

ONKOGYNEKOLOGIE

David Cibula
Luboš Petruželka
a kolektiv

Úplná obrazová příloha na CD



Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umísťování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.





Copyright © Grada Publishing, a.s.

Prof. MUDr. David Cibula, CSc., prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., a kolektiv

ONKOGYNEKOLOGIE

Autorský kolektiv:

doc. MUDr. Otakar Bělohávek, CSc.
MUDr. Jiří Bouda, Ph.D.
MUDr. Andrea Burgetová
prof. MUDr. David Cibula, CSc.
PhDr. Blanka Čepická
MUDr. Martin Doležel
MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.
doc. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D.
MUDr. Daniela Fischerová, Ph.D.
doc. MUDr. Pavel Freitag, CSc.
prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc.
doc. MUDr. Zdeněk Holub, CSc.
MUDr. Natalia Jančárková, Ph.D.
Mgr. Danuše Jandourková
doc. MUDr. Ladislav Jarolím, CSc.
MUDr. Edita Kabičková
MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.
MUDr. Ivana Krajsová
MUDr. Jan Lacheta
MUDr. Pavla Líbalová, Ph.D.

MUDr. Ladislav Masák, CSc.
prof. MUDr. Miloš Mlynček, CSc.
doc. MUDr. Pavel Mohr, Ph.D.
MUDr. Jan Novotný, Ph.D.
MUDr. David Pavlišta, Ph.D.
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.
doc. MUDr. Helena Robová, Ph.D.
MUDr. Karel Řežábek, CSc.
prof. MUDr. Zdeněk Seidl, CSc.
MUDr. Jiří Sláma
MUDr. Libor Ševčík, Ph.D.
doc. MUDr. Jiří Špaček, Ph.D., IFEPAG
doc. MUDr. Petra Tesařová, Ph.D.
MUDr. Věra Tomancová
MUDr. Václav Urbánek, CSc.
doc. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.
MUDr. Pavel Vítek
prof. PhDr. Petr Weiss, Ph.D.
MUDr. Eva Závadová, CSc.
MUDr. Michal Zikán, Ph.D.

Recenzenti:

doc. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D.
doc. MUDr. Bohuslav Svoboda, CSc.

© Grada Publishing, a.s., 2009
Vydala Grada Publishing, a.s.
U Průhonu 22, Praha 7
jako svou 3682. publikaci
Odpovědná redaktorka PhDr. Alena Palčová
Sazba a zlom Vladimír Vašek
Zpracování CD Antonín Plicka
Fotografie dodali autoři.
Perokresby MgA. Adam Souček
Počet stran 616
1. vydání, Praha 2009

Součástí publikace je CD s úplnou obrazovou přílohou.

Vytiskla tiskárna Finidr, s.r.o.
Lipová č.p. 1965, Český Těšín

Názvy produktů, firem apod. použité v této knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplynávají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

Všechna práva vyhrazena. Tato kniha ani její část nesmějí být žádným způsobem reprodukovány, ukládány či rozšiřovány bez písemného souhlasu nakladatelství.

Autoři	19
Předmluva	21

Obecná část

1 Buněčný cyklus a apoptóza (Z. Kleibl)	25
1.1 Buněčný cyklus	26
1.1.1 Mitogenní signalizace a zahájení buněčného cyklu	27
1.1.2 G1 fáze buněčného cyklu a její restrikční bod	36
1.1.3 S fáze: replikace DNA	38
1.1.4 G2 fáze: kontrola integrity DNA a příprava na M fázi	40
1.1.5 Mitóza (M fáze)	41
1.2 Apoptóza	42
1.2.1 Průběh	42
1.2.2 Extrinzická cesta aktivace	43
1.2.3 Intrinzická cesta aktivace	45
1.2.4 Kontrolní fáze	45
1.2.5 Exekutivní část apoptotické kaskády	46
1.3 Význam znalosti buněčného cyklu a apoptózy pro klinickou praxi	47
Literatura	47
2 Molekulární biologie v klinické praxi (M. Zikán)	49
2.1 Molekulární principy tumorogeneze	49
2.1.1 Protoonkogeny a onkogeny	50
2.1.2 Tumor supresory	51
2.1.3 Mechanizmy mutagenese	52
2.1.4 Epigenetické změny	53
2.1.5 Význam molekulární genetiky pro klinickou praxi	53
2.2 Molekulární genetika některých gynekologických malignit	54
2.2.1 Molekulární genetika ovariálního karcinomu	54
2.2.2 Molekulární genetika karcinomu endometria	59
2.2.3 Molekulární genetika karcinomu děložního hrdla	61
2.3 Metody molekulární genetiky s významem pro klinickou praxi	62
2.3.1 Polymerázová řetězová reakce	62
2.3.2 Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)	64
2.3.3 Real-time polymerázová řetězová reakce	64
2.3.4 Elektroforéza nukleových kyselin nebo jejich fragmentů	64
2.3.5 Hybridizace	65
2.3.6 Metody mutační analýzy	65
2.3.7 Sekvenování DNA	67
2.3.8 Metody analýzy transkripčního profilu – microchip arrays	67
2.4 Očekávaný rozvoj molekulární genetiky malignit	68

Literatura	68
3 Hereditární syndromy (M. Zikán)	69
3.1 Hlavní hereditární syndromy	69
3.2 Syndrom hereditárního karcinomu prsu a vaječníků	69
3.2.1 Gen BRCA1	70
3.2.2 Gen BRCA2	71
3.2.3 Funkce proteinů BRCA1 a BRCA2	71
3.2.4 Riziko vzniku hereditárního karcinomu prsu a vaječníků	71
3.2.5 Karcinom prsu u nositelek mutací genů BRCA1 a BRCA2	72
3.2.6 Karcinom ovaria u nositelek mutací genů BRCA1 a BRCA2	73
3.2.7 Reprodukční faktory a riziko karcinomu prsu a vaječníků u nositelek mutací	74
3.2.8 Hormonální kontracepce u nositelek mutací genů BRCA1 a BRCA2	74
3.2.9 Mutační analýza genů BRCA1 a BRCA2 a indikace k vyšetření	74
3.2.10 Klinická péče o nositele mutací	76
3.3 Karcinom endometria jako součást hereditárního syndromu	77
3.3.1 Riziko vzniku hereditárního karcinomu endometria	78
3.3.2 Mutační analýza genů MMR systému a indikace k vyšetření	78
3.3.3 Klinická péče o nositele mutací	80
Literatura	80
4 Incidence, mortalita a prognóza (D. Pavlišta)	83
4.1 Incidence a mortalita	83
4.2 Prognóza	86
Literatura	87
5 Histopatologie (P. Dundr)	89
Literatura	89
6 Rizikové a prognostické faktory (P. Freitag)	91
6.1 Rizikové faktory	91
6.2 Prognostické faktory	91
Literatura	92
7 Prevence a screening zhoubných nádorů (M. Zikán, D. Cibula)	93
7.1 Prevence	93
7.1.1 Primární prevence	93
7.1.2 Sekundární prevence	93
7.1.3 Terciární prevence	93
7.1.4 Kvartérní prevence	94
7.2 Screening	94
7.2.1 Obecné principy	94
7.2.2 Screening zhoubných nádorů reprodukčních orgánů	95
Literatura	95

8	Staging (<i>J. Sláma</i>)	97
8.1	TNM klasifikace	97
8.2	FIGO klasifikace	99
	Literatura	99
9	Diagnostika (<i>D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohlávek</i>)	101
9.1	Klasické rentgenové zobrazovací metody	101
9.2	Další diagnostické metody	104
9.3	Moderní zobrazovací metody	105
9.3.1	Ultrazvukové vyšetření	106
9.3.2	Počítačová tomografie	112
9.3.3	Magnetická rezonance (MR)	116
9.3.4	Pozitronová emisní tomografie	121
9.4	Klinický staging	124
9.4.1	Využití zobrazovacích metod ve stanovení klinického stagingu	125
9.4.2	Shrnutí využití jednotlivých zobrazovacích metod v klinickém stagingu	130
	Literatura	131
10	Sérové nádorové markery (<i>L. Masák</i>)	133
10.1	Dělení nádorových markerů	133
10.2	Vlastnosti ideálního nádorového markeru	134
10.3	Charakteristika nejčastěji používaných nádorových markerů	136
10.3.1	Karcinoembryonální antigen (CEA)	136
10.3.2	Alfa-1-fetoprotein (AFP)	136
10.3.3	Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)	136
10.3.4	Choriový gonadotropin (HCG)	137
10.3.5	Steroidní hormony	137
10.3.6	Inhibin	137
10.3.7	Laktátdehydrogenáza (LDH)	137
10.3.8	Antigen epidermálních karcinomů (SCCA)	137
10.3.9	CYFRA 21-1	138
10.3.10	CA 125	138
10.3.11	CA 19-9	138
10.3.12	CA 72-4	138
10.3.13	CA 15-3	138
10.3.14	Kyselina sialová asociovaná s lipidy (LASA)	139
10.3.15	Inhibitor tripsinu asociovaný s tumory (TATI)	139
10.3.16	S karcinomem asociovaný sérový antigen (CASA)	139
10.4	Možnosti využití nádorových markerů v klinické praxi	139
	Literatura	140
11	Proteomika (<i>J. Lacheta</i>)	143
11.1	Metody proteomické analýzy	144
11.1.1	2D-PAGE	144
11.1.2	Hmotnostní spektrometrie	144

11.2	Význam proteomické analýzy v onkogynekologii	144
11.3	Další „-omy“	147
	Literatura	147
12	Léčba – úvod (<i>D. Cibula</i>)	149
13	Chirurgická léčba – úvod (<i>D. Cibula</i>)	151
14	Lymfatické mapování a koncept sentinelové lymfatické uzliny (<i>L. Ševčík</i>)	153
14.1	Historie	154
14.2	Lymfatický systém	155
14.2.1	Lymfa a lymfatické cévy	155
14.2.2	Lymfatické uzliny	156
14.3	Metody detekce SLN	158
14.3.1	Metoda využívající barvivo	158
14.3.2	Metoda využívající radiokoloid	159
14.3.3	Předoperační detekce SLN	161
14.3.4	Peroperační detekce SLN	161
14.4	Radiohygienická bezpečnost lymfatického mapování	162
14.5	Selhání lymfatického mapování	163
14.6	Histologické vyšetření lymfatických uzlin	164
14.6.1	Pooperační vyšetření lymfatických uzlin	164
14.6.2	Peroperační vyšetření SLN	164
14.6.3	Pooperační vyšetření SLN	165
14.6.4	Imunohistochemické metody zpracování SLN	166
14.6.5	Molekulárněbiologické metody zpracování SLN	166
14.7	Klinický a prognostický význam konceptu lymfatického mapování	166
	Literatura	167
15	Význam endoskopické chirurgie (<i>Z. Holub</i>)	169
15.1	Hysteroskopie	169
15.1.1	Úloha hysteroskopie v diagnostice a terapii gynekologických malignit	169
15.1.2	Limitace a rizika hysteroskopie	169
15.2	Laparoskopické operace	169
15.2.1	Laparoskopická technika	169
15.2.2	Laparoskopická lymfadenektomie	170
15.3	Závěr	170
	Literatura	170
16	Urologické komplikace (<i>L. Jarolím</i>)	171
16.1	Prevence urologických komplikací	171
16.2	Anatomie ureteru a cévního zásobení adnex, uteru a vaginy, hemostáza	172
16.3	Iatrogenní poranění ureteru	172

16.3.1	Poranění ureteru rozpoznaná peroperačně	173
16.3.2	Poranění ureteru rozpoznaná pooperačně	174
16.4	Iatrogenní poranění močového měchýře	177
16.4.1	Poranění měchýře při oddělování dělohy od měchýře	177
16.4.2	Poranění měchýře rozpoznané během gynekologické operace	178
16.4.3	Poranění měchýře nerozpoznané během gynekologické operace	178
16.4.4	Vezikovaginální píštěle	178
16.5	Rektovezikovaginální píštěle	180
16.6	Uretrovaginální píštěle	181
	Literatura	182
17	Chirurgické komplikace (R. Gürlich)	183
17.1	Únik obsahu gastrointestinálního traktu do dutiny břišní	183
17.1.1	Perioperační poranění trávicí trubice	183
17.1.2	Chirurgické výkony při poranění tenkého a tlustého střeva	184
17.2	Dehiscence anastomózy	184
17.2.1	Rizikové faktory	185
17.2.2	Diagnostika a léčba	185
17.3	Pooperační porucha pasáže	185
17.4	Ranná infekce	186
	Literatura	186
18	Chemoterapie (J. Finek, D. Fischerová, J. Novotný, N. Jančárková)	187
18.1	Nejčastěji používaná cytostatika v onkogynekologii	188
	Literatura	190
19	Hormonální léčba (P. Libalová)	191
19.1	Steroidy	191
19.2	„Antihormony“	192
19.3	Inhibitory aromatázy	192
19.4	Analoga gonadoliberinů	192
	Literatura	193
20	Cílená molekulární biologická léčba (L. Petruželka, E. Zavadová, J. Novotný)	195
20.1	Principy molekulární bioregulační léčby	195
20.2	Skupina receptorů epidermálních růstových faktorů EGFR	195
20.3	Signální transdukce	196
20.4	Monoklonální protilátky	197
20.5	Tyrozinkinázové inhibitory (TKI) – blokáda tyrozinkinázy intracelulární domény receptoru pro epidermální růstový faktor	198
20.6	Imunoterapie a molekulární cílená léčba	199
20.7	Antiangiogenní terapie	201

20.7.1	Antiangiogenní léčba ovariálních karcinomů	202
20.7.2	VEGF receptor a tyrozinkinázové inhibitory	204
20.8	Nežádoucí účinky biologické léčby	204
	Literatura	206
21	Radioterapie (V. Tomancová, J. Vaňásek, P. Vitek, M. Doležel)	207
21.1	Princip protinádorového efektu radioterapie.	207
21.2	Metody	208
21.2.1	Základní pojmy	208
21.2.2	Technika radioterapie	209
21.3	Klasifikace	213
21.4	Nežádoucí účinky	213
21.4.1	Geneze nežádoucích účinků	213
21.4.2	Časné nežádoucí účinky	214
21.4.3	Pozdní nežádoucí účinky	215
	Literatura	217
22	Podpůrná léčba a léčba komplikací chemoterapie (P. Tesařová)	219
22.1	Hematologická toxicita	219
22.1.1	Anémie pacientů se zhoubnými nádory	219
22.1.2	Neutropenie a její léčba	222
22.1.3	Léčba febrilní neutropenie	224
22.1.4	Trombocytopenie	226
22.2	Prevence a léčba chemoterapií indukované nevolnosti a zvracení	226
22.2.1	Patofyziologie nauzey po chemoterapii	227
22.2.2	Emetogenní potenciál chemoterapie	227
22.2.3	Akutní zvracení	228
22.2.4	Odložené zvracení	229
22.2.5	Anticipované zvracení	229
22.2.6	Speciální situace	229
22.3	Mukozitida	229
22.3.1	Prevence	230
22.3.2	Léčba	231
22.4	Kardiotoxicita	231
22.4.1	Mechanismus kardiotoxicity	231
22.4.2	Rizikové faktory	232
22.4.3	Klinické příznaky	232
22.4.4	Snížení rizika	233
22.4.5	Sledování v průběhu léčby	233
22.4.6	Prognóza a léčba	233
22.4.7	Další kardiotoxická chemoterapeutika	233
22.5	Hyperkoagulační stavy spojené s malignitou	234
22.5.1	Patogeneze	234
22.5.2	Incidence tromboembolické nemoci	235
22.5.3	Vrozená trombofilie	235
22.5.4	Prevence a léčba	236
22.6	Enterotoxita	236

22.6.1	Průjem	236
22.6.2	Zácpa	237
22.6.3	Kolitidy	237
22.7	Nefrotoxicita	237
22.7.1	Zhodnocení glomerulární filtrace pro přizpůsobení dávky cytostatika	237
22.7.2	Nefrotoxicita jednotlivých cytostatik	238
22. 8	Neurologické komplikace chemoterapie	240
	Literatura	243

23 Symptomatická léčba (J. Novotný) 245

23.1	Maligní výpotek	245
23.2	Lymfedém	246
23.3	Bolest	247
23.4	Metastatické poškození skeletu	249
23.4.1	Základní charakteristika bisfosfonátů	249
23.4.2	Klinické využití bisfosfonátů	250
23.5	Únava	250
23.6	Nádorová anorexie a kachexie	251
23.7	Hospicová péče	252
	Literatura	253

24 Ochrana reprodukčních funkcí a možnosti zachování fertility (K. Řežábek) . 255

24.1	Faktory zajišťující plodnost u ženy	255
24.2	Ochrana folikulů	257
24.2.1	Při operaci	257
24.2.2	Při radioterapii	257
24.2.3	Při chemoterapii	257
24.3	Mimotělní uchování oocytů či embryí	257
24.3.1	Uchování ovariální tkáně	258
24.3.2	Uchování oocytů	258
24.3.3	Kryokonzervace embryí	259
24.3.4	Ochrana folikulů analogy GnRH	259
24.3.5	Málo běžné a budoucí způsoby uchování fertility	260
24.4	Bezpečnost použití kryokonzervovaných buněk	260
24.5	Etické a právní otázky kryokonzervace tkání a buněk	261
24.6	Přijetí darovaných oocytů (embryí)	261
24.7	Za jak dlouho po léčbě zhoubného nádoru se lze snažit o těhotenství?	262
24.8	Praktický postup pro zachování reprodukčních funkcí	262
	Literatura	263

25 Hormonální substituce po léčbě zhoubných nádorů (D. Cibula) 265

25.1	Karcinom ovaria	265
25.2	Karcinom endometria	266

25.3	Karcinom děložního hrdla	267
	Literatura	267
26	Psychiatrická léčba onkologických patientek (P. Mohr)	269
26.1	Duševní poruchy u nádorových onemocnění	269
26.1.1	Diagnostika duševních poruch u onkologických nemocných	270
26.1.2	Deprese	270
26.1.3	Úzkostné poruchy	272
26.1.4	Delirium	273
26.1.5	Suicidium	274
26.2	Terapie depresivních a úzkostných stavů	276
26.2.1	Farmakoterapie – antidepresiva	276
26.2.2	Farmakoterapie – anxiolytika	280
26.2.3	Farmakoterapie – hypnotika	281
26.2.4	Farmakoterapie – stimulancia	282
26.2.5	Psychoterapie	283
26.3	Terapie delirantních stavů	283
	Literatura	285
27	Psychologie onkologického pacienta (D. Jandourková, B. Čepická)	287
27.1	Osobnost pacienta	287
27.2	Vyrovňávání se s nemocí	288
27.3	Stadia nádorového onemocnění a jejich prožívání	289
27.4	Léčebné společenství	291
27.5	Psychosociální intervence u onkologicky nemocných	291
27.6	Péče o pečovatele	293
	Literatura	294
28	Sexuální rehabilitace u žen se zhoubnými nádory reprodukčních orgánů (V. Urbánek, P. Weiss)	295
28.1	Vliv onemocnění a jeho léčby na sexuální funkci	295
28.1.1	Vliv operační léčby zhoubných nádorů rodidel	296
28.1.2	Vliv aktinoterapie při zhoubném nádoru rodidel	297
28.1.3	Vliv chemoterapie při zhoubném nádoru rodidel	298
28.2	Sexuální rehabilitace	298
28.2.1	Poradenská péče	299
28.2.2	Sexoterapie	300
28.2.3	Minimalizace negativního vlivu tělesných postižení	300
28.3	Některé závěry pro praxi	302
	Literatura	302
29	Sledování po ukončení léčby (M. Mlynček)	305
	Literatura	306

Speciální část

30 Prekancerózy v gynekologii	(J. Sláma)	311
30.1	Prekancerózy vulvy	311
30.1.1	Klasifikace	311
30.1.2	Etiopatogeneze a rizikové faktory	311
30.1.3	Klinický obraz	312
30.1.4	Diagnostika	312
30.1.5	Management a metody léčby	312
30.1.6	Dispenzarizace	313
30.2	Prekancerózy pochvy	313
30.2.1	Klasifikace	313
30.2.2	Etiopatogeneze a rizikové faktory	314
30.2.3	Klinický obraz	314
30.2.4	Diagnostika	314
30.2.5	Management a metody léčby	315
30.2.6	Dispenzarizace	315
30.3	Prekancerózy děložního hrdla	315
30.3.1	Klasifikace	315
30.3.2	Etiopatogeneze	317
30.3.3	Diagnostika	320
30.3.4	Management	330
30.3.5	Dispenzarizace	336
30.3.6	Prevence karcinomu děložního hrdla	337
30.4	Prekancerózy endometria	339
30.4.1	Klasifikace	339
30.4.2	Etiopatogeneze a rizikové faktory	339
30.4.3	Klinický obraz	339
30.4.4	Diagnostika	339
30.4.5	Management a metody léčby	340
30.4.6	Dispenzarizace	340
	Literatura	340
31 Nádory vulvy		343
31.1	Incidence a mortalita (D. Pavlišta)	343
31.2	Histopatologická klasifikace (P. Dundr)	343
31.2.1	Maligní epitelové nádory	344
31.2.2	Maligní mezenchymální nádory	347
31.2.3	Maligní melanom	348
31.3	Rizikové a prognostické faktory (P. Freitag)	349
31.3.1	Rizikové faktory	349
31.3.2	Prognostické faktory	349
31.4	Staging (J. Sláma)	350
31.5	Diagnostika (D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohávek)	351
31.5.1	Diagnostické metody u zhoubného nádoru vulvy	352
31.6	Sérové tumorové markery (L. Masák)	353
31.7	Léčba	353

31.7.1	Chirurgická léčba (<i>D. Cibula</i>)	353
31.7.2	Lymfatické mapování a detekce sentinelové uzliny (<i>L. Ševčík</i>)	361
31.7.3	Význam endoskopické chirurgie (<i>Z. Holub</i>)	368
31.7.4	Radioterapie (<i>V. Tomancová, J. Vaňásek, P. Vítek, M. Doležel</i>)	368
31.7.5	Chemoterapie (<i>D. Fischerová, J. Novotný, L. Petruželka</i>)	369
31.7.6	Fertilitu zachovávající léčba (<i>H. Robová</i>)	370
31.8	Sledování po léčbě (<i>M. Mlynček</i>)	370
31.9	Melanom vulvy (<i>I. Krajsová</i>)	370
31.9.1	Incidence	371
31.9.2	Etiologie a patogenze	371
31.9.3	Klinický obraz	371
31.9.4	Klasifikace	373
31.9.5	Prognóza	374
31.9.6	Léčba	374
31.9.7	Diferenciální diagnostika	377
	Literatura	378

32 Nádory pochvy 381

32.1	Incidence a prognóza (<i>D. Pavlišta</i>)	381
32.2	Histopatologická klasifikace (<i>P. Dunder</i>)	381
32.2.1	Maligní epitelové nádory	382
32.2.2	Maligní mezenchymální nádory	383
32.2.3	Maligní melanocytární nádory	384
32.3	Rizikové a prognostické faktory (<i>P. Freitag</i>)	384
32.3.1	Rizikové faktory	384
32.3.2	Prognostické faktory	385
32.4	Staging (<i>J. Sláma</i>)	385
32.5	Diagnostika (<i>D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohávek</i>)	386
32.6	Léčba	388
32.6.1	Chirurgická léčba (<i>D. Cibula</i>)	388
32.6.2	Radioterapie (<i>V. Tomancová, J. Vaňásek, P. Vítek, M. Doležel</i>)	389
32.6.3	Chemoterapie (<i>D. Fischerová, J. Novotný, L. Petruželka</i>)	390
	Literatura	390

33 Nádory děložního hrdla 393

33.1	Incidence a prognóza (<i>D. Pavlišta</i>)	393
33.2	Histopatologická klasifikace (<i>P. Dunder</i>)	394
33.2.1	Maligní epitelové nádory	394
33.2.2	Maligní mezenchymální nádory	399
33.2.3	Směšené maligní epitelové a mezenchymální nádory	399
33.3	Rizikové a prognostické faktory (<i>P. Freitag</i>)	399
33.3.1	Rizikové faktory	399
33.3.2	Prognostické faktory	400
33.4	Prevence a screening (<i>J. Sláma</i>)	401
33.5	Staging (<i>J. Sláma</i>)	402
33.6	Diagnostika (<i>D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohávek</i>)	405

33.6.1	Diagnostické metody	406
33.7	Sérové tumorové markery (<i>L. Masák</i>)	411
33.8	Léčba	412
33.8.1	Chirurgická léčba (<i>D. Cibula</i>)	412
33.8.2	Lymfatické mapování a detekce sentinelové uzliny (<i>L. Ševčík</i>)	426
33.8.3	Význam endoskopické chirurgie (<i>Z. Holub</i>)	435
33.8.4	Radioterapie (<i>V. Tomancová, J. Vaňásek, P. Vitek, M. Doležel</i>)	437
33.8.5	Chemoterapie (<i>D. Fischerová, J. Novotný, L. Petruželka</i>)	443
33.8.6	Fertilitu zachovávající léčba (<i>H. Robová</i>)	446
33.9	Sledování po ukončení léčby (<i>M. Mlynček</i>)	450
	Literatura	451

34 Nádory děložního těla 457

34.1	Epitelové nádory	457
34.1.1	Incidence a prognóza (<i>D. Pavlišta</i>)	457
34.1.2	Histopatologická klasifikace (<i>P. Dundr</i>)	458
34.1.3	Rizikové a prognostické faktory (<i>P. Freitag</i>)	465
34.1.4	Prevence a screening (<i>M. Zikán, D. Cibula</i>)	466
34.1.5	Staging (<i>J. Sláma</i>)	467
34.1.6	Diagnostika (<i>D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohávek</i>)	470
34.1.7	Sérové tumorové markery (<i>L. Masák</i>)	474
34.1.8	Léčba	474
	■ Chirurgická léčba (<i>D. Cibula</i>)	474
	■ Význam endoskopické chirurgie (<i>Z. Holub</i>)	480
	■ Radioterapie (<i>V. Tomancová, J. Vaňásek, P. Vitek, M. Doležel</i>)	483
	■ Chemoterapie (<i>L. Petruželka, D. Fischerová, J. Novotný</i>)	485
	■ Hormonální léčba (<i>P. Líbalová</i>)	487
	■ Fertilitu zachovávající léčba (<i>H. Robová</i>)	488
34.1.9	Sledování po ukončení léčby (<i>M. Mlynček</i>)	489
34.2	Sarkomy (<i>J. Špaček</i>)	489
34.2.1	Incidence a prognóza (<i>D. Pavlišta</i>)	489
34.2.2	Charakteristika a základní klasifikace	489
34.2.3	Diagnostika	492
34.2.4	Léčba	492
	■ Chirurgie	492
	■ Radioterapie (<i>V. Tomancová</i>)	494
	■ Chemoterapie	495
	■ Hormonální léčba	496
	■ Léčba pokročilého onemocnění	496
	■ Léčba recidiv	496
	■ Dispenzarizace	496
	Literatura	497

35 Nádory ovaria 503

35.1	Border line nádory (<i>D. Cibula</i>)	503
35.1.1	Klinická charakteristika	503
35.1.2	Histopatologická klasifikace (<i>P. Dundr</i>)	503
35.1.3	Prognostické faktory	505
35.1.4	Léčba	506

35.1.5	Sledování po léčbě	508
35.2	Epitelové nádory	508
35.2.1	Incidence a prognóza (<i>D. Pavlišta</i>)	508
35.2.2	Histopatologická klasifikace (<i>P. Dunder</i>)	510
35.2.3	Rizikové a prognostické faktory (<i>P. Freitag</i>)	519
35.2.4	Prevence a screening (<i>D. Cibula, M. Zikán</i>)	521
35.2.5	Staging (<i>J. Sláma</i>)	524
35.2.6	Diagnostika (<i>D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohávek</i>)	527
35.2.7	Sérové tumorové markery (<i>L. Masák</i>)	533
35.2.8	Léčba	534
	■ Chirurgická léčba (<i>D. Cibula</i>)	534
	■ Význam endoskopické chirurgie (<i>Z. Holub</i>)	543
	■ Radioterapie (<i>V. Tomancová</i>)	544
	■ Chemoterapie (<i>L. Petruželka, D. Fischerová, J. Novotný</i>)	544
	■ Hormonální léčba (<i>P. Libalová</i>)	555
	■ Možnosti fertilitu zachovávající léčby (<i>H. Robová</i>)	555
35.2.9	Sledování po ukončení léčby (<i>M. Mlynček</i>)	557
35.3	Neepitelové nádory ovaria (<i>P. Libalová</i>)	558
35.3.1	Incidence	558
35.3.2	Histopatologie	559
35.3.3	Prevence a screening	559
35.3.4	Rizikové a prognostické faktory	559
35.3.5	Diagnostika	559
35.3.6	Gonadostromální nádory – specifické rysy a léčba	560
35.3.7	Germinální nádory ovaria	564
35.3.8	Nádory smíšené germinální a gonadostromální	568
35.3.9	Ovariální sarkomy	568
35.3.10	Malobuněčný karcinom ovaria – hyperkalcemický typ	569
35.3.11	Úloha endoskopie v léčbě neepitelových nádorů ovaria	569
	Literatura	569

36 Nádory vejcovodu 575

36.1	Incidence a prognóza (<i>D. Pavlišta</i>)	575
36.2	Histopatologická klasifikace (<i>P. Dunder</i>)	575
36.3	Rizikové a prognostické faktory (<i>P. Freitag</i>)	576
	36.3.1 Rizikové faktory	576
	36.3.2 Prognostické faktory	576
36.4	Staging (<i>J. Sláma</i>)	576
36.5	Diagnostika (<i>D. Fischerová, A. Burgetová, Z. Seidl, O. Bělohávek</i>)	578
36.6	Sérové tumorové markery, léčba a sledování po skončení léčby (<i>L. Masák, M. Mlynček</i>)	579
	Literatura	579

37 Nádory v dětském věku (*E. Kabičková*) 581

37.1	Nádory vaječníku	581
	37.1.1 Klinické projevy	584
	37.1.2 Diagnostika	585
	37.1.3 Léčba a prognóza	585

37.2	Nádory dělohy	586
37.3	Nádory pochvy	586
37.4	Nádory vulvy	587
	Literatura	587
38	Nádory v graviditě (J. Bouda, J. Novotný)	589
38.1	Radioterapie	589
38.2	Chemoterapie	591
38.2.1	Bezpečnost podání jednotlivých cytostatik v průběhu těhotenství	591
38.2.2	Reverzibilní nežádoucí účinky cytostatik na vyvíjející se plod	591
38.3	Specifika onkochirurgického výkonu	592
38.4	Prekancerózy a zhoubné nádory děložního hrdla	592
38.5	Nádory ovaria	594
38.6	Ostatní gynekologické zhoubné nádory	596
38.6.1	Prekancerózy a zhoubné nádory vulvy	596
38.6.2	Prekancerózy a zhoubné nádory pochvy	596
38.6.3	Karcinom endometria	597
38.7	Negynekologické zhoubné nádory	597
38.7.1	Karcinom prsu	597
38.7.2	Maligní melanom	597
38.7.3	Lymfomy	597
38.7.4	Leukemie	597
	Literatura	598
	Zkratky	599
	Rejstřík.	605



Autoři

doc. MUDr. Otakar Bělohlávek, CSc.

