

# Patobiochemie nádorů

## Autoři

Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

(bousova@faf.cuni.cz)

Katedra biochemických věd

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zhoubná nádorová onemocnění představují celospolečenský problém, v ČR jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí. Nádor je tvořen nádorovým parenchymem (nádorové buňky) a stromatem (nenádorové buněčné složky a nebuněčné součásti). Nádorové buňky mají na rozdíl od zdravých „nenádorových“ buněk větší schopnost množit se a růst, vyšší odolnost a delší životaschopnost, čímž získávají nad zdravými buňkami převahu. Téměř všechny nenádorové buněčné složky (např. fibroblasty, mezenchymové kmenové buňky, adipocyty, buňky imunitního systému) podporují přežití, růst a šíření nádorového parenchymu díky větší či menší deregulaci. Přeměna zdravé buňky na nádorovou (karcinogeneze) je několikastupňový proces, kdy dochází k postupnému hromadění mutací genů, které kontrolují buněčnou proliferaci, diferenciaci a zánik buňky. Cílem této lekce je přiblížit charakteristické rysy a průběh karcinogeneze, popsat fyzikální, chemické a biologické faktory účastnící se karcinogeneze, popsat růst a metastazování nádorů a uvést přehled nejvýznamnějších biomarkerů nádorových onemocnění. Součástí lekce jsou i bližší informace o programované buněčné smrti (apoptose).

## Základní pojmy

Nádor (tumor, novotvar, neoplazma) lze definovat jako novou a abnormální tkáň autonomní povahy v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nezastává žádnou fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem. Tato do jisté míry autoregulační schopnost každého nádoru se projevuje zejména v oblasti regulace buněčné proliferace a buněčné smrti, kterými se zajišťuje tzv. tkáňová homeostáza. Tkáňová rovnováha je narušena i za fyziologických podmínek, např. tehdy, když jsou nastartovány procesy hojení (reparace), náhrady ztracených tkání (regenerace), nebo obrany proti cizorodým agens (zánět, imunitní reakce). V těchto případech je však zdravý organismus vybaven mechanismy, které dokáží po skončení příčiny a úpravě stavu tento nerovnovážený stav omezit a nadbytečnou proliferaci zastavit (tzv. regulace negativní zpětnou vazbou). Při defektech těchto autoregulačních mechanismů, pravděpodobně vzniklých na podkladě genetické chyby, nastává situace, ze které se nádor může (ale nemusí) vyvinout. Některé z těchto přednádorových stavů se označují jako **prekancerosy** nebo **dysplasie**. Jedná se o změnu tkáně, ve které ještě nezačalo nádorové bujení, ale vznik nádorových novotvarů je statisticky významně častější než ve zdravé tkáni stejného

histogenetického původu a stejné anatomické lokalizace. Jedná se o změny ve tkáni, na jejichž podkladě může vzniknout maligní nádor.

Podle schopnosti infiltrovat jinou tkáň rozeznáváme benigní a maligní nádory. Buňky **benigních (nezhoubných) nádorů** si zachovávají alespoň přibližně vzhled i funkci normálních buněk a především zůstávají v místě svého vzniku (nemigrují, neinvadují do jiných tkání, nezakládají metastasy), okolní struktury jen odtlačují (expanzivní růst) a rostou poměrně pomalu. Buňky, které ztratily většinu vlastností buněk, ze kterých jsou odvozené (ztráta morfologické i funkční diferenciací) a mají snahu pronikat do okolních tkání (invazivita) i na vzdálená místa (metastasy), jsou **buňky maligní**. Tyto buňky se vyznačují značnou agresivitou a velkou životností.

Podle histogeneze (tedy podle buněk/tkání, ze kterých nádory vznikají) rozlišujeme mezenchymové, epitelové, neuroektodermové, smíšené a germinální nádory. Mezenchymové nádory jsou odvozeny z buněk pojiva, svaloviny a cév (např. benigní fibromy, myomy, lipomy, chondromy, osteomy hemangiomy a maligní sarkomy) a z krevních buněk (leukémie a lymfomy – obojí maligní). Epitelové nádory vznikají z povrchového (benigní papilom, maligní adenokarcinom) nebo žlázového epitelu (benigní adenom, maligní karcinom). Neuroektodermové nádory zahrnují nádory CNS (např. benigní gliom, maligní glioblastom), nádory periferních nervů (např. benigní feochromocytom a maligní neuroblastom) a nádory z melanocytů (benigní a maligní melanom). Germinální nádory jsou odvozeny ze zárodečných buněk a embryonální tkáně (např. benigní mola hydatidosa, maligní choriokarcinom, embryom, nádory trofoblastu). Smíšené nádory jsou tvořeny dvěma nebo více typy tkání (např. benigní fibrolipom, fibroadenom, maligní adenosarkom).

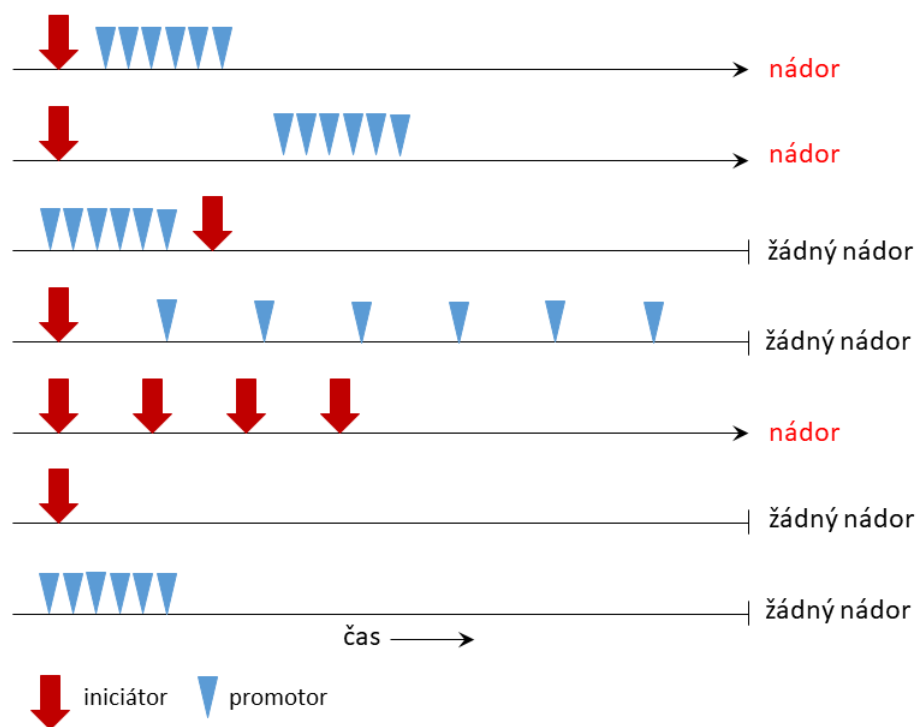
## Nádorová transformace (karcinogeneze)

Přeměna normální buňky na buňku nádorovou (**karcinogeneze**), tedy schopnou autonomního růstu a invaze do okolních tkání, je složitý několikastupňový proces. Dochází při něm k abnormální proliferaci buněk, která není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnováhou organismu. Nádorové buňky se v důsledku genetických změn vymkly kontrole a jejich proliferace pokračuje i po odstranění příčiny vzniku genetických změn. V současnosti se předpokládá, že všechny buňky nádoru mají **monoklonální původ**, vznikají tedy původně z jedné transformované buňky. Rozdíly mezi jednotlivými nádorovými buňkami vznikají v průběhu vývoje nádoru – jedná se tedy o subklony.

Během karcinogeneze se postupně hromadí klíčové genetické a epigenetické mutace. **Genetické mutace** mění primární strukturu DNA konkrétních genů (zejm. genů kontrolujících proliferaci, diferenciaci a zánik buněk) nebo mikroRNA (miRNA), což obvykle způsobí strukturální a funkční narušení příslušných proteinů (u mutací genů) nebo změny v expresi cílových proteinů (u mutací miRNA). **Epigenetické mutace** způsobují narušení sekundární (epigenetické) struktury DNA, která je dána posttranslační úpravou histonů a/nebo DNA (např.

acetylce, methylace, citrulinace, ubikvitinylace). Výsledkem je změna prostorového uspořádání DNA a s ní spojená změna v expresi příslušných genů a miRNA.

Nádorové onemocnění pobíhá v několika fázích. Úvodní etapu karcinogeneze můžeme rozdělit na fázi iniciace a promoce. **Iniciace** představuje nevratný proces, při kterém je vlivem působení karcinogenního faktoru (**iniciátor**) mutován určitý kritický gen. Takto iniciovaná (preneoplastická) buňka, která má potenciál přeměnit se na buňku nádorovou, může přežívat v morfologicky zdravých tkáních léta. Stadium preneoplastické léze je typické klonálním dělením buněk, které mají selekční výhodu proti nenádorovým buňkám. Ve fázi **promoce** jsou iniciované buňky vystaveny působení faktorů, které se označují jako **promotory** (např. chemické karcinogeny, ionizující záření, zánět). Ty nejsou schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, jen ji podpořit. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon stimulován, a naopak odstranění podpůrných faktorů může proces karcinogeneze zpomalit nebo i zastavit. Díky stimulaci proliferace klonu nádorových buněk, potlačení oprav DNA a apoptosy během fáze promoce je usnadněn vznik dalších genetických a epigenetických změn, které buňku nevratně směřují do plně maligního fenotypu. Rozdíly v působení iniciátoru a promotoru jsou uvedeny v Obr. 1.



