

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**VZTAH EXPRESE GENŮ ANGIOGENNÍCH SIGNÁLNÍCH DRAH
K VASKULARIZACI NÁDORŮ JATER**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Tereza Macánová

Učitelství pro střední školy, obor Učitelství biologie a chemie pro střední školy

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Plzeň, 2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně
s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 30. června 2017

.....
vlastnoruční podpis

Tímto bych chtěla velice poděkovat svému vedoucímu práce Doc. RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. za jeho velikou pomoc, trpělivost a vstřícnost během práce v laboratoři i během psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Zbyňkovi Tonarovi, PhD., za poskytnutí imunohistochemické hodnocení vaskularizace tkáně.

ZDE SE NACHÁZÍ ORIGINÁL ZADÁNÍ KVALIFIKAČNÍ PRÁCE.

OBSAH

Úvod	3
1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	4
2 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO RŮSTU	5
2.1 OBECNÁ DEFINICE NÁDORU	5
2.2 PATOGENEZE VZNIKU ZHOUBNÝCH NÁDORŮ	5
2.2.1 Indukční fáze.....	5
2.2.2 Fáze blastoma in situ	6
2.2.3 Fáze progresu nádoru.....	6
2.3 KLASIFIKACE NÁDORŮ	7
3 GENETICKÉ A EPIGENETICKÉ ZMĚNY DNA VEDOUcí K NÁDOROVÉ TRANSFORMACI	9
3.1 GENETICKÉ ZMĚNY	9
3.2 EPIGENETICKÉ ZMĚNY	11
3.2.1 Metylace DNA.....	11
3.2.2 Remodelace chromatinu	12
3.2.3 Změny regulace genové exprese molekulami mikroRNA.....	12
3.3 PROTOONKOGENY	13
3.4 TUMOR-SUPRESORY	14
4 ZÍSKANÉ VLASTNOSTI MALIGNÍCH NÁDORŮ (ROBERT A. WEINBERG 2000).....	16
4.1 SOBĚSTAČNOST V PRODUKCI RŮSTOVÝCH SIGNÁLŮ	17
4.2 NECITLIVOST K SIGNÁLŮM ZASTAVUJÍCÍ BUNĚČNÝ CYKLUS	18
4.3 POŠKOZENÁ APOPTÓZA.....	19
4.4 NEOMEZENÝ REPLIKAČNÍ POTENCIÁL	20
4.5 POSÍLENÁ ANGIOGENEZE	21
4.6 TVORBA METASTÁZ	24
4.7 NESTABILITA GENOMU.....	27
4.7.1 Opravy DNA	27
4.7.2 Chromozomální nestabilita	28
5 DALŠÍ CHARAKTERISTIKY NÁDOROVÉ TKÁNĚ	30
5.1 INTRATUMORÁLNÍ HETEROGENITA	30
6 JATERNÍ METASTÁZY KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU	32
7 HEPATOCELULÁRNÍ KARCINOM.....	35
8 GENY AKTIVUJÍCÍ ANGIOGENEZI	37
8.1 SIGNÁLNÍ DRÁHA PI3K/AKT/MTOR.....	39
8.2 SIGNÁLNÍ DRÁHA VHL/HIF	40
8.3 SIGNÁLNÍ DRÁHA RTK/MAPK	41
9 POUŽITÉ METODICKÉ POSTUPY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE	43
9.1 PŘÍPRAVA TKÁNĚ	44
9.2 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z FFPE BLOČKŮ	44
9.2.1 Deparafinizace vzorku	45
9.2.2 Izolace RNA	46
9.2.3 Izolace DNA.....	47
9.3 REVERZNÍ TRANSKRIPCE	49
9.3.1 Postup reverzní transkripce z celkové RNA s použitím random hexamerů.....	49
9.4 KVANTITATIVNÍ PCR (qPCR).....	49
9.4.1 Postup quantitative real-time PCR	50
10 VYHODNOCENÍ REAL-TIME PCR.....	52

10.1 HODNOCENÍ EXPRESE GENŮ METODOU RT REAL-TIME PCR	53
10.1.1 Metodika vyhodnocení.....	53
10.1.2 Normalizace stanovených hodnot exprese metodou real-time PCR	54
10.1.3 Imunohistochemické stanovení přítomnosti receptoru CD34	55
10.2 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	55
11 VÝSLEDKY	56
11.1 DESKRIPTIVNÍ STATISTIKA	56
11.1.1 Deskriptivní statistika popisující hodnoty exprese sledovaných genů v nádorové tkáni	56
11.1.2 Deskriptivní statistika popisující hodnoty exprese sledovaných genů v normální tkáni	58
11.1.3 Deskriptivní statistika popisující hodnoty exprese sledovaných genů v přechodné tkáni	60
11.2 VYHODNOCENÍ EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ	63
11.2.1 Hodnoty exprese sledovaných genů a porovnání exprese těchto genů mezi nádorovou a přechodnou tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu	63
Porovnání exprese genů signální dráhy VHL/HIF (geny VHL, HIF1a, HIF2a)	63
11.2.2 Hodnoty exprese sledovaných genů a porovnání exprese těchto genů mezi nádorovou tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a normální tkáni	65
Porovnání exprese genů signální dráhy VHL/HIF (geny VHL, HIF1a, HIF2a)	65
11.2.3 Hodnoty exprese sledovaných genů a porovnání exprese těchto genů mezi přechodnou tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a normální tkáni	67
Porovnání exprese genů signální dráhy VHL/HIF (geny VHL, HIF1a, HIF2a)	67
11.3 HODNOCENÍ VASKULARIZACE NA ZÁKLADĚ IMUNOHISTOCHEMICKÉHO STANOVENÍ EXPRESE MOLEKULY CD34	70
12 DISKUSE	71
ZÁVĚR.....	73
RESUMÉ	74
SEZNAM LITERATURY	75
SEZNAM ZKRATEK	80
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ	83
SEZNAM PŘÍLOH	86
PŘÍLOHY	I

Úvod

Zhoubná nádorová onemocnění představují v současné době závažný problém pro celou společnost. Také v České republice patří onkologická onemocnění k nejčastějším důvodům úmrtí páté, šesté a sedmé dekády života. V České republice každý čtvrtý člověk umírá na maligní nádorové onemocnění. Pokud vezmeme v úvahu, že část pacientů se vyléčí, je incidence těchto onemocnění, ještě větší. Můžeme zobecnit, že jedna ze tří rodin má minimálně jednoho člena postiženého maligní chorobou. (Adam, Z., Vorlíček, J. a Koptíková, J., 2003). Incidence jaterních metastáz kolorektálního karcinomu, onemocnění, kterým se ve své práci zabývám, byla v roce 2013 v České republice osm nemocných na 100 000 obyvatel (Dušek et al., 2007). Toto onemocnění je od 70. let stále častěji diagnostikováno, jedním z důvodů této skutečnosti jsou však také neustále se lepšími diagnostické možnosti. Mortalita na toto onemocnění v roce 2013 byla sedm nemocných na 100 000 obyvatel. Na rozdíl od incidence, která stoupá, mortalita v posledních 20 letech setrvává na stejné úrovni. Zároveň se prodlužuje přežití nemocných, což je dáno zlepšujícími se možnostmi onkologické léčby (Dušek et al., 2007).

Nárůst možností, jak léčit nádorová onemocnění, stoupá již od 20. let 20. století po objevení rentgenových paprsků a jejich možného využití. Ve 40. letech minulého století se začalo experimentovat s chemoterapií, která se následně v 60. letech stala jednou z hlavních metod k léčbě rakoviny. Od 70. let minulého století se již mnoho vědců začalo zabývat možnostmi posilování protinádorové imunity, a dochází také k postupnému zdokonalování diagnostických metod. Zároveň se zlepšuje podpůrná a doplňková léčba, která významně omezuje a tlumí nežádoucí účinky, kterými je podání většiny metod protinádorové léčby provázeno (Klener, P., Klener jr., P., 2010).

Od 90. let minulého století se intenzivně zkoumají možnosti, jak v nádorové tkáni zpomalit novotvorbu cév. V roce 2004 byl uveden na trh lék Bevacizumab, který účinně snižuje hladinu volného vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). A právě porozumění signálním drahám a roli molekul podílejících se na novotvorbě cév u jaterních metastáz kolorektálního karcinomu se zabývá tato práce.

1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem práce bylo stanovení exprese genů, jejichž produkty se podílejí na aktivaci angiogeneze v nádorové tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a porovnání s expresí s přechodnou tkání (nádor – normální tkáň) a normální tkání jater.

- 1) Cílem bylo izolovat celkovou RNA a DNA z formalinem fixované, v parafínu zalité tkáně (FFPE) jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a přilehlé tkáně.
- 2) Hlavním cílem bylo stanovení exprese genů, podílejících se na 3 hlavních signálních drahách aktivujících angiogenezi.
- 3) Dalším cílem bylo vyhodnocení dat získaných metodou real-time PCR a porovnání exprese v nádorové tkáni s přechodnou tkání a normální tkání jater.

2 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO RŮSTU

V úvodní části diplomové práce je popsána patogeneze nádorového růstu, přičemž nejprve se text soustředí na popis fenotypu nádorové tkáně a její charakteristických vlastností a následně jsou popsány procesy a geny, které k získání charakteristických vlastností nádorové tkáně vedou.

2.1 OBECNÁ DEFINICE NÁDORU

Nádorovou tkáň je možno popisovat a hodnotit z různých hledisek. Obsahu mé práce nejlépe odpovídá definice, která uvádí: „Nádor je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu. Nádorová proliferace přetrvává i po odstranění základního etiologického momentu“. Maligním nádor je schopen invazivního růstu, infiltrování přilehlých tkání a zakládání vzdálených ložisek - metastáz (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

2.2 PATOGENEZE VZNIKU ZHOUBNÝCH NÁDORŮ

Maligní transformace nádorové tkáně probíhá stupňovitě a dlouhodobě bez ohledu na její příčinu. Celý proces vzniku maligního nádoru je dán změnami genotypu a epigenetickými změnami, které se projeví změnou ve fenotypu – transformací buněčné populace. Tento proces, přeměna normální tkáně v nádorovou, lze rozdělit do tří fází – fáze indukce, fáze blastoma *in situ* a nakonec fáze progresu nádoru, kdy dochází ke klinické manifestaci nádoru. Je nutné si uvědomit, že rozdělení patogeneze do těchto fází slouží zejména pro účely jejího pochopení a u jednotlivců se liší jak průběhem, tak délkou trvání (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002; Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

2.2.1 INDUKČNÍ FÁZE

Tuto fázi lze z patologického hlediska rozlišit na další tři etapy. První je etapa iniciace nádorového zvratu buňky. Dochází k ireverzibilní změně genotypu buňky (výjimečně i skupiny buněk), kdy tato změna (změny) bývá nejčastěji podmíněna mutací. Buňka, která se takto změní, se označuje jako iniciovaná. Iniciaci indukuje řada transformujících onkogenních faktorů a dochází k ní téměř vždy ihned, nebo velice brzy po začátku jejich působení. Tyto onkogenní faktory nazýváme iniciátory (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

Faktory indukce nádoru jsou různé, dnes považujeme za prokázanou chemickou iniciaci, kdy se iniciátor váže na buněčnou DNA. Při fyzikální iniciaci dochází k zprostředkované nebo přímé změně DNA. U biologické iniciace dochází ke změnám genomu inzercí heterologních nebo aktivací vlastních onkogenně působících sekvencí DNA (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

Další etapou v indukční fázi je tzv. etapa latence. Její délka je u jednotlivců rozdílná. V této etapě může pokračovat působení iniciátoru, kdy se mohou opakovaně eliminovat změněné buňky silami organismu a také dochází k počátku pozitivní fenotypové selekce změněných iniciovaných buněk (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

Poslední etapou indukční fáze je etapa promoce. V této etapě dlouhodobě působí promoční faktor – promotor. Promotor je látka, která bez předchozí iniciace sama nádorovou přeměnu neindukuje. Promotorem může být například karcinogenní látka (vzácně identická s iniciátorem), hormonální dráždění, působení růstových faktorů, fyzikální iritace vedoucí k výrazné proliferaci, někdy i onkogenní virus. Chemické látky, přicházející zevně, mající promoční účinek, nazýváme kokarcinogeny (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

K fenotypovým změnám buňky dochází pokračující proliferací a selekční fixací změn genomu. Z hlediska tkáňových charakteristik dochází k dediferenciaci a většinou k populačnímu klonálnímu homogenizování změněné tkáně. Indukční fáze se všemi etapami může trvat 20 až 30 let (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

2.2.2 FÁZE BLASTOMA IN SITU

Tato fáze trvající přibližně 5-10 let se vyznačuje z hlediska tkání a buněk postupnou selekcí atypických buněk s plně genotypickou charakteristikou maligního nádoru, ale ne zcela funkčně vyjádřeným maligním fenotypem. Zejména chybí schopnost invazivního růstu a metastazování (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

2.2.3 FÁZE PROGRESE NÁDORU

Fáze progresu trvající přibližně 8 let má dvě etapy, jejichž moment přechodu první v druhou je často neznámý. První je etapa invaze, trvající 1 až 3 roky. Dochází během ní k lokálnímu infiltrativnímu růstu nebo destruktivnímu růstu. K diseminaci (metastatickému rozsevu) dochází až v etapě diseminace, která trvá 1 rok až 5 let (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

2.3 KLASIFIKACE NÁDORŮ

Maligní nádor se od benigního liší několika zásadními vlastnostmi. Je to zejména rychlost proliferace, buněčná diferenciaci a anaplazie společně s architekturou tkáně, lokálně infiltrativním a destruktivním růstem a tvorbou metastáz (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Buňky benigní, tj. buňky nezhoubných nádorů, své buněčné povrchy nemají výrazně změněny oproti jiným proliferujícím buňkám organismu – buňky si zachovávají vzájemnou kohezivitu. Jejich růst je jen mírně expanzivní, nádory tohoto typu často rostou pomalu, zůstávají ohraničené a na okolí působí v podstatě jen tlakem. Tyto nádory jsou vazivově opouzdřené, což je také morfologickým podkladem snadné chirurgické odstranitelnosti. I přesto mohou benigní nádory ohrožovat organismus – např. endokrinní aktivitou (toxické nádory štítné žlázy); nepříznivou lokalizací (centrální nervová soustava) a dále (Fölsh, U.R., Kochsiek, K. a Schmidt, R.F., 2003).

Maligní – zhoubné – nádory rostou vůči okolní tkáni infiltrativně a jsou schopny vytvořit metastázy. Infiltrativní šíření komplikuje jejich chirurgické odstranění. Nádorové buňky nejsou schopny odpovídat na místní regulaci – zejména díky ztrátě kontaktní inhibice. Na povrchu nádorových buněk také nacházíme proteázy a enzymy (často matrixové metaloproteinázy) štěpící kolagen, glykosaminoglykany a proteoglykany, díky kterým dochází k destrukci bazálních membrán a okolních tkání (Fölsh, U.R., Kochsiek, K. a Schmidt, R.F., 2003).

Klasifikace nádorů a jejich terminologie se řídí výchozím Vichrovovým konceptem histologicko-histogenetické klasifikace nádorů. Vichrov rozpoznal, že nádorové buňky jsou modifikované fyziologické buňky, s nimiž některé vlastnosti sdílí, některé však mají unikátní. Z této obecné definice vychází i současná upravená definice WHO. Nádory se tak dělí do pěti základních kategorií: epitelové, mezenchymové, hematopoetické, nádory s víceliniovou diferenciací (zárodečné nádory, teratomy) a neklasifikovatelné nádory a zvláštní formy (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Pokud se jedná o maligní nádor, původu epiteliálního, zdůrazníme přidáním slova „karcinom“ k základu, který je tvořen názvem výchozí tkáně – např. adenokarcinom. Nádory, které vycházejí z jednotlivých orgánů, mají ve svém názvu jméno výchozího orgánu – např. hepatocelulární karcinom. Maligní mezenchymové nádory mají přídavek „sarkom“ – např. fibrosarkom. Pokud může mít nádor jak maligní, tak benigní formu, je důležité zdůrazňovat u názvu, o jaký se jedná – např. benigní Schwannon. Pokud

neexistuje benigní protějšek, stačí jednoslovný název, jakým je např. melanom (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003)

3 GENETICKÉ A EPIGENETICKÉ ZMĚNY DNA VEDOUcí K NÁDOROVÉ TRANSFORMACI

Změny vedoucí k transformaci normální buňky v nádorovou zahrnují jednak genetické změny, tzn. změny v pořadí nukleotidů DNA a dále epigenetické změny genetické informace, tzn. změny, které se sice přenáší do dalších generací, avšak nemají vliv na pořadí nukleotidů jako takové. Z hlediska patogeneze nádorových onemocnění genetické a epigenetické změny postihují dvě hlavní skupiny genů, a to tumor-supresorové geny a protoonkogeny.

3.1 GENETICKÉ ZMĚNY

Genetické změny můžeme klasifikovat dle rozsahu:

- 1) mutace bodové
- 2) submikroskopické delece nebo inserce
- 3) cytogeneticky zřejmé strukturální chromozomální aberace
- 4) numerické chromozomální aberace
- 5) změny počtu chromozomových sad

Možným mechanismem vzniku bodových mutací je chyba při replikaci DNA nebo poškození DNA chemickou mutagenezí či radiací společně s poškozením DNA během replikace dříve, než mohlo dojít k opravě (případně došlo k selhání reparačních mechanismů). Submikroskopické delece nebo inserce mohou vzniknout špatným přiložením homologních sekvencí při rekombinaci; insercí viru či transpozónu; chybou při replikaci DNA; také poškozením DNA chemickou mutagenezí či radiací. Cytogeneticky zřejmé strukturální chromozomální aberace vznikají podobně jako submikroskopické delece či inserce - špatným přiložením homologních sekvencí při rekombinaci nebo poškozením DNA chemickou mutagenezí či radiací. Za vznikem numerických chromozomálních aberací stojí chyby v segregaci chromozómů během meiózy či první mitózy zygoty.

Bodová mutace je důležitým a specifickým poškozením, které vede k regulačním nebo strukturálním změnám ovlivňujícím protoonkogeny i tumor-supresory. Výsledkem může být u tumor-supresorů ztráta funkce, způsobená syntézou nižšího množství proteinu, nebo strukturálně pozměněného proteinu. U protoonkogenů, které jsou v důsledku těchto změn přeměněny na onkogeny, dochází k produkci zvýšené hladiny proteinů, nebo k produkci

trvale aktivovaného proteinu. Tyto změny jsou stabilní a odhalitelné metodami molekulární genetiky (Cibula, D., Petruželka, L., 2009).

Nejběžnějším příkladem aktivace onkogenu bodovou mutací je mutace v *ras* protoonkogenu. Dochází k silné redukci GTP-ázové aktivity *ras* proteinů. Mutace tohoto genu se vyskytují u většiny lidských nádorů (frekvence je závislá na typu nádoru – až 90 % u pankreatických adenokarcinomů a cholangiokarcinomů); nevyskytují se ale u karcinomů děložního čípku a prsu (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

Strukturní aberace chromozomů mohou vést ke vzniku fúzního genu např. *TMPRSS2 – ERG*, kdy transkripční faktor podporující růst (*ERG*) se dostává pod kontrolu v dané tkáni aktivního genu, zde transmembránové proteázy serinového typu 2 (Kulda, V., et al., 2016).