Oddělení nukleární medicíny – PET centrum,
Nemocnice Na Homolce, Praha

MUDr. Jiří Bouda, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN
Plzeň

MUDr. Andrea Burgetová

Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

prof. MUDr. David Cibula, CSc.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

PhDr. Blanka Čepická

S.E.N.A. s.r.o., Praha

MUDr. Martin Doležel

Oddělení klinické a radiační onkologie, Pardubická
krajská nemocnice, a.s.

MUDr. Pavel Dundr, PhD.

Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

doc. MUDr. Jindřich Finek, Ph.D.

Onkologické a radioterapeutické oddělení, Fakultní
nemocnice Plzeň
LF UK v Plzni

MUDr. Daniela Fischerová, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

doc. MUDr. Pavel Freitag, CSc.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc.

Chirurgická klinika 3. LF UK a FNKV v Praze

doc. MUDr. Zdeněk Holub, CSc.

Gynekologicko-porodnické oddělení, Oblastní
nemocnice Kladno, a.s.

MUDr. Natalia Jančárková, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

Mgr. Danuše Jandourková

Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

doc. MUDr. Ladislav Jarolím, CSc.

Urologická klinika 2. LF UK a FN Motol v Praze

MUDr. Edita Kabíčková

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK
a FN Motol v Praze

MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF
UK v Praze

MUDr. Ivana Krajsová

Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN
v Praze

MUDr. Jan Lacheta

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

MUDr. Pavla Líbalová, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika 3. LF UK
a FNKV v Praze

MUDr. Ladislav Masák, CSc.

Klinika gynekologickej onkológie, Onkologický
ústav sv. Alžbety v Bratislave a SZU Bratislava

prof. MUDr. Miloš Mlynček, CSc.

Gynekologicko-porodnická klinika FN a UKF
Nitra

doc. MUDr. Pavel Mohr, Ph.D.

Psychiatrické centrum Praha, 3. LF UK, Centrum neuropsychiatrických studií

MUDr. Jan Novotný, Ph.D.

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze
a Institut onkologie a rehabilitace Na Pleši s.r.o.

MUDr. David Pavlišta, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

doc. MUDr. Helena Robová, Ph.D.

Gynekologicko porodnická klinika 2. LF UK a FN
Motol v Praze

MUDr. Karel Řežábek, CSc.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

prof. MUDr. Zdeněk Seidl, CSc.

Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. Jiří Sláma

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

MUDr. Libor Ševčík, Ph.D.

Porodnicko-gynekologická klinika FN Ostrava

doc. MUDr. Jiří Špaček, Ph.D., IFEPAG

Porodnická a gynekologická klinika, LFUK a FN
v Hradci Králové

doc. MUDr. Petra Tesařová, Ph.D.

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. Věra Tomancová

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. Václav Urbánek, CSc.

Sexuologický ústav 1. LF UK a VFN v Praze

doc. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.

Oddělení klinické a radiační onkologie, Pardubická
krajská nemocnice, a.s.

MUDr. Pavel Víték

Ústav radiační onkologie, Fakultní nemocnice na
Bulovce

prof. PhDr. Petr Weiss, Ph.D.

Sexuologický ústav 1. LF UK a VFN

MUDr. Eva Závadová, CSc.

Ústav klinické imunologie a mikrobiologie 1. LF
UK a VFN v Praze

MUDr. Michal Zikán, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze



Předmluva

V českém odborném písemnictví dosud nebyla problematika gynekologické onkologie v rozsahu podobném této knize zpracována. Onkogynekologie je přitom jednou ze základních subspecializací oboru gynekologie a porodnictví, a to nejen v Evropě, ale i ve většině rozvinutých zemí. Získání specializace vyžaduje nejdelší postgraduální přípravu, zejména vzhledem k nezbytnému počtu provedených chirurgických výkonů. V ČR bylo do roku 2007 jedinou možností pro získání této specializace složení atestace z klinické onkologie. Možnost subspecializace z gynekologické onkologie byla otevřena až v roce 2008. Požadavky na získání specializace jsou shodné s většinou zemí EU a byly převzaty z doporučení ESGO (European Society of Gynecological Oncology). Největší důraz je kladen na získání kvalitní erudice v onkochirurgii, součástí oboru je však komplexní léčba nádorů včetně podávání chemoterapie a podpůrné léčby.

Velká pozornost byla v ČR v posledních letech věnována systému centralizace péče o pacientky se zhoubným nádorem reprodukčních orgánů. Pod Onkogynekologickou sekci České gynekologicko-porodnické společnosti (ČGPS) byl ustanoven systém onkogynekologických center a spolupracujících oddělení. Systém je otevřený, s možností vyloučení či přijetí členů na základě počtu nových pacientek a počtu prováděných radikálních výkonů. Hlavním cílem je standardizace a zvýšení kvality diagnostické a léčebné péče. Přes veškeré úsilí a mnoho známých argumentů, dokládajících lepší výsledky léčby ve specializovaných centrech, je na těchto pracovištích v současnosti v ČR léčeno jen něco přes polovinu pacientek se zhoubnými nádory gynekologických orgánů. Věříme, že i tato kniha přispěje k úrovni poskytované péče i k centralizaci onkologických pacientek.

V incidenci zhoubných nádorů reprodukčních pánevních orgánů obsazuje Česká republika stabilně nepříznivá přední místa ve světových tabulkách. Incidence karcinomu endometria patří k nejvyšším na světě společně s USA, incidence karcinomu ovaria je jedna z nejvyšších v Evropě, srovnatelná pouze s Pobaltskými zeměmi nebo Dánskem. V incidenci

karcinomu děložního hrdla překračujeme více než dvojnásobně průměr Evropské unie; horší situace je pouze v některých zemích východní Evropy. Příčiny nepříznivé situace se liší u jednotlivých nádorů. U karcinomu děložního hrdla je to zejména neexistence organizovaného celoplošného screeningu, u dalších zhoubných nádorů přesné důvody neznáme; u karcinomu endometria se pravděpodobně uplatňují faktory životního stylu, u karcinomu ovaria může být jedním z důvodů malá frekvence užívání hormonální kontracepce v minulosti. Nepříznivé jsou i trendy vývoje incidence – u karcinomu endometria, ovaria i vulvy je dlouhodobě patrný pomalý nárůst. Pouze u karcinomu děložního hrdla je incidence stabilní, to však v žádném případě nelze považovat za úspěch – v ČR se nepodařilo napodobit výrazný pokles, který nastal ve všech zemích EU v důsledku zavedení organizovaného screeningu. V absolutních počtech v ČR každý rok onemocní okolo 4500 žen zhoubným nádorem jednoho z pánevních reprodukčních orgánů.

Kniha Onkogynekologie je určena především onkogynekologům, ale rozhodně ne pouze jim. Ucelený přehled problematiky by měli ocenit všichni gynekologové pracující v nemocničních zařízeních, kliničtí onkologové, radiační onkologové, ale i další odborníci, kteří pracují se ženami se zhoubnými nádory reprodukčních orgánů. Pečlivě vybraný kolektiv autorů čítá celkem 40 odborníků z celé ČR a ze Slovenska, kteří se dlouhodobě zabývají svěřenými oblastmi. Obsah odráží komplexnost problematiky a zdůrazňuje nutnost mezioborové spolupráce. Členy autorského kolektivu jsou kliničtí onkologové, chirurgové, urologové, psychiatři, psychologové, radiologové, radioterapeuti, sexuologové, dermatologové i teoretičtí vědci. Zcela záměrně nebyla problematika jednotlivých zhoubných nádorů svěřena jednomu autorovi, ale každý autor či kolektiv autorů zpracoval oblast své specializace.

Vzhledem k rozdílnému charakteru některých kapitol je kniha rozdělena do dvou částí. Obecná část obsahuje kapitoly, které se týkají nádorů všech nebo více orgánů, v části speciální je problematika rozdě-

lena podle jednotlivých orgánů. Atraktivitu publikace by mělo zvýšit i přiložené CD, obsahující bohatou obrazovou dokumentaci histologických, kolposkopických a peroperačních nálezů, zobrazovacích vyšetření a dalších. CD rovněž obsahuje barevné verze některých obrázků či fotografií, uvedených v knize v černobílé formě. Tyto obrázky jsou v textu označeny symbolem  a na konci kapitol je uvedený kompletní seznam obrázků, které se vztahují k dané problematice.

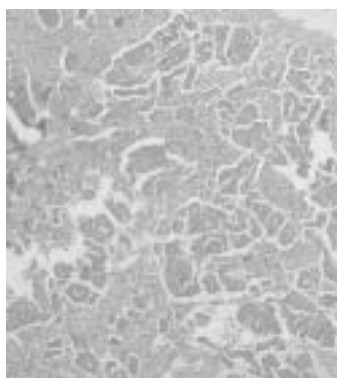
Je třeba upozornit i na problematiku, která v knize zpracována není a kterou by zde čtenář mohl hledat. Zhoubné nádory prsu byly opakovaně zpracovány v monografiích klinické onkologie. Rovněž chybí problematika gestační trofoblastické nemoci (GTN), kterou se v ČR zabývají dvě specializovaná centra

a byla v české literatuře přehledně zpracována v posledních letech několikrát.

Jedním z nedůležitějších posláních předmluvy je i poděkování oceňující velké úsilí věnované rozsáhlému dílu, které nemá komerční význam pro většinu aktérů. Srdečné poděkování za pochopení, podporu a spolupráci patří zejména autorskému kolektivu, který pečlivě připravil svěřené kapitoly, aby později trpělivě snášel četné připomínky editora; oběma recenzentům, kteří ve velmi krátké době rozsáhlé dílo připomínkovali; redaktorce – PhDr. Aleně Palčové, která významně přispěla k výsledné podobě knihy i rychlosti jejího vydání; grafikovi i akademickému malíři, kteří s citem zpracovali bohatou grafickou část; ale i mnoha kolegům a blízkým, kteří téměř rok snášeli časové zaneprázdnění autorů a editorů.

Praha, duben 2009
David Cibula

Obecná část





Buněčný cyklus a apoptóza

Nejvýznačnější charakteristikou nádorových buněk je jejich nekontrolovatelný růst napříč výstavbovým plánem organismu. Tento výstavbový plán počíná u jednotlivých buněk, sdružujících se do buněčných uskupení, ze kterých se skládají tkáně tvořící jednotlivé orgány, uspořádané do orgánových soustav. Výstavbovému plánu organismu odpovídá i jeho řízení – lokální regulace jednotlivých buněk v rámci tkání je realizována pomocí lokálních působků, růstových faktorů, zatímco regulaci orgánů a jejich soustav ovládají neurohumorální systémy. Správnou funkci buněčných komponent trvale dozoruje imunitní systém. Vznik maligního nádoru je poruchou této vyvážené regulace. Porucha začíná na úrovni buněk maligně transformované tkáně. Ta při selhání kontrolních imunitních mechanismů a v důsledku distančně se šířících metastáz může vyvolat až příznaky systémového kolapsu vedoucího ke smrti. Ačkoliv postup nádorové transformace se v jednotlivých případech odlišuje, neoplastická tkáň vždy vykazuje některé shodné charakteristiky:

- autonomii v produkci růstových signálů,
- sníženou senzitivitu k inhibičním růstovým signálům,
- poruchy apoptózy,
- bezprahový replikační potenciál (imortalizaci),
- poruchy v reparaci DNA (genomová instabilita),
- významnou angiogenezi,
- schopnost tkáňové invazivity a metastázování.

Nekontrolovatelný růst nádoru je výsledkem selhání regulačních pochodů v buňce. Jsou tak postiženy dva kritické děje, které se doplňují v ovlivňování tkáňové homeostázy – **buněčný cyklus a apoptóza**. Rovnováha mezi novotvorbou buněk vznikajících dělením v buněčném cyklu a zánikem opotřebovaných, nepotřebných či poškozených buněk v procesu apoptózy charakterizuje normální fyziologický stav ve tkáni dospělého organismu. Nádorové buňky se vždy vyznačují poruchou této rovnováhy, jež je způsobena zvýšením rychlosti buněčného cyklu a rezistencí k indukci apoptózy. Negativní regulace buněčného cyklu a zvýšení senzitivity k proapoptotickým me-

chanizmům v nádorové buňce tvoří tedy základní obecný koncept protinádorové terapie.

Maligní nádor je genetickým onemocněním. Na podkladě genetických alterací a s přispěním epigenetických změn vznikají autonomně se chovající nádorové buňky. Genetické změny – mutace (změny primární struktury genomové DNA) vznikají průběžně ve všech buňkách v organismu v důsledku působení exogenních vlivů (fyzikálních, chemických i biologických) i endogenních pochodů (chyby při replikaci DNA, tvorba endogenních produktů metabolismu s genotoxickými účinky). K těmto genetickým alteracím se přidružují epigenetické změny (změny metylace DNA či modifikace histonů) ovlivňující expresi genetické informace. Bez ohledu na to, zda se jedná o poškození rozsáhlé části genomu či mutace na úrovni jediného deoxyribonukleotidu genomové DNA, pro maligní transformaci je rozhodující kvalitativní a kvantitativní poškození tří skupin genů:

- **protoonkogenů**, kódujících bílkovinné produkty pozitivně ovlivňující buněčné dělení (promitotické působení) a přežívání buněk (antiapoptotické působení),
- **tumor supresorových genů**, jejichž genové produkty působí negativní regulaci buněčného cyklu nebo aktivaci apoptózy,
- **DNA reparačních genů**, které kódují proteiny podílející se na procesech oprav genomové DNA a její regulaci.

Mutace v onkogenech, které způsobují jejich trvalou aktivaci, nebo zvýšená exprese onkogenů umožňují buněčné dělení, které se v postižené buňce stává autonomním dějem, a to bez ohledu na jeho potřebu ve vztahu k vlastnímu organismu. Na akcentované proliferaci nádorových buněk se podílí i ztráta negativních regulačních signálů buněčného dělení, které vyplývá z vyřazení tumor supresorových genů mutacemi nebo hypermetylacemi jejich promotorových sekvencí. Aktivované produkty protoonkogenů a defekty některých tumor supresorových genů (účastnících se regulace apoptózy) inhibují v nádorově transformovaných buňkách spuštění apoptózy.

Poruchy DNA reparačních mechanismů dovolují v postižené buňce tolerovat vznik mutací, které by za normálních okolností vedly k zástavě buněčného cyklu a/nebo k apoptóze. Prostředí genomové nestability v prvotním klonu maligně transformovaných buněk vede kaskádovitě ke vzniku dalších genových alterací. Zakládají se tak genotypově i fenotypově odlišné subpopulace původního nádorového klonu.

V poslední době je silně diskutovaným tématem i otázka prvotní populace, ze které vzniká iniciální klast (cluster) nádorově transformovaných imortalizovaných buněk. V každé tkáni lze vysledovat (předpokládat) tři hlavní vývojové populace, které jsou nutné pro jejich fyziologickou obnovu v průběhu lidského života, neboť – až na výjimky (např. pyramidální nervové buňky) – existence většiny buněk představuje zlomek doby života organismu. Pro obnovu tkáně je tedy nutné, aby v ní byly přítomny takové buňky, jejichž replikační potenciál je srovnatelný s dobou života celého organismu. Těmito buňkami jsou (pravděpodobně) **tkáňově specifické kmenové buňky**. Jejich koncentrace ve tkáni je velmi nízká, vyznačují se sice neomezeným replikačním potenciálem, avšak nízkou mitotickou aktivitou. S ohledem na to, že z těchto kmenových buněk musí vzniknout veškeré populace specializovaných buněk příslušné tkáně, vyznačují se chyběním většiny fenotypových znaků maturovaných buněčných populací. Kmenové tkáňové buňky jsou tedy nositeli časově neomezeného replikačního potenciálu ve tkáni. Tento úkol plní tím, že obnovují zásobu **progenitorových buněk**. Progenitorové buňky se na rozdíl od kmenových buněk vyznačují omezeným replikačním

potenciálem, avšak rychlým dělením, schopností migrace a schopností se diferencovat do podoby buněk specializovaných buněčných populací příslušné tkáně. V jejich fenotypové výbavě se tak podle stupně jejich diferenciace setkáváme se znaky maturovaných buněk. **Specializované buňky tkání** vznikající diferenciací ze svých progenitorů tvoří >99 % buněčné populace ve tkáních. Jsou vykonavateli tkáňově specifických funkcí, avšak v průběhu jejich diferenciace dochází k výraznému snížení jejich replikačního potenciálu. Diferencované buňky v průběhu svých několika dělení stárnou a musí být nahrazeny novou populací buněk vznikajících diferenciací z progenitorů.

S ohledem na známé charakteristiky nádorových buněk (neomezený replikační potenciál, ztráta kontaktní inhibice, neúplná exprese fenotypových znaků plně diferencovaných buněk tkáně atd.) je pravděpodobné, že prvotní klon nádorově transformovaných buněk (**nádorové kmenové buňky**) vzniká postupnou kumulací genetických a epigenetických alterací spíše na úrovni kmenových nebo progenitorových buněk než v majoritních populacích plně maturovaných buněk tkání.

Řešení otázky původu populací buněk v maligním nádoru je nejenom významným teoretickým problémem, ale její řešení může přinést značný pokrok v onkologické terapii. Většina současných strategií sice umožňuje likvidaci satelitních populací masy nádorových buněk, avšak pravděpodobně není adekvátně účinná na kmenové buňky nádoru. Jejich setrvávání ve tkáních je pravděpodobně častou příčinou recidivy onemocnění

1.1 Buněčný cyklus

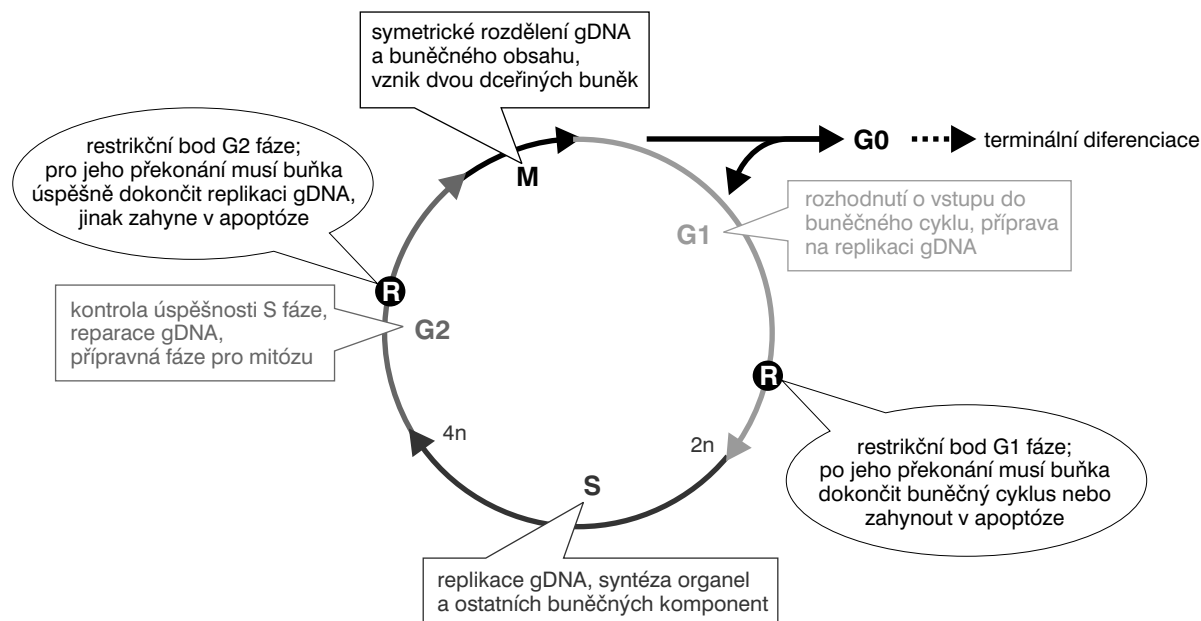
Buněčný cyklus je biochemický děj, který reguluje vznik dvou dceřiných buněk z jedné buňky mateřské. Ačkoliv morfologické charakteristiky buněčného dělení jsou známy již dlouho, teprve v posledních letech se podařilo ozřejmit základní molekulární podstatu buněčného cyklu a částečně i jeho regulaci.

Za normálních okolností se většina buněk v organismu nachází v klidové, tzv. **G0 fázi**, kdy i přes intenzivně probíhající intracelulární metabolismus a zapojení buňky v plnění specializovaných úkolů příslušné tkáně nedochází k přípravě na buněčné dělení. Za fyziologického stavu je vstup buňky do buněčného cyklu umožněn po splnění několika základních podmínek:

- dělení buňky musí být pozitivně stimulováno mitogenní signalizací,
- pro dělení buňky musí existovat dostatečný prostor ve tkáňové nise,
- k dělení může dojít pouze v buňce s intaktním genomem,
- pro dělení musí mít mateřská buňka dostatek stavebních substrátů (především deoxynukleosidtrifosfátů pro syntézu DNA) a energie (ve formě ATP).

Všechny tyto podmínky jsou do různé míry alterovány u maligně transformovaných buněk.

V rámci vlastního buněčného cyklu musí buňka vyřešit dva klíčové problémy. Prvním je absolutně přesné a správné kopírování genomové DNA proce-



Obr. 1.1 Schéma fází buněčného cyklu s vyznačením klíčových úkolů v průběhu jednotlivých fází a charakteristika hlavních restrikčních bodů (R) (gDNA – genomová DNA)

sem replikace DNA. Společně s replikací pochopitelně probíhá i zdvojení počtu buněčných organel a ostatních celulárních komponent pro nově vznikající dvě dceřiné buňky. Druhý úkol spočívá v symetrickém rozdělení mateřské buňky tak, aby dceřiné buňky obsahovaly přesnou polovinu replikovaného genetického materiálu a rovněž přibližnou polovinu buněčných organel a ostatních komponent. Řešení těchto dvou základních úkolů v rámci buněčného cyklu odpovídá i jeho rozdělení na fáze. Oběma hlavním fázím, ve kterých dochází k replikaci genomové DNA (**S fáze**) a konečnému dělení genetického materiálu a buněčného obsahu do dceřiných buněk (**M fáze**), předchází přípravná a kontrolní fáze (**G1 a G2 fáze**, obr. 1.1).

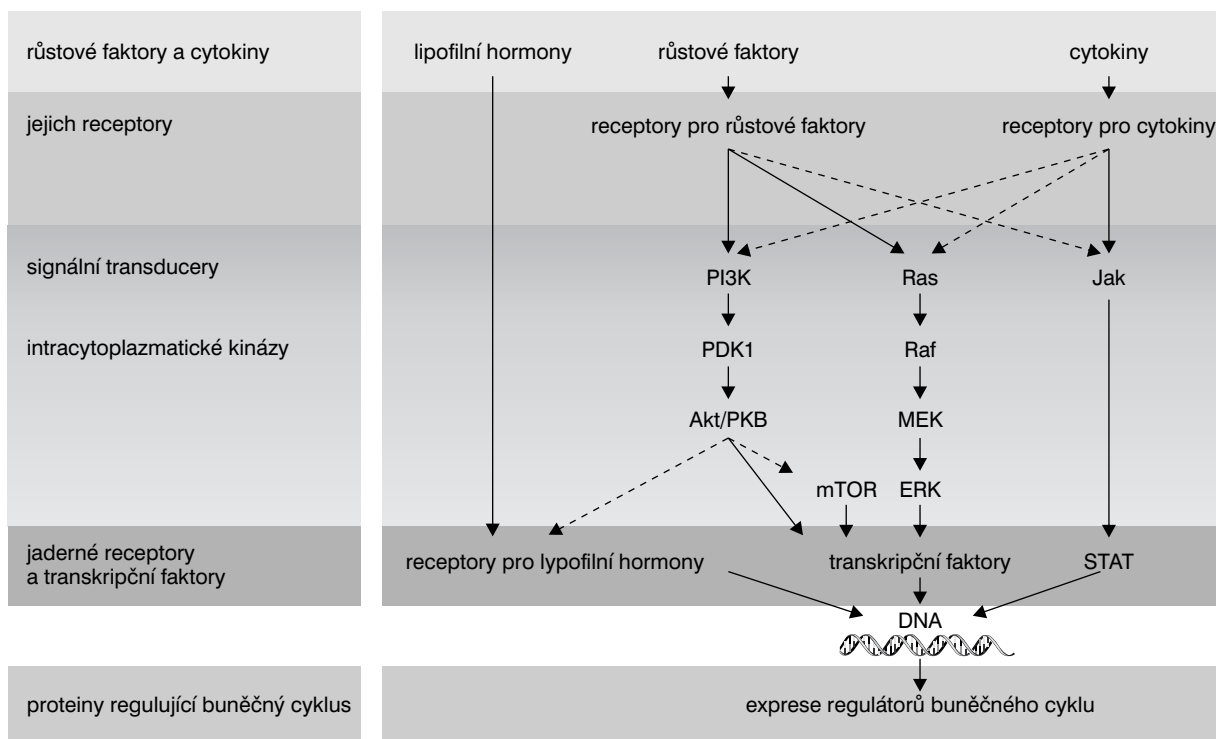
Přípravné fáze obsahují kontrolní, tzv. „restrikční“, body, jejichž překonání je kritickou podmínkou vstupu do následující fáze buněčného cyklu. Nadto restrikční body umožňují synchronizaci buněčného cyklu s dalšími pochody, nesouvisejícími přímo s buněčným dělením (např. reparací DNA).

1.1.1 Mitogenní signalizace a zahájení buněčného cyklu

V každém okamžiku působí na buňky řada pozitivních a negativních mitogenních signálů. Podmínkou zahájení buněčného cyklu je převaha pozitivní mitogenní signalizace, která většinou pochází z vnějšího

prostředí buňky. V buňce je tento signál přenášen a amplifikován cestou signálně transdukčních kaskád. Jednotlivé komponenty kaskád jsou buď malé molekuly s funkcí druhých posílů, nebo specializované bílkoviny aktivované nadřazenou signální molekulou. Po své aktivaci (často zprostředkované fosforylací) tyto proteiny specificky interagují s bílkoviny na další úrovni kaskády, které aktivují. Konečným cílem promitogenní signalizace je buněčné jádro, kde dochází ke specifickému ovlivnění míry transkripce určitých genů. Změna genové exprese se týká především regulátorů buněčného cyklu. Celý systém přenosu signálu do buněčného jádra zahrnuje několik logických a kompartmentových úrovní (obr. 1.2):

- **růstové faktory** (EGF, FGF, IGF), **cytokiny** (interleukiny, interferony, TNF),
- **receptory pro růstové faktory** (např. EGFR, ErbB2, receptorové tyrozinkinázy) a **receptory pro cytokiny** (např. TNFR1, IL-6R, receptor pro erythropoetin, receptory bez vlastní tyrozinkinázové aktivity spojené se samostatnými tyrozinkinázami),
- **přenašeče signálu** (signální transduktory, např. Ras, MAPK, Jak),
- **intracytoplazmatické kinázy** (např. RAF, MAPK, JAK) zprostředkovávající přenos signálu cytoplazmou a jeho amplifikaci,
- **jaderné receptory a transkripční faktory** (např. estrogenní receptor, RXR receptor, c-MYC) zod-



Obr. 1.2 Schéma hlavních cest přenosu signálu pro aktivaci buněčného cyklu. Mezi nejdůležitější signálně transdukční systémy patří aktivace receptorů pro steroidní hormony a kaskády zahrnující PI3K, Ras/MAPK a Jak/STAT.

povědné za aktivaci genů pro regulátory buněčného cyklu,

- **proteiny přímo regulující buněčný cyklus** (např. cykliny).