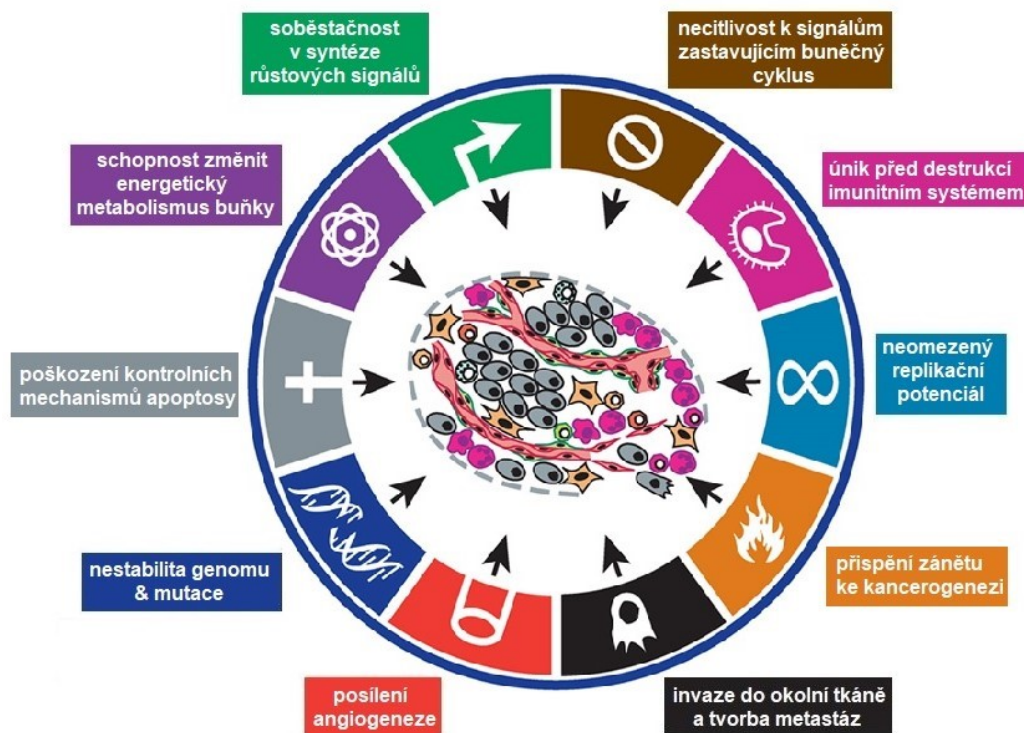
Obr. 1. Rozdíl v působení iniciátoru (mutagen) a promotoru (není mutagen) nádoru v čase a možné výsledky (upraveno z Alberts a kol. 2007).

V pozdějších fázích vývoje nádoru (**progrese**) dochází k hromadění dalších mutací (zejm. změny počtu chromosomů a jejich přestavby), následkem čehož stoupá rychlost proliferace nádorových buněk a jejich invazivita, nádorová tkáň získává schopnost tvořit nové

cévy (angiogeneze) a metastázovat do okolních tkání. Preneoplastická populace se nevratně mění na neoplastickou a benigní nádor přechází do maligního stádia.

## Buněčné a molekulární základy nádorového onemocnění

Díky různorodým genomickým a epigenomickým změnám získávají nádorové buňky během karcinogeneze jedinečné fenotypové vlastnosti. Všechny nádory se projevují osmi základními změnami v buněčné fyziologii, které jsou považovány za typické znaky nádoru (Obr. 2). **Typické znaky nádorových buněk** zahrnují: 1) soběstačnost v produkci růstových signálů (aktivace onkogenů), 2) necitlivost k signálům zastávujícím buněčný cyklus (inaktivace tumor-supresorových genů), 3) schopnost přeprogramovat energetický metabolismus buňky (Warburgův efekt – posílení aerobní glykolýzy a potlačení mitochondriálního metabolismu), 4) schopnost obejít apoptosu, 5) nepřetržitá tvorba nových kapilár (angiogeneze), 6) schopnost invadovat a tvořit metastázy, 7) neomezený replikační potenciál (nesmrtelnost) a 8) schopnost uniknout před imunitní odpovědí hostitele. Získání genetických a epigenetických alterací, které tyto charakteristické rysy propůjčují, může být urychleno nestabilitou genomu nádorových buněk a zánětem podporujícím nádorové bujení. Ty jsou považovány za umožňující charakteristiky, protože podporují buněčnou transformaci a následnou progresi nádoru. Ovšem vlastní průběh karcinogeneze je individuální a pořadí i počet získaných vlastností se u jednotlivých nádorů liší, stejně tak se nádory liší i konkrétními zasaženými geny.



Obr. 2. Charakteristické rysy nádorových buněk (upraveno z Hanahan a Weinberg 2011)

Maligní nádor vzniká na podkladě kumulace somatických alterací určitých genů vyvolaných genotoxickým působením fyzikálních, chemických nebo biologických vlivů. Vznik maligního nádoru u postiženého jedince může být urychlen existencí hereditárních mutací. Na jeho rozvoj mají významný dopad i epigenetické faktory ovlivňující expresi genetické informace. U solidních nádorů dochází v průběhu karcinogeneze k nahromadění průměrně šesti až osmi kritických mutací, tedy mutací, které jsou přímým podkladem maligní transformace nádorových buněk. Mezi kritické mutace patří aktivace protoonkogenů, inaktivace anti-onkogenů (tumor-supresorových genů), zvýšení exprese inhibitorů apoptosy a mutace genů řídících průběh buněčného cyklu.

### Protoonkogeny a jejich aktivace

**Protoonkogeny** jsou vysoce konzervované normální geny přítomné v genomu všech buněk. Jejich produkty se podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptosy normálních buněk. Působí jako pozitivní regulátory buněčného dělení (stimulace dělení) a negativní regulátory apoptosy (inhibice apoptosy). Protoonkogeny snadno podléhají genetickým změnám, které umožní jejich aktivaci. Pokud jsou aktivovány nebo modifikovány na strukturní nebo kontrolní úrovni, začnou se chovat jako **onkogeny** a podporují vývoj nádoru. V současnosti je známo asi 100 onkogenů. Mutace, které vedou ke změně protoonkogenů na onkogeny, jsou aktivující a dominantní (stačí změna jedné alely).

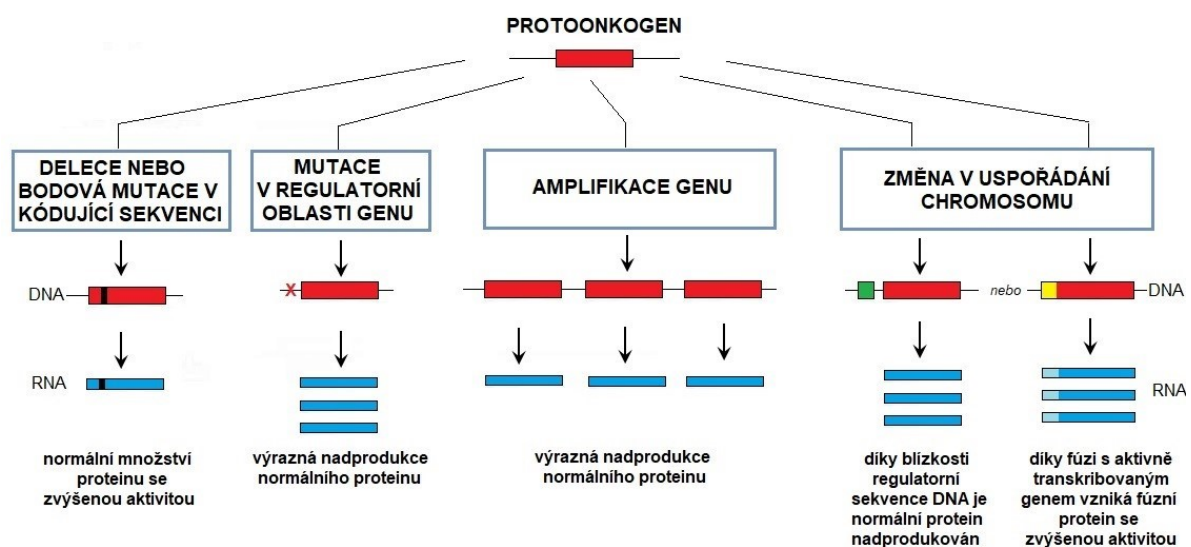
Onkogeny byly objeveny díky retrovirům nesoucím virové analogy buněčných onkogenů. Tyto **virové onkogeny** byly objeveny při studiu genomu těchto virů dříve než onkogeny buněčné, což podporovalo představu o obecném virovém původu nádorů. Technikami hybridizace se však zjistilo, že normální buňky mají identické nebo podobné sekvence jako tyto virové onkogeny. Ty jsou tedy odvozeny od lidských (obecně eukaryontních) „protoonkogenů“, které byly přetaženy z hostitelské buňky a zabudovány do genomu retroviru v průběhu jeho životního cyklu.

Názvy jako onkogen a protoonkogen sugerují představu, že funkcí těchto genů je navodit nádorovou transformaci buňky. Teprve později se zjistilo, že protoonkogeny jsou významné geny, jejichž produkty představují molekuly, účastníci se řádných buněčných dějů, jakými jsou diferenciaci, regulace, signalizace nebo recepce signálů.

Nomenklatura těchto genů je většinou odvozena od primárně zjištěného účinku virového onkogenu, vžila se a používá se i nyní, kdy je už známa normální buněčná funkce příslušné molekuly. Např. názvy *ras* pro gen a *ras* pro příslušný protein jsou odvozeny od toho, že tyto geny byly objeveny v retrovirech, způsobujících sarkom u potkanů: rat sarcoma  $\Rightarrow$  *ras*. Podobně *sis* od simian sarcoma (opičí sarkom), *fes* od feline sarcoma (kočičí sarkom) atp. (podrobnější informace jsou uvedeny dále v textu). V kontextu virové transformace pak označujeme buněčný protoonkogen jako *c-onc* a jeho virovou formu jako *v-onc* (např. *v-ras* a *c-ras*).

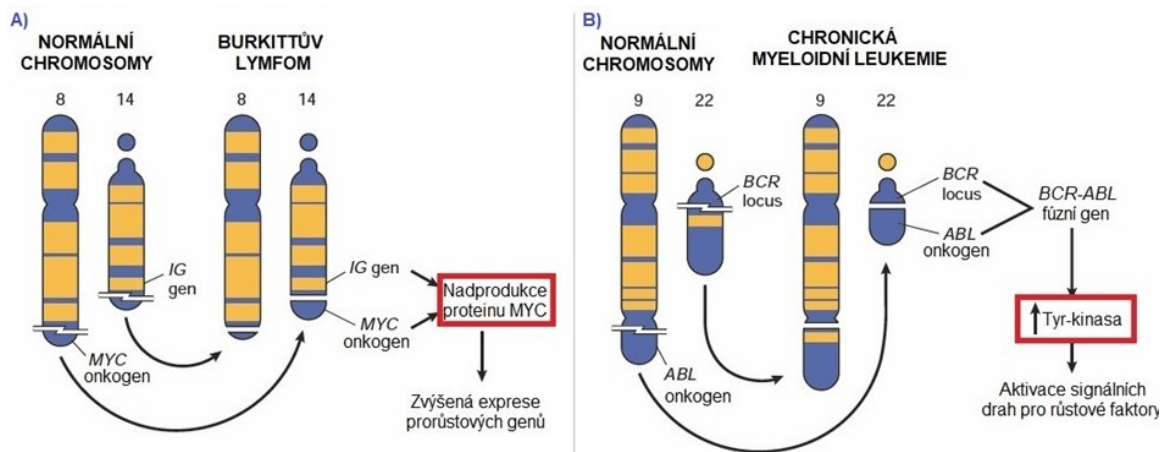
Protoonkogeny regulují replikaci DNA a přenosy signálu přes své produkty - proteiny. Protoonkogeny můžeme dělit **podle funkce jejich produktu** na růstové faktory, receptory pro růstové faktory, cytoplasmatické proteiny (proteinkinasy a G-proteiny), jaderné proteiny. Znamé produkty protoonkogenů a onkogenů spadají do několika funkčních skupin a jsou označovány třemi písmeny: růstové faktory (*sis*, *hst*), receptory pro růstové faktory (*erbB*, *fms*, *kit*) a tyrosinkinasy (*src*, *fgr*, *fcs*, *trk*), membránově-vázané analogy proteinů vážících GTP (*gsp*, *gip*, *ras*) cytoplasmatické serinové a threoninové kinasy (*mil*, *mos*, *raf*), jaderné proteiny fungující jako aktivátory transkripce (*myb*, *myc*, *fos*, *jun*). U řady lidských nádorů byla prokázána zvýšená exprese členů jednotlivých tříd, která pak přispívá k řadě vlastností nádorů (např. buněčná proliferace, invazivita a tvorba metastáz).