Delece a inserce jsou změnami sekvence DNA, které mohou zahrnovat více nukleotidů, ale i celé introny, exony a geny. Tyto změny sekvence DNA často vedou k produkci zkrácených proteinů. Jejich efekt také záleží na tom, zda dojde k posunutí čtecího rámce („frame-shift“), nebo ne. „In-frame“ delece či inserce vedou zejména ke zkrácení, nebo i prodloužení produkovaného proteinu. Často nedochází k úplné ztrátě funkce. Naproti tomu u „out-of-frame“ nebo též „frame-shift“ u delecí či inzercí vedoucích k posunu čtecího rámce („out-of-frame“, „frame-shift“) je často produkován velice zkrácený protein, případně nedochází k produkci proteinu vůbec. Amplifikace genů je typická pro onkogeny a vede k nadprodukci proteinů kódovaného daným genem (Fölsh, U.R., Kochsiek, K. a Schmidt, R.F., 2003).

Z hlediska dopadu na funkci kódovaného proteinu dělíme změny v sekvenci DNA na změny typu:

- 1) ztráty funkce („loss-of function mutation“), neboli nulová mutace
- 2) mutace ztráty funkce – tzv. hypomorfní mutace
- 3) mutace typu získání funkce („gain-of function mutation“), kdy protein získává nové dodatečné funkce, které nemutovaný protein nenesl, popřípadě dochází k hyperaktivaci proteinu – tzv. hypermorfní mutace

Mutace ztráty funkce jsou mutace recesivní. Alela s recesivní mutací je alelou slabší, podřízenou, a v heterozygotním stavu se většinou neprojeví. Většina z odhalených mutací je právě mutace ztráty funkce. U nádorových onemocnění jsou tyto mutace typické pro tumor-supresorové geny, kdy v důsledku ztráty funkce obou dvou alel daného

tumor-supresoru dojde ke ztrátě jeho inhibiční funkce z hlediska fungování buněčného cyklu (teorie dvojího zásahu, Alfréd Knudson). Tyto změny se týkají např. tumor-supresorů TP53, RB, BRCA1, BRCA2, APC atd.

Mutace získání funkce jsou mutace typické pro onkogeny. Jedná se o mutace dominantní, protože stačí pouze jedna mutovaná alela, aby došlo k fenotypovému projevu. Způsobují změny, které ovlivňují regulaci genové exprese - dochází k nepřiměřené produkci strukturně nezměněné formy normálního proteinu. V kódující sekvenci protoonkogenu tyto mutace vedou k produkci hyperaktivního proteinu, nebo proteinu neodpovídajícího na inhibiční signály. Tyto mutace jsou typické např. pro onkogeny KRAS, BRAF, BCR-ABL atd.

3.2 EPIGENETICKÉ ZMĚNY

Epigenetické změny jsou změny chemické, které postihují molekulu DNA nebo chromatin, ale nemají bezprostřední vliv na sekvenci nukleotidů. Tyto změny však ovlivňují expresi genů a mohou tak dosáhnout stejného účinku jako mutace v příslušných genech. V současnosti jsou mezi epigenetické změny řazeny metylace DNA, remodelace chromatinu (chemicky podmíněná změna v uspořádání chromatinu) a také změny v posttranskripční regulaci genů vlivem mikro RNA.

3.2.1 METYLACE DNA

Jedním z mechanismů epigenetické kontroly genové exprese je metylace. Methylace DNA je proces, kdy jsou metylové skupiny navázány na nukleotidy DNA cytosin a adenin. Methylace je realizována enzymy DNA metyltransferáz (DNMTi). Přesněji dochází k navázání metylové skupiny na C5 cytosinu nacházející se v sekvenci guaninů. Tyto úseky nukleotidů nazýváme CpG ostrůvky („p“ značí fosfodiesterový můstek mezi cytosinem a guaninem) (Klener, P., Klener, jr., P., 2010).

DNA metylace je nezbytná pro normální vývoj organismu a je spojena s velkým počtem klíčových procesů (např. deaktivace chromosomu X, stárnutí, ale také karcinogeneze). Methylace pozměňuje funkci molekuly DNA – pokud je metylována DNA na genovém promotoru, působí pak tato metylace jako inhibitor transkripce. Methylace DNA tak může trvale pozměnit expresi genů v buňkách (Capuano, F., Muelleder, M., Kok, R. M., Blom, H. J., Ralser, M., 2014).

Změna vyvolaná metylací je obvykle trvalá a nevratná – zabraňuje totiž nežádanému navrácení již diferenciováných buněk zpět do buněk kmenových.

U nádorů je popsána globální hypometylace molekul DNA a také specifická hypermetylace promotorů tumor-supresorových genů. Hypermetylace, vyskytující se typicky v ostrůvcích CpG, vede k umlčení transkripce těchto tumor-supresorových genů (tzv. silencing) (Klener, P., Klener, jr., P., 2010)

Metylace je realizována enzymy DNA metyltransferáz (DNMTi). Metylační stav konkrétních genů lze využít i pro prognostiku a léčbu nádorových onemocnění. Mezi nové skupiny epigenetických chemoterapeutik působících změnu chromatinu jsou látky s epigenetickým mechanismem účinku, mezi něž patří inhibitory DNA metyltransferáz (DNMTi). Pokud se zvýší metylace promotorů DNA, zablokuje se i vazba transkripčního faktoru k danému promotoru - DNMTi blokují patologicky zvýšenou metylaci DNA, čímž dochází k demetylaci promotorů a obnovení exprese patologicky reprimovaných genů (jako jsou např. tumor-supresory) (Klener, P., Klener, jr., P., 2010).

3.2.2 REMODELACE CHROMATINU

Remodelace chromatinu je dynamická modifikace chromatinové struktury, která umožňuje přístup transkripčních faktorů a dalších faktorů realizujících genovou expresi, k molekule DNA. Tímto způsobem je také kontrolována exprese genů. Remodelace chromatinu je provedena kovalentní modifikací histonů prostřednictvím enzymů, acetyláz metyltransferáz a kináz.

Chyby v chromatinové remodelaci jsou spojovány s četnými onemocněními, včetně karcinogeneze.

3.2.3 ZMĚNY REGULACE GENOVÉ EXPRESE MOLEKULAMI MIKRORNA

Mezi epigenetické změny také řadíme změny v expresi molekul mikroRNA, které negativně regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni. Molekuly mikroRNA (dále jen miRNA) jsou jednořetězcové RNA, tvořené 21-23 nukleotidy (nejčastěji 22) (Slabý, O., Svoboda, M., 2012). MikroRNA jako důležité regulátory genové exprese kontrolují fyziologické i patologické změny v organismu, jakými je například ontogeneze nebo maligní transformace.

V současnosti je známo více než 2500 různých molekul miRNA a velké množství z nich se podílí na regulaci exprese tumor-supresorů nebo protoonkogenů. Pokud molekuly miRNA regulují expresi onkogenů, jejich působení můžeme označit jako tumor-supresorové. Pokud molekuly miRNA regulují expresi tumor-supresorů, jejich

působení můžeme označit jako protoonkogenní. Z uvedeného vyplývá, že změny v expresi molekul miRNA se mohou podílet na nádorové transformaci.

3.3 PROTOONKOGENY

V experimentech prováděných v minulosti bylo prokázáno, že DNA získaná z nádorových buněk a následně přenesená do normálních buněk, rostoucích v kultuře, vyvolává nádorovou transformaci. Díky těmto a obdobným experimentům tak byla izolována řada genů, které byly zodpovědné za tento efekt. Homology těchto buněčných a virových genů, které mají transformační účinky a zároveň se vyskytují v normálních buňkách, se nazývají protoonkogeny. Protoonkogeny nejčastěji kódují proteiny, které se účastní přenosu vnějších růstových a také diferenciacních signálů z povrchu buňky do cytoplazmy a jádra. Tyto proteiny pak tvoří řadu signálních drah, kontrolující např. genovou expresi – tzn. procesy zodpovědné za regulaci buněčného cyklu a buněčné diferenciaci (Fölsh, U.R., Kochsiek, K. a Schmidt, R.F., 2003).

Cytogenetické, genetické a epigenetické poruchy vedoucí k přeměně normální funkce protoonkogenu na jeho transformující funkci, vedou ke vzniku onkogenů, tzn. kvantitativní či kvalitativní změny exprese protoonkogenů vedou k aktivaci onkogenů.

Jako protoonkogeny nazýváme geny, jejichž fyziologické produkty působí jako růstové faktory, receptory růstových faktorů, přenašeče signálů, jaderné transkripční faktory, cykliny a cyklin-dependentní kinázy. K přeměně protoonkogenů na onkogeny dochází prostřednictvím dvou možných kategorií změn. První jsou změny ve struktuře genu, jejichž následkem je syntéza abnormálního genového produktu (tzv. onkoproteinu), který má změněnou funkci. Druhou kategorií změn jsou změny ovlivňující regulaci genové exprese, mající za následek zvýšení či nepřiměřenou produkci strukturně nezměněné formy normálního proteinu podporujícího růst. Poškození, které vede ke strukturním a regulačním změnám ovlivňující protoonkogeny mohou být již výše uvedené bodové mutace, delecce, inserce, chromozomální translokace či inverze (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

Růstové faktory, jejichž geny mohou být případnými onkogeny, stimulují proliferaci normálních buněk a mnoho z nich hraje významnou roli při procesu maligní přeměny buňky. Buňky mohou expresí růstových faktorů (kdy buňky samy exprimují receptory pro tyto růstové faktory) vytvořit autokrinní proliferační smyčku, díky čemuž dojde k autonomnímu růstu vycházejícímu z buňky samotné (viz 3.1). Řada onkogenů byla identifikována jako nesprávně exprimované či deletované receptory růstových faktorů.

Bylo zjištěno, že také mnoho genů pro přenašeče signálů působí jako onkogeny. Exprimované onkoproteiny většinou vykonávají stejnou funkci jako fyziologické proteiny, avšak se ztrátou odpovědnosti na regulační signály, nebo se schopností aktivovat další skupinu molekul. Tyto onkoproteiny jsou nejčastěji umístěny na vnitřní straně plazmatické membrány. Geny pro přenašeče signálů můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na přenašečů signálů spojených s membránou (skupina s aktivitou tyrozin kinázovou či skupina s GTP-ázovou aktivitou) a cytoplazmatické přenašeče signálů.

V eukaryotických buňkách je postup buněčným cyklem koordinován aktivací cyklinů a cyklin-dependentních kináz (dále jen cdk). Pokud dojde k mutaci těchto genů, dochází k poruše regulace buněčného cyklu a podpoře proliferace. Mutace cyklinů a cdk byly nalezeny v řadě nádorů, a proto jsou cykliny a některé cdk považovány za protoonkogeny (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

3.4 TUMOR-SUPRESORY

Tumor-supresorové geny (jinak také antionkogeny) kódují proteiny, podílející se na kontrole buněčného růstu, procesu diferenciaci nebo na opravách DNA. Tumor-supresory můžeme definovat jako geny, jejichž represe, dysfunkce, inaktivace či ztráta mají příspěvek na buněčné transformaci. Mnoho tumor-supresorů bylo identifikováno s využitím experimentálních přístupů a jejich průkaz působení objasnil v mnohých nádorových systémech dědičnou vazbu náchylnosti k výskytu určitého nádoru.

Prototypem nádorového tumor-supresoru, který byl objeven jako první, je retinoblastomový gen (dále jen Rb). Jeho inaktivace je klíčová v průběhu vývoje řady lidských nádorů. Tento fosfoprotein má významnou roli při kontrole transkripce jiných proteinů a také funguje jako regulátor buněčného dělení. V každé buňce je exprimován a v závislosti na stadiu buněčného cyklu je různě fosforylován. Molekulární účinek Rb je založen na inaktivaci proteinů, které jsou při procesu buněčné proliferace důležité. V jádře je pak závislý na interakci jeho hypofosforylované formy s rodinou transkripčních faktorů E2F. Tyto proteiny tvoří v klidové buňce v G₁ fázi komplex, čímž brání transaktivaci některých genů, důležitých pro regulaci buněčného růstu. Pokud tedy není funkční Rb protein přítomen, nemůže se ani regulovat transkripční faktor E2F a to vede k snadnému přechodu buňky do S fáze.

U lidských nádorů patří mezi nejčastější vyskytující se mutace ty, které postihují tumor-supresorový gen p53. U více než 50 % lidských nádorů je tento gen mutovaný. Gen p53

kóduje jaderný fosfoprotein, který je negativním regulátorem přechodu z G₁ do S fáze buněčného dělení. V nemutované formě je hlavní biochemickou funkcí tohoto genu kontrola normálního buněčného cyklu regulací transkripce a DNA replikace. Působí tak jako molekulární ochrana před šířením genetiky poškozených buněk. K aktivaci genu p53 dochází při poruchách v DNA (způsobené různými typy záření, UV světlem, případně mutagenními látkami). Tyto mechanismy poškození vedou ke zvýšené expresi transkripčně aktivního proteinu p53. Akumulace genu p53 vede k jeho vazbě na specifické sekvence DNA a stimulaci expresi řady genů, které následně vedou k zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi a aktivaci apoptózy. Zastavení buněk před vstupem do S fáze je důležité z toho důvodu, že dává buňkám čas na reparaci poškozené DNA (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Z výše uvedeného vyplývá, že pokud dojde v buňkách k mutacím ztráty funkce genu p53, buňka ztrácí schopnost reakce na poškozenou DNA a schopnost aktivace apoptózy. Mezi další významné tumor-supresory řadíme např. BRCA-1 a BRCA-2 geny (jejich mutace umožňují vznik chyb při DNA replikaci, které následně vedou ke vzniku mutací i v jiných regulačních genech); APC gen (jeho zděděné mutace jsou příčinou FAP – familial adenomatous polyposis); NF-1 a NF-2 geny; WT1 gen; VHL gen a další (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

4 ZÍSKANÉ VLASTNOSTI MALIGNÍCH NÁDORŮ (ROBERT A. WEINBERG 2000)

Jak již bylo řečeno, nádorová onemocnění jsou způsobena kumulací změn v molekule DNA v buňce (buňkách), která byla na počátku růstu nádorové tkáně. Ke změnám molekuly DNA dochází samozřejmě i v buňkách nádorové tkáně během jejího růstu. Tyto změny zahrnují dominantní mutace onkogenů a recesivní mutace tumor-supresorů. Mutace obou slupin těchto genů byly nalezeny napříč všemi nádorovými onemocněními jak v lidských, tak zvířecích nádorových buňkách (Bishop, J.M., Weinberg, R.A., 1996)

Chování nádorových buněk se nejspíše možné studovat na modelu nádorových buněčných linií. Tyto buňky se získávají například vyjmutím maligního nádoru, jeho rozdělením na jednotlivé buňky a kultivováním *in vivo*. Díky tomuto postupu se během let získaly různé buněčné linie, které byly získány z lidských nádorů a jsou uchovávány v buněčných bankách. Buňky také mohou být transformovány v nádorové *in vitro*, působením chemikáliemi či viry a následně přeneseny do zvířecího těla (Karp, G., 2008).

U nádorových buněk byly nalezeny charakteristické fenotypové vlastnosti, které byly shrnuty do 6 základních změn, které dávají vznik a jsou charakteristické pro nádorovou tkáň. K těmto šesti bodům se jako další přidává sedmý bod – genetická nestabilita. Ta však není nezbytnou podmínkou karcinogeneze, je ale nepochybně vlastností velkého podílu všech nádorů a nepřímo se podílí na vzniku nádorů – viz obrázek 1 (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000). V roce 2011 Robert Weinberg výše uvedených charakteristických vlastností nádorové tkáně doplnil o další tři, které se ukazují také typické pro nádorovou tkáň. Je to schopnost nádorových buněk zabránit vlastní destrukci imunitním systémem, dále je to deregulace energetického metabolismu v nádorových buňkách a také se ukazuje, že nádorový růst je podporován prozánětlivými cytokiny (Weinberg, R.A., Hanahan, D., 2011).



Obrázek 1 – Charakteristické fenotypové vlastnosti nádorové tkáně, jejichž získání vede k přeměně normálních buněk v buňky maligního nádoru; zdroj: autor

4.1 SOBĚSTAČNOST V PRODUKCI RŮSTOVÝCH SIGNÁLŮ

Normální buňky potřebují získat mitogenní růstové signály (mitogenní signály jsou takové, které posunují buňku směrem k zahájení buněčného cyklu, pro přesun z klidového stádia (G_0 fáze) do proliferační fáze (G_1 fáze)). Tyto signály buňka získává prostřednictvím transmembránových receptorů. Podle doposud získaných poznatků nemůže žádná fyziologická buňka proliferovat, pokud nepřijme některý z těchto RS. Nádorové buňky redukují svou závislost proliferace na těchto RS. Dokonce jsou schopny si vytvářet mnoho vlastních RS, což ještě více redukuje jejich závislost na jejich mikroprostředí. Tato nezávislost nádorových buněk na okolí a přísunu RS kriticky narušuje velice důležitý systém tkáňové homeostázy, který běžně řídí správné chování rozličných druhů fyziologických buněk (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000). Předpokládá se, že většina RS řídící proliferaci nádorových buněk pochází z buněk nádorového stroma (Skobe, M., Fusenig, N.E., 1998).

V nádorové tkáni je mnoho buněk schopno si vytvářet růstové faktory, na které samy následně reagují a vytváří si tak signální smyčku. Tento proces je nazýván autokrinní stimulací (Fedi, P. et al., 1997). Nádorové buňky navíc mohou změnit typ exprimovaných receptorů, aby byly přítomny zejména ty, které umožňují reagovat na růstové signály přítomné v nádorovém mikroprostředí (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

V laboratorních podmínkách byla necitlivost k růstovým signálům prokázána v kultuře buněk normálních i nádorových. Zjistilo se, že rozdíl ve schopnosti dělit se a růst mezi buňkami normálními a nádorovými není příliš veliký. Pokud kultivujeme normální buňky v prostředí, které podporuje jejich růst, rozvíjí se a rostou stejnou rychlostí jako s nimi srovnávané nádorové buňky. Jakmile však normální buňky pokryjí dno kultivační mističky, jejich proliferace poklesne a buňky setrvávají v jedné vrstvě (*monolayer*). Buňky totiž reagují na své prostředí a odpovídají na přicházející inhibitory z okolí. Pokud však nádorové buňky pokryjí celé dno kultivační mističky, jejich růst neustává a buňky rostou přes sebe a hromadí se – to dokazuje jejich necitlivost k růstovým signálům (Karp, G., 2008).

