

Genotoxicita a karcinogeneze

prof. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.

Přirodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

Vytvořeno ve spolupráci se Servisním střediskem pro e-learning na MU, <http://is.muni.cz/stech/>.

Tiskový výstup publikace vydané na Elportále MU (<http://elportal.cz/>)
<http://is.muni.cz/elportal/?id=1126513>

© 2013 Masarykova univerzita

Obsah

Genotoxicita a karcinogeneze	1
Obsah	2
1. NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ, ÚVOD A ZÁKLADNÍ POJMY	5
1.1 HISTORIE	7
1.2 NÁZVOSLOVÍ	8
1.3 VZNIK A ROZVOJ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ	9
1.4 MECHANIZMY KARCINOGENEZE, BUNĚČNÁ TRANSFORMACE	12
2. MUTACE.....	17
2.1 VÝZNAM MUTACÍ U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	17
2.2 POŠKOZOVÁNÍ A REPARACE DNA	21
2.3 MIKROSATELITY	25
2.4 CHROMOZOMÁLNÍ NESTABILITA	26
2.5 KONTROLNÍ BODY BUNĚČNÉHO CYKLU, APOPTÓZA A MUTOVANÝ FENOTYP	30
2.6. GENETIKA vs. ENVIRONMENTÁLNÍ FAKTORY	32
3. MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ.....	35
3.1 PROTOONKOGENY	35
3.2 RŮSTOVÁ STIMULACE A INHIBICE.....	40
3.3 NÁDOROVĚ SUPRESOROVÉ GENY	43
3.4 VÝZNAM PRO TERAPII	44
4. EPIGENETICKÉ ZMĚNY V KARCINOGENEZI	47
4.1 METYLACE DNA	47
4.2 ACETYLACE HISTONŮ.....	51
4.3 MICRO RNAs.....	52
5. IMORTALIZACE BUNĚK	56
5.1 TELOMERY	56
5.2 IMORTALIZACE BUNĚK	57
5.3 TELOMERÁZA.....	59
5.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ IMORTALIZACI	62
6. PROMOČNÍ FÁZE KARCINOGENEZE	65
6.1. NEGENOTOXICKÉ MECHANIZMY KARCINOGENEZE	65
6.2 NÁDOROVÉ PROMOTORY	66
7. MEZIBUNĚČNÉ INTERAKCE V RŮSTU A NEOPLASII	68
7.1. BUNĚČNÁ KOMUNIKACE A RŮSTOVÁ KONTROLA	71
7.2. VÝZNAM GJIC.....	72
8. PORUCHY PROLIFERACE, DIFERENCIACE A APOPTÓZY	85
8.1 ROVNOVÁHA V BUNĚČNÝCH POPULACÍCH	85
8.2 TEORIE KMENOVÝCH BUNĚK	88
8.3 VÝZNAM BUNĚČNÉHO DĚLENÍ A DIFERENCIACE	89
8.4 AUTOKRINNÍ REGULACE	94
8.5 RŮSTOVÉ REGULÁTORY V KARCINOGENEZI	95
8.6 ANTIPROLIFERAČNÍ MOLEKULY	98
9. HORMONÁLNÍ KARCINOGENEZE	99
9.1 ENDOGENNÍ FAKTORY	99
9.2 MECHANIZMY ENDOGENNÍCH FAKTORŮ.....	99
9.3 EXOGENNÍ HORMONY.....	107
9.4 POLYGENNÍ MODEL A BIOMARKERY	107
10. INVAZIVITA A VZNIK METASTÁZ	109
10.1 METASTATICKÁ KASKÁDA	109
10.2 METODICKÉ ZÁKLADY SOUČASNÉHO VÝZKUMU	112
10.3 ÚLOHA BUNĚČNÝCH ADHEZÍ V METASTATICKÉM PROCESU.....	112
10.4 MIGRACE A INVAZE BUNĚK	115
10.5 UCHYCENÍ BUNĚK V NOVÉ TKÁNI	121
10.6 ÚLOHA MUCINŮ V KARCINOGENEZI	128
11. ANGIOGENEZE	131
11.1 INDUKTORY ANGIOGENEZE.....	132
11.2 ÚLOHA BUNĚČNÉ ADHEZE V ANGIOGENEZI.....	133
11.3 VÝZNAM ANGIOGENEZE A ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE	135
12. KONTROLA KRVETVORBY (HEMOPOÉZY) A LEUKÉMIE	138

12.1 SEBEOBNOVNÉ BUNĚČNÉ POPULACE	138
12.2 LEUKEMIE A LYMFOMY	144
12.3 DIAGNOSTIKA, LÉČBA, TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ CYTOKINŮ	158
13. NÁDORY TLUSTÉHO STŘEVA (KOLONU) A REKTA (CRC).....	172
13.1 ANATOMIE STŘEVA	174
13.2 VZNIK NÁDORŮ KOLONU A REKTA	179
13.3 DĚDIČNÉ TYPY CRC.....	182
13.4 GENY UPLATŇUJÍCÍ SE V CRC.....	182
13.5 ROZVOJ ADENOM-KARCINOM.....	184
13.6 EPIGENETIKA A NEGENOTOXICKÉ FAKTORY V CRC	188
13.7 ÚLOHA CYTOKINŮ A SPECIFICKÝCH SIGNÁLNÍCH DRAH	191
13.8 FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ	199
13.9 ÚLOHA LIPIDŮ, MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH METABOLIZMU	203
14. KARCINOGENEZE A ŽIVOTNÍ STYL	214
14.1. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK A ROZVOJ NÁDORŮ.....	214
14.2 DIETETICKÉ FAKTORY.....	216
14.3 KALORICKÝ PŘÍJEM A VÝZNAM TUKŮ	218
14.4 DALŠÍ FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ.....	219
14.5 PREVENCE	220
15. ÚLOHA LIPIDŮ V ROZVOJI NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	225
15.1 VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (VNMK)	226
15.2 NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY V KARCINOGENEZI.....	235
15.3 METABOLIZMUS VNMK, TVORBA EIKOSANOIDŮ	245
15.4 INTERAKCE S BUŇKAMI IMUNITNÍHO SYSTÉMU	254
15.5 ÚČINKY NESTEROIDNÍCH PROTIZÁNĚTLIVÝCH LÁTEK	257
15.6 MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMY PŮSOBNÍ N-3 VNMK	257
15.7 LIPIDOVÉ MEMBRÁNOVÉ MIKRODOMÉNY	258
15.8 BUNĚČNÝ PŘÍJEM, TRANSPORT A AKUMULACE MK.....	262
15.9 DĚJE NA MITOCHONDRIÍCH A OXIDATIVNÍ METABOLIZMUS.....	267
15.10 DALŠÍ MECHANIZMY PŮSOBNÍ n-3 VNMK.....	270
15.11 PRAKTICKÉ ASPEKTY – KLINIKA.....	274
16. PREVENCE, DIAGNOSTIKA A LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	280
16.1 PREVENCE	280
16.2 DIAGNOSTIKA	283
16.3 LÉČBA.....	289
16.4 MECHANIZMY PŮSOBNÍ CHEMOTERAPEUTIK	297
16.5 MECHANIZMY VZNIKU REZISTENCE K LÉČIVŮM	304
16.6 ÚLOHA P53 V PREDIKCI ODPOVĚDI K CHEMOTERAPII.....	317
16.7 PREDIKTIVNÍ MARKERY	321
16.8 NOVÉ SMĚRY VÝVOJE PROTINÁDOROVÉ LÉČBY	325
16.9 TERAPEUTICKÉ ASPEKTY VYUŽITÍ CYTOKINŮ	326
16.10 HODNOCENÍ DAT – VÍCEROZMĚRNÉ ANALÝZY.....	327
Doporučená a použitá literatura	331
Literatura	331
Internetové zdroje	332
Reviews.....	332

Vznik a rozvoj nádorů (karcinogeneze, kancerogeneze, tumorigeneze) je složitý proces podmíněný genetickými faktory, které se uplatňují v interakci s faktory vnějšího prostředí. U některých typů nádorů hraje roli dědičná složka (dědičné mutace specifických genů), ale rozvoj většiny nejčastěji se vyskytujících nádorů ovlivňuje ve velké míře životní styl a faktory vnějšího prostředí.

Následující kapitoly textu doplněného obrázky vycházejí z aktuálních vědeckých poznatků a poskytují základní znalosti o buněčných a molekulárních mechanismech karcinogeneze. Popisují vznik a úlohu mutací, které mění strukturu a funkce specifických genů tzv. (proto)onkogenů a nádorově supresorových genů i úlohu telomer při tzv. immortalizaci buněk. K tzv. genotoxickým mechanismům se pak přiřazují mechanismy epigenetické a negenotoxické, které jsou odpovědné za změny exprese genů. V důsledku součinnosti těchto faktorů jsou pak ovlivňovány různé signály a signální dráhy, které regulují základní buněčné procesy jako je reparace DNA, buněčný cyklus, buněčné dělení, diferenciaci i buněčná smrt. Tyto změny pak modulují odpověď buněk na fyziologické podněty i působení látek z vnějšího prostředí.

Důležitou úlohu v rozvoji nádorů hrají rovněž změny komunikace jak mezi buňkami tak i s mimobuněčnou matrix ve tkáni. Ty se pak podílejí na porušení homeostázy a na vzniku metastáz, s nimiž souvisí i proces angiogeneze. Mechanizmy rozvoje nádorů a podíl specifických faktorů je popsán na konkrétních příkladech onemocnění jako jsou nádory krevetvorné tkáně či tlustého střeva a rekta.

Z faktorů životního prostředí je pozornost věnována zejména výživě a v ní pak lipidovým složkám. Jsou popsány detailní dosud známé mechanismy působení esenciálních nenasycených mastných kyselin a jejich metabolitů i předpokládané účinky podporující či tlumící rozvoj nádorů. Pozornost je věnována rovněž možnostem prevence nádorů, diagnostickým metodám a terapii s ohledem na různé mechanismy působení specifických chemopreventivních látek a protinádorových léčiv včetně vzniku rezistence nádorových buněk k terapii.

Informace obsažené v souboru nejsou zdaleka vyčerpávající a nemohou pokrýt velkou komplexnost dané problematiky. To předpokládá jejich další doplňování samostudiem rozšiřujícím znalosti v daných tématech. K tomu přispívá přehled doporučené literatury včetně přehledových článků.

1. NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ, ÚVOD A ZÁKLADNÍ POJMY

Pacienti trpící nádorovým onemocněním (rakovinou) se cítí jako napadeni nějakou neznámou mimozemskou silou. Ve skutečnosti však toto onemocnění vzniká z naší vlastní tkáně. Existuje řada důkazů, že nádor **je obecně odvozen od jedné buňky, která se dramaticky mění po sérii genetických změn.**

Zdravá buňka má definovaný tvar a strukturu a prosperuje mezi uspořádanými okolními buňkami. Odpovídá na podněty ze svého okolí a dává vznik dceřiným buňkám jen tehdy, jestliže rovnováha stimulačních a inhibičních signálů z okolí upřednostní buněčné dělení. Avšak v procesu replikace DNA a dělení existuje stálá hrozba **vzniku mutací**, náhodných změn, které mohou tento regulační cyklus porušovat. Jedna mutace může způsobit, že buňka, která vypadá normálně a je méně citlivá na vnější signály se může příležitostně začít nekontrolovaně dělit. Akumulace genetických změn v důsledku **genetické nestability** může způsobit, že se dceřiná buňka stane zcela hluchou k externím signálům a vykazuje **znaky malignity**.

Znamená to, že buňka ztrácí přesný tvar a hranice, nereaguje na růstově inhibiční signály a získává schopnost nekontrolovaně se dělit. Vznikající masa nejen stlačuje a poškozuje zdravou tkáň ve svém sousedství, ale může dále překonávat bariéry jednotlivých orgánů a metastazovat, což znamená, že kolonizuje vzdálené tkáně. Nádor se stává zhoubným (maligním).

Nádory vznikají z naší vlastní tkáně. Avšak **je to nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem.** Představuje *geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru*. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu.

Studie v průběhu několika desítek posledních let znamenaly velký pokrok v identifikaci **nejhlubších základů celého procesu vzniku a rozvoje nádorového onemocnění, tj. těch na buněčné a molekulární úrovni.**

Ve skutečnosti pojem „rakovina“ odpovídá více než sto formám této choroby. Téměř všechny tkáně v těle mohou podlehnout tomuto onemocnění. Asi 30 trilionů buněk v normálním zdravém organismu žije ve složitě vzájemně propojeném svazku a vzájemně reguluje své chování včetně proliferace (dělení). Vzájemná spolupráce buněk zajišťuje, že každá tkáň těla udržuje svou odpovídající velikost a architekturu.

Nádorové buňky naopak ničí toto schéma, stávají se hluchými k obvyklé kontrole proliferace a vytvářejí si svůj vlastní vnitřní program reprodukce. Kromě toho mají ještě nebezpečnější vlastnost - schopnost migrovat a tvořit masu ve vzdálených částech těla. Nádory z takovýchto buněk se stávají čím dál agresivnější a jsou letální, jestliže rozrušují tkáně a orgány důležité pro přežití organismu jako celku.

Ukázalo se, že nádor vzniká ze společné buňky, ve které byl - většinou desítky let před vznikem viditelného nádoru - zahájen program neregulovaného dělení. **Maligní transformace (přeměna) buňky probíhá přes akumulaci mutací ve specifických třídách genů.** Právě tyto geny mohou poskytnout klíč k porozumění procesů v kořenech lidské rakoviny.

Existují dvě třídy genů, které dohromady tvoří jen malou část celé genetické výbavy, ale hrají hlavní úlohu v zahájení procesu tvorby nádoru. Ve své normální konfiguraci **řídí životní cyklus buňky, tj. sled dějů, při kterých se buňka zvětšuje a dělí.**

Protoonkogeny podporují tento růst, kdežto **nádorově supresorové geny** jej inhibují. Jestliže mutují, stávají se protoonkogeny karcinogenními **onkogeny**, které vedou k nadměrné proliferaci. Mutace způsobuje, že protoonkogen většinou poskytuje příliš mnoho růst stimulačního proteinu nebo jeho nadměrně aktivní formu. Naopak nádorově supresorové geny přispívají k rakovině, jestliže jsou inaktivovány mutací.

Pro vývoj nádoru se musí mutace vyskytnout ve více růst kontrolujících genech. Změněné formy jiných tříd genů se pak mohou také účastnit na vzniku malignity tím, že umožní proliferující buňce být invazivní a dostat se do jiných částí těla.

V normální buňce je **rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována, protože to souvisí s regulací buněčného cyklu**, který je rozhodující pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. V nádorové buňce je v důsledku změn v signálních drahách organizace buněčného cyklu narušena.

Buňka je vybavena také **zpětnovazebními mechanizmy**, které mohou působit proti neobvyklým změnám v procesu buněčného dělení. Patří k nim např. **apoptóza**, schopnost buňky spáchat za určitých podmínek „sebevraždu“, tj. jestliže její základní komponenty jsou porušeny nebo jestliže je její kontrolní systém deregulován. Tak působí např. poškození chromozomální DNA. V tomto procesu se účastní také specifické geny např. p53 nebo bcl-2. Mutace těchto genů pak způsobují poruchy apoptózy. Bylo zjištěno, že **neschopnost apoptózy** přispívá ke vzniku nádorů a k jejich rezistenci k terapii.

Druhým obranným mechanismem proti neustálé proliferaci je vestavěný buněčný mechanismus, který počítá a limituje celkový počet dělení buňky, buňka stárne a hyne. Molekulárním nástrojem tohoto počítání jsou segmenty DNA na koncích chromozómů tzv. **telomery**. Ty se při každém dělení zkracují, a když dosáhnou kritické délky, dochází k stárnutí a krizi. Jestliže tento počítací systém funguje v nádorové buňce řádně, její nadměrná proliferace je přerušena předtím, než je nádor příliš velký. Aktivací genu, který kóduje enzym **telomerázu**, který není u většiny normálních buněk aktivní, ale funguje v nádorových buňkách, však dochází k obnově telomerických segmentů a to umožňuje buňce se nekonečně množit, tj. stát se nesmrtelnou.

Většinou trvá desítky let než se v prekarcinogenní populaci nasbírá dostatek mutací k malignímu růstu. U některých jedinců je však tato doba silně zkrácena. To je vysvětlováno **dědičností některých genů způsobujících rakovinu**. Jestliže rodičovská zárodečná buňka obsahuje mutaci, tak u potomka je tato mutace přítomna ve všech buňkách těla a pravděpodobnost vzniku nádoru je vysoká.

1.1 HISTORIE

Historie nádorového onemocnění začala popisnými (epidemiologické) poznatky a spadá do konce 18. stol. V r. 1775 byla popsána rakovina šourku u kominíků a souvislost onemocnění s výskytem škodlivin v sazech. V r. 1848 byl pozorován zvýšený výskyt rakoviny prsu u jeptišek a vysloven pravděpodobný předpoklad souvislosti s bezdětností a nekojením. V r. 1902 byla objevena souvislost RTG paprsků a vzniku rakoviny. Počátkem 20. stol. byl popsán rovněž rodinný výskyt nádorů.

Pro poznání příčin nádorového onemocnění měl velký význam v r. 1910 objev viru Rousova sarkomu, kterým lze infikovat a přenášet nádor u kuřat.

Postupně se rozvíjela odvětví, která zásadním způsobem přispěla k poznání mechanismů vzniku a rozvoje nádorového onemocnění. Díky studiu nádorových virů a metodám přenosu DNA (transformace, transfekce) byly poznány protoonkogeny, onkogeny i nádorově supresorové geny. Biochemie umožnila studium onkoproteinů, jejich lokalizace, interakce. Buněčná biologie, molekulární biologie a genetika přispěla ke studiu molekulárních mechanismů řídicích růst buněk, buněčné dělení, k izolaci, charakterizaci, cílené expresi a funkčním testům eukaryotických genů.

Pojem „**rakovina**“ odpovídá více než sto formám této choroby. Téměř všechny tkáně v těle mohou podlehnout malignitě. Asi 30 trilionů buněk v normálním zdravém organismu žije ve

složitým vzájemně propojeném svazku, regulujíc vzájemně svou proliferaci. Tato spolupráce buněk zajišťuje, že každá tkáň těla udržuje svou velikost a architekturu. Nádorové buňky naopak ničí toto schéma, stávají se hluchými k obvyklé kontrole proliferace a vytvářejí si svůj vlastní vnitřní program reprodukce. Kromě toho mají ještě nebezpečnější vlastnost - schopnost migrovat a tvořit masu ve vzdálených částech těla. Nádory z takovýchto buněk se stávají čím dál agresivnější a stávají se letální, jestliže rozrušují tkáň a orgány důležité pro přežití organismu jako celku.

1.2 NÁZVOSLOVÍ

Název **rakovina** je **ekvivalentem** anglického „cancer“ a německého „der Krebs“ a v užším smyslu je názvem pouze pro karcinomy (nádory epiteliálního původu). Název je odvozen od řeckého slova karkinos - rak nebo onkos – krab. Věda o nádorech se pak nazývá **onkologie** a onkologická onemocnění jsou ekvivalentem nádorových onemocnění. Pro proces vzniku a rozvoje nádorového onemocnění se užívá označení **karcinogeneze, kancerogeneze, onkogeneze nebo tumorigeneze**.

- **MUTACE - dědičná genetická změna v buňce** (vzniká bodovou mutací, delecí nebo inzercí jednoho či více nukleotidů, amplifikací segmentů DNA, inverzí, translokací nebo získáním či ztrátou chromozómu). Základem je změna genetického materiálu v buňce, nikoli změna v jeho expresi.
- **EPIGENETICKÁ ZMĚNA** je změna v genové expresi bez změny v sekvenci DNA nebo genetického obsahu buňky (zejména změny metylace DNA a acetylace histonů).
- **INICIOVANÁ BUŇKA** je mutovaná buňka se schopností stát se nádorovou nebo maligní.
- **BENIGNÍ NÁDOR** je lokální rozrůstání iniciované buňky.
- **MALIGNÍ (ZHOUBNÝ) NÁDOR** je nádor se schopností vrůstat do tkání a rozšiřovat se do vzdálených míst.
- Termín **NEOPLASIE (nový růst)** se používá pro celý rozsah benigního i maligního chování buněk.

Kritéria dělení nádorů

- a) podle míry nebezpečí je dělíme na benigní a maligní:

- **Benigní nádory** připomínají zralou tkáň, ale buňky se neúměrně namnoží. Jsou ostře ohraničeny od okolní tkáňe.
- U **maligních nádorů** se buňky vracejí do embryonálního stádia, vykazují různé stupně zralosti, infiltrují do okolních tkání a krevní nebo lymfatickou cestou se dostávají do vzdálených míst, kde tvoří sekundární nádory – metastázy.

b) podle tkáňe, kde vznikají (tab. 1)

- karcinomy,
- sarkomy,
- leukémie,
- lymfomy,
- blastomy.

Tab.1 Základní klasifikace nádorů

Výchozí tkáň		Zralé benigní buňky (nezhoubné)	Nezralé maligní buňky (zhoubné)
epitel	povrchový	papilom	karcinom
	žlázový	adenom	adenokarcinom
	kolagenní	fibrom	fibrosarkom
	tukové	lipom	liposarkom
Pojivo	chrupavka	chondrom	chondrosarkom
	kost	osteom	osteosarkom
	Sval	myom	myosarkom
	Cévní	angiom	angiosarkom
Krvetvorná lymfatická		mononukleóza?	leukemie lymfom, myelom
Nervová	centrální	gliom	glioblastom
	periferní	ganglioneurom paragangliom	neuroblastom maligní paragangliom
Zárodečná		gonadoblastom	seminom dysgerminom
		teratom zralý	teratom nezralý

1.3 VZNIK A ROZVOJ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

Podle teorie „**nádorové kmenové buňky**“ je nádor obecně odvozen od jedné buňky, která se dramaticky mění po sérii genetických změn. Zdravá buňka má definovaný tvar a strukturu a prosperuje mezi uspořádanými okolními buňkami. Odpovídá na podněty ze svého okolí a dává vznik dceřiným buňkám jen tehdy, jestliže rovnováha stimulačních a inhibičních signálů z okolí upřednostní buněčné dělení.

Avšak v *procesu replikace nebo dělení existuje stálá hrozba vzniku mutací, náhodných změn, které mohou tento regulační cyklus porušovat. Jedna mutace může způsobit, že buňka, která vypadá normálně a je méně citlivá na vnější signály se může příležitostně začít nekontrolovatelně dělit.*

Akumulace genetických změn v důsledku genetické nestability může způsobit, že se dceřiná buňka stane zcela hluchou k externím signálům a vykazuje znaky malignity. Buňka ztrácí přesný tvar a hranice, nereaguje na růstově inhibiční signály a získává schopnost nekontrolovatelně se dělit.

Vznikající masa stlačuje a poškozuje zdravou tkáň ve svém sousedství a může dále překonávat bariéry jednotlivých orgánů a metastázovat, což znamená, že *kolonizuje vzdálené tkáně.*

Většina benigních i maligních nádorů je složena z heterogenní směsi dediferencovaných buněk vzniklých z jediné buňky. Epidemiologické studie předpokládají, že *nádorové onemocnění je způsobeno kombinací faktorů genetických a faktorů okolního prostředí.* Výskyt je ovlivněn prostředím (polutanty, expozice chem. látkám, viry), životním stylem (kouření, alkohol), výživou (přítomnost antioxidantů, vitamínů, vlákniny, tuků). Předpokládá se, že vznik a rozvoj zejména některých typů nádorových onemocnění je až z 80% ovlivněn faktory prostředí. Zbývajících 20% je přičítáno dědičným složkám a spontánním mutacím.

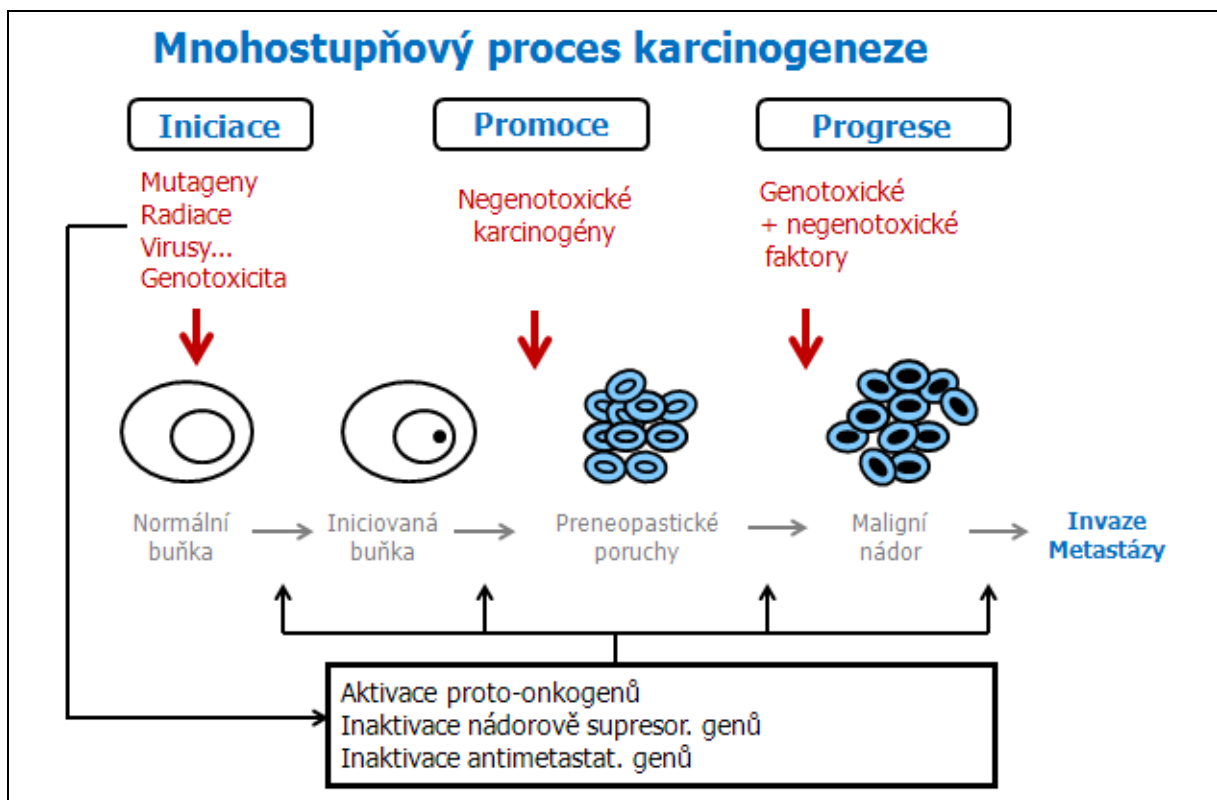
Průběh onemocnění je velmi různý. Liší se podle typu nádoru, věku pacienta i způsobu léčení. Zhoubné nádory jsou u lidí velmi časté, v civilizovaných zemích jsou na druhém místě příčin úmrtí. Nádory však trpí i jiné živočišné druhy. Myši mají téměř všechny typy nádorů, které nalézáme u člověka, a proto jsou často využívány v experimentální oblasti. Jinak nádory nacházíme i u drůbeže, koček, psů, opic, plazů a dokonce i hmyzu.

Vznik a rozvoj nádorového onemocnění – karcinogeneze (kancerogeneze, ontogeneze, tumorigeneze) – je vícestupňovitý proces, který je výsledkem interakce genetických a epigenetických změn vyskytujících se hlavně u kmenových a prekursorových buněk různých typů. Za vývoj nádoru jsou zodpovědné

- 1) **genetické změny** – mutace
- 2) **epigenetické změny** ovlivňující expresi genů (především změny metylace DNA a acetylace histonů a dále ovlivnění mechanismů přenosu signálů regulujících buněčný cyklus, proliferaci, diferenciaci a smrt buněk apoptózou, inhibice mezibuněčné komunikace atd.).

Základem celého procesu karcinogeneze je indukce mutací, tj. **fáze iniciace**. Dochází ke změnám genetického materiálu buňky, které nevratně mění normální buňku v preneoplastickou. Ve **fázi rozvojové - promoční** dochází k preferovanému klonálnímu růstu preneoplastických nebo neoplastických buněk po působení tzv. **nádorově promočních podnětů** (regenerace po odstranění části buněčné populace nebo po smrti buněk, růstové signály, působení vnějších signálů – látky z diety, chemické a fyzikální faktory). Fáze je zpočátku vratná, později nevratná. Přechodná **fáze konverze či transformace** zahrnuje změny fenotypu a vznik maligního klonu.

Progrese představuje pozdější fáze vývoje nádoru a je charakterizována **akumulací dalších mutací, zejména** změnami počtu chromozómů a jejich přestavbami, což je spojeno se vzrůstající rychlostí proliferace, invazivitou a vznikem metastáz. Dochází tak k nevratnému přechodu preneoplastické populace v neoplastickou, z benigního do maligního stádia (obr 1-1).



Obr. 1-1 Mnohostupňový proces karcinogeneze

Nádorové onemocnění vzniká v zásadě **porušením homeostázy na úrovni buněk a buněčných populací**. Homeostáza v tkáních je udržována **integrovaným systémem komunikačních mechanismů (mimo-, vnitro- a mezibuněčných)** a reguluje chování buněk především s ohledem na schopnost proliferace, diferenciace, adaptivní odpovědi a apoptózy.

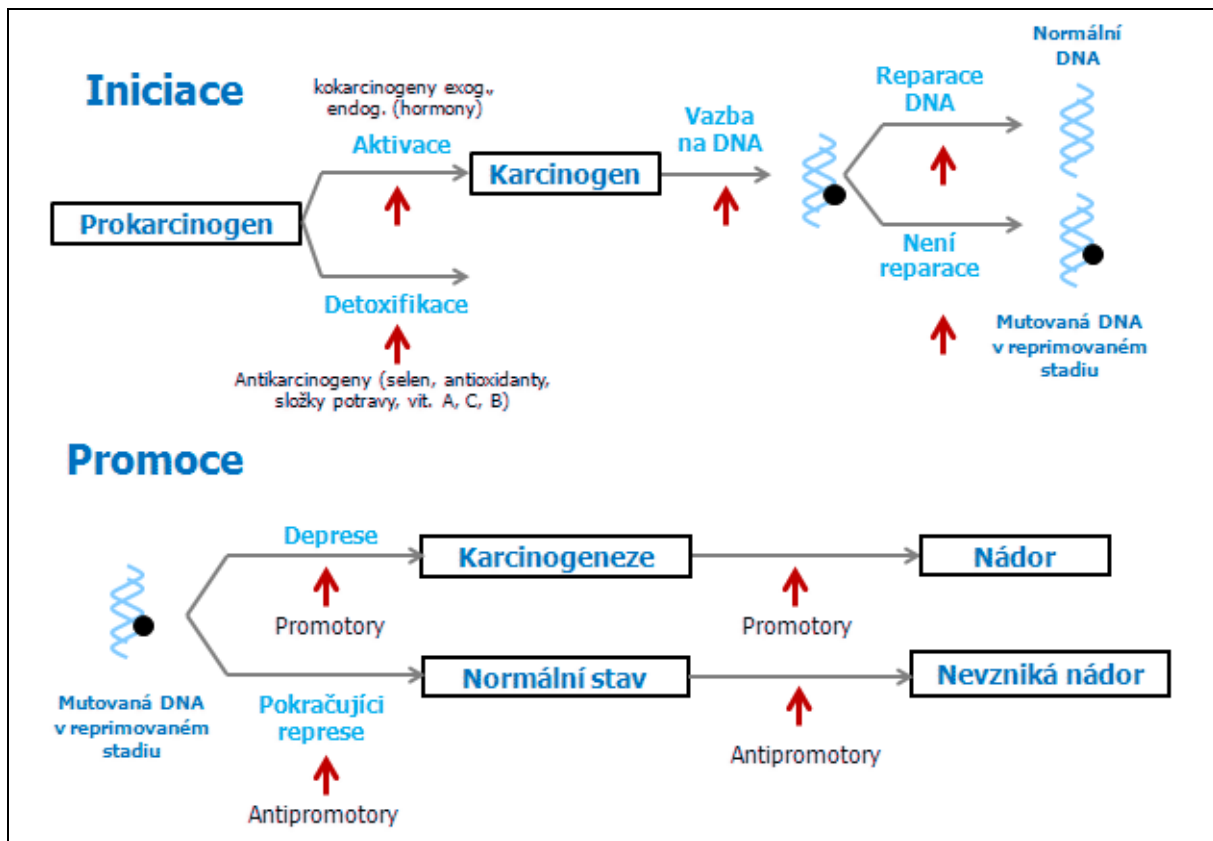
Iniciované preneoplastické buňky jsou udržovány v latentním stavu v důsledku působení těchto "přirozených" regulačních mechanismů. V podpůrné (promoční) fázi rozvoje nádorů se uplatňují látky **působící negenotoxickými (nebo epigenetickými) mechanismy**, které způsobují změny chování buněk v důsledku deregulace zmíněných procesů. Zásahy, které vedou ke **změnám v expresi genů** a k poruchám homeostázy se odehrávají v buňce na různých úrovních a různými mechanismy.

Základními znaky nádorové populace jsou pak zejména **ztráta kontaktní inhibice** a kontroly růstu, ztráta schopnosti terminální diferenciaci, ztráta schopnosti apoptózy a snížení nebo inhibice mezibuněčné komunikace.

1.4 MECHANIZMY KARCINOGENEZE, BUNĚČNÁ TRANSFORMACE

Mechanismus karcinogeneze zahrnuje přímé interakce s DNA a změny v expresi genů. Zatímco iniciace a progresse zahrnují strukturální změny v DNA, promoce je charakterizována nestálými změnami v proliferaci iniciovaných buněk a jejich potomstva a reverzibilními změnami v genové expresi. Strukturální změny genomu iniciované buňky jsou kvalitativně odlišné od změn v progresivním stadiu. **V iniciačním stadiu** dochází k jednoduchým záměnám bazí nebo malým delecím v kritických genech, zejména tzv. protoonkogenech, což stačí k přeměně normální buňky v iniciovanou. **V progresivním stadiu** dochází k velkým změnám v genomu, jako jsou chromozomální translokace, delece, inzerce a amplifikace genů.

Přítomnost jedné nebo více iniciovaných buněk v tkáních s určitým stupněm replikace je obecným jevem. **K fixaci iniciované buňky je třeba alespoň jedno kolo buněčného dělení (podobné fixaci mutace).** Protože iniciační podněty jsou součástí prostředí (radiační pozadí, kontaminace potravin, látky v ovzduší), je mnoho zdrojů spontánního vzniku iniciovaných buněk. Takové pozadí iniciovaných buněk je pak zdrojem pro neoplastické poruchy, které se vyvíjejí po chronickém působení promočních látek (obr 1-2).



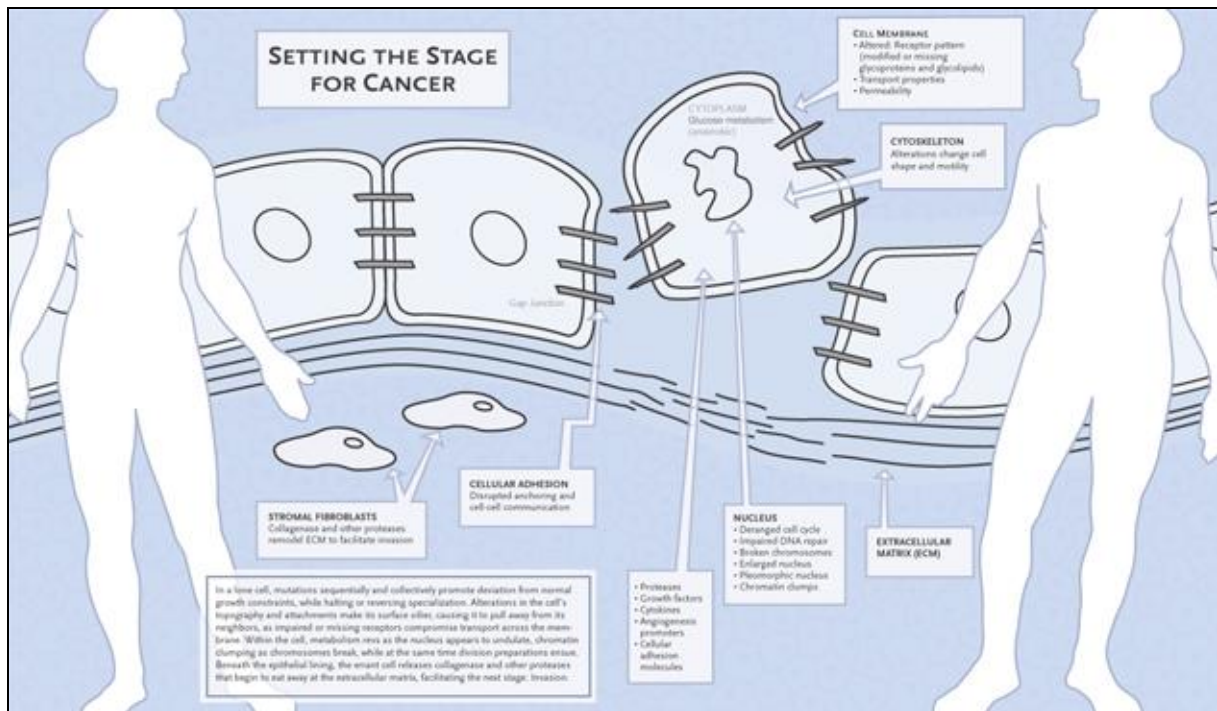
Obr. 1-2 Iniclace a promoce

Abnormality v karyotypu, které jsou znakem progresivního stadia, se mohou vyskytovat v populacích s rychlostí proliferace převyšující normál, tedy takových, které jsou ve stadiu promoce a obzvláště, jestliže jejich genom je již změněn mutací. Tak se obě "genetická" stadia karcinogeneze - iniciace a progrese - mohou vyskytovat nahodile a mezistadium promoce (indukované exogenně nebo endogenně) může sloužit k realizaci potenciálu pro neoplastický vývoj těchto spontánních procesů.

Změna genetické informace v buňce je obecně nazývána buněčnou transformací. Může vzniknout spontánně nebo je indukována virem, chemickými látkami nebo fyzikálními faktory. **Transformované buňky** se liší od normálních buněk v metabolických a růstových vlastnostech, v požadavcích na růstové faktory a výživu, na fyzikální podmínky růstu, kultivační povrch (mohou růst i v třírozměrné formě), liší se v antigenních vlastnostech, morfologicky atd. Nemusí však nutně tvořit nádory v organismu.

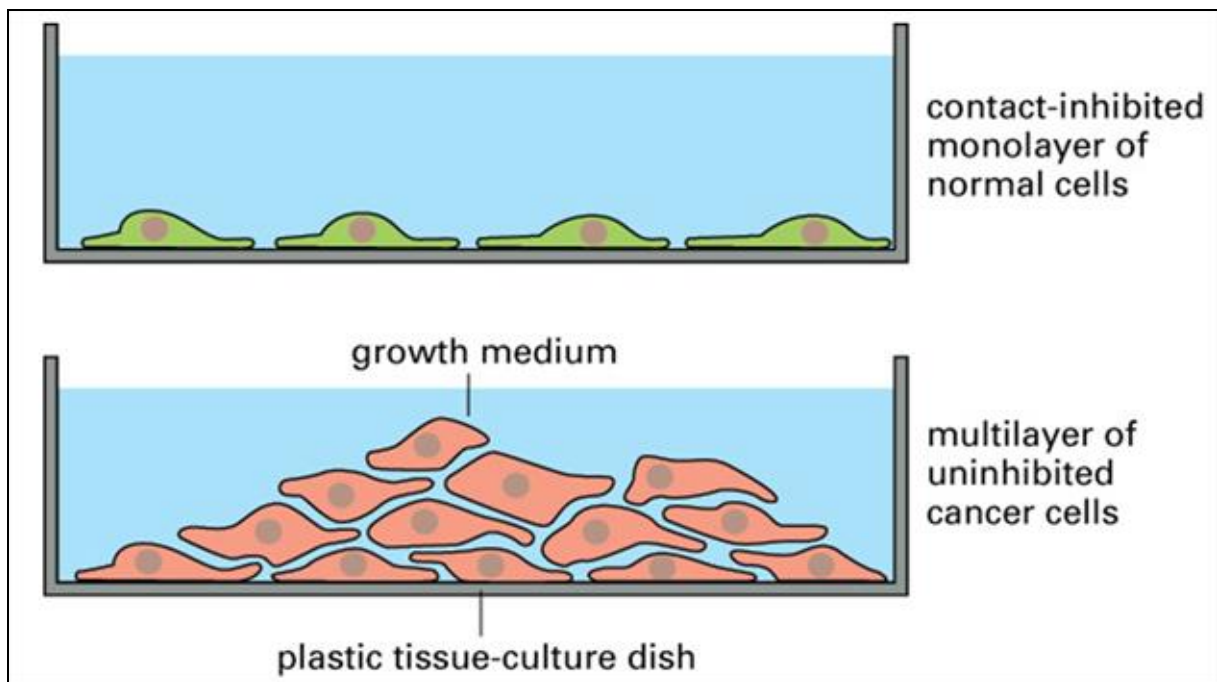
Maligní transformací pak nazýváme přeměnu buňky s normálními růstovými vlastnostmi na buňku s vlastnostmi buňky maligní (zhoubné). Buňka ztrácí schopnost produkovat nebo odpovídat na specifické růstové signály (tj. růstové faktory a inhibiční faktory) nebo na ně od-

povídá jinak, či produkuje vlastní odlišné signály (transformující růstové faktory), (obr. 1-3).



Obr. 1-3 Postupné změny při transformaci normální buňky v nádorovou (*The Scientist*. 2003 : 26.)

Normální buňky rostou v umělé kultuře *in vitro* spořádaně v jediné vrstvě a jejich množení se zastaví, když pokryjí dno nádoby. Existuje u nich tzv. **kontaktní inhibice růstu**. Tuto vlastnost nádorové buňky postrádají, rostou pořád dál i přes sebe, chovají se chaoticky a neuspořádaně. Nádorové buňky jsou "nesmrtelné", to znamená, že je lze neomezeně množit (obr. 1-4).



Obr. 1-4 Ztráta kontaktní inhibice v buněčné kultuře (Figure 23–25. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition)

Denzitně závislá kontrola růstu transformovaných buněk může být porušena ztrátou závislosti na koncentraci nebo přítomnosti pozitivních růstových faktorů séra. U negativních faktorů může být tato kontrola narušena buď ztrátou schopnosti transformovaných buněk tyto inhibitory produkovat, nebo ztrátou schopnosti na ně reagovat. Je tedy narušena takto realizovaná **negativní zpětná vazba**.

Kontrola růstu normálních savčích buněk zahrnuje interakce řady nespecifických i specifických růstových signálů. Při maligní transformaci dochází ke změnám v produkci i příjmu specifických růstových signálů zprostředkovaných proteiny v roli růstových stimulatorů nebo inhibitorů. Tyto podněty protipůsobí nebo působí aditivně. **Růst je tedy výslednicí interakce pozitivních a negativních signálů.**

Změny v produkci a příjmu pozitivních a negativních signálů, které jsou výsledkem působení karcinogenních činitelů na genetický materiál buňky, mohou být startovací silou dalších fyziologicko – morfologických změn.

Dereprese nesprávných genových sekvencí vede pak procesem kaskádovitých katastrof k rozvoji široké škály změn a je velmi těžké definovat změnu primární.

Existuje mnoho stupňů a úrovní, na kterých může být růst ovlivňován. Je to kombinace přímých a nepřímých mechanismů, tj. průniku regulačních růstových faktorů do buněk za současného uvolnění vnitrobuněčných mediátorů modifikujících a zprostředkujících rozšíření růstového signálu v buňkách.

Některé změny chování transformovaných buněk mají úzký vztah k **membránovým vlastnostem**, což se projevuje v komunikaci buněk, především ve snížené schopnosti komunikace pomocí **mezerovitých spojení (gap junction)** - viz dále. Maligní změny mohou být dále spojeny i se ztrátou **specifity komunikace**.

Může tedy existovat **mnoho úrovní vzniku nekontrolovaného nádorového růstu**. Poznání těchto úrovní regulace se jeví jako hlavní směr poznání příčin nekontrolovaného růstu u jednotlivých typů nádorů.

Ztráta produkce růstových inhibitorů a reaktivity na ně a ztráta požadavků na růstové faktory u maligně transformovaných buněk jsou zřejmě primární děje v procesu maligní transformace onkogenními viry, chemickými karcinogeny a zářením.

Teorie onkogeneze obsahuje koncept autokrinní růstové deregulace, zastavené diferenciaci a imortalizace. V souvislosti s poznáním, že v onkogenním procesu jsou stejně důležité ztráta negativních signálů a indukce pozitivních signálů, byly identifikovány nádorově supresorové geny a onkogeny. V poslední době je kladen důraz na novou třídu onkogenů, tzv. **represory apoptózy**. Je velmi pravděpodobné, že všechny lidské typy rakoviny zahrnují mechanismus potlačení apoptózy. V souvislosti s tím se objevil i termín „anti - cellular senescence factors“, tj. faktory působící proti stárnutí buňky.

Kontrolní otázky k tématu:

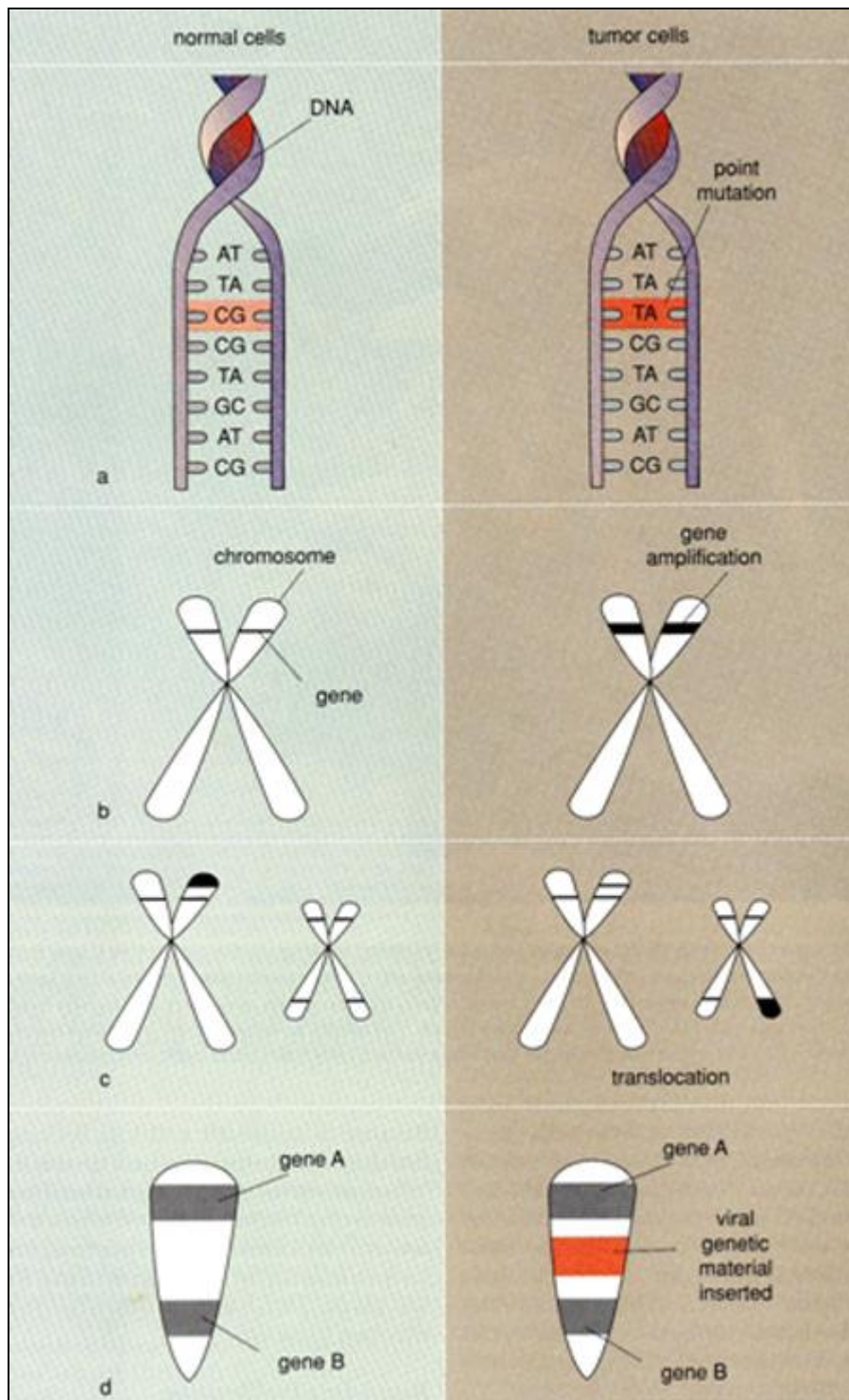
- Jak lze charakterizovat nádorovou tkáň?
- Jak se liší benigní a maligní nádor?
- Jaký je rozdíl mezi mutací a epigenetickou změnou?
- Jaké základní fáze rozeznáváme v procesu karcinogeneze a čím jsou charakterizovány?
- Jaké jsou zásadní rozdíly mezi iniciační a promoční fází?
- Ve kterých fázích a jak se rozhoduje o pokračování nádorového procesu?
- Jaké jsou základní znaky nádorové populace?
- Co rozumíte pod pojmem buněčná transformace a maligní transformace?
- Jak je v zásadě zajišťována rovnováha (homeostáza) v buněčných populacích?
- V jakém smyslu se z hlediska růstových signálů mění nádorová populace?
- V jaké tkáni vznikají karcinomy a v jaké sarkomy?
- Vyjmenuj faktory, které mohou způsobit iniciaci buňky.
- Co znamená kontaktní inhibice růstu buněk?

2. MUTACE

2.1 VÝZNAM MUTACÍ U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Mutace je definována jako **kvalitativní nebo kvantitativní změna v genetické informaci obsažené v DNA**. Je považována za *nevratnou (ireverzibilní) změnu a může být indukována fyzikálními, chemickými či jinými faktory*.

Mutace mohou vznikat na úrovni genů nebo chromozómů. Jeden specifický gen může být změněn přidáním, ztrátou nebo záměnou jedné báze. Protein kódovaný tímto genem pak může být změněn s ohledem na strukturu a funkci (obr. 2-1).

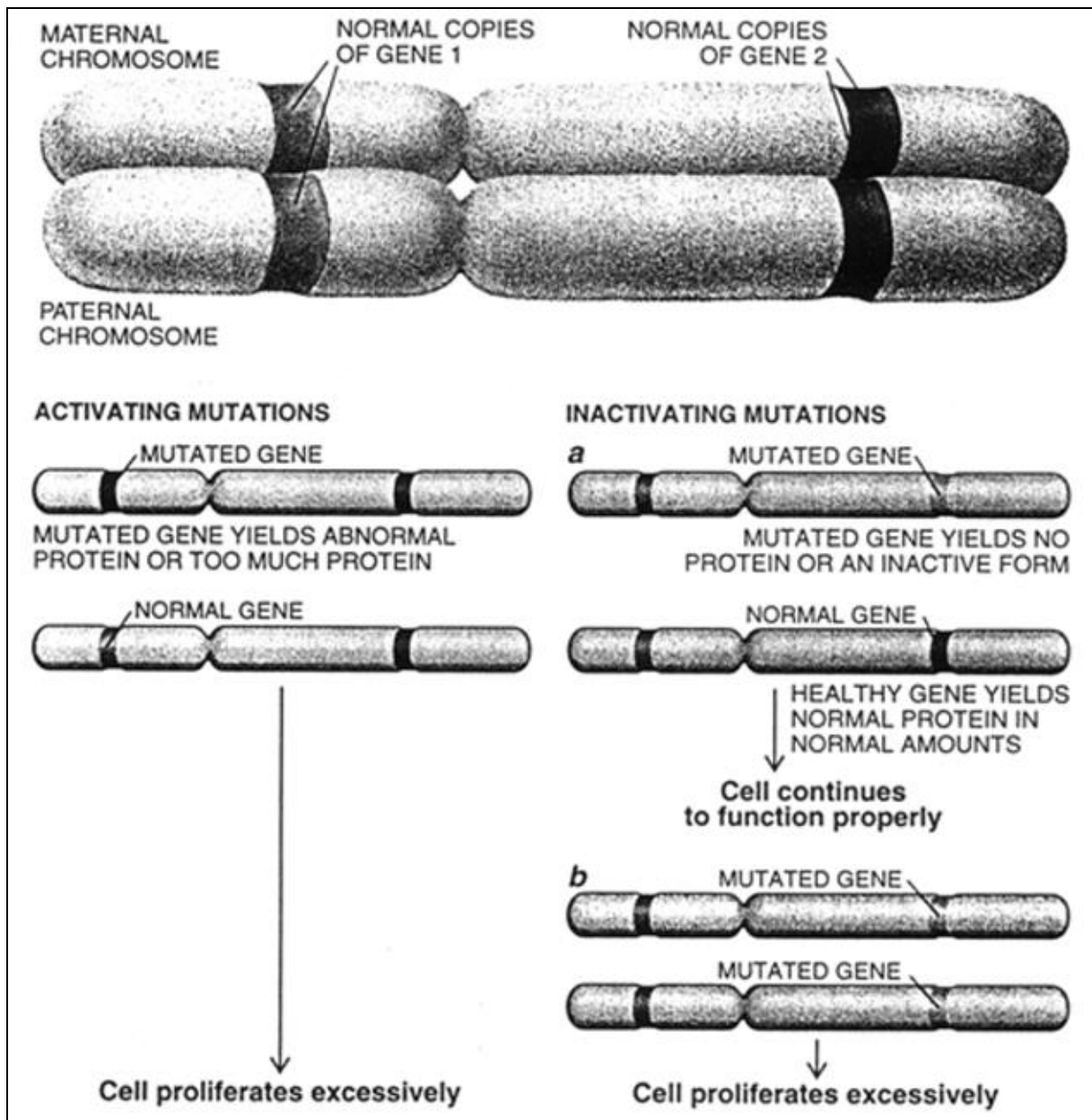


Obr. 2-1 Genetické změny a disorganizace chromozómů v nádorových buňkách (Van Noorden C.J.F. et al., *American Scientist* 1998 : 130)

Jestliže mutace zahrnuje změnu v počtu chromozómů v buňce (nondisjunkce, polyploidizace), tak potom, i když jednotlivé geny jsou normální, jejich počet může narušit jejich funkci. Změny v uspořádání chromozómů způsobené delecí nebo translokací části jiných chromozó-

mů také mohou způsobit jak mutace genů, tak abnormální expresi genů umístěných na takovémto chromozómu.

Není pochyb, že mutace hrají u nádorových onemocnění důležitou úlohu. Jak onkogeny a nádorově supresorové geny tak i abnormální chromozómy a počty chromozómů jsou spojeny s nádorovými buňkami (obr 2-2).



Obr. 2-2 Geny se dědí v odpovídajících párech (Cavence E.K. and White R.L., Scientific American 1995 : 50)

Jako **mutageny** mohou působit různé **chemické látky i fyzikální faktory** (např. ionizující či UV záření), ale i **viry**, které indukují v buňkách mutace. Kromě toho mohou **dědičné mutace**

(Xeroderma pigmentosum, Wilmsův nádor, albinismus atd.) předurčovat jedince k určitým typům nádorů.

Důležité je, uvědomit si, že **mutagenita se nerovná karcinogenitě**. Ze studií vyplývá, že ačkoliv mutageny mají vysokou pravděpodobnost být i karcinogeny (84 %), může docházet k falešným predikcím, protože řada nekarcinogenních látek jsou rovněž mutageny. Naopak také mnoho nemutagenních chemikálií může být karcinogenní.

Chemikálie jsou označovány jako karcinogeny, jestliže v exponované lidské populaci je vyšší frekvence nádorů než v neexponované populaci nebo jestliže se objevují nádory u zvířat, kterým byla chemikálie podávána.

Existuje také řada látek či faktorů, které fungují jako **kokarcinogeny**, tím, že např. zvyšují hladiny buněčných enzymů, které aktivují karcinogeny.

Antikarcinogeny se zase chemicky váží na karcinogen, odbourávají jej, tlumí enzymy aktivující karcinogeny nebo obsadí cílové místo (kompetitivní inhibice).

Mutace jsou výsledkem různých typů mechanismů. Některé bodové vznikají následkem **chyb v reparaci poškozené DNA** při replikaci DNA s nereparovanými poškozeními. Na druhé straně některé mutace mohou vzniknout při replikaci normální DNA s **defektivní DNA polymerázou** nebo normální DNA polymerázou, která je inhibovaná.

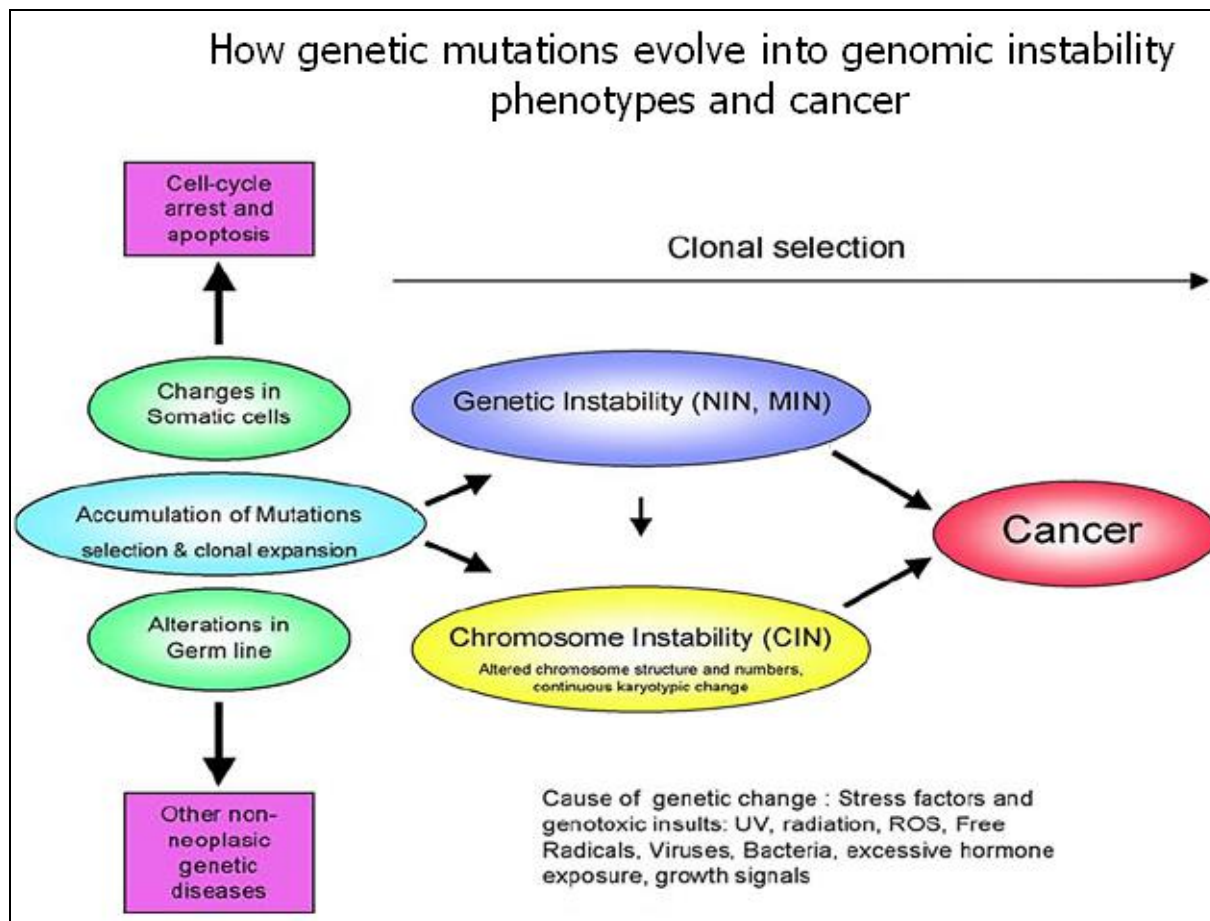
Změny v počtu chromozómů jsou pravděpodobně způsobeny faktory, které neovlivňují přímo DNA, ale ovlivňují molekuly zodpovědné za segregaci chromozómů během buněčného dělení. **Chromozomální přestavby** jsou pravděpodobně způsobeny jak faktory poškozujícími DNA, tak i jiné enzymy nutné pro její stabilitu.

Mutace jsou nejen znakem nádorů, ale jsou také zásadní pro jejich vývoj. Normální frekvence mutací 10^{-7} – 10^{-8} /nukleotid/buněčné dělení. Zvýšená frekvence mutací podporuje karcinogenezi. Molekulární techniky dnes umožňují zkoumat lidský genom od chromozómů až po sekvence nukleotidů a odhalovat tak stále více a více mutací v nádorových buňkách.

Genom nádorových buněk je nestabilní a tato nestabilita vyústí v kaskádu mutací, z nichž některé umožňují nádorovým buňkám obejít regulační procesy, které kontrolují lokalizaci buňky, její dělení, adaptaci a smrt. **Genetická nestabilita** je manifestována velkou heterogenitou buněk v každém nádoru. Kromě toho se u nádorů vyvíjí rezistence k chemoterapeutikům.

2.2 POŠKOZOVÁNÍ A REPARACE DNA

Každý nádorový fenotyp obsahuje specifické mutace v kritických genech. Tyto mutace vznikají buď kopírováním nereparovaných poškození v DNA nebo chybami během syntézy DNA (obr. 2-3).



Obr. 2-3 Spojení genotoxického stresu a genomové nestability (Jefford Ch.E., Irminger-Finger I., Crit Rev Oncol/Hematol 2006 : 1)

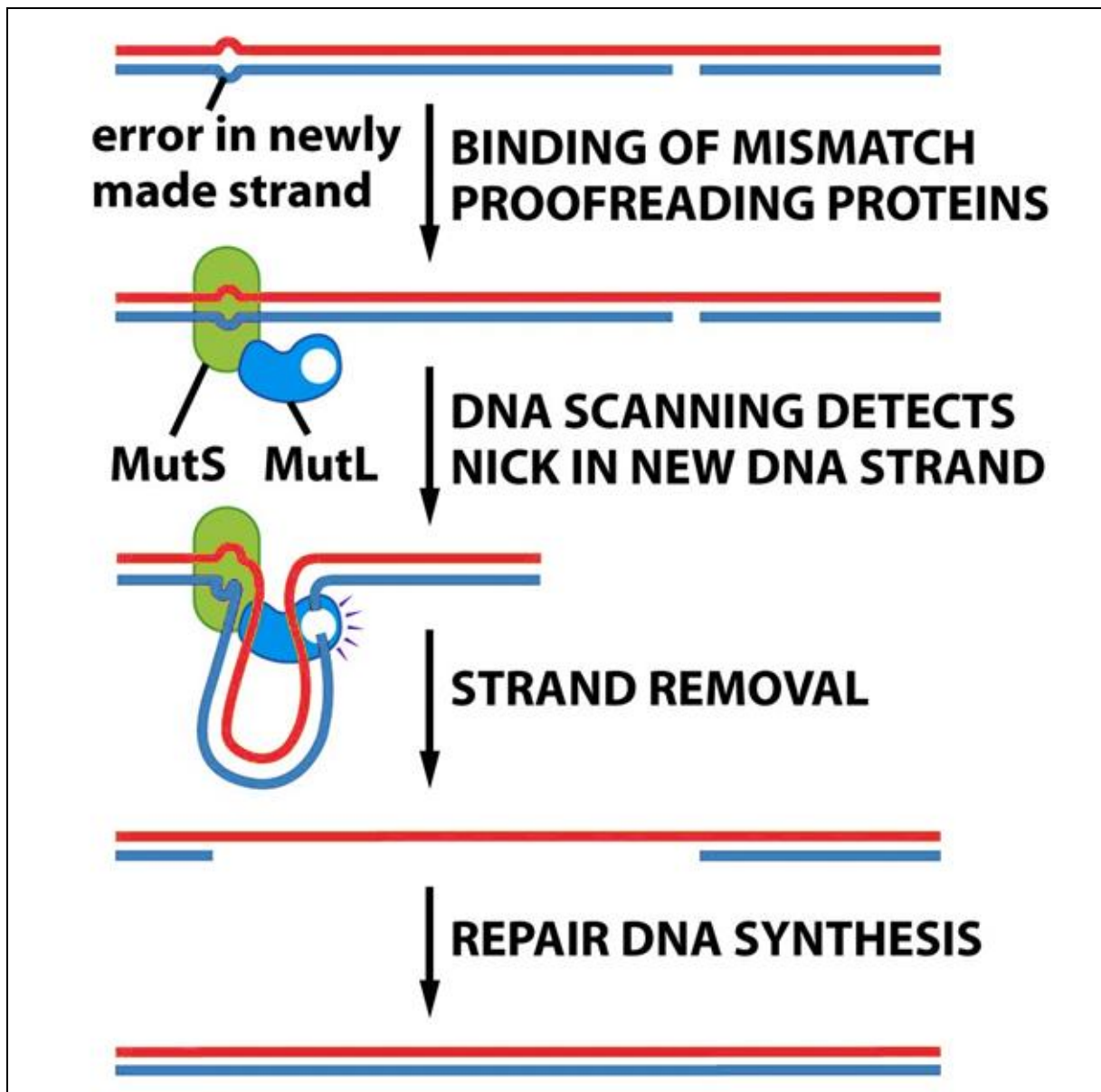
Současné studie předpokládají dva hlavní mechanismy vzniku mutací v nádorových buňkách:

- deficit v reparaci DNA (kopírování nereparovaných poškození v DNA nebo chyby během syntézy DNA)
- deficit v rozdělování chromozómů při buněčném dělení

Zdrojem nepřesností při replikaci DNA jsou chyby vzniklé při DNA polymeraci (tj. kvalita DNA polymeráz a souvisejících „proofreadingových“ procesů) a chyby v systémech reparace DNA. Chyby purifikovaných DNA polymeráz *in vitro* se pohybují od 5000 pro polymerázu beta, která syntetizuje krátké úseky po 10 mil. pro polymerázu delta a eta účastníci se replika-

ce DNA. U nádorů nebyly prokázány defekty v DNA polymerázách, ale byly prokázány defekty ve dvou hlavních systémech reparace DNA.

- a) **Nukleotidová excizní oprava** („*nucleotide-excision repair*“ – **NER**) – s ní spojená nestabilita („*NER-associated instability*“ – **NIN**)
- b) **Oprava špatného párování** („*mismatch repair*“ – **MMR**) - s ní spojená mikrosatelitová nestabilita (**MIN**) (obr. 2-4)



Obr. 2-4 Oprava špatného párování bazí (Figure 12.8c. Weinberg R. A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

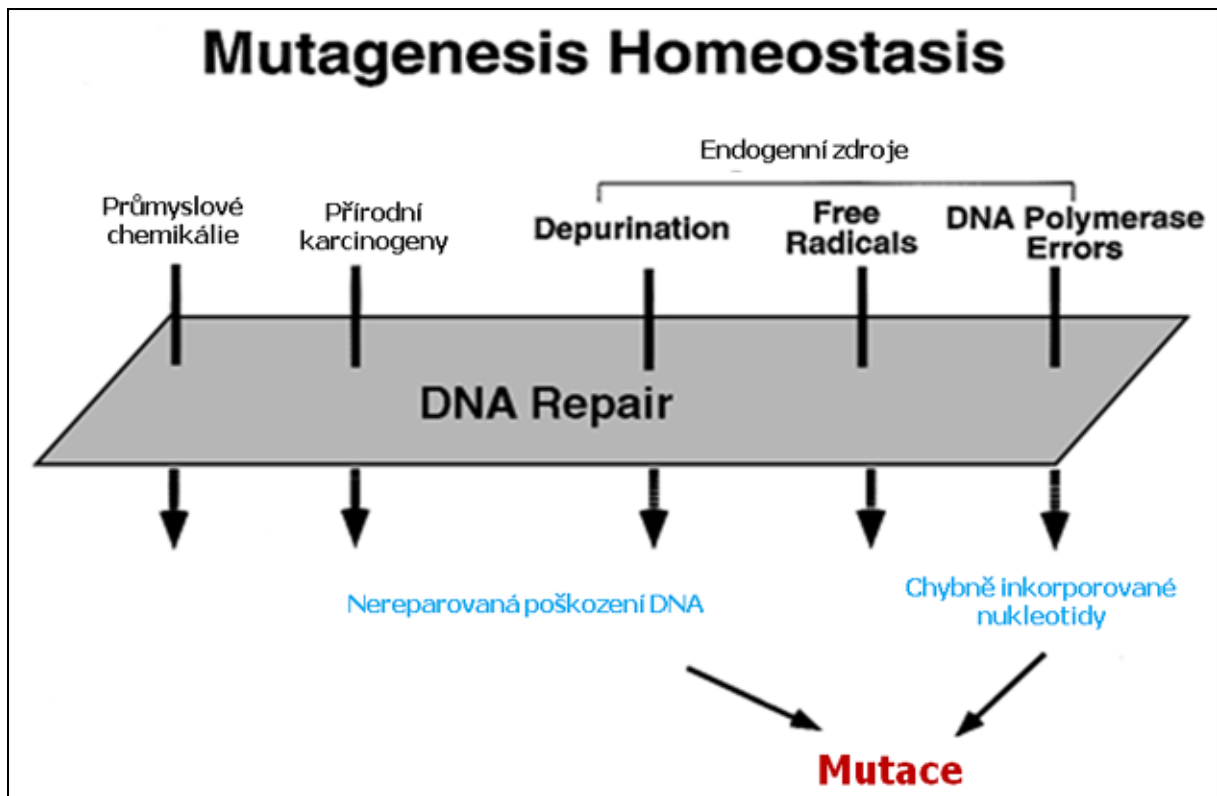
V buněčné DNA dochází ke stálému poškozování a resyntéze. DNA je poškozována jak **environmentálními tak endogenními zdroji**. Mnoho z těchto látek jsou mutageny a řada z nich i karcinogeny. *Poškození DNA chemikáliemi spadá do dvou kategorií:*

- a) ty, které produkují velké rozsáhlé adukty a jsou reparovány excisí nukleotidů a*
- b) ty, které způsobují malé změny reparované excisní reparací bází, jako např. alkylační činidla, která přidávají metyl- a etylskupiny do nukleotidů.*

Bylo prokázáno, že kromě chemikálií existuje řada **přírodních látek v potravě**, které také mohou poškozovat DNA. Konzumace těchto látek je pravděpodobně daleko vyšší než expozice průměrně produkovanými chemikáliemi.

Buněčné metabolické procesy rovněž produkují reaktivní chemické produkty se schopností poškozovat DNA a tak produkovat spontánní mutace. Dokonce i voda má schopnost poškozovat DNA, když způsobí hydrolýzu glykosilických můstků a tvorbu mutagenních abazických míst. Odhaduje se, že každá buňka je každý den podrobena 10 000 depurinací. **Poškození DNA reaktivními kyslíkovými radikály (ROS)** se vyskytuje přibližně se stejnou frekvencí a poškozené baze např. 8-oxo-deoxyguanosine narušují kód. Ačkoliv je deaminace cytosinu na tymidin méně častá, způsobuje změnu sekvence nukleotidů. Vzhledem k vysoké frekvenci poškození je pravděpodobné, že významná část poškození unikne reparaci a produkuje mutace během replikace této nereparované DNA DNA polymerázami. Týká se to zejména drobných změn. Rozsáhlé adukty je obtížné obejít a indukce mutací závisí na indukci dalších mechanismů zahrnujících chybnou syntézou DNA.

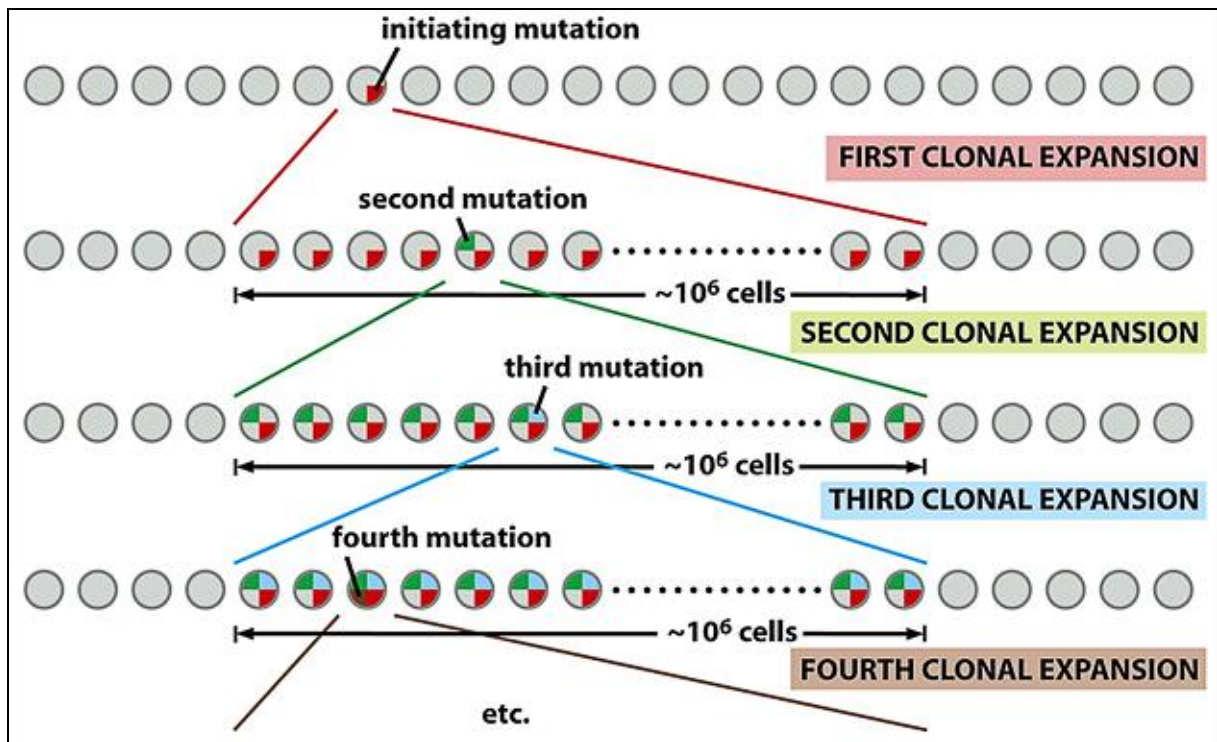
Nukleotidové sekvence v buněčné DNA jsou udržovány v homeostatické rovnováze, kdy růst poškození DNA nebo snížení reparace vedou ke zvýšené frekvenci mutací (obr. 2-5).



Obr. 2-5 Faktory vedoucí k akumulaci mutací v nádorových buňkách (Loeb K. R. and Loeb L. A., *Carcinogenesis 2000* : 379)

Obrovské množství chromozomálních aberací a heterogenita nádorů předpokládají, že **nádorové buňky jsou geneticky nestabilní**. K této nestabilitě přispívají v zásadě a nezávisle **dva překrývající se mechanismy**:

- a) vznik mutovaného fenotypu nádorových buněk založený na **vzrůstajícím počtu chyb v syntéze DNA během replikace**. Tyto chyby vznikají v důsledku mutací v DNA polymerázách, takže vnáší chyby nebo mutací v DNA reparačních proteinech, které jsou tak defektní. Některé z těchto mutací nastávají v genech důležitých pro udržování genetické stability
- b) **akumulace mutací** založená na postupných vlnách **klonální selekce**. Tento model vytvořil na základě analýzy sekvence chromozomálních aberací v nádorech Nowell v r. 1976 (obr 2-6).



Obr. 2-6 Hromadění, selekce a klonální expanze mutací (Figure 11.12. Weinberg R.A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

2.3 MIKROSATELITY

Bylo zjištěno, že velké množství mutací (např. až sto tisíc u nádoru kolonu) se nachází v tzv. **mikrosatelitech** – repetitivních sekvencích mezi geny. Nyní se ukazuje, že repetitivní sekvence jsou i uvnitř genů a jsou u nádorových buněk zkracovány nebo prodlužovány s vysokou frekvencí. Tak dochází patrně k *inaktivaci nádorově supresorových genů během rozvoje nádorů*. Vysoká hladina nestability mikrosatelitů se vyskytuje zejména u tzv. HNPCC – dědičný nepolypózní nádor kolonu. Dědí se zde mutace v jedné alele genů zahrnutých v opravě nesprávných spojení v DNA ("mismatch repair") a dochází s vysokou frekvencí ke ztrátě druhé divoké alely. Lokus zodpovědný za HNPCC byl zmapován do oblasti 2p16 a 3p21. V roce 1993 poprvé navrženo, že HNPCC může souviset s defekty MMR a bylo potvrzeno, že „odpovědnými“ geny jsou *MSH2* na chromozómu 2 a *MSH1* na chromozómu 3. *MSH2* a *MSH1* odpovídají za 90% vrozených mutací HNPCC, další jsou *PMS1*, *PMS2* a *MSH6*.

U jiných nádorů, u kterých dochází k expanzi nebo delecii repetitivních sekvencí, je snižená reparace DNA způsobena metylací společně s redukovanou expresí některého z genů pro "mismatch" reparaci. Na nestabilitě mikrosatelitů se ve velké míře podílejí ROS, takže se uvažuje o terapeutickém využití látek působících jako antioxidanta.

Nádory vykazující nestabilitu mikrosatelitů obsahují často změny v délce repetitivních sekvencí uvnitř řady genů spojených s nádory jako je APC, IGF, TGF-beta, hMSH3, hMSH6.

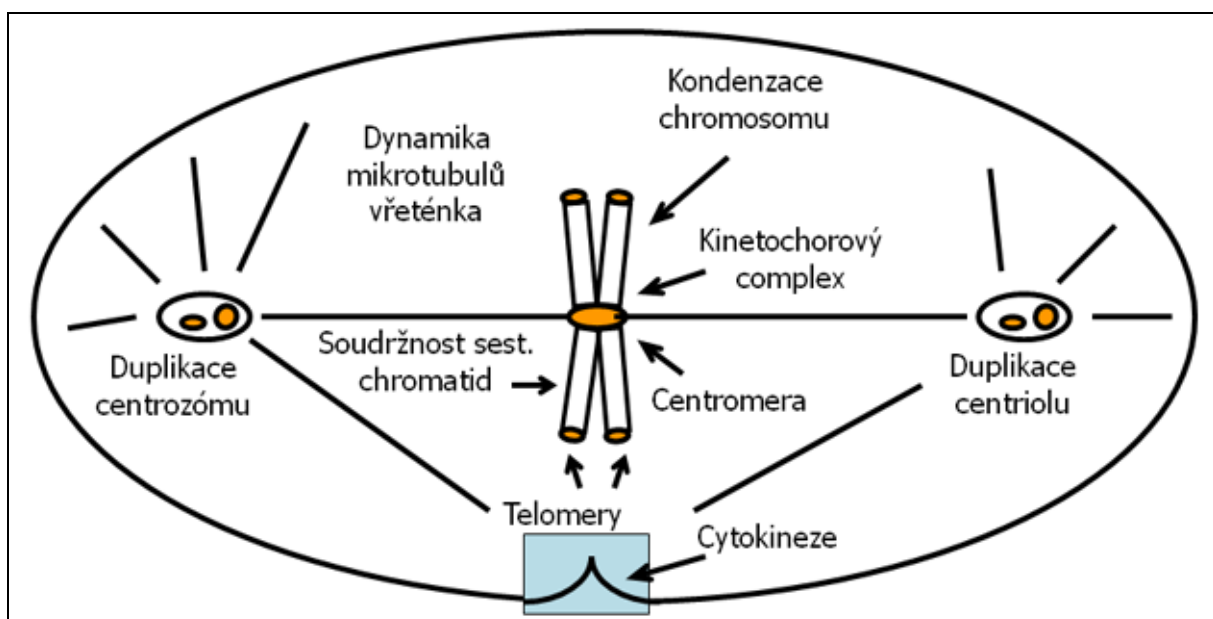
2.4 CHROMOZOMÁLNÍ NESTABILITA

Genetická nestabilita nádorových buněk se projevuje nejen **na úrovni nukleotidů vznikajícími bodovými mutacemi**, ale také **na úrovni celých chromozómů translokacemi, delecemi, amplifikacemi a aneuploidií**. Oba typy nestability vedou k **mutantnímu fenotypu** prostřednictvím změněné exprese proteinů, funkcí nebo efektem genové dávky.

Amplifikace (zmnožení) genů. Téměř všechny nádory prsu a vaječnicků studované s využitím srovnávací genomové hybridizace obsahují řadu změn v počtu genových kopií. Genová amplifikace se objevuje u některých typů nádorů vyšších stádií a může souviset s rezistencí k chemoterapeutikům (*N-myc*, *erb* a *ras*). Amplifikace se objevují v pozdních stádiích maligní transformace, jsou spojeny s agresivně rostoucími nádory a signalizují nepříznivý prognostický vývoj.

Aneuploidie, změna v počtu chromozómů, je vlastností řady nádorů. Protože každý chromozóm obsahuje tisíce genů, je udivující, že změny v počtu chromozómů jsou slučitelné s viabilitou buněk. Specifické chromozomální výměny se vyskytují ve vysoké frekvenci a jsou detekovány v určitých nádorech. Obecně existuje **pozitivní korelace mezi počtem chromozomálních změn v nádoru a maligním potenciálem tohoto nádorového onemocnění**.

Je však poměrně málo známo o tom, jak se aneuploidie vyvíjí nebo o selektivních výhodách jaké přináší nádorům. Aneuploidie může vzniknout fragmentací chromozómů, translokací, amplifikací nebo nondisjunkcí. Progresivní růst aneuploidie je raným počátečním dějem vedoucím ke genetické nestabilitě a je nezávislý na akumulaci jiných typů mutací (obr. 2-7).

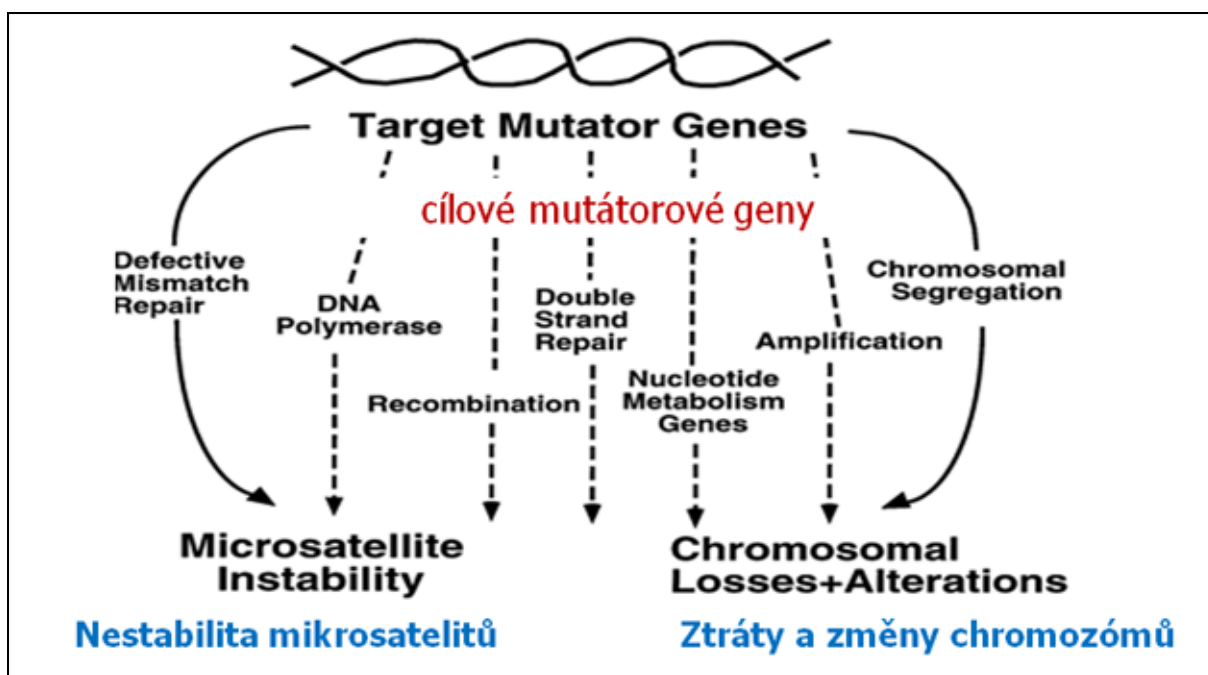


Obr. 2-7 Potenciální mitotické cíle vedoucí k aneuploidii (podle Sen S., *Curr Opin Oncology* 2000 : 82)

Předpokládá se, že nejdříve vznikají tetraploidní mezistupně po defektní mitóze nebo endoreduplikaci. Po přechodné zástavě mitózy v přítomnosti poškození vřeténka, jsou některé nádorové buňky schopny obnovit buněčný cyklus vstupem do dalšího kola syntézy DNA, což vede k **endoreduplikaci**. Počínají si tak zejména buňky, které postrádají funkční produkty genů kontrolujících přechod fáze G1/S jako jsou p53, pRb, p16, p21 i buňky se zvýšenou expresí onkogenu myc. Úloha defektních kontrolních mitotických bodů při vzniku aneuploidie však není ještě zcela jasná

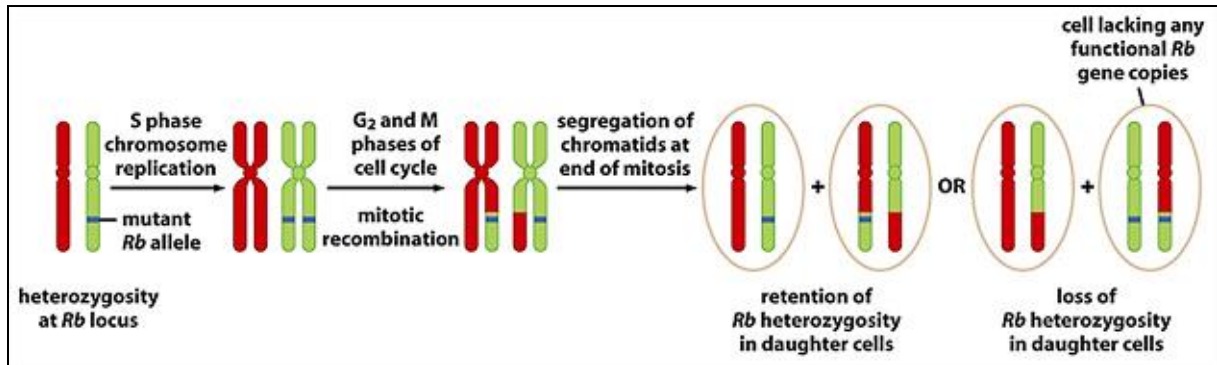
Předpokládá se, že existují **dva základní mechanismy vzniku genetické nestability** (obr. 2-8):

- *Mechanismus zahrnující mutace v genech pro opravu nesprávných spojení DNA (mismatch) a manifestují se nestabilitou mikrosatelitů. Je zapotřebí mutace v obou alelách.*
- *Mechanismus manifestující se fragmentací chromozómů nebo duplikací či delecí celých chromozómů. Stačí pouze jedna mutace, protože fenotyp nestability chromozómů má dominantní charakter.*



Obr. 2-8 Různé dráhy vedoucí ke vzniku mutovaného fenotypu nádorové buňky (Loeb K. R. and Loeb L. A., *Carcinogenesis* 2000 : 379)

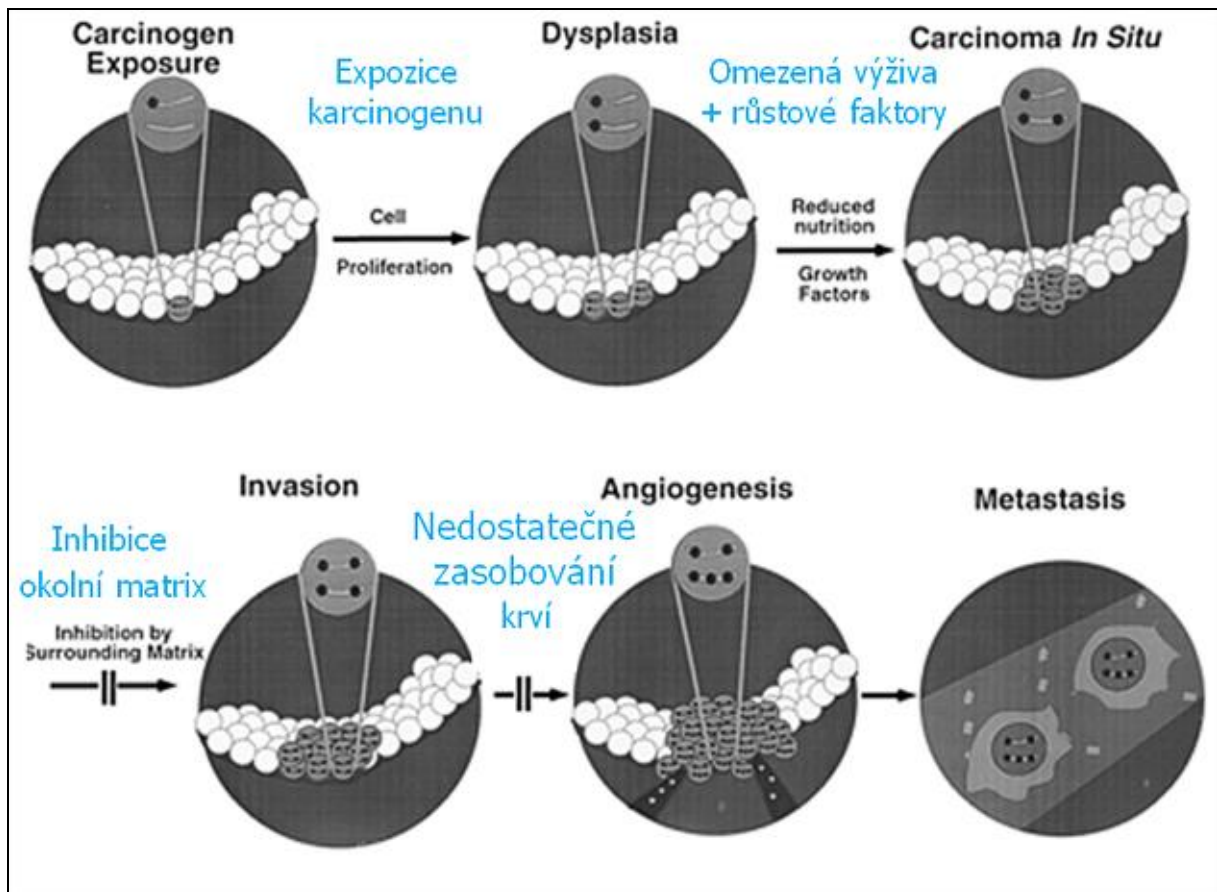
Důležitým procesem při vývoji nádorů je rovněž **ztráta heterozygotnosti („lost of heterozygosity“, LOH)**. Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, ztrácejí delecí velkou část chromozómu, který nese funkční alelu. V oblastech s vysokou frekvencí LOH často leží geny nádorových supresorů. Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru (např. retinoblastoma- RB gen), ztrácejí funkční alelu (obr. 2-9).



Obr. 2-9 Ztráta heterozygotnosti (Figure 7.8. Weinberg R. A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

Předpokládá se proto, že mutovaný fenotyp je manifestován pravděpodobněji nestabilitou chromozómů než bodovými mutacemi. Souvisí to však s tím, že chromozomální změny jsou daleko snadněji detekovatelné než náhodné bodové mutace.

S růstem počtu mutací přispívá ke genetické nestabilitě **jev klonální selektivity**. Jak se nádor rozrůstá, střetává se s řadou překážek omezujících jeho růst. Je to vliv okolních tkání, omezená výživa a přístup kyslíku, potřeba růstových faktorů, nedostatečné zásobování krví atd. *Každá z těchto překážek může být překonána v důsledku mutací, které poskytují **růstovou výhodu** a ustanovují novou klonální populaci.* Za každým kolem selekce dochází také ke vzniku dalších mutací (obr. 2-10).



Obr. 2-10 Vývoj nádoru založený na selekci mutovaného fenotypu (Loeb K. R. and Loeb L. A., *Carcinogenesis* 2000 : 379)

Díky genetické nestabilitě dochází během času k akumulaci mutací buď v gametách nebo somatických buňkách. Somatické nebo dědičné genetické změny zahrnuté v genetické nestabilitě postihují funkce jako je reparace DNA a kontrolní body buněčného cyklu a mitózy, což předchází zvýšenou telomerázovou aktivitu. Somatické buňky však vyžadují pro rozvoj nádoru ještě dysfunkci tzv. „gatekeepers“. Mutace umožňující genomovou nestabilitu jsou v gametách i somatických buňkách selektovány.

„**Gatekeepers**“ jsou recesivní geny, které přímo regulují (limitují) růst nádorů buď inhibicí jejich růstu nebo indukcí jejich smrti.

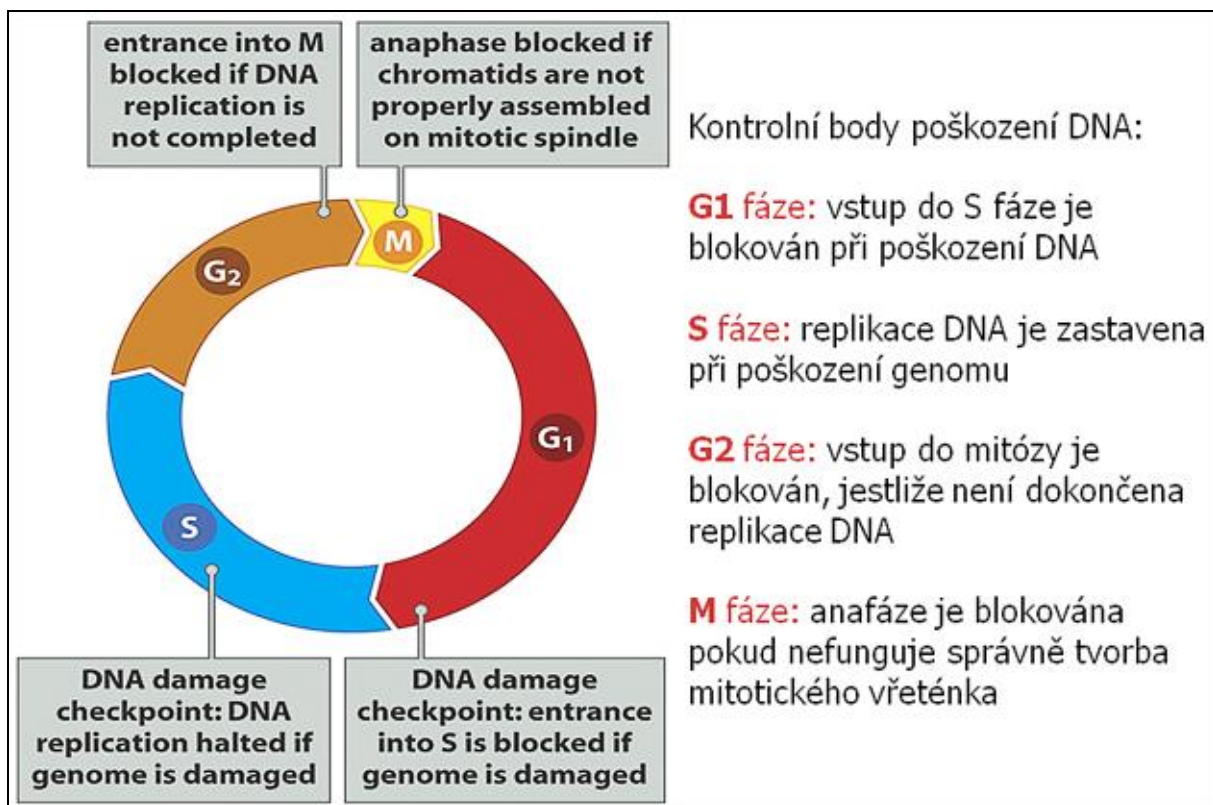
„**Caretakers**“ jsou geny, jejichž inaktivace navozuje genetickou nestabilitu a ta pouze nepřímo indukuje růst nádorů zvyšováním mutační rychlosti.

Geny jako jsou APC, či p53 fungují zároveň jako „gatekeepers“ i „caretakers“.

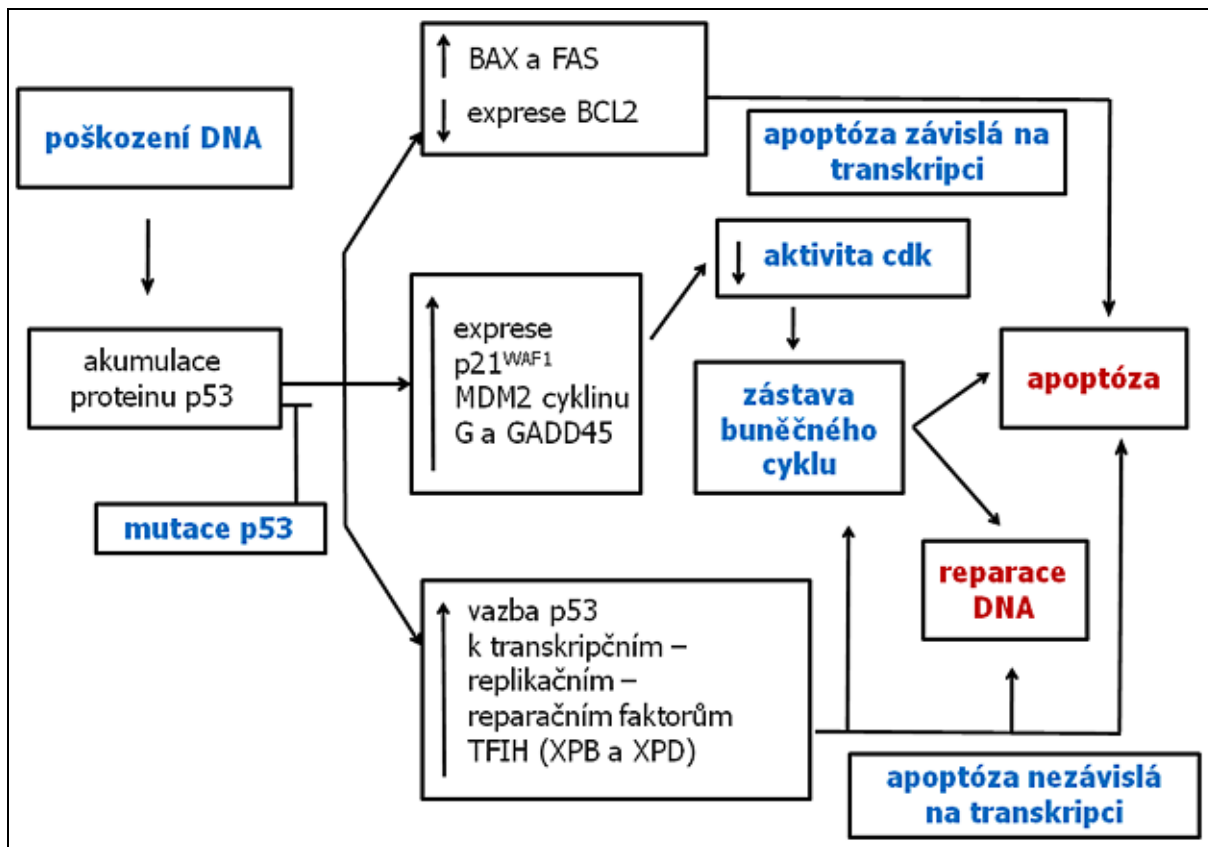
2.5 KONTROLNÍ BODY BUNĚČNÉHO CYKLU, APOPTÓZA A MUTOVANÝ FENOTYP

V eukaryotické buňce existují kontrolní body, které zastavují replikaci DNA a umožňují reparaci. Při mutaci genů kontrolujících např. přechod G1/S buněčného cyklu je umožněna replikace nereparované DNA a výsledkem je zvýšená mutageneze.

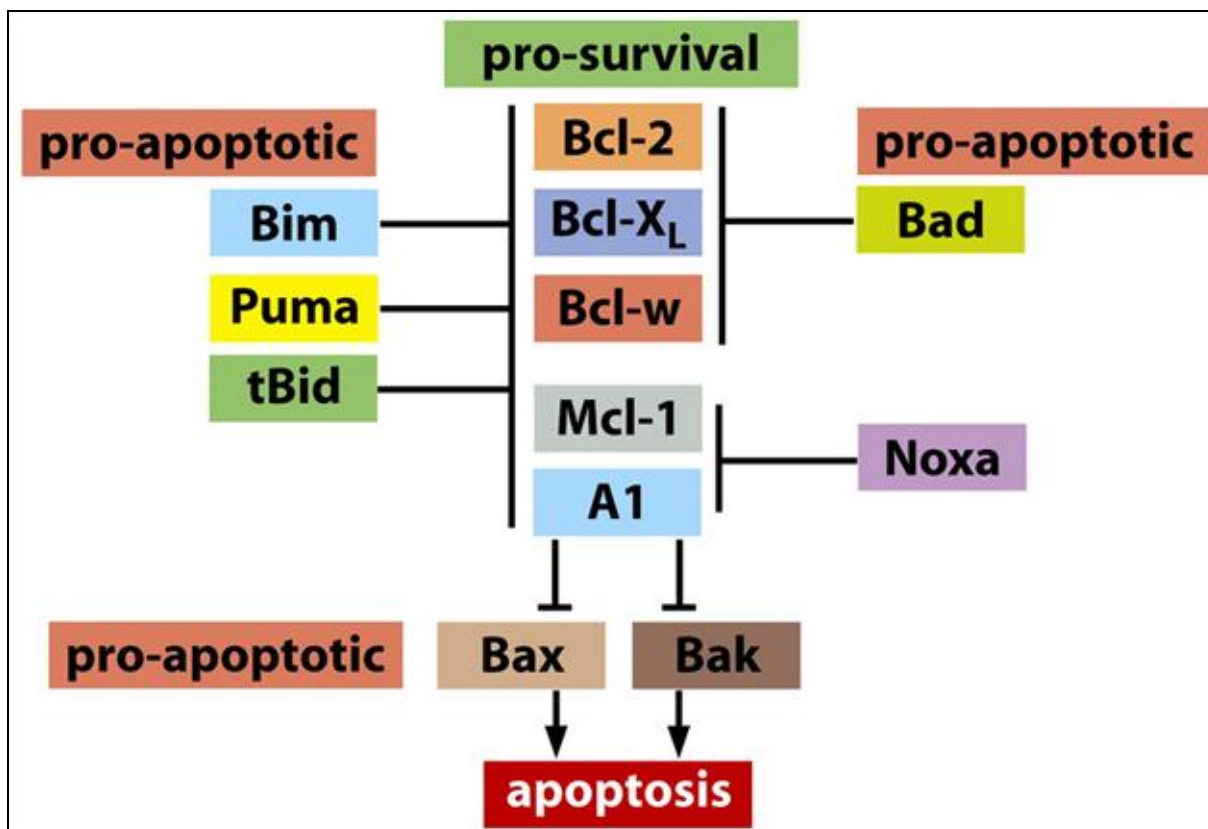
Změny v načasování fází buněčného cyklu poskytují další mechanismus pro vznik mutovaného fenotypu. V průběhu buněčného cyklu existuje několik **kontrolních bodů**, kde je monitorována reparace poškození před vstupem do *následující fáze* (obr. 2-11). Při aktivaci se v těchto bodech cyklus přechodně zastavuje, aby mohla být poškození reparována. *Eliminace těchto kontrolních bodů vede k vývoji mutovaného fenotypu*. Např. mutace v p53 způsobuje absenci kontroly poškození DNA a umožňuje nádorové buňce replikovat tuto poškozenou DNA a akumulovat mutace v dceřinných buňkách, což vede ke genomové nestabilitě. *V případě vzniku nereparovatelného poškození se normálně spouští apoptóza, která zabrání rozšíření mutací* (obr. 2-12). Řada nádorů však obsahuje **mutace, které zpožďují nebo zabraňují apoptóze** a tak podporují přežití geneticky nestabilních maligních buněk (obr. 2-13).



Obr. 2-11 Kontrolní body buněčného cyklu (Figure 8.4. Weinberg R.A., The Biology of Cancer (© Garland Science 2007))



Obr. 2-12



Obr. 2-13 Proteiny spouštějící nebo blokující apoptózu (Figure 9.27c. Weinberg R.A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

2.6. GENETIKA vs. ENVIRONMENTÁLNÍ FAKTORY

Při vzniku nádorů působí dva typy mechanismů - environmentální faktory a genetické vybavení jedince.

V některých případech je primární environmentální faktor, který způsobí vznik nádoru u "normálního" jedince. Avšak i v tomto případě jsou zasaženy geny, protoonkogeny a nádorově supresorové geny. Kromě toho existují další geny, které mohou způsobit větší či menší citlivost (susceptibility) jedince k environmentálním faktorům.

Předpokládáme-li, že všechny nádory jsou výsledkem iniciační, promoční a progresivní fáze karcinogeneze, měly by existovat geny, které:

- a) buď chrání, nebo predisponují protoonkogeny nebo nádorově supresorové geny k aktivaci nebo inaktivaci,
- b) selektivně podporují nebo suprimují růst a expanzi iniciované buňky,
- c) zabraňují nebo zvyšují možnosti získání genetické/epigenetické nestability iniciované buňky, které zapříčiňují její malignitu.

Příkladem jsou některé **lidské dědičné syndromy** (obr. 2-14):

▪ **Albinismus**

Jedinci s tímto syndromem nemají melaninovou pigmentaci, která chrání kůži nebo oči před škodlivými účinky UV záření. Mají normální reparační mechanismy DNA, ale množství poškození je větší než je tento systém schopen zvládnout. Nereparovaná poškození DNA fungují jako substrát pro vznik mutací v protoonkogenech nebo nádorově supresorových genech. Syndrom je klasifikován jako *typ náchylný ke vzniku nádorového onemocnění*. Protože poškození DNA je velké, mnoho buněk umírá a smrt kožních buněk stimuluje tzv. **kompenzační – regenerační růst buněk přežívajících**. V tomto procesu pak vzniká možnost podpory dělení iniciovaných buněk. Klony iniciovaných buněk dále exponované UV vykazují zvýšenou pravděpodobnost dalších mutačních (genetických) změn, při jejichž hromadění dochází k postupu populace buněk do progresivního stadia.

▪ **Xeroderma pigmentosum**

Genetický syndrom, který také předurčuje jedince k rakovině kůže, avšak na jiném principu. Jedinci jsou nositeli genu, který neumožňuje reparovat poškození DNA indukované UV. Výsledkem jsou nereparovaná poškození DNA, která vedou ke smrti buněk nebo k mutacím. Podobně jako u albínů dochází ke *kompenzační hyperplazii* při náhradě odumřelé tkáně. Iniciovaná buňka kůže proliferuje, ale nediferencuje. Vytváří

klon iniciovaných buněk (papilom) citlivý k indukci dalších genetických/epigenetických změn a k progresivnímu rozvoji.

Name of syndrome	Name of gene	Cancer phenotype	Enzyme or process affected
HNPCC	(4–5 genes) ^a	colonic polyposis	mismatch repair enzymes
XP ^b	(8 genes) ^b	UV-induced skin cancers	nucleotide-excision repair
AT ^c	ATM	leukemia, lymphoma	response to dsDNA breaks
AT-like disorder ^f	MRE11	not yet determined	dsDNA repair by NHEJ
Familial breast, ovarian cancer	BRCA1, BRCA2 ^d	breast and ovarian carcinomas	homology-directed repair of dsDNA breaks
Werner	WRN	several cancers	exonuclease and DNA helicase ^e , replication
Bloom	BLM	solid tumors	DNA helicase, replication
Fanconi anemia	(9 genes) ^f	AML, HNSCC	repair of DNA cross-links and ds breaks
Nijmegen break ^g	NBS	mostly lymphomas	processing of dsDNA breaks, NHEJ
Li-Fraumeni	TP53	multiple cancers	DNA damage alarm protein
Li-Fraumeni	CHK2	colon, breast	kinase signaling DNA damage

^aFive distinct MMR genes are transmitted as mutant alleles in the human germ line. Two MMR genes—*MSH2* and *MLH1*—are commonly involved in HNPCC; two other MMR genes—*MSH6* and *PMS2*—are involved in a small number of cases; a fifth gene, *PMS1*, may also be involved in a small number of cases.

^bXeroderma pigmentosum, at least eight distinct genes, seven of which are involved in NER. The seven genes are named XPA through XPG. An eighth gene, *XPV*, encodes DNA polymerase η .

^cAtaxia telangiectasia, small number of cases.

^dMutant germ-line alleles of *BRCA1* and *BRCA2* together may account for 10–20% of identifiable human familial breast cancers.

^eAn exonuclease digests DNA or RNA from one end inward; a DNA helicase unwinds double-stranded DNA molecules.

^fNine genes have been cloned and at least eleven complementation groups have been demonstrated. Complementation group J encodes the BACH1 protein, the partner of BRCA1.

^gThe NBS1 protein (termed nibrin) forms a physical complex with the Rad50 and Mre11 proteins, all of which are involved in repair of dsDNA breaks. The phenotypes of patients with Nijmegen break syndrome are similar but not identical to those suffering from AT.

Adapted in part from B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; and from E.R. Fearon, *Science* 278:1043–1050, 1997.

Obr. 2-14 Lidské dědičné syndromy způsobené dědičnými defekty v reparaci DNA (*Figure 12.1. Weinberg R. A., The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)*)

Jedinci s albinismem nebo XP však nejsou odsouzeni k nádorovému onemocnění. Jestliže je pokožka chráněna před UV, nemusí být vyvoláno.

Při nadměrném působení UV mohou být postiženi i “normální” jedinci. Reparační systém je přetížen a vzniká poškození DNA vedoucí opět k mutacím a ke smrti buněk podobně jako v předchozích případech. Jedinci s větší pigmentací jsou lépe chráněni před škodlivými účinky UV.

Existuje řada environmentálních faktorů a genů, které předurčují nebo chrání jedince před vznikem nádorů. Existuje řada chemikálií buď exogenních (dieta, životní styl, léčiva, polutan-ty) nebo endogenních (hormony, růstové faktory), které nepoškození DNA a nejsou mutagen-ní. Jsou to negenotoxicky působící látky (faktory), které mohou působit jak promoční stimulací proliferace iniciované buňky, tak supresí apoptózy. Jedinci, kteří jsou normálně exponováni a akumulují iniciované buňky (což se normálně děje s přibývajícím věkem), ale kteří jsou exponováni abnormálnímu množství promočních látek v těle v důsledku genetického defektu, jsou označováni jako "promotion-prone".

Vyloučení působení nádorových promotorů může u normálních jedinců snížit vznik nádorů přesto, že dojde k iniciaci. Naopak pravidelná a chronická expozice dostatečnému množství nádorového promotoru zvyšuje riziko vzniku nádoru. Podobně jako existují antiiniciátorové geny a látky, tak existují i geny a látky působící antipromočně.

Kontrolní otázky k tématu:

- Jak je definována mutace?
- Na jaké úrovni mohou mutace vznikat?
- V jakém smyslu může být určitý protein změněn mutací?
- Jaký je rozdíl mezi aktivační a inaktivační mutací?
- Jaké jsou 2 hlavní mechanismy vzniku mutací v buňkách?
- Poruchy jakých typů reparační DNA jsou zásadní při vývoji nádorů?
- Jakou úlohu hrají při vzniku mutací DNA polymerázy?
- Jak vzniká genetická nestabilita a které mechanismy k ní přispívají?
- Co jsou to tzv. „gatekeeper“ a „caretaker“ geny?
- Kde se nacházejí hlavní kontrolní body buněčného cyklu? Vyjmenuj nejdůležitější molekuly spojené s jejich regulací.
- Jakou roli hraje v karcinogenezi apoptóza?
- Co jsou to mikrosatelity a jakou úlohu hrají v nádorech?
- Co je to genová amplifikace a její význam.
- Co je aneuploidie a co k ní přispívá?
- Jakou roli hraje ztráta heterozygotnosti u nádorového onemocnění?
- Vysvětlete pojem klonální selektivita a jeho význam v rozvoji nádoru?
- Které dva základní vlivy se uplatňují při vzniku a rozvoji nádorového onemocnění?
- Charakterizujte lidské dědičné syndromy predisponující k nádorům způsobeným UV zářením. - Jaký je mechanismus vzniku nádorů u takto postižených jedinců?
- V jakých buňkách se nacházejí mutace v případě dědičných nádorů?

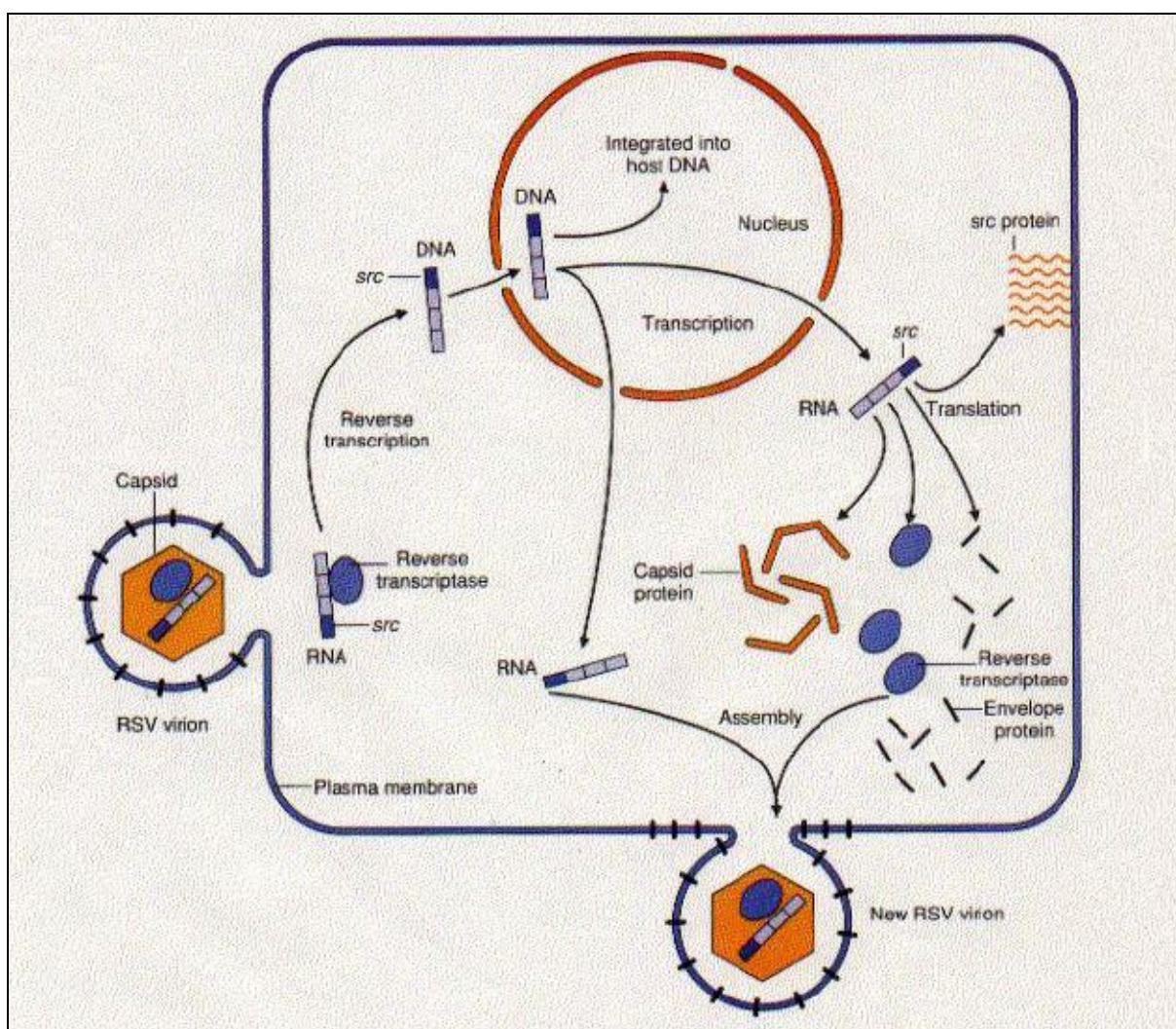
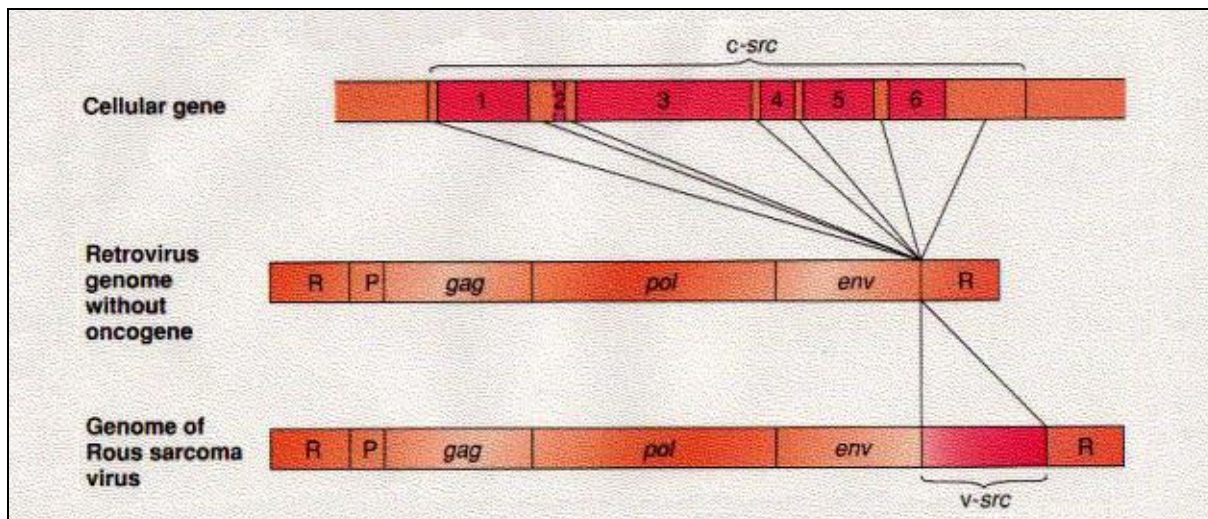
3. MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

Během posledních desítek let bylo věnováno velké úsilí poznání základních molekulárních mechanismů vzniku nádoru. Karcinogeneze zahrnuje postupnou modifikaci řady genů, kde každá další změna genu vytváří další fenotypovou aberaci. Existuje řada důkazů pro **pri-mární úlohu poškození DNA v maligní transformaci**. Interakce řady karcinogenů s DNA, souvislost karyotypových abnormalit s řadou nádorů a dědičnost maligního fenotypu svědčí o **mutační etiologii maligní transformace**.

Postupně vznikl koncept společného mechanismu maligní transformace u různých nádorů. Objev genů důležitých v tomto procesu umožňuje charakterizovat jejich úlohu u dědičných nádorů, popsat řadu genetických aberací nutných pro maligní transformaci a objasňovat molekulární mechanismy karcinogeneze. Intenzivní studie těchto genů poskytují také nový pohled na kontrolu buněčného růstu a diferenciaci.

3.1 PROTOONKOGENY

Byla již objevena **řada genů odpovědných za vývoj rakoviny**. Na porozumění maligní transformaci má zásluhu zejména široká škála dřívějších prací s **onkogenními viry**. První tzv. **onkogen s r c** (sarcoma) byl izolován v roce 1970 z viru Rousova sarkomu u kuřat a označen v-src (virus). **Virus Rousova sarkomu** má dvě rozdílné části: část **kódující proteiny odpovědné za replikaci viru** a část **kódující s r c gen** umožňující vznik nádorů *in vivo* u kuřat. Normální kuřecí genom obsahuje příbuzný gen c-src (cellular) (obr. 3-1). Později se ukázalo, že *řada retrovirů je onkogenních*. Bylo též prokázáno, že src není jednoznačně retrovirový gen, ale spíše téměř přesná kopie genu nalezeného ve všech kuřecích buňkách. Tento normální gen, tzv. **protoonkogen** je v retroviru modifikován (aktivován) tak, že působí po přenesení do buněk nádor (obr. 3-2). Objev s onkogeny příbuzných sekvencí v eukaryotickém genomu stimuloval úsilí transformovat normální buňky DNA stejným způsobem, jaký užívají retroviry. V řadě laboratoří byly transformovány myší fibroblasty DNA s různých přirozených nebo chemicky indukovaných nádorů. Ukázalo se, že maligní charakter transformovaných buněk může být přenášen defektem přítomným v DNA z nádorů. Pozitivních je však v transformačních pokusech asi jen 20 % nádorových vzorků.



Obr. 3-1 Virus Rousova sarkomu a jeho životní cyklus (zdroj: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RSV.html>)

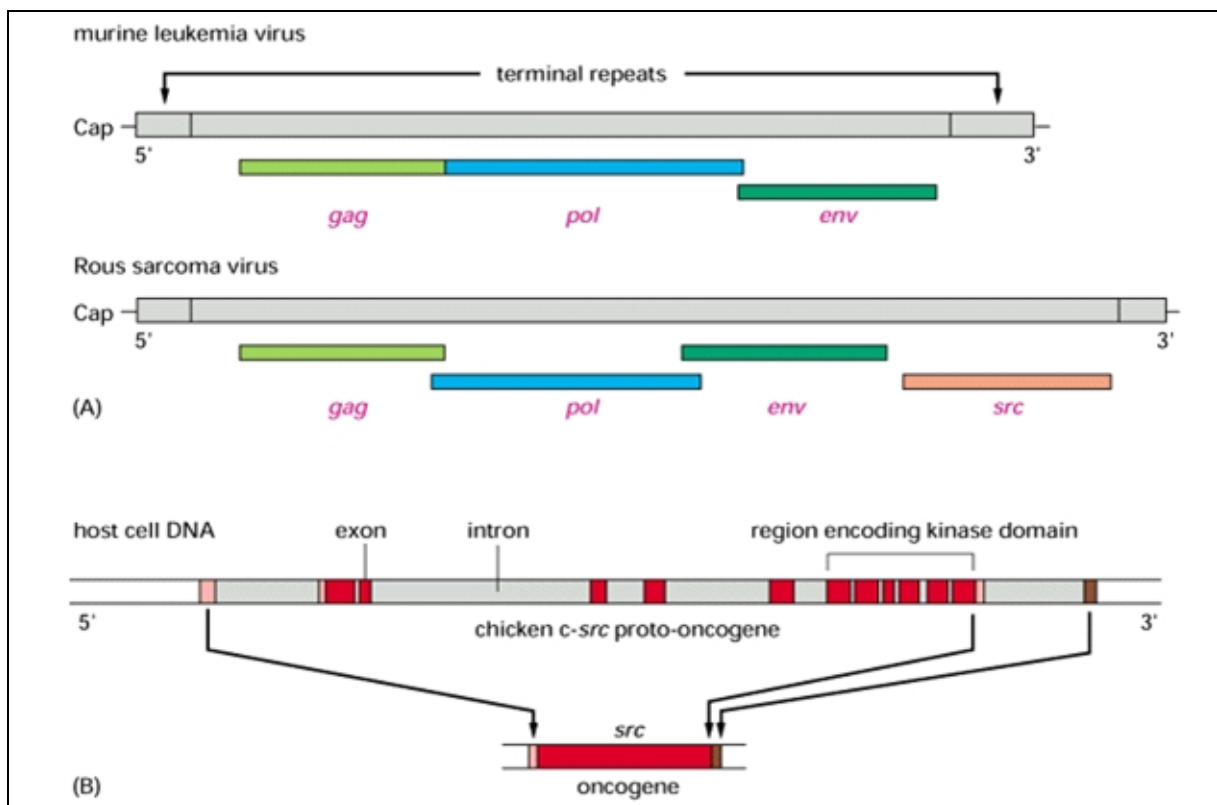
Obr. 3-1 Virus Rousova sarkomu a jeho životní cyklus

The Rous sarcoma virus has only 4 genes (bottom panel):

- *gag*, which encodes the **capsid** protein
- *pol*, which encodes the **reverse transcriptase**
- *env*, which encodes the **envelope protein**
- *src*, which encodes a **tyrosine kinase**, an enzyme that attaches **phosphate groups** to Tyr residues on a variety of host cell proteins.

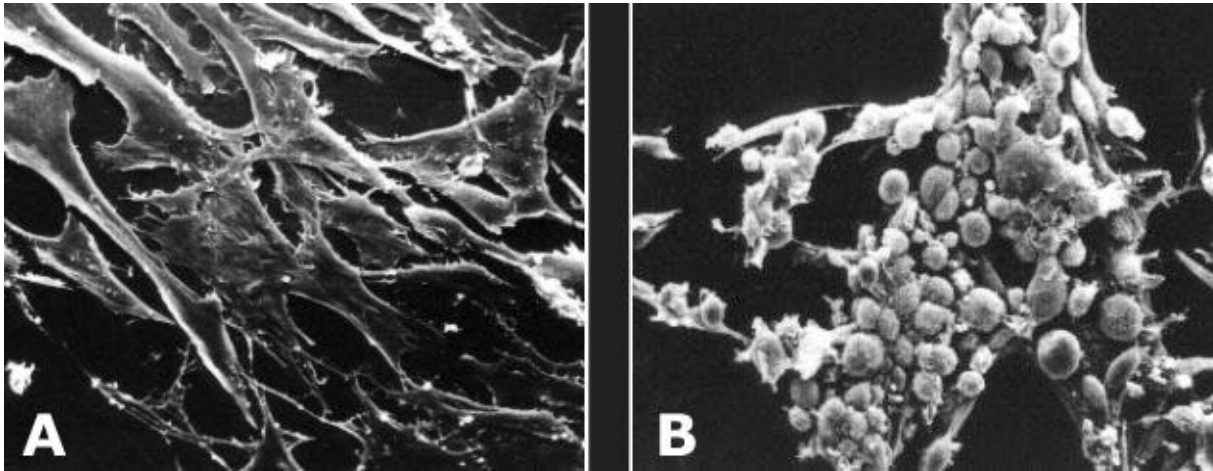
In addition, each end of the RNA molecule has a set of repeated sequences of nucleotides ("R" and "P") that perform at least two important functions:

- they enable the DNA copies of RSV to insert into the host's DNA and
- they act as **enhancers**, causing the host nucleus to transcribe the RSV genes at a rapid rate.



Obr. 3-2 Srovnání viru myší leukemie, viru Rousova sarkomu a inserce c-src do hostitelské DNA

(zdroj: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RSV.html>)



Obr. 3-3 Normální (a) a transformované (b) myší fibroblasty (zdroj:

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CancerCellsInCulture.html>)

Protoonkogeny byly v průběhu evoluce dobře konzervovány a jejich přítomnost v normálních buňkách všech vyšších organismů předpokládá, že **mají základní význam v buněčné fyziologii**. Kódují proteiny, které hrají klíčovou úlohu na různých úrovních integrace mitogenních signálů nesených růstovými faktory a hormony a hrají důležitou úlohu v regulaci růstu, diferenciace a apoptózy normálních buněk. Jsou-li modifikovány, ať na strukturální nebo kontrolní úrovni, začnou se chovat jako **onkogeny** a podporují vývoj nádoru. Tak je mnoho onkogenů aktivovanými homology protoonkogenů, které existují v normálních buňkách. Uměle navozená mutace v onkogenu způsobuje deregulaci buněčného růstu, immortalizaci a transformaci *in vitro* a vývoj nádorů *in vivo*. Při vzniku nádorů u zvířat a u člověka se uplatňují stejné mechanismy. Tak je možno transformovat lidskými onkogeny živočišné buňky a na nich testovat látky schopné inhibovat expresi nádorového fenotypu.

Protoonkogen lze tedy definovat jako normální buněčný gen zahrnutý v regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy, který, je-li aktivován, může přispívat k vývoji malignity.

Jak se rozvíjelo porozumění cest přenosu (transdukce) signálů, bylo jasné, že tyto geny mohou zahrnovat abnormality na každém stupni tohoto procesu. Protoonkogen se stane transformovaným buď po změně v sekvenci nukleotidů nebo změně jeho transkripce a exprese, takže buňka produkuje abnormální protein se změněnými biochemickými vlastnostmi či exprimuje abnormálně vysoké množství proteinu. K onkogenní aktivaci dochází většinou: **bodovou mutací, chromozomální přestavbou nebo genovou amplifikací**.

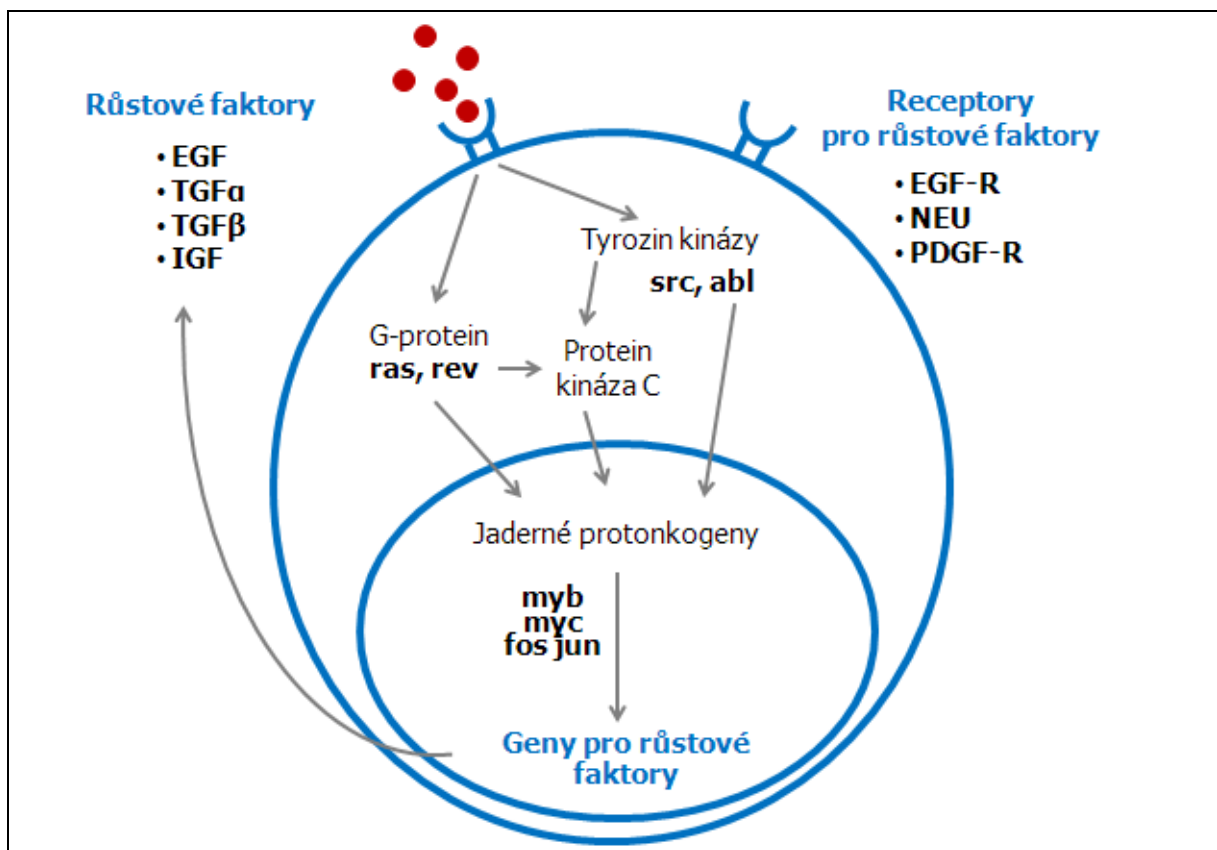
Protoonkogeny lze dělit

- a) **podle lokalizace jejich produktu** na ty, které kódují (obr. 3-4):

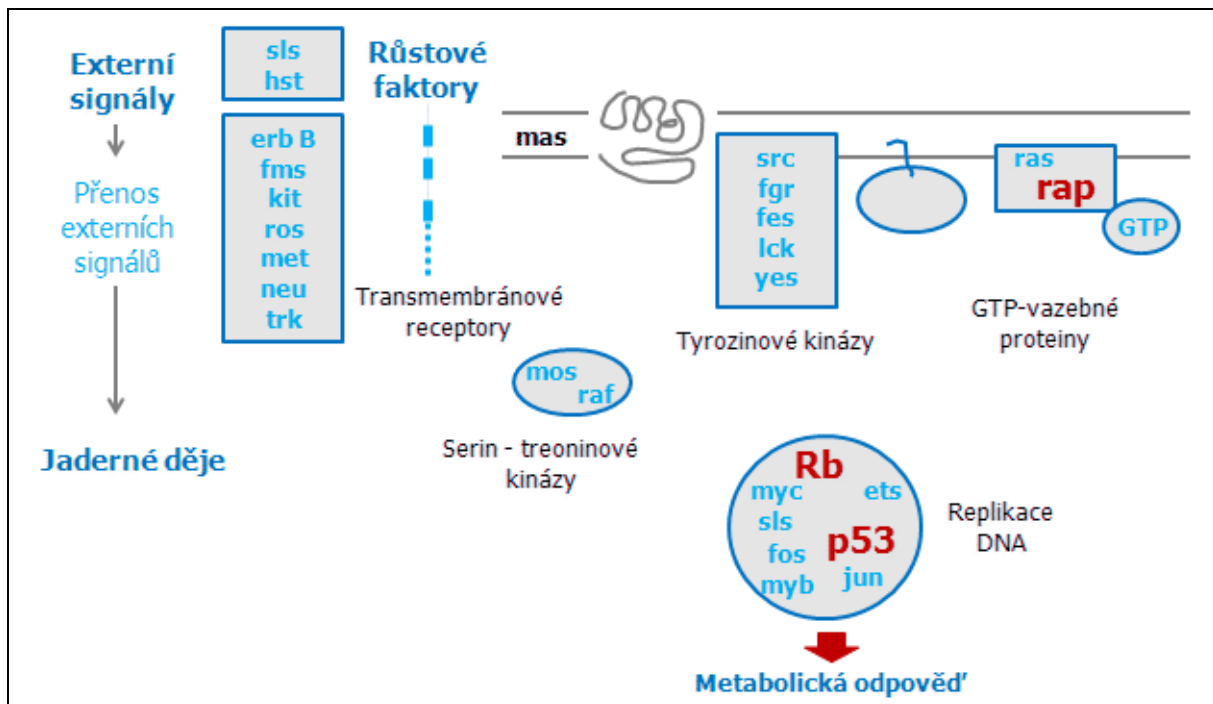
- sekreční proteiny,
- proteiny buněčného povrchu,
- cytoplazmatické proteiny,
- jaderné proteiny,

b) podle funkce jejich produktů na (obr. 3-5):

- růstové faktory,
- receptory pro růstové faktory,
- cytoplazmatické proteiny – protein kinázy a G-proteiny,
- jaderné proteiny.



Obr. 3-4 Přenos signálů a růstová regulace v eukaryotických buňkách. Jsou znázorněny reprezentativní protoonkogeny v signálních dráhách. (podle Miller D.M. et al., Amer J Med Sci 1990 : 59)



Obr. 3-5 Onkogeny a nádorově supresorové geny. *Hlavní funkční skupiny onkogenních proteinů (bledě modrá) a jejich pravděpodobná vnitrobuněčná lokalizace. Nádorově supresorové geny jsou označeny červeně. (podle Rey I. et al., Fundam Clin Pharmacol 1990 : 401)*

Protoonkogeny regulují replikaci DNA a přenosy signálů přes své různé proteinové produkty. Známé produkty onko- a protoonkogenů spadají do několika funkčních skupin a jsou označovány třemi písmeny (příklady uvedeny v závorkách):

- růstové faktory (sis, hst)
- receptory pro růstové faktory (erb B, fms, kit) a tyrozin kinázy (src, fgr, fcs)
- na membránu vázané analogy proteinů vážících guanosin trifosfát - GTP (ras)
- cytoplazmatické serinové a treoninové kinázy (mil, mos, raf)
- jaderné proteiny fungující jako aktivátory transkripce (myb, myc, fos, jun)

Členové jednotlivých tříd vykazují **zvýšenou expresi u řady lidských nádorů** a tato exprese pak přispívá k řadě nádorových vlastností, jako jsou zvýšená buněčná proliferace, invaze a metastázy.

3.2 RŮSTOVÁ STIMULACE A INHIBICE

Mnoho protoonkogenů kóduje proteiny mající vztah k **růstově stimulačním signálům** přecházejících z vnějšího prostředí do nitra buňky. *Růst buňky je deregulovaný, jestliže mutace v protoonkogenu způsobí trvalou aktivaci růstově stimulační dráhy.* Toto souvisí se signály,

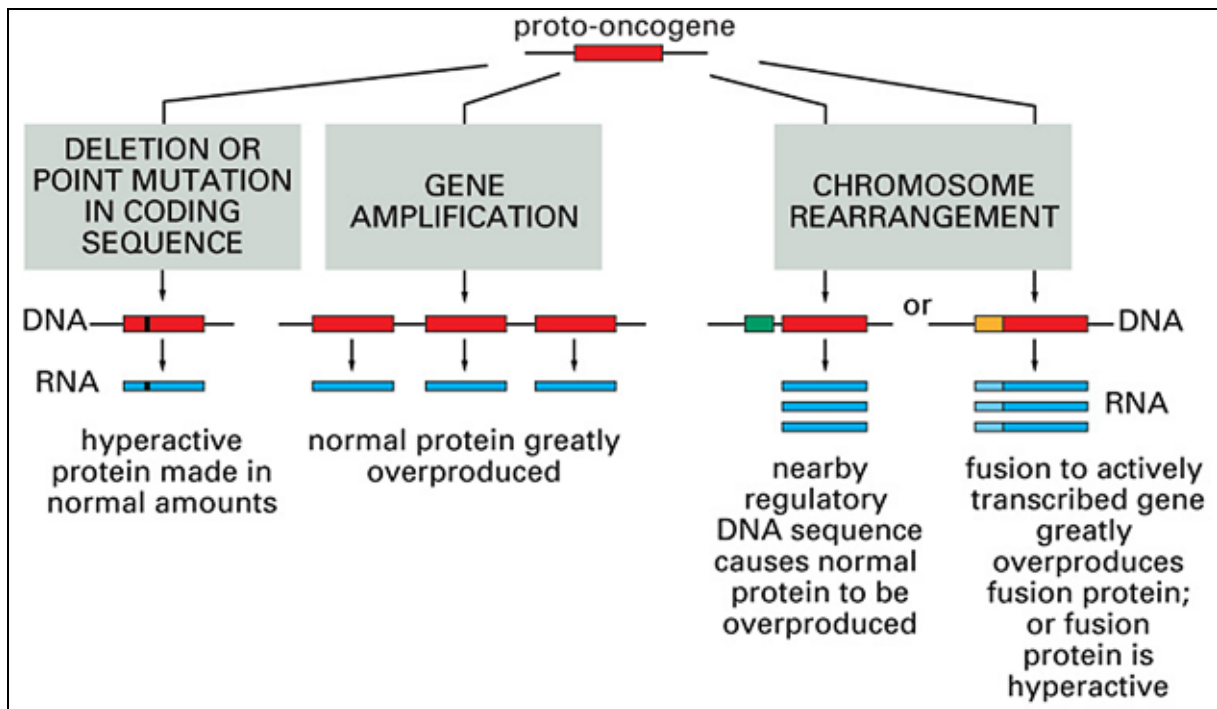
kteře si navzájem předávají buňky v tkáních. Jedny buňky uvolňují růstové faktory, (glyko) proteiny, které se pohybují mezi buňkami a po vazbě na vhodný receptor na povrchu jiných buněk vyvolávají kaskádu dějů, které přenáší tento signál přes cytoplasmu až do jádra. V jádře pak proteiny nazývané transkripční faktory odpovídají tím, že aktivují řadu genů, které pomáhají buňce procházet buněčným cyklem. Podobně funguje i přenos růstově inhibičního signálu.

*Stimulace buněk ve fázi G_0 po působení růstových faktorů nebo hormonů vede k vzrůstu vnitrobuněčného pH, volného Ca^{2+} a aktivaci řady protein kináz. Je to částečně výsledkem rozkladu PIP_2 (fosfoinositoldifosfát) a otevření Ca^{2+} kanálů indukované aktivitou tyrozinkinázy spjaté s receptorem. Pak dochází k velkému vzrůstu aktivity protein kináz závislých na cAMP. Výsledkem aktivace této kaskády je přechodná exprese (během několika minut) některých produktů jaderných protoonkogenů jako *myc*, *fos* a *jun*, které přímo ovlivňují transkripci.*

Je známo, že vývoj a udržení jistých typů lidských nádorů jsou přísně závislé na přítomnosti specifických růstových faktorů. Jedna z protinádorových strategií tak sleduje identifikaci růstových faktorů a hledání jejich antagonistů. Např. buňky lidského melanomu exprimují „platelet-derived growth factor – like“ (PDGF) protein, který stimuluje inkorporaci 3H -tymidinu (ukazatel syntézy DNA) do lidských fibroblastů. Jiné tzv. „growth-like“ faktory s transformující aktivitou jsou např. epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor (TFG) alfa, fibroblastový růstový faktor (FGF) atd.

Změny receptorů pro růstové faktory jsou jinou cestou aktivace onkogenů. Tak v-erb-B je změněná forma receptoru pro EGF a v-fms pro kolonie stimulující faktor (CSF-1). Asi polovina známých produktů onkogenů jsou protein kinázy.

Zmíněné geny mohou být **aktivovány různým způsobem** (obr. 3-6). Geny pro růstové faktory mohou být aktivovány buď mutacemi, které vyústí ve zvýšenou expresi nebo na sekreční úrovni. Receptory a cytoplazmatické signálně transdukční proteiny jsou většinou aktivovány strukturálními mutacemi, které dovolují vývoj růstové autonomie. K maligní transformaci je potřeba koordinovaná změna v řadě zásadních genů. Ačkoliv např. zvýšená exprese H-ras je schopná zvýšit buněčnou proliferaci, není tento gen sám schopen indukovat maligní transformaci.



Obr. 3-6 Tři způsoby aktivace a změny protoonkogenu v onkogen (*Figure 23–27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)

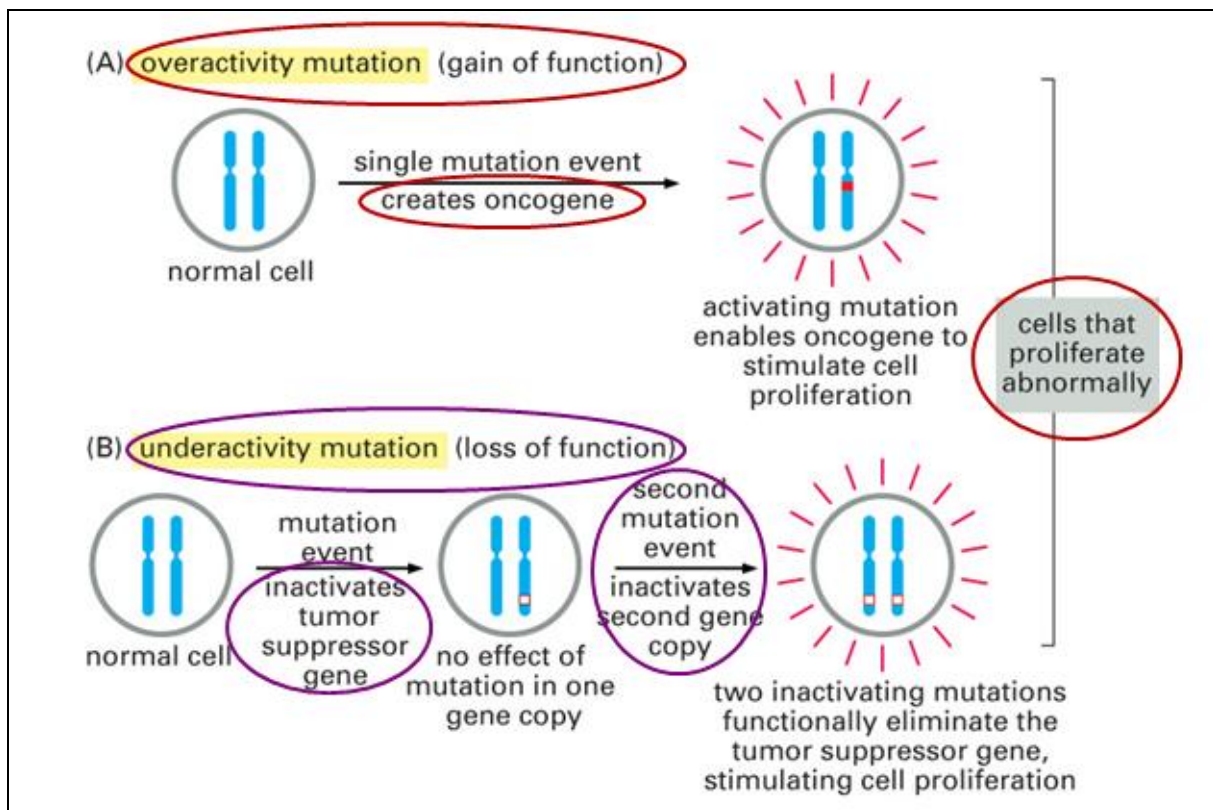
Po účinku polypeptidových růstových faktorů nebo steroidních hormonů dochází k expresi **jaderných protoonkogenů** jako jsou c-myc, c-fos, c-jun, c-myb. Jsou to tzv. **geny rané odpovědi (immediate early genes)** a jejich produkty jsou proteiny vážící se na DNA a fungující jako tzv. **transkripční faktory**, které regulují transkripci pozdních genů.

Jaderné protoonkogeny jsou většinou aktivovány zvýšenou expresí, která může být indukována různými způsoby: translokací (Burkitt lymphoma), inzercí retroviru (spíše v experimentálních systémech) a amplifikací genů. Amplifikace – přítomnost více kopií genu - je obecným mechanismem aktivace jaderných protoonkogenů a byla pozorována u řady nádorů. Přítomnost nebo absence amplifikace c-myc má např. prognostickou hodnotou u malých plicních nádorů. U neuroblastomu určuje amplifikace n-myc agresivitu maligního fenotypu.

Mutace protoonkogenu vedoucí k transformaci můžeme funkčně rozdělit do dvou tříd (obr. 3-7):

- získání funkce (gain-of-function)**, kde aktivita protoonkogenu vzrůstá a má za následek abnormální nebo nadměrnou růstovou stimulaci;
- ztráta funkce (loss-of-function)**, která vede k inaktivaci represorové složky, která normálně negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci (nádorově supresorové geny).

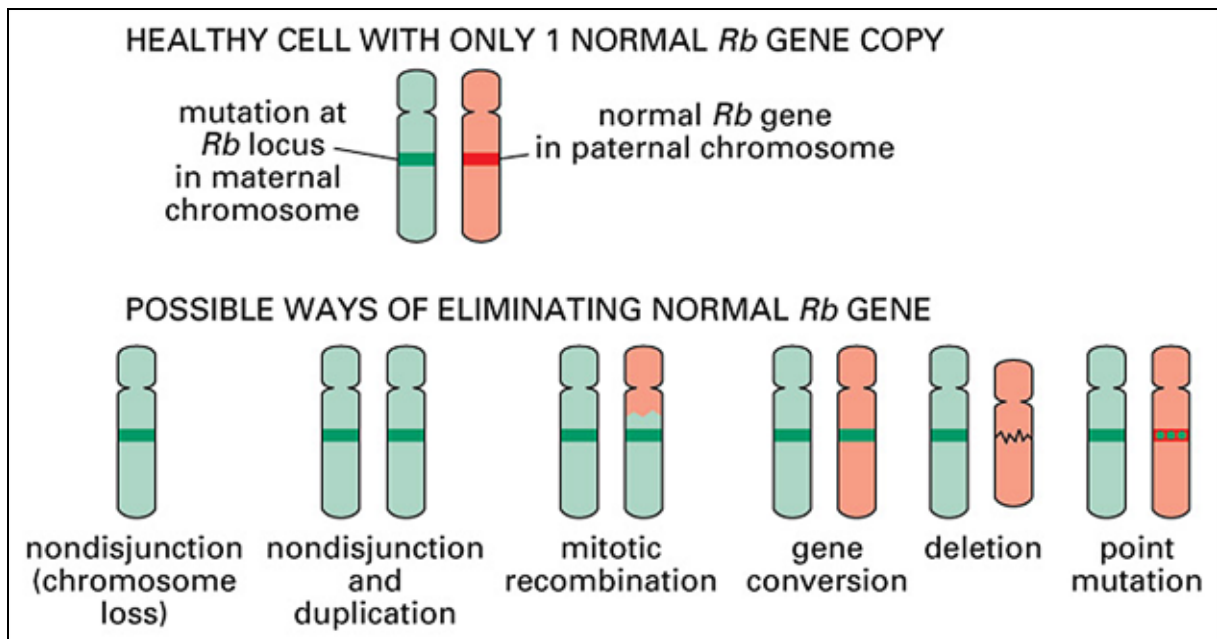
V obou případech je **výsledkem nadměrná stimulace růstu**. Produkty onkogenů pak přeměňují cestu mitogenního signálu tak, že udělí buňce konstitutivní růstový stimul.



Obr. 3-7 Geny kritické pro vývoj nádorů spadají do dvou jasně rozlišitelných kategorií: dominantní a recesivní (*Figure 23–24. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

3.3 NÁDOROVĚ SUPRESOROVÉ GENY

Buněčné dělení je stimulováno řadou signálů, jako jsou růstové faktory, hormony apod., ale je ovlivňováno i **negativní regulací**. Existuje řada genů, které působí proti funkci onkogenů a hrají úlohu v zástavě abnormální buněčné proliferace. Jsou to tzv. **nádorově supresorové geny**. Předpokládá se, že v některých případech je to právě ztráta funkce těchto genů, co způsobuje vývoj rakoviny. Např. při vývoji retinoblastomu po ztrátě obou alel genu RB na 13 chromozómu. Produkt genu reguluje expresi specifických genů zahrnutých v mitogenezi (obr. 3-8).

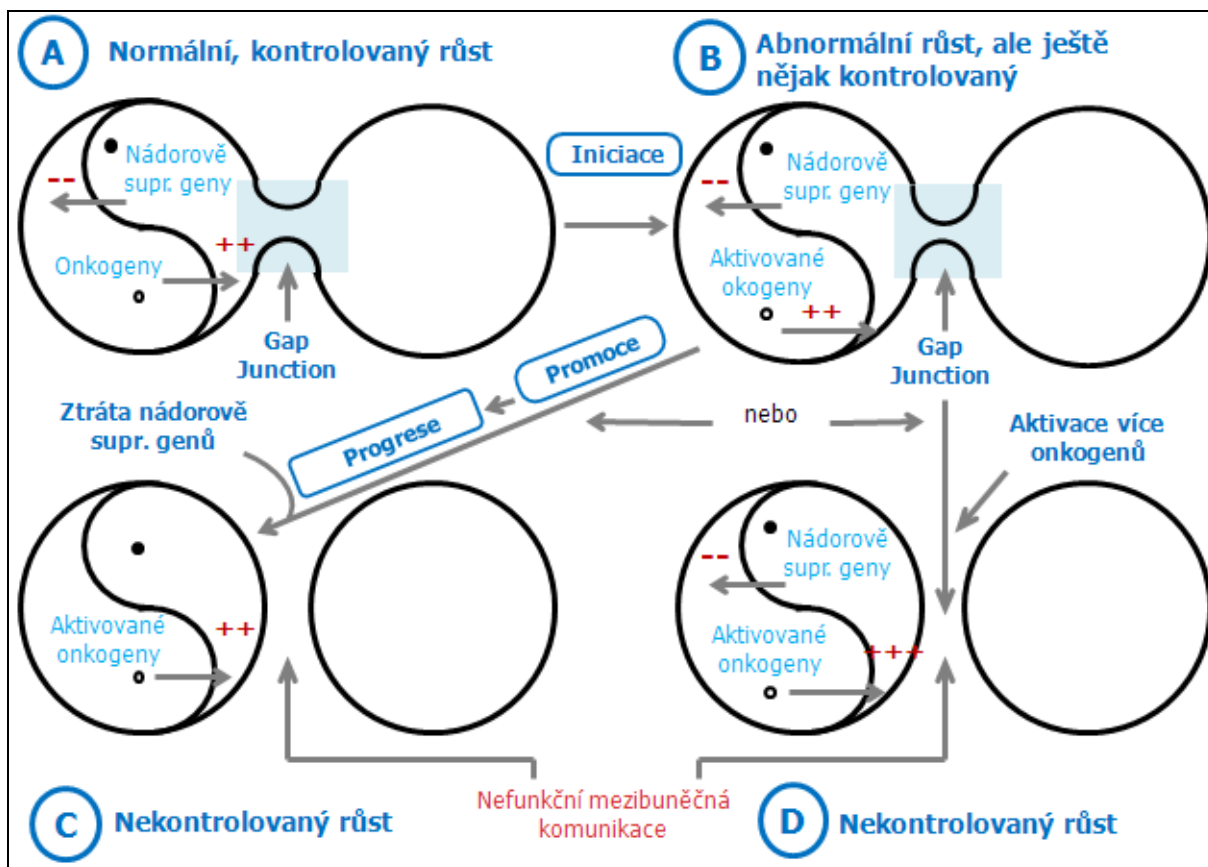


Obr. 3-8 Šest způsobů ztráty zbývající dobré kopie nádorově supresorového genu (*Figure 23–29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)

Podobně jako růstové faktory podporují buněčný růst, na jeho útlumu se podílejí **antiproliferačně působící molekuly**, které představují významné téma zejména pro protinádorový výzkum. Např. TGF beta je z rodiny dimerických proteinů, které kontrolují růst a diferenciaci řady buněčných typů a mohou mít jak růstově podpůrnou, tak růstově inhibiční funkci v závislosti na buněčném typu a podmínkách. TGF beta stimuluje proliferaci buněk mesenchymálního původu indukcí exprese c-sis protoonkogenu, který kóduje PDGF-like protein. Naopak inhibuje proliferaci buněk epitelálního původu, endoteliálních buněk, B lymfocytů a tymocytů a u řady buněčných typů indukuje diferenciaci. U endoteliálních buněk ovlivněných TGF beta je redukována exprese EGF receptoru s vysokou afinitou a tak buňka není schopna odpovídat na mitogenní signál EGF. Zatímco buňky retiny jsou normálně citlivé k antimitogennímu působení TGF beta, buňky nádoru (retinoblastomu) neexprimují TGF beta receptory a tak unikají negativní kontrole. Dalším endogenními antiproliferačním proteinem je např. interferon (IFN) gamma.