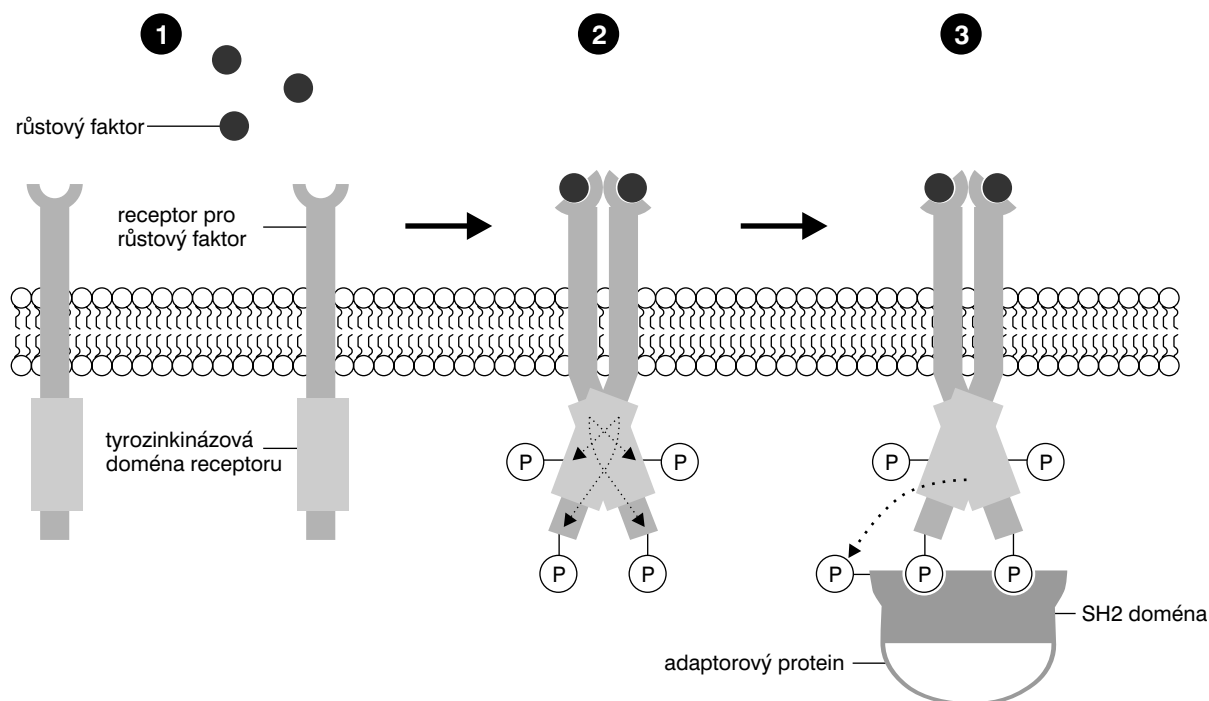
■ Receptory lokalizované na cytoplazmatické membráně a jejich kinázy

Mitogenní stimulaci iniciují hormony pocházející ze žláz s vnitřní sekrecí nebo signální molekuly produkované v samotné tkáni – cytokiny a růstové faktory.

Růstové faktory s mitogenními účinky jsou polypeptidy a proteiny produkované lokálně buňkami tkání, na které zpětnovazebně působí. Jedná se (na rozdíl od hormonů) o signalizaci s krátkým (lokálním) dosahem účinku. Při dosažení určité koncentrace a v závislosti na typu a stupni maturace cílových buněk způsobují růstové faktory mitogenní aktivaci buňky (přesun z G0 do G1 fáze). Například působením epidermálního růstového faktoru (EGF) či destičkového růstového faktoru (PDGF) dochází ke stimulaci buněčného dělení a zahájení G1 fáze. Inzulinu podobné růstové faktory (insulin-like growth factors, IGF-I a IGF-II) jsou v řadě tkání podmínkou pro úspěšný průchod G1 fází buněčného cyklu. Kromě stimulace proliferace však růstové faktory a cytokiny ovlivňují v cílových buňkách i řadu

dalších aktivit (metabolismus, diferenciaci nebo růst). Je nezbytné si uvědomit, že všechny buňky organismu jsou v průběhu své existence trvale stimulovány řadou tkáňových působků – růstových faktorů vytvářejících komplexní signální síť. Bez této neustávající stimulace by buňky zanikly apoptózou.

Membrána buněk je pro proteinové molekuly růstových faktorů neprostupná. Proto působí na cílové buňky prostřednictvím specifických receptorů – **receptorů pro růstové faktory** – zodpovědných za transmembránový přenos signálu. Tyto receptory jsou vytvářeny v cílových buňkách a lokalizovány v jejich cytoplazmatické membráně. Navázání molekul růstových faktorů vede ke změnám uspořádání bílkovinného řetězce (konformace) v receptorových molekulách a jejich dimerizaci (obr. 1.3). Receptory pro růstové faktory se vyznačují vlastní kinázovou aktivitou (hovoříme o tzv. receptorových tyrozinkinázách). Kinázová aktivita katalyzuje fosforylaci vlastního receptoru v jeho cytoplazmatické části, což je podmínkou pro navázání adaptorových proteinů (např. Grb). Tato vazba následně umožní navázání intracelulárních přenašečů signálu (transduktorů; např. Ras protein). Intracelulární transduktory jsou zodpovědné za přenos signálu z aktivovaných receptorových komplexů na kaskádu kináz v cytoplazmě.



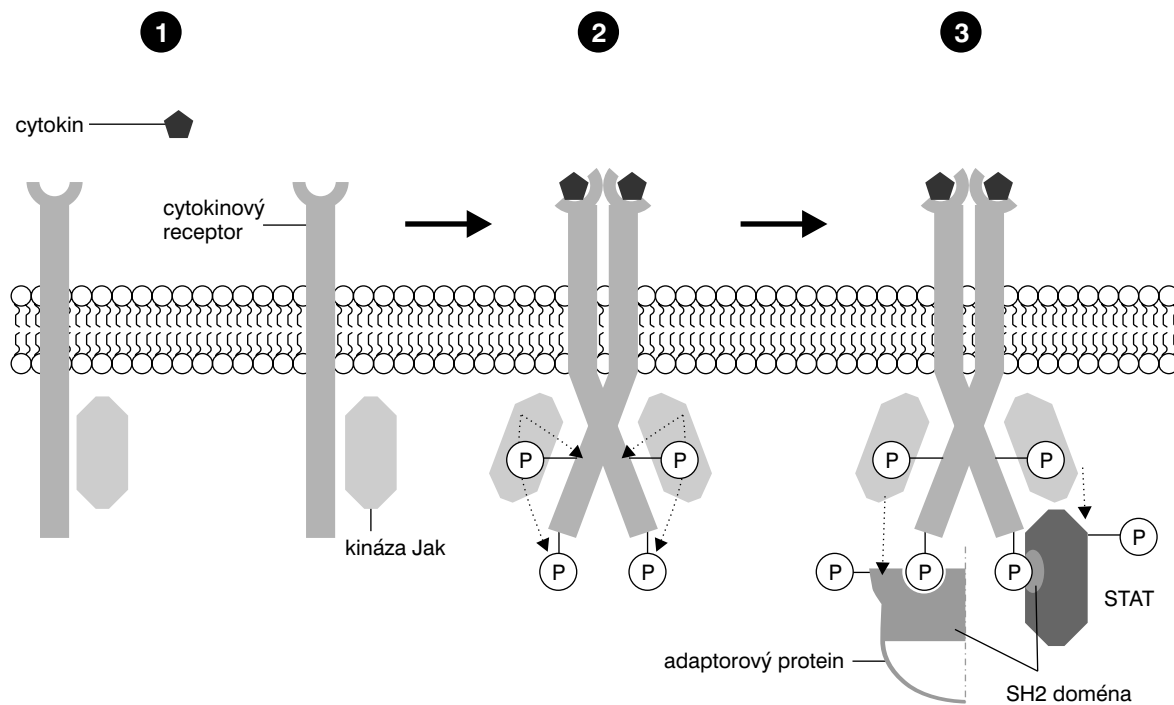
Obr. 1.3 Schéma aktivace receptorů pro růstové faktory. (1) Receptory pro růstové faktory jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně cílových buněk. Vně buňky se nachází extracelulární část receptoru (doména) sloužící pro navázání příslušného růstového faktoru. Receptory pro růstové faktory obsahují intracytoplazmatickou tyrozinkinázovou doménu. (2) Po navázání ligandu – růstového faktoru – receptorové molekuly dimerizují a dochází v nich ke změně konformace vyvolávající aktivaci tyrozinkinázových domén. Kinázová aktivita katalyzuje fosforylaci tyrozininých zbytků v cytoplazmatické části receptoru. (3) Fosforylovaný receptor slouží pro navázání tzv. adaptorových proteinů. Adaptorové proteiny jsou po interakci s receptorovým komplexem často fosforylovány receptorovou tyrozinkinázovou doménou. Navázání adaptorového proteinu umožňuje interakci širšího spektra dalších proteinů (ovlivňujících signální transdukcii) s aktivovaným receptorovým komplexem. Adaptorové proteiny rozpoznávají fosforylované receptory díky přítomnosti vazebných domén (typicky Src-homologní (SH2) domény, které se vyskytují např. v proteinech Src, Grb, STAT, PI3K, Abl, SOCS).

Následná kaskádovitá fosforylace cytoplazmatických kináz umožňuje šíření signálu cytoplazmou a jeho amplifikaci. Mezi hlavní signální cesty aktivující buněčnou proliferaci patří aktivace kaskády mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK), aktivace fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a Jak/STAT kaskáda. Na konci kinázových kaskád jsou fosforylovány transkripční faktory, které aktivují genovou expresi na úrovni syntézy mRNA konkrétních genů (nebo skupin genů).

Podobně jako růstové faktory, i **cytokiny** jsou lokálními produkty tkání. Na rozdíl od růstových faktorů cytokiny vykazují především imunomodulační účinky. **Receptory pro cytokiny** postrádají vlastní tyrozinkinázovou aktivitu a jsou aktivovány podobným mechanismem jako receptory pro růstové faktory. Úlohu vnitřní tyrozinkinázové domény zde přebírají samostatné molekuly intracelulárních tyrozinkináz (např. kináza Jak; obr. 1.4).

Poruchy protoonkogenů kódujících růstové faktory a jejich receptory jsou častým nálezem u řady maligních tumorů. Nejčastějšími typy genových alterací jsou multiplikace genů, kdy vlivem poruch v genomové DNA dochází ke zmnožení kopií genů kódujících růstové faktory a jejich receptory v genomu maligně transformovaných buněk. Následná zvýšená exprese zmnožených genů vyvolává hyperstimulaci promitogenní signalizace. Časté jsou i mutace v genech receptorů pro růstové faktory. Aktivační mutace vedou k syntéze mutovaných, trvale aktivních receptorů bez ohledu na jejich stimulaci ligandem.

Receptor **HER2/neu** z rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor, EGFR) kódovaný genem **ErbB-2** zvyšuje v řadě tkání proliferaci aktivací kaskád MAPK a PI3K. Amplifikace genu **ErbB-2** se vyskytuje u přibližně 25–30 % karcinomů prsu, kde je spojena se zvýšeným rizikem recidiv a horší prognózou onemocnění. Vyskytuje se rovněž asi u 6–8 % karcino-



Obr. 1.4 Schéma aktivace receptorů s asociovanou tyrozinkinázovou aktivitou. (1) S ohledem na chybění vlastní kinázové domény v receptoru je (2) fosforylace tyrozininých zbytků receptoru po jeho aktivaci ligandem (způsobuje dimerizaci a změnu konformace) katalyzována asociovanou kinázou (například Jak kinázou). Tato kináza fosforyluje receptor na základě konformační změny vyvolané jeho aktivací ligandem. (3) Kináza Jak kromě samotné receptorové molekuly následně fosforyluje i efektorové molekuly STAT, případně aktuálně dostupné adaptorové molekuly (viz dále obr. 1.8).

mů ovaria a 9–30 % karcinomů endometria, kde je známkou zhoršeného celkového přežití. Klinický význam *ErbB-2* spočívá především v možnosti inhibice jeho genového produktu pomocí humanizované monoklonální protilátky trastuzumabu (Herceptinu), který se s vysokou afinitou váže na extracelulární doménu HER2/neu receptoru a znemožňuje jeho aktivaci. Použití trastuzumabu u karcinomu prsu a ostatních nádorů (karcinomů plic, ovaria, endometria, ORL oblasti) je podmíněno přítomností vysoké exprese *ErbB-2*.

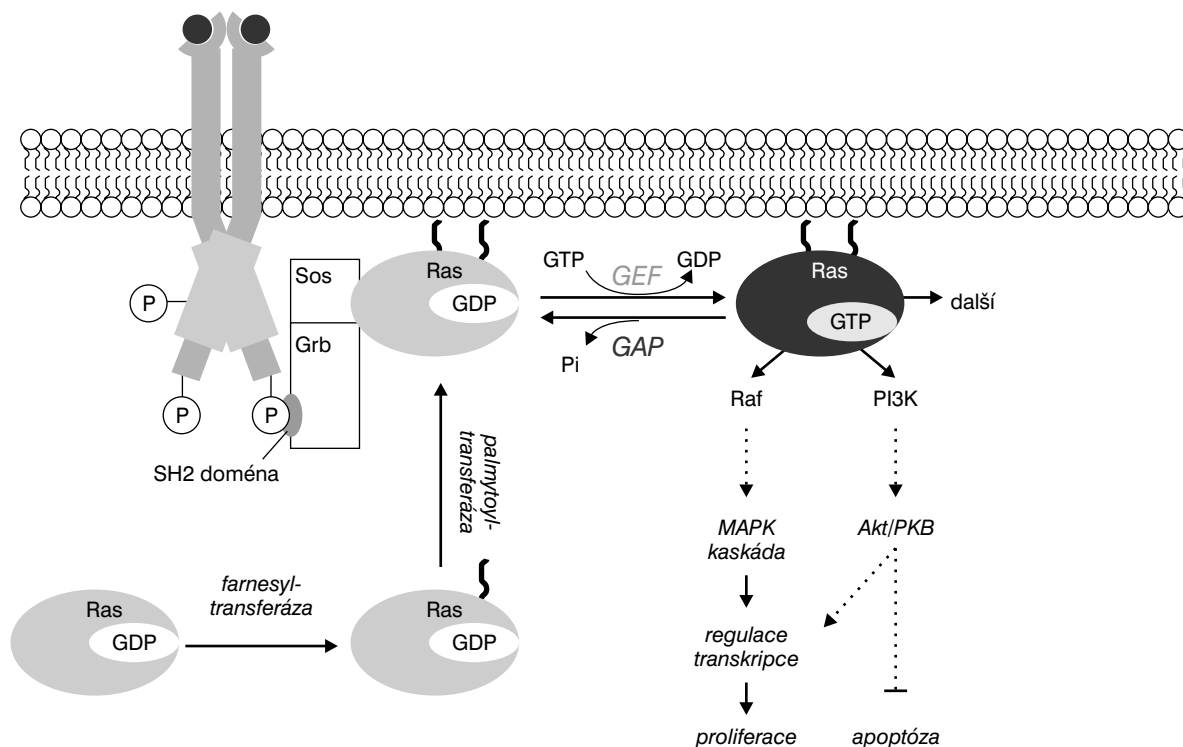
Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je rovněž vysoce exprimovaný u řady solidních tumorů. Jeho zvýšená exprese se vyskytuje u 35–70 % karcinomů ovaria. Podobně jako je tomu v případě HER2/neu i EGFR je atraktivním cílem specifické protinádorové léčby. V případě EGFR je pro klinické použití schváleno několik monoklonálních protilátek s mechanismem účinku podobným trastuzumabu. V současnosti je používán cetuximab (Erbix) pro léčbu metastázujícího kolorektálního karcinomu; probíhají studie léčby karcinomu cervixu, endometria a ovaria. Další monoklonální protilátky (matuzumab, EMD 72000) určené pro léčbu karcinomu ovaria jsou ve studiích fáze I/II.

Kromě protilátkových inhibitorů EGFR jsou vyvíjeny i nízkomolekulární látky intracelulárně inhibující tyrozinkinázovou aktivitu EGFR. Mezi tyto léky již používané v klinické praxi patří erlotinib (Tarceva) určený pro léčbu pokročilého karcinomu pankreatu a nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) a gefitinib (Iressa) pro terapii pokročilého NSCLC. Duálním EGFR a HER2/neu inhibitorem schváleným pro léčbu pokročilého karcinomu plic je lapatinib (Tyverb).

Vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), aktivující angiogenezi, vykazuje potentní účinky na růst karcinomu ovaria *in vitro*. Ve stadiích II a III klinického testování je bevacizumab (Avastin), protilátka proti VEGF schválená pro léčbu metastázujících NSCLC a karcinomů kolorekta. V jedné ze studií bylo monoterapií bevacizumabem dosaženo zlepšení klinické odpovědi u 21 % léčených pacientek s pokročilým karcinomem ovaria.

■ Ras protein

Přenos mitogenního signálu z aktivovaných receptorů na cytoplazmatické membráně často probíhá přes Ras proteiny. Ras proteiny tvoří rodinu molekulár-



Obr. 1.5 Schéma aktivace Ras proteinu. Aktivace proteinu Ras probíhá v oblasti vnitřního listu cytoplazmatické membrány, kde je protein Ras ukotven pomocí kovalentně vázaných lipofilních molekul mastných kyselin. Tato kovalentní modifikace je zprostředkována farnesyl- a palmitoyltransferázou. Stimulace receptoru (např. receptoru pro růstové faktory) způsobí navázání adaptorových molekul (Grb, Sos), které umožní navázání inaktivního proteinu Ras-GDP. GEF aktivita proteinu Sos umožní směnu GDP>GTP v proteinu Ras. Aktivovaný Ras-GTP asociuje s Raf kinázou, která zahajuje vlastní kaskádovou fosforylaci dalších kináz (MEK, ERK), nebo aktivuje fosfatidylinozitol-3-kinázu (PI3K), což vede k aktivaci Akt/proteinkinázy B (PKB). Kromě těchto dvou hlavních směrů může Ras-GTP ovlivňovat i řadu dalších signálních cest. Inaktivace Ras proteinu je zprostředkována hydrolýzou GTP na GDP+Pi, která je katalyzována vnitřní GTPázovou aktivitou proteinu Ras a urychlena proteiny GAP.

ních přepínačů signálu exprimovaných ve většině tkání. Aktivace Ras ovlivňuje řadu intracelulárních pochodů, především růst, diferenciaci, morfogenezi, transport vezikul a uspořádání cytoskeletu. Pro přenos mitogenních signálů na kaskády kináz slouží hlavně proteiny H-Ras, K-Ras a N-Ras (p21^{Ras}). Protoonkogeny kódující tyto proteiny jsou mutovány přibližně u 30 % všech lidských nádorů.

Aktivace molekuly Ras proteinu spočívá ve směně GDP za GTP (obr. 1.5). Proteiny Ras jsou funkčně blízké α -podjednotce G proteinů. Společným znakem je transdukční signální aktivita a schopnost směřovat guanozinfosfáty (GTP nebo GDP). Signálně aktivní forma molekuly je Ras-GTP. Ras protein má vlastní, avšak pomalou GTPázovou aktivitu hydrolyticky štěpící navázaný GTP na GDP, čímž se obnovuje signálně neaktivní stav Ras proteinu (Ras-GDP). Oscilace mezi stavem s navázaným GDP nebo GTP v Ras proteinu jsou ovlivňovány pomocnými proteiny. Zatímco proteiny skupiny GEFs (guanine nucleotide exchange factors; např. proteiny

Sos) usnadňují směnu GDP→GTP, a tak urychlují aktivaci Ras molekuly (působí proonkogeně), proteiny GAPs (GTPase activating proteins; např. neurofibromin – NF1) přibližně 10 000× urychlují štěpení vázaného GTP, čímž zásadně zkracují poločas aktivovaného Ras proteinu (působí antionkogeně).

Ras protein je zakotven na vnitřním povrchu cytoplazmatické membrány buněk pomocí lipidové kotvy tvořené zbytky mastných kyselin – kyseliny farnesylové a palmitové. Posttranslační modifikace molekuly Ras proteinu farnesyltransferázou a palmitoyltransferázou je podmínkou pro správnou lokalizaci a tedy i funkci Ras proteinu.

S aktivovaným receptorem je molekula Ras proteinu asociována pomocí heterodimeru tvořeného proteiny Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) a Sos. Grb podjednotka (díky SH2 doméně) slouží k navázání Ras molekuly na aktivovaný receptor, zatímco Sos protein s GEF aktivitou napomáhá aktivaci Ras proteinu.

Protein Ras se u člověka vyskytuje v podobě tří homologních proteinů H-Ras, K-Ras a N-Ras, exprimovaných v různých tkáních. Nejčastěji se mutace vyskytují v protoonkogenu *K-Ras* – u karcinomů pankreatu (70–90 %) a karcinomů plic (20–50 %), výjimečně u karcinomů prsu a ovaria. Je zajímavé, že mutace v *K-Ras* genu nebo jeho efektoru *B-Raf* se u karcinomu ovaria vyskytují u >50 % nádorů s nízkým gradingem (invazivní mikropapilární serózní karcinomy a serózní borderline tumory), zatímco u agresivních forem serózních karcinomů se prakticky nenacházejí. U karcinomů endometria je výskyt mutací v *Ras* genech popisován v rozmezí 2–20 %. Mutace se výrazně častěji nacházejí u karcinomů endometria typu I (~26 %) než typu II (serózní karcinomy; <2 %).

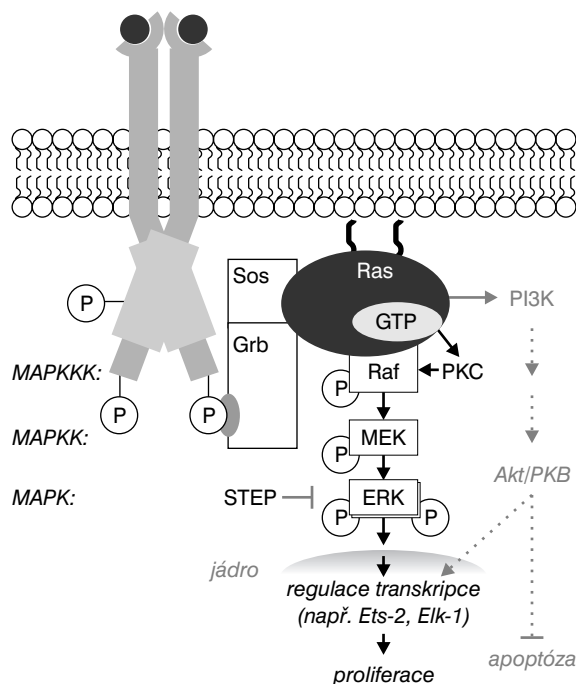
S ohledem na častý výskyt mutací v genech *Ras* u řady nádorových onemocnění se jeho ovlivnění stalo cílem protinádorové léčby. Jednou z možností je inhibice farnesylace, v jejímž důsledku by mělo být zabráněno ukotvení Ras proteinu v cytoplazmatické membráně, které je nezbytné pro efektivní přenos signálu z aktivovaných receptorů na kinázy kaskád. Ve stadiu klinických studií je několik perorálních inhibitorů farnesyltransferázy (tipifarnib –

R115777, lonafarnib – SCH66336, BMS-214662, L778123), avšak dosavadní výsledky léčby u karcinomu plic zůstávají za očekáváním.

■ MAP kinázová kaskáda

Kaskáda mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK) reguluje řadu buněčných aktivit včetně regulace proliferace, diferenciace nebo syntézy autokrinních růstových faktorů. Obvyklým signálním substrátem aktivovaného Ras proteinu v mitogenní signalizaci je kináza **Raf** (obr. 1.6). Tato serin/treoninová kináza se vyskytuje v podobě tří homologních proteinů: A-Raf, B-Raf a Raf-1. Asociací s aktivovaným Ras-GTP dochází v molekule Raf ke konformační změně, v jejímž důsledku je aktivována její kinázová doména. Aktivovaný protein Raf následně disociuje z komplexu s Ras proteinem a fosforyluje kinázu **MEK** (MAP and ERK kinase, MEK1 a MEK2). Substrátem těchto duálně specifických kináz (serin/treoninové kinázy) je proteinkináza **ERK** (extracellular signal-regulated kinase). Fosforylace ERK kináz (ERK1 a ERK2) způsobuje jejich dimerizaci, po které přestupuje ERK do buněčného jádra. Intranukleárně ERK fosforyluje řadu transkripčních faktorů (např. Elk-1, Ets-2), které v konečném důsledku stimulují expresi cyklinu D1 (kap. 1.1.2).

Aktivované kinázy v MAPK kaskádě jsou za normálních okolností defosforylovány specifickými fos-

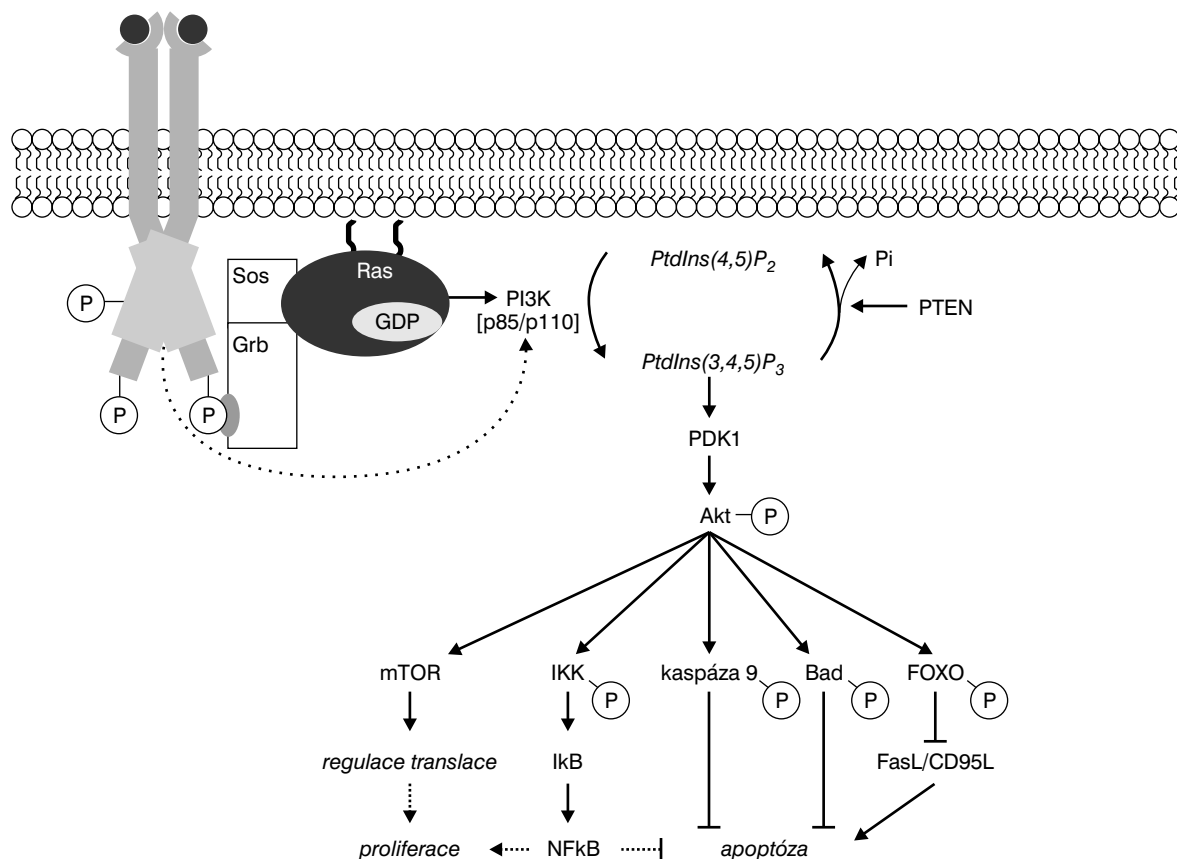


Obr. 1.6 Schéma přenosu signálu cestou kaskády MAPK. Aktivovaný Ras protein umožňuje navázání kinázy Raf, která se autokatalyticky fosforyluje a následně disociuje z komplexu s Ras-GTP. Raf fosforyluje kinázu MEK, která následně fosforyluje ERK. Po fosforylaci molekula ERK vytváří homodimer, který je translokován do buněčného jádra, kde fosforyluje transkripční faktory (např. Ets-2 nebo Elk-1) indukující expresi řady genů, jejichž proteinové produkty se podílejí na růstu a diferenciaci buňky (např. Elk-1 aktivuje expresi transkripčních faktorů iniciujících následně syntézu cyklinů skupiny D umožňujících přesun z G1 do S fáze buněčného cyklu). Komponenty kaskády MAPK jsou často označovány podle stupňů aktivace kinázové aktivity – MAPkináza kinázy kinázy (MAPKKK; např. Raf), MAPkináza kinázy (MAPKK; např. MEK) a MAPkináza (např. ERK).

fatázami. Například aktivovaná ERK2 kináza je defosforylována fosfatázami **STEP** (striatum-enriched phosphatase) nebo **DUSP2** (dual specific serin/threonine phosphatase – jejíž exprese může být aktivovaná proteinem p53). Defosforylace ERK2 blokuje její aktivní doménu, což zabraňuje transportu ERK2 do buněčného jádra.

Zatímco mutace v *Raf-1* a *A-Raf* genech jsou poměrně vzácné, mutace v protoonkogenu *B-Raf* se vyskytují u řady nádorů, nejvíce u melanomu (70 %), papilárního karcinomu štítné žlázy (50 %) a kolorektálního karcinomu (15 %). U karcinomu ovaria se (podobně jako v případě mutací v *Ras* genu) mutace *Raf* vyskytují u nádorů s nižším gradingem; zřídka se vyskytují u karcinomu děložního hrdla a endometria.