Způsoby **aktivace** a změny **protoonkogenu** na onkogen jsou uvedeny v Obr. 3. Jejich výsledkem je narušení struktury protoonkogenu, nebo zvýšení jejich exprese. Mechanismy aktivace protoonkogenů zahrnují mutace, genové amplifikace a chromosomální přestavby. Malá změna DNA (bodová mutace nebo delece) v kódující oblasti genu může způsobit vznik proteinu se zvýšenou aktivitou, zatímco tato změna v regulatorní oblasti daného genu může vyvolat nadprodukcii normálního proteinu. Chyby v replikaci DNA mohou být příčinou zvýšení počtu kopií genu (amplifikace), což může vést k redundantní replikaci DNA a nadbytečné expresi (nadprodukcii) normálního proteinu. Chromosomální přestavba (translokace) v kódující sekvenci genu může vyvolat fúzi protoonkogenu s jiným genem, jejímž výsledkem bude vznik fúzního (chimerního) proteinu se zvýšenou aktivitou (např. Filadelfský chromosom u chronické myeloidní leukemie). Naproti tomu alterace v regulatorní oblasti genu, jako je přemístění genu k vysoce aktivní promotorové sekvenci (např. poblíž genů pro imunoglobuliny nebo T-receptory), mohou způsobit, že gen bude přepisován mnohem častěji než za normálních podmínek (např. Burkittův lymfom). Mutace v buněčném genomu vedoucí k maligní transformaci mohou být způsobeny také onkogenními viry (nejčastěji retroviry, viz dále).



Obr. 3. Způsoby aktivace a změny protoonkogenu na onkogen (upraveno z Alberts a kol. 2007)

Jako příklady chromosomálních aberací, které jsou příčinou aktivace protoonkogenu, uvádíme translokaci genu *c-myc* (Burkittův lymfom) a vznik Filadelfského chromosomu (chronická myeloidní leukemie). U **Burkittova lymfomu** dochází k chromosomové přestavbě a to sice k translokaci mezi osmým a čtrnáctým chromosomem t(8;14), která je vyvolána virem Epstein a Barrové. Buněčný protoonkogen *c-myc* je přemístěn z 8. chromosomu na chromosom 14, kde se dostává do blízkosti aktivního promotoru genu pro těžký imunoglobulinový řetězec. Následně dochází k neregulované expresi genu *c-myc*, který kóduje transkripční faktor C-MYC podílející se na regulaci buněčného cyklu, apoptosy a buněčné transformace (Obr. 4A). V případě **Filadelfského chromosomu**, který je typický pro myeloidní leukemie, dochází k translokaci protoonkogenu *abl* z 9. chromosomu na chromosom 22 t(9;22). Protoonkogen *abl* se při translokaci připojí uprostřed genu *bcr*, který má silný promotor. Vzniká fúzní gen *bcr-abl*, který po přepisu poskytuje fúzní protein BCR-ABL. Produkt genu *abl* na původní pozici fyziologicky stimuluje buněčnou proliferaci (má tyrosinkinasovou aktivitu), zatímco fúzní protein BCR-ABL stimuluje buňky k nekontrolovatelnému dělení (Obr. 4B).



Obr. 4. Chromosomální translokace u Burkittova lymfomu a chronické myeloidní leukemie (upraveno z Kumar a kol. 2014)

### Tumor-supresorové geny

Buněčné dělení je kromě pozitivní stimulace růstovými faktory či hormony řízeno rovněž negativní regulací. Tuto negativní regulaci zprostředkovávají produkty **tumor-supresorových genů** (antionkogenů), které potlačují proliferaci buněk, působí jako kontrolní body buněčné proliferace nebo programované buněčné smrti. Tyto proteiny tedy fungují jako negativní regulátory buněčného cyklu (antiproliferační signály, inhibice mitosy a buněčného růstu) a pozitivní regulátory apoptosy (navození buněčné smrti). Odhaduje se, že v lidském genomu je přítomno asi 30 tumor-supresorových genů. Transkripce tumor-supresorových genů je aktivována při buněčném stresu nebo poškození, aby se zabránilo abnormální proliferaci a přenosu poškozené genetické informace. Mutace, delece nebo epigenetická regulace (např. metylací DNA) těchto genů umožňuje proliferaci postižené buňky a výrazně zvyšuje riziko vzniku nádoru. Mutace zasahující tumor-supresorové geny jsou inaktivující a recesivní (nutná

změna obou alel – teorie dvojího zásahu). Rozdíly mezi onkogeny a tumor-supresorovými geny jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tab. 1. Některé rozdíly mezi onkogeny a tumor-supresorovými geny (upraveno z Rodwell a kol. 2015)

Onkogeny	Tumor-supresorové geny
Mutace v jedné ze dvou alel je dostatečná pro aktivitu, je dominantní vůči divokému typu	Mutace v obou alelách nebo v jedné s následnou ztrátou nebo redukcí homozygotnosti v druhé
„Získání funkce“ u proteinu, který spouští buněčné dělení	Ztráta funkce proteinu
Mutace vznikají v somatických tkáních, nejsou dědičné	Mutace jsou přítomné v zárodečné buňce (mohou být dědičné) nebo v somatické buňce
Preference některých tkání	Silná tkáňová preference (např. vliv <i>Rb1</i> genu v sítnici)

Mezi známé tumor-supresorové geny patří gen *Rb*, *APC*, *p53* nebo *BRCA 1/2*. Předpokládá se, že v některých případech je to právě ztráta funkce genů kódujících tyto proteiny, co způsobuje vývoj nádoru. Prvním objeveným tumor-supresorovým genem byl **retinoblastomový gen *Rb***, který je zapojen do regulace buněčného cyklu. Produkt tohoto genu protein pRb váže transkripční faktory E2F, které jsou nutné při přechodu buňky z G<sub>1</sub> do S fáze. Cyklin-dependentní kinasy fosforylují a tím inaktivují pRB, po fosforylaci se totiž změní konformace pRb a dojde k uvolnění faktoru E2F, který stimuluje transkripci genů nutných pro postup buňky do S fáze (např. cykliny A a E a enzymy replikace DNA). V případě mutace genu *Rb* nebo při sekvestraci pRb proteiny adenovirů či papilomavirů dojde ke vzniku maligního nádoru sítnice – retinoblastomu.

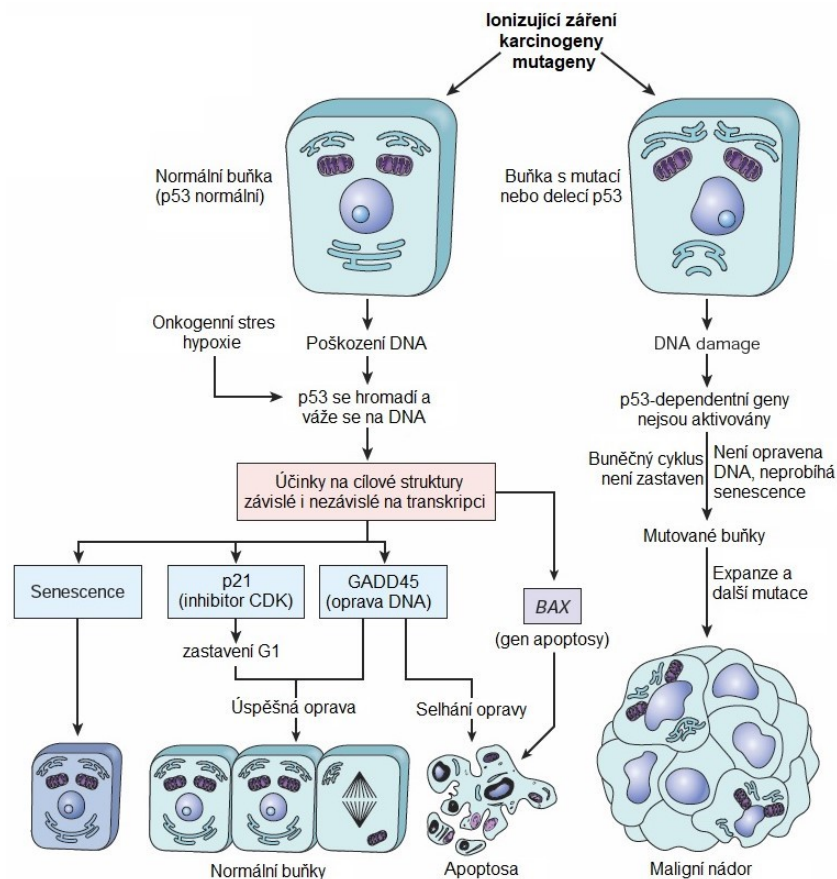
**Protein p53** („strážce genomu“) je transkripční faktor, který je aktivovaný při poškození DNA, a brání růstu a rozvoji nádorů. Tento protein je klíčový pro udržení genetické stability buňky, protože omezuje poškození genomu. V normálních buňkách je exprese p53 velmi nízká a zvyšuje se při oxidačním stresu a po ozáření UV světlem. Při poškození DNA navozuje protein p53 v jádře zvýšení transkripce genu pro protein p21, který inhibuje cyklin-dependentní kinasy (CDK) a dočasně tak zastavuje buněčný cyklus v G<sub>1</sub> fázi. Následně protein p53 indukuje opravy DNA prostřednictvím stresových proteinů GADD45<sup>1</sup> a pokud je DNA neopravitelně poškozená, pak indukuje apoptosu buňky cestou regulátoru apoptosy BAX<sup>2</sup>. Nefunkční p53 způsobí, že poškozené/mutované buňky pokračují v buněčném cyklu, umožní

<sup>1</sup> GADD45 = Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45

<sup>2</sup> BAX = Bcl2-Associated Protein X (Bcl-2 = B-Cell Lymphoma-2)



poškozeným buňkám vyhnout se apoptose a umožní vznik genetické nestability s následnou akumulací mutací (Obr. 5). Mnohostrannost p53 naznačuje, že jeho mutace je zdrojem řady poruch. Mutace p53 patří mezi nejčastější genetické změny v lidských nádorech a byly popsány až u poloviny všech lidských nádorů. Pokud jedinec zdědí od rodičů pouze jednu funkční alelu genu p53, je predisponován k rozvoji nádorového onemocnění a obvykle se u něj v dětství či v časně dospělosti vyvine několik zhoubných nádorů v různých tkáních (např. osteosarkomy a sarkomy měkkých tkání, karcinom prsu, adenokarcinom dřeně nadledvin, nádory CNS, leukémie). Toto onemocnění se označuje jako Li-Fraumeniho syndrom.