4.2 NECITLIVOST K SIGNÁLŮM ZASTAVUJÍCÍ BUNĚČNÝ CYKLUS

Nádorové buňky získávají oslabenou citlivost k působení antiproliferačních signálů. Tyto signály jsou přijímány stejně jako signály růstové přes transmembránové receptory a jsou dále přenášeny intracelulárními signálními dráhami. Antimitogenní signalizace obecně blokuje proliferaci. Posunuje buňky do klidové fáze buněčného cyklu – do bodu G₀, nebo do postmitotické fáze (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000; Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Vznikající nádorové buňky musí obejít působení antiproliferačních signálů, aby si získaly a uchovaly proliferační aktivitu. Signální dráhy, které umožňují fyziologickým buňkám reagovat na antiproliferační signály, jsou spojeny s buněčným cyklem, zejména s přechodem buňky z G₁ fáze do S fáze. Buňky jsou během G₁ fáze připraveny reagovat na signály z jejich okolí a dále se rozhodují, zda proliferovat, zůstat v klidové fázi či přejít do postmitotické fáze. Téměř veškeré antiproliferační signály vedou v buňkách k zasažení signální dráhy obsahující protein retinoblastom (pRb) a jemu dva příbuzné proteiny p107 a p130 (Weinberg, R.A., 1995; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Pozastavení buněčné proliferace může také být výsledkem vnitrobuněčné signalizace. Nádorový supresor p53 je stabilizován či aktivován například při poškození DNA, aktivací některých onkogenů či při hypoxii (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003). Nádorové buňky dále mohou inhibovat expresi integrinů a adhezních buněčných molekul, které působí jako antiproliferační signály; naopak mohou podporovat expresi takových, které přenáší signály proliferační (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Buněčná proliferace však závisí na více faktorech, než jen vyhnutí se antiproliferačním signálům. Nádorová buňka se musí také vyhnout nenávratné postmitotické fázi,

kdy dochází k diferenciaci jednotlivých buněk. Jedna ze strategií vyhnutí se diferenciaci zahrnuje onkoprotein Myc (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000). Signály indukující diferenciaci jsou během normálního vývoje zprostředkovány komplexem transkripčních faktorů Mad-Max. Pokud je však patologicky nadprodukován protein Myc, protein Mad je vytěsněn z komplexu a vzniká komplex Myc-Max. Ten má však zcela jiný účinek na transkripci cílových genů a dochází ke zvratu procesu diferenciaci (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

4.3 POŠKOZENÁ APOPTÓZA

Schopnost populace nádorových buněk přežít a dále expandovat není dána pouze zvýšenou rychlostí proliferace, ale také poškozením apoptotického procesu. Apoptický program je přítomen latentně ve všech buněčných typech. Jakmile je jedinou proces apoptózy spuštěn, proběhne dle přesně předem daných kroků až do konce. Tyto kroky jsou: narušení buněčné membrány, degradace cytoskeletu a cytoplazmy, zaškrcování cytosolu, degradace chromozomů, fragmentace jádra a úplné vymizení buňky. Signálem pro spuštění apoptózy může být poškození DNA, hypoxie, deregulace některých onkogenů, přítomnost signálů smrti či nepřítomnost signálů přežití atd. (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Signály aktivace apoptózy přicházejí jednak z extracelulárního prostředí, a jednak na základě změn uvnitř buňky, z intracelulárního prostředí. Nejčastěji dochází k získání rezistence aktivace apoptózy díky mutacím genu p53 a poškozením signální dráhy p53. Deaktivace proteinu p53, je nalézána ve více než 50 % všech lidských tumorech, jak již bylo řečeno (Harris, C.C., 1996).

U některých nádorů pak může být necitlivost k aktivaci apoptózy vnější cestou způsobena např. sníženou expresí, mutací nebo jinou inaktivací receptorů smrti, např. receptoru Fas. Negativní regulátory apoptózy mají onkogenní potenciál. Jejich patologická aktivace je součástí karcinogeneze (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Signály z vnitřního prostředí buňky, tzv. vnitřní dráha aktivace apoptózy, vedou k integraci pro- a anti- apoptických signálů. Pokud převáží proapoptické signály, dojde k uvolnění cytochromu C z mitochondrií, a je prostřednictvím kaspázy 9 aktivována efektorová část apoptózy. Proteiny z rodiny Bcl-2, snižující permeabilitu mitochondriální membrány, zabraňují uvolnění cytochromu C a tím působí antiapoptoticky (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003)

4.4 NEOMEZENÝ REPLIKAČNÍ POTENCIÁL

Přestože nádorové buňky díky získání soběstačnosti v produkci růstových signálů a necitlivosti k signálům zastavující buněčný cyklus by měly být schopny vytvořit makroskopický nádor, tzn. „velkou“ masu buněk. Obsahují buňky vnitřní mechanismus, který limituje replikační potenciál a který musí také nádorové buňky překonat. Pro vytvoření makroskopického nádoru je tedy nepostradatelnou součástí karcinogeneze získání neomezeného replikačního potenciálu (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Experimentální pozorování buněk v tkáňové kultuře ukázalo, že normální typy lidských buněk mají konečný počet buněčných dělení – zhruba 60-70. Po dosažení tohoto počtu dělení přestávají buňky růst, začínají stárnout a mění svůj fenotyp. Metabolicky aktivní klidový stav, který poté nastává, se nazývá senescence a je velice stabilní. Stav senescence lze u lidských buněk obejít deaktivací dvou nádorových supresorů, které udržují buňky mimo buněčný cyklus, pRb a p53. Poté se mohou buňky dále dělit, dokud nedojdou do stavu, nazývaného krize. Tato fáze je charakteristická masivním úhynem buněk, který je důsledkem kumulace velkého množství chromozomálních abnormalit (vč. „end-to-end“ fúzí chromozomů). V této fázi je také velice nízká šance (1 z 10^7), že některé buňky získají možnost se replikovat bez omezení a tím pádem se stát nesmrtelnými (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Repetitivní sekvence na koncích lineárních chromozomů, telomery, jsou oním molekulárním mechanismem, který určuje vnitřní replikační potenciál buněk. V lidském těle jsou tvořeny mnoha opakováními sekvence TTAGGG v délce od 5 až 15kb. U normálních buněk se tyto repetice v důsledku mechanismu replikace, kdy není možno nahradit koncový RNA primer, zkracují. To znamená, že DNA je replikována mechanismem, který neumožňuje kompletní replikace 3'-konce DNA. Právě proto jsou pak při každé replikaci dceřiné řetězce DNA na 5'- konci kratší. V každém následujícím buněčném cyklu se tak telomery zkracují o 50 až 200 párů bází, dokud nedojde ke kritickému zkrácení, kdy už telomery nejsou schopny chránit konce chromozomů. Po zhruba 60-70 děleních je toto zkrácení tak velké, že buňka jej rozeznává jako poškození DNA, to je signálem (zprostředkovaný p53 a pRb) k zastavení buněčného cyklu a senescenci (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

V nádorových buňkách jsou na tyto telomery navázány složité proteinové komplexy, které chrání konce lineárních chromozomů tak, aby je buněčné mechanismy nevnímaly jako

zlomy DNA a tudíž nebyly degradovány či spojovány fúzí. Zároveň aby nedocházelo ke zkracování telomer, je potřeba aby byl v buňkách přítomen ribonukleoproteinový enzym telomeráza. Ta zajišťuje, že při replikaci chromozomů jsou oba konce chromozomu zreplikovány úplně.

Enzym telomeráza se skládá z RNA podjednotky a katalytické podjednotky TERT. Právě gen pro podjednotku TERT ve většině lidských somatických buňkách neexprimuje a při každé replikaci dochází ke zkracování telomer, čímž limituje počet replikací jednotlivých buněk. Téměř všechny maligní nádorové buňky mají schopnost udržovat délku telomer a to většinou (85-90 %) díky expresi podjednotky TERT a tedy díky přítomnosti telomerázy. Ta je v nádorových buňkách aktivní až v pozdějších fázích karcinogeneze, protože telomery jsou v těchto buňkách o něco kratší než v buňkách somatických. Z důvodu tak vysokého procenta výskytu telomerázy u nádorových buněk je telomeráza jeden z univerzálních znaků nádorových buněk, významně odlišuje nádorové buňky od ostatních (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Zbýlých cca 15 % nádorových buněk užívá alternativní mechanismus na udržení délky telomer. Tento mechanismus je založen na rekombinaci DNA – tzv. ALT („*alternative telomere lengthening*“); pro tyto buňky jsou charakteristické nestejně dlouhé a často velmi dlouhé telomery (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

4.5 POSÍLENÁ ANGIOGENEZE

Angiogeneze je termín označující novotvorbu cév. Jedná se o velice složitý proces, do kterého se zapojuje velké množství genů jak nádorových, tak nenádorových buněk, tzn. na angiogenezi se podílí produkty genů většiny buněk nádorového mikroprostředí. Schopnost tvořit cévy (angiogenní fenotyp) patří mezi získané vlastnosti tumoru. Neovaskularizaci je indukována nádorovými buňkami od objemu nádorové masy 1-2mm³. Pokud by nádor neměl schopnost tvořit nové cévy, bylo by to limitem jeho růstu, protože by se nádorovým buňkám nedostávalo přísunu kyslíku a živin. Již v sedmdesátých letech minulého století začal experimentální výzkum angiogeneze a jejího významu pro růst nádoru, který se ještě zintenzivnil v 90. letech (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

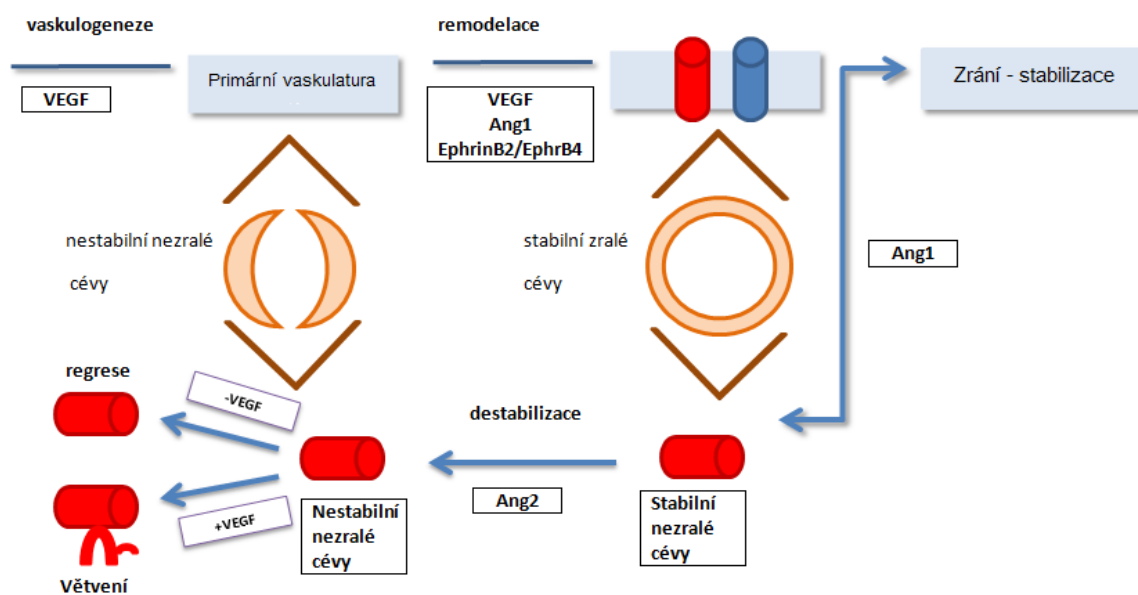
Během organogeneze mají všechny buňky tkáň zajištěn přístup ke zdroji kyslíku a živin koordinovaným růstem a vývojem cév společně s parenchymem. Ve chvíli, kdy je vývoj tkáň dokončen, proces růstu je proces angiogeneze omezen a přísně regulován.

Nádorové buňky jsou schopny produkovat řadu faktorů, které stimulují angiogenezi. V nádorové tkáni je původně přesně regulovaný procs angiogeneze patologicky změněn přepnutím na angiogenní fenotyp (tzv. angiogenní switch). Toto přepnutí je nejčastěji indukováno hypoxií, zánětem a podporováno expresí onkogenů (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Aktivace angiogeneze vysvětluje hypotéza rovnováhy (viz obrázek 3). Angiogeneze je podle této teorie regulována rovnováhou mezi inhibitory (jejich převaha angiogenezi vypíná) a aktivátory (jejich převaha angiogenezi zapíná). Mezi některé v současné době známé aktivátory patří faktor bFGF a FGF (bazický a acidický fibroblastový růstový faktor) a VEGF – (vaskulární endoteliální růstový faktor). VEGF, respektive rodina růstových faktorů VEGF, jsou nejprozkoumanějšími angiogenními faktory. Členové této rodiny stimulují proliferaci, přežití a také migraci aktivovaných endotelových buněk. Mezi další faktory patří TNF – (tumor nekrotizující faktor). Při odbourávání extracelulární matrix, během nádorového růstu, jsou uvolňovány a aktivovány další faktory, které jsou na matrix vázány. Jedná se například o FGF faktor. Předpokládá se, že mnoho dalších faktorů bude ještě objeveno (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003; Klener, P., Klener jr., P., 2010)

Nové cévy se mohou vyvíjet z endoteliálních prekurzorů (EP) - tento proces nazýváme vaskulogenezi. Novotvorba cév není závislá na již existujících cévách. Vaskulogenezi vznikají fyziologický primitivní embryonální cévy, které jsou formovány na základě endoteliálních progenitorů (CEP), které mají původ v kostní dřeni. Mobilizaci CEP působí faktory jako VEGF, TGF β a další, které tak hrají klíčovou roli v angiogenezi – viz obrázek 3 (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003, Klener, P., Klener jr., P., 2010).

Samotná angiogeneze je realizována různými mechanismy. Nejčastěji dochází k angiogenezi pučením a/nebo intususcepí již nově vytvořených cév. Další možností je angiogeneze pučením; mozaikové cévy, kdy jsou cévní stěny vytvořeny z částí nádorovými buňkami; vaskulogenní mimikry – nádorové buňky vytvářejí avaskulární kanály, kterými protéká krev, případně plazma; nádor může také růst podél již vytvořených cév, což se nazývá koopce cév (Klener, P., Klener jr., P., 2010).

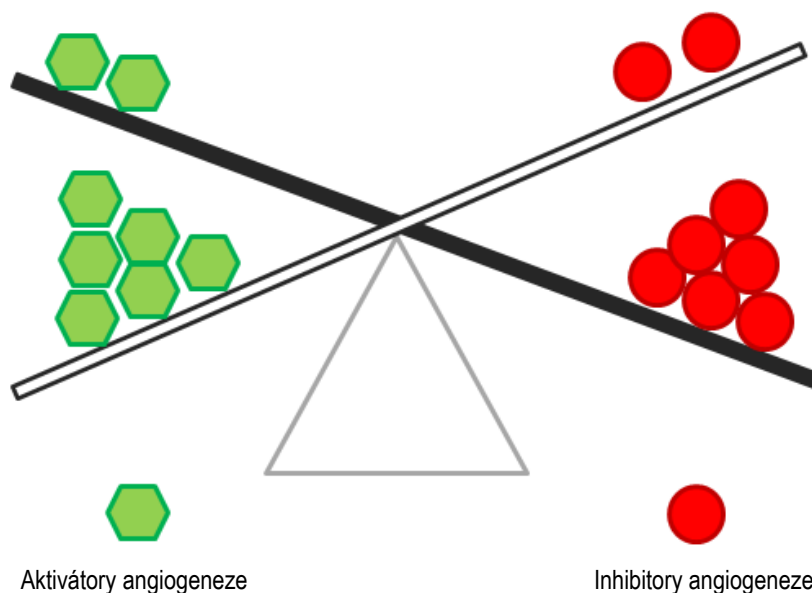


Obrázek 2 – Průběh angiogeneze; znázorněny jsou 3 hlavní fáze angiogeneze: vaskulogeneze, remodelace, stabilizace a nejdůležitější faktory, které se podílejí na jejich průběhu; zdroj: upraveno dle Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003

Rozdíl mezi angiogenezí nádorovou a fyziologickou je ten, že proces nádorové angiogeneze je značně nekontrolovaný, živelný a v podstatě deregulovaný. Cévy tumoru, které vzniknou angiogenezí jsou proto chaotické, neuspořádané, nevyzrálé, bez bazální membrány a nemají téměř žádnou vrstvu podpurných buněk, tzv. pericytů (buněk hladkého svalstva). Následkem toho je pak časté krvácení nebo naopak trombózy, průnik plazmy do intersticia a následné zvyšování intratumorálního tlaku. Vlivem zvýšeného tlaku klesá průnik chemoterapeutik do nádoru, zhoršuje se průtok krve nádorem a tím pádem dochází k hypoxickým nekrotázám, které opět vedou k další stimulaci angiogeneze (Klener, P., Klener jr., P., 2010).

Míra neovaskularizace je závislá na typu nádoru. Nejvyšší je u gliomů; u chondrosarkomů je naopak velice malá. Mimo to má každý nádor odlišnou neovaskularizaci. Čím je lépe zásobován krevním oběhem, tím je horší prognóza nemocného. Vyhodnocování angiogeneze u maligních chorob je v posledních letech v popředí zájmu, a stimuluje vývoj nových léků zabírající právě angiogenezi (Klener, P., Klener jr., P., 2010). Od devadesátých let 20. století lze pozorovat nástup klinických studií, které užívají antiangiogenní léky. Je zkoušeno přes 40 látek s antiangiogenním účinkem, některé už podstupují fázi III klinických studií. Antiangiogenní léčiva jsou v několika bodech odlišná od klasické cytostatické léčby. Obecně účinkují pomaleji a jsou lépe snášena. Při jejich užívání ale může být narušeno hojení ran a také např. fertilita. Terapie není

nádorově specifická, také je možno ji kombinovat s dalšími protinádorovými léčebnými postupy. Léky, které inhibují angiogenezi, fungují dvěma způsoby – buď blokují účinek stimulatorů angiogeneze, nebo zvyšují aktivitu endogenních inhibitorů angiogeneze. (Klener, P., Klener jr., P., 2010).