Pro ovlivnění aktivity mutovaných Raf proteinů se studuje řada nízkomolekulárních inhibitorů v různých



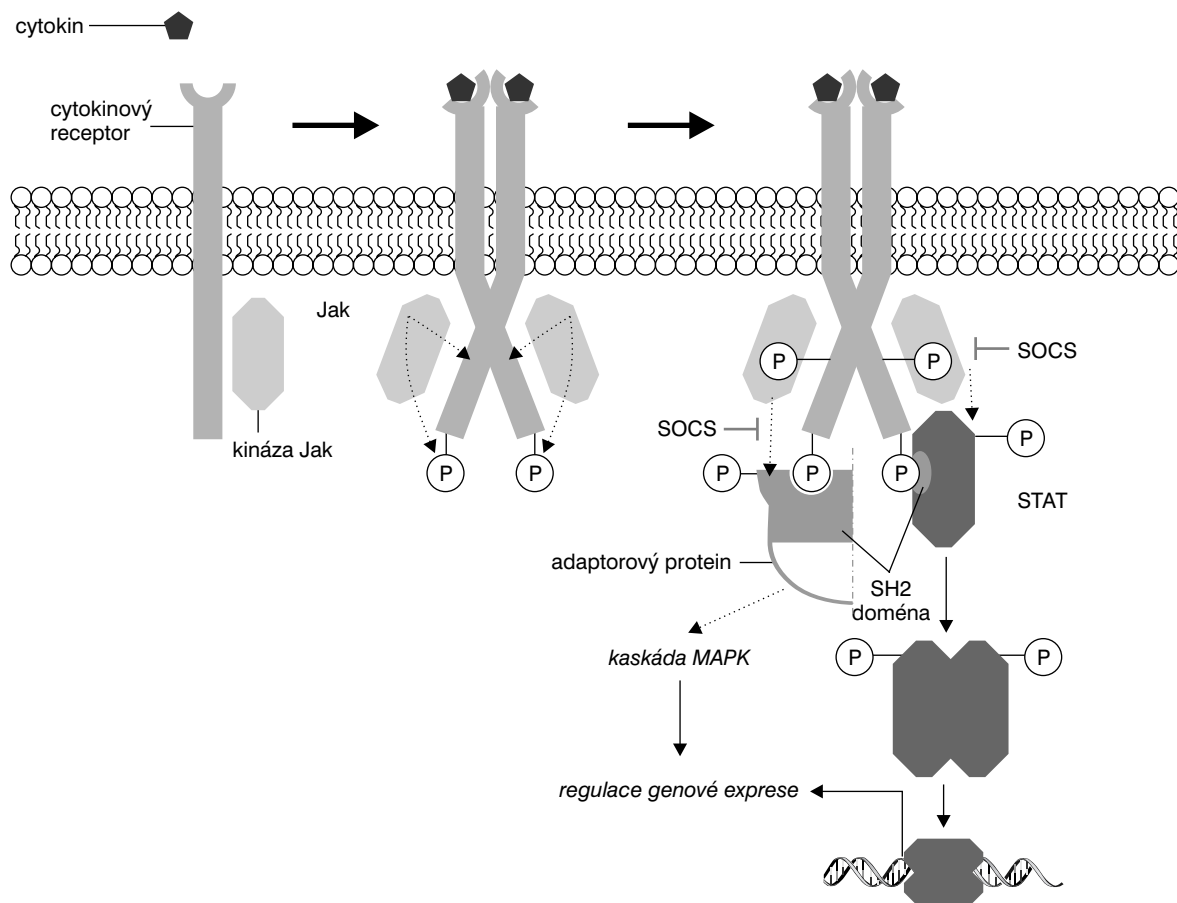
Obr. 1.7 Schéma aktivace Akt/PKB. Receptorové tyrozinkinázy aktivují PI3K/Akt kaskádu cestou interakce s molekulou proteinu Ras, nebo přímou interakcí s aktivovanou receptorovou tyrozinkináзой. Indukovaná kinázová aktivita PI3K fosforyluje $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ na $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. Molekula $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ aktivuje PDK1, jejímž substrátem je tyrozinkináza Akt ovlivňující řadu intracelulárních pochodů: Akt kináza inaktivuje protein Bad (Bcl-2 associated death promoter), prokaspázu 9 a Forkhead proteiny (FOXO – regulátory exprese FasL/CD95L) čímž inhibuje apoptózu (dále kap. 1.1.2). Fosforylací proteinu mTOR (mammalian target of rapamycin) se podílí na regulaci translace. Fosforylace IKK (IκB kinase) umožňuje inaktivaci IκB (inhibitor of NFκB) s následnou aktivací transkripčního faktoru NFκB. Aktivita NFκB umožňuje prodloužené přežívání nebo diferenciaci a inhibici apoptózy v řadě buněčných populací. Fosforylace eNOS (endothelial nitric oxide synthase) reguluje syntézu NO a fosforylace GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) se podílí na regulaci glukózového metabolismu. Negativní regulace Akt/PKB je zprostředkována produktem tumor supresorového genu PTEN. Fosfatáza PTEN hydrolyticky štěpí $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ za vzniku signálně neaktivního $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$.

ných stádiích klinického hodnocení. U pacientek s karcinomem ovarií probíhají studie s použitím sora-fenibu – společného multikinázového inhibitoru receptoru pro VEGF (VEGFR), receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGFR), kináz B-Raf, Raf-1 a c-Kit. V klinickém hodnocení jsou rovněž preparáty konstruované na základě antisense oligonukleotidů (ISIS 5132), jejichž cílem je snížení exprese Raf interferencí s Raf mRNA.

Rovněž MEK kinázy jsou možným cílem protinádorové léčby, především u pacientů s konstitutivní aktivací Ras či Raf proteinů a mitogenně aktivních receptorů pro růstové faktory. Ve stadiu klinických studií je několik jejich nízkomolekulárních inhibitorů (např. CI-1040, AZD6244).

■ Aktivace PI3K a Akt/PKB

Fosfatidylinositolfosfáty (PtdInsP) jsou fosfolipidy fyziologicky se vyskytující v cytoplazmatické membráně. Signální aktivita těchto malých molekul s funkcí druhých signálních posílů závisí na stupni jejich fosforylace, kterou katalyzuje **fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K)**. PI3K je heterodimerním proteinem složeným z katalytické p110 podjednotky (PIK3CA) fosforylující PtdInsP a regulační podjednotky p85 (PIK3R1), jež má funkci adaptorového proteinu (obsahuje SH2 doménu). PI3K tak může být aktivována jednak Ras proteiny, jednak přímo receptorovými tyrozinkinázami. PI3K aktivuje serin/treoninovou proteinkinázu **PDK1** (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1), která následně



Obr. 1.8 Schéma signální cesty Jak/STAT. Po aktivaci ligandem cytokinem fosforyluje kináza Jak molekuly cytokinových receptorů v jejich intracytoplazmatické oblasti. Fosforylované receptorové molekuly umožňují navázání transkripčních faktorů STAT. Molekuly STAT jsou fosforylovány Jak kinázou, následně se uvolňují z receptorového komplexu, dimerizují a po translokaci do buněčného jádra regulují genovou expresi. Inhibice Jak/STAT signalizace spočívá v kompetici SOCS proteinů se STAT proteiny ve vazbě na Jak kinázy. Po fosforylaci Jak kinázou jsou aktivované receptory pro cytokiny schopny prostřednictvím vazby adaptorových proteinů aktivovat i další signálně-transdukční cesty, jako je např. MAP kinázová kaskáda.

fosforyluje proteinkinázu **Akt** (označovanou též proteinkináza B, **PKB**). Akt/PKB se vyskytuje v podobě tří vysoce homologních proteinů Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) a Akt3 (PKB γ). Substrátem Akt kináz je pestrá skupina proteinů, jejichž fosforylaci Akt ovlivňuje řadu buněčných aktivit, především inhibici apoptózy, růst a proliferaci buněk nebo energetický metabolismus (obr. 1.7).

Negativním regulátorem signální cesty PI3K/Akt(PKB) je proteinový produkt tumor supresorového genu **PTEN** (phosphatase and tensin homolog).

Aktivita signalizace PI3K/Akt(PKB) s významnými mitogenními a antiapoptotickými vlivy je zvýšena u řady nádorů (karcinom ovaria, prsu, kolorekta, plic). Důvodem hyperaktivity této signální dráhy jsou amplifikace nebo aktivační mutace protoonko-

genů (hlavně **PIK3CA**) a inaktivující mutace v tumor supresorovém genu **PTEN**.

Amplifikace **PIK3CA** se vyskytuje u 25–40 % obvykle serózních karcinomů ovaria s vysokým gradínem, méně často (2–5 %) jsou u těchto nádorů přítomny mutace genu. Amplifikace **PIK3CA** je v těchto případech výrazně negativním prognostickým znakem celkového přežití. Raritně byly zaznamenány u těchto nádorů i mutace v regulační p85 podjednotce. U endometriálních karcinomů ovaria a karcinomů ze světlých buněk se mutace v **PIK3CA** vyskytují přibližně ve 20 % případů. Amplifikace **PIK3CA** jsou nalézány u více než 80 % případů karcinomů děložního hrdla.

Expresí genů **Akt** je zvýšena u několika typů nádorů. Hyperexpresí **Akt1** je častým nálezem u adenokarcinomů žaludku, zvýšená exprese a amplifikace

Akt2 provází nádory prsu a ovaria (5–18 % tumorů s vysokým gradingem) a zvýšená exprese *Akt3* byla zaznamenána hlavně u karcinomů prsu neexprimujících estrogenní receptor. Předpokládá se, že aktivace Akt kinázy se podílí na zvýšené chemorezistenci ovariálních tumorů na účinky platinových derivátů.

Dědičné mutace v genu *PTEN* jsou zodpovědné za vznik Cowdenova syndromu. U nositelů mutací je zvýšeno riziko vzniku karcinomu prsu. Somatické alterace *PTEN* jsou častým nálezem u některých tumorů mozku, prostaty a u melanomu. Méně často se nacházejí u karcinomů močového měchýře, plic, prostaty a nádorů lymfatického systému. Často (~50 %) se však vyskytují u endometriálních ovariálních nádorů, avšak u jiných histologických typů je jejich nález vzácností.

■ Signální transdukce zahrnující Jak/STAT

Signální cesta Jak/STAT je charakteristickou signální dráhou aktivovanou cytokinovými receptory (receptory bez vlastní tyrozinkinázové aktivity, obr. 1.8). Charakteristikou této signální dráhy je její linearita, kdy k rychlému přenosu signálu z cytoplazmy do jádra, kde nastávají cílené změny genové exprese, dochází aktivací malého počtu signálních molekul.

Skupina cytokinových receptorů zahrnuje receptory pro interleukiny, interferony a některé další chemokiny (např. erythropoetin, granulocyte colony stimulating factor – G-CSF). Po navázání cytokinu tyto receptory dimerizují a indukovaná změna konformace umožňuje aktivaci kinázy **Jak** (Janus activated kinase, obr. 1.8). Kináza Jak je známa v podobě čtyř homologních tyrozinkináz (Jak1, Jak2, Jak3 a Tyk2). Po aktivaci fosforyluje kináza Jak cytoplazmatickou doménu asociované receptorové molekuly, která stimuluje navázání transkripčních faktorů **STAT** (signal transducer and activator of transcription). Do současnosti bylo popsáno celkem sedm STAT proteinů (STAT1–4, STAT5A, STAT5B, a STAT6) lišících se afinitou k různým typům cytokinových receptorů a schopností řídit expresi různých genů. STAT proteiny se v cytoplasmě vyskytují v podobě monomerních neaktivních molekul. Po navázání na fosforylovaný receptor (prostřednictvím SH2 domény) jsou fosforylovány Jak kinázou asociovanou s receptorem. Jejich fosforylovaná forma disociuje z receptorového komplexu a vytváří dimerní molekuly. Aktivní dimery jsou translokovány do buněčného jádra, kde plní úlohu transkripčních faktorů, např. STAT1 a STAT3 jsou důležitými regulátory exprese genů ovlivňujících přežívání buněk (*BC1-X_L*, survivin, kaspázy) a buněčnou proliferaci (*c-Myc*, *p21*, *cyclin D1*).

Negativní regulaci Jak/STAT signalizace zajišťují proteiny SOCS (suppressors of cytokine signaling).

S ohledem na prioritní cytokinovou signalizaci v regulaci imunitní odpovědi a regulaci buněk hematopoetického systému byly mutace v Jak/STAT signální kaskádě studovány především u lymfoproliferativních onemocnění. Nejčastější poruchou je aktivací mutace V617F v Jak2 kináze vyskytující se převážně (>50 %) u nemocných s leukemiemi bez přestavby BCR/ABL.

Nedávné studie však ukazují, že poruchy regulace Jak/STAT signální kaskády se nacházejí i u solidních nádorů. Cytokiny (např. prolaktin nebo IL-6) jsou známými regulátory růstu a diferenciace buněk prsní žlázy a ovaria. Ve vzorcích karcinomu ovaria bylo zjištěno, že aktivace a translokace STAT3 do buněčného jádra je známkou nepříznivé prognózy onemocnění a výskyt fosforylované formy STAT3 koreluje s expresí HER2/neu, EGFR, a Ki-67. Ve studii analyzující hypermetylace SOCS (negativních regulátorů Jak/STAT kaskády) ve vzorcích karcinomu ovaria a prsu byla hypermetylace a snížená exprese SOCS1 a SOCS2 (ale nikoliv SOCS3) nalezena u 23 % karcinomů prsu a 14 % karcinomů ovaria. Izolovaná hypermetylace SOCS1 byla zaznamenána u 9 % karcinomů prsu. V normálních tkáních se hypermetylace SOCS genů nevyskytují. Předpokládá se, že hypermetylacemi snížená exprese SOCS genů se může podílet na zvýšené citlivosti transformovaných buněk prsu a ovaria na proonkogenní účinky cytokinů.

■ Důsledky promitotické signalizace a zahájení buněčného cyklu

V předchozím textu jsme ukázali, že popsané signální cesty aktivují řadu transkripčních faktorů ovlivňujících genovou expresi v buněčném jádře. Prvotními geny exprimovanými v důsledku mitogenní stimulace na počátku buněčného cyklu v časně G1 fázi jsou tzv. **geny časně odpovědi**. Tyto geny kódují specifické transkripční faktory sloužící pro následné řízení genové exprese vlastních regulátorů buněčného cyklu (označované jako tzv. **geny s oddálenou odpovědí**). Typickým příkladem transkripčních faktorů ze skupiny genů časně odpovědi jsou proteiny z rodiny **E2F**, které řídí genovou expresi klíčových regulátorů buněčného cyklu – cyklínů.

Cyklíny jsou transientně exprimované regulační proteiny vytvářející katalyticky aktivní komplexy s **cyklin dependentními kinázami (Cdk)**. Bez navázaného cyklinu je samostatná Cdk neaktivní. Plné kinázové aktivity dosahují komplexy cyklin-Cdk po aktivací fosforylaci zprostředkované cyklin akti-

Tab. 1.1 Přehled komplexů cyklinů a Cdk, které řídí průběh jednotlivých fází buněčného cyklu. Celkem bylo charakterizováno 10 Cdk a osm typů cyklinů (A–H). Některé z nich se podílejí přímo na řízení buněčného cyklu, jiné usměrňují řadu dalších dějů.

komplex cyklin-Cdk		regulace fáze buněčného cyklu (poznámka)
katalytická podjednotka	regulační podjednotka	
Cdk4	cyklin D	G1
Cdk6	cyklin D	G1
Cdk2	cyklin E	G1-S
Cdk2	cyklin A	S
Cdk1	cyklin A	G2
Cdk1	cyklin B	M
Cdk7	cyklin H	CAK
Cdk3	?	podobná aktivita jako Cdk2 v některých tkáních
Cdk8	cyklin C	regulace RNA polymerázy II
Cdk5	?	alternativa Cdk2 v nervovém systému; fosforylace strukturálních proteinů
Cdk9	?	patrně regulace transkripce
Cdk10	?	kontrola přechodu G2-M; exprese v plně maturovaných buňkách; tumor supresorová funkce?

vačními kinázami (CAK). Komplexy cyklinů s cyklin dependentními kinázami se v průběhu buněčného cyklu mohou vyskytovat ve dvou stavech (aktivní a neaktivní) v závislosti na fosforylaci. Ovlivnění aktivity komplexů cyklinů a Cdk fosforylací/defosforylací zprostředkovanou kinázami/fosfatázami má zásadní vliv na regulaci buněčného cyklu (tab. 1.1). Cykliny se jako regulační podjednotky podílejí na rozpoznávání cílových substrátů, jež jsou fosforylovány serin-treonin kinázovou aktivitou komplexů **cyklin-Cdk**. Substrátem těchto komplexů je řada proteinů podílejících se na řízení buněčného cyklu, replikaci genomové DNA a růstu buňky v průběhu buněčného cyklu. Fosforylace proteinů katalyzovaná komplexy cyklin-Cdk ovlivňuje jejich aktivitu obousměrně (ve smyslu aktivace i inaktivace).

Kromě transkripční aktivace genů pro cykliny je intracelulární koncentrace cyklinů (a tím i aktivita komplexů cyklin-Cdk) regulována díky rychlému odbourávání cyklinů zprostředkovanému jejich ubiquitinizací a následnou degradací v proteazomech. Řízená exprese a následná degradace cyklinů v jednotlivých fázích buněčného cyklu je základním biochemickým regulačním mechanismem jeho řízení.

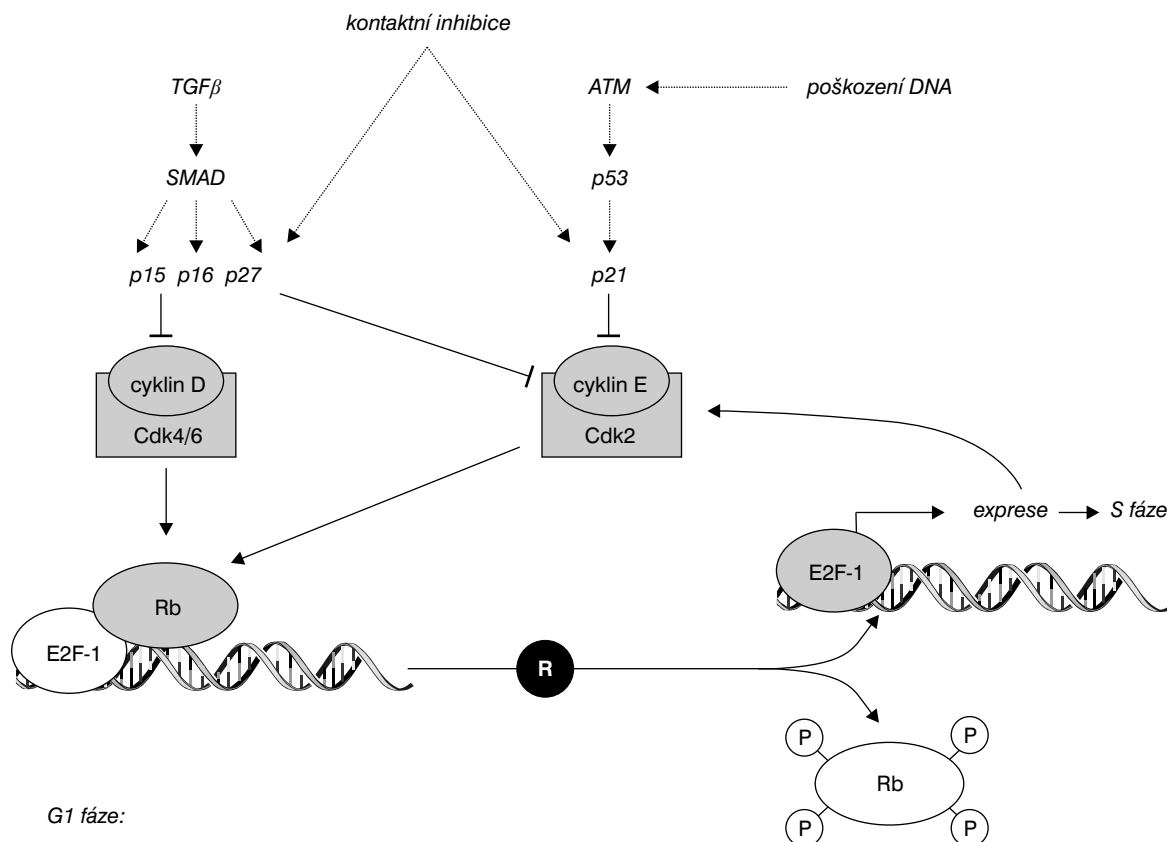
Negativní regulaci katalyticky aktivních komplexů cyklinů-Cdk zajišťují **inhibitory komplexů cyklinů-Cdk (CKI)**. Proteinové produkty těchto tumor supresorových genů spadají do dvou proteinových rodin: **INK4A** (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}) a **KIP/CIP** (p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}). Exprese těchto inhibitorů je indukována řadou dějů interferujících s buněčným cyklem v jeho průběhu

(porušení genomové DNA, selhání replikace DNA, hyperaktivace promitotických signálů, nedostatek substrátů nebo kontaktní inhibice; obr. 1.9). Molekuly CKI jsou v důsledku těchto negativních vlivů aktivovány zvýšením genové exprese řízené transkripčními faktory p53 a SMAD (SMA- and MAD-related proteins). Inhibice komplexů cyklin-Cdk způsobuje rychlou zástavu buněčného cyklu umožňující reparaci vzniklých defektů. Při selhání reparačních pochodů jsou aktivovány apoptotické mechanismy iniciující řízenou destrukci poškozené buňky (kap. 1.2).

Zatímco poruchy exprese a mutace v genech pro Cdk se vyskytují poměrně zřídka, u řady nádorových onemocnění nacházíme hyperexpresi cyklinů a poruchy aktivace CKI.

1.1.2 G1 fáze buněčného cyklu a její restriční bod

V úvodní části G1 fáze buněčného cyklu dochází vlivem zvýšené exprese transkripčních faktorů E2F k zahájení syntézy **cyklinů D** (D1–D3). Cykliny D vytvářejí komplexy s **Cdk4** nebo **Cdk6**. Důležitým substrátem těchto komplexů je produkt tumor supresorového genu – **protein Rb** (retinoblastomový protein). Rb protein je silný negativní regulátor buněčného cyklu, jehož aktivita spočívá v navázání řady intracelulárních bílkovin, především transkripčních faktorů z rodiny E2F. Dokud není Rb protein inaktivován fosforylací, váže transkripční faktory E2F, čímž znemožňuje jejich plné uplatnění v pozitivní re-



Obr. 1.9 Schéma iniciální fáze buněčného cyklu a překonání restričního bodu (R) v G1 fázi. Biochemickou podstatou překonání restričního bodu v G1 fázi, která umožní další průběh buněčného cyklu, je inaktivace Rb proteinu fosforylací katalyzovanou komplexem cyklin D-Cdk4/6 a cyklin E-Cdk2. Tyto komplexy mohou být negativně regulovány CKI aktivovanými při poškození genomové DNA (obr. 1.12), v důsledku kontaktní inhibice, nebo stimulací TGFβ (transforming growth factor β). TGFβ je negativní růstový faktor a stimulací jeho receptoru dochází k aktivaci transkripčního faktoru SMAD. SMAD aktivuje expresi CKI (p15, p16 a p27), které inhibují komplexy cyklin D-Cdk4/6 a cyklin E-Cdk2.

gulaci genové exprese cyklinů. Účinkem kinázové aktivity komplexu cyklinu D-Cdk4/6 dochází k fosforylaci Rb, v jejímž důsledku fosforylovaný Rb protein (pRb) uvolňuje navázané transkripční faktory E2F. Uvolněné E2F proteiny iniciují masivní expresi cyklinu D a následně i **cyklinu E**, který v komplexu s Cdk2 dále hyperfosforyluje pRb (obr. 1.9).

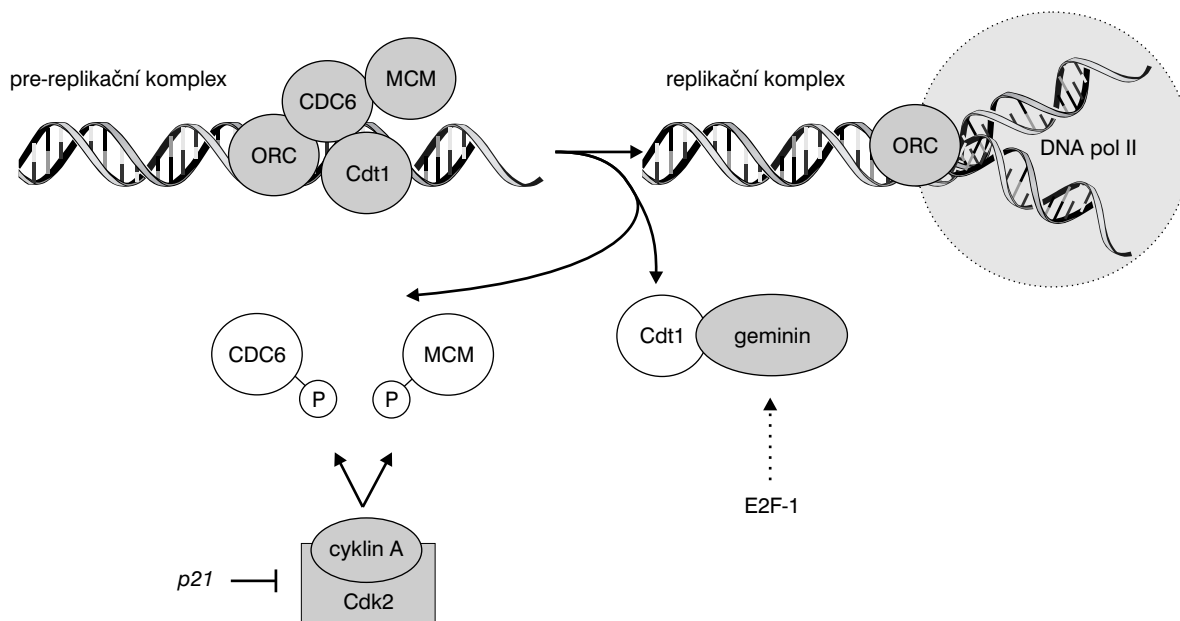
Transkripční faktory E2F řídí expresi i dalších genů nezbytných pro normální průběh buněčného cyklu (DNA polymerázy, geny pro enzymy katalyzující syntézu nukleotidů (např. dihydrofolátreduktáza, tymidylátsyntetáza, tymidinkináza).

Fosforylace Rb je tedy nezbytným krokem pro další průběh buněčného cyklu a je i biochemickou podstatou **restričního bodu v G1 fázi**. Po uvolnění E2F a překonání kontrolního bodu ve fázi G1 dochází k syntéze regulačních faktorů a enzymů zodpovědných za syntézu deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs) a replikaci DNA v S fázi, do které vstupuje buňka pod vlivem komplexu cyklinu E-Cdk2. Restriční

bod v G1 fázi je mimořádně důležitým místem buněčného cyklu. Do okamžiku jeho překonání může v buňce dojít k zastavení buněčného cyklu a buňka se může vrátit zpět do klidového stadia G0. Po překonání restričního bodu v G1 fázi však návrat do G0 fáze již není možný a v cílové buňce se buď dokončí buněčné dělení, nebo v případě jeho neúspěchu buňka zanikne procesem apoptózy.

Rozhodující postavení restričního bodu v G1 fázi je patrné i z toho, že u nádorových onemocnění jsou velmi často alterovány geny jeho regulátorů. Mezi nejčastější poruchy patří mutace a hyperexprese protoonkogenů pro cykliny D (geny *CCND1-3*) a E (geny *CCNE1-2*) a inaktivace tumor supresorových genů *p53*, *Rb*, genů pro inhibitory komplexů cyklin-Cdk *CIP/KIP* a *ARF*. Tyto genetické alterace umožňují v cílových buňkách proliferaci relativně nezávislou na přítomnosti mitogenních faktorů.

Zvýšená exprese transkripčního faktoru E2F-1 byla v jedné ze studií zaznamenána u 33/72 (46 %)



Obr. 1.10 Schéma zahájení replikace v S fázi a význam licenčních faktorů. Zahájení replikace v S fázi je podmíněno vznikem pre-replicative komplexu. Základ tohoto komplexu vzniká v G1 fázi asociací proteinů ORC a licenčních faktorů CDC, Cdt1, které na počátku S fáze doplňuje protein MCM exprimovaný pod vlivem transkripčního faktoru E2F-1. Na pre-replicative komplex nasedá DNA-dependentní DNA polymeráza za současného uvolnění licenčních faktorů. Uvolněné licenční faktory jsou bezprostředně inaktivovány, aby se předešlo rereplikaci již replikovaných úseků DNA: aktivita Cdt1 je inhibována gemininem syntetizovaným v průběhu S fáze, zatímco CDC6 a MCM jsou inhibovány fosforylací komplexem cyklinu A/Cdk2 a následně translokovány do cytoplazmy. Inhibice komplexu cyklinu A-Cdk2 proteinem p21^{WAF1/CIP1} je důležitým nástrojem regulace oprav chyb DNA vzniklých v průběhu replikace.

epiteliálních karcinomů ovaria, kde overexpres E2F-1 korelovala se stadiem podle FIGO, histologickým gradingem a mitotickým indexem. Stanovení exprese E2F-1 tak může být užitečným prognostickým znakem.