Obr. 5. Úloha p53 v zachování integrity genomu (upraveno z Kumar a kol. 2014).

### Poruchy reparačních genů

Na vzniku nádorů se podílejí rovněž poruchy reparačních genů, které zabezpečují zachování genetické stability, které je pro přežití organismu nezbytné. Genetická stabilita je zajištěna velmi přesnou replikací DNA a reparací případných mutací. Opravné procesy poškozených bazí, abazických segmentů či jednořetězcových zlomů se významně liší od opravných procesů dvouřetězcových zlomů DNA. Integrita DNA je v průběhu buněčného cyklu pravidelně kontrolována v klíčových kontrolních bodech („checkpoint“) mezi fázemi G<sub>1</sub> a S, v průběhu syntézy DNA, po dokončení syntézy DNA mezi fázemi S a G<sub>2</sub> a mezi fázemi G<sub>2</sub> a M. V případě poškození DNA zastavují produkty reparačních genů buněčný cyklus a dávají buňce možnost opravy chyb. Mezi opravné geny patří geny kódující různé proteinkinasy,

např. „checkpoint“ kinasy 1 a 2, jejichž aktivace zastavuje buněčný cyklus v bodech G<sub>1</sub>-S a G<sub>2</sub>-M, nebo kinasy ATM a ATR<sup>3</sup>, které se uplatňují v reparaci dvouřetězcových zlomů DNA. Mutace opravných genů samy o sobě neposkytují buňce možnost nekontrolované proliferace, ale zvyšují frekvenci výskytu mutovaných protoonkogenů a tumor-supresorových genů.

### Telomery a telomerasy - imortalizace buněk

Normální somatické buňky mají omezený počet dělení a tedy i délku života. U lidských somatických buněk je maximální počet dělení (tzv. Hayflickův limit) kolem 60-70, po jeho překročení se již buňka nemůže dělit, nastává ireverzibilní zástava růstu a buňka vstoupí do období senescence, které může vyústit v apoptózu. Senescentní buňka se sice nemůže dělit, ale zůstává metabolicky aktivní. Podstatou Hayflickova limitu je zejm. postupné zkrácení telomer pod kritickou délkou, která již neumožňuje další replikaci chromozomu.

**Telomery** jsou koncové části jaderných chromosomů eukaryot. Jedná se o vysoce konzervované nukleoproteinové komplexy, které obsahují tandemově se opakující sekvence DNA bohaté na guanin (TTAGGG) obalené specifickými proteiny, které telomery chrání před degradací. Telomery jsou klíčovým stabilizačním faktorem koncových částí chromosomu, umožňují rozpoznat přirozené konce chromosomů od míst s dvouřetězcovými zlomy, chrání DNA před působením degradačních enzymů (např. DNA-exonukleas) a uplatňují se při replikaci DNA.

Replikace DNA vyžaduje pro tvorbu nového vlákna DNA-polymerasu, deoxyribonukleotidy a primer, což je oligonukleotidová sekvence RNA, která se na základě komplementarity bazí připojuje k vlákně DNA a umožňuje zahájit jeho replikaci. U vyšších živočichů nemůže DNA-polymerasa sama iniciovat syntézu nového vlákna DNA a iniciaci tedy zajišťuje navázání na primer. Po ukončení replikace je primer odstraněn. Vzhledem k tomu, že DNA-polymerasa umí přidávat nové nukleotidy pouze na 3' konec nově vznikajícího řetězce DNA, nemůže DNA-polymerasa po odstranění primeru na 5' konci dceřiného vlákna nahradit odstraněné sekvence nukleotidů primeru, takže dceřiné vlákno DNA je na 5' konci po každé replikaci kratší. Proto jsou na koncích chromosomů přidány repetitivní nekódující sekvence – telomery, na nichž se odehrává zkracování DNA po replikaci. Během každé replikace dojde ke zkrácení o 50 – 200 párů bazí. Když dosáhnou telomery kritické délky, je odkrytý konec chromosomu buněčnými mechanismy vyhodnocen jako dvouřetězcový zlom a dojde k aktivaci kontrolních bodů pRB a p53, které zastaví proliferaci (tzv. fáze mitotické krize). Buňka přechází do senescence a může být aktivována apoptosa.

Tento mechanismus je u nádorových buněk narušen aktivací genu kódujícího enzym **telomerasu**. Jedná se o reverzní transkriptasu, která rozšiřuje telomerické TTAGGG opakované sekvence na konci chromosomů, čímž vzniká templát pro dosyntetizování opožděujícího se řetězce. Telomerasa tak blokuje stárnutí a umožňuje buňce neomezeně se dělit

---

<sup>3</sup> ATM = Ataxia Teleangiectasia Mutated; ATR = Ataxia Teleangiectasia and Rad3-Related

(imortalizace). Většina lidských buněk nemá aktivní telomerasu (gen je však přítomný v genomu všech buněk), výjimkou jsou zárodečné, embryonální a hematopoetické buňky. Nádorové buňky jsou schopné obnovit aktivitu telomerasy, což jim umožní neomezeně se dělit.

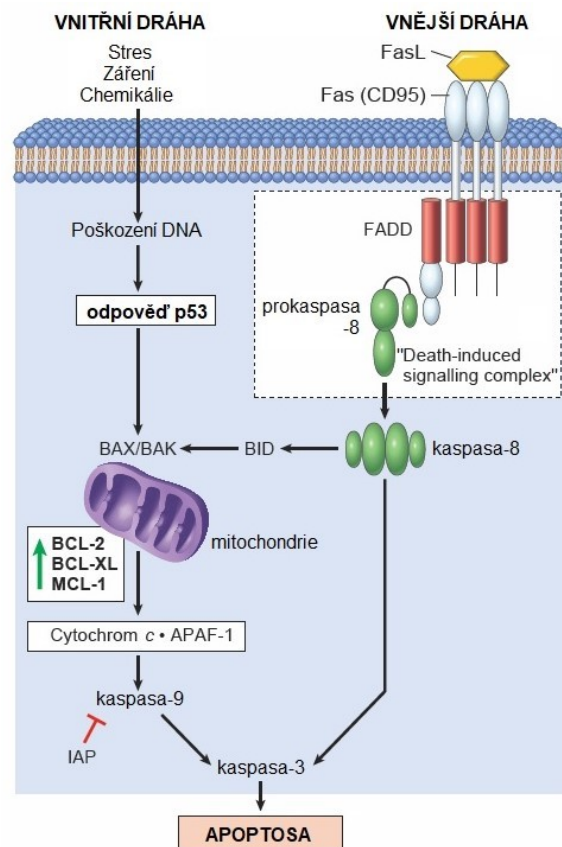
Imortalizované buňky vznikají ve stadiu mitotické krize. Příčinou bývá inaktivace p53 a pRB, zvýšená exprese onkogenů c-Myc a Ras a vážná poruchy genomové stability. Ve stadiu krize dochází k aktivaci dráhy, která spojí odhalené konce dvou nehomologních chromosomů za vzniku fúzního dicentrického chromosomu, který je v další anafázi rozštěpen a tak vzniknou další dvouřetězcové zlomy DNA. Při každém dalším dělení se poškození genomu zvětšuje díky cyklu zlom-fúze-přemostění, buňka se tak ocitá na prahu mitotické katastrofy a buněčné smrti. Pokud je buňka schopná reaktivovat telomerasu, může pak prodloužit své telomery, obnovit chromosomální stabilitu a přežít. Takové buňky však pravděpodobně utrpěly poškození onkogenů a tumor-supresorových genů a je u nich značné riziko maligní transformace. Prakticky u všech typů nádorů jsou telomery zachovány a v 85-95 % případů je to díky upregulaci telomerasy. Zbývající nádory používají k udržení délky telomer mechanismus ALT (alternativní prodloužení telomer), který pravděpodobně závisí na rekombinaci DNA.

## Apoptosa

K akumulaci neoplastických buněk může docházet nejen díky aktivaci onkogenů nebo inaktivaci tumor-supresorových genů, ale i díky mutacím v genech regulujících apoptosu. **Apoptosa** je jedním z mechanismů programované buněčné smrti, dalšími typy jsou např. autofagie, anoikis, nekroptosa či kornifikace. Jedná se o fyziologický proces, který slouží k odstranění nepotřebných nebo poškozených buněk. Buňka umírající apoptoticky vykazuje charakteristické morfologické znaky (např. kondenzace a fragmentace chromatinu, tvorba výběžků cytoplazmatické membrány, celkové zmenšení buňky a nakonec rozpad buňky na tzv. apoptotická tělíčka), které ji odlišují od nekrotických buněk. V apoptotické buňce jsou aktivovány cysteinové proteasy – **kaspasy**, které štěpí řadu cílových proteinů, a nukleasy, degradující DNA. Kaspasy se dělí na iniciátorové a efektorové. Iniciátorové kaspasy (CASP-8, -9, -10) interagují s proteiny spouštějícími apoptosu, aktivací těchto kaspas dojde ke spuštění efektorových kaspas (CASP-3, -6, -7) a programované buněčné smrti.