Obrázek 3 - Aktivace angiogeneze je výsledkem převahy aktivátorů angiogeneze, nad jejími inhibitory; zdroj: upraveno dle Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003

4.6 TVORBA METASTÁZ

Během růstu většiny typů tumorů dochází dříve či později k uvolnění nádorových buněk ze tkáně primárního nádoru. Tyto buňky se lymfatickými nebo krevními cévami dostávají dále do organismu a některé z těchto buněk mají v pro ně příznivých místech schopnost vytvořit sekundární nádor – metastázu. Prostředí vhodné pro vznik sekundárních nádorů je takové, kde mají vycestovalé nádorové buňky alespoň zpočátku neomezený přístup živin a dostatečný prostor pro svůj růst a rozvoj. Aby byla invaze úspěšná a metastázy se mohly rozvíjet, buňky sekundárního nádoru musí mít samozřejmě uchovány výše zmíněné charakteristické vlastnosti nádorové tkáně. Vznik sekundárního nádoru probíhá na základě tzv. metastatické kaskády, kdy nejprve:

- 1) nádorová buňka se uvolňuje z primárního nádoru
- 2) prostupuje extracelulární matrix (ECM) a bazální membránou
- 3) dostává se do krevního (případně lymfatického) systému, kterým migruje
- 4) prostupuje opět bazální membránou a ECM
- 5) zakládá ohnisko sekundárního nádoru

(Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000)

Dva podstatné rysy metastazování, které tento proces provází, jsou:

- 1) postupná změna buněčných adhezí – nádorové buňky jsou méně adhezivní
- 2) remodelace ECM – nádorové buňky vytvářejí méně ECM

Buňka komunikuje s okolím pomocí několika typů adhezivních molekul. Mezi tyto molekuly patří například kadheriny, imunoglobuliny, integriny, selektiny aj. Kadheriny jsou jednořetězcové transmembránové glykoproteiny, díky kterým jsou zprostředkovány homotypické mezibuněčné adherence. Ve všech pevných tkáních jsou kadheriny intenzivně exprimovány – zajišťují fyzický kontakt mezi buňkami a také přenos antiproliferačních signálů mezi sousedními buňkami. U epitelových tkání je hlavní adhezivní molekulou E-kadherin. U většiny karcinomů je pozorováno poškození její funkce vlivem mutace genů nebo metylací promotoru. Právě ztráta exprese nebo funkce E-kadherinu souvisí s invazivitou a tvorbou metastáz (Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000; Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Také u zmíněných integrinů může docházet ke změně v jejich expresi, což je pozorováno u invazivních a metastatických buněk. Integriny jsou heterodimerické receptory skládající se z α a β řetězců; integriny zajišťují komunikaci mezi buňkou a ECM, v malé míře také interakci mezi buňkami navzájem. Téměř všechny buňky v těle musí být spojeny s ECM, aby mohly přežít. Pokud se vazba buňky s ECM naruší, za normálních okolností dojde ke spuštění apoptózy – tento jev se nazývá anoikis. Závislost na přichycení zprostředkovávají právě integriny a anoikis je pak následkem nedostatku signálů přežití. Metastazující buňka, která migruje, prochází proměnlivým prostředím, a tudíž se setkává i s odlišným složením ECM. Aby buňka přežila, musí se na prostředí adaptovat a v tom jí napomáhají integriny – buňka mění jejich spektrum, které na svém povrchu exprimuje (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Aby se mohla migrující nádorová buňka dostat z krevního řečiště do místa svého metastazování, musí narušit bazální membránu a ECM. Proteolytické enzymy, které se na jejich degradaci podílí, představují 4 třídy proteáz: serinové, asparátové, cysteinové a metaloproteinázové. Právě metaloproteinázy mají hlavní roli při fyziologické remodelaci ECM a invazi nádorových buněk. Zvýšená aktivita metaloproteináz obecně souvisí se schopností metastazování – může být např. zvýšena exprese těchto proteinů. Zajímavé je, že proteázy podílející se na remodelaci ECM během metastazování neprodukují jen nádorové buňky – naopak je téměř většina metaloproteináz produkována stromatálními buňkami, zatímco nádorové buňky mohou uvolňovat faktory, které podporují tvorbu těchto proteinů stromatálními buňkami (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Mimo tento způsob vzniku metastáz existují ještě tzv. implantační metastázy, které se nachází v serózních a obdobných perforovaných dutinách jako na peritoneu, v perikardu, na pleuře apod. Při prostupu nádoru totiž dochází k oddrolování jeho částic, které se mohou příležitostně ujmout na vzdálených místech dutiny (Rejthar, A., Vojtěšek, B., 2002).

Metastáza vykazuje strukturu nádoru jako takového. Metastázy mohou vznikat ve tkáních, orgánech, v tělních dutinách a lymfatických uzlinách. Pokud je u pacienta nádorové onemocnění diagnostikováno ve stádiu, kdy jsou metastázy přítomny, prognóza pro vyléčení se výrazně snižuje – až 90 % úmrtí na nádorová onemocnění je způsobeno právě metastazováním primárního nádoru (Sporn, M.B., 1996). Důvodem je, že chirurgické odstranění metastáz je velice omezené, jelikož přístup k nim je často problematický nebo zcela nemožný (Karp, G., 2008). Pokud je v krvi či orgánu nález omezen pouze na jednotlivé buňky, je prognóza pro pacienta lepší. Takovéto izolované maligní buňky nazýváme reziduální chorobou – nikoliv metastázou. Z těchto reziduálních chorob se pravděpodobně ne vždy vyvine metastáza - některé z takových buněk zahynou v krevním oběhu či mimo něj (Klener, P., Klener jr., P., 2010).

Samotný průnik nádorových buněk do krevních a lymfatických cév ještě nemusí znamenat, že dojde k metastatickému procesu. Jen asi 0,1 % buněk uvolněných z primárního nádoru dává vzniku metastázám. Z uvolněných buněk do krevního a lymfatického řečiště jsou přibližně 2,5 % schopny vlastní proliferace, angiogeneze a následné tvorby mikrometastáz. Mikrometastázy si v 99 % případů zachovávají svoji velikost, a za čas zaniknou. I nádorové buňky s angiogenním a metastatickým fenotypem jsou však po poznání lymfocyty ničeny jak specifickými, tak nespecifickými imunitními silami (Rejthar, A., Bořivoj, V., 2002).

V klinických studiích bylo statisticky prokázáno, že mezi velikostí tumoru a rychlostí jeho šíření je lineární závislost. Je to dáno přítomností buněk, které získaly agresivnější (a tím pádem invazivnější) vlastnosti, než měly původní nádorové buňky (více se dediferenciovaly). Doba, která uplyne mezi vznikem primárního nádoru a následným vznikem jeho metastázy, se u různých nádorů liší. Byly pozorovány pozdní metastázy, které vznikly 5-10 let po resekci nádorů, jindy vznikají záhy po vytvoření primárního nádoru. Předpokládá se, že metastazující buňky jsou v neproliferující G₀ fázi, dokud je nějaký stimul posune do proliferačního cyklu (Klener, P., Klener jr., P., 2010).

4.7 NESTABILITA GENOMU

Jak je již uvedeno, genetická nestabilita nádorových buněk je předpokladem a součástí nezbytnou karcinogeneze. Nestabilita genomu je důvodem velkého množství změn v dané buňce (buňkách), z které vzniká vlastní nádor. Známa mutační rychlost v somatických buňkách činí 10^{-7} na gen na generaci buněk – což by znamenalo, že k akumulaci tolika mutací by nemohlo za život člověka dojít. Je proto obecná představa, že nádorové buňky jsou geneticky nestabilní; je u nich zvýšená mutační rychlost, jejichž výsledkem je získání všech výše uvedených fenotypových vlastností buněk související s karcinogenezí. Genetická nestabilita tak má pro nádorová onemocnění zásadní význam - stojí za heterogenitou nádorové tkáně, o které bude pojednáno ve zvláštním odstavci (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

U nádorů lze pozorovat dva typy genetické nestability. První typ se odehrává na úrovni změn sekvence nukleotidů DNA a je spojen především s poruchami oprav DNA. Častěji se však setkáváme s typem genetické nestability, kdy dochází ke změně počtu chromozomů a dochází k poruchám řízení kontrolních bodů buněčného cyklu (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

4.7.1 OPRAVY DNA

Poruchy opravných mechanismů DNA nejsou příliš časté, ale jejich následky jsou velice závažné. Opravy DNA představují enzymové odstranění chyb DNA vznikající během replikace, rekombinace, případně při působení vnějších vlivů na DNA buňky. Existuje více způsobů, kterými se poškozená místa na DNA v buňkách opravují. Právě tyto způsoby opravy jsou u nádorových buněk narušeny – pozorujeme zejména poruchy dvou typů oprav DNA – poruchy nukleotidové excisní opravy a opravy nesprávného párování (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Při nukleotidové excisní opravě (NER) se báze poškozené vnějšími vlivy enzymaticky vyštěpují z DNA a jsou nahrazovány správnými nukleotidy. Na NER se podílí několik proteinů, které jsou kódovány geny *XP-A* až *XP-G*. Vrozené mutace těchto genů jsou příčinou vzácného recesivního onemocnění – *Xeroderma pigmentosum*. Při tomto onemocnění je zvýšená citlivost k UV a vysoké riziko vzniku nádorů kůže v místech vystavených slunci (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Při opravě špatného párování (tzv. „*mismatch repair*“ - MMR) jsou během replikace chybně zařazené nukleotidy následně enzymaticky odstraňovány. Poruchy MMR vedou

k mikrosatelitové nestabilitě. Oprava DNA typu MMR je realizována větším množstvím genů. Při vrozené mutaci těchto genů se vyvíjí tzv. Lynchův syndrom. Ten je spojen s rizikem vývoje nepolypózního kolorektálního karcinomu a v menší míře i jiných nádorů (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

S vysokým rizikem vývoje nádorů je spojeno nejen poškození opravných mechanismů, ale všech systémů, které mají za úkol detekovat poškození a signalizovat zahájení opravných procesů. Zásadní roli zde má nádorový supresor p53, který právě po poškození DNA zastavuje buněčný cyklus a u buněk s poškozenou molekulou DNA, kterou nejsou schopny opravit reparační mechanismy buňky, zahajuje apoptózu (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

4.7.2 CHROMOZOMÁLNÍ NESTABILITA

Provedené karyotypické studie ukázaly, že velké množství nádorů je aneuploidních – tzn., že u nich došlo ke změně počtu chromozomů. Karyotypie pak může být jednou z forem ztráty heterozygotnosti, která silně zvýhodňuje buňky, u nichž došlo k vyřazení některých nádorových supresorů. Zajímavá je skutečnost, že u nádorů s mikrosatelitovou nestabilitou se nevyskytuje nestabilita chromozomální a naopak – nejspíše se tedy z hlediska navození genetické nestability jedná o ekvivalentní procesy (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

V kontrolním bodě buněčného cyklu během mitotické fáze probíhá kontrola mitotického vřeténka. Dochází k zabránění segregaci chromozomů, pokud nejsou přichyceny k mitotickému vřeténku. Přichycení chromozomů k mitotickému vřeténku je zajišťováno speciálními proteinovými komplexy – tzv. kinetochory. Na detekci kinetochorů nepřichycených k vřeténku se podílí proteiny jako MAD2, CDC20 a další. V mnoha rozličných typech nádorů byly nalezeny mutace či změny exprese některých z těchto genů a byla prokázána i jejich souvislost s progresivní aneuploidíí těchto nádorů (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Mutace nádorového supresoru APC („*adenomas polyposis coli*“) přináší buňkám výhodu v rámci genetické nestability. Tato mutace se projevuje hned v časných stádiích vzniku kolorektálního karcinomu; hereditární mutace tohoto genu jsou příčinou onemocnění familiární adenomatózní polypózou. Kromě regulace volné hladiny β -kateninu se tento protein jako součást kinetochoru podílí na správné interakci mezi chromozomy a mitotickým vřeténkem, čímž ovlivňuje genetickou stabilitu buněk. Mutace APC

se uplatňuje nejen v časných stádiích, ale i ve všech dalších fázích karcinogenze, protože zvyšují pravděpodobnost hromadění dalších mutací v buňce. To vysvětluje, proč se adenomy s mutací *APC* dostávají do stadia invazivních karcinomů rychleji nežli ty, které mají mutaci β -kateninu (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

5 DALŠÍ CHARAKTERISTIKY NÁDOROVÉ TKÁŇE

5.1 INTRATUMORÁLNÍ HETEROGENITA

Původ intratumorální heterogenity byl předmětem mnoha diskuzí, které vedly k navržnutí dvou teorií pro vznik a vývoj intratumorální heterogenity - teorie o kmenových nádorových buňkách a teorie o klonální evoluci (tzv. stochastický model karcinogeneze). Hypotéza zvažující existenci nádorových kmenových buněk předpokládá, že malá část buněk s charakterem kmenových buněk dává vzniku a vývoji nádoru. Jedině tyto „nádorové kmenové buňky“ pak mají neomezené možnosti sebeobnovy. Kumulace mutací buněk a jejich následná diferenciací vede k intratumorální heterogenitě (Michor, F., Polyak, K., 2010).

Model klonální evoluce naproti tomu nabízí jiný pohled, kdy premaligní a maligní populace buněk akumulují v průběhu času rozličné změny genetického materiálu, které jsou důvodem znevýhodnění, či naopak zvýhodnění mezi jednotlivými buňkami. Karcinogeneze je pak stimulována akumulací různých mutací v jednotlivých buňkách, které dávají buňkám větší schopnost agresivity, invazivity, rezistenci k léčivům atp. Vznik nových dědičných vlastností v premaligních a nádorových buňkách tedy dává buňkám možnost vzniku heterogenity (Michor, F., Polyak, K., 2010).

Ačkoliv byly tyto dvě hypotézy nabízeny jako vysvětlení intratumorální heterogenity, jeví se příhodné je spojit, protože znaky z každé z těchto teorií můžeme pozorovat v průběhu karcinogeneze a vzniku rozdílných generací buněk – nádorové heterogenity. Pouze buňky, které mají schopnost sebeobnovy, jsou schopny přetrvat v organismu a akumulovat v sobě genetické změny nezbytné pro vznik a progresi nádorového onemocnění. Takovéto buňky nádoru pak dávají vznik všem dalším diferenciovaným buňkám nádoru. I v těchto buňkách může následně docházet ke genetickým změnám, ale dokud neobsahují mutace, které jim umožňují dokonalou sebeobnovu, jsou tyto změny z buněk „odstraněny.“ Alternativou pro vysvětlení toho, že pouze malá část buněk je schopna podpořit vznik nádoru a vzniku intratumorální heterogenity, je plasticita nádorových buněk. Podle tohoto modelu má většina buněk (nebo všechny) charakteristiku kmenové buňky na určité úrovni. Ta závisí na jejich okolních podmínkách a/nebo vnitrobuněčné náhodnosti (Michor, F., Polyak, K., 2010).

Aplikace a význam intratumorální heterogenity je důležitý zejména v oblasti léčby rakoviny. Nádorové buňky jsou velice heterogenní a průběžně se vyvíjejí směrem

k agresivnějším fenotypům, proto je nalezení účinné léčby velmi složité. Nádory obsahující odlišné buněčné klony mají jednotlivé části nádoru odlišně citlivé k terapeutikům, než jsou nádory monoklonální. Nádorová diverzita také komplikuje molekulární klasifikaci nádoru do jednotlivých podtypů pro lepší předpověď prognózy – odebraný vzorek nádoru může díky intratumorální heterogenitě představovat nereprezentativní úsek a díky tomu být nasazena i špatná léčba. Intratumorální heterogenita je tedy z klinického hlediska velice významná a je v centru zájmu výzkumu (Michor, F., Polyak, K., 2010, Gerlinger, M. et al., 2012).

6 JATERNÍ METASTÁZY KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Játra jsou při nádorovém onemocnění častěji zasažena metastázami, nežli nádorem vznikajícím primárně v játrech (viz kapitola 6). Společně s plícemi jsou játra nejčastějšími viscerálními orgány, do kterých se rozšiřují metastázy jiných nádorů. Primárními zdroji jaterních metastáz nejčastěji nádory kolorekta, dále jsou v játrech nacházeny metastázy nádorů prsu, plic a slinivky břišní. V játrech však mohou metastazovat jakékoliv jiné nádory lidského organismu. Játra díky metastázám mohou dosahovat váhy až několik kilogramů a tyto metastázy mohou představovat až 80 % z celkového objemu jater (Robbins, S., Kumar, V., Cotran, R., 2010).

Téměř všechny kolorektální karcinomy vznikají maligním zvratem adenomu (Jablonská, M. et al., 2000). Tyto nádorové buňky tedy nejsou původu jaterního. V západních Čechách a obecně v celé České republice je nádor kolorekta velice častý, a proto je potřeba věnovat pozornost i nádorům jater.

Jaterní metastázy vznikají zejména hematogenní cestou - to znamená, že na jejich počátku je vstup nádorových buněk do stromatálních krevních cév, případně do cév v bezprostředním okolí nádoru. Vznikají embolickým mechanismem (shluky nádorových buněk obalené fibrinem a trombocyty tvoří emboly) zejména v žilním systému. Žilní cestou se metastazování děje do místa fyziologického zúžení cévního řečiště, u jater převládá typ žilních metastáz *vena portae*. Právě tento typ metastáz nalézáme při lokalizaci nádoru v nepárovém břišním orgánu s metastázemi do jater (Rejthar, A., Vojtěšek, B. 2002).

Při léčení jaterních metastáz je využíváno jejich zvláštního postavení z hlediska cévního zásobení. Větší tumory vylučují TAF (*tumor angiogenesis factor*) a kapiláry arteriálního řečiště vrůstají do nádorové tkáně a živí ji. Jaterní metastázy jsou tak živeny v podstatě jen arteriální krví z aorta hepatica, zatímco normální jaterní tkáň prokrvuje tato tepna jen asi z 15%. Intraarteriální terapie využívá této skutečnosti, kdy dodává cytostatika přímo vstupem do řečiště aorta hepatica (Jablonská, M. et al., 2000).

Chirurgická léčba metastáz kolorektálního karcinomu se může řešit resekcí, neboť tyto metastázy mají proti metastázám jiných nádorů lepší prognózu. Podaří-li se odstranit celý metastatický nádor, může být vyléčení až 25%. Nemocní, u kterých byl primární nádor již v pokročilém stádiu, mají prognózu horší. Úmrtnost po resekci jaterních metastáz činí asi 2 %, recidivy po odstranění všech zjištěných ložisek se objevují průměrně po 9 měsících a resekovat je lze opět v zhruba 15% případů (Jablonská, M. et al., 2000).

Pokud bychom chtěli uvést klasické příznaky onemocnění, je nejprve důležité se zaměřit na velikost nádoru a na funkční stav jater. Jelikož mají játra velkou regenerační schopnost, často je nádor odhalen až v pokročilejším stádiu onemocnění. Mezi nespecifické příznaky můžeme zařadit například váhový úbytek, bolesti břicha, pocit plnosti nebo náhlé zhoršení již dříve zjištěné jaterní cirhózy. U nižšího procenta pacientů (zhruba u 10 %) se setkáváme se symptomy jako je hyperkalcémie či hypoglykémie a další (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010).