3.4 VÝZNAM PRO TERAPII

Studie různých protoonkogenů ukazují, jak různé genetické změny mohou vyústit v expresi aberantních růstových signálů nebo, v případě nádorově supresorových genů, v utlumení růstově inhibičních signálů (obr. 3-9).



Obr. 3-9 Proces vzniku nekontrolovaného růstu buňky

Jak jsou objasňovány molekulární mechanismy přenosu signálu mezi mimobuněčnými a vnitrobuněčnými doménami receptorů, děje obsazení receptoru související s produkcí raných růstových signálů a cesty, kterými tyto signály indukují expresi regulačních genů, je jasné, že může být změněn každý krok v kaskádě proliferačního signálu a může přispět k expresi transformovaného fenotypu. Proto také **každý krok představuje možný cíl terapeutického působení**. Nádorově supresorové geny představují zvláště slibný přístup k obnovení normální kontroly buněčné proliferace. Cílem budoucí chemoterapie je udržet expresi těchto genů nebo nahradit jejich defektní funkci.

Kontrolní otázky k tématu:

- Co jsou to protoonkogeny a jak z nich vznikají onkogeny?
- Jak fungují nádorově supresorové geny?
- Jaké odvětví výzkumu přispělo k objevu onkogenů?
- Co jsou to retroviry?
- Dle jakých kritérií dělíme protoonkogeny?
- Jaká je funkce jaderných protoonkogenů?

- Jakými mechanismy mohou být protoonkogeny aktivovány na onkogeny?
- Jaké základní mutace protoonkogenů rozeznáváme a co je jejich výsledkem?
- Jakým způsobem může dojít ke ztrátě funkce nádorově supresorového genu?
- Jaké jsou v souhrnu hlavní poznatky o molekulárně genetické podstatě nádorového onemocnění?

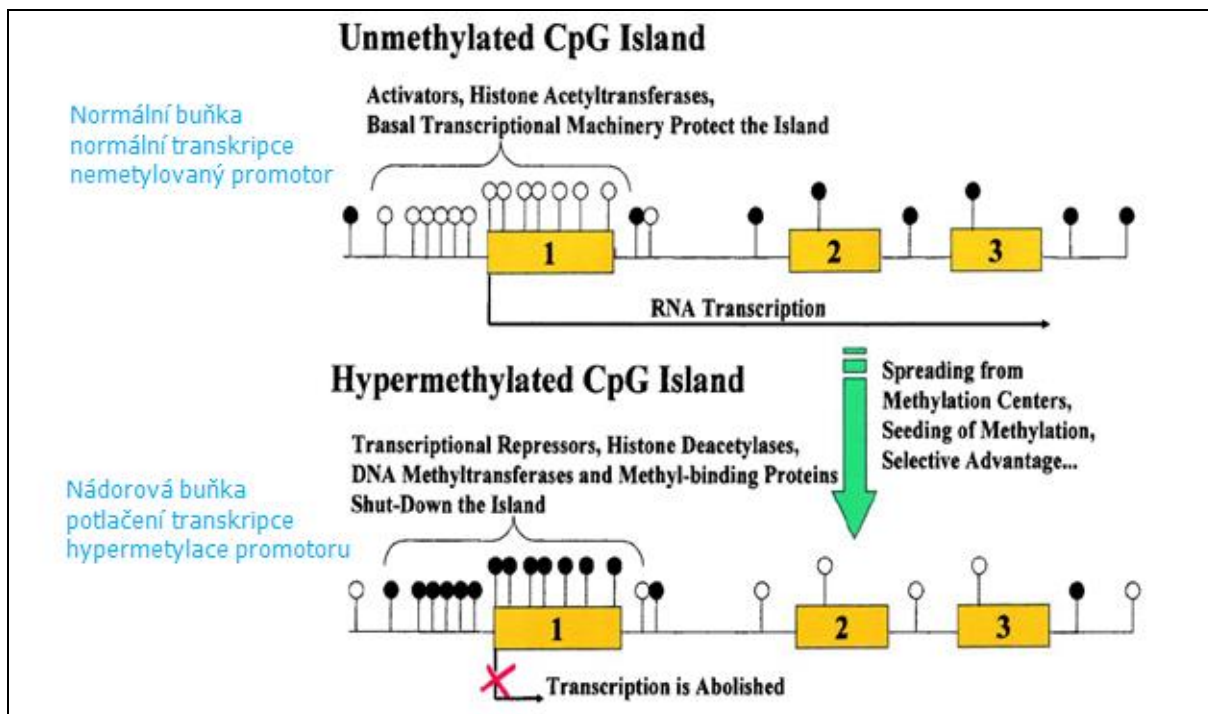
4. EPIGENETICKÉ ZMĚNY V KARCINOGENEZI

Jako **epigenetické** jsou označovány **dědičné změny v genové expresi** bez změny v sekvenci DNA.

4.1 METYLACE DNA

Savčí buňky mají schopnost epigeneticky modifikovat svůj genom prostřednictvím kovalentního přidávání metylových skupin do 5 pozice na cytosinovém kruhu v CpG dinukleotidu za účasti enzymu metyltransferázy. Epigenetické změny hrají významnou úlohu v karcinogenezi.

Přibližně 70 % CpG zbytků v savčím genomu je metylováno. Distribuce je ale nerovnoměrná a většina genomu je chudá na CpG. Ty jsou nahromaděny buď v rozsáhlých repetitivních sekvencích (satelity, centromerické repetice) nebo v krátkých úsecích (asi 1 kb) bohatých na CG, tzv. „CpG islands“ (obr. 4.1). Tyto úseky jsou normálně nemetylované a tak je umožněna transkripce genů za přítomnosti příslušného transkripčního faktoru. Repetitivní genomické sekvence roztroušené mezi zbytkem genomu jsou naopak silně metylovány a hrají asi roli ve vývoji nekódujících oblastí DNA a v utlumení endoparazitických a retrovirových transpozónů.



Obr. 4-1 Typické CpG ostrůvky nádorově supresorového genu v normální a nádorové buňce

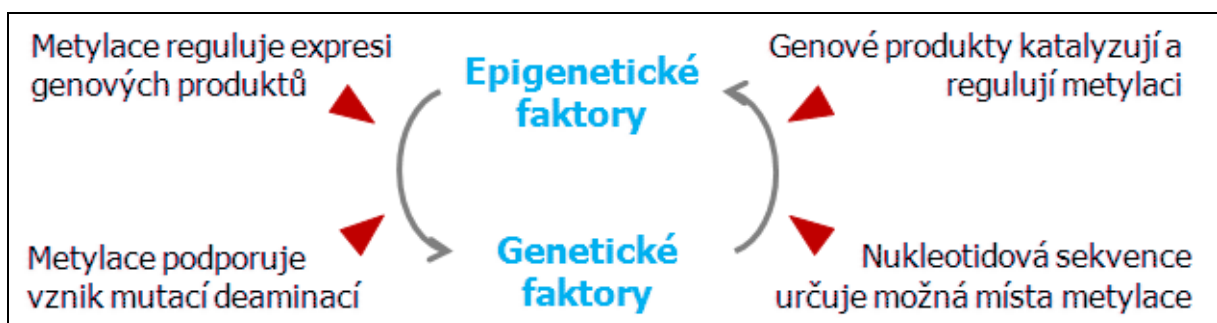
Metylace cytosinových zbytků je spojena s navázáním specifických proteinů (methyl-binding domain proteins), aktivací histon deacetyláz (HDAC) a histon metyltransferáz, modifikací histonů, kondenzací chromatinu a transkripční inaktivací příslušného genu.

Souhra metylace CpG islands pomocí metylačních a demetylačních enzymů je jednou z částí epigenetické kontroly zárodečné a tkáňově specifické genové exprese.

Metylace DNA hraje zásadní úlohu v normálním vývoji, v inaktivaci chromozómu X a supresi tzv. parazitických sekvencí DNA. Je nástrojem, který umožňuje zapínat a vypínat geny na správném místě a ve správné době. Metylace DNA však může také způsobit zvýšení mutací a dědičně tlumí geny, jejichž promotory jsou asociovány s tzv. „CpG islands“ a které kontroly buněčnou proliferaci. Zatím neznámé mechanismy zabraňují *de novo* metylaci těchto promotorů u normálních buněk.

Vědecké studie odhalily spojitost mezi metylací DNA a genovou expresí. Využívá se k tomu **inhibitoru metylace 5-azacytidinu**. Působení na řadu buněčných linií ukázalo, že mnoho genů může být reaktivováno, např. metylačně specifická PCR. Primery rozlišují metylovanou a nemetylovanou DNA v nádorových biopsiích nebo tekutině. Další metodou je v současnosti imunoprecipitace purifikované metylované DNA, umožňující detekovat metylační profil DNA celého genomu (DNA methylom).

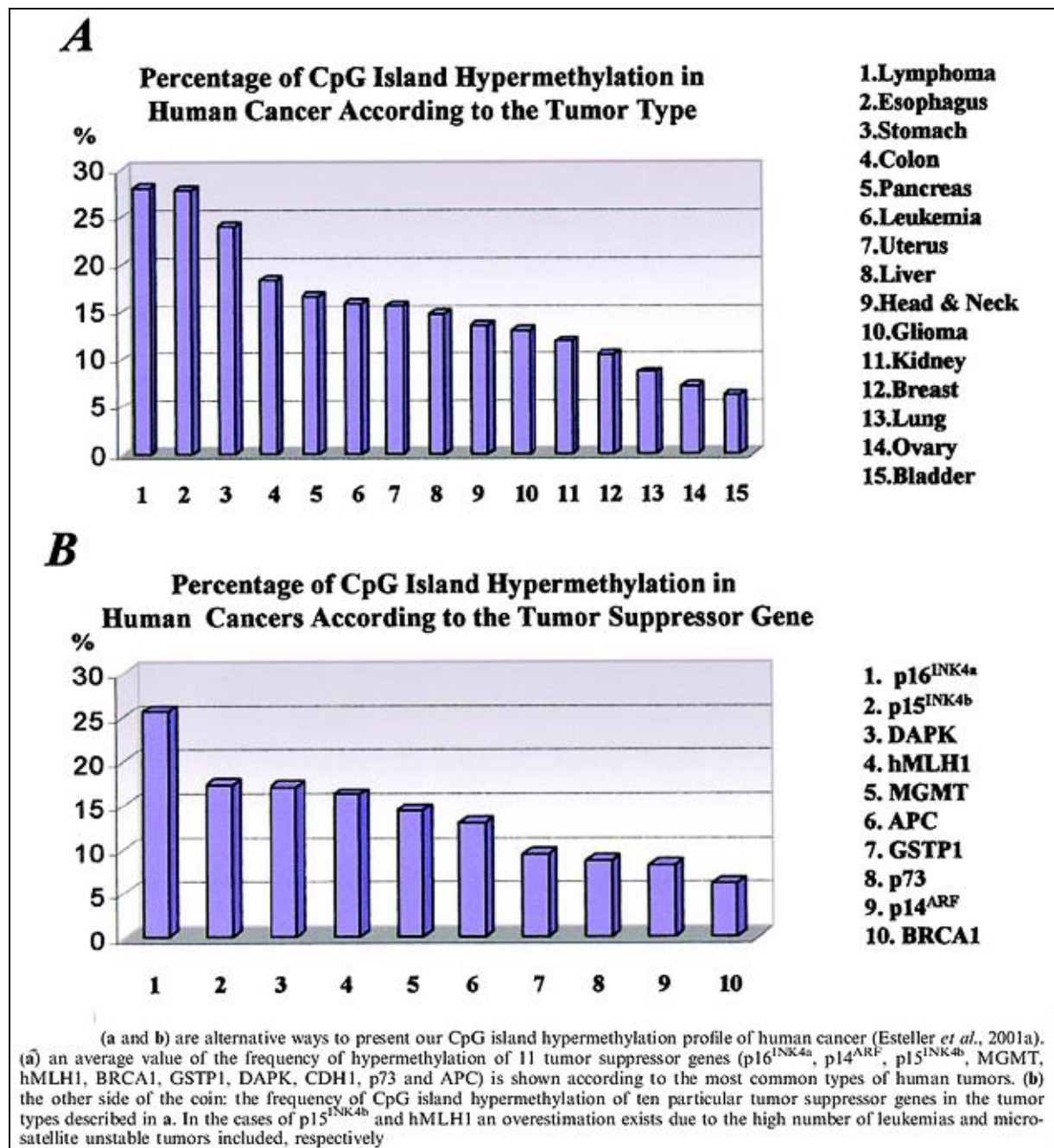
Hypo- nebo hypermetylace DNA (obsah 5-metylcytosinu) patří mezi negenotoxické mechanismy karcinogeneze. Způsobuje epigenetické změny, tj. změny exprese normálních genů (včetně nádorově supresorových genů) (obr. 4-2). Detailní studie účinků metylace DNA na promoční aktivitu odhalilo, že metylace DNA je účinným supresorem genové aktivity zejména *nádorově supresorových genů*. Klíčovým mechanismem je aberantní metylace DNA v promotorové oblasti.



Obr. 4-2 Interakce genetických a epigenetických faktorů

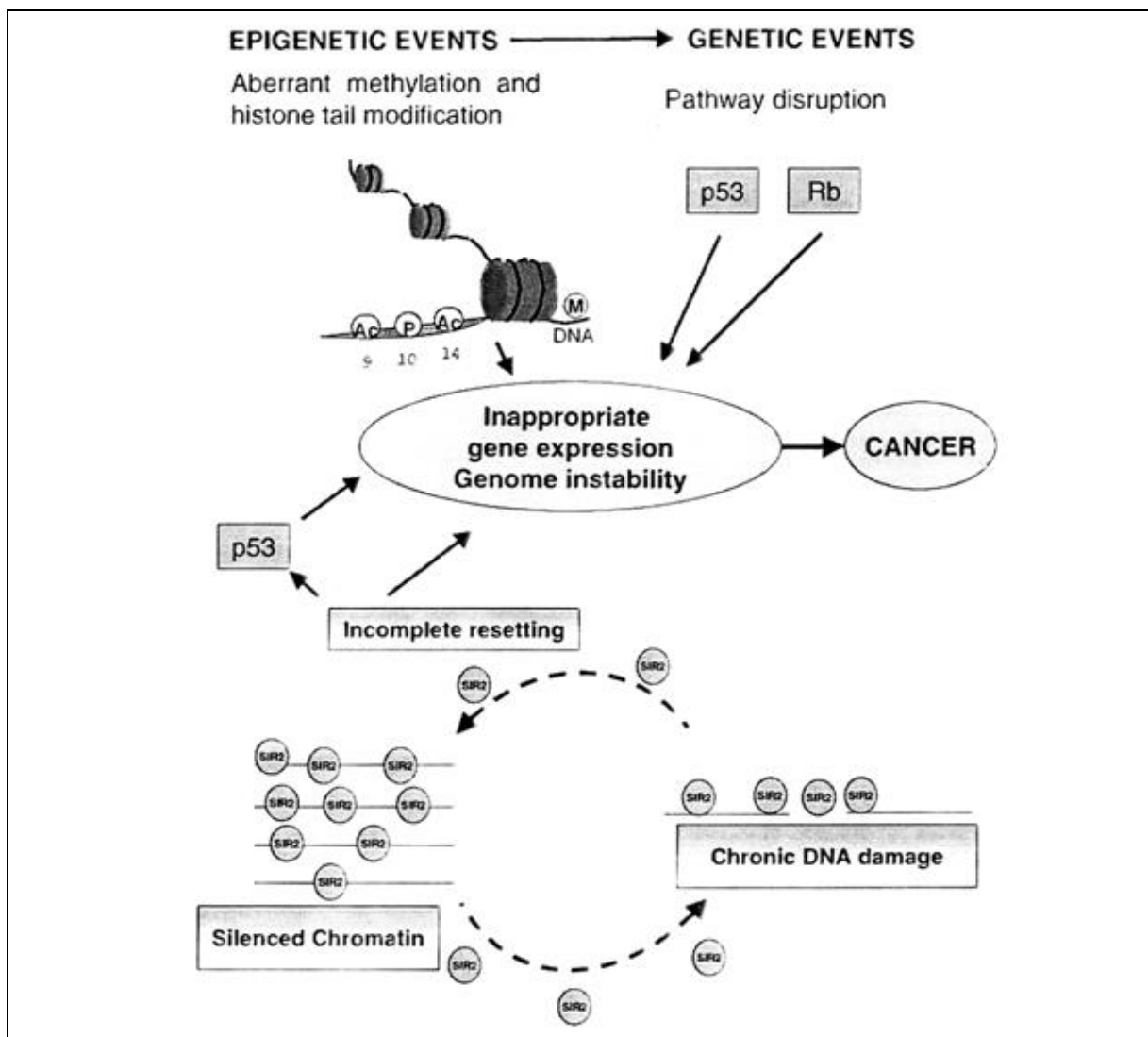
Více než 30 let je známo, že **metylační struktura v nádorových buňkách se liší od normálních buněk**. Globální hypometylace genomu je doprovázena místně specifickou hypermetylací, jejímiž cílovými místy jsou ostrůvky CpG. Hypermetylace promotorů pro nádorově

supresorové geny v těchto CpG ostrůvcích je doprovázena jejich utlumením a růstovou výhodou pro tyto buňky (obr. 4-3). Řada důkazů podporuje příčinnou roli metylace DNA v karcinogenezi. Redukovaná metylace DNA tlumí tvorbu střevních polypů u tzv. $Apc^{min/+}$ myši. U jednostranného retinoblastomu byla prokázána metylace promotorového úseku genu Rb. Studie sporadických případů kolorektálních karcinomů vykazujících nestabilitu mikrosatelitů ukazují vysokou frekvenci hypermethylace promotoru tzv. „mismatch repair“ (MMR) genu. Působení inhibitoru metylace může funkci tohoto genu obnovit. Existují příklady toho, že jedna kopie nádorově supresorového genu je divokého typu, ale je tlumena hypermethylací, zatímco druhá kopie je nebo není mutovaná.



Obr. 4-3 Procento hypermetylace CpG 11 nádorově supresorových genů: (A) u různých typů lidských nádorů; (B) u 10 různých nádorově supresorových genů (*Esteller M., Cancer Res 2001 : 3225*)

Metylace DNA může též usnadňovat mutagenezi, protože 5MeC může spontánně deaminovat na thymin (hypermutabilita). Hypometylace DNA je spojena se zvýšenou genovou expresí (např. zvýšená exprese mutovaného H-ras je spojena s nádorovou transformací). CpG místa v oblastech kódujících p53 jsou u všech studovaných lidských tkání metylována a přispívají asi k 50 % všech inaktivujících mutací u nádorů kolonu a 25 % u nádorů obecně. Výzkum metylace DNA umožňuje odhalovat změny v expresi genů, buněčné proliferaci, mutacích, chromatinových aberacích i inaktivace nádorově supresorových genů a uvádět je do souvislosti s procesem karcinogeneze (obr. 4-4).



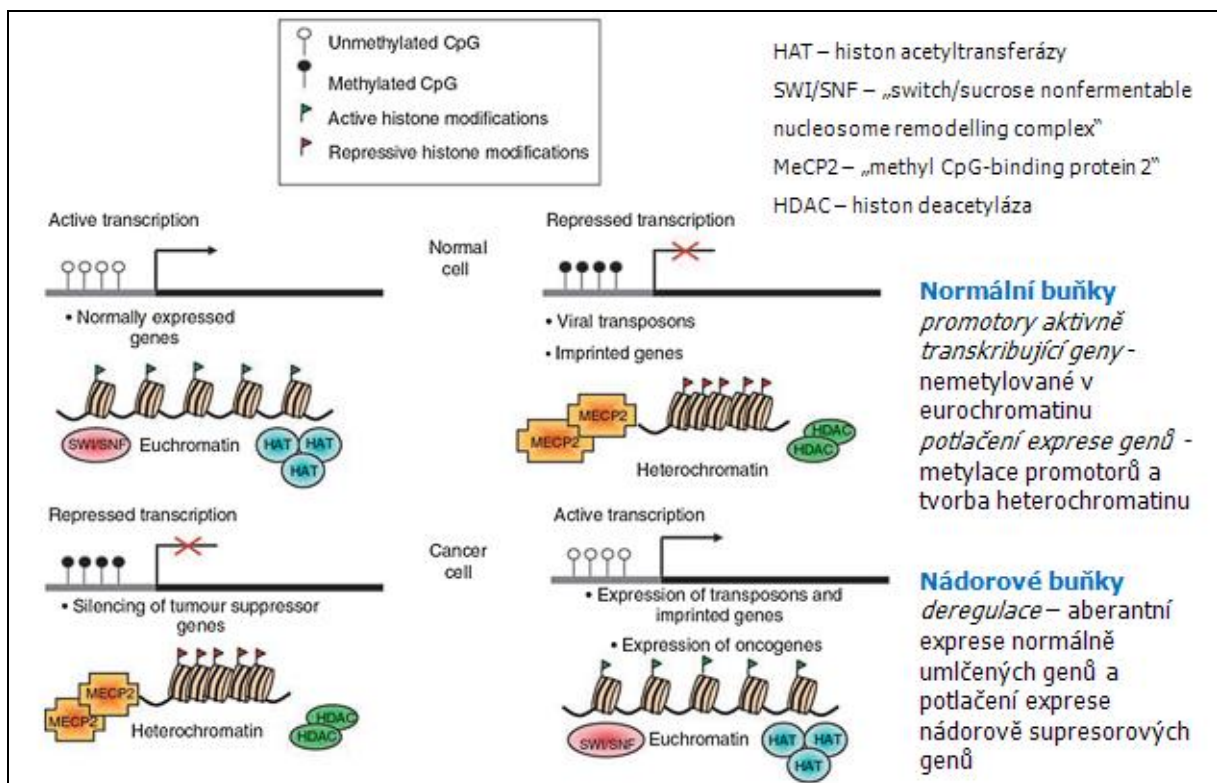
Obr. 4-4 Aberantní epigenetické a genetické děje mohou vést prostřednictvím nesprávné genové exprese k tvorbě nádorů (*Neumeister P. et al., Int J Biochem & Cell Biol 2002 : 1475*)

4.2 ACETYLACE HISTONŮ

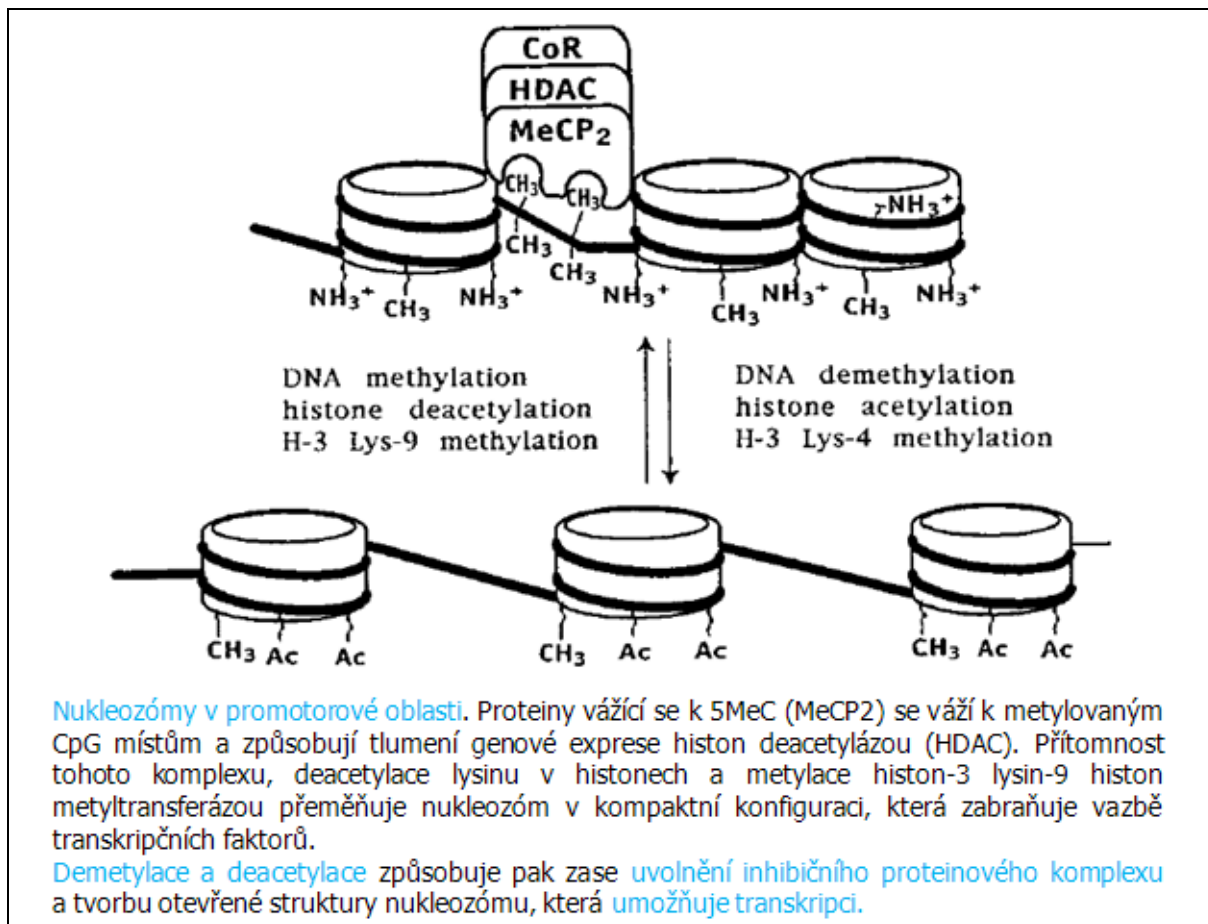
Genová exprese je regulována i strukturou chromatinu. **Histony** jsou považovány za důležité „překladače“ mezi genotypem a fenotypem a mají dynamickou funkci v regulaci struktury chromatinu a genové aktivity. Mohou být *modifikovány acetylací, metylací, fosforylací, ubiquitinací*. Specifická modifikace konců histonů enzymy **histontransferázami** je přímo spojena s aktivní nebo utlumenou transkripcí.

Chromatin obsahující hypoacetylované lysiny v histonech má kompaktní strukturu represivní pro transkripci. Řada látek fungujících jako **inhibitory histonových deacetyláz (HDAC)** může vytvářet otevřené struktury chromatinu a aktivovat určité geny inhibující nádorový růst, což lze využít v terapii (butyrát, trichostatin). Histony se podílejí na tvorbě a udržování tzv. „**epigenetické paměti**“.

Existuje významné *propojení („crosstalk“)* mezi metylací DNA a acetylací histonů při aktivaci i tlumení genové exprese. 5-azacytidin a inhibitory HDAC způsobují v kombinaci reaktivaci nádorově supresorových genů (obr. 4-5 a 4-6).



Obr. 4-5 Některé známé změny DNA a chromatinu v nádorových buňkách (J. Lopez et al. Br J Cancer 2009 : 571)



Obr. 4-6 Utlumení genové exprese aberantní metylací DNA a modifikací histonů (*Momparler R. L., Oncogene 2003 : 6479*)

4.3 MICRO RNAs

Důležitou součástí epigenetické regulace jsou také tzv. malé regulační RNA – mikroRNA (miRNA) (obr 4-7). V tzv. **RISC komplexu** se miRNA vážou na částečně komplementární cílová místa genů a mohou řídit buď translační inhibicí, nebo degradaci mRNA. Tato represe prostřednictvím miRNA je další cestou jak může být modulována genová exprese (obr. 4-8).

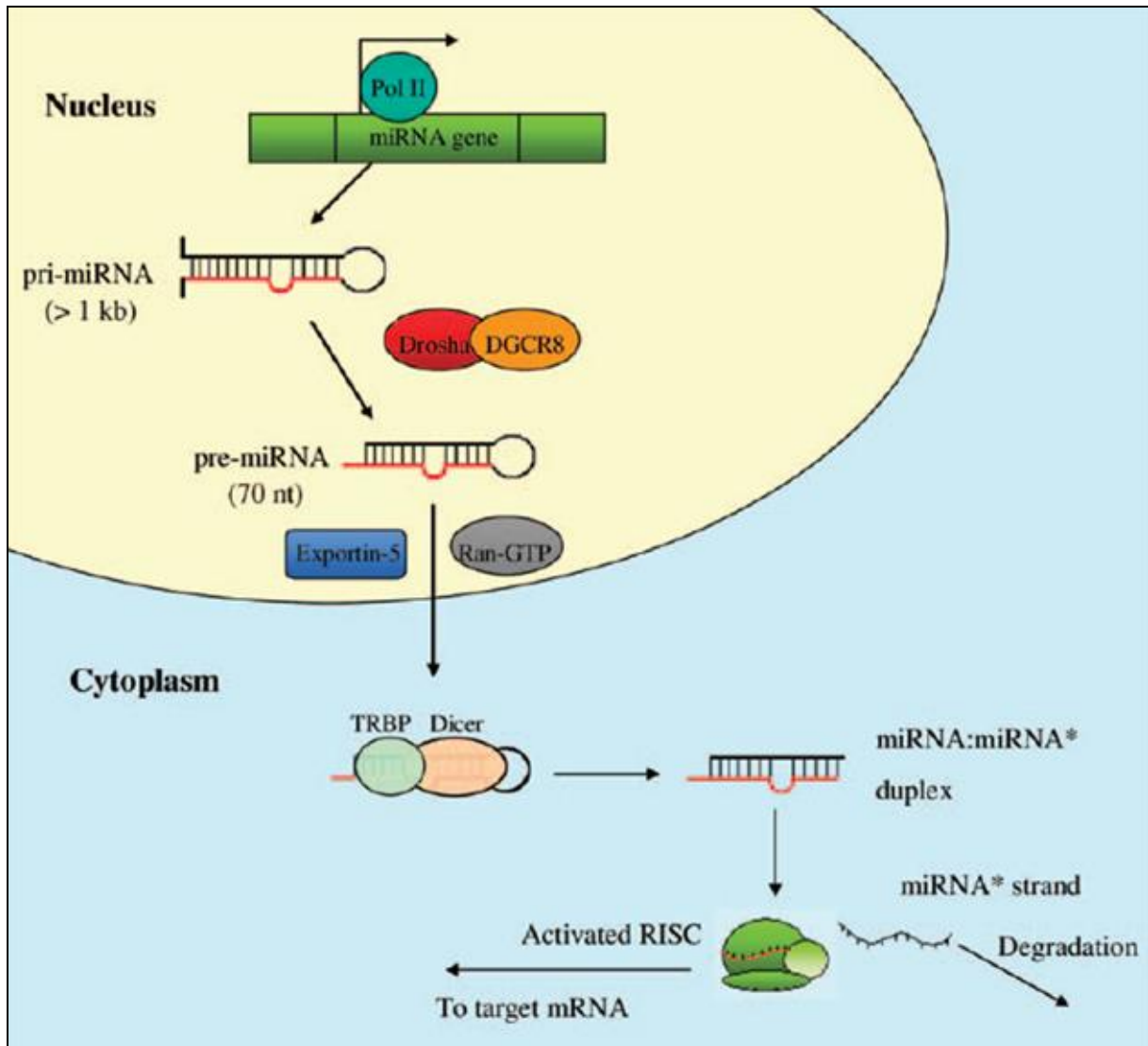


Fig. 1. Biosynthesis of microRNA. RNA polymerase II (Pol II) primarily facilitates transcription of the miRNA gene in the nucleus. The resulting primary transcript (pri-miRNA), is then cleaved by Drosha and DGCR8, producing a precursor molecule (pre-miRNA). The pre-miRNA is transported to the cytoplasm by Exportin-5 and Ran-GTP. Here, the pre-miRNA undergoes its final processing step, which involves cleavage by Dicer and TRBP below the stem-loop. This produces a duplex molecule, which contains the single-stranded mature miRNA molecule and a miRNA* fragment. The miRNA:miRNA* complex is then incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC), which is activated upon unwinding of the miRNA:miRNA* duplex. The miRNA* fragment is degraded, whilst the mature miRNA molecule guides the RISC to the target mRNA.

Obr. 4-7 Biosyntéza microRNA (*Lynam-Lennon N. et al., Biological Review 2009 : 55*)

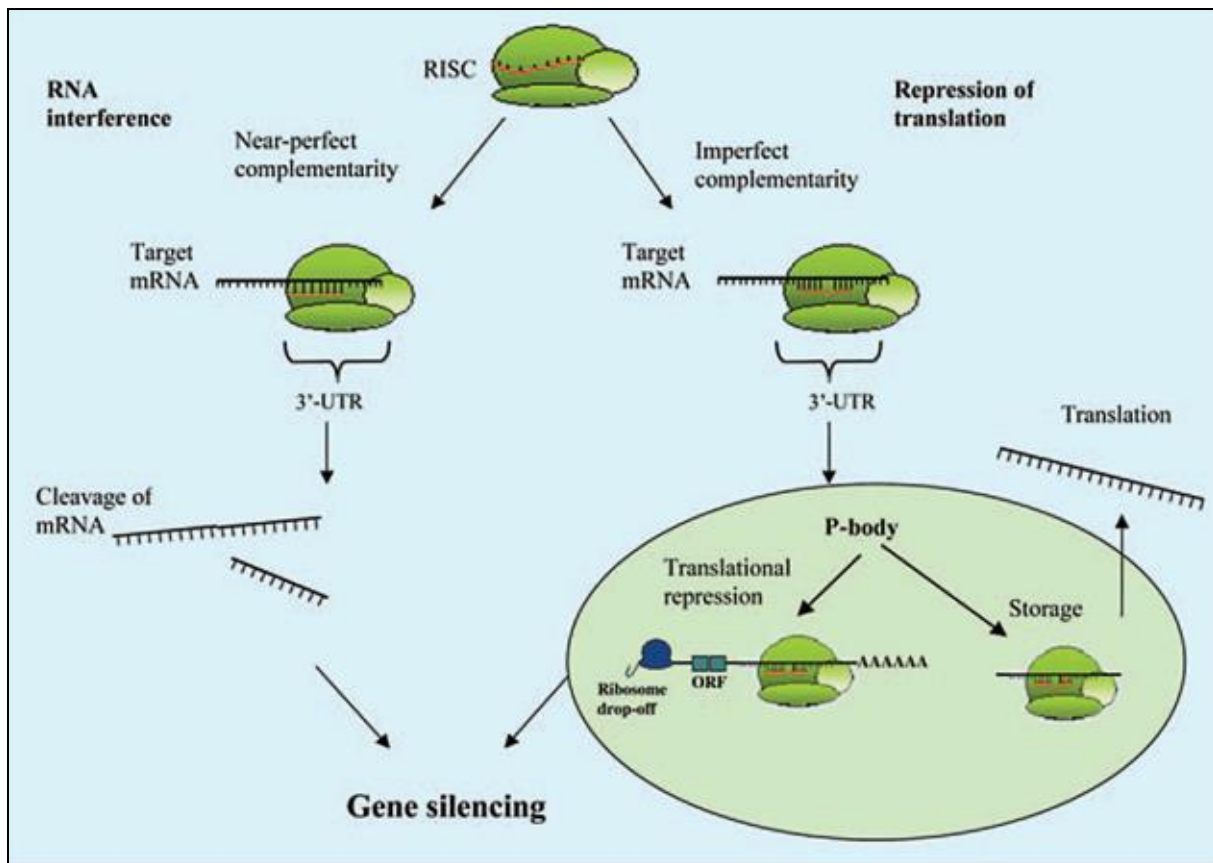


Fig. 2. microRNA regulation of target genes. The degree of complementarity between the 3'- untranslated region (UTR) of the target mRNA and the seed region of the miRNA determines the mechanism of regulation. If there is sufficient (near perfect) complementarity regulation is carried out by RNA interference. The RNA-induced silencing complex (RISC) is directed to cleave the target mRNA, and does so between the nucleotides pairing to residues 10 and 11 of the miRNA. If there is insufficient complementarity, regulation is carried out by repression of translation. This occurs pre-initiation and/or post-initiation of translation. Target mRNA can also be stored in P-bodies, and can re-enter polysomes for translation. ORF, open reading frame.

Obr. 4-8 Regulace cílových genů microRNA (Lynam-Lennon N. et al., *Biological Review* 2009 : 55)

miRNAs jsou deregulovány u řady nádorových typů a mohou fungovat jako nádorové supresory. Hypermetylace ostrůvků CpG spojených se specifickými *miRNAs* může být jedním z mechanismů, kterým může být *miRNA* selektivně snížena. V případě, že je *miRNA* situována v kódující oblasti genu, metylace může zároveň tlumit expresi jak genu kódujícího protein, tak příslušné *miRNA*.

Kontrolní otázky k tématu:

- Co rozumíte pod pojmem negenotoxické změny?
- Jakými mechanismy fungují tzv. nádorové promotory? Uveď příklady takovýchto látek či faktorů.
- V čem spočívá teorie kmenových buněk ve vztahu ke karcinogenezi?
- Čím jsou charakterizovány epigenetické změny?
- Které základní epigenetické mechanismy hrají úlohu v nádorovém onemocnění?

- Jak a kde probíhá (de)methylace DNA a jaký je její význam?
- Jak jsou s ohledem na metylaci charakterizované nádory?
- Jakou funkci mají v buňkách histony?
- Jaký je význam acetylace histonů u nádorových buněk a jak ji lze modifikovat?
- Jakou roli hrají v buňkách mikroRNA a jaká je jejich funkce v rozvoji nádorového onemocnění?

5. IMORTALIZACE BUNĚK

Imortalizace buněk (možnost nekonečného dělení) zahrnuje inaktivaci specifických nádorově supresorových genů jako jsou pRB a p53, které se účastní regulace přechodu fáze G1-S buněčného cyklu a indukce apoptózy, i dalších genů spojených s těmito procesy. Kromě toho existuje v buňkách mechanismus tzv. *buněčné hodiny odpočítávající počet dělení a regulující stárnutí buňky*. Normální somatická buňka má omezený počet dělení, tj. limitovanou schopnost proliferovat a nastává ireverzibilní zástava růstu, tzv. **replikativní senescence**. Gerontologický výzkum nedospěl ještě k vysvětlení složitosti stárnutí. Doba života je omezená a liší se obecně mezi druhy. Větší živočichové žijí obecně déle než menší. To naznačuje genetické vlivy a existuje řada teorií o změnách funkcí stadiem, kdy nedochází k dělení, tzv. **Hayflickův limit** nebo stadium smrti. Určité specifické geny mohou měnit délku života, ale zda také regulují stárnutí, zůstává otázkou.

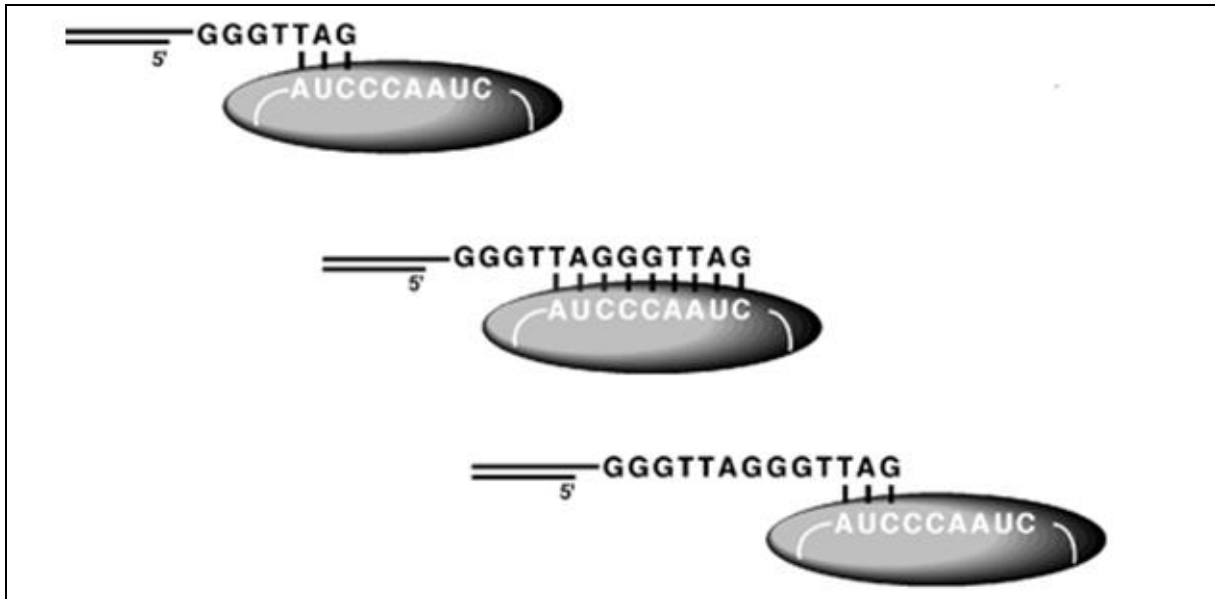
5.1 TELOMERY

Telomery jsou vysoce konzervované nukleoproteinové komplexy přítomné na koncích chromozómů a obsahují tandemové opakující se sekvence DNA bohaté na guanin (TTAGGG) obalené specifickými proteiny vázajícími se na DNA. Telomery tvoří protektivní čepičku kolem genomové DNA a zabraňují chromozomálním ztrátám a aberantním fúzím během mitotického cyklu. Avšak u většiny lidských buněk se telomery zkracují úměrně počtu buněčných replikací a až dosáhnou kritické délky, buňka umírá. Jak buňka stárne, délka telomer se postupně zkracuje z asi 15 000 bp opakovaných sekvencí TTAGGG tak, že se ztrácí 25–200 bp při každém dělení. *Zkracování telomer vybudí proliferativní stárnutí (senescence)* a přes aktivaci kontrolních bodů pRB a p53 dochází u p53-divokých typů buněk k zástavě proliferace. Zatímco délka telomer koreluje s buněčným stárnutím, neexistují žádné důkazy pro jasnou korelaci na organismální úrovni a korelace s délkou života člověka či jiných druhů.

Ztráta telomerických konců však může způsobit genomovou nestabilitu a změněnou genomovou expresi. Tyto buňky procházejí krizovým stadiem nebo umírají. Dochází k bariéře v proliferaci charakterizované dysfunkcí telomer, extrémní genomovou nestabilitou a rozsáhlou smrtí buněk mechanismy závislými i nezávislými na p53.

Tento mechanismus je u nádorových buněk narušen aktivací genu kódujícího enzym **telomerázu**, který doplňuje telomerické segmenty, tak blokuje stárnutí a umožňuje buňce nekonečné dělení – **imortalizaci** (obr. 5-1). To má za následek jednak neomezený růst nádoru a jednak

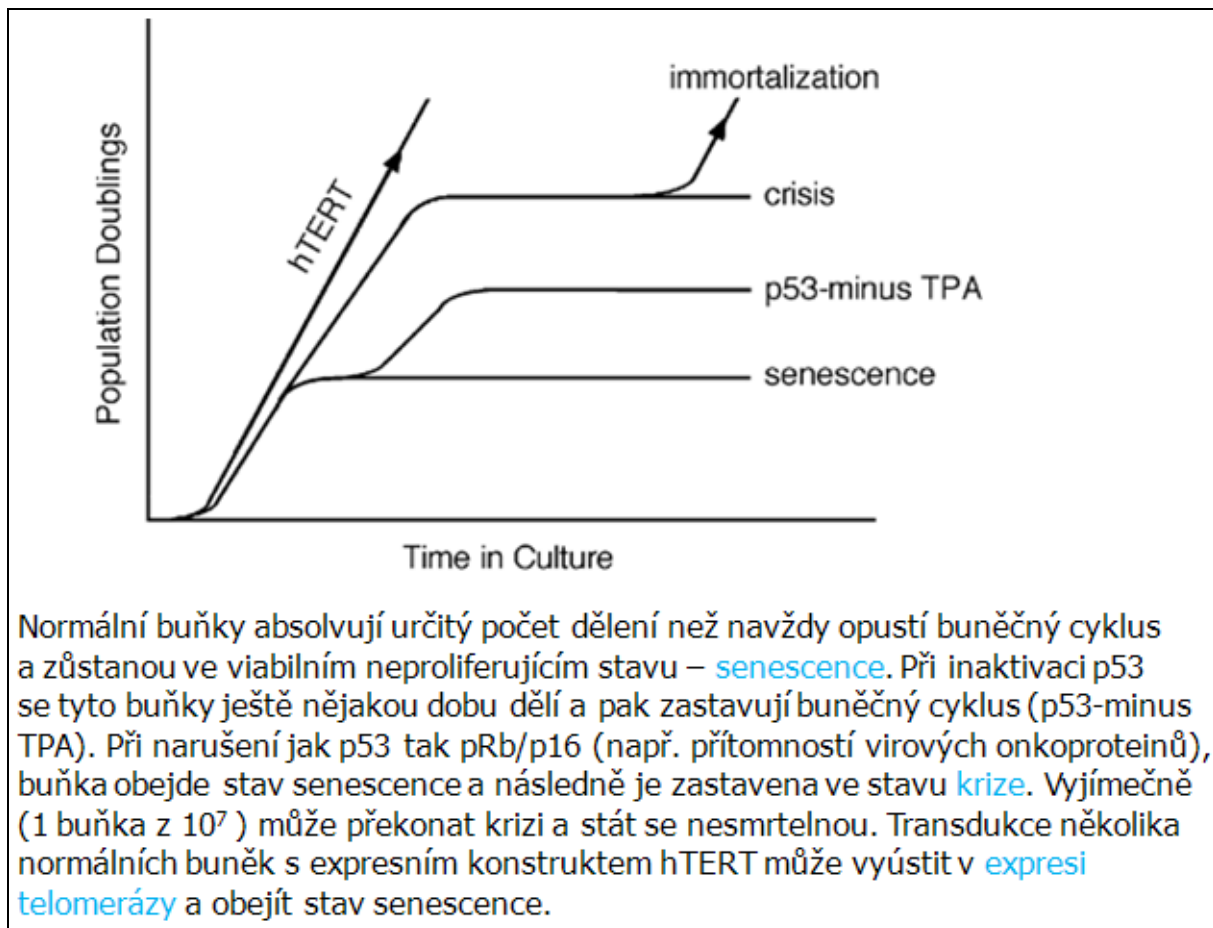
akumulaci dalších mutací, které zvyšují schopnost replikace, invaze a metastáz. U zdravých buněk až na specifické typy, jako jsou např. spermie, tento enzym není funkční.



Obr. 5-1 Rozšiřování na guanin (G) bohatých telomerových vláken telomerázou

5.2 IMORTALIZACE BUNĚK

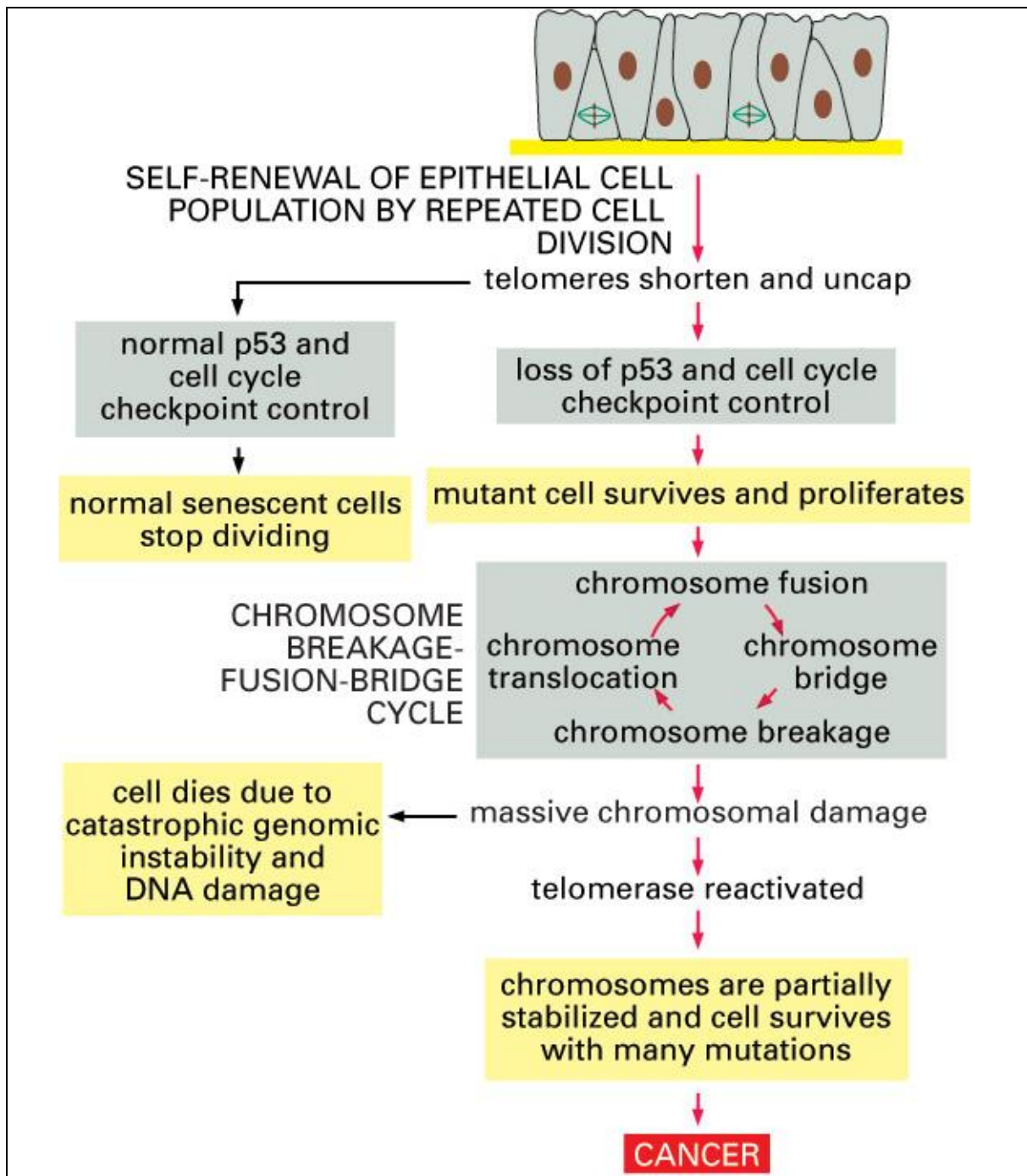
Imortalizované buňky vznikají z krizového stadia. Příčinou může být inaktivace p53 a pRB, zvýšená exprese onkogenů c-Myc a Ras a vážná genomová nestabilita. V těchto buňkách se obnovuje funkce telomer aktivací telomerázy, alternativním telomery udržujícím mechanismem (ALT) nebo jiným adaptivním mechanismem (obr. 5-2).



Obr. 5-2 Stadium terminální proliferační zástavy

Heterogenita průměrné délky telomer odráží genetické rozdíly a komplexní rovnováhu mezi procesy, které vedou k degradaci a těmi, které prodlužují telomery. Např. buňky se sebeobnovnou kapacitou mají delší telomery než diferencované buňky nebo telomery laboratorních myší jsou delší než u člověka. Telomery jsou kratší u lidských somatických tkání ze starších lidí než u mladších jedinců nebo u zárodečných buněk. Děti s genetickými nemocemi projevujícími se rychlým stárnutím tzv. **progerickým syndromem** (Down, Werner, Ataxia telangiectasia) umírají v raném věku s tělem devadesátiletých a jejich telomery jsou drasticky zkráceny.

Ve skutečnosti mají nádorové buňky kratší telomery než jejich odpovídající normální buněčné typy. Tyto telomery se dále zkracují během progresu nádoru a u myších experimentálních modelů jsou zkrácené telomery spojeny se zvýšenou genetickou nestabilitou a zvýšenou nebo redukovanou spontánní malignitou v závislosti na genetickém kontextu (obr. 5-3). Mnoho faktorů (genetických, nutričních, hormonálních, environmentálních, farmakologických) může modulovat udržování telomer a potenciál buněčného života.



Obr. 5-3 Zkracování telomer může vést k chromozomální nestabilitě a vzniku nádoru (Figure 23-36. *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

5.3 TELOMERÁZA

Telomeráza

Telomery nejsou udržovány normálním replikačním procesem. U kmenových, nádorových a immortalizovaných buněk, je zkracování telomer zastaveno aktivací **telomerázy** – **reverzní transkriptázy**, která rozšiřuje telomerické TTAGGG opakované sekvence.

Obsahuje *tři hlavní složky: s telomerázou spojený protein, TLP1, telomerázovou RNA - hTR a telomerázovou katalytickou jednotku TP2 – lidská telomerázová reverzní transkriptáza.*

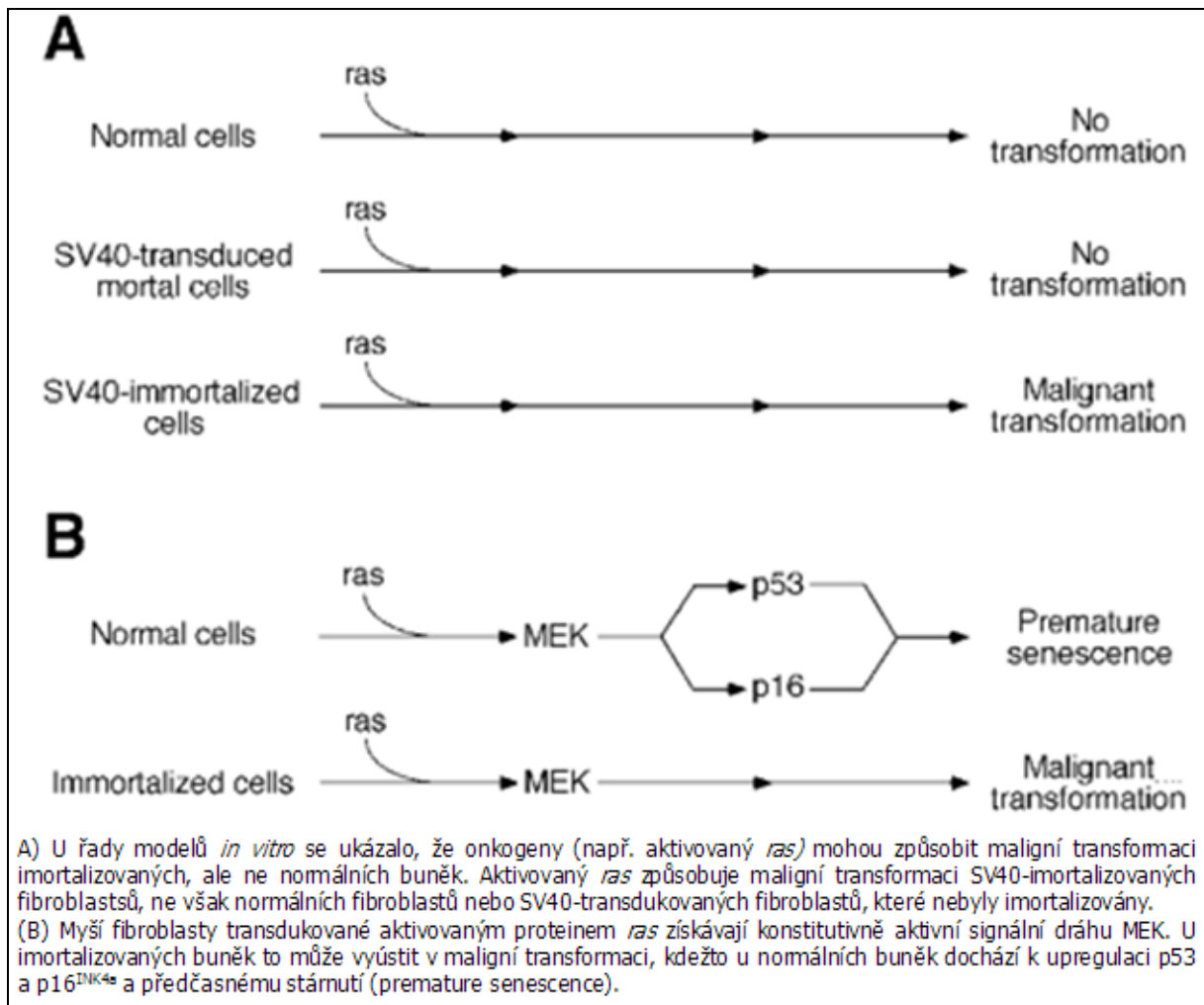
Telomeráza používá svou RNA k navázání na telomery, zatímco katalytická proteinová jednotka syntetizuje DNA přímo na koncích chromozómů reverzní transkripcí templátu RNA. *Telomeráza je vysoce exprimována ve většině nádorů a kmenových buněk, středně v hyperplastických buňkách a velmi nízká nebo žádná v normálních diferencovaných tkáních. Postupně se také snižuje s věkem.* Exprese telomerázy je spojena s vysokým proliferačním indexem a obnovným tkáňovým potenciálem, agresivitou nádorů, vysokým histopatologickým gradem a s proliferací cévního endotelu.

Telomerázová aktivace a zvýšená exprese je často nezbytným a raným dějem v mnohastupňové karcinogenezi. Vyrůstá rychle během chemické karcinogeneze a po zkrácení telomer. Telomeráza není ani onkogen ani nádorově supresorový gen, ale je regulována nahoru nebo dolů mnoha faktory a stává se důležitým predisponujícím dějem u karcinogeneze nebo cílené nádorové terapie.

Homeostáza systému telomery-telomeráza je komplexní a svázána s genetickými a environmentálními faktory.

Řada faktorů snižuje (diferenciační činidla, epigallocatechin gallate z čaje, antineoplastické látky – cisplatina, doxorubicin, protein fosfatáza 2, MAPK, tamoxifen, androgeny, volné radikály, inhibitory reverzní transkriptázy) a řada látek zvyšuje telomerázovou aktivitu (chemické karcinogeny, mutace telomerických sekvencí, gamma záření, PKC, EGF, estrogeny).

Vztahy mezi telomerázovou aktivitou a nádorovým onemocněním jsou složité a jen částečně objasněné. Telomeráza může paradoxně buď podporovat, nebo inhibovat tvorbu nádorů v závislosti na genetickém kontextu (obr. 5-4).



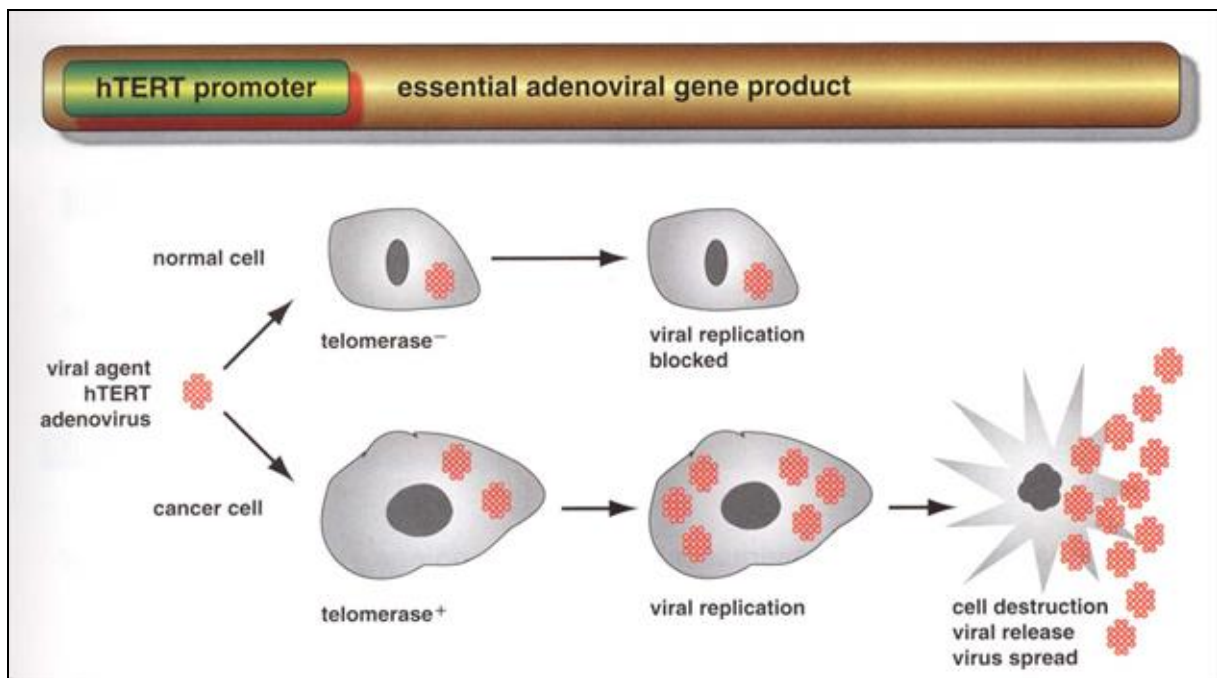
Obr. 5-4 Imortalizace je nutná, ale ne dostačující pro maligní transformaci

U nádorových buněk jsou telomery kratší a telomerázová aktivita obvykle následuje po zkracování telomer. Ztráta funkce telomer při raném dělení zahajuje genetickou nestabilitu, zatímco v pozdějším bodě progresu nádoru absence telomerázy inhibuje růst. Tak zatímco inhibice telomerázy u ustanovených nádorů může být cenným terapeutickým přístupem, na věku závislé zkracování telomer může být rizikovým faktorem pro nádory tím, že umožňuje obejít kontrolní bod mortality.

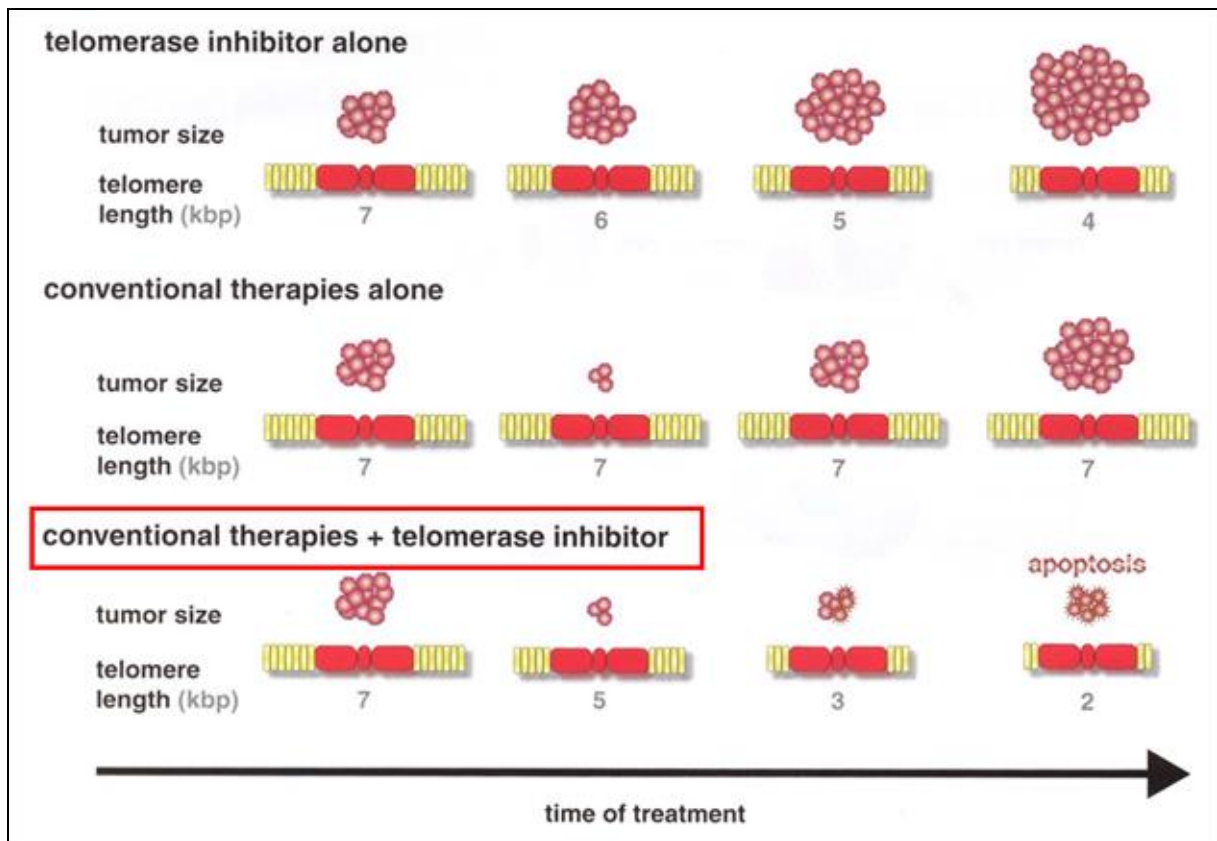
Ukázalo se, že např. u epitelálních buněk a fibroblastů musí být narušeny nejméně 4 signální dráhy: odpověď na mitogeny aktivací *ras*, udržení aktivní telomerázy, inaktivace pRB a p53. Tak se ukazuje, že aktivace telomerázy je zásadním dějem v mnohastupňové karcinogenezi, tvorbě prekarcinogenních buněk, nádorových buněk a je považována za znak nádorových buněk. Avšak důležitost dysfunkce telomer pro imortalizaci a tumorigenezi je komplexní a jen částečně objasněna.

5.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ IMORTALIZACI

Systém telomery-telomeráza představuje komplexní skupinu molekul interagujících navzájem a modulujících věk buněk, genetickou stabilitu a nádorovou transformaci. Vnější zásahy mohou modulovat žití zvyšováním nebo snižováním délky života, ale s tímto přístupem jsou spojeny také odpovídající problémy. Udržování telomer by mohlo být důležité pro prodloužení života, ale vzhledem ke složitosti fyziologických mechanismů na buněčné a zejména organismální úrovni, nelze tento problém zjednodušovat. Z onkologického hlediska, může vyšší exprese telomerázy zvyšovat riziko vzniku nádorů. Ačkoliv normální buňky s delší dobou života a udržovanými telomerami se nejeví jako neoplastické, zpoždění fyziologické smrti může zvyšovat pravděpodobnost kontaktu s karcinogeny. Telomeráza sama také podporuje onkogenní potenciál predisponovaných buněk a je cílem protinádorových terapií (obr. 5-5 a 5-6).



Obr. 5-5 Adenovirová terapie využívající promotoru pro telomerázu selektivně usmrcuje nádorové buňky (Shay J.W. and Wright W.E., *Cancer Cell* 2002 : 257)



Obr. 5-6 Inhibitory telomerázy a konvenční terapie

Zatím se pozornost soustřeďuje na zvýšení doby života několika cílových buněk nebo snížení proliferujících nádorových buněk. Málo pozornosti je věnováno organismální úrovni, mikro- a makroprostředí, ve kterém tyto buňky rostou jako normální nebo immortalizované nádorové buňky, tj. angiogenezi, růstovým a diferenačním faktorům, cytokinům, hormonům, imunitnímu systému a environmentálním faktorům.

Na závěr se nabízí otázky, na které není lehké najít odpověď:

- Je bezpečné prodlužovat lidský život použitím terapeutických látek?
- Je lepší prodlužovat lidský život nebo zlepšovat kvalitu života?

Kontrolní otázky k tématu:

- V čem spočívá immortalizace buněk?
- Co jsou to telomery, telomeráza a jak fungují u nádorových buněk?
- Které faktory mohou ovlivnit telomerázovou aktivitu a jaký význam má její snížení (zvýšení).
- Jak přispívá zkracování telomer ke vzniku nádorů?

- Jak jsou poznatky o mechanismech fungování systému telomery-telomeráza využívány v terapii?

6. PROMOČNÍ FÁZE KARCINOGENEZE

6.1. NEGENOTOXICKÉ MECHANIZMY KARCINOGENEZE

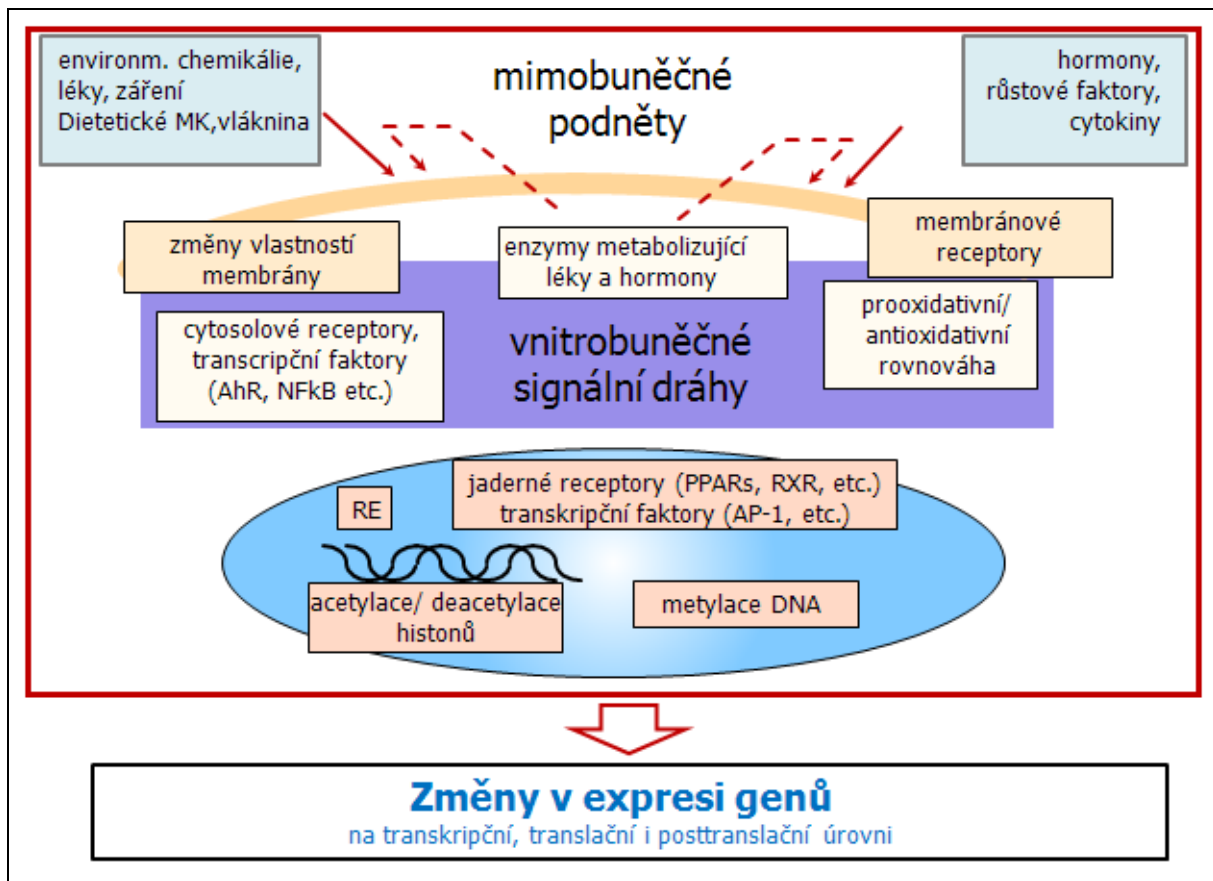
Všechny formy rakoviny vznikají jako směs genetických změn v buněčném genomu vyskytujících se ve vývoji nádorových buněk a epigenetických i negenotoxických změn ve stadiu nádorové promoce a progresu.

*Karcinogeneze je proces, který zahrnuje víc než jen mutageny. Dochází nejen ke genovým a chromozomálním mutacím (**genotoxické změny**), ale dalšími mechanismy jsou vyvolávány **epigenetické a negenotoxické změny**. Tyto děje způsobují **změny v expresi genetické informace na transkripční, translační nebo posttranslační úrovni**. V mnohobuněčném organismu zahrnuje homeostatická kontrola regulaci buněčné proliferace, diferenciace, programované smrti a adaptivní odpovědi diferencovaných buněk.*

Přestože všechny buňky mnohobuněčného organismu obsahují odhadem 100 000 genů, pouze část z nich je v určité buňce exprimována. Geny jsou zapínány a vypínány, tj. selektivně transkribovány nebo reprimovány, během vývoje, buněčného cyklu, proliferace, diferenciace i během adaptivní odpovědi diferencovaných buněk. Když se oplodněné vajíčko vyvíjí v embryo, fetus a dospělý organismus, totipotentní buňky jsou směřovány do pluripotentních kmenových buněk, které proliferují, tvoří progenitorové buňky a pak diferencují, adaptivně reagují a hynou apoptózou. Tyto děje jsou řízeny epigeneticky a negenotoxickými mechanismy.

Za hlavní mechanismy charakterizující negenotoxickou karcinogenezi považujeme

- aktivace specifických receptorů
- ovlivnění mechanismů signálové transdukce
- produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)
- (de) aktivace enzymů metabolizujících chemikálie a hormony
- změny v metylaci DNA nebo v acetylaci histonů, příp. miRNA (epigenetické změny)
- ovlivnění exprese onkogenů, nádorově supresorových genů a genů buněčného cyklu
- změny „gap junctional intercellular communication“ (GJIC) – viz dále
- změny buněčného cyklu
- změny proliferace (regenerativní nebo mitogenní)
- změny v apoptóze
- poruchy v rovnováze (homeostáze) vyúsťující ve změnu obratu buněk ve tkáni



Obr. 6-1 Hlavní epigenetické (negenotoxické) mechanismy zahrnuté v karcinogenezi

6.2 NÁDOROVÉ PROMOTORY

Jestliže je kmenová buňka iniciována (změněna mutacemi), je omezena v dalším růstu okolními normálními buňkami. Dojde-li však k expozici takovéto buňky tzv. **nádorovým promotorem** nebo **promočními podmínkami** (např. obnova tkáně po odstranění či odumření buněk), tlumící účinek okolních buněk prostřednictvím kontaktní inhibice mizí. Iniciovaná buňka se tak může začít dělit. Protože iniciovaná buňka není schopna terminální diferenciace jako normální kmenová buňka, **akumulují se klonys dysfunkčních buněk** (např. papilomy v pokožce, polypy ve střevě, noduly v ledvinách, enzymově změněné fokusy v játrech). Faktory, které fungují jako *nádorové promotory většinou působí jako mitogeny (stimulátory růstu) a inhibitory programované buněčné smrti.*

Hlavní účinek nádorových promotorů je zejména specifická expanze iniciované buněčné populace v zasažené tkáni. Fáze je zpočátku reverzibilní, později ireverzibilní. Promotory se neváží kovalentně na DNA a nejsou mutagenní, působí na iniciovanou buňku a způsobují důležité *epigenetické nebo negenotoxické změny vyúsťující v modulaci exprese genů.*

Mohou však též působit jinak i na genetický materiál a způsobovat amplifikaci genů, synergicky působit s viry či zvyšovat transformaci. Tyto změny asi odpovídají za ireverzibilní část promoce.

Nádorovou promoci může indukovat řada *chemických látek, fyzikální faktory i některé přírodní látky a složky potravy*. Chemikálie, jako jsou extrakty z některých rostlin (forbolové estery), léčiva (fenobarbital), potravinové doplňky (sacharin), složky výživy (tuky, vysoce nenasycené mastné kyseliny), pesticidy (DDT), polutanty (polychlorované aromatické uhlovodíky) a faktory životního stylu (cigaretový kouř), mohou takto působit v necytotoxických koncentracích. Tyto látky tak nevyvolávají mutace (nejsou genotoxické), ale mohou působit negenotoxickými mechanizmy podporujícími mitogenní expanzi iniciované buňky. Tyto látky mohou indukovat v buňkách různé signály a dráhy, které vedou také k bloádě kontaktní inhibice prostřednictvím omezení **mezibuněčné komunikace** zprostředkované mezerovitými spojeními, tzv. **gap junctions** (viz dále).

Jako přirozené nebo **endogenní nádorové promotory** mohou fungovat *hormony, růstové faktory nebo cytokiny*.

Jako **progresory** pak označujeme látky nebo faktory, které fungují jako karcinogeny, nádorové promotory nebo hormony *ve fázi progresu a přeměňují nádorovou populaci na maligní*. Mohou působit *jak genetické tak negenetické změny* v nádorových buňkách, které přispívají k invazi, migraci a vzniku metastáz.

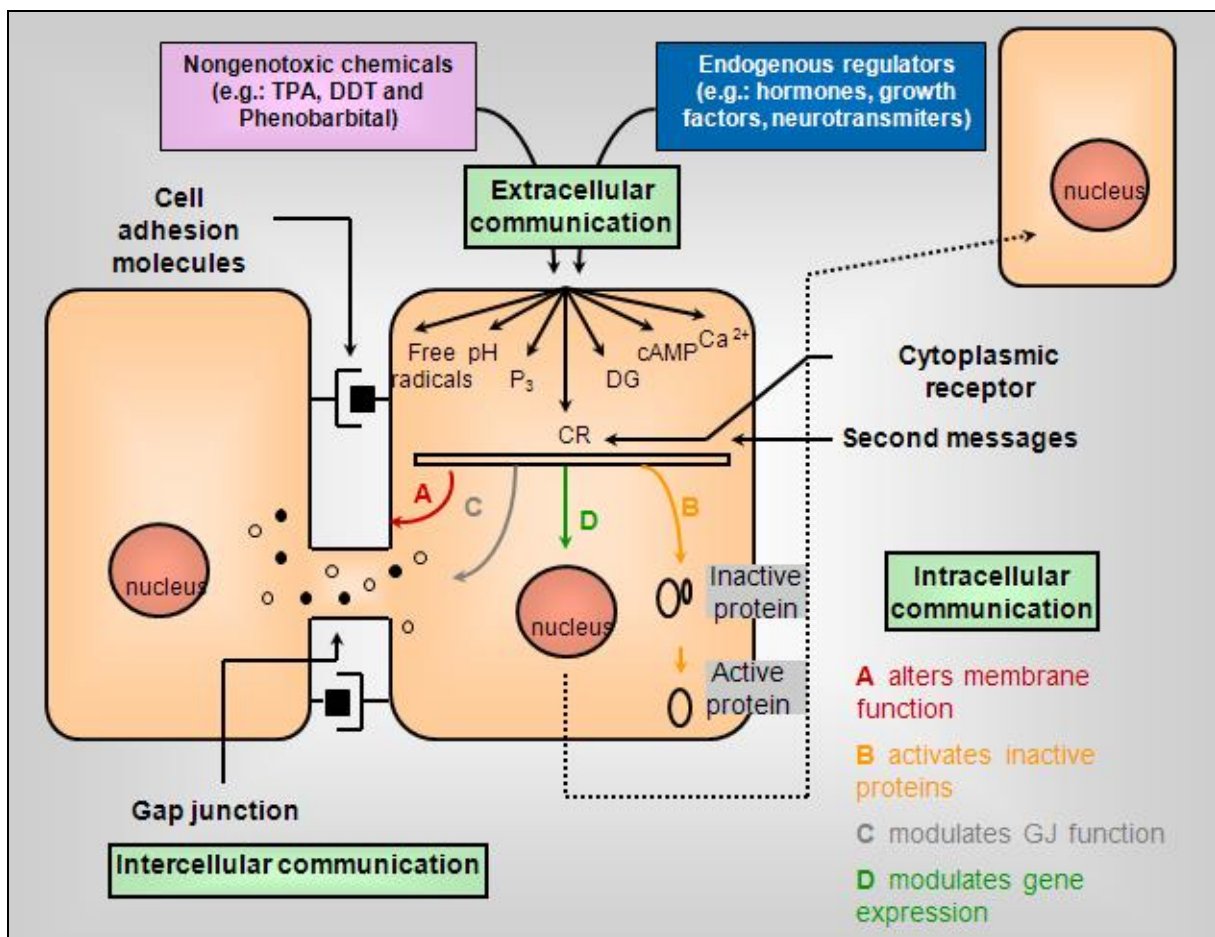
Kontrolní otázky k tématu:

- Co rozumíte pod pojmem negenotoxické změny?
- Jaké jsou hlavní mechanizmy negenotoxické složky karcinogeneze?
- Jakými mechanizmy fungují tzv. nádorové promotory? Uveďte příklady takovýchto látek či faktorů.
- Jaké látky označujeme jako nádorové progresory?

7. MEZIBUNĚČNÉ INTERAKCE V RŮSTU A NEOPLASII

Vnitrobuněčné a molekulární změny v dělící se buňce jsou definovány poměrně rychle. Během posledních desítek let byla objevena řada genů souvisejících s karcinogenezí, tj. onkogenů a nádorových supresorů a objasněna jejich funkce. Navíc byly dokumentovány změny v expresi a aktivitě růstových faktorů, receptorů, uvolňování druhých posílů a genové exprese během růstu a neoplastické transformace. Mnohem méně definované jsou však mezibuněčné děje a procesy zahrnuté v růstu a neoplasmii.

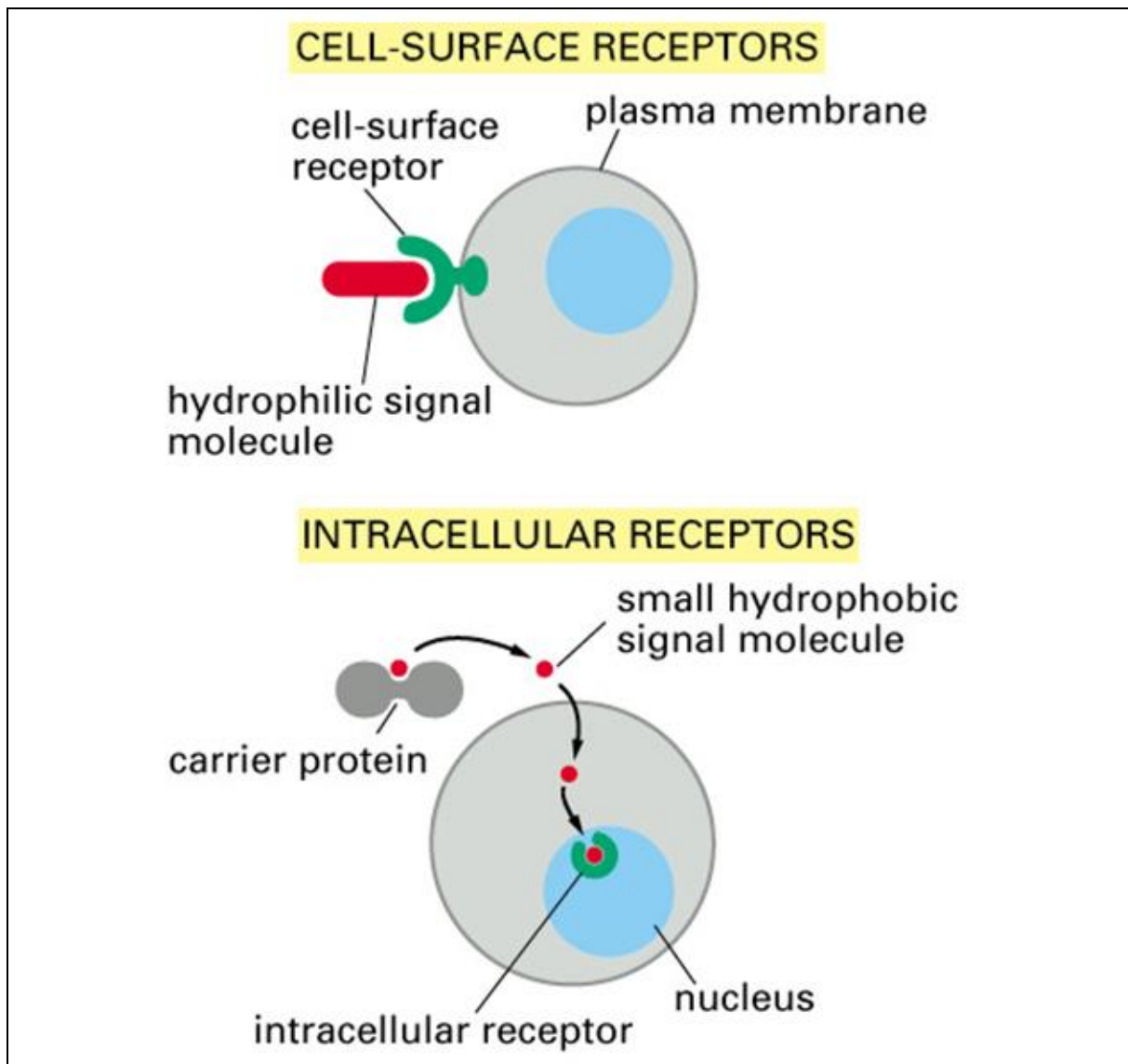
Chování buněk a rovnováha v buněčných populacích jsou regulovány komplexním integrovaným komunikačním systémem, který zahrnuje signály mimobuněčné, mezibuněčné a vnitrobuněčné (obr. 7-1).



Obr. 7-1 Tři hlavní způsoby mezibuněčné komunikace (podle J.E.Trosko: *Environmental Health Perspectives* 1998 : 331)

Živočišné buňky obsahují systém proteinů, který jim umožňuje reagovat na signály jiných buněk. Zahrnuje receptorové proteiny na buněčném povrchu nebo uvnitř buněk (v cytoplasmě

nebo v jádře) (obr. 7-2), proteinové kinázy, fosfatázy, proteiny vážící se na GTP a řadu dalších vnitrobuněčných proteinů, se kterými tyto signály interagují.

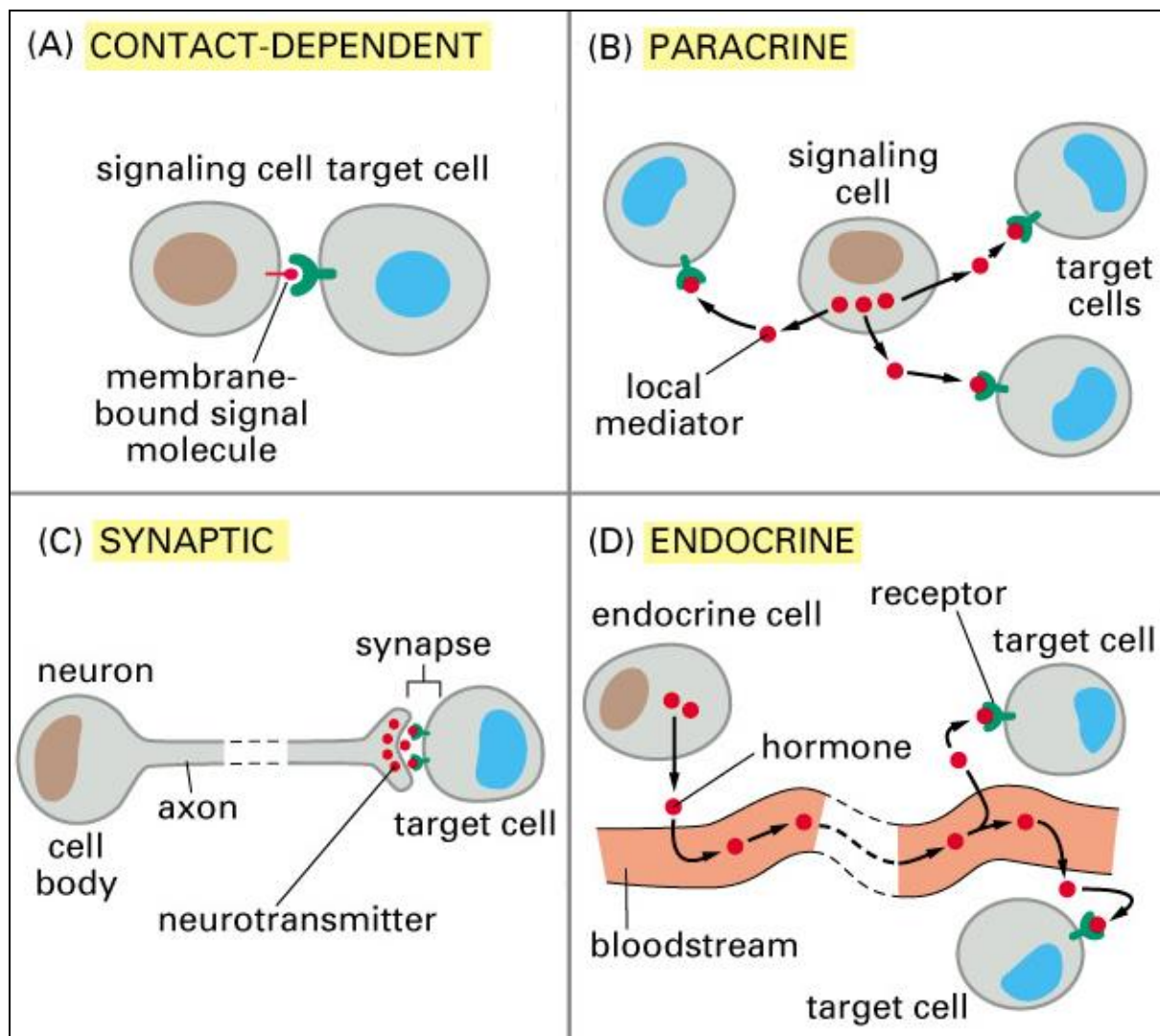


Obr. 7-2 Vazba mimobuněčných signálních molekul na povrchové nebo vnitrobuněčné receptory
(Figure 15-3. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition.)

Mezibuněčné interakce zahrnují (obr. 7-3):

- *uvolnění růst modulujících faktorů do mezibuněčného prostoru* (růstových faktorů, inhibitorů, eikosanoidů apod.) a ovlivnění sousedních buněk. Jsou to tzv. tkáňové mediátory působící parakrinní regulací.
- *odpovědi buněk na složky buněčných membrán sousedních buněk a na složky mimobuněčné matrix*. Patří sem i kadheriny a integriny důležité z hlediska metastatického procesu.

- *přímý přenos signálů* (malé molekuly asi 1 kDa) mezi buňkami prostřednictvím tzv. **GJIC (gap junctional intercellular communication)** realizovanou přímým propojením membrán sousedních buněk tzv. **gap junctions**. *Poruchy GJIC vedou k poruchám rovnováhy v buněčných populacích a mohou vést k deregulaci růstu a k neoplasii.*



Obr. 7-3 Formy mezibuněčných signálů (*Figure 15-4. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Modulace mimobuněčné a mezibuněčné komunikace buď genetickou nerovnováhou růstových faktorů, hormonů, neurotransmiterů nebo látkami z vnějšího prostředí (dieta, chem. látky) může spustit specifické signální vnitrobuněčné dráhy. Tyto signály pak modulují expresi genů a modulují též GJIC (obr. 7-4).



Obr. 7-4 Analogie signálních drah v buňkách (paralelní a křížící se dráhy)

Poruchy mezibuněčné komunikace a GJIC řadíme k **negenotoxickým mechanismům karcinogeneze**.

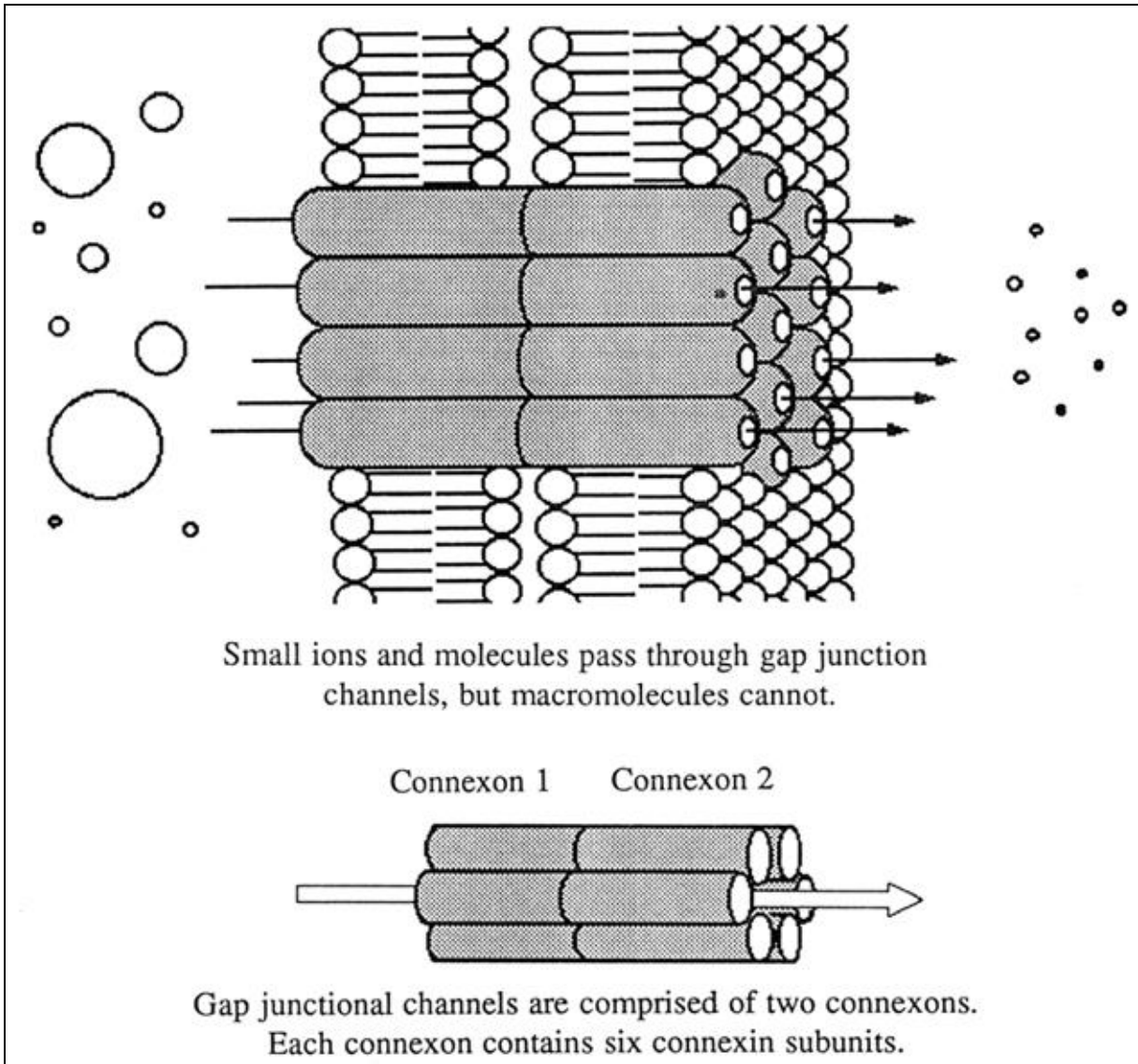
7.1. BUNĚČNÁ KOMUNIKACE A RŮSTOVÁ KONTROLA

Karcinogeneze je několikastupňový proces, během něhož je porušena kontrola růstových mechanismů, což odráží fakt, že geny kontrolující růst (onkogeny a geny suprimující nádory) jsou v nádorech často změněny. **Růst buněk však není kontrolován jen geny, ale také různými formami mezibuněčných kontaktů.** Je možné, že tyto buněčné kontakty hrají zásadní úlohu v regulaci onkogenů a supresorových genů. V epitelech, kde vzniká většina lidských nádorů je komunikace zprostředkována adhezivními molekulami (Cell Adhesion Molecules – CAM) a gap junction považována za velmi důležitou pro kontrolu růstu a diferenciaci a tudíž i pro karcinogenezi.

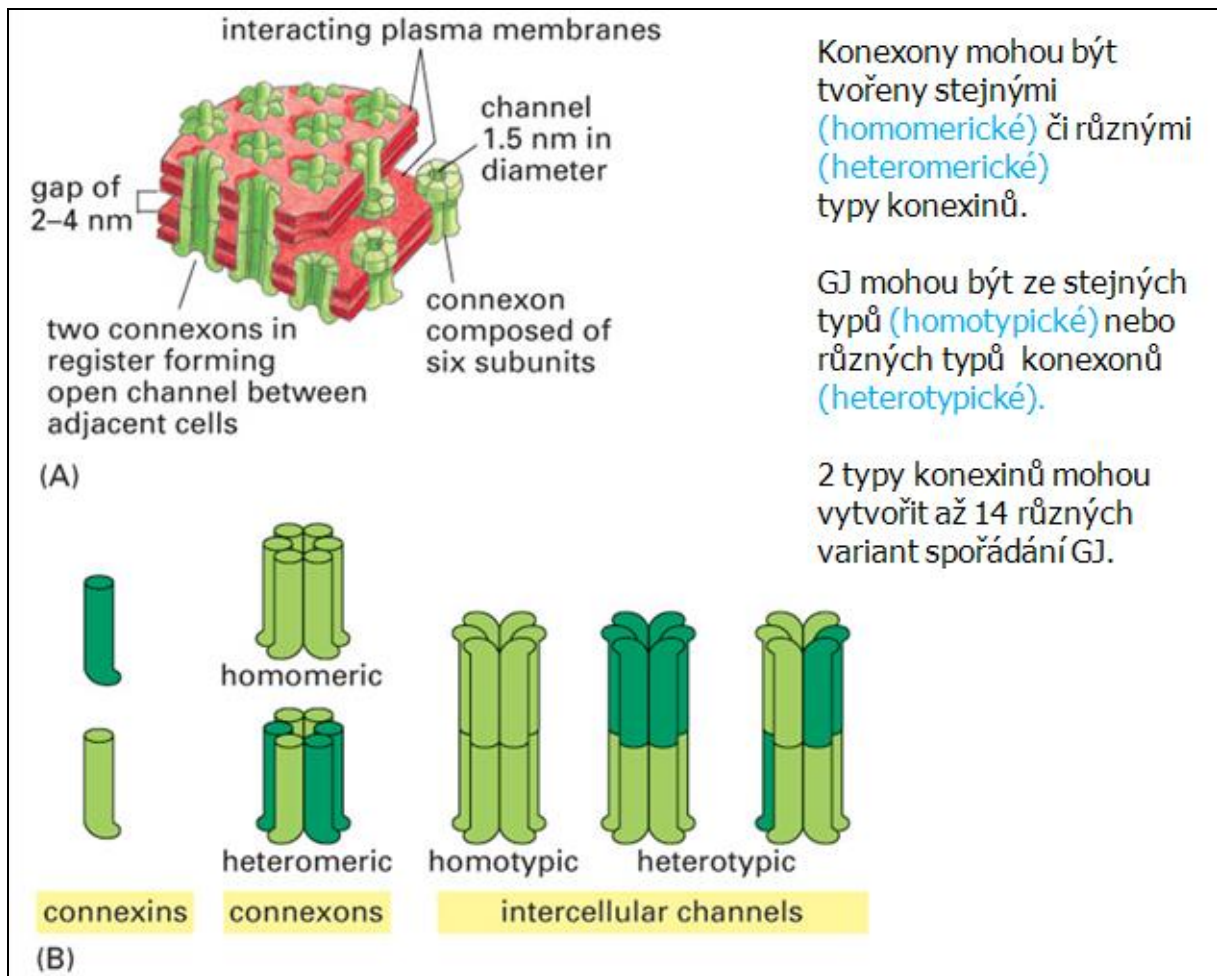
Kadheriny jsou členové rodiny molekul, které určují specifické rozpoznávání buněk v tkáních mnohobuněčných organismů a hrají základní úlohu v buněčném vývoji. Aberantní exprese nebo funkce těchto molekul souvisí s invazivní a metastatickou fází karcinogeneze. Exprese a funkce E-kadherinu (a dalších proteinů) může být na různých úrovních ovlivněna karcinogeny a karcinogenními procesy. Rozpoznání buněk zprostředkované adhezivními molekulami předchází komunikaci prostřednictvím gap junction. **Integriny** pak zprostředkovávají kontakt buňka – mimobuněčná matrix (ECM). Tyto molekuly zprostředkovávají nejen adhezi, ale hrají důležitou roli v přenosu příslušných signálů mezi buňkami a mezi buňkami a ECM.

7.2. VÝZNAM GJIC

Buněčný růst a fenotyp jsou z části kontrolovány mezibuněčnou výměnou růstově regulačních faktorů prostřednictvím **mezibuněčných spojení - gap junctions (GJ)**. Ty zprostředkovávají přímý tok malých molekul (méně než 1 kDa). Skládají se ze **dvou spojených kanálů - konexonů složených ze 6 jednotek proteinů konexinů** (obr. 7-5 a 7-6). Konexiny jsou členové multigenové rodiny a u mnoha byla klonována cDNA. Cytoplazmatická část konexinů je homologní se zbytkem molekul a obsahuje fosforylační místa na uhlíkovém konci (obr. 7-7). Konexiny tvořící GJ putují z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu. Vytvořené konexony jsou transportovány do plazmatické membrány, kde se sdružují s konexony sousedních buněk a tvoří propojovací kanálky (GJ) (obr. 7-8). Optimální diferenciací savčích epitelálních buněk v komplexním prostředí vyžaduje regulované vazby GJ útvarů s dalšími proteiny (beta-katenin, klaudin, okludin, tubulin). Kromě toho musí být funkční další vazby zajišťující interakce buňka-ECM, adheze buňka-buňka a signály rozpustných faktorů (obr. 7-9 a 7-10).



Obr. 7-5 Model gap junctions

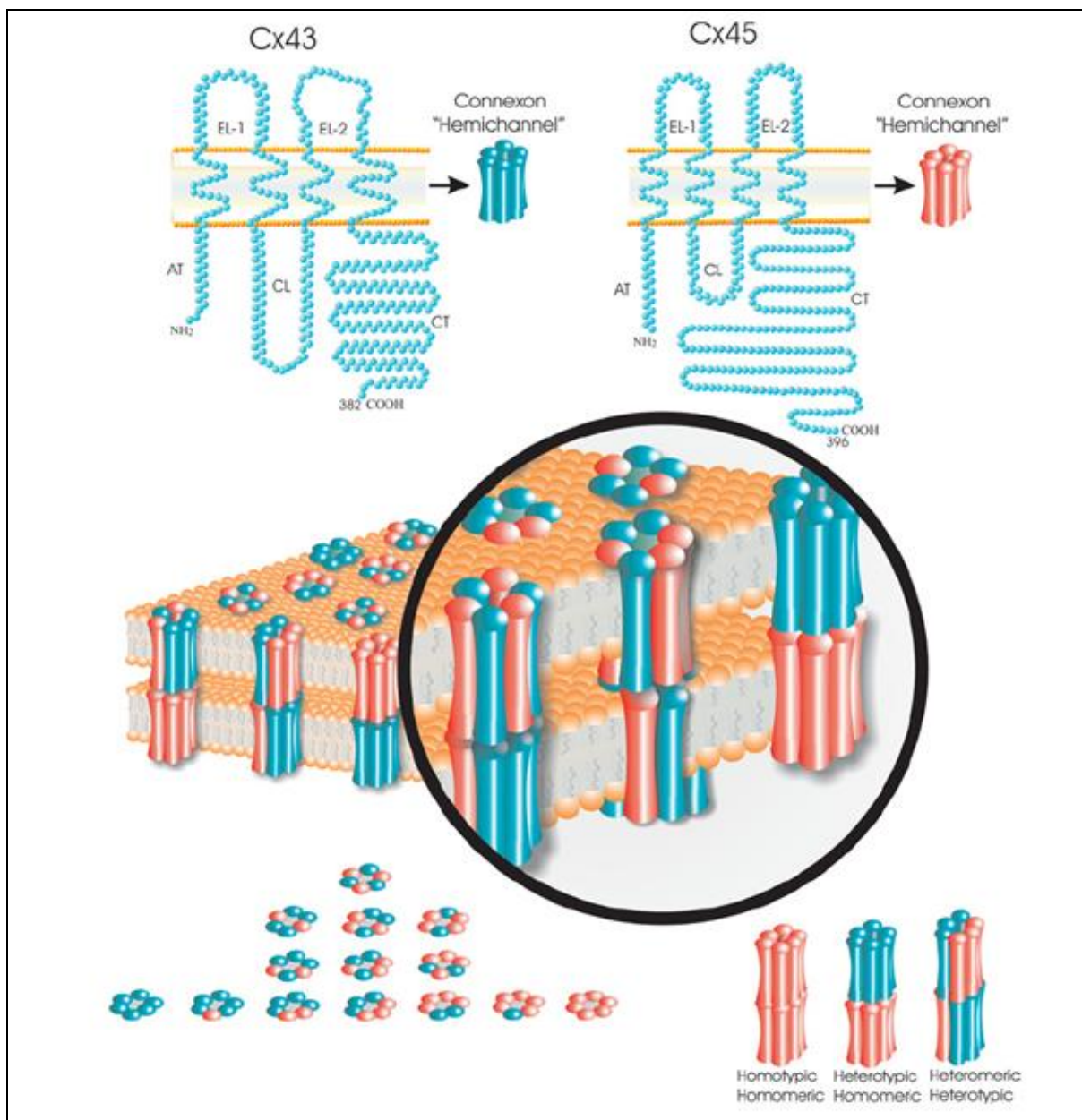


Konexony mohou být tvořeny stejnými (homomerické) či různými (heteromerické) typy konexinů.

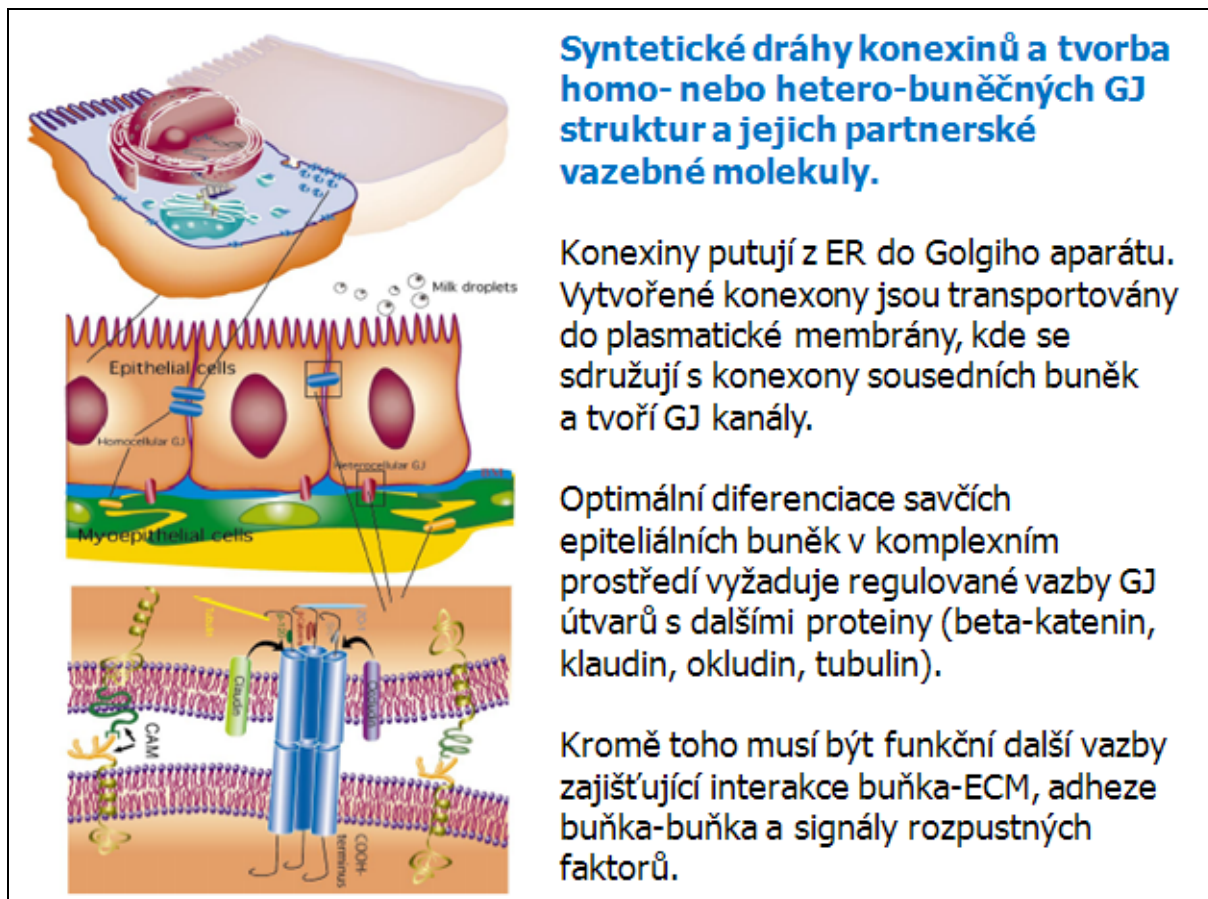
GJ mohou být ze stejných typů (homotypické) nebo různých typů konexonů (heterotypické).

2 typy konexinů mohou vytvořit až 14 různých variant spořádání GJ.

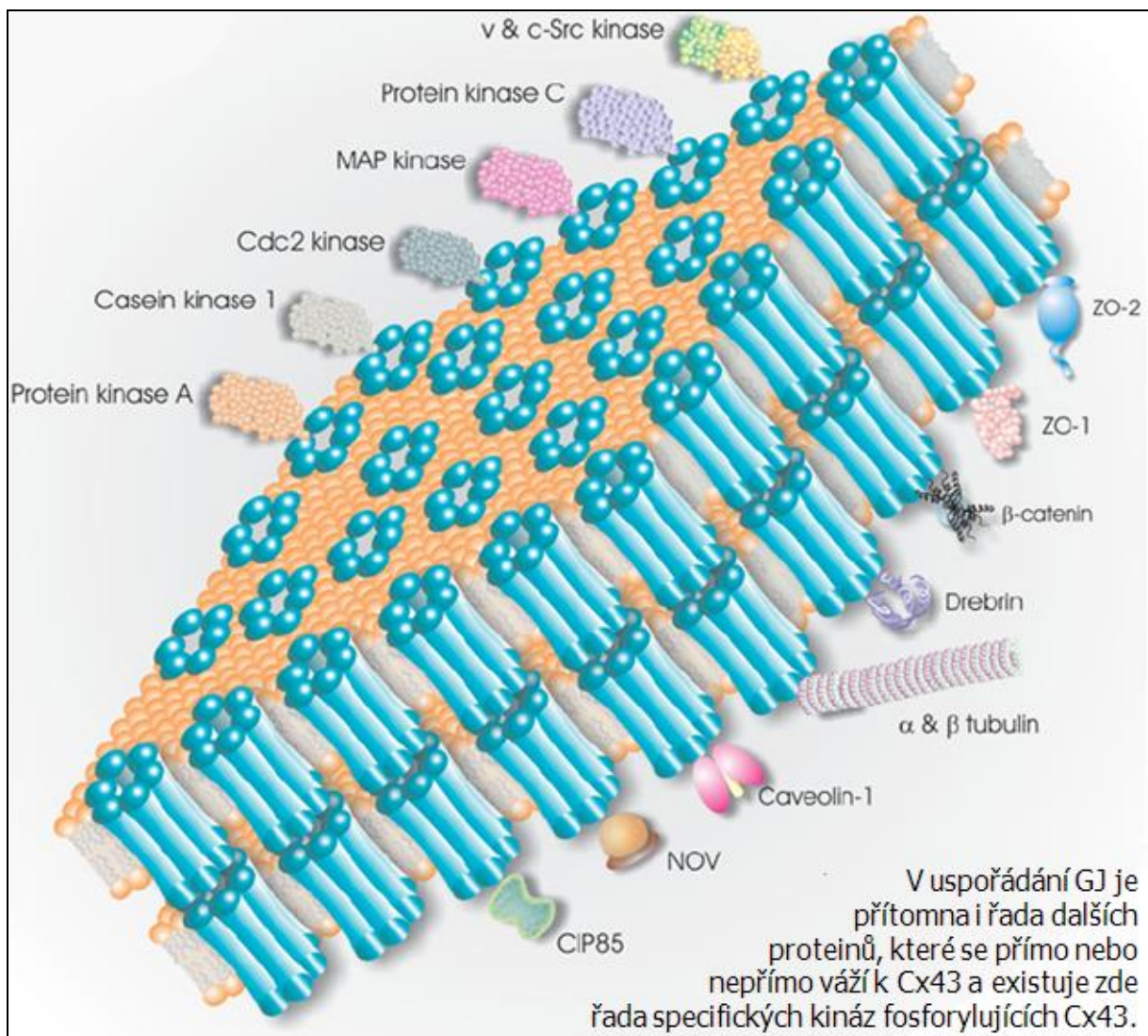
Obr. 7-6 Organizace gap junctions (GJ) (Figure 19-15. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition.)



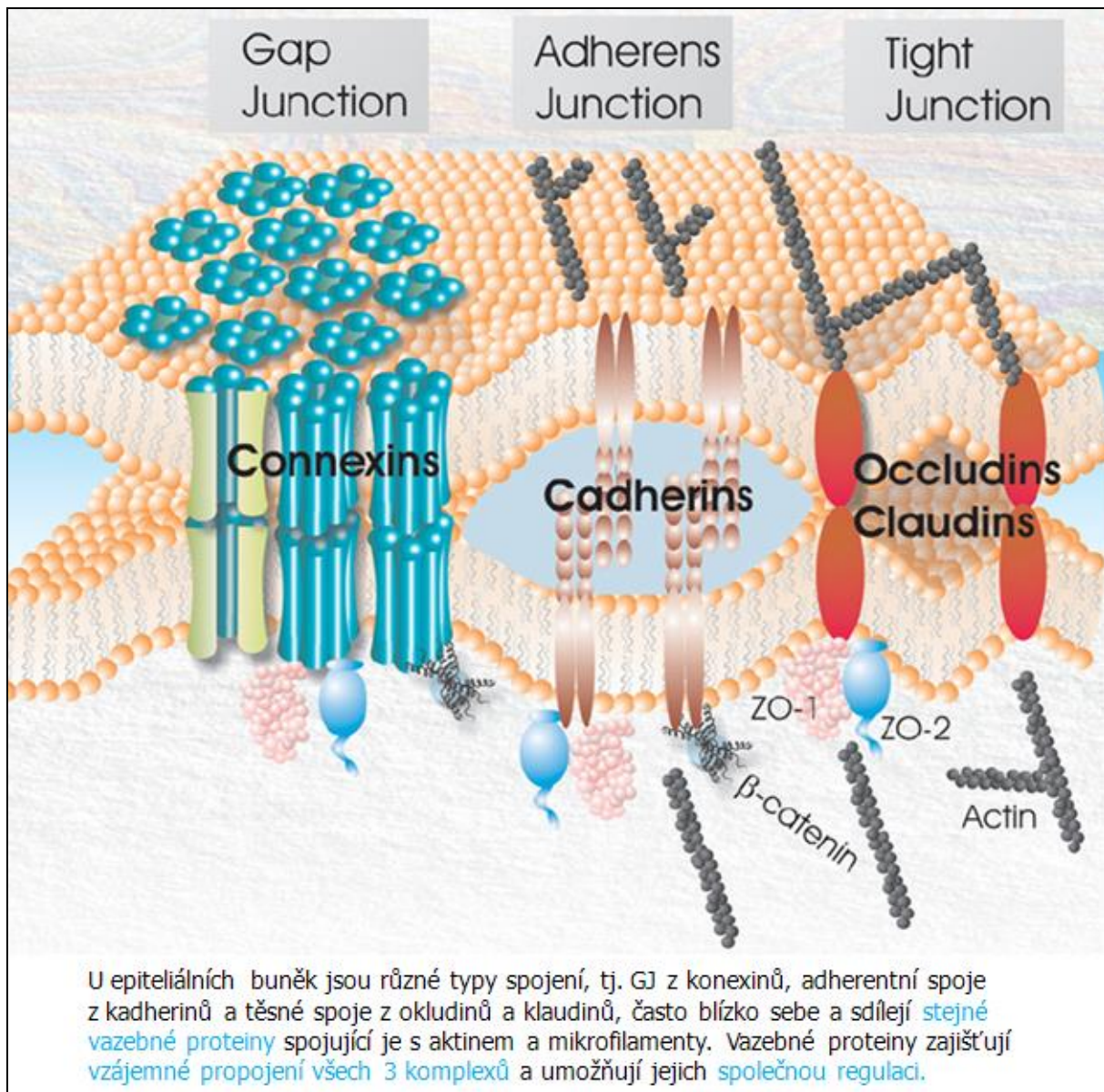
Obr. 7-7 Kompletace konexinů do „gap junctions“ (Laird D. W., *Biochem J.* 2006 : 527)



Obr. 7-8 Syntetické dráhy konexinů a tvorba homo- nebo hetero-buněčných GJ struktur a jejich partnerské vazebné molekuly (*El-Sabban M.E., J Mammary Gland Biol Neopl 2004 : 463*)



Obr. 7-9 Proteiny vážící se s konexinem 43 (Cx43) (Laird D. W., *Biochem J* 2006 : 527)

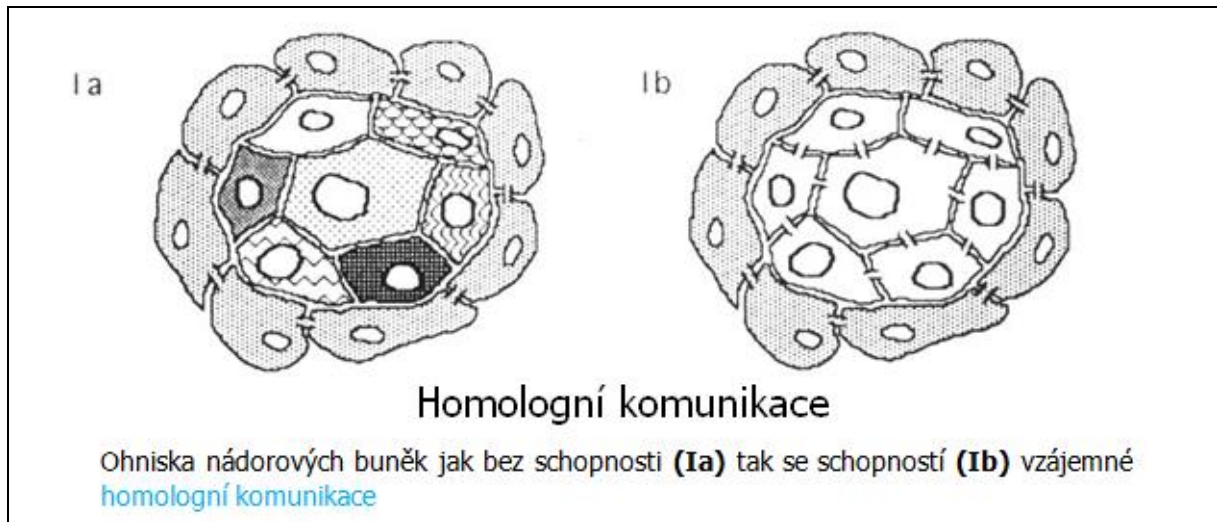


Obr. 7-10 Uspořádání spojovacích buněčných komplexů (Laird D. W., *Biochem J* 2006 : 527)

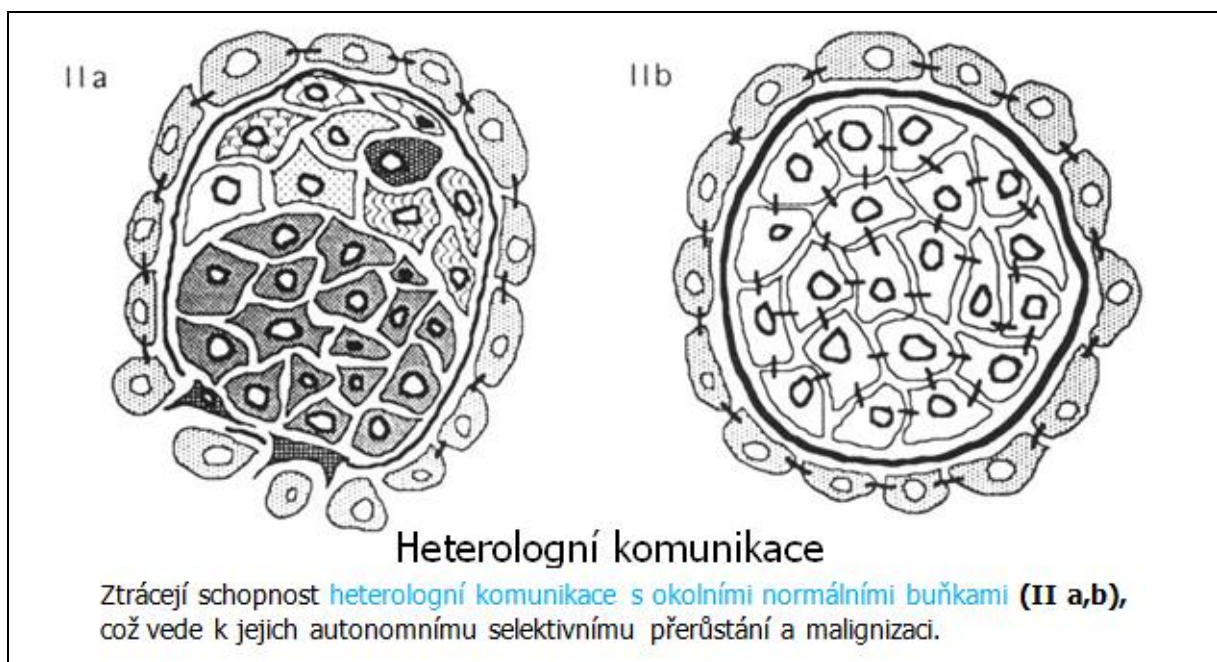
Mnoho nádorů vykazuje aberantní komunikaci zprostředkovanou buněčnými kontakty, tj. ztrácí GJ komunikaci mezi sebou nebo s okolními normálními buňkami nebo vykazují abnormální expresi rozpoznávacích molekul. Snížená exprese těchto molekul je často spojena se zvýšenou metastatickou schopností nádorů. Porušená GJIC v nádorech nemusí být nutně spojena s aberantní funkcí adhezivních molekul, což předpokládá další regulační mechanismy pro GJ. Předpokládá se, že konexinové geny fungují jako nádorově supresorové geny, kdežto geny pro adhezivní molekuly působí jako supresory metastáz.

Selektivní absence **heterologní GJIC** (spíše než homologní) hraje významnou úlohu v klonální expanzi nádorových buněk (obr. 7-11 a 7-12). Obnovení heterologní komunikace mezi transformovanými a normálními buňkami prokázala nádorově supresorové účinky. Pokusy

s transfekcí konexinových genů ukázaly, že určité nádorové buňky jsou defektní v expresi těchto genů, ale že selektivní absence GJIC je porušována jinými mechanismy.



Obr. 7-11 Úloha ztráty heterologního typu GJIC v karcinogenezi – Homologní komunikace



Obr. 7-12 Úloha ztráty heterologního typu GJIC v karcinogenezi – Heterologní komunikace (*Kratovskikh V. and Yamasaki H., Histol Pathol 1997 : 761*)

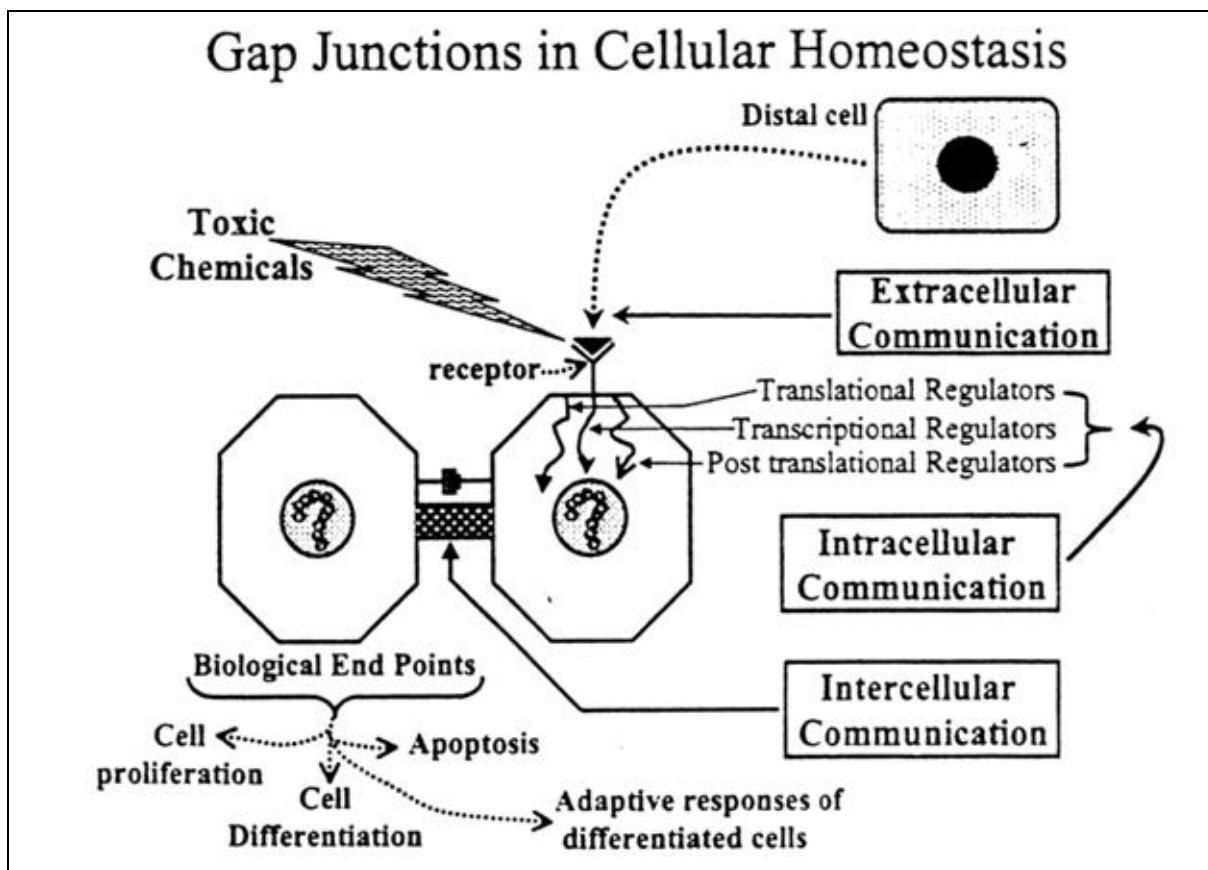
Jak a kdy jsou během mnohastupňové karcinogeneze porušovány funkce GJ a buněčných adhezivních molekul je stále předmětem zkoumání. Existují dva základní mechanismy:

- přímé účinky na geny;
- defekt na funkční úrovni.

To naznačuje, že jak genotoxické tak negenotoxické karcinogeny mohou indukovat takové změny, a že defekty mohou vznikat v různých stádiích karcinogeneze.

Poruchy GJIC vedoucí k deregulaci růstu a k neoplasii by mohly být integrujícím faktorem, který propojuje všechny teorie karcinogeneze dohromady. GJIC má totiž zásadní roli při **udržování tkáňové homeostázy** (obr. 7-13) a existuje řada důkazů na podporu její zásadní úlohy v tomto procesu.

- pro většinu nádorových buněk je charakteristická dysfunkce homo- nebo heterologní komunikace
- většina nádorových promotorů inhibuje (reverzibilně) GJIC
- růstové faktory a hormony mající nádorově promoční účinky inhibují GJIC
- onkogeny jako jsou ras, raf, src mohou snižovat GJIC
- nádorově supresorové geny zvyšují GJIC
- transfekce nádorových buněk konexinovými geny obnovuje GJIC a růstovou regulaci těchto buněk
- “antisense” geny pro konexiny mohou snižovat GJIC
- protinádorové látky a chemopreventivní agens zvyšují GJIC
- konexinové geny fungují jako nádorově supresorové geny
- GJIC jsou důležité pro adaptivní odpověď i apoptózu.



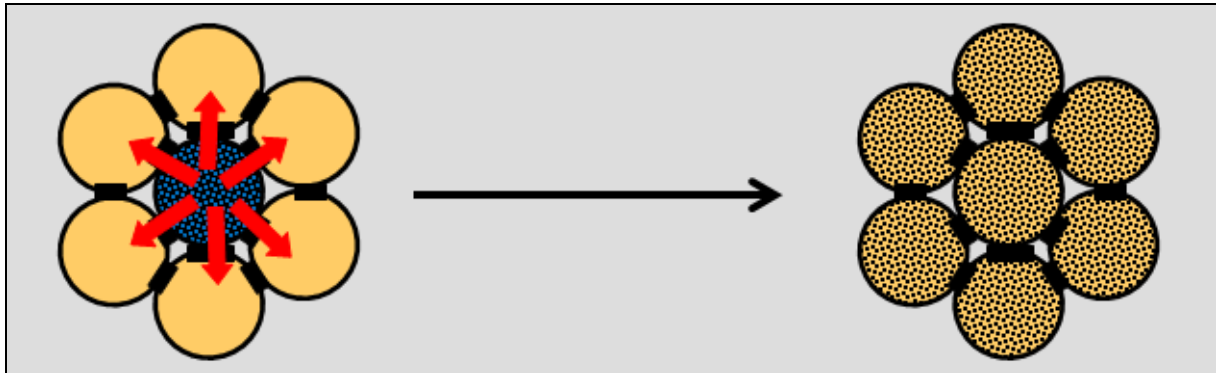
Obr. 7-13 „Gap junctions“ v buněčné homeostáze (Trosko, J.E. et al., *Toxicol. Lett* 1998 : 71)

Řada **nádorových promotorů inhibuje GJIC a indukuje buněčnou proliferaci**. To vysvětluje roli těchto promotorů v klonálním růstu iniciovaných buněk ve smyslu uvolnění takových buněk z růstové kontroly okolních normálních buněk. Různé typy nádorových promotorů však mohou působit různými mechanismy: TPA působí v době připojení konexinu k buněčné membráně, fenobarbital působí na úrovni mRNA pro konexin apod.

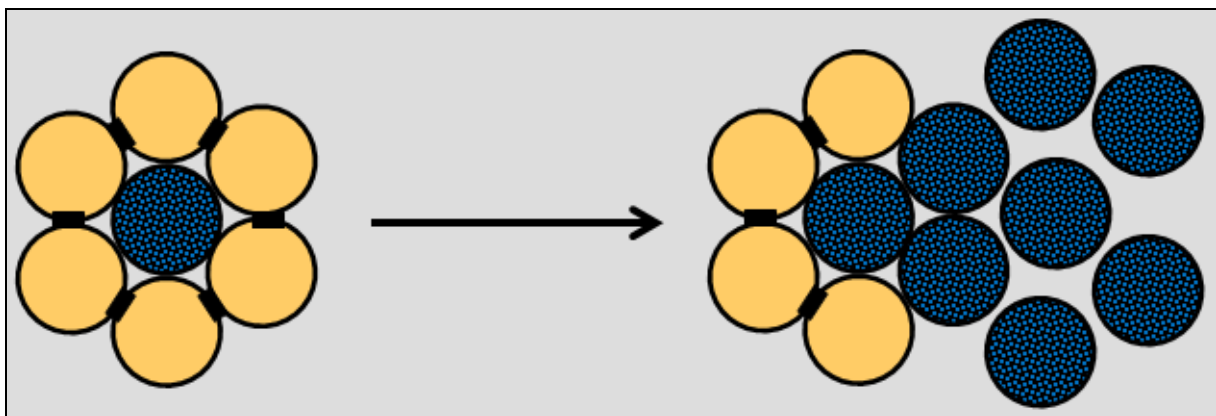
Snižování GJIC exogenními chemickými promotory nebo endogenními růstovými faktory nebo hormony vyžaduje překročení prahové dávky a stálé, pravidelné chronické působení. U všech známých epigeneticky a negenotoxicky působících látek existují **prahové hodnoty**, pod nimiž je buňka schopna obnovovat svůj původní stav bez osudových důsledků. Je jasné, že také různé typy chemikálií mají své prahové hodnoty pro modulaci GJIC a cytotoxicitu a že také různé živočišné druhy a různé typy buněk reagují na tutéž látku různě. Další důkazy o účasti blokování komunikace v nádorové promoci pocházejí ze studia účinků antipromočních látek na GJ.

Mezibuněčná komunikace je mechanismem kontroly růstu (obr. 7-14 až 7-17). Když se buňky setkají s vnějším faktorem, k prvnímu kontaktu dochází na membráně. Účinek pak mu-

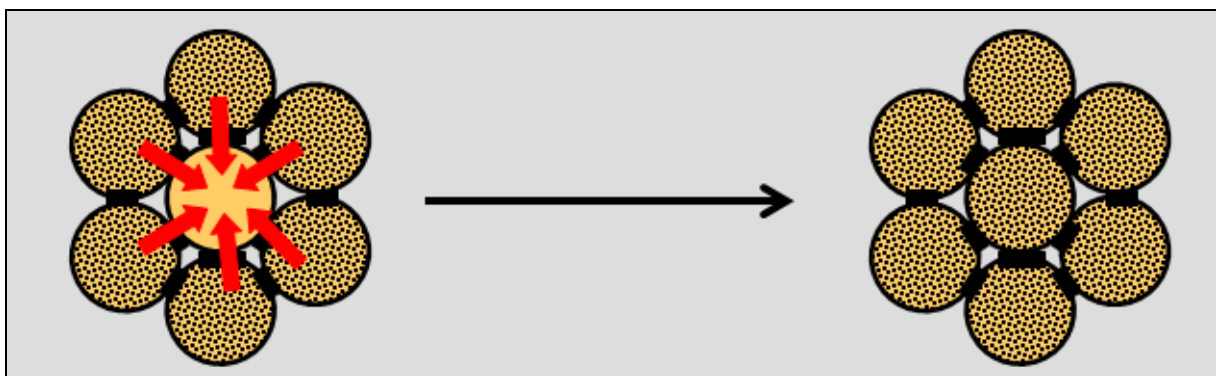
sí být přenesen do jádra různými cestami. Porušení kontaktu buněk seškrábnutím monovrstvy indukuje buněčný růst spojený s expresí genů, jako jsou c-fos. Také exprese jaderných onkogenů v-myc, v-fos může být inhibována okolními buňkami. Není však jasné jak mezibuněčný kontakt reguluje geny kontroly růstu, zda indukcí genomové instability nebo působením na určité body buněčného cyklu.



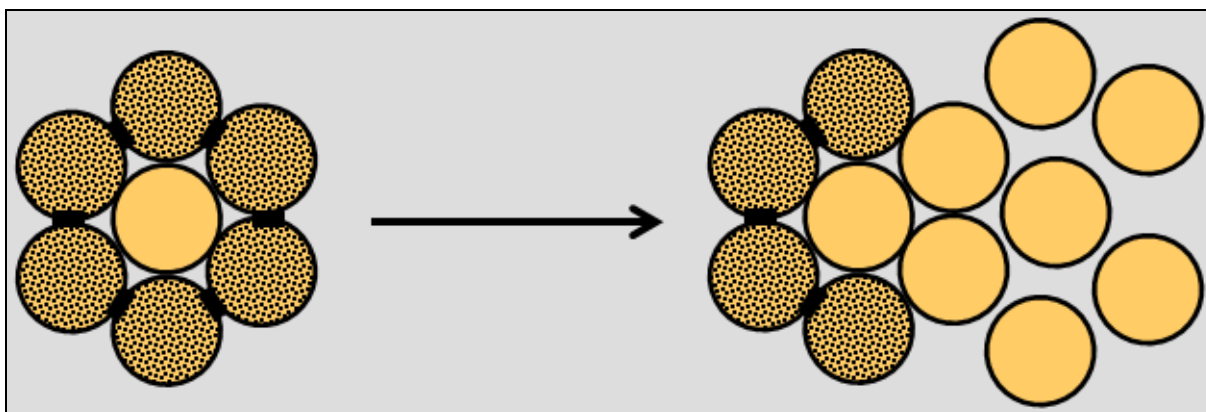
Obr. 7-14 Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ) – Růstově stimulační signál 1. Růstově stimulační signál difunduje do sousedních buněk přes GJ a dosahuje substimulační úrovně.



Obr. 7-15 Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ) – Růstově stimulační signál 2. K difúzi signálu nedochází u buněk postrádajících GJ a je zahájeno buněčné dělení.



Obr. 7-16 Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ) – Růstově inhibiční signál 1.
Růstově stimulační signál difunduje do sousedních buněk přes GJ a zabraňuje buněčnému dělení.



Obr. 7-17 Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ) – Růstově inhibiční signál 2.
Signál se nešíří do buněk postrádajících GJ a dochází k buněčnému dělení.

Nádorové promotory mohou indukovat genomovou nestabilitu inhibicí GJIC, např. TPA indukuje amplifikaci genů a mutace. Mnoho nádorů vykazuje defekty ve schopnosti mezibuněčné komunikace a zvýšenou genomovou nestabilitu. Je u nich rovněž zvýšená amplifikace genů. Dá se usuzovat, že v genomové nestabilitě je zahrnuta transdukce signálu a protože druzí poslové v ní zahrnutí jsou distribuovány pomocí GJ, blokování GJ může ke genomové nestabilitě přispět.

GJ hrají úlohu v buněčném cyklu (exprese konexinu předchází začátku syntézy DNA). Bylo ukázáno, že mitotické buňky komunikují s klidovými buňkami pomocí GJ. Ale komunikační schopnost mitotických buněk je menší než u klidových. To znamená, že inhibice GJ může zahájit buněčný cyklus jen v úzkém rámci, asi na přechodu G1-S fáze, jak ukázaly pokusy s molekulárními probami na cykliny.

Kromě vzájemného rozpoznávání buněk a GJ zahrnuje síť mezibuněčných komunikací také humorální stimuly, jako jsou růstové faktory a hormony. Buňky komunikují jiným způsobem a v současnosti se předpokládá mechanismus zvaný „**juxtacrine communication**“, kde humorální komunikace funguje jen, jsou-li heterologní buňky v kontaktu. Protože tato komunikace se účastní kontroly růstu, může hrát roli i v karcinogenezi.

Kontrolní otázky k tématu:

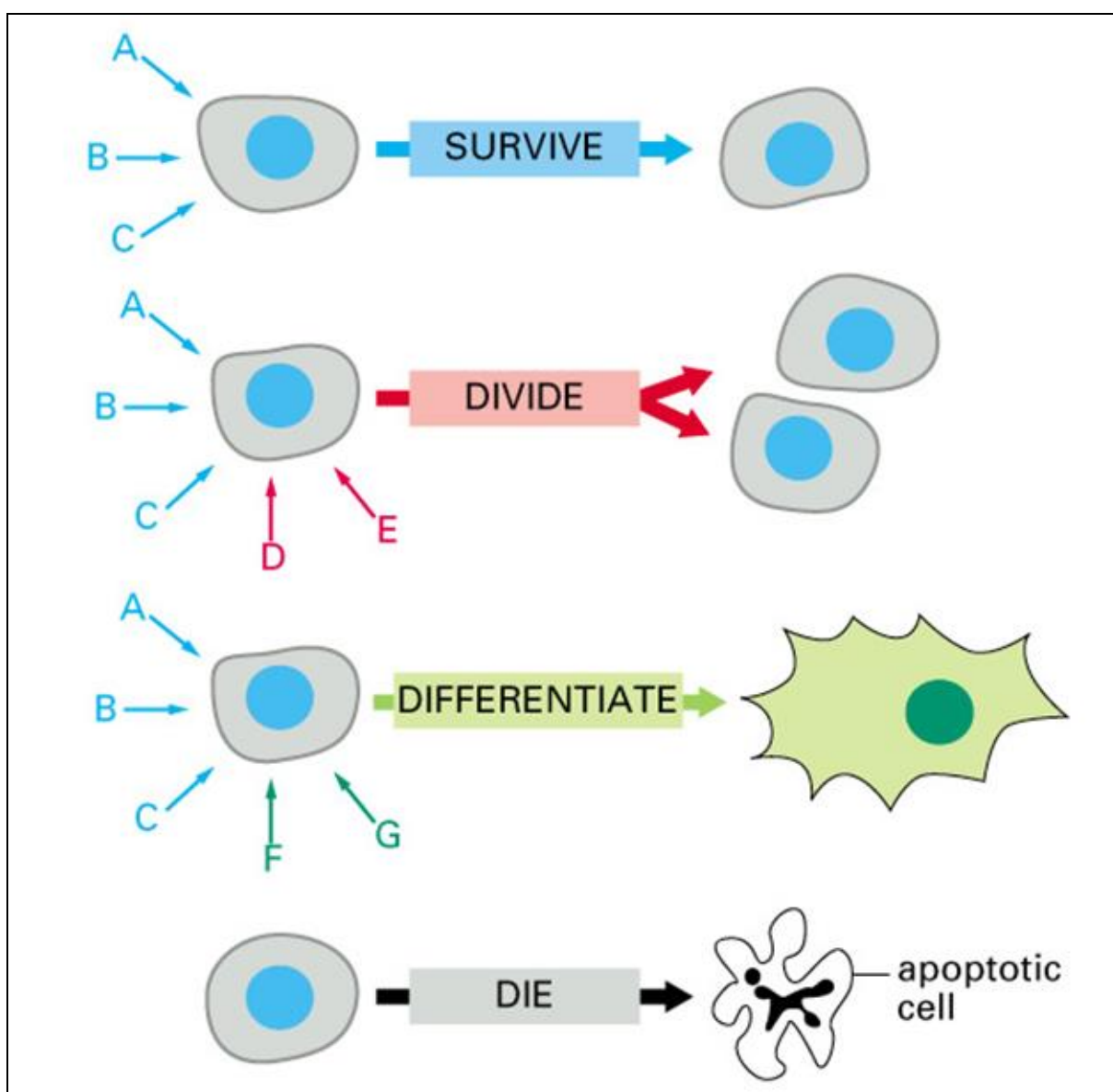
- Jaké základní typy signálů ovlivňují chování buněk v buněčných populacích?
- Jaké typy komunikace zahrnujeme mezi mezibuněčné interakce?

- Jakou úlohu hrají mezibuněčné kontakty v karcinogenezi a jakými typy mechanismů působí?
- Co jsou to „gap junctions“? Popiš jejich tvorbu a složení.
- Jaké typy GJ rozeznáváme?
- K jakým změnám GJIC dochází u nádorových buněčných populací?
- Jaké účinky na GJ mají nádorové promotory, růstové faktory, hormony a onkogeny?
- Jak lze obnovit činnost GJ u nádorových buněk a s jakými důsledky?
- Jaký charakter má snižování GJIC nádorově promočními látkami?
- Kontroly kterých buněčných procesů se GJIC účastní?
- Jaký je vztah mezi GJ a ostatními typy kontaktů a komunikací buněk?

8. PORUCHY PROLIFERACE, DIFERENCIACE A APOPTÓZY

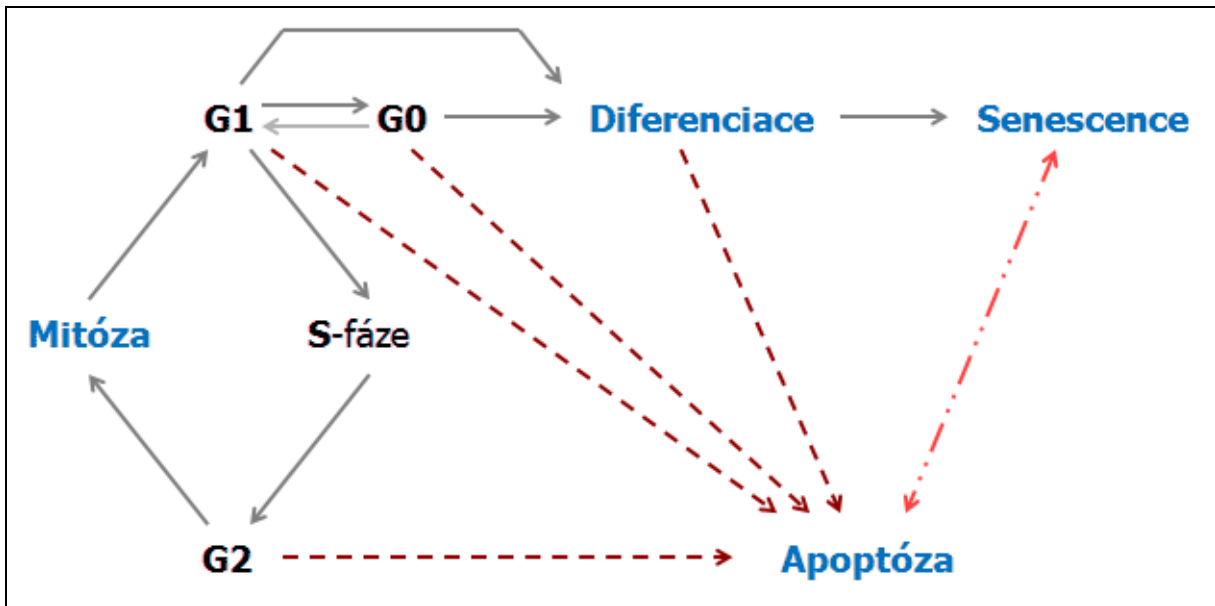
8.1 ROVNOVÁHA V BUNĚČNÝCH POPULACÍCH

Rovnováha v buněčných populacích je udržována přesnou regulací procesů proliferace (bun. cyklus), diferenciace a apoptózy. Vývoj tkání savců se uskutečňuje v prostředí regulačních růstových faktorů. Ty ovlivňují řadu parametrů buněčného vývoje jako je přežívání, proliferace, diferenciace. Řada aspektů chování buněk je ovlivňováno **rovnováhou mezi stimulačními a inhibičními signály** s různým stupněm specifity. Přesný účinek daného faktoru je určován buněčným typem, koncentrací faktoru, přítomností jiných podnětů apod. (obr. 8-1).



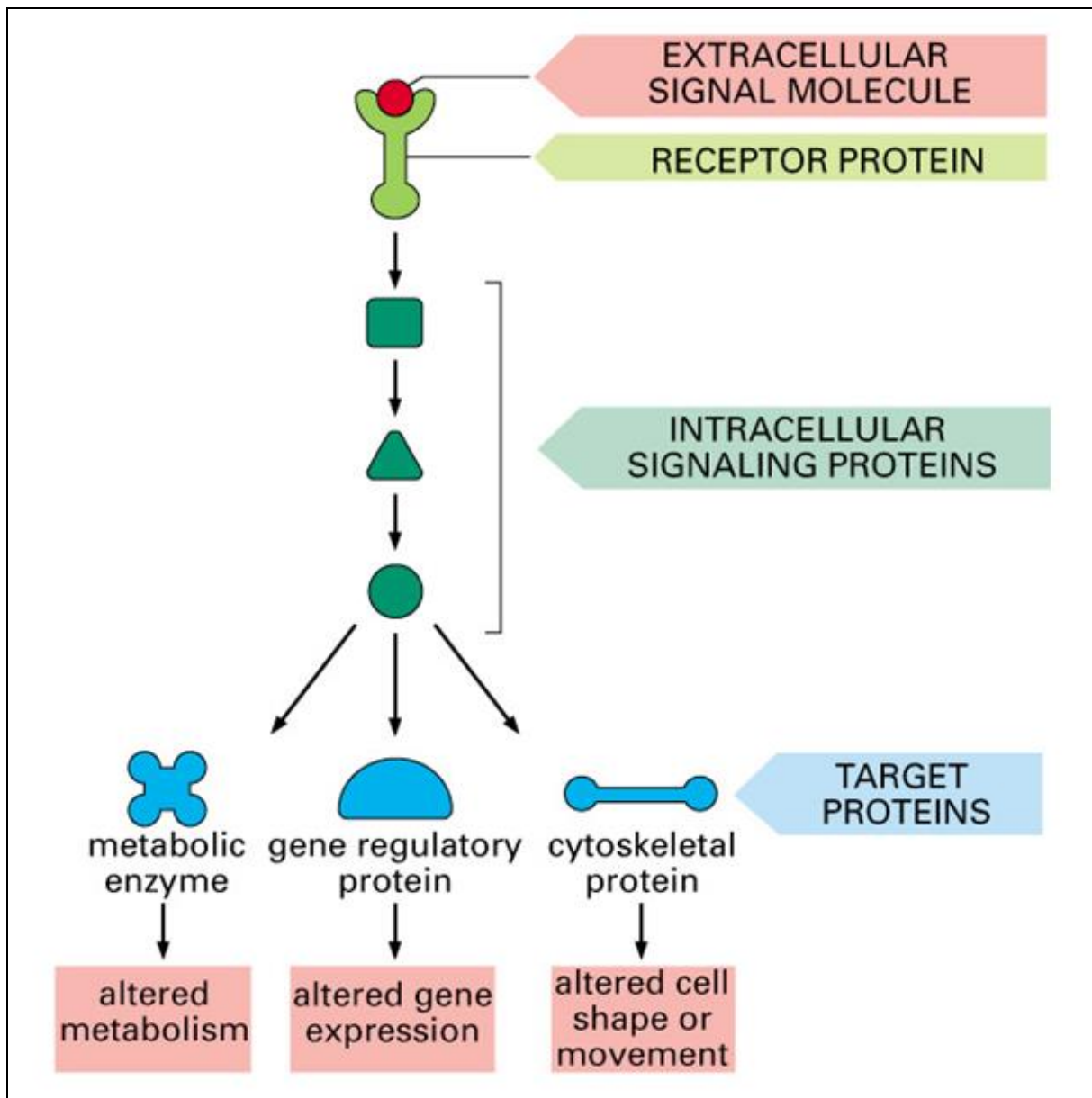
Obr. 8-1 Závislost živočišné buňky na mnohonásobných mimobuněčných signálech (*Figure 15-8. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Aktivace/deaktivace různých drah zajišťuje rovnováhu mezi proliferací, diferenciací a apoptózou. Jejich deregulace podporuje tvorbu nádorů (obr. 8-2).



Obr. 8-2 Rovnováha v buněčných populacích je udržována přesnou regulací procesů proliferace (buněčný cyklus), diferenciací a apoptózy

Klasicky se specifický růstový stimul přenáší do buňky přes aktivaci transmembránových receptorů, které modulují klíčové proteiny v cytoplazmě. Ty pak na oplátku ovlivňují rozhodnutí kontrolující proliferaci, diferenciací a apoptózu změnami v genové expresi a reaktivitě na ostatní faktory (obr. 8-3).

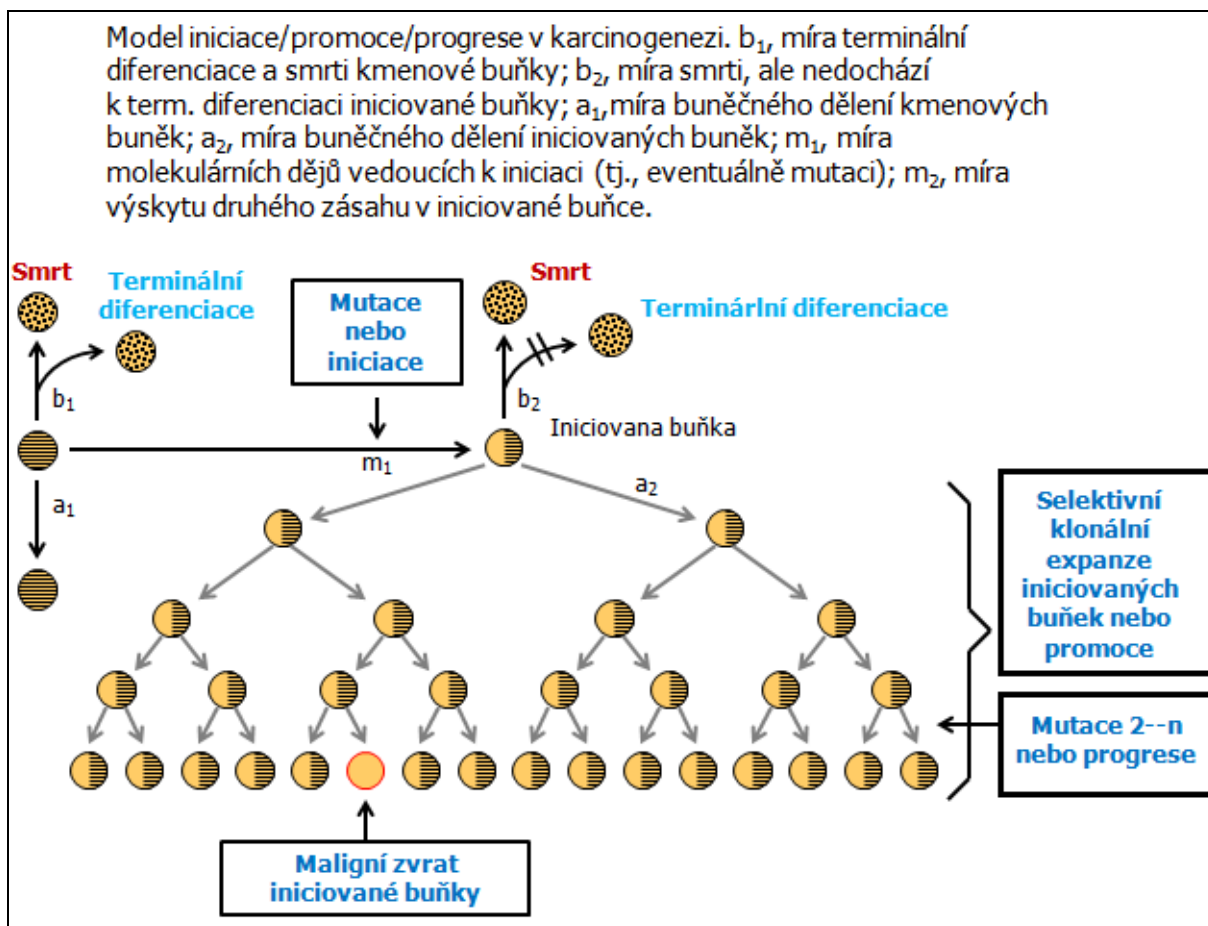


Obr. 8-3 Zjednodušené schéma vnitrobuněčné signální dráhy aktivované mimobuněčnou signální molekulou (*Figure 15-1. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Některé faktory mohou fungovat **extra- i intracelulárně** a tato vlastnost koreluje s karcinogenitou. Aberantní produkce sekretovaných růstových faktorů může hrát rozhodující roli v karcinogenezi zvýšením proliferace a stupně buněčné autonomie a rozšířením oblasti pro expanzi nádoru.