V buňce existují dvě základní dráhy (vnitřní a vnější), jejichž spuštění vede k aktivaci kaspas a apoptose. **Vnitřní (mitochondriální) dráha** je aktivována celou řadou intracelulárních podnětů (např. poškození DNA, oxidační stres, přetížení buňky  $Ca^{2+}$ , nahromadění chybně složených proteinů v ER, nedostatek signálů pro přežití atd.). Do její regulace se zapojuje celá řada proapoptotických (p53 a BAX) i anti-apoptotických proteinů (rodina Bcl-2). Pokud převáží proapoptotické signály, dojde k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP) a následnému úniku cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytoplasmy, který spolu s proteinem Apaf-1 aktivuje proCASP-9 na aktivní CASP-9. Z mitochondrií jsou dále uvolňovány proteiny Smac/Diablo, Arts či proteasa Omi/HtrA2, které vážou a inaktivují anti-apoptotické proteiny IAP („inhibitors of apoptosis“) přítomné

v cytoplasmě. **Vnější (receptorová) dráha** je aktivována vazbou extracelulárních ligandů smrti (TRAIL, FasL, TNF<sup>4</sup>) na membránové receptory smrti (DR4/ DR5, Fas, TNFR<sup>5</sup> a další), které přes další adaptorové proteiny aktivují proCASP-8 a proCASP-10. Obě dráhy posléze konvergují do společné apoptotické dráhy, která začíná aktivací efektorových kaspas. Aktivované iniciátorové CASP-8, -9 a -10 aktivují efektorové kaspasy (CASP-3, -6 a -7) zajišťující inaktivační či aktivační štěpení řady proteinů, jako jsou regulátory apoptosy, proteiny související s buněčnou adhezí, cytoskeletem, strukturou jádra, buněčným cyklem, opravou a syntézou DNA, což nakonec vyústí v eliminaci buňky poškozené nebo z jiných důvodů určené k likvidaci (Obr. 6).



Obr. 6. Vnitřní a vnější cesta apoptosy (upraveno z Kumar a kol. 2014)

V nádorových buňkách je mutována celá řada proteinů, jež přímo či nepřímo ovlivňují rezistenci buněk k indukci apoptosy. Byly detekovány mutace proteinů, které jsou přímou součástí jak vnější dráhy (vzácněji), tak vnitřní dráhy od mitochondriálních regulátorů po kaspasy. Mezi mechanismy, které nádorovým buňkám umožňují uniknout buněčné smrti, patří mutace/ztráta p53, snížené vyplavení cytochromu c díky upregulaci anti-apoptotických faktorů (např. Bcl-2), ztráta Apaf1, upregulace inhibitorů apoptosy IAP, snížené množství receptoru smrti CD95 a inaktivace „death-induced signaling complex“. Dobře popsaná je úloha Bcl-2

<sup>4</sup> TNF = Tumor Necrosis Factor; TRAIL = TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; FasL = First Apoptosis Signal Ligand

<sup>5</sup> DR = Death Receptor; Fas = First Apoptosis Signal; TNFR = TNF Receptor

v protekci maligních lymfoidních buněk před apoptosou. U většiny hematopoetických a solidních tumorů je nadměrně exprimován alespoň jeden člen anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (díky translokaci genu do blízkosti silného promotoru imunoglobulinu), což naznačuje, že únik před apoptosou má velký význam v rozvoji a progresi nádorových onemocnění. Nadměrná exprese členů rodiny Bcl-2 je významným faktorem rezistence nádorů k terapii, protože při chemo- i radioterapii jsou nádorové buňky usmrcovány právě díky indukci apoptosy.

## Angiogeneze

**Angiogeneze (proces novotvorby krevních kapilár)** je komplexní proces, který má zásadní význam pro růst nádoru, jeho invazivitu a metastázování. Angiogeneze je kontrolována rovnováhou mezi **proangienními faktory** (např. VEGF, bFGF, PDGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , hormony – estrogeny, erythropoetin, NO, VCAM-1, E-selektin, cyklooxygenasa 2<sup>6</sup>) a **angienními inhibitory** (např. thrombospondin-1, interferon  $\alpha/\beta$ , prolaktin, angiostatin, endostatin, vasostatin), u nádorů je tato rovnováha posunuta ve prospěch promotorů angiogeneze. Nádor (metastáza) potřebuje ke svému růstu přísun živin a kyslíku a odsun odpadních látek. Kromě toho jsou kapiláry v nádoru cestou, kterou se nádorové buňky dostávají do oběhu a mohou tak metastazovat. Pokud nádor nezíská schopnost novotvořit cévy, nemůže po dosažení velikosti zhruba 1-2 mm<sup>3</sup> dále růst (cca 100-200  $\mu$ m od cévy - překročení difuzního limitu pro kyslík). V počátku vývoje nemá většina lidských nádorů schopnost tvořit cévy a pravděpodobně po léta zůstávají malé nebo *in situ*, dokud není toto stadium ukončeno tzv. angienním přepnutím a nezačnou se tvořit nové cévy. Jeho příčinou je jednak zvýšená tvorba angienních faktorů nebo ztráta inhibitorů angiogeneze vlastními nádorovými buňkami, buňkami zánětu nebo dalšími buňkami nádorového stromatu, a tvorba proteas nádorovými buňkami nebo buňkami stromatu. Relativní nedostatek kyslíku díky hypoxii stabilizuje transkripční faktor HIF1 $\alpha$ <sup>7</sup>, který po translokaci do jádra aktivuje transkripci proangienních cytokinů VEGF a bFGF. Tyto faktory vytvářejí angienní gradient, který stimuluje proliferaci buněk endotelu a řídí růst nových cév k nádoru. Při novotvorbě cév nejprve endoteliální buňky stávajících cév proteolyticky rozloží bazální membránu pomocí plasminu a matrix metalloproteinas (MMP, některé typy proteolyticky aktivovány plasminem) a zahájí migraci do stromatu sousedních tkání, kde následně proliferují.

Mutace zasahující tumor-supresorové geny nebo onkogeny u nádorů může posunout rovnováhu ve prospěch angiogeneze. Ve zdravých buňkách p53 stimuluje expresi antiangienních faktorů (thrombospondin-1) a brání expresi proangienních molekul (VEGF). V nádorových buňkách s mutovaným p53 tak dojde k posílení angiogeneze. Transkripce VEGF je ovlivněna též signály z RAS-MAP kinasové dráhy, takže v případě mutací genů *ras* a *myc* je

---

<sup>6</sup> VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor; bFGF = bazický fibroblastový růstový faktor; PDGF = růstový faktor destiček; TGF $\beta$  = transformující růstový faktor  $\beta$ ; VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule

<sup>7</sup> HIF1 $\alpha$  = Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$

exprese VEGF upregulována. U velkého množství pacientů s nádorovými onemocněními lze detekovat zvýšené hladiny VEGF a bFGF v séru a moči.

### Invazivita a vznik metastáz

Invazivita a tvorba metastáz jsou výsledkem komplexních interakcí mezi nádorovými buňkami a normálním stromatem a jsou hlavní příčinou morbidity a mortality nádorových onemocnění. Metastázováním nádoru rozumíme jeho šíření do oblastí anatomicky vzdálených primárnímu ložisku. Tvorba metastáz velmi úzce souvisí se schopností tvořit nové cévy. Faktory, které se uplatňují v angiogenezi se více či méně podílejí i na tvorbě metastáz. Metastázování je složitý vícestupňový proces, který probíhá ve čtyřech etapách označovaných jako **metastatická kaskáda: invaze – transport – nidace – růst metastázy**.

První etapou metastatické kaskády je **invaze nádoru do okolí**, během níž dochází k průniku nádorových buněk extracelulární matrix (ECM) okolní tkáně a dále přes bazální membránu endotelu do lumina cévy. Invaze do okolí začíná uvolněním nádorových buněk díky výrazné/úplné **ztrátě adheze** vlivem inaktivující mutace nebo snížené exprese membránového glykoproteinu E-kadherinu, který se významně podílí na udržení pevných intercelulárních adhezí. Mutace E-kadherinu se velmi často vyskytuje u pacientů s různými typy epiteliálních nádorů (např. karcinom prsu, tlustého střeva, ovaria, žaludku). Ztráta adhezivity a **zvýšení motility** nádorových buněk je jedním z charakteristických rysů přeměny epiteliálních nádorových buněk na mezenchymovální fenotyp. Druhým krokem invaze je překonání bazální membrány ECM. Rozklad ECM je zprostředkován **proteolytickými enzymy MMP**, které působí na bazální membránu ECM i bazální membránu endotelií a usnadňují tak angiogenezi. MMP secernují buď samotné nádorové buňky, nebo buňky nádorového stromatu, které jsou indukovány růstovými faktory zachycenými na ECM. Rovněž rozkladné produkty kolagenu mají chemotaktické, angiogenní a prorůstové účinky.

Druhou etapou metastatické kaskády je **transport nádorových buněk** krevní nebo lymfatickou cestou. Jedná se o pasivní transport. Samotný průnik do cirkulace neznamená automaticky i tvorbu metastáz, protože nádorové buňky jsou náchylné k destrukci a transport z nich přežije jen asi 0,1 %. Nádorové buňky jsou eliminovány různými mechanismy, jedná se o mechanické faktory (tření, turbulence krevního proudu atd.), apoptosu indukovanou ztrátou adheze (tzv. anoikis) a imunitní mechanismy vrozené i adaptivní imunity a tzv. kyslíkový efekt. Nádorové buňky mají v cirkulaci tendenci se shlukovat mezi sebou nebo s krevními buňkami, zejm. trombocyty. Vznik shluků nádorových buněk s destičkami může zvýšit přežití nádorových buněk a jejich implantabilitu.

**Nidace nádorových buněk a jejich průnik do tkáně**, který probíhá především v kapilárách parenchymatózních orgánů, je třetí etapou metastatické kaskády. Adheze shluků tumor-destičky k endotelu i vzájemné interakce buněk jsou zprostředkovány pomocí **cytoadhezivních molekul** (CAMs, cell adhesion molecules), zejm. selektin E (interakce mezi

buňkami ve shluku) a molekuly ze skupiny imunoglobulinů ICAM-1/2<sup>8</sup> a VCAM-1 (aktivace endotelu a adheze mikrotrombů k endotelu). Z těchto shluků se uvolňuje tromboxan A, který vyvolá ireverzibilní agregaci a tedy i fixaci mikrotrombu s nádorovými buňkami na stěnu cévy. Následuje průnik nádorových buněk bazální membránou zprostředkovaný MMP, angiogenními faktory a dalšími tkáňovými působky. Proliferace buněk mikrometastázy je vyvolána působením PDGF.

