibitory HER-2 receptoru. Vynálezce: HAJDÚCH M, DZIECHCIARKOVA M, RADOVÁ L a SVOBODA M. Česká republika. Patentový spis, CZ 302709 B6. 2011-08-03.
102. Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, et al. UGT1A1*28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 2008; 112:1932.
103. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med.* 1998;129(9):716-8.
104. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25:1247.
105. Ingle JN, Schaid DJ, Goss PE, et al. Genome-wide associations and functional genomic studies of musculoskeletal adverse events in women receiving aromatase inhibitors. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 1;28(31):4674-82.
106. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366(10):883-92.
107. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):356-61.
108. Colombino M, Capone M, Lissia A, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol.* 2012 Jul 10;30(20):2522-9.
109. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30;364(26):2507-16.
110. Su KY, Chen HY, Li KC, et al. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012 Feb 1;30(4):433-40.
111. Svoboda M, Hajdúch M, Kleinová J, et al. Je použití lithia k profylaxi a k léčbě chemoterapií indukované neutropenie opodstatněné a bez rizika? Klinicko-experimentální studie. *Klin Onkol* 2006;19(6):299-304

7 SEZNAM ZKRATEK

5-FU	5-Fluorouracil
5-HIOK	5-Hydroxyindoloctová kyselina
ADH3	Alcohol Dehydrogenase 3
AFP	Alfa-Fetoprotein
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Protein Kinase B
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APML	Acute Promyelocytic Leukemia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
B7-H1	B7 Homolog 1
B7-H4	B7 Homolog 4
BACH1	BTB and CNC Homology 1
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
β -HCG	Beta subunit – Human Chorionic Gonadotrophin
BMPR1A,B	Bone Morphogenetic Protein Receptor, type 1A; Bone Morphogenetic Protein Receptor, type 1B
BRAF	v-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
BRCA1 , BRCA2	Breast Cancer type 1, Breast Cancer type 2
BRIP1	BRCA1 Interactin Protein C-terminal helicase 1
BTA	Bladder Tumor Antige
CA-125	Cancer Antigen 125 nebo Carbohydrate Antigen 125
CAIX	Carbonic Anhydrase IX
CCND1	Cyclin D1
CCNE1	G1/S-specific Cyclin-E1
ccRCC	Clear Cell Renal Cell Carcinoma
CDH1	Cadherin 1
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CML	Chronic Myelogenous Leukemia
CNS	Central Nervous System
CRC	Colorectal Cancer (kolorektální karcinom)
CYP1A1	Cytochrome P1450
CYP1A2	Cytochrome P450
DCIS	Ductal Cacinoma in situ
DFS	Disease-Free Survival
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphom
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ER	Estrogen Receptor
FANCA-M	Fanconi Anemia, Complementation Group A to M
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
FLNC	Filamin C
GBM	Glioblastoma Multiforme
GSK-3 β	Glycogen Synthase kinase 3 beta

GTSM1	Glutathione-S-Transferase M1
GTSTT1	Glutathione-S-Transferase Theta 1
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
HE4	Human Epididymis Protein 4
Her-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HT	Hormone Therapy
CHEK2	Checkpoint Kinase 2 Humane Homolog
ChRT	Chemo- and Radiotherapy
ChT	Chemotherapy
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IgHV	Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region
IHC	Immunohistochemistry
IMP3	IGF2 mRNA Binding Protein 3
INSR	Insulin Receptor
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRAS	Kirsten RA Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LCA	Leukocyte commong antigen
LDH	Lactate Dehydrogenase
LKB1	Liver Kinase B1
lncRNA	Long non-coding RNA
LSP1	Lymphocyte-Specific Protein 1
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization
MAP3K1	Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase 1
MDM2	Murine Double Minute 2
MET	Mesenchamal-Epithelial Transition factor
MGMT	O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase
miR	microRNA
MLH1	MutL homolog 1
MMRd	Mismatch Repair deficiency
MRI	Magnetická rezonance
MSH2, MSH6	MutS homolog 2, mutS homolog 6
MSI	Microsatellite Instability
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide;
MYH	MutY Human Homologue
NAT2	N-acetyltransferase 2
NET	Neuroendocrine Tumor
NCI	National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA)
NF1, NF2	Neurofibromin 1, Neurofibromin 2
NMP22	Nuclear Matrix Protein 22
NPV	Negativní prediktivní hodnota testu
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
NSE	Neuron-Specific Enolase
OS	Overall Survival
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
pAkt	Protein Akt – fosforylovaná forma
PALB2	Partner and Localizer of BRCA2
PAM50	50 genový expresní profil

PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor, alpfa
PET/CT	Positron Emission Tomography / Computed Tomography
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIK3CA	Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic subunit Alpha
PLAP	Placental Alkaline Phosphatase
PMS1,PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 1, Postmeiotic Segregation Increased 2
PPV	Pozitivní prediktivní hodnota testu
PR	Progesterone Receptor
PSA	Prostate Specific Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTCH	Patched Tumor Suppressor
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Cain Reaction
RAN	RAs-related Nuclear Protein
RB1	Retinoblastoma 1 gen
RET	Rearranged during Transfection gen
RNA	Ribonucleic Acid
RS	Reccurence Score
RT	Radiotherapy
RTG	Rentgenové vyšetření
SA	Somatostatin Analogues
SDHA, B, C, D	Succinate Dehydrogenase Complex, subunit A, B, C, D
SDHAF2	Succinate Dehydrogenase Complex assembly factor 2
SELDI	Surface-Enhanced Laser Desorption/ionization
SET8	Set domain containing protein 8
SISH	Silver in situ Hybridization
SMAD4	Mothers against decapentaplegic, drosophila, homolog of 4
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography
SSTR 1-5	Somatostatin Receptors 1-5
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
SULT1A1	Sulfotransferase A1A
TCR	T-Cell Receptor
TLDA	TaqMan Low Density Arrays
TMZ	Temozolomide
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TP53	Tumor Protein p53
TSC1, TSC2	Tuberous Sclerosis 1, Tuberous Sclerosis 2
TTF-1	Transcription Termination Factor 1
TTP	Time to Progression
T-UCR	Transcribed-Ultraconserved Regions
uPA	(Adenoviral) Urokinase-type Plasminogen Activator
VHL	von Hippel-Lindau Tumor Suppressor
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms Tumor gene
XPA-XPG	Xeroderma Pigmentosum, group A; Xeroderma Pigmentosum, group G
XPO5	Exportin 5
XRCC1	X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1

8 SEZNAM PŘÍLOH

Komentované práce

1. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009 8:102. Review.
2. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med*. 2012 16(1):8-21.
3. Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, Svoboda M, Radova L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Evaluation of SNPs in miR.196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterology*. 2012 18(22):2827-2831.
4. Slaby O, Sachlova M, Brezkova V, Hezova R, Kovarikova A, Bischofova S, Sevcikova S, Bienertova-Vasku J, Vasku A, Svoboda M, Vyzula R. Identification of microRNAs regulated by isothiocyanates and association of polymorphisms inside their target sites with risk of sporadic colorectal cancer. *Nutr Cancer*. 2013;65(2):247-54.
5. Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Brezkova V, Vasku A, Svoboda M, Radova L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central-European population. *Eur J Med Res*. 2012 17(1):17.
6. Foretova L, Petráková K, Palácová M, Kalábová R, Svoboda M, Navrátilová M, Schneiderová M, Bolčák K, Krejčí E, Dražan L, Miková M, Hazová J, Vašíčková P, Macháčková E. Genetické testování a prevence hereditárních nádorů v MOÚ – více než desetiletá zkušenost. *Klinická onkologie* 2010;23(6):388-400.
7. Svoboda M, Navrátil J, Fabian P, Palácová M, Gombošová J, Slámová L, Princ D, Syptáková B, Kudláček A, Bílek O, Pospíšil P, Kazda T, Grell P, Poprach A, Selingerová I, Nenutil R, Juráček J, Hěžová R, Slabý O, Vyzula R. Triple-negativní karcinom prsu: analýza souboru pacientek diagnostikovaných a/nebo léčených v Masarykově onkologickém ústavu v letech 2004 až 2009. *Klin Onkol*. 2012;25(3):188-98.
8. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007 72(5-6):397-402.
9. Faltejskova P, Besse A, Sevcikova S, Kubiczkova L, Svoboda M, Smarda J, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27(11):1401-8.
10. Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, Radova L, Fabian P, Slaba K, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 2012;16(11):2655-66.
11. Sana J, Hankeova S, Svoboda M, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Expression Levels of Transcribed Ultraconserved Regions uc.73 and uc.388 Are Altered in Colorectal Cancer. *Oncology*. 2012 82(2):114-118

12. Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R, Nenutil R, Sachlova M, Kocakova I, Michalek J, Smerdova T, Knoflickova D, Vyzula R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol Rep.* 2009 May;21(5):1235-41. PubMed PMID: 19360299.
13. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. DNA and microRNA microarray technologies in diagnostics and prediction for patients with renal cell carcinoma. *Klin Onkol.* 2009 22(5):202–209. Review.
14. Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, Kren L, Michalek J, Vyzula R. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 29:90.
15. Redova M, Svoboda M, Slaby O. MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 405(2):153-6. Review.
16. Redova M, Poprach A, Besse A, Iliev R, Kantorova K, Nekvindova J, Lakomy R, Radova L, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O. MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma.. *Tumour Biol.* 2013 Feb;34(1):481-91
17. Redova M, Poprach A, Nekvindova, J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med.* 2012 10:55.
18. Svoboda M, Sana J, Redova M, Navratil J, Palacova M, Fabian P, Slaby O, Vyzula R. MiR-34b is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients. *Diagn Pathol.* 2012 7(1):31.
19. Slaby O, Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula V. Identification of microRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2012 51(7):707-716.
20. Poprach A, Lakomý R, Selingerová I, Dolečková B, Bílek O, Slabý O, Héžová R, Fabian P, Staník M, Pavlík T, Bortlíček Z, Mlčochová H, Tkáč D, Vyzula R, Kiss I, Kocák I, Kocáková I, Svoboda M. Epidemiologická a klinicko-patologická charakteristika pacientů s renálním karcinomem: analýza 544 případů z jednoho centra. *Klin Onkol.* 2013;26(2):114-23
21. Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, Svoboda M, Dolezelova H, Smrcka M, Vyzula R, Michalek J, Hajduch M, Slaby O. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* 2011 102(12):2186-2190.
22. Lakomý R, Fadrus P, Slampa P, Svoboda T, Kren L, Lzicarová E, Belanová R, Siková I, Poprach A, Schneiderová M, Procházková M, Sána J, Slabý O, Smrcka M, Vyzula R, Svoboda M. Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsekutivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009. *Klin Onkol.* 2011;24(2):112-20.
23. Svoboda M, Poprach A, Dobes S, Kiss I, Vyzula R. Cardiac toxicity of targeted therapies used in the treatment for solid tumours: a review. *Cardiovasc Toxicol.* 2012;12(3):191-207.