Nejčastěji je jaterní karcinom diagnostikován pomocí sonografie, spojené s dopplerovským vyšetřením portální žíly. Dále je prováděno CT a ve sporných případech magnetická rezonance jater. Magnetická rezonance je pak založena na kontrastních látkách (hepatospecifické a supramagnetické kontrastní látky), díky kterým je možno zobrazit normální funkční tkáň a ložiska nádoru. Metastázy jater nejčastěji nacházíme v plicích, nadledvinách a kostech (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010; Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

Léčba může probíhat na úrovni radikální terapie, či prostřednictvím neradiálních terapeutických postupů. Radikální terapie zahrnuje chirurgickou léčbu, kdy jsou játra resekována či transplantována. Jedná se v podstatě o jedinou kurativní metodu, kdy po resekci tumoru přežívá zhruba 60-70 % pacientů i po 5 letech od zákroku. Výsledek záleží na velikosti ložiska, lokalizaci a zejména na funkci a schopnosti jater. Při resekci karcinomu jater je klíčové odstranění veškerých nádorových buněk. Ponechání drobného ložiska by vedlo k progresi a zákrok by tak byl zbytečný (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003). Pro úplnou transplantaci jater (kdy má pacient šanci pětileté přežití bez nádorového postižení kolem 70 %) a zařazení do transplantačního programu je podmínkou splnění tzv. „milánských kritérií.“ Tato kritéria stanovují, že „játra postihuje pouze jeden nádor do 5 cm nebo maximálně 3 nádory menší než 3 cm, není vaskulární invaze či postižení lymfatických uzlin.“ Po transplantaci je nutné trvalé užívání imunosupresiv, což vede mimo jiné i ke zvýšení pravděpodobnosti vzniku nového nádoru. Transplantace jater je velice náročná metoda, omezená jak počtem dárců, tak i ekonomickými faktory. Přesto by se měl u každého pacienta tento terapeutický postup zvážit (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010).

Z výše uvedených důvodů je zřejmé, že radikální chirurgickou léčbu může podstoupit jen menší množství pacientů. Proto se nabízejí i další nechirurgické postupy, které mají podobu lokálních ablačních technik (např. alkoholová, laserová ablace). Nevýhodou těchto technik je ale vysoké procento lokálních recidiv a častá nutnost většího počtu výkonů.

Standartním postupem je embolizace nebo chemoembolizace, kdy při embolizaci je do cév vedoucí k nádoru zaveden embolizační materiál. Při chemoembolizaci s embolizačním materiálem navíc přidává cytostatikum, které se postupně uvolňuje (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010).

Další metodou je například radiofrekvenční ablace (RFA), jejímž principem je nekróza buněk způsobená lokální produkcí tepla při zavedení radiofrekvenční sondy do tumoru. Používá se u ložisek od 3 do 5 cm, nejvýše však do 7cm. Další možností ošetření je alkoholizace ložisek, kdy se do ložiska injekčně vpraví 96% etanol, kdy dochází k denaturaci bílkovin a nekróze nádorových buněk. Mezi experimentální metodu patří v současnosti kryoterapie, kdy se k tumoru zavádí sonda, která následně mrazí tkáň. Stejně tak je zatím v počátcích využití laserů (léčebný účinek infračervených paprsků ve tkáni tumoru) a radioembolizace (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010).

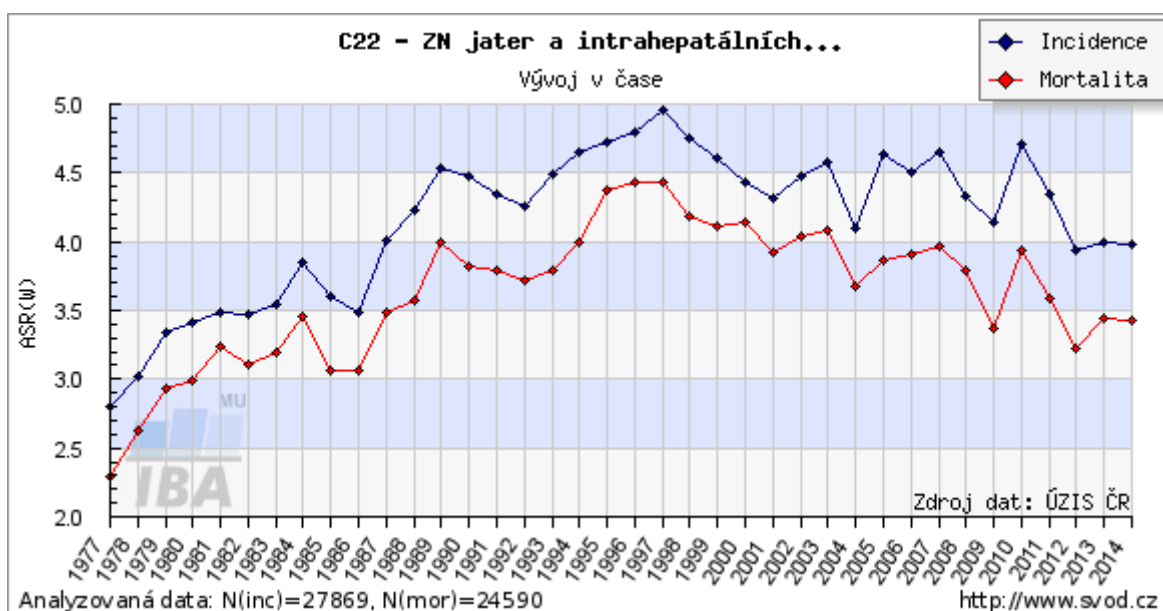
I přes veškeré pokroky v medicíně a uvedené možnosti léčby, je doposud diagnóza hepatocelulárního karcinomu spojena se špatnou prognózou. Pětileté přežití pacientů s touto diagnózou dosahuje pouhých 2 %. Důvodem je zejména pozdní odhalení tumoru, přítomnost dalších onemocnění jako je např. jaterní cirhóza a další postižení jater (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010).

7 HEPATOCELULÁRNÍ KARCINOM

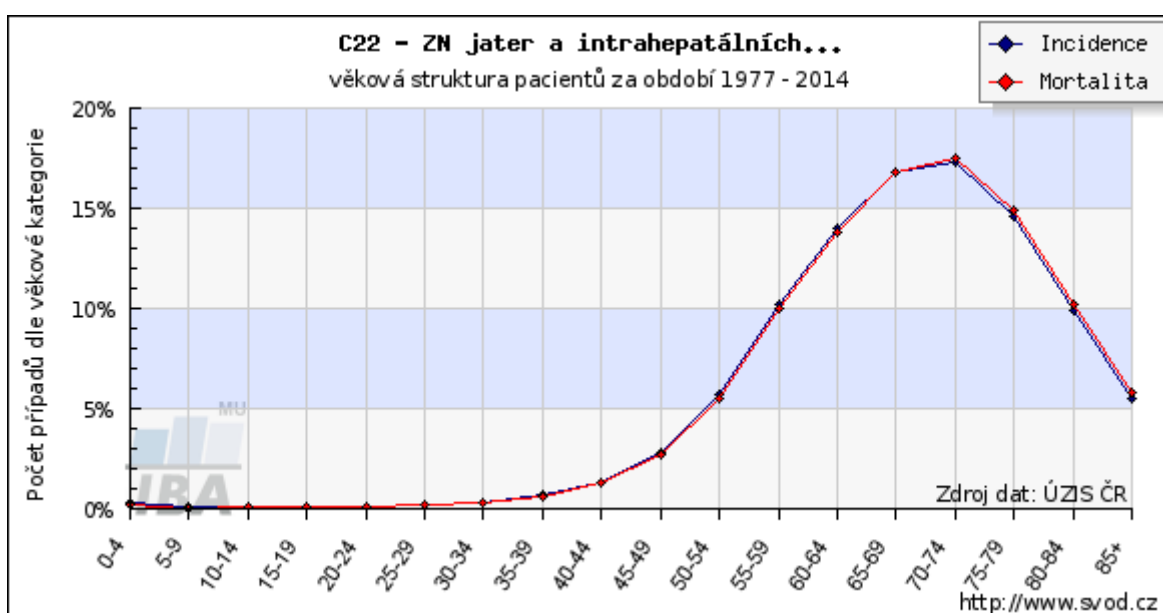
Další malignitou, která postihuje játra je hepatocelulární karcinom (dále jen HCC). HCC je tvořen buňkami s hepatocelulární diferenciací. Tento typ nádoru zastupuje celých 90 % všech primárních zhoubných nádorů jater. Jedná se o nádor, který vzniká přímo v játrech z jaterních buněk.

Co se výskytu zhoubných nádorů jater týče, k roku 2004 bylo v České republice nahlášeno celkem 480 nových onemocnění u mužů a 286 u žen. Incidence byla k roku 2014 3,98 osob na 100000 zdravých osob, úmrtnost pak 3,43 osob ku 100 tisícům zdravých. Nejčastější věk, kdy se HCC vyskytuje je u osob ve věku od 55 do 80 let – viz obrázek 2 a 3 (Dušek et al., 2007). Celkový světový výskyt HCC je okolo 1 milionu nových případů ročně. Zajímavé je geografické rozložení malignit jater, kdy ve východní Asii představuje jeden z nejčastějších smrtelných nádorů, v Evropě a Severní Americe představuje zhruba 1-2,5 % všech malignit (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010). Tyto geografické rozdíly mohou mít souvislost se způsobem výživy v jednotlivých zemích. Z pozorování bylo zjištěno, že v oblastech s menší konzumací ovoce a zeleniny (např. Itálie, Japonsko) se incidence zvyšuje, zatímco v zemích se snižující se konzumací tuků a masa se incidence snižuje (Jablonská, M. et al., 2000).

Rizikovým faktorem, který vede ke vzniku jaterního nádoru, je chronické jaterní onemocnění, mezi které patří například jaterní cirhóza (spojená s nadužíváním alkoholu), nebo infekce virem hepatitidy B a C. Mezi karcinogenní faktory patří například léky (steroidní hormony), jiné přírodní látky (ricinový olej, aflatoxin) a další závažná onemocnění jater. Do jisté míry zvyšuje riziko vzniku karcinomu i obezita či diabetes mellitus, které jsou spojeny s poruchou lipidového metabolismu – přesný mechanismus však ještě není znám (Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., 2010).



Obrázek 4 – Incidence a mortalita na nádory jater a intrahepatálních žlučových cest (diagnóza C22) v České republice mezi lety 1977-2014; zdroj: www.svod.cz



Obrázek 5 - Incidence a mortalita na nádory jater a intrahepatálních žlučových cest (diagnóza C22) v České republice, rozdělení dle věkové struktury pacientů; zdroj: www.svod.cz

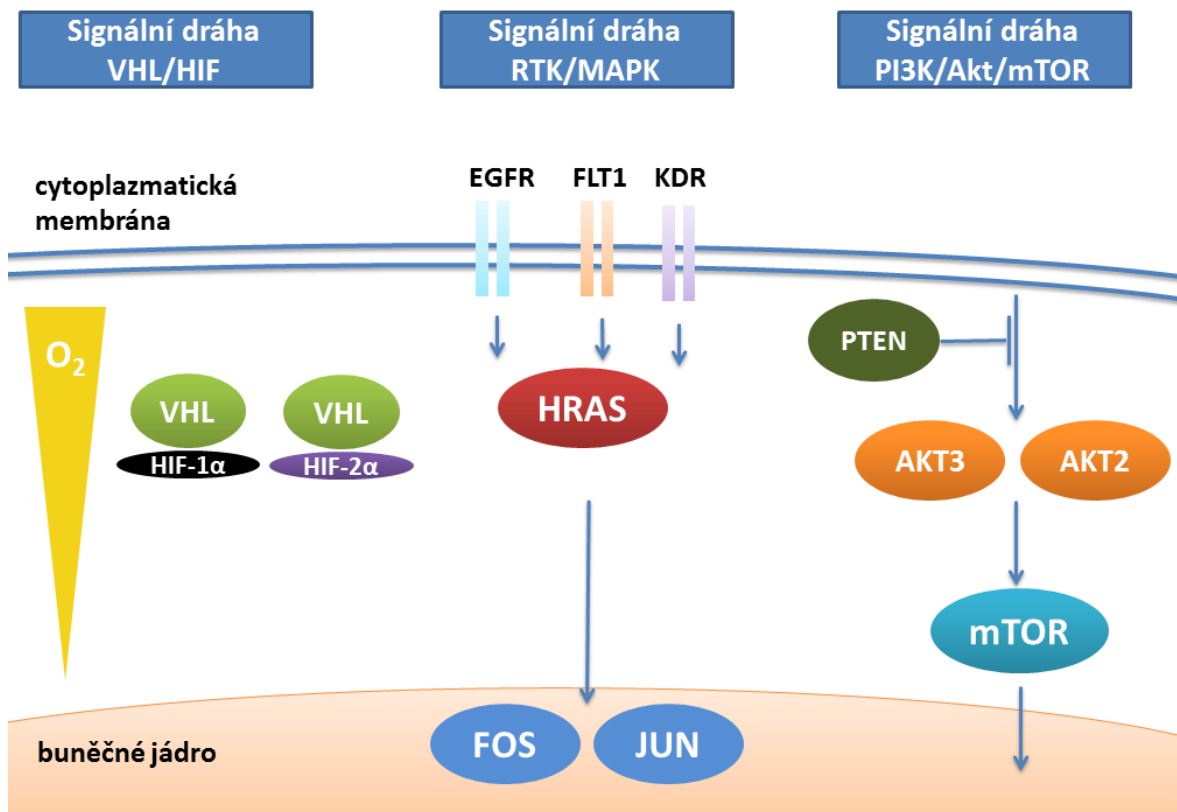
8 GENY AKTIVUJÍCÍ ANGIOGENEZI

Jak už bylo řečeno, jednou z charakteristických vlastností nádorové tkáně je posílení angiogeneze. Na sledování této vlastnosti v nádorové tkáni je zaměřena tato diplomová práce a sledována byla aktivita genů (genová exprese), jejichž produkty, proteiny, realizují novotvorbu cév. K aktivaci těchto procesů dochází v nádorové tkáni, pokud nádorová „masa“ dosáhne 1-2 mm³. Pochopení úlohy genů v procesu aktivace angiogeneze by mohlo pomoci určit ty geny, jejichž produkty jsou klíčové pro tento proces a které by mohly být cílem antiangiogenní léčby. Angiogeneze je aktivována zejména signálními drahami – VHL/HIF, PI3K/Akt/mTOR a RTK/MAPK (Steiner, P., et al., 2013). Bylo provedeno stanovení exprese genů HRAS, FLT, KDR, EGFR, FOS, JUN, které jsou klíčovými proteiny signální dráhy RTK/MAPK; dále bylo provedeno stanovení exprese genů PTEN, AKT3, AKT2 a mTOR, které jsou klíčovými proteiny signální dráhy PI3K/Akt/mTOR; a konečně bylo provedeno stanovení exprese genů VHL, HIF1 α a HIF2 α , které jsou klíčovými proteiny signální dráhy VHL/HIF.

Většina genů, jejichž exprese byla stanovena, se podílí na přenosu signálů dovnitř buňky a aktivaci genové exprese, jejímž výsledkem je novotvorba cév. Tento proces je spojen s proliferací a diferenciací buněk. Obecně můžeme nazvat tyto geny jako protoonkogeny. Dále byly stanoveny geny, které se podílejí na kontrole výše uvedených procesů a mají spíše inhibiční efekt. Tyto geny můžeme nazvat tumor-supresorové geny. V tabulce 1 je uveden předpokládaný efekt v nádorové tkáni z hlediska podpory, nebo inhibice, resp. kontroly procesu angiogeneze.

gen	předpokládaný efekt v nádorové tkáni
AKT2	onkogen
AKT3	onkogen
FLT1	onkogen
FOS(RN)	onkogen
FOS129	onkogen
HIF1 α	onkogen
HIF2 α	onkogen
HRAS	onkogen
JUN	onkogen
KDR	onkogen
MTOR	onkogen
PTEN	tumor-supresor
TP53	tumor-supresor
VHL	tumor-supresor

Tabulka 1 – Geny, jejichž exprese byla stanovena a jejich předpokládaný efekt v nádorové tkáni



Obrázek 6 – Obrázek ukazuje hlavní signální dráhy (VHL/HIF, PI3K/AKT/mTOR a RTK/MAPK) podílející se na aktivaci angiogeneze a receptory a jejich přenašeče signálů, jejichž exprese byla stanovena; zdroj: autor

8.1 SIGNÁLNÍ DRÁHA PI3K/AKT/MTOR

VEGF je signální molekula, stimulující angiogenezi a jako taková je logickým cílem antiangiogenní léčby. V současné době je pacientům s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu podáván lék Bevacizumab (komerční název Avastin), který snižuje hladinu aktivního VEGF. Důležitou signální drahou, která je aktivována molekulou VEGF je signální dráha PI3K/AKT/mTOR. Lipidová kináza PI3K je apikální molekulou této signální dráhy, jejímž významem je integrovat různorodé mitogenní stimuly vnějšího prostředí a převádět signál těchto molekul až k aktivaci jednotlivých transkripčních faktorů. Obecně se tato signální dráha podílí na kontrole buněčného cyklu a přežití, při invazivitě a také novotvorbě cév (Pozarowska, D., Pozarowski, P., 2016).

Mezi významné regulátory signální dráhy PI3K-AKT-mTOR patří PTEN („*phosphatase and tensin homologue*“). PTEN je protein kódovaný genem PTEN. PTEN je tumor-supresorem, jehož mutace jsou ve velkém počtu a s vysokou frekvencí nalézány v mnoha nádorech. Protein PTEN má funkci fosfatázy, kdy defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu v buňkách a tím inhibuje signální dráhu PI3K/Akt/ mTOR (Chen, Z., et al., 2005).

Akt2 („*RAC-beta serine/threonine-protein kinase*“), jehož protein AKT2 je také členem rodiny serin/threonin proteinkináz, jehož funkcí je fosforylace různých proteinů.

Vyazuje zvýšenou expresi u řady nádorů (např. nádor vaječníků) (Kannan, K., et al., 2015).

Akt3 („*RAC-gamma serine/threonine-protein kinase*“) je enzym kódovaný genem AKT3. Protein AKT3 je členem rodiny serin/threonin proteinkináz. AKT kinázy jsou regulátory buněčné signalizace odpovídající na růstové faktory. Je zapojen do mnoha biologických procesů, zejména buněčné proliferace, apoptózy a angiogeneze. Jeho efekt závisí na tkáňovém typu a kontextu (Chin, R., Yoshida, T., Marusyk, A., Beck, A.H., Polyak, K., Toker, A., 2014).

Mitogenem aktivované kinázy Akt2 a Akt3 přenáší signál na molekulu mTOR. mTOR („*mammalian target of rapamycin*“) je součástí dvou proteinových komplexů, mTOR komplexu 1 a mTOR komplexu 2, které regulují rozdílné buněčné procesy. Obecně má ale mTOR v obou komplexech stejnou funkci. Působí jako serin/threonin proteinkináza, která reguluje buněčný růst, syntézu proteinů atd.

Zvýšená aktivita mTOR je spojena se stimulací buňky k postupu v buněčném cyklu a zvýšení buněčné proliferace. Funkčně aktivovaný mTOR má zřejmě důležitou roli

při aktivaci zásobování nádorových buněk kyslíkem a podporou angiogeneze (Duran, I., Lambea, J., Maroto, P. et al., 2017).

8.2 SIGNÁLNÍ DRÁHA VHL/HIF

Během uplynulého desetiletí došlo k výraznému pokroku v pochopení molekulárního mechanismu, který buňky užívají k tomu, aby předjímaly a přizpůsobily se prostředí s nízkým obsahem kyslíku. Tyto procesy jsou realizovány řadou signálních drah, z nichž nejvýznamnější, jak bylo řečeno, jsou VHL/HIF, PI3K/Akt/mTOR a RTK/MAPK.