Metastatická kaskáda je završena **růstem metastáz v novém prostředí**. Ten ovšem neprobíhá uniformně. Buňky v metastáze zůstávají obvykle dlouhou dobu v klidovém stavu, aniž by však ztratily svůj proliferační potenciál, jen výjimečně diferencují. Proliferace buněk v metastáze závisí na přítomnosti růstových faktorů a na jejich poměru s faktory, které proliferaci brzdí. Na proliferaci metastáz se podílejí PDGF a autokrinní humorální faktory, dále produkty onkogenů (c-myc, c-erb, c-sic), které mají aktivitu růstových faktorů (FGF, TGF- $\alpha$ , EGF<sup>9</sup>). Proliferace je rovněž podpořena inhibicí apoptosy v nádorových buňkách. Základním předpokladem pro růst metastáz je plynulý přísun živin a kyslíku, proto je pro růst metastáz nezbytná schopnost angiogeneze.

## Faktory vyvolávající nádorovou transformaci

Vznik mutací, tedy nevratných kvalitativních nebo kvantitativních změn v genetické informaci, může být indukován fyzikálními, chemickými nebo biologickými faktory. Je třeba si uvědomit, že mutagenicita se automaticky nerovná karcinogenitě. Ačkoliv je vysoká pravděpodobnost, že mutageny jsou rovněž karcinogenní (~ 84 %), může docházet k falešným predikcím, protože i řada nekarcinogenních látek jsou mutageny a naopak celá řada nemutagenních látek může být karcinogenní. Řada látek a faktorů funguje jako kokarcinogeny tím, že zvyšují hladiny buněčných enzymů aktivujících karcinogeny.

### Fyzikální onkogenní faktory

Mezi fyzikální faktory způsobující vznik nádorů patří ionizující záření (RTG,  $\gamma$ -záření), neionizující záření (UV A, UV B a UV C záření), chronické mechanické dráždění a vysoká teplota.

**Ionizující záření** (RTG,  $\gamma$ -záření) působí na DNA přímo a nepřímo. Při přímém působení dochází ke zlomům řetězců DNA, v jejichž důsledku vznikají chromosomové aberace, zkřížené vazby („*cross-links*“) či lokální denaturace (rozpojení) DNA. Při nepřímém působení reaguje ionizující záření nejprve s molekulami vody za vzniku ROS, které následně poškozují biomolekuly včetně DNA. Účinek závisí na dávce záření a na době působení. Nejohroženější je lymfatická tkáň.

---

<sup>8</sup> ICAM = Intercellular Adhesion Molecule

<sup>9</sup> EGF = epidermální růstový faktor

**Neionizující UV záření** s delší vlnovou délkou (UV A) vyvolává tvorbu ROS, zatímco UV záření s krátkou vlnovou délkou (a tedy vyšší energií – UV B a UV C) reaguje přímo s molekulami DNA. UV B a UV C záření působí jako katalyzátor v reakci dvou sousedních thyminů v dvoušroubovici DNA za vzniku tzv. dimerů thyminu. Úsek DNA, který obsahuje takovýto dimer, představuje překážku pro DNA-polymerasu a nemůže být úspěšně replikován.

Chronicky působící **vysoká teplota** a chronické **mechanické dráždění** se uplatňují patrně jako promotory nádorových onemocnění díky chronické iritaci. Dlouhodobé pití horkého čaje (> 70°C) osminásobně zvyšuje riziko vzniku nádorů jícnu proti usrkávání čaje (< 65°C). Vdechnutí azbestu (vlákna < 60 nm) způsobuje mechanické poškození chromosomů s následnou fibrózou plic, bronchogenním karcinomem nebo maligním mezotheliomem.

### Chemické onkogenní faktory

Podle epidemiologických studií je 75-80 % malignit způsobeno faktory životního prostředí, u 30-40 % obyvatelstva industrializovaných zemí se během života objeví zhoubný nádor. Faktory zevního prostředí, které se na rozvoji nádorů podílejí, jsou výživa (30 %), kouření tabáku (30 %), nadměrná konzumace alkoholu (10 %), profesionální expozice (5-10 %) a faktory lékové, průmyslové exhalace a další.

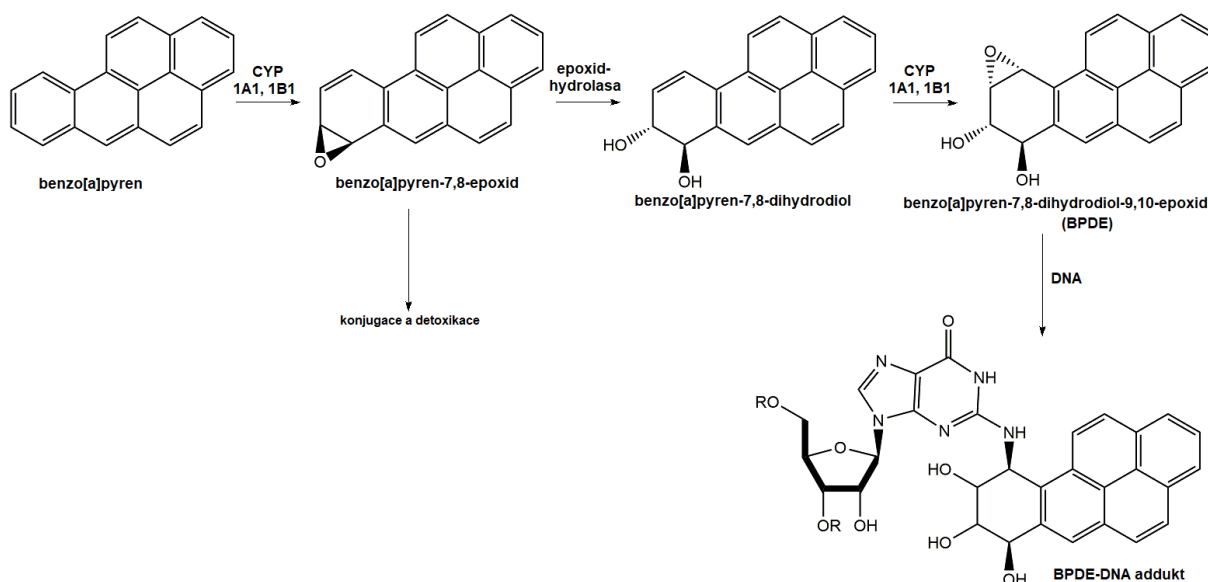
Chemické karcinogeny můžeme klasifikovat na karcinogeny genotoxické, epigenetické (negenotoxické) a kompletní (současně působí genotoxicky i epigeneticky). **Genotoxické karcinogeny** jsou látky s afinitou k DNA, které vytvářejí s nukleotidy kovalentní vazbu (vnesejí mutace). Tyto látky zahajují maligní transformaci v somatických buňkách a jejich účinek je obvykle ireverzibilní. Teoreticky stačí k vyvolání účinku jediná expozice. Typický je elektrofilní charakter těchto látek, který mohou mít některé látky již primárně (přímé karcinogeny), častěji jsou však přítomny v neaktivní formě (prokarcinogen) a je nutná jejich metabolická aktivace na aktivní karcinogen s elektrofilními vlastnostmi (nepřímé karcinogeny). **Epigenetické karcinogeny** nereagují přímo s genetickým materiálem, ale usnadňují vznik nádorového onemocnění jinými mechanismy (např. imunosupresivními, hormonálními, cytotoxickými). Uplatňují se obvykle až v pozdějších stádiích karcinogeneze (většinou ve stádiu promoce).

Mezi chemické karcinogeny patří látky ze skupin polycyklických aromatických uhlovodíků, aromatických aminů, azo-barviv, nitrosaminů a nitrosamidů, hydrazo- a azoxysloučenin, karbamátů, halogenovaných sloučenin, přírodních produktů, anorganických karcinogenů a ostatních sloučenin (např. alkylační činidla, aldehydy, fenolické sloučeniny). Vzhledem k množství prokázaných chemických karcinogenů uvedeme dále jen příklady působení některých vybraných látek.

**Polycyklické aromatické uhlovodíky** (PAH) jsou látky obsahující systém kondenzovaných aromatických kruhů, nejvyšší riziko představují 17-PAH odvozené od fenantrenu (např. benzo[a]pyren, koronen, antracen, fluoren). Jsou to látky těžce rozpustné ve vodě, mají lipofilní charakter a koncentrují se v sedimentech. Vznikají zejména nedokonalým

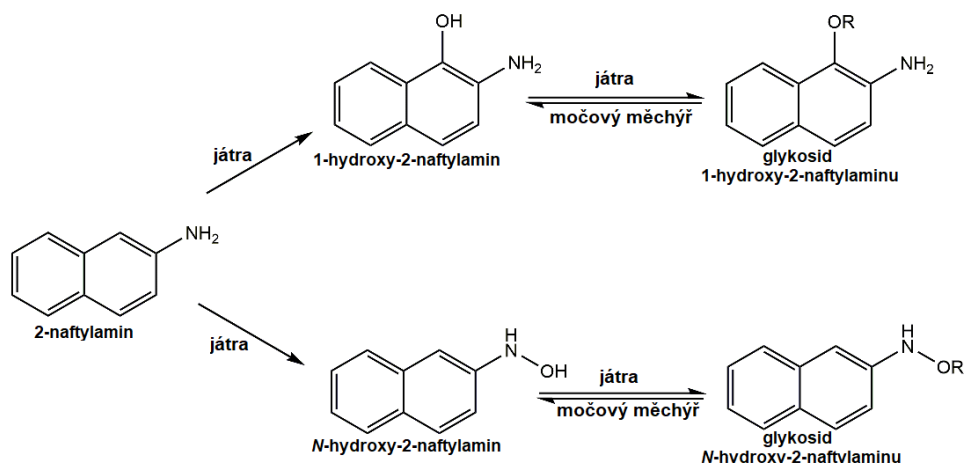


spalováním tuhých paliv, v dopravě, při kouření cigaret a při tepelné úpravě potravy (grilování, smažení, opékání na ohni). PAHy nevykazují akutní toxicitu, ale mohou poškodit celou řadu organismů, zejm. díky navození karcinogeneze a mutace DNA, poruchám reprodukce, podráždění až popálení pokožky. Jsou velmi odolné vůči přirozeným rozkladným procesům, kumulují se zejm. v rostlinách s velkou listovou plochou. Tyto sloučeniny jsou prokarcinogeny, které jsou v organismu biotransformovány na aktivní karcinogen působením různých monooxygenas, zejm. některými isoformami cytochromu P450 (CYP). Příkladem může být biotransformace **benzo[a]pyrenu** (BAP, prokarcinogen), který je nejprve pomocí CYP1A1 a CYP1B1 aktivován na BAP-7,8-epoxid, epoxidhydrolasa pak katalyzuje *trans*-adici vody za vzniku BAP-*trans*-7,8-dihydrodiolu. Tento dihydrodiol podstoupí další biotransformaci CYP1A1 nebo CYP1B1 za vzniku BAP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE), který je ultimátním karcinogenem schopným vytvářet kovalentní vazbu s guaninovými bazemi DNA (Obr. 7).