Základní hierarchickou strukturu procesu vývoje a udržování tkání můžeme pozorovat při **náhradě pokožky, střevního epitelu a krvevorných systémů obratlovců**. Tyto tkáně patří k intenzívně proliferujícím buněčným populacím, které se obnovují celý život. Limitovaný počet **multipotentních kmenových buněk** se během embryogeneze snižuje a vzniká větší populace více vývojově určených **progenitorových buněk**. Ty dále proliferují a produkují

funkčně zralé postmitotické buňky, které nahrazují přirozený úbytek příslušného buněčného typu. **Kmenové buňky jsou schopny sebeobnovy**, kterou nahrazují ty buňky, které dále diferencovaly. Je nutné, aby byla zachována **přísná rovnováha počtu a typů buněk** v příslušných kompartmentech. Jestliže dojde k odtržení jinak koordinovaných procesů proliferace (sebeobnovy) a diferenciaci, vznikají nádory (obr. 8-4).



Obr. 8-4 Model iniciace/promoce/progrese v karcinogenezi (podle Trosko J.E. and Chang Ch., *Mutation Research* 2001: 219)

8.2 TEORIE KMENOVÝCH BUNĚK

Jednu z hlavních teorií karcinogeneze představuje tzv. **teorie kmenových buněk**. Totipotentní kmenová buňka je buňka, která může dát vznik všem buňkám v mnohobuněčném organismu, jako je oplodněné vajíčko nebo raná embryonální buňka. Brzy po embryonálním vývoji, některé buňky částečně diferencují v pluripotentní kmenové buňky. Z nich pak vznikají různé třídy buněk pro několik různých orgánů (např. slinivku a játra). Během dalšího vývoje jsou některé buňky omezeny tak, aby z nich vznikalo jen málo buněčných typů, stávají se z nich určitým způsobem předurčené (tzv. „committed“) buňky. Konečným výsledkem je produkce

terminálně diferencovaných buněk (spermie, vajíčka, keratinocyty, červené krvinky, neurony atd.).

Podobně i zmíněná teorie karcinogeneze vychází z existence kmenové buňky (nejpravděpodobněji pluripotentní nebo komitované). Vychází z pozorování, že každý nádor se jeví ve svém původu jako monoklonální, tj. přes všechny genotypové a fenotypové rozdíly se všechny buňky nádoru vytvořily z jedné původní kmenové. **Nádor je výsledkem mnohočetných genetických, epigenetických a negenotoxických změn, kdy normální buňky s kontrolovaným růstem a schopností terminálně diferencovat ztrácí tyto schopnosti a zároveň získávají schopnost rozšiřovat se do jiných tkání v těle – metastázovat.**

Základní předpoklad zmíněné teorie karcinogeneze je, že kmenová buňka je nesmrtelná. Smrtnou se stává při indukci terminální diferenciaci. Normální kmenové buňky se dělí "asymetricky", tj. jedna dceřinná buňka zůstává jako kmenová a druhá získává schopnost terminálně diferencovat. S tím souvisí domněnka, že prvním krokem v karcinogenezi je imortalizace buňky, která se pak může neomezeně dělit a není schopna diferencovat.

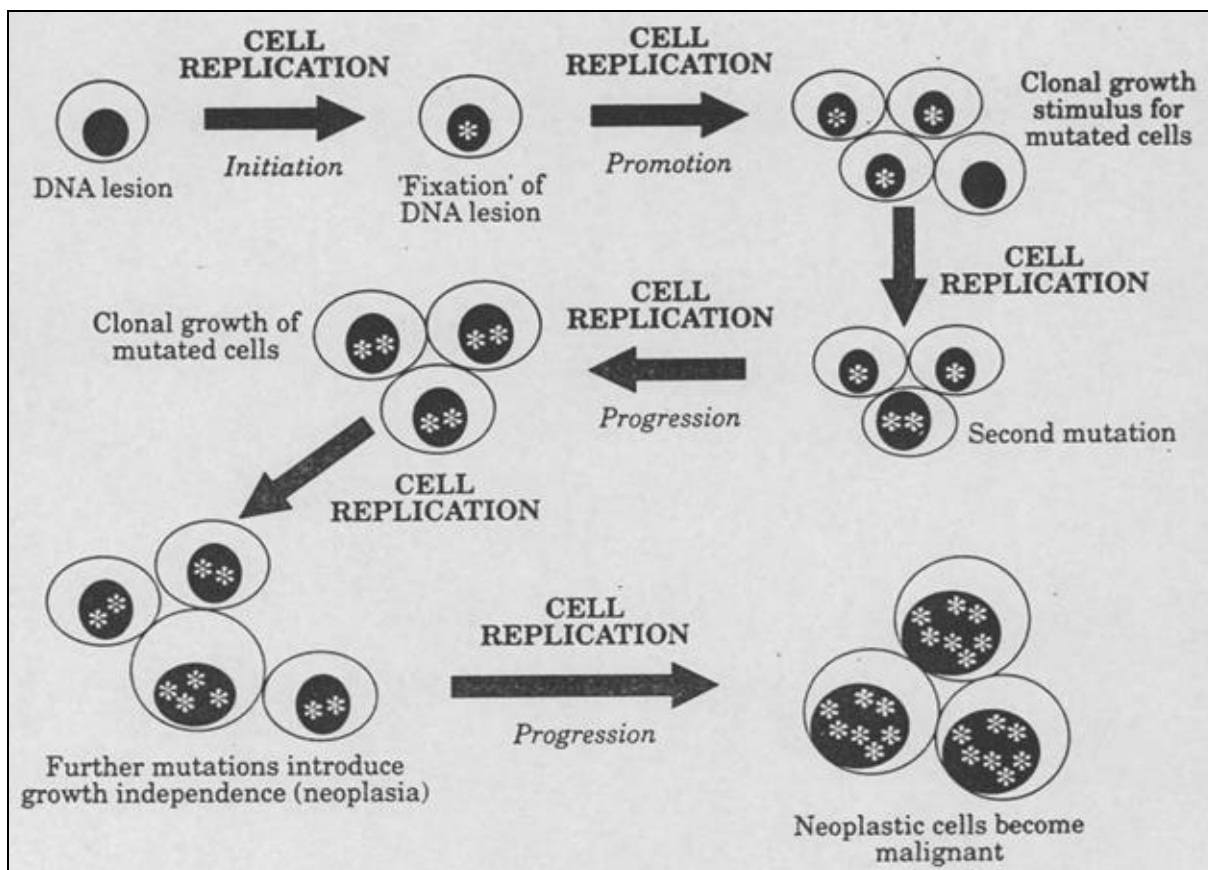
8.3 VÝZNAM BUNĚČNÉHO DĚLENÍ A DIFERENCIACE

Nádorové onemocnění je to stupňovitý proces, který vzniká ze složitých genetických změn vedoucích k deregulaci buněčné proliferace. *Rakovina je tedy především proliferativní chorobou.*

Dělení je základním dějem v životě buňky. Řetěz dějů, který vede k replikaci DNA a k dělení buňky má 4 základní části:

- vznik signálu,
- rozpoznání signálu,
- přenos signálu
- odpověď.

Buněčné dělení hraje klíčovou úlohu v každém stadiu vývoje nádorů a je zcela zřejmé, že **zvýšená proliferace může zvyšovat riziko malignity**. Je důležitá pro fixaci poškození DNA, usnadňuje mutagenezi (výskyt a fixace mutací), umožňuje klonální namnožení iniciované buňky a po vzniku dalších mutací je na ní závislý přechod od neoplastické populace k malignitě (obr. 8-5).

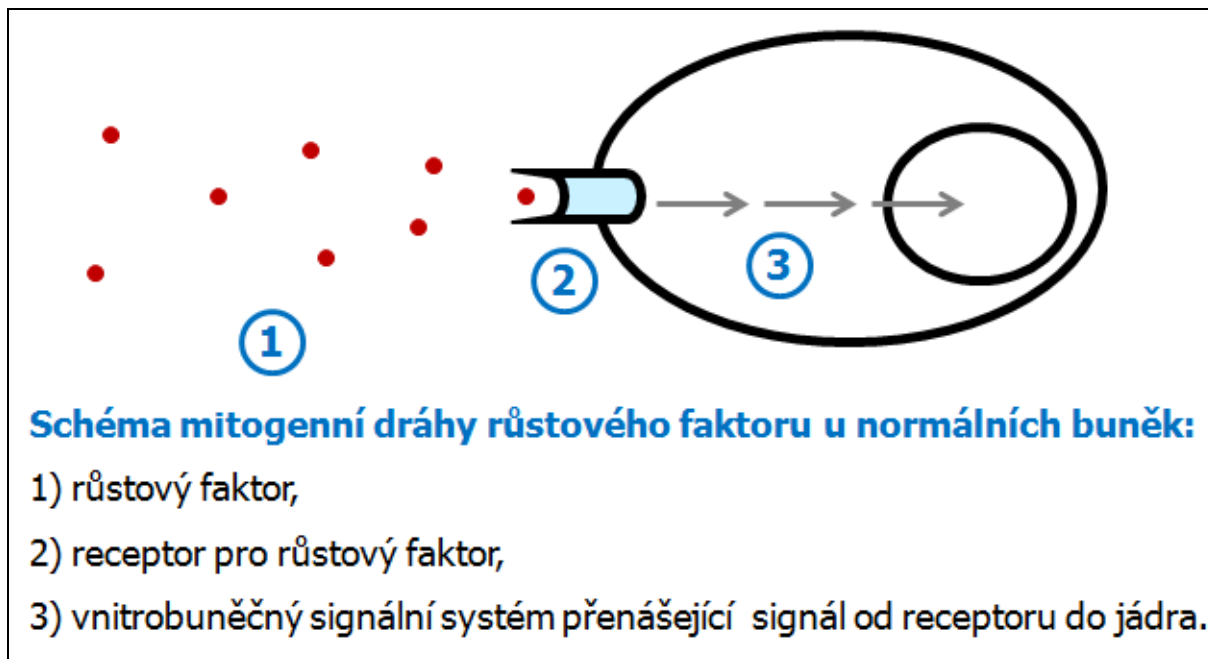


Obr. 8-5 Úloha buněčné replikace v mnohastupňovém procesu karcinogeneze (Foster J.R., *J Comp Pathol* 1997 : 113)

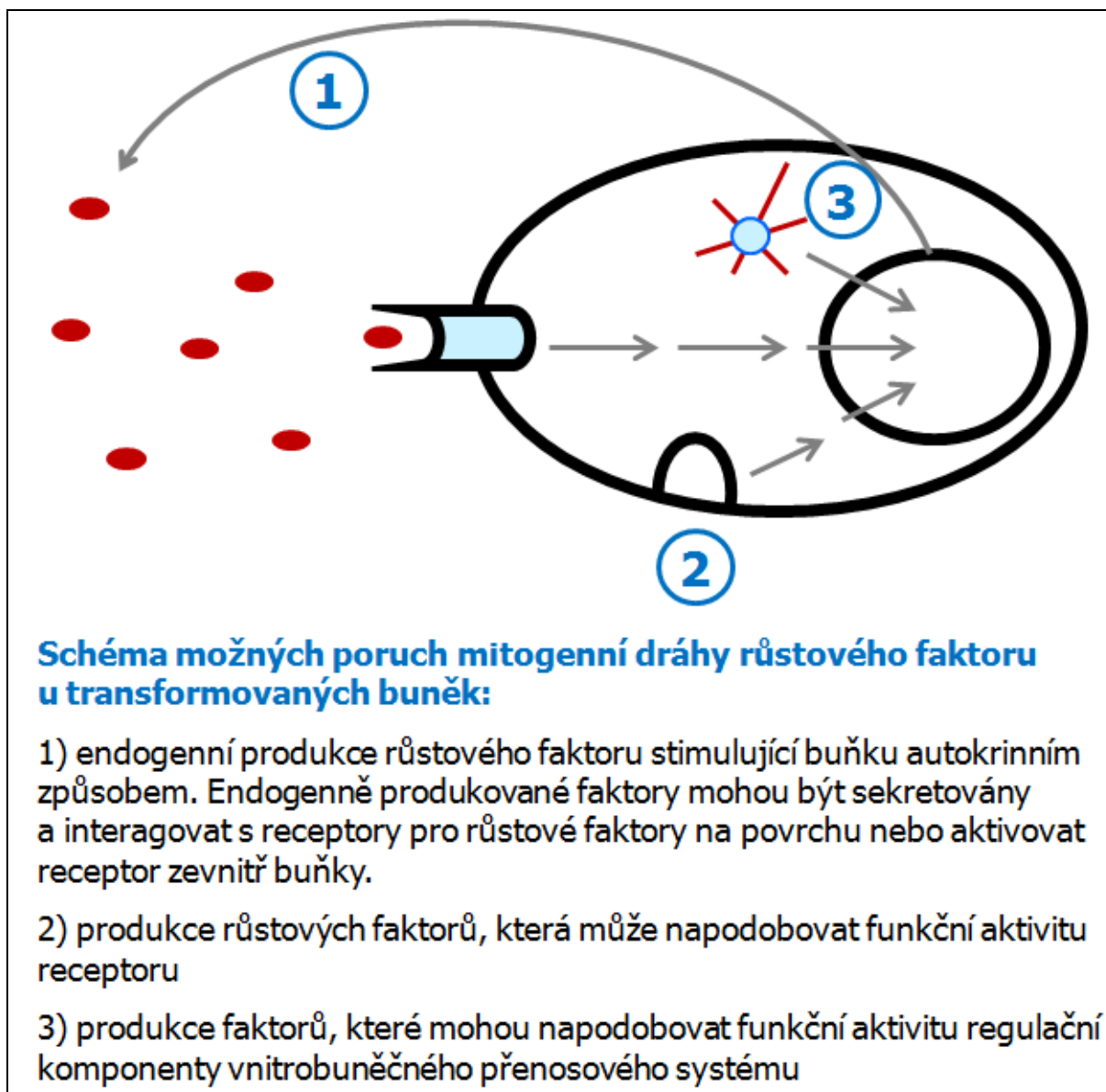
Kromě toho lze na malignitu pohlížet jako na **poruchu diferenciaci**, protože malignita vzniká z kmenových buněk v důsledku **maturačního bloku** nebo může dojít rovněž k **dediferenciaci** zralých buněk, které si zachovaly schopnost proliferace.

Třetím významným procesem, jehož poruchy ovlivňují vznik nádorů je **programovaná buněčná smrt-apoptóza**.

Aktivace mitogenní cesty růstových faktorů je tedy nutným, ale ne dostačujícím jevem (obr. 8-6a, 8-6b). *V terminálně se diferencujících systémech jako např. v hemopoéze musí ještě dojít k diferenciacnímu bloku. Za normálních okolností je během diferenciaci omezována autonomní buněčná proliferace posunutím buněk z populace produkující růstové stimulační faktory k typu buněk produkující místo toho inhibiční faktory. Následně vede blok v diferenciaci k nádorovému růstu pouhým udržením produkce růstově stimulačních autokrinních faktorů.*



Obr. 8-6a Mechanismus mitogeneze v normálních buňkách



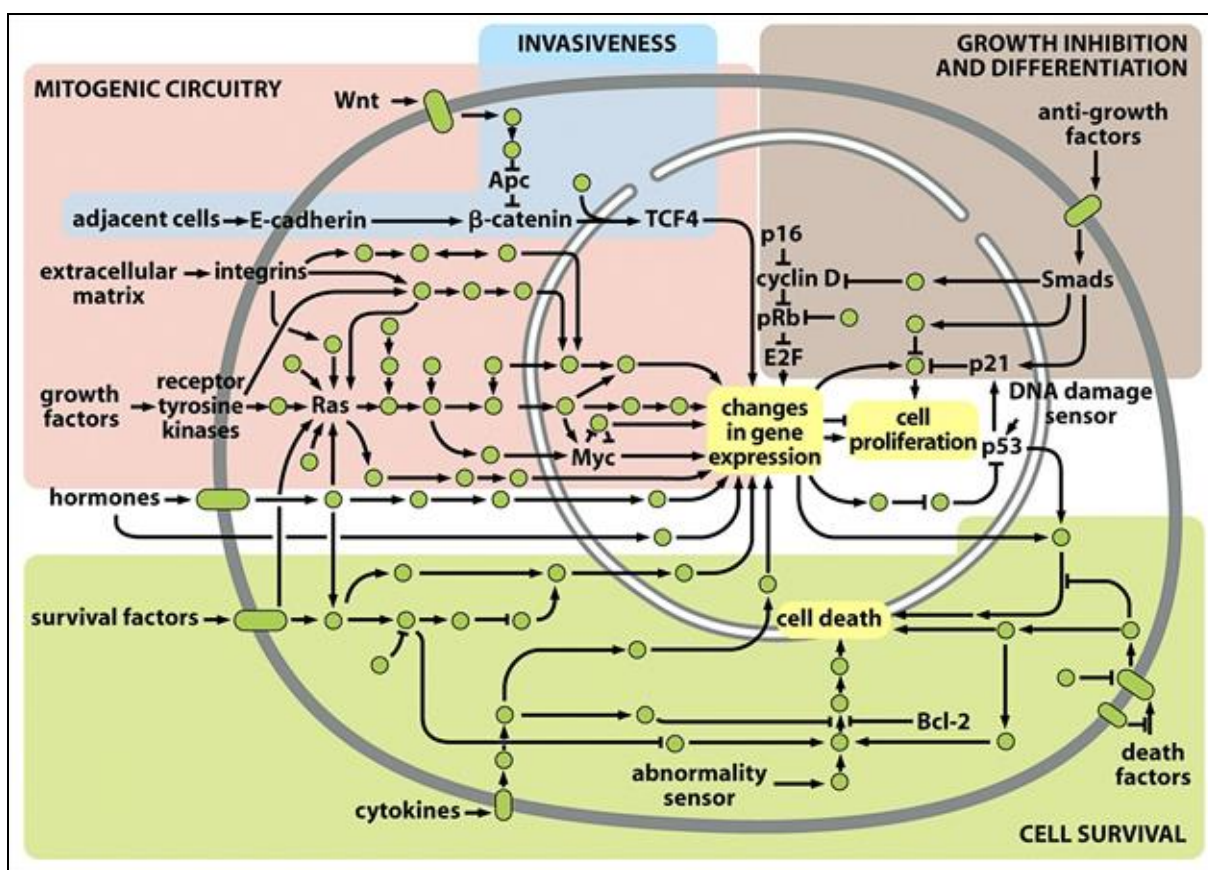
Obr. 8-6b Mechanismus mitogeneze v transformovaných buňkách

Buňky se stávají nádorovými, protože **nejsou schopny diferencovat** v odpověď na příslušné vývojové signály a tak ztrácejí schopnost zastavit produkci růstově stimulačních faktorů a aktivovat dráhy přenosu signálu růstově inhibičních faktorů (např. exprese receptorů pro TGF- β apod.) produkovaných diferencovanými buňkami. Většina nádorů má defekt v diferenciaci kmenové buňky. Proto jeden z klíčů porozumění nádorovému onemocnění spočívá v lepším pochopení toho, jak diferenciacie ovlivňuje produkci klíčových růstových regulačních molekul, včetně růstových faktorů a receptorů. Zástava diferenciacie může nastat i na dalších stupních vývoje progenitorových buněk.

Získáním informací o tom, jak je během diferenciacie regulována exprese klíčových regulačních genů lze vytvořit nový cíl pro efektivnější nádorovou terapii.

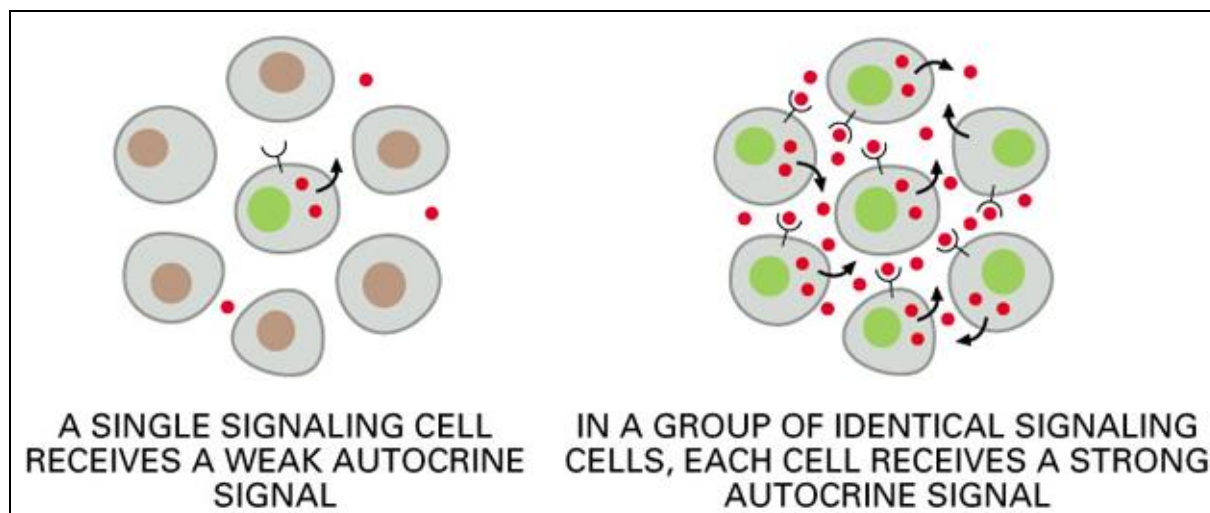
Vývoj malignity zahrnuje genetické změny, které porušují normální rovnováhu mezi růstem a diferenciací. Existuje několik způsobů rozpojení normální kontroly růstu a diferenciaci a několik způsobů, jak se z buňky stane maligní. **Embryonální tkáně** rychle rostou a exprimují řadu protoonkogenů. Jak embryonální nebo kmenové buňky zrají, exprese se ztrácí, ale exprimují se nové protoonkogeny. Jestliže klidová buňka vchází znovu do buněčného cyklu dochází ke zvýšené regulaci asi 60 genů (včetně protoonkogenu c-fos, jun, c-myc), jejichž produkty fungují jako regulátory transkripce. Terminální diferenciaci je někdy doprovázena zvýšenou regulací rodiny proteinů *ras*.

Funkce protoonkogenů je základem průchodu buněčným cyklem, ale tyto geny se liší u různých buněčných typů. Průchod buňčným cyklem je závislý hlavně na prahu růstových signálů tvořených paralelními cestami, spíše než na striktním pořadí exprese jednotlivých protoonkogenů. Zde je i oblast pro vznik chyb a abnormální růst je výsledkem aberantního produktu onkogenu dávajícího vznik stálému nebo zvýšenému růstovému signálu, který posune rovnováhu z klidového do aktivního stadia buněčného cyklu (obr. 8-7).



Obr. 8-7 Signální dráhy v buňce napodobující integrované obvody. Aktivace/deaktivace různých drah zajišťuje rovnováhu mezi proliferací, diferenciací a apoptózou. Jejich deregulace podporuje tvorbu nádorů. (Figure 11.44. *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

8.4 AUTOKRINNÍ REGULACE

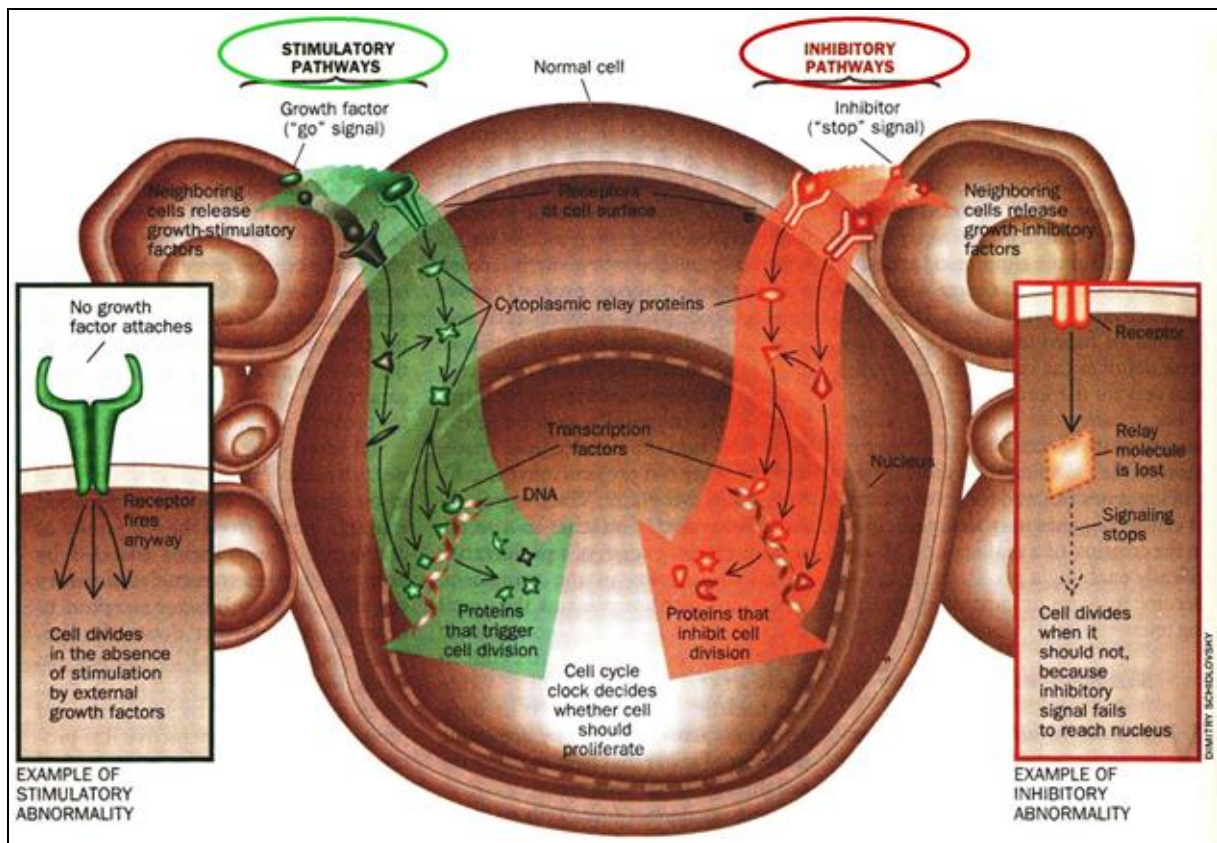


Obr. 8-8 Autokrinní signál (*Figure 15-6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Existuje řada způsobů, kterými mohou růstové faktory přispívat k pozdějším stadiím vývoje nádoru po transformačním ději. Nejběžnější je vytvoření **autokrinní růstové odpovědi**, při níž buňky exprimují a jsou stimulovány mitogenním faktorem a tak se stávají méně závislé na prostředí okolních buněk. Jedná se o neplánovanou produkci růstových faktorů buňkami ne-soucími odpovídající receptory nebo s aberantní expresí receptorů. Některé faktory mohou fungovat mimo- i vnitrobuněčně a tato vlastnost koreluje s možnou ontogenicitou. Tato **autokrinní smyčka** slouží normálně pouze přechodně k urychlení nebo znásobení odpovědi a je kontrolována jak vnitřním buněčným programem, tak mimobuněčnými signály.

Vytvoření autokrinní růstové odpovědi přispívá k vytvoření autonomní nádorové populace a je dosti obecným jevem řady nádorových linií. Avšak jsou i jiné úrovně, na nichž mohou růstové faktory *in vivo* působit. Např. okolní buňky mohou reagovat na růstový faktor produkci jiných faktorů stimulujících proliferaci transformovaných buněk. Některé faktory mají též schopnost indukovat rozšíření cév vedoucích ke zdroji faktoru, přispívají k vaskularizaci nádoru a tím k lepší výživě a expanzi.

8.5 RŮSTOVÉ REGULÁTORY V KARCINOGENEZI



Obr. 8-9 Signální dráhy v normálních buňkách a jejich možné abnormality (Weinberg R.A., *Scientific American* 1996 : 62)

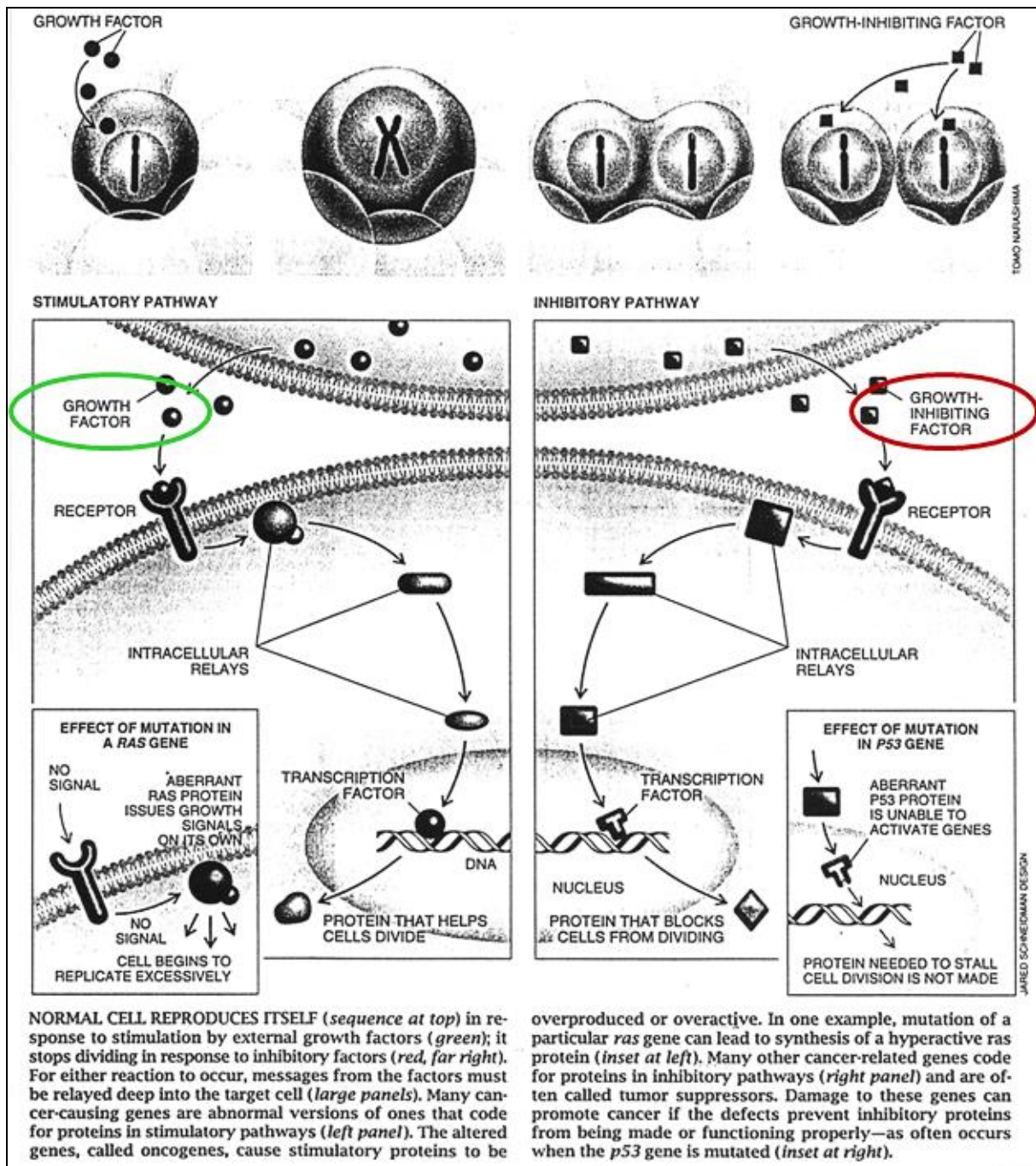
Lidské nádorové buňky konstitutivně produkují řadu růstových faktorů, cytokinů, chemoatraktantů, proteolytických enzymů a jejich inhibitorů. Sousedící normální buňky, jako jsou **fibroblasty, endoteliální buňky a monocyty** tvořící okolní mikroprostředí, **jsou též potenciálním zdrojem většiny těchto faktorů**, ale vyžadují specifický signál k zahájení syntézy nebo uvolňování aktivních faktorů.

Jednotlivé nádorové linie sekretují nadbytek růstových faktorů a cytokinů, avšak různé **autokrinní a parakrinní okruhy** jejich působení nejsou dostatečně definovány.

Biologická aktivita každého faktoru závisí na tom, zdali

- je exprimován jako latentní prekursor a vyžaduje aktivaci,
- vyžaduje uvolnění z vazebného proteinu,
- je biologicky aktivní bez další aktivace.

Biochemická povaha jednotlivých faktorů produkovaných normálními a nádorovými buňkami se většinou neliší, ale liší se velmi regulace jejich exprese (obr. 8-10).



Obr. 8-10 Odpověď buňky na růstově stimulační a inhibiční signály a její poruchy v karcinogenezi
(Cavenee W.K. and White R.L., *Scientific American* 1995 : 50)

Stimulace růstu normálních a maligních buněk, angiogeneze a tvorba stromatu u maligních poruch, degradace tkáně invazivními nádorovými buňkami, pohyb buněk, uvolňování a přichycování nádorových buněk – to vše zahrnuje **interakci mezi autokrinními, parakrinními a endokrinními faktory**.

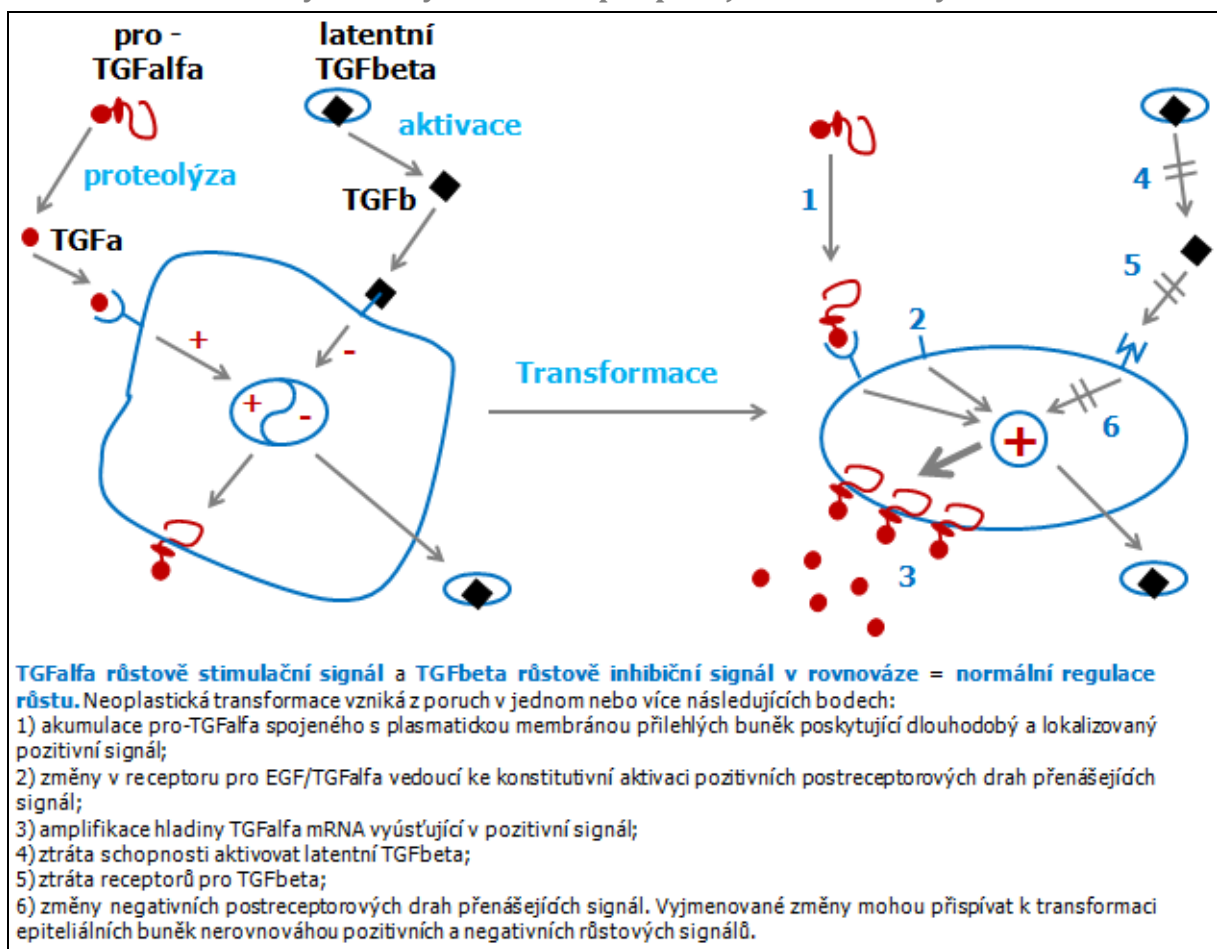
Komplexní biologické aktivity nádorových buněk jsou regulovány řadou faktorů produkovaných maligními buňkami nebo sousedícími normálními buňkami. **Kritická je vzrůstající**

nezávislost na exogenních signálech, která způsobuje přechod z neinvazivního do invazivního a metastázuujícího fenotypu.

Endogenní a exogenní faktory modulují expresi tkáňově degradačních enzymů a jejich inhibitorů, stejně jako buněčné povrchové struktury zahrnuté v přenosu signálů a interakcích buňka-buňka nebo buňka-substrát. Je třeba zdůraznit, že k buněčnému růstu a invazi přispívá interference různých produktů nádorových i normálních buněk.

Nádorové buňky produkují řadu růstových faktorů a cytokinů bez předchozí exogenní stimulace – vzniká autokrinní smyčka.

Příklady růstových faktorů podporujících nádorový růst:



Obr. 8-11 Pozitivní/negativní růstová kontrola epiteliálních buněk

- **TGF alfa (tumor growth factor)** – vykazuje sekvenční homologii s EGF (epidermal growth factor) s vazbou na stejný receptor EGFR. Je produkován řadou karcinomů a působí autostimulačně pro kolorektální, prsní i plicní karcinomy.
- **basic FGF (fibroblast growth factor)** – je produkován normálními i maligními buňkami mesodermálního a neuroektodermálního původu, např. melanomy.

- **Insulin-like faktor** – má autokrinní funkci u nádorů kolonu, plic, pankreatu či neuroblastomů.
- **PDGF (platelet growth factor)**- produkován řadou lidských nádorů. Je mitogenem pro fibroblasty a endoteliální buňky.
- **TGF beta** – rodina dimerických proteinů, které kontrolují růst a diferenciaci řady buněčných typů. Je produkován v latentní formě a musí být aktivován. Tento faktor však s výjimkou stimulace růstu fibroblastů inhibuje růst řady typů buněk mezenchymálního původu, myeloidních buněk, epiteliálních, lymfoidních a endoteliálních buněk. Účinkuje na sekreci proteolytických enzymů a proteinů extracelulární matrix.

8.6 ANTIPROLIFERAČNÍ MOLEKULY

Existuje rovněž řada molekul, které jsou schopny působit na určité typy buněk antiproliferačně. Tyto látky představují pole pro protinádorový výzkum. Patří k nim např. právě TGF beta, který může mít jak růstově podpůrnou, tak růstově inhibiční funkci v závislosti na buněčném typu a podmínkách. Stimuluje proliferaci buněk mezenchymálního původu indukcí exprese *c-sis* protoonkogenu, který kóduje PDGF-like protein. Naopak *inhibuje proliferaci buněk epiteliálního původu, endoteliálních buněk, B lymfocytů a thymocytů a indukuje diferenciaci řady buněčných typů*. U endoteliálních buněk ovlivněných TGFbeta je redukována exprese EGF receptoru a tak buňka není schopna odpovídat na mitogenní signál EGF. Zatímco buňky retiny jsou normálně citlivé k antimitogennímu působení TGFbeta, nádorové buňky retinoblastomu neexprimují TGF beta receptory a tak unikají negativní kontrole. Dalším endogenním antiproliferačním proteinem je např. interferon gamma.

Kontrolní otázky k tématu:

- Jak je udržována rovnováha v buněčných populacích?
- Které tkáně patří k intenzívně proliferujícím buněčným populacím a jak jsou charakterizovány?
- Jaký význam má při vývoji nádoru buněčné dělení?
- Které další procesy hrají významnou úlohu v nádorovém procesu?
- Vysvětlete pojem autokrinní regulace.
- Jakou úlohu hrají v rozvoji nádorového onemocnění molekuly typu růstových regulatorů? Jmenujte příklady.
- Existuje interakce mezi nádorovými a okolními normálními buňkami? Jaký má význam?

9. HORMONÁLNÍ KARCINOGENEZE

9.1 ENDOGENNÍ FAKTORY

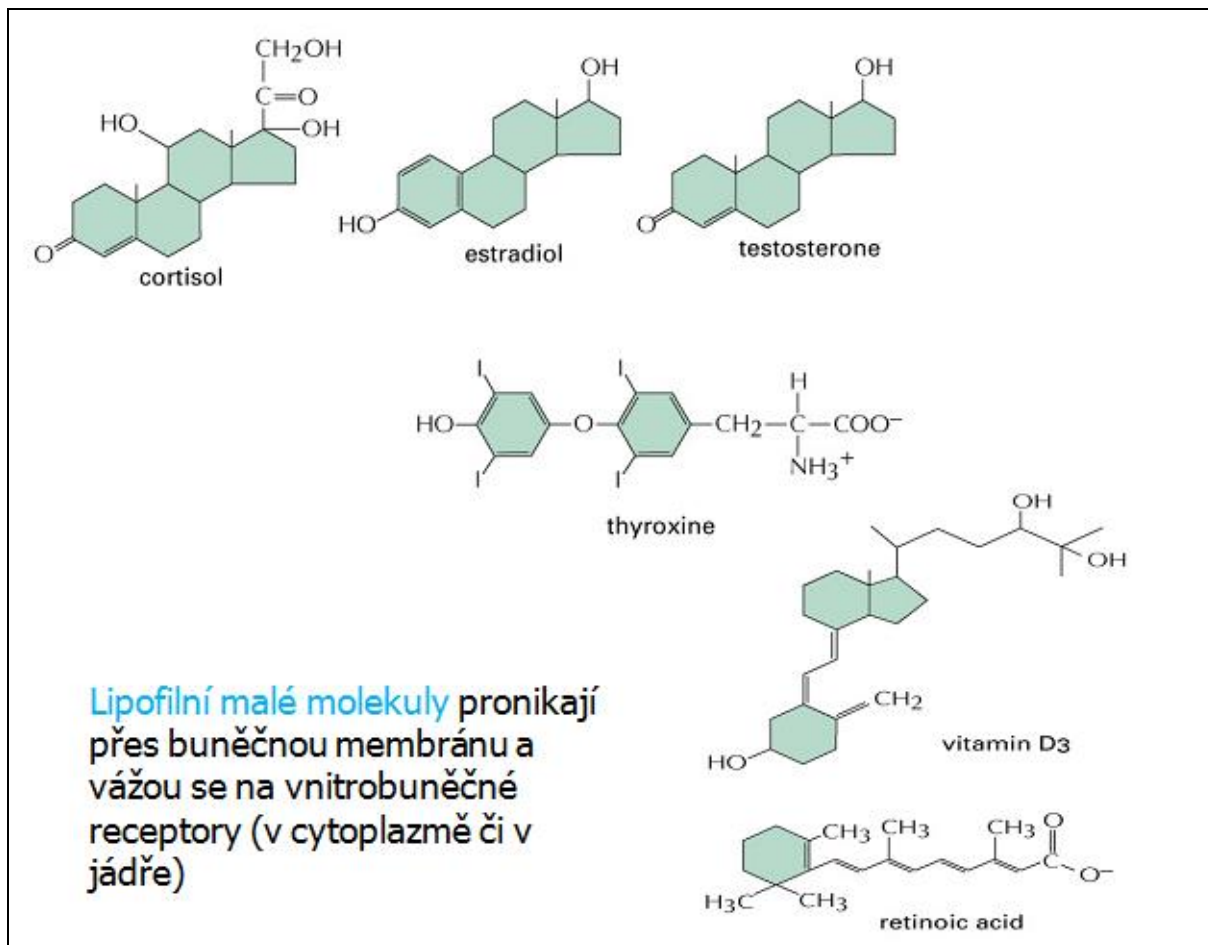
V současné době se ukazuje velký podíl **faktorů prostředí na vzniku lidské neoplasie**. Největší podíl připadá na potravu a kouření, ale významnou roli hrají též infekční látky, expozice průmyslovými látkami a zářením. S výjimkou kouření jako přímé příčiny vývoje plicního karcinomu a karcinomu močového měchýře není přesný mechanismus a podíl dalších faktorů úplně jasný.

Kromě toho musíme brát v potaz i endogenní faktory. Řada chemických sloučenin produkovaných v organismu může být karcinogenních (např. produkty oxidativního metabolismu). Bez výjimky jsou klasifikovány jako promoční na základě jejich funkce v regulaci genové exprese. Jejich působení na buněčnou replikaci a genovou expresi je reverzibilní, což zajišťuje maximální pružnost při udržování homeostázy v organismu.

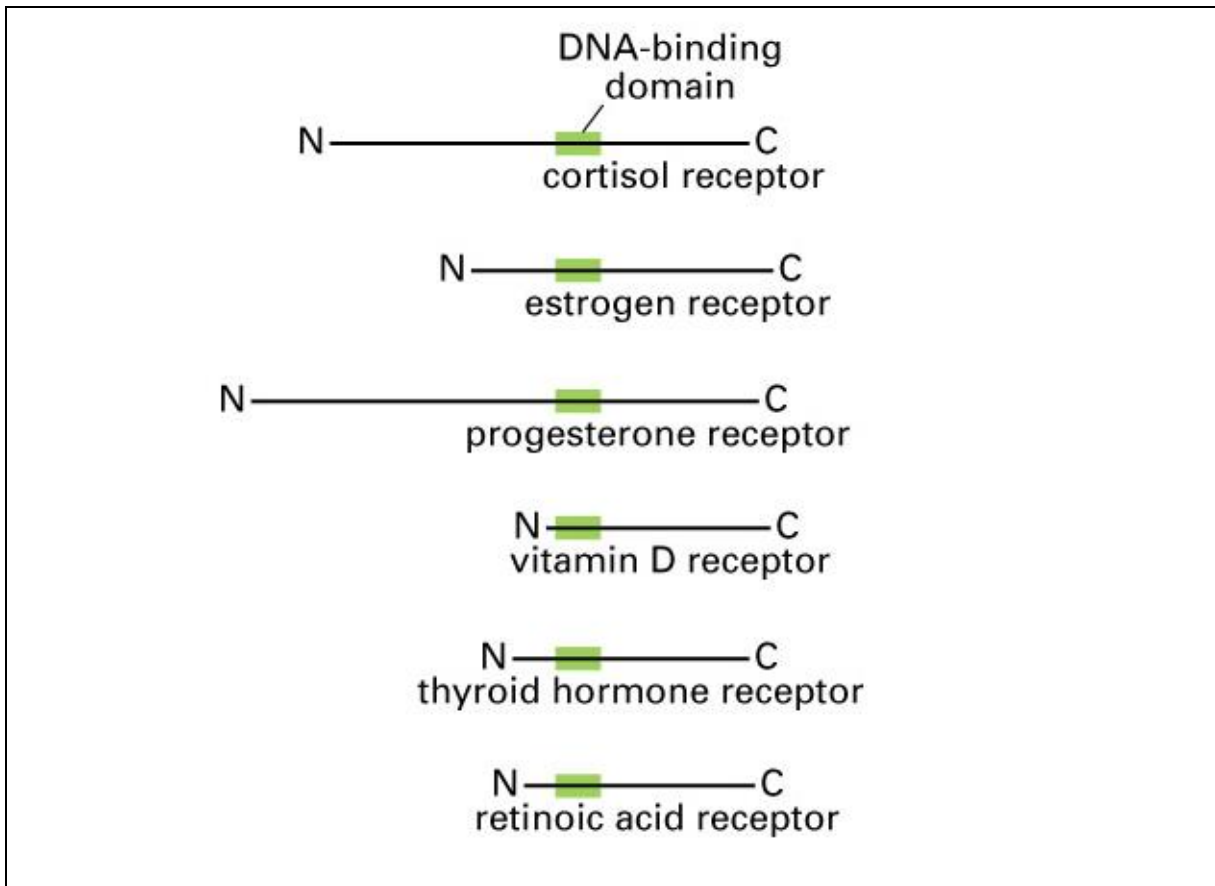
Je také prokázáno, že **endogenní pohlavní steroidy a řada žlučových kyselin** produkovaných v gastrointestinálním traktu hraje důležitou roli v lidské karcinogenezi. Vysoké dávky estrogenů aplikované zvířatům vyúsťují v rakovinu ledvin. Endogenní prolaktin je významným faktorem vývoje neoplasie u řady živočišných druhů, ale u člověka tato spojitost zcela prokázána nebyla. Účinnějšími karcinogeny jsou **syntetické estrogény i androgeny** (hepatokarcinogeneze). Také řada **endogenních polypeptidů** vykazuje karcinogenní účinky v různých systémech.

9.2 MECHANIZMY ENDOGENNÍCH FAKTORŮ

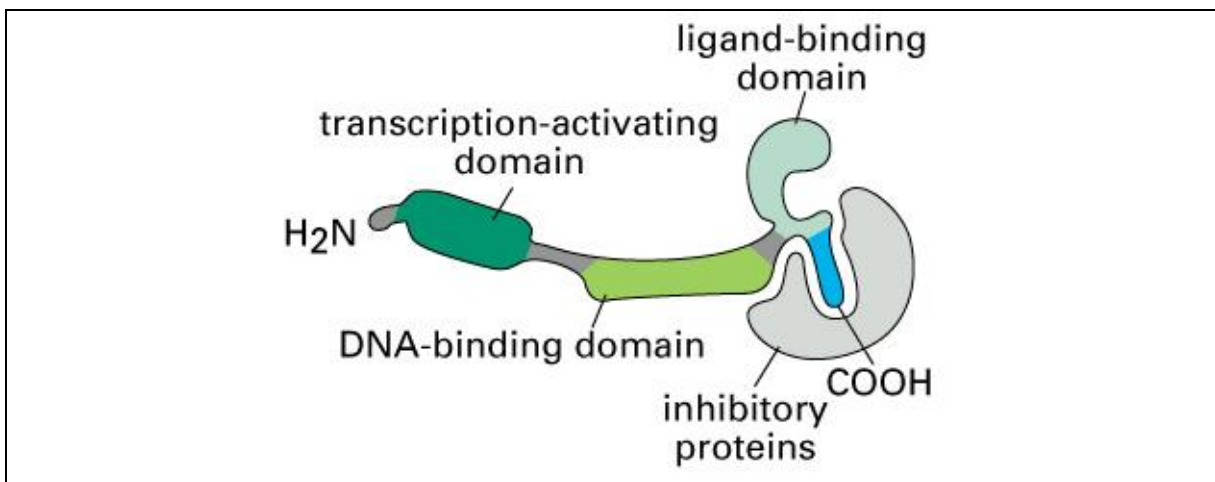
Neoplasie hormonálně závislých tkání představuje víc než 32 % nově diagnostikovaných nádorů u mužů a více než 40 % u žen. **Estrogény** a v menší míře **androgeny** jsou základní **steroidní hormony**, které mohou být karcinogenní *in vivo* (obr. 9-1). Na molekulární úrovni jsou jejich *účinky na genovou expresi zprostředkovány jejich specifickou interakcí s endogenními receptorovými proteiny produkovanými cílovou buňkou* (obr. 9-2). Komplex steroid-receptor interaguje se specifickými sekvencemi regulačních oblastí řady genů, čímž mění jejich transkripci. Jeden nebo více těchto genů je pravděpodobně důležitých v obecném mechanismu nádorové promoce zmíněnými metabolity. K takovým genům patří i ty, jejichž proteinové produkty jsou součástí mezibuněčných gap junctions. Inhibice GJIC je spojena s mechanismem nádorové promoce. Některé žlučové kyseliny inhibují GJIC v systémech *in vitro*. Avšak syntetické estrogény nevykazují inhibici GJIC v buněčných kulturách. Naproti tomu polypeptidické hormony působily inhibiči.



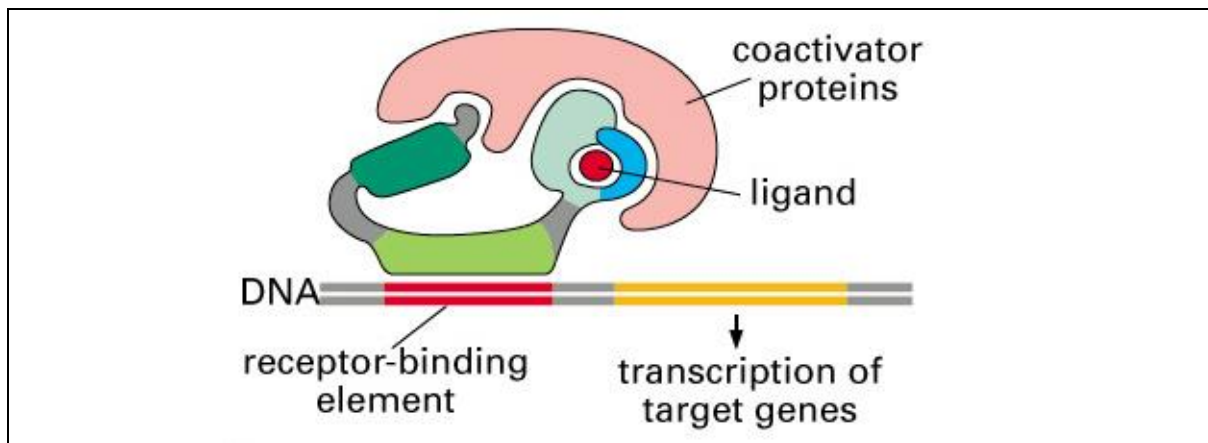
Obr. 9-1 Struktura hormonů vybužujících signál vazbou na vnitrobuněčné receptory (Figure 15-12. *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)



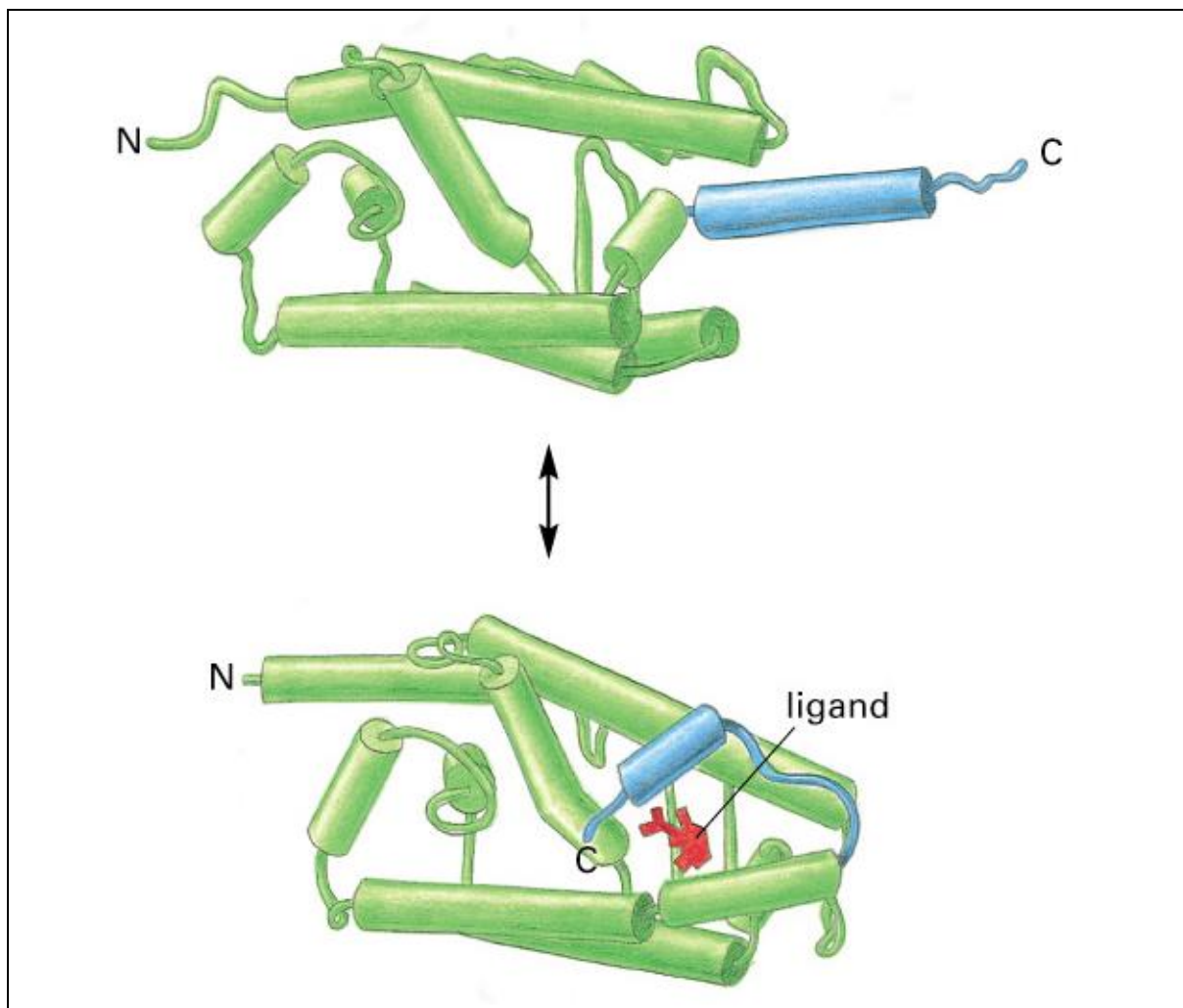
Obr. 9-2 Podobná struktura receptorů s vazebnou doménou (*Figure 15-13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)



Obr. 9-3a Receptorový protein v inaktivní formě vázán na inhibiční proteiny (*Figure 15-13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)

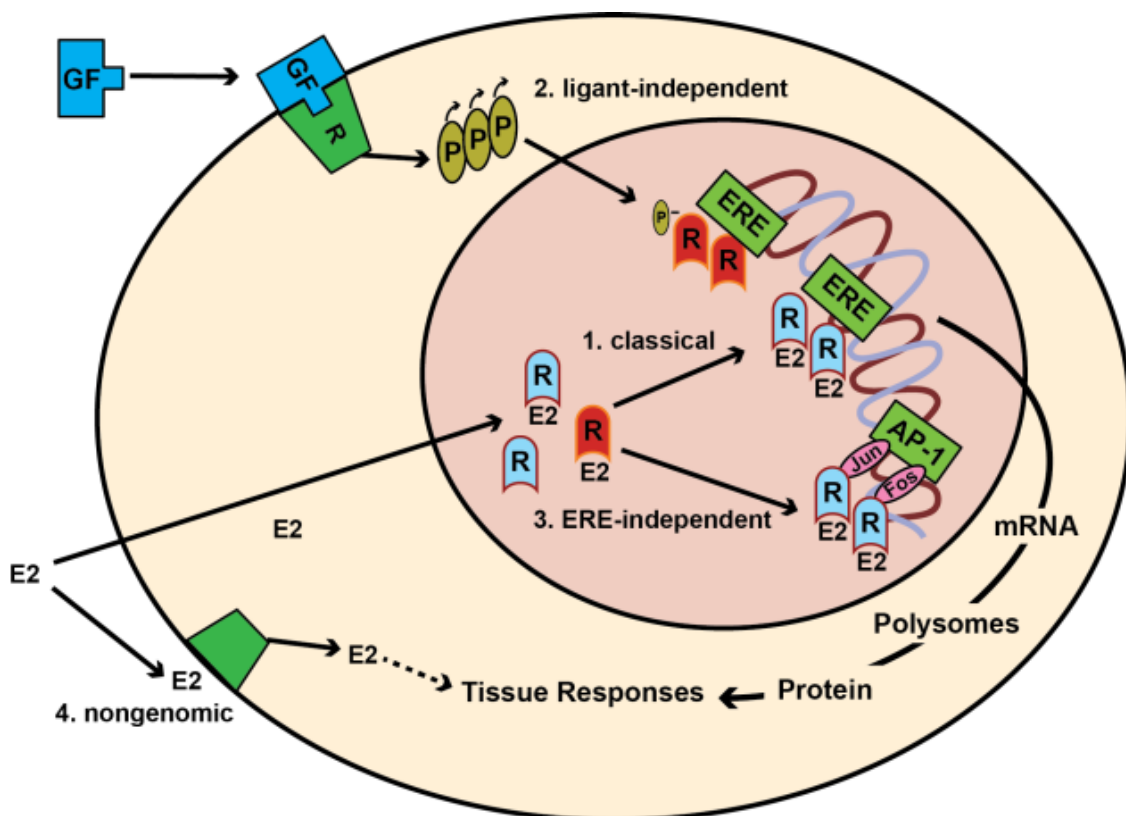


Obr. 9-3b Disociace inhibičního proteinu po vazbě ligandu a navázání koaktivátoru k doméně receptoru aktivující transkripci (*Figure 15-13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)



Obr. 9-4 Trojrozměrná struktura domény vážící ligand bez a s navázaným ligandem. Alfa helix (modře) funguje jako víčko zajišťující polohu ligandu (*Figure 15-13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)

Další gen, jehož změna exprese v odpověď na působení estrogenu může být důležitá v promočním působení, je receptor pro EGF, jehož transkripce významně vzrůstá po působení estrogenu (obr. 9-5).



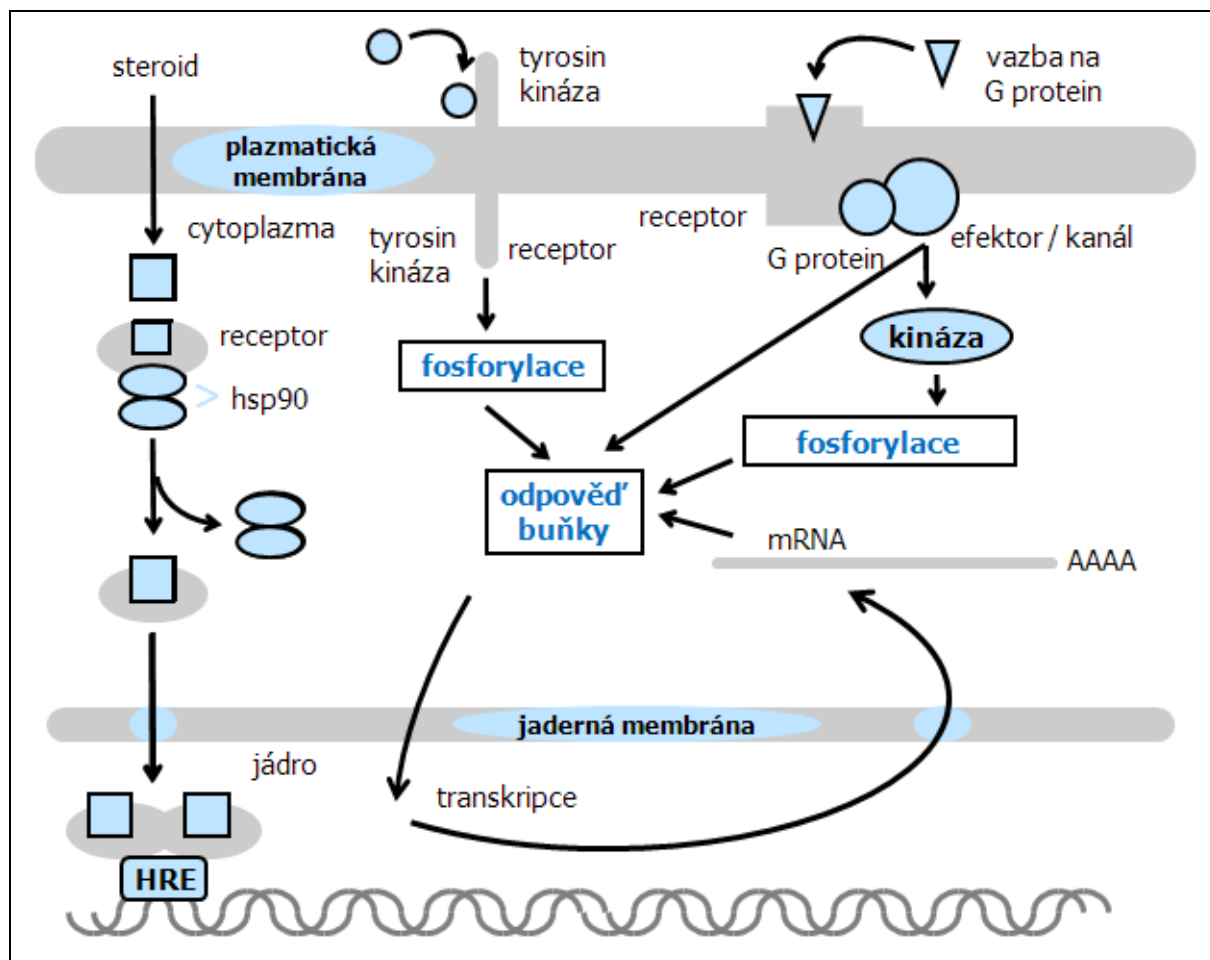
Obr. 9-5 Stimulace estrogenního receptoru. *GF* – růstový faktor, *E2* – estradiol, *R-E2* – estrogenní receptor, *ERE* – responsivní element DNA, *AP-1* – transkripční faktor

Hlavní účinek promočních látek je zvýšení rychlosti buněčné proliferace v cílové iniciované buněčné populaci. Tento účinek je jasný u specifických polypeptidických hormonů stejně jako u polypeptidových růstových faktorů. Jejich působení na iniciovanou buňku je silnější než na buňku normální.

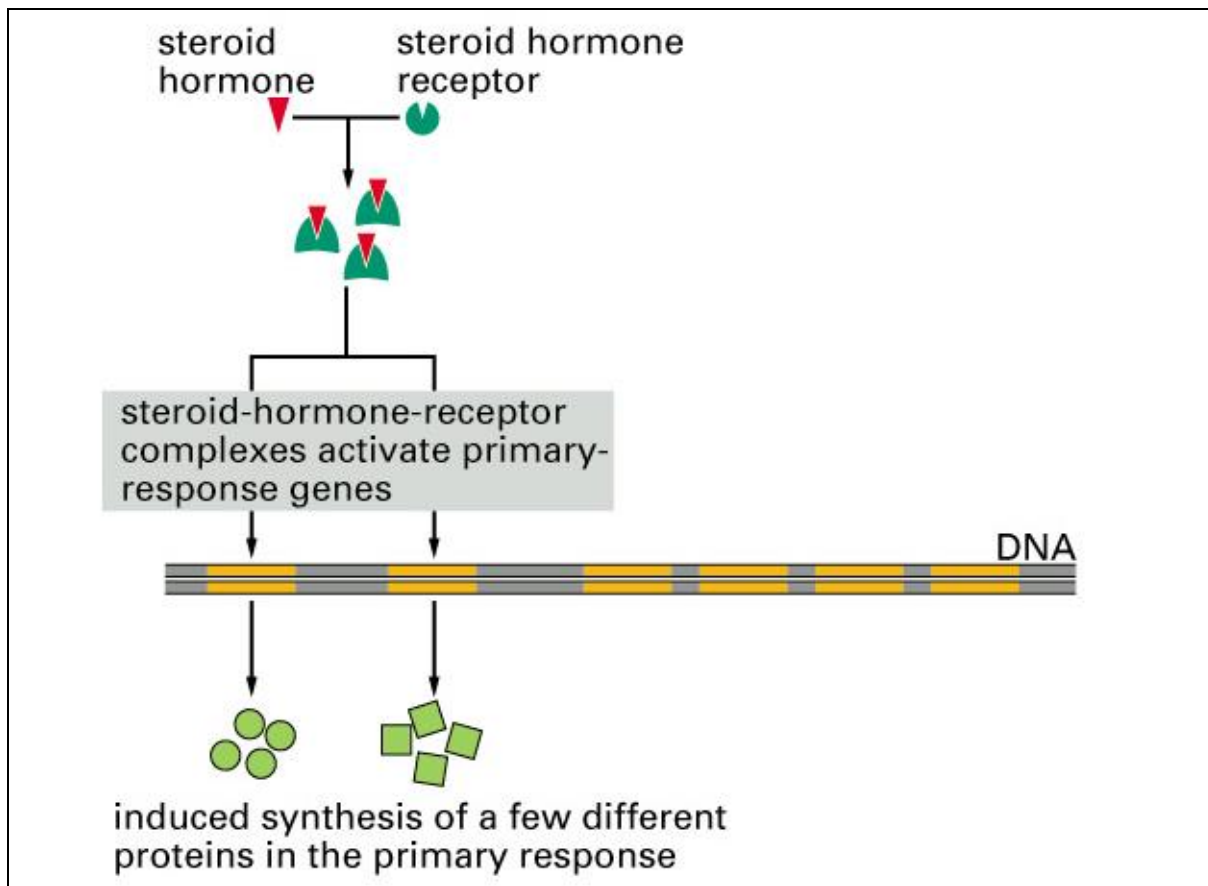
Ačkoliv stadium nádorové promoce klasicky nezahrnuje změny v DNA, řada studií prokázala, že jisté promoční látky mohou způsobovat tvorbu aktivních kyslíkových radikálů. Tyto radikály pak mohou působit nebo stimulovat peroxidaci nenasycených lipidů a tvorbu dalších radikálů, které mohou působit na makromolekuly jako je DNA. Důkazy nejsou však jednoznačné.

Steroidní hormony jsou již dlouho známy jako důležité regulátory podporující růst určitých typů nádorů a je prokázán jejich vliv na expresi jaderných protoonkogenů. *Steroidní hormony (estrogen, testosteron, progesteron, androgen i glukokortikoidy), protože jsou malé a lipofilní*

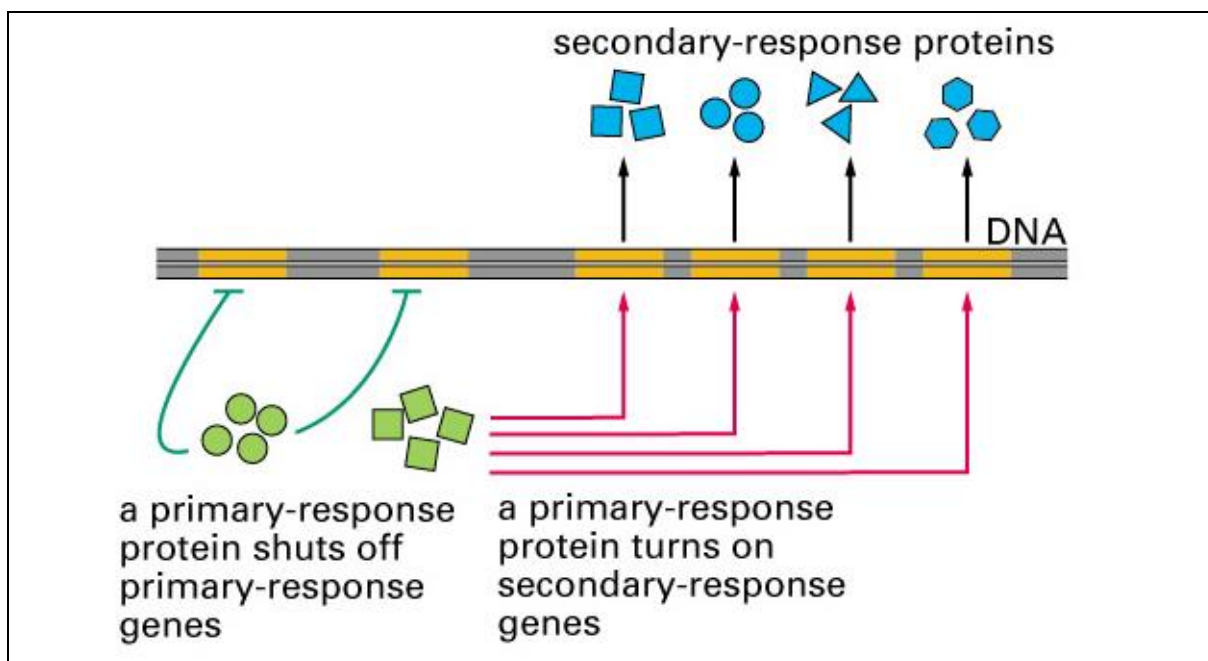
difundují přes membránu do buňky, kde se váží na specifický vnitrobuněčný receptor. Aktivovaný komplex se pak váže na specifické sekvence v DNA, tzv. „steroid response elements“ (SRE). Funguje tedy jako transkripční faktor, který moduluje na steroidy odpovídající geny nebo mění posttranskripční děje vyúsťující ve změny hladiny specifických mRNA nebo proteinů (obr. 9-6).



Obr. 9-6 Srovnání působení steroidů přes vnitrobuněčné receptory a přenosu signálu aktivací membránových receptorů

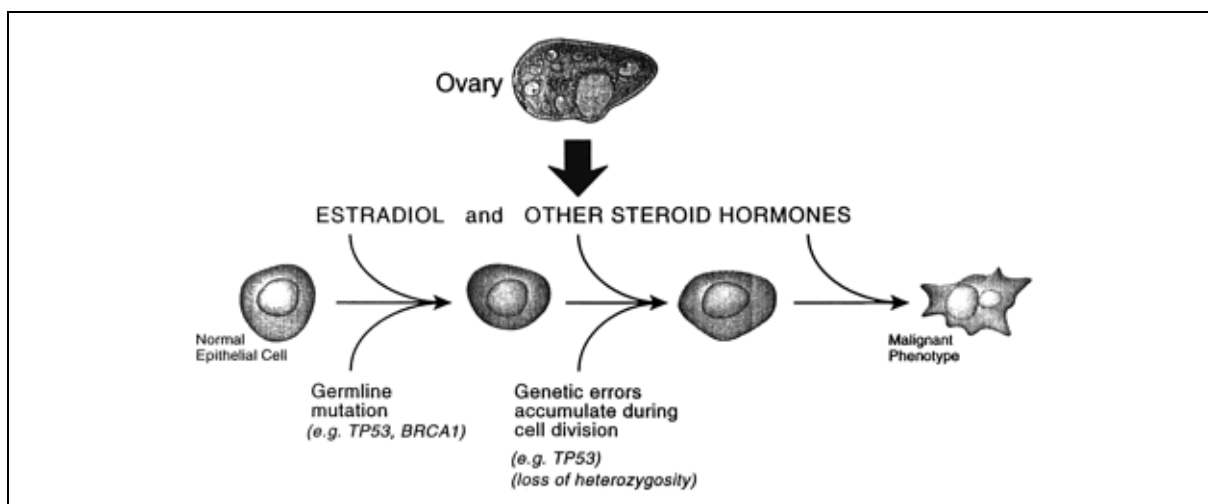


Obr. 9-7a Raná primární odpověď na působení steroidního hormonu (*Figure 15-14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)



Obr. 9-7b Zpožděná sekundární odpověď na působení steroidního hormonu (*Figure 15-14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)

Hormonálně závislé nádory (prsu, endometria, prostaty, varlat, štítné žlázy, kostí) představují ojedinělý mechanismus karcinogeneze. *Endogenní a exogenní hormony podporují proliferaci, zvyšují počet buněčných dělení a pravděpodobnost náhodných genetických chyb.* Hormonální stimulace působí v promočním stadiu a pokračuje do progresivního stadia. Přerušení této dráhy pomocí antihormonální terapie (např. tamoxifen) zpomaluje proces progresu. Byly objeveny specifické geny, jejichž mutace jsou spojeny s hormonálně závislými nádory. Zahrnují geny endokrinní regulace, geny reparace DNA, nádorově supresorové geny a onkogeny. BRCA1 a 2 jsou nádorově supresorové geny spojené s náchylností k nádorům prsu a vaječníků.



Obr. 9-8 Estradiol a v menší míře ostatní steroidní hormony podporují buněčnou proliferaci, která usnadňuje fixaci genetických chyb. Zárodečné mutace v příslušných nádorově supresorových genech urychlují transformaci do maligního fenotypu.

Následující údaje vycházejí z epidemiologických a experimentálních studií:

- **Nádory endometria**

Expozice estrogeny nevyrovnávaná progestiny je riziková pro vznik nádorů endometria. Během premenopausálního stadia je riziko spojeno s mitotickou aktivitou v první polovině menstruačního cyklu, kdy působí estrogen bez protipůsobení progesteronu. Ukázalo se, že užívání hormonální antikoncepce před r. 1976 zdvojnásobovalo riziko u žen. Naproti tomu novější preparáty kombinující estrogen a vysoké dávky progesteronu (od 21 do 28 dne cyklu) mohou snižovat riziko.

Důležitým rizikovým faktorem je také obezita, která ovlivňuje produkci hormonů. Vyšší riziko existuje u bezdětných žen a snižuje se s každým těhotenstvím. Během těhotenství je díky vysokým hladinám progesteronu snížena mitotická aktivita buněk.

- **Nádory prsu**

Estrogeny mohou indukovat a podporovat rozvoj nádorů mléčné žlázy (experimentální důkazy u hlodavců). *Rizikovými faktory je zejména kumulované působení estrogenů.* Raný nástup menstruace a pozdní menopauza maximalizují počet ovulačních cyklů. Naopak prodloužená laktace a fyzická aktivita mohou počet cyklů redukovat (oddaluje se počátek menstruace, redukuje se frekvence ovulačních cyklů a hladiny cirkulujících enzymů). Také vysoká konzumace alkoholu (více než 60g alkoholu denně) je spojována s lineárním vzrůstem nádorů u žen. Alkohol totiž může zvyšovat hladinu estrogenu v plazmě a hladinu tzv. „insulin-like“ růstového faktoru. Primárním zdrojem estrogenu u žen po menopauze je přeměna androstendionu na estron v tukové tkáni.

- **Nádory prostaty**

V karcinogenezi prostaty hraje úlohu biosyntéza, aktivace, inaktivace a transport androgenů. Důležitým rizikovým faktorem je věk a etnicita. Např. v populaci Afroameričanů byl zaznamenán nejvyšší výskyt nádorů prostaty. Jako chemoprevence působí **finasterid**.

9.3 EXOGENNÍ HORMONY

Existují rozsáhlé zdroje vnějších zdrojů steroidních hormonů. Patří k nim právě *hormonální náhradní terapie (HRT) a antikoncepce*. Antikoncepce zahrnující estrogen a vysoké dávky progesteronu může snižovat riziko vaječnicků a dělohy. HRT může zvyšovat riziko nádorů prsu, ale důkazy jsou mnohdy protichůdné. Riziko představuje zejména u žen s rodinou anamnézou nádorů prsu.

Řada tzv. „hormon-like“ přírodních látek může vykazovat také např. estrogení aktivitu.

Poznatky o úloze hormonů v karcinogenezi však neumožňují jednoduše řešit tento fenomén, protože to není tak lehce modulovatelný faktor jako třeba kouření. Jednoduše nemůžeme odstranit nebo snížit endogenní hormony. Nové strategie pro detekci a prevenci zahrnují poznání biomarkerů zvýšeného rizika, např. specifický genotyp a nové způsoby chemoprevence.

9.4 POLYGENNÍ MODEL A BIOMARKERY

Přestože existují důkazy, že sekrece hormonů a jejich metabolismus může být ovlivněn zvenčí (např. dietou, fyzickou aktivitou), velkou úlohu hraje genetická regulace. Proto je důležité charakterizovat geny, které odpovídají za interindividuální rozdíly v hladině hormonů a jsou zahrnuty v metabolismu a transportu hormonů. Předpokládá se multigenový model predispozice k nádorům prsu, který obsahuje několik genů zahrnutých v biosyntéze, vazbě a transportu estrogenů. Individuální rozdíly vycházejí z polymorfizmu těchto zásadních genů.

Genetický základ hladiny hormonů je důležitým rizikovým faktorem (polymorfismus metabolických genů) a dále se uplatňují různé vnější faktory ovlivňující hladinu hormonů (dieta, fyzická aktivita). Důležité je charakterizovat geny odpovídající za interindividuální rozdíly v hladině hormonů a zahrnuté v metabolismu a transportu hormonů.

Kontrolní otázky k tématu:

- Jaké endogenní faktory se mohou uplatňovat v karcinogenezi? Jakým způsobem?
- Popište mechanismus přenosu signálu a působení steroidních hormonů.
- Která nádorová onemocnění a jak závisejí na hormonech?
- Jak se uplatňuje v hormonální karcinogenezi genetická složka?
- Jaké existují možné vnější zdroje hormonů?

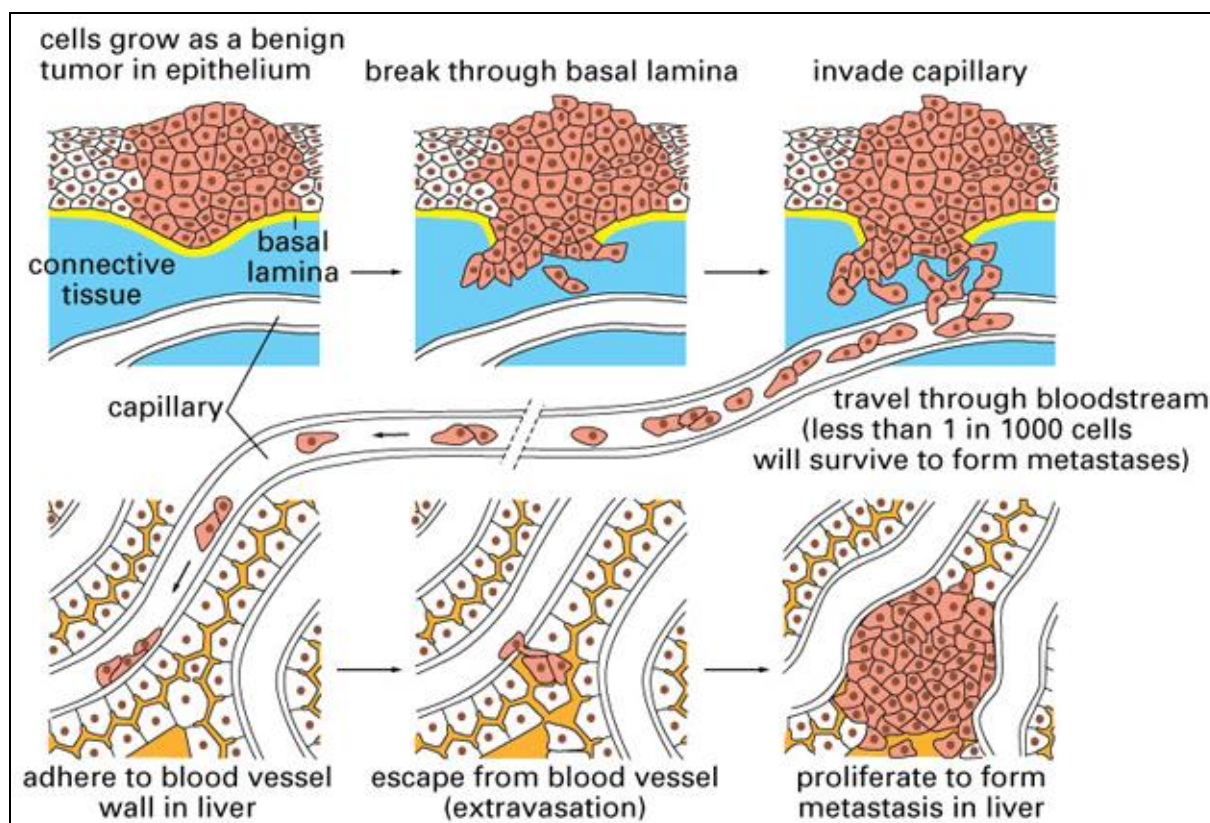
10. INVAZIVITA A VZNIK METASTÁZ

10.1 METASTATICKÁ KASKÁDA

Metastázy jsou definovány jako tvorba progresivně rostoucích sekundárních nádorových fokusů v místech nespojených s primárním nádorem.

Vývoj klinicky významných metastáz vyžaduje u nádorových buněk dovršení série definovaných kroků označovaných jako **metastatická kaskáda** (obr. 10-1), která zahrnuje:

- uvolnění buňky (od okolních buněk a mimobuněčné matrix),
- překonání bazální membrány v epitelech,
- překonání bazální membrány a endotelu cév,
- přenos krevním (lymfatickým) řečištěm,
- překonání endotelu a bazálních membrán v jiné lokalitě,
- uchycení v nové tkáni,
- přežívání, proliferace,
- vznik mikro- a makrometastáz vedoucí k letalitě onemocnění.

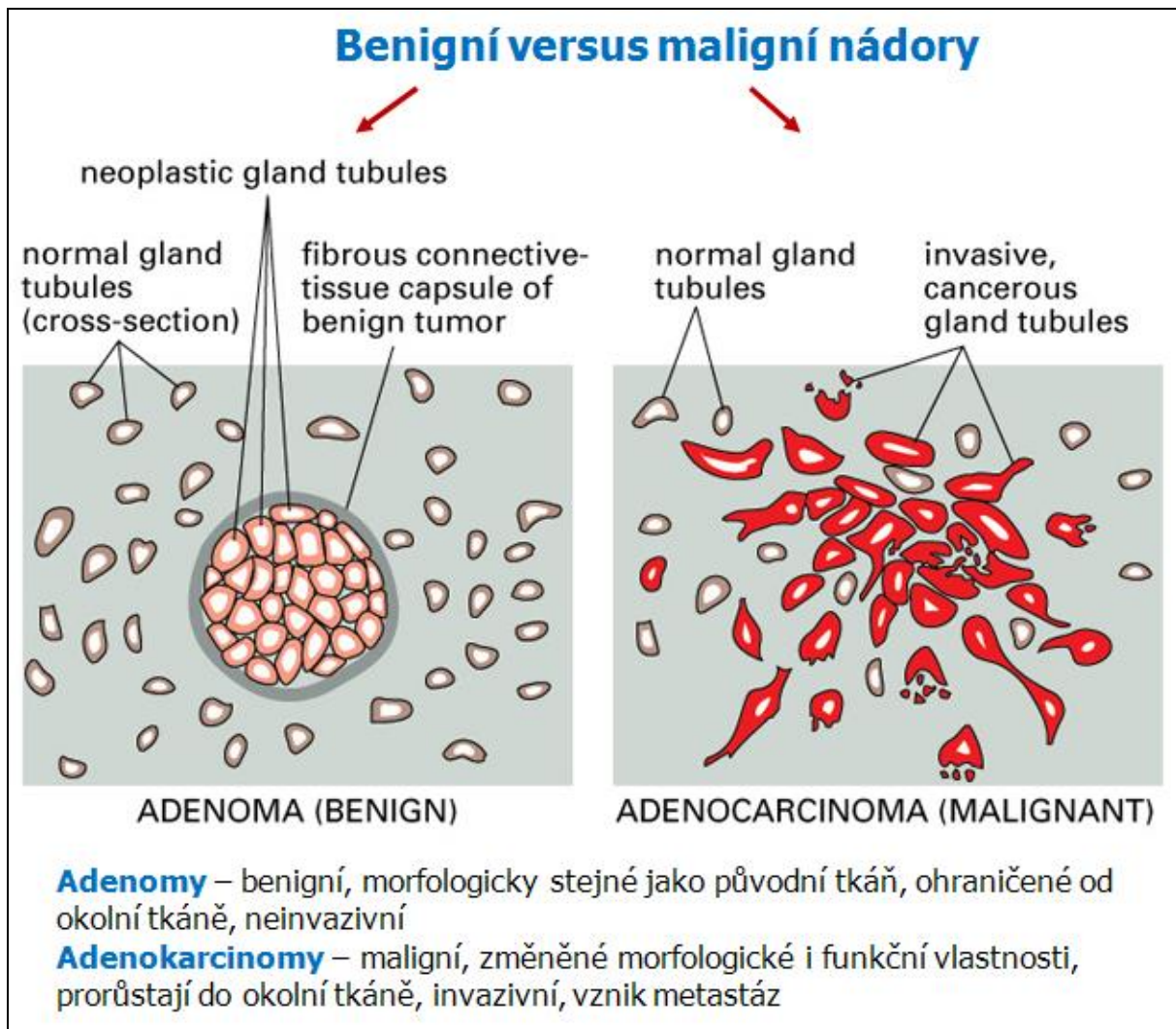


Obr. 10-1 Proces vzniku metastáz (*Figure 23-15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Byla objevena řada genů a proteinů, které regulují metastatickou schopnost buněk a které musí být koordinovaně exprimovány. Naproti tomu existují tzv. **supresorové geny pro metastá-**

zy, které zabraňují tvorbě spontánních makroskopických metastáz, aniž by ovlivňovaly růst primárního nádoru. Tyto geny tvoří zvláštní třídu odlišnou od onkogenů a nádorově supresorových genů a ztráta jejich funkce umožňuje tvorbu metastáz. Jedním z prvních objevených genů je nm23.

Vytvoření primárního nádoru vyžaduje řadu molekulárních a buněčných změn, které buňce umožní obejít normální mechanismy kontroly růstu a ovlivňovat lokální prostředí. **Nádorová progresse** a získání schopnosti tvořit metastázy vyžaduje další změny v genové expresi, které završí maligní fenotyp (obr. 10-2). Důležitou roli hrají zejména enzymy degradující proteiny a adhezivní molekuly. Po invazi do sousedících tkání jsou nádorové buňky přes cévní a lymfatické cesty rozesety a putují individuálně nebo ve shlucích. Na vhodném sekundárním místě se zastavují ať už z důvodů své velikosti nebo po vazbě na specifické molekuly v daném orgánu nebo tkáni. Pro vytvoření metastáz je také zásadní, aby uvolněné nádorové buňky přežily a proliferovaly v cévách nebo v obklopující tkáni. Tvorba klinicky důležitých metastáz závisí na dovršení každého kroku kaskády. Celý proces progresse může trvat řadu měsíců nebo dokonce let.



Obr. 10-2 Benigní versus maligní nádory (*Figure 23-3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Pro uvolnění buněk z nádorové masy i pro jejich uchycení a tvorbu metastáz ve vzdálené tkáni jsou důležité poruchy exprese a funkce molekul zajišťujících jak **vzájemné buněčné vazby (kadheriny) tak vazby k ECM (integriny)**. Uvolněná buňka bez příslušných vazeb za normálních okolností není schopna přežít. Její přežití pak umožňují **poruchy regulace apoptózy**. *Aby mohly proliferovat, musí být přežívající rozestě nádorové buňky schopny zahájit pro buňku odpovídající a na kontextu závislé signální kaskády, které jim umožní nejen přežít, ale zahájit buněčný cyklus a dělit se.* Toto přežití a následný růst dovoluje pouze určité prostředí. Kritické jsou pro přežití **mezbuněčné interakce se stromatem a ostatními nádorovými buňkami**. Ty zahrnují aktivaci na adhezi závislých drah, kde se uplatňují zejména molekuly kadherinů a integrinů.

Přechod od mikro- k makroskopickým metastázám bývá také spojen s projevem tzv. **angiogenního fenotypu**. *Vaskularizace (tvorba nových cév v nádoru) je posledním krokem metastatické kolonizace.*

10.2 METODICKÉ ZÁKLADY SOUČASNÉHO VÝZKUMU.

Výzkum je zaměřen zejména na poznání a úspěšné klonování předpokládaných metastatických genů a manipulace s jejich expresí nebo funkcí genových produktů. Existují tři nejobecněji používané testy metastatického procesu:

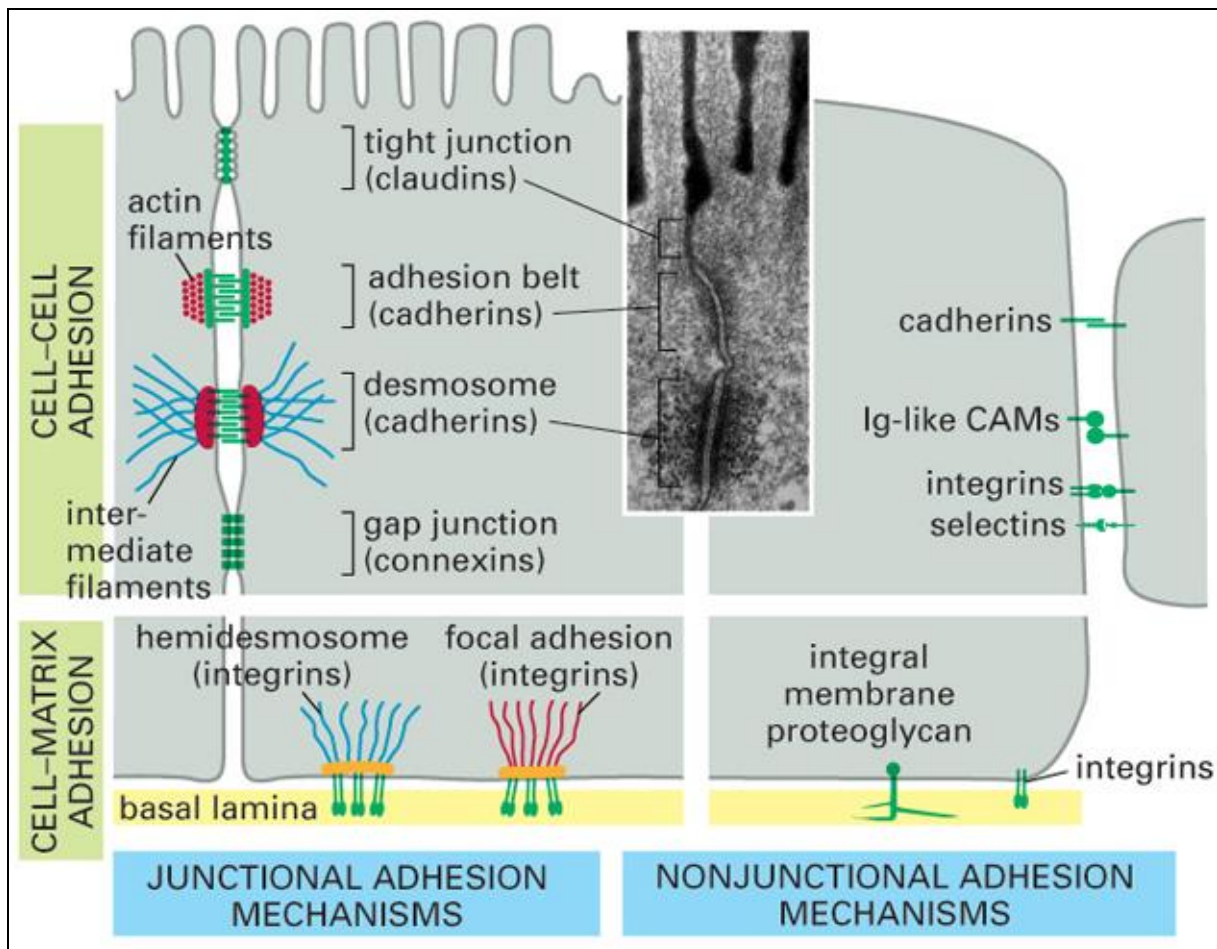
- test na spontánní metastázy *in vivo*, kdy jsou nádorové buňky subkutánně injikovány do syngenních nebo imunodeficientních zvířat, což napodobuje přirozenou situaci
- test na experimentální metastázy *in vivo*, kdy jsou nádorové buňky injikovány intravenózně. Tento test odhaduje schopnost buněk opustit krevní řečiště a kolonizovat specifické tkáně.
- test invazivity *in vitro* s využitím buněčných kultur, kdy jsou nádorové buňky umístěny na povrch matrix (tvořené např. z kuřecí srdeční nebo chorioalantoidní membrány či umělé membrány) a sleduje se migrace tímto materiálem.

Poznatky o povrchových a vnitrobuněčných regulačních molekulách účastnících se metastatického procesu jsou vodítkem pro **nové terapeutické přístupy**. Využívají se např. specifické monoklonální protilátky proti proteinům účastnícím se metastatického procesu nebo „antisense“ techniky zaměřené na vyblokování činnosti specifických genů.

10.3 ÚLOHA BUNĚČNÝCH ADHEZÍ V METASTATICKÉM PROCESU

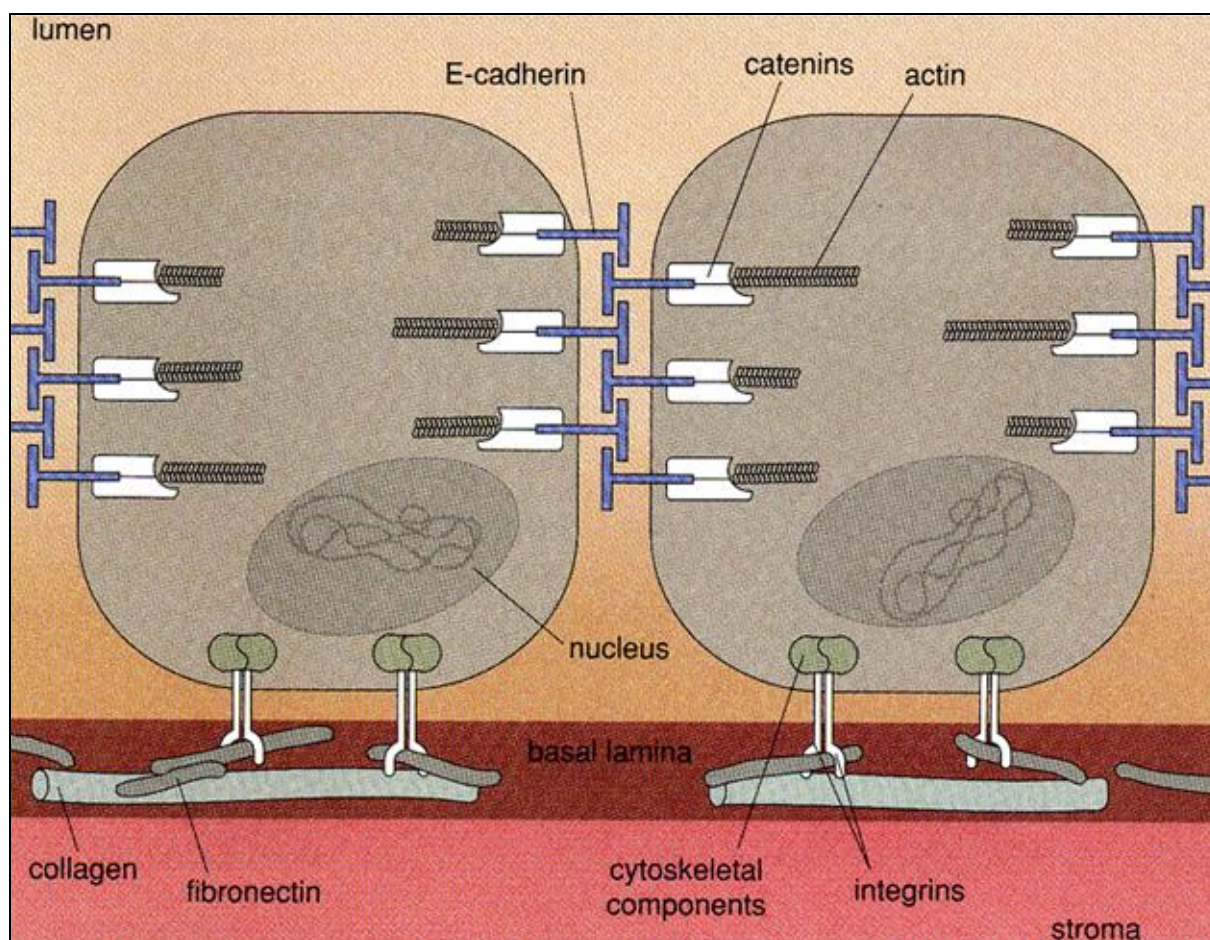
V mnohobuněčném organizmu hrají klíčovou úlohu buněčné kontakty a s nimi spojená výměna signálů (informací). Toto je zásadní jak v embryogenezi tak i při udržování tkáňové integrity a funkce orgánů dospělého organismu. *V normální tkáni jsou buňky spojeny jak navzájem, tak s nerozpustnou směsí proteinů vyplňujících prostor mezi nimi - tzv. mimobuněčnou matrix (ECM).* To platí především pro epitelální tkáně, kde existuje vrstva buněk tvořících povrchy kůže a řady orgánů (plíce, zažívací trakt atd.), z nichž vzniká většina nádorů.

Adhezivní molekuly (Cell Adhesion Molecules – CAM) jsou děleny do 4 základních skupin v závislosti na jejich biochemických a strukturálních vlastnostech: **selektiny, imunoglobulinová supergenová rodina (ICAM), kadheriny a integriny** (obr. 10-3).



Obr. 10-3 „Junctional“ a „nonjunctional“ adhezivní mechanismy živočišných buněk pro vzájemnou vazbu a pro vazbu k extracelulární matrix (Figure 19-32. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition.)

Buňky se navzájem dotýkají prostřednictvím řady povrchových molekul. Tzv. „**juxtacrine signaling**“ vyžaduje těsnou blízkost buněk a hlavní třídou molekul zprostředkujících buněčnou adhezi jsou **kadheriny**. Jak se buňky dotýkají, kadheriny se sdružují a spojují prostřednictvím jejich cytoplazmatických domén a s nimi spojených proteinů, zejména **kateninů** s cytoskeletem. Prvním krokem je interakce mezi mimobuněčnými kadherinovými doménami sousedních buněk. Před sdružením se kadherin spojuje s cytoplazmatickým proteinem **beta-kateninem, vinkulinem nebo plakoglobinem (gamma katenin)**. Kromě spojování kadherinů a stabilizace adhezivních spojů, zprostředkovává beta-katenin a plakoglobin také interakce mezi kadheriny a jinými membránovými receptorovými proteiny, jmenovitě s receptorem pro EGF (obr. 10-4).



Obr. 10-4 Síť proteinových spojů u normálních epiteliálních buněk (Van Noorden Cj.J.F. et al., *American Scientist* 1998 : 130)

S pomocí tkáňových kultur bylo zjištěno, že manipulací např s **E-kadherinem** lze výrazně ovlivnit invazivní schopnost nádorových buněk. Introdukce expresního vektoru pro E-kadherin do metastázujících nádorových buněk neexprimujících E-kadherin zabraňuje invazivitě i tvorbě spontánních metastáz. Naopak „antisense“ nukleotidy pro E-kadherin mohou vyvolat schopnost tvorby metastáz u neinvazivních nádorových buněk.

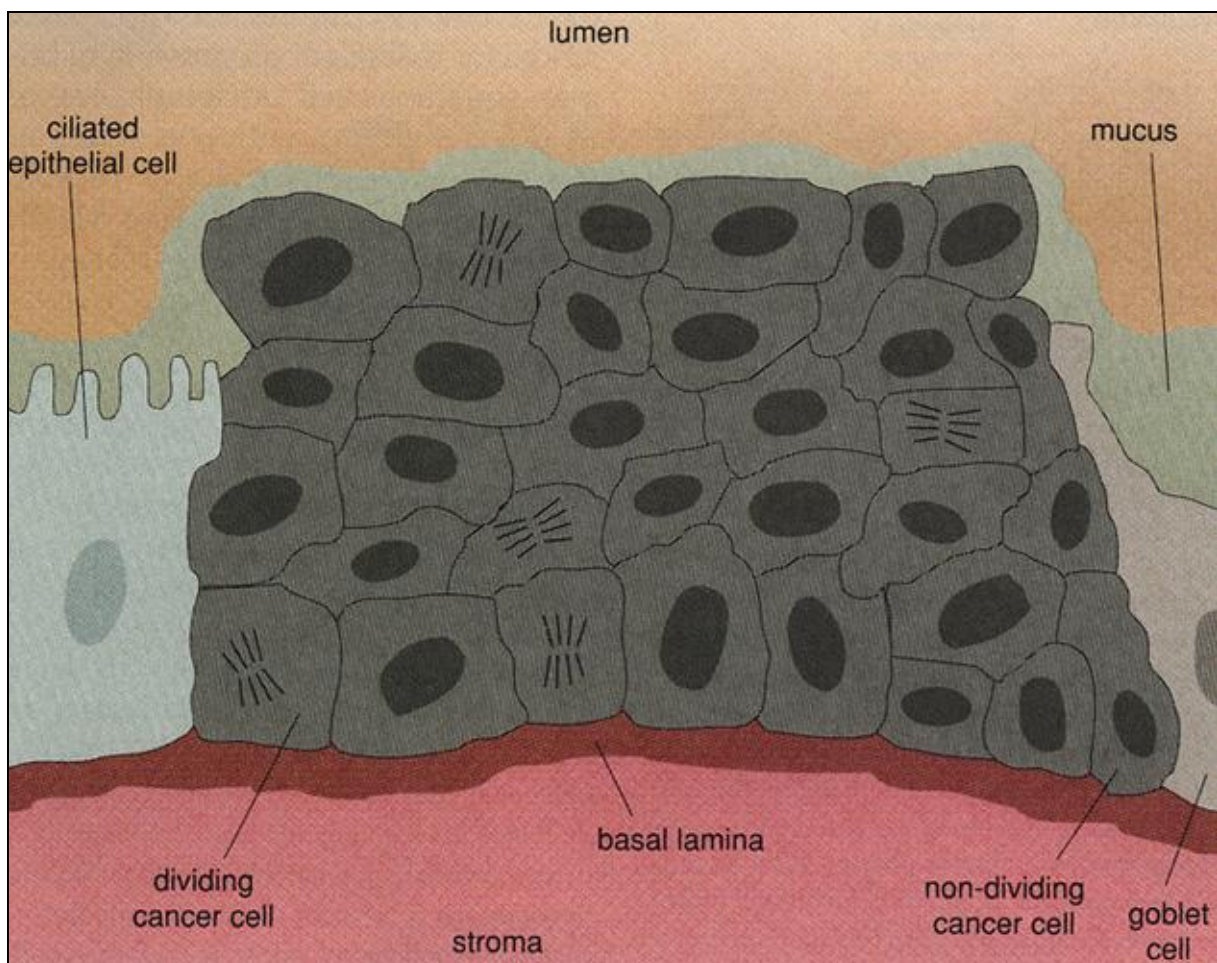
E-kadherin, vinkulin a katenin tak byly identifikovány jako supresorové geny pro metastázy. Ukazuje se, že pro aktivitu kadherinových a kateninových proteinů je potřeba celá řada signálních systémů, což je předmětem současného výzkumu (modely *Drosophila* a *Xenopus laevis*). *Ve složité informační smyčce signálů předávaných sousedními buňkami existuje zpětnovazebné spojení, tj. předávané signály mohou zpětně regulovat komponenty adheze.*

Adhezivní schopnost k ECM umožňuje buňkám přežít a proliferovat. Jak se ukázalo, kultivované buňky se nedělí dokud nejsou přichyceny k povrchu, což je vlastnost zvaná **závislost na podkladu (anchorage dependence)**. Tento vztah je zprostředkován **integriny**. Integriny jsou skupinou buněčných adhezivních receptorů představovaných dvěma nekovalentně spoje-

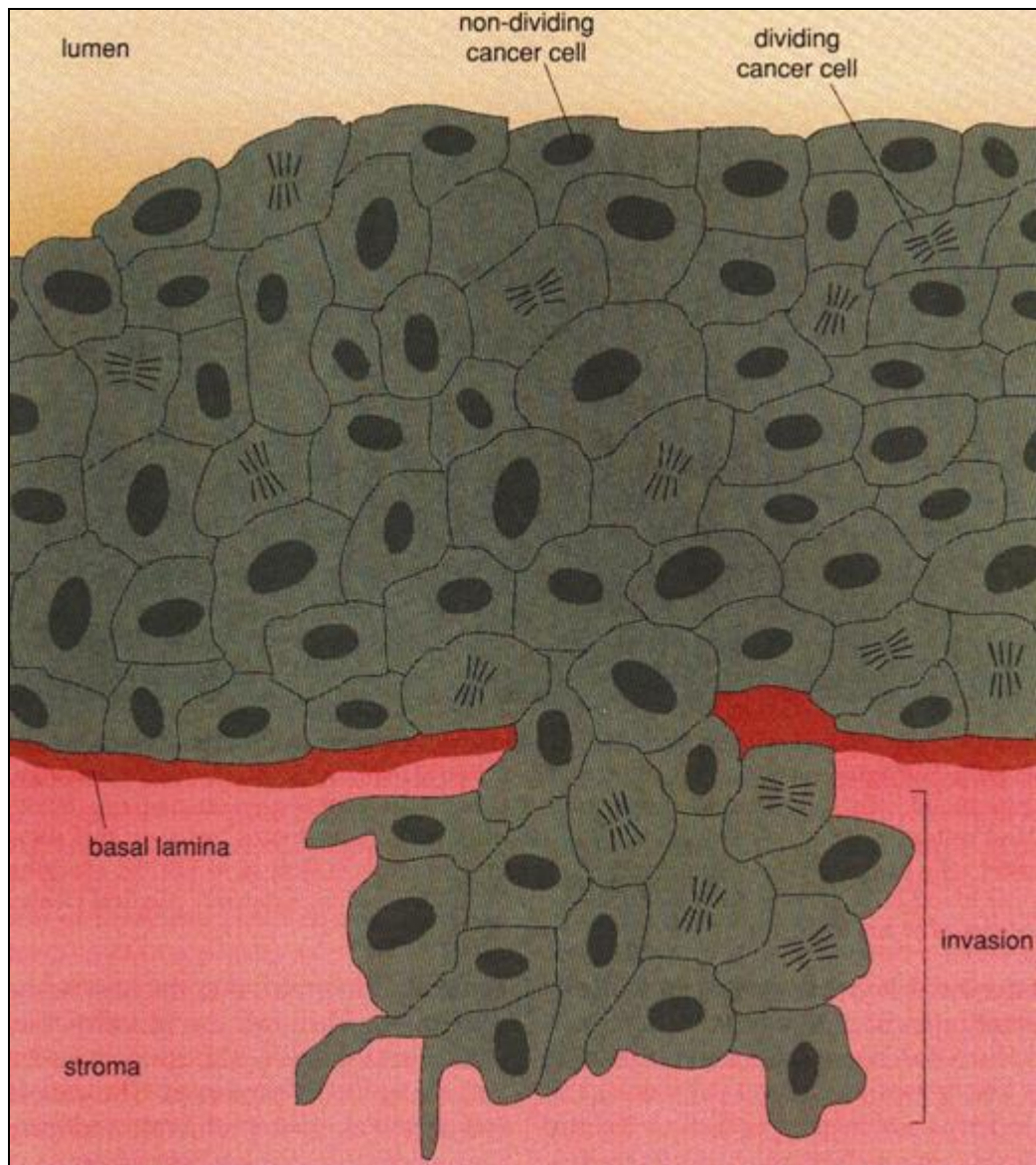
nými jednotkami alfa a beta, které mohou heterodimerizovat ve více než 20 kombinacích. Bylo prokázáno, že neuchycené buňky přestávají proliferovat, protože dochází k inaktivaci komplexu cyklinE-cdk2. Kromě toho podléhají buňky také apoptóze. Aby buňky přežily, je nutné, aby ECM, ke které adherují, nesla určitou oblat, tzv. „**area code**“, a buňky musí exprimovat příslušné integriny.

10.4 MIGRACE A INVAZE BUNĚK

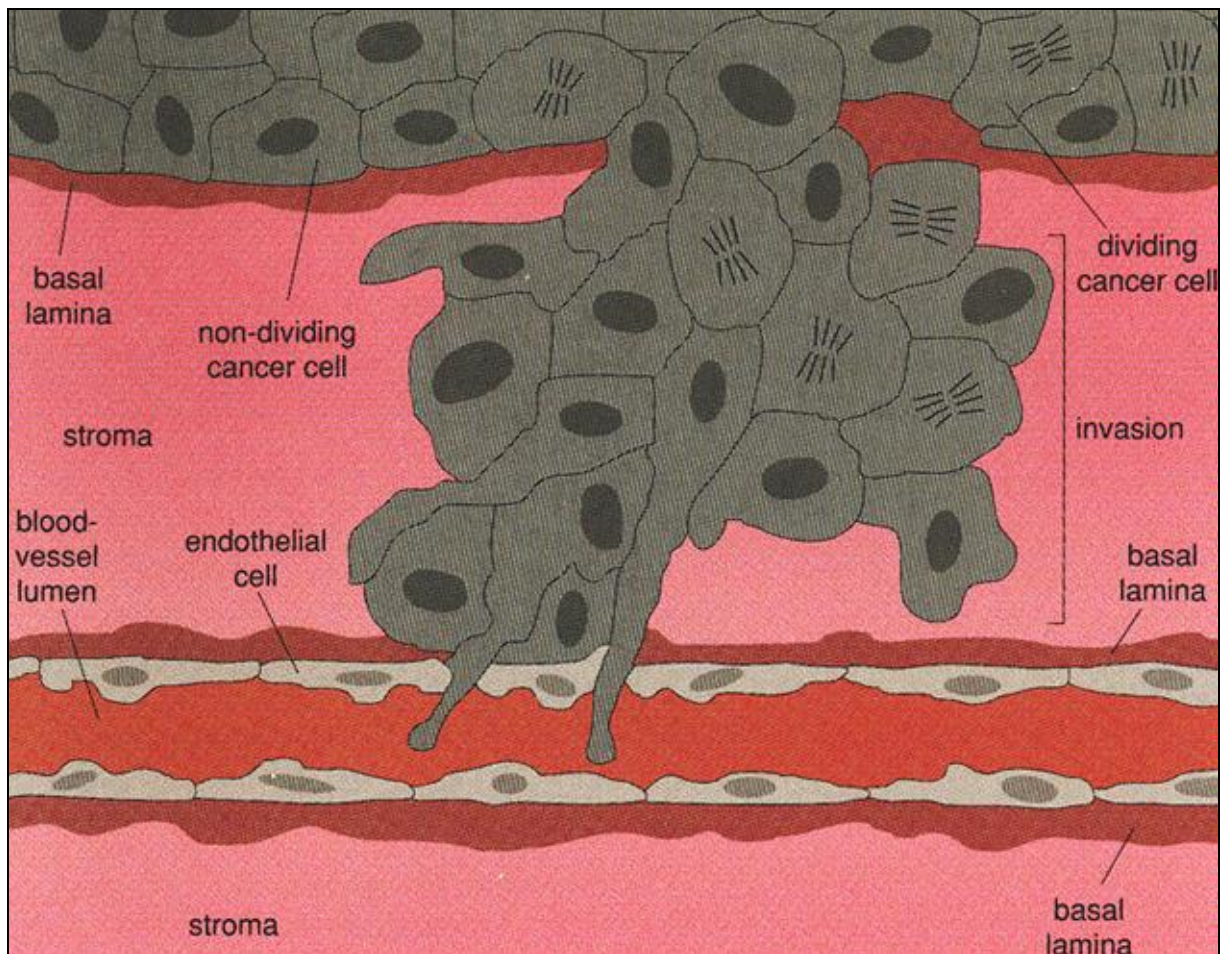
Metastatická schopnost nádorových buněk, tj. schopnost rozsevu do vzdálených míst v organismu, je složitý několikastupňový proces, je odrazem stupně malignity a je většinou příčinou letality onemocnění. Buňky se musí uvolnit z mateřské tkáně a od ostatních nádorových buněk, musí překonat **tzv. bazální membránu** (v epitelech) a následně bazální membránu obklopující krevní cévy. Po překonání vrstvy endoteliálních buněk je buňka v krevním řečišti a může být přenesena kamkoli do těla (obr. 10-5, 10-6, 10-7). V klinice existují metody jak detekovat nádorové buňky v krvi. Tato včasná diagnóza – **detekce mikrometastáz** – ještě před vytvořením samotných metastáz je velmi důležitá pro včasnou a vhodnou terapii.



Obr. 10-5 Karcinom in situ (Van Noorden Cj.J.F. et al., American Scientist 1998 : 130)



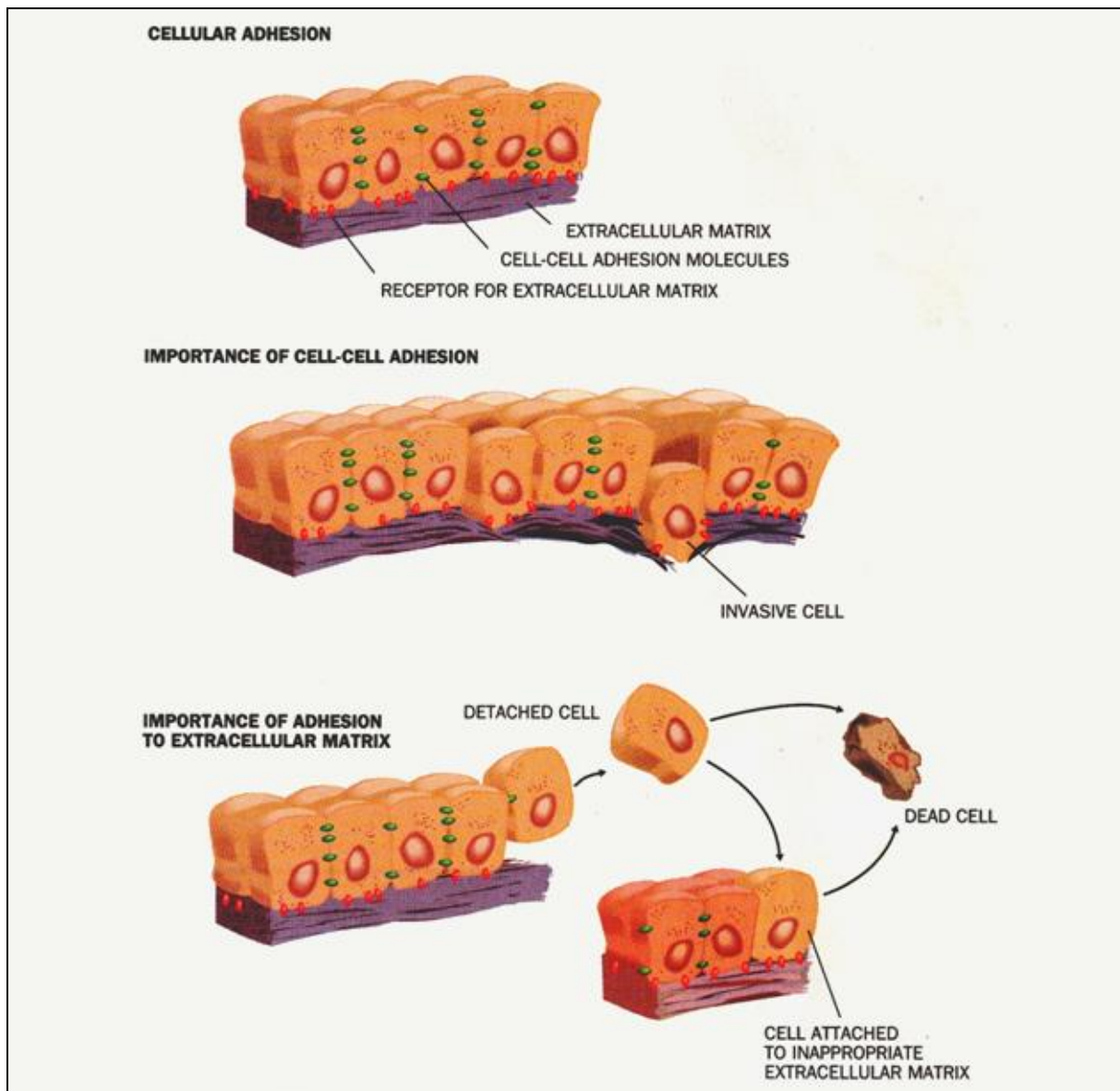
Obr. 10-6 Malignita – buňky pronikají přes bazální laminu a stroma (*Van Noorden Cj.J.F. et al., American Scientist 1998 : 130*)



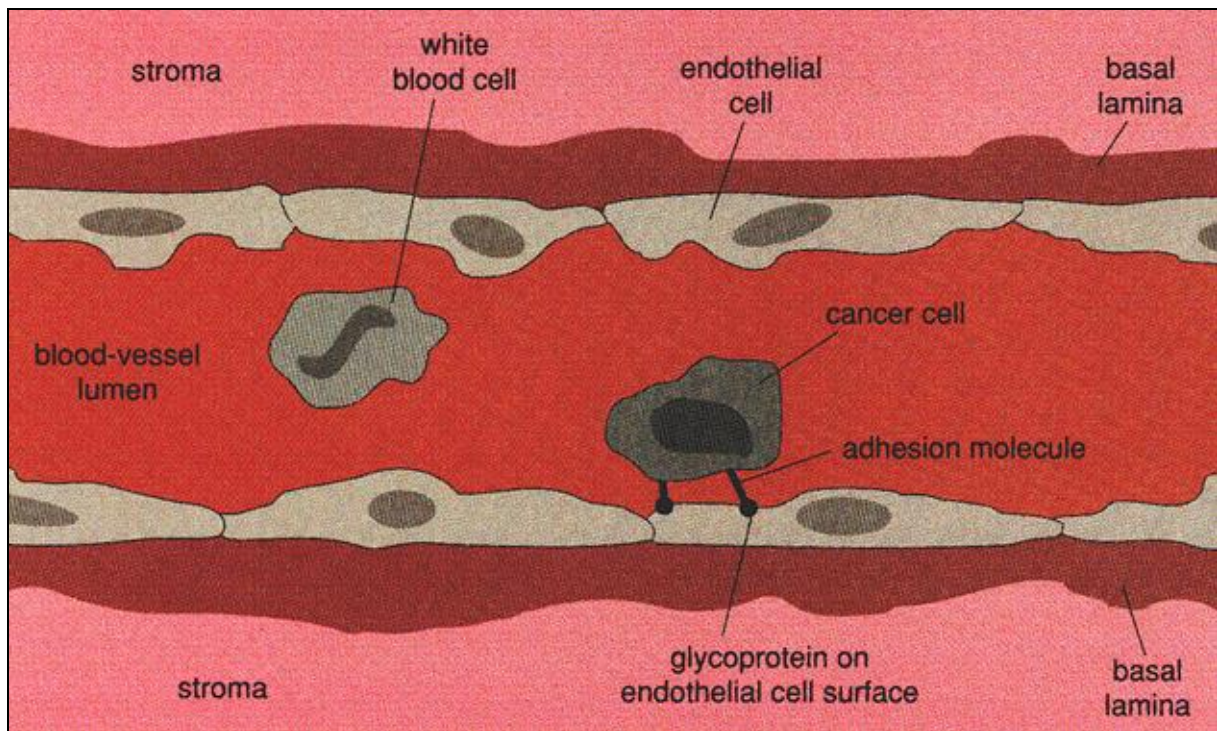
Obr. 10-7 Invaze do krevních a lymfatických cév – narušení endotelové bariéry (Van Noorden Cj.J.F. et al., *American Scientist* 1998 : 130)

Úloha apoptózy

Mechanismem udržujícím integritu tkáně indukovaným po ztrátě uchycení nebo při neodpovídajícím uchycení je apoptóza - **anoikis** („**detachment induced apoptosis**“) Buňky normálně nemohou odplout do jiné tkáně a tam růst. Nádorové buňky musí tyto mechanismy porušit a na tomto procesu se opět podílejí mutované verze normálních genů - onkogeny. Proteiny kódované onkogeny předávají falešné zprávy do jádra buňky, která se pak chová nepatřičně. Závislost na podkladu je však jen jednou z překážek, kterou musí nádorová buňka překonat (obr. 10-8). Během své migrace se buňka musí ubránit řadě obranných mechanismů a tak jen asi 1 z 10 000 nádorových buněk uspěje a vytvoří metastázu. Studium krevního oběhu vysvětluje také, proč různé nádory metastázuji především do specifických orgánů (obr. 10-9). Cirkulující nádorová buňka přechází do nejbližších dostupných cév. Krev odcházející z většiny orgánů směřuje do plic (plicní metastázy), jen ze střeva jde nejdříve do jater (jaterní metastázy). Nádory prostaty často metastázuji do stehenní kosti. Jinak jsou běžné metastázy v lymfatických uzlinách.



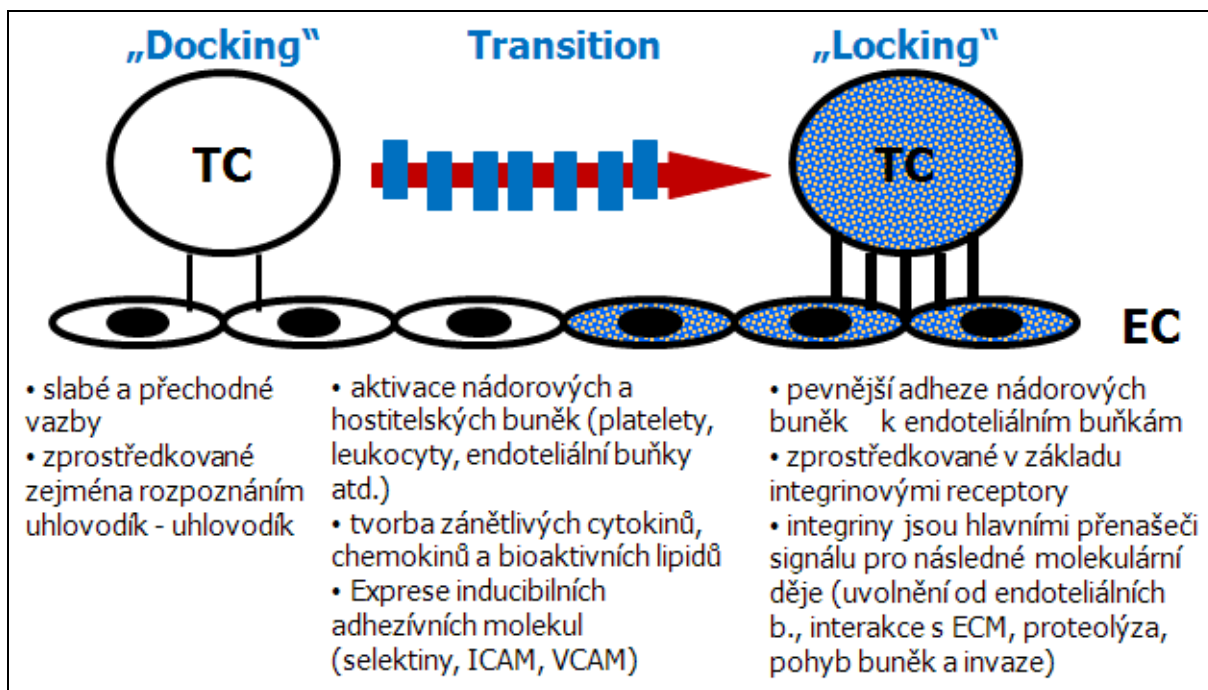
Obr. 10-8 Adheze buněk (Pro uvolnění buněk z nádorové masy i pro jejich uchycení a tvorbu metastáz ve vzdálené tkáni jsou důležité jak vzájemné buněčné vazby tak vazby k ECM. Uvolněná buňka bez příslušných vazeb za normálních okolností není schopna přežít. Přežití umožňují poruchy regulace apoptózy – anoikis („detachment-induced apoptosis“). (Ruoslahti E., *Scientific American* 1996 : 72)



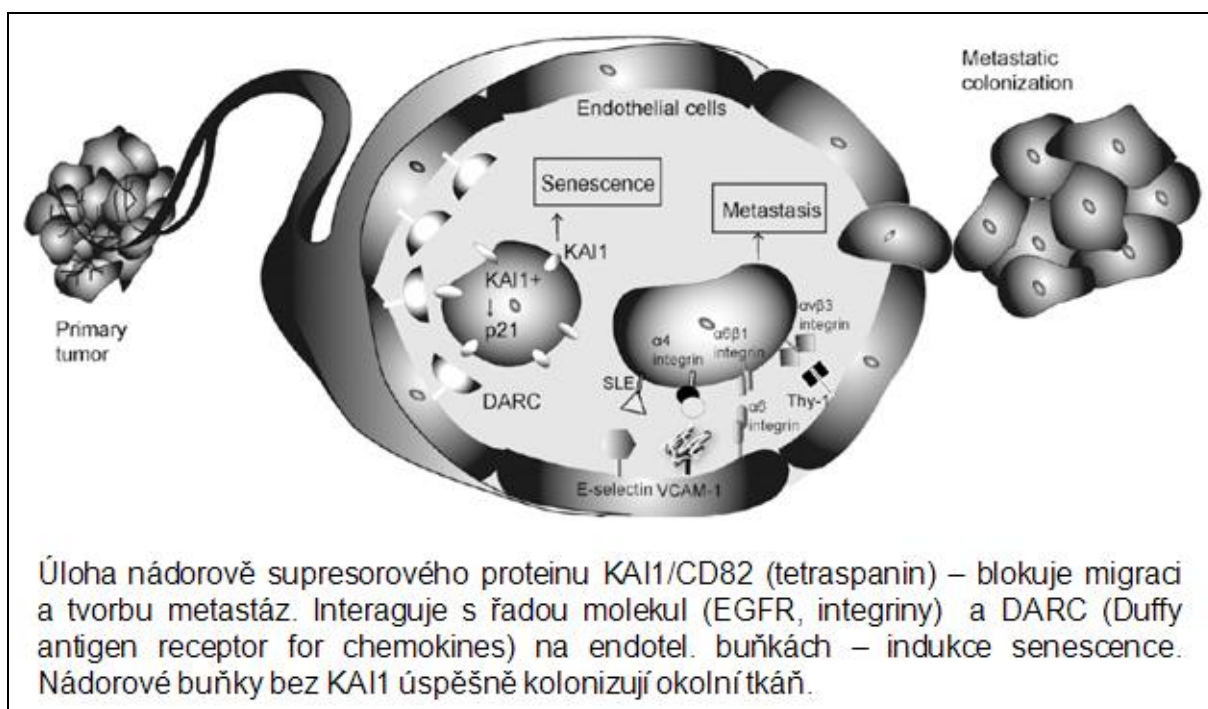
Obr. 10-9 Adheze nádorových buněk na cévní stěny ve vzdálených tkáních (Van Noorden Cj.J.F. et al., *American Scientist* 1998 : 130)

Hypotéza „docking a locking“

Interakce nádorových buněk s cévními endoteliálními buňkami může být rozdělena do počáteční fáze **slabé adheze** („**docking**“) a pozdější fáze **pevné adheze** („**locking**“) (obr. 10-10). Volně putující nádorové buňky nejdříve tvoří volné vazby s endotelem, pak po něm rolují a vytvářejí pevné vazby. Každá fáze je zprostředkována specifickými adhezivními molekulami a přechod je zprostředkován širokou škálou bioaktivních mediátorů (cytokiny, chemokiny a bioaktivní lipidy) produkovaných aktivovanými nádorovými i hostitelskými buňkami (platelety, leukocyty, endoteliální buňky atd.). Slabé vazby jsou zajišťovány povrchovými uhlovodíky, pevnějších vazeb se pak účastní inducibilní adhezivní molekuly (zejména E- selektin, ICAM, VCAM) a pevnější adheze nádorových buněk jsou zprostředkovány v základu integri- novými receptory. Integriny jsou hlavními přenašeči signálu pro následné molekulární děje (uvolnění od endoteliálních buněk, interakce s ECM, proteolýza, pohyb buněk a invaze) (obr. 10-11).



Obr. 10-10 Hypotéza „docking a locking“ (Honn K.V. et al., *Cancer Metastasis Rev* 1994 : 365)



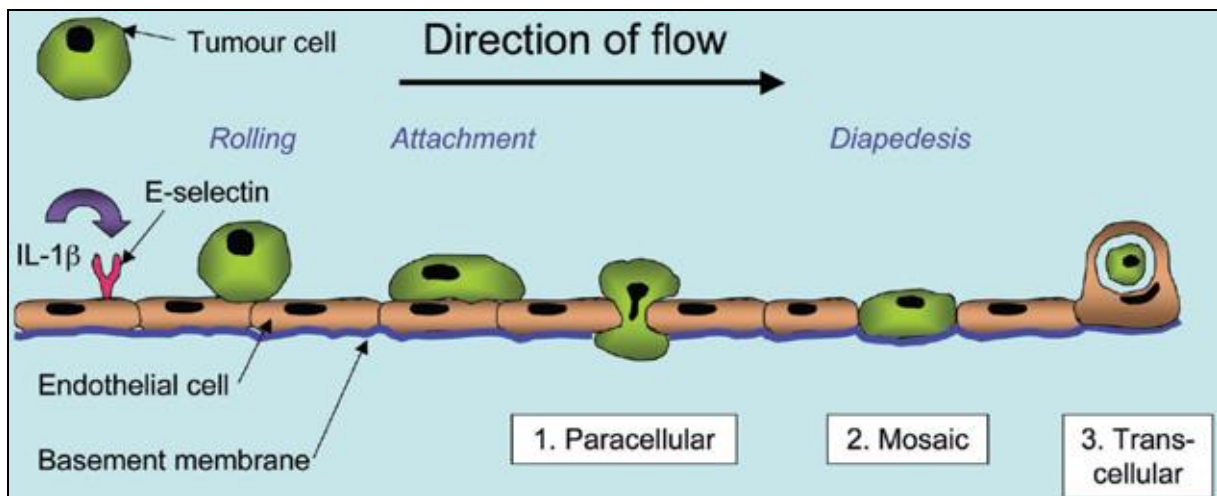
Obr. 10-11 Interakce nádorové buňky s endotelem (Iizumi M. et al., *Microvascular Res* 2007 : 114)

Prostup buněk endotelem

Po vytvoření pevné vazby zahajují nádorové buňky, tzv. **diapedezu** – **prostup endotelem** v několika krocích (obr. 10-12):

1. migrují mezi spoji endoteliálních buněk (paracelulární diapedeza),

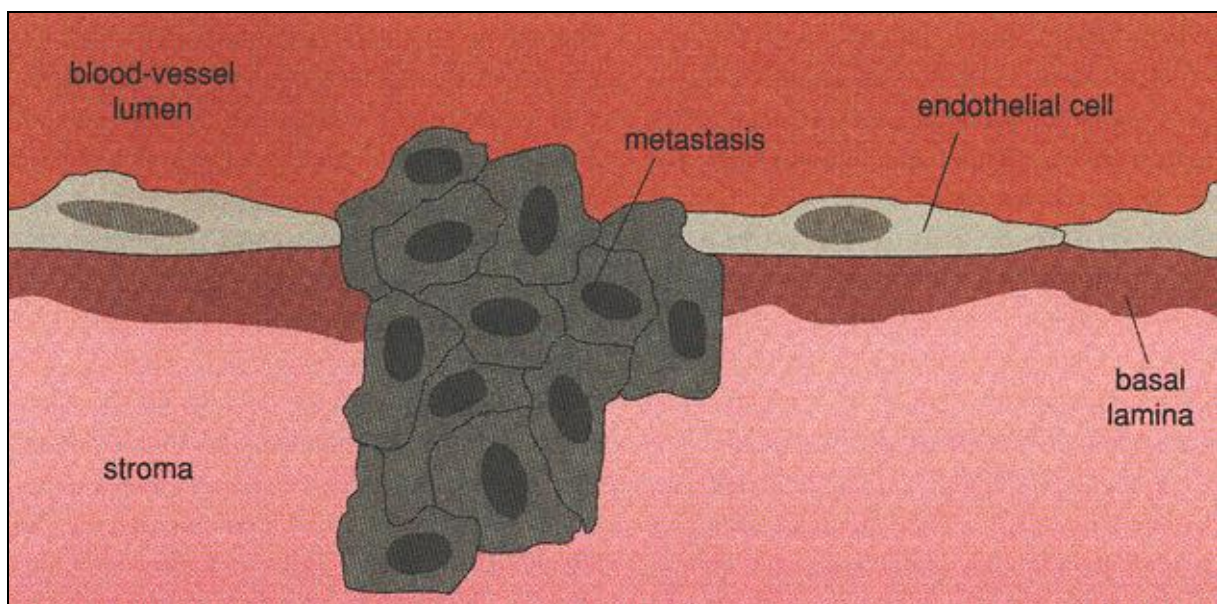
2. tvoří mozaikovitou chimerickou vrstvu obou typů buněk,
3. pronikají skrz endoteliální buňky ve velké vakuole (transcelulární diapedeza).



Obr. 10-12 Prostup (diapedezy) nádorových buněk kolonu endotelem (*Woodward J. Cell Adhesion & Migration 2008 : 151*)

10.5 UCHYCENÍ BUNĚK V NOVÉ TKÁNI

V konečném stadiu musí buňka překonat kromě bariéry endotelu stěny cév, bazální membránu v nové tkáni, musí se zde uchytit a začít se dělit (obr. 10-13). Na těchto procesech se podílí řada molekul. Jsou to zejména proteázy degradující matrix – **metaloproteinázy**. Tyto enzymy exprimují především bílé krvinky, které normálně musí překonávat membránové bariéry. U jiných buněk jsou exprimovány málo a funguje zde systém zahrnující inhibitory metaloproteináz. Dále jsou to receptory pro endoteliální buňky, vazebné proteiny, faktory motility a jejich receptory, receptory pro růstové faktory (odpověď na nové mikroprostředí) atd.



Obr. 10-13 Metastatická nádorová buňka proniká přes endotelovou bariéru do tkáně, uchytí se, začne se dělit a tvoří sekundární nádor (*Van Noorden Cj.J.F. et al., American Scientist 1998 : 130*)

Poruchy proteolytické – antiproteolytické rovnováhy hrají důležitou roli v degradaci tkání. *Během nádorového růstu a tvorby metastáz je kontrola proteolytické aktivity narušena.*

Systémy následujících proteolytických enzymů fungují v kooperaci (obr. 10-14):

- Lyzozomální proteázy - aspartyl a cystein proteázy – katepsiny
- Serinové proteázy – plasminogen, plasminogenové aktivátory
- Metaloproteinázy

Protease family	Protease	Protease function	Protease inhibitors
Aspartyl protease	Cathepsin D	Degradation of ECM components Conversion of cysteine procathepsins into cathepsins	
Cysteine proteases	Cathepsins B, L, H, K	Degradation of ECM components Conversion of pro-MMPs into MMPs	Cystatins, stefins, kininogen
Serine proteases	Plasmin	Degradation of ECM components Activation of uPA Conversion of inactive elastase into elastase	α_2 -antiplasmin, α_2 -macroglobulin
	Urokinase-type plasminogen activator (uPA)	Conversion of plasminogen into plasmin	PAI-1, 2, 3
	Tissue-type plasminogen activator (tPA)	Conversion of plasminogen into plasmin	
Neutrophil serine proteases	Elastase	Degradation of ECM components	α_2 -antiplasmin α_2 -macroglobulin
	Cathepsin G		secretory leukoprotease inhibitor
Matrix metalloproteinases		Degradation of collagens and other ECM proteins Activation another pro-MMPs into MMPs	TIMP-1, 2, 3, 4 α_2 -macroglobulin
	Collagenases [MMP-1, 8, 13]	Degradation of collagens: I, II, III, VII, X and gelatins	
	Stromelysins [MMP-3, 10]	Degradation of proteoglycans, laminin, gelatins, collagens III, IV, V, IX, fibronectin, entactin, SPARC, collagenases-1	
	Gelatinases [MMP-2, 9]	Degradation of gelatins, collagens: I, IV, V, VII, X, fibronectin, elastin, procollagenase-3	
	Membrane-type [MMP-14, 15, 16, 17, 24, 25]	Degradation of collagen I, II, III, gelatins, aggrecan, fibronectin, laminin, vitronectin, MMP-2,13, tenascin, nidogen	
	Others [MMP-7, 11, 12, 19, 20, 23]	Degradation of proteoglycans, laminin, fibronectin, gelatins, collagens IV, elastin, entactin, tenascin, α_1 -antiproteinase, amelogenin	

Obr. 10-14 Proteázy degradující ECM a jejich inhibitory

Plasminogenové aktivátory (PA) jsou serinové proteázy, které přeměňují plasminogen na plasmin. **Plasmin** degraduje různé složky ECM včetně fibrinu, fibronektinu, lamininu atd. Plasmin také aktivuje několik typů metaloproteináz.

Rodina matrix metaloproteináz (MMP) má asi 16 členů, z nichž většina jsou rozpustné sekretované enzymy nebo transmembránové proteiny schopné digesce ECM nebo komponent bazální membrány. Představují různé typy enzymů podle struktury a substrátové specifity (kolagenázy, gelatinázy, stromelysiny). Jsou exprimovány jako latentní enzymy s podobnou

strukturou domén. Některé také obsahují transmembránovou doménu a jsou lokalizovány na buněčném povrchu.

PA a MMP jsou sekretovány spolu se svými inhibitory (za normálních podmínek nízká hladina), což zajišťuje přísnou kontrolu lokální proteolytické aktivity a je tak zachována normální struktura tkání.

Aktivita PA i MMP je kontrolována na několika úrovních:

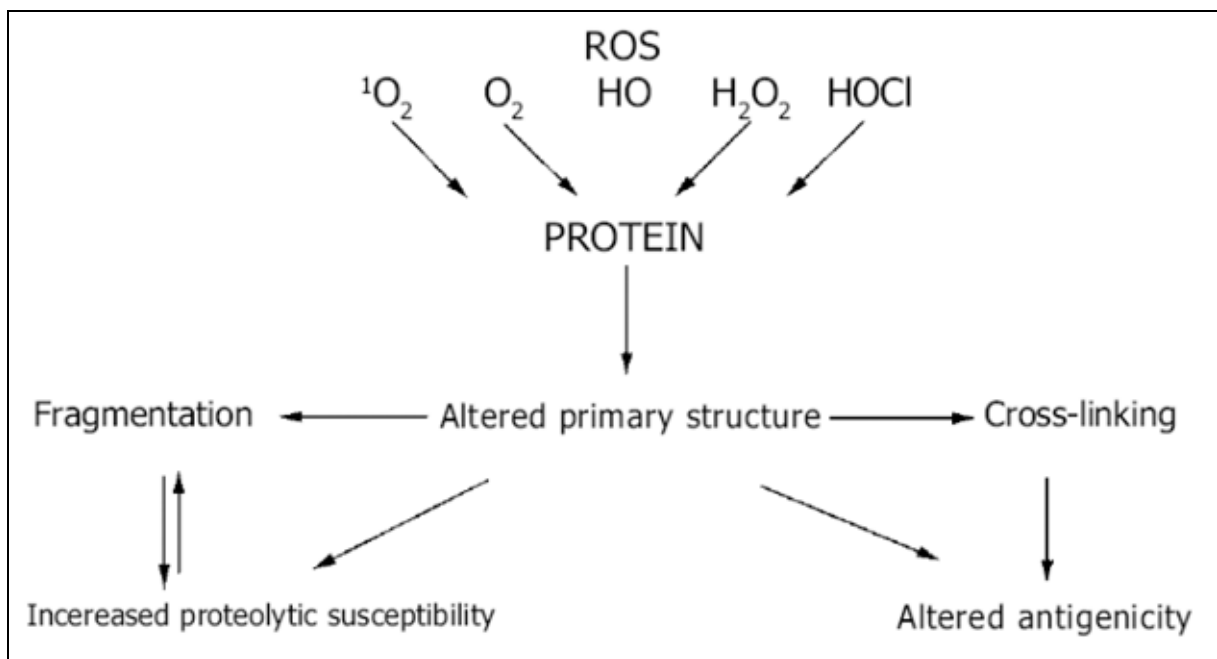
- exprese se zvyšuje působením angiogenních růstových faktorů a cytokinů
- pro-MMP a pro-PA mohou být proteolyticky aktivovány
- MMP, plasmin a PA jsou regulovány **tkáňovými inhibitory MMP (TIMP)**.

Existuje řada důkazů, že tato kontrola je během nádorového růstu a tvorby metastáz narušena. U mnoha typů nádorů (kolorekta, prsu, žaludku, moč. měchýře, prostaty) byla detekována vysoká aktivita MMP. Byla také nalezena dobrá korelace mezi množstvím MMP a agresivitou a invazivitou nádoru.

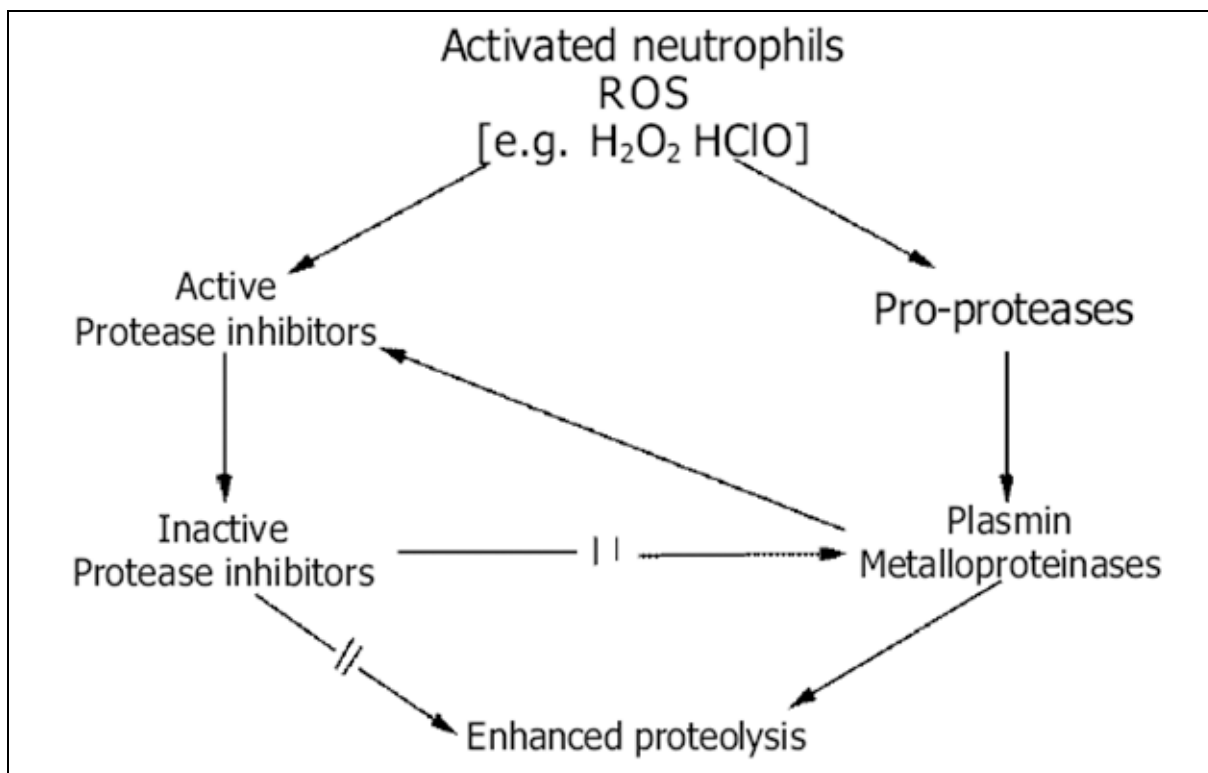
V invazivním procesu hrají také důležitou roli **oxidativní změny** biologicky aktivních proteinů, které jsou závislé na typu a koncentraci reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS).

Oxidativní modifikace struktury proteolytických enzymů a jejich inhibitorů vede k porušení rovnováhy. Tyto změny zpětně pak podporují další produkci ROS granulocyty a makrofágy (obr. 10-15 a 10-16).

Vše vede ke zvýšené proteolýze a destrukci ECM.



Obr. 10-15 Reaktivní metabolity kyslíku (ROS) v proteolytické – antiproteolytické rovnováze 1



Obr. 10-16 Reaktivní metabolity kyslíku (ROS) v proteolytické – antiproteolytické rovnováze 2

Interakce s ECM

Migrující buňky musí navázat také nové kontakty s komponentami matrix. Tyto kontakty jsou umožňovány dalšími povrchovými adhezivními molekulami důležitými pro usídlení buněk v nové tkáni. Patří k nim především **hyaluronan** (velký glykosaminoglycan) regulující buněčnou motilitu, chemotaxi, invazi, proliferaci, tvar a metabolické funkce. *Významná je exprese specifických receptorů pro hyaluronan, která podporuje vznik metastáz (obr. 10-17). Patří k nim CD44, pleomorfní receptor, který váže též fibronectin, laminin a jiné ligandy.* CD44 byl objeven jako leukocytární antigen umožňující usídlení (homing) lymfocytů. Pomocí specifických monoklonálních protilátek byl pak detekován u metastázujících buněk, kterým umožňuje transendoteliální migraci a kolonizaci tkání (obr. 10-18). Předpokládá se, že *metastázující buňky tak využívají genetický program lymfocytů a makrofágů - jediných migrujících buněk v normálním dospělém organismu.* Jako další takové molekuly byly detekovány **specifické selektiny a integriny (obr. 10-19).** *Nádorové buňky mění složení integrinů na svém povrchu během progrese (obr. 10-20).* Je-li pomocí specifických peptidů blokována interakce s ligandem, je blokována invaze *in vitro* i tvorba experimentálních metastáz.