VHL je protein, který je v buňkách kódován genem VHL. Mutace tohoto genu jsou spojovány se syndromem *von Hippel-Lindau*. Protein VHL je součástí proteinového komplexu (zahrnujícího elongin B, elongin C a cullin-2) a ovládá aktivitu ubiquitin-ligázy E3. Tento komplex má roli v procesech ubiquitinace a degradace hypoxií indukovatelného faktorem (HIF) (Czyzyk-Krezska, M.F., Meller, J., 2004).

HIF (Hypoxií indukovatelné faktory) působí jako transkripčními faktory reagující na snižující se hladinu koncentrace kyslíku v buňkách – tzv. hypoxii. Pokud v buňkách nastává hypoxie, HIF1 α zvyšuje expresi genů, které podporují přežití buněk v podmínkách se sníženou koncentrací kyslíku. Jedním z těchto genů je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), který podporuje novotvorbu cév (Wong, W., et al., 2008).

HIF2 α je protein kódovaný genem EPAS1 („*endothelial PAS domain-containing protein 1*“). Jedná se o typ hypoxií indukovatelných faktorů, který patří do skupiny transkripčních faktorů odpovídajících na sníženou koncentraci kyslíku v buňce. Protein HIF2 α má odlišnou fyziologickou funkci; HIF2 α reguluje produkci erythropoietinu v dospělosti (Percy, M.J., et al., 2008).

Jak již bylo řečeno, hypoxie je mechanismem vedoucím k aktivaci exprese molekuly HIF (1 α a 2 α) a to i při nádorové progresi. Nádorové buňky používají různé strategie ke stimulaci signalizace molekulou HIF:

- 1) zvýšení exprese HIF-1 α stimulací transkripce (mRNA)
- 2) zvýšením stability proteinů

Bylo zjištěno, že HIF u vzdálených metastáz, zejména v pozdní fázi onemocnění, stimuluje angiogenezi. (Rankin, E.B., Giaccia, A.J., 2016).

8.3 SIGNÁLNÍ DRÁHA RTK/MAPK

Signální dráha receptorem aktivovaných kináz (RTK), jejichž signál je dále přenášen mitogenem aktivovanými kinázami (MAPK) ve vztahu k angiogenezi zahrnuje receptory pro VEGF a další růstové faktory. EGFR a VEGF aktivují receptory EGFR, FLT1 (VEGFR-1) a KDR (VEGFR-2), jejichž exprese byla stanovena. Tyto receptory zprostředkovně stimulují malou GTP-ázu HRAS, která ve výsledku stimuluje transkripční faktory C-FOS a C-JUN. Tyto transkripční faktory interagují s promotory genů stimulujících buňky k proliferaci a diferenciaci.

EGFR („*epidermal growth factor*“) je transmembránový protein, který je receptorem pro faktory z rodiny epidermálních růstových faktorů (*EGF family*) z extracelulárních proteinových ligandů. Mutace, které vedou ke zvýšení exprese EGFR nebo ke zvýšení jeho aktivity, jsou spojovány s velkým počtem nádorových onemocnění. Mutace mohou vést k trvalé aktivaci EGFR, což vede k nekontrolovanému buněčnému dělení (Herbst, R.S., 2004).

FLT1 („*Fms-related tyrosine kinase 1*“) je gen, kódující protein VEGFR-1 („*vascular endothelial growth factor receptor 1*“). Onkogen FLT1 je protein-kinázově aktivní, což je důležité během kontroly buněčné proliferace a diferenciaci (Shibuya, M., 2007).

KDR je gen („*kinase insert domain receptor*“) jinak také nazýván VEGFR-2 („*vascular endothelial growth factor receptor 2*“), kódující receptor pro VEGF („*vascular endothelial growth factor*“) na buněčné membráně (Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M., Cross, M.J., 2007).

HRAS je gen kódující GTPázu HRas, jinak také známou jako transformující protein p21. HRas je malý G protein rodiny Ras. Když dojde k napojení H-Ras na guanosin-trifosfát, H-Ras aktivuje Raf kinázu, což je jedním z kroků RTK/MAPK signální dráhy.

Somatické mutace genu HRAS jsou pravděpodobně zapojeny do rozvoje mnoha typů nádorových onemocnění. Mutace trvale aktivující gen HRAS vedou k nekontrolovanému buněčnému růstu (Chiose, S.I., Miller, M., Seethala, R.R., 2014).

c-Fos je onkogenem, který je součástí Fos rodiny transkripčních faktorů. Má důležitou roli v mnoha buněčných pochodech a také se se zvýšenou expresí vyskytuje u mnoha nádorových onemocnění. S onkogenem JUN tvoří heterodimer a tvoří tak jednotku AP-1 („*activator protein 1*“), která se napojuje na DNA na AP-1 specifických úsecích na promotoru a transformuje extracelulární signály v přeměny v genové expresi (Milde-Langosch, K., 2005).

JUN je onkogen kódující protein c-Jun; jedná se o první objevený onkogenní trsanskripční faktor, který je podjednotkou AP-1 („*activator protein 1*“). Jeho zvýšená exprese se vyskytuje u mnoha nádorových onemocnění a také je úzce spojena s proliferací, zvýšenou invazivitou nádorových buněk a angiogenezí (Jiao, X., et al., 2010) .

9 POUŽITÉ METODICKÉ POSTUPY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Metody molekulární biologie umožňují studovat buněčné procesy na molekulární úrovni a umožňují charakterizovat genovou expresi od úrovně DNA až po fenotyp. Zároveň tyto metody umožňují analyzovat molekulu DNA a tak identifikovat podstatu genetických chorob a vyšetřovat je v klinické praxi.

Pro analýzu angiogenetických drah byla použita metoda hodnocení genové exprese na úrovni mRNA. Analýza byla provedena jako retrospektivní a jako zdroj zkoumané tkáně byly použity formalinem fixované v parafinu zalité tkáně (FFPE) jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. Výhodou těchto bločků je, že je lze využít i zpětně a novými metodami z nich izolovat DNA a RNA pro molekulárně genetické analýzy (Smolová, B., 2016).

Vlastní exprese byla hodnocena na úrovni mRNA metodou reverzní transkripce následované PCR v reálném čase (RT real-time PCR). Tato metoda umožňuje přesné hodnocení exprese studovaných genů na úrovni mRNA a dává dobrou představu o výsledné hladině studovaných genů. Celková RNA byla izolována na základě makrodisekce z bločků FFPE, kdy byla použita pouze oblast tkáně, která byla označena patologem. Pro analýzu byla od patologa označena tkáň metastáz, přechodová tkáň mezi metastázou a normální tkání.

Metodické postupy v podkapitole 8.1 a 8.2 vychází z firemního manuálu Fa. Quiagen. V české podobě byl publikován v bakalářské práci B. Smolové. Následující text vychází z obou těchto textů a je přizpůsoben tomu, jak byl soubor vzorků zpracováván pro analýzy jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. Pro analýzy, které jsou součástí této diplomové práce, byla izolována RNA; pro budoucí analýzy, které by srovnávaly informace z úrovně exprese mRNA a DNA sledovaných genů, byly provedeny také izolace DNA z FFPE.

9.1 PŘÍPRAVA TKÁŇĚ

1. Řádně očistíme mikrotom; připravíme histologické bločky a k nim korespondující eosinová sklíčka, která mají řezy tkáně obarvené Hematoxylin-Eosinem. Na těchto sklíčkách je patologem vyznačena nenádorová, přechodová a normální tkáň.
2. Dle počtu vzorků a vyznačených oblastí, které budeme izolovat, si připravíme 1,5ml mikrozkušavky typu Eppendorf (dále jen mikrozkušavky Eppendorf), které popíšeme – př. 1T (tumor), 1N (normální tkáň). Od každého vzorku a typu tkáně zhotovíme vždy řezy do dvou zkumavek (je potřeba mít i vzorky záložní).
3. FFPE bloček upevníme do mikrotomu, pomocí šroubů srovnáme do polohy, kdy je tkáň skrajována rovnoběžně. Při krájení se orientujeme podle vyznačených oblastí na eosinovém sklíčku tak, abychom skrajovali požadovanou tkáň.
4. Vrchní cca 3-4 vrstvy z bločku skrojíme, protože jsou oxidované (na počtu skrojených vrstev záleží podle množství zalité tkáně – pokud je jí dostatek, je lepší skrojit vrstev až 5).
5. Bloček následně skrajujeme a z jeho řezů si skalpelem oddělujeme nádorovou a normální, případně přechodovou tkáň, kterou následně vkládáme do předem připravených a popsaných mikrozkušavek Eppendorf. Do každé mikrozkušavky vložíme alespoň 250 mm² skrájené tkáně. To odpovídá přibližně 5ti řezům, ale množství řezů musíme hodnotit individuálně podle plochy skrájeného materiálu.
6. Mikrozkušavky Eppendorf s nakrájenými vzorky uložíme do popsaných sto jamkových krabiček a skladujeme v temnu.

9.2 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z FFPE BLOČKŮ

K izolaci nukleových kyselin byla použita souprava AllPrep[®] DNA/RNA Kit QIAGEN.

- Příprava vybavení a potřebných reagentů: Souprava AllPrep[®] DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN), 96-100% ethanol (nepoužívat denaturovaný alkohol), 96-100% isopropanol, deparafinační činidlo DIASOLV (xylen, heptan atd.), sterilní špičky s filtrem, pipety, sterilní 2ml mikrozkušavky typu Eppendorf, centrifuga (>10.000 rpm), vortex, suchá lázeň (56 °C, 80 °C a 90 °C).

- Po otevření doposud nepoužité soupravy doplníme některé pufrы přidáním dalších chemikálií.
- Pufr FRN doplníme 42 ml isopropanolu.
- Pufr RPE doplníme 44 ml ethanolu.
- Pufr AW1 doplníme 25 ml ethanolu.
- Pufr AW2 doplníme 30 ml ethanolu.
- DNasa I je dodána v lyofilizovaném stavu. Lahvičku sklepeme a opatrně otevřeme a přidáme 550 μ l RNase-free vody. Rozpuštěnou DNasu nevortexujeme, jen rukou protřepeme a skladujeme maximálně 9 měsíců při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo 6 týdnů při $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.2.1 DEPARAFINIZACE VZORKU

1. Suchou lázeň ohřejeme na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Do mikrozkuavek Eppendorf se tkání připravenou na mikrotomu přidáme 1 ml xylenu, nebo jeho méně toxické formy - diasolv.
3. Mikrozkuavky Eppendorf řádně zvortexujeme po dobu zhruba 10 s a zcentrifugujeme 2 min v centrifuze při 13.000 otáčkách.
4. Supernatant z mikrozkuavek Eppendorf opatrně odstraníme pipetou. V tomto kroku je důležité, abychom se nedotkli špičkou pipety pelety na dně zkuavky. Následně přidáme 1ml ethanolu, tím odstraníme zbytky xylenu (diasolvu).
5. Peletu s přidáním ethanolem silně zvortexujeme 10 s a centrifugujeme 2 min při 13.000 otáčkách.
6. Pipetou nasajeme a odstraníme co možná největší množství supernatantu z mikrozkuavek Eppendorf, ty následně otevřené necháme ležet alespoň 10 minut při pokojové teplotě (RT), pro odpaření zbytku ethanolu.
7. Po vyschnutí zkuavek s peletou přidáme 150 μ l pufru PKD, který navodí příznivé podmínky pro působení Proteinasy K.
8. K vzorkům přidáme 10 μ l Proteinasy K, která rozštěpí přítomnou tkáň, dojde k rozvolnění buněk a také jejich lyzi.
9. 10 s mikrozkuavky Eppendorf silně vortexujeme a 15 min inkubujeme v připravené suché lázni (bod č.1) při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10. Během inkubace si můžeme 2ml mikrozkuhavky Eppendorf popsat a připravit si led.
11. Mikrozkuhavky Eppendorf s tkání po 15 min inkubace vyndáme ze suché lázně a přendáme na 3 min na led. Po zchlazení centrifugujeme 15 min při maximálních otáčkách (13.000 rpm).
12. Pipetou přeneseme supernatant z mikrozkuhovek Eppendorf do předem popsaných 2ml mikrozkuhovek Eppendorf. Supernatant obsahuje zlyzované buňky, a tudíž RNA pro následnou izolaci.

Mikrozkuhavky Eppendorf s peletou obsahují zbytky tkáně, dále použijeme k izolaci DNA.

9.2.2 IZOLACE RNA

1. Supernatant, který jsme přenesli do mikrozkuhovek Eppendorf inkubujeme 15 min v suché lázni při 80 °C. Díky tomu dojde k odstranění modifikací RNA, které mohl způsobit formalín.
2. Ke vzorkům přidáme 320 µl pufru RLT. PufR RLT navozuje příznivé podmínky pro zachycení RNA na silikátové kolonce během centrifugace v bodě 4.
3. Vzorky spolu s pufrem RLT vortexujeme a přidáme 1120 µl ethanolu. Zkuhavky vortexujeme. Připravíme a popíšeme růžové kolonky (jedná se o speciální zkuhavky se silikátovým filtrem, během centrifugace přes něj projde roztok a zachytí se RNA).
4. Pipetou přeneseme polovinu vzorku z mikrozkuhovek Eppendorf do růžových a popsaných kolonek. Ty centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
5. Roztok, který prošel silikátovým filtrem (tzv. filtrát) vylejeme, zkuhavky otřeme o buničinu a do kolonek napipetujeme další část vzorků.
6. Kolonky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
7. Filtrát stejným postupem vylejeme a zkuhavky otřeme o buničinu, do kolonek přeneseme zbytek vzorků.
8. Kolonky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
9. Filtrát vylejeme, zkuhavky otřeme o buničinu; do kolonek přidáme 350 µl pufru FRN.
10. Kolonky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.

11. Filtrát opět vylejeme a zkumavky otřeme o buničinu.
12. Do čisté mikrozkušavky Eppendorf napipetujeme 70 μ l pufru RDD a 10 μ l DNázy I./na 1 vzorek. Vortexujeme a krátce centrifugujeme. Případné zbytky DNA na kolonce obsažené v původním supernatantu se díky tomuto roztoku odstraní
13. Do kolonek napipetujeme 80 μ l připraveného roztoku DNázy I. a 15 min inkubujeme při laboratorní teplotě (RT).
14. Po inkubaci přidáme do kolonek 500 μ l pufru FRN. Centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
15. Filtrát přelejeme zpět do kolonek, kolonky vložíme do čistých zkumavek. Opět centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
16. Filtrát vylejeme, zkumavky otřeme o buničinu a přidáme 500 μ l pufru RPE. Pufr RPE je promývací roztok, díky němuž odstraníme kontaminující látky.
17. Kolonky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
18. Krok 16. a 17. opakujeme.
19. Kolonky přendáme opět do čistých zkumavek a centrifugujeme otevřené 5 min při 13.000 otáčkách.
20. Tyto kolonky dáme do čistých mikrozkušavek Eppendorf, přidáme 30 μ l RNA-free vody, a centrifugujeme je 1min při 12.500 otáčkách.
21. Po tomto kroku růžové kolonky vyhodíme, mikrozkušavky Eppendorf obsahující filtrát popíšeme. Cílovým krokem je změření koncentrace RNA ve vzorcích při 260nm na přístroji Nanodrop.
22. Vzorky RNA skladujeme při -70 °C.

9.2.3 IZOLACE DNA

1. Suchou lázeň ohřejeme na 56 °C.
2. Do mikrozkušavek Eppendorf s peletou přidáme 180 μ l pufru, ATL, peletu tkáň resuspendujeme a vzorky vortexujeme.
3. Do mikrozkušavek Eppendorf přidáme 40 μ l Proteinasy K.
4. Vzorky vortexujeme po dobu 10 s a inkubujeme v suché lázni 1 hodinu při 56 °C.

5. Po hodinové inkubaci teplotu suché lázně zvýšíme na 90 °C, v té vzorky inkubujeme 2 hodiny.
6. Po 2 hodinách vzorky z bloku vyndáme, necháme je vychladnout a krátce centrifugujeme (15 s při 13.000 otáčkách).
7. Do mikrozkušavek Eppendorf přidáme 200 µl pufru ATL.
8. Ke vzorkům přidáme 200 µl ethanolu a vortexujeme.
9. Popíšeme bílé kolonky (kolonky, na nichž se nachází silikátový filtr bílé barvy, který zachytí DNA) a přeneseme do nich celý obsah mikrozkušavek Eppendorf.
10. Zkušavky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
11. Kolonky přendáme do čistých zkušavek a přidáme do nich 700 µl pufru AW1, tím omyjeme DNA na filtru a zbavíme ji tak kontaminujících látek.
12. Vzorky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
13. Filtrát vylejeme stejně jako při práci s růžovými kolonkami na RNA, zkušavky otřeme o buničinu a přidáme 700 µl promývacího pufru AW2. Opět zkušavky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
14. Filtrát ze zkušavek vylejeme, zkušavky otřeme o buničinu a přidáme do nich 700 µl ethanolu. Ten odstraní v alkoholu rozpustné kontaminující látky a také napomáhá zafixování DNA na kolonce.
15. Zkušavky centrifugujeme 1 min při 10.000 otáčkách.
16. Kolonky přendáme do čistých zkušavek; otevřené je centrifugujeme 5 min při 13.000 otáčkách.
17. Po centrifugaci kolonky vložíme do čistých mikrozkušavek Eppendorf. Do nich přidáme 50 µl elučního pufru ATE. ATE je roztok deionizované vody, která umožňuje odpoutání DNA od kolonek a také její stabilizaci.
18. Vzorky centrifugujeme 1 min při maximálních otáčkách (13.000 rpm).
19. Bílé kolonky vyhodíme, mikrozkušavky Eppendorf obsahující filtrát popíšeme a koncentrace DNA ve vzorcích změříme jako u RNA na přístroji Nanodrop při 260nm.
20. Vzorky DNA vždy skladujeme při -20 °C.

9.3 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Jedná se o metodu, která umožňuje syntetizovat s použitím enzymu reverzní transkriptázy *in vitro* vlákno DNA, které je komplementární k molekule RNA a dále s ním pracovat. Používá se zejména při studiu exprese a abnormálního stříhu mRNA a dále je možno tuto metodu využít pro získání cDNA, pro účely sekvenace genů, kdy se snažíme vyhnout sekvenaci intronů.