Cykliny skupiny D (D1–D3) jsou exprimovány různě v jednotlivých tkáních. Zvýšení exprese cyklinu D1 je jednou z nejčastějších charakteristik buněk karcinomu prsu, kde k němu dochází nejčastěji v důsledku amplifikace genu pro cyklin D. Amplifikace *CCND1* koreluje s negativitou exprese estrogenního receptoru a pozitivitou HER2/neu a je negativním prognostickým faktorem. U nemocných s karcinomem ovaria byla doposud zvýšená exprese cyklinu D1 studována spíše okrajově, i když pilotní práce ukazují, že je přítomna u více než 40 % nemocných s epiteliálními ovariálními karcinomy. Nižší četnosti (kolem 24 %) dosahuje hyperexpres cyklinu D1 u pacientek s karcinomem děložního hrdla.

Zvýšení exprese cyklinu E je nezávislou negativní prognostickou známkou celkového přežití u pacientek s karcinomem prsu. U pacientek s karcinomem prsu i ovaria je amplifikace genu cyklinu E častou genetickou alterací. Její detekce u pacientek s karcinomem ovaria pomocí kvantitativní PCR byla

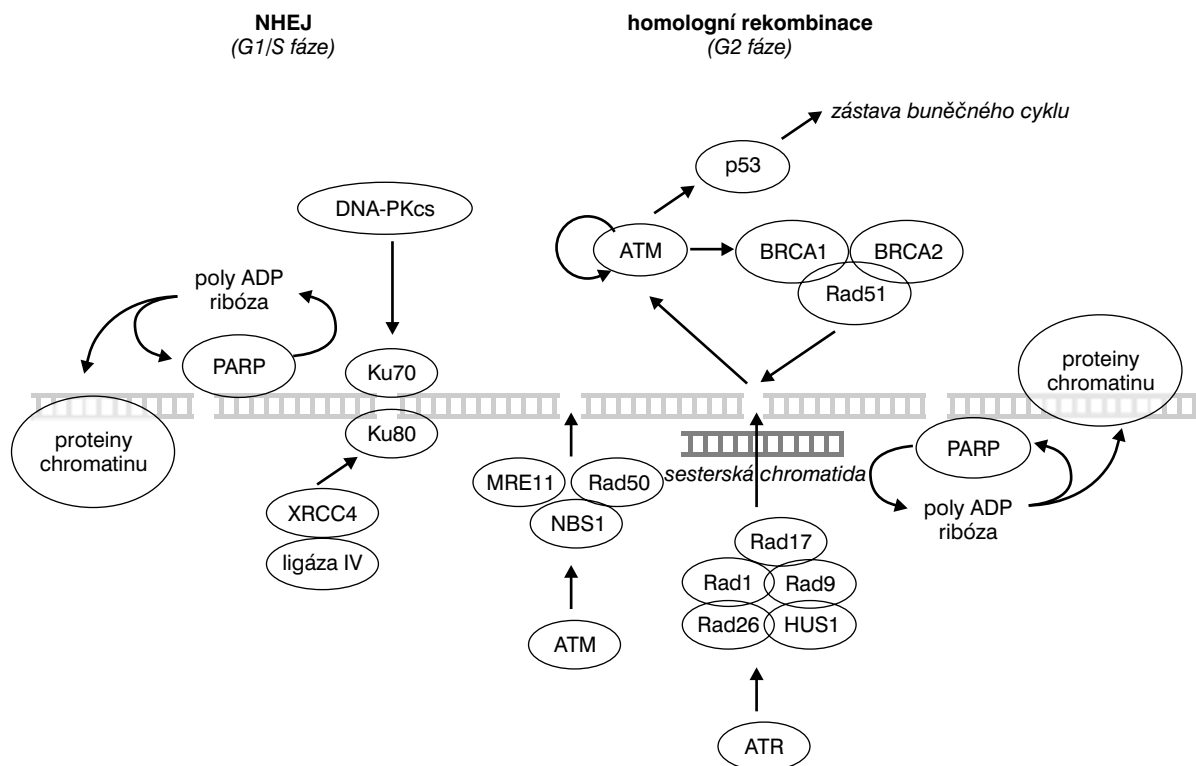
s úspěchem použita pro časnou diagnostiku intraperitoneální diseminace. Ve srovnání s klasickou cytologickou diagnostikou dosahovalo stanovení cyklinu E pomocí kvantitativní PCR výrazně vyšší senzitivity (95,6 % v. 73,9 %).

Nejčastější alterací proteinu Rb u gynekologických malignit je jeho inaktivace proteinem E7 lidského papilomaviru (HPV) u karcinomů děložního hrdla, kde se tato infekce vyskytuje téměř ve všech případech onemocnění (kap. 2.2.3).

1.1.3 S fáze: replikace DNA

Vstup do S fáze buněčného cyklu řídí komplex **cyklin E-Cdk2**. Zásadním úkolem S fáze je replikace genomové DNA. S ohledem na vznik dvou rovnocenných plně funkčních dceřiných buněk je podstatné i intenzivní zvyšování počtu buněčných struktur i organel a duplikace centriolů jako kotvicích bodů mitotického vřetenka.

Převážná část S fáze je tedy spojena se vznikem a regulací replikačního komplexu a regulací DNA reparačních dějů. Zatímco S fáze končí kompletní replikací genomové DNA, reparační pochody pokraču-

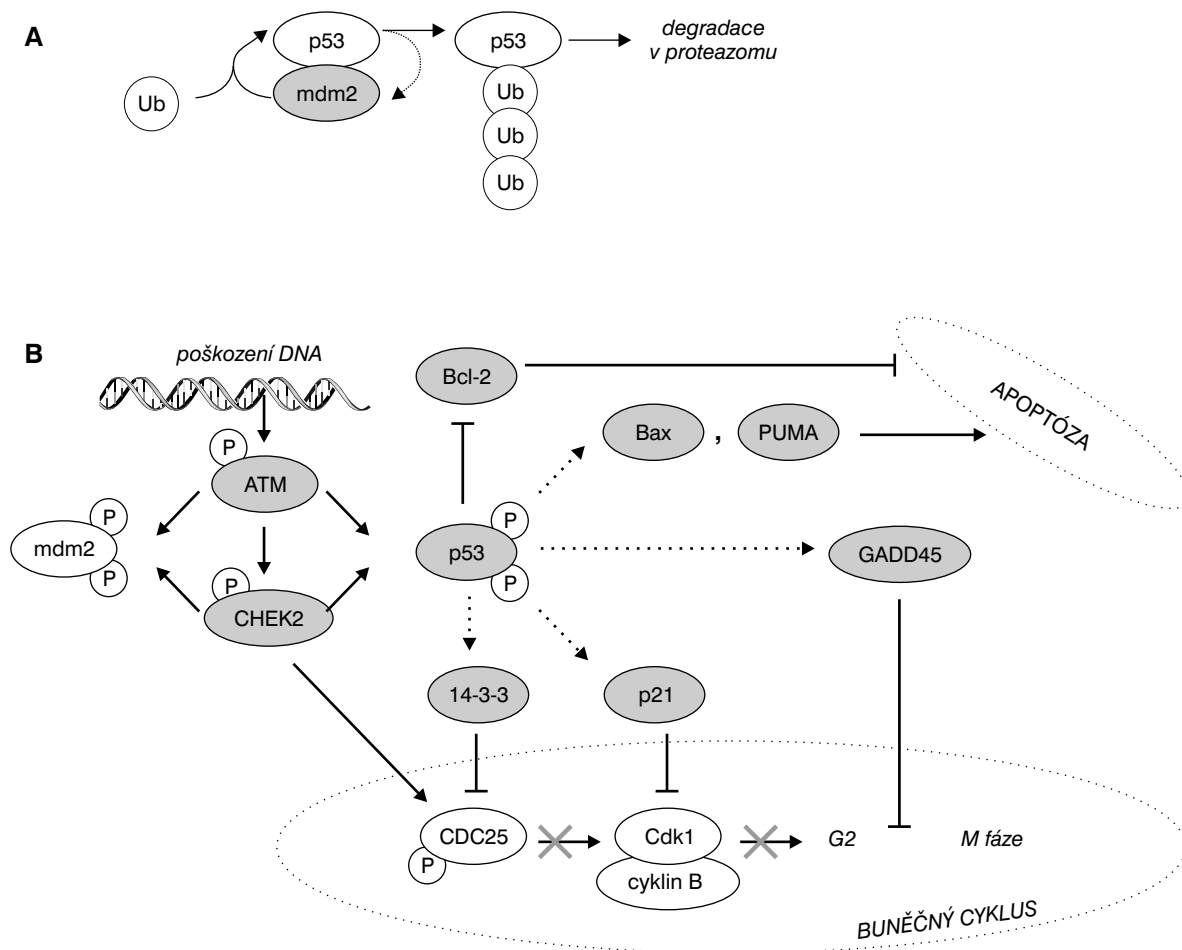


Obr. 1.11 Schéma reparačních mechanismů dvouřetězcových zlomů DNA v průběhu buněčného cyklu. V G1/S fázi se uplatňuje především reparace na základě nehomologního spojení přerušených řetězců (non homologous end joining; NHEJ), zatímco v G2 fázi je hlavním reparačním postupem homologní rekombinace (HR). V obou procesech se uplatňuje enzym PARP (poly(ADP-ribose) polymerase), který přenáší ribozylové zbytky na řadu proteinů, především proteiny chromatinu (histony H1, H2A_x) a topoizomerázy. Polyribosylace těchto proteinů ovlivňuje jejich aktivitu v reparačních dějích. Katalytické centrum NHEJ tvoří XRCC4, DNA ligáza IV a DNA dependentní proteinkinázový komplex složený z heterodimeru proteinů Ku70 (XRCC6)/Ku80 (XRCC5) vázajících se na přerušené vlákno DNA a katalytická podjednotka DNA dependentní serin/treoninové proteinkinázy (DNA-PKcs). Na zahájení HR má kritický vliv autofosforylace kinázy ATM, která následně fosforyluje MRN komplex (MRE11, Rad50, NBS1) vytvářející základ reparační multiproteinové platformy, na jejímž uspořádání se podílejí i proteiny BRCA1 a BRCA2. Vlastní reparační mechanismus zahrnující syntézu vláknů DNA podle templátu sesterské chromatidy je zprostředkován asociací skupiny Rad proteinů (Rad1, 2, 9, 17, HUS1) (podle Lavin et al., 2002)

ji i v následující G2 fázi. Na genomové instabilitě nádorových buněk se podílejí jak poruchy v regulaci replikace, tak selhání reparace genomové DNA. S ohledem na rozsáhlost genomu (3×10^9 bp) a rychlost replikace ($1-3 \times 10^3$ bází za sekundu) probíhá syntéza DNA z mnoha míst současně. Pro vznik dvou genomově identických buněk je však nezbytné, aby replikace proběhla ve všech částech genomu právě jednou (přesné zdvojení genetické informace). Tento problém je v buňce vyřešen označením míst počátku replikace specifickými proteinovými komplexy, které jen jedenkrát „licencují“ navázání replikačního aparátu DNA polymerázy.

Replikační počátky jsou vymezeny komplexem proteinů asociujících k DNA v průběhu G1 fáze.

Komplex vytváří proteiny **ORC** (origin recognition complex) asociující s DNA, společně s tzv. **licenčními faktory** – proteinem CDC6 (cell cycle controller 6, též CDC18L), Cdt1 a MCM (minichromosome maintenance). Takto vzniklý tzv. prereplikační komplex umožňuje navázání DNA polymerázy (obr. 1.10). DNA polymeráza vstupuje do replikačního komplexu výměnou za uvolňující se licenční faktory a zahajuje replikaci DNA. Schopnost vazby licenčních faktorů na ORC je po jejich uvolnění při replikaci inhibována do konce probíhajícího buněčného cyklu, aby nemohlo dojít k označení již replikovaného úseku DNA.



Obr. 1.12 Schéma p53-dependentní inhibice buněčného cyklu v kontrolním bodě G2 fáze. A. Protein p53 je trvale expri-mován, avšak jeho biologický poločas je velmi krátký v důsledku zpětnovazebné inaktivace mdm2 proteinem. Mdm2 s ubikvitinligázovou aktivitou navazuje molekuly ubiquitinu na p53, který je následně degradován v proteazomu. Vzhle-dem k tomu, že p53 je transkripčním faktorem – mimo jiné zvyšujícím expresi mdm2 – je poměr mezi mdm2 a p53 za fyziologických podmínek vyrovnaný. B. Při poškození genomové DNA kinázy ATM i CHEK2 fosforylují proteiny mdm2 i p53. Tato fosforylace inhibuje ubiquitinylaci p53 zprostředkovanou mdm2. V důsledku toho dochází k rychlé akumulaci p53, který transaktivuje geny pro p21^{WAF1/CIP1}, GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible gene) a 14-3-3 protei-ny. Všechny tyto proteiny se různými mechanismy podílejí na zástavě buněčného cyklu v restričním bodu G2 fáze: CHEK2 kinázou fosforylovaná CDC25 fosfatáza je inhibována asociací s 14-3-3 proteinem (indukovaným p53). CDC25 tak nemůže aktivovat komplex cyklinu B-Cdk2 (MPF) nezbytný pro regulaci úvodní části mitózy (kap. 1.1.5). Tento kom-plex je navíc přímo inhibován p21. Protein GADD45 způsobuje separaci cyklinu B z komplexu s Cdk1. Zástava buněč-ného cyklu dovoluje reparačním mechanismům opravit poškození v DNA. Při jejich selhání protein p53 aktivuje proces apoptózy – je negativním regulátorem exprese Bcl-2 a transaktivuje proapoptotické proteiny Bax a PUMA (kap. 1.2.4).

1.1.4 G2 fáze: kontrola integrity DNA a příprava na M fázi

Po dokončení replikace DNA v S fázi vstupuje buňka do G2 fáze. V průběhu G2 fáze pokračuje kontrola integrity genomové DNA. Při přítomnosti poruch DNA, především dvouřetězcových zlomů DNA, dochází k aktivaci reparačních enzymů a zástavě bu- něčného cyklu v **G2 restričním bodě**.

Do dnešního dne byla již charakterizována řada onemocnění způsobených alteracemi reparačních ge-nů, které u nositelů mutací predisponují dědičně ke vzniku (hereditárních) nádorů (kap. 3). Rozpoznání poruch v DNA je umožněno díky **proteinu ATM** (ataxia-telangiectasia mutated) a jeho homologu **ATR** (ataxia-telangiectasia and Rad3 related). ATM/ATR kinázy přímo, nebo prostřednictvím akti-vace kináz CHEK1 a CHEK2 (check point kinase)

fosforylují řadu proteinů, které se podílejí na zástavě buněčného cyklu a reparaci DNA (obr. 1.11).

Hlavním substrátem kinázy ATM, integrujícím reparaci DNA se zástavou buněčného cyklu, je tumor supresorový **protein p53**. Protein p53 je transkripční faktor, který aktivuje expresi řady genů, jejichž genové produkty způsobují zástavu buněčného cyklu (např. *p21^{WAF1/CIP1}*, *GADD45*, *14-3-3σ*, obr. 1.12) a při selhání DNA reparačních dějů aktivují apoptózu (např. *Bax*, *PUMA*; kap. 1.2.3).

V průběhu G2 fáze dochází ke zvýšení exprese cyklinu B a vytvoření komplexu s Cdk1. Komplex cyklin B-Cdk1 je fosforylován (v různých buněčných kompartmentech kinázami, např. *wee1*, *CAK*) a do konce G2 fáze je v neaktivním (hyperfosforylovaném) stavu zadržován v cytoplasmě.

Dědičné mutace obou alel tumor supresorového genu *ATM* jsou příčinou onemocnění označovaného jako syndrom **ataxie-telangietázie** (A-T) u nositelů mutací, které je charakterizované mozečkovou ataxií a výrazným sklonem ke vzniku nádorových onemocnění v časně dospělosti. Podobný fenotypový projev mají tzv. A-T-like syndromy vyvolané dědičnými mutacemi v dalších reparačních genech (např. *Mre11*). Mezi typické A-T nádory patří i karcinom prsu. Podíl nositelství monoalelické mutace v *ATM* na vzniku karcinomu prsu a hyperrádiosenzitivitu je však doposud sporný. Hereditární mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou zodpovědné za syndrom hereditárních karcinomů prsu a ovarií (kap. 3.2). Dědičné alterace v *NBS1* (nibrin) jsou příčinou **Nijmegen breakage syndromu** charakterizovaného chromozomální instabilitou, mikrocefalií, růstovou retardací, imunodeficiencí a také predispozicí ke vzniku nádorů.

Reparační pochody DNA zahrnují i rozsáhlou skupinu genů, jejichž proteinové produkty katalyzují opravy nesprávného párování bází v DNA (mismatch repair system; geny *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*). Dědičné mutace těchto genů se vyskytují u pacientů s hereditárním nepolypózním karcinomem kolorekta (HNPCC). Toto onemocnění s typickým vysokým rizikem vzniku kolorektálních nádorů se rovněž vyznačuje významným zvýšením rizika vzniku karcinomu endometria (kap. 3.3).

Porucha genu *p53* je pravděpodobně nejčastější molekulárněbiologickou událostí v maligních nádorech. S jeho mutacemi se setkáváme přibližně u poloviny všech nádorových onemocnění. Přítomnost hereditární mutace *p53* – Li-Fraumeni syndrom – je vzácné dědičné nádorové onemocnění s výrazným sklonem ke vzniku nádorů v časném věku u nositelů

mutace (sarkomy, lymfomy, leukemie, nádory nadledvin, karcinomy prsu; kap. 3.1).

1.1.5 Mitóza (M fáze)

Mitóza je morfologicky nejpestřejší částí buněčného cyklu. Probíhá ve čtyřech fázích (profázi, metafázi, anafázi a telofázi) charakterizovaných přesuny genetického materiálu. Na počátku mitózy dochází k výrazné kondenzaci chromatinu, jejímž výsledkem je vznik pentlicovitých útvarů chromatid nezbytných pro symetrické rozdělení genomové DNA do dceřiných buněk.

Na biochemické signální úrovni můžeme charakterizovat dvě hlavní části mitózy: první zahrnuje řízení profáze a metafáze, druhá je zodpovědná za regulaci anafáze s telofází. Kritickým bodem je tedy rozhraní mezi metafází a anafází. Řídícími jednotkami obou těchto částí mitózy jsou multiproteinové komplexy. První část (profáze a metafáze) je pod vlivem fosforylační aktivity **MPF** (mitosis promoting factor), který je aktivní podobou komplexu cyklin B-Cdk1. Aktivita MPF je ukončena na přechodu mezi metafází a anafází proteolytickou degradací cyklinu B v proteazomu. Proteazomální destrukce MPF je zprostředkována ubikvitinligázovou aktivitou **APC** (anaphase-promoting complex), nazývaným též **cyklozom**.

Počátek M fáze je charakterizován přesunem komplexu cyklin B-Cdk1 do buněčného jádra. K translokaci tohoto komplexu dochází v důsledku jeho defosforylace účinkem **fosfatázy CDC25**. Aktivní MPF v průběhu profáze a metafáze fosforyluje řadu substrátů, mezi které patří například komponenty mikrotubulárního aparátu zodpovědné za tvorbu dělicího vřeténka nebo molekuly laminu tvořící jadernou laminu, po jejichž fosforylaci dochází k rozpadu jaderného obalu. První polovina mitózy končí ukotvením mikrotubulů dělicího vřeténka do oblastí centromer sesterských chromatid všech chromozomů uspořádaných v rovníkové oblasti buňky. Pro tento pochod je důležitá fosforylace centromerních proteinů (CENP) **aurora kinázami** (AURKA/STK15 a AURKB/STK12), jejichž aberantní exprese je detekovatelná u řady nádorových onemocnění a podílí se na vzniku aneuploidií v nádorových buňkách. Podobně jako jaderný obal se na počátku mitózy v důsledku fosforylaci MPF rozpadají i cisternální systémy Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula.

Zahájení druhé poloviny mitózy je podmíněno aktivací dalšího proteinového komplexu **APC**. APC je multiproteinový komplex s E3 ubikvitinligázovou

aktivitou. Jeho hlavní funkcí je degradace inhibitorů anafáze, mezi které patří MPF. Kritickými substráty, které jsou degradovány v důsledku ubiquitinylace zprostředkované APC, jsou komplexy cyklin-Cdk. Proto se APC označuje rovněž jako cyklozom.

Rozpadem komplexů kohezinů, proteinů spojujících sesterské chromatidy, dochází k separaci chromatid a následná depolymerace vláken dělicích vřetének působí tažení chromatid k pólům buňky. Teprve po segregaci sesterských chromatid a jejich transportu k buněčným pólům může být aktivována závěrečná fáze mitózy – cytokineze. K vlastnímu rozdělení buňky dochází za situace, kdy se genetický materiál nachází v polárních oblastech dělicí se buňky a je již obalen jadernou membránou a zpětně se regeneruje endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát.

V rámci konečných fází mitózy dochází rovněž k aktivaci specifických fosfatáz, jejichž účinkem je

defosforylován protein Rb (kap. 1.1.2). Defosforylovaná (aktivní) forma Rb proteinu rychle asociuje se zbývajícími transkripčními faktory E2F, a tím se podílí na inhibici okamžitého vstupu do dalšího buněčného cyklu v nově vzniklých dceřiných buňkách.

Licenční faktory a jejich regulátory (kap. 1.1.3) a aurora kinázy mají důležitý vliv na udržení genomové stability. Ve studii u pacientek s karcinomem ovaria byla sledována exprese proliferčního markeru Ki67, a proteinů MCM2, gemininu a aurora kináz A a B s ohledem na DNA ploiditu nádorových buněk a klinický obraz. Všechny hodnocené faktory signifikantně korelovaly s gradíngem onemocnění, exprese aurorakinázy A predikovala interval bez onemocnění (DFS) ($p = 0,03$).

V současnosti je ve fázi klinických testů pro léčbu nádorových onemocnění řada inhibitorů aurora kináz (např. VX-680, PHA-680632).

1.2 Apoptóza

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je aktivní forma zániku jednotlivých buněk nebo buněčných populací. Společně s mitózou, jako svým protipólem, je apoptóza fyziologickým dějem nutným pro udržení tkáňové homeostázy. Její aktivita je nepostradatelná pro formování tkání a orgánů v období embryogeneze. V postnatálním vývoji spočívá zásadní úloha apoptózy v regulaci populací imunokompetentních buněk, eliminaci virově infikovaných a nádorově transformovaných buněk a likvidaci buněk nepotřebných. Snížená schopnost indukce apoptózy je charakteristickou známkou všech nádorových onemocnění. Vzhledem k tomu, že účinek většiny typů protinádorové terapie je zprostředkován aktivací apoptózy v nádorových buňkách, odráží schopnost její aktivace i senzitivitu k protinádorové léčbě.

1.2.1 Průběh

Průběh apoptózy charakterizuje jednotný morfologický obraz, při němž postupně dochází ke ztrátě mezibuněčných kontaktů, změnám buněčného jádra a měchýřkovitému „pučení“ cytoplazmatické membrány vyúsťujícímu v konečný rozpad buňky za vzniku apoptotických tělísek. Na rozdíl od nekrózy, při které dochází k edematóznímu zduření buňky se vznikem defektů v cytoplazmatické membráně, kterými se do intersticiálního prostoru dostává cytoplazmatický obsah buňky indukující zánětlivou odpo-

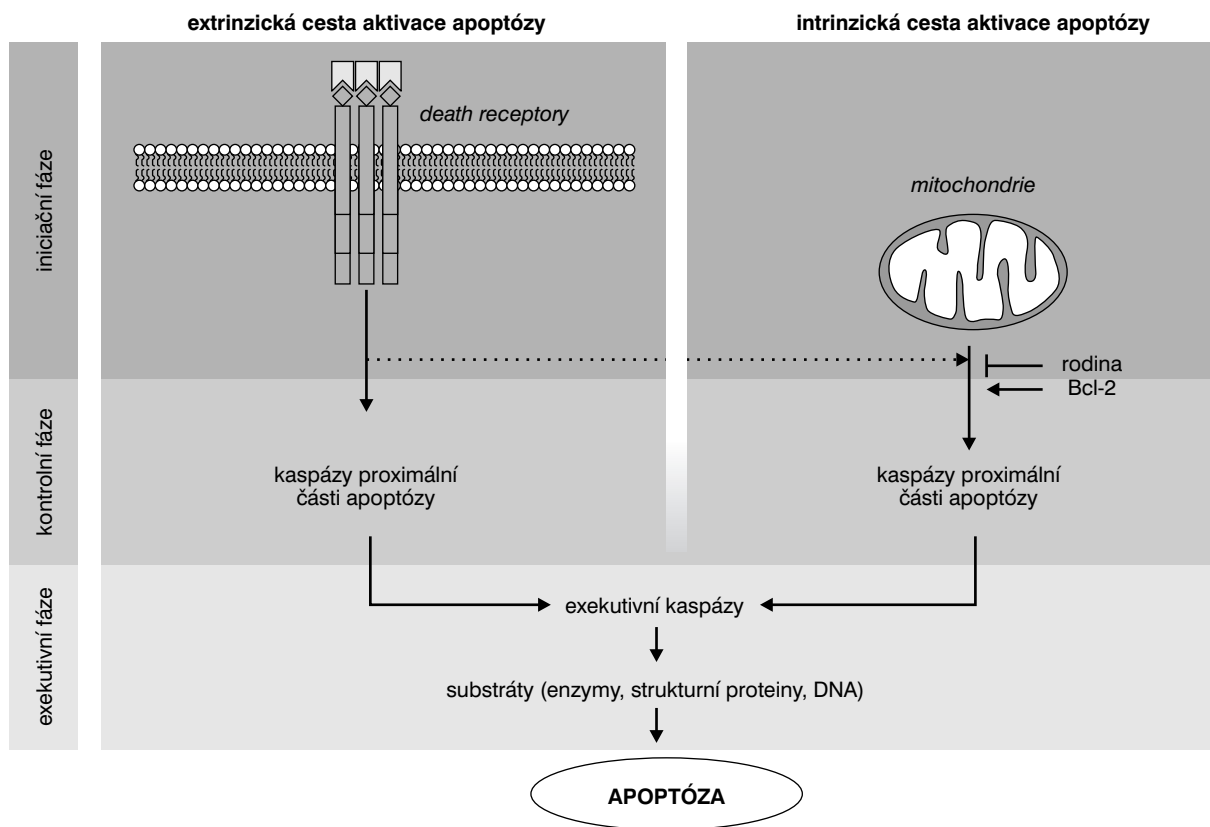
věď, při prosté apoptóze jsou apoptotická tělíska (fragmenty zaniknuvší buňky obalené cytoplazmatickou membránou) endocytována okolními buňkami tkáně a nezpůsobují tak rozvoj imunitní reakce. Při rozsáhlé apoptóze (např. vlivem ionizujícího záření) však může dojít k překročení fagocytární kapacity a apoptotická tělíska se rozpadají a indukují zánět.

Apoptóza vyžaduje přítomnost řady specializovaných výkonných a regulačních molekul zúčastněných na třech úrovních průběhu apoptózy: v **iniciační, kontrolní a exekutivní fázi** (obr. 1.13). Iniciační fáze apoptózy, v jejímž průběhu vznikají iniciační apoptotické signální komplexy, je velmi heterogenní. V kontrolní fázi dochází k integraci proapoptotických a protiapoptotických signálů, které jsou ovlivňovány i dalšími intracelulárními signálními cestami. V případě převahy proapoptotické signalizace vstupuje apoptóza do poslední – exekutivní fáze. Přechodem do exekutivní fáze se apoptóza stává nevratným dějem končícím rozpadem buňky.

Biochemickou podstatou apoptózy je série regulovaných proteolytických štěpení intracelulárních proteinů zprostředkovaná výkonnými apoptotickými proteolytickými enzymy – kaspázami.

Přestože apoptóza je vyvolávána řadou podnětů, aktivační děje probíhají dvěma hlavními směry:

1. **Extrinzickou (zevní) cestou**, zahajovanou vytvořením apoptotického aktivačního komplexu ze stimulovaných receptorů na cytoplazmatické



Obr. 1.13 Schéma hlavních aktivačních cest a fází apoptózy. Extrinzickou cestou je indukována apoptóza působením imunokompetentních buněk prostřednictvím stimulace death receptorů. Pro aktivaci intrinzické cesty apoptózy je rozhodující permeabilita zevní mitochondriální membrány, kterou ovlivňuje přítomnost proteinů Bcl-2 rodiny. Obě cesty vedou k aktivaci kaspáz úvodní části apoptózy, jejichž společnými substráty jsou exekutivní kaspázy. Exekutivní kaspázy proteolyticky štěpí intracelulární proteiny, v důsledku čehož nastává rozpad buňky. Při aktivaci apoptózy extrinzickou cestou je v řadě případů nezbytné zesílení apoptotického signálu indukcí intrinzické cesty aktivace apoptózy.

membráně cílové buňky (tzv. death receptors). Tyto receptory jsou stimulovány imunokompetentními buňkami. Extrinzická cesta apoptózy je dominantním způsobem iniciace buněčné smrti u nádorově transformovaných a virem napadených buněk.