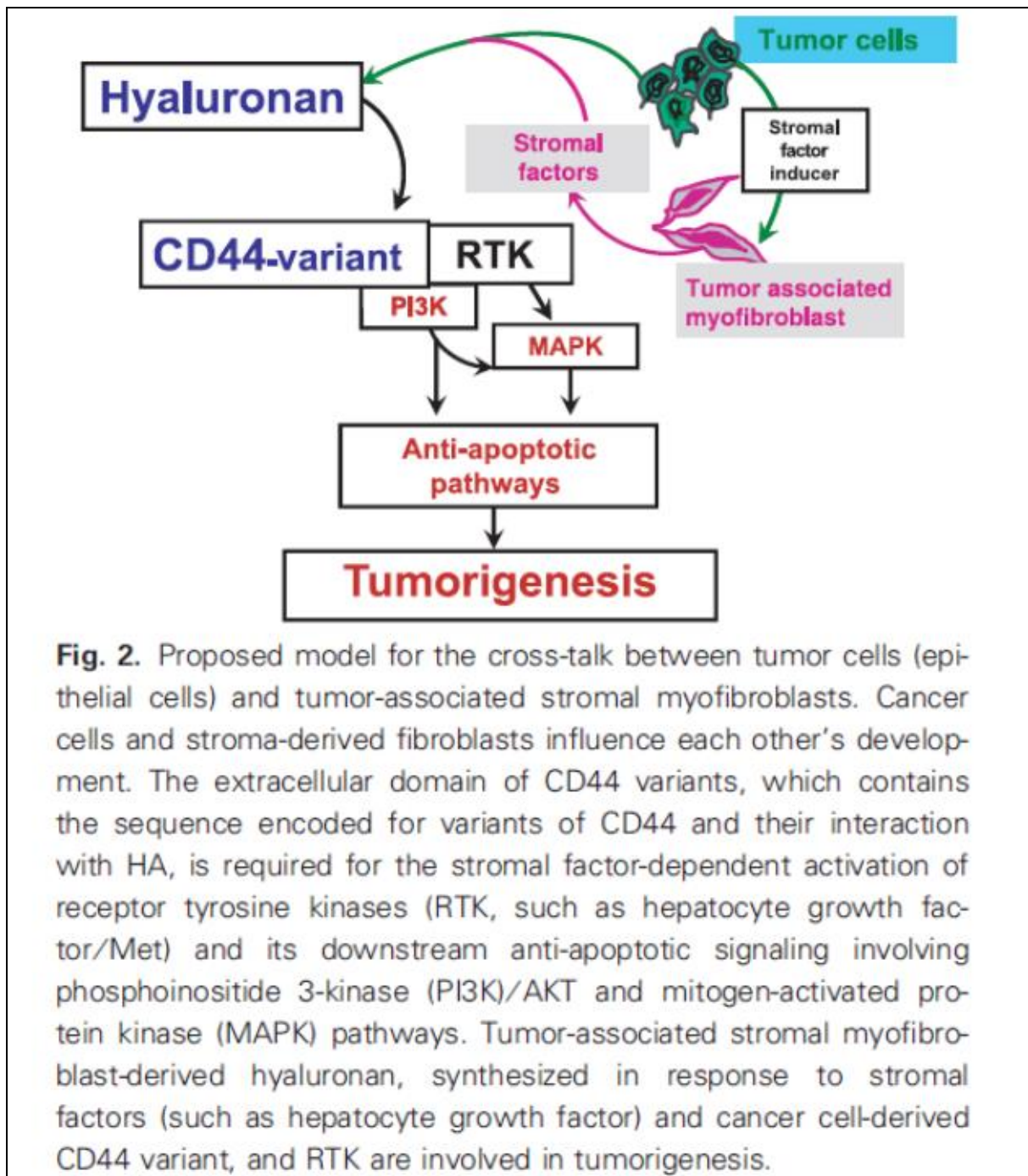
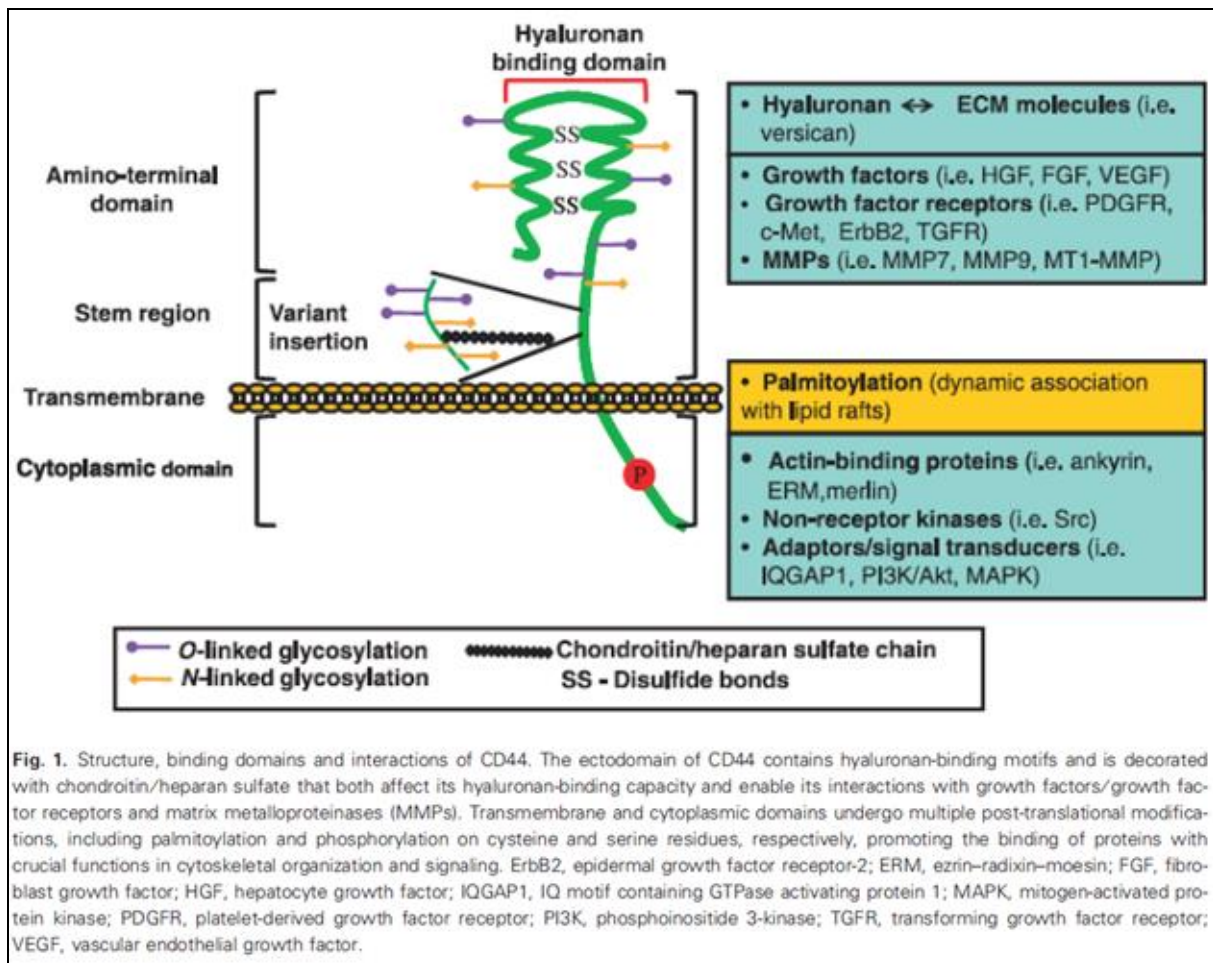
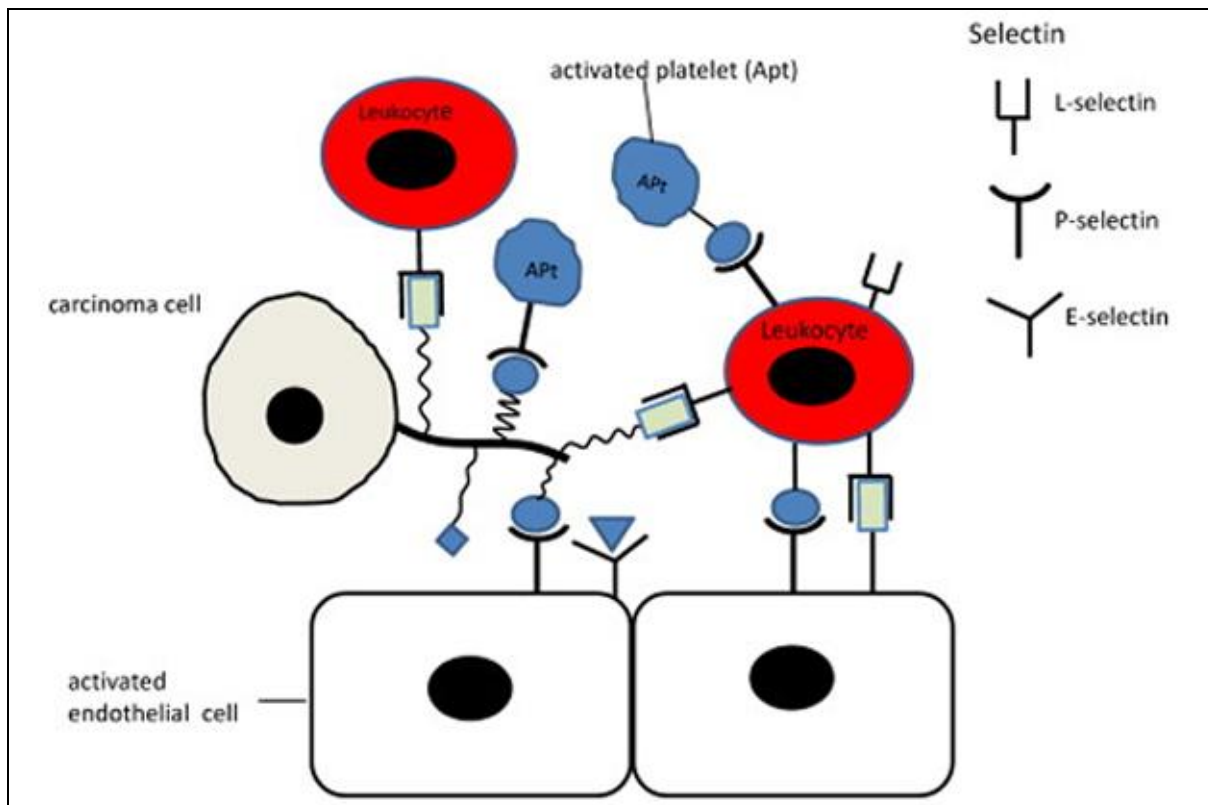


Fig. 2. Proposed model for the cross-talk between tumor cells (epithelial cells) and tumor-associated stromal myofibroblasts. Cancer cells and stroma-derived fibroblasts influence each other's development. The extracellular domain of CD44 variants, which contains the sequence encoded for variants of CD44 and their interaction with HA, is required for the stromal factor-dependent activation of receptor tyrosine kinases (RTK, such as hepatocyte growth factor/Met) and its downstream anti-apoptotic signaling involving phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. Tumor-associated stromal myofibroblast-derived hyaluronan, synthesized in response to stromal factors (such as hepatocyte growth factor) and cancer cell-derived CD44 variant, and RTK are involved in tumorigenesis.

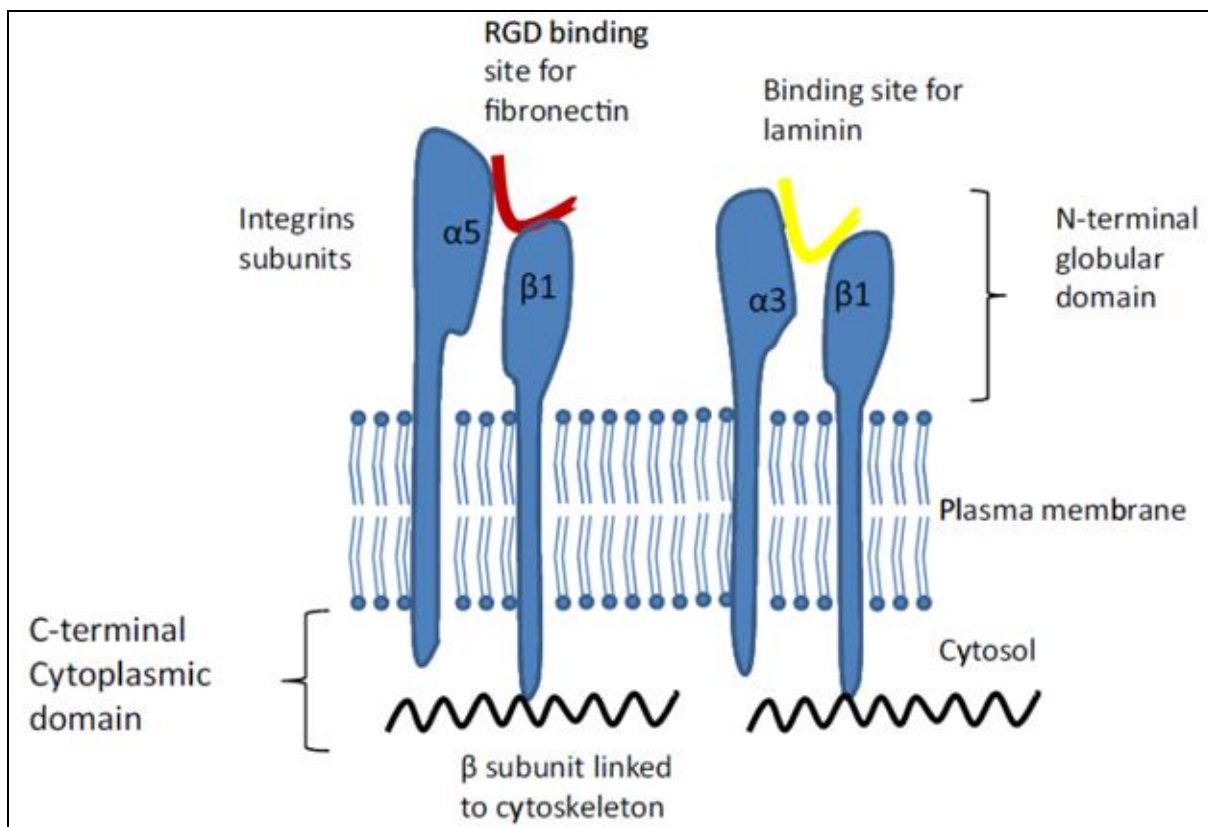
Obr. 10-17 Model interakce mezi nádorovými buňkami a stromatem (*Misra S et al., FEBS J 2011 : 1429*)



Obr. 10-18 Význam interakce hyaluronan a CD44. CD44 – pleomorfní doména vážící hyaluronan a další molekuly Hyaluronan – důležitý pro vazbu nádorové buňky s ECM přenos signálu reorganizující cytoskeleton a aktivující spec. molekuly. (*Misra S et al., FEBS J 2011 : 1429*)

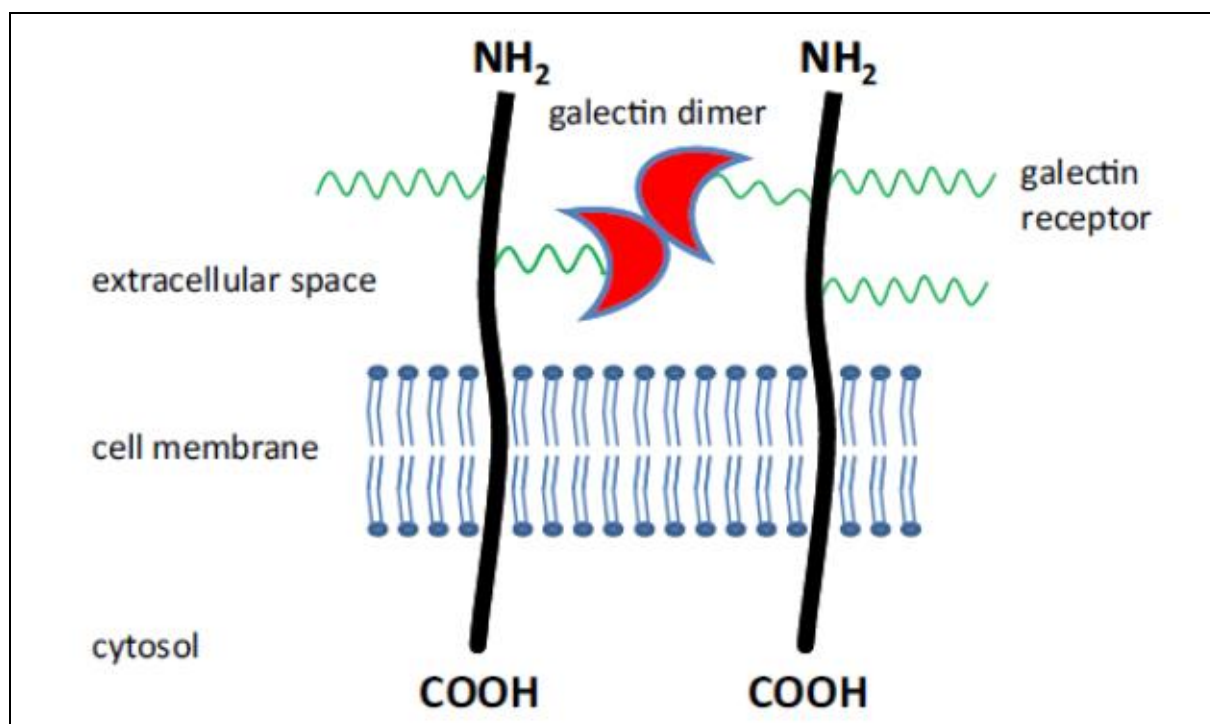


Obr. 10-19 P-, E- and L-selektiny u aktivovaných endoteliálních buněk a leukocytů se vážou ke specifickým nádorovým ligandům (Rambaruth N.D.S. a Dwek M.V., *Acta Histochemica* 2011 : 591)



Obr. 10-20 Interakce mezi buňkami a ECM . Vazebná místa integrinů pro složky ECM (fibronektin, laminin) (*Rambaruth N.D.S. a Dwek M.V., Acta Histochemica 2011 : 591*)

Povrchové a transmembránové molekuly jako CD44 a integriny nezpůsobují jen vzájemný buněčný kontakt nebo kontakt s ECM, ale zajišťují též přenos signálu do nitra buňky po navázání ligandu (obr. 10-21). To má za následek jednak reorganizaci cytoskeletonu (změny tvaru buněk, motility) a jednak změny genetického programu, např. zvýšení fosforylace tyrozinu nebo aktivaci GTP. Byly identifikovány též intracelulární proteiny, které se specificky exprimují v metastázujících buňkách a účastní se přenosu signálů v buňce, např. mts-1 a Tiam-1.

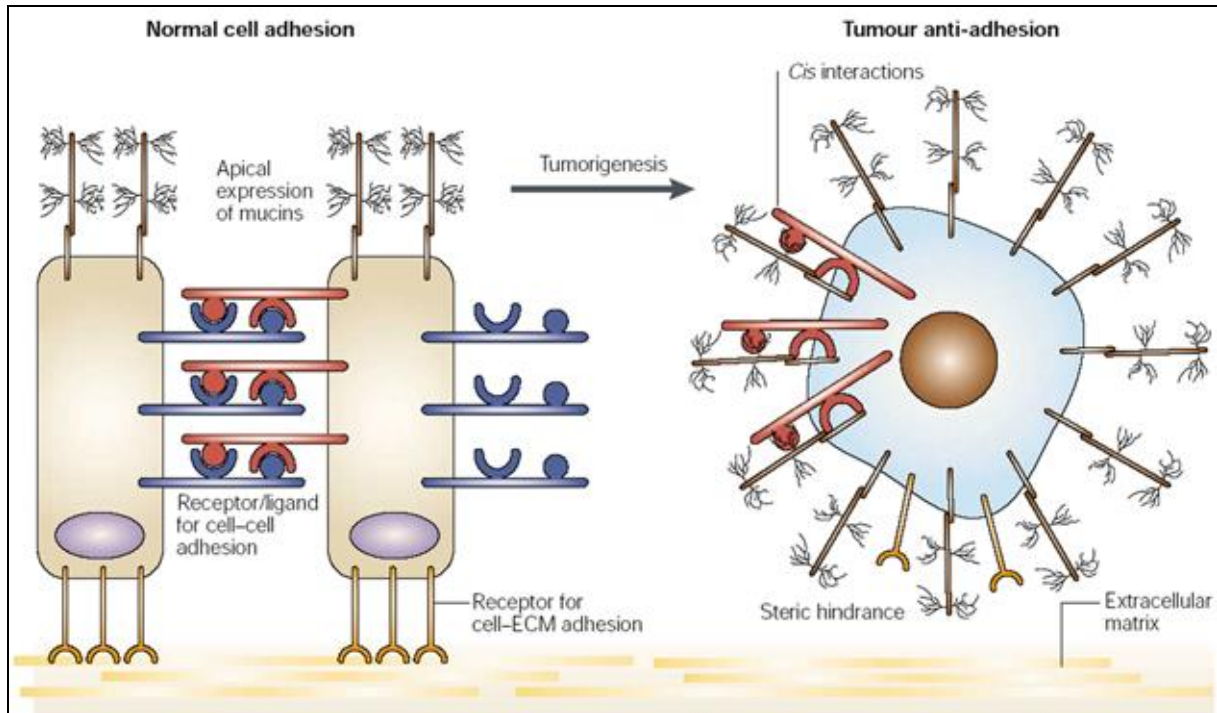


Obr. 10-21 Galektiny se účastní adhezi buňka-ECM, migrace, růstu, apoptózy a diferenciaci. Tvoří propojení důležitá při aktivaci receptorů a indukci vnitrob. signálů Jsou změněny v patologických podmínkách. (*Rambaruth N.D.S. a Dwek M.V., Acta Histochemica 2011 : 591*)

10.6 ÚLOHA MUCINŮ V KARCINOGENEZI

Muciny (MUC) jsou velké glykosylované proteiny syntetizované buňkami gastrointestinálního, dýchacího a močopohlavního ústrojí. Jsou kódovány řadou tkáňově specifických genů. Jejich úlohou je chránit epitel proti mechanickému, chemickému, enzymatickému a mikrobiálnímu poškození. Normální epiteliální buňky sekretují s membránou spojené muciny jen na apikálním konci a tak nebrání adhezi mezi buňkami navzájem nebo mezi a buňkou a substrátem. Hlavním mucinem sekretovaným ve střevě gobletovými buňkami je MUC2.

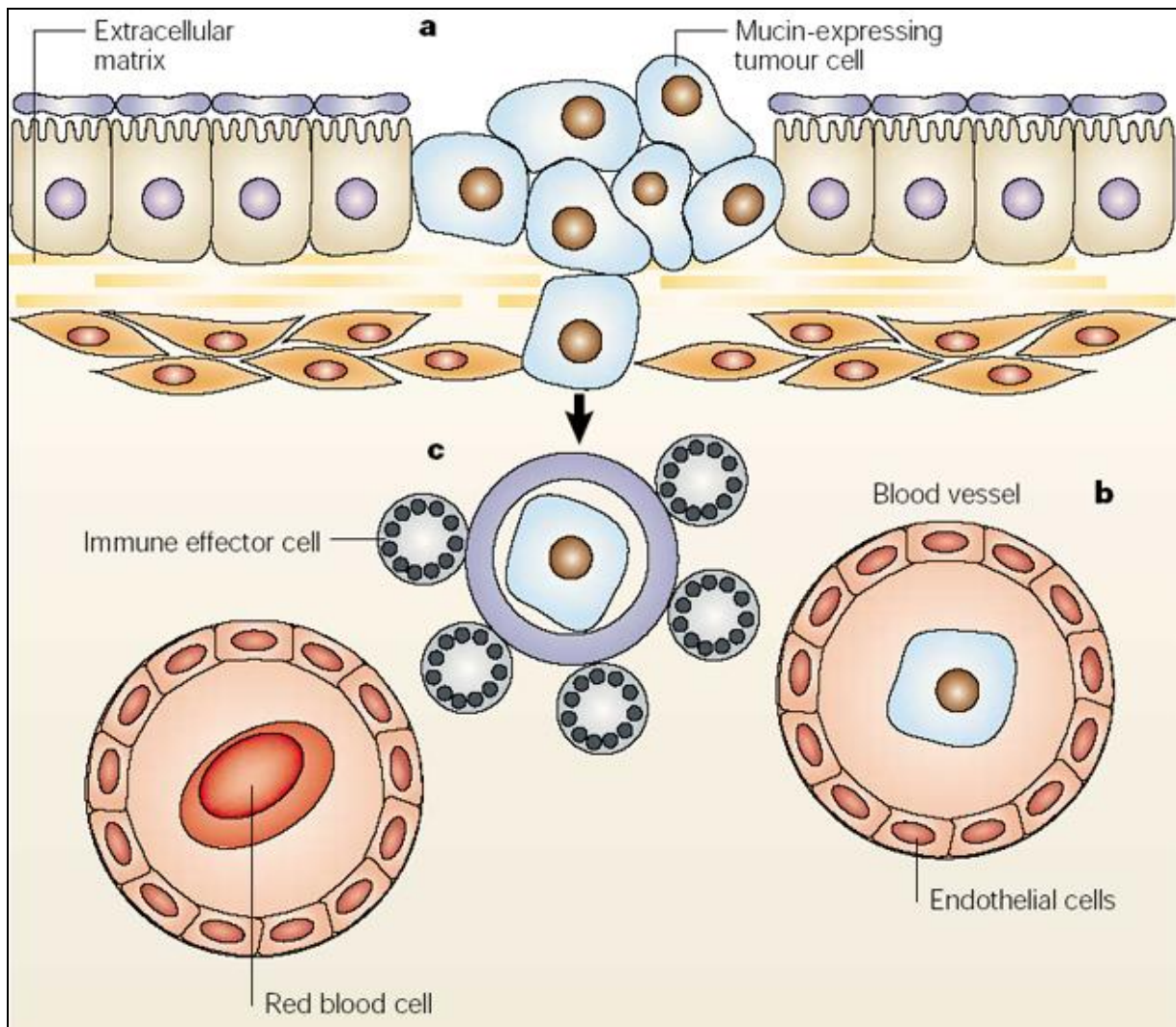
Poruchy povrchových mucinů jsou obecnou charakteristikou maligní transformace (obr. 10-22). Jsou odpovědné za abnormální chování buněk, změny adheze nebo metastázování a uniknutí z imunologického dozoru. Nádorové buňky totiž exprimují muciny po celém povrchu, což blokuje receptory a adheze s ostatními buňkami. Exprese se zvyšuje působením angiogenních růstových faktorů a cytokinů.



Obr. 10-22 Antiadhezivní vlastnosti mucinů (Hollingsworth M.A. and Swanson B.J. *Nature Rev Cancer* 2004 : 45)

Nádory využívají

- antiadhezivních vlastností mucinů k uvolnění z nádorové masy a okolního stromatu a k invazi
- adhezivních vlastností mucinů k připojení k endotelu a k invazi
- muciny k úniku z imunologického dohledu.



Obr. 10-23 Mnohonásobná úloha mucinů v rozvoji nádorů (*Hollingsworth M.A. and Swanson B.J. Nature Rev Cancer 2004 : 45*)

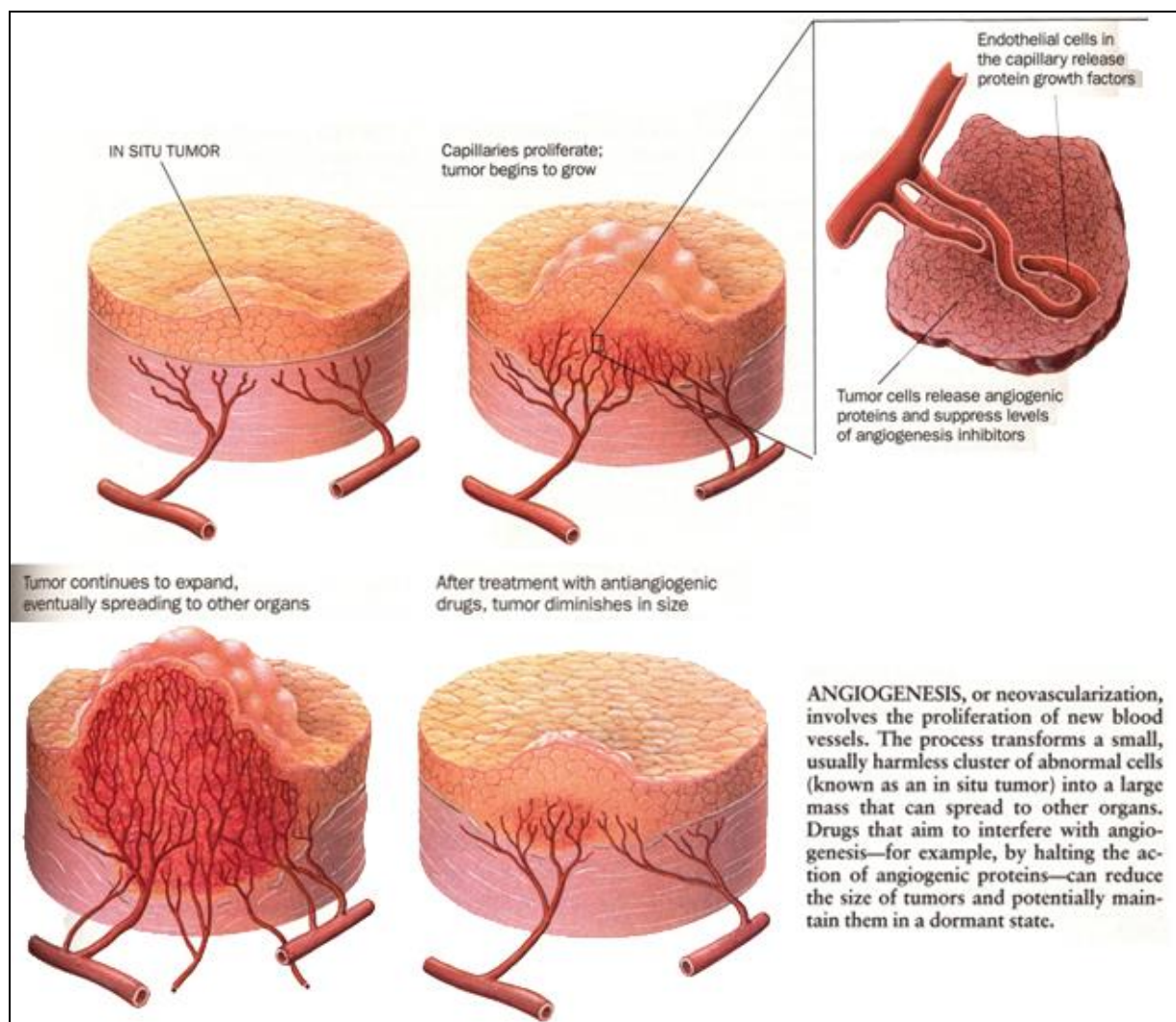
Kontrolní otázky k tématu:

- Jak je charakterizováno progresivní stadium karcinogeneze?
- Popište metastatickou kaskádu.
- Které adhezivní molekuly hrají významnou úlohu v metastatickém procesu?
- Co rozumíte pod pojmem závislost buněk na podkladu?
- Jaká je úloha apoptózy v metastatickém procesu?
- Vysvětlete hypotézu tzv. „docking a locking“.
- Jak překonávají nádorové buňky tkáňové bariéry?
- Jmenujte molekuly účastníci se proteolytické-antiproteolytické rovnováhy ve tkáních.
- Které molekuly jsou zásadní v interakci s ECM?
- Co jsou to muciny a jak se uplatňují při rozvoji nádorů?

11. ANGIOGENEZE

Angiogenezi nazýváme **proces tvorby nových krevních kapilár**. U dospělého jedince je proliferace endoteliálních buněk velmi nízká. Fyziologickou výjimku, kde je ale angiogeneze přísně regulována, tvoří ženský reprodukční systém a hojení ran. Neregulovaná angiogeneze je spojena s řadou patologických stavů jako je revmatická artritida, psoriasis (lupénka), diabetická retinopatie a nádorová onemocnění.

Nádorový růst a tvorba metastáz jsou závislé právě na angiogenezi. Rostoucí nádor potřebuje rozsáhlou síť kapilár k zásobování živinami a kyslíkem. Kromě toho jsou kapiláry uvnitř nádorů cestou, kudy se nádorové buňky dostávají do oběhu a mohou tak metastázovat v různých vzdálených orgánech. Angiogeneze je opět komplexní proces zahrnující širokou souhru mezi buňkami, rozpustnými faktory a složkami ECM (obr. 11-1).



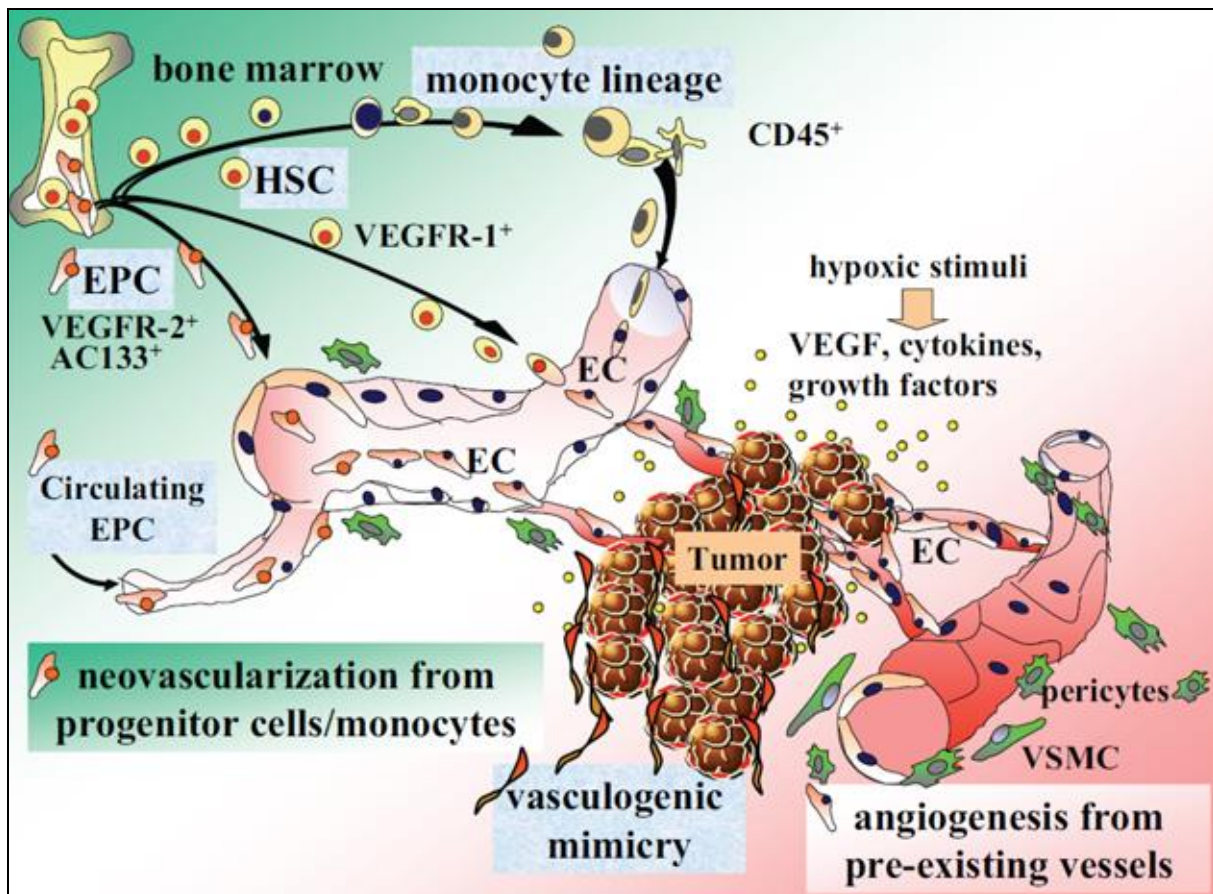
Obr. 11-1 Angiogeneze (Folkman J., *Scientific American* 1996 : 150)

K zahájení tvorby nových kapilár musí endoteliální buňky stávajících cév degradovat bazální membránu a vniknout do stromatu sousedních tkání. Tento proces invaze a migrace vyžaduje opět kooperativní aktivitu PA a MMP. Po proteolytické degradaci zahajují "vedoucí" endoteliální buňky migraci přes degradovanou matrix. Jsou následovány prolifерujícími endoteliálními buňkami, které jsou stimulovány řadou faktorů, z nichž některé jsou uvolňovány z degradované ECM.

11.1 INDUKTORY ANGIOGENEZE

Hlavní endogenní induktory angiogeneze představují různé peptidové růstové faktory a prozánětlivé mediátory (obr. 11-2):

- rodina **vaskulárního endoteliálního růstového faktoru** (vascular endothelial growth factor – VEGF) a angiopoetiny působí specificky na endoteliální buňky. VEGF působí protiapopticky a aktivuje receptorové tyrozin kinázy. Jeho hladina je zvyšována hypoxií.
- **přímo působící cytokiny a chemokiny**, které aktivují řadu dalších buněčných typů. Prototypem je bazální fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor - bFGF), růstový faktor destiček (platelet growth factor – PDGF) a dále interleukiny (IL-8, IL-3).
- **nepřímo působící faktory** jako je nádor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor - TNF alpha) a transformující růstový faktor (transforming factor - TGF beta), které působí parakrinně uvolňování dalších faktorů z makrofágů, endoteliálních nebo nádorových buněk. Např. TNF alpha stimuluje uvolňování VEGF, IL-8 a FGF-2 z endoteliálních buněk.
- **enzymy** (cyklooxygenáza-2 - COX2, angiogenin), **hormony** (estrogeny), **oligosacharidy** (hyaluronan), **hemopoetické faktory** (erythropoetin – EPO, granulocytární růstový faktor – G-CSF, granulocytární monocytární růstový faktor – GM-CSF), **adhezivní molekuly** (VCAM-1, E-selektin), **oxid dusíku** atd.



Obr. 11-2 Patologická neovaskularizace během nádorové progresse (Furuya M. et al., *Vascular Health and Risk Management* 2005 : 277)

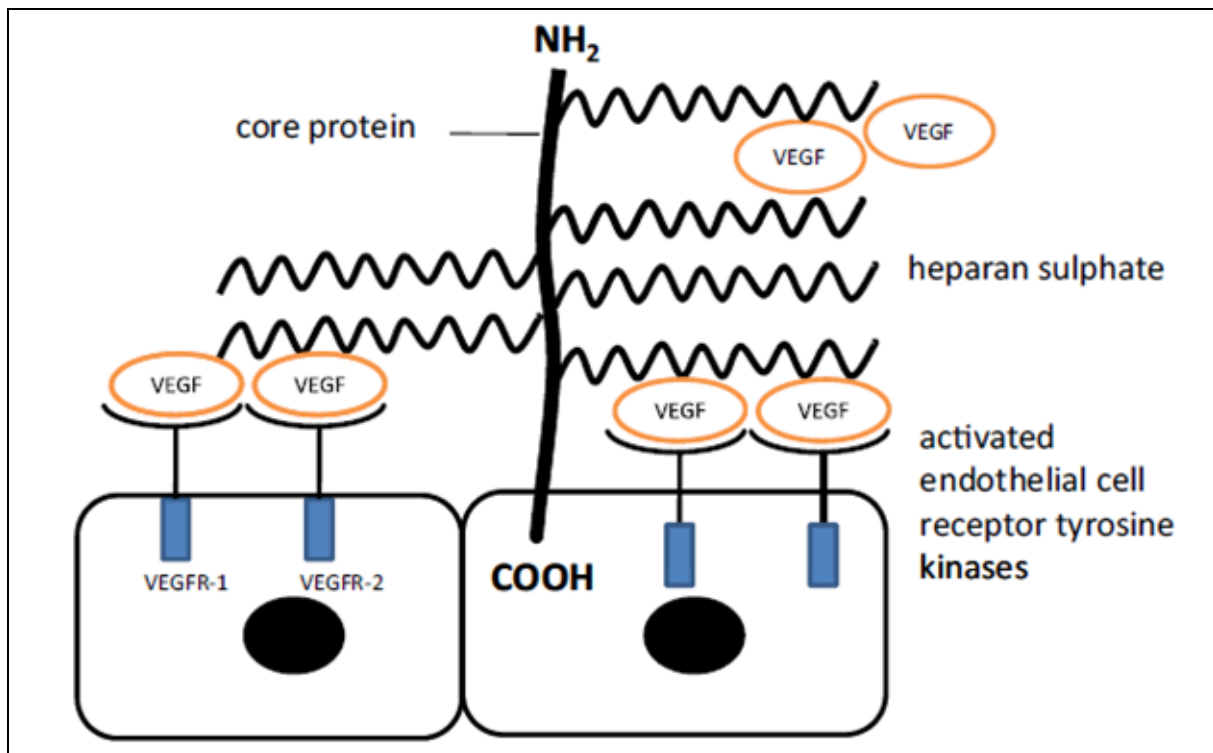
Jako **endogenní inhibitory angiogeneze** působí trombospodin-1, interferon α/β , prolactin a tzv. statiny (angiostatin, endostatin, vasostatin atd.)

Zahájení nádorové angiogeneze je výsledkem posunu v rovnováze stimulantů a inhibitorů.

11.2 ÚLOHA BUNĚČNÉ ADHEZE V ANGIOGENEZI

Proces buněčné invaze, migrace a proliferace není závislý jen na angiogenních enzýmech, růstových faktorech a jejich receptorech, ale je zprostředkován také adhezivními molekulami. V angiogenezi se uplatňují členové každé skupiny CAM.

K zahájení angiogenního procesu se musí endoteliální buňky uvolnit od sousedních buněk. Během invaze a migrace je pak interakce endoteliálních buněk s ECM zprostředkována integriny. Také konečná fáze angiogenního procesu, včetně konstrukce kapilárních smyček a určení polarity buněk, vyžaduje buněčné kontakty a kontakty s ECM (obr. 11-3).



Obr. 11-3 Interakce heparan sulfátu (HS) s VEGF na receptorech endoteliálních buněk během angiogeneze (Rambaruth N.D.S. a Dwek M.V., *Acta Histochemica* 2011 : 591)

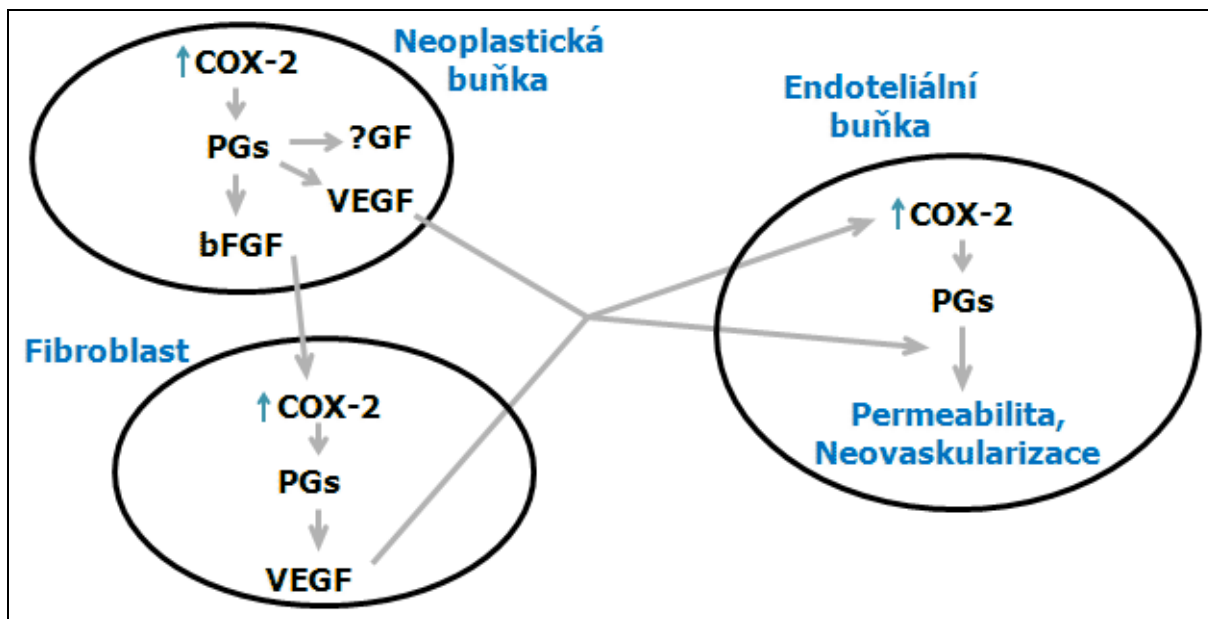
Endoteliální buňky tak exprimují několik různých integrinů, což jim umožňuje napojení na široké spektrum proteinů ECM. Některé integriny jsou nedetekovatelné v klidovém endotelu, ale jsou zvýšeny během angiogeneze indukované cytokiny nebo nádorem. V aktivovaném endotelu mohou potlačovat aktivitu p53 a p21 a zvyšovat poměr Bcl2:Bax, což má antiapoptické účinky.

Kromě integrinů se v angiogenezi uplatňuje i řada dalších molekul:

- vaskulární endoteliální kadherin zprostředkovává homofilní interakce mezi endoteliálními buňkami závislé na Ca²⁺
- členové ICAM zprostředkovávají heterofilní adheze. Jsou zvyšovány TNF alfa, IL-1 nebo interferonem-gamma.
- P- nebo E-selektin podporují adhezi leukocytů k endotelu aktivovanému cytokiny.

V angiogenezi se uplatňují rovněž **interakce řady buněčných typů** (obr. 11-4). V nádorových buňkách prostaglandiny (PGs) tvořené přes COX-2 zvyšují produkci růstových faktorů jako je VEGF, které působí přímo na endoteliální buňky a bFGF, který stimuluje produkci COX-2 u fibroblastů. PGs tvořené ve fibroblastech stimuluje produkci VEGF, který působí parakrinním způsobem na endoteliální buňky a opět zvyšuje aktivitu COX-2 a usnadňuje

permeabilitu cév a angiogenezi. Inhibitory COX-2 blokují produkci PGs a tak zabraňují angiogenezi indukované růstovými faktory.



Obr. 11-4 Model angiogeneze – interakce buněčných typů (podle Leahy K.M. et al., *Curr Med Chem* 2000 : 163)

11.3 VÝZNAM AGIOGENEZE A ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE

Existuje úzký vztah mezi angiogenezí a tvorbou metastáz. Čím intenzivnější angiogeneze, tím větší riziko metastáz a horší prognóza nádorového onemocnění. Hustota cév uvnitř nádoru má také prognostickou hodnotu. Byla nalezena pozitivní korelace mezi nádorovou angiogenezí a rizikem vzniku metastáz, znovuobnovením nádoru a smrtí. Kvantitativní hodnocení je prognostickým faktorem např. u rakoviny prsu, děložního čípku, močového měchýře a melanomu. Zvýšená vaskularizace kostní dřeně značí horší prognózu u akutní leukémie. Z histologických řezů se detekují fokální oblasti tzv. „hot spots“ pomocí monoklonálních protilátek proti cévnímu endotelu nebo adhezivním molekulám CD31 a CD34.

Odhalování molekulární a buněčné biologie angiogeneze dává základ pro **nové terapeutické přístupy**, které využívají řadu **anti-angiogenních látek** specifických pro jednotlivé kroky angiogeneze. V současnosti existuje řada protinádorových chemoterapeutických látek. Bohužel, mnohé mají omezenou účinnost díky problémům s doručením a pronikáním k buňkám a díky malé selektivitě pro nádorové buňky, čímž způsobují vážné poruchy v normálních tkáních. Jejich aktivita je omezena také vývojem rezistence. Nádorové buňky se rychle mění díky své genomové nestabilitě, heterogenitě a vysoké mutační rychlosti, což vede k selekci a přerůstání rezistentní nádorové populace.

Antiangienní terapie, která zasahuje aktivované endoteliální buňky, poskytuje řadu výhod proti terapii mířené přímo proti nádorovým buňkám. Endoteliální buňky jsou geneticky stabilní, diploidní a homogenní cíl a zřídka zde dochází k mutacím. Také jejich obnova je až padesátkrát vyšší než v normální klidové tkáni a aktivované krevní cévy vykazují specifické markery jako jsou integriny a selektiny nebo VEGF receptory.

K potenciálně využitelným látkám patří (obr. 11-5):

- inhibitory buněčné invaze, motility a adheze (inhibitory MMP aktivity, inhibice buněčných adhezivních molekul)
- inhibitory aktivovaných endoteliálních buněk jako je trombospodin-1, fyziologický inhibitor angiogeneze, který je snížen během aktivace angiogeneze a jeho produkce je regulována p53. Dále různé typy statinů jako je angiostatin a endostatin, jejichž zdrojem jsou samotné nádorové buňky i uměle syntetizované látky (talidomid).
- látky, které interferují s angiogenními růstovými faktory a jejich receptory (specifické protilátky, INF-alfa)
- inhibitory enzymů jako je COX-2 (nesteroidní protizánětlivé látky – NSAIDs)

Name	Description
Thrombospondin-1 and internal fragments of thrombospondin-1	Thrombospondin is a 180 kDa, large, modular extracellular matrix protein (53)
Angiostatin	A 38 kDa fragment of plasminogen involving either kringle domains 1–3, or smaller kringle 5 fragments (58,163,164)
Endostatin	A 20 kDa zinc-binding fragment of type XVIII collagen (59)
Vasostatin	An N-terminal fragment (amino acids 1–80) of calreticulin (61)
Vascular endothelial growth factor inhibitor (VEGI)	A 174 amino acid protein with 20–30% homology to tumor necrosis factor superfamily (60)
Fragment of platelet factor 4 (PP4)	An N-terminal fragment of PP4 (63)
Derivative of prolactin	16 kDa fragment of the hormone (57)
Restin	NC10 domain of human collagen XV (165)
Proliferin-related protein (PRP)	A protein related to the pro-angiogenic proliferin molecule (166)
SPARC cleavage product	Fragments of secreted protein, acid and rich in cysteine (62)
Osteopontin cleavage product	Thrombin-generated fragment containing an RGD sequence (65)
Interferon α/β	Well known anti-viral proteins (56)
Meth 1 and Meth 1	Proteins containing metalloprotease and thrombospondin domains, and disintegrin domains in NH ₂ termini (65)
Angiopoietin-2	Antagonist of angiopoietin-1 which binds to tie-2 receptors (39,44)
Anti-thrombin III fragment	A fragment missing C-terminal loop of anti-thrombin III (a member of the serpin family) (64)

Obr. 11-5 Endogenní inhibitory angiogeneze

Specifickým přístupem je tzv. "vascular targeting", tj. inhibice růstu nádoru destrukcí nádorových cév. Problémem je nedostatek specifických markerů pro aktivované nádorové endotelium. Potenciální cílové molekuly zahrnují integriny, E-selektin a receptory pro VEGF. Destrukce může být dosaženo lokálním dodáním specifických peptidů nebo protilátek s přímou biologickou aktivitou nebo konjugované s toxiny (obr. 11-6).

Drug	Sponsor	Mechanism
COL-3	Collagenex, NCI	Synthetic MMP inhibitor; tetracycline derivative
Squalamine	Magainin	Inhibits Na/H exchanger
Combretastatin	Oxigene	Apoptosis in proliferating endothelium
PTK787/ZK2284	Novartis	Blocks VEGF receptor signaling
Endostatin	NCI/EntreMed	Induction endothelial cell apoptosis <i>in vivo</i>
CAI	NCI	Inhibitor of calcium influx
PTK787/2K22584	Novartis	Small molecule inhibitor of VEGF receptor

CGS-27023A	Novartis	Synthetic MMP inhibitor
TNP-470	TAP Pharm.	Fumagillin analogue; inhibits endothelial proliferation
Thalidomide	Celgene	Unknown
SUS416	Sugen	Blocks VEGF receptor signaling
Vitaxin	Ixsys	Antibody to integrin on endothelial surface
Interleukin-12	Genetics Inst.	Induces IFN-gamma and IP-10
EMD121974	Merck, Germany	small molecule integrin antagonist

Phase III

Marimastat	British Biotech	Synthetic MMP inhibitor
AG3340	Agouron	Synthetic MMP inhibitor
Neovastat/AE941	Aeterna	Natural MMP and VEGFR inhibitor
Anti-VEGF Ab	NCI	Monoclonal antibody to VEGF
Interferon-alfa	Commercially available	Inhibition of bFGF production
IM862	Cytran	unknown mechanism

Obr. 11-6 Inhibitory angiogeneze v klinických zkouškách

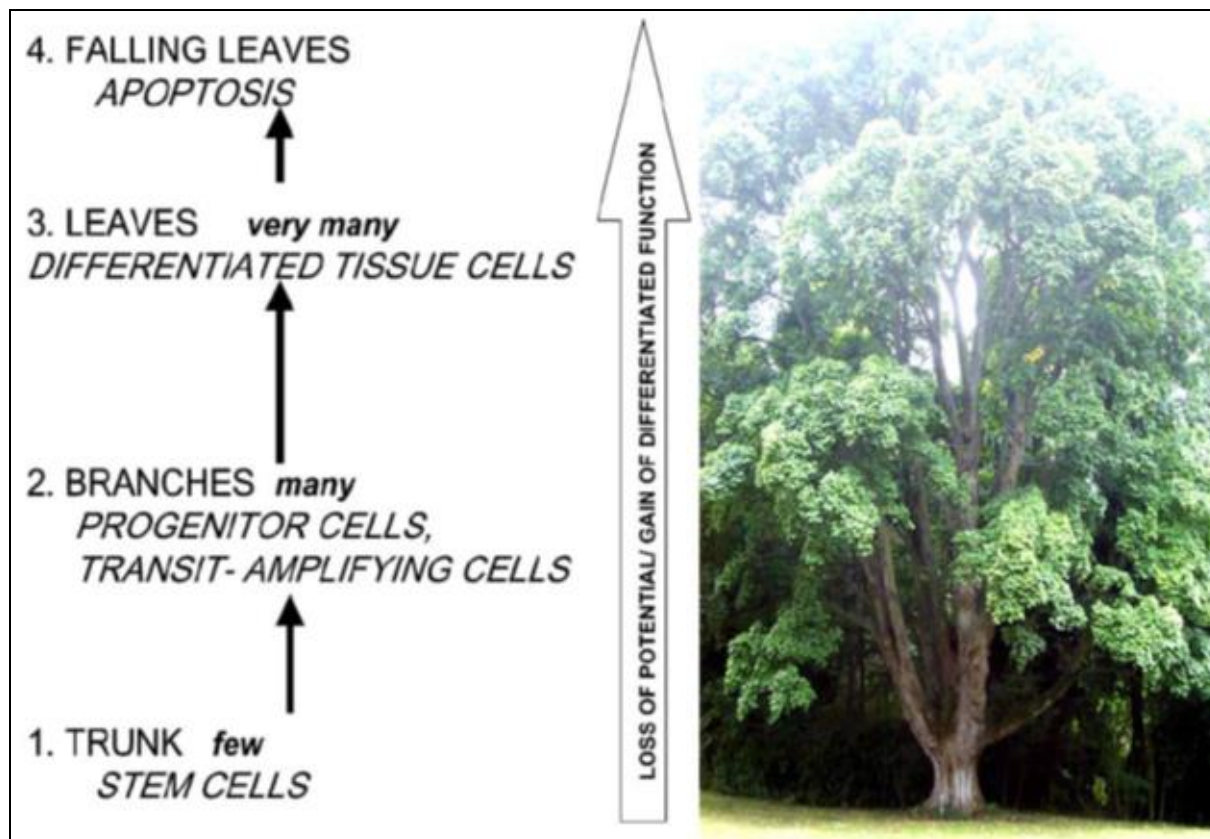
Kontrolní otázky k tématu:

- Co je to angiogeneze a jaký je její význam pro růst nádorů?
- Vyjmenujte skupiny látek (faktorů) patřící mezi induktory angiogeneze.
- Jaké látky fungují jako inhibitory angiogeneze?
- Jakým způsobem se v angiogenezi uplatňují adhezivní molekuly?
- Jakým způsobem funguje během angiogeneze interakce různých buněčných typů - příklad?
- Jak souvisí angiogeneze s tvorbou metastáz?
- Jak jsou využívány poznatky o mechanizmech angiogeneze v terapii?

12. KONTROLA KRVETVORBY (HEMOPOÉZY) A LEUKÉMIE

12.1 SEBEOBNOVNÉ BUNĚČNÉ POPULACE

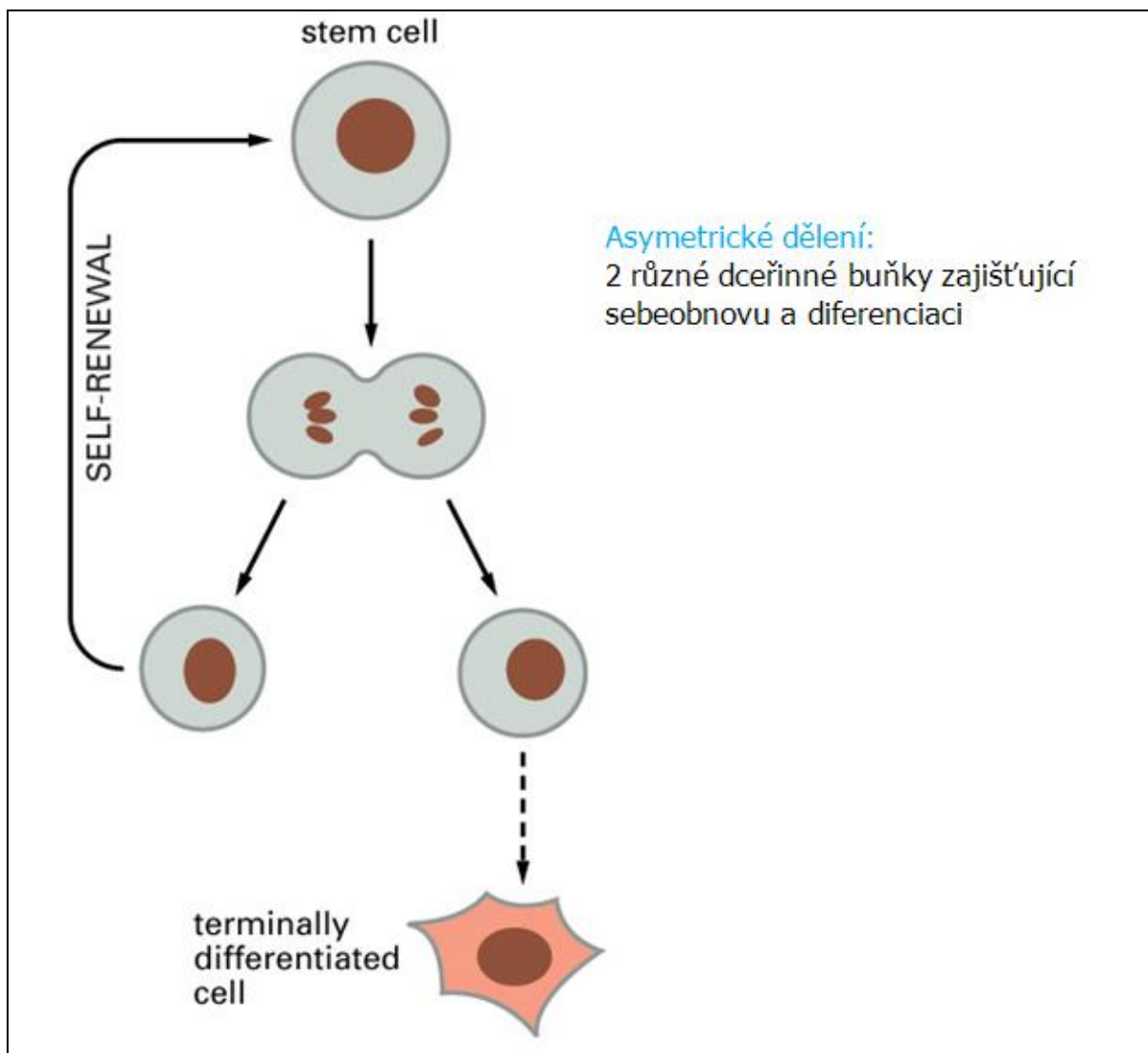
Krvetvorná tkáň patří mezi tzv. **sebeobnovné buněčné populace** podobně jako kožní a střevní epitel či zárodečné populace. Tyto tkáně se vyznačují **hierarchickou strukturou**, kde jsou v jednotlivých kompartmentech **multi- nebo pluripotentní kmenové buňky**, **progenitorové buňky** a **zralé diferencované buňky** (obr. 12-1).



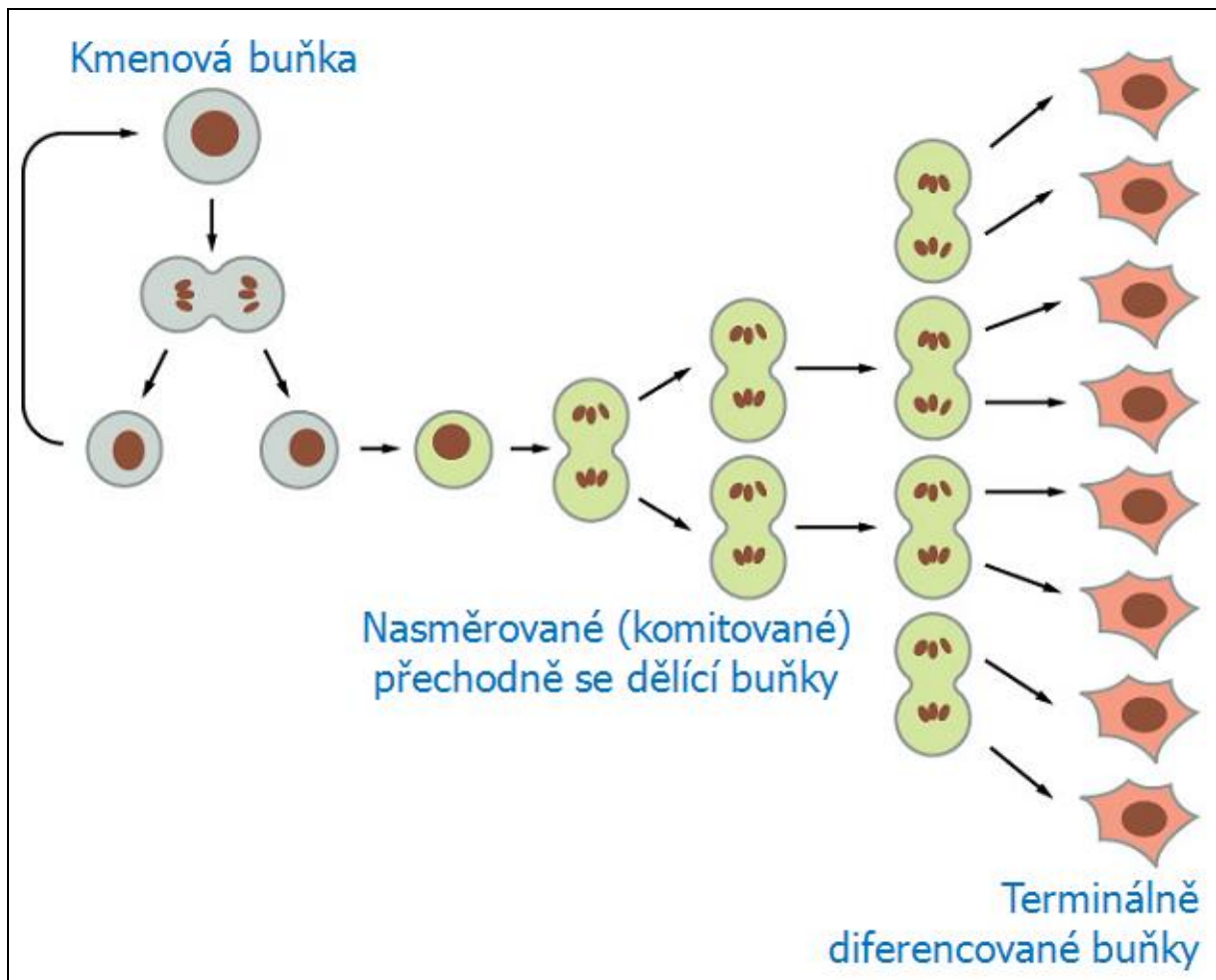
Obr. 12-1 Linie kmenových buněk v dospělé tkáni a normální obnova tkání (analogie s kmenem, větvemi a listy stromu) (Sell S., *Crit Rev Oncol Hematol* 2004 : 1)

Multi/pluripotentní nejprimitivnější hematopoetická buňka je klidová kmenová buňka reagující na stres. Z ní vzniká většina proliferujících buněk v kostní dřeni (progenitory).

Tyto kmenové buňky se vyznačují schopností **asymetrického dělení**, kdy dávají vznik jedné nové dceřinné kmenové buňce (sebeobnova) a druhé dceřinné buňce se schopností diferenciacce (obr. 12-2). Vznikají z ní progenitorové přechodně se dělící (transit-amplifying) a více diferencované buňky, které postupně dozrávají v terminálně diferencované buňky (lymfoidní a myeloidní řady), které se přestávají dělit, jsou udržovány v klidové G0 fázi a umírají apoptózou (obr. 12-3).

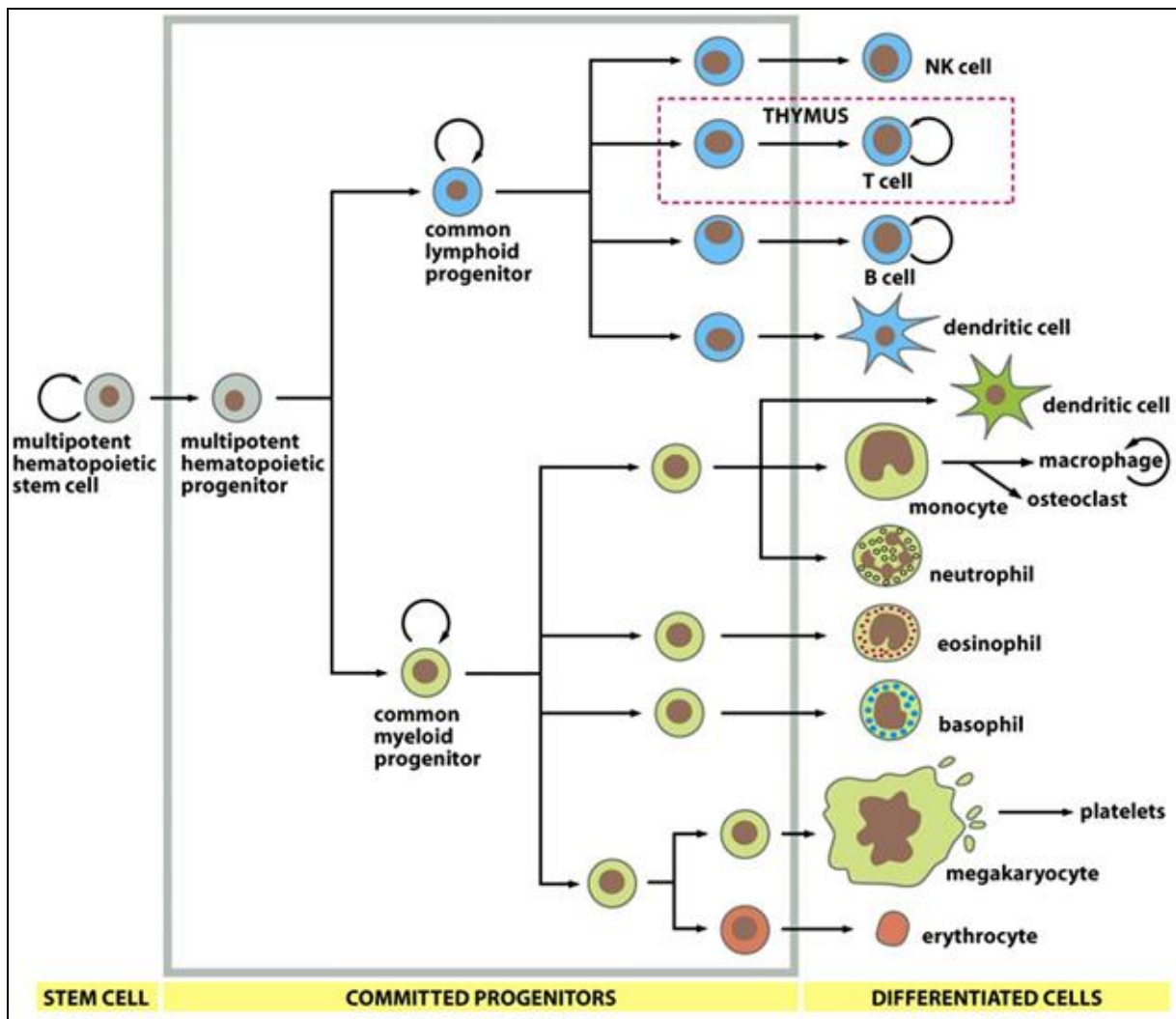


Obr. 12-2 Definice kmenové buňky (*Figure 22-4. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

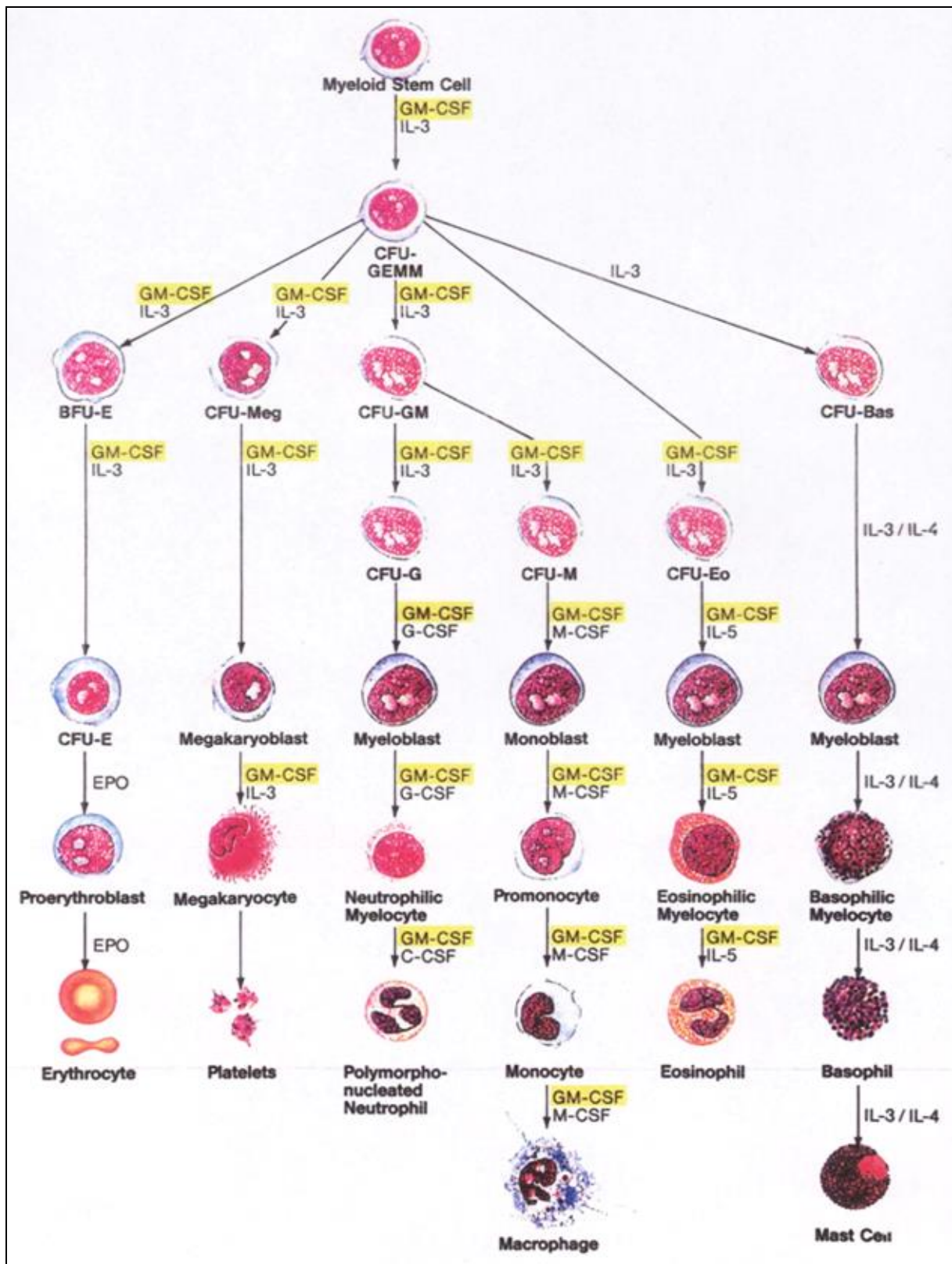


Obr. 12-3 (Figure 22-7. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition.)

V tomto systému je nutné, aby byla dodržována přísná rovnováha počtu a typů buněk v jednotlivých kompartmentech lymfoidní a myeloidní řady (obr. 12-4). Při udržování rovnováhy mezi proliferací, diferenciací a apoptózou se uplatňují mezibuněčné interakce, stimulační a inhibiční signály, diferenciací a viabilitní faktory, které jsou specifické pro jednotlivé fáze vývoje a určité typy krvetvorných buněk (obr. 12-5).

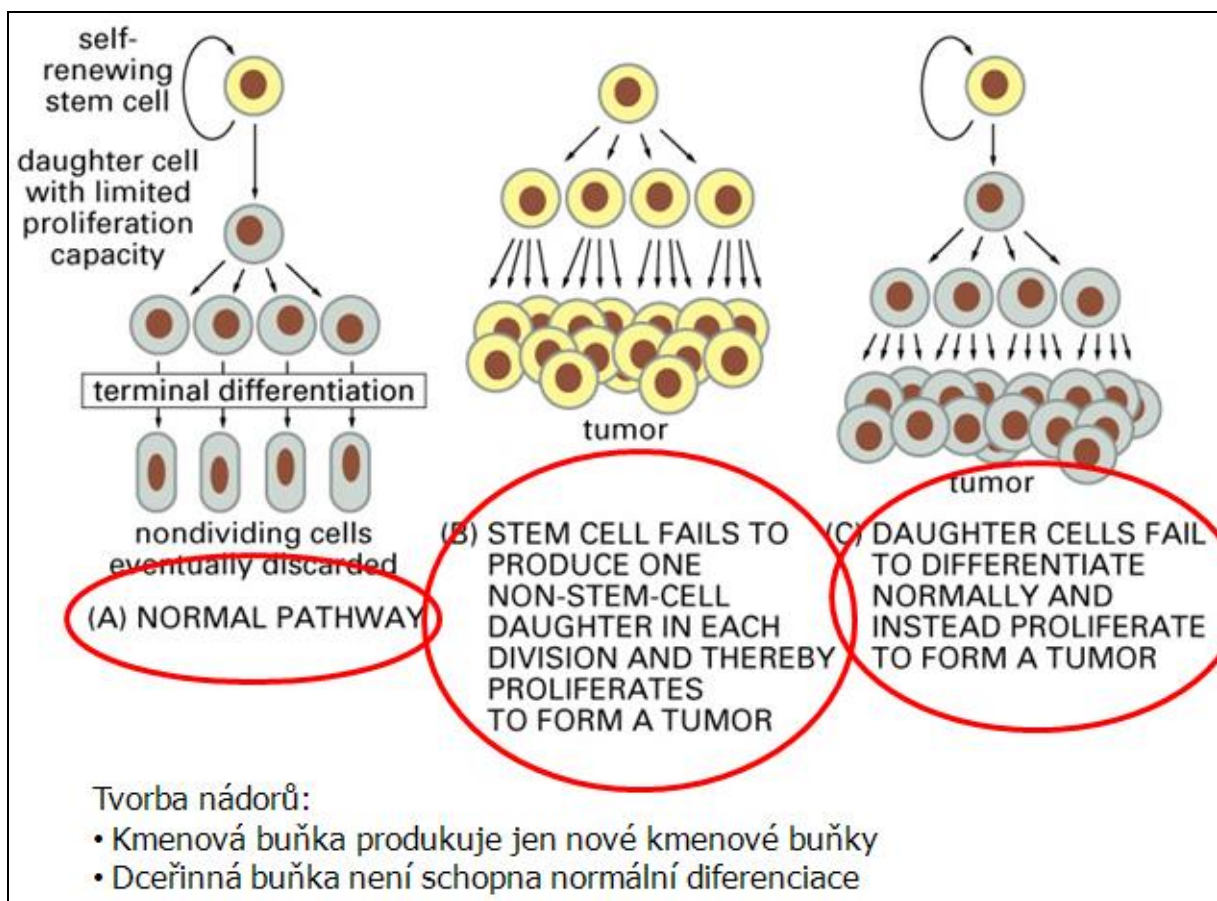


Obr. 12-4 Sebeobnovná krvetvorná tkáň (Figure 22–35. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition)



Obr. 12-5 Špecifické rústové a viabilní faktory. V jednotlivých fázích krvetvorby a u různých typů krevních buněk se uplatňují specifické rústové a viabilní faktory (kolonie stimulující faktory – CSF, erythropoetin a interleukiny -IL).

V normální buňce je **rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována**, což také **souvisí s regulací buněčného cyklu**, který je rozhodující pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. V nádorové buňce je v důsledku změn v signálních drahách organizace buněčného cyklu narušena, buňky se neomezeně množí a nejsou schopny diferenciace (obr. 12-6). Buňka je vybavena také **zpětnovazebnými mechanizmy**, které mohou působit proti neobvyklým změnám v procesu buněčného dělení. Patří k nim např. **programovaná buněčná smrt – apoptóza**, schopnost buňky spáchat za určitých podmínek sebevraždu, jestliže její základní komponenty jsou porušeny nebo když je její kontrolní systém deregulován. Tak působí např. poškození chromozomální DNA. V tomto procesu se účastní také specifické geny např. p53 nebo bcl-2. Mutace těchto genů pak způsobují poruchy apoptózy a *neschopnost apoptózy přispívá ke vzniku nádorů a k jejich rezistenci k terapii*.



Obr. 12-6 Normální a narušená kontrola produkce z kmenové buňky (Figure 23-14. *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Změny v počtu buněk je třeba interpretovat jako změny buněčné kinetiky, tj. sledování změn v čase. Tvorba terminálně diferencovaných buněk z časných buněčných prekurzorů trvá asi 4 až 8 dnů (3-6 mitotických dělení). Tyto buňky pak setrvávají v periferní krvi asi 10 hodin (ne-

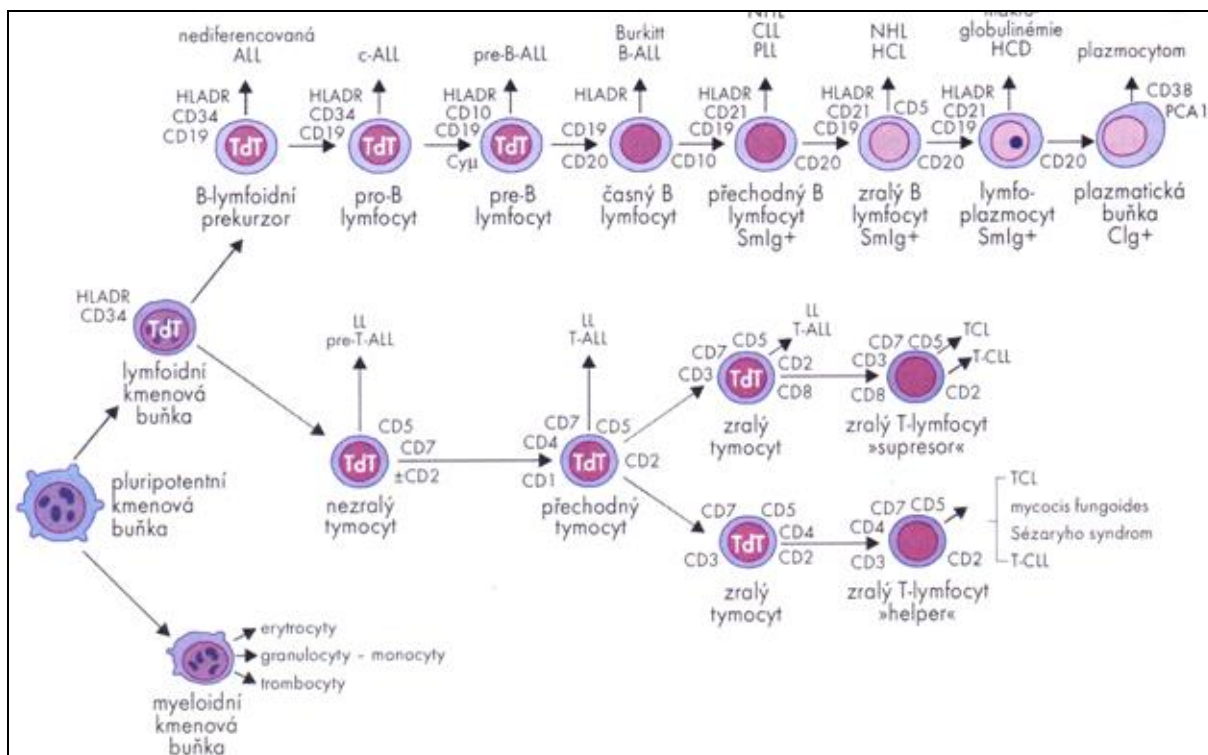
utrofilní leukocyty), 10 dnů (trombocyty) nebo více než 100 dnů (erytrocyty). Schopnost produkce kmenových buněk, z nichž každý den vzniká asi 3×10^{11} funkčních buněk se může zvýšit v případě potřeby až desetkrát.

S produkcí různých typů krvetvorných buněk souvisí i různé **poruchy a patologické stavy** jako je *anemie (snížená produkce erytrocytů)* či *polycytemie (zvýšená produkce erytrocytů)*. Kvantitativní poruchy se mohou týkat různých úrovní diferenciacie erytrocytů. *Trombocytopenie a trombocytémie* jsou poruchy produkce trombocytů a jsou následkem poruchy tvorby nebo ploidie megakaryocytů. *Neutropenie* jsou poruchy granulocytárního systému. Periferní neutropenie mohou být způsobeny zrychleným odbouráváním buněk, poruchou v jejich produkci nebo změnou jejich distribuce. *Neutrofilní leukocytózy* jsou podmíněny nadprodukcí nebo přesunem mezi kompartmenty (CML – příklad klonálně podmíněné leukocytózy). *Lymfopenie a lymfocytózy* jsou poruchy lymfocytů (CLL). Jako *pancytopenie* je označována kvantitativní porucha několika buněčných systémů. *Aplastická anemie* znamená obecné snížení hematopoetických buněk v kostní dřeni.

12.2 LEUKEMIE A LYMFOMY

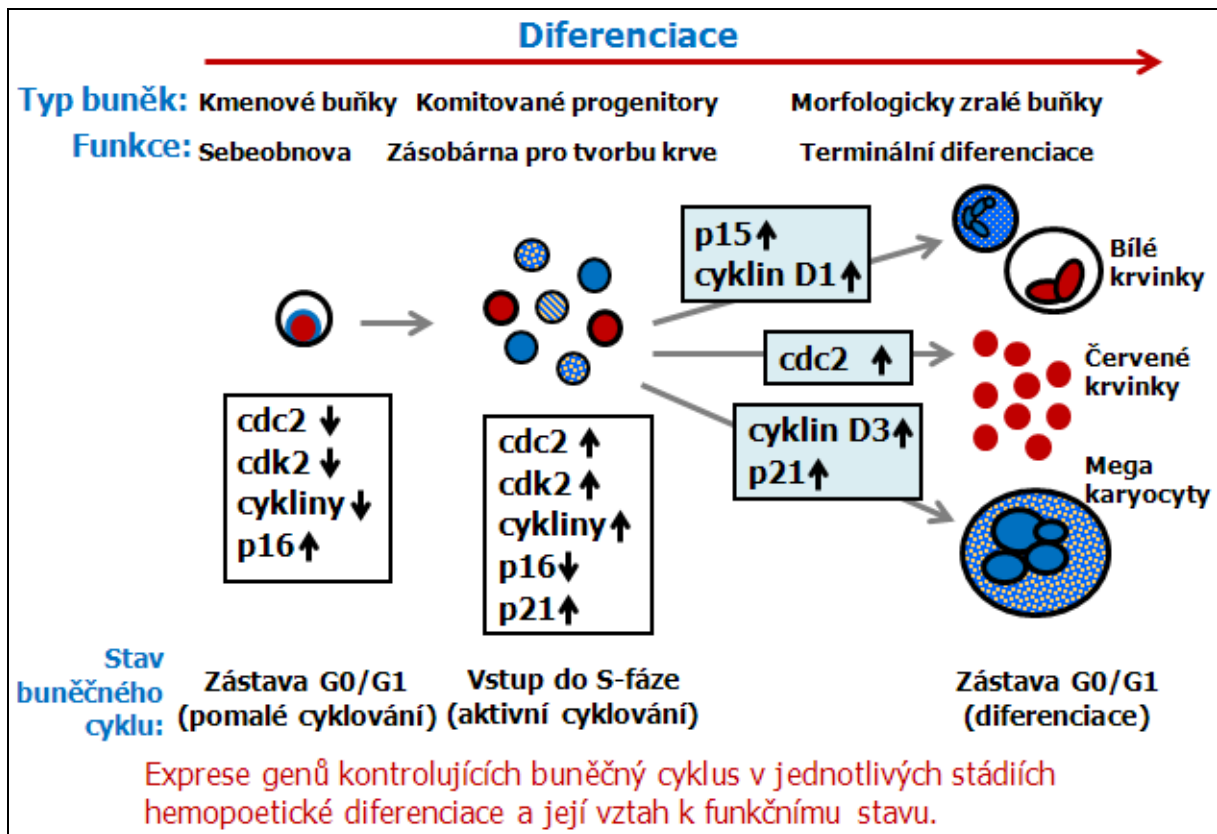
Leukémie vzniká jako nekontrolovaná proliferace nebo expanze hematopoetických buněk, které si neudrží schopnost normálně se diferencovat do zralých krevních buněk.

Onemocnění je silně heterogenní s odlišnými epidemiologickými, histologickými, cytologickými, imunologickými a genetickými charakteristikami. Liší se projevy, stupněm malignity a odpovědí na léčbu. *Vzniká na různých úrovních vývoje hematopoetických buněk* (obr. 12-7). *Mechanismy iniciace a progresu leukémií souvisejí se změnami v normálním homeostatickém mechanismu, který reguluje produkci krevních buněk. V tomto procesu se významně uplatňují rovněž poruchy genů regulujících buněčný cyklus. Tyto geny se různě exprimují v postupných fázích vývoje hematopoetických buněk a kontrolují diferenciaci* (obr. 12-8, 12-9).

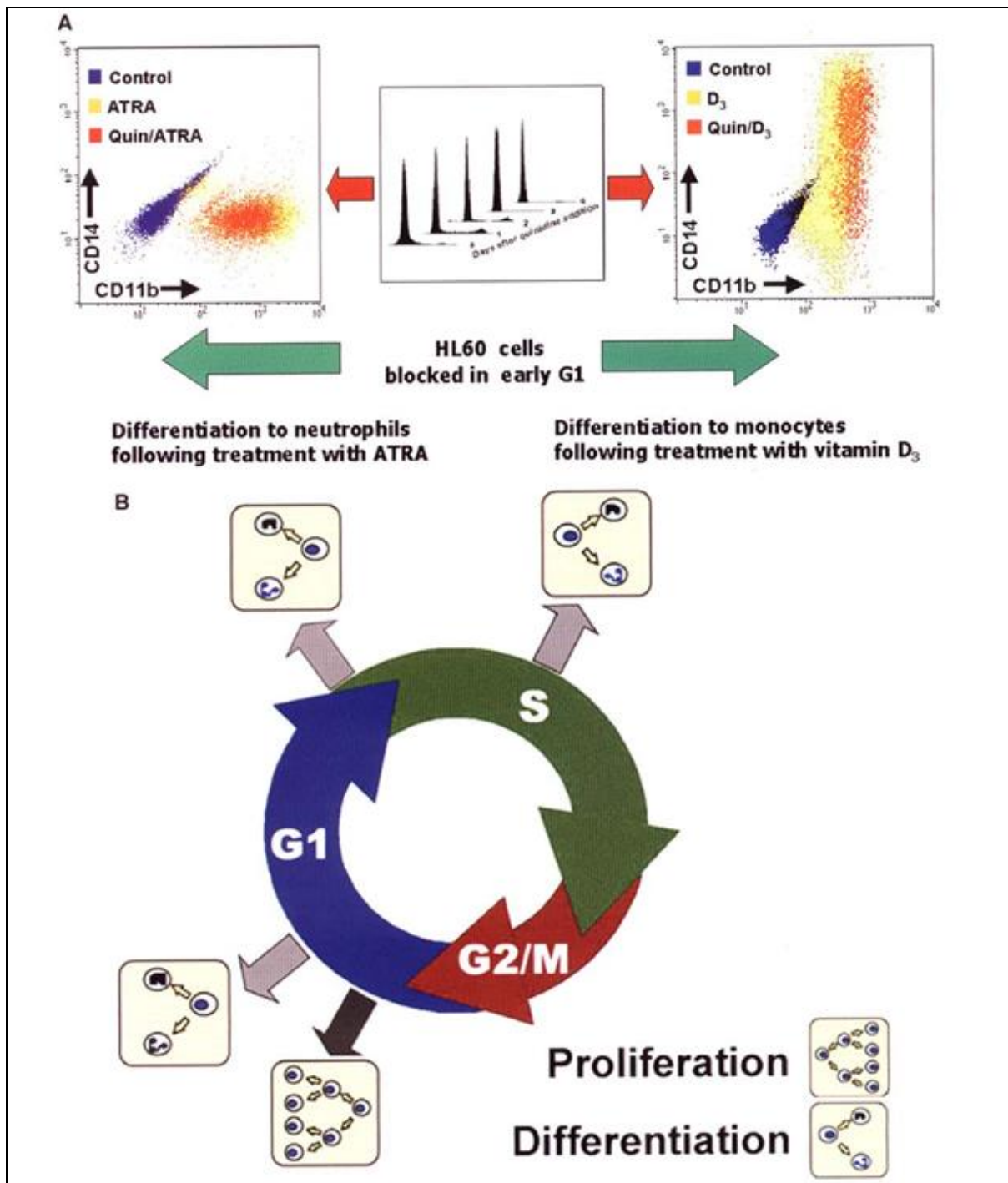


Obr. 47.4. Schéma lymfoidní diferenciace s vyjádřením vztahu k různým lymfoproliferačním onemocněním. Tato onemocnění mohou vznikat maligní transformací lymfocytu v kterémkoliv stadiu jeho postupného vyžívání. Fenotyp buněk v patologické populaci se podobá fenotypu jejich normálních protějšků. ALL – akutní lymfoblastická leukémie; PLL – prolymfocytární leukémie; HCL – trichocelulární leukémie; CLL – chronická lymfatická leukémie; NHL – nehodgkinský lymfom; HCD – choroba z těžkých řetězců; LL – lymfocytární lymfom; Smlg – povrchový imunoglobulin; TdT – terminální deoxynukleotidyltransferáza; Clg – cytoplazmatický imunoglobulin; cALLA – společný leukemický antigen

Obr. 12-7 Schéma lymfoidní diferenciace s vyjádřením vztahu k různým lymfoproliferačním onemocněním (P. Klener: Klinická onkologie, 2002)



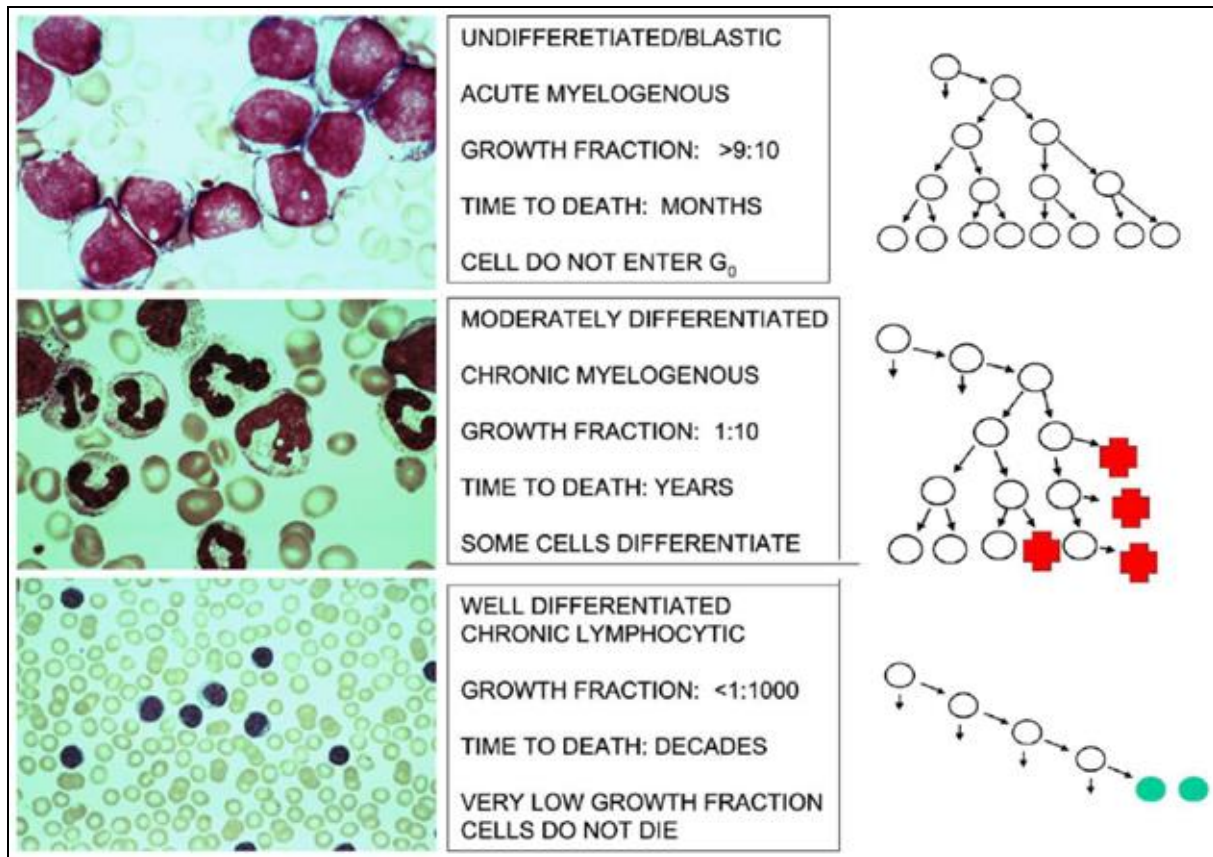
Obr. 12-8 Geny kontroly buněčného cyklu v hemopoéze



Obr. 12-9 Vztah mezi buněčným cyklem a diferenciací

Většina leukémií je klasicky rozdělována na **lymfoidní a myeloidní**. Některé poruchy hemopoézy nejsou striktně leukemické, protože vyjadřují jen část plného leukemického fenotypu – buď **expanzi růstu (myeloproliferační syndromy)**, nebo **diferenční blok (myelodysplazie)** (obr. 12-10). Leukemická onemocnění se vyskytují v dětském i dospělém věku. Mnohdy jsou těžko definovatelné. Pro dobrou klasifikaci důležitou jak pro prognózu tak léčbu jsou

využívány různé systémy – zejména tzv. **imunofenotypizace pomocí spektra charakteristických buněčných povrchových (CD) antigenů.**



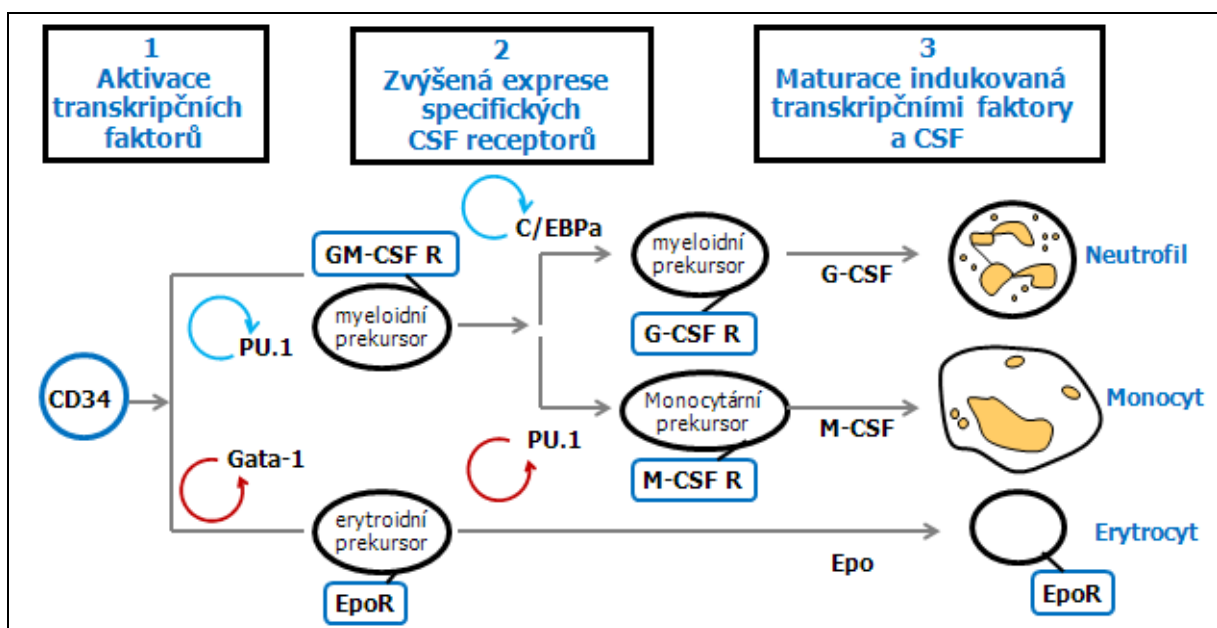
Obr. 12-10 Růstová frakce, morfologie a klinický průběh tří typů leukémií (*akutní myeloidní leukémie, chronická myeloidní leukémie, chronická lymfocytární leukémie*) (Sell S., *Crit Rev Oncol Hematol* 2004 : 1)

Všechny elementy krve a lymfy jsou odvozeny během fetálního a dospělého života od pluripotentní hematopoetické kmenové buňky. Tyto buňky se nacházejí v malém počtu v kostní dřeni a většina z nich se aktivně nedělí. Pokrok v izolaci a charakterizaci pluripotentní kmenové buňky pomáhá k poznání s ní souvisejících malignit. **Lidské kmenové buňky nesou povrchový znak CD34** a jsou schopny tvořit řadu kolonií v semisolidním prostředí v odpověď na různé specifické růstové faktory. Jisté lidské leukemické buňky, jako ty z chronické myeloidní leukémie (CML) nebo akutní myeloidní leukémie (AML), které představují velmi nezralé kmenové buňky nebo prekuzory jednotlivých linií, se jen velmi obtížně kultivují *in vitro*, přestože v pacientech rostou velmi rychle. Chybí asi specifické faktory dodávané mikroprostředím kostní dřene.

Byl objeven nový tzv. **steel faktor** produkovaný stromálními buňkami a jeho receptor **c-kit** přítomný na řadě hematopoetických buněk. U myši byly definovány dva genetické lokusy regulující vývoj kmenové buňky – steel (SL) a white-spotting (W). W lokus kóduje c-kit onkogen, což je člen třídy onkogenů pro tyrozin kinázové receptory. Je to receptor pro produkt

genu Sl, který vykazuje růstově promoční aktivitu pro mnoho hematopoetických linií a synergií s dalšími růstovými a diferenciacními faktory jako GM-CSF, Epo a IL-7. Sl faktor je považován za kritický pozitivní efektor růstu a vývoje kmenových buněk. Proto je věnována pozornost jeho roli v růstové regulaci u leukemií, které představují primitivní typy kmenových buněk.

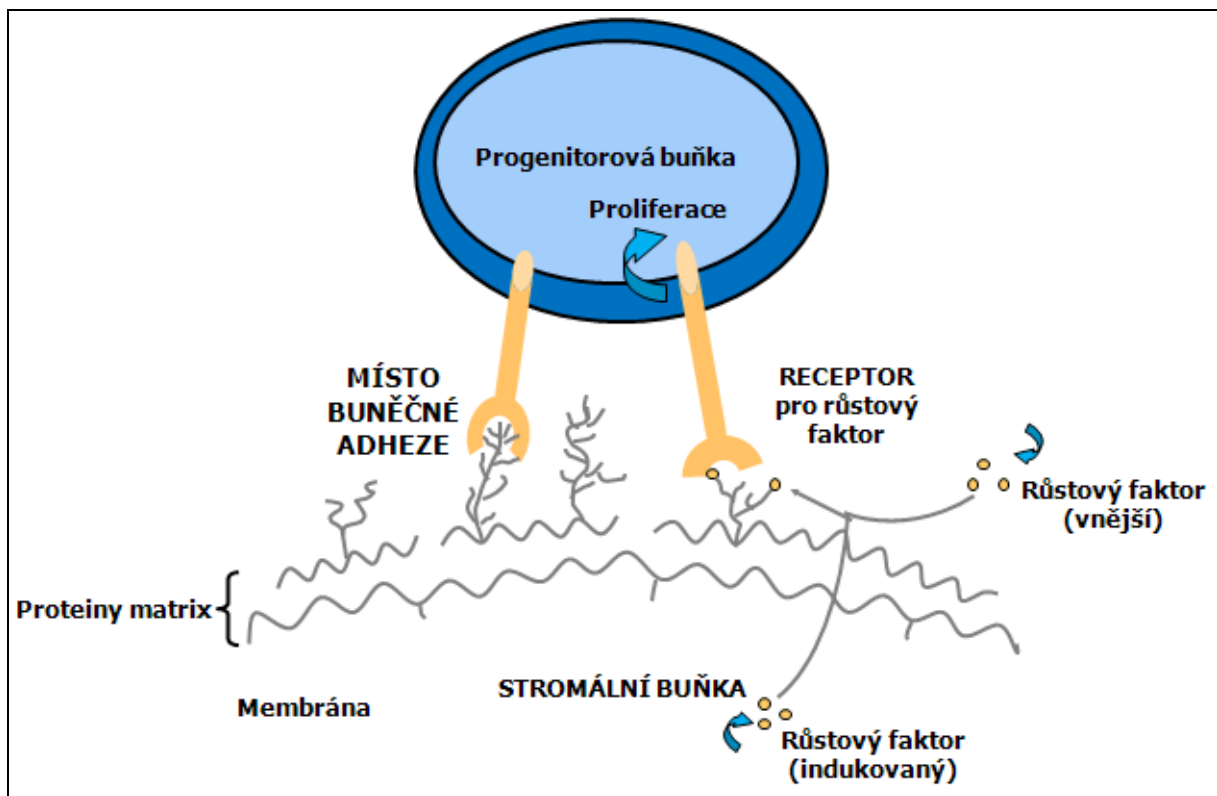
U kmenových buněk CD34 jsou málo exprimovány transkripční faktory. Působením blíže nedefinovaných signálů, jako je vliv interakce ve stromatu nebo signály růstových faktorů, dochází ke zvýšené expresi *specifických transkripčních faktorů* např. *GATA-1* nebo *PU.1*. To vede k jejich autoregulaci a zvýšené expresi specifických receptorů pro růstové faktory, což má za následek vzestup proliferace, diferenciace a supresi apoptózy specifických linií. Snížená exprese specifických faktorů (jako je GATA-1 během myeloidního vývoje) může také hrát důležitou úlohu. U lidských i živočišných leukemií byly identifikovány geny homologní se známými transkripčními aktivátory. Některé hrají roli v diferenciaci hematopoetických buněk, protože jsou homologní nebo identické s geny dříve identifikovanými v jiných experimentálních systémech jako geny ovlivňující vývoj a diferenciaci. Existuje tedy vazba mezi onkogenezi a transkripční deregulací (obr. 12-11).



Obr. 12-11 Model indukce hematopoetické diferenciace specifickými transkripčními faktory (podle Tenen D.G., *Blood* 1997 : 489)

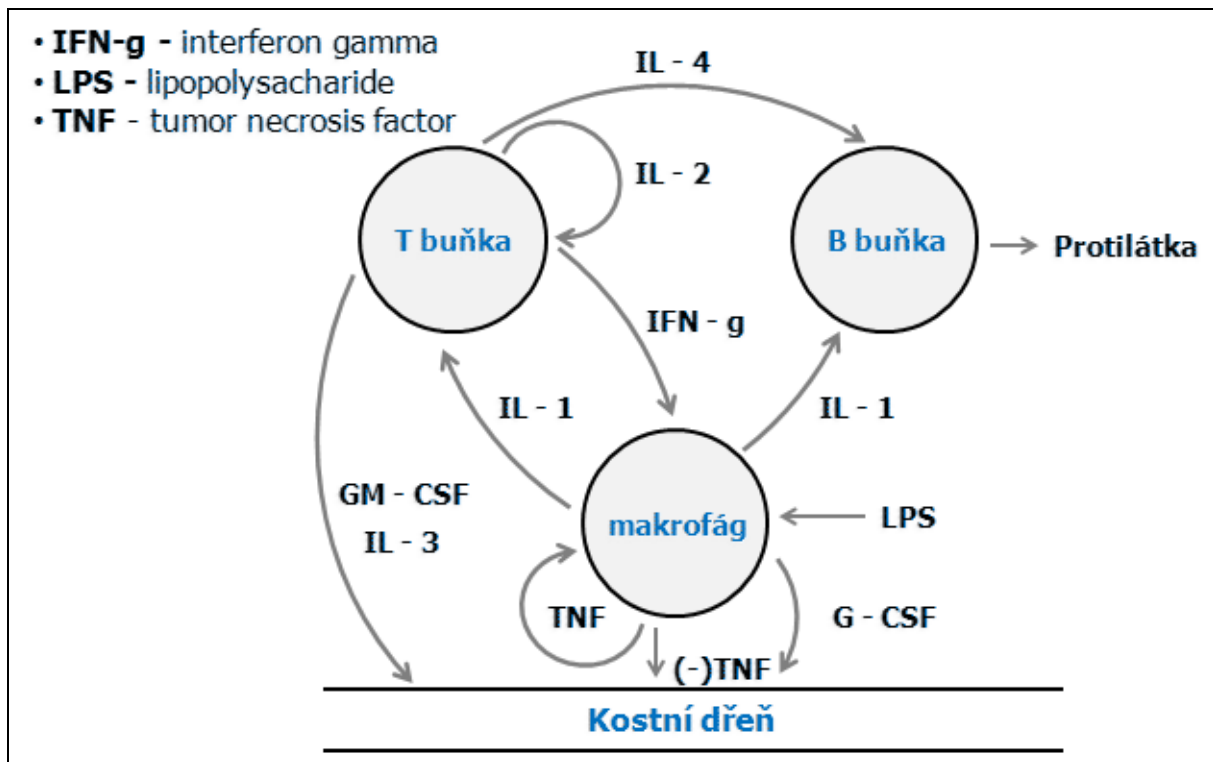
Linie výzkumů mechanismů působení retroviru indukujícího erytroleukémii vedlo k odhalení, že virové proteiny mohou stimulovat růst hostitelských buněk tím, že působí jako pseudoligandy pro receptory růstových faktorů.

Poměrně dobře je objasněna **úloha stromatu kostní dřeně** v regulaci normální krvetvorby. Byly vytvořeny dlouhodobé kultury pro myeloerytroidní a lymfoidní vývoj. Řada údajů předpokládá, že vzájemné kontakty buněk a specifické účinky mimobuněčné matrix pomáhají regulovat vývoj kmenové buňky. Různé typy leukémií se mohou lišit od normálních protějšků tím, že nevyžadují dále blízký buněčný kontakt pro růstovou expanzi a cirkulaci v krvi (obr. 12-12). Existují údaje o negativních regulátorech kmenových i líniově specifických buněk, např. TGF beta produkovaný stromálními buňkami. Stojí za to věnovat pozornost tomu, jak kmenové buňky a různé leukemie unikají této negativní kontrole.



Obr. 12-12 Model prostorové organizace hematopoetických kmenových buněk a růstových faktorů v mikroprostředí kostní dřeně

Při vývoji buněk kostní dřeně existuje kontrola a rovnováha, která limituje celkovou buněčnost a odpověď na stresy jako záření, krvácení apod. Interakce sítě cytokinů produkovaných různými typy krevních buněk zajišťují kontrolu pomocí pozitivní a negativní zpětné vazby (obr. 12-13).

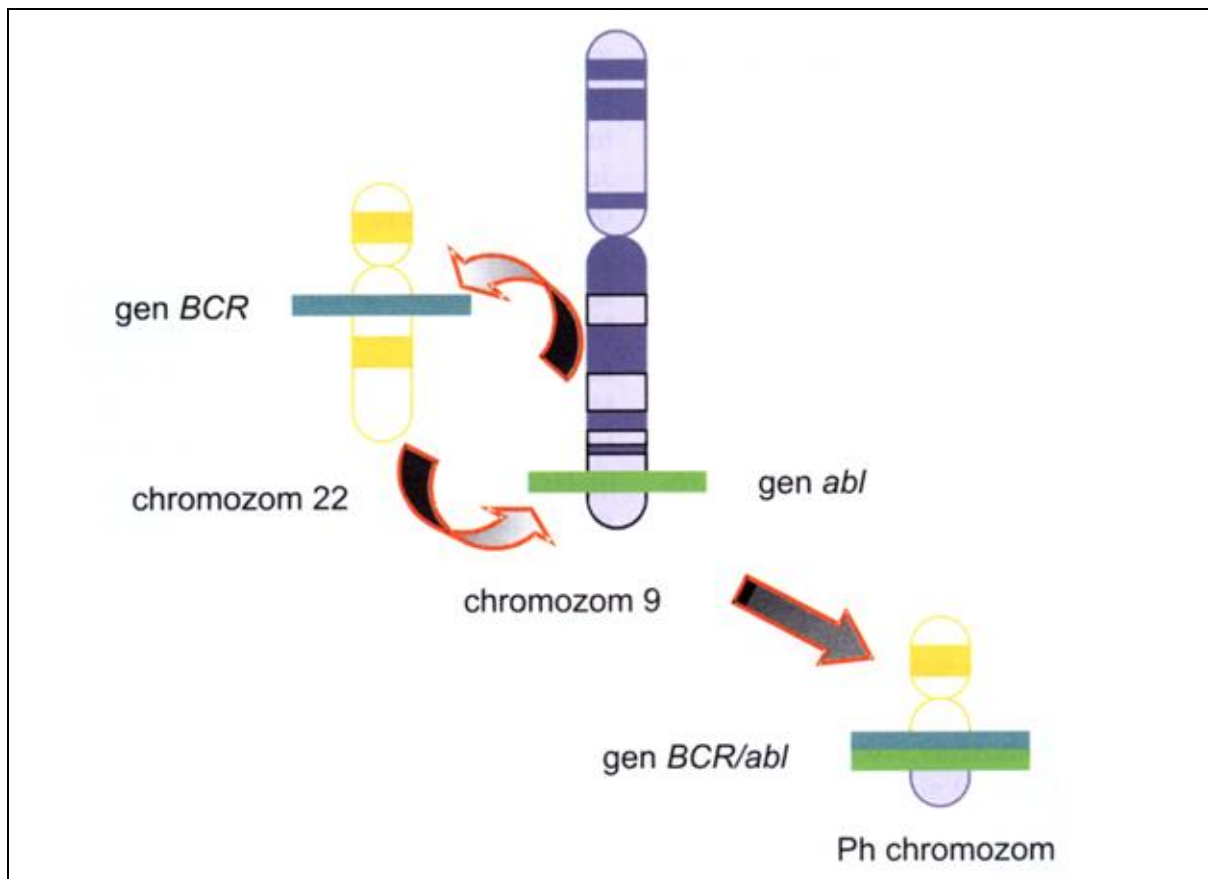


Obr. 12-13 Síť interakce cytokinů, pozitivní a negativní zpětná vazba

CML – chronická myeloidní leukémie

CML je klonální myeloproliferativní porucha primitivních hematopoetických kmenových buněk. Zahrnuje myeloidní, erytroidní, megakaryocytární, B- někdy T-lymfoidní elementy, ale ne např. fibroblasty kostní dřeně. Nemoc je silně heterogenní, má 2 až 3 fázový průběh.

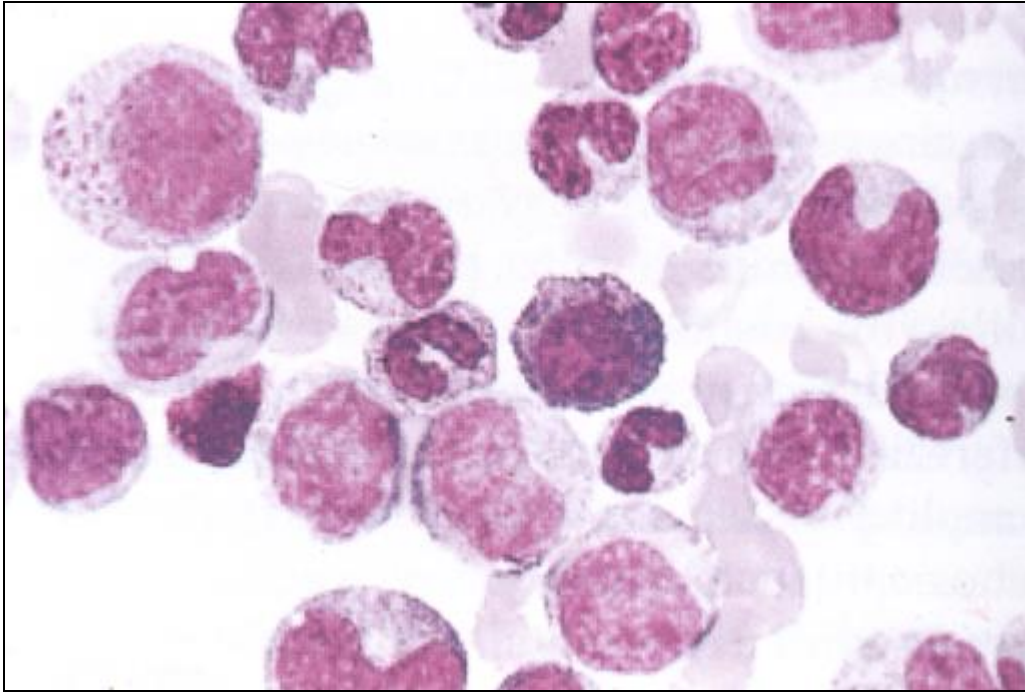
CML buňky mají charakteristické cytogenetické (Philadelphia -Ph chromozóm) a molekulární (bcr-abl zřuzovaný gen) znaky. Chromozomální abnormalitu představuje translokace $t(9,22)$ *c-abl* tyrozin kinázového protoonkogenu do jisté oblasti velkého genu nazývaného *bcr*, čímž je aktivována tyrozin kinázová aktivita *c-abl* a konvertuje *abl* na transformující protein hematopoetických buněk (obr. 12-14).



Obr. 12-14 Ph chromozom je produktem translokace $t(9;22)(a34;q11)$. Na Ph chromozómu vzniká fúzní gen BCR/abl, který se významně podílí na maligní transformaci hematopoetických prekurzorů.

(Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, 2003)

CML je nemoc kmenové buňky, protože Ph chromozóm je nalézán ve všech hematopoetických liniích maligních pacientů, ale ne už v kožních fibroblastech nebo stromálních buňkách. Klinickým fenotypem choroby je expanze myeloidního kompartmentu během iniciační fáze, ale udržení plné diferenciace. CML v chronické fázi vykazuje klonální expanzi normálně se diferencujících granulocytů a je původně benigní poruchou (obr. 12-15).

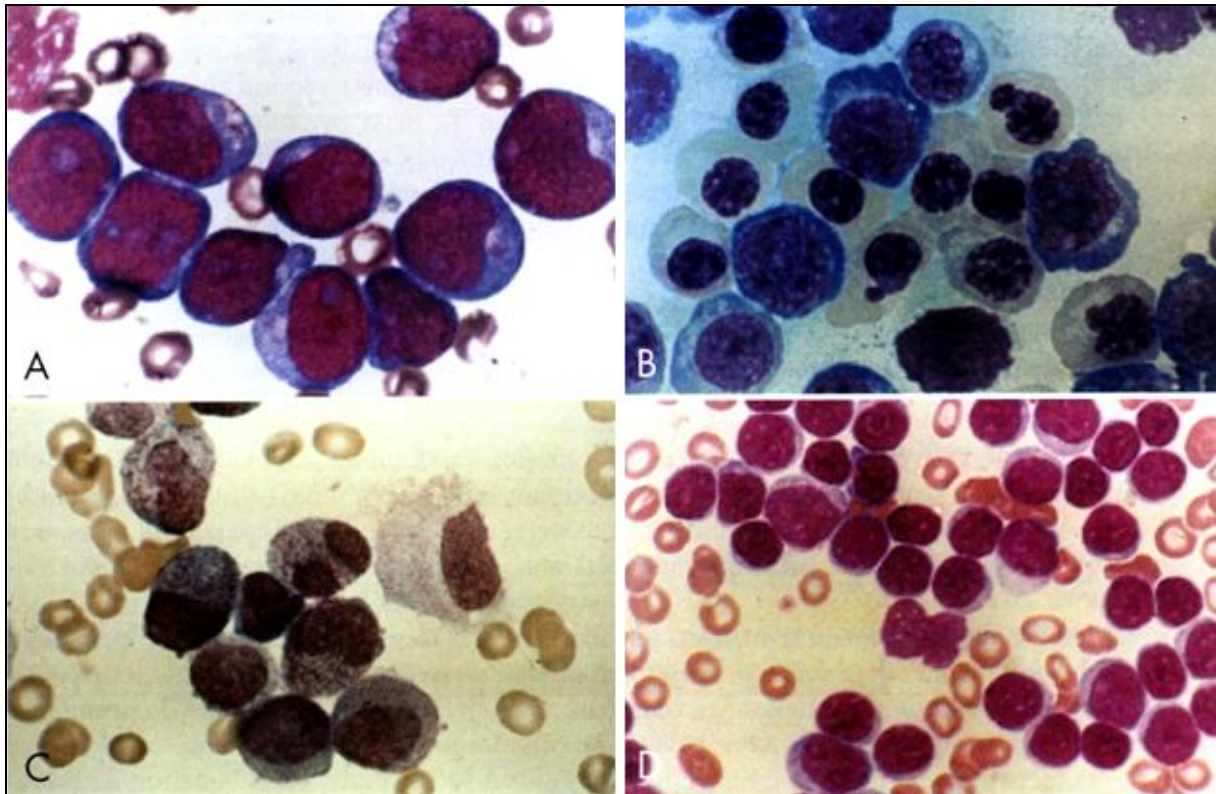


Obr. 12-15 Chronická myeloidní leukemie (*P. Klener: Klinická onkologie, 2002*)

Původní (chronická) fáze je následována eventuální progresí do **akutní leukémie** charakterizované cirkulujícími nediferencovanými lymfoidními nebo myeloidními **blastovými buňkami** (obr. 12-16). Ph chromozóm je nalézán také u 20–25 % dospělých a 5 % dětí s **akutní lymfoblastickou leukémií** (ALL). Zdá se, že tato nemoc vychází spíše z lymfoidních prekurzorů než z kmenové buňky.

U akutní leukémie dochází jak k růstu počtu cirkulujících bílých krvinek, tak k poruše normálního zrání a funkce. Některé neleukemické poruchy krve, jako jsou myeloproliferační nebo myelodysplastické syndromy, mají jen jednu nebo jiné z těchto abnormalit, ale obě mohou vyústit v akutní myeloblastickou leukémii (AML). Plná leukemická transformace vyžaduje defekt jak v růstu tak v diferenciaci.

Asi 5–10% akutních leukémií nemůže být klasifikováno jako lymfoidní nebo myeloidní, protože vykazují povrchové markery i histochemické vlastnosti obou linií. Původ těchto leukémií není zcela objasněn.



Obr. 12-16 Kostní dřeň u akutních leukémií

A – akutní myeloblastová leukémie (M1)

B – akutní myeloblastová leukémie (M2)

C – akutní myeloblastová leukémie (M3)

D – akutní lymfoblastická leukémie

(P. Klener: *Klinická onkologie*, 2002)

Myelodysplastický syndrom (MDS)

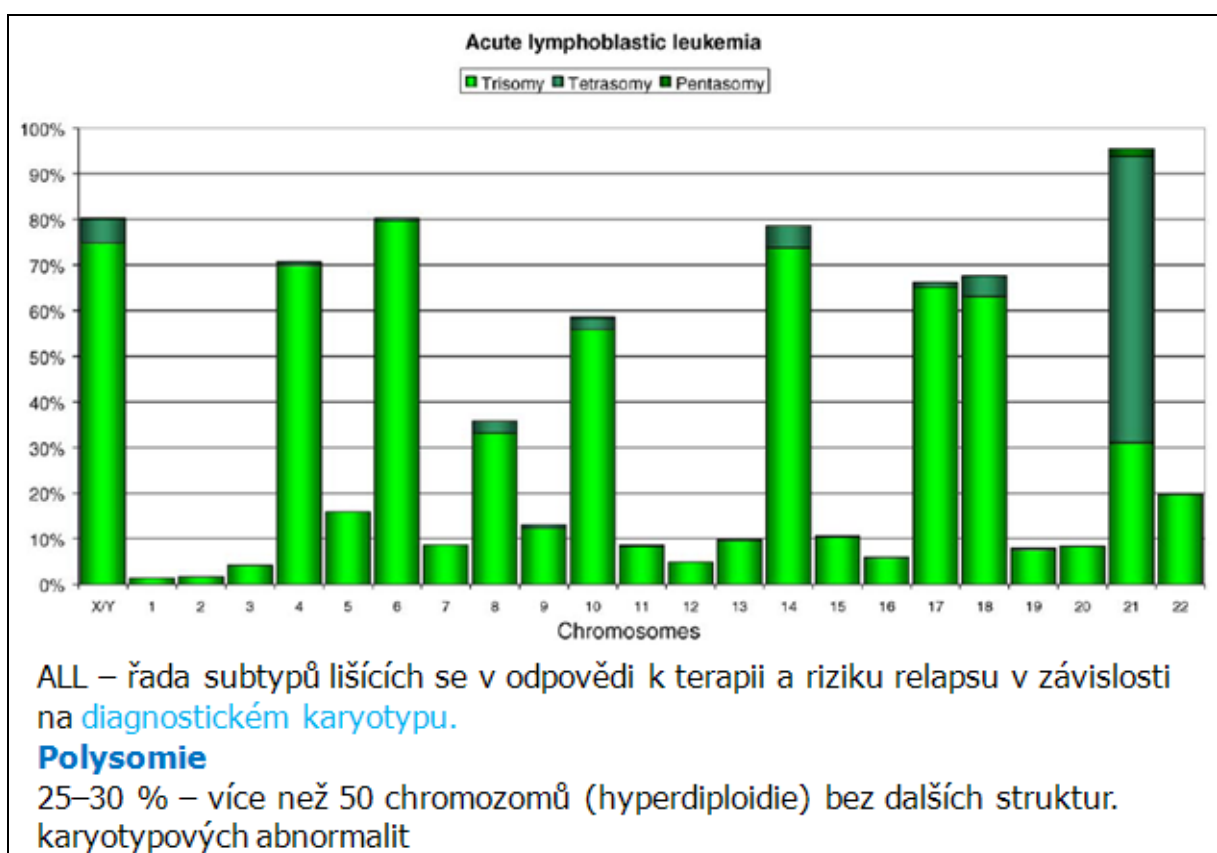
MDS je preleukemie, která představuje poruchu diferenciacie charakterizovanou malými počty cirkulujících krevních buněk. Kostní dřeň pacientů ukazuje normální nebo mírně zvýšené počty prekurzorů, které však nezrají normálně. Morfologicky vykazují asynchronii zrání jádra a cytoplazmy. U MDS jsou velmi časté chromozomální abnormality. Zvláště ztráta části dlouhých ramen chromozómů 5 a 7 indikuje vysoké riziko leukemické transformace. Na 5 chromozómu jsou lokalizovány geny řady růstových faktorů a jejich receptorů. Změna nebo ztráta těchto genů může hrát roli v MDS nebo existuje ještě neobjevený supresorový gen v této oblasti, který je inaktivován.

Akutní leukemie

Akutní lymfoblastické leukemie (ALL) představují akumulaci nezralých lymfoidních buněk v kostní dřeni. Tato onemocnění vznikají maligní transformací lymfocytů v kterémkoli stadiu jejich dozrávání a dle toho jsou klasifikována. Objevují se převážně u dětí a tvoří asi 80 % všech leukemií dětského věku a asi 25 % všech dětských nádorů. Prognóza je relativně příz-

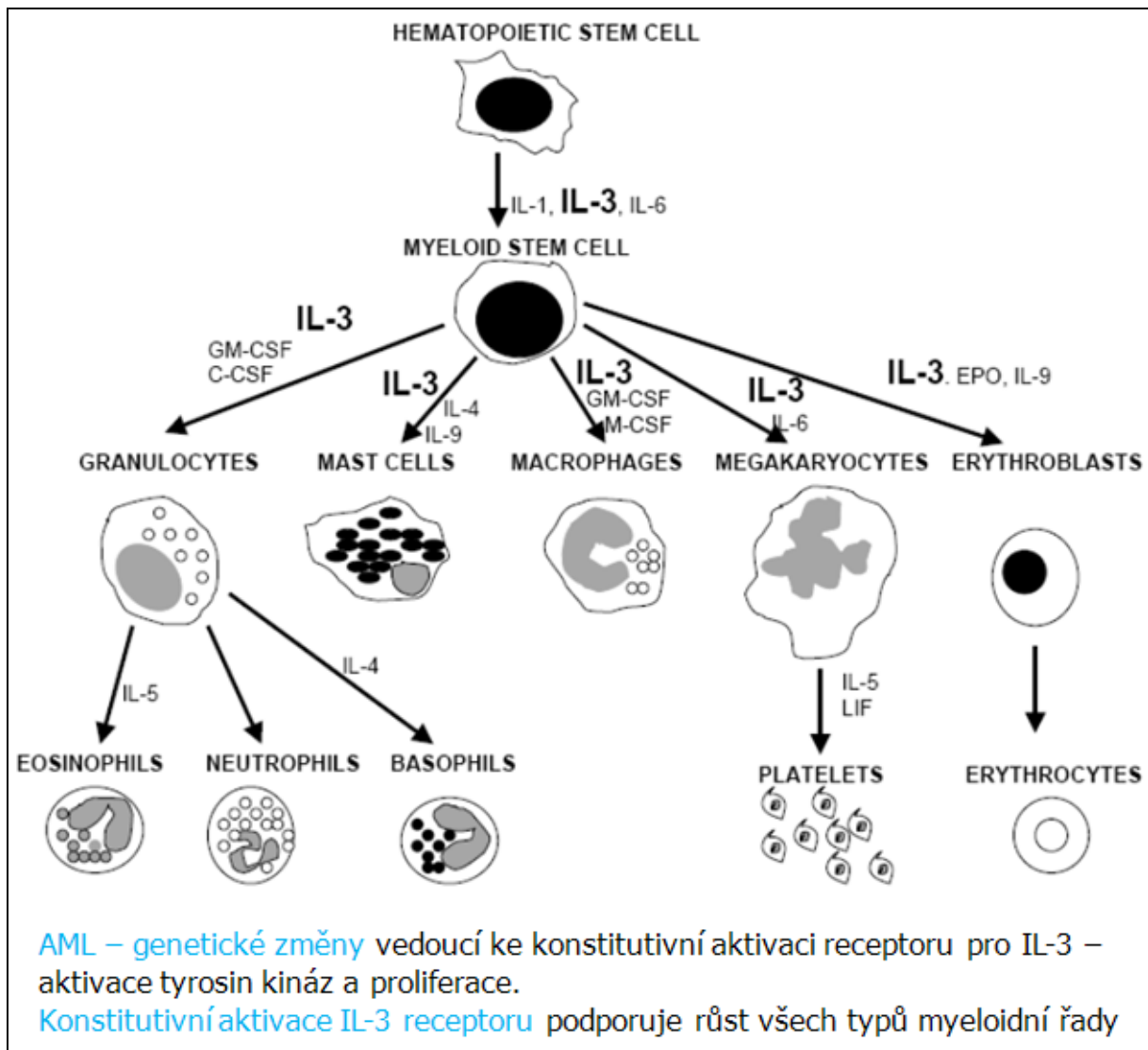
nivá. U dospělých staršího věku tvoří asi 20 % všech akutních leukemií s méně příznivou prognózou. ALL představují řadu subtypů lišících se v odpovědi k terapii a riziku relapsu v závislosti na diagnostickém karyotypu. Rozlišujeme dva základní typy – B-ALL nebo T-ALL.

Nejčastější cytogenetickou abnormalitou u dětí (25–30 %) je **polysomie** charakterizovaná výskytem více než 50 chromozómů (masivní hyperdiploidie) v leukemických buňkách bez dalších strukturálních karyotypových abnormalit. Tato cytogenetická vlastnost je spojena s dobrou prognózou příslušné odpovídající léčby. Nejčastěji jsou detekovány na chromozómech 21 (většinou tetrasomie), X, 6, 14, 4, 18, 17 a 10 (obr. 12-17).



Obr. 12-17 Akutní lymfoblastická leukémie (Teixeira M. R. and Heim S., *Seminars in Cancer Biol* 2005 : 3)

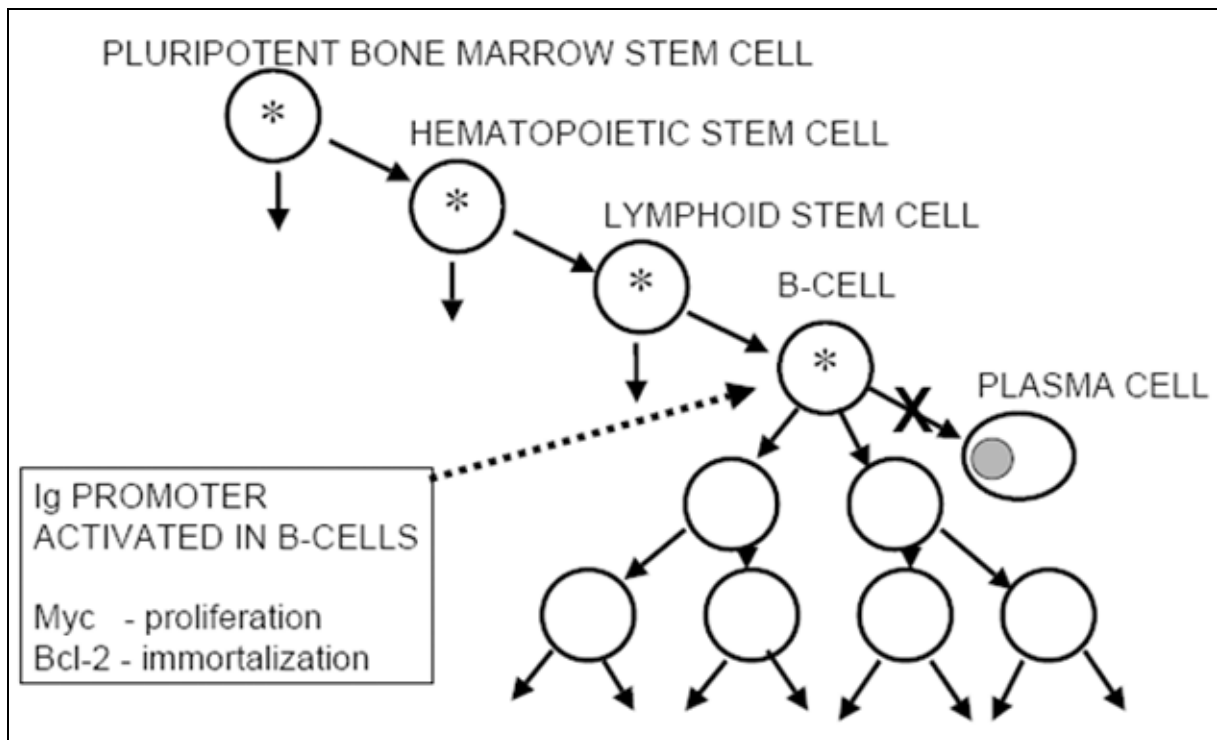
Akutní myeloidní leukemie (AML) je nejčastější leukemické onemocnění dospělých. Tvoří až 85 % všech akutních leukemií u osob starších 20 let. Prognóza se v posledních letech zlepšila. Pro AML jsou charakteristické genetické změny vedoucí ke konstitutivní aktivaci receptoru pro IL-3, následované aktivací tyrozinových kináz a podporou proliferace. Konstitutivní aktivace IL-3 receptoru podporuje růst všech typů myeloidní řady (obr. 12-18).



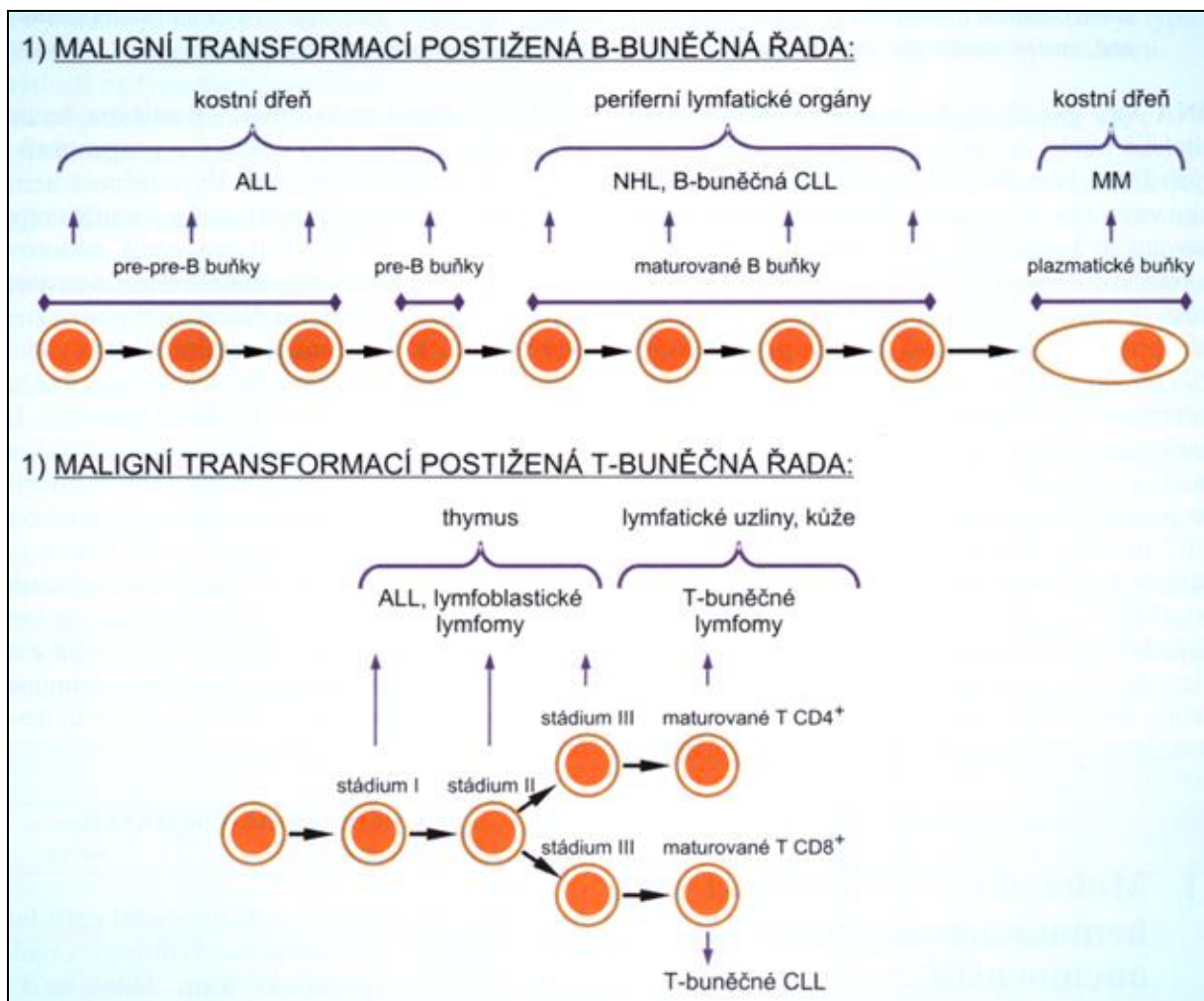
Obr. 12-18 Akutní lymfoblastická leukémie (Sell S., *Crit Rev Hematol Oncol*, 2004 : 1)

B-lymfomy, Burkittův lymfom

U tohoto onemocnění se jedná o rychlý nárůst nezralých B buněk, které neumírají. Je spojeno s translokací a aktivací imunoglobulinového (Ig) promotoru spolu s aktivací onkogenů c-Myc (podpora proliferace) a Bcl-2 (blok apoptózy). Genetická změna je přítomna v kmenové buněce, ale růst nádoru je určen stadiem maturace, kde dojde k aktivaci Ig promotoru (obr. 12-19, 12-20).



Obr. 12-19 B-lymfomy, Burkittův lymfom (Sell S., Crit Rev Hematol Oncol, 2004 : 1)



Obr. 12-20 Typ hematologického onemocnění, které se bude vyvíjet, závisí na vývojovém stadiu lymfoidní prekurzorové buňky zasažené maligní transformací. (Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: *Obecná onkologie a podpůrná léčba, 2003*)

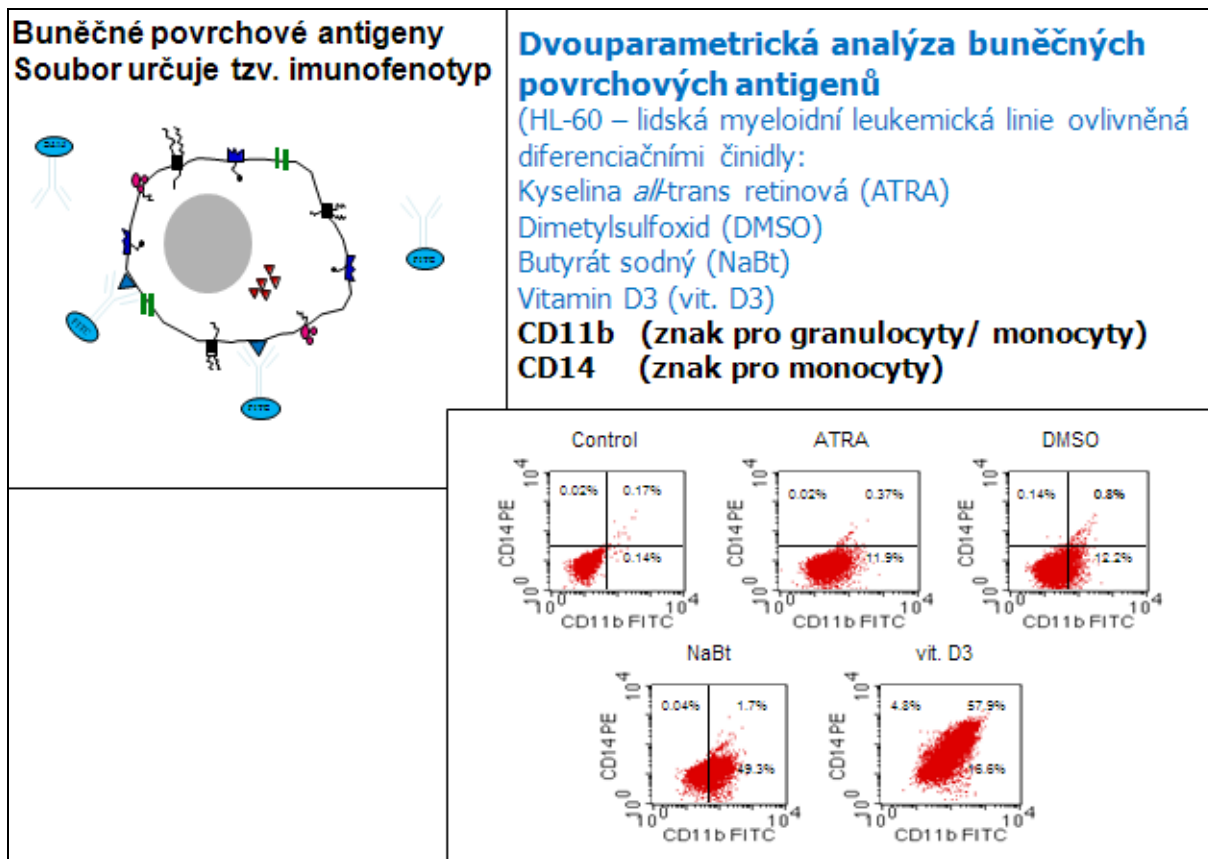
Non-hodgkinské lymfomy (maligní lymfomy, NHL)

Lymfomy vznikají nádorovou transformací buněk lymfoidních tkání. Klasifikace je obtížná a někdy není rozdíl mezi leukemií a lymfomem jasný. U dětí představuje asi 12 % a u dospělých 3–4 % všech zhoubných nádorů.

12.3 DIAGNOSTIKA, LÉČBA, TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ CYTOKINŮ

Zlepšující se znalosti v oblasti biologie a imunologie hostitele a nádorové patofyziologie umožnily využít další nové přístupy v terapii nádorových pacientů. Patří k nim stimulace obranných mechanismů hostitele včetně specifických a nespecifických imunologických přístupů a strategie cílené přímo na změnu nádorového růstu a diferenciaci terapeutickým ovlivněním patofyziologických mechanismů.

Velmi důležitá je dobrá počáteční **diagnostika onemocnění a monitorování úspěšnosti léčby**. K nejdůležitějším vyšetřením patří, tzv. *imunofenotypizace dle souboru povrchových znaků – CD antigenů - charakteristického pro určitý typ buněk periferní krve a kostní dřeně, tzv. imunofenotyp* (obr. 12-21). Využívá se stanovení imunohistochemické a imunocytochemické, kdy se řezy tkání, nátěry a antigeny znázorňují protilátkou vizualizovanou zpravidla enzymatickou reakcí. Tyto metody umožňují i současné stanovení morfologie buněk a vyšetření tkání.



Obr. 12-21 Dvouparametrická analýza buněčných povrchových antigenů (Karel Souček, 2000)

Metoda imunofluorescence umožňuje detekovat zkoumané antigeny pomocí specifických fluorescenčně značených protilátek (fluorochromy, imunofluorescence, přímé nebo nepřímé značení). Je to rychlá metoda využívající široké spektrum protilátek a umožňuje detekci v buněčných suspenzích – krev, kostní dřeň, výpotky, mozkomíšni mok, suspenze ze solidních tkání. Využívají se tzv. *kokteily protilátek*, to znamená, že jedním fluorochromem je značeno více protilátek i kombinace více protilátek proti různým epitopům jednoho antigenu. Ke stanovení fluorescence se používá **fluorescenční mikroskopie**, ale v současné době především vícebarevná **průtoková cytometrie** (obr. 12-22 až 12-25).

Becton Dickinson Instruments (BD)



Obr. 12-22a FACSCalibur

The FACSCalibur is the first a 4-colour, dual laser, benchtop system capable of both cell analysis and sorting fully integrated multiparameter system, wide range of research and clinical applications.



Obr. 12-22b FACSDiVa (Vantage)

High performance, high speed cell sorter Flow sorting instrument for the research laboratory.

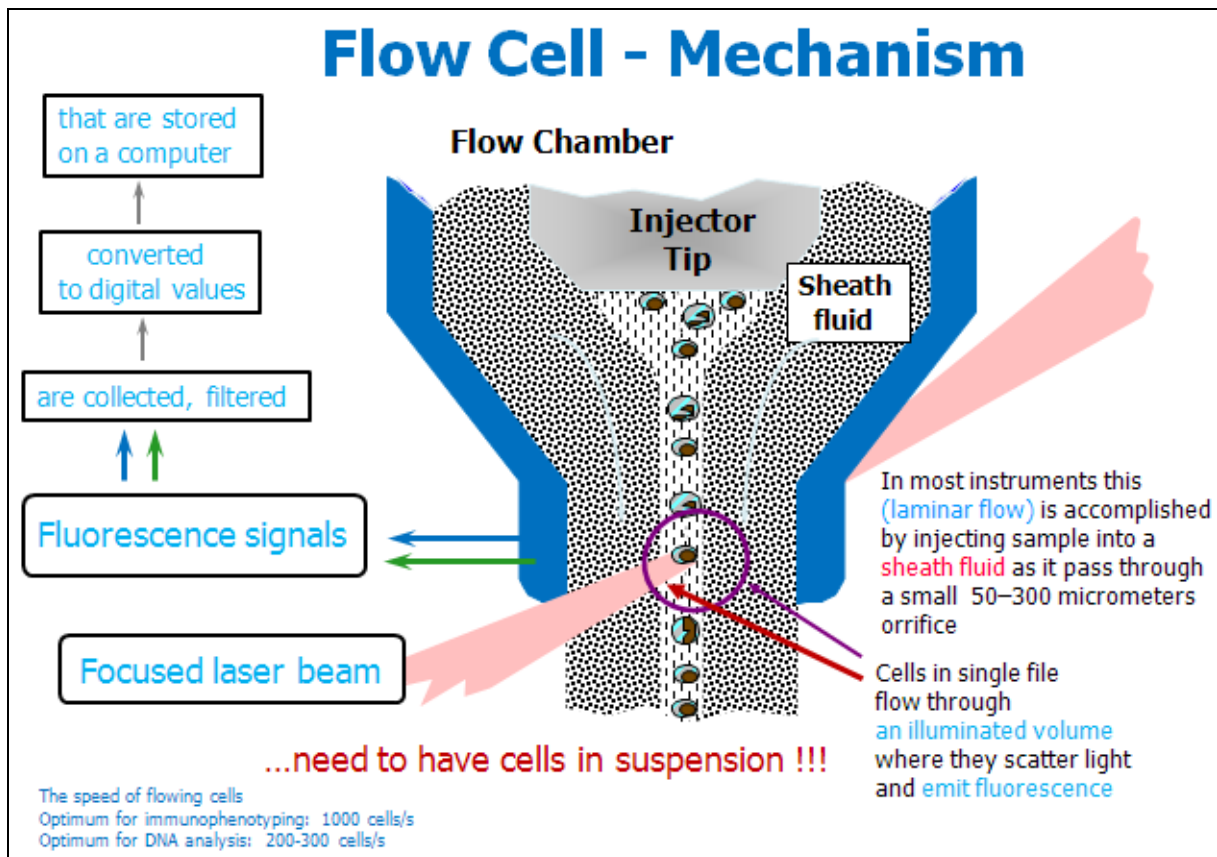


Obr. 12-22c BD LSR

the first 6-Color Benchtop Research Flow Cytometer

It has combined benchtop easy-of-use with the flexibility and performance of high-end flow cytometers.

Building on the easy-of-use standard set by the FACSCalibur, the BD LSR offers software instrument Control, push button fluids, and fine-adjust sample flow-rate control.



Obr. 12-23 Flow Cell – Mechanism (*Purdue University Cytometry Laboratories,*

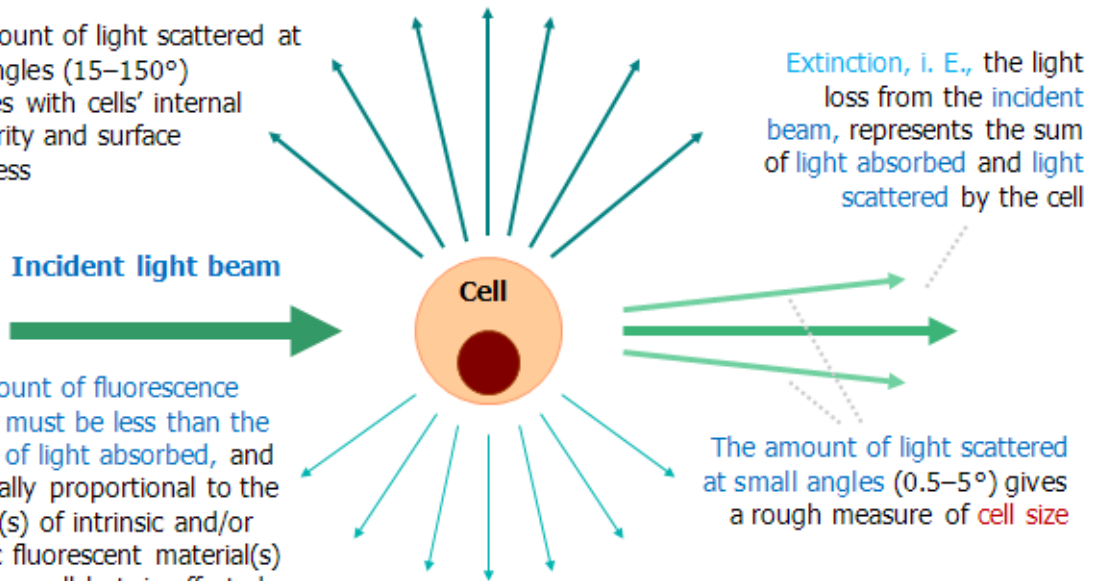
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate.htm>)

Interaction of light with the cell

Fluorescence is emitted, and light scattered, in all directions.

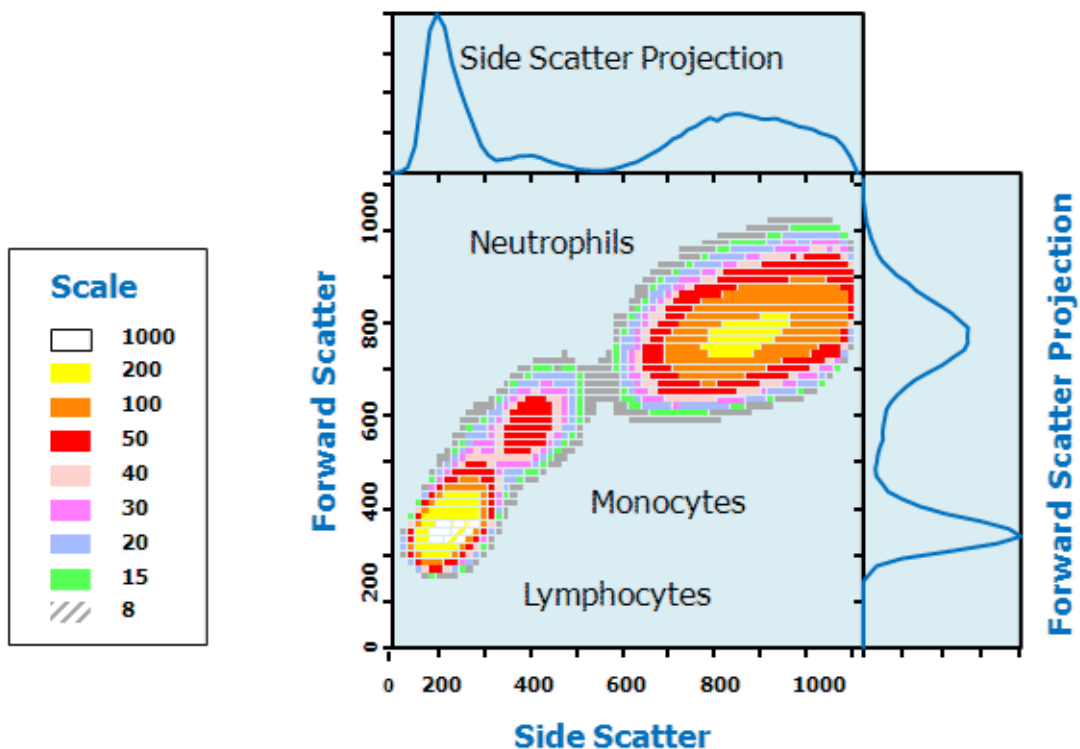
The amount of light scattered at large angles (15–150°) increases with cells' internal granularity and surface roughness

The amount of fluorescence emitted must be less than the amount of light absorbed, and is generally proportional to the amount(s) of intrinsic and/or extrinsic fluorescent material(s) **in** or **on** a cell but is affected by other factors, such as refractive index



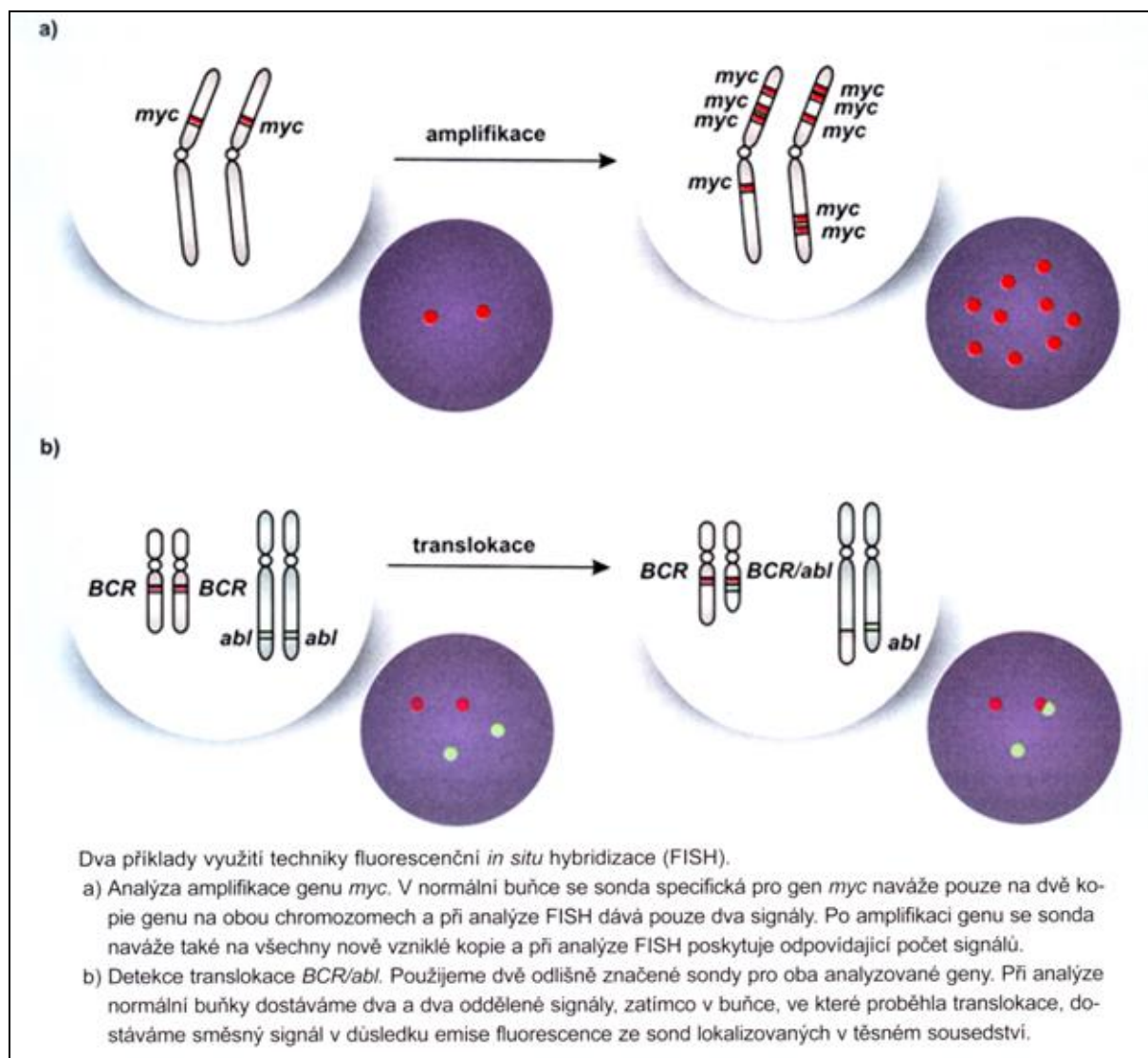
Obr. 12-24 Interaction of light with the cell (*Purdue University Cytometry Laboratories*)

Light Scatter Gating



Obr. 12-25 Light Scatter Gating (*Purdue University Cytometry Laboratories*)

Výpovědní hodnotu má i mikroskopické stanovení dle **morfologie buněk** a **molekulárně biologické metody**, např. FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), detekující genetické abnormality (obr. 12-26).



Obr. 12-26 In situ fluorescenční hybridizace (FISH) (*Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: Obecná onkologie a podpůrná léčba, 2003*)

Hematopoéza je regulována více než 20 dobře charakterizovanými faktory definovanými jako **kolonie stimulující faktory (CSF)**, **interleukiny (IL)** a **cytokiny**. Některé z těchto faktorů jsou běžně používány, ale potenciální klinické využití není úplně objasněno. Využívají se faktory uplatňující se v pozitivní i negativní regulaci, v autokrinním růstu a imunomodulační látky.

Vytvoření kultivačních systémů pro klonální vývoj hematopoetických buněk umožnilo odhalit proteiny, které regulují buněčnou viabilitu, růst a diferenciaci různých hematopoetických linií a také molekulární základy normálního a abnormálního vývoje krvetvorných tkání. *Různé cytokiny indukují viabilitu, množení a diferenciaci a hemopoéza je kontrolována sítí interakcí cytokinů.* Tato multigenová síť zahrnuje pozitivní regulátory jako jsou CSF a IL a negativní regulátory jako TGF beta a TNF. Síť cytokinů, která vznikla během evoluce, umožňuje značnou flexibilitu závisující na tom, která část sítě je aktivována a na okamžitém zesílení odpovědi na příslušný stimul. CSF a IL indukují buněčnou viabilitu inhibicí programované buněčné smrti – **apoptózy**. Ta je též regulována geny jako p53, c-myc a bcl-2 a suprese nebo indukce tohoto programu může vyústit v podporu nebo supresi nádoru. *Cytokiny, které regulují normální hemopoézu mohou kontrolovat abnormální růst jistých typů leukemických buněk a potlačovat malignitu indukci diferenciaci.* Genetické abnormality, z nichž vzniká malignita, jsou tak obcházeny a jejich účinek anulován indukci diferenciaci a apoptózy. Hematopoetické cytokiny objevené *in vitro* jsou aktivní *in vivo* a jsou klinicky využívány.

Pozitivní regulace hemopoézy

Prvním cytokinem využitým v terapii byl **erythropoetin** a to

1. při stimulaci erythropoézy po chemoterapii a transplantaci kostní dřeně,
2. u některých lymfoproliferačních poruch jako mnohočetné myelomy a chronická lymfocytární leukémie,
3. u anémií spojených s chronickým onemocněním (nádory, AIDS),
4. v programech autologního odběru krve.

Také **G-CSF a GM-CSF** mají řadu klinických aplikací:

1. urychlení zotavení krvetvorby po chemoterapii,
2. zlepšení sběru progenitorů z periferní krve,
3. zvýšení účinnosti cytotoxických léčiv vybuzením klidových leukemických buněk,
4. stimulace hemapoézy u syndromů poruch v kostní dřeni jako je cyklická neutropenie či aplastická anémie,
5. aktivace efektorových buněčných funkcí (AIDS, poruchy funkce leukocytů)

V mnoha klinických studiích aplikace G-CSF a GM-CSF zabraňuje nebo redukuje neutropenii po chemoterapii a zvyšuje počty neutrofilů u primárních poruch kostní dřeně.