9.3.1 POSTUP REVERZNÍ TRANSKRIPCE Z CELKOVÉ RNA S POUŽITÍM RANDOM HEXAMERŮ

1. Připravíme si dva master mixy. Master mix I se skládá z 1 μ l random hexamerů a 1 μ l dNTP pro 1 vzorek. Master mix II se skládá ze 4 μ l pufru (5x koncentrovaný First Strand B.), 1 μ l DTT a 1 μ l SPS III (SuperScript III RT, Invitrogen) na 1 vzorek. SPS III i master mixy je nutné po rozmražení, vortexování a stočení uchovávat na ledu.
2. RNA izolovanou z parafínových bločků, zředěnou a rozmraženou (uchovává se v mrazáku při -70 °C) protřepeme na vortexu a stočíme na centrifuze. Neustále ji uchováváme na ledu, aby nedošlo k jejímu poničení.
3. K 7 μ l H₂O přidáme 2 μ l Master mixu I a 5 μ l vzorku ředěné RNA.
4. Dáme na 5 minut do 65 °C nastavených na termocykleru (program SPS III).
5. Vzorky inkubujeme 1 minutu na ledu.
6. Po minutě do každého takto připraveného vzorku přidáme 6 μ l Master mixu II a vložíme opět do termocykleru.
7. Termocykler je nastaven na program, kde jsou vzorky uloženy 5 min při 25 °C, 50 min při 50 °C; 15 min při 70 °C a nakonec při 15 °C 15 min.
8. Reverzní transkripci provedeme pro jednotlivé vzorky RNA alespoň třikrát, abychom získali dostatek cDNA pro stanovování genové exprese. Jednotlivé produkty transkripce RNA tzv. spojíme (angl. poolujeme), tzn., že je přepipetujeme do jedné společné zkumavky.

9.4 KVANTITATIVNÍ PCR (QPCR)

PCR neboli polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“ – PCR) je enzymatickou *in vitro* amplifikací krátkých úseků DNA, kdy je tento úsek ohraničen syntetickými oligonukleotidy specifickými pouze pro analyzovaný úsek genu. Syntéza DNA probíhá opakováním cyklů, střídání třech teplot (denaturace molekul DNA – 94° C,

připojení primerů k odděleným DNA řetězcům – 55° - 60° C, polymerizace nového úseku DNA – 72° C) v termocyklerech. Jako enzymy zajišťující polymeraci se používají termostabilní DNA polymerázy odolávající teplotám, při kterých DNA denaturuje, což je nutná podmínka amplifikace DNA.

Jednou z technik kvantifikace DNA je tzv. real-time PCR, tedy PCR umožňující sledování amplifikace produktu v reálném čase, tzn. přímo během probíhající reakce. Nejpřesnější a nejběžněji využívanou metodou kinetického sledování amplifikace je systém TaqMan. Využívá se 5' nukleázové aktivity Taq polymerázy a jednořetězcové fluorescenčně značené sondy. Sonda se podle principu komplementarity váže na jeden řetězec cílové DNA. V inaktivním stavu jsou fluorochromy (označující sondu) zvoleny tak, že jeden fluorochrom pohlcuje energii emitovanou druhým fluorochromem po excitaci laserovým paprskem. Tento efekt je nazýván zhášení a ruší se po exonukleázovém rozštěpení sondy, která je navázána na cílové místo, polymerázou postupující během elongace po amplifikovaném templátu. Fluorochromy mají rozdíl v intenzitě fluorescence a ta je detegována pomocí optického systému. Ten přenáší emitované záření z jednotlivých zkumavek a je zpracováván na PC (Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003).

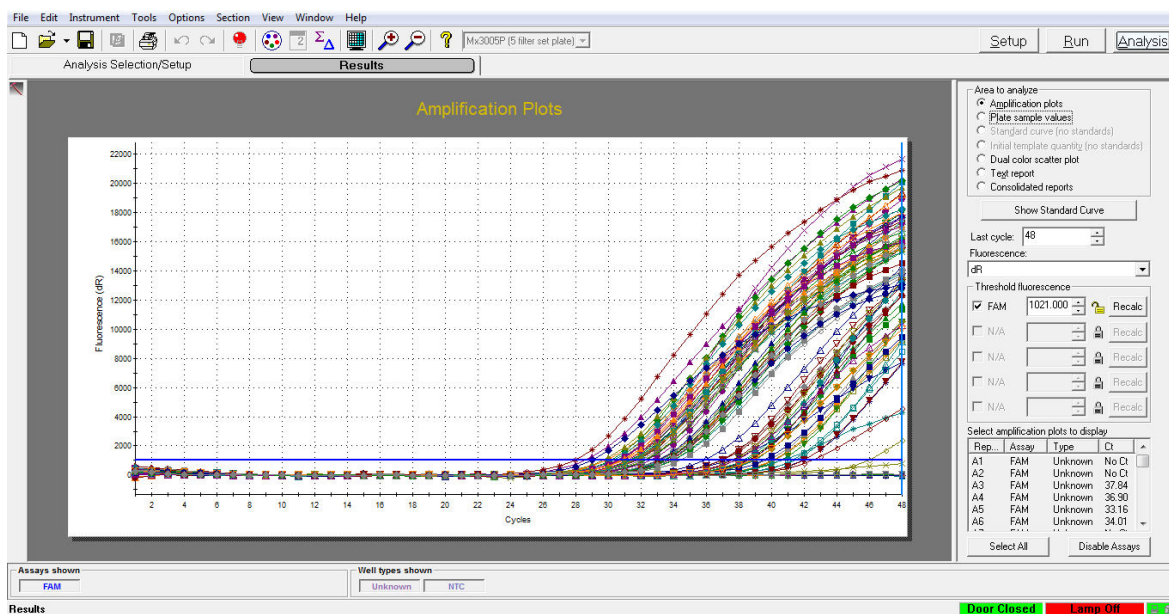
9.4.1 POSTUP QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

1. Používáme cDNA, tj. vzorky, které jsme získali reverzní transkripcí z RNA, izolované z FFPE tkáně a spojili. Jedná se celkem o 72 vzorků.
2. Určíme si, který gen budeme během RT real-time PCR stanovovat.
3. Každý gen stanovujeme pomocí příslušných primerů (nesoucí název genu; ve dvojicích forward a reverse) a k primerům příslušející sondy. Číslo sondy je uvedeno na lahvičce primeru, který aktuálně používáme. Primery a sondu vyndáme z mrazáku, kde jsou skladovány při -21 °C, necháme rozmrazit, vortexujeme a stočíme na centrifuze. Sondu je důležité zabalit do alobalu, jelikož nesmí být vystavena přímému světlu.
4. Dále si vyndáme vodu a Roche probe master, který je uchováván též v -21 °C a je nutno jej rozmrazit.
5. Připravíme master mix, který se skládá z 7,8μl H₂O, 10μl Roche probe masteru, 0,4μl primeru forward, 0,4μl primeru reverse a 0,4μl příslušné sondy na 1μl vzorku.

6. Vzorky cDNA je nutno nechat rozmrazit, jelikož jsou uchovávány v mrazáku při 32 °C. Vzorky je neustále vhodné co nejvíce uchovávat v chladu, to znamená rozmrazit je až jako poslední a uchovávat v lednici, pokud s nimi zrovna nepracujeme. Po rozmražení a těsně před prací s nimi je stočíme na centrifuze.
7. Do předem připraveného čistého plata, uloženého do chladicí destičky, pipetujeme do každé jamky po 19 μ l připraveného master mixu a vždy do dvou jamek vedle sebe po 1 μ l jednoho vzorku.
8. Plato po napipetování master mixu a vzorků uzavřeme víčky, centrifugujeme a vložíme do přístroje Stratagene Mx3005P. Na Připojeném PC zapneme program MxPro, necháme rozehrát lampu (20 min) a spustíme příslušný program.
9. Doba, kterou potřebuje stroj na práci a zobrazení získaných výsledků činí pro tento postup hodinu a dvacet minut, během kterého projde plato se vzorky čtyřiceti osmi cykly.

10 VYHODNOCENÍ REAL-TIME PCR

Hodnoty, které byly získány pomocí RT real-time PCR jsou hodnoty Ct. Na základě těchto hodnot zjistíme, kolikrát je exprese námi sledovaného genu vyšší nebo nižší než referenční gen, resp. srovnávaná tkáň. Jedná se o tzv. relativní kvantifikaci. Získání hodnoty Ct provedeme nastavením tzv. thresholdu (base line) do úrovně exponenciální amplifikace sledovaného produktu (viz obrázek 7 a 8). Při dané hodnotě fluorescence je odečtena hodnota Ct, tzn. cyklus, ve kterém byla stanovené fluorescence sledovaného vzorku dosažena. Tyto hodnoty byly získány v software, který je součástí přístroje Stratagene 3005, na kterém byla jednotlivá stanovení prováděna. Hodnoty Ct byly exportovány do programu MS Excel a dále vyhodnoceny metodou ΔCt a $\Delta\Delta Ct$. Metoda ΔCt spočívá v zjištění kolikrát se sledovaný gen více či méně exprimoval, než referenční gen (house-keeping gen). Vypočteme ji na základě vzorce $2^{-Ct(\text{target})-Ct(\text{ref})}$. Metoda $\Delta\Delta Ct$ spočívá ve stanovení poměru exprese sledovaného genu v nádorové tkáni a normální tkáni.



Obrázek 7 – Záznam PCR v reálném čase, stanovení exprese genu JUN. Osa X znázorňuje počty cyklů, osa Y ukazuje fluorescenci, která koresponduje s množstvím kopií sledovaného genu ve stanovovaném vzorku; zdroj: autor

Well	Well Name	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
A1	1Z	Unknown	1021.000	No Ct
A2	1Z	Unknown	1021.000	No Ct
A3	3P	Unknown	1021.000	37.84
A4	3P	Unknown	1021.000	36.90
A5	6T	Unknown	1021.000	33.16
A6	6T	Unknown	1021.000	34.01
A7	9Z	Unknown	1021.000	No Ct
A8	9Z	Unknown	1021.000	40.12
A9	11P	Unknown	1021.000	31.58
A10	11P	Unknown	1021.000	31.03
A11	14T	Unknown	1021.000	31.40
A12	14T	Unknown	1021.000	33.00
B1	1T	Unknown	1021.000	No Ct
B2	1T	Unknown	1021.000	No Ct
B3	4Z	Unknown	1021.000	No Ct
B4	4Z	Unknown	1021.000	No Ct
B5	6P	Unknown	1021.000	31.56
B6	6P	Unknown	1021.000	31.78
B7	9T	Unknown	1021.000	40.62
B8	9T	Unknown	1021.000	No Ct
B9	12Z	Unknown	1021.000	33.67
B10	12Z	Unknown	1021.000	33.42
B11	14P	Unknown	1021.000	32.64
B12	14P	Unknown	1021.000	33.71
C1	1P	Unknown	1021.000	33.10
C2	1P	Unknown	1021.000	33.78
C3	4T	Unknown	1021.000	33.69
C4	4T	Unknown	1021.000	33.20
C5	7Z	Unknown	1021.000	40.25
C6	7Z	Unknown	1021.000	39.01
C7	9P	Unknown	1021.000	30.73
C8	9P	Unknown	1021.000	30.31
C9	12T	Unknown	1021.000	38.63
C10	12T	Unknown	1021.000	36.00

Obrázek 8 - Záznam PCR v reálném čase, vyhodnocení stanovení exprese genu JUN. Tabulka zobrazuje hodnotu fluorescence pro threshold a k tomu odpovídající hodnoty Ct pro jednotlivé vzorky na přístroji Stratagene Mx3005p; zdroj: autor

10.1 HODNOCENÍ EXPRESE GENŮ METODOU RT REAL-TIME PCR

Jednotlivá stanovení byla provedena v dubletu, u zhruba 90 % vzorků proběhla PCR v obou reakčních zkumavkách. U zhruba 2,5 % stanovení došlo k amplifikaci v pouze 1 zkumavce a v tom případě stanovení bylo zopakováno. U některých vzorků nedošlo k amplifikaci ani po opakované reverzní transkripci a PCR; v tom případě byla provedena nová izolace RNA. Protože zdrojem tkáně byly bločky FFPE, jednalo se o materiál, s obtížně stanovitelnou expresí RNA. U 3 vzorků nebylo možno i přes opakovanou izolaci a reverzní transkripci expresi sledovaných genů určit. Vzhledem k tomu, že RNA stanovovaných genů se nacházela ve tkáni v různé koncentraci, u některých vzorků bylo možno stanovit expresi pouze u genů, jejichž hladina ve vzorku byla spíše vyšší.

10.1.1 METODIKA VYHODNOCENÍ

1. Stanovíme threshold na co nejnižší hodnotu fluorescence. Při studiu vybraných sledovaných genů byla hodnota threshold stanovena vždy na hodnotu 5 % maximální fluorescence vzorků v daném stanovení (běhu) přístroje. Hodnota 5 % byla respektována při vyhodnocení všech genů.
2. Jednotlivá stanovení vzorků na přístroji (run přístroje) dle kalibrátorů. Kalibrátor je vzorek, který byl přítomen v referenčním runu přístroje. Referenční run přístroje je obvykle 1. Stanovení vzorku, které úspěšně proběhlo. S tímto stanovením vzorků jsou následně harmonizovány všechny následující runy přístroje.

3. Přepočít (kalibrace) se provádí porovnáním hodnot Ct tří vzorků, které byly současně stanoveny v referenčním runu přístroje a runu dalších vzorků. U všech tří vzorků provedeme výpočet. Ct referenčního vzorku odečteme od Ct vzorku současného, z těchto hodnot stanovíme průměr. Takto získaný průměr pak odečítáme od jednotlivých hodnot Ct u vzorků, stanovených u vzorků daného runu. Před odečtením hodnot Ct od vzorků stanovených pro vzorky daného runu vyřadíme ty kalibrátory, jejichž hodnoty jsou příliš odlišné od hodnot ostatních kalibrátorů.
4. Z dvou hodnot Ct stanovení daného vzorku, přepočtených dle kalibrátorů, stanovíme průměr těchto dvou hodnot, pokud není jejich rozdíl větší než 0,5. U vzorků, kde je rozdíl větší, než 0,5 pro další vyhodnocení použijte hodnotu s nižším Ct.
5. Každý takto získaný průměr Ct, stanovený pro každý ze vzorků (kdy Ct pro každý vzorek bylo stanovováno u celkem 16 různých genů), porovnáme se stejně zpracovanými hodnotami 4 house-keeping genů (GAPDH, HPRT, ACTB a ACTB 2) – to znamená, že např. u genu JUN porovnáme Ct vzorku 1T s hodnotou Ct vzorku 1T genu GAPDH a tak dále.
6. Spojením všech získaných hodnot stanovení exprese sledovaných genů z jednotlivých runů přístroje, včetně opakování stanovení, která nevyšla, vznikla finální tabulka, přiložená k této diplomové práci.
7. Tato tabulka s hodnotami exprese ΔCt a hodnotami Ct byla použita pro statistické vyhodnocení.

10.1.2 NORMALIZACE STANOVENÝCH HODNOT EXPRESE METODOU REAL-TIME PCR

Aby bylo možno porovnat hodnoty exprese mezi jednotlivými vzorky, bylo do reverzní transkripce použito stejné množství RNA a to 50ng RNA. Získané Ct hodnoty exprese všech vzorků je proto možno vztáhnout k tomuto množství RNA a porovnávat mezi sebou. Jako další způsob normalizace exprese jsme použili referenční geny (house-keeping geny) GAPDH, HPRT, ACTB a β Actin. Pro použití každého z výše uvedených genů můžeme najít argumenty pro i proti. Platí však, že exprese těchto genů je nejčastěji používána pro získání relativních hodnot exprese. Podíl hodnoty exprese sledovaného genu hodnotou exprese referenčního genu nám říká, kolikrát více, respektive méně, je námi sledovaný gen exprimován. GAPDH je jako referenční gen vhodný pro získání relativní hodnoty exprese

genů, jejichž exprese je spíše vysoká (nižší hodnoty Ct). HPRT je vhodný jako referenční gen pro získání relativní hodnoty exprese genů, jejichž exprese je spíše nízká (vyšší hodnoty Ct). Pro stanovení exprese genů buněk, které mají relativně stálou velikost je vhodné použití genu β Actinu. V případě genu pro β Actin jsme pro stanovení využili dvou různých párů primerů (označeno ACTB a BetaActin). Výsledky normalizace ukázaly ekvivalentnost použití obou sad primerů.

10.1.3 IMUNOHSITOCHEMICKÉ STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI RECEPTORU CD34

Hodnocení exprese genů podílejících se na aktivaci angiogeneze bylo porovnáno s vaskularizací příslušné tkáně, která byla stanovena pomocí markeru endotelových buněk molekuly CD34. Tyto výsledky byly použity s laskavým svolením Doc. Mgr. MUDr. Zbyňka Tonara, PhD. Imunohistochemie je technika barvení histologických preparátů využívající protilátek pro detekci přítomnosti konkrétních molekul, v tomto případě receptoru CD34. Přítomnost detekované molekuly, tzn. vazba protilátky na tuto molekulu, je následně vizualizována, nejčastěji barevnou reakcí vytvořenou enzymem, který je spojen s použitou protilátkou.

10.2 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Hodnoty exprese v nádorové tkáni, přechodné tkáni a normální tkáni byly porovnány Wilcoxonovým párovým testem. Tento test porovnává hodnoty exprese párových vzorků jednotlivých skupin a umožňuje stanovit rozdíl mezi jednotlivými skupinami. Jako statisticky významné byly hodnoceny výsledky, jejichž p-value byla menší než 0,05. Vyhodnocení bylo provedeno programem Statistica (StatSoft Česká republika).

11 VÝSLEDKY

11.1 DESKRIPTIVNÍ STATISTIKA

11.1.1 DESKRIPTIVNÍ STATISTIKA POPISUJÍCÍ HODNOTY EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ V NÁDOROVÉ TKÁNI

Tabulka zobrazuje hodnoty exprese sledovaných genů v nádorové tkáni. Sloupec pojmenovaný „gen“ označuje jednotlivé sledované geny a způsob normalizace (výsledky vztažené k GAPDH, HPRT, β Actinu, ACTB a celkové RNA). Ve sloupci s názvem „N“ je uveden počet stanovených vzorků, v dalším sloupci je uvedena statistická odchylka („St. odchylka“). Sloupec „1. kvartil“ uvádí hodnotu exprese vzorku odpovídajícímu dolním 25 % exprese. „Medián“ uvádí hodnotu exprese střední části souboru a „3. kvartil“ uvádí hodnotu exprese vzorku v 75 % souboru. Hodnota exprese při normalizaci k celkové RNA (pospáno gen_tumor) je uvedena v podobě Ct, tzn. čím vyšší hodnota Ct, tím nižší hodnota exprese. V ostatních případech je hodnota exprese sledovaného genu vztažena k referenčnímu genu (např. AKT2_GAPDH_tumor). Hodnota exprese uvádí kolikrát více, respektive kolikrát méně je sledovaný gen exprimován, než referenční gen.