Obr. 7. Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu a jeho vazba na DNA

**Aromatický amin  $\alpha$ -naftylamin** byl po mnoho desetiletí používán v barvířství a barvířském průmyslu. Jedná se však o silný karcinogen s latencí 15-20 let. Samotný  $\alpha$ -naftylamin karcinogenní není, ale jeho biotransformací jaterními monooxygenasami vznikají toxické hydroxylované metabolity *N*-hydroxy-2-naftylamin a 1-hydroxy-2-naftylamin, které jsou konjugovány s kyselinou glukuronovou na nekarcinogenní glykosidy. V močovém měchýři jsou hydrolýzou uvolněny aktivní karcinogeny, které vyvolávají vznik karcinomu močového měchýře (Obr. 8).



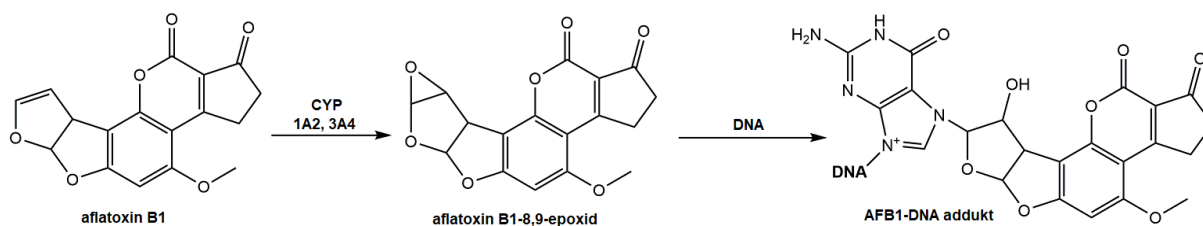
Obr. 8. Metabolická aktivace  $\alpha$ -naftylaminu.

**Karcinogeny potravy** se jednak vyskytují přirozeně (např. rostlinné alkaloidy, toxiny) a lze se jim tedy snadno vyhnout, vznikají při tepelné úpravě potravy (PAHy, Maillardova reakce, pyrolýza proteinů a aminokyselin za vzniku heterocyklických aromatických aminů), jsou do potravy záměrně přidávány (např. potravní aditiva, barviva) nebo je jimi potrava kontaminována, a pak je velmi obtížné se jim vyhnout. **Maillardova reakce** je neenzymová reakce mezi redukujícími cukry (nebo jejich rozkladnými produkty) a volnými aminoskupinami proteinů v potravě. Tento proces je typický pro potraviny upravované pečením. Produktem jsou sensoricky aktivní látky, které poskytují potravě charakteristickou chuť, barvu (zlatohnědé zbarvení) a chuť, označované jako koncové produkty pokročilé glykace (AGE). Jedná se o komplexní směs stovek sloučenin, které nejsou ještě zcela charakterizované. Při vysokých teplotách však vznikají i karcinogenní látky, jako jsou akrylamid a 5-hydroxymethylfurfural. Neenzymová glykace však probíhá i v organismu (viz. diabetes mellitus).

U **potravních aditiv** (náhradní sladidla, umělá barviva, antioxidanty, dusičnany a dusitany) je často jen podezření na karcinogenní účinky. **Dusičnany** jsou nejprve nitroreduktasami v ústní dutině redukovány na **dusitany**. K redukci dusičnanů dochází i v žaludku při zvýšeném pH (nedostatek HCl) působením reduktas z ústní dutiny a reduktasami střevních bakterií při jejich průniku do žaludku. Dusitany pak reagují se sekundárními aminy potravy (sýry, ryby atd.) za vzniku **nitrosaminů**, které jsou mutagenní, karcinogenní a teratogenní. Nitrosaminy způsobují metylaci DNA a tím vyvolávají nádory jícnu a žaludku.

Rovněž některé **přírodní složky potravy** jsou zdrojem karcinogenů a/nebo mají mutagenní účinek. Obvykle však tyto efekty vykazují až ve vysokých koncentracích. Můžeme zde zmínit některé rostlinné **polyfenolické látky** (flavonoidy, trísloviny, lignany atd.). Tyto látky mají schopnost buď přímo interagovat s DNA, nebo zvyšují karcinogenní aktivaci jiných látek (např. flavonoid kvercetin a nádory močového měchýře). **Safrol**, látka ze skupiny fenypropenů přítomná v rostlinách rodu *Sassafras*, je metabolizován na 1-hydroxyderivát, který je ve vyšších koncentracích hepatokarcinogenní. **Pyrrolizidinové alkaloidy** z podbělu, brutnáku či kostivalu mají hepatotoxické a hepatokarcinogenní účinky. V některých houbách

(např. ucháč obecný, pečárky) jsou přítomné **mykotoxiny** s hydrazinovou skupinou (gyromytrin, agaritin), které po hydrolýze na aktivní karcinogen (substituovaný hydrazin) vyvolávají karcinomy plic nebo žaludku. Dalšími mykotoxiny s karcinogenními účinky jsou produkty plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* – aflatoxiny, ochratoxiny, trichoteceny, zearalenony a fumonisiny. Člověk je jim vystaven při konzumaci kontaminované potravy (např. ořechů napadených plísní). **Aflatoxin B1** je aktivován CYP 1A2 a CYP3A4 na toxický epoxid, který se váže na guaninové zbytky a vytváří tak addukty s DNA (Obr. 9). Karcinogenita tohoto metabolitu je způsobena vnesením bodové mutace do kodonu 249 genu kódujícího p53, kde dochází ke změně pořadí bází z AGT na AGG s následnou inaktivitou vznikajícího proteinu p53 a vznikem hepatocelulárního karcinomu.



Obr. 9. Metabolická aktivace aflatoxinu B1 a jeho vazba na DNA

### Biologické onkogenní faktory

U zhruba 20 % lidských nádorů se předpokládá, že jsou infekčního původu. Za 5-6 % z nich jsou zodpovědní parazité a bakterie. Někteří **parazité**, jako jsou např. motolice z rodu *Schistosoma*, se spolupodílejí na vzniku karcinomu močového měchýře jeho chronickou iritací. Drážděním se na vzniku karcinomu v otevřené kaverně podílí rovněž **bakterie** *Mycobacterium tuberculosis*. Některé nádory žaludku vznikají v důsledku antigenní stimulace při infekce *Helicobacter pylori*, kdy se v žaludku vyvine lymfatická tkáň, která zde normálně není přítomna. Pokud antigenní stimulace přetrvává, dojde k lymfoidní hyperplazii s následným rozvojem maligního lymfomu žaludku z pozárodečných B-buněk, které již prodělaly antigenní stimulaci a selekci (MALT<sup>10</sup> lymfom).

Nejčastějším biologickým onkogenním faktorem jsou **viry**, u nichž se předpokládá, že se podílejí na vzniku zhruba 15 % lidských maligních nádorů. Virové onkogeny působí jako iniciátory nebo promotory karcinogeneze. Podmínkou onkogenity viru je integrace části nebo celého virového genomu do genomu hostitelské buňky. Studium onkogenních virů přispělo k porozumění principům maligní transformace. Byly popsány dvě třídy onkogenních virů – DNA viry a RNA viry (retroviry), které se liší mechanismem replikace.

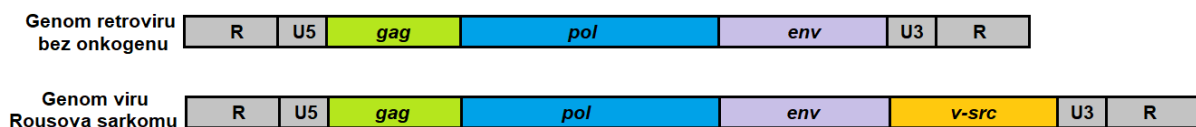
**DNA viry** neobsahují ve svém genomu onkogeny. Onkogenní účinek těchto virů je zprostředkován jednak **inaktivací tumor-supresorových genů** hostitelské buňky a také **inaktivací regulátorů buněčného cyklu** virovými proteiny (posouvají hostitelskou buňku do S-fáze buněčného cyklu). Inaktivace p53 patří ke klíčovým událostem při maligní transformaci

<sup>10</sup> MALT – slizniční lymfatická tkáň (z ang. Mucosa Associated Lymphoid Tissue)

buňky. Příkladem onkogenního DNA viru je virus SV 40 (Simian Virus), vyvolávající lytickou infekci u opic. Genom viru SV 40 má dvě oblasti – časnou a pozdní. Časná oblast se exprimuje hned po infekci a je nezbytná pro syntézu virové DNA. Časná oblast kóduje dva proteiny – malý a velký T-antigen, které jsou klíčové pro replikaci viru a expresi hostitelského genomu (buněčná DNA-polymerasa). Pozdní oblast se exprimuje až po zahájení replikace virové DNA a zahrnuje geny kódující pro strukturní složky virové částice. V permissivních buňkách se podle lytického programu tvoří nové virové částice, buňka naplněná viriony následně lyzuje a zaniká, nemůže být proto transformována (plné uplatnění časných i pozdních virových genů). V non-permissivních buňkách je reprodukce viru zastavena, virová DNA v hostitelské buňce perzistuje volně nebo je integrována do hostitelského genomu (malá pravděpodobnost). Hostitelská buňka pak exprimuje specifické virové geny, které vyvolávají transformaci buňky na buňku nádorovou.

Mezi nejvýznamnější DNA-viry vyvolávající nádorovou transformaci u člověka patří viry z rodin *Papovaviridae*, *Herpesviridae* a *Hepadnaviridae*. Papillomaviry, které patří do rodiny *Papovaviridae*, jsou původci cervikálního karcinomu, dlaždicobuněčného karcinomu ústní sliznice a papilomatosy hrtanu. Lidské herpetické viry (rodina *Herpesviridae*) zahrnují lidský herpesvirus 8, spojovaný s Kaposiho sarkomem, a virus Epstein a Barrové (EBV), který se podílí na vzniku Burkittova lymfomu, Hodgkinova a T-buněčného lymfomu a nasofaryngeálního karcinomu. Virus hepatitidy B (HBV, *Hepadnaviridae*) je spojován se vznikem hepatocelulárního karcinomu, jeho působení však bude pravděpodobně nepřímé a multifaktoriální.