IL-3 nazývaný multi-CSF podporuje přežívání *in vitro*, proliferaci a vývoj multipotentních hematopoetických kmenových buněk a komitovaných progenitorů pro granulocyty a makrofágy, erythrocyty, megakaryocyty, eosinofily a basofily.

Negativní regulace hemopoézy

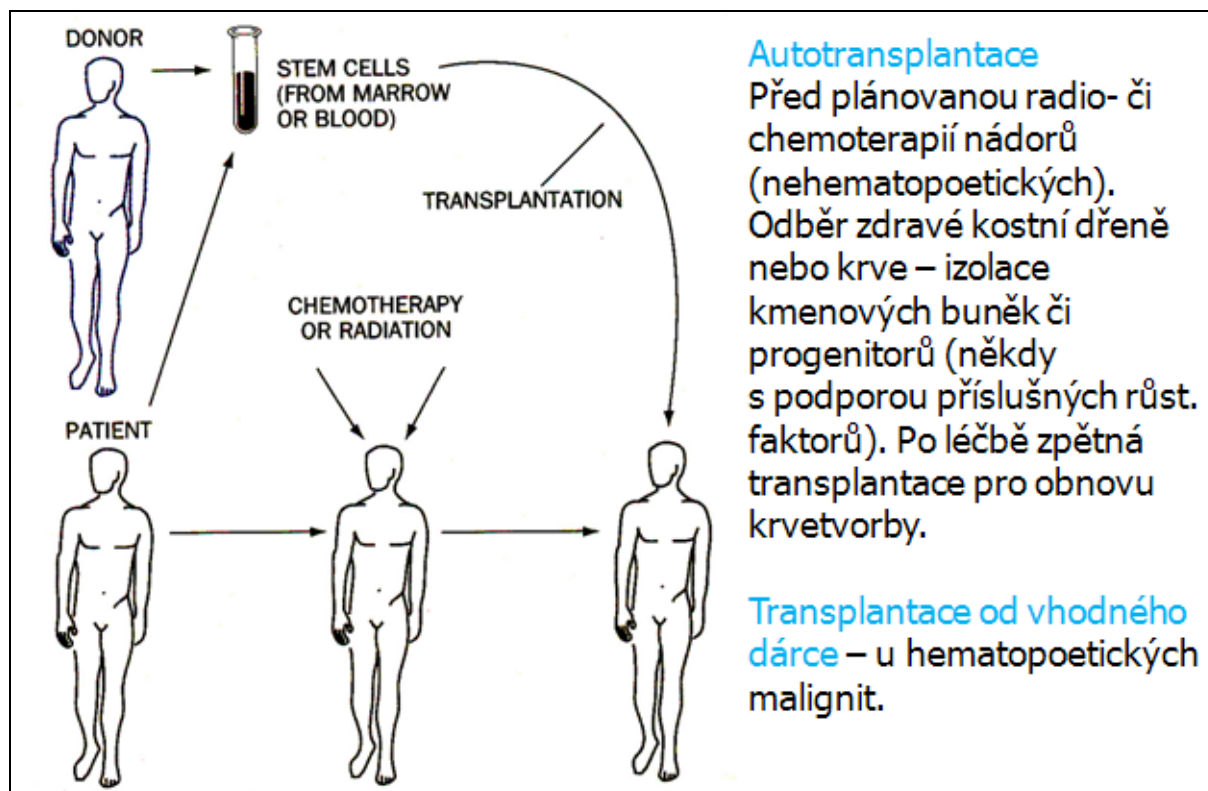
Využití negativních regulátorů hemopoézy představuje zcela jiný přístup založený na prevenci poškození ochranou pluripotentních kmenových buněk proti cytotoxickému působení chemoterapeutik. Patří k nim např. **TGF beta a MIP 1alfa** (macrophage inflammatory protein), které tlumí proliferaci kmenových buněk během fáze působení chemoterapeutik a chrání je tak před poškozením.

Růstové faktory a autokrinní růst

Autokrinní růst je definován jako vývoj malignity buňky endogenní produkcí vlastního stimulačního faktoru, což způsobí její nezávislost na vnější fyziologické kontrole růstu. Autokrinní růstový faktor se tvoří v jádře a je uvolňován buňkou. Ta na svém povrchu nese receptory pro tento faktor, přes které je buňka další komplikovanou cestou přenosu signálu nucena k další produkci růstového faktoru, čímž se zvyšuje její malignita. Proto je cílem terapie blokáda těchto cest různými antagonisty růstových faktorů a receptorů a látkami, které zasahují do sítě přenosu signálu. Nyní dochází v této oblasti k velkému rozmachu a hledají se nové látky působící na buněčné membráně. Patří k nim inhibitory inositol lipidového metabolismu, eterové lipidy, antagonisty PAF (platelet-activating factor), inhibitory protein kinázy C atd. Další strategie zahrnuje indukci diferenciaci nádorových buněk a navození apoptózy.

Léčebné postupy

U pacientů s CML byla v minulosti prognóza velmi špatná (střední doba přežití 3 roky). Nyní se situace zlepšila díky včasné diagnóze, zlepšující se terapii a podpůrné léčbě. K léčbě se využívá hydroxyurea s busulfanem podporovaná IFN, ARA-C a dále **autologní transplantace kostní dřeně** (obr. 12-27). Střední doba přežití je asi 60–65 měsíců. Po léčbě IFNalfa přežívá 20–25 % pacientů. Léčba má však vedlejší účinky jako je horečka, nechutenství, svalové bolesti i dlouhodobější problémy jako je ztráta váhy, deprese, nespavost atd.



Obr. 12-27 Transplantace (Christiansen J.C., *Scientific American* 1996 : 124)

MDS jako získaná klonální porucha kostní dřeně charakterizovaná kvantitativními i kvalitativními poruchami v hemopoéze je diagnostikována zejména u starších lidí. Není proto možné použít drastickou terapii a transplantace. Standardizovaná terapie zde neexistuje.

Řada léčebných protokolů je zaměřena na **využití diferenciačních látek** k podpoře zrání blokováných buněk. Existují modely *in vitro*, kde je možno navodit diferenciaci buněk pomocí analogů kyseliny retinové, dimetylsulfoxidu nebo vitaminu D3, glukokortikoidů, IFN, příp. G-CSF, GM-CSF (obr. 12-28). Přestože experimentální výsledky jsou nadějně, u pacientů nepřinášejí tyto metody žádoucí výsledky.

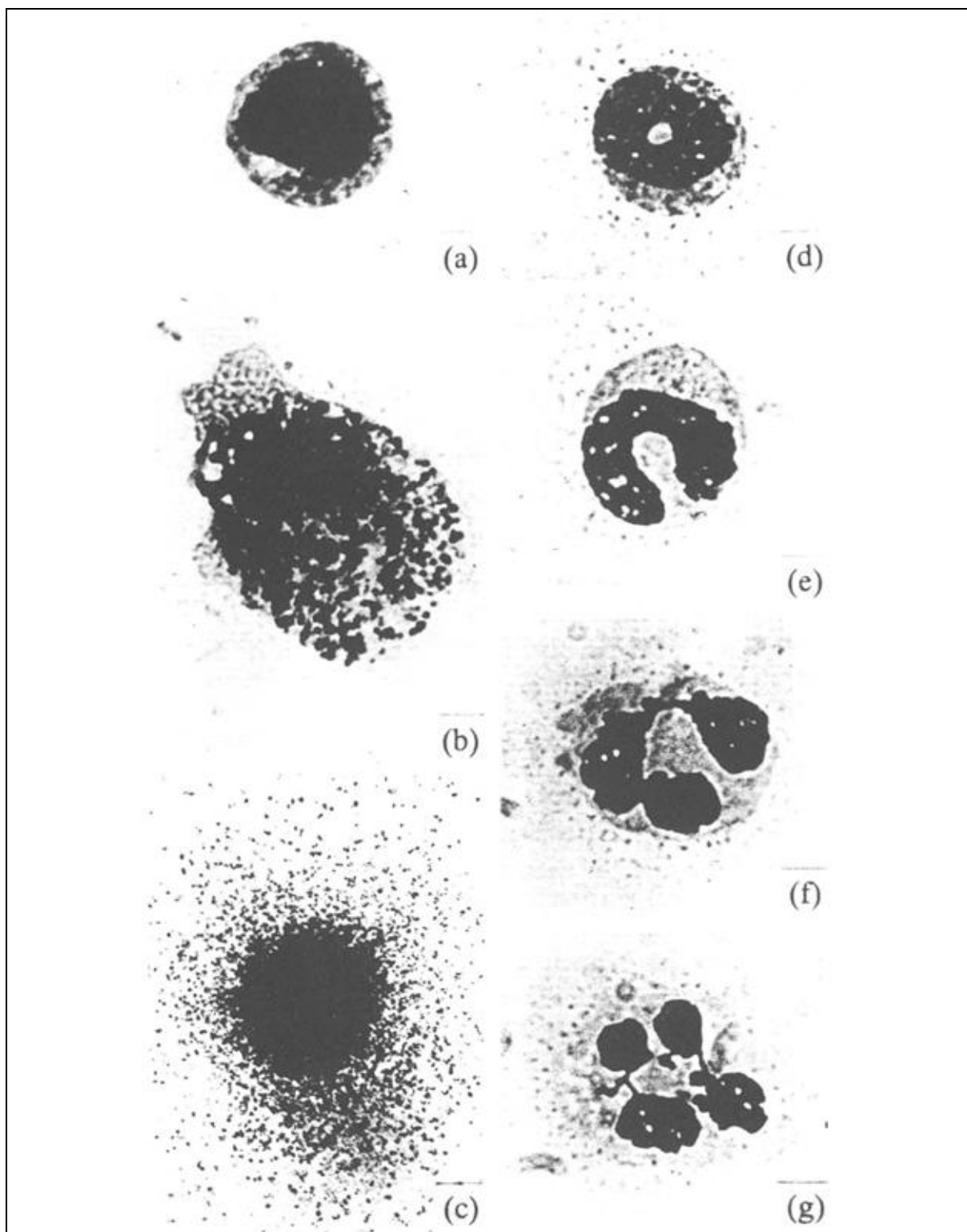


Figure 5. Differentiation of myeloid leukaemic cells to non-malignant mature macrophages or granulocytes by normal myeloid differentiation-inducing protein IL-6. (a) Leukaemic cell; (b) macrophage; (c) colony of cells with macrophages; (d–g) stages in differentiation to granulocytes [74].

Obr. 12-28 Diferenciace myeloidních leukemických buněk do nemaligních zralých makrofágů nebo granulocytů interleukinem-6 (*Saachs L., Eur J Cancer 1994 : 852*)

All-trans retinová kyselina (ATRA) je nyní efektivním lékem při léčbě *akutní promyelocytární leukémie*. Na MDS má však malý účinek, což má pravděpodobně genetický důvod a to absenci translokace 15,17, jejíž přítomnost je pro klinický účinek ATRA důležitá. Rekombinantní růstové faktory jako GM-CSF a IL-3 jsou u MDS pacientů úspěšně využívány ke zvýšení počtu cirkulujících bílých krvinek a destiček.

Pozorování předpokládají, že MDS je způsobena defektním diferenciacním programem, ale progresse do AML vyžaduje další abnormalitu, která poskytne růstovou stimulaci, jako je autokrinní produkce růstového faktoru nebo konstitutivní aktivace receptoru pro růstový faktor. Identifikace řady protoonkogenů jako jsou růstové faktory nebo jejich receptory a důležité účinky těchto proteinů na hematopoetické buňky vedly k hledání deregulace těchto molekul u leukémií.

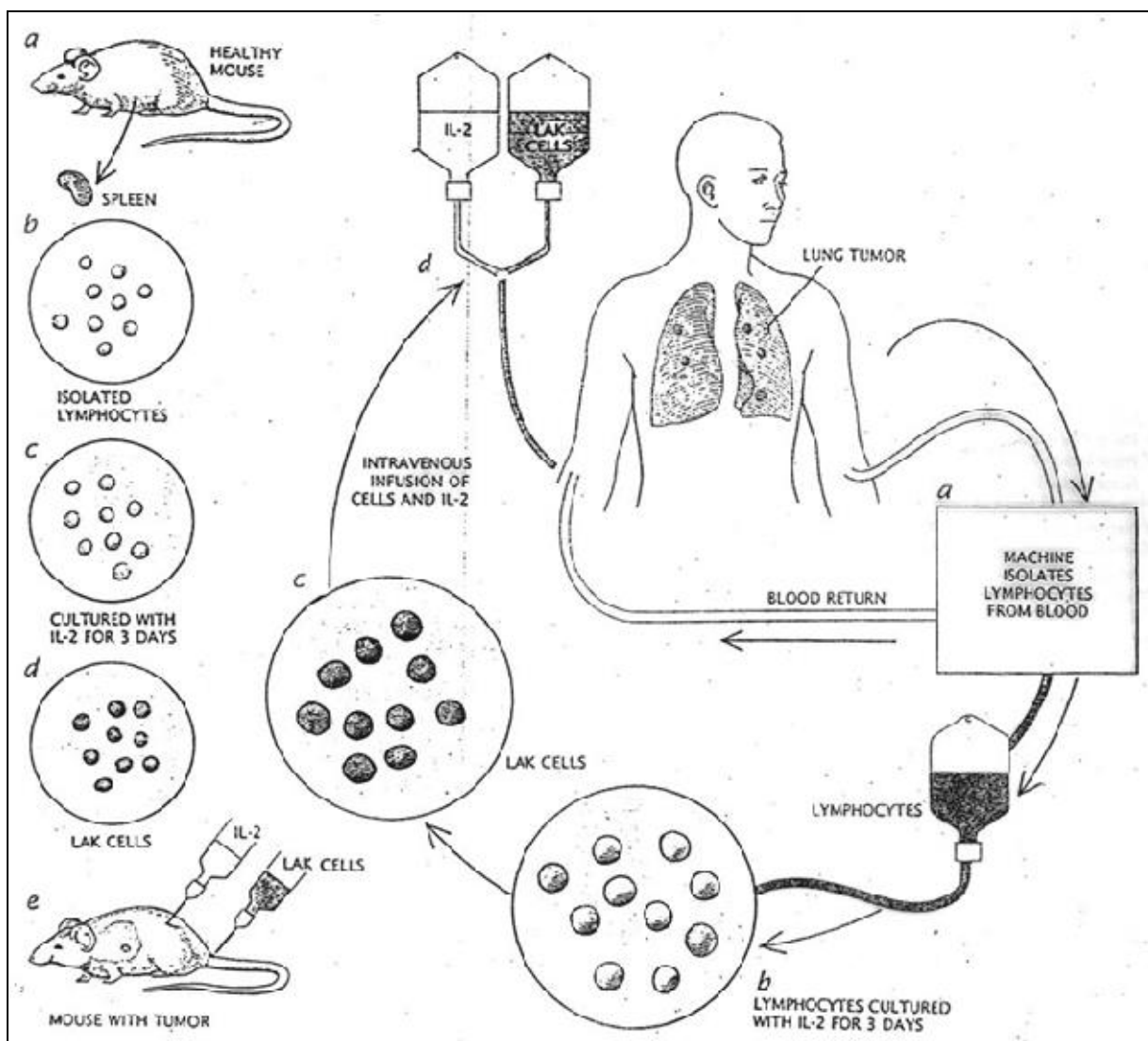
Využití vysokých dávek chemoterapeutik, které účinně působí na citlivé nádory je omezeno vedlejšími účinky s hematologickou toxicitou. Jednou z cest jak překonat tyto obtíže je **metoda transplantace kmenových buněk z periferní krve (PBSC)**, která je alternativou k transplantaci kostní dřeně a je stále více využívána. Má řadu výhod: sběr PBSC leukaferézou probíhá mimo pacienta bez potřeby anestézie a možností autograftu v případě ovlivnění kostní dřeně infiltrací nádoru, fibrózou nebo hypoplasií po chemo- a radioterapii. Navíc dochází k rychlejšímu obnovení granulocytopoézy a megakaryocytopoézy a k redukované možné kontaminaci transplantantu maligními buňkami. Odhad je, že v kostní dřeni je asi 0.001 % pravých kmenových buněk, 10x víc multiliniových progenitorů a 100x víc liniově specifických progenitorů. U dospělců cirkuluje v periferní krvi asi 5–10 % počtu progenitorových buněk v kostní dřeni. Představují asi 0.1% mononukleární frakce periferní krve.

Byly vyvinuty metody zvýšení cirkulujících progenitorů aplikací specifických cytokinů. CD34 je glykosylovaný povrchový antigen exprimovaný především kmenovými a méně progenitorovými buňkami. Byla vyvinuta řada metod pro selekci buněk s tímto znakem CD34+. S vývojem metod kultivace *in vitro* lze tyto buňky namnožit s pomocí synergického působení kombinace cytokinů (steel faktor + další) a pak pomocí reinfuze aplikovat pacientům. Tyto buňky je též možné využít *in vitro* k označení genů a genové terapii.

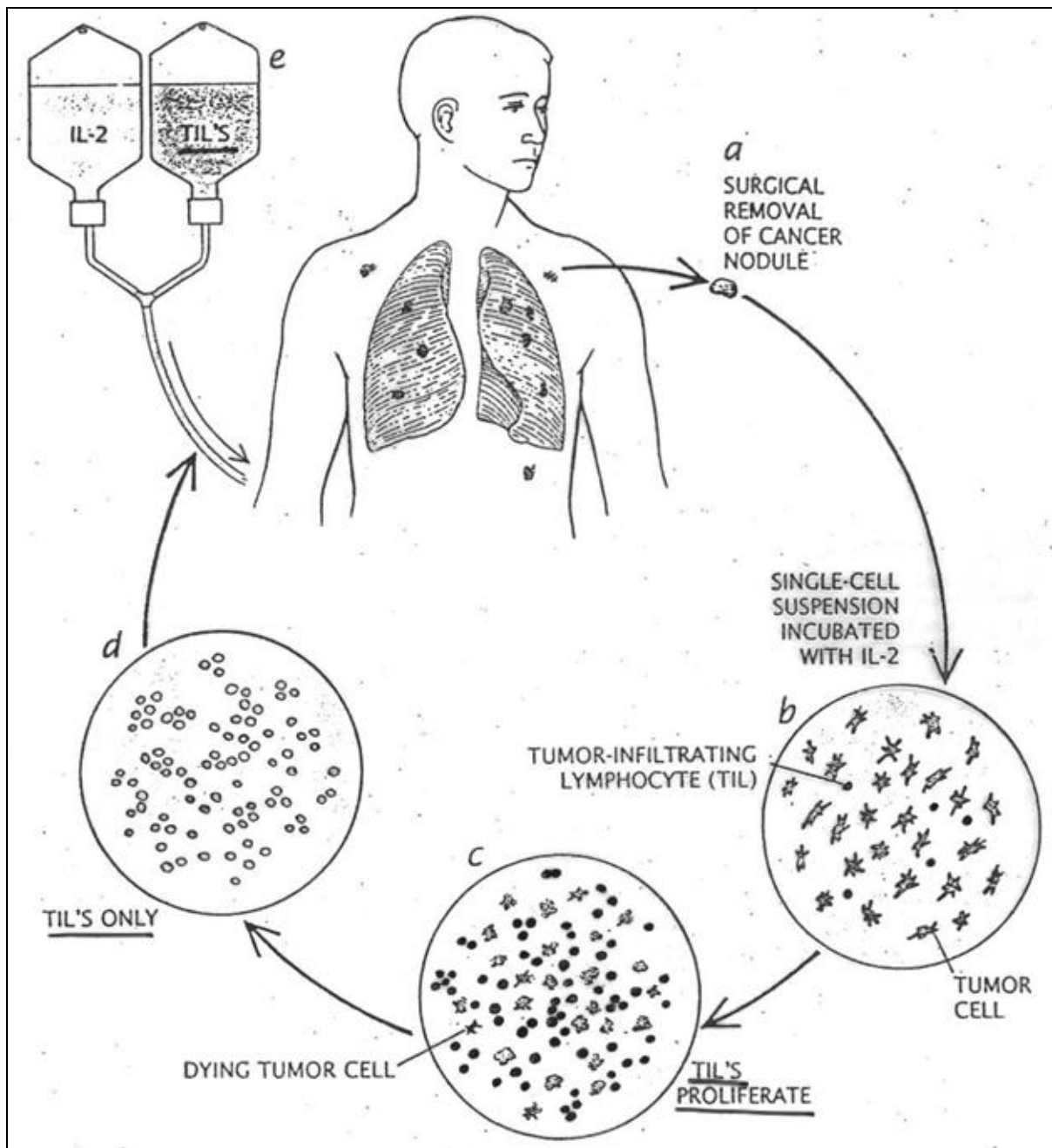
Cílem terapie s využitím **imunomodulačních látek** je ovlivnění imunitního systému hostitele k podpoře boje proti nádoru. Cílové buňky pro imunomodulaci mohou patřit k lymfatickému systému, ale v protinádorovém boji hraje důležitou roli i monocytární-makrofágový systém. GM-CFC, M-CFC nebo IL-3 stimulují cytotoxicitu makrofágů *in vitro*. G-CSF a IL-8 stimulují funkce neutrofilů např. u MDS.

Interferony (např. IFN alfa, gamma) vykazují regulační aktivitu u řady maligních poruch. Klinická aplikace IFN alfa na multičetné myelomy není zcela jednoznačná, malé dávky však působí na tzv. vlasaté leukemie.

Interleukin -2 je schopen tvořit tzv. *lymfokinem aktivované zabijáče (LAK)*, které mají širší spektrum cílových buněk než NK nebo cytotoxické T buňky. Tato metoda objevená v 80. letech byla zkoušena nejdříve na myších, později i na pacientech. Lymfocyty izolované z krve pacientů je možné kultivovat in vitro s IL-2 a tyto stimulované LAK transplantovat zpětně pacientovi (obr. 12-29). Kromě toho byla zkoušena i metoda mimotělní kultivace, kdy tzv. *TIL'S (tumor-infiltrating lymphocytes)* vyžadují víc než měsíc přípravy před aplikací pacientům. Ze vzorku nádoru jsou vykultivovány TILs, namnoženy s IL-2 a zpětně transplantovány pacientům (obr. 12-30). Tyto metody však nenašly širší využití.



Obr. 12-29 Využití LAK (lymfokine-activated killer) buněk v protinádorové terapii (Rosenberg S.A. et al., *Int Natl Cancer Inst* 1993 : 622)



Obr. 12-30 TIL'S (tumor-infiltrating lymphocytes) vyžadují víc než měsíc přípravy před aplikací pacientům (Rosenberg S.A. et al., *Int Natl Cancer Inst* 1993 : 622)

Cytokiny mohou kromě samostatných účinků působit také biomodulaci cytotoxických látek. Biomodulace je definována jako zvýšení protinádorové aktivity manipulací metabolických cest cytostatických látek sekundárními biomodulačními látkami, které samy mají malou nebo žádnou antiproliferační aktivitu (např. INF alfa zvyšuje účinnost 5-fluorouracilu u gastrointestinálních malignit).

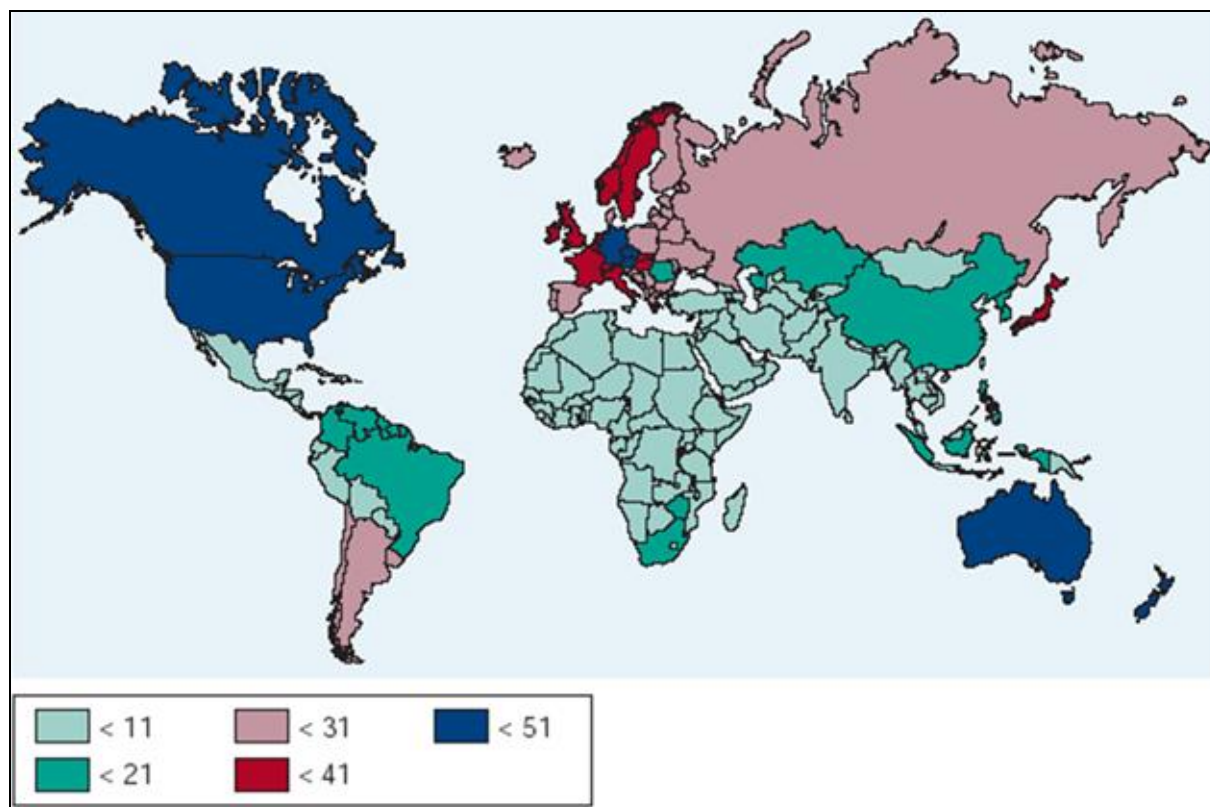
Kontrolní otázky k tématu:

- Jaká je charakteristická organizace sebeobnovných buněčných populací? Uveďte příklady.
- Jak je organizována krvetvorná tkáň? Jmenujte základní krvetvorné řady.
- Uveďte příklady patologických poruch krvetvorby.
- Jak je charakterizována leukémie?
- Jaká je úloha stromatu kostní dřeně v regulaci krvetvorby?
- Charakterizujte preleukemické poruchy.
- Jak dochází ke zvratu v akutní leukémii?
- Charakterizujte základní 2 typy akutní leukémie.
- Co jsou to lymfomy?
- Jaké metody se používají k diagnostice onemocnění a úspěšnosti léčby poruch krvetvorby?
- Jak jsou využívány poznatky o působení cytokinů a růstových faktorů v léčbě leukemií?
- Které konkrétní cytokiny či růstové faktory a k čemu se využívají?
- Co znamená diferenciační terapie?
- V čem spočívá metoda transplantace a které typy buněk se transplantují?
- V čem spočívá využití imunomodulačních látek?
- Co je to biomodulace?

13. NÁDORY TLUSTÉHO STŘEVA (KOLONU) A REKTA (CRC)

CRC patří mezi nejčastěji se vyskytující nádory v západních industrializovaných zemích a jsou téměř všude na třetím místě v pořadí úmrtí na nádorová onemocnění (obr. 13-1). V posledních 20 letech byla objasněna řada molekulárních mechanismů vedoucích ke vzniku CRC, avšak prognóza zejména pokročilých stádií CRC se příliš nezlepšila (obr. 13-2). Důvodem je stále vysoké procento pozdě diagnostikovaných onemocnění, přičemž právě včasná diagnóza hraje nejdůležitější úlohu v úspěchu léčby.

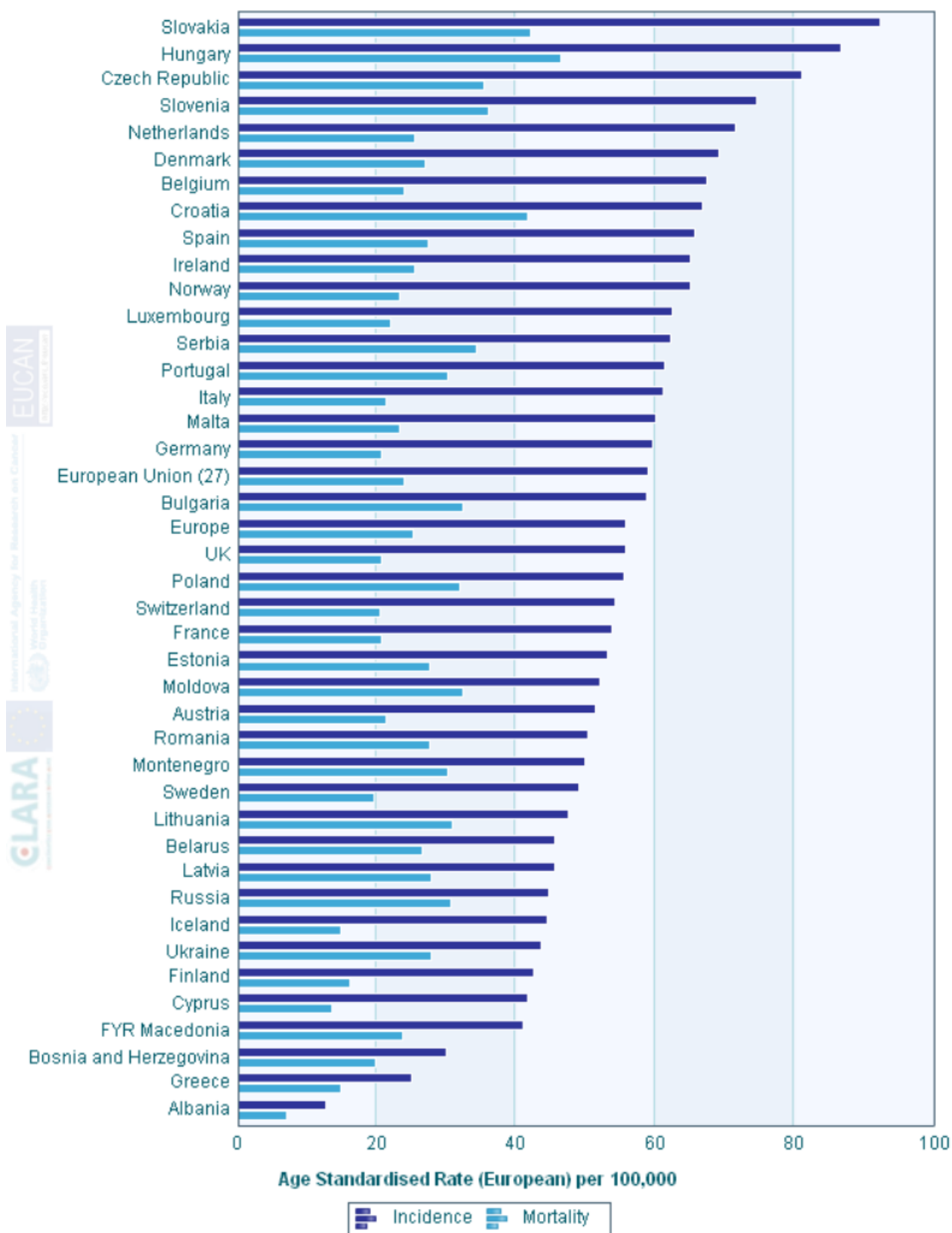
CRC představuje soubor heterogenních onemocnění zahrnujích dědičné i tzv. sporadické formy. Většina nádorů je sporadických, ale vyznačují se velkou heterogenitou a rozdíly s ohledem na patogenezi a prognózu.



Obr. 13-1 Nejvyšší výskyt CRC v průmyslově vyspělých zemích (Kanada, USA, Evropa, Austrálie)

(zdroj: <http://www.indox.org.uk/research/epidemiology/colorectalcancer>)

Estimated incidence & mortality from cancer of the large bowel in men, 2012

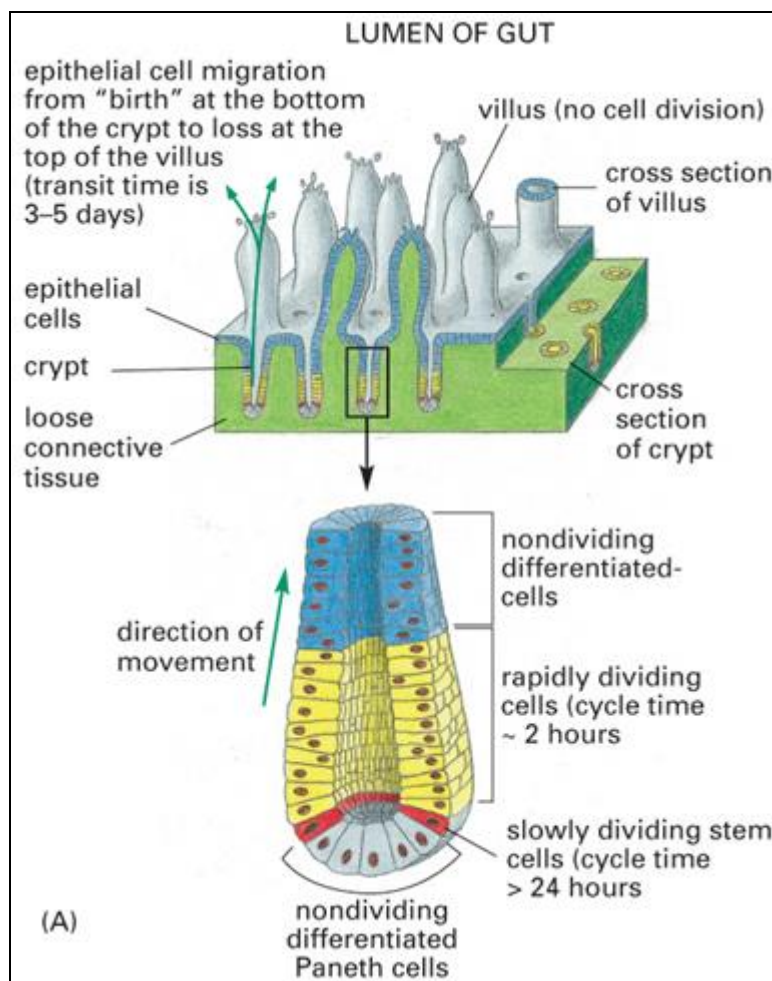


Obr. 13-2 Incidence a mortalita kolorektálních nádorů u mužů v EU 2012 (zdroj:

<http://eco.iarc.fr/eucan>)

13.1 ANATOMIE STŘEVA

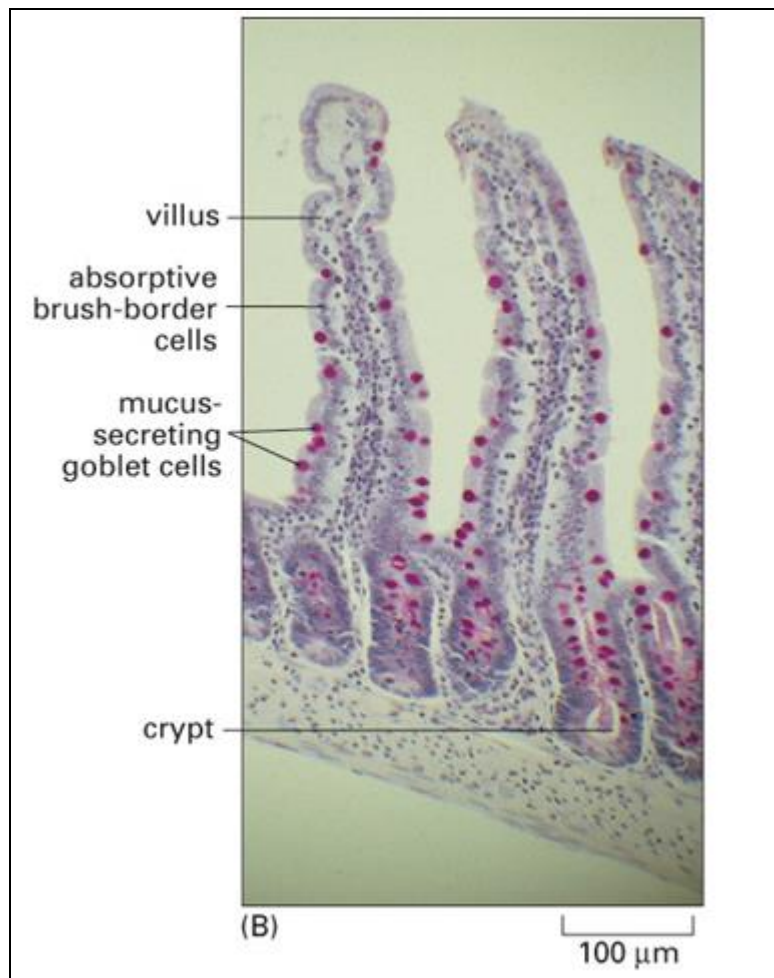
Střevní tkáň představuje **sebeobnovnou tkáň** s unikátní topologií. Jednovrstevná bariéra mezi lumen a vnitřním prostředím tvoří *krypty a klky (villi) v tenkém střevě a krypty v kolonu*. V dolní části krypt se nacházejí kmenové buňky (příp. Panethovy buňky v tenkém střevě) (obr. 13-3a s 13-3b). Z těch vznikají obnovou a asymetrickým dělením další kmenové buňky nebo progenitorové buňky, které postupují k vrcholu krypty, postupně ztrácejí proliferační potenciál a diferencují ve zralé kolonocyty. *Staré kolonocyty na vrcholu krypt odumírají a jsou odlupovány do střevního lumen*. Tento proces se nazývá **anoikis** (detachment-induced apoptosis) (obr. 13-4).



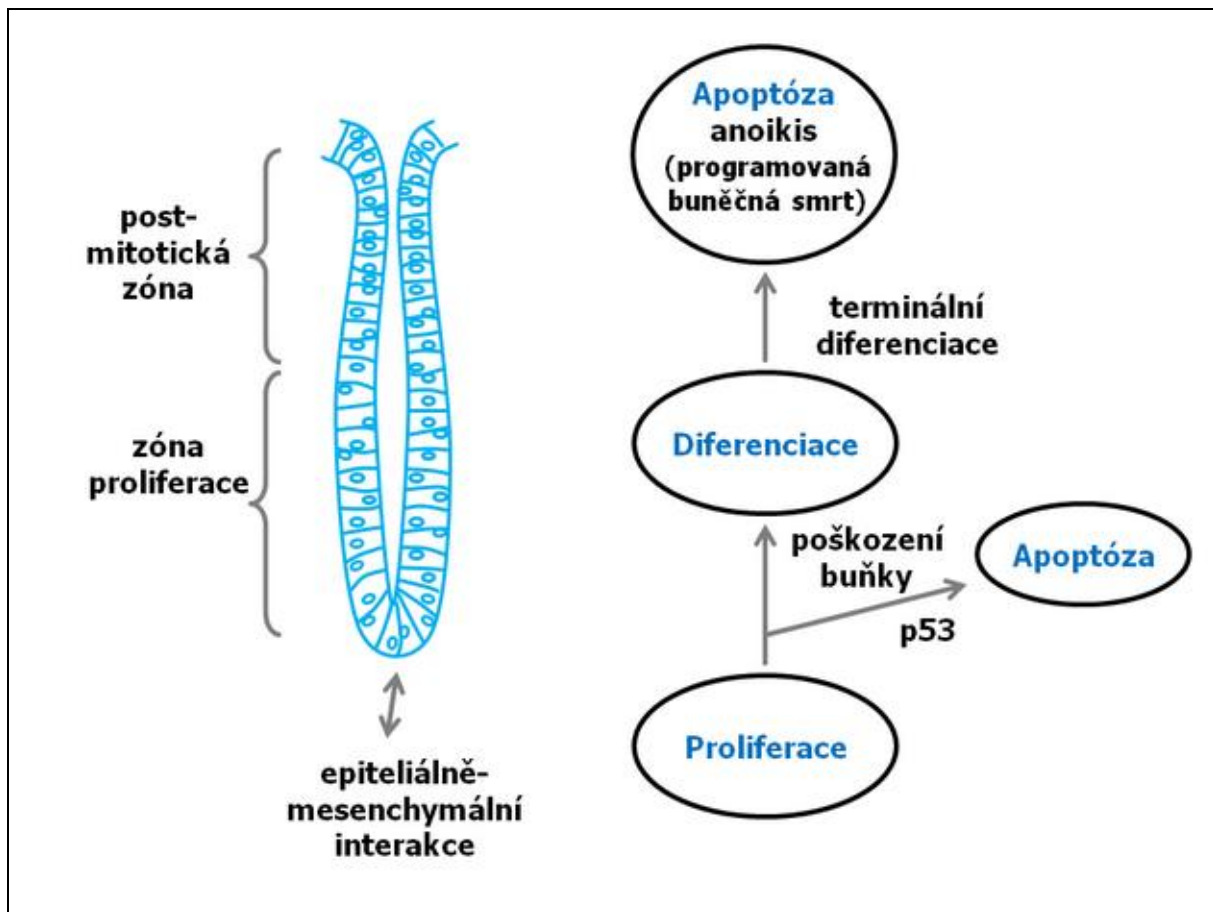
Obr. 13-3a Obnova střevní výstelky

(A) Střevní krypty (část proliferační a diferenciační)

Výměna epitelu – buňky migrují ze spodní části krypty, oblast kmenových buněk (pomalu se dělící – 24h, rychle se dělící buňky – 2 h, diferenciací buněk podél krypty, snižování proliferace, na vrcholu odumírají apoptózou-anoikis (detachment-induced apoptosis), celé trvá 3–5 dní. (*Figure 22-19. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)



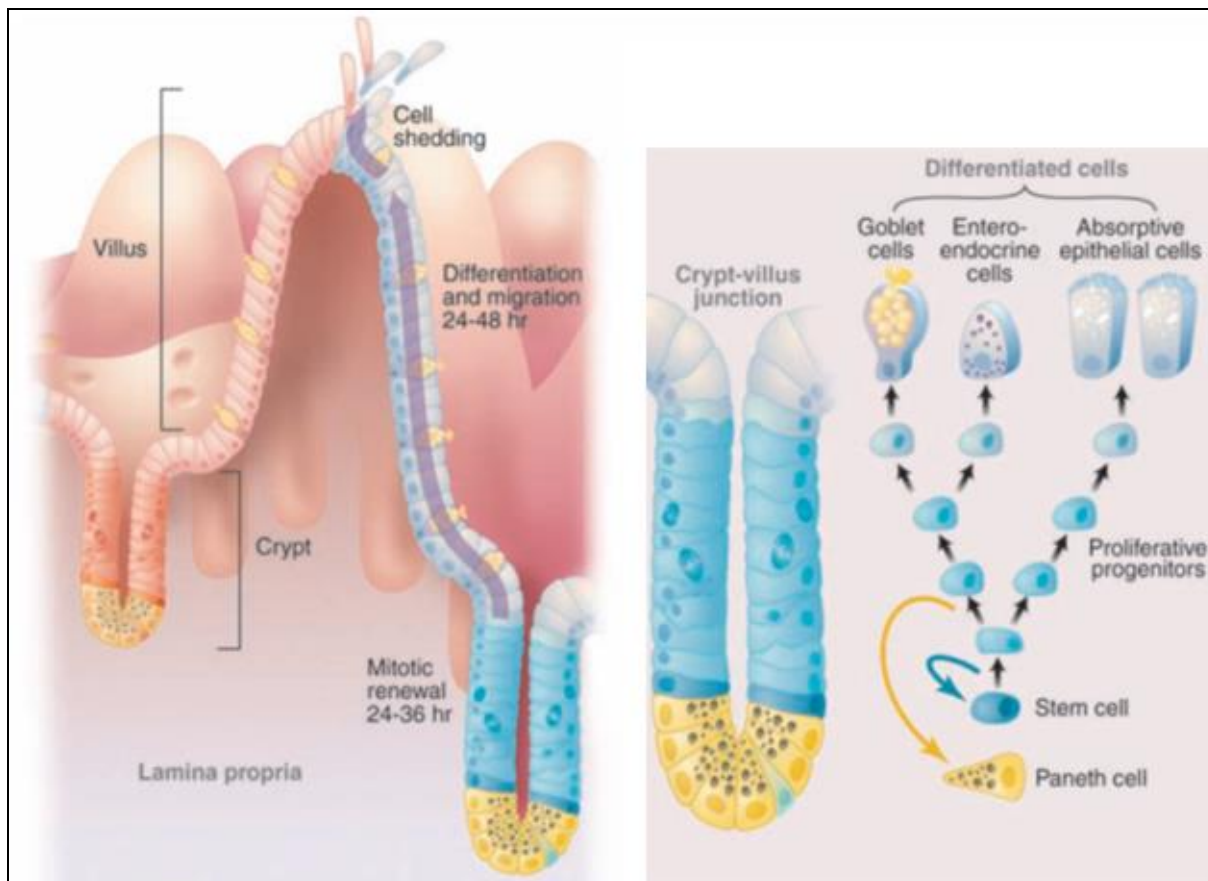
Obr. 13-3b Obnova střešní výstelky (B)



Obr. 13-4 Zóny v kryptě kolonu

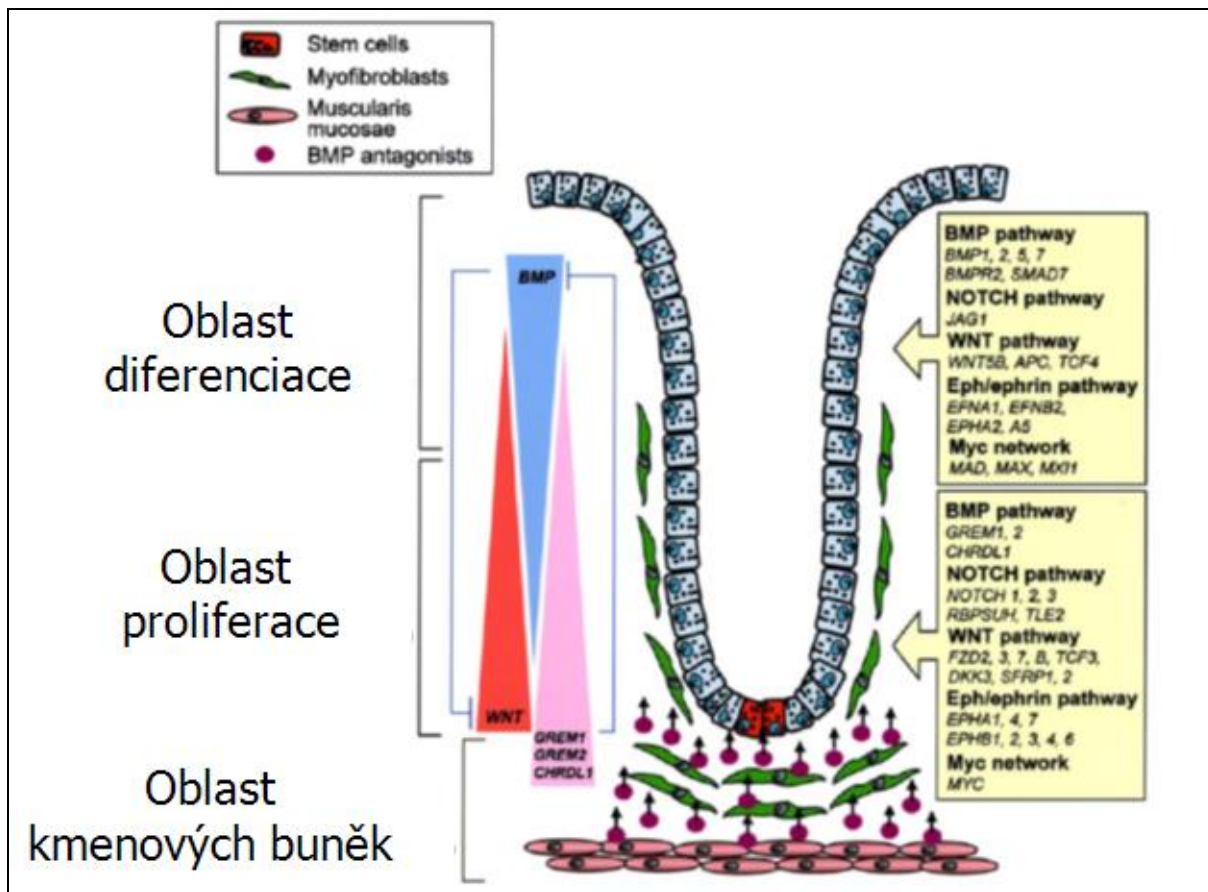
Ve střevě se vyskytuje několik buněčných typů (obr. 13-5):

- **Enterocyty** jsou nejpočetnější a představují *absorbivní linii*.
- *Sekreční linie* jsou zastoupeny **gobletovými buňkami**, které sekretují protektivní muciny a jejich počet přibývá směrem ke kolonu a **enteroendokrinními buňkami**, které tvoří asi 1 % a sekretují hormony (serotonin, sekretin)
- *Panethovy buňky* jsou zastoupeny *pouze v tenkém střevě* a sekretují antimikrobiální látky, což zajišťuje kontrolu mikrobiálního obsahu ve střevě.

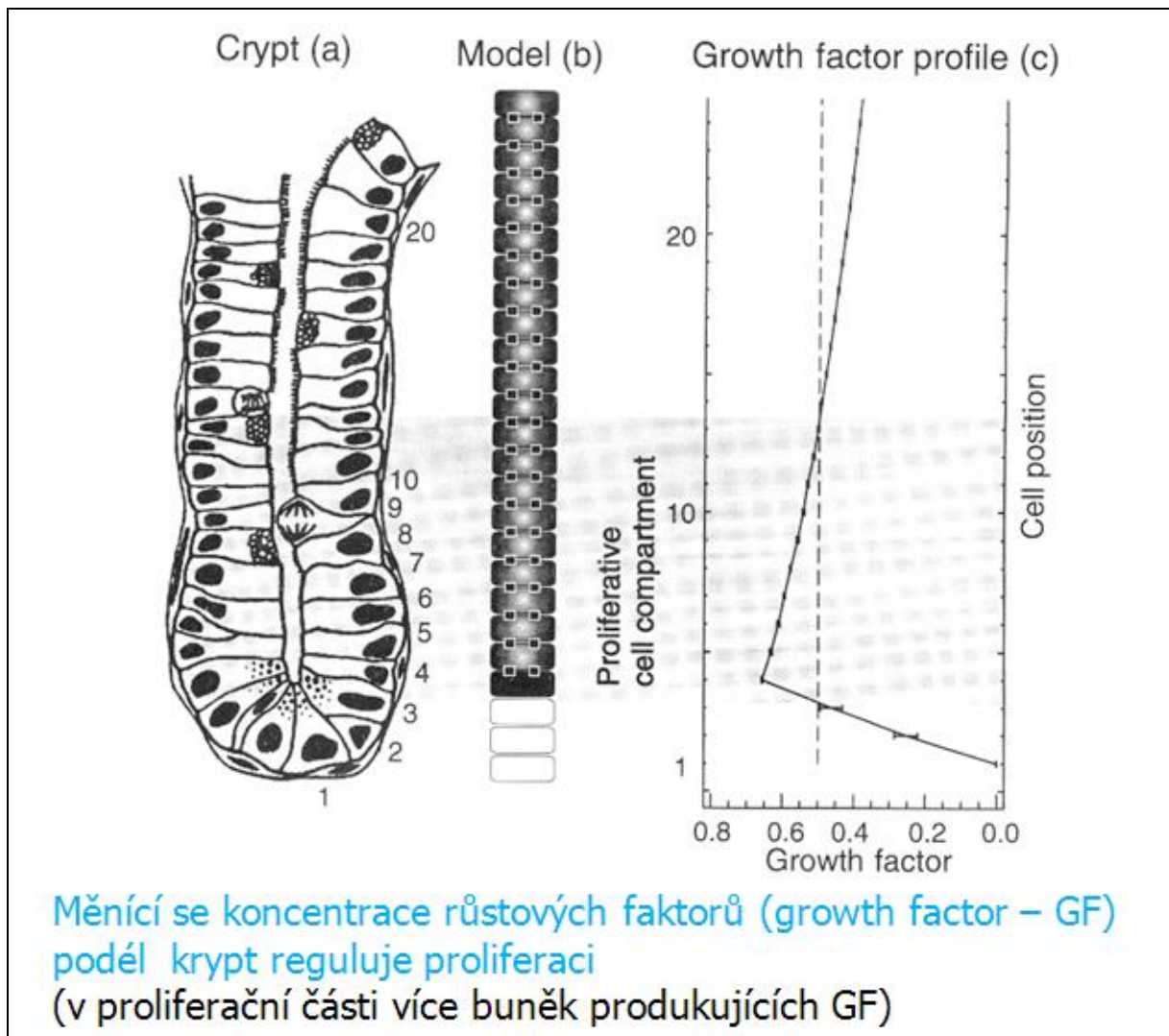


Obr. 13-5 Anatomie epitelu tenkého střeva – krypty a villi (Radtke F. and Clevers H., *Science* 2005 : 1904)

Ve střevní tkáni je velmi důležitá **regulace procesů proliferace, diferenciaci a apoptózy** pro **zachování rovnováhy mezi přírůstkem a úbytkem buněk**. To je zajišťováno zapojením specifických signálních drah (WNT, BMP, NOTCH) (obr. 13-6) a změnami koncentrace příslušných růstových faktorů (obr. 13-7). Poruchy této regulace pak vedou k patologickým stavům včetně nádorových onemocnění. Právě molekulární mechanismy kontrolující homeostázu jsou terčem změn podílejících se na vzniku nádorů.



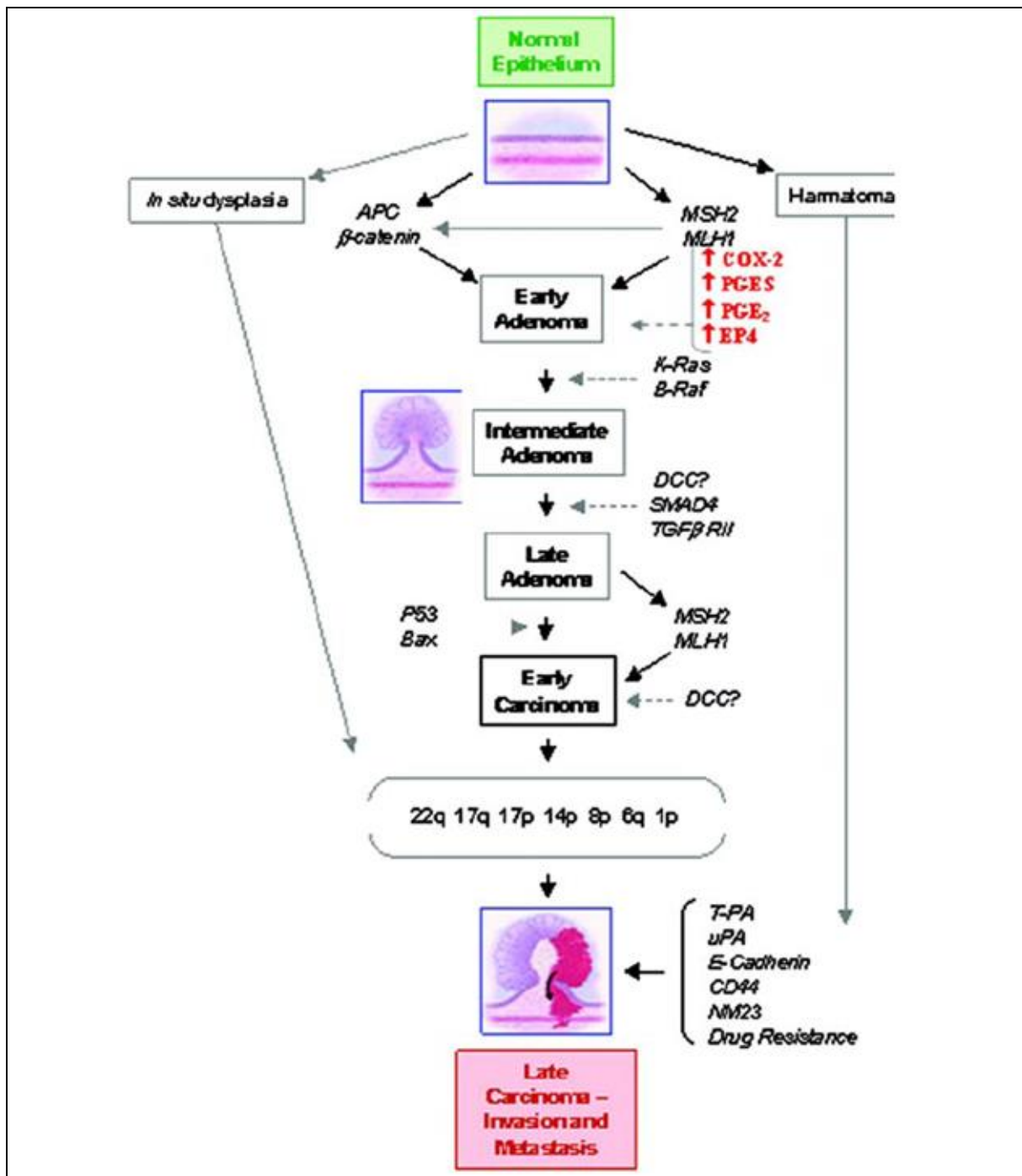
Obr. 13-6 Střevní krypta s jednotlivými kompartmenty a aktivními signálními drahami (*Kosinski C., PNAS 2007 : 15418*)



Obr. 13-7 Střevní krypta a profil růstových faktorů (*Gerike T.G. et al., Cell Proliferation 1998 : 93*)

13.2 VZNIK NÁDORŮ KOLONU A REKTA

Tyto nádory vznikají **progresivní akumulací genetických a epigenetických změn vedoucích k transformaci normálního střevního epitelu do adenokarcinomu** (obr 13-8). K tomu se přidávají účinky dalších faktorů nazývaných **modifikátory CRC**. Klíčovými faktory jsou **celkový životní styl a výživa působící ve všech stádiích karcinogeneze**.



Obr. 13-8 Rozvoj z adenomu do karcinomu (Chell S., BBA 2006 : 104)

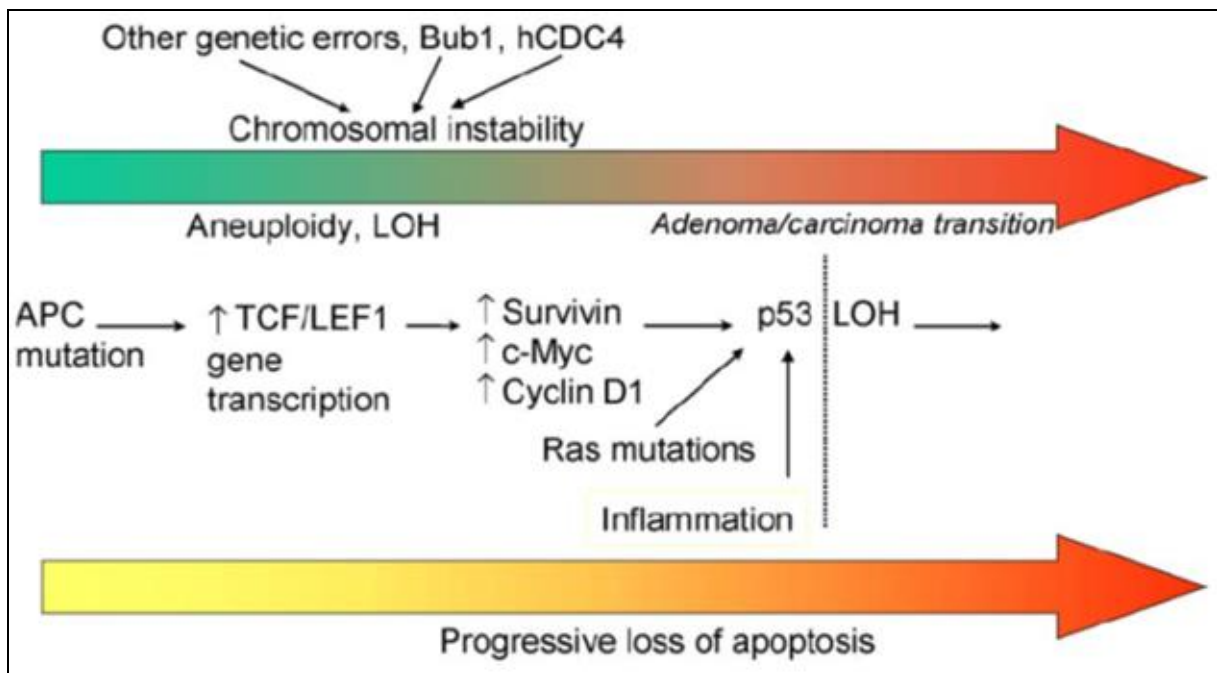
V základu 4–6 genetických defektů (mutace, deregulace protoonkogenů – K-ras, c-myc, inaktivace nádorových supresorů – APC, p53)
 APC – „adenomatous polyposis coli“
 DCC – „deleted in colorectal cancer“

Genetické změny jsou provázeny progresí z malých premaligních poškození do pokročilých adenokarcinomů

Molekulárně genetické poznatky charakterizující CRC

- Mnohastupňová progresse na molekulární i morfologické úrovni
- Genetické (mutační aktivace onkogenů a inaktivace nádorově supresorových genů) a epigenetické změny (změny metylace DNA a acetylace histonů) podporují tvorbu nádoru poskytující klonální růstovou výhodu změněným buňkám.
- Klíčovým molekulárním krokem je ztráta genomové stability
- Dědičné nádorové syndromy často odpovídají formám klíčových genetických defektů u zárodečných linií, jejichž somatický výskyt nastartuje sporadické nádory kolonu.

Ztráta genomové stability je klíčovým molekulárním a patogenetickým krokem vyskytujícím se na počátku nádorového procesu a vytváří permisivní prostředí pro výskyt změn onkogenů a nádorově supresorových genů (obr 13-9).



Obr. 13-9 Vznik chromozomální nestability u CRC; LOH – loss of heterozygosity (*Watson AJF Crit Rev. Oncol Hematol 2006 : 107*)

Při vývoji CRC se uplatňují tři hlavní typy genetické nestability:

- Nestabilita mikrosatelitů (MSI)
- Nestabilita chromozómů (CIN) - získání či ztráta úseků chromozómů, aneuploidie
- Chromozomální translokace

13.3 DĚDIČNÉ TYPY CRC

Existují dědičné poruchy predisponující jedince k nádorům. *Hereditární syndromy jsou způsobeny zárodečnými mutacemi ve specifických genech způsobujících zejména nefunkčnost nádorově supresorových genů.* Tyto inaktivační mutace jsou v základu recesivní a nemusí se u nositele fenotypově projevit kromě predispozice k nádoru. Incidence nádorů však vykazují často dominantní typ dědičnosti, protože existuje vysoká pravděpodobnost, že další mutace, ztráta heterozygotnosti nebo umlčení inaktivuje druhou normální alelu.

Existují dva základní typy dědičných syndromů CRC:

- **polypózní formy** (familiární adenomatózní polypóza – FAP) vyskytující se asi v 1 %. Představují *mutace nádorově supresorového genu APC (adenomatous polyposis coli)*, následkem kterých se tvoří tisíce adenomatózních polypů ve střevě a následné riziko vzniku nádoru je téměř 100 %.
- **nepolypózní formy** (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – HNPCC), Lynchův syndrom) představují asi 15 %. Jsou charakterizovány *mutacemi genů pro MMR enzymy (mismatch DNA repair) a množstvím mutací v repetitivních sekvencích DNA – mikrosatelitech.* Zde existuje zvýšené riziko i dalších typů nádorů.

Přesné rozlišení mezi tzv. sporadickými a familiárními a mezi genetickými a environmentálními faktory predisponujícími k CRC není striktní. U sporadických forem nacházíme často mutační inaktivace podobných genů jako u dědičných forem.

Rodinný výskyt „sporadického“ kolorektálního karcinomu představuje kombinaci genetických predispozic se zevními faktory. U takových jedinců je doporučováno pravidelné vyšetření od určitého věku (okultní krev, sigmoidoskopie, kolonoskopie).

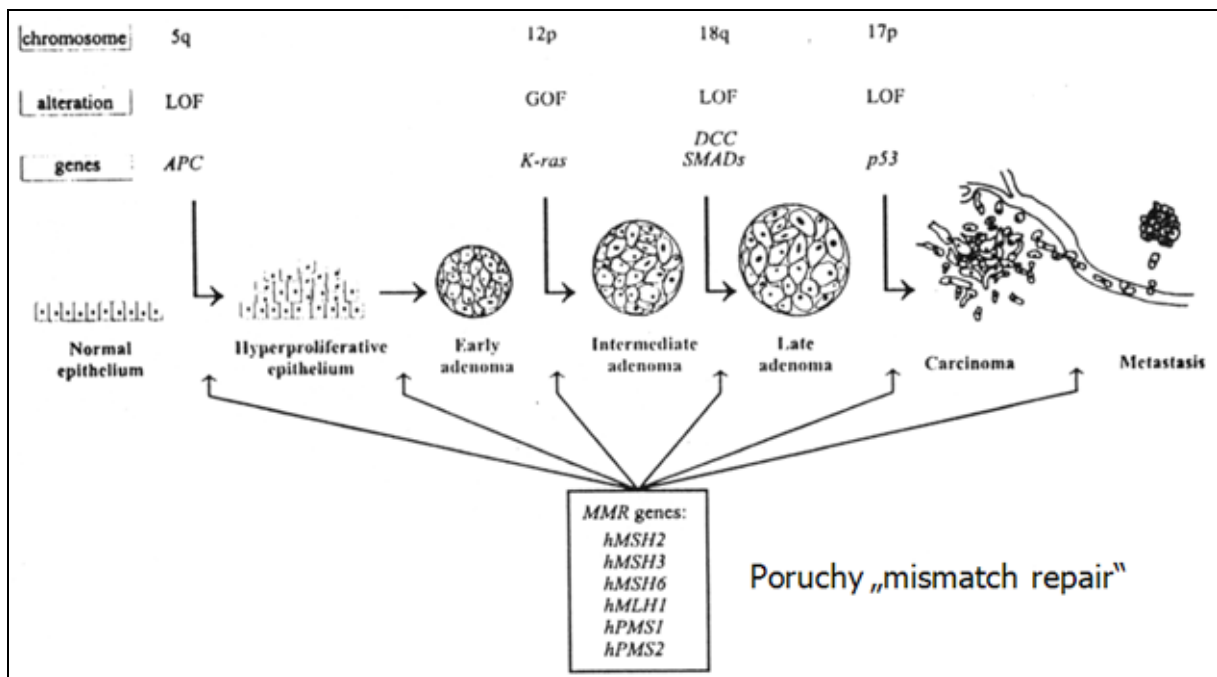
13.4 GENY UPLATŇUJÍCÍ SE V CRC

Při vzniku a rozvoji CRC se uplatňují jak aktivace onkogenů tak inaktivace nádorově supresorových genů či poruchy genů reparace DNA (obr. 13-10). Příklady:

- **Onkogeny** (ras, c-myc, c-myb, hst-1, trk, c-raf, c-src, c-myb, Her2-neu). Geny kódující proteiny H-ras, K-ras, N-ras jsou aktivované přes receptory spojené s G proteiny a s tyrozin kinázami. Aktivace drah kináz RAF, MEK, MAPK se uplatňuje v přechodu z adenomu do karcinomu. C-myc, c-myb jsou tzv. geny rané odpovědi – transkripční faktory odpovědné za transkripci dalších důležitých genů. Her2-neu kóduje receptor

pro epidermální růstový faktor a změny jeho exprese se uplatňují zejména u nádorů prsu.

- **Nádorově supresorové geny.** Gen p53 je mutován nebo deletován u 70–80 % nádorů, což je spojeno zejména s poruchami regulace buněčného cyklu, reparace DNA a apoptózy. Delece či mutace v genu APC je brzký děj u adenomů (80%) a je spojen s deregulací signální dráhy Wnt, chromozomální nestabilitou, chybami ve spojení mikrotubulů a kinetochoru a abnormální segregací chromozómů se vznikem polyploidie. DCC je gen deletovaný gen u 70–80 % nádorů, a hraje úlohu v zástavě G2/M fáze buněčného cyklu a apoptóze.
- **Geny reparace DNA,** které jsou zodpovědné za tzv. „mismatch repair“ (hMSH2, hMLH1)



Obr. 13-10 Genetické změny spojené s kolorektální karcinogenezí. LOF – loss of function; GOF – gain of function.

Existují i další mutace zvyšující náchylnost při působení environmentálních faktorů. Důležitý je proto výzkum interakcí genů a environmentálních faktorů a dalších tzv. modifikujících genů, které mohou dále ovlivňovat účinky jak genů, tak environmentálních faktorů.

Signální dráhy MAPK-ERK zprostředkovávají buněčnou odpověď na řadu mimobuněčných impulsů a jsou zahrnuty v regulaci proliferace, apoptózy, sekrece a diferenciace.

K-ras a B-raf jsou klíčové molekuly v této signální kaskádě, protože mutace vyúsťují ve stálou genovou aktivaci vedoucí k autonomní proliferaci a nádorovému růstu. Gen KRAS náleží

do rodiny RAS onkogenů a kóduje 21kDa protein s GTPázovou aktivitou. Tento protein je regulován cyklem lipidové modifikace (de- a repalmitoylace), která podporuje jeho rychlou výměnu mezi plazmatickou membránou a Golgiho aparátem. Zatímco během karcinogeneze je změněna celá řada genů, počet deregulovaných signálních drah je relativně malý.

Za klíčový mechanismus špatného signálování jsou považovány mutace v genech kódujících APC a TP53 a ztráta heterozygotnosti (LOH).

V posledních letech byly objeveny nové dráhy vzniku sporadických CRC. Molekulární změny se liší od těch provázejících tradiční přechod adenom – karcinom. U tzv. „**serrated lesions**“ jsou mutace APC nebo TP53 a LOH vzácné a převažují hypermetylace CpG ostrůvků a nestabilita mikrosatelitů.

V souhrnu je CRC založena na sekvenci molekulárních dějů v enterocytech zahrnujících genové mutace, epigenetické modifikace a aberantní signálování v základních buněčných drahách. Avšak proliferace, buněčná aktivita a smrt enterocytů i činnost tzv. modifikujících genů závisí na dalších faktorech jako je složení matrix, mikrobiom, chronický zánět, vliv prostředí a složek diety.

13.5 ROZVOJ ADENOM-KARCINOM

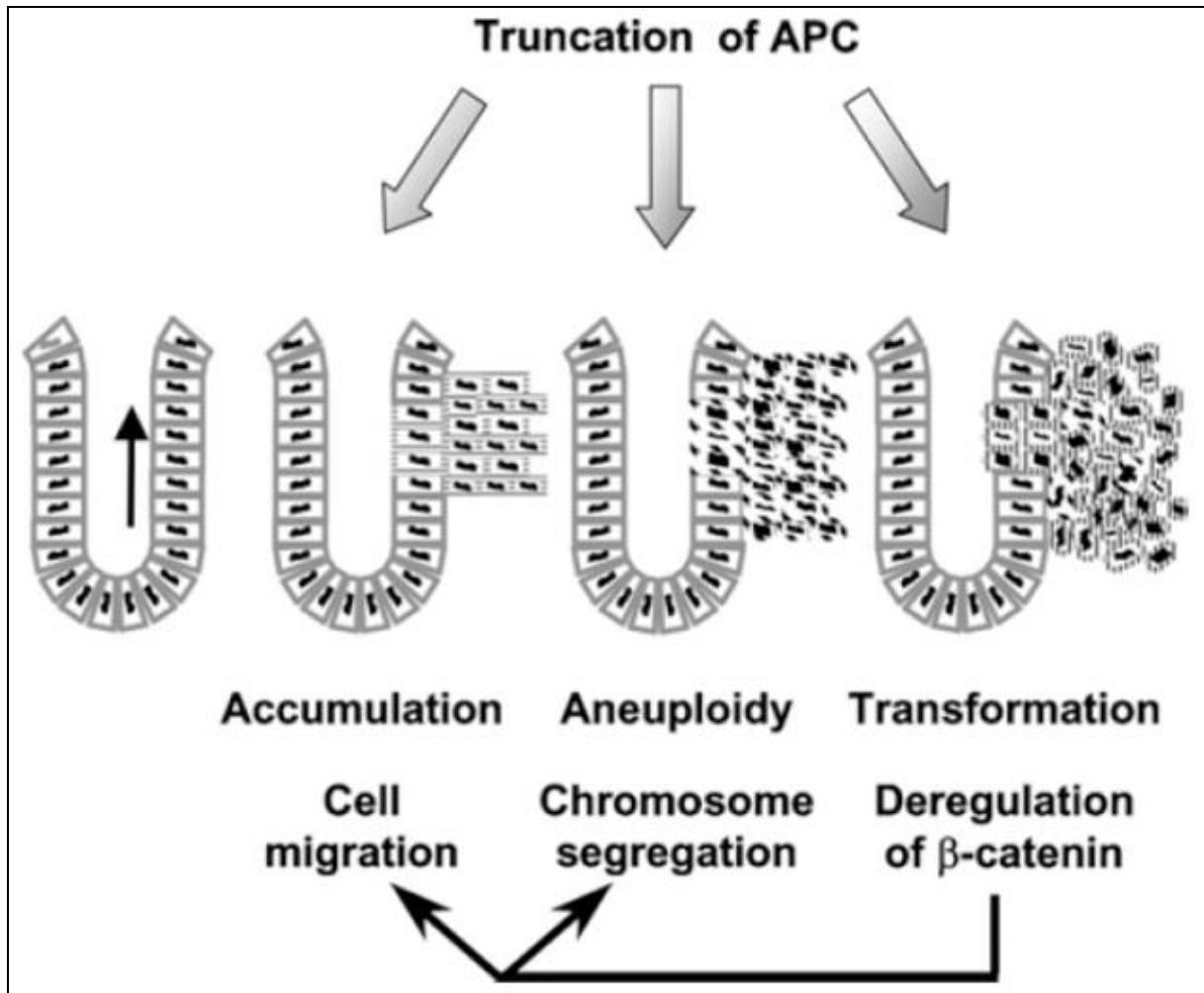
Rozvoj CRC z normální tkáně přes benigní adenom k malignímu adenokarcinomu je dlouhodobý komplexní několikastupňový proces, který není úplně stejný u různých typů CRC. Obecně je v zásadě nutných 4-6 genetických defektů (mutace, deregulace protoonkogenů – K-ras, c-myc a inaktivace nádorových supresorů – APC, p53).

Funkce APC (adenomatous polyposis coli) proteinu

APC je 300kD cytoplazmatický protein kódovaný APC genem a je často mutovaný v prvotních stádiích CRC (u adenomů) (obr. 13-11). APC interaguje s řadou buněčných proteinů a drah a přispívá tak k regulaci diferenciaci, migraci, proliferaci a adhezi. Jeho mutace tak ovlivňuje všechny tyto procesy. Multifunkční protein APC se účastní:

- regulace signálu indukovaného beta-kateninem (regulace Wnt dráhy);
- regulace buněčné adheze prostřednictvím beta-kateninu a E-kadherinu;
- regulace migrace buněk interakcemi s mikrotubuly a F-aktinem;
- zástavy buněčného cyklu zřejmě přímou inhibicí jeho komponent;

- změny cytoskeletu a deregulace beta-keninu, která vede k poruchám diferenciace a genové exprese;
- ovlivnění migrace buněk a mitotického vřetenka vyúsťující v aneuploidii. Zvýšená hladina beta-keninu způsobuje neschopnost vazby APC na mikrotubuly a dochází k deregulaci migrace buněk a segregace chromozómů.



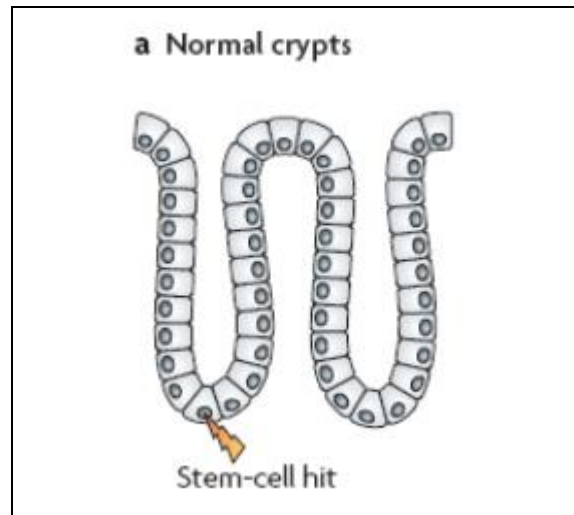
Obr. 13-11 Mutace genu APC (Näthke I, Biochem Soc Transactions 2005 : 694)

Interakce buněk kolonových krypt s látkami vznikajícími v krvi nebo v lumen střeva

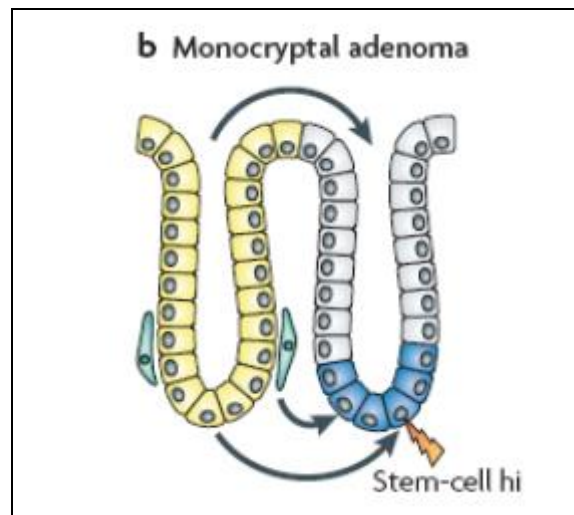
Mutace genu APC v kmenových buňkách může být výsledkem působení látek z krve nebo zárodečné mutace a produkuje abnormality v buněčné proliferaci, migraci a adhezi. Důsledkem je akumulace abnormálních buněk na vrcholu krypt, kde se tvoří **aberantní fokusy (ACF)**, které vyčnívají do proudu stolice. Zvyšuje se tak pravděpodobnost dalších mutací kontaktem proliferujících buněk s fekálními mutageny a postupnou klonální expanzí se tvoří adenomy.

Postup vzniku adenomu je následující (obr. 13-12):

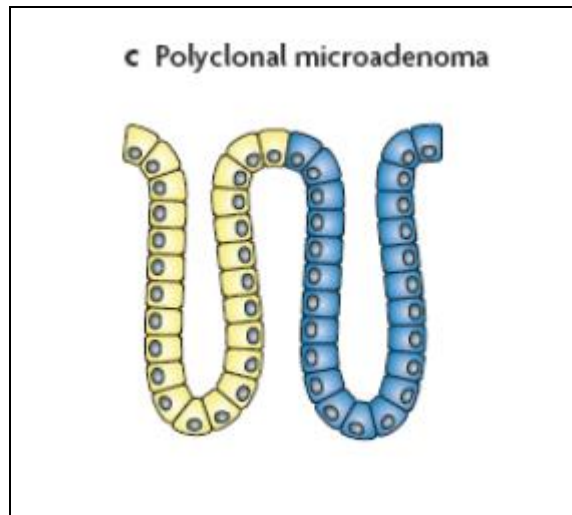
1. Mutace kmenové buňky např. v genu APC;
2. Kolonizace krypty buňkami APC^{-/-} a vznik monokryptálního adenomu;
3. Polyklonalita vzniká v důsledku krátkodobé interakce zřejmě změnou signálování buněk spojených s lamina propria. Dochází k mutaci v přilehlé kryptě;
4. Expanze adenomu;
5. Expanze dominantního klonu vede ke vzniku monoklonálního nádoru.



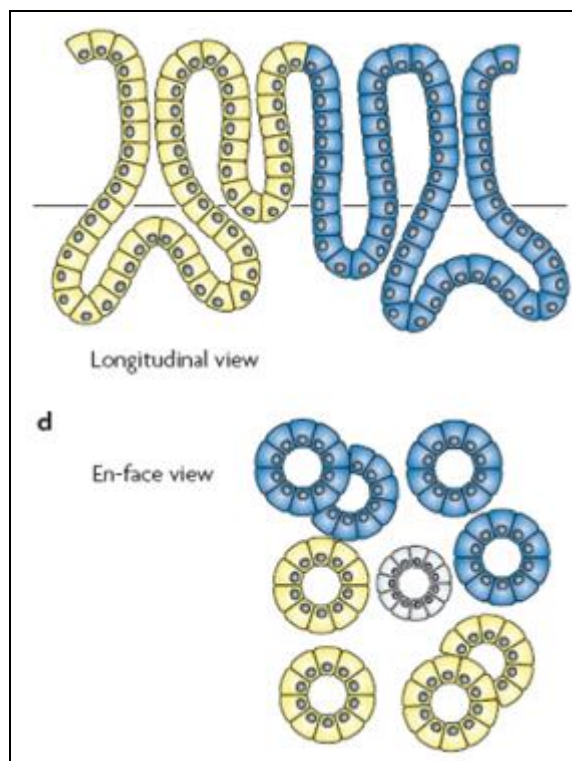
Obr. 13-12a Mutace kmenové buňky např. v genu APC (*Humphries A and Wright NA, Nature Rev Cancer 2008 : 415*)



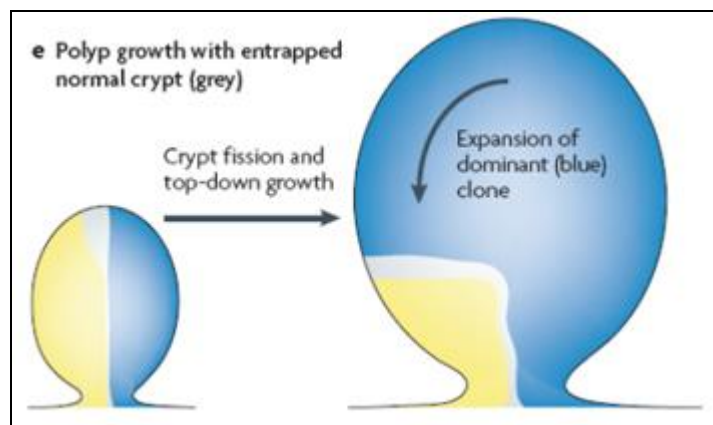
Obr. 13-12b Kolonizace krypty buňkami APC^{-/-} a vznik monokryptálního adenomu



Obr. 13-12c Polyklonalita vzniká v důsledku krátkodobé interakce zřejmě změnou signálování buněk spojených s lamina propria – mutace v přilehlé kryptě



Obr. 13-12d Expanze adenomu



Obr. 13-12e Expanze dominantního klonu vede ke vzniku monoklonálního nádoru

13.6 EPIGENETIKA A NEGENOTOXICKÉ FAKTORY V CRC

Vznik sporadických forem CRC je často spojen s epigenetickými změnami, které způsobují zvýšenou expresi onkogenů nebo inhibici exprese nádorově supresorových genů. Jedná se hypo- nebo hypermetylace promotorů pro tyto geny. Hypometylace je obecný a raný děj odpovědný např. za overexpresi KRAS. Naopak hypermetylace vede k inaktivaci nádorově supresorových genů (např. APC).

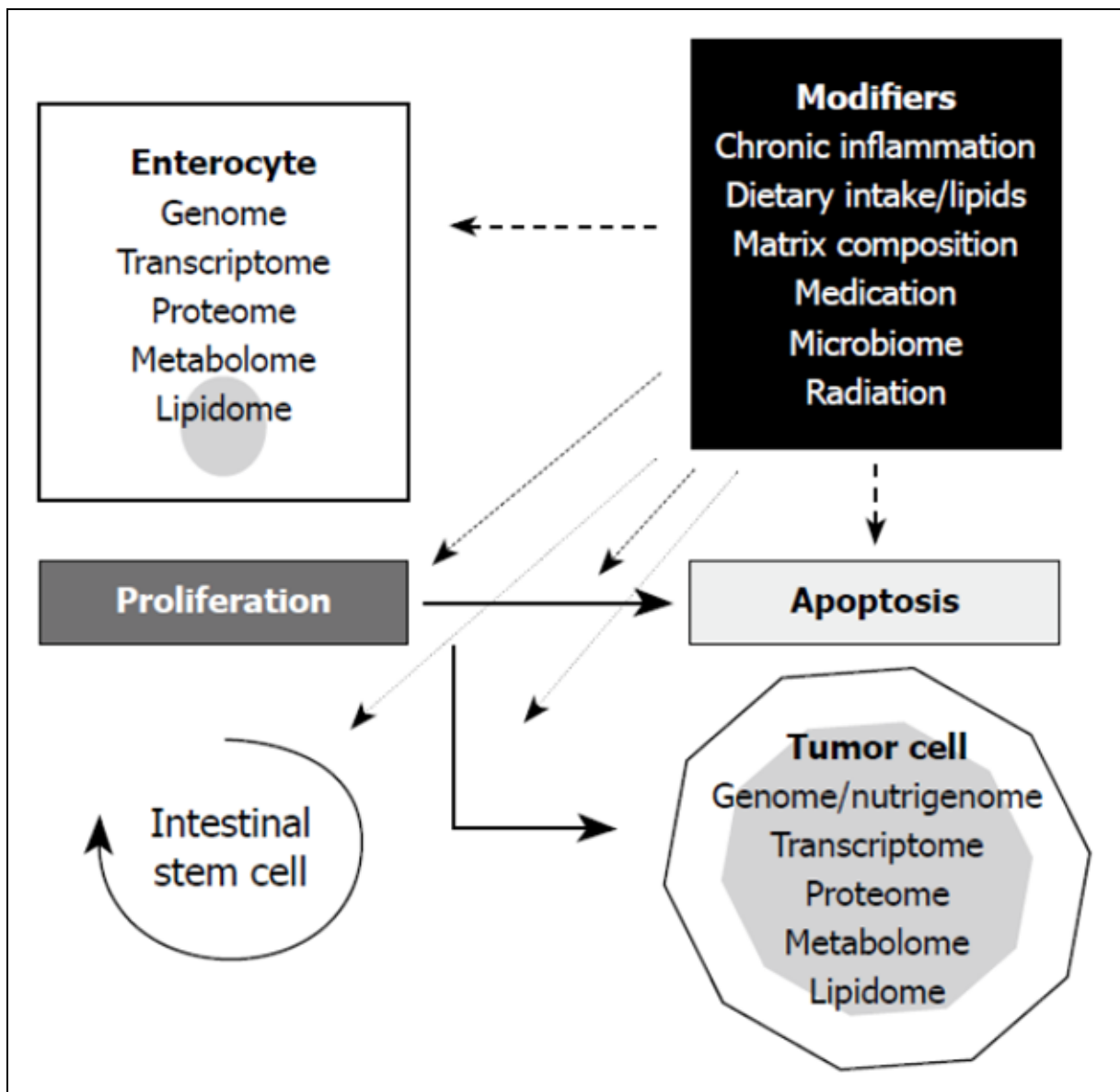
Mutace genů MLH1 a MLH2 účastnících se reparace DNA (fungujících jako „caretakers“ nebo kontrolujících stabilitu genomu) jsou velmi časté u hereditárních forem a predisponují jedince i k jiným typům jako jsou nádory endometria, žaludku či vaječníků. Oba geny kódují složky aparátu pro „mismatch repair“ a jejich inaktivace vede k nestabilitě mikrosatelitů.

Tyto geny jsou však často metylovány u sporadických forem CRC (epimutace), což vede k podobným projevům jako u dědičných forem CRC. Epimutace nemusí být omezeny jen na jednotlivý typ genů. Metylace je silně spojena s nádory vykazujícími tzv. CIMP fenotyp (CpG island methylator phenotype). Tyto nádory často vznikají ve vstředním kolonu u starších žen. Fenotyp s mnoha metylovanými promotory vykazuje odlišné klinicko-patologické vlastnosti a CIMP pozitivita je charakteristická pro hyperplastické polypy a „serrated“ adenomy. Pro tyto poruchy je charakteristická i zvýšená metylace v normální mukóze proximálního kolonu.

Epimutace per se se nedědí přes zárodečné linie, ale mohou být výsledkem dědičných genetických aberací predisponujícím k epimutaci.

Řada faktorů (chronický zánět, výživa - lipidy, složení matrix, medikace, bakterie, záření) ovlivňuje základní molekulární dráhy a tím i délku života, proliferaci a apoptózu enterocytů. Tyto dráhy a molekulární entity (genom, transkriptom atd.) určující chování buněk jsou vysta-

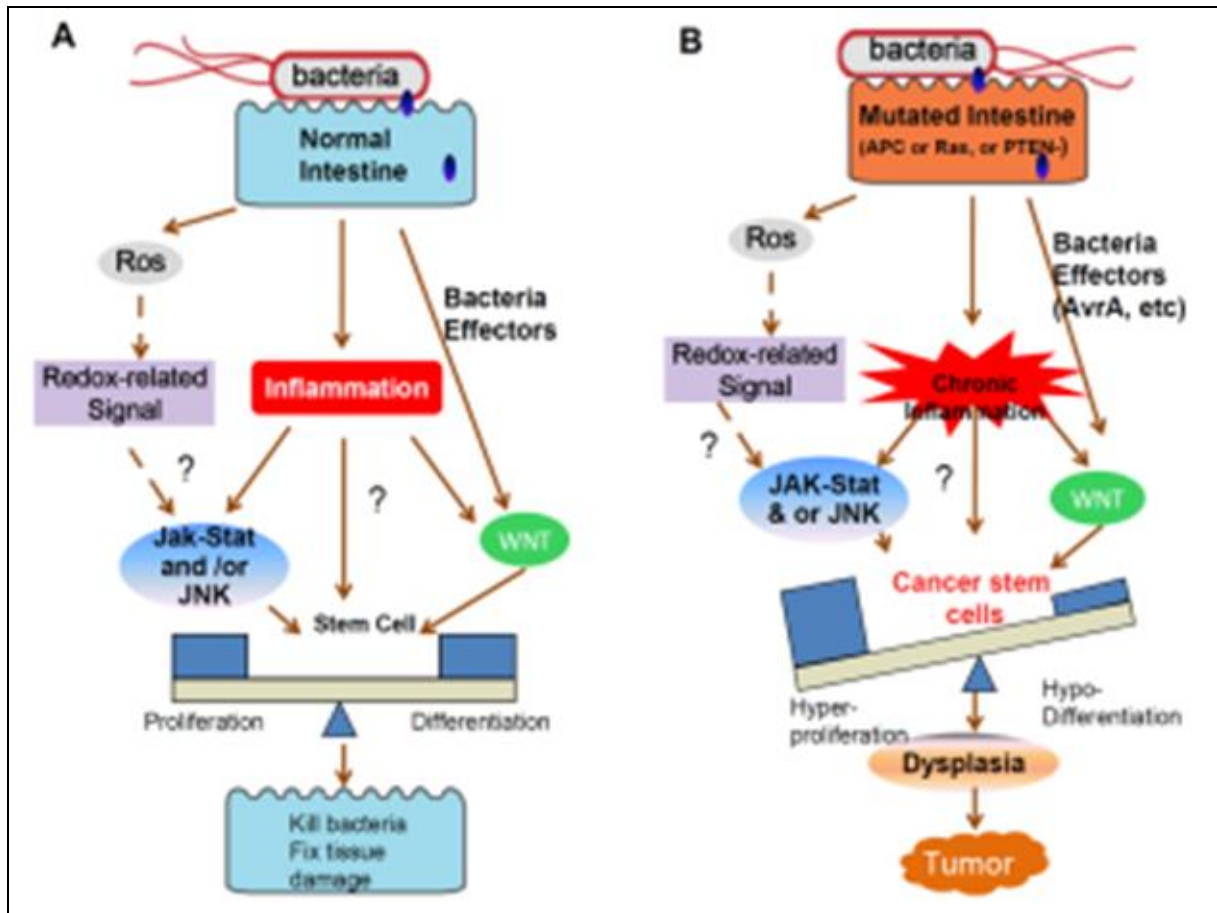
veny buněčnému stresu a fungují jako modifikátory. Podobně jsou ovlivňovány i střevní kme- nové buňky. Aberantní modifikace hraje v rozvoji CRC důležitou úlohu (obr 13-13).



Obr. 13-13 Modifikátory kolorektální karcinogeneze (Gassler N. et al. *World J Gastroenterol* 2010 : 1820)

Důležitým modifikátorem v patogenezi CRC byl identifikován v posledních 10 letech **mikrobiom**, tedy vysoce dynamická komunita mikroorganismů na povrchu střevní mukózy. *Interakce střevních buněk s mikrobiomem má dopad na metabolom a lipidom, maturaci a proliferaci střevních buněk podél krypty, tkáňovou homeostázu a hraje úlohu v řadě onemocnění.* Střevní bakterie a jejich produkty (např. efektorový protein AvrA) indukují ROS a zánět vedoucí k aktivaci signálních drah JAK-STAT, JNK a Wnt. Tyto dráhy udržují homeostázu mechanismy regulujícími apoptózu enterocytů a nahrazování poškozené tkáně proliferací kme-

nových buněk a diferenciací. Tyto procesy jsou ve zdravé tkáni v rovnováze. Ve střevě obsahujícím mutované buňky (mutace APC, Ras, PTEN) indukují bakterie chronický zánět a aktivaci Wnt a JAK-STAT dráhy vyúsťující ve zvýšený počet kmenových buněk. Nekontrolovaný zánět a hyperproliferaace vedou k dysplazii a případně k vývoji nádoru (obr. 13-14).



Obr. 13-14 Bakteriální regulace kmenových buněk a tvorby nádorů ve střevě. (Sun J., *Cancers* 2011 : 285)

Ve všech stádiích rozvoje karcinomu se mohou uplatňovat **bioaktivní složky potravy**. Mohou jak brzdit tak stimulovat progresi jednotlivých stádií. Název **nutrigenom** nádorových buněk odráží modifikaci genomu maligních buněk složkami diety a expresi tzv. modifikátorových genů.

Příjem dietetických složek ovlivňujících metylační metabolismus jako je folát, methionine, cholin, vitamin B12 (obsažené zejména v zelené listové zelenině) může modifikovat metylační strukturu. Folát udržuje stabilitu genomu regulací biosyntézy DNA, reparace a metylace. Deficience folátu pak indukuje a urychluje karcinogenezi. Environmentální vlivy na počátku vývoje mohou predisponovat jedince k nádorům i jiným chorobám právě modifikací epigenomu.

Jedním z modifikujících genů odhalených u APC myši je gen kódující sekretorickou fosfolipázu A2 (sPLA2). Aktivita enzymu je spojena s různými funkcemi včetně trávení, kontrakce hladkého svalstva a buněčnou proliferací. Navíc se uplatňuje v zánětlivých podmínkách a je zvyšována prozánětlivými cytokiny, např. TNF a IL-1. Byl identifikován PLA2 receptor jako nový nádorově supresorový gen zásadní pro buněčnou senescenci přes aktivaci dráhy p53.

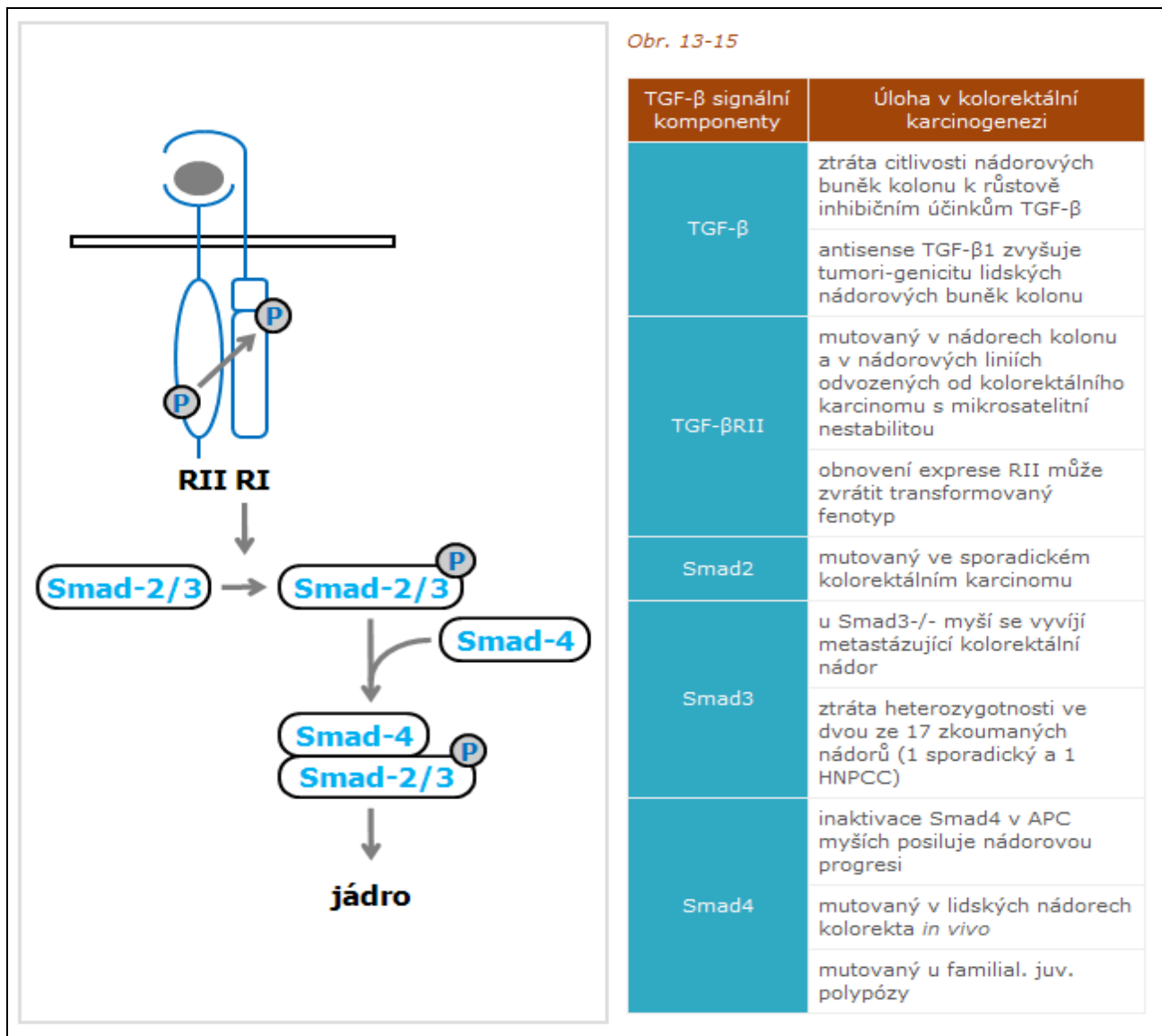
Kromě genů fungujících jako modifikátory v CRC je důležitým faktorem modifikujícím chování epiteliálních buněk a intestinální karcinogenezi rovněž ECM. Různorodost složení matrix je výsledkem složité směsi neepiteliálních buněk uchycených v adaptované síti mimobuněčných lamelárních a nelamelárních molekul. Kromě toho fungují jako důležité modifikátory intestinální patogeneze různé typy sekretovaných produktů jako jsou muciny a další glykoproteiny jako součást nebuněčných složek matrix.

Mucin 2 je exprimován gobletovými buňkami, patří k nejvíce sekretovaným mucinům a je důležitý pro intestinální homeostázu. Narušená exprese nebo sekrece mucinů koreluje se vznikem zánětu a kolorektální karcinogenezi. V současné době byla detekována interakce Muc2 a APC vyúsťující v modifikaci Wnt signálování.

13.7 ÚLOHA CYTOKINŮ A SPECIFICKÝCH SIGNÁLNÍCH DRAH

V kolorektální karcinogenezi se uplatňují různé endogenní faktory, jejichž deregulace přispívá k rozvoji nádoru. *Důležitými mediátory chronického zánětu a modifikátory vzniků střevních nádorů jsou např. cytokiny. Jejich zdrojem ve střevě jsou zejména lymfocyty. Současná epidemiologická data ukazují na vysokou incidenci CRC u pacientů s chronickým zánětem střeva, který je spojen s poruchami ve složení nebuněčných složek matrix.*

Důležité jsou cytokiny z rodiny transformujícího růstového faktoru (TGF α , TGF β). *TGF β funguje jako negativní růstový faktor epiteliálních buněk. Aktivuje specifické receptory TGF β RI a RII a přes kaskádu signálních proteinů rodiny SMAD 2-4. Zastavuje buňky v G1 fázi a inaktivační mutace této signální dráhy vede k poruchám apoptózy a k progresi adenomkarcinom (obr. 13-15).*



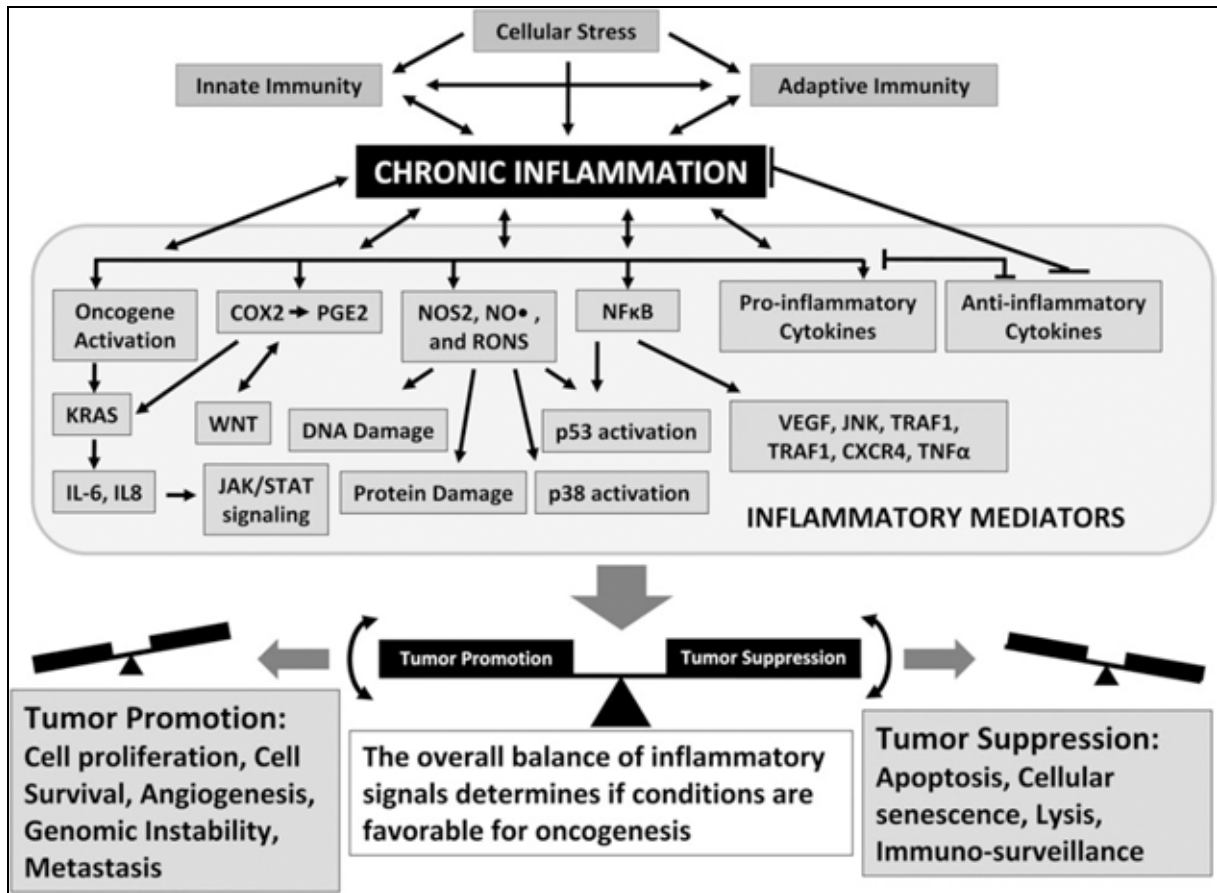
Obr. 13-15

TGF-β RII receptor je mutovaný v nádorech kolonu a v nádorových liniích odvozených od kolorektálního karcinomu s mikrosatelitní nestabilitou. Obnovení exprese RII může zvrátit transformovaný fenotyp TGFβ, který vede ke ztrátě citlivosti nádorových buněk kolonu k růstově inhibičním účinkům

TGFα sdílí společný receptor s epidermálním růstovým faktorem (EGF) a oba typy podporují proliferaci buněk.

Významnou úlohu ve vývoji CRC sehrává **zánětlivé onemocnění střeva (IBD)**. V prostředí chronického zánětu dochází k *nadprodukcí zánětlivých cytokinů* – TNF-α, interleukinů (IL-1,

-6, -8) a dalších mediátorů (např. prostaglandinů) i k nadprodukcii kyslíkových a dusíkových reaktivních metabolitů. Tyto faktory mohou vést buď přímo k poškození DNA, nebo působí negenotoxickými mechanizmy vedoucími k inhibici apoptózy, k podpoře angiogeneze a invaze. Dochází k aktivaci specifických signálních drah a transkripčních faktorů, např. PI3K/Akt dráha či transkripční faktor NFκB (obr. 13-16).



Obr. 13-16 Úloha zánětu v karcinogenezi (Schetter AJ et al., *Carcinogenesis* 2010 : 37)

Významnou rodinou cytokinů je rodina TNF zastoupená TNF-α, Fas ligand, TRAIL – TNF related apoptosis- inducing ligand.

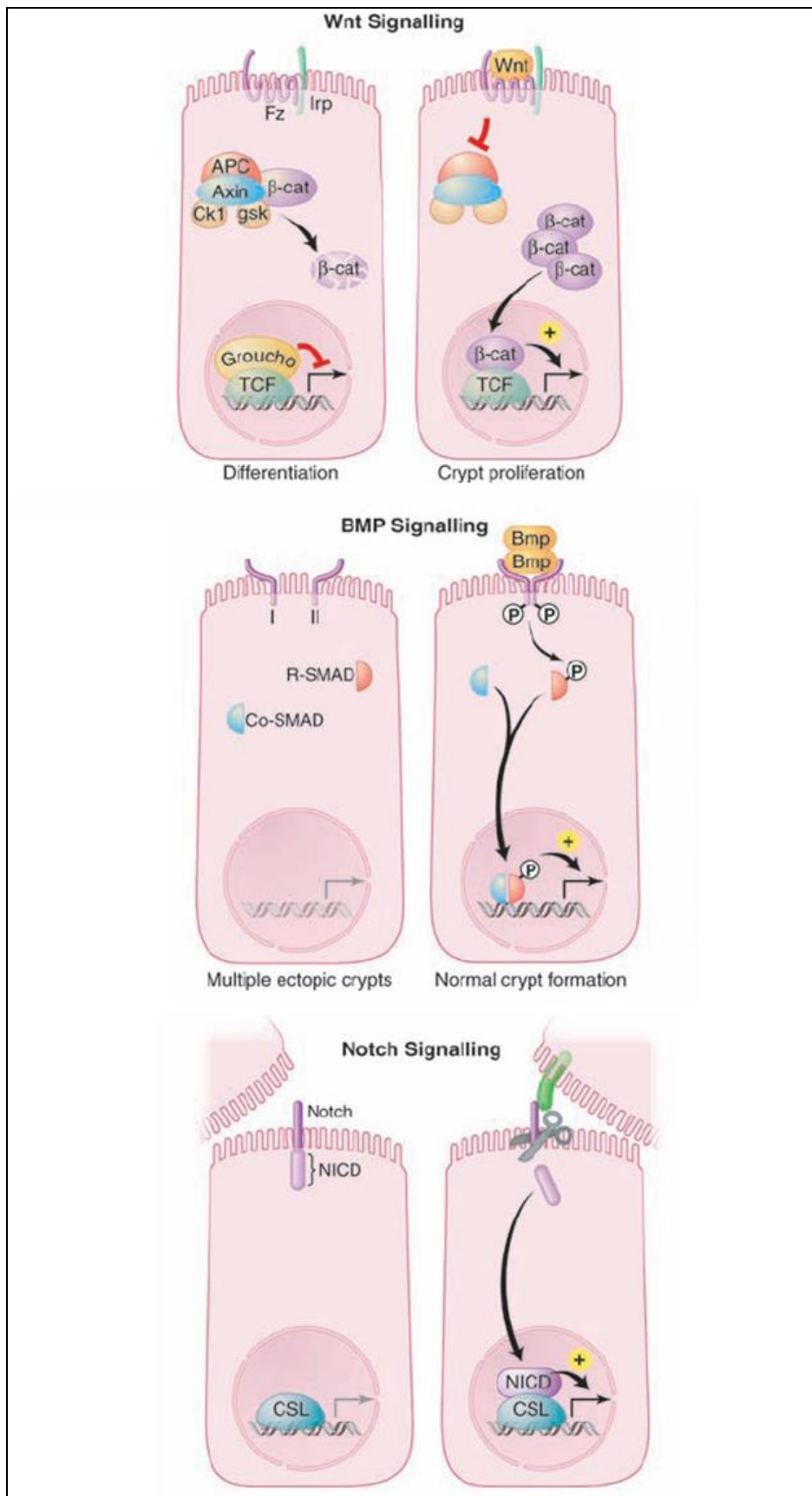
TNF-α je

- multifunkční cytokin
- jeden z hlavních mediátorů zánětu
- produkován makrofágy a dalšími buňkami imunitního systému

Koncentrace TNF-α v kolonu je zvýšena během chronického zánětu (ulcerativní kolitida nebo Crohnova choroba) a hraje úlohu v nádorové kachexii.

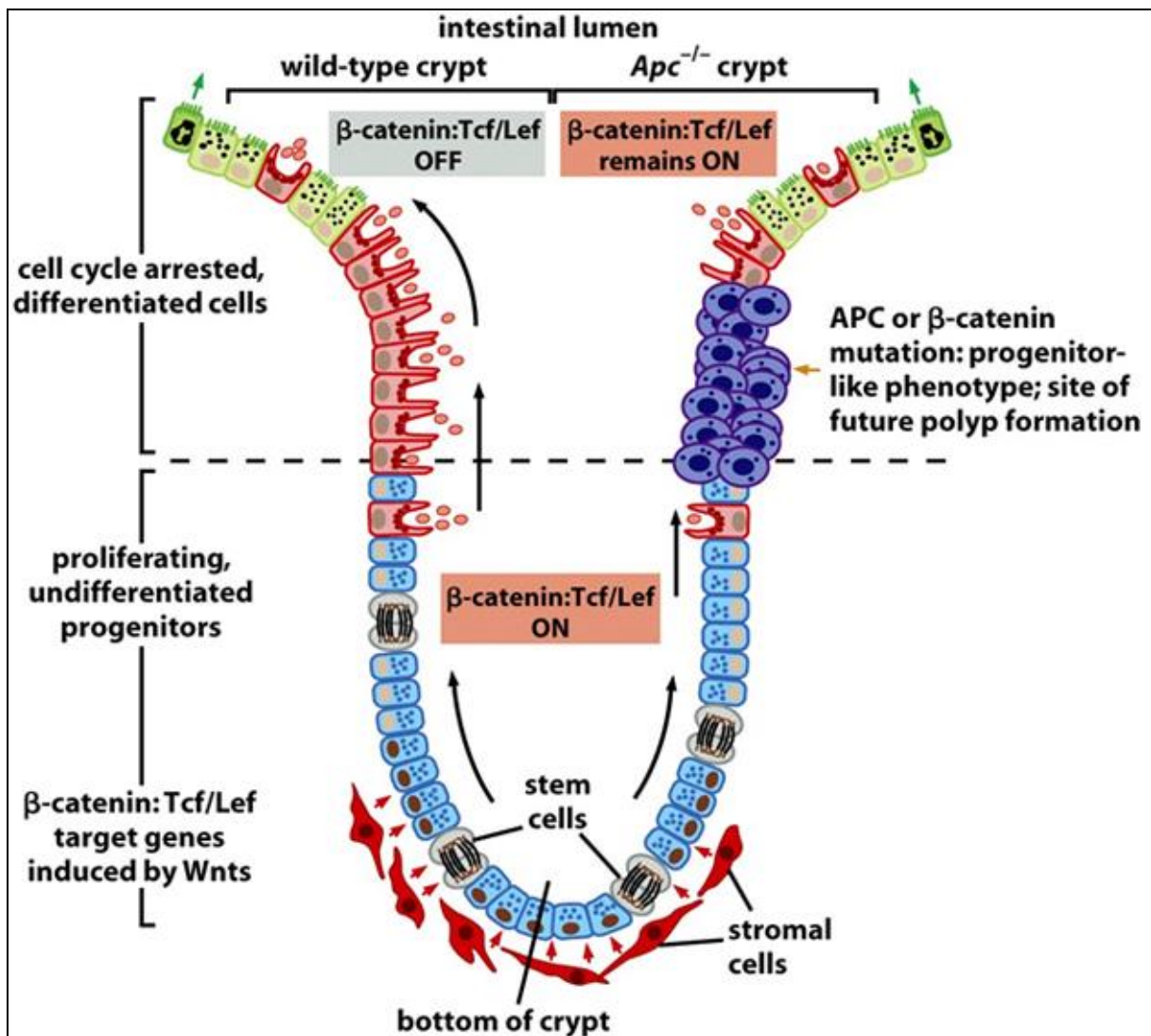
Důležitý je poznatek, že mezi cytokiny a dietetickými faktory (mastné kyseliny a eikosanoidy) existuje vzájemná interakce. Tak produkce zánětlivých cytokinů podporuje produkci např. prostaglandinů a naopak.

Signální dráhy Wnt, BMP a Notch *kontrolují transkripci specifických cílových genů a jsou často deregulovány u CRC (obr. 13-17). Tyto dráhy jsou ovlivňovány řadou vnitřních i vnějších faktorů.*

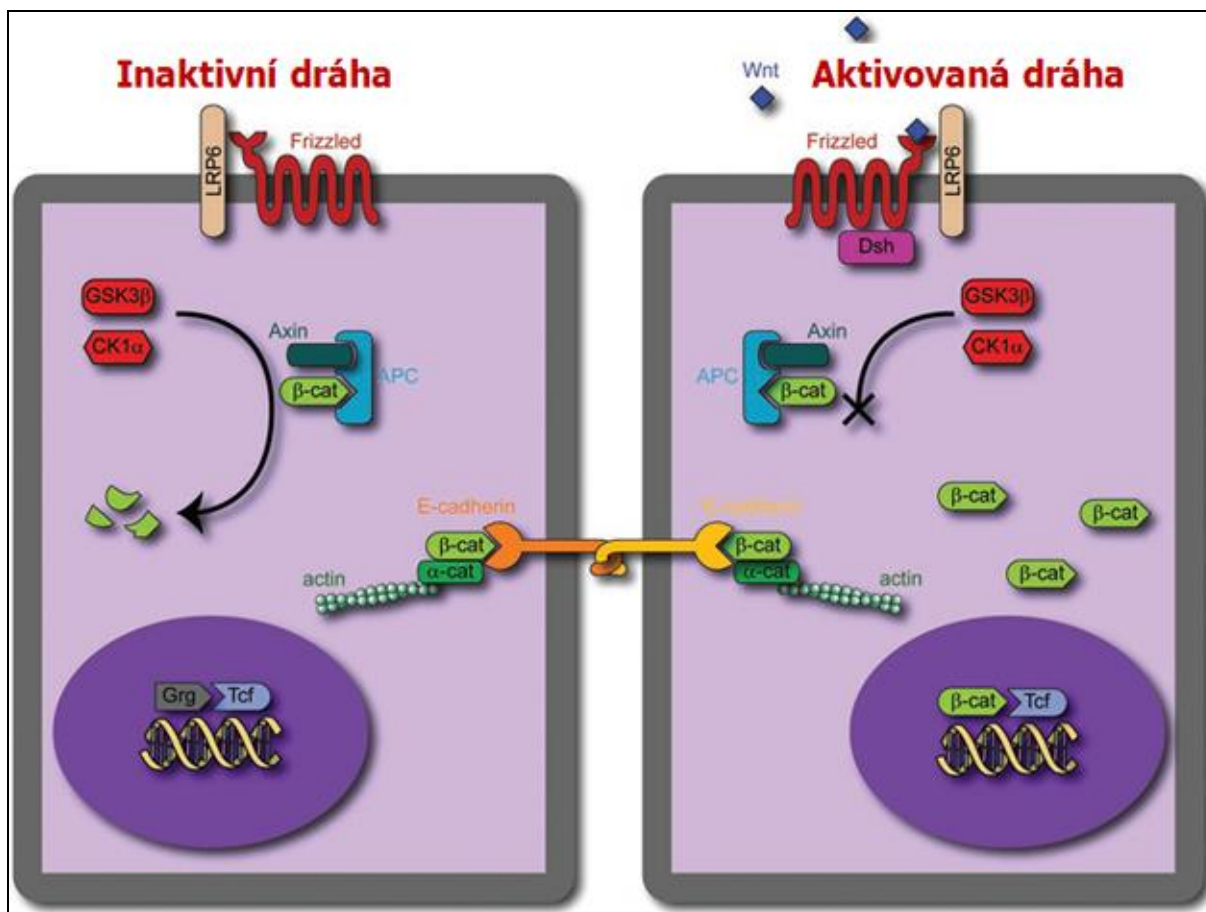


Obr. 13-17 Regule (deregule) transkripčních faktorů u střevních buněk (Radtke F. and Clevers H., *Science* 2005 : 1904)

Buňky citlivé k Wnt nesou transmembránové receptory Frizzled (Fz) a Lrp5 a Lrp6 (low density lipoprotein receptor – related protein). Při absenci sekretovaného faktoru Wnt destrukční komplex sestávající z APC, axinu a kináz CK1 a GSK3 beta indukuje degradaci cytoplasmatického beta-keninu. Transkripční faktor Tcf spojený s korepresorem reprimuje cílové geny specifické pro Wnt. Aktivace Fz receptoru blokuje destrukční komplex, dochází k akumulaci beta-keninu, translokaci do jádra, aktivaci Tcf a Wnt cílových genů (obr. 13-18 a 13-19).



Obr. 13-18 Fungování signální dráhy beta katenin – Tcf/Lef v normální a *Apc*^{-/-} kryptě (Figure 7.24a. Weinberg R.A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))



Obr. 13-19 Schéma Wnt/beta kateninové dráhy (*Timp W. et al., Cell Cycle 2009 : 383*)

Dráha BMP není aktivována při absenci signálu sekretovaným faktorem BMP. Sekretovaný faktor BMP propojí BMP receptor I a II, což vede k fosforylaci proteinu R-SMAD, spojení se SMAD, translokaci do jádra a aktivaci BMP cílových genů.

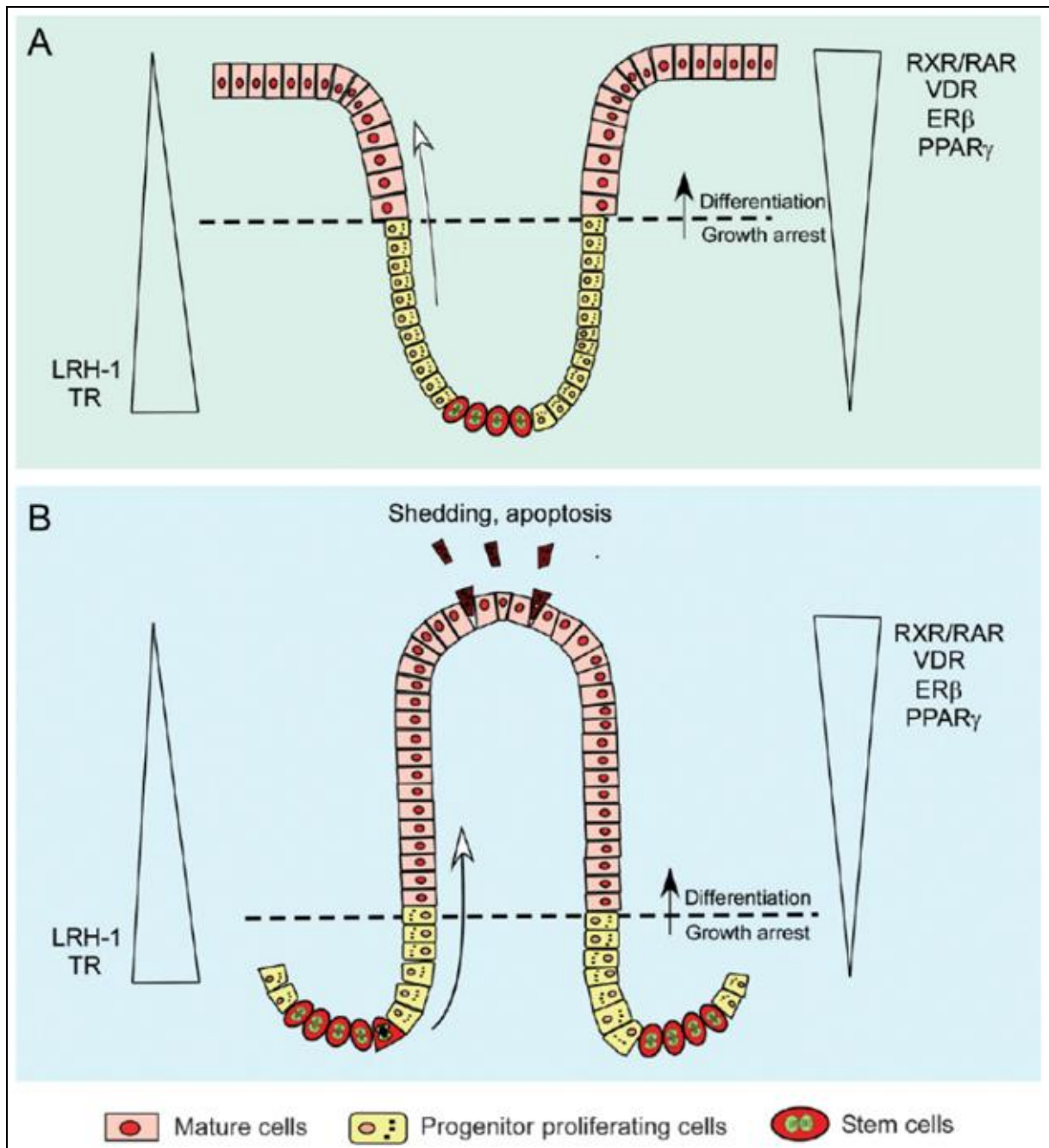
Dráha Notch je aktivována vazbou Notch receptoru na ligand vázaný k buňce. Následný proteolytický krok vede k uvolnění vnitrobuněčné domény NICD, která putuje do jádra, váže se s transkripčním faktorem NCL a aktivuje transkripci Notch cílových genů.

Jaderné transkripční faktory

K rozvoji CRC přispívají rovněž změny aktivace různých cytoplazmatických i jaderných receptorů - transkripčních faktorů. Hladina těchto receptorů kolísá v různých kompartmentech tlustého střeva a mění se i v průběhu vývoje CRC (obr. 13-20). Tyto vnitrobuněčné receptory mohou být aktivovány různými faktory a podněty (endogenními i exogenními) a po navázání na příslušné elementy DNA ovlivňují genovou expresi (obr. 13-21). Patří nim:

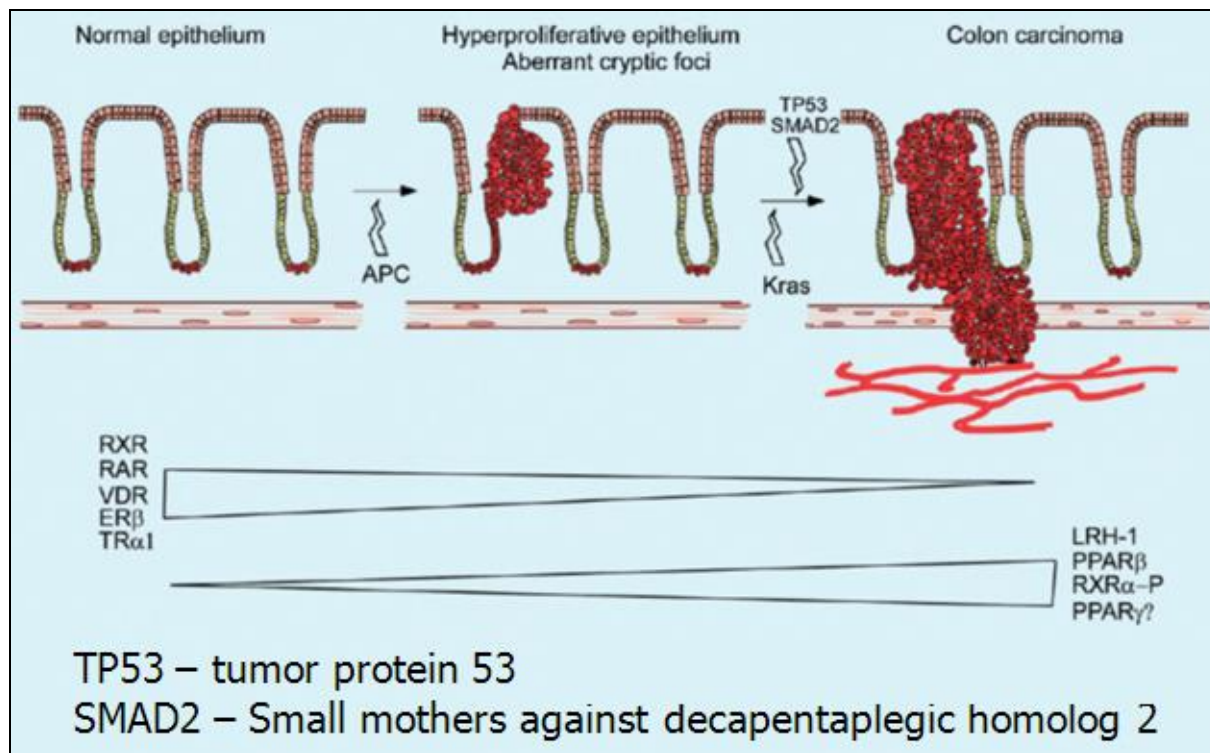
- *Jaderný transkripční faktor NFκB*
- *Receptory pro peroxizómové proliferátory – PPAR (α, β/δ, γ)*

- Liver receptor homology LRH-1
- Retinoidní receptory RXR/RAR
- Receptor pro vitamin D (VDR)
- Receptor pro tyroidní hormon (TR)
- Estrogenní receptor (ER)



Obr. 13-20 Hladina jaderných receptorů v různých kompartmentech tlustého (A) a tenkého střeva (B)
 LRH-1 – liver receptor homology
 TR – thyroid hormone receptor
 RXR/RAR – retinoid x receptor/retinoid acid receptor

VDR – vitamin D receptor
 ER – estrogen receptor
 PPAR – peroxisome proliferator-activated receptor
 Receptory tvoří homo- nebo heterodimery (např. PPAR-RXR)
 (D'Errico I and Moschetta A., Mol Cell Life Sci 2008)



Obr. 13-21 Vývoj nádorů kolonu a exprese jaderných receptorů

TP53 – tumor protein 53
 SMAD2 – Small mothers against decapentaplegic homolog 2
 (D'Errico I and Moschetta A., Mol Cell Life Sci 2008 : 1523)

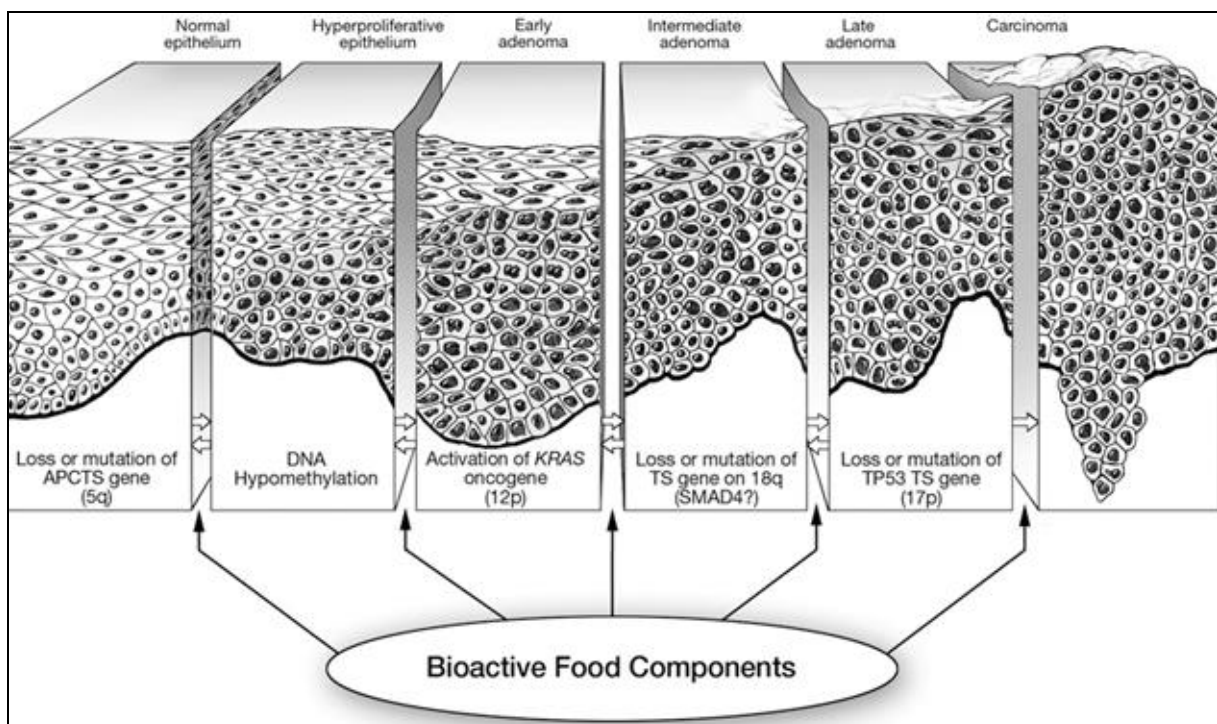
13.8 FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ

Kromě genetické složky je rozvoj CRC ovlivňován **vnějšími faktory** - životním prostředím a životním stylem. Sporadická forma nádorů kolonu je nedědičná a postupně se vyvíjí řadu (desítky let). Výsledky epidemiologických studií však nejsou jednoznačné, protože je velmi obtížné standardizovat všechny parametry. Nicméně z různých studií vyplývají např. škodlivé účinky vysoké spotřeby červeného masa, zvláště silně opékaného, alkoholu a kouření spolu s nízkou konzumací vlákniny, folátu a metioninu. Protektivní působení je uváděno u zeleniny, ovoce, vlákniny, vitamínu D, kalcia a látek typu nesteroidních antiflogistik (NSAIDs).

Mezi vnější faktory patří i **výživa**, která nás ovlivňuje denně a dlouhodobě (obr. 13-22). Podíl diety na rozvoji CRC je stále diskutován, nicméně je zřejmé, že význam má

- celkový kalorický příjem a frekvence příjmu potravy

- obsah a kvalita tuků v potravě (působení žlučových kyselin, obsah a kvalita nasycených a nenasycených tuků spojených např. s lipidovou peroxidací či zvýšenou tvorbou prostaglandinů)
- ochranný vliv vlákniny (zajišťuje vazbu karcinogenů, zkrácení doby tranzitu střevem, snížení pH)
- obsah vitaminů a další mikrokomponent (vit. A, C a E a selen jsou antioxidanty)
- konzumace alkoholu a kávy
- kouření (hlavně doutníky a dýmky)
- přítomnost potravinových mutagenů (zejména heterocyklických aminů vznikajících ve vařeném a pečeném masu a tucích)
- konzumace masa a vajec (vysoká konzumace červeného masa může být riziková (vepřové, hovězí)



Obr. 13-22 Bioaktivní složky potravy

Ve všech stádiích rozvoje karcinomu se mohou uplatňovat bioaktivní složky potravy. Mohou jak brzdit tak stimulovat progresi jednotlivých stádií. (Tammariello AE. and Milner JA. *J Nutr Biochem*, 2010 : 77)

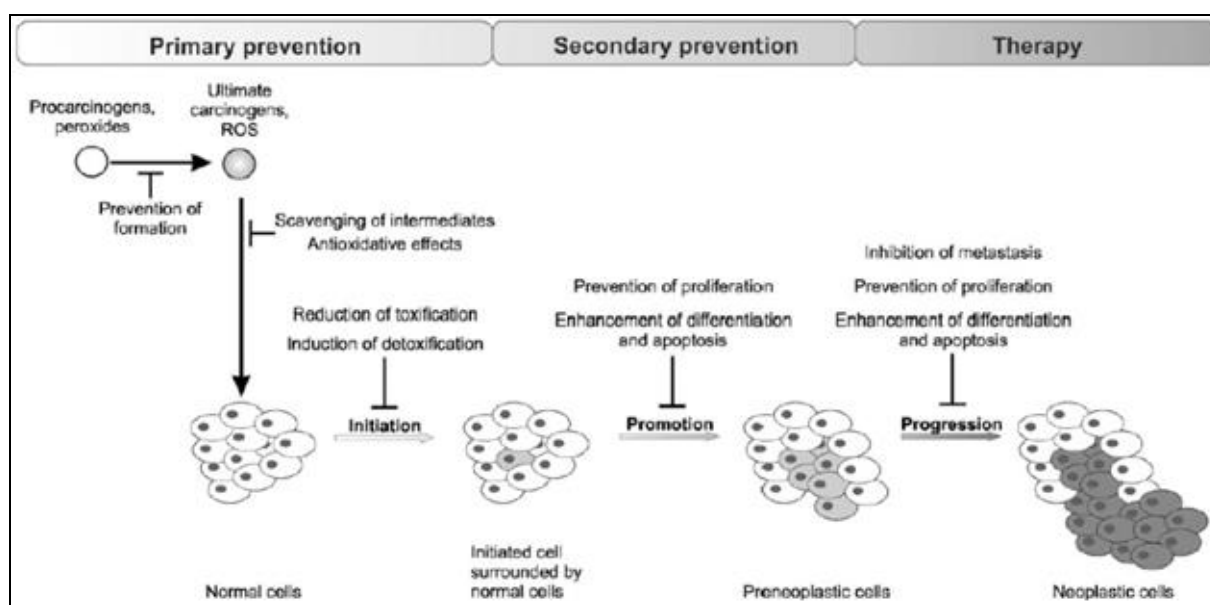
Rizikovým faktorem u CRC je také **nedostatek fyzické aktivity**, která může modifikovat metabolismus a podporovat účinky diety s vysokým obsahem tuků.

Úlohu mohou hrát rovněž **profesionální faktory**, které mohou být zdrojem látek zvyšujících riziko nádorů kolorekta (zejména kovoprůmysl, automobilový a dřevařský průmysl). Charak-

teristickým rysem CRC je **narůstající výskyt s přibývajícím věkem** (pokud nejde o dědičné formy). Svou roli může hrát rovněž **oslabený a neefektivní imunitní systém**.

Chemoprevence

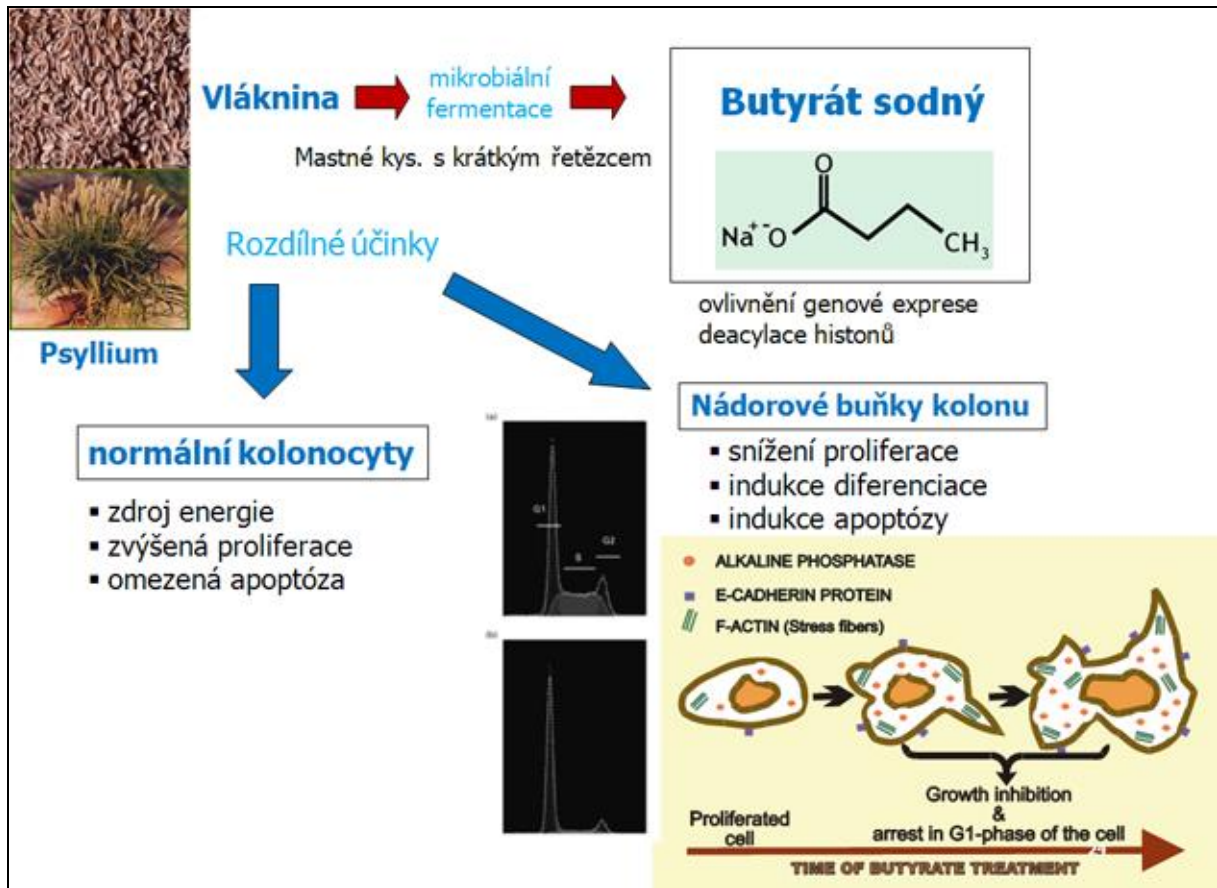
Existuje řada faktorů a látek, které mohou rozvoj CRC brzdit, tj. působí chemopreventivně, buď ve stadiu iniciace či promoce. Patří k nim rovněž složky potravy, jako jsou antioxidanty; vápník; selen; folát, atd. Primární prevence brzdí iniciaci buněk snížením toxicity nebo indukci detoxifikace. Sekundární prevence redukuje promoci iniciovaných buněk do preneoplastických inhibicí proliferace či indukci diferenciaci nebo apoptózy. Účelem terapie je pak omezení progresu preneoplastických buněk do neoplastické populace (obr. 13-23).



Obr. 13-23 Různé fáze chemoprevence (Scharlau D. et al., *Mutat Res* 2009 : 39)

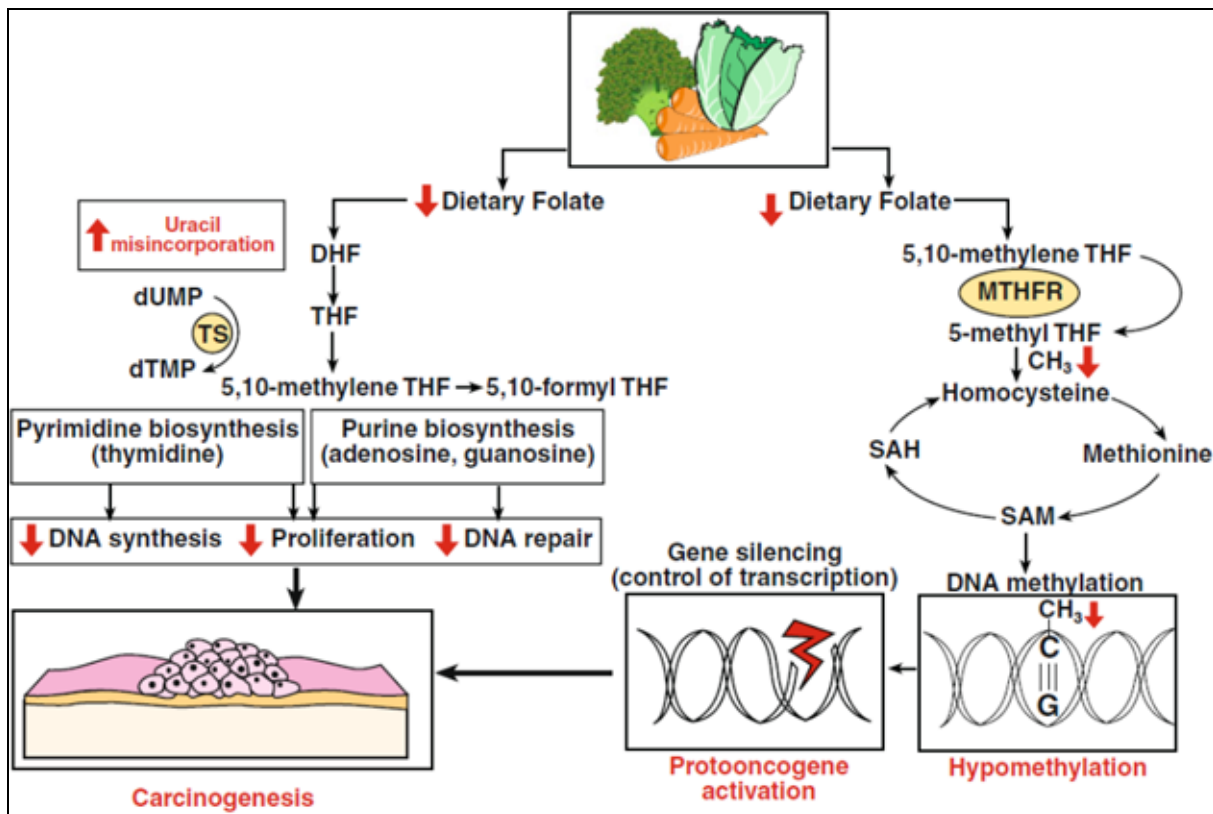
Důležitou skupinu chemopreventivních látek představují **mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA)**. Jsou to organické mastné kyseliny s 2-5C (acetát, propionát, butyrát), které vznikají bakteriální anaerobní fermentací vlákniny a účastní se regulace funkcí a cytokinetiky v kolonu.

Nejvýznamnější je **butyrát** důležitý pro udržení homeostázy ve střevní tkáni regulací exprese genů spojených s proliferací, diferenciací a apoptózou. Microarray analýza prokázala změny exprese až 19 400 genů. *Butyrát funguje také jako inhibitor histon deacetyláz (HDAC)*, což je skupina látek potenciálně využitelných v protinádorové terapii, protože ovlivňují expresi řady důležitých genů. *Butyrát slouží jako zdroj energie pro normální kolonocyty, ale brzdí proliferaci a indukuje diferenciaci a apoptózu neoplastických kolonocytů in vitro a in vivo* (obr. 13-24).



Obr. 13-24 Butyrát slouží jako zdroj energie pro normální kolonocyty, ale brzdí proliferaci a indukuje diferenciaci a apoptózu neoplastických kolonocytů in vitro a in vivo.

Folát, jehož zdrojem je zelenina může ovlivňovat syntézu, reparaci a metylaci DNA (obr 13-25).



Obr. 13-25 Příznivé účinky folátu na syntézu a reparaci poškození DNA a ovlivnění metylace (Duthie SJ., *J Inherit Metab Dis* 2010 : 101)

Důležitou skupinou chemopreventivních látek jsou tzv. **nesteroidní protizánětlivé látky (NSAIDs)**. Ty fungují jako inhibitory metabolismu kyseliny arachidonové a brzdí tvorbu zánětlivých a imunosupresivních metabolitů (prostaglandinů, leukotrienů) – viz dále. Mohou být účinné pro zastavení rozvoje polypózy do adenomů a adenokarcinomů.

13.9 ÚLOHA LIPIDŮ, MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH METABOLIZMU

Důležitou roli v rozvoji CRC hrají i lipidy a jejich metabolismus. Proto je pozornost věnována konzumaci a účinkům různých typů lipidů v dietě a souvislostem s rozvojem CRC. Důležitá je nejen kvantita, ale také skladba mastných kyselin (MK) i exprese a aktivita enzymů metabolizujících lipidy.

Bioaktivní složky diety obsahující esenciální polynenasycené MK (PUFAs) s nenasycenými dvojnými vazbami mohou modulovat důležité děje spojující zánět s rozvojem a progresí nádorů.

Ve střevě byla identifikována celá řada specifických receptorů pro mastné kyseliny lišících se dle délky řetězce dané kyseliny, u nichž se předpokládá, že mohou být spojeny s transformací buněk a vznikem nádorů.

MK s dlouhým řetězcem vykazují řadu aktivit ovlivňujících buněčný cyklus a apoptózu. *Jsou důležitou součástí fosfolipidů buněčných membrán* a mohou tak modulovat strukturu i vlastnosti těchto membrán a tak i příjem a přenos důležitých signálů z vnějšího prostředí do buněk. Kromě toho je za základní mechanismus modifikačních aktivit MK na řadu signálních kaskád a receptorových struktur považována lipidace proteinů. Dietetické MK jsou tedy důležité substráty pro modifikaci proteinů přímou molekulární interakcí. Syntéza derivátů acyl-CoA z dietetických MK je důležitým krokem pro tuto modifikaci a biodostupnost lipidů.

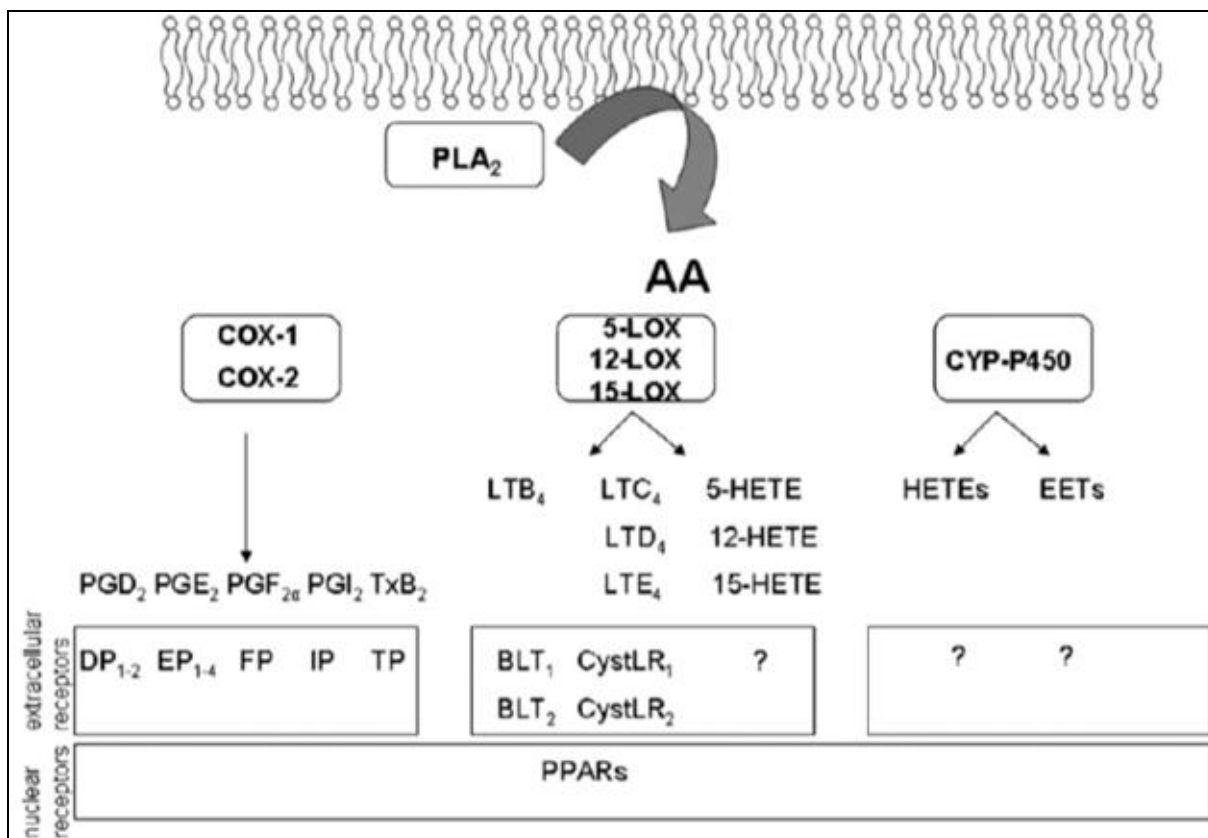
Lipidomika se tak stává nástrojem pro objasnění interakcí dietetických lipidů a buněčného lipidového metabolismu. Protože se ukazuje zásadní úloha lipidů v řadě signálních drah včetně těch spojených s apoptózou, proliferací a karcinogenezí, je nutné porozumět a analyzovat význam lipidů v kolorektální karcinogenezi, diagnostice, prognóze a ovlivnění.

Lipidomika slouží také k výzkumu buněčného lipidového metabolismu a patologických změn lipidových drah. Je definována jako široké studium drah a sítí buněčných lipidů a studována s využitím celé škály biochemických a molekulárně biologických metod.

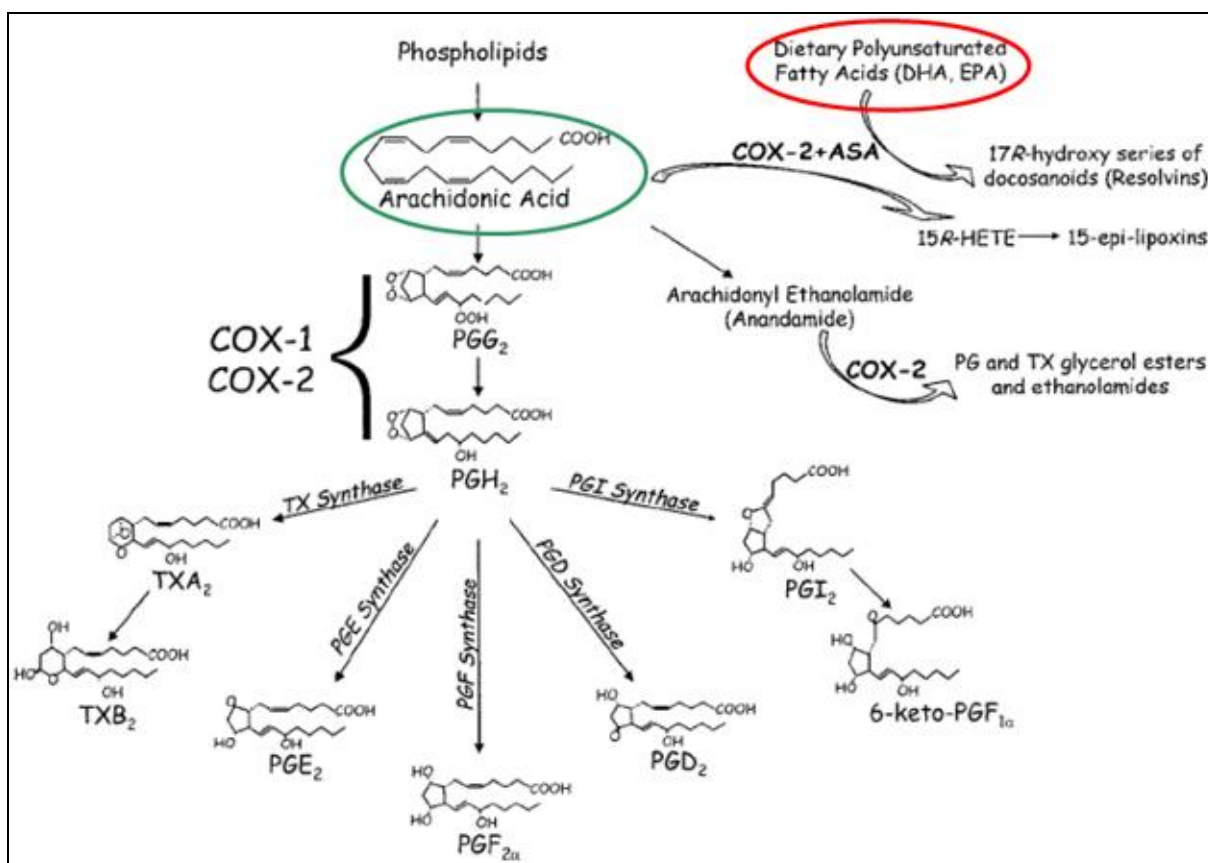
Buněčný lipidom obsahuje přes 1000 různých vysoce odlišných a složitých typů molekul, z nichž mnohé jsou metabolicky nepřeměnitelné a strukturálně podobné.