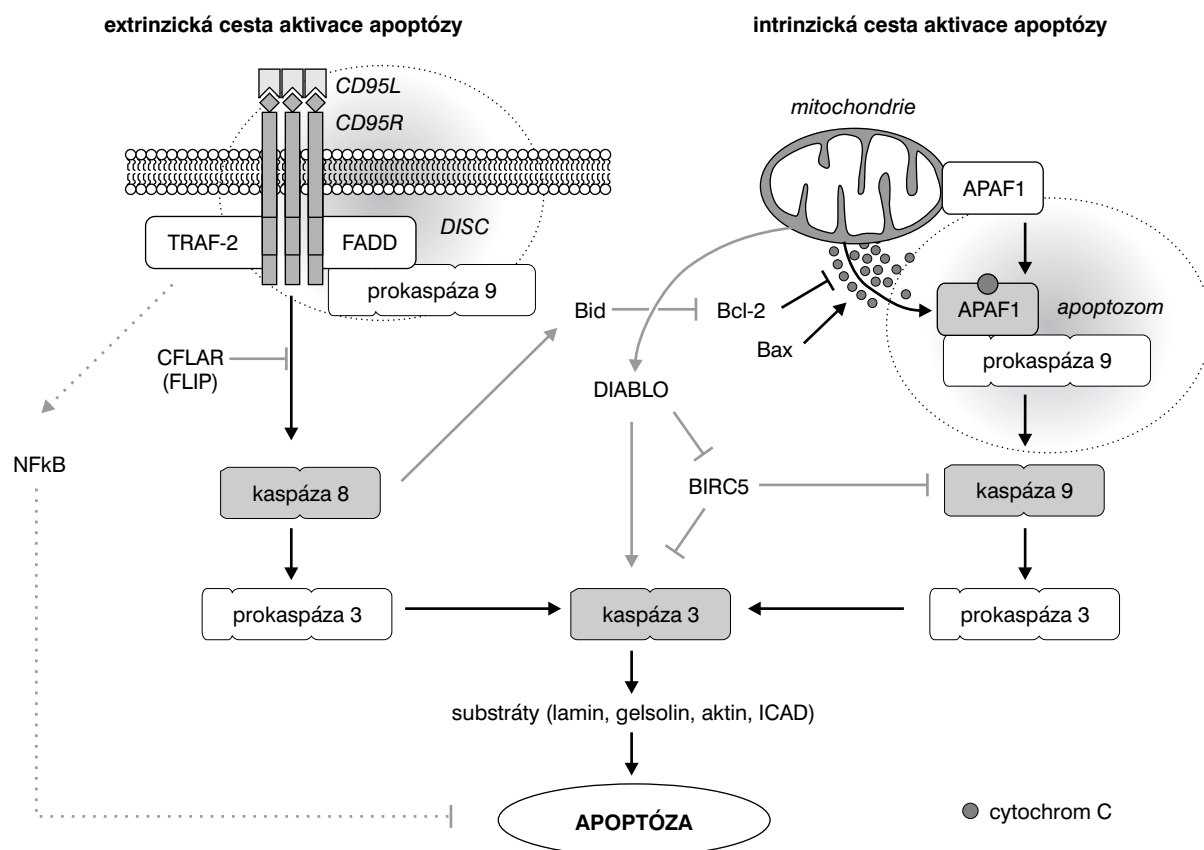
2. Nevratné poškození genomové DNA, významné alterace v regulaci buněčného cyklu nebo insuficientní energetický a substrátový metabolismus buňky vyvolává iniciaci apoptózy **intrinzickou (vnitřní) cestou**, ve které dominantní roli sehrává vznik apoptotických aktivačních komplexů na povrchu zevní membrány mitochondrií. Rozhodující vliv na indukcii těchto apoptotických aktivačních komplexů mají proteiny rodiny Bcl-2.

Extrinzická a intrinzická cesta aktivace apoptózy vyúsťují ve společnou exekutivní fázi probíhající za mohutné aktivace kaspáz. **Kaspázy** jsou proteolytické enzymy, které jsou v buňce trvale exprimovány

v podobě neaktivních zymogenů – **prokaspáz**. Kaspázy aktivované proapoptotickými komplexy v úvodní části apoptózy (kaspáza 8, 9) následně aktivují exekutivní kaspázy (např. kaspáza 3, 6) hydrolyticky štěpící strukturní a regulační buněčné proteiny. Na konci apoptózy je genomová DNA štěpena kaspázami aktivovanou endonukleázou **CAD** (caspase-activated DNase).

1.2.2 Extrinzická cesta aktivace

Extrinzická cesta aktivace apoptózy slouží pro iniciaci buněčné sebedestrukce zprostředkované efektorovými buňkami imunitního systému. Tyto buňky (cytotoxické T lymfocyty nebo NK buňky) exprimují na svém povrchu membránově vázané ligandy „receptorů smrti“ (death ligands). Zatímco ligandy smrti (death ligands) jsou molekuly exprimované pouze efektorovými buňkami imunitního systému, jejich



Obr. 1.14 Schematické znázornění procesu apoptózy. Na počátku aktivace apoptózy vznikají proapoptotické signální komplexy – DISC v extrinziční cestě a apoptozóm v intrinziční. Jejich výsledkem je uvolnění kaspáz 8 a 9 v úvodní části aktivace apoptózy. Tyto kaspázy aktivují exekutivní kaspázy apoptózy (kaspáza 3), jejichž substrátem jsou strukturní a regulační intracelulární proteiny. Jejich degradace vede k zániku buněk apoptózou. Regulace apoptózy (šedé linky) probíhá na řadě úrovní. V extrinziční cestě apoptózy je aktivace prokaspázy 9 inhibována její kompeticí s CFLAR (FLIP) ve vazbě do DISC. Spojení mezi extrinziční a intrinziční cestou apoptózy zprostředkovává Bid proteolyticky štěpený kaspázou 8. Hlavní aktivační krok intrinziční cesty apoptózy – uvolnění cytochromu c z mitochondrie – regulují proteiny rodiny Bcl-2 (inhibice Bcl-2, aktivace Bax). Kaspáza 9 vznikající z apoptozómu je negativně regulována BIRC-5 (survivinem), který je inhibován proteinem SMAC/DIABLO uvolňovaným z poškozených mitochondrií.

receptory jsou trvale exprimovány v cytoplasmatické membráně buněk všech tkání (včetně buněk imunitního systému). **Death receptor** patří do skupiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNFR). Spolu s ním je **CD95 receptor** (CD95R, nazývaný též FasR, Apo-1) hlavním proapoptotickým zástupcem této proteinové rodiny.

Po stimulaci svými ligandy (např. FASL/CDSL, TNF α) receptory smrti asociují na povrchové membráně za vzniku trimerních komplexů. V této podobě dochází ke změně jejich konformace, která v intracelulární doméně receptorů umožňuje navázání adaptorových proteinů (např. TRAF-2, FADD) určujících směřování další signalizace (obr. 1.14).

Navázáním prokaspázy 8 vzniká plně funkční apoptotický aktivační komplex **DISC** (death inducing signaling complex). Lokalizace prokaspázy 8

v DISC umožňuje její autokatalytickou aktivaci proteolýzou prokaspázové molekuly za vzniku aktivní, volné kaspázy 8, jejímž hlavním substrátem je prokaspáza 3 v exekutivní části apoptózy.

Bylo popsáno, že exprese FasR/CD95R se u karcinomu ovaria snižuje s narůstajícím gradingem onemocnění. Exprese ligandu FasL/CD95L není častým nálezem u karcinomu endometria, děložního hrdla ani ovaria, avšak vyskytuje se poměrně hojně u nemocných s pokročilým karcinomem prsu.

U nemocných s epiteliálním karcinomem ovaria se často nacházejí i defekty v regulaci exprese dalších death receptorů a jejich regulátorů. Snížená exprese DR4 (death receptor 4) nebo DR5 byla nalezena ve více než 20 % vzorků, zatímco zvýšená exprese CFLAR (FLIP) téměř u 40 %.

1.2.3 Intrinzická cesta aktivace

Aktivací intrinzické cesty apoptózy zanikají buňky poškozené, staré nebo nepotřebné, u kterých se funkční porucha projeví porušením mitochondriálního transmembránového potenciálu způsobujícího nedostatečnou tvorbu ATP. V buňkách s výraznou alterací genomové DNA v důsledku jejího poškození fyzikálními a chemickými vlivy (např. chemoterapií nebo radioterapií) nebo poruchou replikace genomové DNA je aktivace intrinzické cesty apoptózy indukována aktivní permeabilizací zevní mitochondriální membrány. V jejím důsledku dochází k uvolnění **cytochromu c** – hlavního iniciačního faktoru intrinzické cesty apoptózy. Cytochrom c je malý protein obsahující hem, normálně přítomný ve vnitřní mitochondriální membráně, kde slouží k přenosu elektronů v dýchacím řetězci. Z mitochondrie uvolněný cytochrom c aktivuje protein **APAF1** (apoptotic promoting activating factor 1), který změnou konformace ve své molekule je schopen následně vázat **prokaspázu 9**. Navázáním prokaspázy 9 se vytváří apoptotický signální komplex intrinzické cesty aktivace apoptózy, nazývaný **apoptozom**. Apoptozom umožňuje autokatalytickou aktivaci prokaspázy 9 (obr. 1.14) za vzniku aktivní volné kaspázy 9, jejímž hlavním substrátem je prokaspáza 3 v exekutivní části apoptózy (kap. 1.2).

1.2.4 Kontrolní fáze

Kontrolní fáze apoptózy se účastní řada proteinů ovlivňujících nejen apoptotickou kaskádu přímo, ale sloužících k integraci další intracelulární signalizace v rámci regulace apoptózy.

Zásadními regulátory ovlivňujícími uvolňování cytochromu c z mitochondrie je skupina bílkovin patřící do rozsáhlé (>20 zástupců) **rodiny proteinu Bcl-2**. Jednotlivé proteiny Bcl-2 rodiny patří jak mezi inhibitory (**Bcl-2**, **Bcl-X_L**), tak aktivátory (**Bax**, **Bad**, **Bid**) apoptózy. Jejich charakteristickou vlastností je asociace se zevní mitochondriální membránou a schopnost vytvářet vzájemně homodimery i heterodimery. Proapoptotičtí zástupci Bcl-2 rodiny mají schopnost vytvářet v zevní mitochondriální membráně kanály způsobující uvolnění cytochromu c, který je rychle rozpoznáván molekulami APAF1 asociovanými se zevní mitochondriální membránou. Naproti tomu protiapoptoticky působící zástupci Bcl-2 rodiny vedou ke stabilizaci mitochondriální

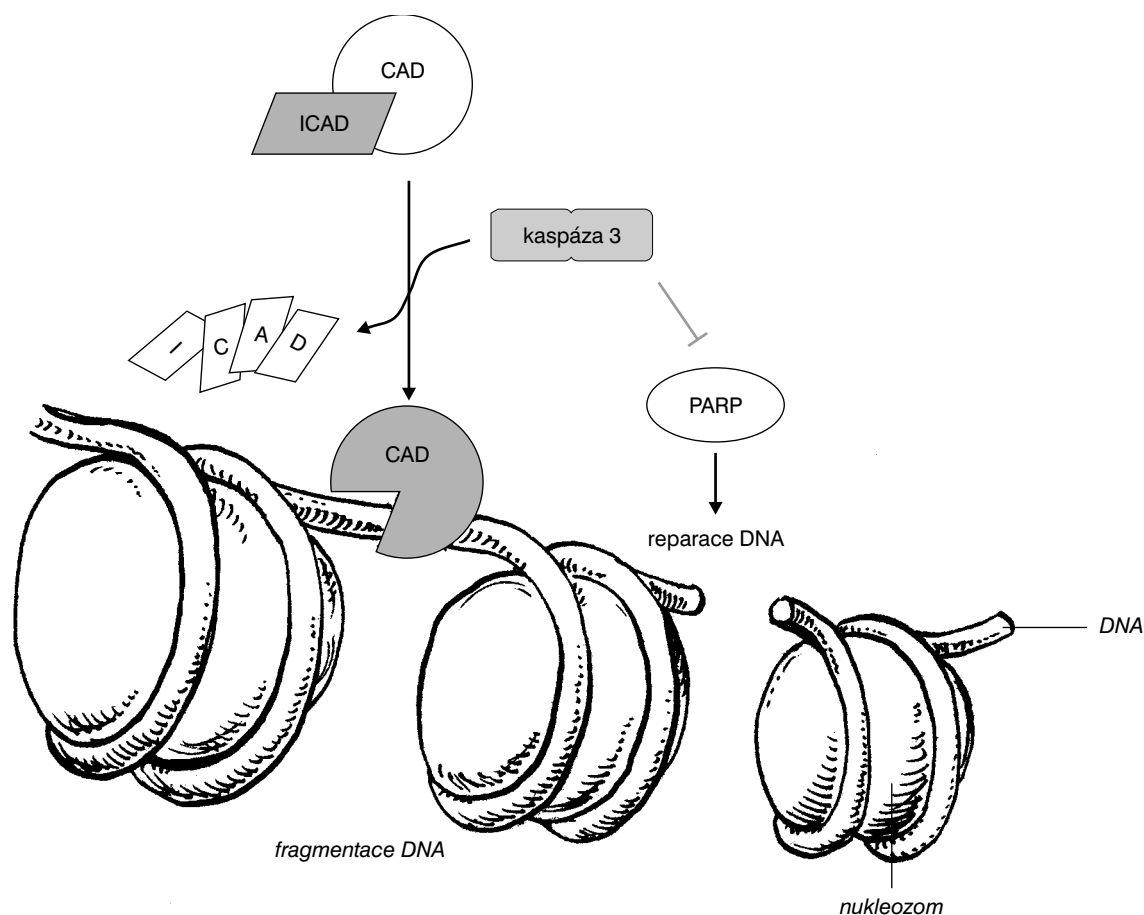
membrány a zabraňují unikání cytochromu c z mitochondrie.

Mezi inhibitory aktivace prokaspáz patří např. protein **CFLAR** (CASP8- and FADD-like apoptosis regulator, nazývaný též FLIP, CASPER), který kompetuje s prokaspázou 8 o vstup do DISC. Přímými inhibitory již aktivovaných kaspáz jsou proteiny ze skupiny proteinů IAP – inhibitorů apoptózy. Jedním z IAP proteinů často zvýšeně exprimovaných u řady nádorů, včetně karcinomu ovaria, je **BIRC5** (baculovirus IAP repeat-containing protein 5, **survivin**). Jeho negativním regulátorem je mitochondriální protein **SMAC/DIABLO** (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI) uvolňovaný z mitochondrie při porušení její zevní membrány (obr. 1.14).

Schopnost buňky indukovat apoptózu určuje mimo jiné i poměr intracelulárních koncentrací mezi skupinami proapoptotických, respektive protiapoptotických zástupců rodiny Bcl-2, obvykle vyjadřovaných jako poměr jejich dvou zástupců Bcl2/Bax. S overexpresí proteinu Bcl-2 (obvykle způsobenou amplifikací genu) se setkáváme u 40 % karcinomů prsu. Zvýšená exprese Bcl-2 je negativním prognostickým znakem, na druhou stranu rovněž možným cílem protinádorové léčby pomocí Bcl-2 *antisense* oligonukleotidů. V současné době probíhají studie klinické fáze II–III s oblimersenem, modifikovaným *antisense* oligonukleotidem cíleným proti prvním šesti kodonům Bcl-2 mRNA u pacientů s pokročilými nádory (melanom, karcinom ledviny a některá lymfoproliferativní onemocnění).

Podobně jako i u většiny ostatních nádorů, snížená exprese Bax je negativním prognostickým znakem karcinomu ovaria.

Tumor supresorový protein p53 je transkripční faktor, který aktivuje genovou expresi negativních regulátorů buněčného cyklu a aktivátoru apoptózy (kap. 1.1.1, obr. 1.12). Některé práce uvádějí, že mutace v genu *p53* jsou negativním prognostickým faktorem odpovědi na léčbu deriváty cisplatiny u pacientů s ovariálním karcinomem, avšak řada dalších výsledků tyto nálezy zpochybňuje. Oproti tomu experimentální i klinická data naznačují, že odpověď na léčbu taxany indukuje apoptózu zprostředkovanou proteinem Bax nezávisle na účasti p53. Z tohoto důvodu by kombinace derivátů cisplatiny a paklitaxelu mohla vést ke zlepšení výsledků protinádorové léčby u pacientek s ovariálním karcinomem s mutací v genu *p53*.



Obr. 1.15 Schéma degradace genomové DNA v exekutivní části apoptózy. Účinkem exekutivních kaspáz (kaspáza 3) dochází k proteolytické degradaci ICAD. Volná endonukleáza CAD s vysokou účinností štěpí genomovou DNA v místech mezi jednotlivými nukleozomy. Mezi substráty kaspázy 3 patří i PARP, čímž je znemožněna reparační procesy DNA.

1.2.5 Exekutivní část apoptotické kaskády

Postupná aktivace prokaspáz aktivními kaspázami indukovanými v úvodní části apoptózy amplifikuje apoptotický signál. Aktivní kaspázy 8 a 9 mají překrývající se substrátové cíle, mezi které patří především exekutivní prokaspázy (3, 6, 7). Substráty exekutivních kaspáz jsou strukturní a funkční intracelulární proteiny nezbytné pro normální existenci buňky. Mezi tyto proteiny například patří aktin (součást cytoskeletu), lamin (součást nukleárního skeletu), proteiny regulující sestřih mRNA (tím dochází k zastavení genové exprese) nebo reparační proteiny

(např. PARP; obr. 1.11). Na vrcholu exekutivní fáze apoptózy počíná degradace genomové DNA aktivací endonukleázy CAD, která hydrolyticky štěpí genomovou DNA (obr. 1.15).

Jakmile dojde v buňce k aktivaci kaspáz exekutivní části apoptózy, stává se tento děj již nevratným a takováto buňka vždy zaniká. Kaspázami degradované strukturní proteiny způsobí kolaps cytoskeletárního a nukleoskeletárního aparátu, který společně se štěpením genomové DNA vede k fragmentaci buněčného jádra a následně i k rozpadu buňky na apoptotická tělíska. Charakteristické projevy apoptózy jsou tak morfologickým korelátem již pokročilé a ireverzibilní fáze exekutivní části apoptózy.

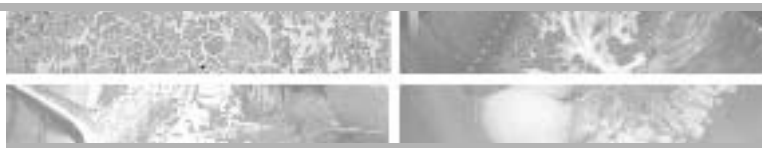
1.3 Význam znalosti buněčného cyklu a apoptózy pro klinickou praxi

Znalost základních principů řízení buněčného dělení a apoptózy – jako dvou klíčových dějů ovlivňujících fyziologickou regulaci homeostázy ve tkáních – je základem pro pochopení jejich alterací, které jsou přítomny u všech nádorových onemocnění. Charakterizace poruch buněčného cyklu a apoptózy umožňuje přípravu nových specificky cílených léčiv. Řada z nich je již v současnosti dostupná pro klinické po-

užití a řádově větší počet prochází klinickými zkouškami. Cesta individualizované a biologicky cílené léčby je nadějí pro budoucí pacienty, avšak pro její plné využití budou nezbytní erudovaní lékaři se schopností racionální aplikace cílených preparátů na základě znalostí o specifických molekulárních poruchách u konkrétních pacientů.

Literatura

- Bradshaw RA, Dennis EA, eds. Handbook of Cell Signaling. Vol. 1–3. San Diego: Elsevier Academic Press, 2003. 2576 s.
- Bronchud MH. Principles of Molecular Oncology. Clifton NJ: Humana Press, 2000. 452 s.
- Crocker J, Murray PG, eds. Molecular Biology in Cellular Pathology. New York: Wiley, 2003. 400 s.
- Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003. 558 s.
- Lavin et al. Role of ATM in Radiation signal transduction. In: Handbook of Cell Signaling, ed. Dennis E. A., Elsevier, 2002; kap. 305.



Molekulární biologie v klinické praxi

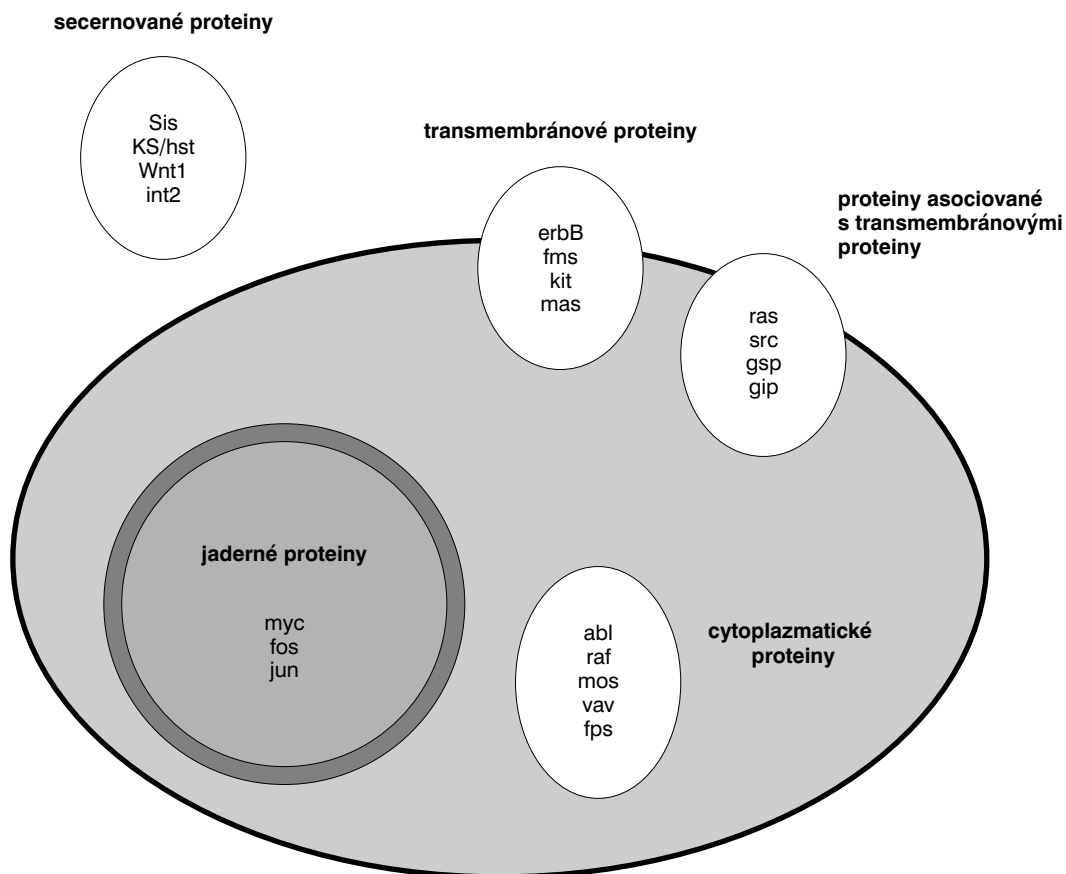
2.1 Molekulární principy tumorogeneze

Vznik nádoru je proces mnohastupňový. Zahrnuje změny genetické, tedy přímé změny sledu nukleotidů v DNA, změny epigenetické, neměnící genetický kód, ale ovlivňující jeho vyjádření, expresi – metylace některých bází DNA nebo acetylce histonů – a změny funkční na úrovni regulace metabolismu buňky a na úrovni kontroly genové exprese a dělení buňky.

Normální, nenádorová buňka se řídí podněty, které dostává zvenčí, i reakcemi a interakcemi probíha-

jícími v ní samé. Tyto podněty mohou být zprostředkovány ionty, malými molekulami i makromolekulami, prostřednictvím receptorů, změnou elektrických potenciálů nebo např. i přímým ovlivněním aktivity jednotlivých enzymů (ionty jako koenzymy). Velmi důležitý je také přímý kontakt buněk, který se ve většině tkání podílí na inhibici a regulaci růstu a množení buněk.

Buňka nádorová naproti tomu v důsledku regulačních, genetických a epigenetických změn ztrácí



Obr. 2.1 Onkogeny tvoří různorodou skupinu, jejíž proteinové produkty se uplatňují v odlišných buněčných kompartmentech

Tab. 2.1 Některé onkogeny, jejich funkce a nádory, u nichž jsou nejčastěji inaktivovány

onkogen	funkce	nádor
<i>c-K-ras</i>	membránový přenos signálu	karcinom endometria, ovarií
<i>c-myc</i>	regulace transkripce	karcinom endometria, ovarií
<i>v-E6</i>	inhibice p53	karcinom děložního hrdla
<i>v-E7</i>	inhibice pRb	karcinom děložního hrdla
<i>c-ErbB2 (HER2/neu)</i>	receptor růstových faktorů	karcinom prsu, ovarií
<i>c-fos</i>	regulace transkripce	sarkomy
<i>c-jun</i>	regulace transkripce	sarkomy
<i>c-sis</i>	růstový faktor	sarkomy (karcinom prsu?)
<i>c-abl</i>	proteinkináza	leukemie
<i>c-bcl2</i>	inhibice apoptózy	karcinom ovarií
<i>c-mdm2</i>	inhibice p53	sarkomy, gliální tumory

c – celulární onkogen, v – virový onkogen

kontrolu nad svým dělením a přestává reagovat na inhibiční podněty z okolí. Nadměrně se dělí a může získat vlastnosti, v jejichž důsledku destruuje okolní tkáň nebo se uvolní z vazby k okolním buňkám a metastázuje – stává se buňkou maligního nádoru.

Každý zhoubný nádor je směsí buněk s různými vlastnostmi, neboť v průběhu nadměrného a většinou chaotického, nepřesného dělení dochází ke kumulaci dalších změn a získání nových vlastností. Proto v buňkách metastáz můžeme najít jiné genetické změny než v buňkách původního nádoru. Všechny tyto buňky však vznikly dělením jedné původně malignizované buňky, a nádor je tak označován jako monoklonální.

Zde budeme hovořit o změnách somatických, tedy poruchách konkrétní buňky těla. O změnách zárodečných, které se přenášejí do všech buněk jedince, pojednává kapitola 3. Tyto somatické změny – mutace – postihují dva typy genů: protoonkogeny a tumor supresory.

2.1.1 Protoonkogeny a onkogeny

Jako **protoonkogeny** jsou označovány geny kódující funkční proteiny, které v případě defektu struktury nebo absolutního či relativního nadbytku stimulují buněčné dělení.

Poruchou – mutací – protoonkogenu vzniká **onkogen**, poškozený gen, který kóduje protein, jenž, vyskytuje-li se v abnormální formě nebo množství, může způsobit nádorovou transformaci buňky, často s vysokým růstovým potenciálem (obr. 2.1). Hovoří se také o aktivaci protoonkogenu. Příkladem může být gen označovaný jako *HER2/neu (c-ErbB-2)*, který kóduje receptor pro některé růstové faktory (EGF,

TGF α). Dojde-li k mutaci tohoto genu, je jím kódovaný receptor trvale aktivní nebo reaguje i na jiné molekuly (gain of function). Známe i onkogeny virové – např. geny *E6* a *E7* jsou součástí genomu lidského papilomaviru (HPV) a vytvářejí komplexy s produkty tumor supresorových genů *p53* a *Rb* a inaktivují je (tab. 2.1).

Onkogeny kódují proteiny, které působí:

- jako transkripční regulační faktory (v buněčném jádru se váží na regulační sekvence DNA a ovlivňují expresi dalších genů regulujících proliferaci a diferenciaci, některé mají schopnost buňku immortalizovat),
- jako proteinkinázy a receptory růstových faktorů (podílejí se na přenosu růstových signálů do buňky nebo na amplifikaci signálu uvnitř buňky),
- jako růstové faktory (přímo stimulují dělení buňky – spouštějí kaskádu dějů vedoucích k dělení buňky),
- jako signální transduktory (zprostředkovávají přenos signálu do buňky a uvnitř buňky),
- jako faktory blokující apoptózu.

Zcela zvláštní postavení s velkým klinickým významem pro onkogynekologii pak mají onkogeny, jejichž produkty inaktivují produkty tumor supresorových genů. Jedná se např. o onkogeny *E6* a *E7* lidského papilomaviru.