24. Svoboda M, Grell P, Šimíčková M, Fabian P, Petráková K, Palácová M, Macková D, Trojanec R, Hajdúch M, Pavlík T, Nenutil R, Vyzula R. Výsledky retrospektivní analýzy cílené léčby metastatického karcinomu prsu trastuzumabem v MOÚ. Identifikace prediktivních faktorů. *Klin Onkol.* 2008;21(6):348-58.

25. Grell P, Fabian P, Khoylou M, Radova L, Slaby O, Hrstka R, Vyzula R, Hajduch M, Svoboda M. Akt expression and compartmentalization in prediction of clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Int J Oncol.* 2012;41(4):1204-12.

26. Garajova I, Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Silak J, Smerdova T, Kocak I, Ruzicková J, Hoch J, Vyzula R. Gene expression profiling in prediction of tumor response to neoadjuvant concomitant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal carcinoma: pilot study. *Cas Lek Cesk.* 2008 147(7):381-386.

27. Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nektivindova J, Radova L, Vyzula R, Slaby O. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiat Oncol.* 2012;7:195.

28. Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, Smrcka M, Svoboda M, Dolezalova H, Novakova J, Valik D, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma.* 2010 57(3):264-9.

29. Slaby O, Sachlova M, Bednarikova M, Fabian P, Svoboda M, Vyzopilova S, Valik D, Vyzula R. Gene expression of somatostatin receptor 4 predicts clinical outcome of patients with metastatic neuroendocrine tumors treated with somatostatin analogs. *Cancer Biother Radiopharm.* 2010 25(2):237-43.

30. Svoboda M, Hajdúch M, Kleinová J, Holánek M, Radová L, Lipert J, Šimíčková M, Gombošová J, Folber F, Chobola M, Andrašínová T, Paseka T, Konečná E, Slezáková, Sošková R, Nagyová L, Grell P, Garajová I, Solaříková I, Žídková A, Hanák L, Je použití lithia k profylaxi a k léčbě chemoterapií indukované neutropenie opodstatněné a bez rizika? Klinicko-experimentální studie.. *Klinická onkologie* 2006;19(6);299-304.

Ostatní práce autora, které se věnují problematice biomarkerů

31. Astier AL, Xu R, Svoboda M, Hinds E, Munoz O, de Beaumont R, Crean CD, Gabig T, Freedman AS. Temporal gene expression profile of human precursor B leukemia cells induced by adhesion receptor: identification of pathways regulating B-cell survival. *Blood.* 2003 Feb 1;101(3):1118-27. Epub 2002 Sep 19. PubMed PMID: 12393420.

32. Svoboda M, Fabian P, Slabý O, Stanková M, Lakomý R, Nemecek R, Vyzula R. [EGFR tyrosine kinase inhibitors as a targeted therapy for bronchioloalveolar carcinoma of the lung: a case report of a clinically prompt and intensive response and literature review]. *Klin Onkol.* 2010;23(4):224-30. Review. Czech. PubMed PMID: 20806820.

33. Poprach A, Bortlíček Z, Büchler T, Melichar B, Lakomý R, Vyzula R, Brabec P, Svoboda M, Dušek L, Gregor J. Patients with advanced and metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the Czech Republic: twenty cancer centres, six agents, one database.

Med Oncol. 2012 Dec;29(5):3314-20. doi: 10.1007/s12032-012-0286-9. Epub 2012 Jun 30. PubMed PMID: 22752571.

Práce autora citované v úvodních kapitolách

34. Citace z úvodní kapitoly č. 18.

Svoboda M, Grell P, Fabián P, Palácová M, Petráková K, Nenutil R, Hajdúch M, Vyzula R, Molekulární taxonomie a prediktivní systémy karcinomu prsu definované na základě profilů genové exprese. *Klinická onkologie* 2006;19(Supplement2);373-381.

35. Citace z úvodní kapitoly č. 19.

Svoboda M, Vášová I, Kotašková J, Malčíková J, Fabián P, Tichý B, Berkovcová J, Klabusay M, Rejthar A, Aplikace DNA čipů u lymfoidních malignit. *Klinická onkologie* 2006;19 (Supplement2);389-396.

8 PŘÍLOHY