Metabolismus kyseliny arachidonové (AA)

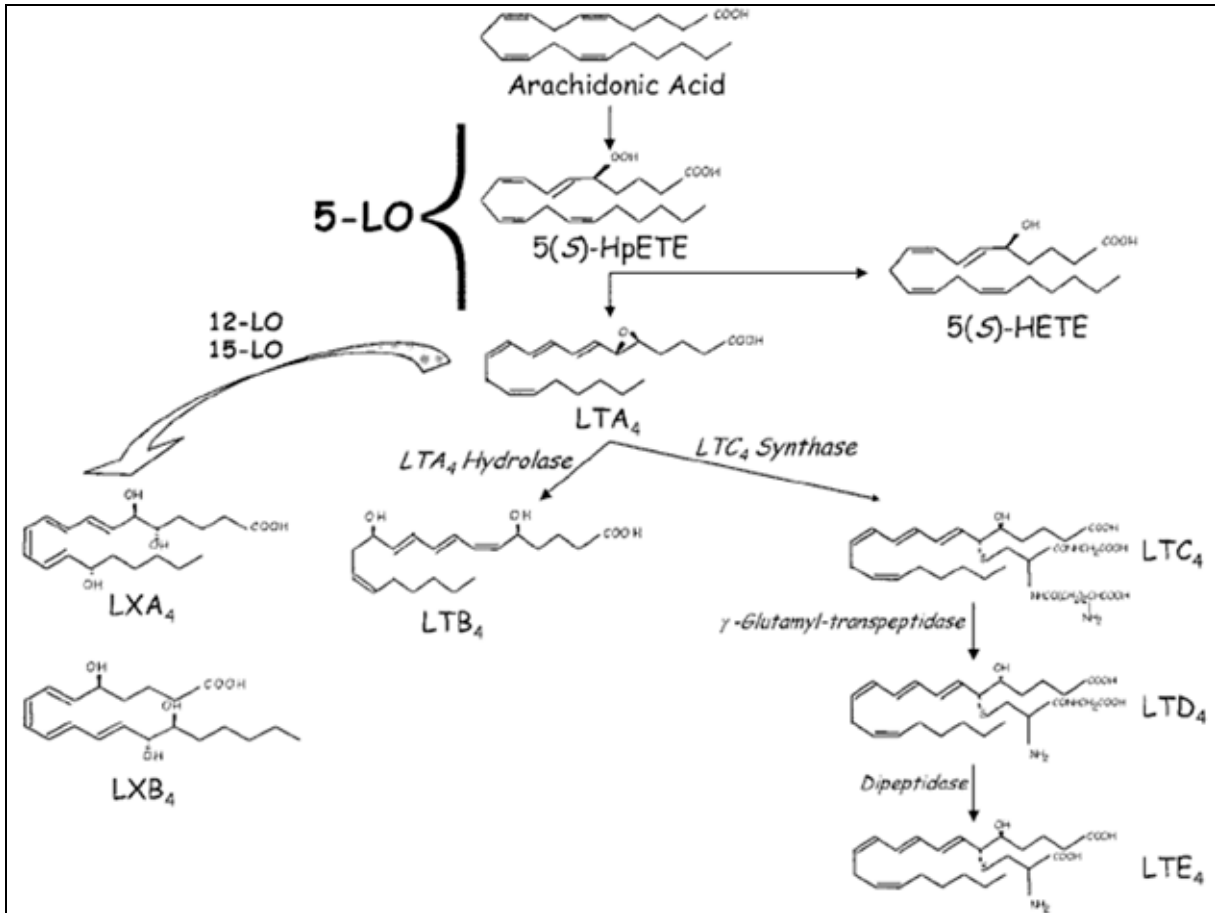
V rozvoji CRC hraje významnou úlohu metabolismus AA. Ten zahrnuje aktivitu fosfolipázy A2 (PLA2) uvolňující AA z membránových fosfolipidů a dalších specifických enzymů katalyzujících přeměnu AA na **aktivní metabolity – eikosanoidy**. Mezi ně patří zejména **cyklooxygenázy (COX-1 a COX-2), lipoxygenázy (5-,12- a 15-LOX) a cytochromy P450** (obr. 13-26). COX katalyzují vznik různých typů prostaglandinů (PG) a tromboxanů (TX) (obr. 13-27), LOX katalyzují vznik různých typů hydroxykyselin (HETE), lipoxinů (LX) a leukotrienů (LT) (obr. 13-28). O stejné enzymy soutěží s AA i nenasycené mastné kyseliny typu n-3 (EPA, DHA), ze kterých vznikají méně biologicky aktivní a protizánětlivé metabolity (neuroprotektiny, resolviny). Produkty AA mohou ovlivňovat cytokinetiku, adhezivitu a invazivitu buněk, ovlivňovat produkci cytokinů a imunitní systém. Uplatňují se také v zánětu. *Chronický zánět mění hladiny zánětlivých mediátorů včetně COX-2, reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku a zánětlivých cytokinů a aktivuje protoonkogeny*. V závislosti na společných funkcích a rovnováze zánětlivých mediátorů může zánětlivá odpověď nádor buď podporovat, nebo působit protinádorově.



Obr. 13-26 Schéma hlavních enzymů, metabolitů a receptorů dráhy přeměny AA (*Ferrer R. and Moreno JJ., Biochem Pharmacol 2010 : 431*)

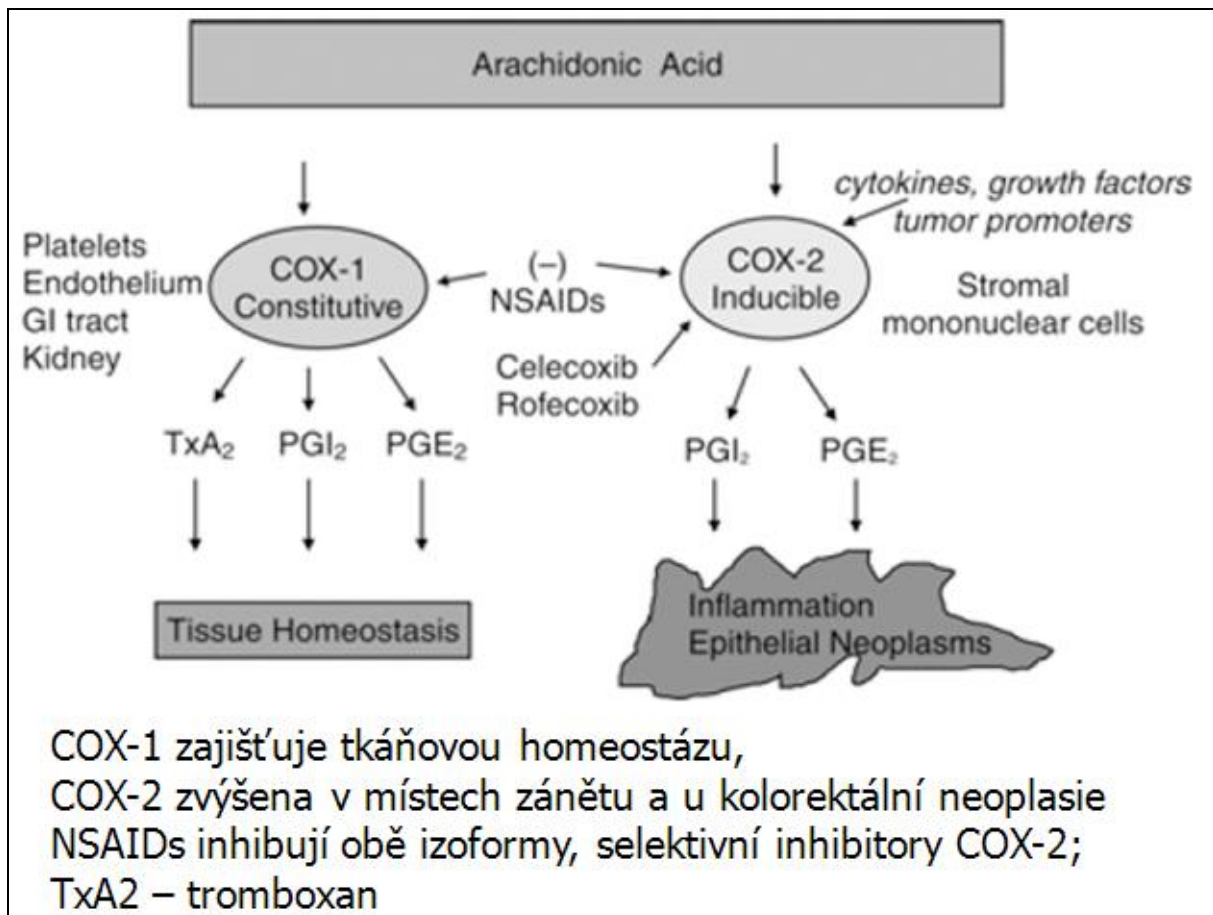


Obr. 13-27 Dráhy přeměny kyseliny arachidonové v prostaglandiny (Romano N. and Claria S., *FASEB J 2003 : 1986*)



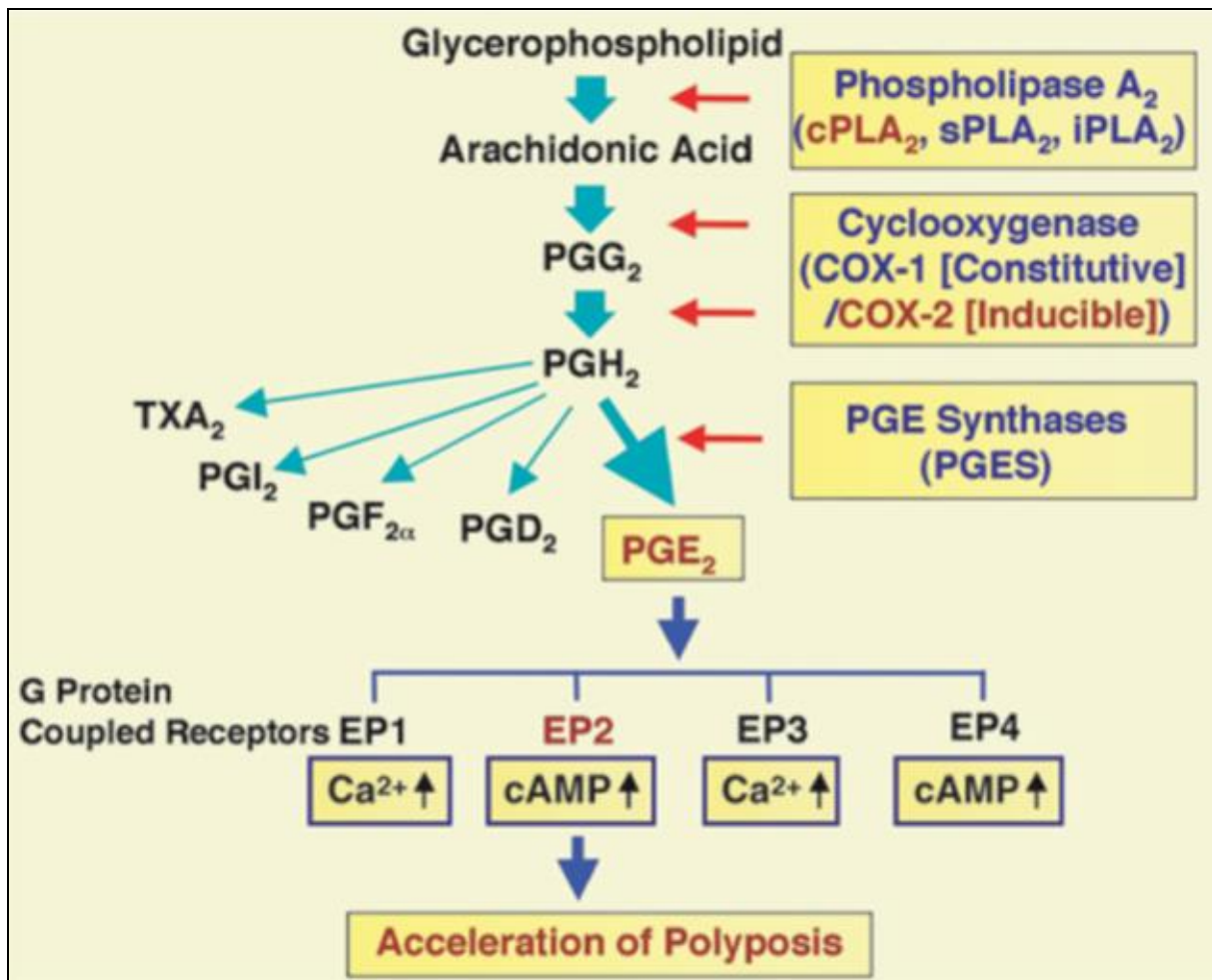
Obr. 13-28 Dráha 5-lipoxygenázy – vznik leukotrienů (Romano N. and Claria S., *FASEB J 2003 : 1986*)

U kolorektálních karcinomů je často zvýšena exprese indukibilní izofomy enzymu COX-2 a množství produktu prostaglandinu E₂ (PGE₂) (obr. 13-29). Ten stimuluje růst a inhibuje apoptózu nádorových buněk a dále působí na funkce imunitních buněk (imunoprese) a má prozánětlivé účinky. Zvýšená exprese COX-2 byla detekována i u řady buněčných typů spojených s nádorovým prostředím – makrofágy, fibroblasty, osteoblasty, endoteliální buňky, které tak mohou podporovat růst nádoru řadou mechanismů.



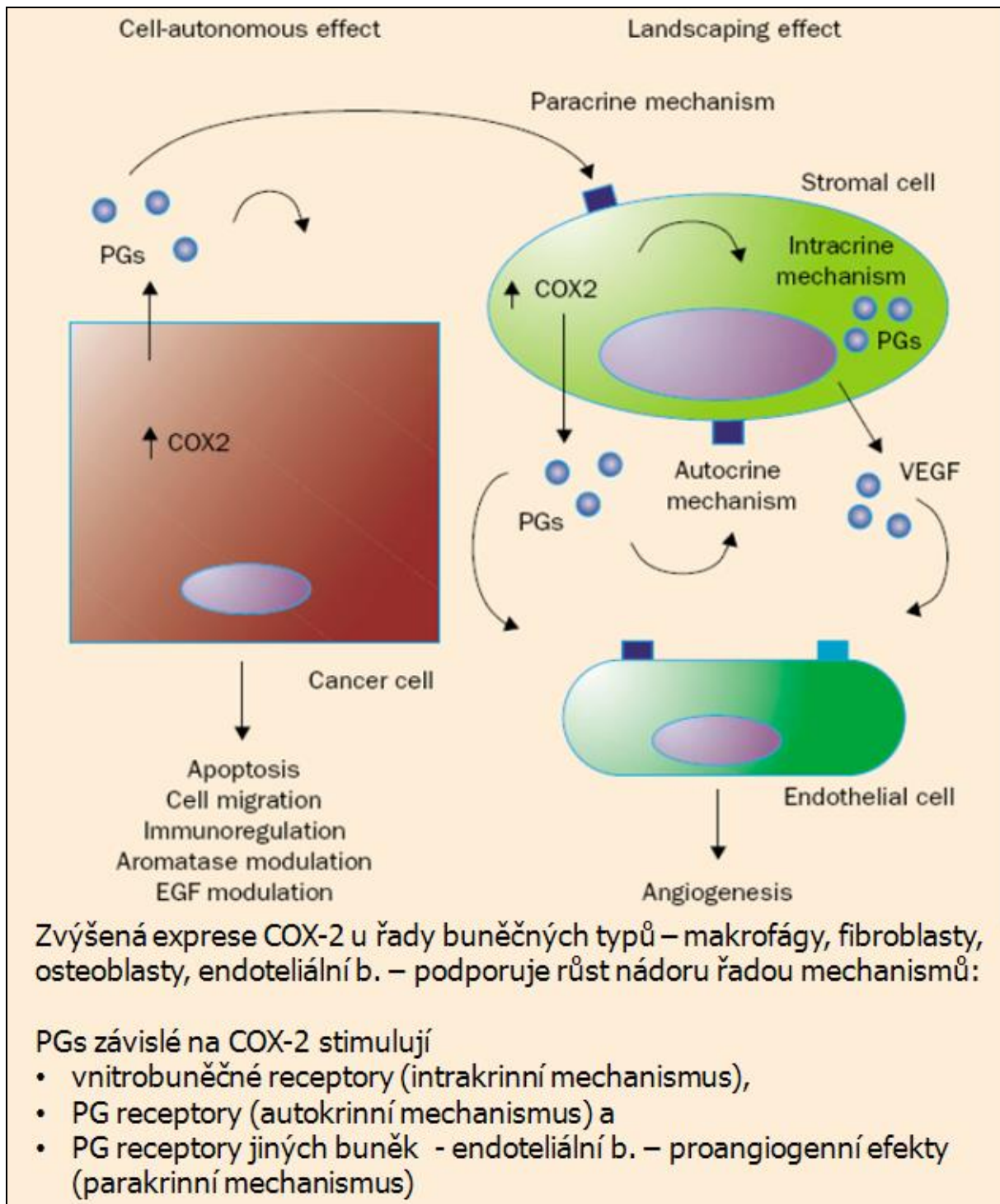
Obr. 13-29 Konstitutivní COX-1 a inducibilní COX-2 izoenzymy (*Simicrope F.A., Molecular Carcinogenesis 2006 : 447*)

Zvýšená aktivita COX-2 je zodpovědná za **nadměrnou produkci určitých typů PGs**. Ty působí na **specifické receptory (EP1-4)**, které jsou spřaženy s G proteiny (obr. 13-30).



Obr. 13-30 Metabolismus AA v kontextu vzniku střevní polypózy (Taketo MM., *Cancer Sci* 2006 : 355)

PG fungují buď autokrinními mechanismy, nebo působí na EP receptory jiných buněk, např. endoteliálních a mají proangiogenní efekty (parakrinní mechanismus) (obr. 13-31). S onkogenními účinky PGE₂ souvisejí specifické signální dráhy.



Obr. 13-31 (Gasparini G. et al., *The Lancet* 2003 : 605)

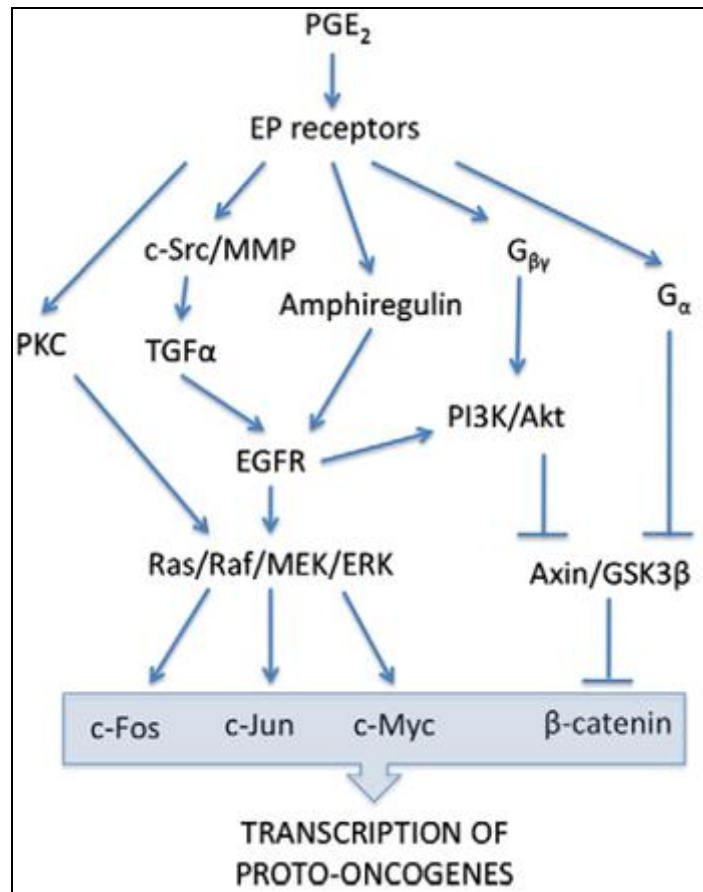
Tři hlavní dráhy aktivované PGE2 jsou:

- transaktivace EGFR
- fosforylace ERK závislá na PKC
- indukce beta-ateninu

Zvýšená exprese specifických receptorů pro PG (EP4) usnadňuje kolorektální karcinogenezi, protože vzniká pozitivní zpětná smyčka zvyšující expresi COX-2.

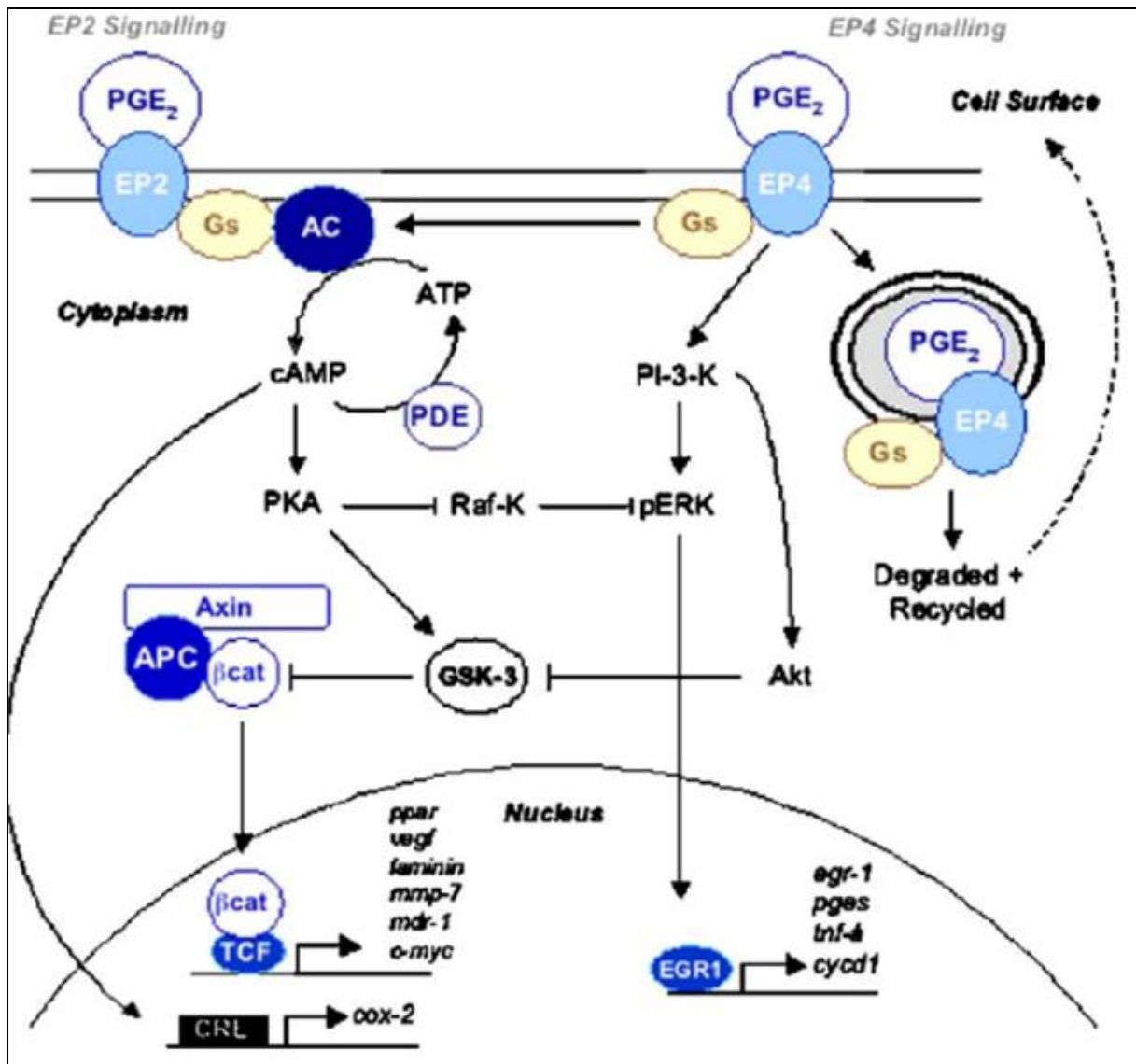
Normální buňky vykazují nízkou expresi EP i COX-2 a při vysoké koncentraci PGE₂ dochází k inhibici růstu. Naopak nádorové buňky vykazují zvýšenou expresi EP4 (transkripční upregulace, aktivační mutace či chromozomální amplifikace) i COX-2 a tvorba PGE₂ způsobuje (spolu s aktivací růstového signálu přes aktivaci ERK1/2 dráhy) růstovou stimulaci.

Vzniká autokrinní smyčka, kdy přenos signálů z receptorů EP2 a EP4 se uskutečňuje prostřednictvím aktivace adenylát cyklázy přes G proteiny, dochází ke stimulaci produkce cAMP a PKA, aktivace transkripčního faktoru CREB – cAMP response-element (CRE) a k transkripci genu pro COX-2. *Selekční tlak pak upřednostňuje přežívání buněk s vyšší expesí EP* (obr. 13-32).



Obr. 13-32 Signální dráhy související s onkogenními účinky PGE₂ (Wu WKK. *et al.*, *Cancer Letters* 2010 : 144)

EP2/EP4 aktivují paralelně Tcf/Lef signální dráhu nezávisle na APC. EP4 aktivuje také dráhu pro přežití PI3K/Akt a ERK1/2 kinázy a transkripční faktor EGR1 regulující expresi genů pro PGE, TNF, cyklinD1 (obr. 13-33).



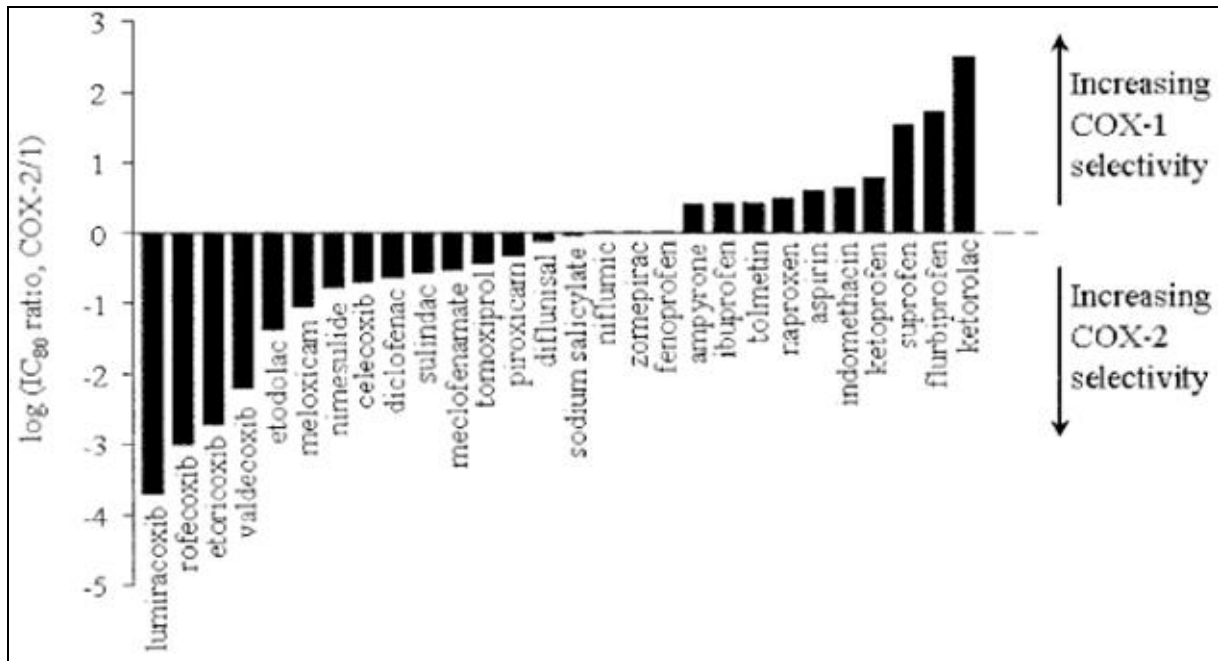
Obr. 13-33 Přenos signálů receptorů EP2 a EP4 (Chell S. et al, BBA 2006 : 104)

Aktivace adenylát cyklázy přes G proteiny – stimulace produkce cAMP a PKA, aktivace transkr. faktoru CREB – cAMP response-element (CRE) – genová transkripce. EP2/EP4 aktivují paralelně Tcf/Lef signální dráhu nezávisle na APC. EP4 aktivuje PI-3-K, Akt a ERK1/2 kinázy a tr. faktor EGR1 regulující expresi genů pro PGE, TNF, cyklinD1.

U kolorektálních karcinomů byla detekována také zvýšená aktivita a produkty 12- a 15-LOX, které podporují tvorbu metastáz a angiogenezi.

Různé typy NSAIDs inhibují oba izoenzymy COX nebo mohou být specifické pro COX-2 (coxiby). Tyto látky mohou snižovat zánět a riziko kolorektálních nádorů (obr. 13-34). Při dlouhodobém užívání však hrozí poškození střeva (krvácení) a proto se vyvíjejí nové preparáty. Tyto látky působí různými mechanismy interferujícími s účinky a signálními drahami eikosanoidů (obr. 13-35). Jde o modulace specifických signálních drah (PI3K/Akt) či aktivace

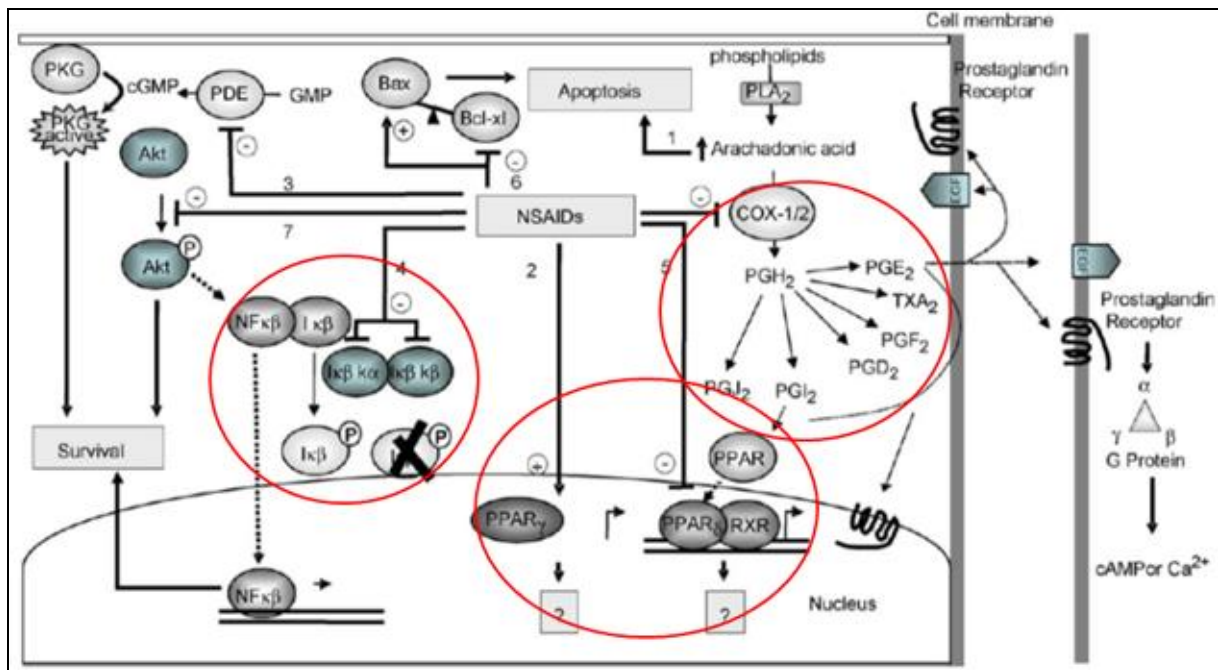
(inaktivace) specifických transkripčních faktorů (PPARs, NFκB, AP1) a exprese specifických proteinů např. regulujících apoptózu (Bax, Bcl1).



Obř. 13-34 Selektivita řůzných inhibitorů cyklooxygenáz. (Moore B.C. and Simmons D.L., *Curr Med Chem*, 2000 : 1131)

Inhibitory COX-1 i COX-2 (ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, indometacin, kys. acetylsalicylová – aspirin).

Selektivní inhibitory COX-2 (coxiby –rofecoxib, celecoxib, meloxicam, nimesulide).



Obř. 13-35 Molekulární mechanismy působení COX-2 a NSAIDs (Zha S., *Cancer Letters* 2004 : 1)

Kontrolní otázky k tématu:

- Popište stavbu tenkého a tlustého střeva.
- Jaké faktory se podílejí na vzniku nádorů kolonu a rekta?
- Vyjmenujte molekulárně genetické poznatky charakterizující toto onemocnění.
- Jaké jsou dědičné typy CRC?
- Jaké základní genetické změny se uplatňují při vzniku a rozvoji CRC?
- Jakou roli hrají u CRC epigenetické modifikace?
- Popište rozvoj onemocnění od adenomu ke karcinomu.
- Jaké jsou funkce genu APC?
- Co jsou to muciny a jak mohou podporovat rozvoj CRC?
- Jaký je význam mikrobiálního prostředí ve střevě?
- Které cytokiny hrají významnou roli v CRC?
- Které důležité signální dráhy jsou deregulovány u CRC?
- Které transkripční faktory se podílejí na rozvoji CRC?
- Které faktory vnějšího prostředí mají významný podíl na rozvoji CRC?
- Které látky mohou u CRC působit chemopreventivně?
- Které typy lipidů mohou ovlivnit zdraví střevního epitelu?
- Jak se v rozvoji CRC uplatňuje metabolismus kyseliny arachidonové?
- Jakým mechanismem přispívá k CRC enzym cyklooxygenáza-2 (COX-2)?
- Popište signální dráhu PGE2.
- Které další produkty AA kromě prostaglandinů se uplatňují v rozvoji CRC?
- Na jakém principu fungují nesteroidní antiflogistika?
- Které signální dráhy a regulační molekuly jsou zahrnuty v působení eikosanoidů?

14. KARCINOGENEZE A ŽIVOTNÍ STYL

14.1. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK A ROZVOJ NÁDORŮ

Při vzniku určitých typů nádorů se uplatňují změny ve specifických genech. Úloha dědičné složky při vzniku nádorů, která je uváděna 5-10 %, je však doplňována dalšími znalostmi o **působení faktorů vnějšího prostředí**, které mohou sehrát v tomto procesu významnou úlohu. *Určité typy nádorů jsou spojovány s konzumací alkoholu a kouřením, s infekcí, působením environmentálních karcinogenů či s obezitou (tab. 14-1, 14-2).*

Tab. 14-1 Životní styl a další faktory ovlivňující riziko vzniku nádorů

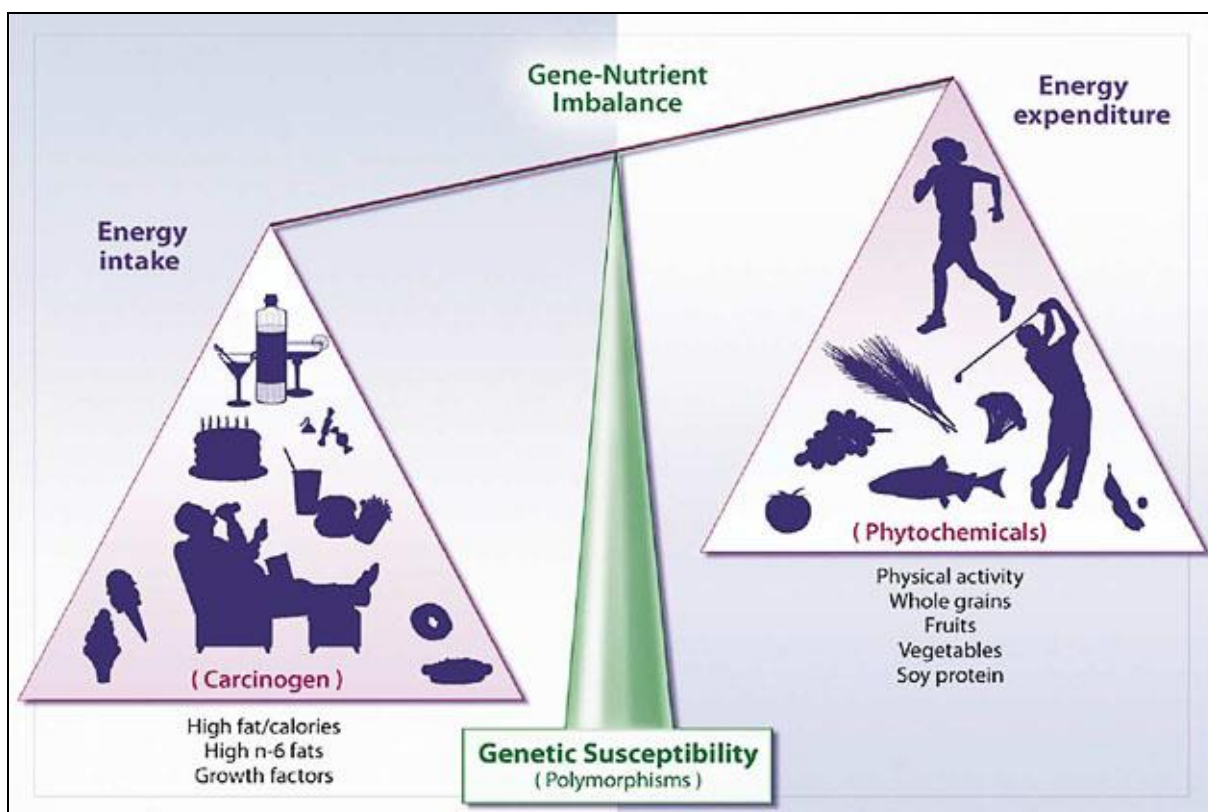
Typ nádoru	Zvýšení rizika	Snížení rizika
Tlustého střeva a rekta	Adenomatózní polypy, zánět střeva, obezita (muži)	Fyzická aktivita
Prsu	Brzká první menstruace, pozdní menopauza, první těhotenství v pozdním věku, vysoký vzrůst, obezita (po menopauze)	Fyzická aktivita
Plic	Kouření, profesní zátěž	Fyzická aktivita
Žaludku	Infekce <i>Helicobacter pylori</i>	
Děložního čípku	Lidský papillomavirus, kouření	
Dělohy	Expozice estrogenu, obezita	
Jícnu	Kouření, gastro-esophagální reflux (Barrettův jícen)	
Slinivky břišní	Kouření, alkohol, chronický zánět	
Krve	Kouření, profesní zátěž, schistosomální infekce	
Vaječnicků		Dlouhodobé užívání orální hormonální antikoncepce?

Tab. 14-2 Hlavní příčiny úmrtí na nádorová onemocnění v USA, 1999

Životní styl	% z celk. počtu
Dieta s vysokým obsahem tuků a smažených jídel a s nízkým obsahem nestravitelné vlákniny, zeleniny a čaje může vést ke vzniku nádorů kolorekta, prsu, slinivky břišní, prostaty, vaječnicků a dělohy.	35
Dieta s vysokým obsahem soli a konzervovaných jídel a s nízkým obsahem zeleniny a čaje může vést ke vzniku nádoru žaludku.	2–3
Užívání tabáku může vést ke vzniku nádorů plic, hrtanu, ústní dutiny, močového měchýře, ledvin, slinivky břišní nebo žaludku.	36
Tabák a alkohol mohou způsobit vznik nádorů úst, jícnu nebo slinivky břišní.	6
Užívání alkoholu může vést ke vzniku nádorů jater nebo jícnu.	3
Sluneční záření a genetické faktory mohou způsobit vznik melanomů.	2
Nedostatek pohybu, sedavé zaměstnání a obezita mohou přispívat k výskytu nádorových onemocnění.	
Podobné faktory životního stylu mohou vést i ke vzniku kardiovaskulárních chorob.-	

K významným faktorům vnějšího prostředí patří zejména **dieta**, jejímuž působení jsme vystaveni denně a dlouhodobě. Podíl diety je stále diskutován, ale některé práce uvádějí vysoký podíl (až 70 %), zejména u některých typů nádorů (kolon, prostata, pankreas).

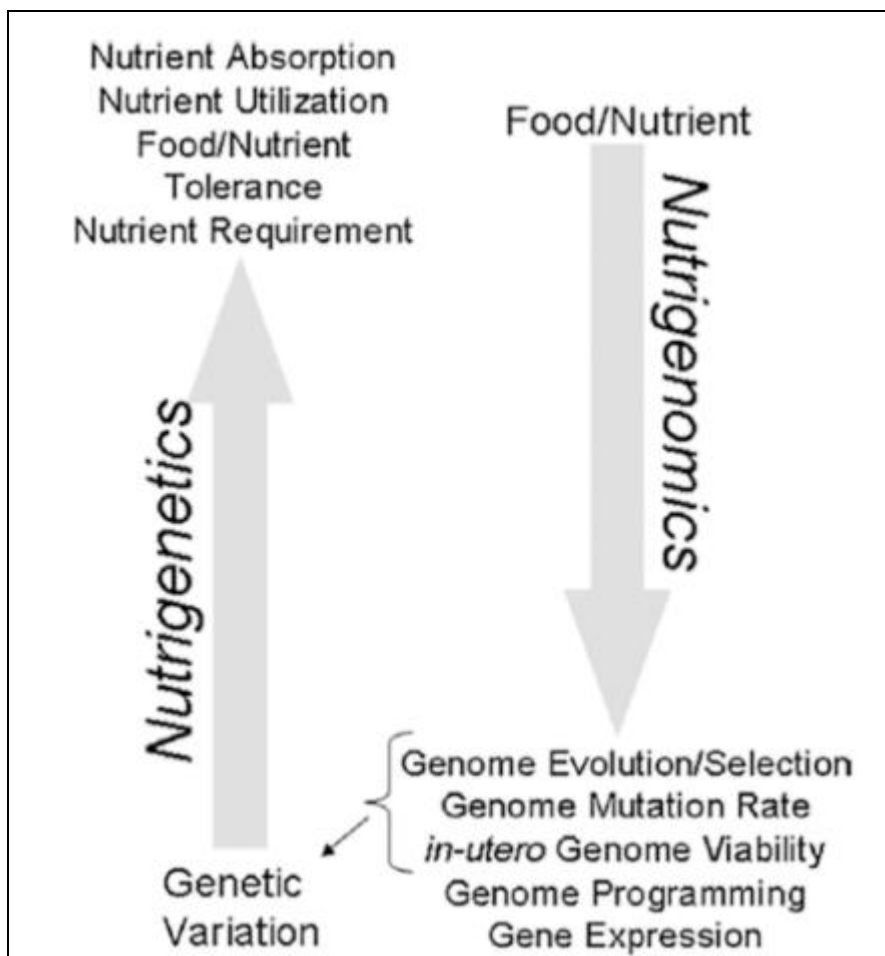
S dietou souvisí v základu **rovnováha mezi příjmem a výdejem energie**. Vyšší příjem energie, nízký poměr nenasycené/nasyčené tuky, inzulínová rezistence, a sedavý životní styl jsou rizikovými faktory vedoucími k obezitě a chronickým onemocněním (srdeční choroby, diabetes, případně nádory). To je vyvažováno fyzickou aktivitou a dietou bohatou na celá zrna, ovoce, zeleninu, sóju atd., která snižuje riziko těchto chorob. Energetický metabolismus a obezita jsou však ovlivňovány rovněž **genetickými polymorfizmy**, které **posouvají rovnováhu mezi příjmem a výdejem energie** (obr. 14-1).



Obr. 14-1 Nerovnováha mezi příjmem a výdejem energie ve vztahu k obezitě a chronickým onemocněním (Trujillo E., *J Amer Diet Assoc.*, 106, 2006 : 403)

Interakce živin a genomu dala vznik dvěma novým odvětvím nutrigenetiky a nutrigenomiky.

Nutrigenetika se zabývá vlivem genetických variant na požadavek, utilizaci, toleranci a metabolismus živin. **Nutrigenomika** pak zkoumá modulační úloha živin na evoluci genomu, frekvenci mutací, in-utero viabilitu. Nutrigenomika zpětně ovlivňuje genetické variace pozorované v různých lidských populacích (obr. 14-2).



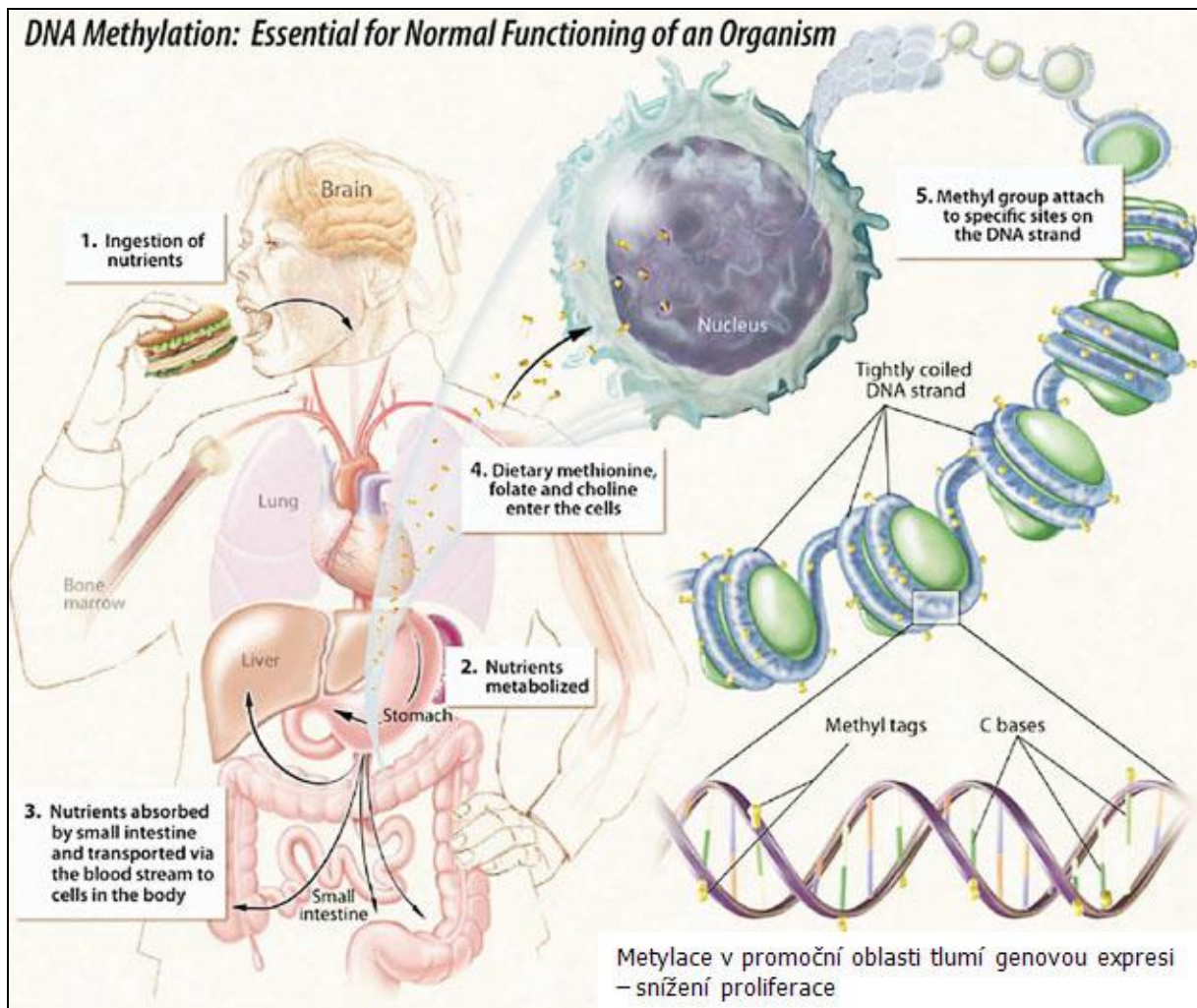
Obr. 14-2 Interakce živin a genomu (Stover PJ and Caudill MA J Am Diet Assoc 2008 : 1480)

14.2 DIETETICKÉ FAKTORY

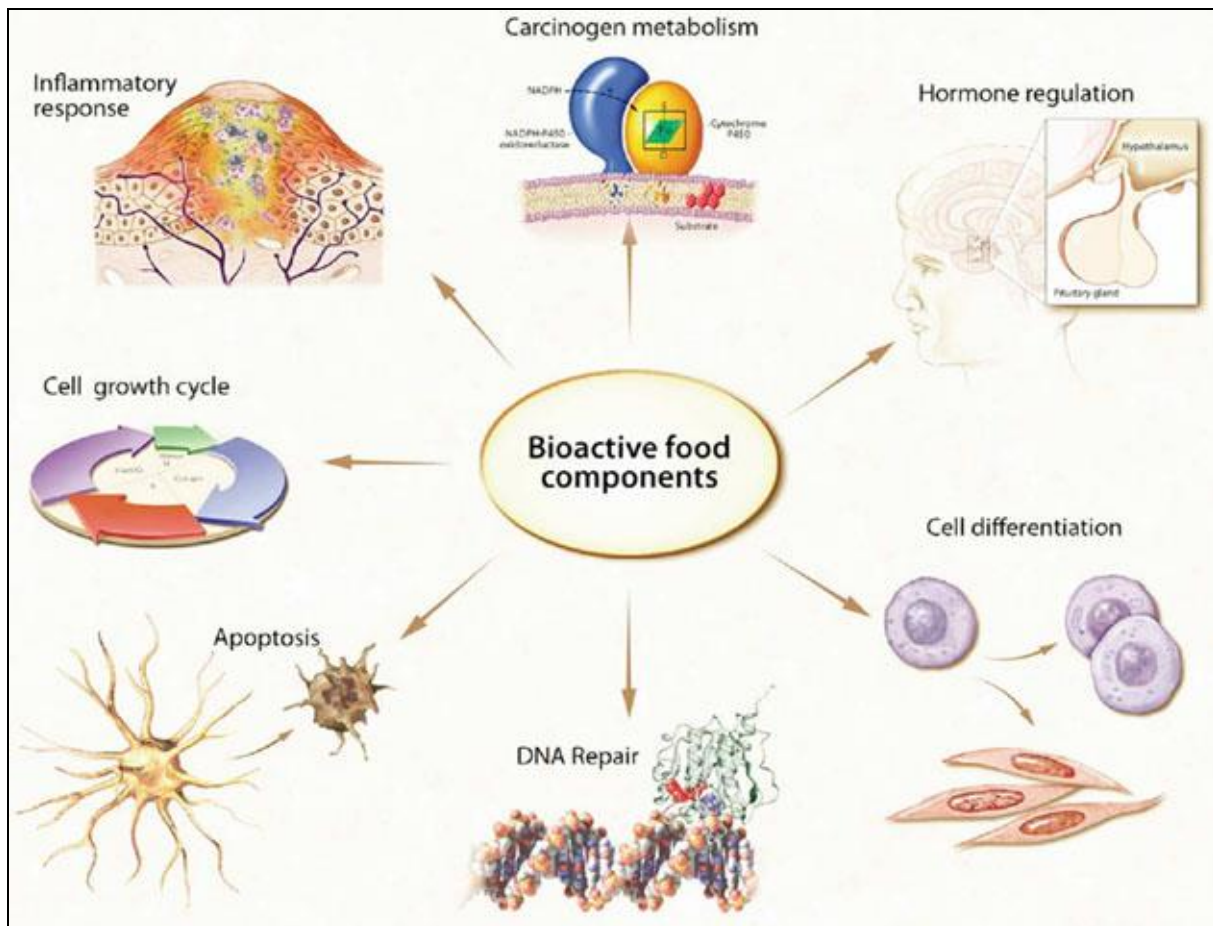
Hromadí se důkazy, že změny diety mohou redukovat riziko nádorů na 1- 2/3. Nelze však zcela jistě určit, které typy rakoviny jsou příčinně spojeny s dietou a jaká jejich část je způsobena specifickými složkami potravy. Dieta je považována za hlavní faktor v etiologii nádorů tlustého střeva a žaludku a je důležitá i v etiologii řady dalších typů nádorů. Kromě protektivního působení ovoce a zeleniny je velmi obtížné formulovat praktická dietetická pravidla, která by redukovala riziko nádorových onemocnění. I když existuje řada experimentálních důkazů o účinku různých složek potravy na vznik a rozvoj nádorových onemocnění, často jsou výsledky protichůdné a je obtížné z nich dělat obecné závěry. Také epidemiologické studie jsou obtížné a nejednotné.

To, že dieta ovlivňuje incidenci rakoviny, vyplývá z experimentálních studií na zvířatech, které ukazují, že se tak děje různými cestami. Nejen přenosem karcinogenů do těla, ale také ovlivněním metabolismu karcinogenů a reakce organismu na ně.

Řada složek potravy, tzv. **bioaktivní složky**, ovlivňuje genetické i epigenetické děje spojené se vznikem různých patologických procesů. *Složení potravy hraje roli v karcinogenezi řadou různých mechanismů, které je nutné objasňovat a přinášet o nich vědecké důkazy.* Přírodní složky mohou ovlivňovat základní děje jako je reparace DNA, metylace DNA (obr. 14-3), buněčná proliferace (buněčný cyklus), diferenciace či apoptóza. Kromě toho ovlivňují metabolismus karcinogenů i endogenních hormonů a mohou tlumit či podporovat zánětlivou reakci (obr. 14-4).



Obr. 14-3 Ovlivnění metylace DNA složkami diety (methionin, folát, cholin) (Trujillo E., *J Amer Diet Assoc.*, 106, 2006 : 403)



Obr. 14-4 Bioaktivní složky potravy mohou ovlivňovat genetické i epigenetické děje související se vznikem onemocnění (Trujillo E., *J Amer Diet Assoc.*, 106, 2006 : 403)

Předpokládá se, že nádory zažívacího traktu (žaludek, kolon a rektum) mohou být příčinně spojeny s určitými dietetickými faktory. Také např. u nádoru nosohltanu bylo prokázáno spojení především s konzumací solených ryb a podobně konzervovaných potravin (hlavně v jižní Číně). Snížení výskytu rakoviny žaludku je přičítáno omezení solení, nakládání a konzervace potravin a zvýšené konzumaci ovoce a zeleniny.

14.3 KALORICKÝ PŘÍJEM A VÝZNAM TUKŮ

Epidemiologické studie podporují vztah mezi živočišnými tuky (zvláště z tzv. červeného masa) a nádory kolonu a rekta. Přesné složení diety se však těžko sleduje a tak se uvádí *příčinný vztah spíše mezi celkovou konzumací tuků a nádory*. *Dietetická doporučení u nádorů však zatím nejsou zcela jednoznačná a vyžadují další výzkum* (tab. 14-3). Z pokusů na hlodavcích vyplývá, že dieta bohatá na nasycené tuky indukuje zánět a povrchovou lyzi epitelu kolonu následovanou kompenzující regenerací buněk. Předpokládá se, že tento stimulační účinek na dělení epitelálních buněk je mechanismem, kterým se nasycené tuky účastní patoge-

neze nádorů kolonu. V současné době je velká pozornost věnována možným *preventivním účinkům rybího oleje obsahujícího esenciální n-3 nenasycené mastné kyseliny*.

Tab. 14-3 Hlavní příčiny úmrtí na nádorová onemocnění v USA, 1999

Rizikový faktor	Tvorba adenomu	Růst adenomu	Karcinom tlust. střeva
Tabák	↑	0	0
Alkohol	±	↑	0
Fyzická aktivita	±	±	↓
Vysoký příjem energie	±	±	↑
Vysoký index tělesné hmoty	±	↑	↑

Další epidemiologické údaje podporují hypotézu, že *nízký obsah vlákniny* je též spojen se zvýšeným rizikem nádoru kolonu. Záleží také na zdroji vlákniny (ovoce, zelenina, obiloviny). **Vláknina** snižuje dobu tranzitu potravy kolonem a zvyšuje obsah vody ve střevě, čímž naředí živiny, např. živočišný tuk, škodlivé látky. Konzumace 20-30g vlákniny denně spolu se snížením konzumace živočišných tuků by mělo podstatně snižovat riziko vzniku nádorů kolonu.

Důležitým faktorem je zde **celkový příjem kalorií ve srovnání s výdejem energie**. Např. pacientky s rakovinou prsu a vysokotukovou dietou přežívají hůře než pacienti s nízkotukovou dietou. Obezita a zvýšená hladina cholesterolu také může ovlivnit přežití těchto pacientů. Obzvláště důležité je složení tuků než celkový kalorický příjem. Zvýšený přísun kalorií a malý výdej během dětství předurčuje brzký nástup puberty, což je důležitý rizikový faktor nádorů prsu. Existují studie prokazující vztah mezi nádorem prsu a konzumací tuků, ale nejsou důkazy pro dávkové závislosti. Větší účinky se mohou projevit u žen po menopauze, kdy dochází ke změnám v působení hormonů (estrogen, prolaktin). *Obezita je jasně rizikovým faktorem u nádorů endometria*. Je velmi obtížné stanovit v lidské populaci vztahy mezi nádory a konzumací tuků. Z dotazníků se těžko zjišťuje např. konzumace různých typů tuků.

14.4 DALŠÍ FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ

Důležitým faktorem pro vývoj určitých typů nádorů jsou hormony. Vztah mezi jednotlivými složkami potravy a hormonálně závislými typy nádorů (prsu, endometria, vaječníků a prostaty) je stále nejasný. Nádory endometria vznikají po kumulativním působení estrogenů bez kompenzujícího účinku progesteronů. Také k nádorům prsu přispívá kumulativní působení estrogenu. Nádory prostaty jsou zase spjaty s kumulativními účinky testosteronu pravděpo-

dobně v kombinaci s estrogenem. Obezita zvyšuje riziko u žen před menopauzou, protože snižuje progesteron a zvyšuje estrogen, který podporuje proliferaci buněk endometria.

Buňky prsu proliferují pod vlivem estrogenu a dále v kombinaci s progesteronem. Proto brzký nástup menstruace a pozdní menopauza jsou tak důležitými rizikovými faktory této choroby. Uvádí se, že ženy, u kterých se dostaví menopauza před 45 rokem, mají poloviční riziko vzniku prsních nádorů než ženy s menopauzou po 55 roce. Také obezita je zde rizikovým faktorem, protože ovlivňuje hormonální funkce. Při léčbě se užívají antiestrogenní látky např. tamoxifen. Ochranným faktorem je brzké první a opakovaná těhotenství.

Pro nádory vaječníků je rizikovým faktorem ovulace, protože stimuluje dělení epitelálních buněk ovária. Faktory zabraňující ovulaci jsou tedy protektivní. Patří k nim těhotenství a orální hormonální antikoncepce, která též chrání před nádory endometria.

Z ostatních faktorů hraje důležitou úlohu **konzumace alkoholu**, která zvyšuje riziko (a znásobuje riziko spolu s tabákem) nádorů ústní dutiny, hltanu, hrtanu, jícnu a jater. Lih, víno a pivo mají asi stejný rizikový účinek. Alkohol zvyšuje také riziko kolorektálních nádorů a nádorů prsu. Alkohol např. stimuluje proliferace rektálních buněk u krys, což by mohlo být jedním z mechanismů ve spojení s nádory střeva.

Na vzniku řady dalších nádorů se podílejí jiné faktory včetně **virů, bakterií, chemických látek, záření (x paprsky i UV záření), mechanické podráždění a trauma**. Virus heptitidy B je spojen s hepatocelulárními karcinomy, *Papilloma virus* s rakovinou děložního čípku a *Hellicobacter pylori* s rakovinou žaludku. Částičky azbestu mohou vyvolat mechanickým drážděním nádory plic (mezoteliom). Trauma vyvolané např. poraněním hlavy se může podílet na vzniku meningiomů.

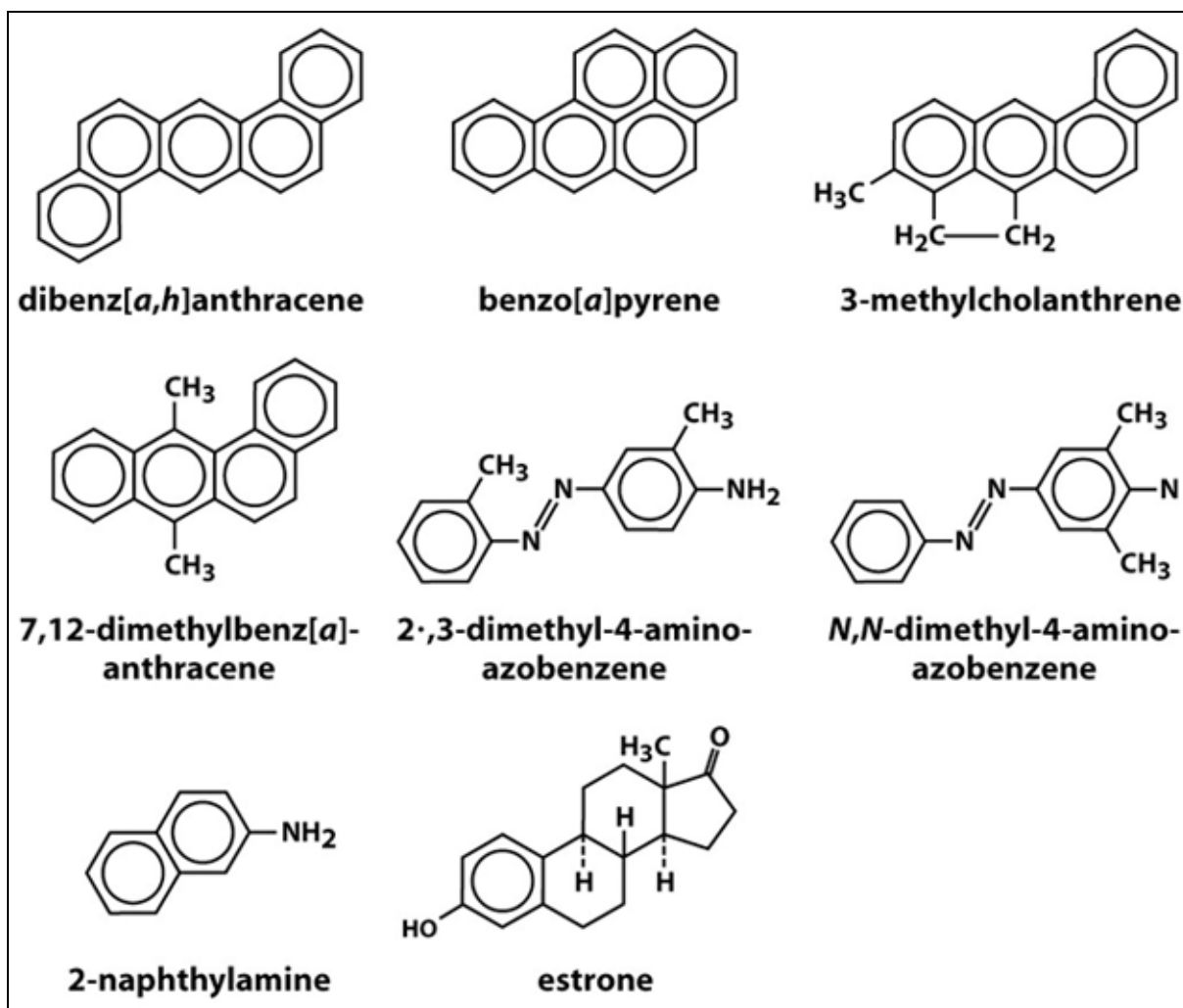
14.5 PREVENCE

Složky potravy také ovlivňují reakce organismu na **chemické karcinogeny**. V *metabolizmu xenobiotik* hrají důležitou roli některé specifické buněčné enzymy, především cytochromy P450, *gammaglutamyltransferáza atd.*, jejichž aktivita může být přírodními látkami ovlivněna. Existují v základu dvě skupiny látek se schopností inhibovat neoplastické účinky chemických karcinogenů:

1. induktory zvýšené funkce oxidázové aktivity v mikrozomech, kde se metabolizují xenobiotické látky. Tyto induktory jsou obsaženy v rostlinách rodu Cruciferae (květák, brokolice, kapusta) a dále jsou to látky typu flavonů, indolů, oxidovaných sterolů přítomné v jiných rostlinách.

2. antioxidanta (vitamíny A, E, beta- karoten), která jsou také obsažena v různých typech zeleniny a ovoce.

Působení karcinogenů je samozřejmě ovlivněno **individuální normou**, zvláště aktivitou některých enzymů zapojených do metabolismu karcinogenů jako je acetyltransferáza (odpovědná za metabolismus aromatických aminů v cigaretovém kouři) nebo cytochrom P450. **Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IACR)** periodicky publikuje *seznam lidských karcinogenů*. Je zaměřen na jednotlivé chemické látky, u nichž existují důkazy karcinogenních účinků jak z epidemiologických studií, tak z oblasti experimentální (obr. 14-5). Tyto látky mají buď přímé genotoxické účinky na DNA, nebo způsobují zvýšení buněčné proliferace (negenotoxické účinky) nebo mají obojí účinky. Cílem je vyloučení expozice lidské populace těmito látkami.



Obr. 14-5 Příklady mutagenních chemických látek (*Figure 2.22 The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

Z poznání úlohy specifických škodlivých faktorů životního prostředí pak vycházejí doporučení směřující k omezení jejich působení na lidskou populaci a tak ke snížení výskytu určitých chorob včetně nádorů (např. omezení kouření, infekce, expozice karcinogeny). Na druhé straně existují faktory, které mohou působit pozitivně a omezovat vznik onemocnění zdravá výživa, fyzická aktivita, omezení stresu).

Tyto poznatky **úlohy různých faktorů v etiologii onemocnění** (studium původu a příčin nemocí) vycházejí z řady typů studií

- **experimentální studie *in vitro*** – cílené studie na úrovni buněčné a molekulární (buněčné kultury, moderní metody molekulární biologie).
- **experimentální studie *in vivo*** – cílené studie na laboratorních zvířatech.
- **klinické studie** – cílené studie na pacientech i na zdravých jedincích, retrospektivní studie.
- **epidemiologické studie** – údaje z vybraných populací, vztahy mezi životním stylem a výskytem onemocnění.
- **migrační studie** – důležité pro výzkum podílu dědičných faktorů a faktorů prostředí.

V současné době je možno v poměrně velkém rozsahu *předcházet řadě nádorových onemocnění změnou životního stylu nebo lékařskými zásahy*. **Tabák** samotný nebo v kombinaci s alkoholem je nejdůležitější příčinou nádorů. Uvádí se asi jeden ze tří případů v USA (nádory plic, ústní dutiny, hrtanu, pankreatu a močového měchýře) (tab. 14-4). Příčinou je aktivní kouření nebo přímá expozice jinými tabákovými produkty. Existuje však stále více důkazů, že i pasivní kuřáci mají zvýšené riziko plicních i jiných nádorů. Omezení kouření tedy může účinně pomáhat v prevenci zmíněných typů nádorů. Např. *strategie omezení kouření v USA* přináší první úspěchy, tj. snížení mortality na rakovinu plic (která vedla mezi smrtelnými nádorovými onemocněními).

Tab. 14-4 Úmrtí na nádorová onemocnění v souvislosti s užíváním tabáku (USA, 1997)

	Muži ($\times 10^2$)	Ženy ($\times 10^2$)
Ústní dutina	5,1	2,7
Jícen	9,2	2,9
Slinivka břišní	6,8	7,3
Hrtan	3,1	0,8
Plíce	83,9	67,6
Močový měchýř	8,1	4,1
Ledviny	7,3	4,6
	Účinek je násoben nadměrným příjmem alkoholu.	
	Roli hrají i faktory výživy.	

Také **změny v dietě a zvýšení fyzické aktivity** mohou snížit riziko specifických nádorů, zvláště zažívacího traktu. Nádorové onemocnění je nyní v USA hlavní příčinou smrti žen. Není to však způsobeno ani tak vzrůstajícím počtem nádorových onemocnění jako spíše snížením úmrtí na kardiovaskulární choroby během posledních asi 40 let, k čemuž vedlo omezení rizikových faktorů jako je kouření, detekce a léčení hypertenze a redukce cholesterolu dietami. Přestože se celková úmrtnost na rakovinu mnoho nemění, mění se spektrum nádorů způsobujících úmrtí, např. úmrtí na Hodgkinův lymfom, nádory děložního čípku, endometria, žaludku, rekta, testes, močového měchýře, štítné žlázy, ústní dutiny a hltanu se snížila o 15 % za posledních 30 let. Je to způsobeno *brzkou detekcí a léčením premaligních stavů, omezením konzervačních látek v potravinářském průmyslu a změnami ve složení konzumované potravy*. Zvýšená mortalita je naopak zaznamenávána u melanomů (zvýšené působení škodlivých složek UV záření), non-Hodgkinova lymfomu a mnohočetných myelomů. Podobné údaje existují i v Evropě.

Existují rovněž důkazy o protinádorovém působení některých látek. Zvýšená konzumace beta-karotenu (obsažený v ovoci a zelenině, patří mezi karotenoidy) může snížit riziko rakoviny plic i jiných epitelálních nádorů. Bylo zjištěno, že pacienti – kuřáci s nádory mají sníženou hladinu beta-karotenu v séru proti zdravým jedincům. Pozitivně může působit i konzumace zeleného čaje či sóji. Hromadí se důkazy i o působení dalších látek, např. vitamínů C a E, které také působí především jako antioxidanty a mají protektivní účinky proti některým nádorům (tab. 14-5).

Tab. 14-5 Zdravotní aspekty preventivního působení čaje

Působení čaje a čaj. polyfenolů	Následky
Silná antioxidační aktivita	Snížení rizika vzniku srdečních chorob; snížení tvorby ROS a oxidovaných nukleotidů v DNA a možná inhibice karcinogeneze
Selektivní indukce metabolických enzymů fáze-I a -II	Zvýšená tvorba detoxifikovaných metabolitů karcinogenů
Snížování míry buněčné proliferace	Snížení růstu abnormálních a nádorových buněk
Selektivní modifikace střevní mikroflóry	Náhrada nežádoucích částí mikroflóry za prospěšné bakterie a následné zlepšení metabolismu
Taky zeleninová jídla a jídla ze sóji mohou působit podobnými mechanizmy.	

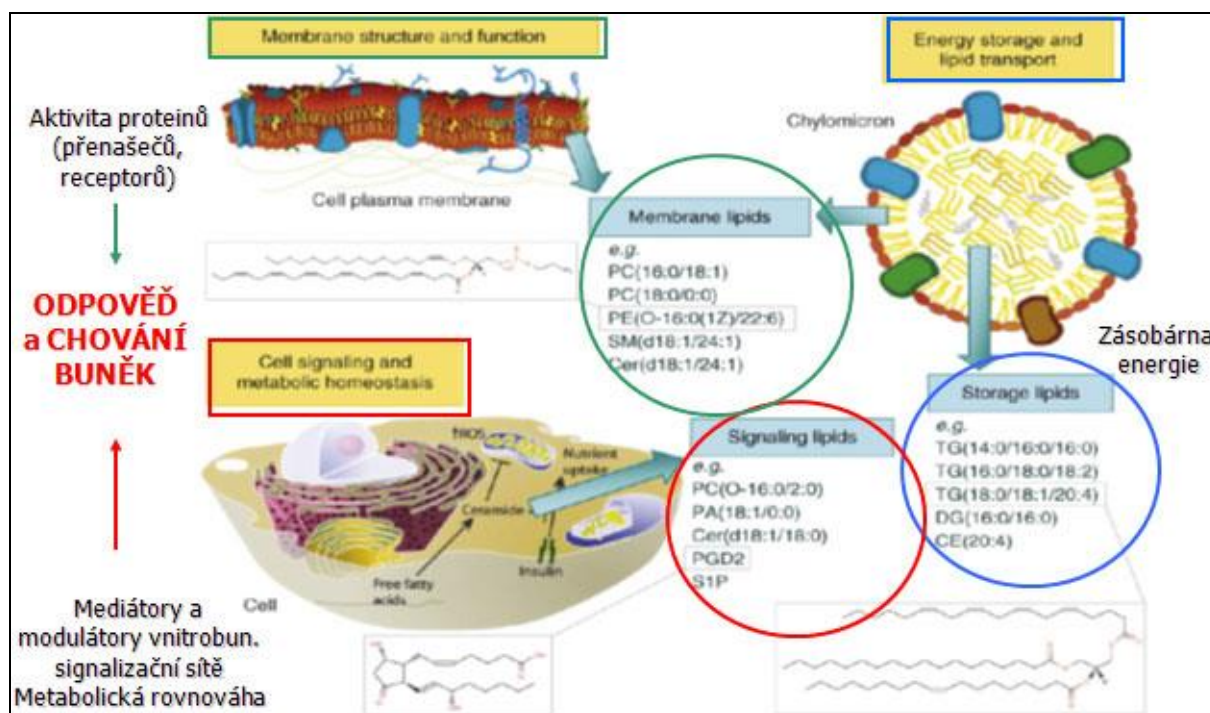
Kontrolní otázky k tématu:

- Čím je ovlivňován energetický metabolismus?
- Co zkoumá nutrigenetika a nutrigenomika?
- Jak se uplatňuje v rozvoji nádorových onemocnění dieta?
- Proč hovoříme o bioaktivních složkách potravy?
- Které složky diety jsou považovány za významné s ohledem na vznik a rozvoj nádorů?
- Jakými mechanismy se mohou na rozvoji nádorů podílet hormony?
- Vyjmenujte další možné vnější faktory podílející se na vzniku nádorů.
- Jak je v organismu regulováno působení chemických karcinogenů?
- Která mezinárodní organizace zajišťuje informace o lidských karcinogenech?
- Co je to etiologie onemocnění a jaké typy studií jsou využívány?
- Jaká opatření lze využít vzhledem k omezení výskytu nádorových onemocnění?

15. ÚLOHA LIPIDŮ V ROZVOJI NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Lipidové složky potravy ovlivňují počátek a rozvoj řady onemocnění. Vysoká hladina cholesterolu je spojena s kardiovaskulárními chorobami, které jsou nejčastější příčinou úmrtí v populaci. Lipidy produkované buňkami imunitního systému se účastní zánětlivých onemocnění, jako je revmatoidní artritida, sepse, astma, zánětlivé onemocnění střeva. Změny lipidů jsou spojovány i se vznikem diabetu a hrají úlohu také v neurodegenerativních a psychických onemocněních (Alzheimerova choroba, deprese, hyperaktivita, schizofrenie apod.) *S ohledem na nádorová onemocnění je uváděn zvýšený příjem tuků jako rizikový faktor zejména u nádorů tlustého střeva (kolonu), prsu či prostaty.*

Důležité je však nejen množství, ale zejména složení tuků, protože tuky nejsou jen zdrojem energie, ale hrají také strukturální a regulační úlohu s významným dopadem na fyziologické funkce organismu (obr. 15-1).

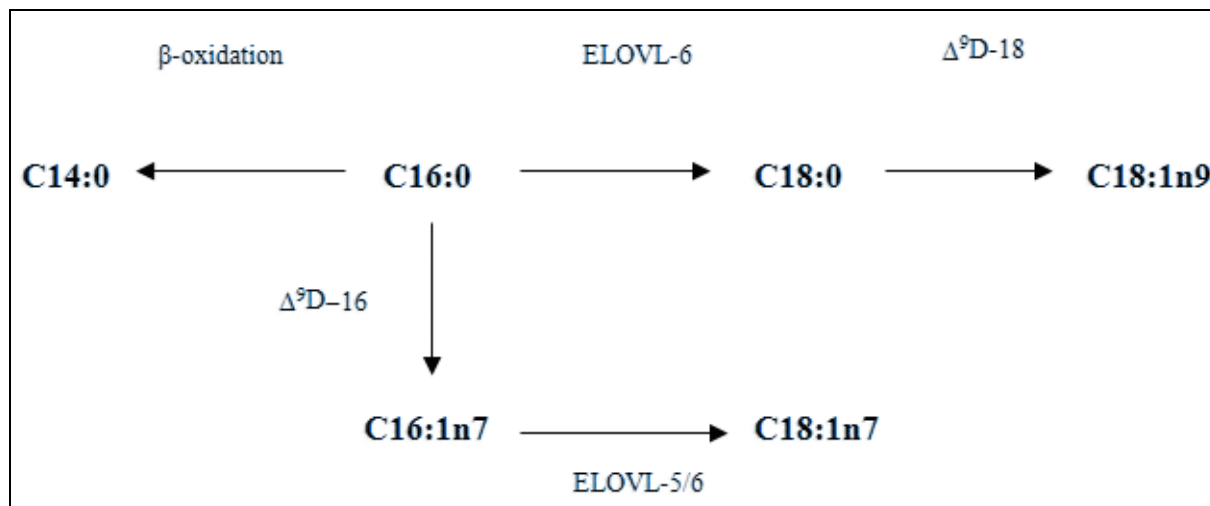


Obr. 15-1 Různá biologická úloha lipidů (Orešič M. et al., Trends in Biotechnology 2008 : 647)

Savci syntetizují mastné kyseliny (MK) *de novo* z acetyl-CoA za účasti syntázy mastných kyselin (FASN). Konečným produktem je kyselina palmitová (16:0), která je elongována na kyselinu stearovou (18:0). V západní dietě je dostatečné množství těchto kyselin. Buněčné membrány však vyžadují k udržení struktury, fluidity a funkce **nenasycené MK**, proto existuje systém desaturace (vnášení dvojných vazeb). Elongázy prodlužují uhlíkové řetězce. Delta-9-

desaturáza vnáší jednu dvojnou vazbu mezi C9-C10 a dochází ke konverzi kyseliny stearové na mononenasyčenou kyselinu olejovou (18:1, n-9) (obr. 15-2).

Rostliny, na rozdíl od živočichů, jsou schopny přidávat další dvojně vazby. Delta 12-desaturáza konvertuje kyselinu olejovou na linoleovou (LA, 18:2, n-6), zatímco delta 15-desaturáza konvertuje kyselinu linoleovou na α -linolenovou (ALA, 18:3, n-3).



Obr. 15-2 Syntéza mastných kyselin z kyseliny palmitové (C16:0) ELOVL – elongázy, Δ D – desaturázy

15.1 VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (VNMK)

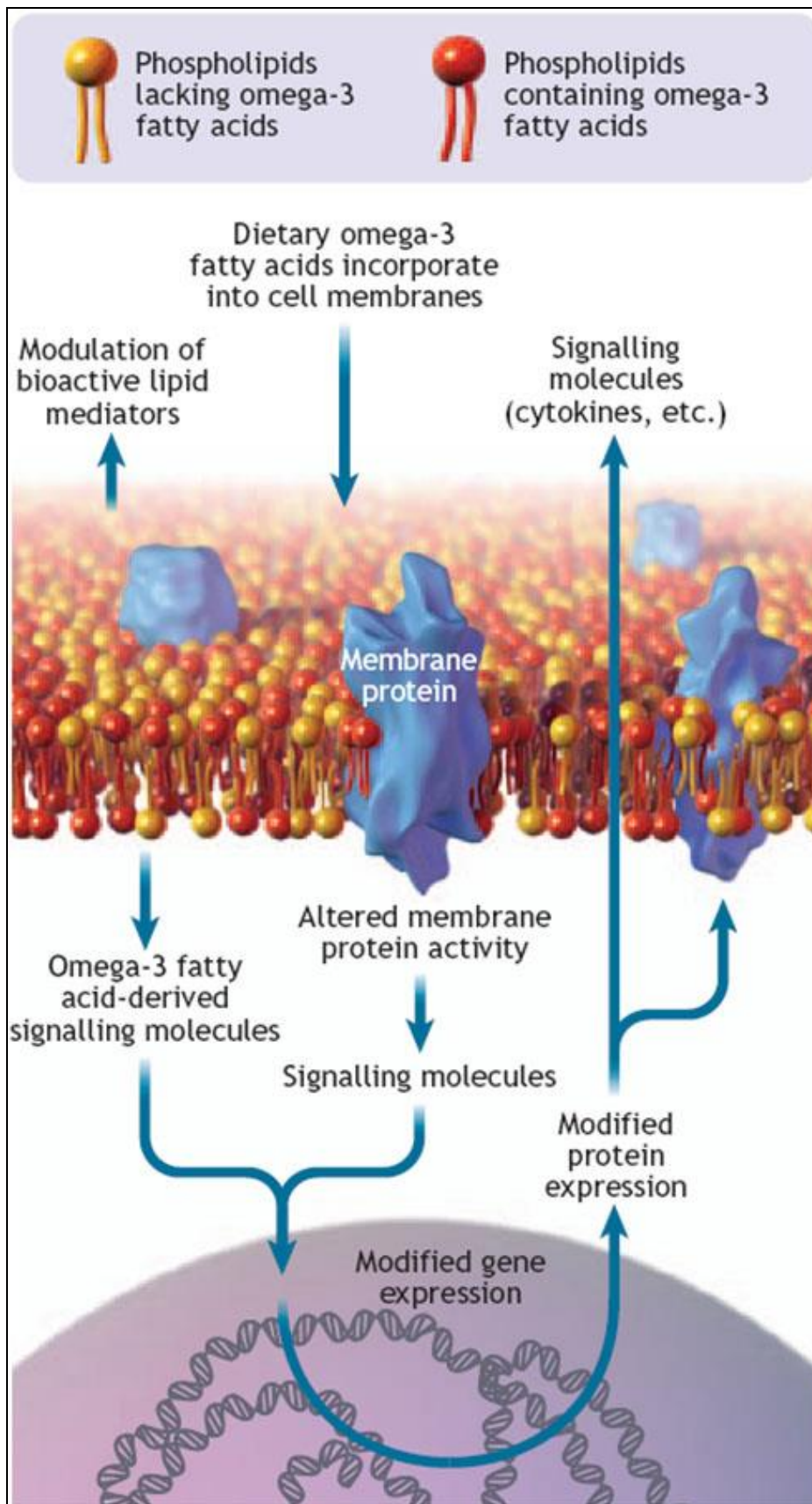
(VNMK, „polyunsaturated fatty acids –PUFAs“)

VNMK jsou mastné kyseliny s 2 i více dvojnými vazbami a hrají důležitou úlohu ve struktuře membrán a v syntéze důležitých metabolitů. Živočichové nedovedou syntetizovat n-3 a n-6 VNMK de novo ani nedovedou přeměnit jednu sérii v druhou. Tyto **esenciální mastné kyseliny** musí být obsaženy v potravě podobně jako vitamíny. Jsou životně důležité jako složka všech membrán a permeabilní bariéry pokožky a jako prekursory metabolitů - eikosanoidů a s nimi souvisejících látek, které hrají důležitou regulační úlohu ve tkáních. Zdrojem jsou rostlinné oleje (zejména n-6 PUFA) a rybí či řasový olej (n-3 VNMK). Mnoho mořských rostlin, zvláště jednobuněčných řas též může přeměňovat ALA na kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA). Ty se pak dostávají potravním řetězcem do ryb a jsou obsaženy v rybím tuku.

Buněčné membrány sestávají z lipidové dvojvrstvy složené z fosfolipidů a cholesterolu a z proteinů, které jsou v této dvojvrstvě zabudovány. V inkorporaci a metabolizaci MK poskytovaných potravou jsou rozdíly mezi jednotlivými buněčnými typy a mezi inkorporací do specifických fosfolipidů (např. n-3 VNMK mají specifickou úlohu v membránách nervového

systemu). *Poměr obsahu n-6 a n-3 VNMK ovlivňuje vlastnosti membrán, zejména jejich fluiditu a produkci látek vznikajících hydrolyzou membránových fosfolipidů.*

Pro životní procesy je důležité udržování příslušných **fyzikálně-chemických vlastností membrány**. *Tak modifikace MK v potravě mění složení fosfolipidových MK a ovlivňuje funkce zprostředkované membránovými proteiny: receptory, transportními proteiny, enzymy i funkce na membránu vázaných signálních molekul (G proteinů, fosfolipáz atd.) (obr. 15-3). VNMK jsou dále prekursory lipidových mediátorů, které hrají klíčovou úlohu v kardiovaskulárních a zánětlivých onemocněních i v procesu karcinogeneze. VNMK a jejich metabolity fungují spolu s cytokiny a hormony jako intra- i intercelulární mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě.*



Obr. 15-3 Inkorporace VNMK (n-3 a n-6) do fosfolipidové dvojvrstvy buněčných membrán a jejich modulační a signalizační funkce (*Surette ME, CMAJ 2008 : 177*)

Existují tři hlavní skupiny VNMK n-3 (omega-3), n-6 a n-9, podle polohy dvojných vazeb nejbližší ke koncovému metylovanému uhlíku.

Nomenklatura:

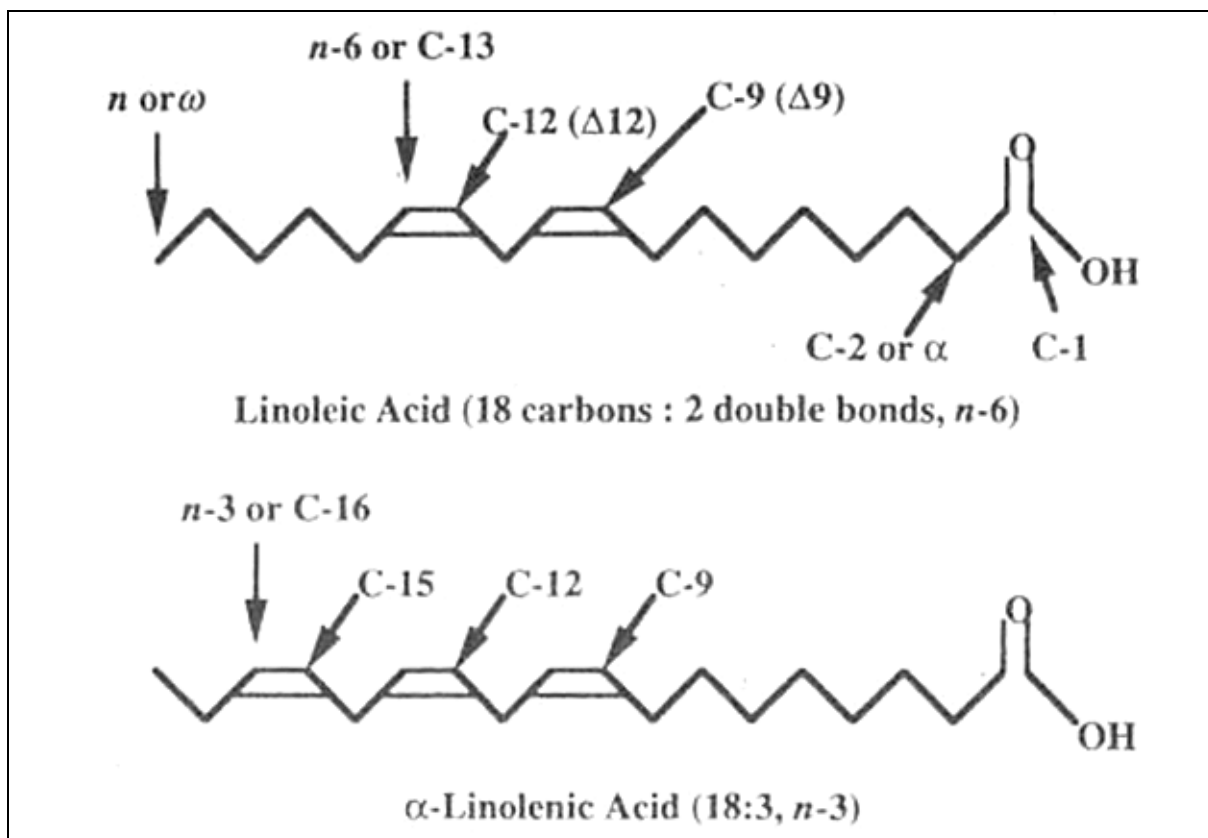
Např. dihomo-gamma-linolenová kyselina (DGLA), 20:3, n-6

- 20 - počet uhlíků
- 3 - počet konjugovaných dvojných vazeb
- n-6 - poloha první dvojných vazeb od metylovaného konce molekuly

Téměř všechny dvojných vazby jsou ve víceméně stabilní cis - konfiguraci. Všechny tři skupiny jsou metabolizovány stejným způsobem **alternativními desaturacími a elongačními enzymy.**

Všechny esenciální MK jsou polynenasycené, ale ne naopak. Např. n-9 VNMK nejsou esenciální - organizmus je může tvořit desaturací kyseliny olejové. Desaturací a elongační systém však preferuje n-3 a n-6 VNMK při dostatku LA a ALA v potravě. Přítomnost více než stopových množství 20:3, n-9 VNMK je indikátorem deficiencie esenciálních MK v potravě.

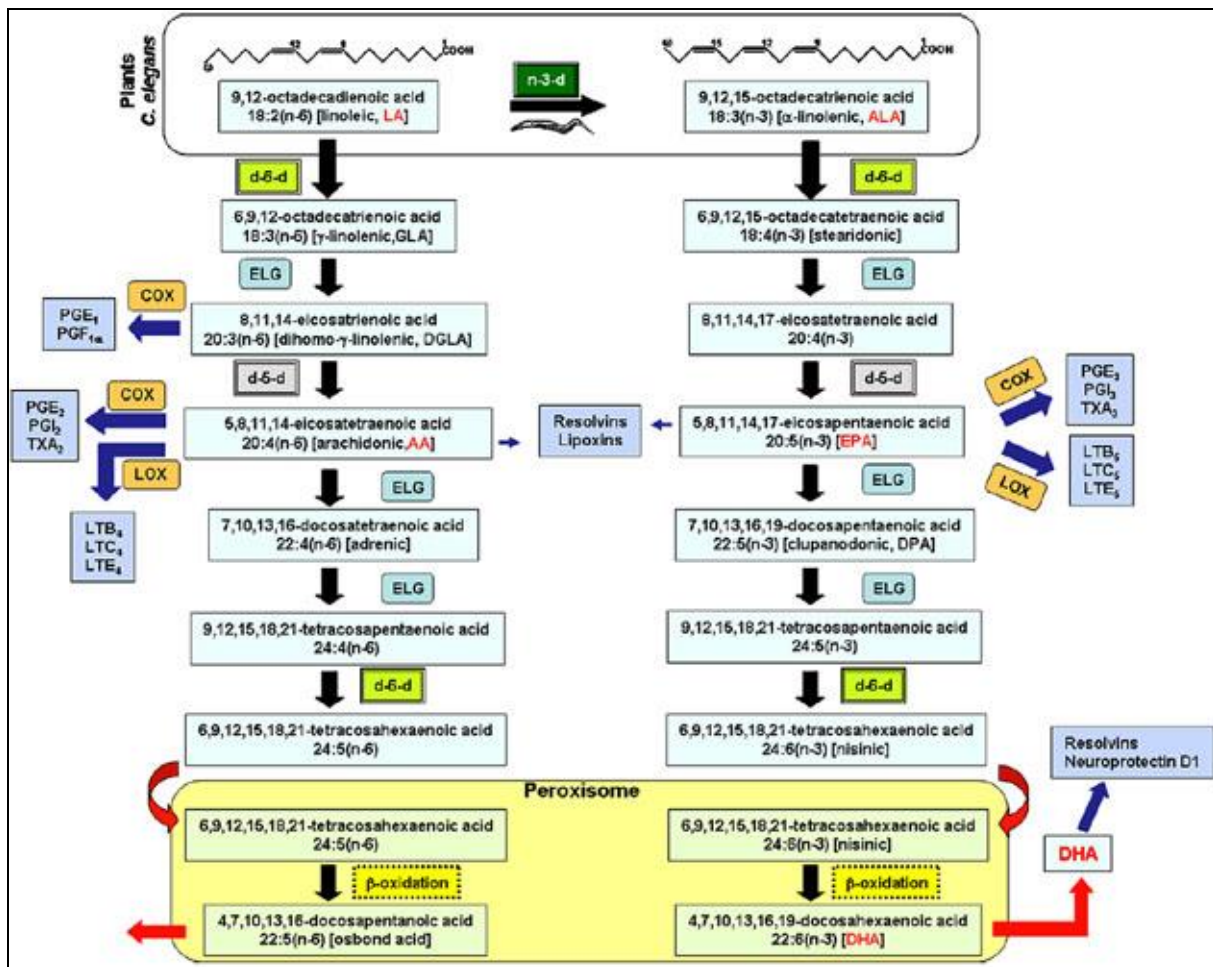
Hlavní esenciální VNMK poskytované potravou jsou cis formy LA a ALA (obr. 15-4). Jsou desaturovány a elongovány sérií reakcí, které prodlužují uhlíkový řetězec a přidávají další dvojných vazby). První krok je delta-6-desaturace (člověk, králík a prase vykazují pomalou desaturací, zatímco krysy a myši rychlou). Elongace je rychlá u všech druhů, ale delta-5-desaturace se zase liší. Mezi faktory, které inhibují delta-6-desaturací patří stárnutí, diabetes, vysoký obsah cholesterolu, vysoké uvolňování katecholaminu během stresu, nedostatek Zn, alkohol a virové infekce. Hladina LA v plazmě i hladina jejích metabolitů je snížena u alkoholiků, cystické fibrózy, infarktů myokardu atd.



Obr. 15-4 Struktura výchozích esenciálních mastných kyselin linoleové a alfa-linolenové

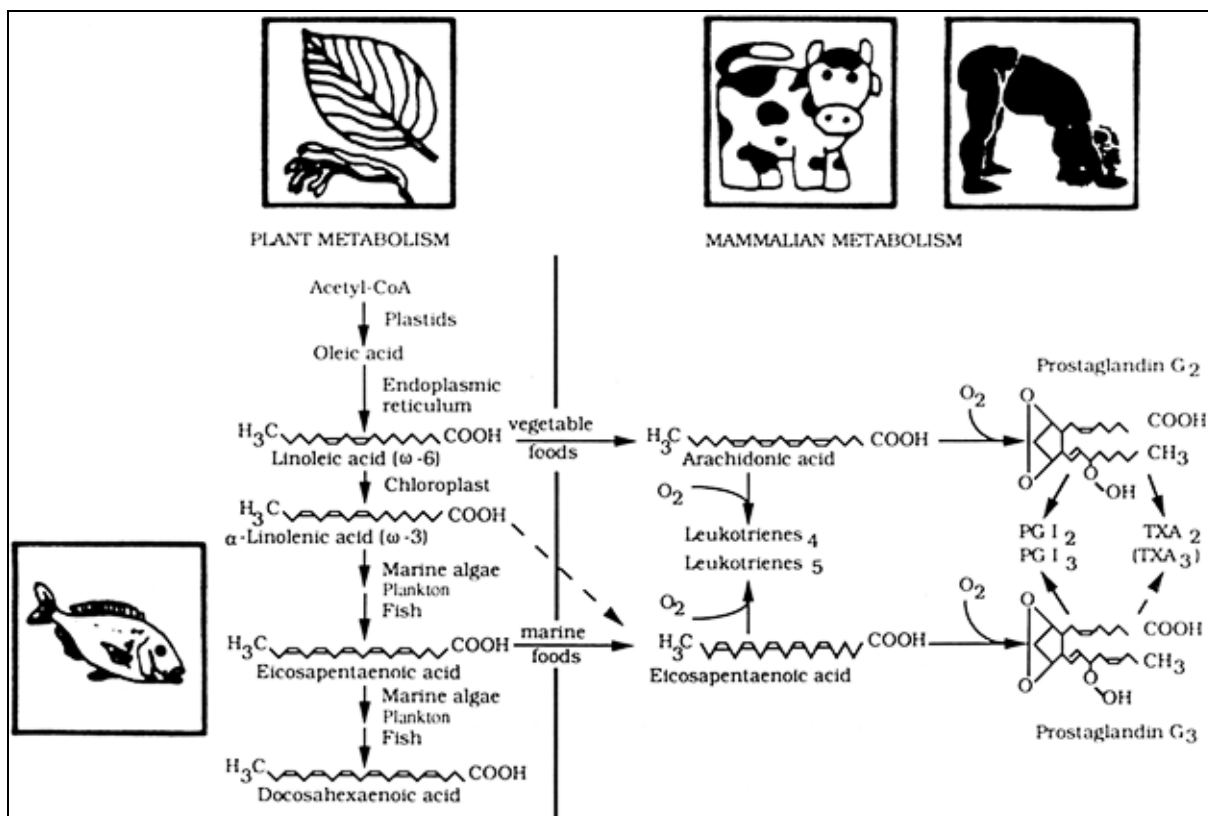
LA a od ní odvozená kyselina arachidonová (AA, 20:4, *n*-6) je důležitým zdrojem biologicky aktivních mediátorů - eikosanoidů (prostaglandiny, leukotrieny) a v experimentálních systémech je často prokazován podpůrný účinek pro vznik a rozvoj nádorů.

Naopak u **ALA a od ní odvozených EPA a DHA** byly prokázány v experimentálních systémech inhibiční protinádorové účinky. DHA (22:6, *n*-3) je potom nejvíce nenasycenou MK s 6 dvojnými vazbami a speciálními strukturálními vlastnostmi (obr. 15-5).



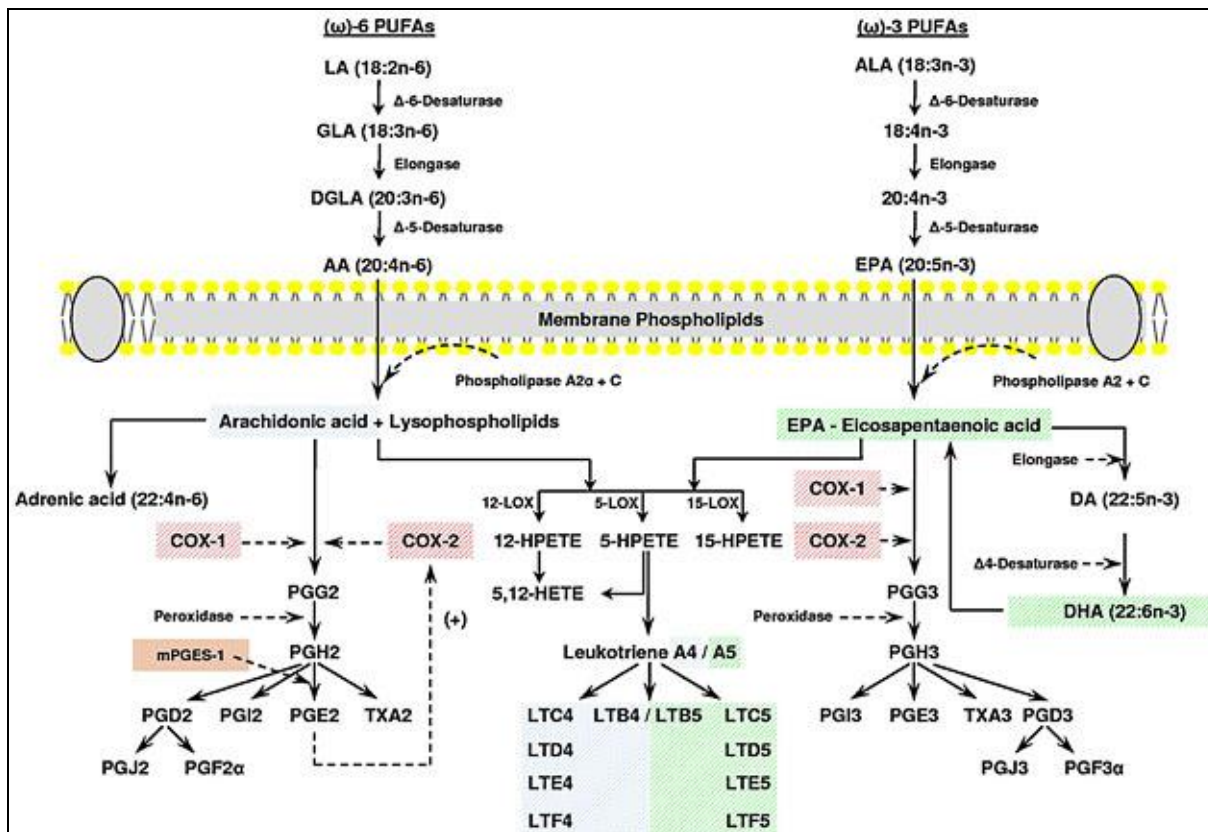
Obr. 15-5 Biosyntéza a metabolismus VNMK d-5(6)-d – desaturázy, ELG – elongázy (*Russo GL, Biochemical Pharmacology 2009 : 937*)

Zdroji esenciálních VNMK jsou rostliny i živočichové. Lidské (ale ne kravské mléko) je poměrně bohaté na desaturační produkty LA a ALA jako jsou kyselina gamma linolenová (GLA), DGLA, AA a EPA. AA je v potravě obsažena v mase, vejících a některé mořské potravě, ale některé metabolity nejsou běžné jinde než třeba v játrech, ledvinách, pankreatu, vaječnicích, testes. V současnosti byla GLA nalezena v některých rostlinných olejích (černý rybíz). Dlouhořetězcové n-3 VNMK jsou v mořské potravě (mořský plankton, řasy, tučné ryby - makrela, treska, sled', losos) (obr. 15-6).



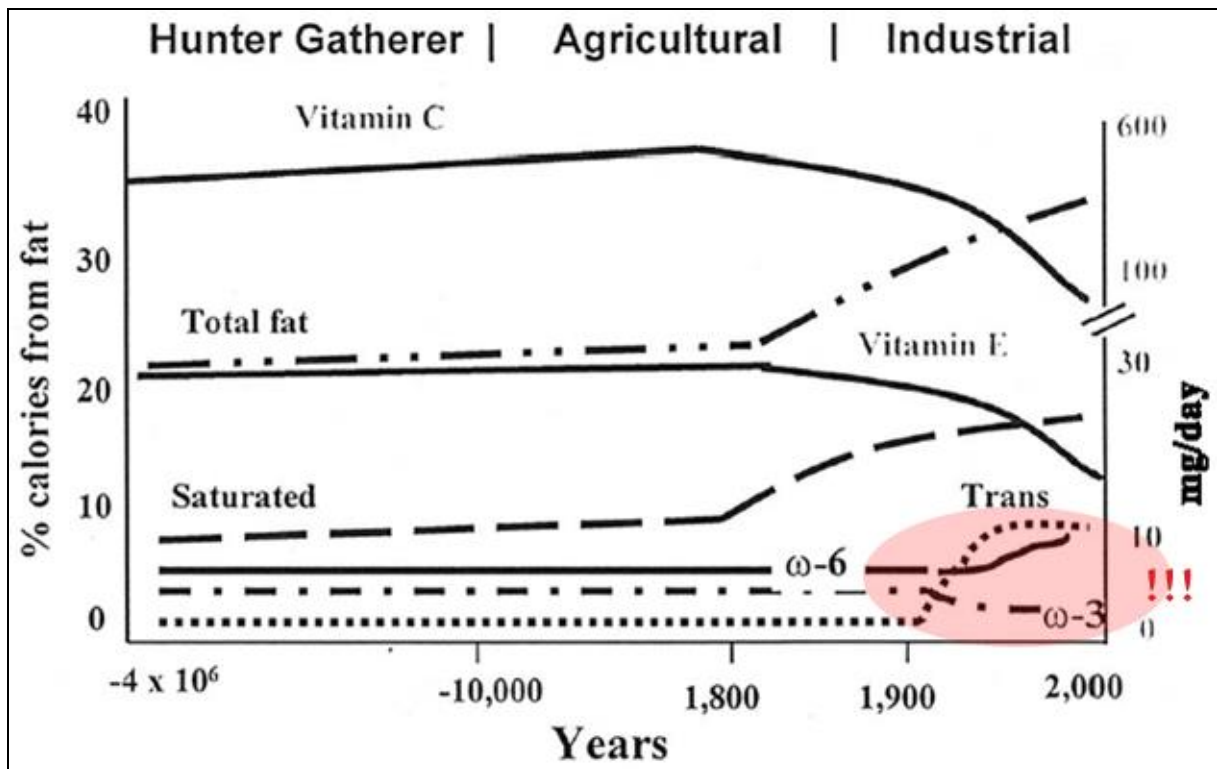
Obr. 15-6 Původ n-3 and n-6 VNMK a biosyntéza eikosanoidů z kyseliny arachidonové (n-6) a eikosapentaenové (n-3)

AA a EPA jsou prekursory eikosanoidů. Biosyntéza je katalyzována cyklooxygenázou (COX) 1 a 2 (vznik prostaglandinů a tromboxanů), 5- 12- a 15-lipoxygenázou – LOX (vznik leukotrienů a lipoxinů) a systémem monoxygenáza - cytochrom P 450 (vznik epoxykyselin a diolů). Eikosanoidy mají široké spektrum biologických aktivit a působí již ve velmi malých koncentracích. V odpověď na řadu stimulů je aktivován **systém fosfolipáz**, které uvolňují z fosfolipidů buněčných membrán AA, která je metabolizována na prostaglandiny (PG), tromboxany (TX, způsobují agregaci destiček a vazokonstrikci) a prostacyklin PGI₂ enzymem COX 1 a 2 a prostřednictvím LOX na řadu typů hydroperoxykyselin (HPETE) a leukotrieny (LT). EPA může být metabolizována na PGI₃, který je aktivní jako vasodilatační a antiagregační a v malém množství TXA₃, který je inaktivní a LT typu 5. Dalšími metabolity jsou pak resolviny a neuroprotektiny vznikající rovněž z DHA (obr. 15-7).



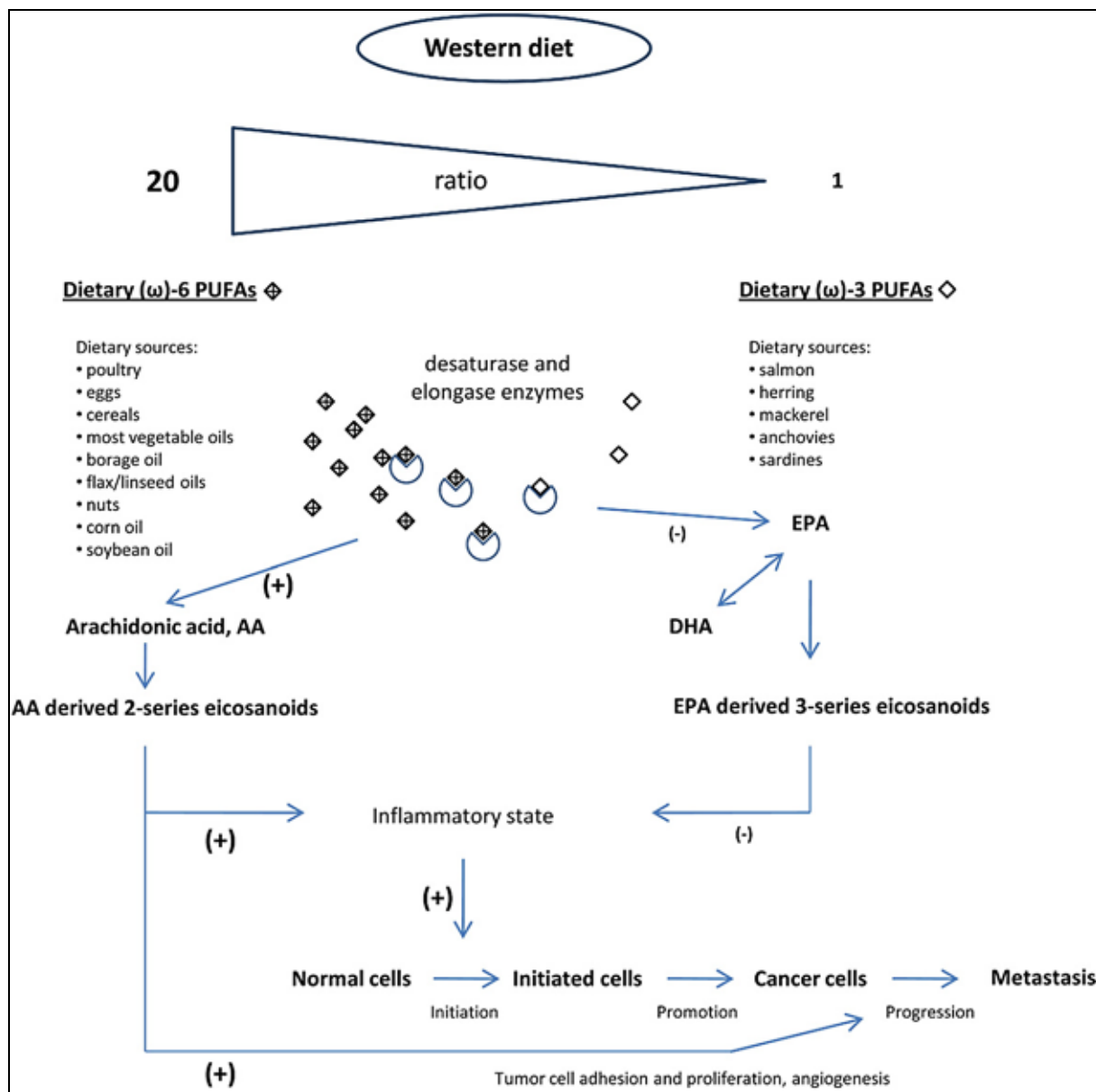
Obr. 15-7 Zjednodušené schéma hlavních drah metabolismu n-6 a n-3 VNMK

V průběhu vývoje lidské společnosti od lovců sběračů přes zemědělskou k industriální společnosti se také zásadně změnila spotřeba a spektrum lipidů ve výživě. Během průmyslové revoluce došlo zejména k prudkému nárůstu spotřeby celkového tuku a nasycených MK se současným poklesem příjmu antioxidantů ve formě vit C a E a rovněž se rozevřely nůžky mezi spotřebou n-6 a n-3 VNMK v neprospěch n-3 (obr. 15-8). Poměr n-6:n-3 VNMK v dietě drasticky změnil a uvádí se, že v tzv. západní dietě (Western diet) je dnes místo 1:1 poměr změněn na 10-25:1. V potravinách se také objevily **trans mastné kyseliny** vznikající průmyslovým zpracováním tuků, které mohou mít negativní dopady na lidské zdraví. Zatímco proteiny jsou geneticky determinovány, složení buněčné membrány s ohledem na VNMK je z velké části závislé na příjmu z potravy. Kanada se stala první zemí s dietetickými doporučeními množství n-3 a n-6 VNMK pro různé věkové skupiny a těhotné ženy.



Obr. 15-8 Relativní procento různých mastných kyselin v potravě a změny v průběhu vývoje lidské populace od lovců sběračů, zemědělskou společnost a společnost po průmyslové revoluci (*Simopoulos AP, Exp Biol Med 2008 : 674*)

VNMK typu n-3 a n-6 jsou metabolicky i funkčně odlišné, ale *soutěží o stejné desaturační a elongační enzymy*. Důsledkem dodání n-3 VNMK je tak inhibice syntézy AA z LA a snížení produkce aktivních eikosanoidů. Jejich rovnováha je důležitá pro homeostázu a normální vývoj. Nepoměr n-3 a n-6 VNMK pak přispívá mj. i k rozvoji zánětlivých a nádorových onemocnění (obr. 15-9).



Obr. 15-9 Potenciální mechanismy typické západní diety bohaté na n-6 VNMK podporující zánět a karcinogenezi (*Schumacher MC et al., Urologic Oncology 2011 : 318*)

15.2 NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY V KARCINOGENEZI

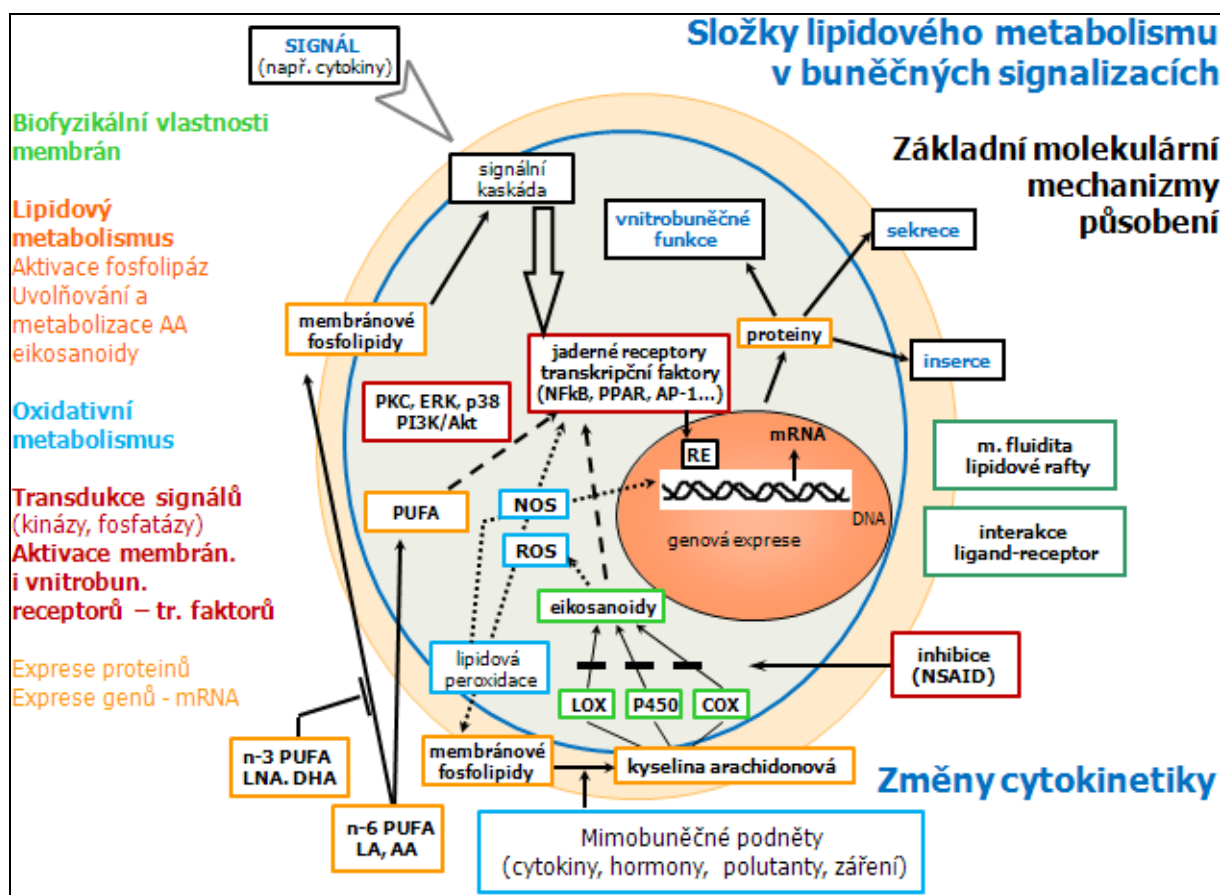
Epidemiologické, klinické a laboratorní studie poukazují na důležitost množství a druhu konzumovaných tuků v etiologii a přežívání některých druhů nádorů (zvláště prsu, kolonu). Zatímco nasycené mastné kyseliny mohou stimulovat iniciaci karcinogeneze, **nenasyčené mastné kyseliny** mohou působit v promoční a progresivní fázi v dávkové závislosti. Epidemiologické studie předpokládají, že nízkotuková dieta v kombinaci s nenasycenými MK, kde je vyvážený poměr n-3:n-6 souvisí s nižší mortalitou nádoru prsu a kolonu. Úloha těchto VNMK je zkoumána rovněž u dalších typů nádorů gastrointestinálního traktu (např.

pankreatu) i u nádorů prostaty. Některé tuky, zvláště s obsahem mononenasyčených nebo n-3 VNMK nemají promoční účinky, i když jejich obsah v potravě je vysoký.

Během posledních 10-15 let se objevilo několik tisíc studií na tkáňových kulturách, živočišných modelech i klinické studie, které sledují úlohu n-3 VNMK (EPA, DHA) z hlediska jejich antitrombických, hypolipidemických, antihypertensních a protizánětlivých účinků. Průlomové byly práce Kang a spol. z Bostonu v Massachusetts, kteří objevili ***Fat-1 gen (C. elegans) kódující omega 3 desaturázu***, kterou savci postrádají a prokázali celou škálu prospěšných účinků n-3 VNMK na modelech transgenních buněk, myši, prasat apod. Byly prokázány antiarytmické, protizánětlivé, antialergické, neuroregenerativní i protinádorové účinky. Přesné mechanismy účinků různých lipidů a VNMK nejsou však stále objasněny.

Hlavními uvažovanými mechanismy působení VNMK, které se mohou uplatňovat v průběhu karcinogeneze jsou

- *strukturální a funkční změny membrán, jejichž nedílnou součástí VNMK jsou. Ovlivnění biofyzikálních i biochemických vlastností membrán má dopad zejména na funkci na membránu vázaných proteinů, přenašečů a receptorů.*
- *produkce specifických metabolitů ovlivňujících buněčné signálování a genovou expresi, např. eikosanoidy, ceramid, DAG atd. i imunitní systém a uplatňujících se v zánětu*
- *produkce množství ROS a NOS a lipidové peroxidy vznikající metabolizací VNMK a ovlivňující řadu dějů v buňkách a tkáních. VNMK ovlivňují i antioxidační systémy a dochází ke změnám redoxní rovnováhy.*
- *přímé působení na vnitrobuněčné signální složky jako jsou, specifické signální molekuly (kinázy, fosfatázy) a transkripční faktory. V důsledku toho dochází pak ke změně přenosu signálů a exprese genů s dopady na chování buněk.*



Obr. 15-10 Složky lipidového metabolismu v buněčných signalizacích. Základní molekulární mechanismy působení. (adaptováno podle Miles E.A. and Calder P.C., Proc Natur Soc 1998 : 277)

Účinky tuků mohou být přímé (zahrnují změny ve struktuře a funkci buněčných membrán) nebo nepřímé (zahrnují změny v endokrinním systému a metabolismu VNMK, tj. syntéza PG a LT a dále suprese imunitní odpovědi). Některé VNMK mohou účinně a přímo řídit transkripci specifických genů (např. geny kódující lipogenní proteiny, delta desaturázy atd.).

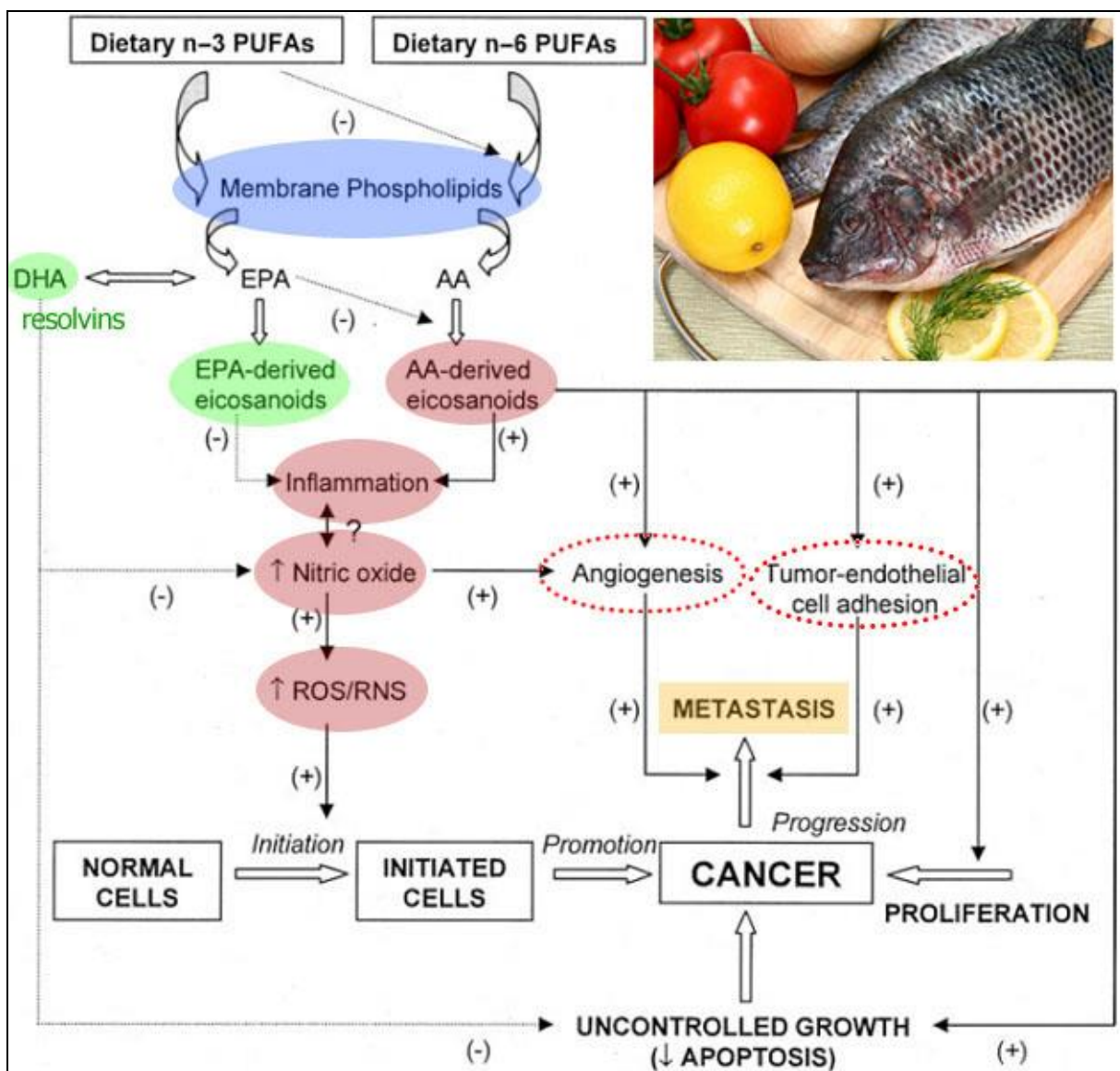
Tak může příznivý a nepříznivý účinek lipidů na různé choroby zahrnovat kombinaci interaktivních regulačních mechanismů:

1. *akutní, rychlá a přímá regulace exprese genů*
2. *dlouhodobá adaptivní modulace složení membrán, která může přímo ovlivnit příjem a přenos signálů hormonů, cytokinů, produkci eikosanoidů apod.*

Výsledky na zvířecích modelech s nádory indukovanými karcinogeny nebo transplantovanými nádory ukazují, že n-3 VNMK mohou snižovat výskyt nádorů, jejich velikost i rychlost růstu. Naopak u n-6 VNMK byl mnohdy prokázán podpůrný účinek na tvorbu a vývoj nádorů. N-3 VNMK v dietě snižují tvorbu PGE₂ a zabraňují nebo zpožďují tvorbu transplantovaných

nádorů u laboratorních zvířat. Ve studiích s buňkami lidského nádoru prsu na nahých myších měly myši krmené tukovou dietou obsahující n-3 VNMK méně plicních metastáz, snížený obsah estrogenu a prolaktinu v séru, méně PGE₂ v nádoru a redukovanou hladinu mRNA pro c-myc onkogen v buňkách nádorové tkáně.

Živočišné studie v současné době využívají podávání rybího oleje k odhalení mechanismů včetně změn v produkci PGE₂, imunitní funkce, tvorby volných radikálů, změn ve fluiditě membrán, modulace vnitrobuněčného transportního systému, hormonální sekrece, využití kalorií i genové exprese. Nádorově podpurné působení některých tuků může také souviset s jejich schopností snižovat nebo inhibovat mezibuněčnou komunikaci a blokovat tak metabolickou kooperaci. Ztráta zpětnovazebné kontroly pak přispívá k nádorovému bujení (obr. 15-11).



Obr. 15-11 Potenciální mechanismy podpůrných a supresivních účinků n-6 a n-3 VNMK v karcinogenezi (*Larsson SC et al., Am J Clin Nutr 2004 : 935*)

Řada výzkumných týmů je zaměřena na výzkum mechanismů účinků VNMK u nádorových buněk *in vitro* v tkáňových kulturách. Bylo zjištěno, že tyto látky působí cytostaticky a cytotoxicky na řadu nádorových linií, ale ve stejných koncentracích tak většinou nepůsobí na nenádorové ekvivalenty těchto buněk. Nejúčinnější jsou VNMK se 3 a 4 dvojnými vazbami (AA, gamma linoleová, LA). VNMK s 2 a 6 vazbami jsou inaktivní a EPA s 5 je středně aktivní. Rybí olej obsahující EPA a DHA je též účinný. Významné protinádorové působení bylo ale potvrzeno rovněž u konjugované kyseliny linoleové (cLA, n-6).

Současné údaje prokazují vedoucí úlohu lipidů v kontrole peroxidativního poškození membrán. Dvojně nenasycené vazby podléhají autokatalytickému procesu, který produkuje celou řadu produktů. **Peroxidace lipidů hraje důležitou regulační roli v mitotické aktivitě buňky prostřednictvím produktů degradace membránových lipidů.** Tento mechanismus je v nádorových buňkách defektní, stupeň peroxidace je nízký a metabolismus reaktivních druhů kyslíku je aberantní.

Při maligní transformaci dochází kromě jiných změn též k *restrikci exprese antioxidantní enzymatické ochrany buňky. Oxidativní stres pak poškozuje lipidové struktury membrány a snižuje obsah VNMK.*

V růstové fázi nádoru je jeden z kontrolních mechanismů buněčného dělení, inhibiční působení produktů peroxidace lipidů na syntézu DNA, značně sniženo. Membrány nádorových buněk jsou změněny co do složení a strukturální organizace lipidů v raném stadiu neoplastické transformace mimo jiné v důsledku snížení antioxidantní ochrany.

Nádorové buňky jsou pak rezistentní k peroxidaci lipidů díky:

1. *nízkému obsahu VNMK*
2. *snížení koncentrace cytochromu P-450*
3. *sníženému obsahu NADPH*
4. *zvýšené antioxidantní aktivitě (opak než při transformaci)*

Metabolismus a obrat fosfolipidů v membránách i oxidativní metabolismus nádorových buněk se zásadně liší od buněk nenádorových.

Např. nádorové buňky kolonu vykazují:

- změny ve spektru a koncentraci VNMK ve srovnání s normální tkání
- zvýšenou periferní utilizací VNMK z potravy, změny v oxidativním metabolismu a antioxidační ochraně
- zvýšenou aktivitu enzymů metabolismu AA (COX-2, 12-LOX) a produkci eikosanoidů
- sníženou citlivost k endogenním inhibitorům růstu (TGF- β 1), induktorům apoptózy (TNF α , FasL, TRAIL) a diferenciaci (butyrát)

Některé zdroje uvádějí, že stupeň tumorigenicity nepřímo úměrně koreluje s obsahem VNMK v membránách buněk. VNMK zabíjející nádorové buňky v kultuře mohou iniciovat vlastní peroxidaci zvýšeným počtem superoxidových radikálů. Normální buňky tak nereagují, což skýtá možnosti selektivního ovlivňování nádorových buněk.

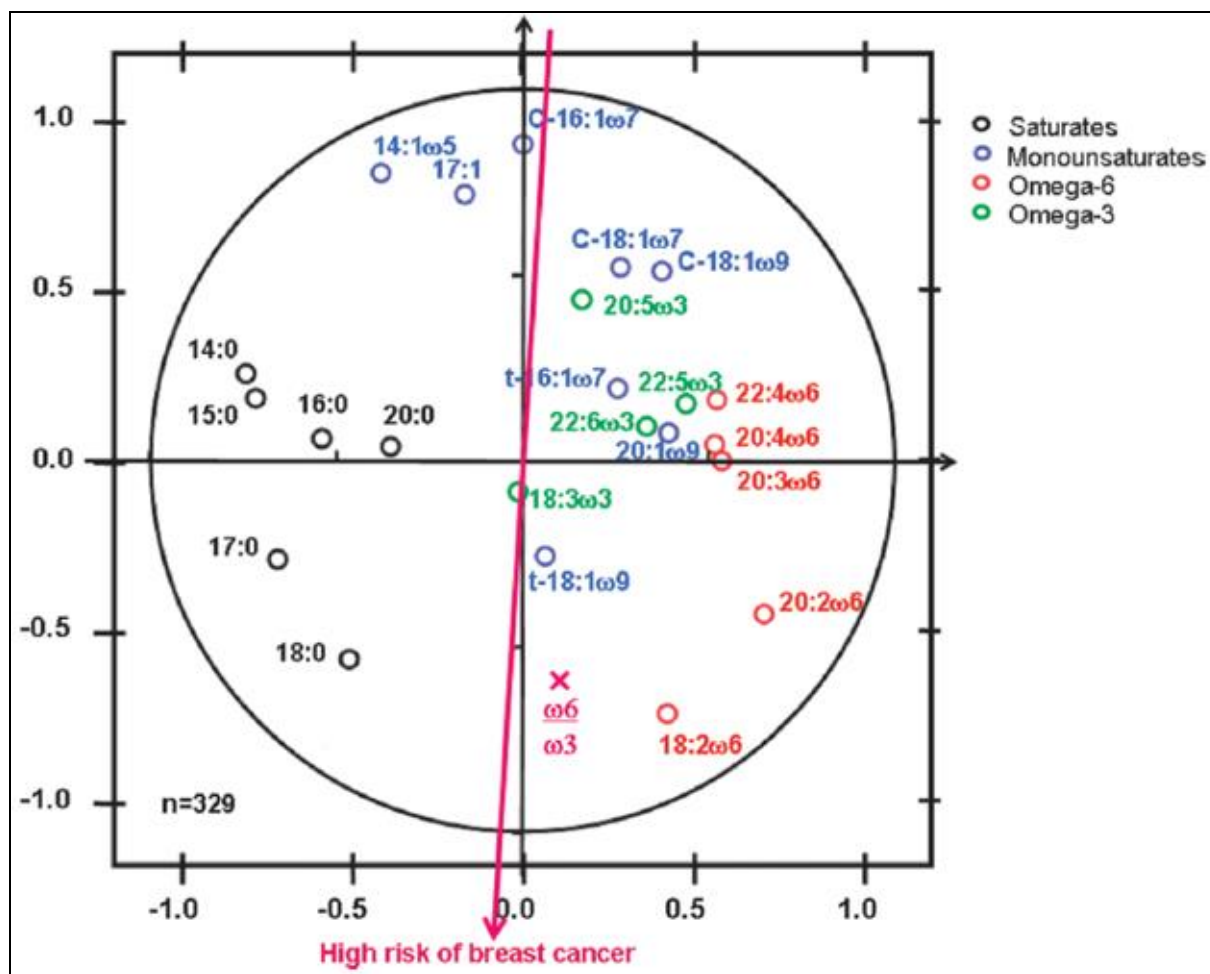
V experimentálních systémech *in vivo* byly prokázány změny spektra MK v plazmě i tkáních po podávání n-6 nebo n-3 VNMK (obr. 15-12). V plazmě nádorových pacientů a v nádorové tkáni a buňkách byly ve srovnání s nenádorovými buňkami prokázány změny ve složení a metabolismu lipidů. Jedná se zejména o snížení obsahu n-3 VNMK (DHA) ve srovnání s n-6 (LA a AA). Ukázalo se, že dlouhodobější podávání vysokých dávek EPA a DHA zvyšuje jejich obsah v plazmě, v membránách erytrocytů, ale i v membránách buněk jiných tkání vč. nádorových.

Diet, Cancer, and the Lipidome				
Table 1. Changes in rat WAT fatty acid composition induced by either α -linolenic acid or DHA supplementation (16, 19)				
Fatty acids (mol%)	α -Linolenic acid		DHA	
	Control (n = 12)	Supplemented (n = 14)	Control (n = 7)	Supplemented (n = 6)
Saturates				
16:0	15.2	17.3	22.9	20.8
18:0	2.7	2.9	2.8	3.4
Total*	19.4	21.8	27	28.9
Monounsaturates				
c-18:1 ω 9	56.9	48.3 [†]	52.7	43.8 [†]
Total [†]	62.4	54.7 [†]	57.9	48.9 [†]
ω 6 PUFA				
18:2 ω 6	13.9	13.4	12.2	11.1
Total [†]	14.4	13.7	12.7	11.3
ω 3 PUFA				
18:3 ω 3	1.3	6.9 [†]	0.6	0.8
22:6 ω 3	0.1	0.1	0.1	8.2 [†]
Total [†]	1.4	7.0 [†]	0.7	9.3 [†]
Ratio				
ω 6/ ω 3	10.3	1.9 [†]	18.1	1.2 [†]

*Including: 14:0, 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, and 24:0.
[†]Within diet, significantly different from control values ($P < 0.05$).
[†]Including: 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, c-18:1 ω 7, and 20:1.
[†]Including: 18:3 ω 6, 20:2 ω 6, 20:3 ω 6, and 20:4 ω 6.
[†]Including: 20:3 ω 3, 20:5 ω 3, 22:5 ω 3, and 22:6 ω 3.

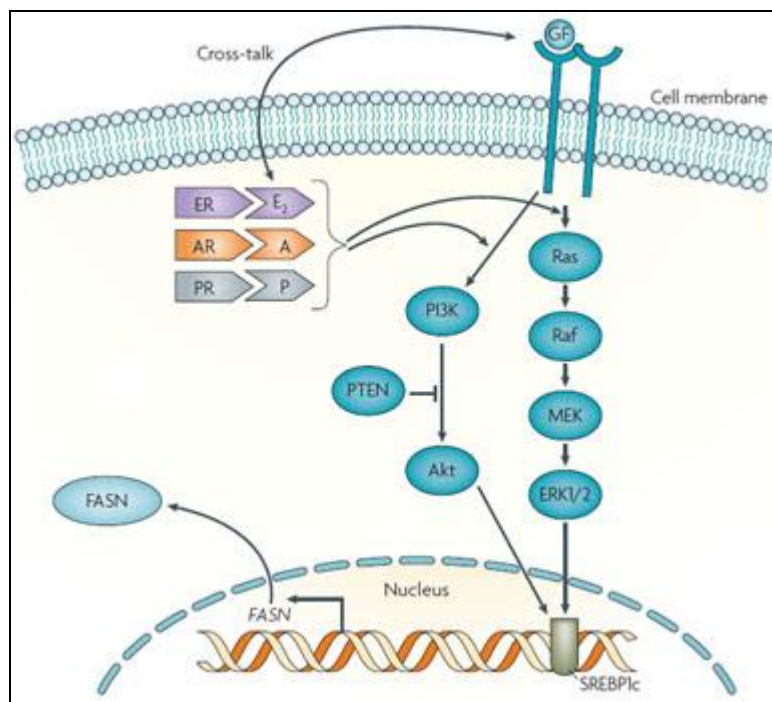
Obr. 15-12 Změny spektra mastných kyselin v tukové tkáni krysu po podávání alfa-linolenové a dokosaheptaenové kyseliny WAT – white adipose tissue (Bougnoux P. et al, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 : 416)

*Integrovaný pohled na komplexní lipidové interakce, které určují výsledný tzv. **lipidom** tvoří lipidový profil jednotlivce, který může být důležitý s ohledem na riziko vzniku některých typů nádorových onemocnění ovlivňovaných dietou. S protekcí určitých typů nádorů (např. prsu) je spojen složený indikátor kombinující zvýšené mononenasyčené MK a nízký poměr n-6/n-3 PUFAs. Tento lipidom by se mohl stát templátem pro detekci rizika nádorů prsu ve vztahu k dietě (obr. 15-13).*

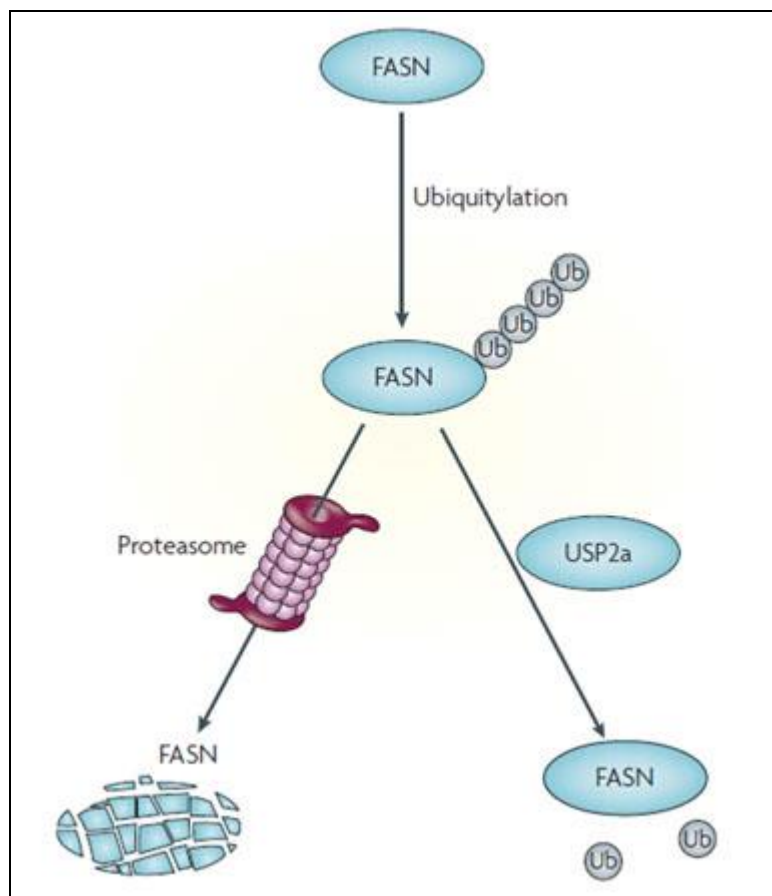


Obr. 15-13 Analýza hlavních komponent (PCA) mastných kyselin v tukové tkáni ukazující zvýšené riziko nádoru prsu (Bougnoux P. et al, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 : 416)

Během karcinogeneze se vyvíjí tzv. lipogenní charakter buněk. Znamená to *zvýšenou endogenní syntézu mastných kyselin a sníženou citlivost k nutričním zásahům. Syntáza mastných kyselin (FASN – fatty acid synthase) funguje pod transkripční kontrolou tzv. SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein), jehož aktivita může být ovlivňována hormonálně a nutričně a je napojena částečně na signálovou transdukcii přes fosfoinositol-3 kinázu (PI3K)/Akt a ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) regulující expresi a maturaci SREBP (obr. 15-14a, 15-14b).*

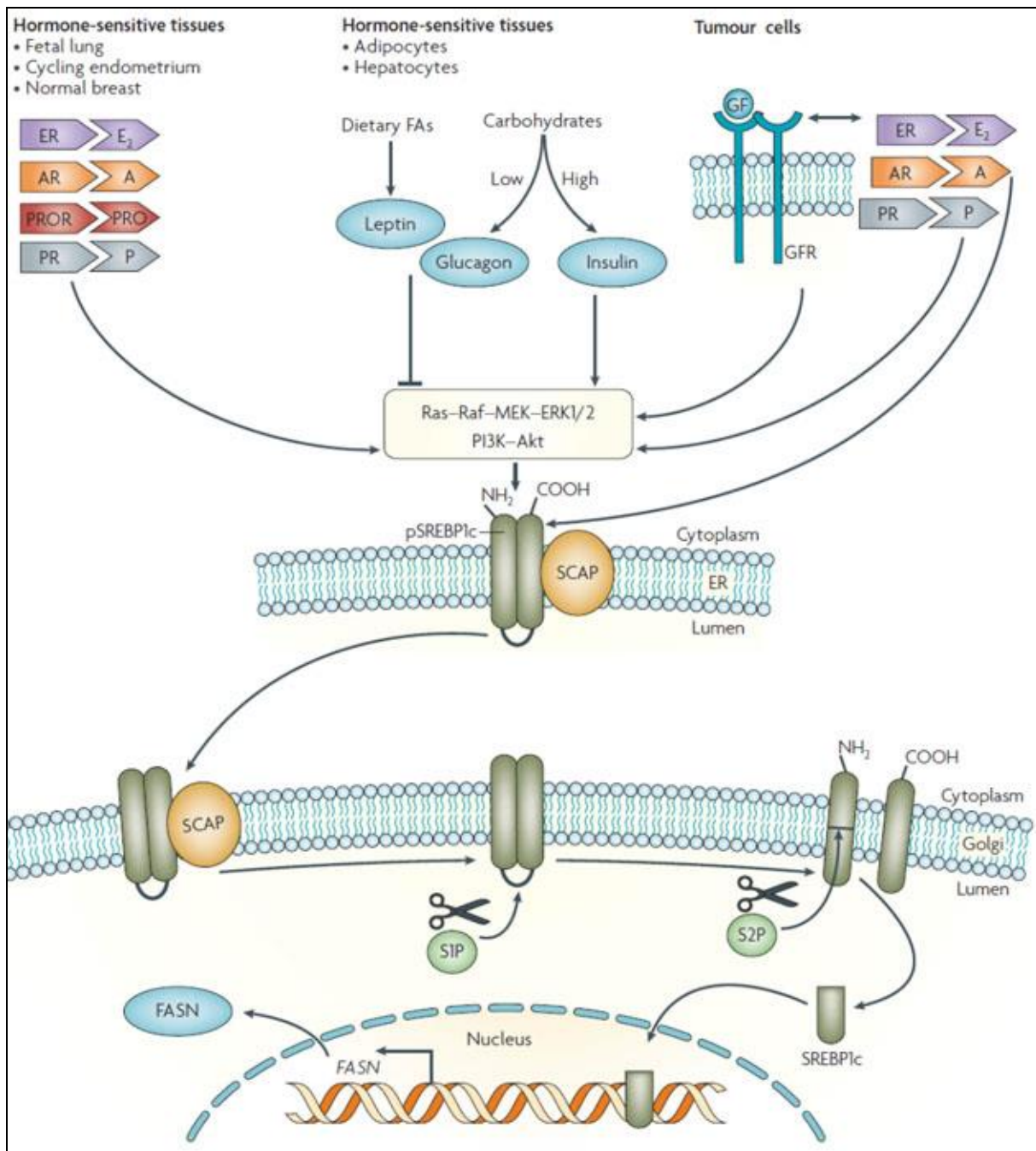


Obr. 15-14a Hlavní dráhy regulující expresi s nádorem spojené FASN (*fatty acid synthase*). Stimulace signálních drah PI3K/Akt a MEK/ERK1/2 růstovými faktory nebo hormony (estrogen-ER, progesteron-PR, androgen-AR) vázícími se na příslušné vnitrobuněčné receptory aktivuje transkripční faktor SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein), pod jehož transkripční kontrolou FASN funguje. Nádorový supresor PTEN tento proces inhibuje. (*Menendez JA and Lupu R Nature Rev 2007 : 763*).



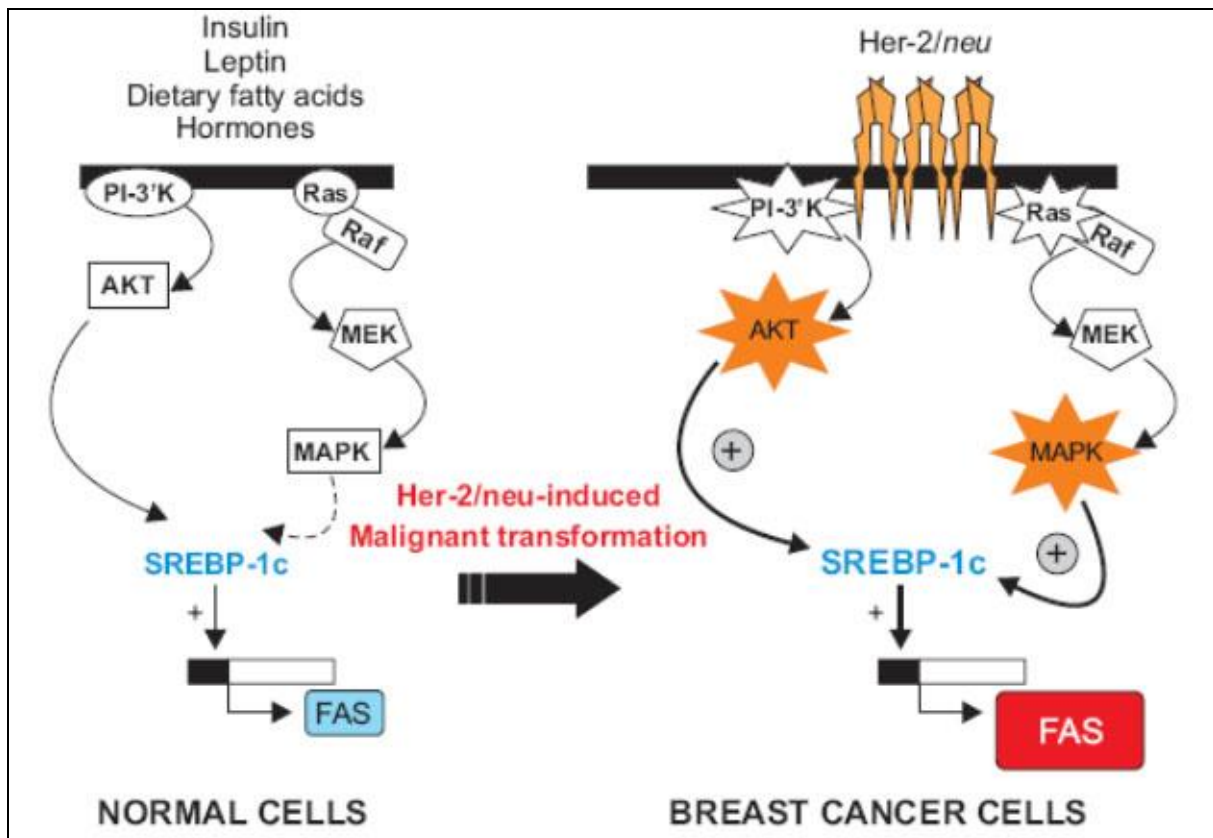
Obr. 15-14b Hlavní dráhy regulující expresi s nádorem spojené FASN (*fatty acid synthase*). S nádorem spojená zvýšená exprese FASN může být dosažena i posttranslačně stabilizací enzymu pomocí proteázy USP2a (Menendez JA and Lupu R *Nature Rev* 2007 : 763).

U nádorových buněk hyperaktivace této dráhy v důsledku onkogenní deregulace (nadprodukce růst. faktorů, hyperaktivace receptorů, nebo ztráta funkce negativních regulátorů, např. PTEN) způsobí konstitutivní expresi či maturaci SREBP1c, zvýšenou transkripci a aktivitu FASN a v důsledku toho zvýšenou syntézu lipidů, které jsou vyžadovány pro energii i stavbu buněčných membrán při rychlém dělení nádorových buněk (obr. 15-15).



Obr. 15-15 Modulační traskripčního faktoru SREBP1c (sterol regulatory element – binding protein)
(Menendez JA and Lupu R Nature Rev 2007 : 763)

U nádorů prsu byla např. detekována zvýšená exprese a aktivace receptoru Her-2/neu (receptor pro EGF) a aktivace signálních drah PI3K/Akt a MAPK (mitogen activated protein kinase). Aktivita tohoto receptoru může být také ovlivňována složením lipidových raftů. Během maligní transformace se tak zvyšuje exprese a aktivita FASN. Tyto procesy mohou být ovlivněny, hormony či dietetickými faktory (obr. 15-16).



Obr. 15-16 Zvýšení exprese a aktivity FASN během buněčné transformace u nádorů prsu (Menendez JA et al Drug News Perspect 2005 : 375)

15.3 METABOLIZMUS VNMK, TVORBA EIKOSANOIDŮ

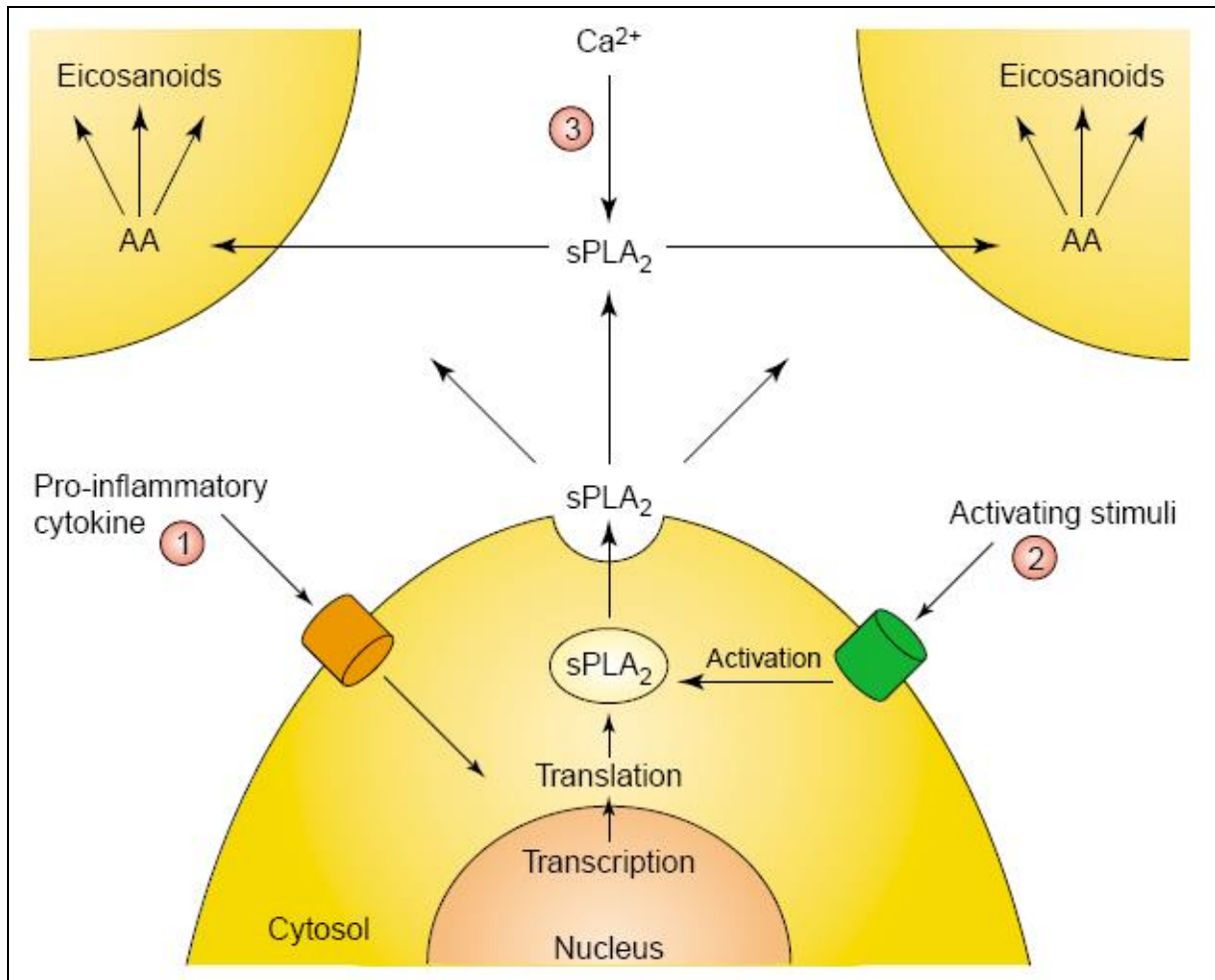
VNMK mohou v buňkách fungovat přímo nebo jsou metabolizovány na velkou škálu více či méně stabilních oxidačních produktů. V důsledku různých podnětů jsou také vázané VNMK (AA, EPA, DHA) uvolňovány z sn-2 pozice membránových fosfolipidů a to enzymy fosfolipázami a přeměna na eikosanoidy je katalyzována cyklooxygenázami (izoenzymy COX-1 a COX-2), lipoxygenázami (nejběžnější 5-, 12- a 15- LOX) a cytochromy P-450.

Fosfolipáza A2 je enzym účastnící se lipidového metabolismu, důležitý pro řadu buněčných procesů. Rozlišují se tři skupiny:

- sekretovaná PLA2 (sPLA2),
- na vápníku nezávislá PLA2 (iPLA2),
- na vápníku závislá cytosolová PLA2 (cPLA2).

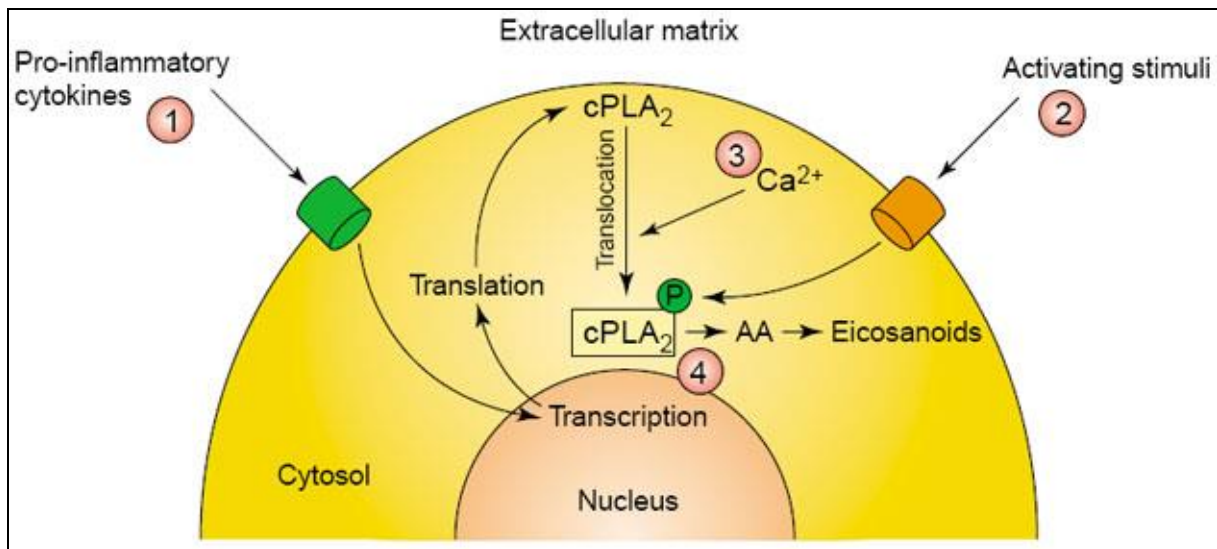
Kromě úlohy v buněčném signálování souvisejí PLA2 s různými patologickými stavy, včetně zánětu, tkáňové reparační a nádorů. U řady nádorů byly detekovány zvýšené hladiny sPLA2 a cPLA2, takže jsou tyto molekuly také cílem protinádorové terapie.

sPLA2 se uplatňuje v zánětlivé odpovědi. Prozánětlivé cytokiny indukují její expresi aktivací faktory uvolňují sPLA2 ze sekrečních granul do extracelulární matrix. Za přítomnosti Ca^{2+} hydrolyzuje sPLA2 membránové fosfolipidy sousedních buněk. Uvolnění AA a následná tvorba eikosanoidů pak indukuje zánět (obr. 15-17).