Alterací aktivující protoonkogen v onkogen může být:

- bodová mutace (delece, inserce, substituce),
- amplifikace (zmnožení) genu (stav, kdy vznikne několik dalších kopií genu v buňce, čímž vzroste i tvorba, byť normálního, proteinu),
- velká genomická přestavba v podobě chromozomální translokace, tj. přenesení části chromozomu na chromozom jiný, kdy může dojít k přene-

Tab. 2.2 Některé tumor supresory, jejich funkce a nádory, u nichž jsou nejčastěji inaktivovány

tumor supresor	funkce	nádor
<i>p53</i>	transkripční faktor	téměř všechny nádory
<i>BRCA1</i>	oprava DNA	karcinom prsu, ovarií
<i>BRCA2</i>	oprava DNA	karcinom prsu, ovarií
<i>PTEN</i>	regulátor transkripce	karcinom endometria, prsu
<i>MSH2, MLH1, MSH6</i>	oprava DNA (mismatch repair)	karcinom tlustého střeva, endometria
<i>WT1</i>	transkripční faktor	Wilmsův tumor
<i>p16</i>	inhibitor CDK	melanoblastom, karcinom pankreatu
<i>pRb</i>	regulátor transkripce	retinoblastom, osteosarkom
<i>NF-1</i>	protein aktivující GTPázu	neurofibrom, gliální nádory
<i>NF-2</i>	cytoskeletální spoj k membráně	neurinom, meningeom
<i>APC</i>	suspektní regulátor β -kateninu	karcinom tlustého střeva

sení genů pod vliv silného promotoru nebo k vytvoření zcela nového genu produkujícího nový onkoprotein,

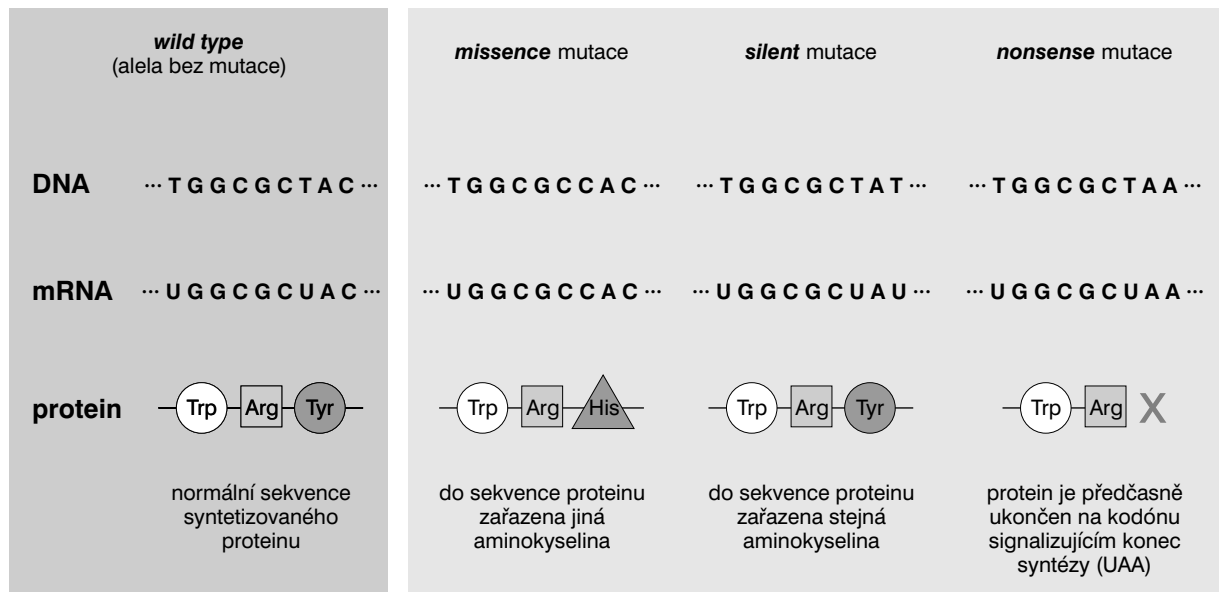
- inzerce virového (nejčastěji retrovirového) promotoru.

2.1.2 Tumor supresory

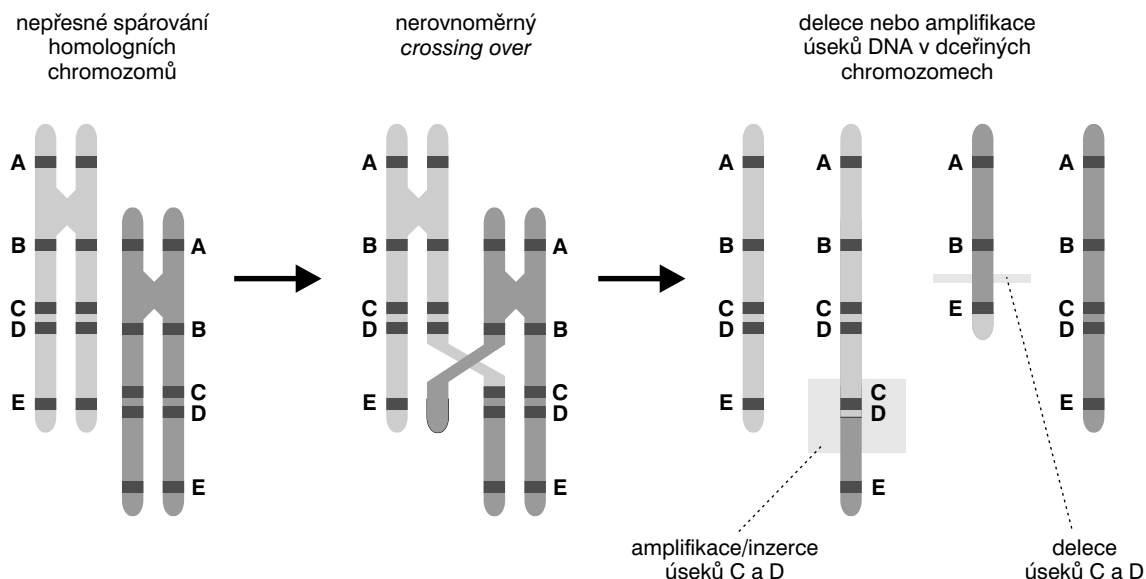
Tumor supresorové geny (nazývané také antionkogeny) hrají důležitou úlohu v kontrole buněčného dě-

lení. Jejich proteinové produkty kontrolují správnost a přesnost dělení a dokáží vzniklé chyby buď opravit (tzv. „care takers“, např. *BRCA1*, *BRCA2*), nebo buňku nepustit do další fáze dělení (tzv. „gate keepers“) či dokonce vyvolat buněčnou smrt, apoptózu (např. *p53*, *ATM*, *Rb*).

Jejich porucha způsobí, že buňka s chybou ve struktuře DNA postoupí do další fáze buněčného dělení a v důsledku selhání mechanismů opravujících DNA umožní vznik dalších mutací (tab. 2.2).



Obr. 2.2 Efekt jednotlivých typů bodových mutací na konečný proteinový produkt genu. Tzv. *missence* mutace vede ve svém důsledku ke vložení jiné aminokyseliny do syntetizovaného proteinového řetězce. To může vést ke změně konformace proteinu a ke ztrátě (tumor supresory), nebo naopak získání nové funkce (onkogeny). Mutace tichá, *silent*, neovlivní strukturu proteinu. Na úrovni DNA a především mRNA však může ovlivňovat některé regulační a sestřihové mechanismy. *Nonsense* typ mutace vede k ukončení syntézy proteinu v místě mutace, neboť dojde k vytvoření tzv. terminačního kodonu – kombinace tří nukleotidů (kodónu), které nekódují žádnou aminokyselinu, ale signalizují ukončení translace.



Obr. 2.3 Příklad vzniku velkých genových amplifikací a delecí, které vedou k amplifikaci protoonkogenů a výpadku tumor supresorů. Po nepřesném spárování homologních chromozómů a následné nerovnoměrné výměně genetického materiálu mezi chromatidami v dceřiných buňkách přebývá, nebo se naopak nedostává genetický materiál.

2.1.3 Mechanismy mutagenese

U onkogenů je dostačující, aby byla poškozena jedna jeho kopie, alela, a na templátu takto modifikovaného genu vzniká patologický protein. Tumor supresorový gen musí být naopak inaktivován, a to obě jeho kopie, alely (tzv. Knudsonova teorie dvojího zásahu – two hits theory). Inaktivujícím zásahem může být bodová mutace, výpadek celého genu nebo velkého chromozomálního úseku, ale i změna epigenetická.

■ Bodové mutace

Formy poruchy genu mohou být různé. Bodová mutace znamená, že jeden, nebo několik málo nukleotidů, „písmen“, DNA vypadne (delece), je naopak navíc vloženo (inzerce, duplikace), nebo zaměněno bez změny počtu nukleotidů (substituce – může být missense, tzn. že do sekvence proteinu je zařazena jiná aminokyselina, nebo nonsense, tzn. že mutace vytvoří stop kodon, triplet, na němž tvorba proteinu končí). Syntetizovaný protein je pak kratší (v důsledku posunové, frameshift, nebo nonsense mutace) nebo jsou v jeho struktuře jiné aminokyseliny, což vede buď ke ztrátě jeho funkce (u tumor supresorů), nebo naopak k trvalé aktivaci či získání nové funkce (u onkogenů). Vzhledem k tomu, že středně velký gen (např. *BRCA1*) má několik set tisíc nukleotidů, jedná se o změny subtilní, odhalitelné složitými metodami molekulární genetiky (obr. 2.2).

■ Translokace

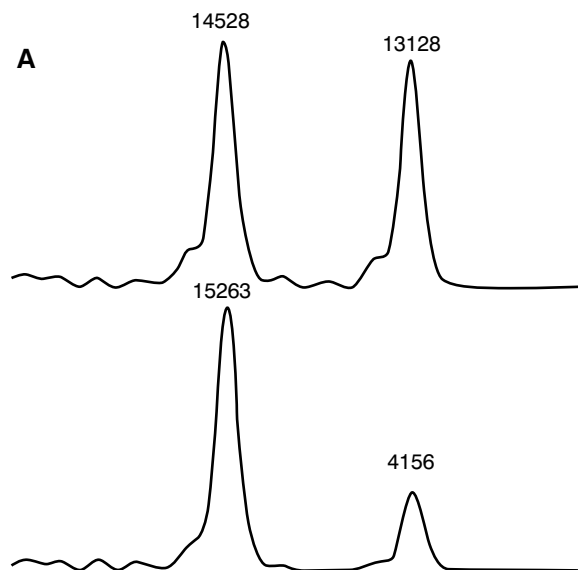
Poruchy struktury genů však mohou postihovat daleko větší úseky. Celý chromozom může být v jednom místě zlomen a pak napojen na chromozom jiný – translokace (typická např. pro krevní malignity). Části různých genů tak mohou vytvořit zcela nový fúzní gen, který může působit jako onkogen. Nebo se takto protoonkogen může dostat pod vliv cizího silného promotoru (sekvence, která rozhoduje, v jakém množství bude daný gen exprimován, tj. kolik proteinu se vytvoří) a jeho proteinový produkt se tvoří v nadměrném množství (obr. 2.3).

■ Amplifikace

V průběhu nepřesného buněčného dělení může být do dceřiné buňky přeneseno více homologních chromozomů nebo jejich fragmentů. Geny na nich lokalizované jsou tak v buňce přítomny ve více kopiích, což může vést k jejich větší expresi.

■ Ztráta heterozygosity (LOH – loss of heterozygosity)

V DNA se nacházejí úseky s vysokou interindividuální variabilitou sekvence. Kombinace variability v mnoha úsecích vytváří pro daného jedince zcela jedinečný vzorec, někdy hovoříme o tzv. DNA fingerprintingu. Tato variabilita je využívána v některých molekulárně biologických aplikacích. Příkladem je analýza ztráty heterozygosity, která využívá variabilitu v tzv. mikrosatelitárních markerech.



Obr. 2.4 Ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity – LOH) při fragmentační analýze fluorescenčně značených produktů PCR na přístroji Abi Prism 310. Analyzován je mikrosatelitární úsek na chromozomu 17 označovaný jako D17S855. Čísla na vrcholech křivky popisují plochu pod křivkou. Horní křivka – analýza DNA izolované z krve, dolní křivka – analýza DNA z nádoru.

Jako mikrosatelitární markery (také STRs – short tandem repeats) jsou označovány úseky DNA, v nichž se opakovaně tandemově za sebou uspořádán vyskytuje jedno- až šestibázový motiv. Celková délka takové sekvence je do několika set párů bází. Jsou velmi frekventní, jeden mikrosatelitární marker připadá na 6 kb genomické sekvence.

Heterozygosity je vyjádřena různou délkou mikrosatelitárních markerů na obou alelách (tj. na mateřském a otcovském chromozomu).

U tumor supresorových genů může dojít ke ztrátě celého genu nebo i ještě větší části chromozomu. Při analýze nádoru se takový genový výpadek projeví jako tzv. ztráta heterozygosity (LOH) (obr. 2.4). Zatímco v nenádorové tkáni vidíme obraz dvou (rozdílných) alel, ve tkáni nádorové najednou jedna z alel chybí (v některých studiích je tento typ inaktivace tumor supresorového genu označován jednoduše „loss“, oproti amplifikaci označované jako „gain“).

Někdy můžeme při analýze nádoru vidět místo původních dvou alel alely tři nebo alely jiné délky než původní. V takovém případě hovoříme o mikrosatelitární instabilitě. Ta vzniká v důsledku poruchy genů, tzv. mismatch repair system, které mají za úkol opravovat drobné chyby v sekvenci DNA. Při jejich dysfunkci se chyby hromadí a v některých, repetitivních, úsecích DNA, kde se opakuje mnohokrát za se-

bou stejný dvou- nebo několikabázový motiv, vedou ke generování „nových“ alel.

2.1.4 Epigenetické změny

Pouze genetické alterace nejsou dostatečným vysvětlením všech změn doprovázejících nádorovou transformaci buňky, především změn exprese jednotlivých genů, zvláště když žádnou mutaci (ať již bodovou či velkou chromozomální) v DNA nenacházíme. Proto bylo zvýšené úsilí věnováno odhalení faktorů ležících mimo samotný sled nukleotidů. Tyto změny jsou nazývány epigenetické, neboť nemění samotnou sekvenci DNA, ale modifikují buď jednotlivé nukleotidy (aniž by měnily smysl genetického kódu), nebo bílkoviny komplexu nukleoproteinů, které mají zásadní vliv na genovou expresi. Mezi tyto změny patří především metylace cytozinů v promotorových sekvencích a acetylace histonů.

Promotory některých genů, sekvence sloužící k vazbě transkripčních faktorů na DNA, jsou bohaté na tzv. CpG islands, sledy dinukleotidů CG. Cytozin v této pozici může být enzymy metylázami (a demethylázami) metylován (či demetylován) za vzniku tzv. 5-metylcytozinu. Gen s hypermetylovaným promotorem je exprimován méně, s hypometylovaným promotorem více. Metylační vzorec se přenáší do dceřiných buněk. V germinální (zárodečné) podobě je pak podstatou tzv. imprintingu, tj. rozdílného fenotypického projevu, v závislosti na tom, zda se alela dědí od otce, nebo od matky (Praderův Williův/Angelmanův syndrom).

Acetylaci histonů řídí enzymy acetylázy/deacetylázy. Snížení exprese je nejčastěji spojeno s deacetylací histonů.

2.1.5 Význam molekulární genetiky pro klinickou praxi

Pro efektivní léčbu malignit je nezbytná časná a přesná diagnóza s možností optimalizace terapie a minimalizace nežádoucích účinků. Časná diagnóza nádorového onemocnění spolu s individuální terapií „na míru“ mohou snížit úmrtnost a zlepšit perspektivu a kvalitu života pacienta. Gynekologické zhoubné nádory představují skupinu chorob, u kterých je prognóza závislá na subtilních genomických, epigenetických a proteomických změnách. Užití molekulárně biologických technik, včetně analýzy metylací a acetylací a technik proteomických, se stává důležitým nástrojem nejen v základním výzkumu, ale

i v rozhodování o vhodné terapii. Epigenetika a proteomika v současné době nabízejí nové a velmi slibné přístupy nejen pro identifikaci specifických biomar-

kerů a jejich následné využití ve screeningu, ale také pro přesnou charakterizaci a typizaci tkání, včetně tkání nádorových.

2.2 Molekulární genetika některých gynekologických malignit

2.2.1 Molekulární genetika ovariálního karcinomu

■ Etiologie

V současnosti existují dvě starší a rozšířené hypotézy popisující příčiny vzniku epiteliálního ovariálního karcinomu. Ovulační hypotéza předpokládá, že nádor vzniká v důsledku opakovaných mikrotraumat povrchového epitelu vaječnicku při ovulaci. Po každé ovulaci poškozený epitel proliferuje a hojí se. Čím čtenější je proliferace epitelu, tím větší je možnost chybné replikace a nádorové transformace postižené buňky. Podle této teorie je riziko vzniku maligního epiteliálního nádoru funkcí počtu ovulačních cyklů v životě ženy. Každý faktor redukující počet ovulačních cyklů působí protektivně.

Gonadotropinová hypotéza naproti tomu předpokládá, že zvýšené hladiny cirkulujících gonadotropinů (folikuly stimulující hormon a luteinizační hormon) stimulují produkci ovariálních estrogenů a jejich prekurzorů. To vede ke vzniku inkluzních cyst a takto „uvězněné“ (entrapped) epiteliální buňky mohutně proliferují, což může opět vést k replikačním chybám a nádorové transformaci. Riziko vzniku karcinomu ovaria je podle této teorie funkcí délky expozice vaječnicků gonadotropinům. Faktory redukující hladiny cirkulujících hormonů by pak měly snižovat riziko ovariálního karcinomu.

Obě uvedené hypotézy mohou vysvětlit protektivní efekt užívání hormonální kontracepce a těhotenství na vznik ovariálního karcinomu. Existuje však stále ještě mnoho kontroverzí.

Předpokládáme-li platnost gonadotropinové teorie, pak by hormonální substituční terapie (HRT), která snižuje hladinu cirkulujících gonadotropinů, měla snižovat riziko ovariální malignity. Recentní data však ukazují, že HRT na vznik nádoru vliv nemá, nebo dokonce že riziko vzniku karcinomu zvyšuje.

Podobně, pokud platí ovulační teorie, měly by mít ženy s ovulační infertilitou snížené riziko vzniku nádoru. Současné práce však uvádějí, že ženy s ovulační infertilitou mají toto riziko nezměněné, nebo vyšší. Porody dvojčet, kde bychom u matky předpokládali větší počet ovulací, jsou spojeny se snížením

rizika ovariálního karcinomu. Pokud navíc koreluje užívání hormonální kontracepce s délkou období ovulací (ovulatory life), zjistíme, že dochází k většímu snížení rizika vzniku karcinomu, než by odpovídalo mechanismu pouhé inhibice ovulace.

Je zřejmé, že uvedené dvě rozšířené hypotézy nemohou vysvětlit všechny pozorované aspekty vzniku ovariálního karcinomu. Proto v současné době vznikají hypotézy další, které se snaží předchozí teorie doplnit.

Další teorie, androgenová/progesteronová, předpokládá zapojení těchto hormonů do procesu vzniku karcinomu vaječnicků. Androgeny jsou produkovány tekálnými buňkami, jsou přítomny ve folikulární tekutině a jsou základními steroidy rostoucího folikulu. V postmenopauze byla zaznamenána vyšší produkce androgenů a výskyt androgenních receptorů v ovariální tkáni. Úlohu androgenů v ovariální karcinogenezi podporují i epidemiologická data. Hormonální kontracepce snižuje produkci testosteronu v ováriích o 35–70 %. V prospektivní studii byly pozorovány vyšší hladiny sérového androstendionu u pacientek s karcinomem ovaria ve srovnání s kontrolami. V jiné studii bylo ve skupině pacientek signifikantně vyšší zastoupení žen s polycystickými ovárii, a tedy s vyššími hladinami androgenů než v kontrolní skupině zdravých žen. V rozsáhlé prospektivní studii sledující 31 000 původně zdravých žen po dobu 7 let vzrůstalo riziko ovariálního karcinomu signifikantně se vzestupem poměru pas-boky (waist-to-hip ratio), který je markerem centrální obezity. Centrální obezita pozitivně koreluje s hladinou androgenů u žen. Progesteron má oproti tomu zřejmě při vzniku ovariálního karcinomu roli protektivního faktoru.

Ve snaze vysvětlit vztah mezi pánevním zánětem, endometriózou a ovariálním karcinomem vznikla tzv. teorie zánětu předpokládající, že právě zánět hraje kauzální roli při vzniku nádoru. Tubální ligace a hysterektomie, které přerušují cestu možné infekce do abdominální dutiny, vedou v některých pracích ke snížení rizika ovariálního karcinomu. Užívání nesteroidních antiflogistik také působí protektivně.

Všechny uvedené hypotézy jsou podpořeny daty získanými v experimentálních a populačních studiích. Přesto však žádná nevysvětluje dokonale všechna získaná data. Odhalují ale potenciální synergické protektivní a rizikové mechanismy podílející se na vzniku epiteliálního ovariálního karcinomu a upozorňují na jevy, které je nutno blíže zkoumat. Úkolem studia molekulárních mechanismů karcinogeneze je integrovat, vysvětlit a využít základní buněčné a subcelulární procesy vedoucí v důsledku k maligní transformaci buňky.

■ Typ I a typ II ovariálního karcinomu

Sled molekulárních změn vedoucích ke vzniku epiteliálního ovariálního karcinomu není v současné době tak dobře znám jako u jiných solidních nádorů. Je to především proto, že jsme donedávna neznali přesně stadia vývoje ovariálního tumoru od benigního po maligní. V posledních několika letech bylo vynaloženo velké úsilí na studium vlastností neinvazivních a invazivních ovariálních tumorů všech histologických typů ve snaze poznat jejich patogenezi a předpovědět biologické chování.

Epiteliální ovariální nádory jsou tradičně děleny do skupin podle histologických charakteristik (serózní, mucinózní, endometriální, nádor z jasných buněk a Brennerův tumor) a každý typ se může vyskytovat ve formě benigní, hraniční (borderline) a maligní (karcinom). Mucinózní a endometriální borderline nádory jsou často spojovány s rozvojem invazivních nádorů, zatímco serózní borderline nádory pouze vzácně se vznikem serózního invazivního karcinomu. To také vedlo k názoru, že se jedná o dvě odlišné entity a ne pouze dvě stadia vývoje téhož nádoru.

Četné studie rozlišují podskupinu low-grade serózních nádorů, kterou nazývají mikropapilární serózní karcinom (micropapillary serous carcinoma – MPSC). Kromě definované morfologie má tato jednotka nízkou proliferativní aktivitu a příznivé biologické chování. Takové nádory ostře kontrastují s konvenčním typem serózních karcinomů, které naopak představují agresivní, málo diferencované nádory s vysokou proliferativní aktivitou.

Termín MPSC popisuje neinvazivní nádor nízkého maligního potenciálu, který je však již odlišný od častějšího typu, tzv. „atypický proliferující serózní tumor“, který spadá do skupiny borderline nádorů. MPSC je tak považován za prekursor, *in situ* stadium, low-grade serózních karcinomů (je proto častěji nazýván intraepiteliálním low-grade serózním karcinomem).

Výsledky molekulárněgenetických analýz umožnily v současné době podrobnější charakterizaci

benigních, borderline i maligních ovariálních epiteliálních nádorů a dovolují odlišit dva základní typy ovariálních epiteliálních karcinomů, které mají do jisté míry odlišný vzorec genových změn a také odlišné biologické chování. Spíše než vazbu k typickému histotypu popisuje tato kategorizace odlišné molekulární cesty karcinogeneze (tab. 2.3).

Epiteliální ovariální karcinom typu I

Nádory typu I jsou označovány jako „low-grade“. Vyznačují se postupným vývojem z benigních a borderline nádorů (sekvence cystadenom, eventuálně adenofibrom – borderline – karcinom). Patří sem tzv. low-grade serózní karcinomy (cca 25 % všech serózních karcinomů), mucinózní karcinomy, endometriální karcinomy, maligní Brennerův tumor a clear cell karcinomy. Serózní a mucinózní nádory vznikají přímo z povrchového epitelu či z inkluzních cyst, nádory endometriální a světlobuněčné pak z ložisek endometriózy.

U těchto nádorů nacházíme velmi často mutace onkogenů *BRAF* a *K-ras*. Produkty obou genů působí jako počáteční regulátory transdukční buněčné cesty RAS/RAF/MEK/ERK/MAP, která zprostředkovává přenos růstových signálů do buněčného jádra. Onkogenní mutace *BRAF* a *K-ras* vedou k trvalé, konstitutivní aktivaci této cesty a podporují tak procesy vedoucí k nádorové transformaci buňky. Tyto mutace vznikají velice časně v procesu karcinogeneze, pravděpodobně předcházejí vzniku borderline nádorů. Ani jeden z těchto genů není mutován u high-grade karcinomů (typ II).

U endometriálních karcinomů nacházíme navíc i mutace tumor supresorového genu *PTEN* (nalezené i v ložiscích endometriózy obklopující karcinom), ztrátu heterozygoty či mikrosatelitární instabilitu. MSI je často pozorována i u clear cell karcinomů. Je pravděpodobné, že endometriální a clear cell karcinomy vznikají ze stejných prekursorů (některými autory je clear cell karcinom považován za nediferencovanou formu endometriálního karcinomu).

Low-grade tumory jsou charakterizovány pomalejší progresí a vyšším pětiletým přežitím (55 % v. 33 % u typu II).

Epiteliální ovariální karcinom typu II

Nádory typu II jsou označovány jako „high-grade“. U těchto karcinomů neznáme vývojová stadia, předpokládáme, že vznikají rychle, přímo z ovariálního epitelu nebo z inkluzních cyst na základě mutací významně ovlivňujících mitotickou stabilitu buňky a jsou charakteristické vyšším gradingem a horší prognózou. Patří sem high-grade serózní karcinomy (cca

Tab. 2.3 Molekulární změny u obou typů epiteliálních ovariálních karcinomů

typ I (low-grade)	prekurzor	molekulární změny
low-grade serózní karcinom	serózní cystadenom/cystadenofibrom serózní borderline tumor	mutace <i>BRAF</i> , <i>K-ras</i> (~67 %)
mucinózní karcinom	mucinózní cystadenom mucinózní borderline tumor intraepiteliální karcinom	mutace <i>K-ras</i> (>60 %)
endometriální karcinom	endometrióza endometriální adenofibrom endometriální borderline tumor intraepiteliální karcinom	LOH, mutace <i>PTEN</i> (20 %) mutace β - <i>katenu</i> (16–54 %) mutace <i>K-ras</i> (4–5 %) MSI (13–50 %)
clear cell karcinom	endometrióza clear cell adenofibrom clear cell borderline tumor intraepiteliální karcinom	mutace <i>K-ras</i> (5–16 %) MSI (~13 %) mutace <i>TGFβ RII</i> (66 %)
maligní Brennerův nádor	Brennerův nádor borderline tumor typu Brennerova nádoru	zatím neznámé
typ II (high-grade)	prekurzor	molekulární změny
high-grade serózní karcinom	neznámý	mutace <i>p53</i> (50–80 %) amplifikace/overexprese <i>HER2/neu</i> (10–20 %); mutace <i>AKT2</i> (12–18 %)
nediferencovaný karcinom	neznámý	zatím neznámé
maligní smíšený mezodermální nádor (karcinosarkom)	neznámý	mutace <i>p53</i> (>90 %)

75 % všech serózních karcinomů), nediferencované karcinomy a maligní smíšený mezodermální nádor (karcinosarkom). Některé nádory této skupiny jsou označovány jako clear cell (jasnobuněčné, světlebuněčné), neboť jejich buňky – alespoň některé – mají světlou (jasnou) cytoplazmu. Geneticky se však odlišují od „klasických“ clear cell karcinomů typu I. U tohoto typu nádorů nacházíme v naprosté většině případů mutace tumor supresorového genu *p53* (u karcinosarkomu stejné mutace v epiteliální i mezenchymální komponentě, což je jedním z dokladů monoklonálního původu tohoto nádoru). V této skupině je pozorována také vysoká frekvence amplifikace a overexprese *HER2/neu* (20–67 %), inaktivace tumor supresoru *p16* (zčásti v důsledku hypermetylace promotoru), amplifikace genu pro serin/treoninovou kinázu *AKT2*, amplifikace genu *Rsf-1*, jehož produkt se podílí na remodelaci chromatinu. Tyto genetické změny jsou velmi vzácné u benigních, borderline a low-grade nádorů.

High-grade nádory se liší i svým expresním vzorcem. Především je nadměrně exprimován apolipoprotein E (apo-E) a lidský leukocytární antigen G (HLA-G). Podobná korelace exprese *HLA-G* s horším biologickým chováním nádoru byla pozorována i u nemalobuněčného karcinomu plic. Vysvětlení ta-

kové korelace je možné najít v ochraně nádorových buněk před lýzou buňkami imunitního systému (především NK buňkami).

■ Prognostické a prediktivní molekulární markery u karcinomu ovaria

Ovariální karcinom je onemocnění se širokou variabilitou klinické odpovědi. Proto jsou intenzivně studovány parametry, především molekulární markery, které by mohly přesněji než klasické markery jako grading nádoru nebo stadium onemocnění určit prognózu (a tím zařadit pacientku do skupiny s větším nebo menším rizikem) nebo predikovat odpověď na léčbu.

Regulace buněčného cyklu

Vznik zhoubného nádoru je charakterizován chybnou proliferací, která je výsledkem poruch regulačních mechanismů buněčného cyklu. Úloha mnoha onkogenů a tumor supresorů v molekulárních cestách, regulujících ať již pozitivně, nebo negativně buněčný cyklus, je známá. Konkrétní prognostický a prediktivní význam jednotlivých genových produktů je však stále předmětem studia.

Gen *p53* ▶ Kóduje nukleární fosfoprotein, který se váže na specifické sekvence DNA a funguje jako transkripční faktor – ovlivňuje pozitivně, nebo negativně expresi dalších genů regulujících růst a dělení buňky. Protein *p53* se v buňce (v jejím jádře) účastní procesů kontroly buněčného cyklu, odpoví na poškození DNA a udržování genomické stability, odpoví na stres, buněčného stárnutí a apoptózy.

Gen *p53* je jedním z nejčastěji mutovaných genů v liniích lidských karcinomů, jeho somatické alterace nacházíme u zhruba 50 % všech epiteliálních zhoubných nádorů. Většina missense mutací mění konformaci proteinu *p53*, což vede ke ztrátě jeho funkce, zároveň však zvyšuje jeho stabilitu, a tím zvyšuje i jeho buněčnou hladinu. Proto je pozorována korelace mezi zvýšenou imunoreaktivitou *p53* a mutací tohoto genu.

Ve shodě s pozorováním u řady jiných nádorů je i u karcinomu vaječníků detekována mutace nebo overexprese *p53* u zhruba 50 % nádorů bez závislosti na stadiu onemocnění. Řada analýz udává možnou prognostickou hodnotu těchto alterací ve vztahu k celkovému přežití. Multivariátní studie však nepotvrzují jejich nezávislou prognostickou hodnotu. Nejasný je také význam prediktivní (predikce odpovědi na léčbu).