**Retroviry** (RNA viry s reverzní transkriptasou) se mohou podílet na vzniku nádorů více mechanismy. Při replikaci retroviru v hostitelské buňce je nejprve virová RNA přepsána reverzní transkriptasou (RNA-dependentní DNA-polymerasa) do dvouvláknové DNA, která je následně inkorporována do genomu hostitelské buňky jako tzv. provirus. Primerem pro reverzní transkriptasu je tRNA z kapsidy retroviru. Následné transkripce jsou již zajištěny enzymovým aparátem hostitelské buňky. Retrovirus je nejvyšší parazit, protože jeho genom je stabilně spojen s genomem hostitelské buňky, vznikají nové viry, ale hostitelská buňka neumírá. Na základě biologické aktivity mohou být retroviry rozděleny do dvou skupin – pomalu a rychle transformující. Rychle transformující retrovirus obsahuje proti původnímu „typickému“ (pomalu transformujícímu) retroviru onkogenní sekvenci navíc (Obr. 10).



Obr. 10. Genom pomalu a rychle transformujícího retroviru

**Pomalu transformující retroviry** obsahují ve své RNA geny *gag*, *pol* a *env*, které zajišťují replikaci virové částice (*gag* kóduje antigenní proteiny kapsidy, *pol* virovou reverzní transkriptasu a *env* strukturní proteiny kapsidy a virového obalu). Proteinové produkty těchto genů nemají transformační účinek na hostitelskou buňku. Tyto viry neobsahují ve své genetické informaci onkogen, ale naruší inzercí své sekvence do genomu buňky sekvenci některého z protoonkogenů a tím jej aktivují (inzerce vysoce aktivního genového promotoru způsobí zvýšení jeho transkripce). Maligní transformace buňky po infekci těmito viry je pomalejší než u rychle transformujících virů a projevuje se až po dlouhé době latence (např. leukemie). U člověka byl transformující účinek prokázán pouze u lidského T-lymfotropního viru (HTVL-1 a HTVL-2), který vyvolává T-buněčnou leukemii/lymfom dospělých.

**Rychle transformující retroviry** obsahují ve své RNA oblast zajišťující replikaci viru (geny *gag*, *pol* a *env*) a navíc ještě některý z onkogenů (např. *src*, *abl*, *fos*, *jun*, *myc*), který vyvolá nádorovou transformaci hostitelské buňky. Tento onkogen je homologní s hostitelským protoonkogenem a dostal se do kapsidy při chybném vyštěpení vložené virové sekvence z buněčného genomu při resyntéze virových částic v průběhu infekce buňky. Inzercí této genetické informace do dalších infikovaných buněk dojde k amplifikaci sekvence určitého onkogenu v buňce a k rychlejšímu nástupu maligní transformace. Rychle transformující retroviry měly značný význam pro objevení buněčných (proto)onkogenů, ale vyskytují se pouze u zvířat. Příkladem je virus Rousova sarkomu způsobující maligní transformaci buněk u kura domácího, který obsahuje gen *v-src* homologní s buněčným genem *c-src*. Příklady dalších retrovirových onkogenů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2. Příklady onkogenů retrovirů (upraveno z Rodwell a kol. 2015)

Onkogen	Retrovirus	Původ	Produkt onkogenu
<i>abl</i>	Virus Abelsonovy myši leukemie	Myš	Protein-tyrosinkinasa
<i>erb-B</i>	Virus ptačí erythroblastosy	Kuře	Zkrácený receptor pro EGF
<i>fes</i>	Virus kočičího sarkomu	Kočka	Protein-tyrosinkinasa
<i>fos</i>	Virus myšního sarkomu	Myš	Transkripční faktor (AP-1); v komplexu s <i>jun</i>
<i>jun</i>	Virus ptačího sarkomu	Kuře	Transkripční faktor (AP-1); v komplexu s <i>fos</i>
<i>myc</i>	Virus myelocytu 29	Kuře	DNA-vázající protein
<i>sis</i>	Virus opičího sarkomu	Opice	Zkrácený PDGF ( $\beta$ -řetězec)
<i>src</i>	Virus Rousova sarkomu	Kuře	Protein-tyrosinkinasa

## Nádorové markery

**Nádorové markery** jsou skupinou látek, které mohou být produkovány nádorovými buňkami nebo organismem jako odpověď na nádorové bujení. Od látek tvořených normálními

buňkami se liší buď kvalitativně (nejsou v nich přítomny) nebo kvantitativně. Jejich význam spočívá v tom, že jsou laboratorním ukazatelem přítomnosti a postupu nádorového onemocnění. Hladina markeru se stanovuje v krvi, moči (kvantitativní) nebo přímo ve tkáni nádoru (kvalitativní) metodami chemickými, imunologickými nebo molekulárně-biologickými metodami. Při využití vhodného markeru přináší zjištěná koncentrace markeru v sledovaném biologickém materiálu informace o biologických vlastnostech a chování nádoru.

Ideální nádorový marker by měl splňovat několik kritérií:

- vysoká specifická vzhledem k malignímu onemocnění
- vysoká orgánová specifická
- vysoká citlivost
- korelace mezi hladinou markeru a velikostí nádoru
- korelace mezi hladinou markeru a stádiem onemocnění, prognózou a účinkem zvolené terapie

Nádorové markery lze **klasifikovat** podle různých hledisek. Podle místa produkce a chemického složení je dělíme na látky tvořené nádorem (např. antigeny, hormony, enzymy, metabolity, onkogeny a antionkogeny) a markery s nádorem sdružené (např. receptory, sérové proteiny), podle biologického chování na markery, účastníci se proliferace, diferenciaci a rozpadu nádorových buněk. Z biochemického hlediska rozeznáváme markery humorální (např. onkogenní antigeny, enzymy, hormony, plasmatické proteiny), buněčné a genetické.

Pro racionální využití nádorových markerů a interpretaci laboratorních výsledků je třeba si uvědomit několik skutečností. **Hlavním účelem** vyšetřování markerů je **sledování průběhu onemocnění, neslouží k primární diagnostice ani screeningu**. Ke stanovení diagnózy je rozhodující histopatologické vyšetření nádorové tkáně doplněné o průkaz nádorového markeru. Schopnost produkce markeru je u každého nádoru jiná, negativní výsledek vyšetření proto neznamená, že nádor není přítomen. Přechodně zvýšené hladiny nádorového markeru se mohou vyskytovat nejen u nádorových ale i u některých nenádorových onemocnění (např. benigní nádor, zánět, trauma, poškození ledvin u markerů vylučovaných ledvinami), v některých případech může hladina markeru stoupat během účinné léčby díky rozpadu nádorových buněk („celulární reakce“). Každý marker je vhodný ke sledování jiného typu nádoru. Prakticky žádný marker není zcela specifický pro určitý typ nádoru nebo jeho lokalizaci, proto je vhodné sledovat min. 2 nádorové markery, které jsou pro danou oblast nejvhodnější, a zvýšit tak pravděpodobnost záchytu.

Pro příklad uvedeme některé často používané nádorové markery. **Karcinoembryonální antigen (CEA)** je onkofetální glykoprotein, který je za fyziologických podmínek tvořen ve vyvíjejícím se embryu. V dospělosti je omezeně syntetizován epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. CEA se podílí na procesu adheze a metastazování buněk. Je tvořen např. karcinomy zažívacího traktu, plic, mléčné žlázy, karcinomy močového měchýře či ledvin. Zvýšení CEA v séru bylo popsáno u benigních nebo premaligních lézí (např. jaterní cirhóza, Crohnova choroba, střevní polypy, pankreatitida, benigní onemocnění prsu) a u kuřáků a

alkoholiků. **Alfa-1-fetoprotein** (AFP) je onkofetální glykoprotein s transportní úlohou (např. steroidy, bilirubin, mastné kyseliny, retinoidy), produkovaný v embryonálním žloutkovém vaku a ve fetálních játrech. V dospělém zdravém organismu je syntéza AFP omezena na minimum; je důležitým ukazatelem fyziologického vývoje těhotenství. Základním využitím AFP je monitorování průběhu onemocnění; pro hepatocelulární karcinom je AFP markerem první volby. **Lidský choriogonadotropin** (hCG) je glykoprotein tvořený podjednotkami alfa a beta. Stanovení má význam pro zhodnocení stadia onemocnění, pro potvrzení histologické charakterizace nádorů varlat a choriokarcinomů a pro jejich monitorování. **Prostatický specifický antigen** (PSA) je serinová proteasa, která umožňuje zkapalnění seminální tekutiny a tím usnadňuje pohyb spermií. Stanovení poměru volného a celkového PSA (část je vázána na  $\alpha$ 1-antichymotrypsin a  $\alpha$ 2-makroglobulin) se používá pro odlišení benigní hyperplazie prostaty od karcinomu. Monitorování hladin PSA má význam při terapii, protože jeho pokles obvykle koreluje s délkou přežití.

## Použitá literatura

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007) *Molecular Biology of the Cell*. 5th edition. Garland Science, New York, USA. 1392 pp.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hofmanová J (2013) *Genotoxicita a karcinogeneze*. 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno. 322 s. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/index.html>
- Klener P jr., Klener P (2013) *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vydání. Grada, Praha, 200 s.
- Krška Z, Hoskovec D, Petruželka L a kol. (2014) *Chirurgická onkologie*. 1. vydání. Grada, Praha. 904 s.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2014) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th edition. Elsevier, Canada, 1472 pp.
- Masopust J (2003) *Patobiochemie buňky*. 1. vydání. 2. LFUK, Praha, 344 s.
- Ondroušková E, Vojtěšek B (2014) Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách. *Klin Onkol.* 27 (Suppl 1): S7–S14.
- Pelcová D a kol. (2014) *Nemoci z povolání a intoxikace*. 3. vydání. Karolinum, Praha. 318 s.
- Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA (2015) *Harpers Illustrated Biochemistry*. 30th edition. McGraw-Hill Education, USA, 832 pp.
- Rokyta R a kol. (2015) *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. 1. vydání. Grada, Praha, 712 s.
- Šípek A jr. *Genetika - Biologie*. Online, dostupné z <http://www.genetika-biologie.cz> [citováno 13. 3. 2018]