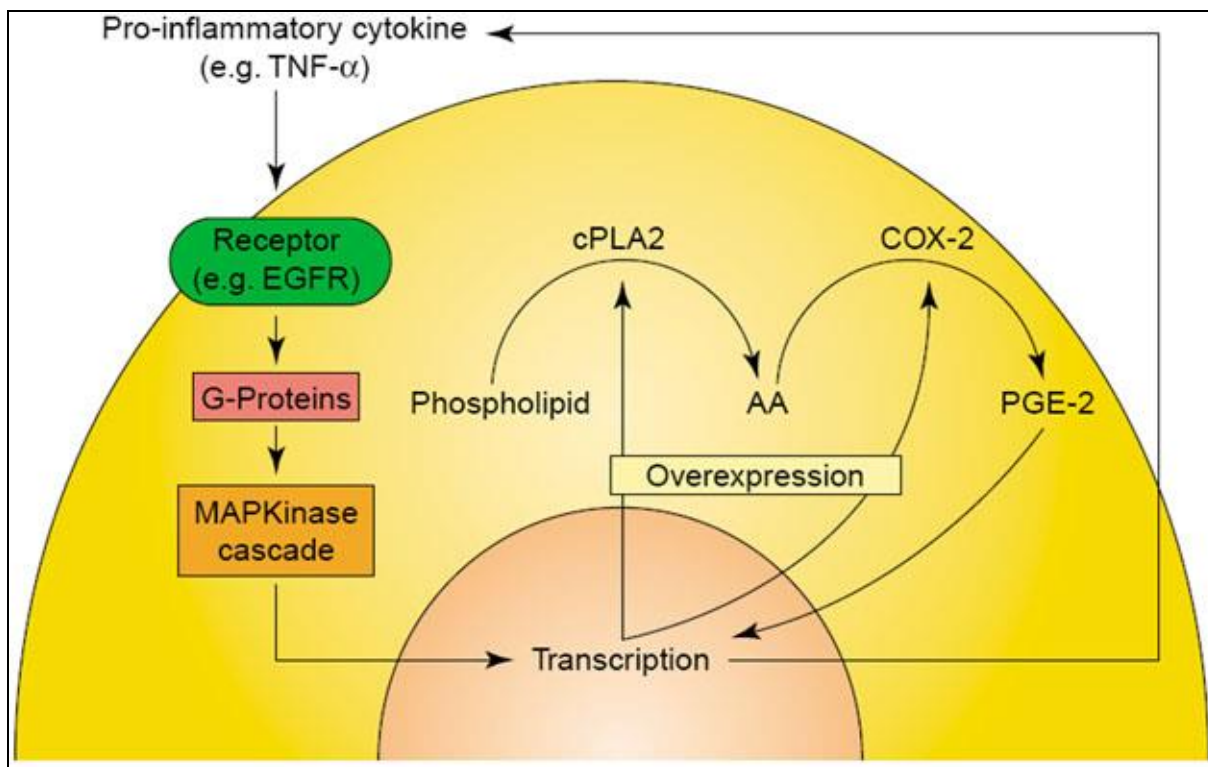
Obr. 15-17 Uplatnění sPLA2 v zánětlivé odpovědi (Laye JP and Gill JH, *Drug Discovery Today* 2003 : 710)

Prozánětlivé cytokiny indukují také expresi **cPLA2**. Následuje fosforylace zprostředkovaná MAP kinázami. Ca^{2+} způsobuje translokaci cPLA2 z cytosolu do perinukleární membrány, kde je také její substrát a enzymy nutné k tvorbě eikosanoidů. Aktivovaná cPLA2 lyzuje membránové fosfolipidy a uvolňuje AA, která je metabolizována COX a LOX (obr. 15-18).

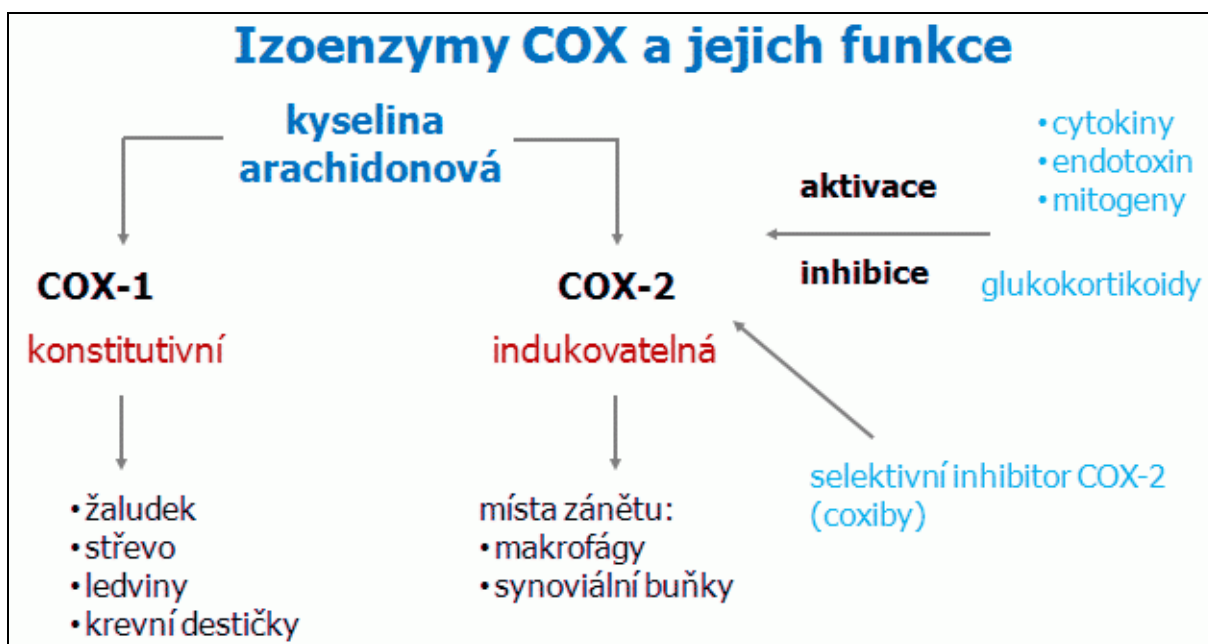


Obr. 15-18 Aktivace a translokace cPLA2 a uvolnění AA (Laye JP and Gill JH, *Drug Discovery Today* 2003 : 710)

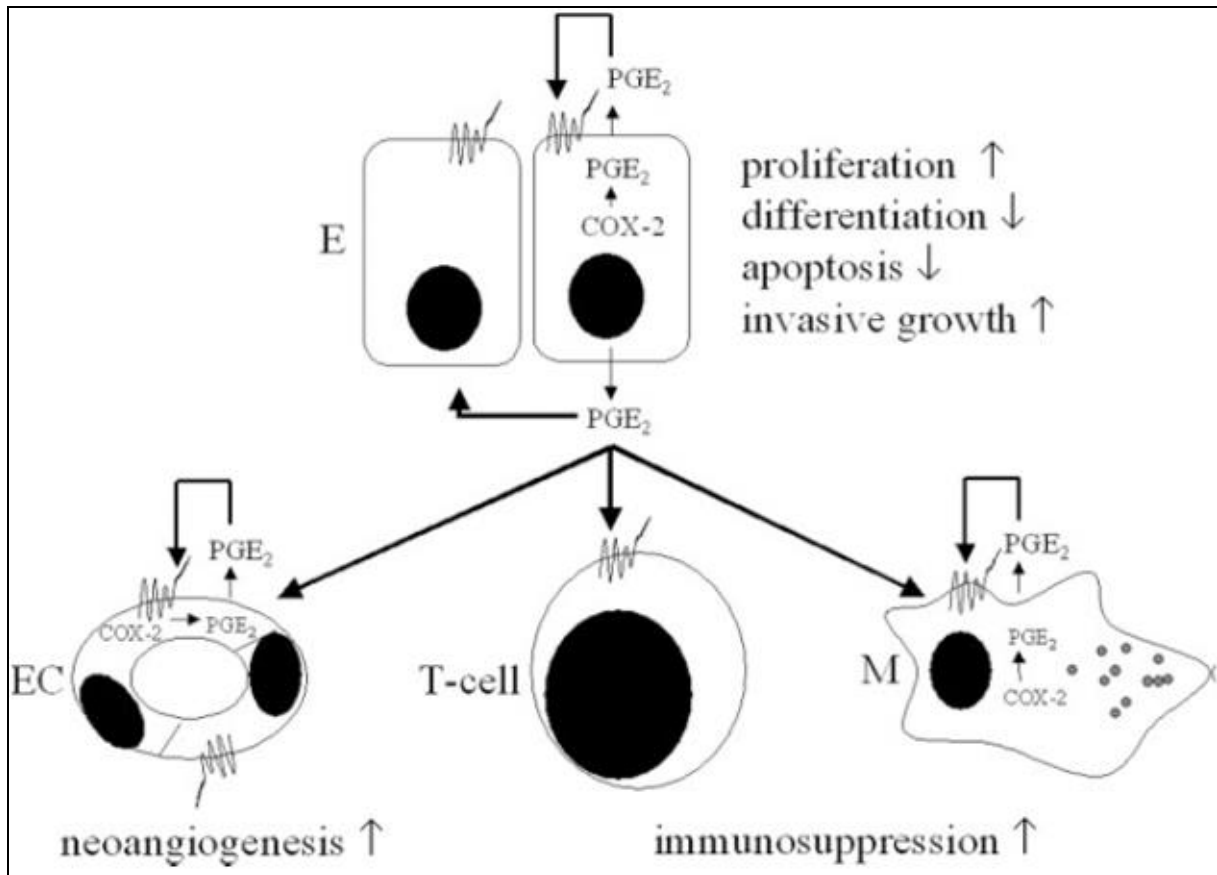
Je předpokládán model konstitutivní zvýšené exprese cPLA2 a COX-2 u nádorových buněk (obr. 15-19). Zatímco **COX-1 je exprimována konstitutivně** a zajišťuje tkáňovou homeostázu, **COX-2 je inducibilní** a exprimuje se v případě zánětu. Její nadměrná exprese byla také detekována ve vysokém procentu (až 80%) u řady nádorů. *Prozánětlivé cytokiny, růstové faktory i nádorové promotory aktivují signální dráhy vedoucí k transkripci genů pro cPLA2 a COX-2* (obr. 15-20). Ty podporují uvolňování AA a její přeměnu na **prozánětlivé, imunosupresivní a proliferaci podporující prostaglandiny**. Např. PGE₂ podporuje růst nádorů aktivací specifických receptorů EP a následných signálů vedoucích ke stimulaci buněčné proliferace, inhibici apoptózy, podpoře angiogeneze, stimulace invaze, motility a tvorby metastáz a supresi imunitní odpovědi (obr. 15-21). *COX-2 je indukována řadou podnětů (onkogeny, růstové faktory, nádorové promotory)*. Stimulace PKC nebo signálování přes Ras zvyšují aktivitu MAPK, což vyúsťuje ve zvýšenou transkripci COX-2 zprostředkovanou řadou transkripčních faktorů (AP1, NFκB). COX-2 může být také regulována posttranskripčními mechanismy (obr. 15-22).



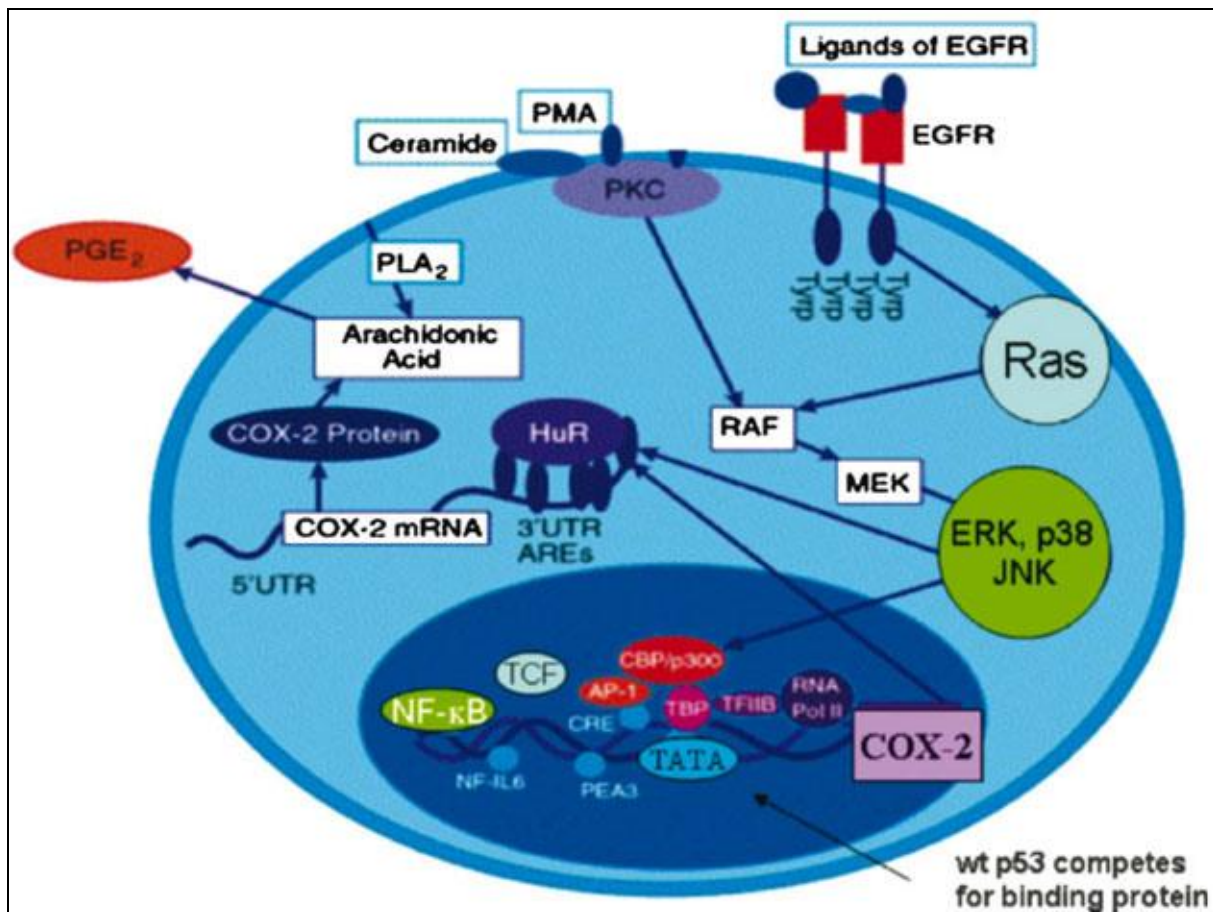
Obr. 15-19 Model konstitutivní overexpresce cPLA2 a COX-2 u nádorových buněk (Laye JP and Gill JH, Drug Discovery Today 2003 : 710)



Obr. 15-20 Izoenzymy COX a jejich funkce

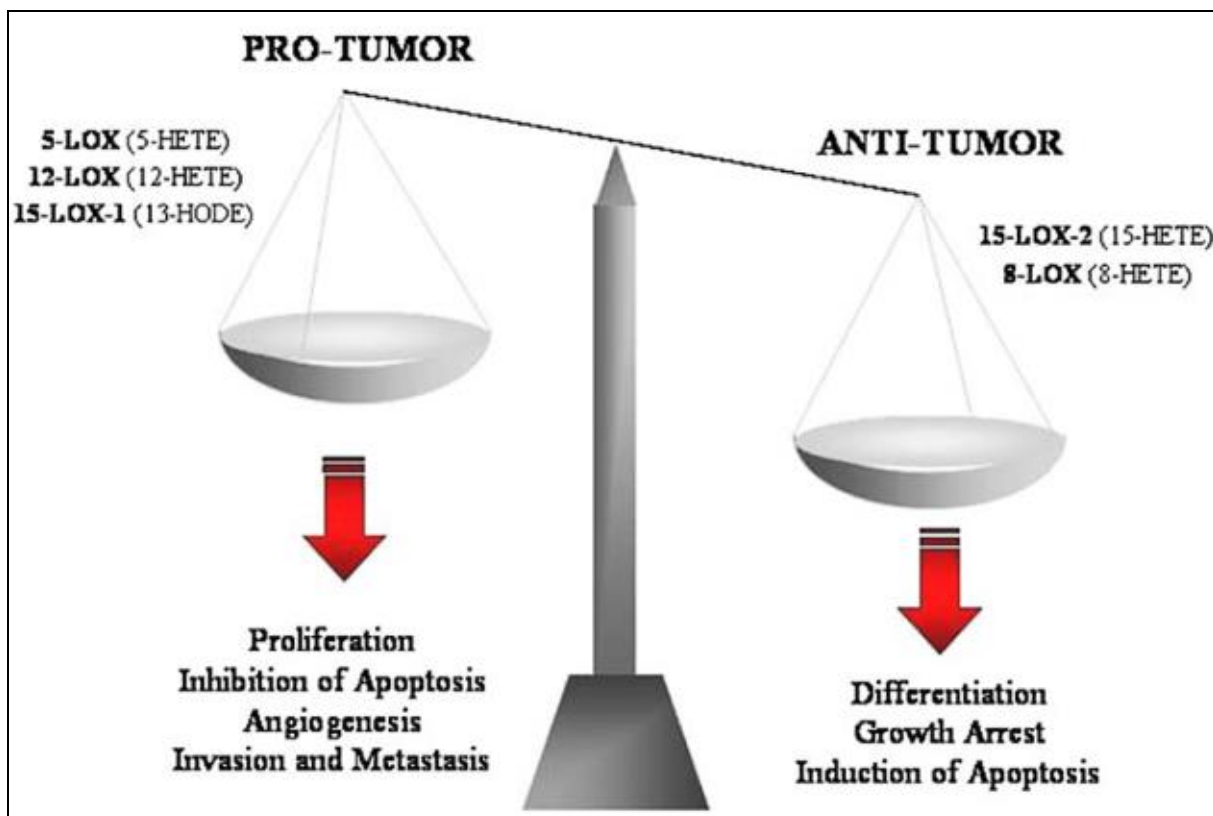


Obr. 15-21 Úloha PGE₂ v karcinogenezi (Fürstenberger G, *Int J Cancer* 2006 : 2247)

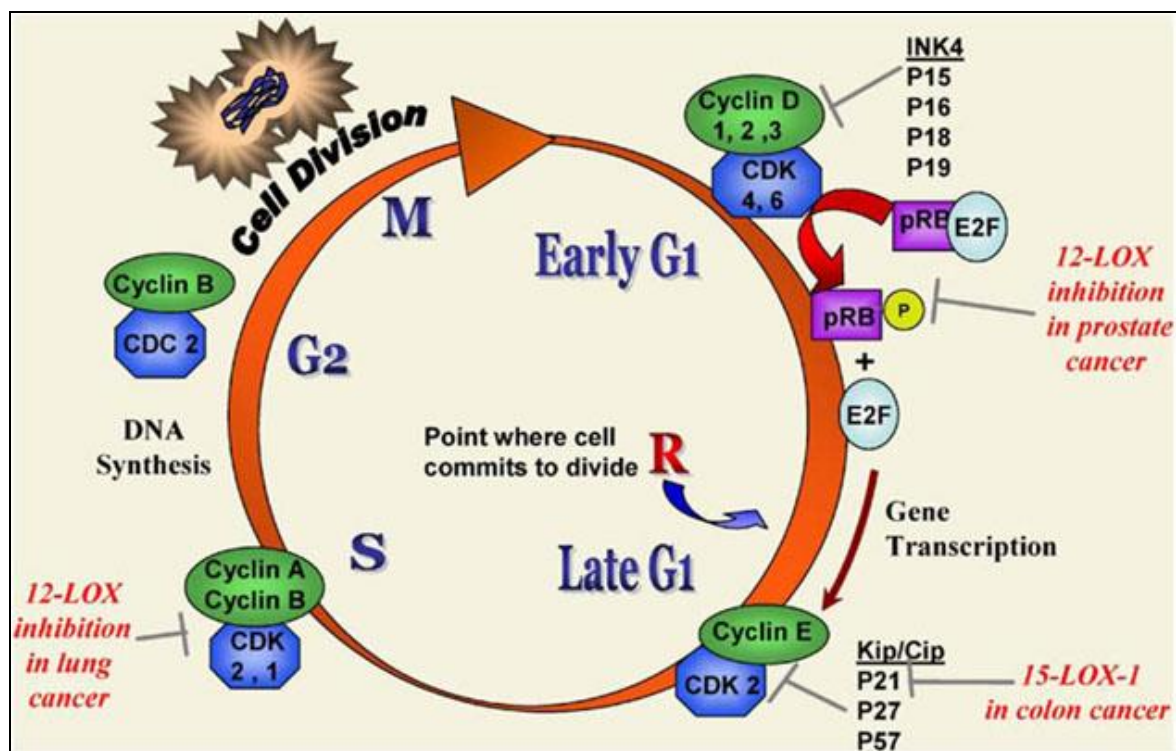


Obr. 15-22 Regulace exprese COX-2 v nádorech (*Sinicrope FA, Molecular Carcinogenesis* 2006 : 447)

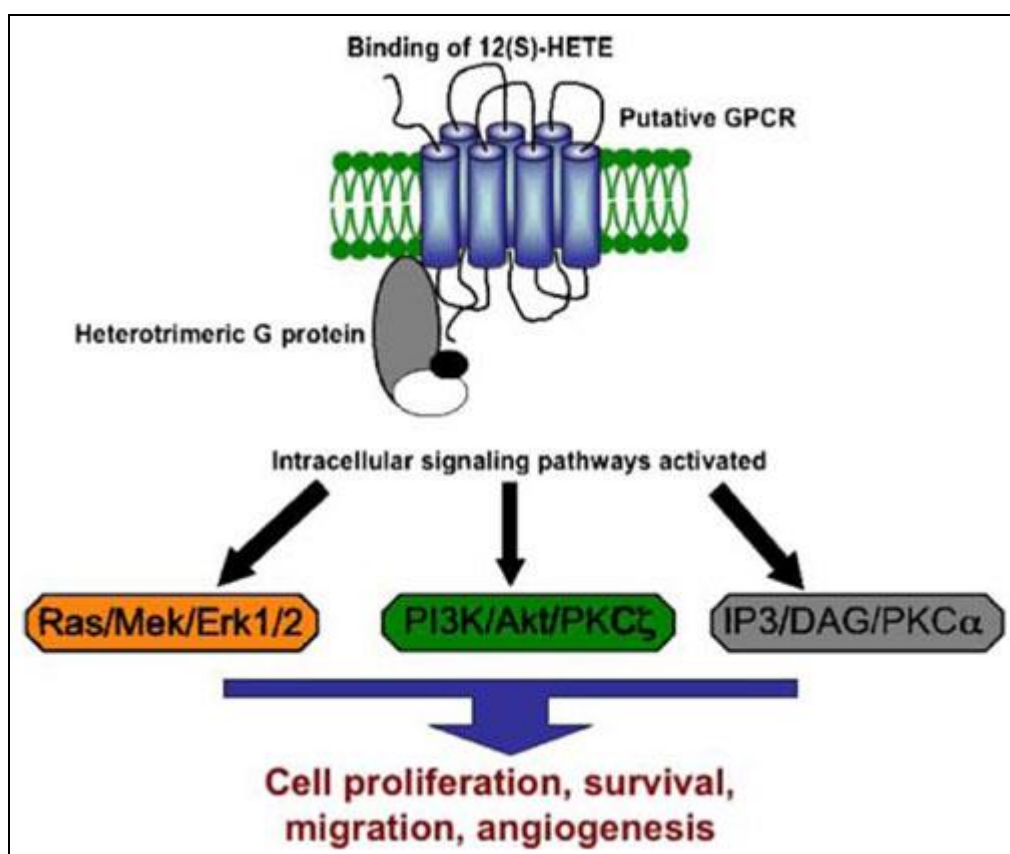
O vývoji nádorů rozhoduje rovněž rovnováha v produkci různých **isoforem LOX** (pro- i protinádorově působících) a jejich biologická aktivita (obr. 15-23). *12- a 15-LOX a jejich metabolity podporují průchod nádorových buněk buněčným cyklem.* Jejich inhibice způsobuje zástavu buněčného cyklu následovanou obvykle apoptózou (obr. 15-24). 12(S)-HETE se váže na receptory spojené s G-proteiny. Aktivace receptoru spouští vnitrobuněčné signální dráhy, např. ERK, PI3K/Akt, IP3/DAG zprostředkující funkční odpověď zahrnutou v progresi nádoru (obr. 15-25).



Obr. 15-23 Úloha různých lipoxygenáz (LOX) v rozvoji nádoru (*Pidgeon GP et al Cancer Metastasis Rev, 2007 : 503*)

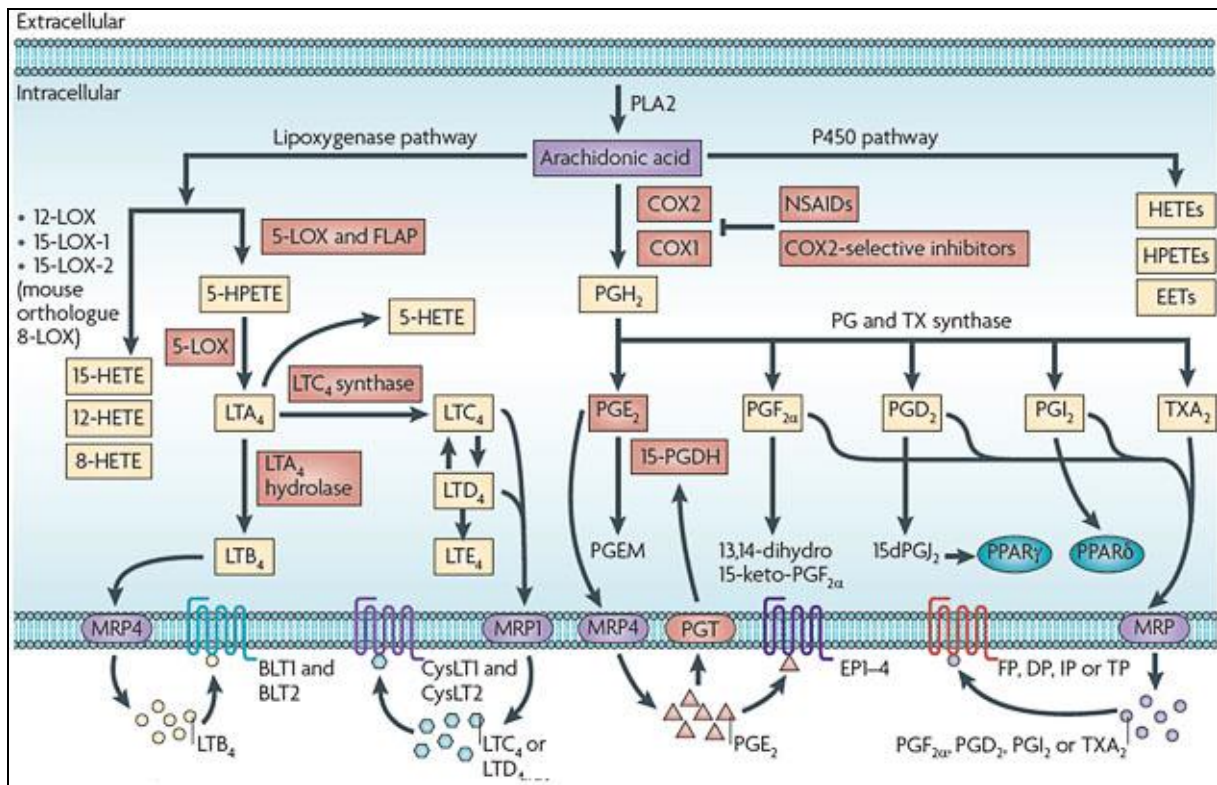


Obr. 15-24 Metabolismus LOX podporuje průchod buněk buněčným cyklem (*Pidgeon GP et al Cancer Metastasis Rev, 2007 : 503*)



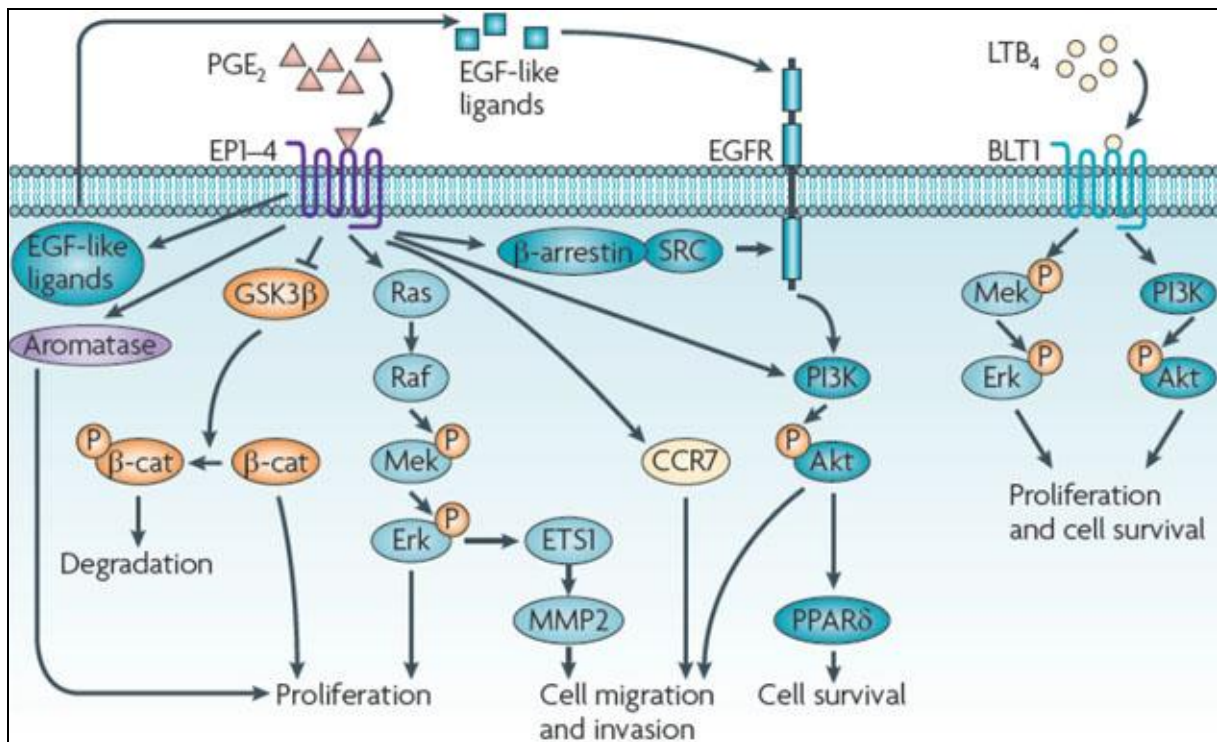
Obr. 15-25 Signální dráhy aktivované 12(S)-HETE (*Pidgeon GP et al Cancer Metastasis Rev, 2007 : 503*)

Eikosanoidy obecně působí na buňky prostřednictvím řady specifických transmembránových receptorů spřažených s G proteiny a aktivací příslušných signálních drah (obr. 15-26).



Obr. 15-26 Syntéza eikosanoidů a jejich vazba na receptory spřažené s G proteiny (Wang D, DuBois RN, *Nature Rev Cancer* 2010 : 181)

Úlohu metabolismu VNMK v nádorovém onemocnění podporují nálezy změn tohoto metabolismu a produkce zvýšeného množství metabolitů AA u řady nádorů. Úroveň exprese jednotlivých typů enzymů se liší podle typu a histologického stupně nádoru. Mitogenní a viabilitní faktory (EGF, HGF atd.) a prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1) indukují uvolňování AA a tvorbu eikosanoidů, které slouží jako přenašeče nebo modulátory signálů regulujících proliferaci a apoptózu. Podporují pak progresi nádoru indukcí proliferace, přežívání, migrace a invaze nádorových epiteliálních buněk (obr. 15-27).

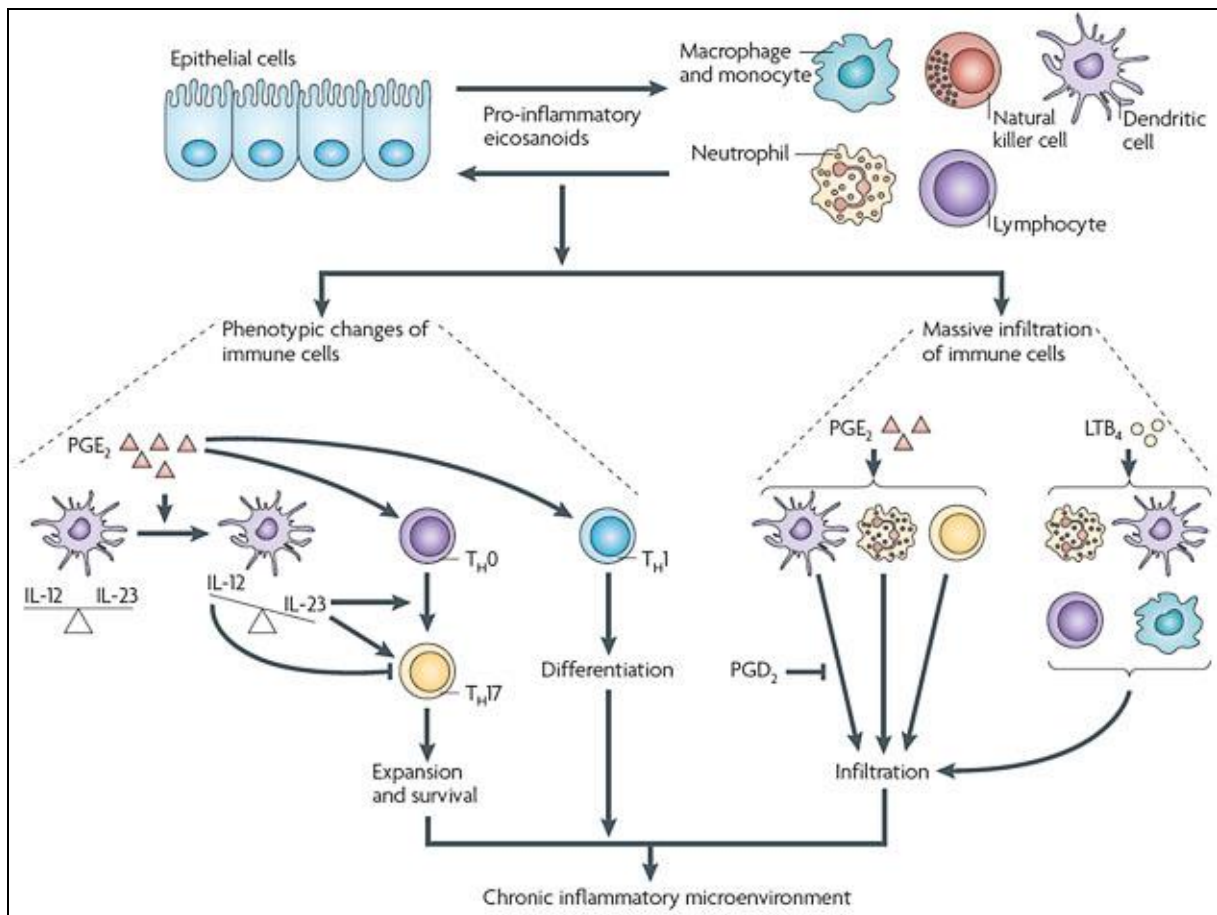


Obr. 15-27 PGE₂ a LTB₄ podporují progresi nádoru indukci proliferace, přežívání, migrace a invaze nádorových epiteliálních buněk (Wang D, DuBois RN, *Nature Rev Cancer* 2010 : 181)

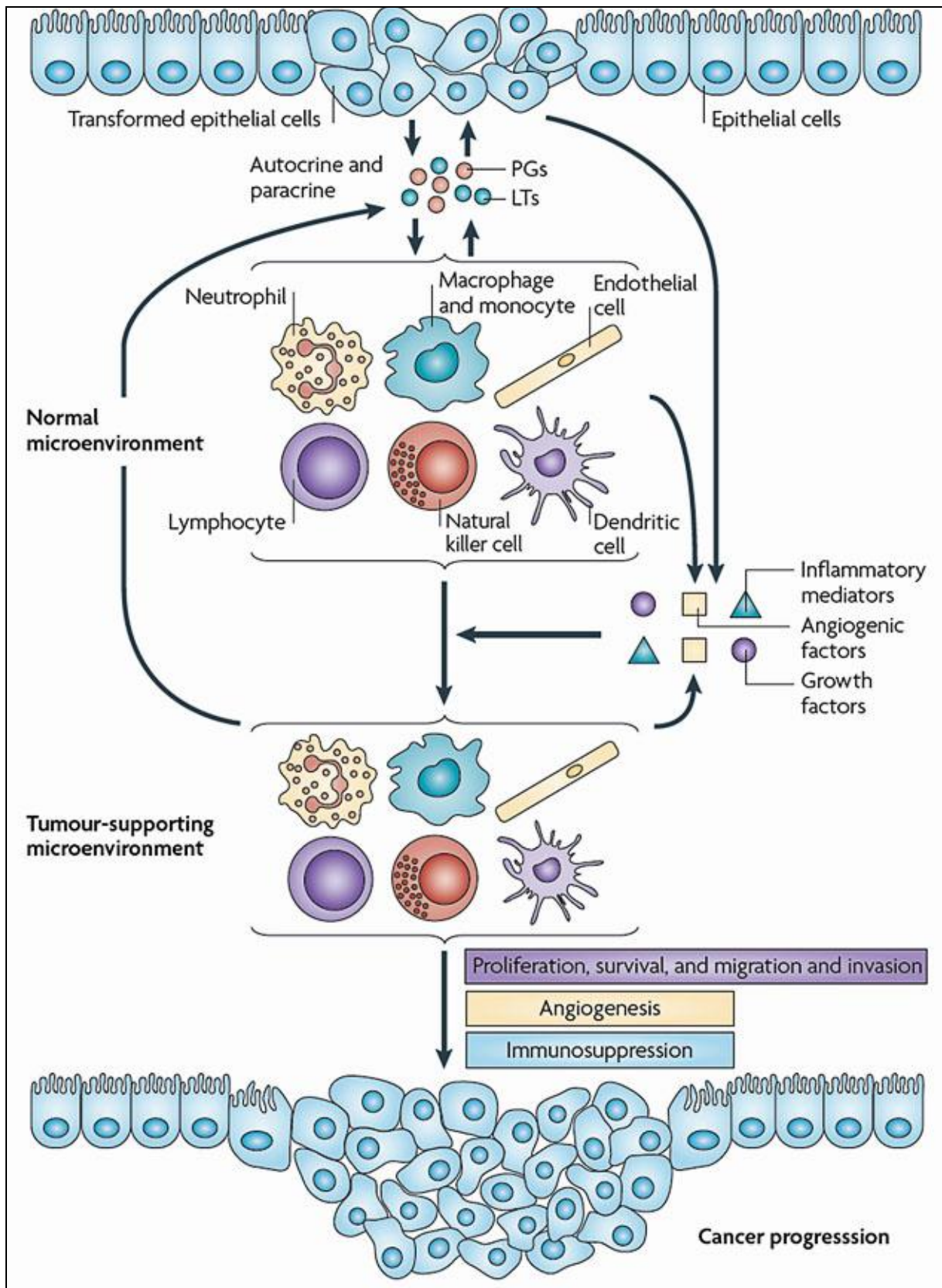
15.4 INTERAKCE S BUŇKAMI IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Mnoho studií ukázalo, že *množství a typ tuků v dietě může ovlivňovat funkce buněk imunitního systému*. Patří k nim proliferace lymfocytů v odpověď na mitogenní signály, cytotoxická aktivita T-lymfocytů, NK buněk nebo makrofágů, chemotaxe neutrofilů a monocytů a exprese hlavního histokompatibilního systému a přítomnost antigenů.

VNMK (n-3 a n-6) mohou ovlivňovat komunikaci buněk imunitního systému, která se uskutečňuje buď prostřednictvím chemických mediátorů (eikosanoidy, cytokiny, NO atd.) nebo přímo kontaktem mezi buňkami prostřednictvím adhezivních molekul. Existuje vzájemná stimulace produkce a působení prozánětlivých cytokinů a eikosanoidů. PG a LT odvozené od AA a cytokiny jsou produkovány nádorovými buňkami, stromálními buňkami, endoteliálními buňkami i buňkami imunitního systému a mohou působit autokrinně a parakrinně (obr. 15-28). To pak vyúsťuje v podporu přežití, proliferace, migraci, invazi, angiogenezi a imunosupresi (obr. 15-29).



Obr. 15-28 PG a LT zprostředkovávají interakci mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému (Wang D, DuBois RN, *Nature Rev Cancer* 2010 : 181)



Obr. 15-29 Model prozánětlivých PG a LT v podpoře nádorové progrese (Wang D, DuBois RN, *Nature Rev Cancer* 2010 : 181)

15.5 ÚČINKY NESTEROIDNÍCH PROTIZÁNĚTLIVÝCH LÁTEK

(non-steroidal antiinflammatory drugs –NSAIDs)

Existuje řada přírodních a syntetických látek, které mají schopnost inhibovat aktivitu enzymů metabolizujících VNMK. **Nesteroidní antiflogistika** patří mezi farmaka běžně používaná v klinice k léčbě bolesti a zánětu (aspirin, sulindac, indometacin, ibuprofen, piroxicam). Inhibují aktivitu COX, produkci PGE₂ a mohou mít preventivní a terapeutické účinky na rozvoj nádorů, zejména kolonu. Důležitý byl objev selektivních inhibitorů COX-2 (tzv. coxibů), které jsou účinnější a nemají takové nepříznivé vedlejší účinky jako látky, které inhibují oba izoenzymy. Dlouhodobé užívání těchto látek však může mít negativní účinky, např. na žaludeční a střevní sliznici či srdeční činnost.

Bylo prokázáno, že NSAID mohou snižovat proliferaci a indukovat apoptózu, avšak mechanismy mohou být závislé i nezávislé na aktivitě COX. Účinky těchto látek mohou být přímé (ovlivnění signálních drah, receptorů či transkripčních faktorů, přes které působí aktivátory COX a metabolity AA) nebo nepřímé zprostředkované např. změnami aktivity imunitního systému (liší se účinky v systémech *in vitro* a *in vivo*).

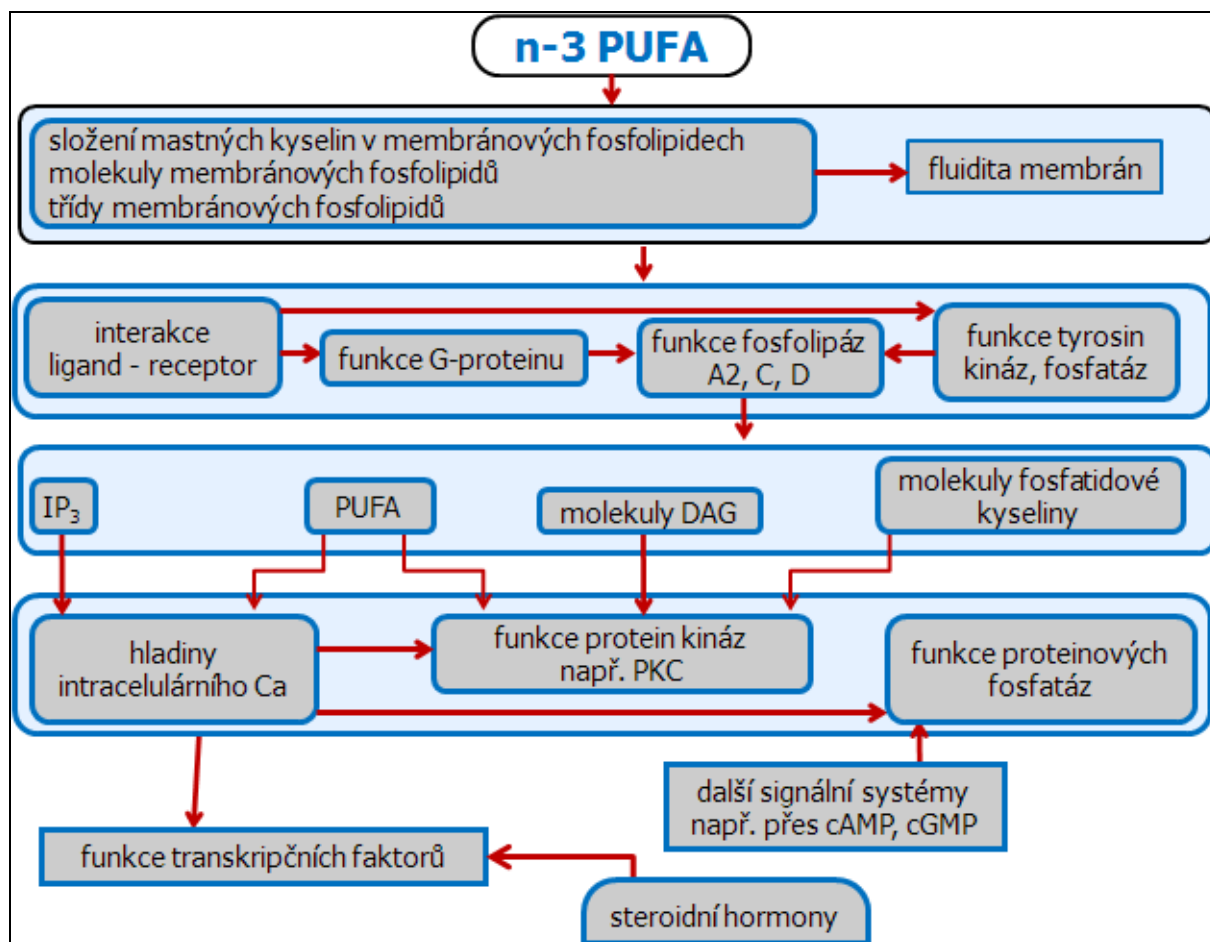
Rovněž u řady **inhibitorů LOX** (NDGA, esculetin, MK-886) byla prokázána schopnost snižovat proliferaci a indukovat apoptózu řady nádorových linií. Prokázalo se, že produkty 5-LOX fungují jako druzí poslové řady růstových a viabilitních faktorů. Produkty 12-LOX se zase uplatňují v procesu invaze a tvorby metastáz tím, že ovlivňují exprese proteáz či adhezivních molekul.

15.6 MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMY PŮSOBENÍ N-3 VNMK

Vzhledem k prokazovanému protinádorovému působení n-3 VNMK je velké úsilí věnováno výzkumu molekulárních mechanismů účinků. Jsou uvažovány zejména:

- změny vlastností buněčných membrán (fluidita, lipidové rafty) a s tím související změny v signálování některých faktorů;
- suprese biosyntézy eikosanoidů odvozených od AA ovlivňující imunitní odpověď a modulující zánět, proliferaci, apoptózu i tvorbu metastáz a angiogenezi;
- ovlivnění signálové transdukce, tj. aktivity specifických signálních drah (PI3K/Akt, ERK, p38), transkripčních faktorů (NFκB, PPARγ, SREBP) a genové exprese působící změny metabolismu, buněčného růstu, diferenciace a apoptózy;
- změny metabolismu estrogenů a redukce estrogenu stimulovaného růstu;

- zvýšená nebo snižená produkce volných radikálů (kyslíku i dusíku);
- mechanismy zahrnující citlivost k insulinu.



Obr. 15-30 Mechanizmy působení n-3 VNMK v buňce (podle Miles E.A. and Calder P.C., *Proc Nutr Soc* 1998 : 277)

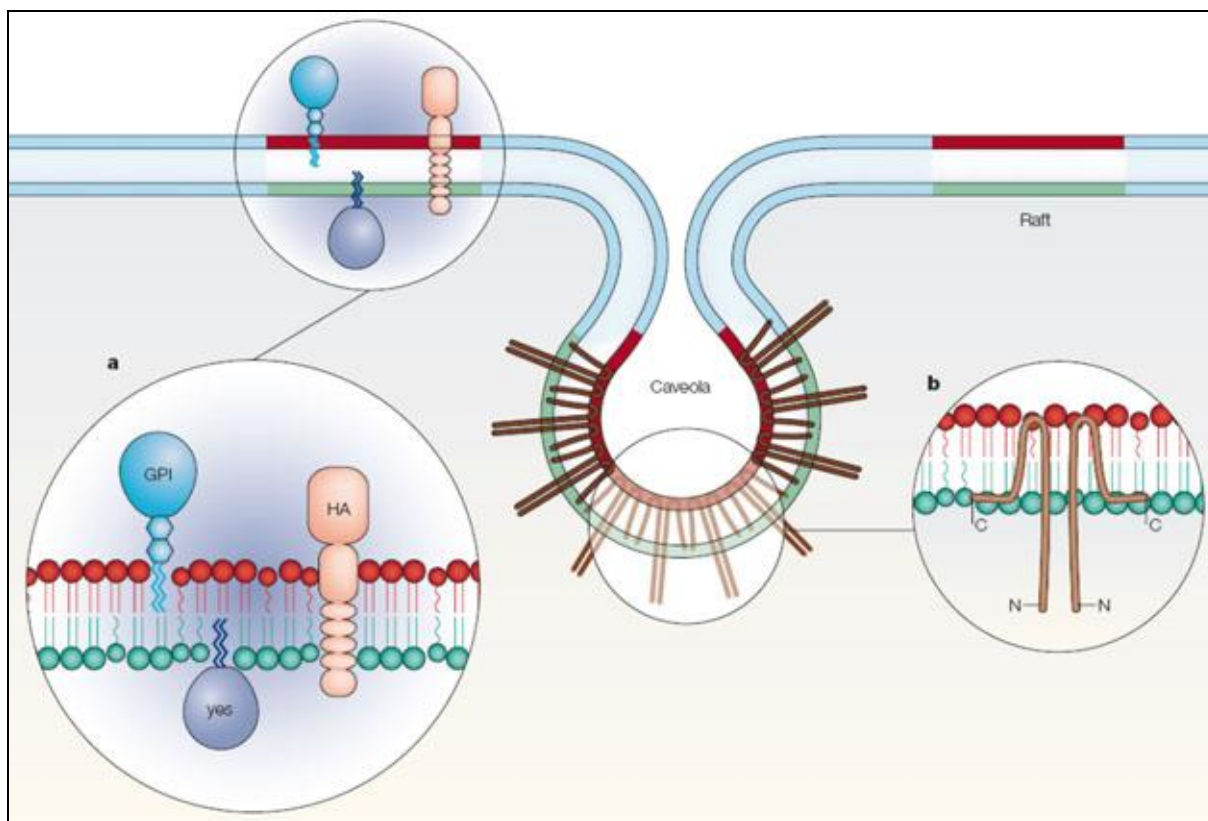
Změny biofyzikálních vlastností buněčných membrán provázejí procesy diferenciacce a apoptózy savčích buněk a souvisejí do značné míry s modulacemi ve složení, struktuře, symetrii a metabolismu buněčných lipidů. Byly pozorovány rozdíly těchto vlastností u nádorových a normálních buněk i u nádorových buněk senzitivních a rezistentních k cytostatikám.

15.7 LIPIDOVÉ MEMBRÁNOVÉ MIKRODOMÉNY

V posledních letech je věnována velká pozornost speciálním oblastem buněčné membrány, tzv. **lipidovým membránovým mikrodoménám – raftům a kaveolám**.

Ty představují *malé oblasti proteinů a lipidů v membráně s unikátním složením lipidů, bohaté na cholesterol a sfingolipidy*. Tyto struktury jsou funkčně zahrnuty v kompartmentalizaci, modulaci a integraci buněčných signálů a tak modulují důležité procesy jako buněčný růst či

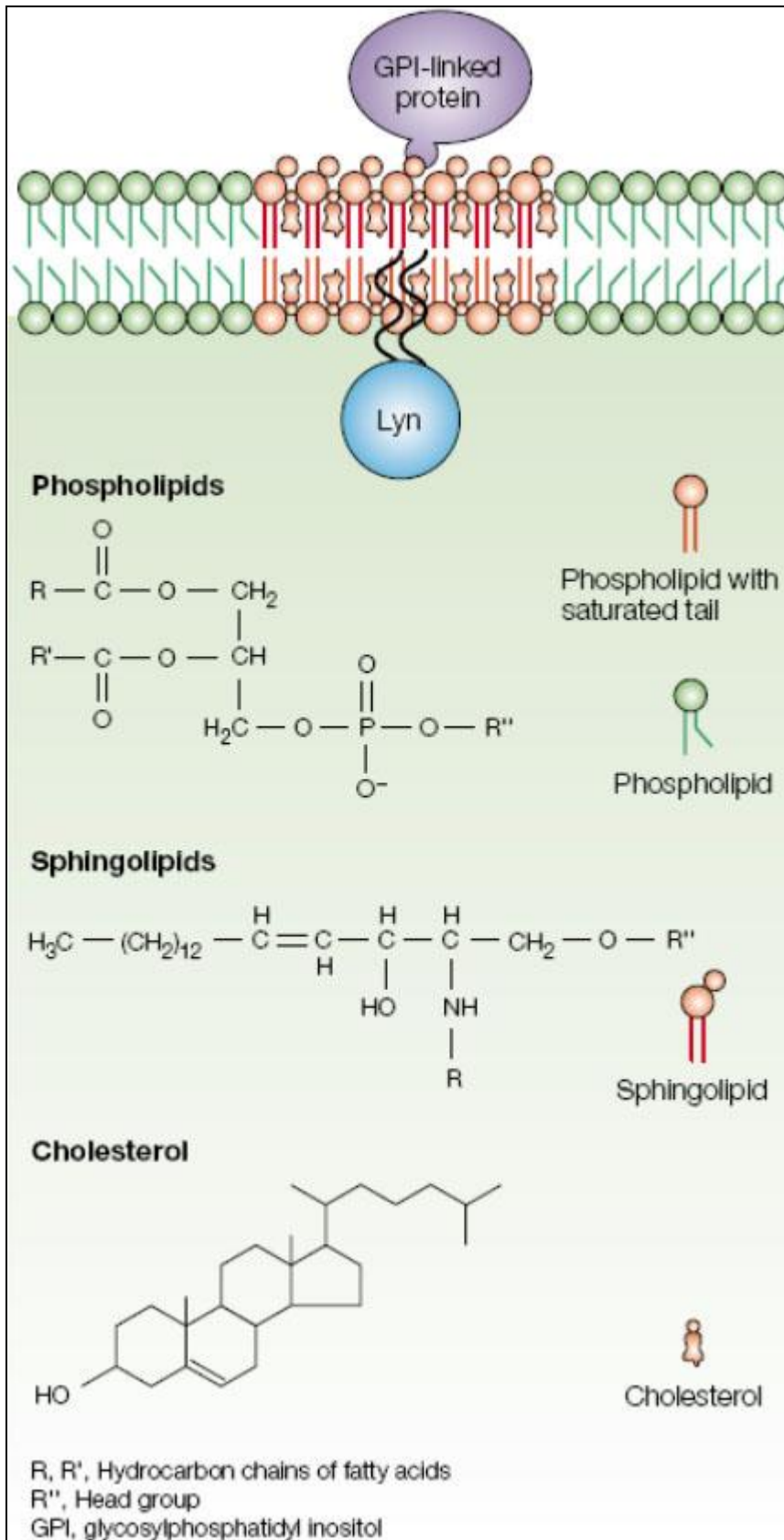
apoptózu. Dvojvrstva lipidů v raftu je asymetrická, kde vnější vrstva („exoplasmatic leaflet“) je obohacená sfingomyeliny a glykosfingolipidy a vnitřní vrstva („cytoplasmic leaflet“) obsahuje glycerolipidy. Rafty obsahují proteiny upevněné k dvojvrstvě acylovým koncem GPI kotvami (např. kináza Yes z rodiny Src) nebo přes transmembránové domény (virové proteiny neuraminidáza a hemaglutinin – HA) (obr. 15-31).



Obr. 15-31 Model organizace lipidových raftů a kaveol modifikujících aktivaci membránových receptorů a signálních proteinů v plazmatické membráně (*Simons K and Ikonen E, Nature 1997 : 569*)

Sfingolipidy se liší od ostatních fosfolipidů svými dlouhými většinou nasycenými acylovými řetězci, které jim dovolují být pevně sbaleny v dvojvrstvě a tvořit **gelovou fázi**, ve které je velmi malá možnost laterálního pohybu nebo difúze. Tato gelová fáze je měněna připojením cholesterolu, který kondenzuje uspořádání sfingolipidů obsazením prostoru mezi acylovými řetězci (obr. 15-32). Tak sfingolipidové mikrodomény obsahující cholesterol existují v podobě *tekuté fáze* („*liquid-ordered*“), významně fluidnější než fáze gelová. Na druhé straně, fosfolipidy jsou bohaté na nenasycené acylové řetězce, které jsou volněji sbaleny, *výrazně fluidnější* („*liquid disordered*“) a umožňují tak rychlý laterální pohyb uvnitř dvojvrstvy. Tyto rozdíly pak pravděpodobně vedou k *fázové separaci mezi sfingolipidy a fosfolipidy*. Sfingolipidové mikrodomény plavou ve fosfolipidové dvojvrstvě (lipidové rafty). Cholesterol upřednostňuje „*liquid ordered*“ fázi a je zásadní pro udržení obou fází. Vnější vrstva membráno-

vých raftů je spojena s vnitřní vrstvou bohatou na fosfolipidy a cholesterol. Velikost raftů a jejich doba přetrvávání není zcela jasná. Uvádí se elementární velikost 26–70 nm obsahující jen několik tisíc molekul vážících několik málo proteinů. Rafty selektivně zahrnují nebo naopak vylučují některé proteiny a slouží tak jako mechanismus pro laterální dělení proteinů v membráně. Umístění či vyloučení určitých proteinů (např. receptorů, přenašečů) ovlivňuje pak jejich aktivaci. VNMK jsou základní složkou lipidových raftů a předpokládá se, že např. DHA může částečně působit zvýšením fázové separace lipidů v membráně.

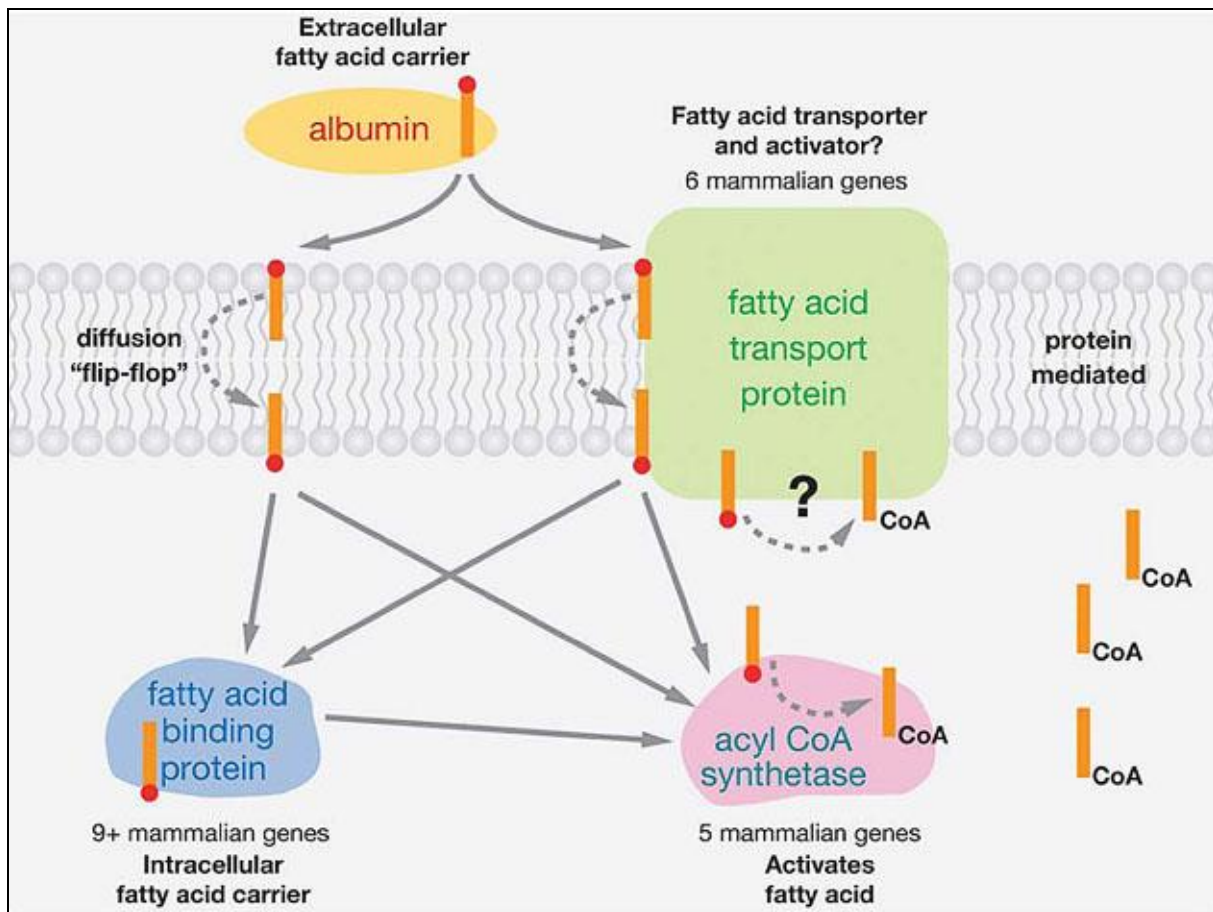


Obr. 15-32 Struktura a složení lipidových raftů (Whitfield J., *Nature Reviews*, 2004 : 1)

Kaveoly jsou tvořeny proteiny kaveoliny tvořícími vlasové smyčky v membráně. **Kaveolin** je 21-24 kDa membránový protein. Funguje jako složka membránových systémů zprostředkujících molekulární transport, buněčnou adhezi nebo signální transdukcí. Zajišťuje např. transport proteinů z endoplazmatického retikula (ER) k membráně a může regulovat aktivitu řady regulačních a signálních molekul, např. ERK, Ras, Raf, PI3K/Akt, TGFβ, Wnt/beta katenin, COX-2, cyklin D1. U řady nádorů byly detekovány časté změny kaveolinu-1 a to buď snížená exprese (nádory vaječníků, plic a prsu) či zvýšená exprese (nádory prostaty, žlučníku či kolonu). V některých případech působí jako supresor růstu nádoru, ale přes různé mechanismy může přispívat i k vývoji maligních struktur. PPAR γ je regulátorem exprese kaveolinu v lidských nádorových buňkách

15.8 BUNĚČNÝ PŘÍJEM, TRANSPORT A AKUMULACE MK

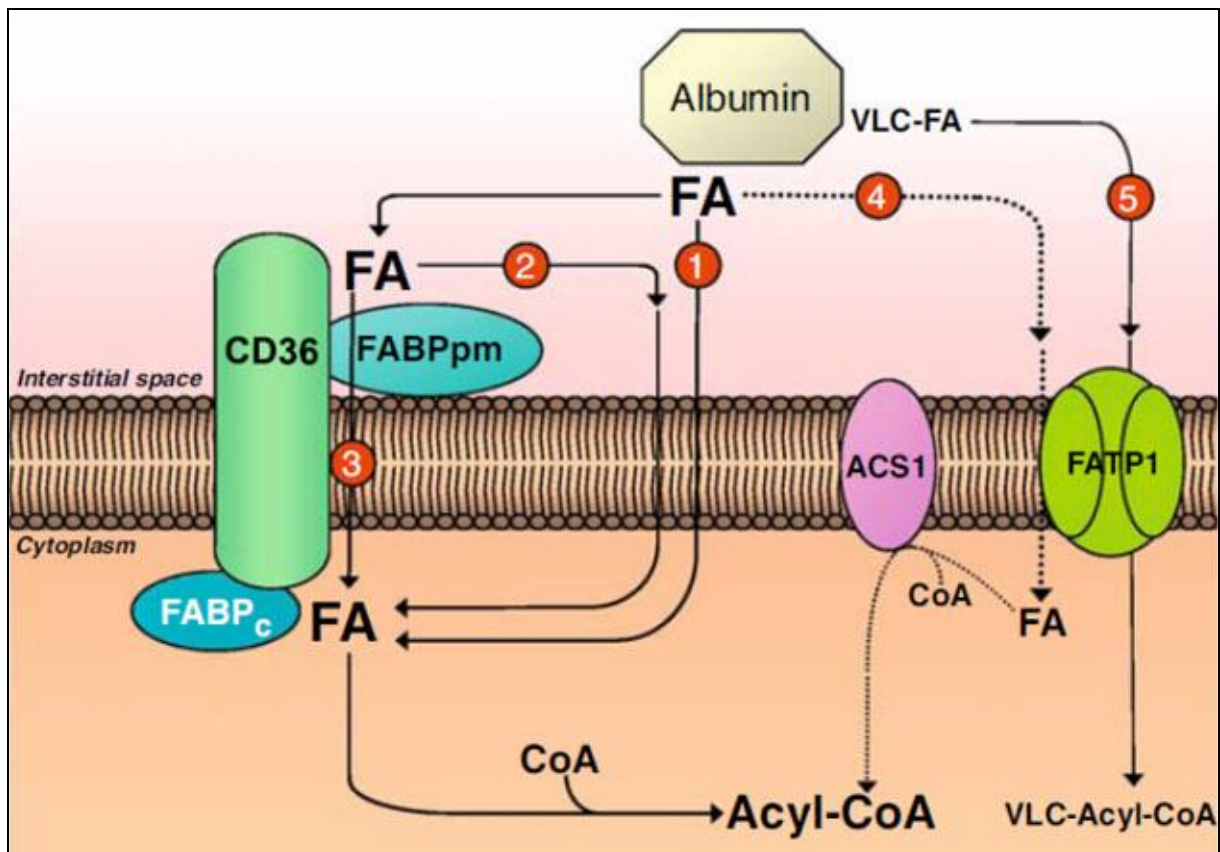
Strukturální integrita raftů a kaveol je základní také pro příjem VNMK. MK jsou obecně vázány na albumin v séru a přenášeny přes membránu difúzí nebo pomocí **specifických transportních proteinů (FATPs)**. Byla objevena řada proteinů zodpovědných za *aktivní přenos mastných kyselin* - *FATP 1-6 (fatty acid transport proteins)*. Jsou to acyl CoA ligázy, které zrychlují příjem MK jejich přeměnou na acyl CoA. Vykazují různou tkáňovou distribuci: FATP1 v tukové tkáni, FATP4 ve střevě, FATP2 a 5 v játrech (obr. 15-33).



Obr. 15-33 Transport mastných kyselin do buňky (Marszalek JR and Lodish HF, *Annual Rev Cell Dev Biol* 2005 : 633)

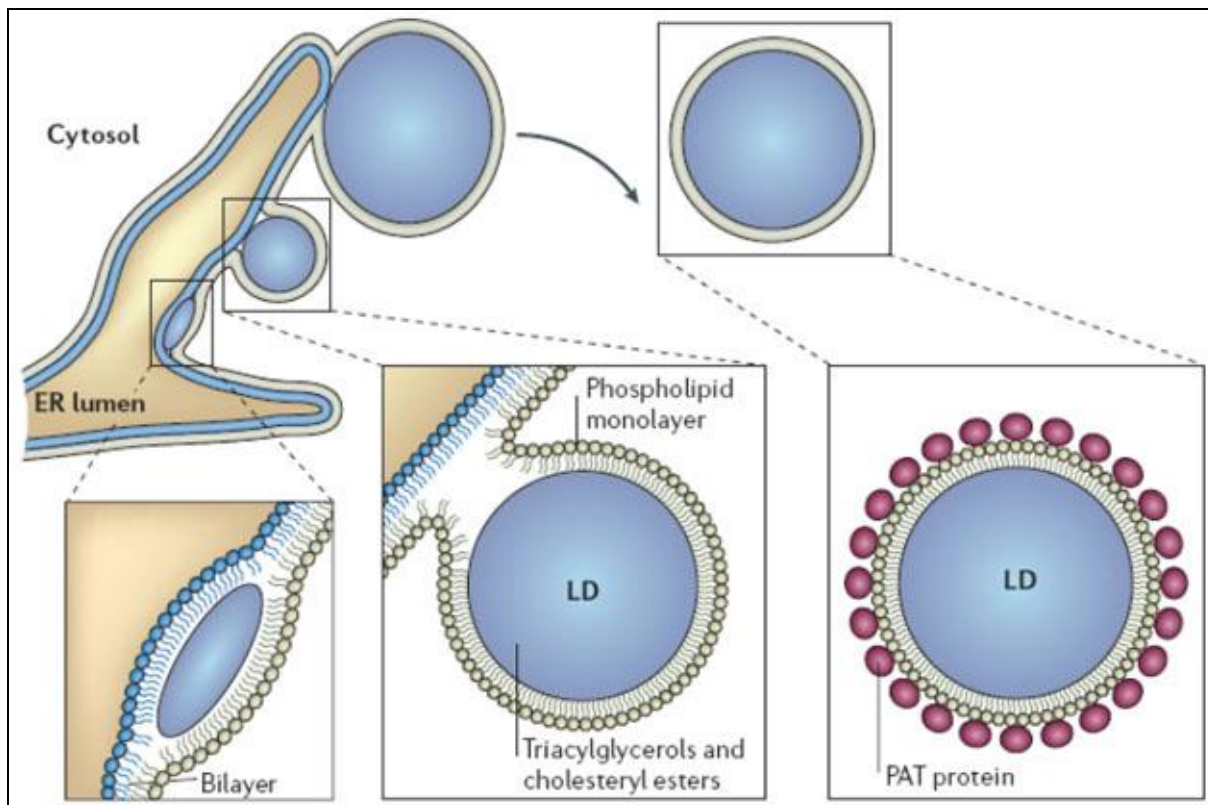
FAT/CD36 (88 kDa) je lipoproteinový receptor v plazmatické (a pravděpodobně i mitochondriální) membráně a je vázána v lipidových raftech. Spolu s **FABPpm (plasma membrane-associated fatty acid-binding protein (43kDa))** vážou MK na povrchu, zvyšují lokální koncentraci a usnadňují tak difúzi. *CD36 je zároveň multifunkční adhezni receptor* pro trombospodin a kolagen a „scavenger“ receptor pro LDL (low density lipoprotein) exprimovaný na plateletech, monocytech ale i jiných typech buněk. Je exprimován i enterocyty, myocyty či endoteliálními buňkami. *Expresse FAT/CD36 je ovlivňována mj. transkripčním faktorem PPAR γ* . Zpětně FAT/CD36 kontroluje např. diferenciaci adipocytů regulací hladiny aktivátorů PPAR γ .

Uvnitř buněk zajišťují přesun MK specifické vazebné **proteiny FABP 1-17 (fatty acid binding proteins)** před vstupem do metabolických či signálních drah. Malá část MK je transportována FABP a rychle aktivována membránovými acyl-CoA syntázami (ACS1) a tvoří estery acyl-CoA. MK s dlouhým řetězcem (> C22) jsou transportovány preferenčně a přímo konvertovány na estery acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem.



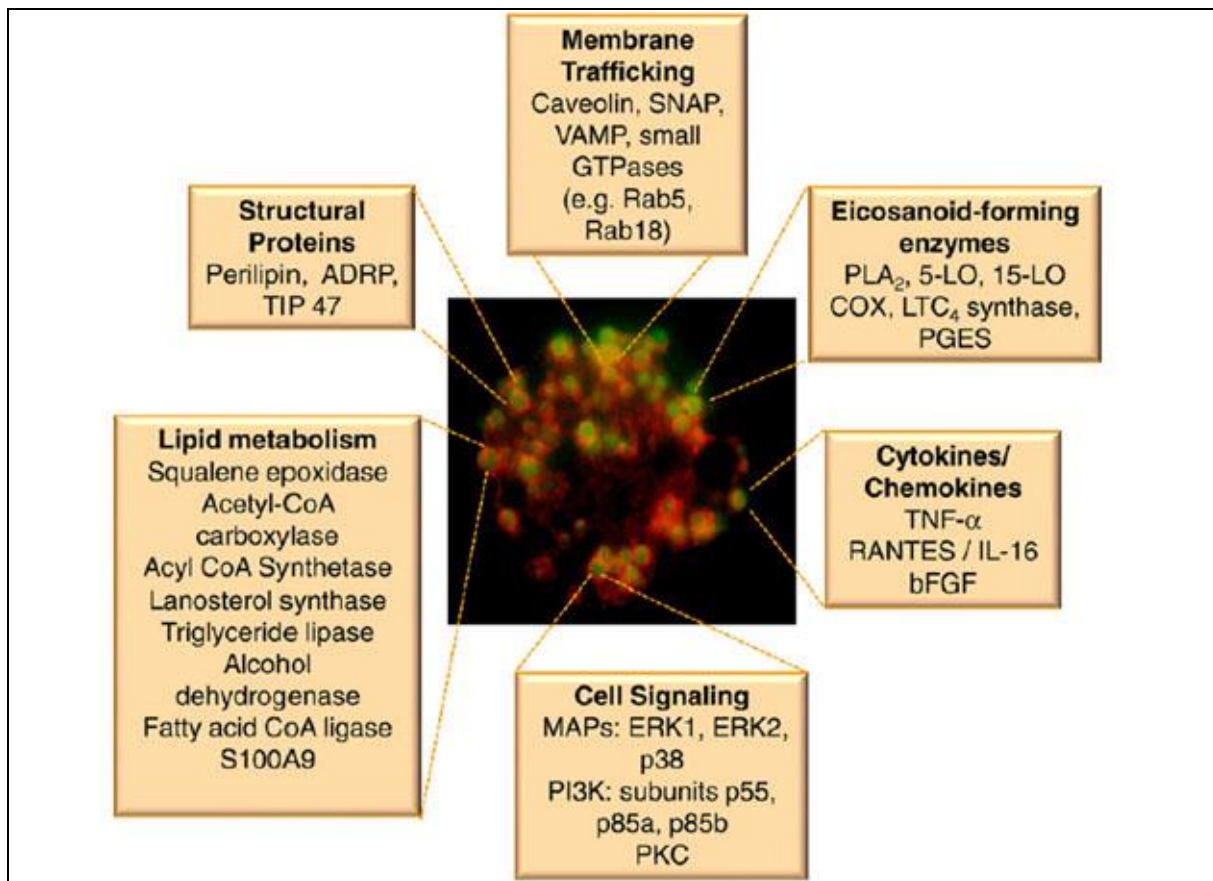
Obr. 15-34 Transport mastných kyselin přes cytoplazmatickou membránu a jejich přenos v buňce
(Schwenk RW et al., Prostagl Leuk Ess Fatty A 2010 : 149)

Po dodání mastných kyselin a jejich vstupu do buňky se v cytoplazmě tvoří útvary zvané **lipidové droplety (LD) nebo tělíska (bodies)**. Jsou syntetizována v ER, kde se tvoří a odlučují. *LD tvořící nezávislé orgány ohraničené monovrstvou fosfolipidů a napojených specifických proteinů (rodina PAT proteinů).* Uvnitř jsou zejména triacylglyceroly, které slouží jako zásobárna energie a zdroj signálních molekul (obr. 15-35).



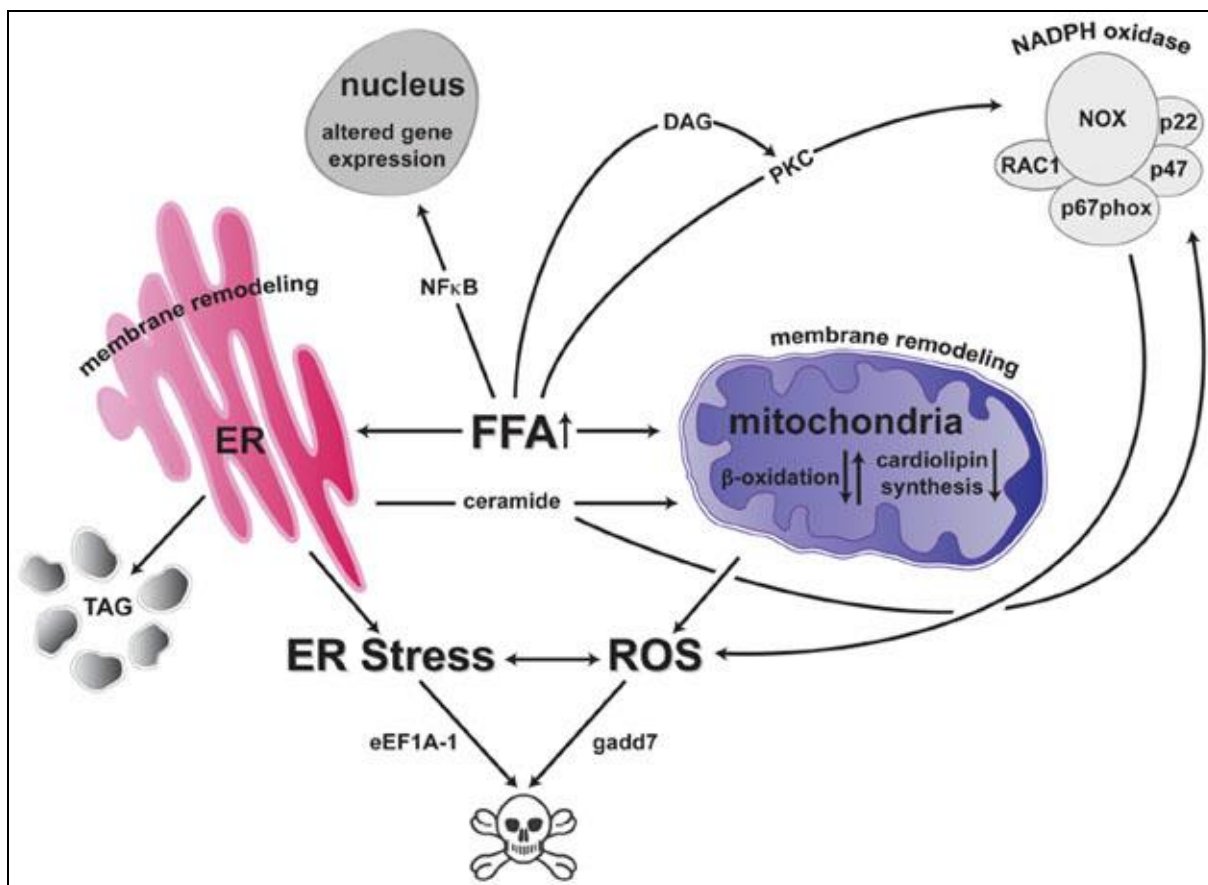
Obr. 15-35 Tvorba lipidových dropletů (LD) v endoplazmatickém retikulu (Martin S. and Parton RG, *Nature Rev Mol Cel Biol* 2006 : 373)

LD hrají významnou úlohu v udržování lipidové homostázy, metabolismu lipidů a přenosu vnitrobuněčných signálů. Je s nimi spojena činnost řady enzymů lipidového metabolismu, ale rovněž dalších signálních molekul nebo cytokinů (obr. 15-36).



Obr. 15-36 Funkce lipidových dropletů a důležité proteiny s nimi spojené (Bozza P et al., *BBA* 2009 : 540)

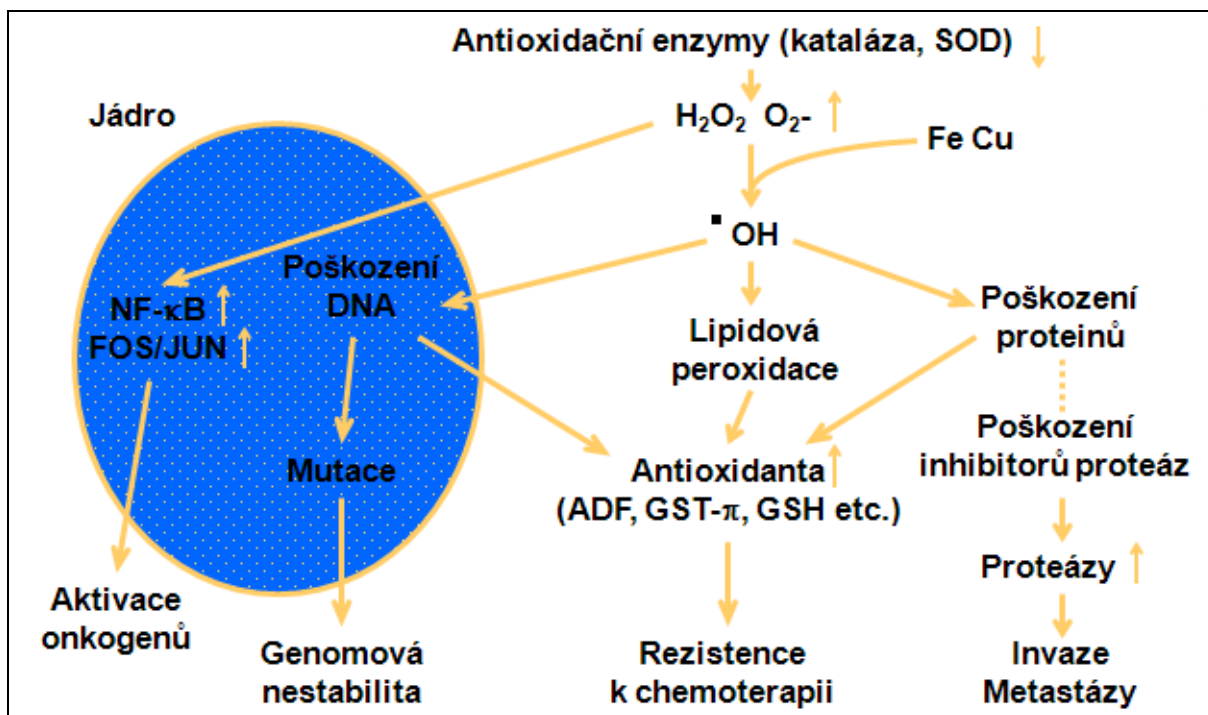
V netukové tkáni způsobuje vysoké množství MK prostřednictvím lipidových metabolitů a signálních drah oxidativní stres a stres ER. Lipotoxicita způsobuje dysfunkci mitochondrií a ER, což je klíčový mechanismus jak nadbytek lipidů indukuje buněčnou smrt. Nasměrování lipidů a jejich uchování v lipidových dropletích působí cytoprotektivně (obr. 15-37).



Obr. 15-37 Lipotoxicita (Brookheart RT et al, Cell Metab 2009 : 9)

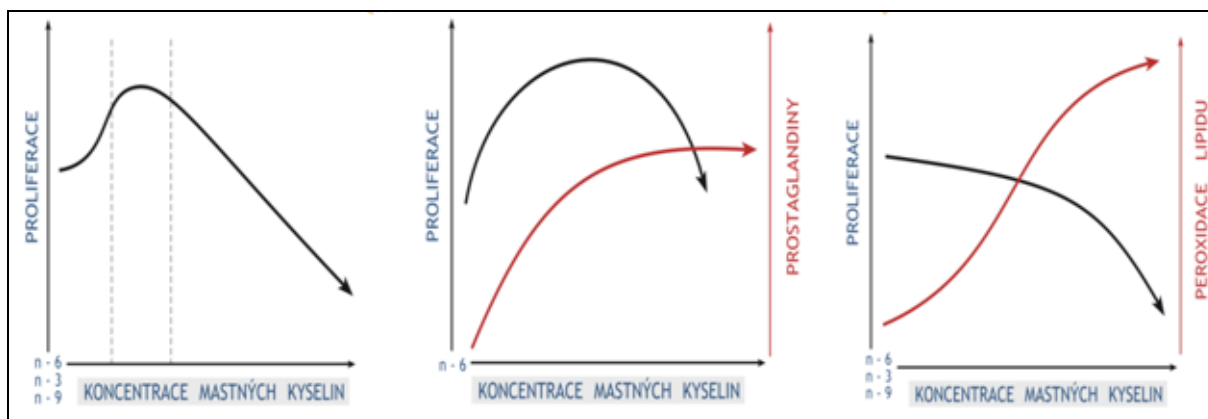
15.9 DĚJE NA MITOCHONDRÍÍCH A OXIDATIVNÍ METABOLIZMUS

Zvýšené množství VNMK vede ke zvýšené produkci ROS a lipidové peroxidaci, což vyvolává **oxidativní stres**. Kromě ROS hrají v rozvoji nádorů úlohu i reaktivní metabolity dusíku (RNS), jejichž produkce je stimulována aktivací **inducibilní syntázy oxidů dusíku** iNOS. Oxidativní produkty (aldehydy, hydroxynonenal) mohou přímo oxidativně poškozovat DNA a působit mutace a genetickou nestabilitu, mohou také aktivovat specifické transkripční faktory a měnit expresi genů (aktivovat onkogeny), ovlivňovat mitochondrie a aktivitu apoptických proteinů s nimi spojených. Mohou také poškozovat lipidy (lipidová peroxidace) či proteiny, což se může účastnit různými mechanismy angiogeneze a tvorby metastáz. Změněná redoxní rovnováha může také podporovat rezistenci k chemoterapii (obr. 15-38). Na druhé straně může oxidativní poškození likvidovat selektivně nádorové buňky na základě jejich odlišného oxidativního metabolismu a snížené antioxidační ochrany.



Obr. 15-38 Schematický přehled úlohy reaktivních kyslíkových radikálů v karcinogenezi. SOD, superoxid dismutáza; OH, hydroxylový radikál; ADF, adult T-cell leukemia-derived factor; GTS, glutation S-transferáza; GHS, glutation.

Ze souhrnu řady studií se ukázalo, že MK působí v závislosti na koncentraci. Nízké koncentrace mohou podporovat buněčný růst, kdežto vysoké koncentrace, díky zejména indukci oxidativního metabolismu, mohou růst tlumit a indukovat buněčnou smrt. Zvýšená produkce PG, ale podporuje proliferaci různými parakrinními i autokrinními mechanismy (podpora produkce cytokinů, ovlivnění vnitrobuněčných signálních drah, imunosuprese) (obr. 15-39).

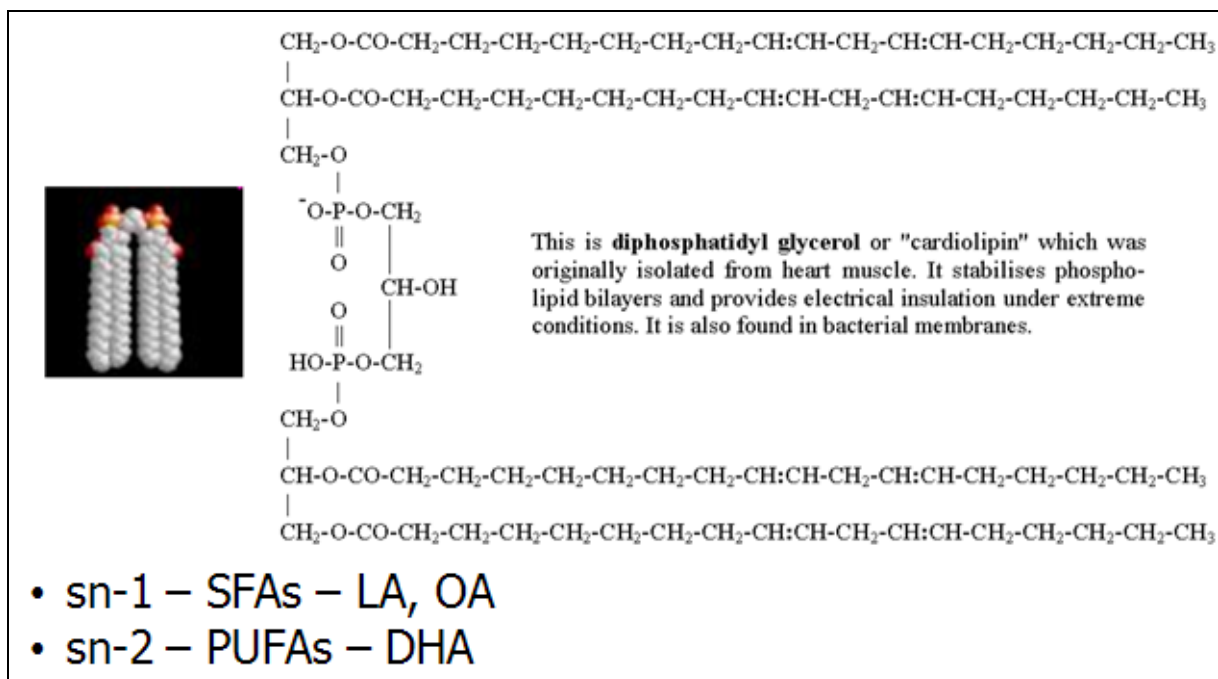


Obr. 15-39 Oxidativní metabolismus a nenasycené mastné kyseliny. Vliv na proliferaci nádorových buněk („Fatty Acid Paradoxes“) (D.G.Cornwell and N.Morisaki, *Free Radicals in Biology*. Vol.6, 1984).

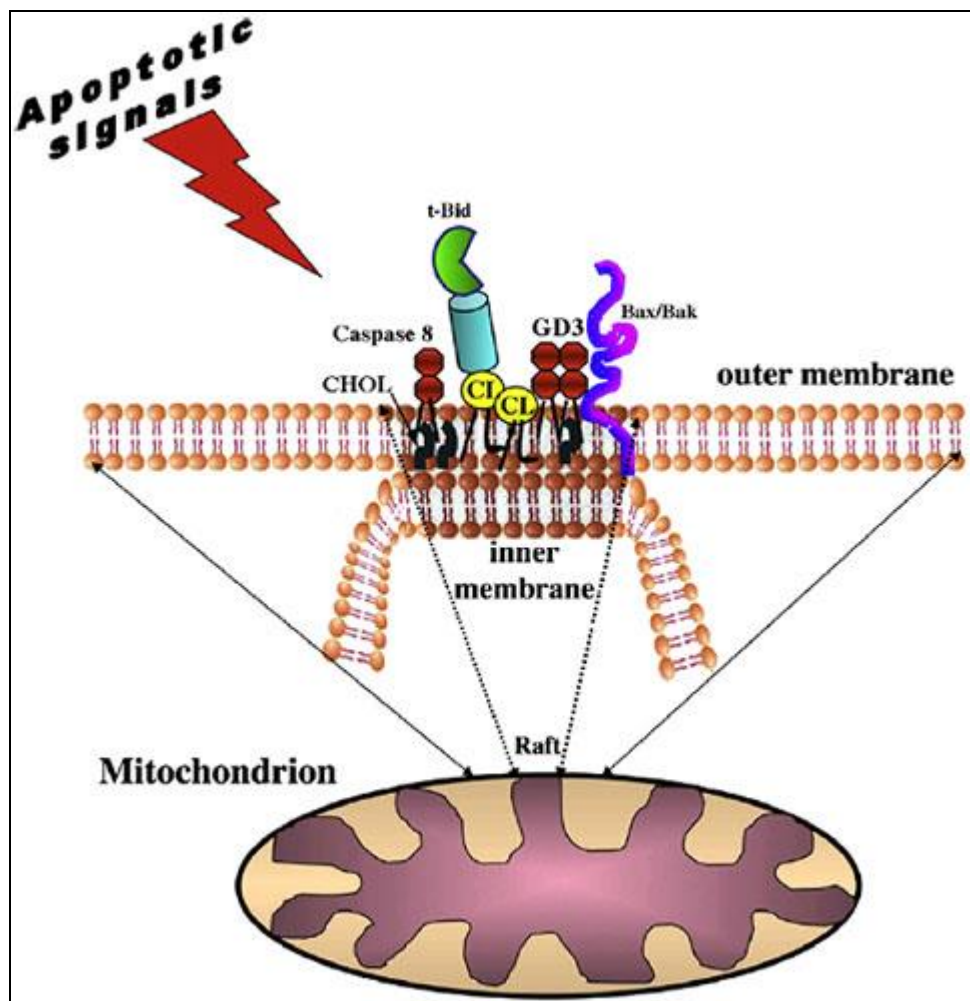
VNMK, zejména *n-3* DHA fyzicky interagují s mitochondriální membránou, mění její permeabilitu otevíráním MTP (membrane permeability pores) a snižují tak membránový potenciál.

DHA je přednostně inkorporována do kardiolipinu, fosfolipidu vnitřní mitochondriální membrány. Zvýšená polynenasycenost membránové dvojvrstvy (zejména následkem obsahu DHA) mění fyzikální vlastnosti, zvyšuje molekulární aktivitu membránových proteinů a metabolickou aktivitu buněk, tkání a celého organismu.

Kardiolipin (difosfatidyl glycerol, glycerolfosfolipid) tvoří hlavní součást membrán mitochondrií. DHA se přednostně vestavuje do sn-2 pozice kardiolipinu, mění nenasycenost mitochondriální membrány a oxidativní metabolismus (obr. 15-40). To souvisí s aktivitou **cytochrom c oxidázy** vázané na kardiolipin, s uvolňováním **cytochromu c** a apoptózou. S lipidy mitochondriální membrány reagují rovněž proteiny **rodiny Bcl-2** (pro- i antiapoptické) a tak mohou VNMK modulovat jejich aktivitu (obr. 15-41).



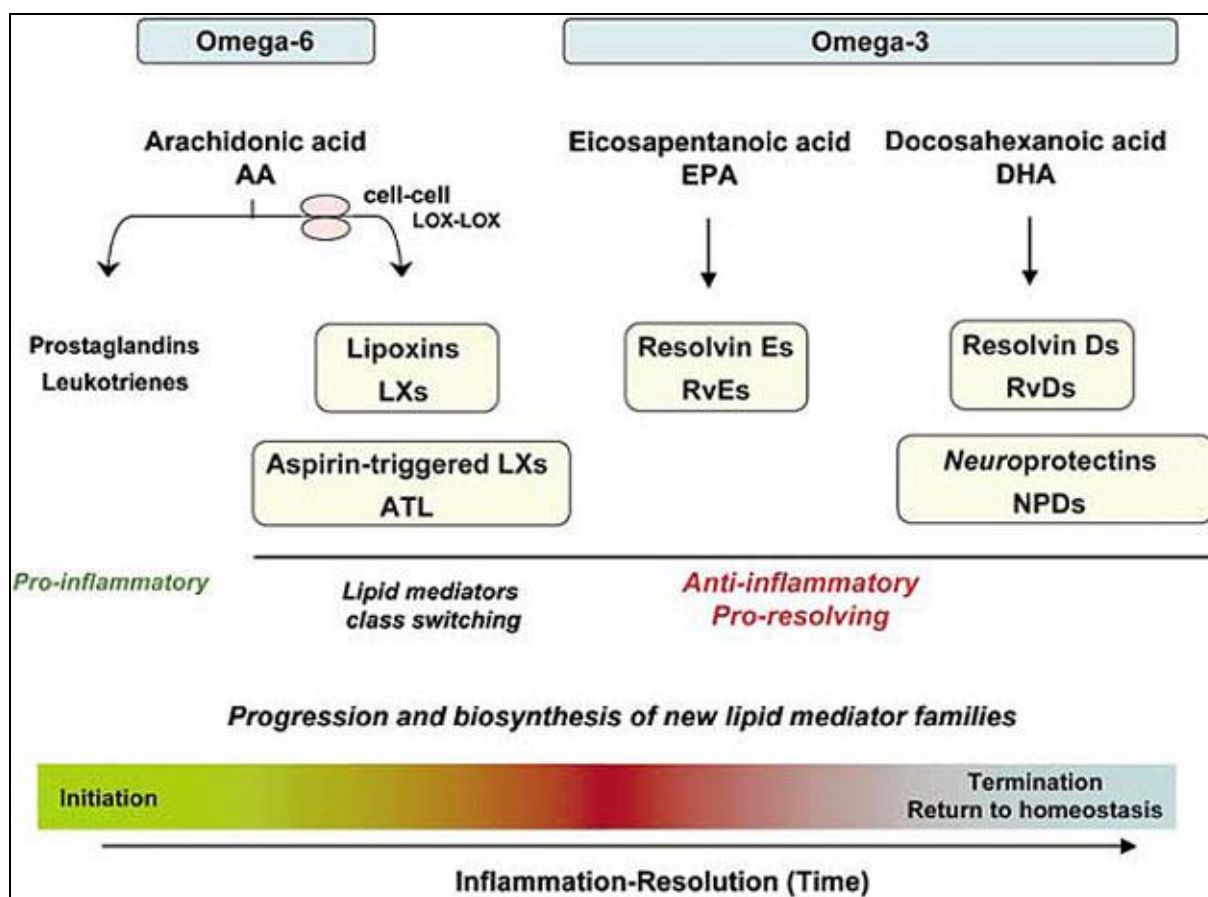
Obr. 15-40 Kardiolipin (Difosfatidyl glycerol, glycerolfosfolipid). Hlavní součást membrán mitochondrií.



Obr. 15-41 Reakce proteinů Bcl-2 s lipidy mitochondriální membrány (Sorice M et al., *FEBS Letters* 2009 : 2447)

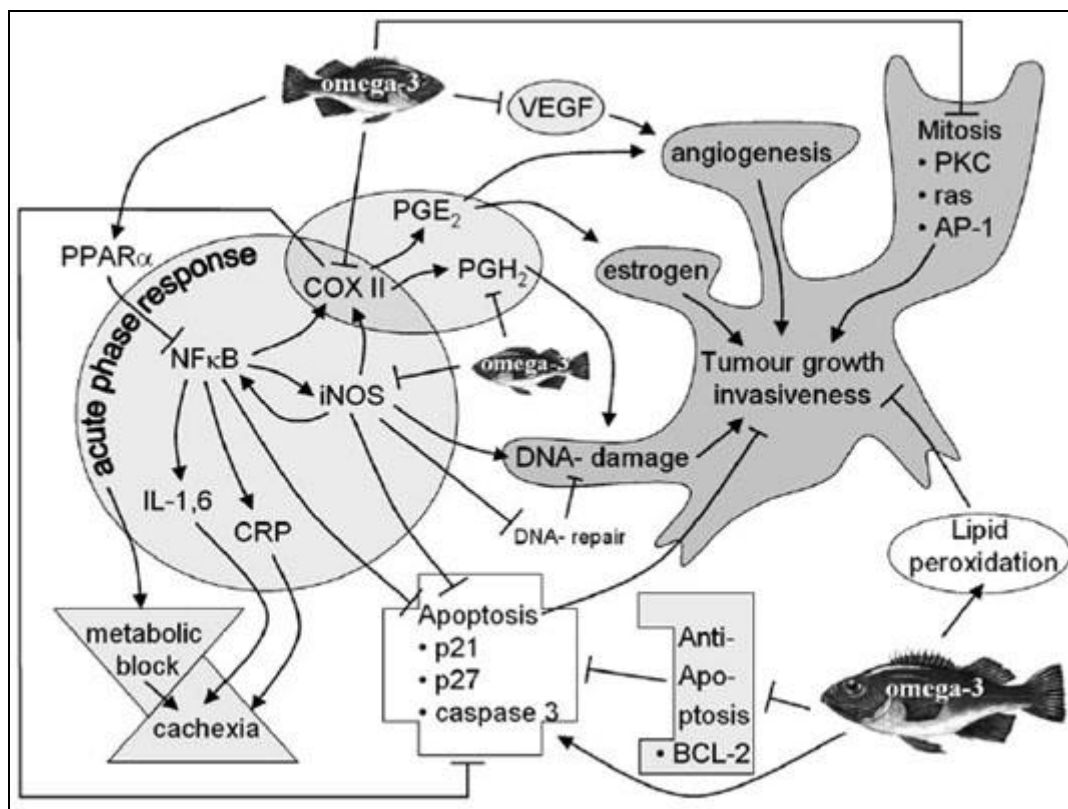
15.10 DALŠÍ MECHANIZMY PŮSOBENÍ n-3 VNMK

Jeden z mechanismů protinádorového působení n-3 VNMK zahrnuje také *inhibici metabolismu AA kompeticí o metabolizující enzymy*. Jsou pak produkovány méně biologicky aktivní a protizánětlivé produkty odvozené od EPA (PG typu 3 a LT typu 5, resolvinu E) nebo DHA (resolvinu D a neuroprotektiny) (obr. 15-42). Tímto způsobem mohou n-3 VNMK ovlivnit i produkci a funkci různých cytokinů (zejména prozánětlivých). Studie na laboratorních zvířatech i u lidí ukazují, že n-3 VNMK mohou ovlivnit (zvýšit nebo snížit) produkce cytokinů jako je $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 u makrofágů (existují rozdíly mezi aktivovanými a rezidentními). U lidí byla po působení n-3 VNMK prokázána snížená produkce těchto cytokinů. Toto protizánětlivé a imunitní systém podporující působení může hrát úlohu i v karcinogenezi, jmenovitě u nádorů kolonu, prostaty či pankreatu.



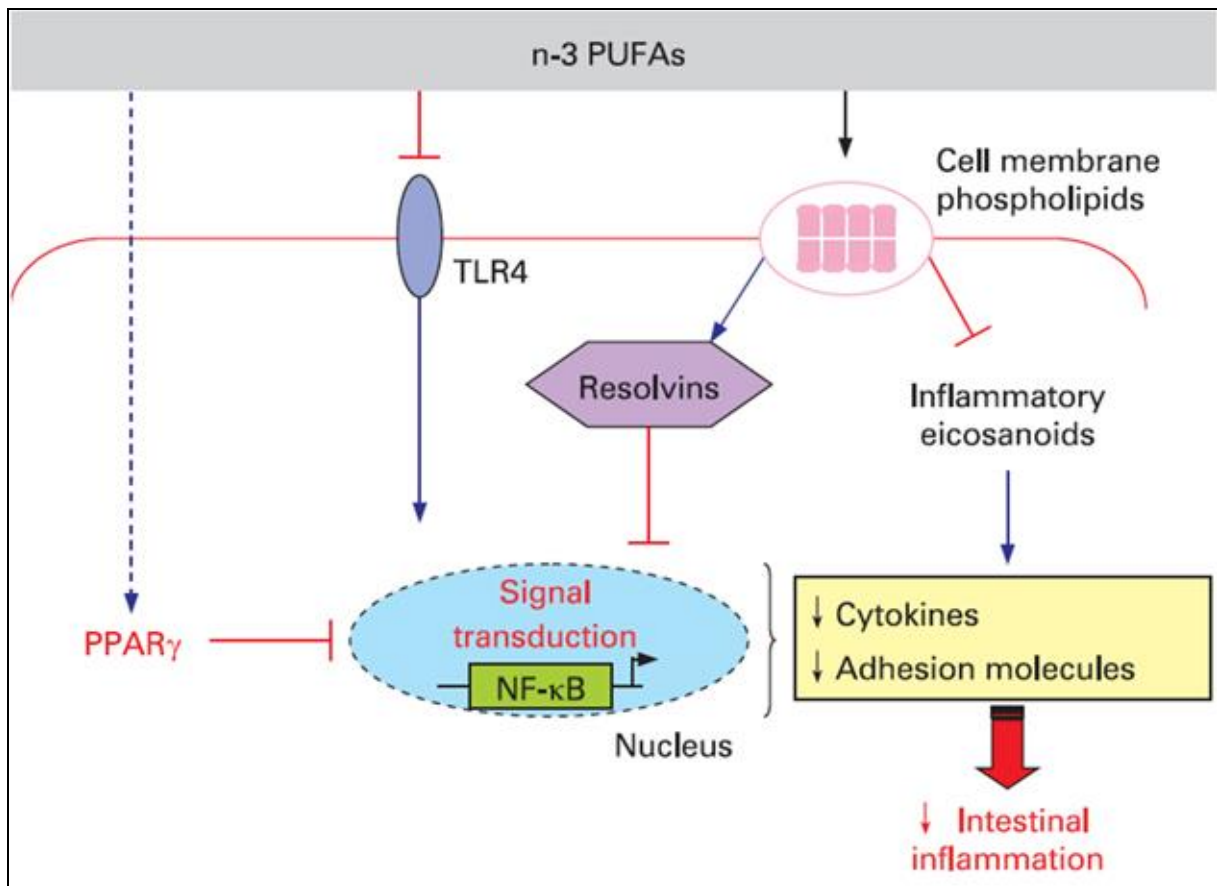
Obr. 15-42 Nové lipidové mediátory odvozené od omega-3 PUFAs. Resolviny a protektiny (*Serhan CN and Chiang N, Br J Pharmacol 2008 : S200*).

V poslední době bylo prokázáno, že VNMK typu n-3 a n-6 mohou odlišně ovlivňovat nejen vlastnosti buněčných membrán a přenos signálů do buněk, ale rovněž *dráhy přenosu signálů*, které spojují *povrchové receptory s aktivací transkripčních faktorů* (hydrolýza membránových fosfolipidů a vznik druhých posílů - DAG, ceramidy, aktivace PKC, změny intracelulárního Ca²⁺) nebo přímou vazbou na vnitrobuněčné receptory - transkripční faktory a změnou jejich aktivace, např. NFκB, AP-1, myc, fos, jun nebo receptory pro steroidní hormony. Tak mohou VNMK nebo jejich metabolity ovlivňovat expresi genů a regulaci důležitých buněčných procesů (obr. 15-43).



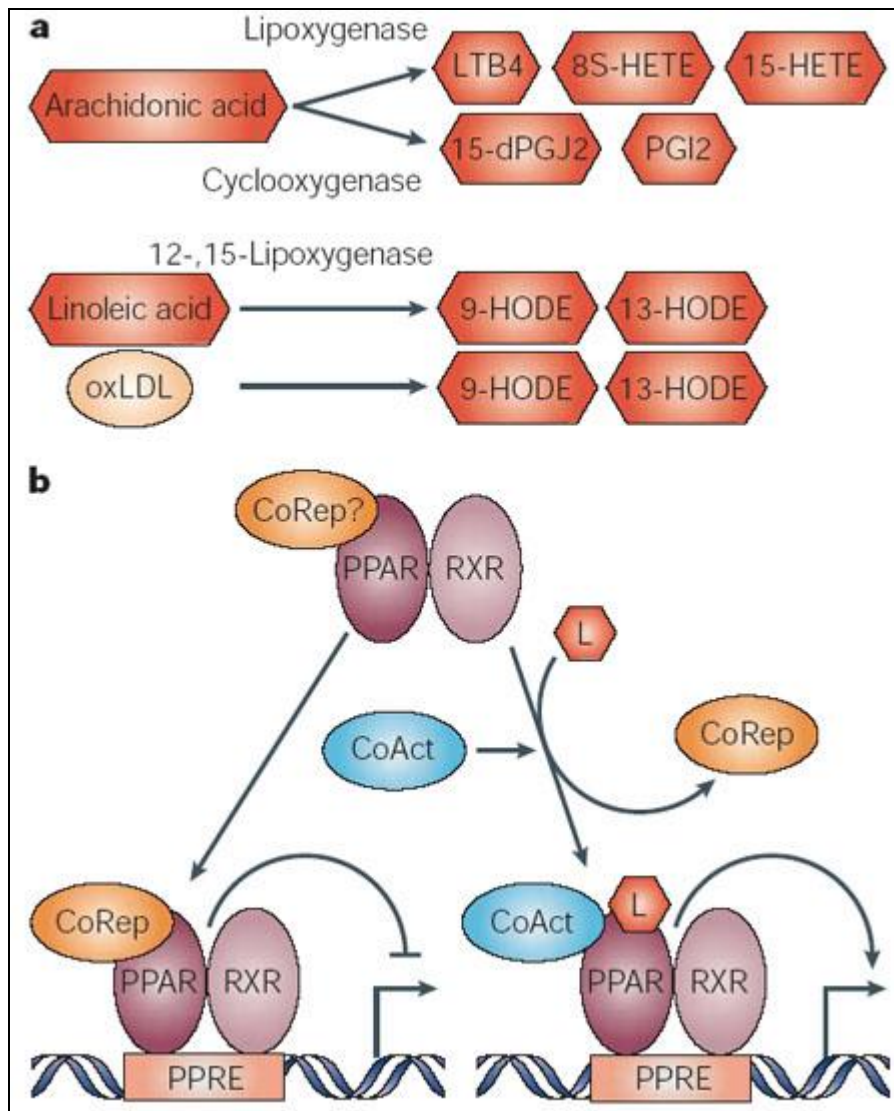
Obr. 15-43 Účinky omega-3 nenasycených mastných kyselin na růst nádoru (Stehr SN and Heller AR, Clinica Chimica Acta 2006 : 1)

NFκB je transkripční faktor, který reguluje syntézu cytokinů jako je TNF, Il-1, IL-2, IL-6 a INFβ. Mastné kyseliny a jejich produkty rovněž aktivují **jaderné receptory pro peroxizómové proliferátory (PPARα, β/δ, γ)**, které působí jako transkripční faktory, účastní se regulace lipidového metabolismu a mohou ovlivňovat proliferaci, diferenciaci a apoptózu různých typů buněk. N-3 VNMK aktivují PPARγ, který inhibuje signální dráhu NFκB a mohou inhibovat toll-like receptor 4 (TLR4). Tyto regulační dráhy snižují produkci prozánětlivých cytokinů a expresi adhezivních molekul, což vede např. ke snížení zánětu střeva (obr. 15-44).



Obr. 15-44 Mechanizmy působení n-3 PUFAs v zánětu střeva (*Marion-Latellier R et al., Gut 2009 : 586*)

Aktivátory PPAR jsou AA, LA a jejich deriváty, např. LTB₄ nebo 8S-HETE, které aktivují PPAR α , 15-deoxy PGJ₂ a 15-HETE aktivující PPAR γ nebo PGI₂ (prostacyklin) aktivující PPAR β/δ . PPAR fungují jako heterodimery s RXR a dalšími koaktivátory a korepresory a vážou se na specifický responsivní element DNA přítomný v promotorové oblasti řady genů, které jsou takto transkripčně aktivovány (obr. 15-45).

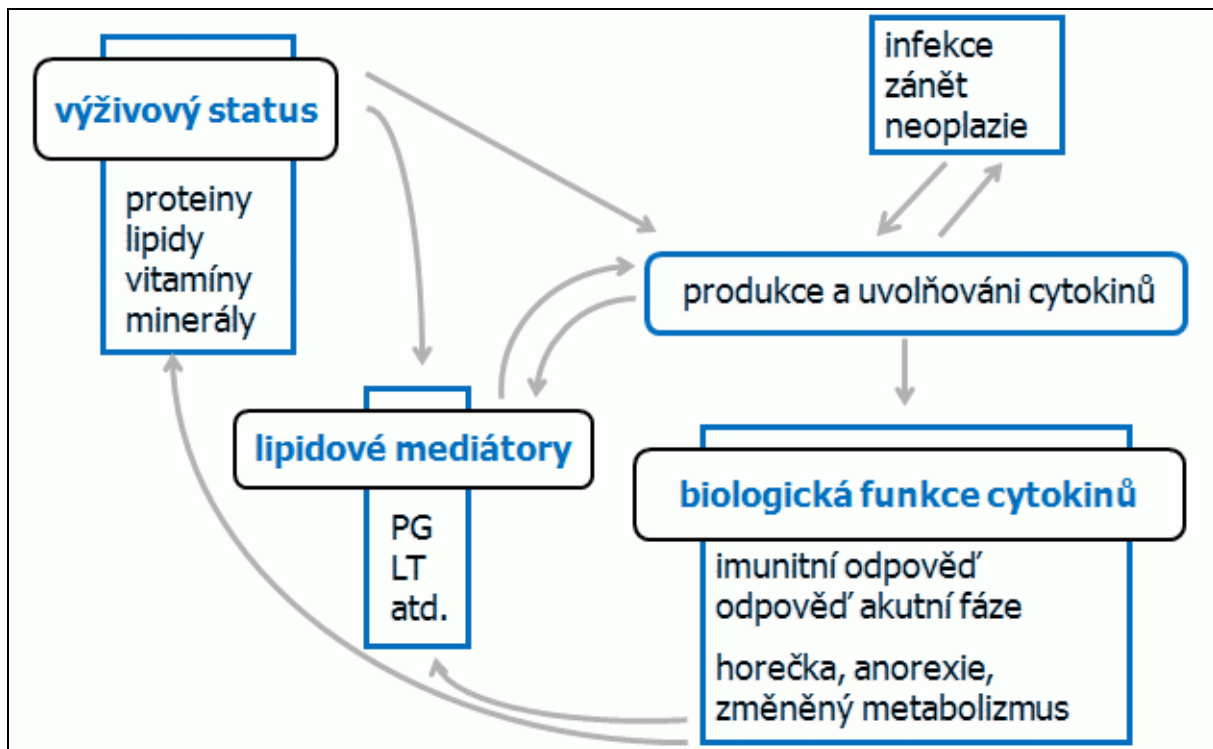


Obr. 15-45 Mastné kyseliny a jejich metabolity fungují jako aktivátory PPARs (*Michalik L et al., Nature Rev Cancer 2004 : 61*)

Dalšími transkripčními faktory ovlivňovanými VNMK jsou např. **SREBP (sterol regulatory-binding proteins)** nebo i **estrogenní receptor**.

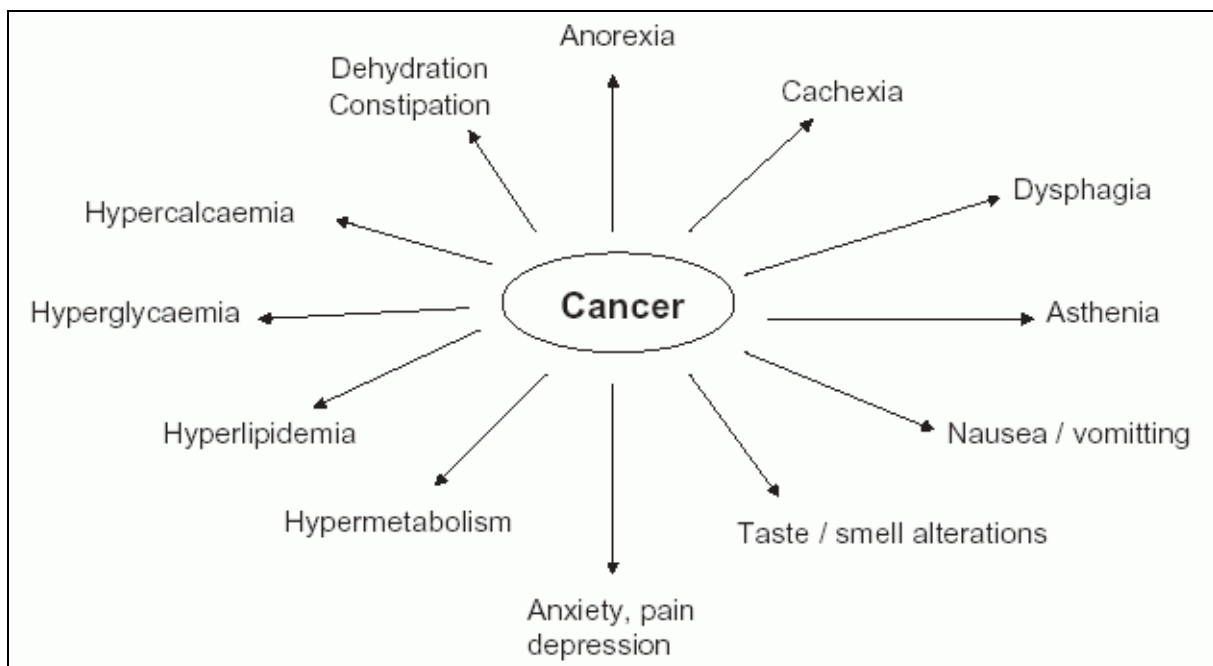
15.11 PRAKTICKÉ ASPEKTY - KLINIKA

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že existují *vzájemné vztahy mezi výživou (jejími lipidovými složkami), infekčními a zánětlivými chorobami zprostředkovanými cytokiny i rozvojem některých nádorových onemocnění* (obr. 15-46).



Obr. 15-46 Vzájemné vztahy mezi výživou a infekčními a zánětlivými chorobami zprostředkovanými cytokiny (podle Meydani S.N., *Nutrition* 1998 : 8)

U pacientů s nádory se vyvíjejí specifické klinické symptomy, které mohou být ovlivňovány výživou (obr. 15-47).



Obr. 15-47 Klinické symptomy vznikající u pacientů v průběhu nádorového onemocnění (Roynette C.E., *Clinical Nutrition* 2004 : 139)

Z poznatků získaných z epidemiologických, experimentálních i cílených klinických studií o úloze a mechanismech působení VNMK při vzniku a rozvoji různých onemocnění včetně nádorových vycházejí pak dietetická doporučení směřující zejména k uchování zdraví a prevenci onemocnění, ale také k využití těchto látek v terapii.

Prevence	Terapie
<p>Epidemiologické studie</p> <p>snížená incidence nádorů (kolonu) v populacích konzumujících velké množství ω-3 VNMK z mořské stravy.</p> <p>Experimentální studie</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ω-3 VNMK inhibují karcinogeny-indukovanou karcinogenezi; ▪ redukují růst transplantovaných nádorů u laboratorních zvířat; ▪ snižují proliferaci a indukují apoptózu u nádorových buněk kolonu <i>in vitro</i>. <p>Klinické studie</p> <p>EPA a DHA inhibují proliferaci epiteliálních buněk kolonu u pacientů s adenomy a vysokým rizikem nádorového onemocnění.</p>	<p>Při chirurgických zákrocích předoperační perorální nebo pooperační enterální či parenterální dieta s ω-3 VNMK zlepšuje postoperační zánětlivou a imunitní odpověď a snižuje infekci.</p> <p>Dieta s ω-3 VNMK zlepšuje nádorovou kachexii a kvalitu života.</p> <p>Kombinace se standartní terapií</p> <p>(chemoterapie, záření)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ dieta s ω-3 VNMK netoxický způsob zvýšení účinků terapie; ▪ samotné použití ω-3 VNMK užitečný přístup, jestliže je vyloučena toxická standartní terapie.

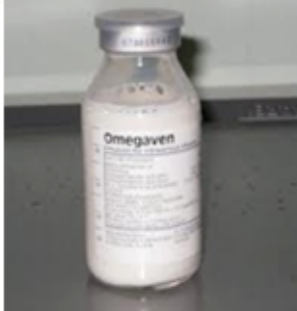
U terapeutického využití mluvíme o tzv. **nutriční farmakologii**, která využívá tyto látky buď přímo jako terapeutika nebo zejména k podpůrné terapii s ostatními léky nebo jako nosiče léků. Cílená výživa při určitém onemocnění může různým způsobem podpořit boj organismu s touto nemocí („disease specific nutrition“).

Složení a využití lipidových emulzí

Obecně jsou VNMK obsaženy v lipidových emulzích, které jsou součástí parenterální a enterální výživy i nádorových pacientů (pooperační stavy, podvýživa atd.). Tyto emulze většinou představují směsi přírodních olejů (většinou sojový, kokosový), emulgované fosfolipidy (vaječný lecitin, sojové fosfolipidy) a izotonizační přísadu (glycerol). Vytvářejí se tukové částice podobné chilomikronům (obr. 15-48).

Components	Intralipid	Elolipid	Lipofundin MCT/LCT	Nutralipid MCT	Nutralipid P
<i>Soybean oil</i>	200	200	100	100	200
<i>Egg phospholipids</i>	12	12	12	12	12
<i>Glycerol</i>	22	25	25	22.5	22.5
<i>Coconut oil (MCT)</i>	–	–	100	100	–
<i>α-tocopherol</i>	–	–	0.2	–	–
<i>Sodium oleate</i>	–	–	0.3	–	–
<i>Oleic acid</i>	–	0.30 - 0.45	–	–	–
<i>Sodium hydroxide</i>	to pH 8	0.04 - 0.08	–	–	–
<i>Water for injection to</i>	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000

Omegaven – obsahuje rybí olej (omega-3 MK)
SMOFlipid – sójový, kokosový, olivový a rybí olej
Umělé strukturální triglyceridy



Obr. 15-48 Složení klinicky využívaných lipidových emulzí v parenterální výživě

V parenterální výživě jsou aplikovány nitrožilně jako součást tzv. „all-in-one“ vaků a slouží zejména jako zdroj energie a esenciálních MK. Mohou však být využívány i jako součást **enterální i orální výživy**

Význam složení tuků v parenterální výživě pacientů

V oblasti nutriční farmakologie mohou být využívány i jako farmaka na základě nových poznatků o regulační úloze lipidů. MK jsou v lipidových výživách obsaženy ve formě triglyceridů (TG).

- **LCT (“long chain” TG)** jsou získávány z rostlinných olejů s vysokým obsahem VNMK. Většinou je to sójový olej s vysokým obsahem n-6 LA. Existují i emulze, které obsahují n-3 VNMK jako je např. Omegaven nebo SMOFlipid. Zdrojem n-3 VNMK může být jak rybí tak řasový olej. S ohledem na možné regulační funkce těchto složek je důležitý poměr n-3 : n-6 VNMK zejména např. s ohledem na protizánětlivé účinky. Cílem je tedy optimalizace složení těchto emulzí s ohledem na diagnózu, zejména u onkologických pacientů.

- **MCT (“medium chain” TG)** představují nasycené MK (6-12 uhlíků) a slouží především jako zdroj energie a působí proti supresi imunitních a fagocytárních funkcí u silně stresovaných pacientů. Některé emulze jsou směsmi LCT/MCT.

Ukazuje se, že složení lipidových výživ může mít významné dopady na stav organismu a jeho boj s onemocněním. Obecně ovlivňuje pooperační stavy, infekci, sepsi, hojení ran a je prokázáno, že využití n-3 VNMK jako součástí těchto lipidových výživ může mít pozitivní účinky, přispívá k ryhlejším zotavení organismu a zkracuje dobu pobytu v nemocnici. Důležité je prokázané pozitivní působení n-3 VNMK ve stavu nádorové kachexie, kde se snižuje produkce TNF α (kachektin), prozánětlivého cytokinu spojeného s kachexií a podporuje se činnost imunitního systému.

Bylo prokázáno, že složení lipidových emulzí ovlivňuje spektrum lipidů v plazmě i v membránách erytrocytů i buněk různých tkání, přičemž metabolismus a obrat fosfolipidů v membránách transformovaných nádorových buněk se zásadně liší od buněk netransformovaných. Na základě výzkumů je známo, že změny ve složení fosfolipidů membrán mění její vlastnosti (fluiditu, produkci volných reaktivních radikálů a biologicky aktivních metabolitů - eikosanoidů), což se dále odráží ve schopnosti příjmu a přenosu signálů důležitých regulačních molekul s následnými účinky na důležité biologické procesy jako jsou buněčný růst, diferenciace a apoptóza a dále funkce buněk imunitního systému.

Změny membrán, signálování a růstových vlastností nádorových buněk po působení VNMK mohou také významně modulovat jejich citlivost k různým terapeutickým zásahům (chemoterapeutika, cytostatika) a mohou přispět k překonání rezistence. Ukazuje se, že kombinace n-3 VNMK s některými chemoterapeutiky (doxorubicin, fluorouracil, irinotecan, paclitaxel), které mají řadu vedlejších účinků, umožňuje snížit jejich dávku, redukuje vedlejší účinky a kachexii. K širšímu využití těchto dietetických složek je však potřeba přinést další vědecké důkazy jak v experimentální tak v klinické oblasti.

Kontrolní otázky k tématu:

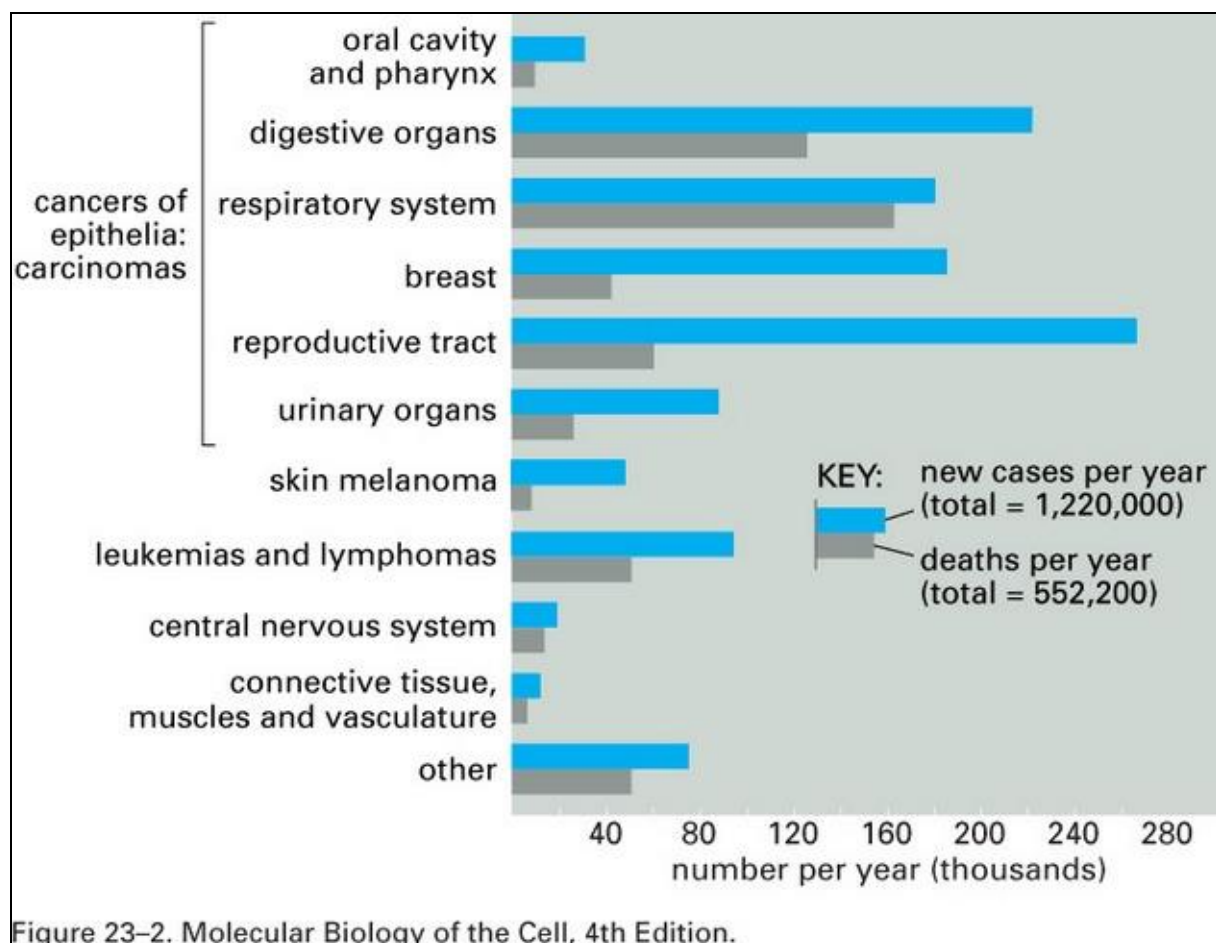
- Které typy lipidů jsou významné s ohledem na nádorová onemocnění?
- Proč jsou některé nenasycené MK esenciální, vyjmenujte základní typy.
- Jaké metabolity vznikají z jednotlivých typů VNMK?
- K jakým zásadním změnám došlo v industriální společnosti vzhledem k lipidům ve stravě?

- Co kóduje gen fat-1 a jak byl využit ve výzkumu?
- Které jsou hlavní mechanismy působení VNMK uplatňující se v průběhu karcinogeneze?
- Jak byste koncipovali studii (např. na hlodavcích) na důkaz pozitivního či negativního působení určitého typu lipidů na vznik a rozvoj nádoru?
- Jaké změny v lipidech a jejich metabolismu byly pozorovány u nádorových buněk ve srovnání s normálními buňkami?
- Co rozumíš pod pojmem lipidom a lipidomika?
- Co znamená lipogenní charakter nádorových buněk a které molekuly jsou s touto vlastností spojeny?
- Popište uvolňování a metabolismus kyseliny arachidonové v buňkách.
- Které metabolity AA a jakým způsobem se uplatňují v rozvoji nádorů?
- Které látky nazýváme nesteroidní antiflogistika a k čemu jsou využívány?
- Jaké jsou hlavní známé mechanismy působení n-3 VNMK na buněčné a molekulární úrovni?
- Jaký význam mají lipidové membránové mikrodomény?
- Jaké je jejich složení a čím je ovlivňováno?
- Jakým způsobem funguje přenos VNMK do buněk?
- Co se děje s VNMK po vstupu do buněk?
- Jaká je skladba a význam tzv. lipid droplets?
- Jak chápeš oxidativní stres a jak se na něm mohou podílet VNMK?
- Která VNMK je významná s hlediska funkce mitochondrií a proč?
- Jakým způsobem ovlivňují n-3 VNMK metabolismus kyseliny arachidonové?
- Jaké transkripční faktory jsou důležité v souvislosti s působením VNMK?
- Co znamená nutriční farmakologie?
- Jak jsou poznatky o VNMK využívány v klinice?
- Které složky by dle vašeho názoru měla obsahovat výživa onkologických pacientů?

16. PREVENCE, DIAGNOSTIKA A LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

16.1 PREVENCE

Obecně je **prevence (předcházení) onemocnění** považována za nejlepší způsob boje s chorobami. Nezanedbatelný je také *ekonomický aspekt*, zejména tam, kde je léčba velmi drahá a ne vždy zcela úspěšná, což jsou právě nádorová onemocnění. Prevencí se omezuje incidence (výskyt) onemocnění, léčbou pak lze snížit úmrtnost na dané onemocnění (obr. 16-1).



Obr. 16-1 Incidence a úmrtnost na nádorová onemocnění (USA) (Figure 23-2. *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*)

K tomu, abychom mohli provádět preventivní opatření a vyloučit faktory, které způsobují nebo přispívají ke vzniku onemocnění, je nutné zkoumat a odhalovat konkrétní mechanismy vzniku a rozvoje těchto nemocí. S nárůstem poznatků o genetických i negenetických faktorech souvisejících s nádorovým onemocněním se rozšiřují rovněž možnosti prevence. Ta spočívá jednak v identifikaci genetických abnormalit, zejména dědičných, souvisejících s určitými

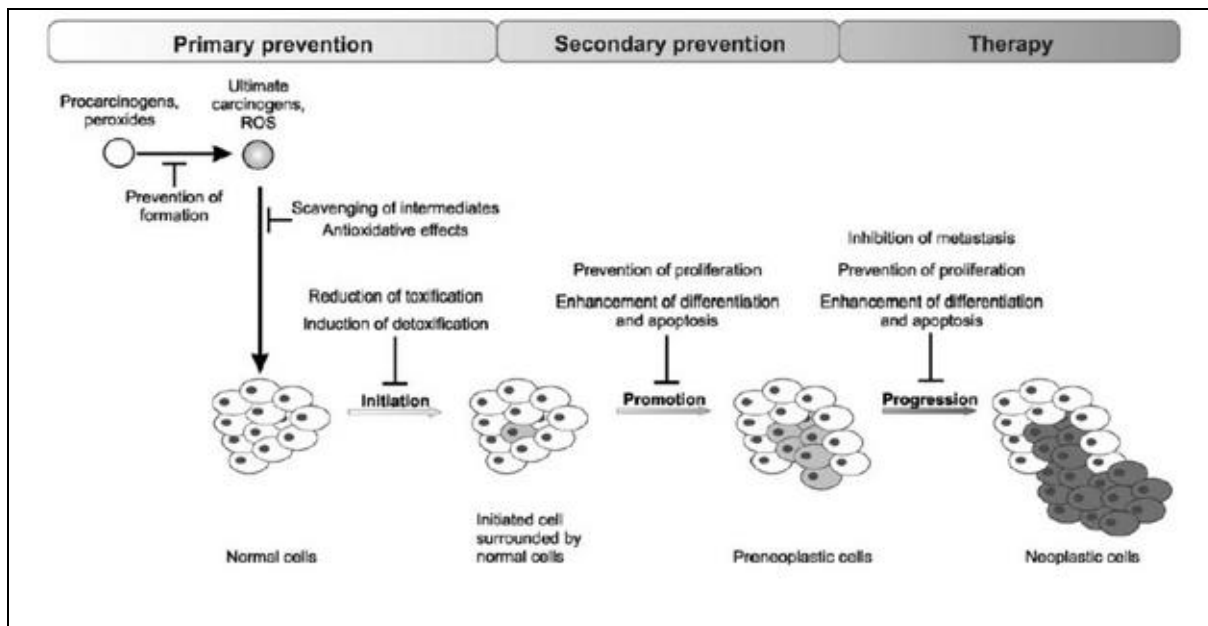
typy nádorových onemocnění a podchycení jedinců náchylných k onemocnění. Na základě cytogenetických analýz nebo např. enzymových markerů se vytvářejí a vyhodnocují tzv. „family trees“ (obr. 16-2).



Obr. 16-2 Dědičnost nádorových onemocnění. Mutace specifických genů způsobují zvýšenou náchylnost (susceptibility) k určitým typům nádorů. Důležité jsou rodinné anamnézy („family trees“).

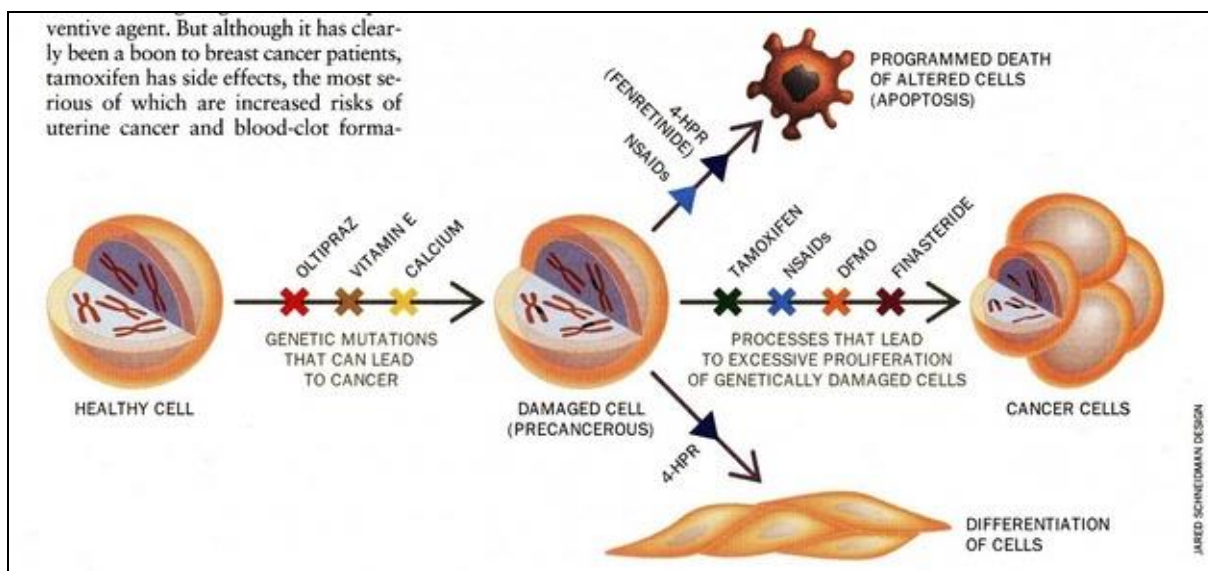
Od toho se odvíjí rovněž vyloučení faktorů vnějšího prostředí a životního stylu, které by mohly vznik a rozvoj podporovat, jak u náchylných tak normálních jedinců. K nejzávažnějším patří zejména kouření, nezdravá strava, nedostatek pohybu, expozice chemickým látkám či záření (ionizující i UV). Existuje také řada faktorů a látek, které mohou aktivně působit proti onemocnění, např. fyzická aktivita a zdravá strava obsahující prospěšné látky.

Primární prevence inhibuje iniciaci buněk redukcí toxicity nebo indukci detoxifikace. *Sekundární prevence* redukuje přeměnu iniciovaných buněk v preneoplastické supresi proliferace nebo indukci diferenciaci nebo apoptózy. *Terapie* se potom zaměřuje na omezení rozvoje onemocnění do progresivního stadia (obr. 16-3).



Obr. 16-3 Prevence a terapie (Scharlau D et al., Mutat Res 2009, 682:39)

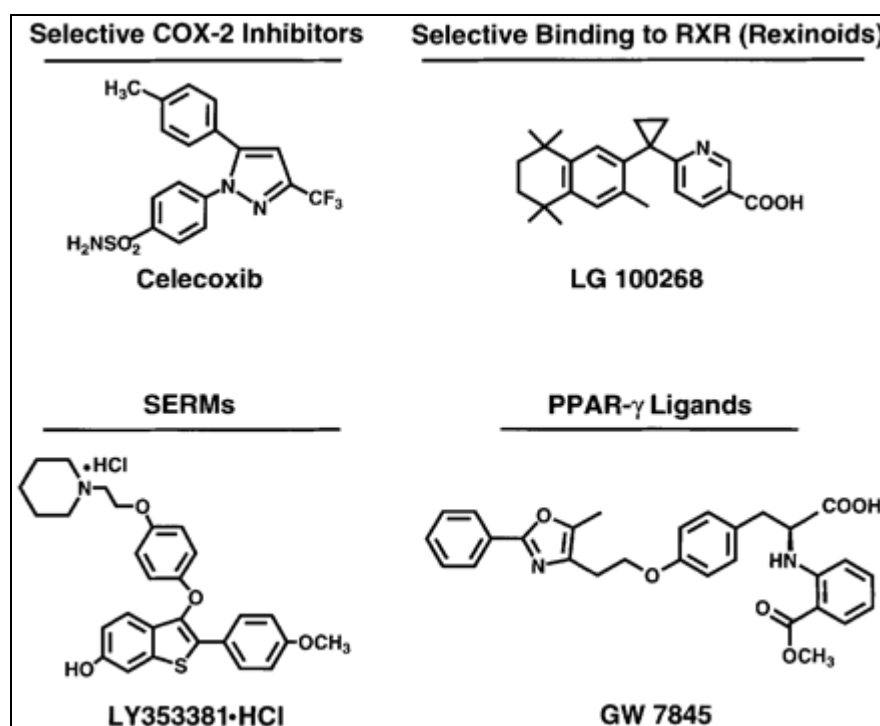
Na využití znalostí o prospěšném působení některých látek je založena **chemoprevence** (obr. 16-4). Jedná se o *přírodní, ale i syntetické látky zasahující v raných fázích karcinogeneze*. Mnoho z těchto sloučenin je obsaženo především v ovoci a zelenině. Laboratorní a epidemiologické studie u nich prokázaly např. schopnost aktivovat detoxifikační enzymy, antioxidantní účinky, ale i řadu dalších mechanismů.



Obr. 16-4 Chemoprevence a chemoterapie (Greenwald P., Scientific American 1996 : 96)

K přirozeným látkám patří α -tokoferol, β -karoten, vitamin A a retinoidy (zelenina, ovoce), dithiolthiony a sulforaphan (brokolice, květák, kapusta), genistein (sója), epigallocatechine

gallate (zelený čaj), curcumin (kari), polyfenoly (tmavé bobuloviny – ostružiny, borůvky, černý rybíz), lykopen (rajčata), resveratrol (červené víno) i látky obsažené v česneku. K uměle syntetizovaným chemopreventivním sloučeninám patří např. tamoxifen - antiestrogen – hojně využívaný v prevenci u žen se zvýšeným rizikem vzniku nádoru prsu. Finasterid, který blokuje přeměnu testosteronu na androgen, působí preventivně u nádorů prostaty. DFMO (difluorometylnitritin) blokuje aktivitu ornitin dekarboxylázy a působí preventivně u různých typů nádorů. Širokou skupinu látek s různými účinky tvoří protizánětlivé nesteroidní látky (NSAID) jako jsou aspirin, indometacin, diclofenac, piroxicam, sulindac a další, z nichž některé jsou využívány pro prevenci rozvoje kolorektálních nádorů. Patří k nim inhibitory cyklooxygenáz (COX) zejména selektivní inhibitory COX-2. Na základě znalostí mechanismů působení jsou využívány i ligandy různých vnitrobuněčných receptorů např. ligandy receptorů pro retinoidy (RXR, RAR) nebo pro peroxisomové proliferátory (PPAR). Stále jsou také vyhledávány nové možnosti na základě strukturálních studií (obr. 16-5).



Obr. 16-5 Příklady syntetických chemopreventivních látek

16.2 DIAGNOSTIKA

Na základě vědeckých poznatků a rozvoje technologií se rozvíjí rovněž možnosti včasné diagnostiky nádorových onemocnění.

Kromě laboratorních vyšetření (sedimentace erytrocytů, hematologické vyšetření, biochemická vyšetření) je dnes již známá celá řada tzv. **nádorových markerů** (*tumor markers*, TM) (obr. 16-6).

Obr. 16-6 Biochemická klasifikace nádorových markerů (TM)

- **Humorální TM** (detekovatelné v tělních tekutinách)
 - *onkofetální antigeny* (CEA, AFP, CA 15–3 atd.)
 - *enzymy* (PSA, NSE, TK, LD atd.)
 - *hormony* (hCG, PRL, PTH, ADH atd.)
 - *plazmatické proteiny* (ferritin, β 2M, paraproteiny aj.)
 - *ostatní* (HIAA, VMK atd.)
- **Buněčné TM** (ER, PR, HER2/neu atd.)
- **Genetické TM** (ATM, BRCA1/2, p53, Rb1 atd.)

Jsou to **laboratorně prokazatelné** známky, od kterých se nádorové bujení odvíjí (onkogeny, nádorově supresorové geny) nebo kterými se nádorové onemocnění projevuje (nádorové antigeny, produkty nádorových buněk nebo reaktivní produkty nenádorových buněk). V užším (klinickém) slova smyslu představují *látky stanovitelné v krvi, moči nebo tkáni, které mají vyšší hodnotu u nádorových onemocnění*. Jsou používány k *zpřesnění diagnózy, sledování průběhu terapie a časnému zachytu relapsu onemocnění*. Mohou být produkovány přímo buňkami nádoru nebo buňkami nenádorovými v reakci na přítomnost nádoru, ale mohou být někdy zvýšeny i z nenádorových příčin.

Nádorové markery můžeme dělit podle místa produkce, specifčnosti, chemické struktury a biologického charakteru. Existuje řada rutinně používaných nádorových markerů (CA 15-3, CEA, proliferační a cytokeratinové markery), stejně jako těch, jejichž prognostický a prediktivní význam v séru je předmětem diskuse (HER-2/Neu, uPA, PAI-1, metaloproteinázy a jejich inhibitory apod.). Detaily existují v doporučeních odborných společností European Group on Tumor Markers (EGTM), American Society of Clinical Oncology (ASCO) a National Academy of Clinical Biochemistry (NACB).

Nádorově specifické nádorové markery souvisí s přítomností určité nádorové tkáně. Vzhledem k tomu, že se produkce TM u různých nádorových tkání značně překrývá, je specifita nízká. Jsou vhodné ke **sledování remise nádorového onemocnění a časně diagnózy relapsu onemocnění**: např. CEA (karcinom gastrointestinálního traktu - GIT); CA19–9 (karcinom pankreatu); CA125 (karcinom ovárií) aj.

Tkáňově specifické nádorové markery souvisí spíše s určitou tkání, ve které může probíhat patologický děj (např. růst nádoru). Často bývají zvýšeny z nenádorových příčin (např. PSA u mužů – prostata; hCG a AFP – zárodečná ev. jaterní tkáň)

Příklady nádorových markerů:

Název **CA** je odvozen z komerčních setů pro jeho určování (carbohydrate antigen) hlavně z nádorů žlázového epitelu a epitelu mléčné žlázy.

- **CA 15-3:** zvýšen u karcinomu prsu – senzitivita 75 %, specifita 90 %, některé nádory GIT. Falešná pozitivita možná u hepatopatií, cholangitidy, plicních nemocí, renálních poruch, gravidity.
- **CA 19-9:** zvýšen u karcinomu pankreatu, žaludku, prsu, kolorekta. Falešná pozitivita – obstrukční ikterus
- **CA 72-4:** zvýšen u karcinomu žaludku, jícnu, plic a ovárií.
- **CA 125** zvýšen u karcinomů ovárií a je využíván pro screening u žen s ovariálním karcinomem v rodinné anamnéze a sledování **léčby karcinomu ovárií**. Falešná pozitivita zjištěna u benigní afekce ovárií a endometria, hepatopatie, pankreatitidy, v těhotenství, během menstruace.
- **SCCS (squamous cell carcinoma) antigen** je zvýšen u dlaždicobuněčných CA v různých lokalizacích
- **TPA/S (tkáňový polypeptidový antigen)** je směs asi 20 fragmentů cytokeratinů. Je to marker proliferace a jeho plazmatická hladina odpovídá růstu různých karcinomů (hlavně karcinom močového měchýře, hlavy a krku)
- **CYFRA 21-1** fragmenty cytokeratinu 19 – specifitější pro nemalobuněčný karcinom plic.
- **Antigen mucinózních karcinomů (MCA):** marker karcinomu prsu, jeho vzestup je dříve než CA 15-3. Užívá se jako potvrzení při zvýšeném CA 15-3.

Onkofetální antigeny:

- **AFP: α -fetoprotein** - zvýšen u nonseminomů, u ostatních germinálních nádorů (testikulární nádory, teratom) a u hepatocelulárního karcinomu (hCC), kde je až 95% senzitivita. Zvažuje se screeningové vyšetřování u rizikových skupin (cirhotici, hepatitida B aj.).
- **CEA: karcinoembryonální antigen** – zvýšen u nejčastějších typů nádorů (obr. 16-7).

Obr. 16-7 Karcinoembryonální antigen CEA

- rodina 36 glykoproteinů na povrchu membrán buněk řady orgánů ektodermálního původu, zejména GIT
- běžně vytvářen v epiteliálních buňkách během fetálního vývoje, ovlivňuje buněčnou adhezi, funkce není plně známa
- má nepřímý imunosupresní vliv na T lymfocyty
- poločas 7–14 dní
- norma do 3 mg/l u kuřáků do 5 mg/l
- může být zvýšen u cirhózy a u zánětů GIT
- produkce u kolorektálního, prsního, plicního a ovariálního karcinomu a metastatického postižení jater
- pokles CEA po 4. týdnu po zákroku svědčí o úspěchu

Enzymy

Klinicky signifikantní může být zvýšení enzymatické aktivity enzymů některého orgánu nebo nadprodukce fetálních enzymů

- **PSA: *prostatický specifický antigen*** – zvýšen u nádorů prostaty (**obr. 16-8**)

Obr. 16-8 PSA prostatický specifický antigen

- biochemicky se jedná o serinovou proteázu
- produkován normálními i nádorovými buňkami prostaty
- naprostá většina secernována do tekutiny produkované semennými váčky, kde přispívá ke zkapalnění ejakulátu
- zvýšen u karcinomu prostaty, ale i při/po jiných fyziologických/patofyziologických jednotkách (nejčastěji ejakulace, p.r. vyšetření před odběrem)
- referenční hodnoty stoupají s věkem (<2,5 µg/l < 50let; <5 µg/l 50-60let; 8,5 < µg/l >60let)
- hodnoty nad 10 µg/l – 50% riziko karcinomu
- v plazmě přítomný jak volný PSA (fPSA) tak vázaný PSA, jejich součet se nazývá total PSA (tPSA) – poměr fPSA/tPSA usnadňuje diagnostiku → nad 25 % – pravděpodobně benigní léze; pod 10 % spíše maligní etiologie 10-25 % zóna překryvu
- asi 20 % ca prostaty má PSA v normě!!!

- **NSE: *neuron specifická enoláza*** – zvýšena u neuroblastomů, retinoblastomu, maligního melanomu, malobuněčného karcinomu plic.
- **LD:** zvýšen u testikulárních nádorů, leukemií
- **ALP:** zvýšen u sarkomů, karcinomů prostaty (prostatická frakce)

- **GMT:** zvýšen u metastatického postižení jater (obecně), u alkoholiků, obstrukce žlučovýchodů
- **K thymidinkináza** představuje náhradní cestu syntézy DNA. Bývá zvýšena u leukemií, lymfomů, nemalobuněčných nádorů plic

Hormony

- **hCG lidský choriový gonadotropin** je placentárního původu s gonadotropními účinky. Zvýšen u tumorů trofoblastu, choriokarcinomu – 100 % senzitivita, germinálních nádorů testes a ovarií; těhotenství. Využití pro screening ohrožených osob.

Plazmatické proteiny

- **Ferritin** bývá zvýšen u mnohočetného myelomu, AML
- **β2 mikroglobulin** zvýšen u mnohočetného myelomu, CLL, lymfomů

Ostatní

- **Kyselina vanilmandlová VMA** je produkt degradace katecholaminů a stanovuje se v moči u funkčních nádorů nadledvin.

Buněčné nádorové markery

- **HER2/neu** se stanovuje u karcinomu prsu a jeho zvýšená exprese značí zvýšenou proliferativní aktivitu a tak horší prognózu. Je cílem monoklonální protilátky **trastuzumab (Herceptin)**, který se aplikuje na základě zjištěné HER2/neu pozitivivity nádoru.

Genetické nádorové markery

Patří sem pro **nádor charakteristické genetické změny** jako jsou některé typické *genové mutace* či *chromozomální abnormality*.

- **p53:** "*strážce genomu*" nádorově supresorový gen regulující buněčný cyklus. Účastní se zástavy buněčného cyklu, reparační DNA a indukce apoptózy. Jeho mutace se vyskytují u více než 50 % nádorů. Tzv. Li Fraumeni syndrom je zděděná mutace zodpovědná za zvýšený výskyt karcinomu prsu, sarkomů apod.
- **BRCA 1 (breast cancer type 1 susceptibility protein)** je marker karcinomů prsu a ovarií, odpovědný za reparaci DNA. První důkaz existence byl podán v r. 1990. BRCA1 je exprimován v buňkách prsu a jiných tkání, kde se účastní reparační DNA nebo likvidace buněk pokud DNA není reparována. Pokud je nefunkční, poškozená DNA není řádně reparována a tím roste riziko vzniku nádorů.

- **BRCA2 (breast cancer type 2 susceptibility protein)** protein je nacházen uvnitř buněk a gen patří do skupiny nádorově supresorových genů. Protein se účastní reparače chromozomálního poškození a má důležitou úlohu při bezchybné reparaci dvojitých zlomů v DNA.

Analýza exprese onkologických markerů

Nádorové buňky se od normálních zdravých buněk liší na molekulární úrovni svým expresním profilem, tj. že nádorová buňka exprimuje jiné geny ze své výbavy, což se projeví změnou množství a spektra exprimované mRNA. Vyšetřením exprese vybraných markerů lze určit základní diagnózu a přítomnost metastáz, tzn. určení typu, rozsahu neboli stupně pokročilosti nádorového onemocnění. Je k tomu využívána metoda **polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR)**, pomocí níž se detekují nádorové buňky v primárním tumoru, v krvi, kostní dřeni či v lymfatickém systému pacienta. Tato metoda umožňuje zjistit nádorové buňky v koncentraci, která je hluboko pod detekčním limitem standardních vyšetřovacích metod (imunohistochemie, průtoková cytometrie aj).

Běžně používaná je řada **biochemických metody detekce**: radioimunologická (RIA), enzym vázající imunosorpční (ELISA). Ke stanovení jsou většinou využívány komerční kity a automatické analyzátory.

Součástí vyšetření bývá i **cytologické a bioptické vyšetření** (pre- nebo postoperační).

Důležité je rovněž vyšetření **stavu buněčné kinetiky**. Sledují se *počty mitóz (mitotický index), apoptóza, syntéza DNA* a jsou využívány různé metody od autoradiografických (inkorporace 3H-tymidinu), přes metody cytochemické (speciální barvení, specifické protilátky proti antigenům spojeným s proliferací jako je Ki-67, PCNA, stanovení AgNOR až k moderním metodám cytometrickým (fluorescenční a konfokální mikroskopie, průtoková cytometrie a sortování) a molekulárně biologickým (Southern, Northern a Western blotting pro analýzu DNA, RNA a proteinů). Polymerázová řetězová reakce spočívá v amplifikaci malých fragmentů DNA, vytváření cDNA knihoven z malého množství mRNA (PCR, RT-PCR), hybridizace *in situ* a microarrays.

K používaným **zobrazovacím metodám** patří ultrasonografie (vyšetření ultrazvukem, neinvazivní), rentgenové vyšetření (kontrastní vyšetření, mamografie – screening a diagnostika rakoviny prsu), magnetická rezonance (zejména vyšetření mozku a míchy). Počítačová tomografie (CT) je schopna odhalit 90 % ložisek menších než 1 cm. *Radionuklidové vyšetřovací*

metody využívají izotopy (scintigrafie, emisní tomografie). Endoskopické vyšetření pak odhaluje nádory v tělních dutinách.

Klasifikace nádorových onemocnění

Určení rozsahu onemocnění je důležité pro volbu léčebné strategie a pro odhad prognózy onemocnění. Existuje **jednotný klasifikační systém TNM**:

- T (tumor) 1-4 – rozsah primárního nádoru
- N (noduli) 1-3, 0, X – stav regionálních mízních uzlin
- M (metastases) 0, 1 – informace o metastázách

Histopatologický grading G1 – 4, X označuje stupeň diferenciaci.

Další nezávazné deskriptory jsou stadium choroby (staging) I. – IV i hodnocení tělesné zdatnosti (funkční staging)

U některých nádorů je formulován soubor prognostických znaků, tzv. **mezinárodní prognostický index (IPI)**.

Nádory jsou biologicky charakterizovány na různých úrovních.