I když není význam samotné inaktivace genu *p53* ve vztahu k prognóze či predikci definitivně vyjasněn, může *p53* fungovat jako pomocný faktor v kombinaci s dalšími molekulárními charakteristikami (např. pozitivní prognostický význam *p21* pouze u tumorů bez alterace *p53*).

p21 (gen *CDKN1A*) ▶ Kóduje potentní inhibitor cyklin dependentní kinázy. Protein *p21* se váže na komplexy cyklin-CDK2 a cyklin-CDK4 a funguje tak jako regulátor progresu buněčného cyklu ve fázi G1. Expresce *p21* je pod kontrolou tumor supresoru *p53*. Protein *p21* je tak mediátorem odpovědi *p53* na buněčný stres a zprostředkovává *p53* dependentní zástavu buněčného cyklu ve fázi G1.

Některé studie uvádějí v multivariátní analýze horší celkové přežití u pacientek s nádory s nižší expresí genu *CDKN1A*, především u *p53* negativních nádorů (tj. nádorů s normální, nezvýšenou, expresí genu *p53*). Jedna studie uvádí pozitivní korelaci exprese *p21* k odpovědi na chemoterapii na bázi platin.

p27 (gen *CDKN1B*) ▶ Kóduje další inhibitor cyklin dependentní kinázy. Stejně jako *p21* inhibuje komplexy cyklin-CDK2 a cyklin-CDK4. Nižší exprese *CDKN1B* je spojena s horší prognózou.

p16 (gen *CDKN2A*) ▶ Metylace promotoru a delece genu *CDKN2A* je spojena s horší prognózou a progresí onemocnění. Studovány byly i další inhibitory cyklin dependentních kináz *p14* a *p57* (*Kip2*), avšak bez jasného prognostického nebo prediktivního významu.

Cykliny ▶ Cyklin D1 tvoří komplex s CDK4 a CDK6 a tvoří jejich regulační podjednotku. Aktivita tohoto komplexu je nutná pro přechod buněčného cyklu z fáze G1 do fáze S. Mnoho studií poukazuje na nezávislý prognostický význam cyklinu D1 – zvýšená exprese je spojena s horší prognózou.

pRb ▶ Produkt genu *Rb* je důležitý pro řízení transkripčních mechanismů v časně fázi G1 buněčného cyklu. Protein *pRb* potlačuje expresi transkripčních faktorů, především E2F, důležitých pro produkci dalších faktorů stimulujících buněčný cyklus. Protein *pRb* je fosforylován komplexy cyklin D1-CDK4 a cyklin E-CDK2. Fosforylace vede k reverzibilní inaktivaci proteinu, a buňka tak může postoupit do další fáze buněčného cyklu. Hypofosforylace naopak vede k zástavě buněčného cyklu v časně G1 fázi. Některé studie uvádějí vztah exprese *pRb* k prognóze onemocnění.

Apoptóza

Apoptóza je důležitým mechanismem uplatňujícím se nejen v procesu karcinogeneze, ale také v odpovědi na chemoterapii, neboť řada chemoterapeutik (např. taxany) působí v buňce změny, které ve svém důsledku vedou v případě nepoškozených buněčných mechanismů k apoptóze.

Rodina *Bcl-2* ▶ Členy této rodiny jsou geny s proapoptoticky (např. *Bax*, *Bcl-x*) a antiapoptoticky (např. *Bcl-2*) působícími funkčními proteinovými produkty.

Proteinový produkt protoonkogenu *Bcl-2* působí jako inhibitor apoptózy. Další členové této rodiny, *Bax* a *Bcl-x*, působí proti této inhibici, možným mechanismem je i přímá heterodimerizace s *Bcl-2*.

Zvýšená exprese *Bcl-2* vede k ochraně nádorové buňky před apoptózou, tedy i před účinkem cytostatik. Předpokládá se, že protein *Bcl-2* je klíčovým faktorem při vzniku mnohočetné lékové rezistence. Nadbytek proapoptotických proteinů této rodiny naopak zvyšuje senzitivitu k cytostatické léčbě.

Survivin ▶ Survivin je inhibitor apoptózy. Inhibuje proteolytickou aktivitu kaspázy 3 a v důsledku svého působení vede k imortalizaci buňky. Podobně jako

u *Bcl-2* je zvýšená exprese tohoto genu spojena s horší prognózou.

CA125/MUC16

Protilátka OC125 reagující s ovariálním karcinomovým antigenem CA125 byla objevena již před 20 lety. CA125 je glykoprotein detekovaný v supernatantu z tkáňových kultur ovariálního karcinomu a detekovatelný i v séru. Jedná se o diferenciační antigen fetálního i dospělého coelomového, ale i bronchiálního epitelu. Gen kódující CA125 byl klonován v roce 2001, sekvenčně je příbuzný s genem pro mucin, proto byl nazván *MUC16*.

U 99 % zdravých žen je plazmatická hladina CA125 nižší než 35 kIU/l, zatímco u 82 % patientek s karcinomem ovaria je vyšší. V 90 % koresponduje longitudinálně sledovaná hladina CA125 s masou nádoru. Zvýšená hladina však může být přítomna i u některých benigních afekcí – endometriózy, jaterní cirhózy, při přítomnosti folikulárních cyst, při menstruaci a v těhotenství. Hodnoty vyšší než v plazmě jsou nalézány v plodové vodě, mateřském mléce a v cervikálním sekretu.

U patientek se vstupní pozitivitou CA125 může být tento marker použit k monitorování nemoci.

c-ErbB2 (HER2/neu)

Gen pro tento lidský homolog původního myšího onkogenu *neu* leží na dlouhém raménku 17. chromozomu (17q21-22). Kóduje 185kDa transmembránový glykoprotein s tyrozinkinázovou aktivitou. HER2/neu je členem rodiny receptorů růstových faktorů. Patří sem i EGF-R (ErbB1), Her3 (ErbB3) a Her4 (ErbB4).

HER2/neu se skládá z extracelulární domény vázající ligand a intracelulární domény s tyrozinkinázovou aktivitou. Může vytvářet heterodimery s dalšími členy EGF-R rodiny. Fosforylační kaskáda spuštěná onkoproteinem HER2/neu vede prostřednictvím aktivace signálních proteinů (fosfolipáza Cg, fosfatidylinositol-3-kináza, nebo ras-GTP kaskáda) ke stimulaci buněčné proliferace a diferenciace.

Nemutovaný *HER2/neu* je zvýšeně exprimován nebo amplifikován s vysokou frekvencí u řady maligních solidních tumorů. Zatím nebyly uveřejněny práce popisující alteraci kódující sekvence tohoto genu. Zvýšená exprese HER2/neu vede ke zvýšené aktivitě genů řídících buněčný růst a dělení.

Ve zdravé ovariální tkáni je exprese *HER2/neu* nízká. Zvýšeně se tento onkogen exprimuje asi u třetiny epiteliálních ovariálních karcinomů (různé práce uvádějí výskyt overexprese u 19–59 % nádorů). Prognostický význam amplifikace nebo overexprese *HER2/neu* zůstává u ovariálního karcinomu nejasný.

Pouze jedna práce uvádí nezávislou korelaci mezi zvýšenou expresí *HER2/neu* a kratším celkovým přežitím. Dosud nebyl pozorován vztah mezi expresí *HER2/neu* a stadiem podle FIGO, gradingem nádoru ani histologickým typem nádoru.

Intenzivně se také studuje otázka chemorezistence nádorových buněk se zvýšenou expresí *HER2/neu*. Felip et al. (1995) pozorovali, že mezi nádory nereagujícími na chemoterapii založené na platinových derivátech bylo 75 % nádorů s overexpresí *HER2/neu*, ve srovnání s 18,6 % ve skupině na léčbu reagující.

c-myc

c-myc je členem rodiny *myc* genů, která zahrnuje geny *B-myc*, *L-myc*, *N-myc* a *s-myc*. Leží na dlouhém raménku osmého chromozomu (8q24) a jeho kódující sekvence je tvořena pouze třemi exony. V důsledku přítomnosti alternativního iniciačního kodonu jsou na templátu mRNA tohoto genu syntetizovány dva proteiny (p64 a p67) lišící se v délce o 15 aminokyselin. Produkt genu *c-myc* je DNA vázající protein. Na N-konci obsahuje transaktivační transkripční doménu, jeho karboxylový konec pak tvoří dimerizační doménu struktury leucinového zipu. Účastní se regulace buněčné proliferace, potlačuje nebo stimuluje expresi mnoha genů, včetně cyklínů A, D a E a genu *p53*. Deregulovanou expresí genu *c-myc* nacházíme u mnoha zhoubných nádorů. Z gynekologických malignit kromě ovariálního karcinomu také u karcinomu prsu a karcinomu děložního hrdla. Aktivace tohoto onkogenu je nejčastěji způsobena chromozomální translokací nebo amplifikací.

Amplifikaci a/nebo zvýšenou expresí nacházíme u 26–37 % všech ovariálních karcinomů. Podíl aktivace tohoto protoonkogenu je u serózních adenokarcinomů až 63 %. Několik studií nepotvrdilo vztah mezi overexpresí genu *c-myc* a celkovým přežitím. Jen jedna studie popisuje signifikantní korelaci, pouze však je-li overexprese *c-myc* spojena s aktivací onkogenů *HER2/neu* a *K-ras*. Aktivace *c-myc* je častým nálezem u pokročilých stadií ovariálních karcinomů, což může být známkou toho, že *c-myc* hraje důležitou roli při progresi onemocnění. Vztah aktivace *c-myc* k odpovědi na chemoterapii nebyl ještě dostatečně prozkoumán.

K-ras

Členové rodiny genů *ras*, *c-H-ras* (Harvey), *c-K-ras* (Kirsten) a *c-N-ras* (neuroblastoma), jsou onkogeny nejčastěji spojovanými se vznikem lidských maligních nádorů (pankreas, kolorektum, plíce). *c-K-ras* byl lokalizován již v roce 1985 na krátkém raménku

Tab. 2.4 Klinické, patologické a molekulární charakteristiky obou typů karcinomu endometria

	typ I	typ II
histotyp	endometroidní	non-endometroidní (serózní papilární)
věk	nižší (pre-, perimenopauzální)	vyšší (postmenopauzální)
předcházející hyperplazie	ano	ne
estrogenní dependence	ano	ne
grade	nízký	vysoký
myometriální invaze	minimální	hluboká
biologické chování	pomalu progredující	rychle progredující
MSI	ano	ne
LOH	ne	ano
genové alterace	<i>PTEN</i> , β - <i>katenin</i>	<i>p53</i>

12. chromozomu (12p12.1). Ačkoli se tři různé *ras* geny liší svou sekvencí, všechny kódují 21 kDa protein, označovaný také $p21^{ras}$. Ras proteiny jsou součástí buněčné membrány a mají GTPázovou aktivitu. Účastní se spouštění růstu a dělení buněk prostřednictvím aktivace kaskády serinových a treoninových proteinkináz, jako RAF-1 nebo MAP kinázy (mitogen activated protein kinases). Ras proteiny mohou být aktivovány širokou řadou podnětů. Patří mezi ně především růstové a diferenciační faktory. Mutovaný K-ras protein ztrácí schopnost spontánní inaktivace a jako trvale aktivní stimuluje autonomně růst a diferenciaci buňky.

Alterace onkogenu *K-ras* jsou pozorovány u karcinomu ovaria poměrně často. Jsou to především bodové mutace v kodonech 12, 13 a 61 (stejně jako u všech ostatních malignit). Řada studií nachází korelaci mezi alteracemi *K-ras* a histologickým typem nádoru; jsou častější u mucinózních nádorů, benigních, borderline i maligních (11–75 % oproti 5–36 % u nemucinózních nádorů). Tyto nálezy podporují hypotézu, že mutační aktivace onkogenu *K-ras* je časovou událostí v procesu vzniku ovariálního mucinózního karcinomu. Pouze několik studií se zabývalo vztahem alterace *K-ras* k prognóze onemocnění. Závěry jsou kontroverzní, některé studie však uvádějí prognosticky nepříznivý efekt těchto alterací. Stejně jako u onkogenu *c-myc* i u *K-ras* není význam aktivace genu pro odpověď na chemoterapii dosud jasně dokumentován. Pouze jedna studie se zabývala odpovědí na terapii platinovými deriváty a nenalezla žádný signifikantní vztah.

Kalikeiny

Kalikeiny tvoří skupinu proteinů s alterovanou expresí v mnoha lidských malignitách. Mnohé z nich byly u karcinomu ovaria popsány jako nezávislé prognostické nebo prediktivní faktory. Zajímavá je

především asociace exprese *hK4* s rezistencí k taxanům.

2.2.2 Molekulární genetika karcinomu endometria

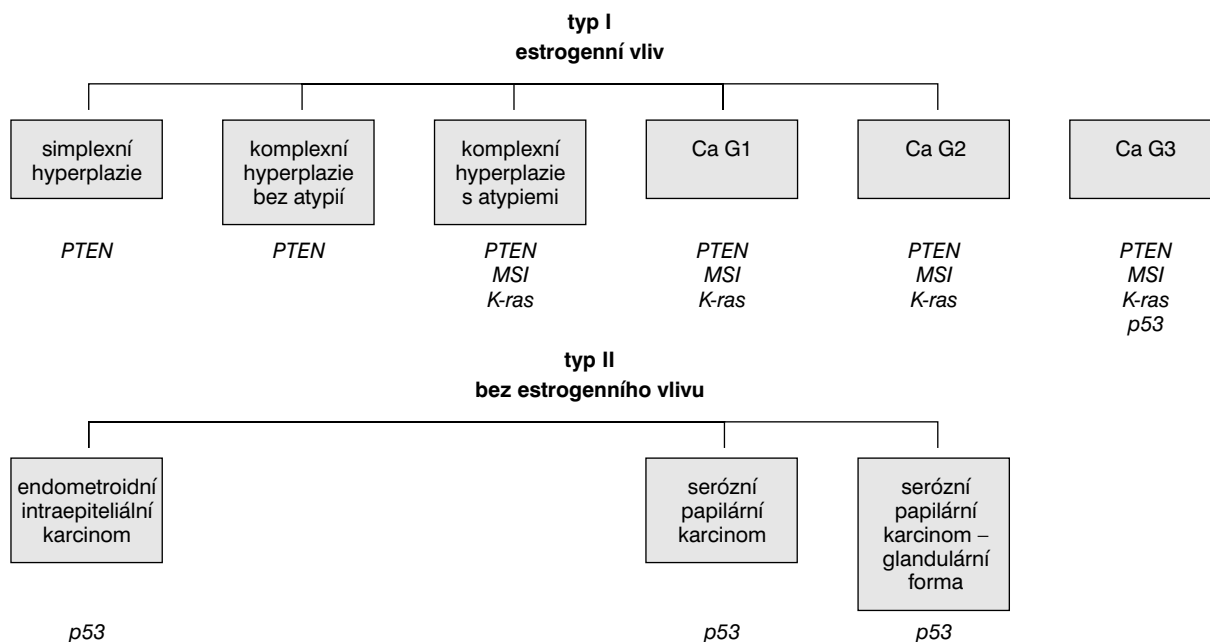
Na základě histologických, biologických a molekulárněgenetických charakteristik můžeme odlišit dva typy endometriálního karcinomu. Tyto dva typy nelze chápat zcela dogmaticky, např. některé non-endometroidní karcinomy zřejmě vznikají na podkladě preexistujícího endometroidního karcinomu (tab. 2.4).

■ Typ I karcinomu endometria

Typ I představuje cca 80 % všech zhoubných nádorů děložní sliznice. Vzniká na základě atypické hyperplazie endometria a je podmíněn estrogenní stimulací. Maximum výskytu je u žen v pre- a perimenopauze. Je doprovázen obezitou, hyperlipidemií, anovulační sterilitou a pozdním nástupem menopauzy. Typicky je takový nádor omezen na dělohu a má příznivou prognózu.

V buňkách těchto nádorů často nacházíme mikrosatelitární instabilitu (MSI, 25–30 %) s předpokladem původní inaktivace (včetně hypermetylace promotorů) genů mismatch repair systému (*MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *PMS2*, *MSH6*). Dále jsou časté především tři alterace: intragenové mutace genů *PTEN* (37–61 %), *K-ras* (10–30 %) a β -*kateninu* (25–38 %). V menší míře jsou nacházeny i mutace genů pro TGF β , Bax a IGF-RII.

Gen *PTEN* je lokalizován na 10. chromozomu (10q23.3). Tento region podléhá ztrátě heterozygozity u 20–30 % karcinomů, intragenové mutace jsou přítomny u 30–80 % nádorů. Mutace genu *PTEN* jsou navíc nacházeny až u 20 % hyperplazií s atypie-



Obr. 2.5 Schéma genových alterací v procesu karcinogeneze jednotlivých typů karcinomu endometria

mi i bez nich, lze tedy předpokládat, že se jedná o časnou událost v procesu karcinogeneze (obr. 2.5). To kontrastuje se zjištěními u jiných nádorů, kde jsou alterace *PTEN* časté (karcinom prostaty, maligní melanom, gliomy) a vznikají v procesu karcinogeneze velmi pozdně.

Protein *PTEN* má fosfatázovou aktivitu na lipidových substrátech, především fosfatidylinositolu. Ten je velmi důležitou molekulou, druhým poslem (second messenger) v signální transdukcí a reguluje fosforylaci proteinkinázy B. Cílem působení fosforylované proteinkinázy B jsou produkty tumor supresorových genů přímo ovlivňující buněčný cyklus (p21, p27) a apoptózu (BAD, MDM2, FKHR). Ztráta funkce *PTEN* tak vede k proliferaci buňky a úniku z kontrolních mechanismů vedoucích k apoptóze.

Spektrum mutací nacházených v genu *PTEN* je široké a zahrnuje všechny tradiční bodové alterace (missense, nonsense, frameshift). Mutace jsou nejčastěji detekovány v exonech 3–5, 7 a 8, ovlivňují ve svém důsledku nejen samotnou přítomnost fosfatázové aktivity, ale také její míru, stabilitu proteinu a jeho subcelulární lokalizaci.

I u 10–20 % endometriálního karcinomu typu I byly pozorovány alterace genu *p53*, většina u nádorů méně diferencovaných. Až polovina nádorů G3 má mutace genu *p53*, vzácně jsou nacházeny u nádorů G2 a nebyly popsány u dobře diferencovaných (G1) nádorů ani u hyperplazie. Zvýšená exprese a mutace *p53* jsou spojeny s horší prognózou. Někte-

rými autory jsou dokonce nediferencované (G3) endometriální karcinomy řazeny pod typ II.

■ Typ II karcinomu endometria

Typ II představuje cca 10 % endometriálních malignit. Histologicky jde zpravidla o papilární serózní karcinomy vyvíjející se z endometriálních polypů nebo prekanceróz v atrofickém endometriu. Nevzniká na podkladě hyperplazie a není závislý na estrogenní stimulaci. Prognóza je horší, častěji pozorujeme hlubokou myometriální a lymfovaskulární invazi. Molekulárně je typický mutacemi genu *p53* a četnými ztrátami heterozygoty (LOH).

Serózní papilární karcinomy endometria byly studovány méně intenzivně než karcinomy endometriální, což odráží především jejich nižší výskyt. Ačkoliv byl výzkum zaměřen na mnoho potenciálních kauzálních genových změn, pouze alterace genu *p53* byly detekovány ve většině nádorů. Některé práce uvádějí, že gen *p53* je alterován až u 90 % těchto karcinomů. Typ II karcinomu endometria má tak poměrně výsadní postavení mezi solidními lidskými malignitami, neboť jen zřídka je to pouze jeden gen s tak zásadním významem pro karcinogenezi. Zároveň se zdá, že je to právě chybějící funkce tumor supresoru *p53*, která dává těmto nádorům vysoký maligní potenciál. U endometriálních intraepiteliálních karcinomů, prekursorů endometriálního karcinomu typu II, nacházíme alterace genu *p53* v 75 %. Zdá se tedy, že k inaktivaci dochází časně v procesu karcinogene-

ze. Tím se nádory typu II také odlišují od typu I, kde nacházíme výpadky funkce genu *p53* až v pozdních fázích, především u nediferencovaných nádorů.

Na rozdíl od typu I jsou u typu II velmi vzácné mutace genů *PTEN* nebo *K-ras*. Mikrosatelitární instabilita nebyla dosud u nádorů typu II popsána. Zdá se, že četnější jsou u typu II alterace genů *c-myc* a *HER2/neu*, dosud však není jasný význam jejich porušené funkce.

■ Méně časté typy karcinomu endometria – nádor z jasných buněk

Clear cell karcinom je poměrně vzácnou variantou karcinomu endometria. V klinicko-patologickém hodnocení nacházíme určité kontroverze ohledně biologického chování tohoto nádoru, pětileté přežití se pohybuje v širokém rozmezí 21–75 %. Karcinom z jasných buněk se může vyskytovat ve své čisté podobě, jasnobuněčná diferenciace však může být přítomna i v nádorech s endometriální, nebo naopak serózní komponentou. I když je jasnobuněčný karcinom řazen do typu II, určitá diskrepance v posuzování jeho biologického chování, molekulární charakteristiky a přítomnost zároveň s endometriální nebo serózní složkou naznačují, že tento typ nádoru zcela nezapadá do tradičního dualistického schématu a může tvořit samostatnou svébytnou jednotku.

Imunohistochemicky, při zaměření na *p53*, *Ki67*, estrogenové a progesteronové receptory, jsou jasnobuněčné nádory ve své čisté formě odlišné od typu I i typu II. Většina jich nenese alterace genů *PTEN* ani *p53*, typické pro jeden z klasických typů. Naopak nádory, které vykazují pouze v části jasnobuněčnou diferenciaci a jejichž základní komponentou je endometriální nebo serózní karcinom, mají vzorec genových alterací typický pro typ I, nebo II. To podporuje, podobně jako u karcinomu vaječníků, monoklonální původ obou komponent těchto nádorů a příslušnost takového karcinomu k jednomu z obou klasických typů.

2.2.3 Molekulární genetika karcinomu děložního hrdla

Největší pozornost je u tohoto nádoru věnována interakci lidského papilomaviru s epiteliální buňkou. HPV je relativně malý neobalený DNA virus velikosti cca 55 nm v průměru. Jeho genom se skládá z jedné cirkulární dvouvláknové molekuly DNA obsahující přibližně 7900 párů bází.

Kódující je pouze jedno vlákno. Funkčně se genom dělí do tří částí: prvních 400–1000 párů bází

zaujímá nekódující sekvence (long control region – LCR). LCR obsahuje tzv. *p97* promotor s enhance-rem a silencerem, tedy sekvencemi, které ovlivňují úroveň exprese. Tento komplex řídí replikaci DNA a reguluje transkripci virového genomu. Tato oblast je podobná tzv. glukocorticoid responsive element – sekvenci DNA, na kterou se váže komplex receptor-steroidní hormon (i progesteron) a indukuje expresi. V některých pracích se tímto efektem vysvětluje zvýšení rizika cervikálního karcinomu u dlouhodobých uživatelů kombinované orální kontracepce.

Druhou část tvoří sekvence časných genů *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7*, které se účastní virové replikace a zasahují do tumorigeneze. Třetí část je tvořena pozdními geny kódujícími kapsidové strukturální proteiny *L1* a *L2*.

K infekci HPV jsou citlivé především buňky bazální vrstvy skvamocelulárního epitelu. Je pravděpodobné, že k infekci je nutné mikrotrauma epitelu. Pokusy o pasážování HPV v prostých tkáňových kulturách selhaly, neboť pro replikaci viru je nutné, aby proběhl proces diferenciace epiteliálních buněk. Množení HPV se tak daří pouze v biologických modelech (xenografty) nebo v pevných kulturách (raft culture systems) umožňujících stratifikaci buněk.

Genom HPV kóduje pouze 8–10 proteinů. Ty však dokáží změnit a „ochotit“ replikační aparát buňky ve prospěch viru. Pro tumorigenezi jsou klíčové dva produkty virových genů – *E6* a *E7*, které interagují s buněčnými tumor supresory, cykliny a cyklin dependentními kinázami, tedy klíčovými faktory regulace buněčného cyklu.

■ Virový onkoprotein E6

Vazba proteinu *E6 high-risk* typu HPV na protein *p53* spouští modifikaci tohoto komplexu buněčnými ubikvitin-ligázami a jeho následnou degradaci. Zásadně je poté alterována regulační funkce *p53* v G1 fázi, spuštění apoptózy a oprav DNA. Inaktivace proteinu *p53* vede k nadměrné tvorbě cyklinu B, který ovlivňuje přechod z G2 do M fáze mitózy. *E6* může navíc aktivovat telomerázu nezávisle na přítomnosti *p53*.

Protein *E6 low-risk* typu HPV neváže *p53* na detekovatelné úrovni a ani v *in vitro* studiích neovlivňuje stabilitu proteinu *p53*.

■ Virový onkoprotein E7

Protein *E7 high-risk* typu HPV se váže na hypofosforylovanou formu proteinů z rodiny produktů *Rb* genů. Vazba vede k rozpojení komplexů *pRb* a transkripčního faktoru *E2F-1*. Uvolněný *E2F-1* spouští

transkripci genů nutných pro přechod z G1 fáze mitózy do S fáze. Navíc může protein E7 interagovat s dalšími promotivními faktory, např. cyklinem E. Důsledkem je stimulace syntézy buněčné DNA a proliferace buňky. E7 nezávisle na pRb indukuje abnormální centrozomální duplikaci.

Protein E7 **low-risk** typů HPV váže protein pRb s nižší intenzitou.

■ Integrace virového genomu do genomu hostitelské buňky

V **low-grade** intraepiteliálních lézích se virová DNA nachází jako extrachromozomální element, zatímco v **high-grade** lézích se virová DNA integruje do genomu hostitelské buňky. To vede nejčastěji k narušení sekvenční genu pro virový protein E2, který potlačuje transkripci genů *E6* a *E7*. Důsledkem je zvýšená exprese těchto dvou genů.

Integrace virového genomu do genomu hostitelské buňky je přímým důsledkem papilomavirem indukované chromozomální instability a je důležitým faktorem v progresi přednádorových lézí. Integrace do hostitelského genomu vede k narušení nebo dysregulaci mnoha důležitých buněčných genů v důsledku inzerční mutagenese.

■ Predispoziční polymorfismus genu *p53*

V roce 1998 byl popsán možný vliv polymorfismu v kodonu 72 genu *p53* na riziko HPV indukované karcinogeneze v cervikálním epitelu. Předpoklad zvýšení rizika byl založen na pozorování, že protein *p53* je efektivněji inaktivován virovým proteinem E6, pokud má v pozici 72 aminokyselinu arginin – ve srovnání s formou, kdy je na pozici 72 prolin. V britské populaci je pro homozygoty arginin/arginin popsáno 7× vyšší riziko HPV asociovaného karcinomu děložního hrdla ve srovnání s heterozygoty arginin/prolin. V české populaci jediná práce toto zvýšení rizika neprokazuje a ani v jiných populacích není dosud význam tohoto polymorfismu zcela jasný.

■ Molekulární cíle v procesu vzniku karcinomu děložního hrdla

I když je více než 99 % karcinomů děložního hrdla spojeno s HPV infekcí, ne všechny HPV pozitivní ženy karcinomem onemocní. Vývoj zhoubného nádoru děložního hrdla je tedy mnohostupňovým procesem, v němž HPV hraje významnou iniciační úlohu. Velká pozornost je věnována identifikaci dalších subcelulárních pochodů, jejichž defekty vznikají v průběhu karcinogeneze. Mezi tyto cíle patří geny *p16*, *Ki67*, *EGFR*, *COX-2* a geny pro keratiny a matrixmetaloproteinázy.

2.3 Metody molekulární genetiky s významem pro klinickou praxi

2.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction) byla vyvinuta v 80. letech minulého století a je široce používanou metodou, která slouží především k získání dostatečného množství materiálu k následným analýzám nebo vytváří dostatečné množství cílové sekvenční k přímé nebo nepřímé detekci.

V izolované DNA je cílová sekvenční, tedy místo v DNA, které chceme zkoumat, v poměru k ostatním sekvencím zastoupena ve velmi malém množství, jež nám většinou neumožňuje detekovat např. změny v základní struktuře (sekvenci) zkoumaného úseku. PCR nám umožňuje cíleně si tento a pouze tento úsek namnožit – amplifikovat tak, aby ve výsledném roztoku představoval naprostou většinu genetického materiálu. Ten lze pak použít k dalším experimentům (např. restrikci nebo sekvenování) nebo přímo detekovat (např. elektroforézou, denaturační kapali-

novou chromatografií/denature high performance liquid chromatography – DHPLC, fragmentační analýzou apod.).

Samotná reakce probíhá v mikrozkuhavce, která je umístěna v termostatu schopném měnit velmi rychle a precizně teplotu (cyklér). V reakční směsi je obsaženo:

- **templátová DNA** (základní materiál, jehož určitý úsek chceme namnožit, amplifikovat),
- **primery** – krátké (obvykle 20–30bázové) úseky jednovláknové DNA; primery jsou dva (označované jako forward a revers), každý komplementární k jinému vlákně DNA a ohraničují amplifikovanou oblast; jejich 3' konce slouží jako „očko“ (místo, od něhož lze začít syntézu) pro DNA polymerázu,
- **DNA polymeráza** – enzym, který napojuje komplementárně deoxynukleosidtrifosfáty (základní stavební kameny DNA) podle templátu stávajícího vlákna DNA na 3'OH skupinu předchozího