- Klinické – staging (jeden z nejsilnějších prognostických faktorů), sledování přežití a léčebné odpovědi
- Organové – sledování odpovědi nádoru na léčbu
- Tkáňové – histologická charakteristika, grading, tkáňová architektura, vaskularizace, expresní profily – imunohistochemie, *in situ* hybridizace
- Buněčná – funkční testy, obsah DNA, proliferační a apoptická aktivita
- Molekulární – cytogenetické a genetické charakteristiky nádorových a somatických buněk

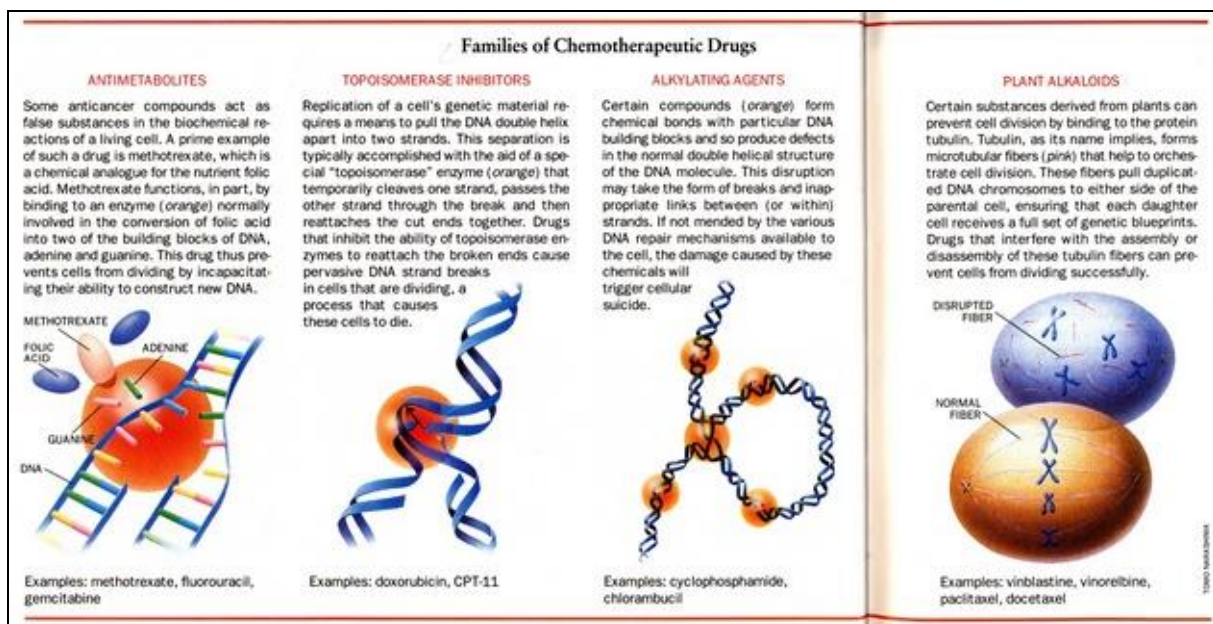
16.3 LÉČBA

K základním léčebným metodám patří u nádorových **onemocnění chirurgie (solidní nádory), ozařování, chemoterapie a nověji biologická terapie**. V současné době se většinou používá jak *kombinace těchto přístupů, tak kombinace různých léčiv*.

K nejvyužívanějším chemoterapeutickým látkám patří:

- platinové deriváty
- antimetabolity (metotrexat, fluorouracil)
- inhibitory topoizomeráz (doxorubicin, etoposid)
- alkylační činidla (cyklofosfamid)
- rostlinné alkaloidy (vinblastin, paclitaxel)

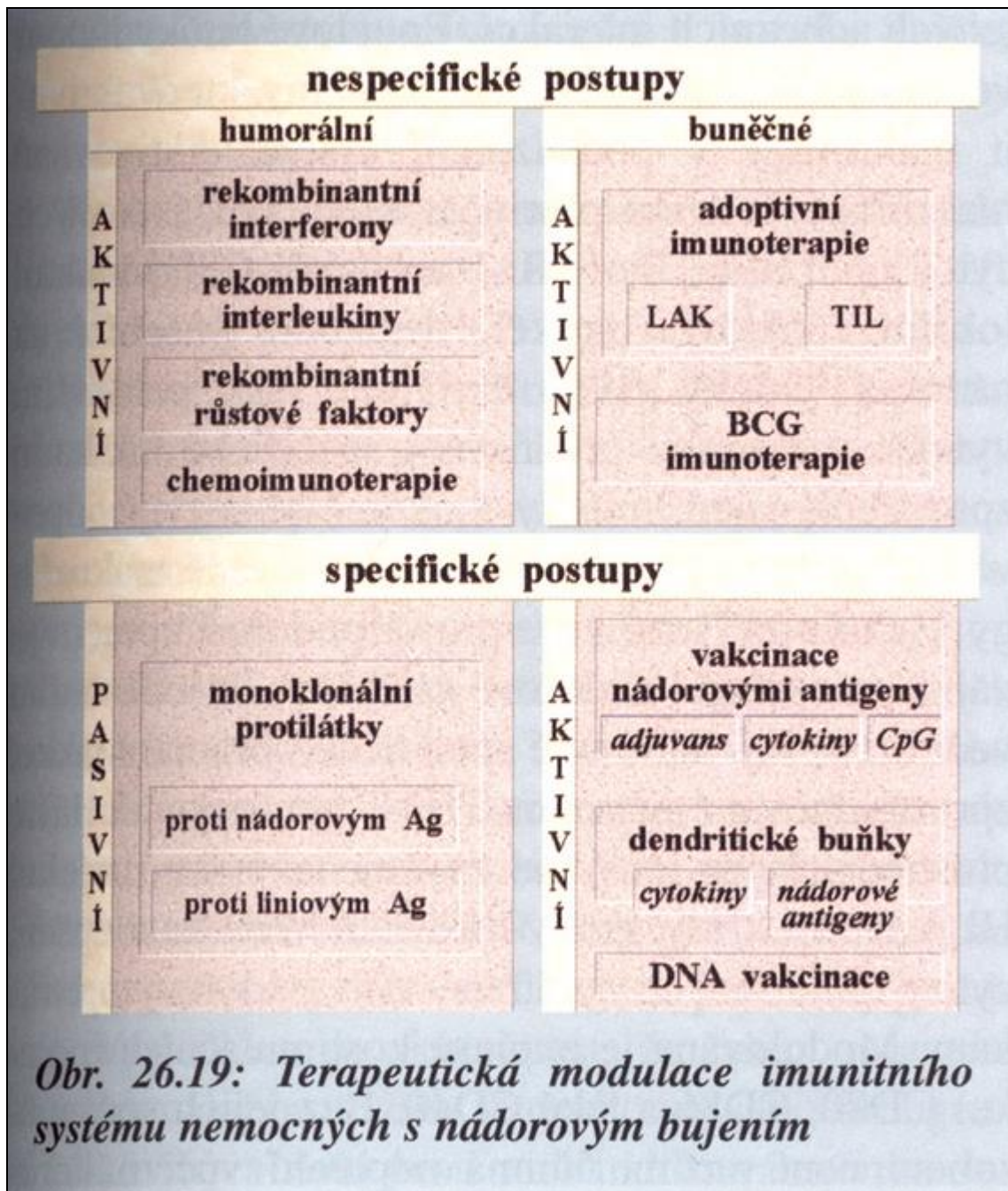
Tyto látky působí na základě různých mechanismů, z nichž mnohé jsou ještě předmětem výzkumu (obr. 16-9).



Obr. 16-9 Chemoterapeutické látky. Chemoterapeutika zabraňují množení buněk nebo indukují apoptózu různými mechanismy. Antimetabolity, inhibitory topoizomeráz a alkylační činidla blokuji syntézu DNA. Rostlinné alkaloidy blokuji mitotické dělení. (Hellman S. and Vokes E.E., *Scientific American* 1996 : 118)

Biologická terapie je charakterizována hledáním nových přístupů na základě poznání mechanismů. Jedná se o:

- Stimulace obranných mechanismů hostitele včetně specifických a nespecifických imunologických přístupů (imunoterapie) (obr. 16-10).



Obr. 16-10 Terapeutická modulace imunitního systému nemocných s nádorovým bujením (Krejsek J. a Kopecký O., *Klinická imunologie* 2004)

- Strategie cílené přímo na změnu nádorového růstu a diferenciaci s využitím růstových faktorů a genetického inženýrství umožňujícího ovlivnění klíčových genů.
- Angiogenní terapie, která je cílená proti vaskularizaci nádorů atd.

Podpůrná (symptomatická) léčba nemá za cíl smrt nádorových buněk, ale usiluje o co nejlepší kvalitu života nemocných (zmírnění obtíží vyvolaných nádorem a léčbou)

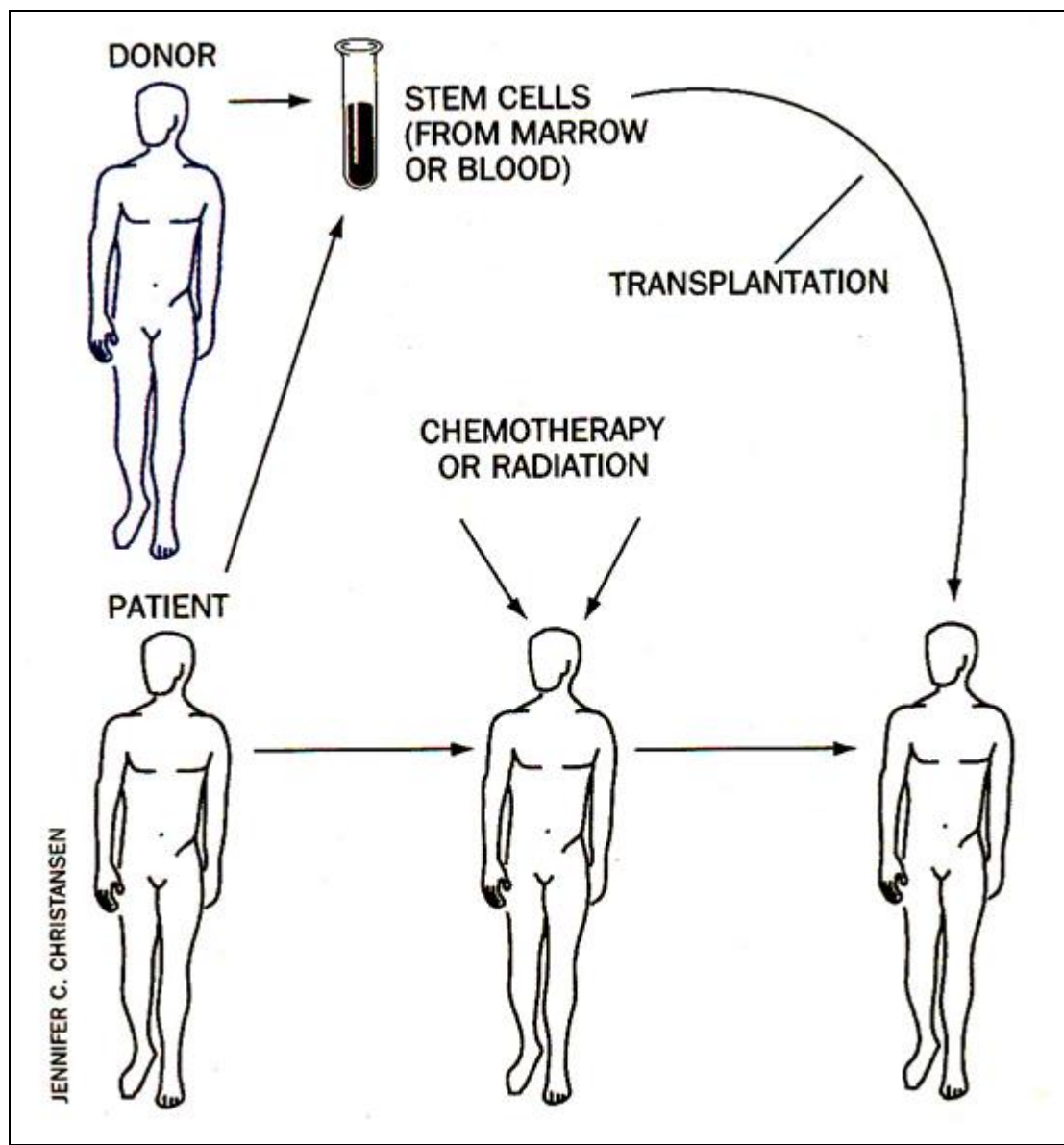
Paliativní léčba je komplexní podpůrná léčba u pacientů s pokročilým nevléčitelným onemocněním

Cílem **kurativní léčby** je vyléčení nemocného, kdežto cílem nekurativní léčby je sice zabíjení nádorových bunek, ale nemá ambice vyhubit všechny (z důvodů pokročilé fáze onemocnění, rezistence na léčbu atd.)

Adjuvantní léčebné postupy označují chemo- nebo radio-terapii u těch nádorů, kde je předpokládána přítomnost mikrometastáz. Nutným předpokladem je chemosenzitivita nádoru.

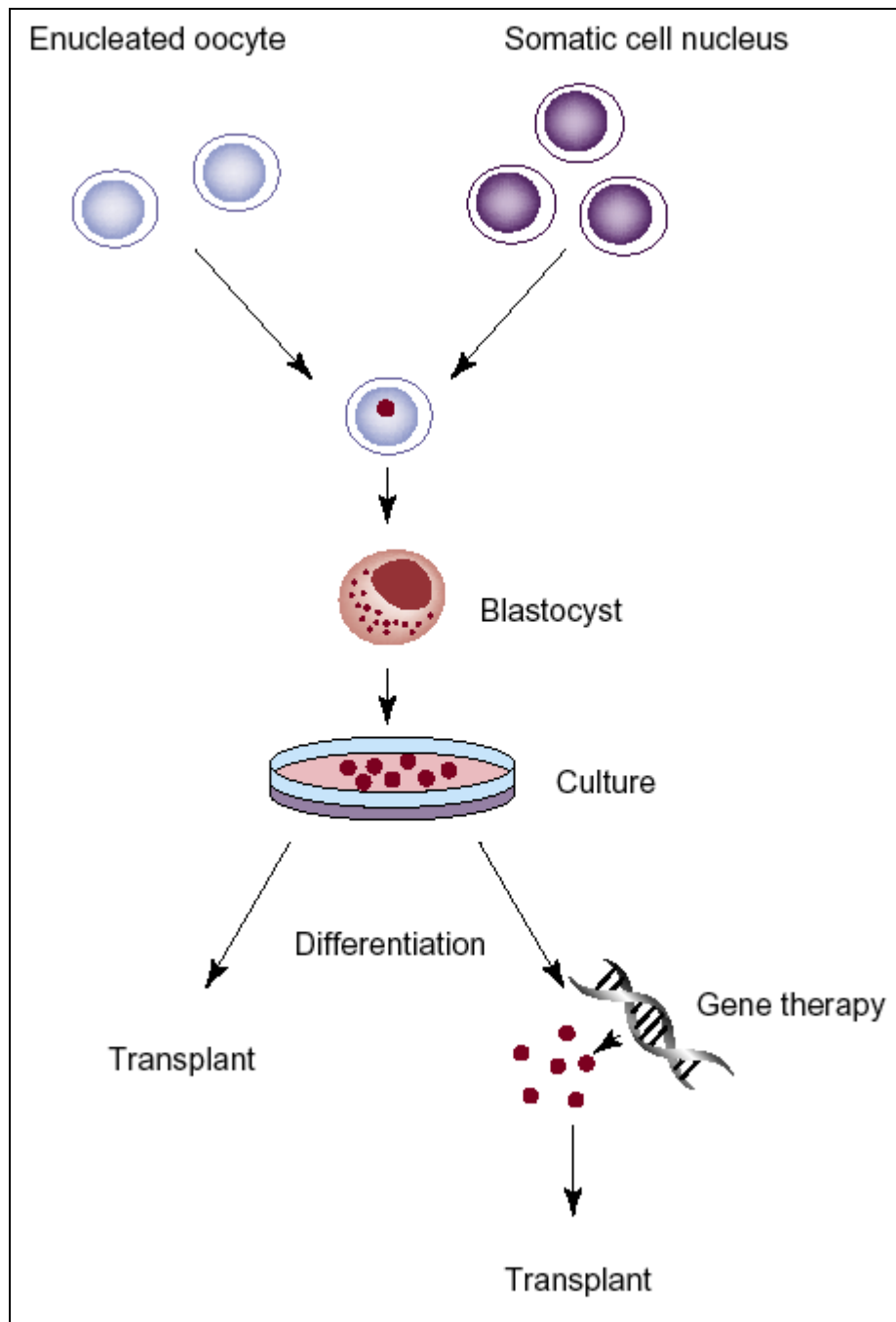
Neoadjuvantní postupy spočívají v předoperační léčbě s cílem zmenšit primární nádor před chirurgickým výkonem

Při léčbě radio- či chemoterapií se u nádorového onemocnění (nehemopoetického) často využívá **autotransplantace**. Spočívá v odběru zdravé kostní dřeně nebo krve a izolace kmenových buněk či progenitorů (někdy s podporou příslušných růstových faktorů). Po léčbě následuje zpětná transplantace pro obnovu krvetvorby (obr. 16-11).



Obr. 16-11 Transplantace (Christansen J.C., *Scientific American* 1996 : 124)

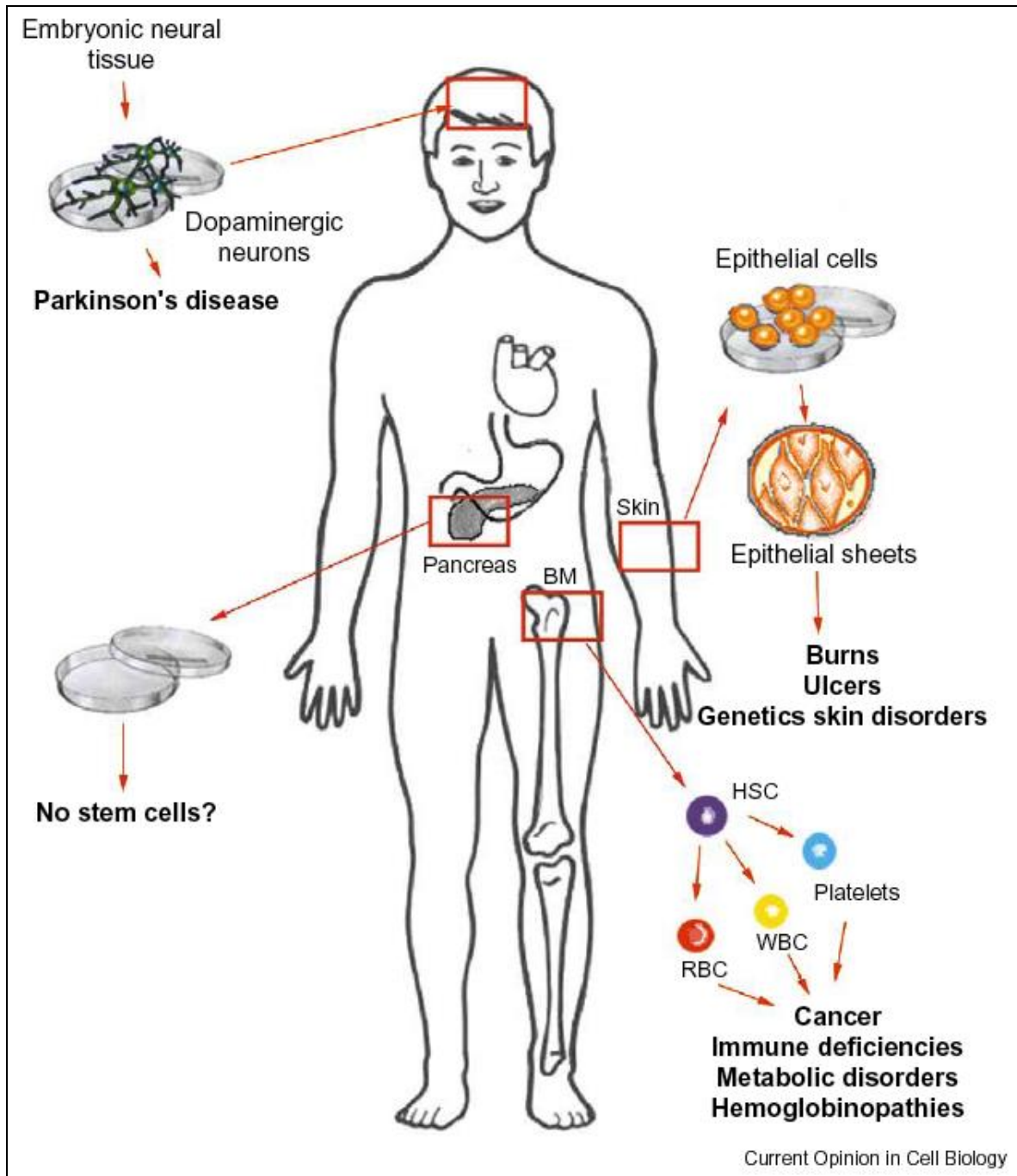
V budoucnu se na základě intenzivního výzkumu počítá rovněž s využitím **transplantace** různých typů **tkánově specifických kmenových buněk** (human stem cells – HSC) (obr. 16-12).



Obr. 16-12 Tvorba emryonálních kmenových buněk přenosem jádra somatické buňky do enukleovaného oocyty. Buňky získané z takto vytvořené blastocysty lze využít k transplantaci, příp. s využitím předchozí genové terapie k nápravě genetických poškození. (Mayhall E.A. et al., *Curr Opin Cell Biol* 2004 : 713)

Izolace HSC z kostní dřeně a následná transplantace umožňuje rekonstituci červené i bílé krevní řady u nádorů, imunologických deficiencí, metabolických poruch či hemoglobinopatií. Epiteliální buňky mohou být kultivovány a transplantovány jako autologní zdroj epiteliálních kmenových buněk u popálenin, vředů a genetických poruch kůže. Dopaminergní neurony

odvozené od embryonální neurální tkáně mohou být transplantovány při Parkinsonově chorobě (obr. 16-13).



Obr. 16-13 Využití transplantace tkáňově specifických kmenových buněk (Mayhall E.A. et al., *Curr Opin Cell Biol* 2004 : 713)

Vznik a vývoj nádorů je složitý děj, který závisí na překonání řady restričních mechanismů na úrovni genomu, buňky, tkáně i celého organismu a který pro svou komplexnost vyžaduje při plánování terapie **individuální přístup** (tailoring therapy) na základě poznanych biologických charakteristik.

Incidence nádorových onemocnění se stále zvyšuje. Přesto je dlouhodobá mortalita téměř konstantní díky výrazným léčebným a diagnostickým pokrokům. *Včasná diagnostika onemocnění několikanásobně zvyšuje úspěšnost léčby.* S tím souvisí i osvětová činnost a individuální přístup k různým **preventivním vyšetřením** (mamografie, test na okultní krev ve stolici, kolonoskopie a další), která jsou veřejnosti nabízena.

Rozvíjí se také nové léčebné postupy, vznikají *nová chemoterapeutika, je využívána kombinovaná terapie a jsou aplikovány nové poznatky o biologii nádorové buňky.*

S tím souvisí rovněž hledání nových **prognosticko/prediktivních faktorů** umožňujících přesnější rozdělení nemocných do rizikových skupin.

K zlepšení výše uvedených přístupů jsou využívány poznatky speciálních oborů, jako je *prediktivní onkologie a molekulární patologie.*

Prediktivní onkologie je klinicky orientovaný onkologický výzkum využívající metod buněčné a molekulární biologie. Je přínosný při hledání nových léčebných postupů a léčiv směřovaných na klíčové genetické změny umožňující transformaci normální somatické buňky v nádorovou.

Jsou to především

- poruchy buněčného cyklu,
- poruchy v aktivitě/množství receptorů pro růstové faktory,
- exprese protiapoptických faktorů a
- nesmrtnost nádorových buněk vázaná či nevázaná na expresi telomerázy.

Chromozomální a genetická analýza nádorových buněk je důležitým faktorem pro prognózu a individualizaci léčby. Problémem jsou zvláště solidní nádory, kde jsou cytogenetické znalosti minimální např. ve srovnání s hematologickými malignitami. V praxi se jedná o stanovení ploidity DNA, chemosenzitivity *in vitro*, cytogenetické a genetické vyšetření atd.

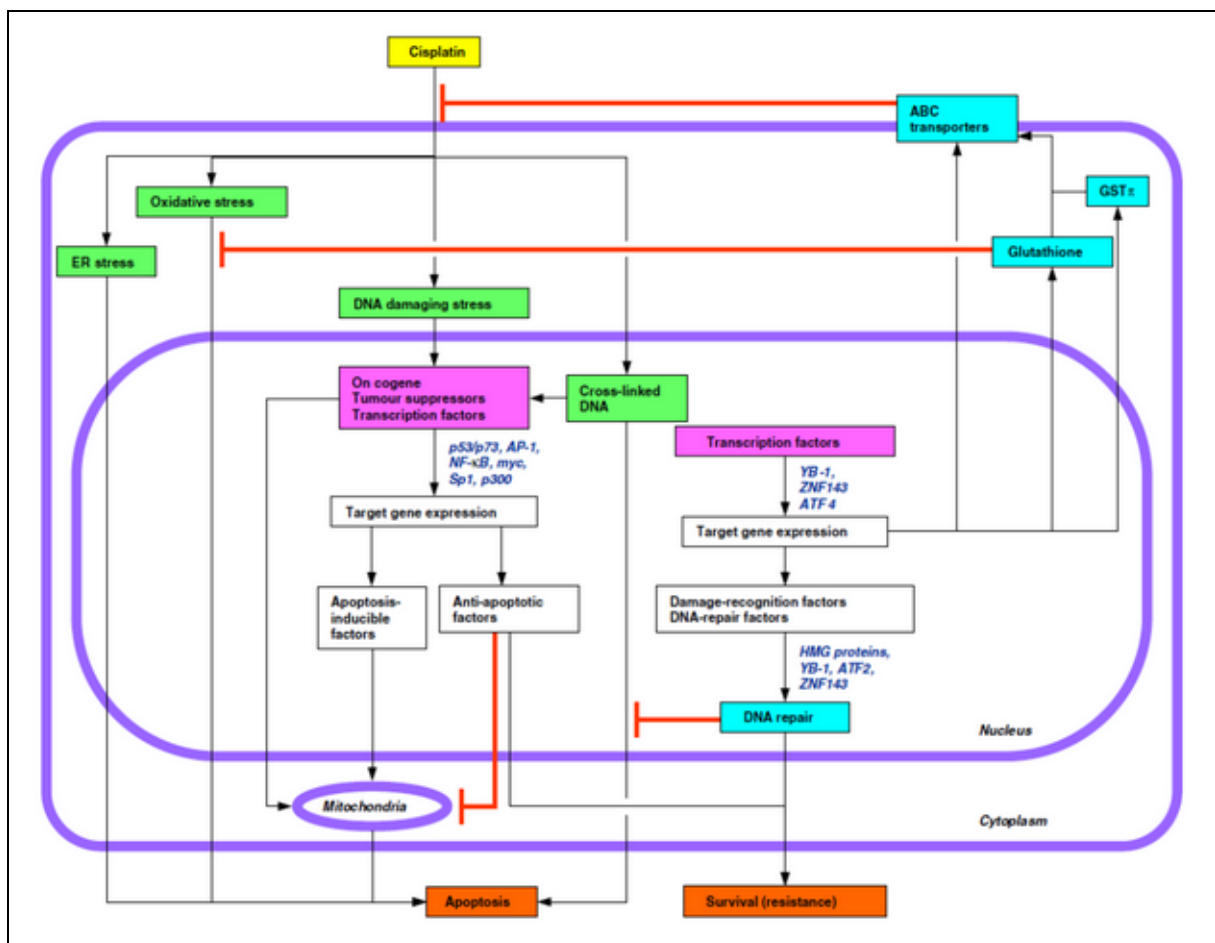
Molekulární patologie se zabývá studiem procesů souvisejících se vznikem a rozvojem chorob, a to na úrovni nukleových kyselin a proteinů, respektive jiných molekul, které jsou jimi regulovány. Využívá technik molekulární biologie a výsledky jsou dávány do kontextu s nálezy dalších biomedicínských oborů. Umožňuje odhalovat počátky nemoci a nahlédnout až na genovou úroveň.

Význam složení tuků v (par)enterální výživě pacientů

Z poznatků o účincích lipidových složek výživy, zejména vysoce nenasycených mastných kyselin (VNMK), pro rozvoj některých typů nádorových onemocnění vyplývá i význam těchto látek pro terapii. VNMK jsou obsaženy nejen ve stravě, ale jsou součástí lipidových emulzí používaných jako součást umělé výživy pacientů (pooperační stavy, kachexie atd.), jak bylo již uvedeno v kapitole 15. Aplikaci těchto látek by měla být věnována náležitá pozornost v souvislosti s diagnózou, léčbou a rozvojem nádorového onemocnění

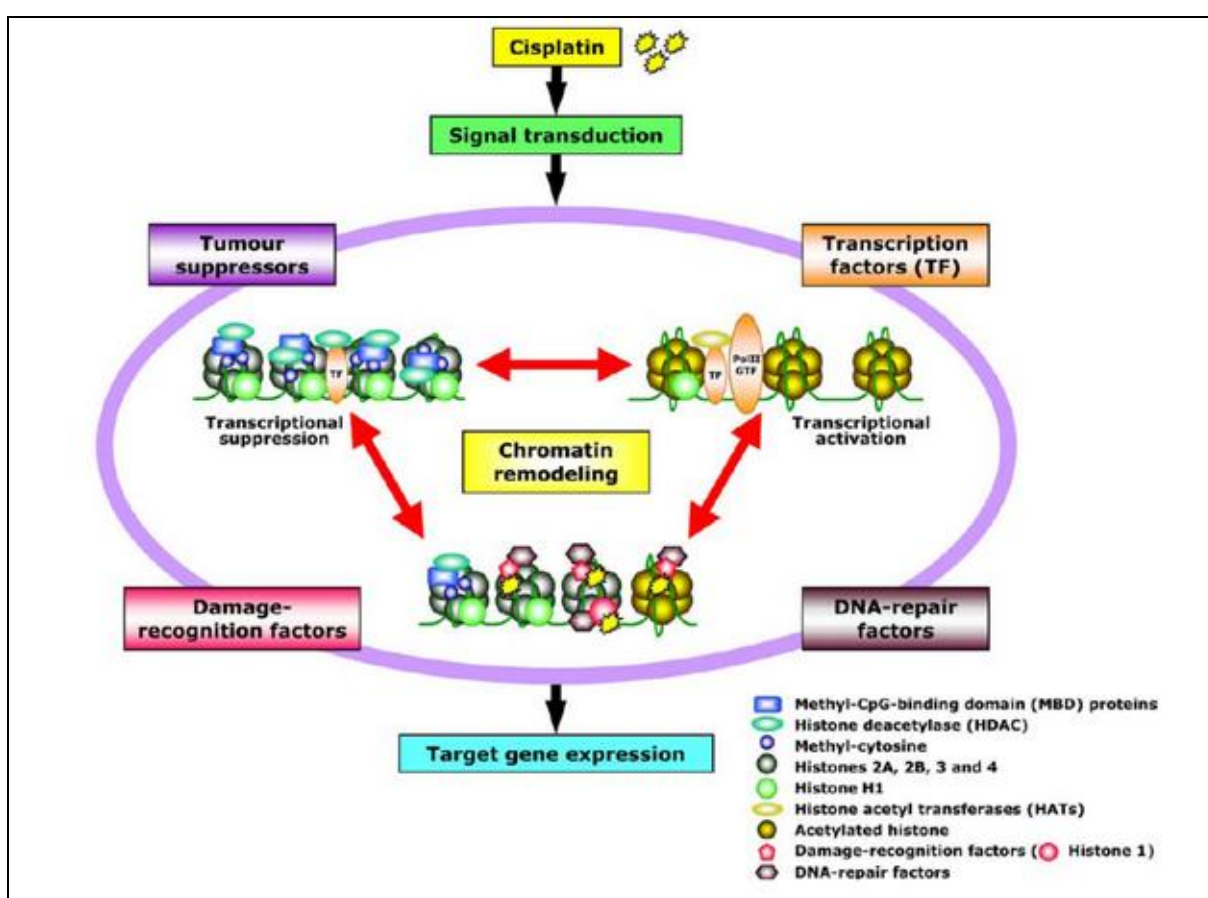
16.4 MECHANIZMY PŮSOBNÍ CHEMOTERAPEUTIK

Mechanismy působení různých typů cytostatik jsou stále předmětem výzkumu. Patří k nim zejména mechanismy ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy, aktivace či inaktivace specifických onkogenů, nádorově supresorových genů a transkripčních faktorů i souvislost s oxidativním stresem a stresem endoplazmatického retikula (ER), např. po působení platino- vých komplexů, antracyklinů, bleomycinu, kamptotecinu či alkylačních činidel. Pozornost je věnována rovněž faktorům rozeznávajícím poškození DNA a mechanismům reparace DNA (obr. 16-14).



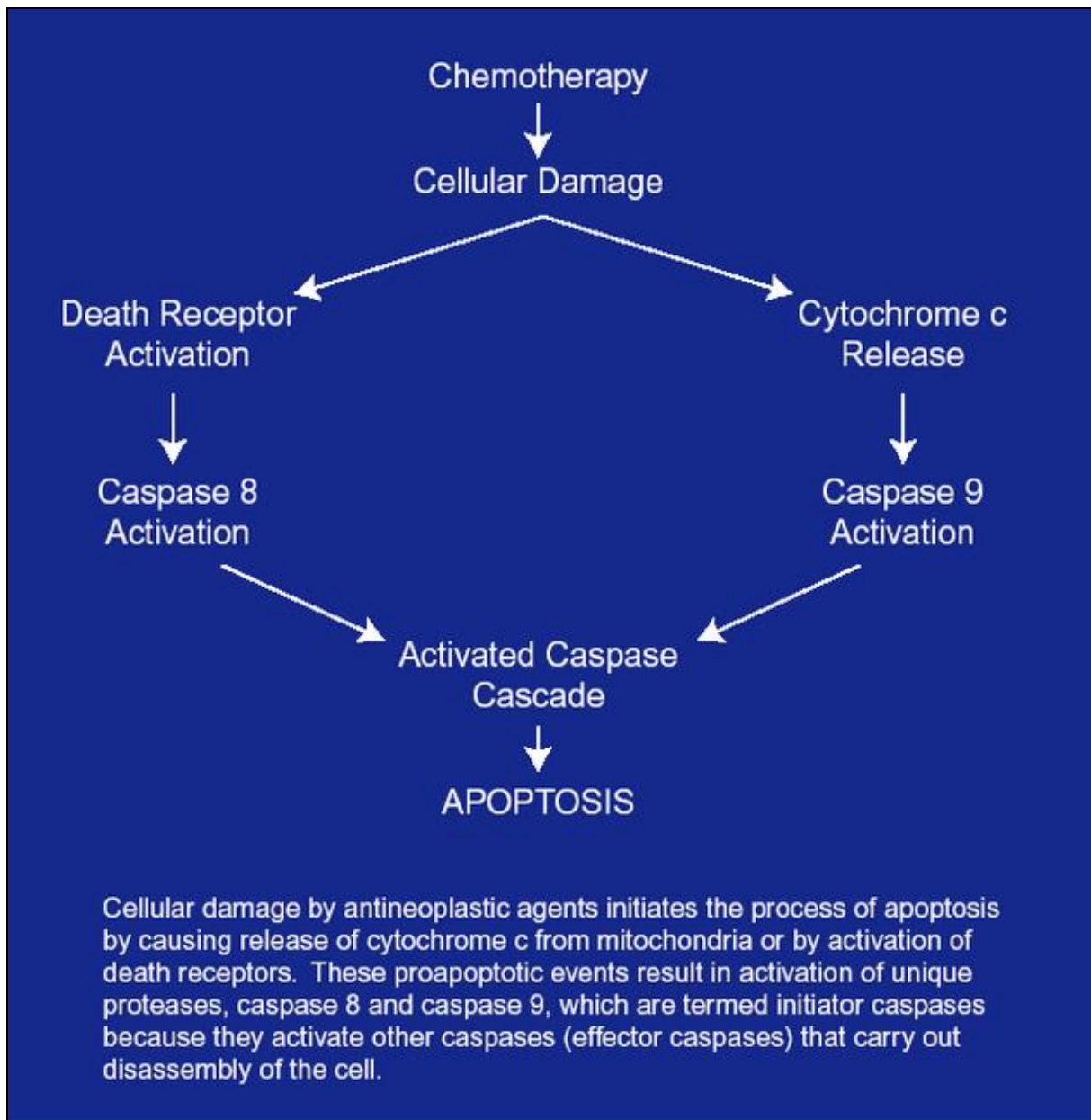
Obr. 16-14 Schéma drah cytotoxického působení cisplatinu a faktory uplatňující se v rezistenci (červeně) (*Kohno K. et al, European Journal of Cancer 2005 : 2577*)

Cisplatina a další platinové deriváty jsou např. zacíleny primárně na DNA jako součást chromatinu a tak způsobují strukturální změny porušující funkční kooperaci nádorových supresorů, nehistonových chromozomálních proteinů, histonů, chromatin remodelujících faktorů, faktorů reparujících DNA a transkripčních faktorů. Ze složek chromatinu rozeznávají cisplatinou modifikovanou DNA histon H1, TATA vazebný protein a HMG (high mobility group) proteiny (obr. 16-15). Působení platinových cytostatik zahrnuje však i další buněčné cíle, které jsou předmětem dalšího výzkumu.



Obr. 16-15 Molekulární interakce spojené s DNA a genovou expresí. Cisplatina aktivuje transkripční faktory, faktory reparace DNA, faktory rozeznávající poškození, nádorové supresory a faktory remodelující chromatin, které interagují a tvoří komplexy, které fungují v jádře. Léky mohou měnit interakční profily. (*Kohno K. et al, European Journal of Cancer 2005*)

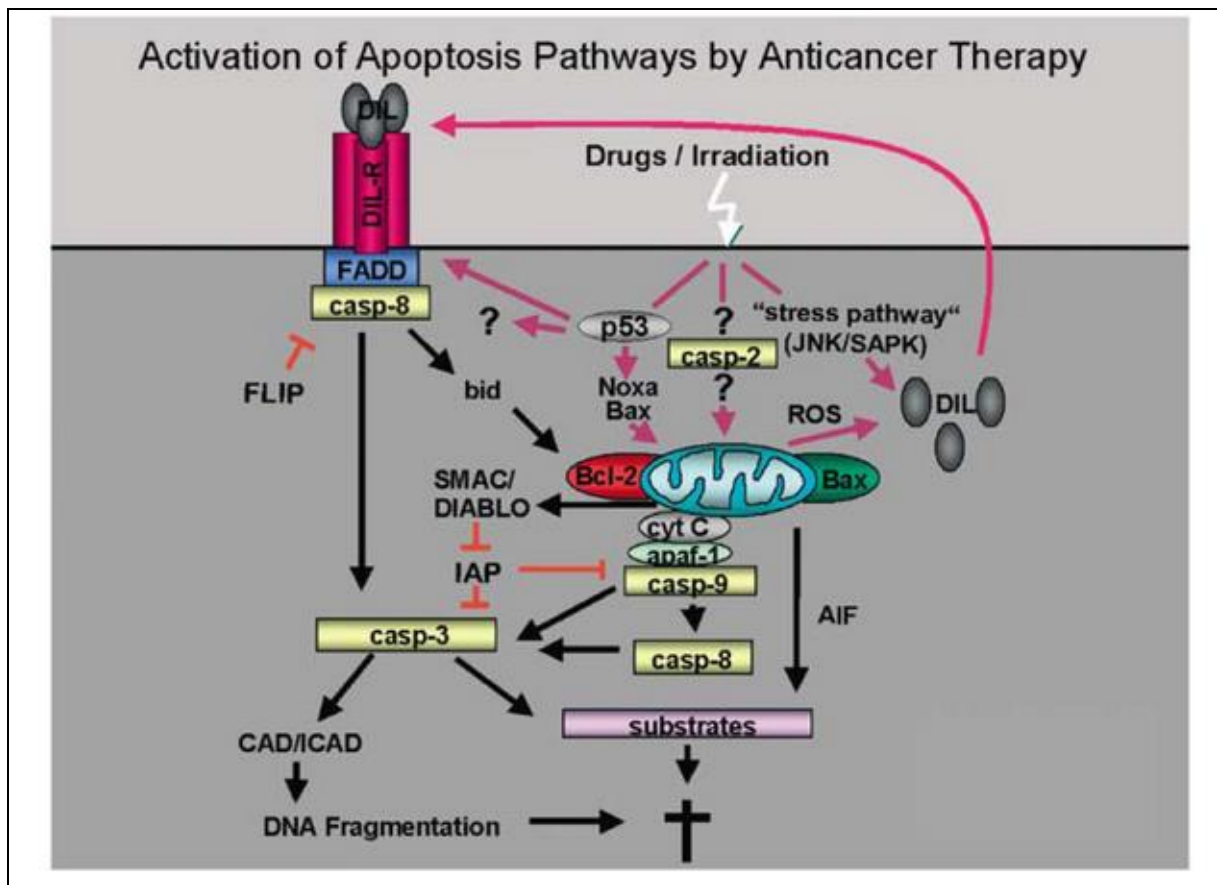
Apoptóza indukovaná chemoterapeutiky může fungovat přes receptory smrti (DR) nebo přes mitochondriální dráhu, mnohdy i kombinovaně (obr. 16-16).



Obr. 16-16 Dvě dráhy aktivace apoptózy chemoterapeutiky Chemoterapeutika aktivují apoptózu přes mitochondriální dráhu nebo přes aktivaci receptorů smrti („death receptors“)

Stimulace DR specifickými **ligandy (DIL) z rodiny TNF jako je Fas ligand (CD95/Fas) nebo TRAIL** vybudí agregaci receptoru a připojení adapterové molekuly FADD a kaspázy 8 do komplexu DISC . Aktivní iniciační kaspáza 8 zahajuje apoptózu a štěpí další efektorové kaspázy. **Mitochondriální dráha** souvisí se změnami na mitochondriích a uvolněním apoptogenních faktorů jako je cytochrom c do cytosolu, kde se vytváří komplex - apoptozóm složený z cytc/Apaf1/kaspáza-9. Protein Smac podporuje aktivaci kaspáz neutralizací inhibičního účinku inhibitorů IAP, zatímco AIF působí kondenzaci DNA. Propojení obou drah se může dít přes protein Bid. Aktivace kaspáz je negativně regulována na úrovni receptorů pro-

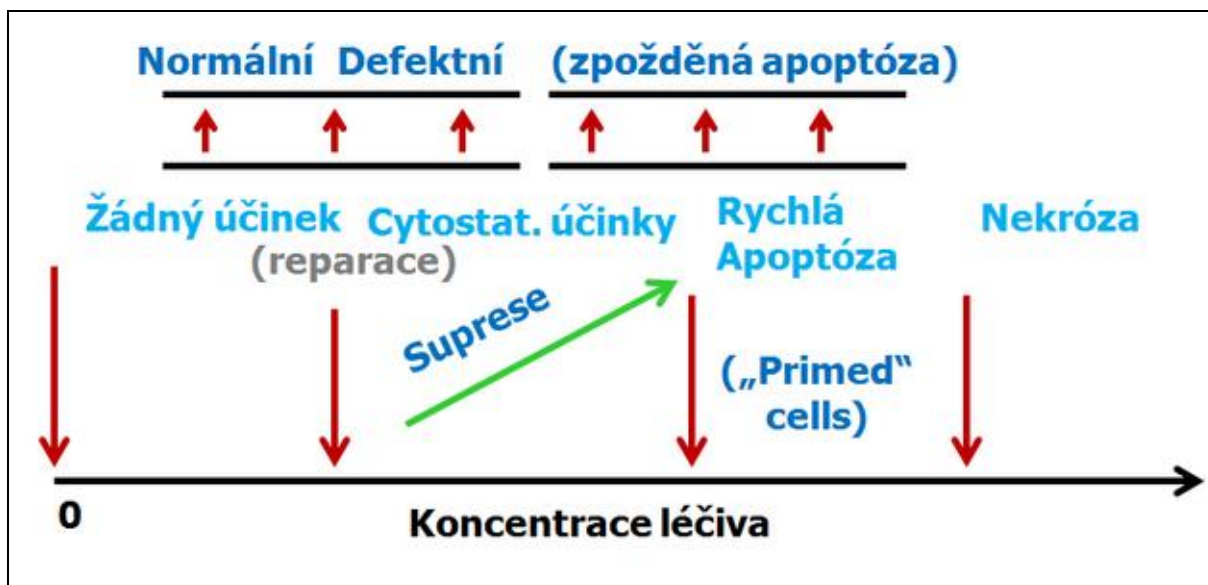
teinem FLIP blokujícím aktivaci kaspázy-8 a na úrovni mitochondrií proteiny z rodiny Bcl-2 a IAP. AIF uvolněný z mitochondrií může po translokaci do jádra vyvolávat fragmentaci DNA nezávisle na kaspázách (obr. 16-17).



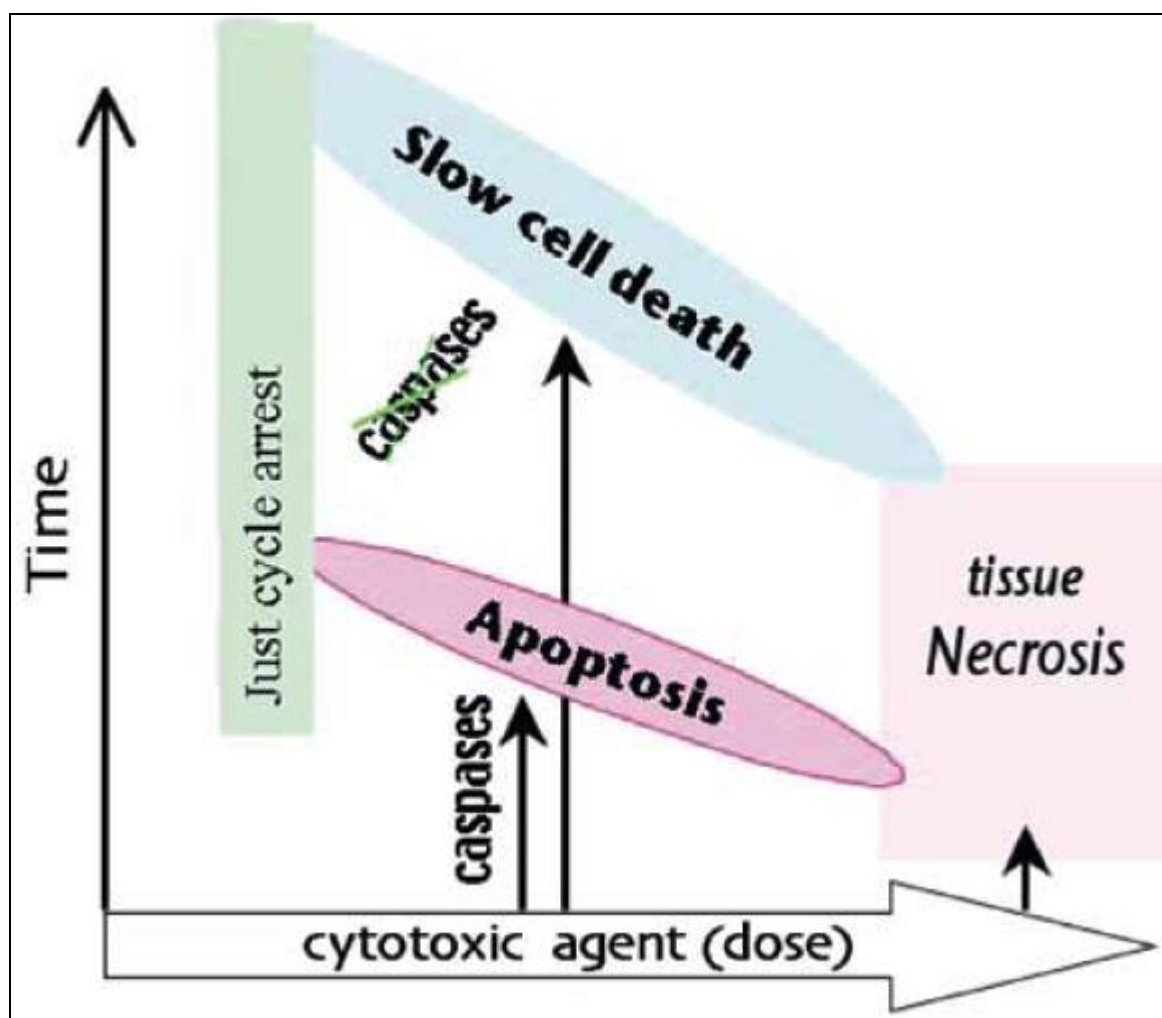
Obr. 16-17 Signální dráhy apoptózy indukované chemoterapeutiky (Debatin K.M. and Krammer P.H., *Oncogene* 2004 : 2950)

Expozice buněk velmi nízkými dávkami chemoterapeutik má minimální efekt na viabilitu nebo buněčný cyklus díky dostatečným schopnostem reparačního systému opravit poškození.

Ve vyšších koncentracích v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti kontrolního bodu v G1 (souvisejícího s expresí p53) se vyskytují 2 typy odpovědi (obr. 16-18 a 16-19):



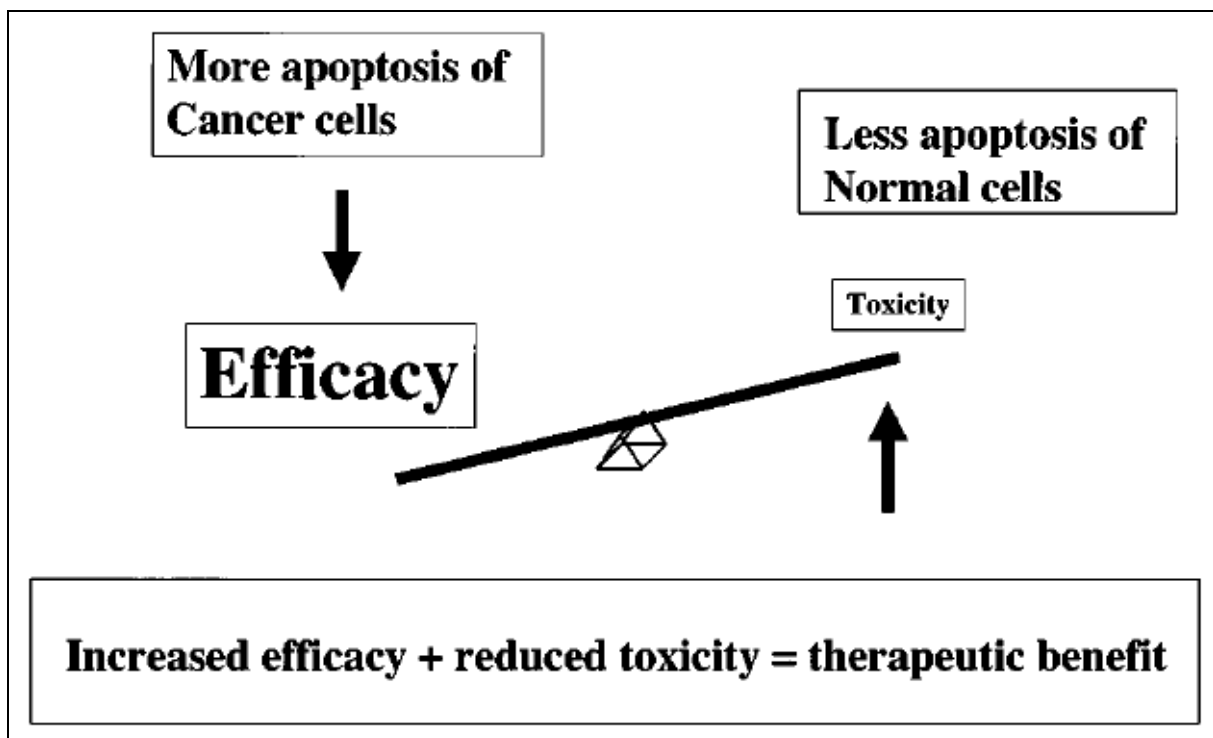
Obr. 16-18 Průchod buněčným cyklem. Obecné schéma účinků vzrůstající koncentrace protinádorových látek poškozujících DNA na buněčný cyklus a apoptózu. (Blagosklonny M.V., *Oncogene* 2004 : 2967)



Obr. 16-19 Působení protinádorových terapeutik – závislost typu buněčné smrti na dávce

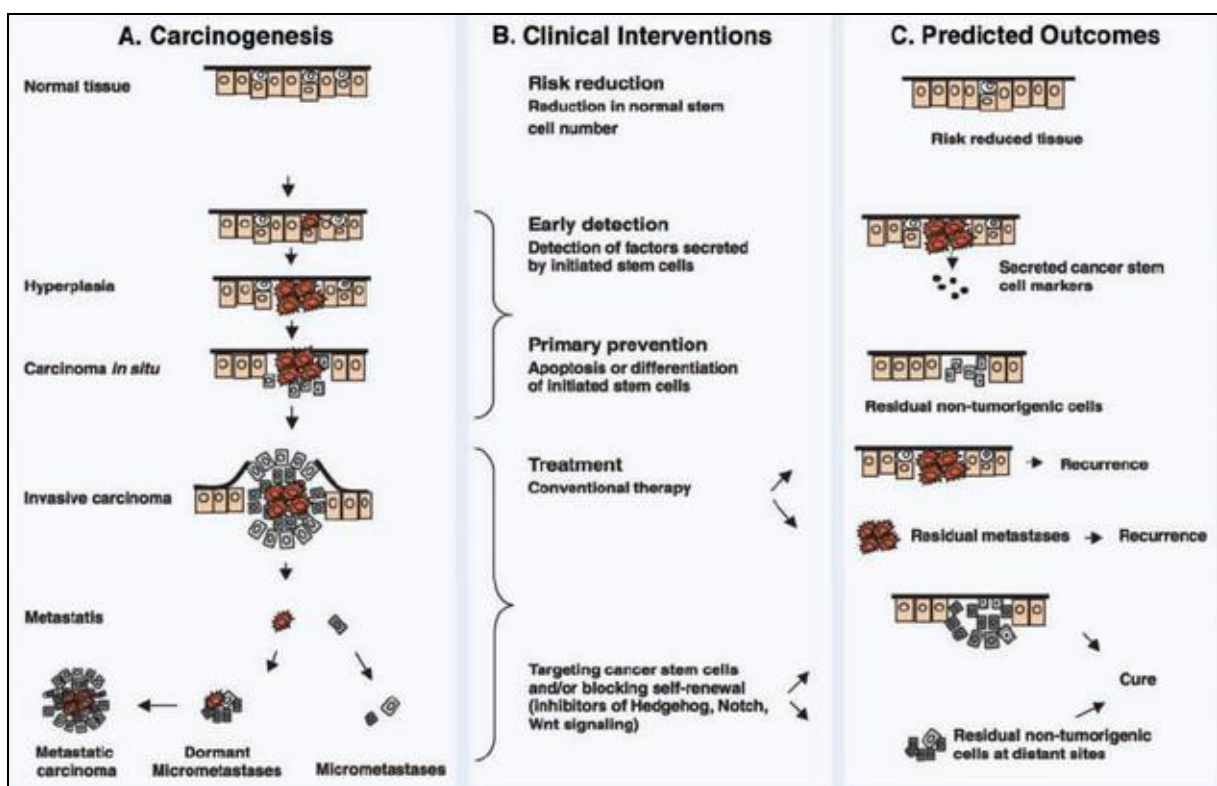
- v případě funkčního kontrolního bodu je buněčný cyklus zastaven v G1 dokud nedojde k opravě poškození nebo dochází ke spuštění apoptózy při velkém rozsahu poškození (po vysokých koncentracích) nebo neúspěšné reparaci.
- jestliže je kontrolní bod nefunkční (např. při mutaci p53) buňky vstupují do S fáze, ale postup (DNA replikace) je suprimována podle koncentrace látky.
 - v případě buněk připravených („primed“) k apoptóze, dojde k apoptóze rychle (3-6 h, „immediate apoptosis“) u prahových hodnot koncentrací, slabě nad těmi, které kompletně inhibují progresi S fáze.
 - v případě „non-primed“ buněk vede prodloužená suprese průchodu buněčným cyklem (defective progression) k růstové nerovnováze, sekundárním změnám, následnému nastartování a pozdní apoptóze. Tato apoptóza vykazuje často atypické vlastnosti, komplikované růstovou nerovnováhou a sekundárními změnami metabolismu.
 - při ještě vyšších koncentracích překračujících farmakologickou dávku dochází k nekróze.

Cílem optimální terapie je maximální účinnost na nádorové buňky (zvýšená apoptóza) a zároveň šetrné působení na buňky normální (obr. 16-20).



Obr. 16-20 Vhodná strategie pro úspěšnou nádorovou terapii

Nádorové tkáně mají, analogicky jako normální tkáně, proliferující část populace a část populace neproliferující, která se skládá z klidových buněk v G0 fázi nazývané někdy také **populace kmenových neoplastických buněk (cancer stem cells – CSC)**. Tyto buňky je obtížné zničit, protože jsou rezistentní k cytostatickému působení záření nebo chemoterapeutik. Určitou dobu po ozáření nebo chemickém působení vstupují znovu do cyklu a jsou **zdrojem obnovy nádorového růstu**. CSC jsou důležité pro snížení rizika nádoru, brzkou detekci, prevenci i terapii. Detekce faktorů sekretovaných iniciovanými SC může pomoci brzké detekci. Indukce apoptózy či diferenciaci SC působí preventivně. Selektivní eliminace CSC nebo blokování jejich sebeobnovy, např. inhibicí Hedgehog, Notch či Wnt signálních drah, vede k úspěšnější terapii (obr. 16-21).



Obr. 16-21 Klinická implikace modelu nádorových kmenových buněk (CSC) (Wicha M. S. et al., *Cancer Research* 2006 : 1883)

Opakovaná cytostatická terapie a kombinovaná terapie (s využitím humorálních faktorů, imunologickou indukci, atd.) představují hlavní přístupy jak dostat do cyklu i klidové buňky, a pak účinně inhibovat jejich růst. Klíčovou otázkou však zůstává volba nejvhodnějšího časového intervalu mezi jednotlivými aplikacemi, k čemuž slouží různé matematické modely. Klidové buňky přežívají mnohem lépe, protože během dlouhého časového intervalu mezi cyto-

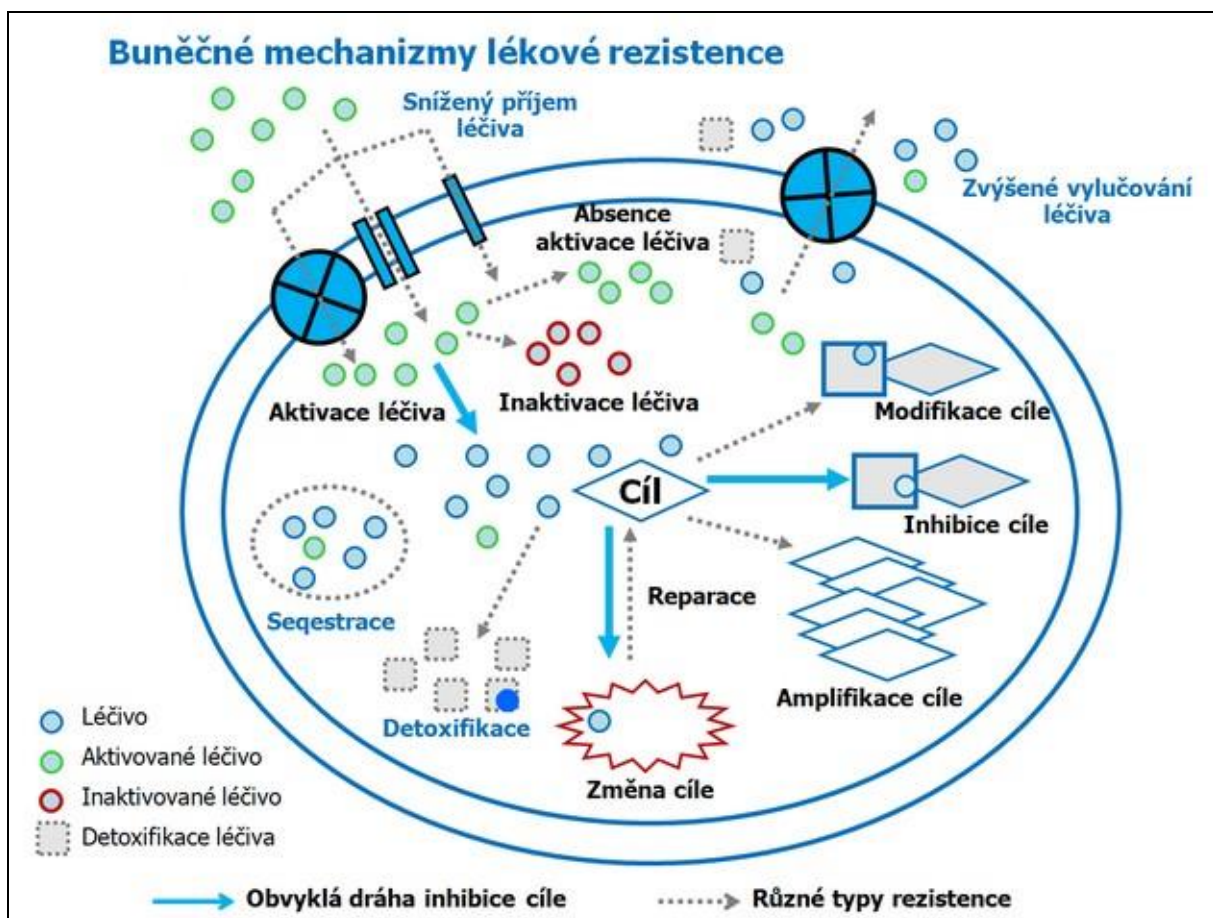
statickým působením a DNA replikací a dělením chromozómů je poškozený genetický materiál reparován.

Rychle rostoucí nádory jsou citlivé na cytostatickou terapii, frakce neproliferujících buněk je malá, buňky mají krátkou generační dobu. Opakovaným působením lze převést klidové buňky ve fázi G0 znovu do cyklu a účinně inhibovat růst (lymfomy, seminomy, některé leukémie).

Pomalou rostoucí nádory mají přechod buněk ze zásobní populace G0 řízen negativní zpětnou vazbou. Tento mechanismus udržuje vždy minimální hladinu těchto buněk, ze kterých se populace vždy obnovuje. Tyto nádory jsou rezistentní na cytostatickou terapii a je velká pravděpodobnost vzniku rezistentních klonů. Buňky pomalu rostoucích nádorů mají dlouhou generační dobu (karcinom tlustého střeva, žaludku, plic, sarkomy).

16.5 MECHANIZMY VZNIKU REZISTENCE K LÉČIVŮM

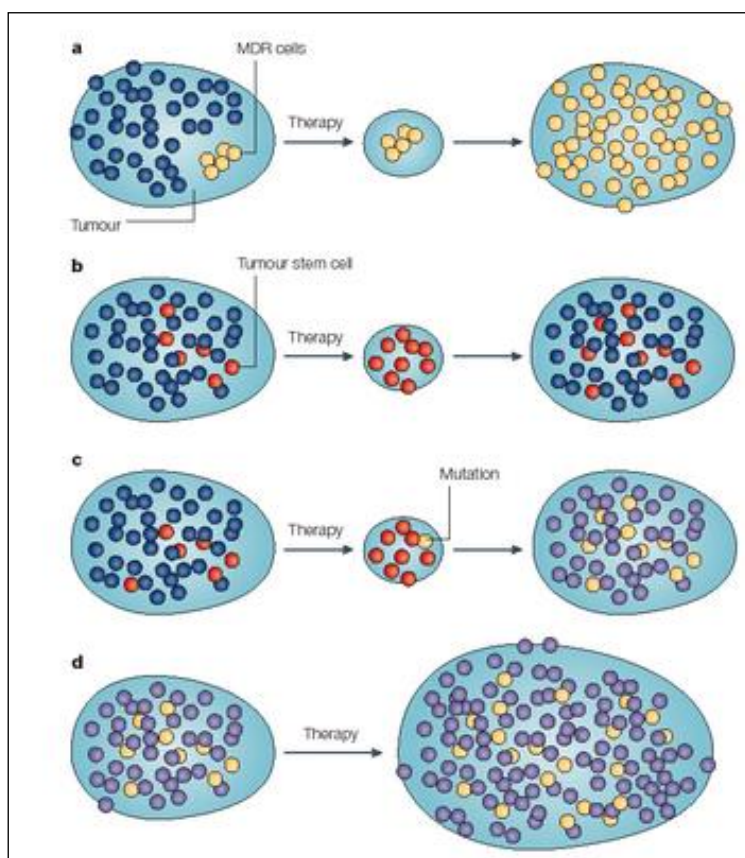
Velkou překážkou úspěšné léčby je častý vznik a rozvoj **rezistence k léčebným látkám**. Ta může vznikat různými mechanismy (obr. 16-22):



Obr. 16-22 Buněčné mechanismy lékové rezistence (podle Saves I. and Masson J.M., *Cell Mol Life Sci* 1998 : 405)

- snížení vnitrobuněčné koncentrace látky díky změněnému příjmu do nitra buňky, zvýšenému vylučování z buňky nebo rozložení v buňce,
- zvýšená buněčná detoxifikace (inaktivace),
- kvalitativní nebo kvantitativní změny buněčného cíle (enzymu),
- neschopnost přeměňovat látku na aktivní formu,
- zvýšená inaktivace látky,
- zvýšená reparace DNA,
- poruchy v drahách apoptózy.

Mnoho těchto mechanismů může působit současně a jsou buď přirozeně přítomny v buňce, nebo vznikají *de novo* během choroby a léčení. Vylučování látky z buňky je spojeno s aktivitou specifických proteinů nebo proteinových komplexů uvnitř cytoplazmatické membrány (obr. 16-23).

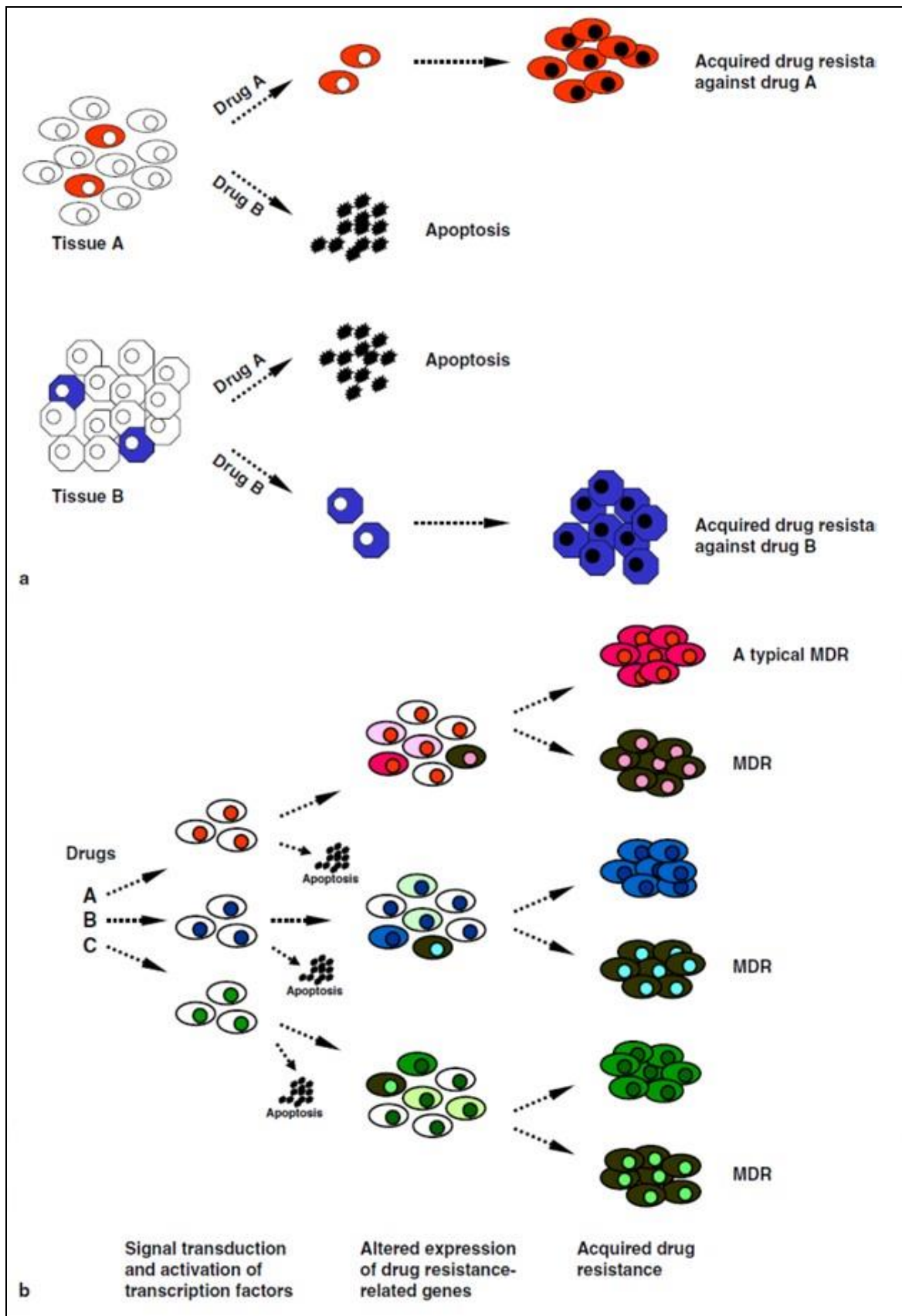


Obr. 16-23

Různé modely lékové rezistence

- A) Genetická změna v nádorové buňce indukuje MDR (multidrug resistance) a vytváří se rezistentní klon,
- B) Malá populace kmenových buněk v nádoru exprimující transportéry léčiva přežívá chemoterapii a repopuluje nádor,
- C) Získaná rezistence - kmenová buňka exprimující transportéry přežívá terapii, kdežto komitované buňky hynou,
- D) Mutací pak vzniká v populaci přežívajících kmenových buněk rezistentní fenotyp,
- E) vnitřní rezistence – jak kmenové buňky tak různě diferencované buňky jsou dědičně rezistentní, takže terapie má malý efekt. (Dean M. et al., *Nature Rev Cancer* 2005 : 275)

Předpokládají se *dva základní mechanismy vzniku rezistence k chemoterapii*: a) **selekce**, která zahrnuje tkáňově specifickou expresi genů spojených s lékovou rezistencí a heterogenitu nádorů, b) **indukce**, kdy protinádorové látky aktivují přenos signálů a transkripčních faktorů podněcujících přechodnou expresi genů lékové rezistence a genů spojených s apoptózou (obr. 16-24). Příklady transkripčních faktorů spojených s lékovou rezistencí jsou uvedeny na (obr. 16-25). Jsou to faktory fungující v rozeznání a reparaci poškození DNA, regulaci buněčné proliferace, nádorvé hypoxii, syntéze glutationu či v angiogenezi.



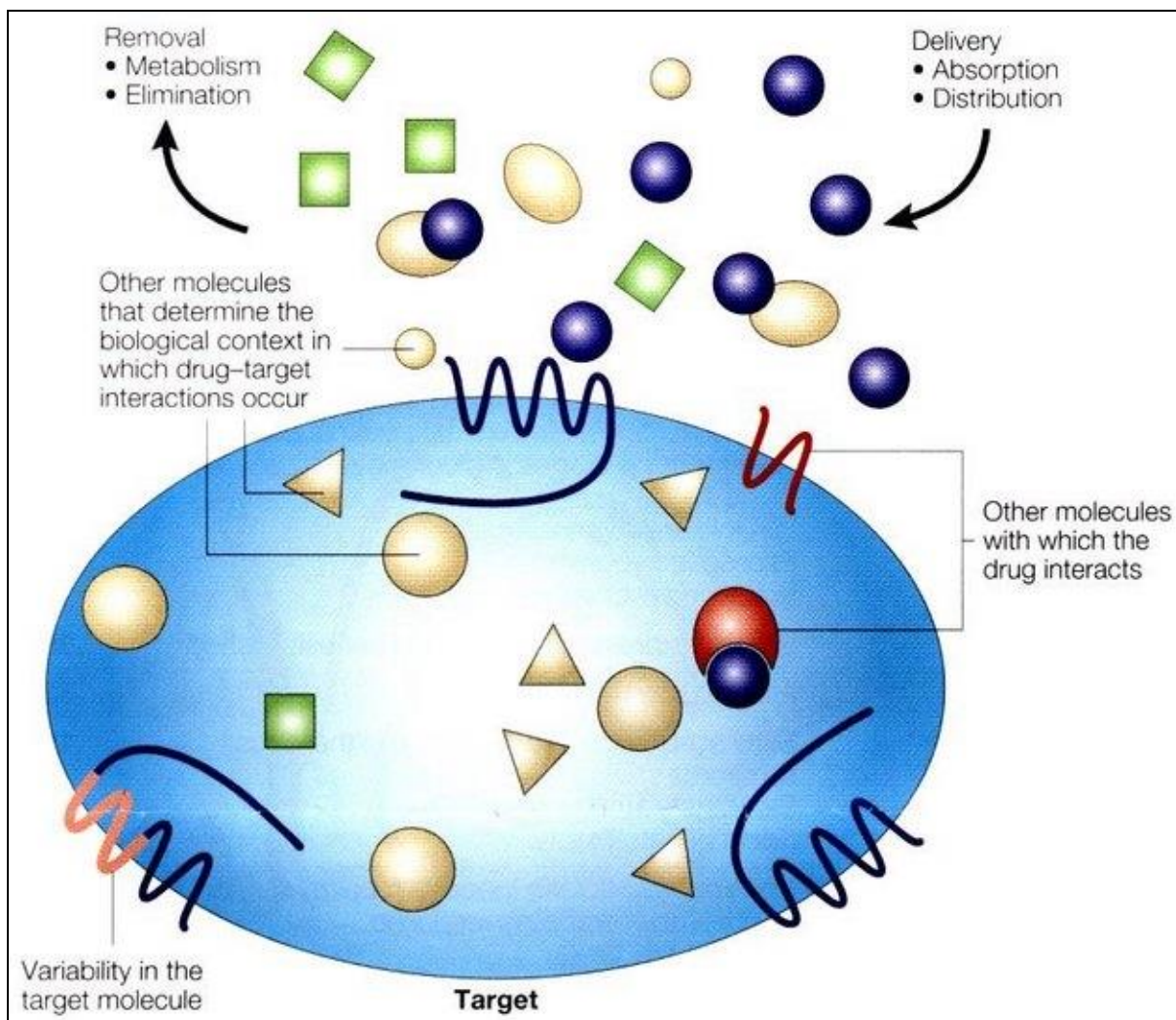
Obr. 16-24 Mechanizmy lékové rezistence: selekce a indukce (Kohno K. et al. *European Journal of Cancer* 2005 : 2577)

Selected transcription factors associated with drug resistance					
Transcription factor	Selected target genes	Selected interacting factors	Drug resistance	Other functions	References
c-Myc	<i>Bax, p53, YB-1</i>	Sp1, Max	CDDP	Cell proliferation	[47,48,85]
NF-κB	<i>Fas/Fas ligand, MDR1</i>	I-κB, c-Jun	CDDP, Paclitaxel, DOX, 5-FU	Angiogenesis	[49,50]
AP-1 (c-Jun)	<i>GSTπ, MDR1, ERCC1</i>	NF-κB		Angiogenesis and sensitivity to CDDP	[52-55,86]
p53/p73	<i>Bax, MDR1</i>	HMG1, YB-1, p300	CDDP	Cell-cycle arrest and DNA repair	[56-59,87]
HIF-1α	<i>MDR1</i>	DNA-PK		Tumor hypoxia	[7,60,88-90]
Sp1	<i>MDR1, Topoisomerase IIα</i>	p300	TAS-103, DOX	Cell proliferation	[17,91]
ATF4	<i>ZNF143</i>		CDDP	Glutathione biosynthesis	[68]
YB-1	<i>MDR1, Topoisomerase IIα</i>	p53, PCNA	CDDP, MMC	Damage recognition	[39,87]
ZNF143	<i>mtTFA</i>		CDDP	Damage recognition	[69]

5-FU, 5-fluorouracil; AP-1, activator protein-1; ATF4, activating transcription factor-4; CDDP, cisplatin; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase; DOX, doxorubicin; GST, glutathion-S-transferase; HIF-1α, hypoxia-inducible factor-1α; HMG, high mobility group; I-κB, inhibitor-kappa B; MDR, multi-drug resistance; MMC, mitomycin C; mtTFA, mitochondria transcription factor A; NF-κB, nuclear factor-kappa B; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; Sp1, specificity protein-1; YB-1, Y-box binding protein-1; ZNF143, zinc finger 143.

Obr. 16-25 Příklady transkripčních faktorů spojených s lékovou rezistencí (Kohno K. et al., *European Journal of Cancer* 2005 : 2577)

Působení léku v cílovém místě je pak ovlivňováno řadou dalších dějů a podmínek (obr. 16-26). **Multiléková rezistence (MDR - "multidrug resistance")** k nádorové chemoterapii je spojena se zvýšenou expresí **Pgp (P170) glykoproteinu** (membránová adenosin trifosfatáza - ATPáza) se širokou specifitou. Transportuje endogenní substance (toxiny, metabolity, odpad, hormony atd.). Farmakologická funkce spočívá v protekci proti cytotoxickým látkám. Mechanismus MDR je posledních 20 let intenzívně studován. Byl izolován lidský gen MDR1 na chromosomu 7. Tento gen kóduje Pgp a jeho exprese je spojena s MDR fenotypem.



Obr. 16-26 Determinanty působení léku v cílovém místě (Roden D.M. and George A.L.Jr., *Nature Rev Drug Discovery* 2001 : 37)

Buněčná detoxifikace. Základní roli v rezistenci nádorových buněk k různým cytotoxickým látkám hraje **glutathion (GSH)**, což je vnitrobuněčný tripeptid obsahující cystein a přítomný v savčích buňkách ve vysokých koncentracích. Zvýšená konjugace s GSH je hlavním mechanismem vývoje rezistence. Hlavní skupinou detoxifikačních enzymů jsou **glutathion-S-transferázy (GST)** zastoupené čtyřmi známými izoenzymy. Protože katalyzují konjugaci s GSH, je hladina jejich exprese hlavním faktorem určujícím senzitivitu buněk. GSH i GST mohou způsobovat rezistenci i jinými mechanismy než konjugací, např. GSH může modulat reparační funkce DNA a tak kontrolovat rezistenci např. k cisplatině. Pro léčebné účely se využívá inhibitorů GSH (indometacin, piriprost).

Rezistence k chemoterapii zprostředkovaná změnami buněčného cíle. Patří sem např. změny **topoizomerázy II**, která je zásadní pro replikaci DNA a která je cílem interkalačních

látek jako je adriamycin, actinomycin D nebo neinterkalačních látek jako jsou etoposid nebo teniposid. Rezistence může být způsobena změnou hladiny topoizomerázy II nebo expesí mutovaného enzymu.

Zvýšená hladina enzymu **dihydrofolátreduktázy (DHFR)** je příčinou rezistence k antifolátovým látkám jako je metotrexát.

Změny **tymidilát syntázy (TS)**, která je cílem působení 5-fluorouracilu, mohou způsobit dva mechanismy rezistence: změny afinity TS k lékům díky substituci jedné aminokyseliny nebo zvýšená aktivita TS.

Důležitým mechanismem rezistence může být rovněž **zvýšení reparační funkce DNA**. DNA je cílem různých cytotoxických látek. Přímou nebo nepřímou vazbou k DNA způsobují tyto látky změny v DNA a genomové poruchy vedoucí k buněčné smrti.

Jednoduchá *alkylační činidla se kovalentně váží k DNA a tvoří vnitro- i meziřetězcové vazby*. Deriváty kovů jako je cisplatina tvoří také podobné vazby. **Cisplatina** obecně porušuje DNA indukci vnitřetězcových vazeb mezi N7 atomy dvou sousedních guaninů a v menší míře indukci meziřetězcových vazeb a monoaduktů. Další cytotoxické látky jsou schopny nekovaletně se vmezeřovat do DNA. Ačkoliv všechny tyto interakce s DNA jsou potenciálně letální, *rozsah buněčné smrti je ovlivňován rozdíly v rozsahu reparační funkce. Existuje inverzní vztah mezi buněčnou reparací a cytotoxickou senzitivitou*.

Reparační procesy DNA jsou velmi komplexní a závisí na typu poškození. Jejich regulace se účastní na 200 různých genů. Mají velký význam pro nádorovou chemoterapii, protože jsou zahrnuty v rezistenci k velkému počtu cytotoxických látek, zejména těch, které nejsou ovlivněny MDR fenotypem.

Jsou rozeznávány **tři hlavní typy reparační funkce DNA:**

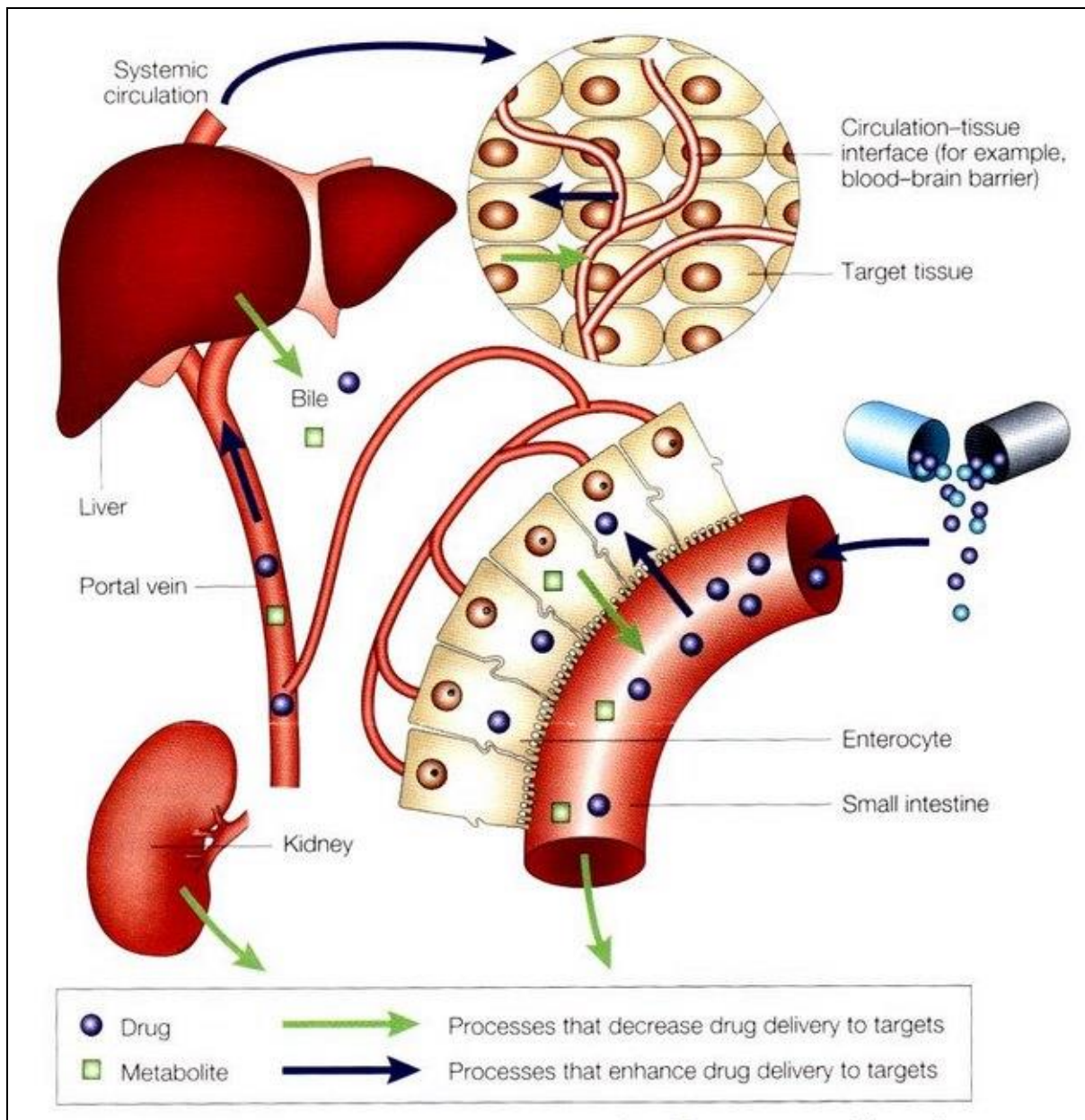
Reverze poškození je nejjednodušší biochemický pochod obnovující integritu DNA. O6 – alkylguanin DNA alkyltransferáza přispívá hlavním dílem k rezistenci k alkylačním činidlům. Inhibice enzymu významně zesiluje cytotoxické účinky látek. Bohužel, tento zásah může na druhé straně indukovat nádory, protože tento enzym zabraňuje karcinogenním účinkům řady molekul.

Excise pošlození specifickými glykosylázami následuje po specifickém poškození bází s následným vyříznutím DNA a doplněním pomocí polymeráz a ligáz. Expese těchto enzymů je u rezistentních buněk pozitivně regulována.

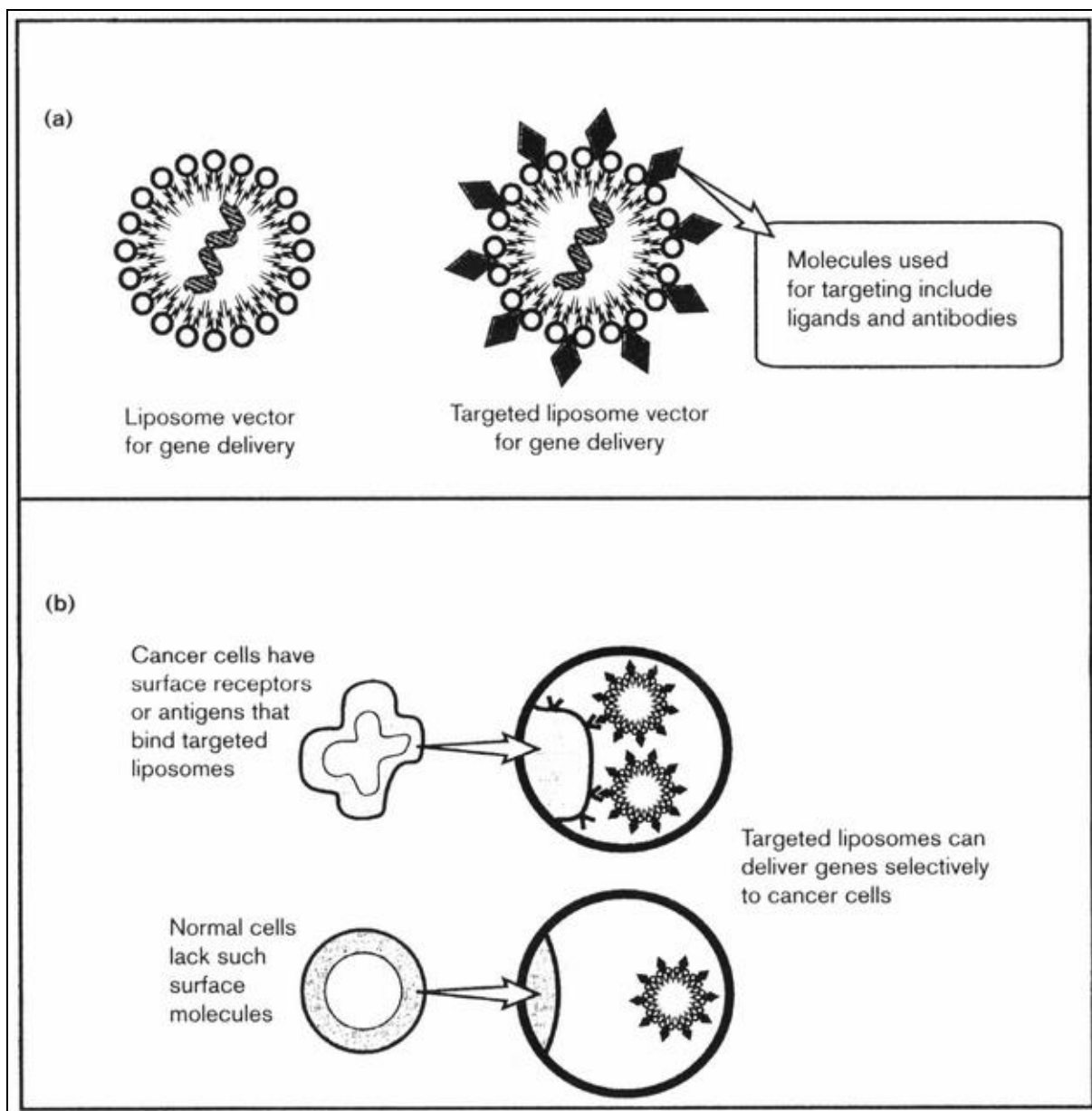
Postreplikační reparace umožňuje nápravu vážných poškození DNA. Jestliže nejsou před replikací opraveny, způsobují tato poškození replikační blok. Buňky obnovují syntézu DNA v jiném replikačním bodě.

Využití inhibitorů reparace DNA může zlepšit terapii. Patří sem inhibice specifických enzymů jako je DNA polymeráza nebo topoizomeráza II.

K úspěšnosti chemoterapie přispívá řada faktorů. Mezi ně patří také farmakologické faktory, které zabraňují adekvátní expozici látkou v místě působení. Zde rozhoduje způsob podávání léku (koncentrace a doba) a dále morfologické podmínky (absorpce, metabolismus, vaskularita a okysličování tkáně), které ovlivňují biodostupnost léčiva (obr. 16-27). V současné době se rozvíjejí *specifické metody dodání léků do cílového místa*, jako jsou např. **liposomy**. Toho lze využít i v případě tzv. **genové terapie** (obr. 16-28).



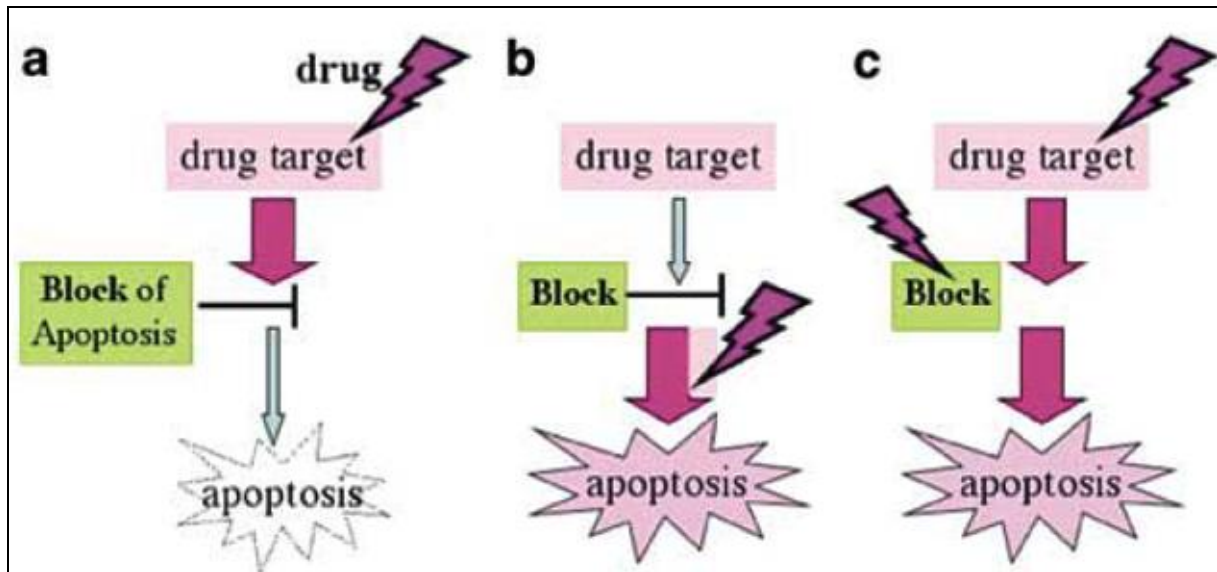
Obr. 16-27 Determinanty dodání léku do cílového místa (Roden D.M. and George A.L.Jr., *Nature Rev Drug Discovery* 2001 : 37)



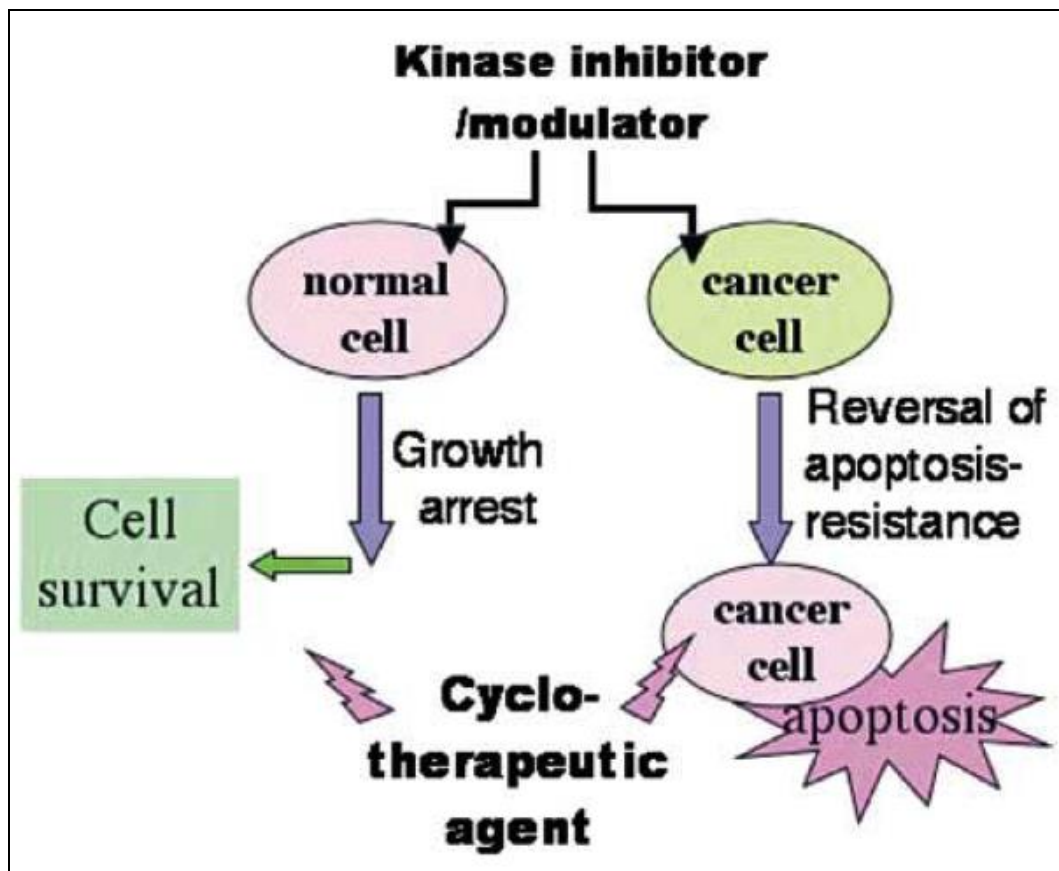
Obr. 16-28 Liposomy a genová terapie. Liposomy jsou využívány v genové terapii (a) a k cílenému dodání látky k nádorovým buňkám majícím příslušné povrchové receptory či antigeny (b).

Kromě těchto faktorů, které mohou být ovlivněny přizpůsobením režimu, existují různé buněčné mechanismy odpovědné za nízkou či vysokou hladinu rezistence. Na rezistenci se mohou významně podílet poruchy indukce buněčné smrti apoptózou (blok apoptózy). Na základě výzkumu detailních mechanismů řízení apoptózy lze pak využít látky cílené na její odblokování na různých úrovních signálů (posílení proapoptických molekul a inhibice antiapoptických molekul), což může vést k posílení účinků daného cytostatika (obr. 16-29). **Inhibice klíčových signálních drah** je dalším moderním terapeutickým přístupem. K takovým látkám patří

např. inhibitory specifických kináz, které zároveň zastavují buněčný cyklus a tak mohou chránit normální buňky (obr. 16-30).



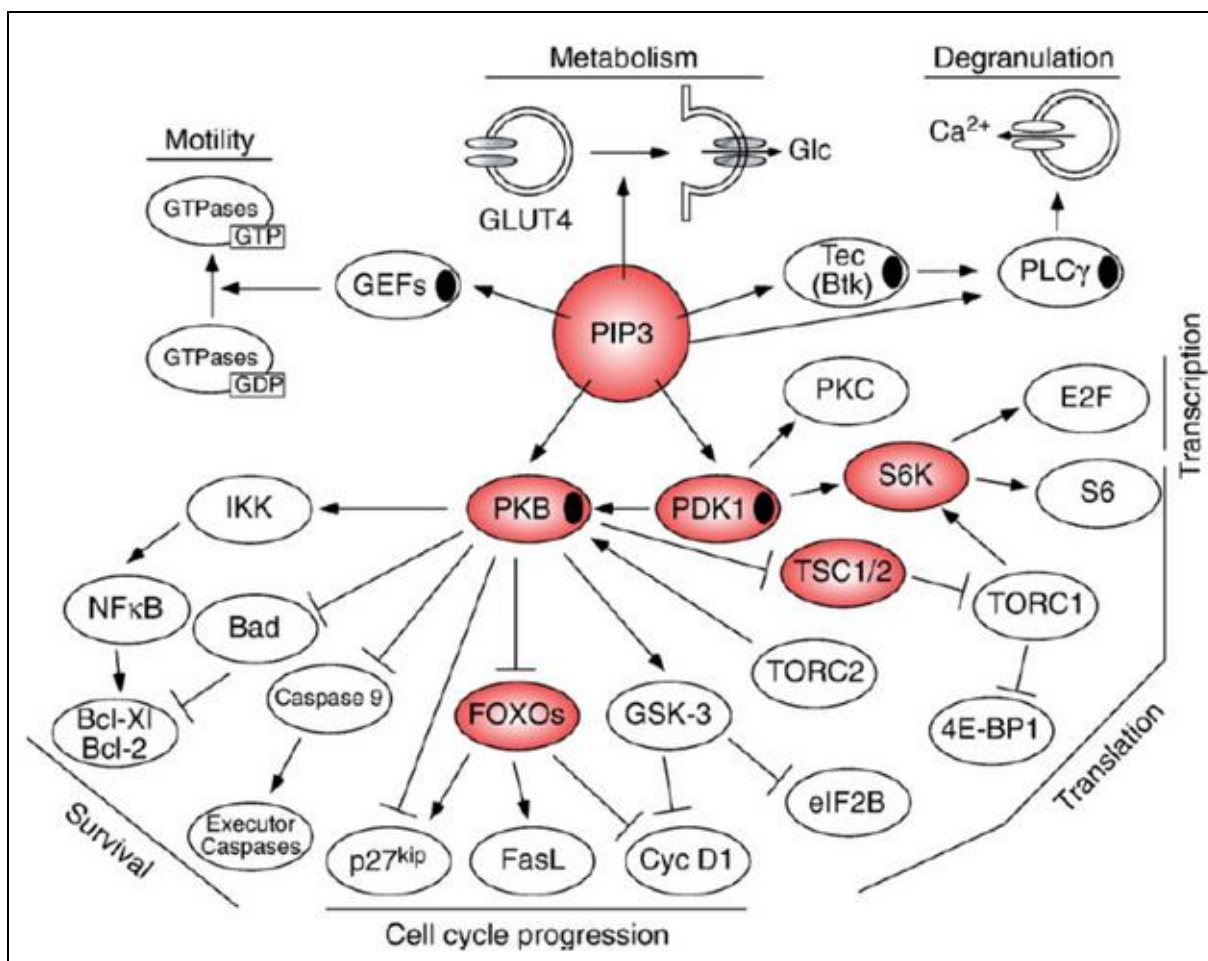
Obr. 16-29 Bloky v indukcí apoptózy jsou jedním z cílů překonání lékové rezistence (*Blagosklonny M.V., Oncogene 2004 : 2967*)



Obr. 16-30 Cykloterapie. Normální buňky podléhají apoptóze, kdežto nádorové buňky bývají k apoptóze rezistentní. Modulací pomocí inhibitorů kináz se stává nádorová buňka k apoptóze citlivá.

Zároveň je normální buňka zastavena v buněčném cyklu a chráněna před účinky léčiva. (Blagosklonny M.V., *Oncogene* 2004 : 2967)

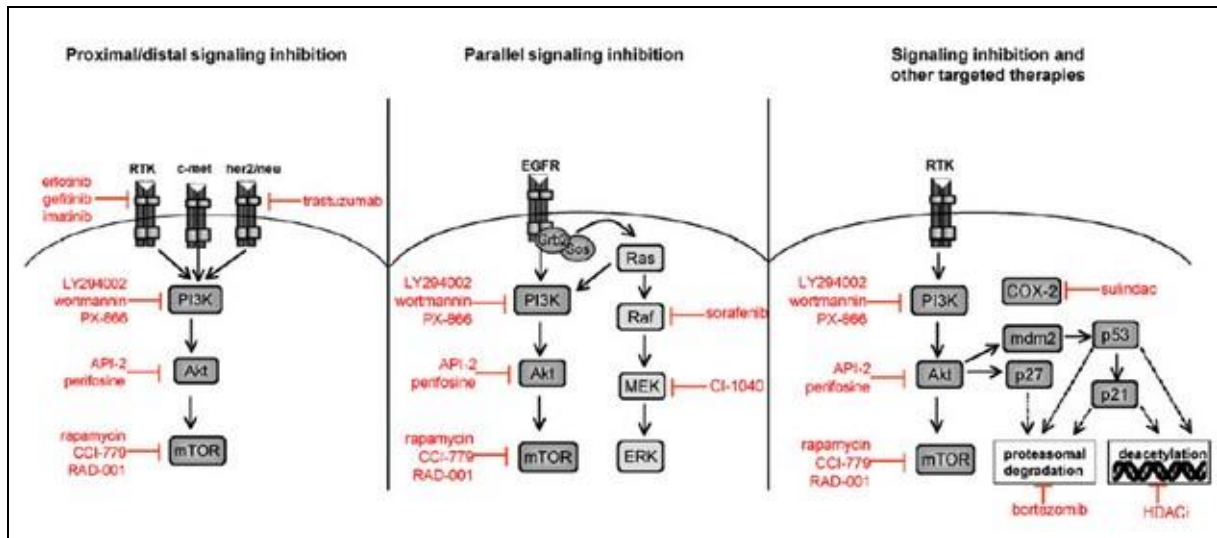
Jedním z takových cílů je skupina kináz **PI3K (phosphoinositide 3 – kinases)**, které regulují buněčnou odpověď zahrnující mitogenní signály, přežívání a růst, metabolickou kontrolu, cytoskeletální přestavby a migraci. S těmito procesy je spojuje řada dalších molekul, např. **kináza Akt (PKB)**. Ta aktivuje nebo inhibuje řadu molekul uplatňujících se v regulaci, transkripce, buněčného cyklu či apoptózy (obr. 16-31).



Obr. 16-31 Centrální úloha dráhy PI3K v buněčném růstu, proliferaci, přežívání a motilitě. (Marone R. et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008 : 159)

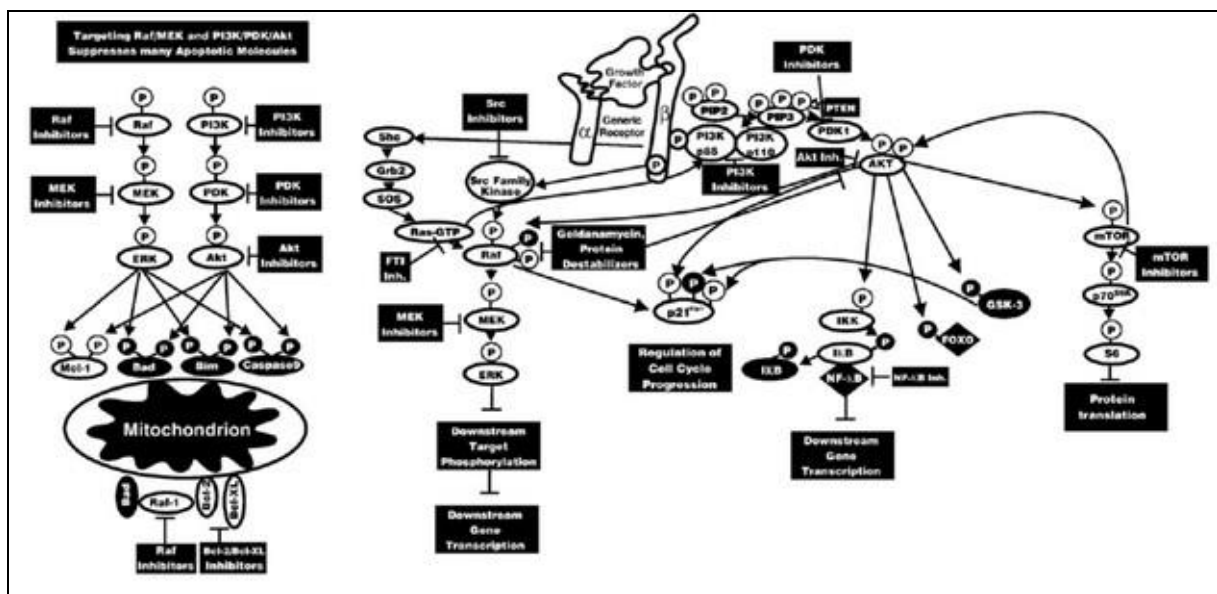
Další molekulou je **mTOR (mammalian target of rapamycin)**. Aktivace dráhy **PI3K/Akt/mTOR** zahrnuje ztrátu funkce nádorově supresorového genu **PTEN**, amplifikaci nebo mutaci PI3K a Akt, aktivaci receptorů pro růstové faktory a expozici karcinogeny. mTOR je klíčovým regulátorem translace proteinů. Pozornost je tedy soustředěna na *přírodní a syntetické inhibitory* této dráhy, kterých existuje v současné době již velké množství. Jsou využívány zejména *kombinace různých látek* inhibujících proximální část (inhibitory recepto-

rů pro růstové faktory a onkogenů) s distální inhibicí Akt nebo mTOR. Další přístup je duální inhibice paralelních signálních drah zabraňující aktivaci redundantních drah přežití. Inhibice této dráhy může být také kombinována s jinými typy cílů včetně inhibitorů histon deacetylázových komplexů, proteazomu nebo cyklooxygenázy 2 (obr. 16-32).



Obr. 16-32 Kombinované přístupy využívající inhibitory dráhy PI3K/Akt/mTOR. (LoPiccolo J. et al. Drug Resistance Updates 2008 : 32)

Další drahou často deregulovanou u nádorů je Ras/Raf/MEK/ERK mitogeny aktivovaná protein kinázová dráha (MAPK). Zprostředkovává buněčnou odpověď na různé růstové signály. Časté jsou mutace B-Raf vedoucí ke konstitutivní aktivaci MAPK při absenci růstového signálu. Velké úsilí je věnováno hledání specifických inhibitorů komponent této dráhy (obr. 16-33).



Obr. 16-33 Místa působení nízkomolekulárních inhibitorů signálních drah. Zásahy do signálních drah Raf/MEK/ERK a PI3K/Akt mohou mít dramatické účinky na řadu molekul regulujících růst a apoptózu (McCubrey J. A. et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 2007 : 1273)

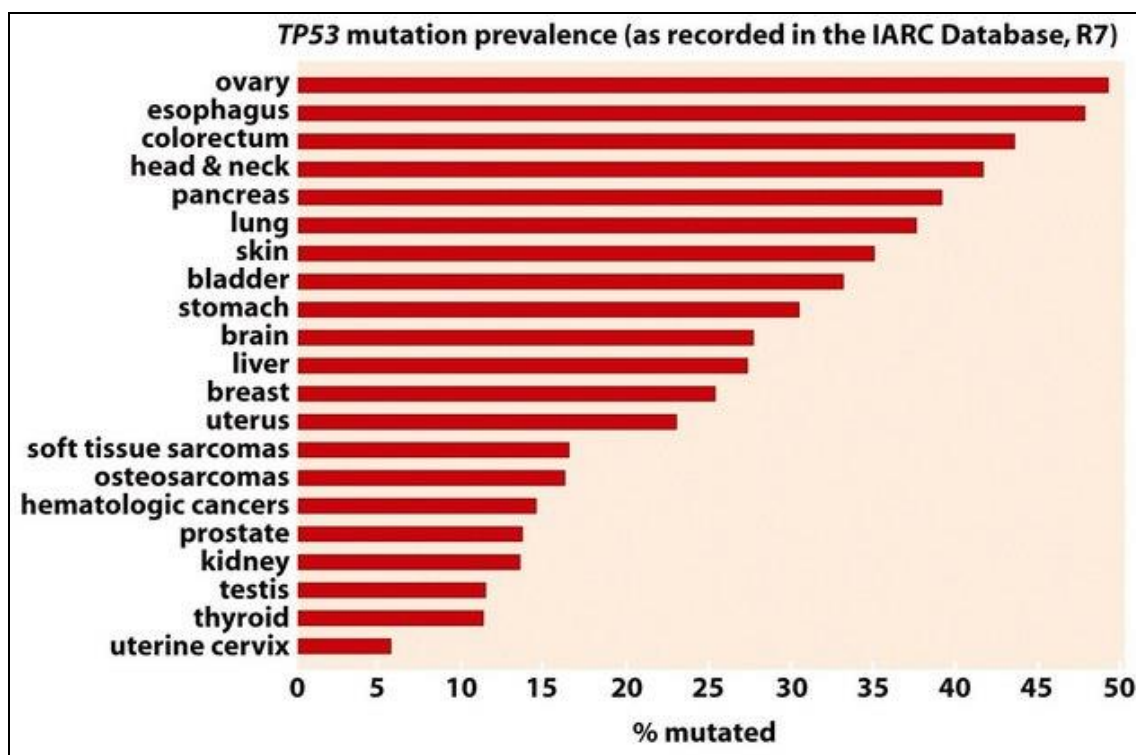
16.6 ÚLOHA P53 V PREDIKCI ODPOVĚDI K CHEMOTERAPII

p53 je 53-kD jaderný fosfoprotein, který funguje jako transkripční faktor. Je to produkt 20-kb genu lokalizovaného na krátkém rameni lidského chromosomu 17 a funguje jako nádorově supresorový gen.

Hlavní fyziologické funkce jsou:

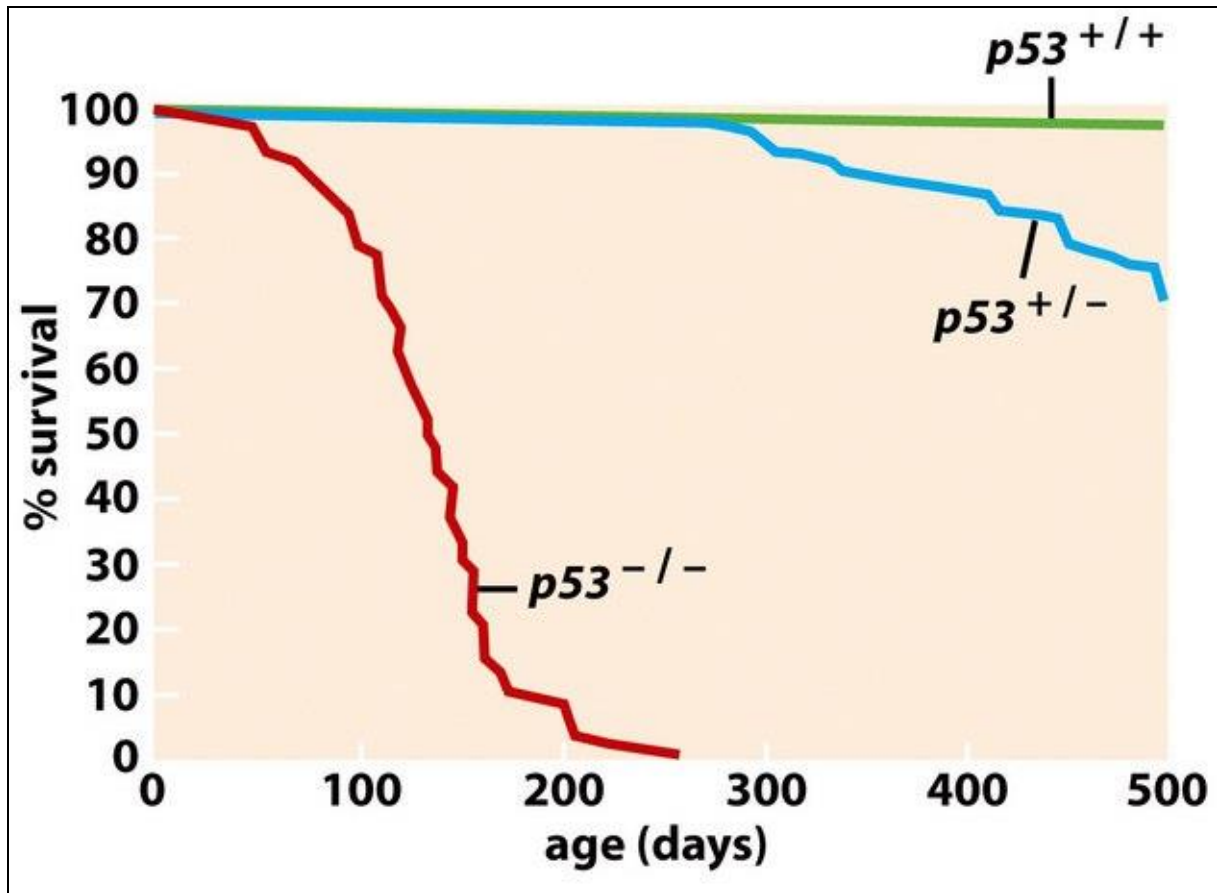
- regulace buněčného cyklu v kontrolních bodech G1/S a G2/M
- indukce apoptózy
- stabilizace genomu

p53 kontroluje odpověď buněk na genotoxický stres indukovaný různými podněty. Ovlivňuje růst a viabilitu přes transkripční aktivaci nebo represí řady genů jako jsou p21 (zástava růstu), gadd-45 (reparace DNA), bax, bcl-2, bcl-x, cd95 (apoptóza), mdm2 (zpětnovazebná regulace aktivity p53). Asi 60 % nádorů obsahuje mutovaný typ p53, což způsobuje jeho zvýšenou stabilitu nebo ztrátu aktivity (obr. 16-34).



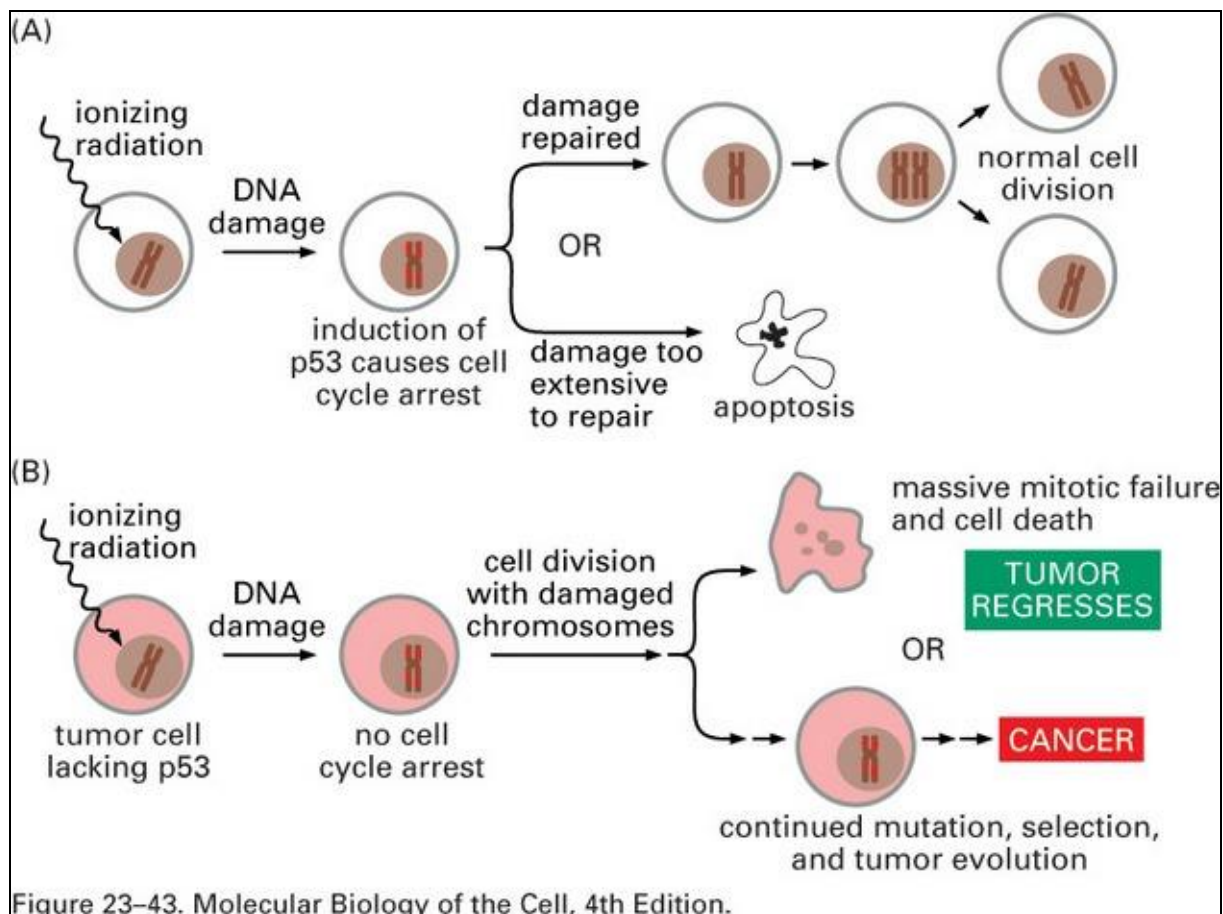
Obr. 16-34 Frekvence mutovaného p53 u různých typů nádorů. (Figure 9.4, Weinberg R. A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

Ztráta aktivity divokého typu (wild-type) p53 je hlavním prediktorem absence odpovědi na radioterapii a chemoterapii u různých typů nádorů (obr. 16-35).



Obr. 16-35 Přežívání u nádorů s různým statusem p53. (Figure 9.5, Weinberg R. A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

p53 zvyšuje chemosenzitivitu podporou apoptózy na transkripci nezávislými nebo závislými mechanismy (obr. 16-36).



Obr. 16-36 Účinky ionizujícího záření na normální (A) a nádorové buňky (B). (*Figure 23-43. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*)

Aktivuje transkripci proapoptických genů jako je bax nebo suprimuje transkripci antiapoptických genů jako je bcl-2. Indukce smrti přes ligandový systém povrchového receptoru CD95(Fas) a Fas ligandu či dalších induktorů buněčné smrti (TNF, TRAIL) může také zahrnovat cesty kontrolované p53 (obr. 16-37).

Table 9.2 Examples of p53 target genes according to function The expression of genes in this table is induced by p53 unless otherwise indicated.

Class of genes	Name of gene	Function of gene product
p53 antagonist Growth arrest genes	<i>MDM2/HDM2</i>	induces p53 ubiquitylation
	<i>p21^{Cip1}</i>	inhibitor of CDKs, DNA polymerase
	<i>Siah-1</i>	aids β -catenin degradation
	<i>14-3-3σ</i>	sequesters cyclin B–CDC2 in cytoplasm
DNA repair genes	<i>Reprimo</i>	G ₂ arrest
	<i>p53R2</i>	ribonucleotide reductase—biosynthesis of DNA precursors
	<i>XPE/DDB2</i>	global NER
	<i>XPC</i>	global NER
	<i>XPG</i>	global NER, TCR
	<i>GADD45</i>	global NER ?
Regulators of apoptosis	<i>DNA pol κ</i>	error-prone DNA polymerase
	<i>BAX</i>	mitochondrial pore protein
	<i>PUMA</i>	BH3-only mitochondrial pore protein
	<i>NOXA</i>	BH3-only mitochondrial pore protein
	<i>p53AIP1</i>	dissipates mitochondrial membrane potential
	<i>Killer/DR5</i>	cell surface death receptor
	<i>PIDD</i>	death domain protein
	<i>PERP</i>	pro-apoptotic transmembrane protein
	<i>APAF1</i>	activator of caspase-9
	<i>NF-κB</i>	transcription factor, mediator of TNF signaling
	<i>Fas/APO1</i>	death receptor
	<i>PIG3</i>	mitochondrial oxidation/reduction control
	<i>PTEN</i>	reduces levels of the anti-apoptotic PIP ₃
	<i>Bcl-2</i>	(repression of) its expression
<i>IGF-1R</i>	(repression of) its expression	
Anti-angiogenic proteins	<i>IGFBP-3</i>	IGF-1–sequestering protein
	<i>TSP-1 (thrombospondin)</i>	antagonist of angiogenesis

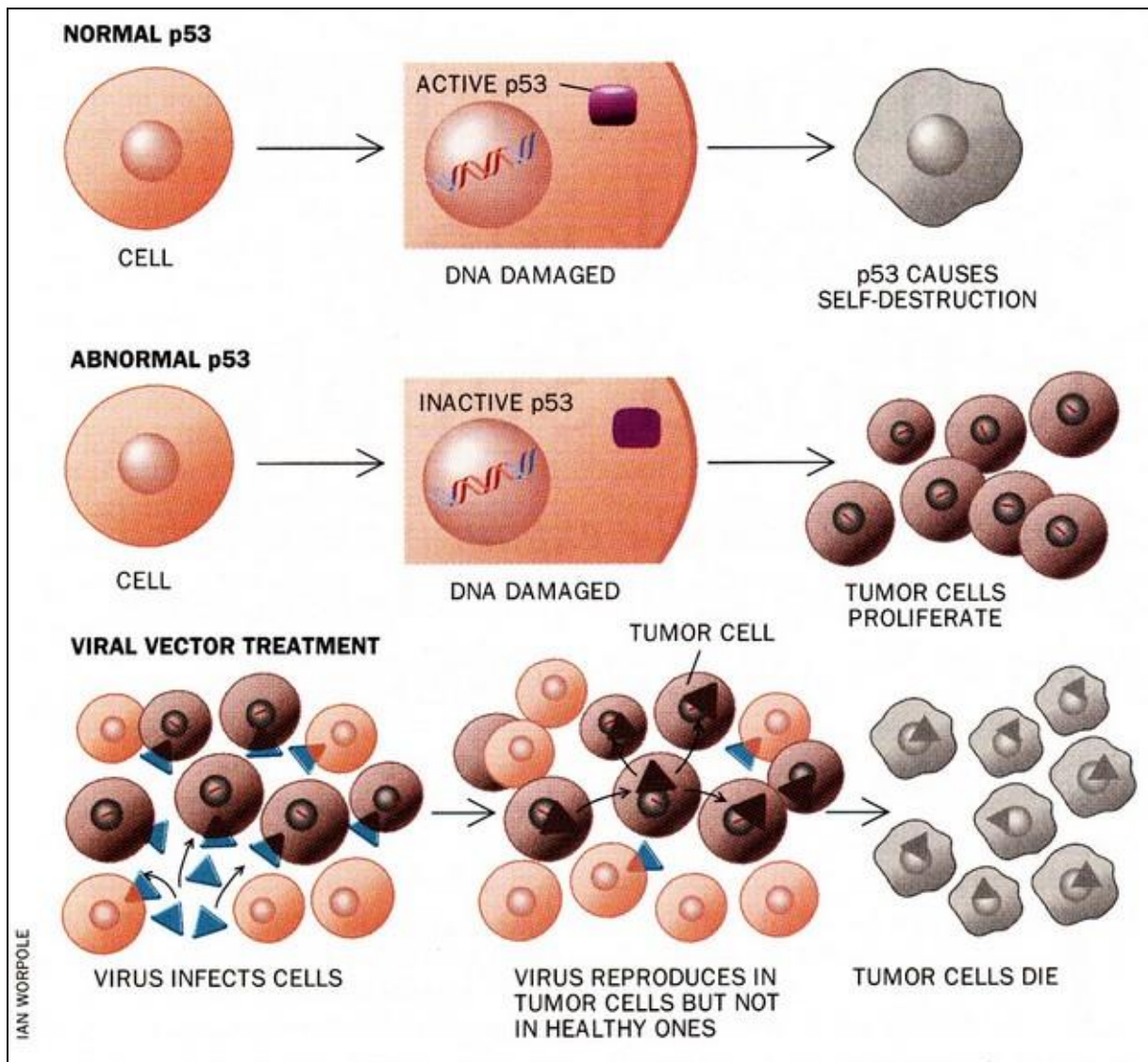
Obr. 16-37 Cílové geny působení p53 a jejich funkce. (Table 9.2, Weinberg R. A., *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

p53 může snižovat chemosenzitivitu podporou

- a) zástavy růstu závislou nebo nezávislou na p21,
- b) reparace DNA a diferenciaci,
- c) zvyšováním transkripce antiapoptických genů jako je bcl-x.

Ukazuje se, že účinky změněného statusu p53 na chemosenzitivitu závisejí na buněčném kontextu. Porucha funkce p53 u normálních buněk může spíše zvyšovat než snižovat chemosenzitivitu. Transformované buňky, které mají wild-type p53 mají tendenci stát se rezistentními.

Jedním z budoucích způsobů terapie specificky cílené na buňky s abnormálním p53 by mohl být např. geneticky modifikovaný virus, který by se množil a tak by ničil jen nádorové buňky s mutovaným p53 (obr. 16-38).



Obr. 16-38 Využití funkce p53 proteinu k selektivní likvidaci nádorových buněk pomocí geneticky modifikovaného viru. (Oloff A. et al., *Scientific American* 1996 : 144)

16.7 PREDIKTIVNÍ MARKERY

Pro diagnostické hodnocení i pro vyhodnocování účinků terapie jsou využívány různé prediktivní či prognostické markery.

Proliferační aktivita a nádorový růst

Růst vyjadřuje celkové zvýšení počtu buněk jako výsledek nárůstu buněk s proliferační aktivitou a ztráty buněk apoptózou nebo nekrózou. *Proliferační aktivita je výsledkem průchodu buněk buněčným cyklem.* Mechanismus odpovědný za proliferační aktivitu (P) je rychlost buněčného cyklu, která je v inverzním vztahu ke generační době (T) na jedné straně a na druhé straně je ve vztahu k podílu buněk vstupujících do cyklu, tzv. růstová frakce (G).

Matematické vyjádření vztahu je $P = G/T$

Vysoká proliferační aktivita je tak důsledkem buď velké růstové frakce nebo krátké generační doby nebo obojího.

Čas zdvojení (Td doubling time) nádoru (bez ztráty buněk) je definován jako

$$Td = T (\log 2 / \log (G+1))$$

Krátký čas zdvojení je tedy výsledkem buď krátkého buněčného cyklu nebo vysoké růstové frakce nebo obojího.

Proliferační markery

Pro stanovení proliferace buněk byly dříve používány techniky inkorporace značených analogů nukleotidů do DNA jako markerů buněk v S-fázi buněčného cyklu, tj. syntetizujících DNA. Patří sem ³H tymidin (detekovaný autoradiograficky nebo scintilačně) nebo bromdeoxyuridin (BrdU, detekovaný imunohistochemicky či průtokovou cytometrií). Nevýhodou je omezené použití *in vivo*, radioaktivita, dlouhé časy pro vyhodnocení i subjektivní kritéria.

Nejstarší metodou vyhodnocování proliferace je **mitotický index (MI)** – mikroskopické počítání mitotických figur na preparátech. Mitózy však představují jen část proliferujících buněk a délka mitózy je variabilní zejména u aneuploidních nádorů. MI jen částečně koreluje s dalšími markery proliferace jako je procento buněk v S-fázi. To je možno stanovit nejlépe pomocí **průtokové cytometrie (flow cytometrie)**, která spočívá ve fluorescenčním barvení DNA vhodnými barvivami (propidium jodid) a měření fluorescence jednotlivých buněk v suspenzi protékající kapilárou před laserovým paprskem. Fluorescenční signál je zpracována systémem různých zrcadel a zesilovačů a výstupem je hodnota v počítači. Z histogramů vyjadřujících obsah DNA (jako hodnotu fluorescence) se vyhodnocují pomocí vhodných počítačových programů procenta buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Dalšími metodami jsou:

Image (static) cytometry spočívá v absorpčním barvení (Feulgenova reakce) a měření buněk na sklíčku.

SPF - S-phase fraction - celkem koreluje s dalšími markery (např. MI nebo Ki67)

Imunohistochemické stanovení antigenů spojených s proliferací jako je PCNA (proliferating cell nuclear antigen), jehož exprese je zvýšena u proliferujících buněk – koreluje s ostatními markery, ale ne vždy. Nepříliš vhodný u nádorů, bývá zvýšený i při reparaci DNA.

Ki67 je protein kódovaný genem na chromozómu 10 a je exprimován v G1, S a G2 fázi u proliferujících buněk. Částečně koreluje s dalšími markery.

DNA topoizomeráza II, jejíž exprese se rychle zvyšuje při přechodu S a G2 fáze a snižuje se na konci mitózy.

Organizátory jadérka (NORs) jsou segmenty DNA spojené s jadérky, které obsahují geny kódující ribozomální DNA. Přispívají k regulaci syntézy proteinů. Jsou vizualizovány barvením stříbrem metodou AgNOR. Koreluje s SPF, Ki67 a MI.

Markery buněčné smrti

Vyhodnocuje se tzv. **apoptický index (AI)**. Metody detekce apoptózy jsou různé, ale k nejběžnějším patří morfologické hodnocení světelnou a zejména fluorescenční mikroskopií a flow cytometrie (stanovení subdiploidní populace, vazba Annexinu V, barvení fragmentů DNA, tzv. TUNEL, aktivita kaspáz atd.)

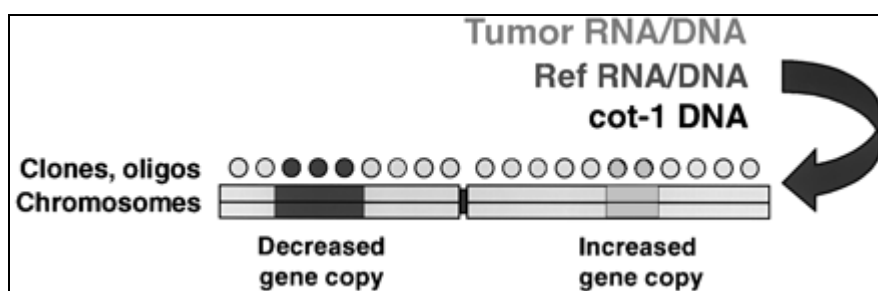
Jako další markery mohou sloužit **specifické molekuly na buněčném povrchu**:

Jako proliferační marker např. CD71 - receptor pro transferin nebo receptory pro specifické růstové faktory (EGF). Jako ukazatel apoptózy exprese receptorů smrti jako je CD95 (Fas).

Významné mohou být i změny cytoskeletonu nebo sledování markerů neproliferujících a klidových buněk jako je statin.

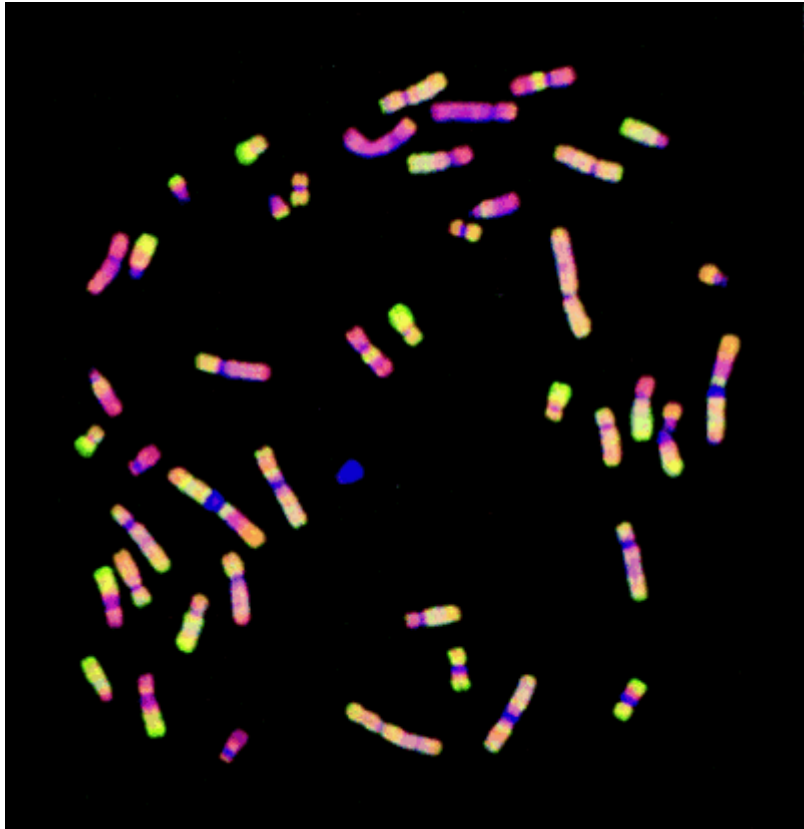
Molekulárně biologickými metodami lze sledovat rovněž změny specifických protoonkogenů a nádorově supresorových genů, např. fosforylace RB proteinu, exprese a status p53 (wild type, mutace), antiapoptické vs. proapoptické proteiny (bcl-2, Mcl-1, bak, bax a další).

Pokročilejšími metodami jsou různé typy „**microarray**“ **analýz** detekujících změny velkého počtu genů či proteinů zároveň. Při **srovnávací genomové hybridizaci** (CGH) a expresní microarray analýze je základní komponentou **fluorescenční poměrná hybridizace** (obr. 16-39).



Obr. 16-39 Srovnávací genomová hybridizace a expresní microarray analýza.

Při ní jsou srovnávány dva vzorky nukleových kyselin, které jsou různě obarveny fluorochromy reagujícími v různých vlnových délkách. Ty jsou hybridizovány za přítomnosti nadbytku neznačené DNA reprezentující genom, jehož informace je mapována. U CGH mohou být použity metafázické chromozómy nebo array z klonovaných prob. U expresní microarray analýzy jsou využívány array z klonů cDNA nebo oligonukleotidů. Praktický příklad CGH analýzy je na obrázku 16-40.



Obr. 16-40 Fluorescenční mikrofotografie z výsledků CGH analýzy lidské linie z nádoru prsu MCF7. MCF7 DNA byla označena zeleně a normální referenční DNA červeně. Chromozómy byly označeny modře DAPI. Úseky se slabou hybridizací se pak jeví modře, oblasti se zvýšeným množstvím kopií zeleně a oblasti se sníženým množstvím kopií červeně.

Při hodnocení a využívání jednotlivých přístupů jsou velmi důležité:

- Otázka interpretace a klinické využitelnosti jednotlivých markerů.
- Standardizace metod a hodnocení mezi laboratořemi.
- Problematika heterogenity nádorů.
- Statické vs. dynamické stanovení parametrů, tj. časový rozvoj.

- Exprese a změny různých onkogenů, které mohou podmiňovat citlivost nádorových buněk k chemo- a radioterapii.
- Postižení vzájemných vztahů jednotlivých markerů.
- Predikce odpovědi na léčbu.

Pro predikce se využívá také různých **biomatematických přístupů** jako jsou multivariační analýzy, analýza základních (principal) component a diskriminační analýza.

16.8 NOVÉ SMĚRY VÝVOJE PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

Zlepšující se znalosti v oblasti biologie a imunologie hostitele a nádorové patofyziologie umožnily využít další nové přístupy v terapii nádorových pacientů. *Na základě poznatků z výzkumu jsou využívány látky, které mohou přímo a cíleně zasáhnout do klíčových mechanismů karcinogeneze na buněčné úrovni (targeted therapy).* Používá se často v kombinaci s konvenčními léčebnými postupy. Příkladem je:

- Terapie cílená proti EGF receptoru, kdy se využívá monoklonální protilátka s vazbou na receptor, inhibitory tyrozinkináz, „antisense nukleotidy“, případně vakcína proti receptoru nebo ligandu
- Diferenciační terapie využívaná zejména u hemopoetických malignit, kdy se pomocí specifických látek navozuje diferenciaci nezralých buněk (kyselina all-*trans* retinová, vitamín D3, butyrát)
- Využití inhibitorů přenosu signálů
 - Inhibitory tyrozinových kináz
 - Inhibitory cyklin-dependentních kináz – ovlivnění buněčného cyklu
 - Inhibitory jiných kináz – např. MAP kinázy, JNK
 - Inhibitory farnesyltransferázy, které inhibují onkoprotein ras spojený s vnitřní stranou plazmatické membrány izoprenoidní lipidovou skupinou – farnesylem. Mutace protoonkogenu ras je častá u nádorů a vede k nekontrolované proliferaci, inhibici apoptózy a zvýšení angiogeneze.

Genová terapie představuje postup mající za cíl napravit genetickou odchylku způsobující vývoj nádorové buňky (p53, geny rezistence, sebevražedné geny, cytokiny). Využívají se tzv. „antisense“ oligonukleotidy, které vyblokuje činnost onkogenu.

Antiangiogenní terapie je cílená proti tvorbě nových cév v nádoru a využívá inhibitory proteáz, inhibitory migrace a proliferace endotelu i inhibitory angiogenních růstových faktorů.

Další možností je **stimulace obranných mechanismů hostitele** včetně specifických a nespecifických imunologických přístupů a strategie cílené přímo na změnu nádorového růstu a diferenciace terapeutickým ovlivněním patofyziologických mechanismů.

Imunoterapie je intervence do imunitních mechanismů hostitele s cílem obnovit nebo modifikovat funkce imunitního systému (substituční, supresivní nebo stimulační, aktivní vs. pasivní, specifická a nespecifická). **Buněčná imunoterapie** spočívá v podání buněk imunitního systému s protinádorovou aktivitou vedoucí k cílenému zasažení nádorové tkáně a překonání tolerance a imunosuprese vyvolané nádorem.

Terčem pro imunitní reakci mohou být i *nádorové antigeny*, kterými se nádorové buňky liší od normálních. Nádory však vykazují mnohdy velmi malou specifickou imunogenitu.

Nespecifická buněčná imunoterapie posiluje protinádorovou imunitu nezávisle na specifických nádorových antigenech. Principem je kultivace efektorových buněk *ex vivo* s látkami, které aktivují nebo posilují jejich protinádorový účinek (lymphokine-activated killer LAK buňky, natural killer NK buňky, aktivované monocyty-makrofágy). Tyto postupy jsou zkoušeny desítky let, ale praktické využití je stále malé.

V současné době se vyvíjejí rovněž tzv. **protinádorové vakcíny**, které navozují specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám v primárním nádoru i metastázách. Využívají se k tomu dendritické buňky.

16.9 TERAPEUTICKÉ ASPEKTY VYUŽITÍ CYTOKINŮ

Biologická terapie s využitím cytokinů a růstových faktorů představuje zcela nový přístup. **Hemopoéza** může být ovlivňována buď hemopoetickými růstovými faktory (kolonie stimulující faktory, interleukiny) nebo negativními regulátory, které mohou zabránit poškození kmenové buňky během chemoterapie. Na základě poznatků o autokrinních mechanismech růstu mohou být *klidové maligní buňky uvedeny do buněčného cyklu svými růstovými faktory, čímž se stanou citlivější k chemoterapii*. Je však nutné si uvědomit, že vědomosti o biologické terapii jsou teprve na počátku, zvláště pokud se týče všech aspektů fascinující propojené sítě cytokinů. Proto je nutná blízká spolupráce mezi preklinickými a klinickými badateli.

Cytokiny a růstové faktory přenášejí signály mezi hemopoetickým a imunitním systémem buď samotné, nebo indukci uvolňování dalších cytokinů. Je nutné si uvědomit, že ovlivňování

pacientů cytokiny podléhá zcela jiným pravidlům, nežli působení cytotoxickými látkami. Cytokiny mají široké spektrum účinků *in vivo* jako je modulace imunitní odpovědi, stimulace hemopoézy, přímá regulace buněčného růstu a diferenciaci, toxicita pro nádorové buňky, účinky na vaskularizaci nádorů apod. Navíc *nevykazují jen primární účinky, ale spouštějí kaskádu sekundárních účinků.*

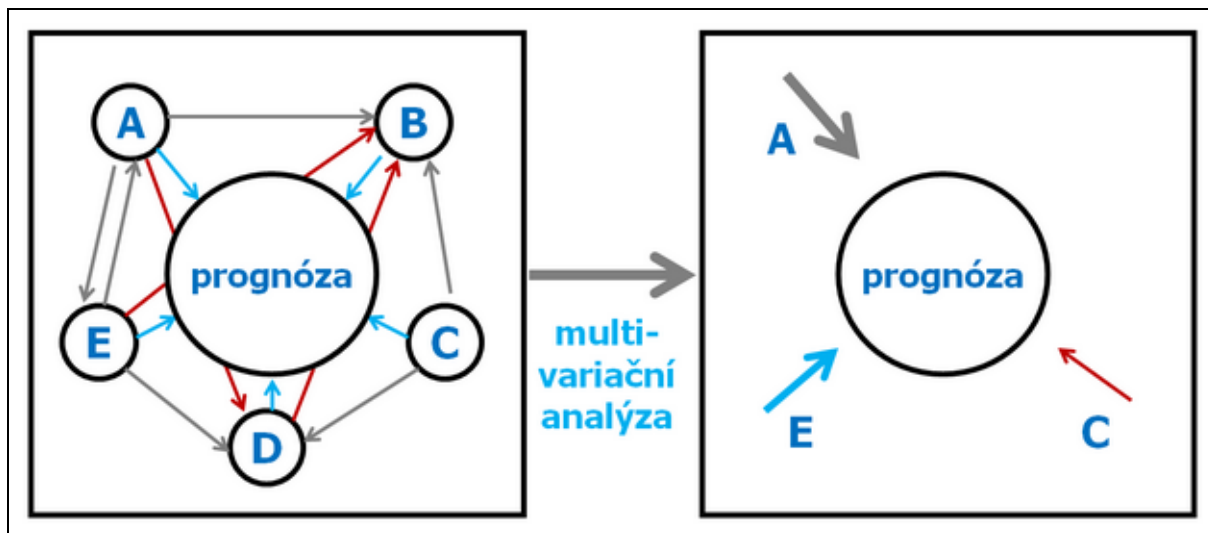
Některé z těchto faktorů jsou běžně používány, ale potenciální klinické využití není úplně objasněno. Využívají se faktory uplatňující se v pozitivní i negativní regulaci, v autokrinním růstu a imunomodulační látky. Podpora hemopoézy je nutná nejen u hemopoetických malignit, ale také *při ozařování a chemoterapii jiných nádorů, kdy dochází k poškození krvetvorby.* V mnoha klinických studiích aplikace G- a GM-CSF zabraňuje nebo redukuje neutropenii po chemoterapii a zvyšuje počty neutrofilů u primárních poruch kostní dřeně.

IL-3 nazývaný multi-CSF podporuje přežívání *in vitro*, proliferaci a vývoj multipotentních hemopoetických kmenových buněk a komitovaných progenitorů pro granulocyty a makrofágy, erytrocyty, megakaryocyty, eosinofily a basofily. Jedním z hlavních důvodů aplikace hemopoetických růstových faktorů je skutečnost, že použití cytotoxických látek je striktně limitováno dávkou. *Vysoké dávky chemoterapeutik jsou s ohledem na nádor vysoce účinné, ale dochází po nich k silné myelosupresi umožňující rozvoj infekcí a sepse.* GM- a G-CSF umožňují zvýšení jednorázové dávky chemoterapeutik nebo redukci intervalu mezi jednotlivými aplikacemi. Také IL-3 významně zvyšuje zotavení leukocytů, neutrofilů a destiček. Růstové faktory se také využívají pro *zvýšení množství progenitorů v krvi při autologní transplantaci buněk periferní krve (při chemoterapii) a pro zlepšení podmínek po transplantaci kostní dřeně.*

16.10 HODNOCENÍ DAT – VÍCEROZMĚRNÉ ANALÝZY

Průnik metod molekulární biologie do onkologické diagnostiky vyžaduje *zpracování multiparametrických (vícerozměrných) souborů dat.* Jedná se o data např. z „array“ analýz (DNA, proteiny), lipidomická data a další.

K tomu jsou využívány pokročilé biomatematické a bioinformatické přístupy. Multivariační analýzy (analýza základních komponent a diskriminační analýza) jsou využívány pro predikce onemocnění (obr. 16-41).



Obr. 16-41 Vyhodnocení biomarkerů pro predikci onemocnění. (podle Hermanet P., *J Clin Epidemiol* 1999 : 371)

Důležitými výstupy jsou stanovené **biomarkery**, případně tzv. „**surrogate biomarkers**“ – „**náhradní**“ **biomarkery**, které jsou využívány při stanovení diagnózy, predikce a průběhu léčby onemocnění.

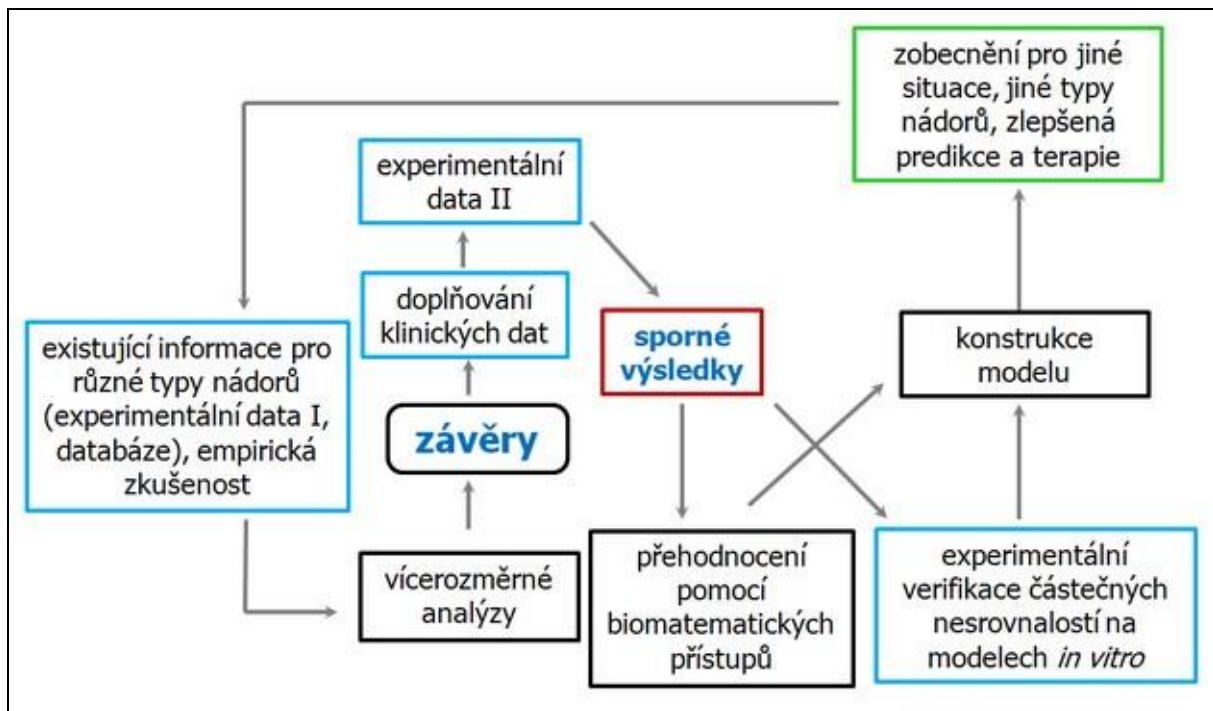
Patří mezi ně

- důležité genetické a cytogenetické markery,
- exprese významných regulačních genů,
- aktivity specifických enzymů,
- cytokinetické parametry,
- parametry angiogeneze, atd.

Provádí se rovněž vyšetření na chemorezistenci v testech *in vitro* (MTT test) a související znaky jako je exprese proteinů souvisejících s rezistencí (MRP, PGP).

Tato data doplňují standardní klinická vyšetření a nespecifické ukazatele imunologického a fyziologického stavu pacienta.

*Je nutné vytvořit systém hodnocení takovýchto dat s cílem určit jejich prognostický význam a zajistit zpětnou vazbu lékaře k těmto hodnoceným datům. To směřuje k **individualizaci léčby**, která může přinést výrazný prospěch pro pacienta (obr. 16-42).*



Obr. 16-42 Vzájemný vztah experimentálních dat, klinických dat a jejich biostatematického vyhodnocování směřující k zlepšení predikce a terapie nádorových onemocnění.

Kontrolní otázky k tématu:

- Proč je důležitá prevence onemocnění?
- Jak lze charakterizovat primární, sekundární prevenci a terapii?
- K čemu je užitečné sestavování tzv. „family trees“? Jste schopni sestavit alespoň částečné takové schéma ve vaší rodině?
- Co je to chemoprevence? Vymenujte některé chemopreventivní látky.
- K čemu slouží nádorové markery a jakého mohou být charakteru? Uveďte některé příklady.
- Jaký je rozdíl mezi buněčnými a genetickými nádorovými markery? Uveďte příklady.
- Jaké metody se využívají k diagnostice nádorového onemocnění a k detekci jeho markerů?
- Podle čeho jsou nádorová onemocnění klasifikována?
- Jaké základní léčebné metody jsou využívány u nádorových onemocnění?
- Jaké jsou nejvyužívanější typy chemoterapeutik?
- Čím je charakterizována biologická terapie?

- K čemu slouží podpůrná a paliativní léčba?
- Kdy se využívá metody autotransplantace krevních buněk?
- Jaké jsou představy o budoucím využití transplantace kmenových buněk?
- Jaké jsou výhody individualizované léčby?
- Čím se zabývají obory prediktivní onkologie a molekulární patologie a jaké přístupy využívají?
- Kde jsou v klinice běžně využívány lipidy?
- Jakými základními mechanismy působí cytostatika a jak jsou jejich účinky závislé na použité koncentraci?
- Jaký význam mají tzv. nádorové kmenové buňky?
- Jaké výhody má využití kombinované terapie?
- Který typ nádoru reaguje lépe na terapii – rychle či pomalu rostoucí?
- Které mechanismy v sobě může zahrnovat rezistence k léčebné látce?
- Co znamená pojem multiléková rezistence?
- Které důležité faktory se účastní buněčné detoxifikace?
- Jak mohou být účinky léků ovlivněny reparačními schopnostmi DNA?
- Jaký je význam p53 v odpovědi na chemoterapii?
- Charakterizujte využívané prediktivní nebo prognostické markery.
- Jaké další terapeutické přístupy jsou využívány na základě nových vědeckých poznatků?
- Jak je využívána tzv. imunoterapie?
- Jak mohou být v léčbě nádorů využity cytokiny?
- Jaké přístupy jsou využívány pro hodnocení onkologických dat?

Doporučená a použitá literatura

Literatura

- B. Alberts et al. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Překlad z anglického originálu *Essential Cell Biology*, Garland Publishing, New York, 1998
- B. Alberts et al.: *Molecular Biology of the Cell*, 4rd edition, Garland Science, New York 2002
- R. A. Weinberg. *Biology of Cancer*, Garland Science, 2007, CD-ROM
- U.R. Folsch, K. Kochsiek, R.F. Schmidt: *Patologická fyziologie*, GRADA Publishing, Praha 2003
- Z. Adam, J. Vorlíček a kolektiv. *Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí*. GRADA Publishing, spol. s r.o., 2001
- Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, GRADA Publishing, Praha 2003
- Z. Adam, J. Vorlíček, J. Vaníček a kolektiv. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob* (druhé, aktualizované a doplněné vydání). Grada Publishing, a.s., 2004
- P. Klener: *Klinická onkologie*, Nakladatelství Galén a Karolinum UK Praha, 2002
- J. Krejsek, O. Kopecký: *Klinická imunologie*, NUCLEUS HK, 2004
- V. Hořejší, J. Bartůňková: *Základy imunologie*, 2. vydání, Triton, Praha 2002
- A. Rejthar, B. Vojtěšek: *Obecná patologie nádorového růstu*, GRADA Publishing, s. r. o., 2002
- M. Jablonská a kol.: *Kolorektální karcinom. Časná diagnóza a prevence*, GRADA Publishing, s.r.o. 2000
- Epigenetics and Human Health: *Linking Hereditary, Environmental and Nutritional Aspects*. Eds. Haslberger A.G., Gressler S. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010
- Cell Adhesion: *Frontiers in Molecular Biology*. Ed. Beckerle M.C., Oxford University Press, 2001
- K. M. Debatin, S. Fulda: *Apoptosis and Cancer Therapy* (Vol. 1, 2), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006
- Cell Cycle Control and Dysregulation Protocols. *Cyclin, Cyclin-Dependent Kinases, and Other Factors*. Methods in Molecular Biology, Vol. 285. Eds. Giordano A. and Romano G., Humana Press Inc., 2004
- Filip S., Mokřý J., Hruška I. *Kmenové buňky: Biologie, medicína, filozofie*. Edice Makropulos. Praha: Galén, 2006
- T. Eckschlager a kolektiv. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Grada Publishing, 1999
- Z. Wilhelm a kolektiv. *Výživa v onkologii*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno, 2004
- D. Heber et al., *Nutritional Oncology*, Elsevier Inc., 2006

Biochemistry of Lipids, *Lipoproteins and Membranes*, 5th edition. Eds. Vance D.E. and Vance J.E., Elsevier, 2008

Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cancer, Eds. Calviello G., Serini S. Springer Science+Business Media B.V., 2010

S. Štípek a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, GRADA Publishing, s.r.o. 2000

Oxidants in Biology: A Question of Balance, eds. Valacchi G. and Davis P. A., Springer Science &Business Media B. V., s 2008

Carcinogenesis, Vol. 21, 2000 – celé číslo

Carcinogenesis, Vol. 31, 2010 – celé číslo

Internetové zdroje

<http://www.insidecancer.org/>

Reviews

J. Hofmanová, M. Machala, A. Kozubík: Epigenetic mechanisms of carcinogenic effects of xenobiotics and *in vitro* methods of their detection. Review. *Folia Biologica (Prague)* 46, 165-173, 2000.

Kozubík A., Vaculová A., Souček K., Vondráček J., Turánek J., Hofmanová J.: Novel anticancer platinum(IV) complexes with adamantylamine – their efficiency and innovative chemotherapy strategies modifying lipid metabolism. *Metal-Based Drugs (review article)*, vol. 2008, Article ID 417897, 15 pages, 2008.

Hofmanová J., Souček K., Vaculová A., Kozubík A.: Fatty acids in the modulation of reactive oxygen species balance in cancer. Chapter 6. In: monography „*Oxidants in Biology: A Question of Balance*”, edited by Valacchi G. and Davis P. A., Springer Science &Business Media B. V., pp. 129-154, 2008.

Hofmanová J., Vaculová A., Kozubík A.: Regulation of the metabolism of polyunsaturated fatty acids and butyrate in colon cancer cells. Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13, 2012, Bentham Science Publishers.

Skender B., Hyršlová Vaculová A., Hofmanová J.: Docosahexaenoic fatty acid (DHA) in the regulation of colon cell growth and cell death: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 156(3): 186-199, 2012