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
AKT2_tumor*	22	3,455991314	28,1481921	29,6975	34,81
AKT2_GAPDH_tumor	22	0,233151727	0,03012324	0,07396003	0,1383582
AKT2_HPRT_tumor	18	57,14821853	9,89735192	30,1824217	72,009978
AKT2_Beta_actin_tumor	20	0,433982708	0,35617479	0,56902028	1,0225182
AKT2_ACTB_tumor	20	1,182371562	0,35612748	0,9279398	1,3583025
AKT3_tumor*	21	2,445332548	30,1913298	31,2216301	34,675
AKT3_GAPDH_tumor	21	0,360867189	0,00599563	0,01514515	0,0553876
AKT3_HPRT_tumor	17	11,03469625	3,80046207	5,40764333	10,488905
AKT3_Beta_actin_tumor	18	1,034240839	0,06086182	0,17759588	0,5751736
AKT3_ACTB_tumor	18	0,879019628	0,1121641	0,26478253	0,9047803
EGFR_tumor*	19	3,648268789	31,5713001	32,42	35,77333
EGFR_GAPDH_tumor	19	0,063174839	0,00222292	0,00641082	0,0143779
EGFR_HPRT_tumor	16	54,65300137	1,31459796	2,35672301	4,6628786
EGFR_Beta_actin_tumor	18	0,451847235	0,02930779	0,05052073	0,1442534
EGFR_ACTB_tumor	18	0,549495171	0,03146836	0,08917511	0,1492462
FLT1_tumor*	19	1,999960459	34,31	35,3546564	36,9275
FLT1_GAPDH_tumor	19	0,223907531	0,00046194	0,00104303	0,0025331
FLT1_HPRT_tumor	15	0,311174274	0,33915108	0,48632747	0,6973718
FLT1_Beta_actin_tumor	16	0,292027059	0,003261	0,00905359	0,0323998
FLT1_ACTB_tumor	16	0,121436494	0,00831875	0,01168749	0,0242315
FOSrn_tumor*	22	3,306763544	29,375	31,205	33,61188
FOSrn_GAPDH_tumor	22	0,316622808	0,01465888	0,04125867	0,0935586

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
FOSrn_HPRT_tumor	15	114,0480009	5,52126941	13,2694413	50,400981
FOSrn_Beta_actin_tumor	21	0,599151668	0,14848084	0,50173587	0,8905457
FOSrn_ACTB_tumor	21	1,481255975	0,2303824	0,46816876	1,5336803
FOS129_tumor*	16	2,961475832	32,6525	34,4490392	36,088147
FOS129_GAPDH_tumor	16	0,014824754	0,00051476	0,00184058	0,0047592
FOS129_HPRT_tumor	13	6,474863791	0,34210097	0,55864357	3,0347911
FOS129_Beta_actin_tumor	16	0,027276845	0,00712995	0,02173144	0,0536139
FOS129_ACTB_tumor	16	0,069531572	0,00956104	0,01996171	0,0691105
HIF1a_tumor*	15	2,585009323	37,5778035	39,3	40,389466
HIF1a_GAPDH_tumor	15	0,017152642	6,9238E-06	3,3511E-05	0,000139
HIF1a_HPRT_tumor	13	0,048352447	0,0074167	0,02091703	0,0425567
HIF1a_Beta_actin_tumor	14	0,000985877	8,4812E-05	0,000244	0,0006247
HIF1a_ACTB_tumor	15	1,320621531	0,00012249	0,0004018	0,0020193
HIF2a_tumor*	21	3,064083656	29,7745976	31,115	35,300643
HIF2a_GAPDH_tumor	21	0,069543173	0,01525132	0,02582657	0,073581
HIF2a_HPRT_tumor	17	26,87223725	5,08308604	7,70075555	23,406773
HIF2a_Beta_actin_tumor	19	0,566232471	0,12116123	0,27360586	0,7534183
HIF2a_ACTB_tumor	19	0,680842127	0,13076062	0,32115774	1,0623969
HRAS_tumor*	14	2,169565245	36,10875	37,2417322	38,3675
HRAS_GAPDH_tumor	14	0,000323088	0,00010059	0,0001586	0,0003114
HRAS_HPRT_tumor	14	0,176141605	0,0375854	0,07173665	0,2365149
HRAS_Beta_actin_tumor	12	0,003370938	0,00036147	0,00068315	0,0033495
HRAS_ACTB_tumor	12	0,001246097	0,00094359	0,00141378	0,0024716
JUN_tumor*	23	3,464264986	30,8249563	33,16	37,575
JUN_GAPDH_tumor	23	0,436648768	0,00625836	0,01184154	0,0218685
JUN_HPRT_tumor	18	7,669569435	1,22488755	5,43648982	11,524449
JUN_Beta_actin_tumor	20	0,206400275	0,04836666	0,08732909	0,1618714
JUN_ACTB_tumor	21	0,272351994	0,0750403	0,1515567	0,3238989
KDR_tumor*	15	1,507379741	36,0941231	36,71	37,983894
KDR_GAPD_tumor	15	0,000340948	8,5424E-05	0,00024374	0,0003188
KDR_HPRT_tumor	13	0,23740428	0,06151102	0,09214183	0,191018
KDR_Beta_actin_tumor	15	0,003020557	0,00077201	0,00118164	0,0049261
KDR_ACTB_tumor	15	0,003259353	0,00106865	0,00270998	0,0056278
MTOR_tumor*	19	2,463057119	32,3831059	32,92	35,515661
MTOR_GAPDH_tumor	19	0,009078639	0,00188865	0,00469389	0,0090352
MTOR_HPRT_tumor	17	2,731682985	0,95769368	2,61171957	5,4024974
MTOR_Beta_actin_tumor	17	0,212417856	0,01403773	0,02946202	0,0706962
MTOR_ACTB_tumor	17	0,311405184	0,0334412	0,04972103	0,0754008
PTEN_tumor*	20	2,805507116	31,2011324	32,5436051	35,7425
PTEN_GAPDH_tumor	20	0,013560379	0,00325857	0,00515542	0,0127307
PTEN_HPRT_tumor	18	3,045897609	1,71815898	3,09110661	4,4784117
PTEN_Beta_actin_tumor	18	0,092203215	0,03581564	0,05007583	0,152337
PTEN_ACTB_tumor	18	0,12541115	0,03542465	0,09988856	0,221513
TP53_tumor*	18	3,358008116	29,785	32,023173	33,987918

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
TP53_GAPDH_tumor	18	0,055682759	0,00471864	0,02314142	0,059665
TP53_Beta_actin_tumor	18	0,265006423	0,06890919	0,11148006	0,2679926
TP53_ACTB_tumor	18	0,308666902	0,08479067	0,20610501	0,3395316
VHL_tumor*	24	2,957022888	33,2761099	34,9989341	37,93125
VHL_GAPDH_tumor	23	0,010405875	0,00123609	0,0026933	0,0041577
VHL_HPRT_tumor	16	0,812686936	0,47268926	0,76776422	2,1279926
VHL_Beta_actin_tumor	21	0,062979485	0,00720239	0,01426516	0,0643903
VHL_ACTB_tumor	23	0,879379075	0,01291329	0,03098041	0,0512964

Tabulka 2 – Deskriptivní statistika u nádorové tkáně

* - hodnota exprese vztažená k celkové RNA

11.1.2 DESKRIPTIVNÍ STATISTIKA POPISUJÍCÍ HODNOTY EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ V NORMÁLNÍ TKÁNI

Tabulka zobrazuje hodnoty exprese sledovaných genů v normální tkáni. Sloupec pojmenovaný „gen“ označuje jednotlivé sledované geny a způsob normalizace (výsledky vztažené k GAPDH, HPRT, β Actinu, ACTB a celkové RNA). Ve sloupci s názvem „N“ je uveden počet stanovených vzorků, v dalším sloupci je uvedena statistická odchylka („St. odchylka“). Sloupec „1. kvartil“ uvádí hodnotu exprese vzorku odpovídajícímu dolním 25 % exprese. „Medián“ uvádí hodnotu exprese střední části souboru a „3. kvartil“ uvádí hodnotu exprese vzorku v 75 % souboru.

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
AKT2_normalni*	18	3,679625792	29,52375	30,6065976	34,42430216
AKT2_GAPDH_normalni	18	0,479931552	0,025359823	0,12081293	0,206489801
AKT2_HPRT_normalni	13	44,40649605	26,81150027	58,2828694	83,98663986
AKT2_Beta_actin_normalni	16	2,575330168	0,485796391	1,21015392	2,27795783
AKT2_ACTB_normalni	17	1693,441385	0,571209188	1,42129842	3,72568055
AKT3_normalni*	16	2,271356933	30,94148964	32,8873066	35,2148451
AKT3_GAPDH_normalni	16	0,400115521	0,014874117	0,03681829	0,110546433
AKT3_HPRT_normalni	12	15,7597545	4,762104067	11,6521114	20,42889409
AKT3_Beta_actin_normalni	15	7,382638819	0,061499828	0,43077308	1,240251179
AKT3_ACTB_normalni	15	262,3773886	0,207250701	0,49511412	1,627703101
EGFR_normalni*	16	3,294867223	31,98102891	33,932813	38,2608325
EGFR_GAPDH_normalni	16	0,07871149	0,010873867	0,01568822	0,029026525
EGFR_HPRT_normalni	12	6,738729458	3,062804579	7,86868117	15,51004976
EGFR_Beta_actin_normalni	15	0,193685933	0,037529529	0,18174657	0,325536276
EGFR_ACTB_normalni	15	0,238196875	0,100834636	0,14450287	0,354177928
FLT1_normalni*	13	1,692580021	34,2125	36,1896483	37,31606983
FLT1_GAPDH_normalni	13	0,035098411	0,000983602	0,00169441	0,004220036

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
FLT1_HPRT_normalni	10	0,789595422	0,443509803	0,64636579	1,303129103
FLT1_Beta_actin_normalni	12	0,073958242	0,007214787	0,01467806	0,047060616
FLT1_ACTB_normalni	12	28,77663148	0,010741527	0,02679513	0,098312324
FOSrn_normalni*	18	4,483254803	28,365	31,8113463	35,23708
FOSrn_GAPDH_normalni	18	0,487373721	0,053084196	0,21130906	0,400277994
FOSrn_HPRT_normalni	11	98,60653871	41,06962872	71,7490658	143,5338216
FOSrn_Beta_actin_normalni	15	1,964615236	0,757422404	1,98850825	4,560430438
FOSrn_ACTB_normalni	16	3,437357746	0,503225678	1,97901302	6,180329807
FOS129_normalni*	13	3,626856523	32,395	33,1381254	39,24615068
FOS129_GAPDH_normalni	13	0,009353567	0,003219413	0,00612771	0,018982479
FOS129_HPRT_normalni	11	6,281825246	0,877806206	2,64817782	6,91629785
FOS129_Beta_actin_normalni	13	0,079054882	0,03081509	0,047655	0,116076507
FOS129_ACTB_normalni	13	0,123659249	0,028337363	0,04889497	0,143198358
HIF1a_normalni*	11	1,959048218	38,86	40,355	42,91
HIF1a_GAPDH_normalni	11	6,66717E-05	0,000017167	4,8556E-05	0,000118522
HIF1a_HPRT_normalni	10	0,040923968	0,009046859	0,025866	0,034215549
HIF1a_Beta_actin_normalni	11	0,001398419	8,99823E-05	0,00046482	0,001094889
HIF1a_ACTB_normalni	11	1,484371942	0,000191549	0,0006998	0,003010299
HIF2a_normalni*	19	3,543931534	29,245	31,6519326	34,971667
HIF2a_GAPDH_normalni	19	0,39605609	0,044338047	0,09775184	0,191221687
HIF2a_HPRT_normalni	13	37,89649084	22,33791837	44,9681928	87,99939458
HIF2a_Beta_actin_normalni	16	1,858866521	0,243915863	1,20353625	3,321266528
HIF2a_ACTB_normalni	17	1010,148096	0,699687789	1,75321144	6,079222249
HRAS_normalni*	9	1,440856597	38,03294525	38,41	39,87089212
HRAS_GAPDH_normalni	9	0,000491764	5,79086E-05	0,00020421	0,000310903
HRAS_HPRT_normalni	8	0,214145466	0,023912638	0,07362315	0,351247144
HRAS_Beta_actin_normalni	9	0,003902408	0,000388109	0,00149566	0,00463451
HRAS_ACTB_normalni	9	0,003367724	0,000698928	0,00151711	0,005764377
JUN_normalni*	23	8,214064786	31,59	35,4229331	38,11667
JUN_GAPDH_normalni	20	397474517,3	0,006303993	0,01355986	0,027349841
JUN_HPRT_normalni	13	3,272272222	3,239329071	6,45313407	8,271503057
JUN_Beta_actin_normalni	18	11011868093	0,060864091	0,19231849	0,777283043
JUN_ACTB_normalni	22	13072283574	0,10228107	0,19213653	0,910852386
KDR_normalni*	14	3,138446701	35,78375	37,1878093	41,05933329
KDR_GAPD_normalni	14	0,005114763	0,00049885	0,00065242	0,001778371
KDR_HPRT_normalni	10	0,535769376	0,197638267	0,35216569	0,865724648
KDR_Beta_actin_normalni	12	0,012566544	0,00471404	0,01008981	0,014755822
KDR_ACTB_normalni	13	0,01777788	0,004773256	0,01504054	0,035383591
MTOR_normalni*	15	2,083346028	32,32	34,2876997	36,485
MTOR_GAPDH_normalni	15	0,055148791	0,003734161	0,00958517	0,018645871
MTOR_HPRT_normalni	13	3,481301377	2,244608412	3,34302831	6,584845898
MTOR_Beta_actin_normalni	15	0,189534805	0,02275099	0,12630643	0,199059255
MTOR_ACTB_normalni	15	293,3256234	0,058720172	0,10923677	0,254811095
PTEN_normalni*	14	3,313970788	31,4625	33,7872233	38,74916675

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
PTEN_GAPDH_normalni	14	0,008833621	0,003368941	0,00741494	0,014022234
PTEN_HPRT_normalni	12	3,201971263	2,767387527	4,13239772	6,509552106
PTEN_Beta_actin_normalni	14	0,095616969	0,043057448	0,06094994	0,123557764
PTEN_ACTB_normalni	14	222,2633056	0,052365143	0,10657705	0,174690787
TP53_normalni*	16	2,819687548	31,82	33,9426362	36,8587525
TP53_GAPDH_normalni	16	0,050125015	0,013273198	0,02401256	0,036221431
TP53_HPRT_normalni	12	11,87974335	4,69841902	7,21365896	10,54436655
TP53_Beta_actin_normalni	15	0,220948326	0,088388348	0,21878765	0,263340259
TP53_ACTB_normalni	16	1,22704241	0,141797466	0,20833088	0,351227032
VHL_normalni*	23	3,024318269	34,51	38,28	40,53
VHL_GAPDH_normalni	20	2,291724365	0,001510526	0,00321639	0,008273179
VHL_HPRT_normalni	13	1,393742503	0,508353952	1,38510947	2,350760344
VHL_Beta_actin_normalni	18	4959,632818	0,006507722	0,04059998	0,142220287
VHL_ACTB_normalni	21	4,183507127	0,027063472	0,05726252	1,465222318

Tabulka 3 – Deskriptivní statistika u normální tkáně

* - hodnota exprese vztažená k celkové RNA

11.1.3 DESKRIPTIVNÍ STATISTIKA POPISUJÍCÍ HODNOTY EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ V PŘECHODNÉ TKÁNI

Tabulka zobrazuje hodnoty exprese sledovaných genů v přechodné tkáni. Sloupec pojmenovaný „gen“ označuje jednotlivé sledované geny a způsob normalizace (výsledky vztažené k GAPDH, HPRT, β Actinu, ACTB a celkové RNA). Ve sloupci s názvem „N“ je uveden počet stanovených vzorků, v dalším sloupci je uvedena statistická odchylka („St. odchylka“). Sloupec „1. kvartil“ uvádí hodnotu exprese vzorku odpovídajícímu dolním 25 % exprese. „Medián“ uvádí hodnotu exprese střední části souboru a „3. kvartil“ uvádí hodnotu exprese vzorku v 75 % souboru.

gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
AKT2_prechodna*	23	2,876923519	27,9827561	29,46	31,715
AKT2_GAPDH_prechodna	23	0,193697362	0,0364755	0,06470406	0,139756216
AKT2_HPRT_prechodna	20	113,4428555	18,8111646	45,3417504	68,16856971
AKT2_Beta_actin_prechodna	20	0,557165075	0,18278559	0,34423454	1,133523324
AKT2_ACTB_prechodna	20	0,981875872	0,33317254	0,96850107	2,152681752
AKT3_prechodna*	22	2,202289453	30,69	32,0233715	34,35067783
AKT3_GAPDH_prechodna	22	0,048088104	0,00632924	0,012957	0,040648032
AKT3_HPRT_prechodna	20	40,355804	3,69175919	6,62679119	11,04984072
AKT3_Beta_actin_prechodna	19	0,25561933	0,02451825	0,0675572	0,205445544
AKT3_ACTB_prechodna	19	0,564309051	0,04496667	0,23259993	0,71449707
gen	N	St. odchylka	1. kvartil	medián	3. kvartil
EGFR_prechodna*	23	3,157599533	31,0138614	32,755	34,705

EGFR_GAPDH_prechodna	23	0,082810427	0,00487629	0,00663388	0,020977695
EGFR_HPRT_prechodna	20	50,22319244	2,39999568	3,47354868	13,08427606
EGFR_Beta_actin_prechodna	20	0,141193107	0,02351336	0,0399907	0,118171334
EGFR_ACTB_prechodna	20	0,278527408	0,03495219	0,11427388	0,222285418
FLT1_prechodna*	20	1,906015784	34,3521661	35,3573278	37,55472467
FLT1_GAPDH_prechodna	20	0,002864246	0,00053805	0,00081861	0,001719379
FLT1_HPRT_prechodna	19	0,366593517	0,22453309	0,43527528	0,659753955
FLT1_Beta_actin_prechodna	18	0,006860297	0,00257908	0,00433395	0,008656347
FLT1_ACTB_prechodna	17	0,011616345	0,00384747	0,01058624	0,017476942
FOSrn_prechodna*	24	3,711905633	27,9834866	29,67083	32,57638431
FOSrn_GAPDH_prechodna	24	0,332321343	0,02335441	0,07342803	0,184443768
FOSrn_HPRT_prechodna	18	183,7171307	13,4533685	41,8365504	100,7939391
FOSrn_Beta_actin_prechodna	23	1,563222252	0,29936968	0,38958229	0,957674428
FOSrn_ACTB_prechodna	22	1,951352342	0,33404804	0,62763374	2,369807199
FOS129_prechodna*	17	2,506211898	30,5103284	33,48	34,63667
FOS129_GAPDH_prechodna	17	0,017240715	0,00120717	0,00513857	0,030982688
FOS129_HPRT_prechodna	15	9,64315249	0,73204285	4,57889664	14,07438521
FOS129_Beta_actin_prechodna	17	0,061130883	0,0128748	0,02110314	0,097403167
FOS129_ACTB_prechodna	16	0,239131143	0,01966075	0,03710634	0,168416542
HIF1a_prechodna*	17	2,340112183	38,0747914	39,475	41,4075
HIF1a_GAPDH_prechodna	17	0,000210593	1,6762E-05	3,0518E-05	0,000130218
HIF1a_HPRT_prechodna	15	0,029844161	0,00929068	0,029977	0,044403958
HIF1a_Beta_actin_prechodna	17	0,001569706	7,4645E-05	0,0001371	0,000815684
HIF1a_ACTB_prechodna	16	0,001678715	9,1383E-05	0,00026325	0,002040931
HIF2a_prechodna*	23	2,402732438	28,9040156	30,31	32,295
HIF2a_GAPDH_prechodna	23	0,079919499	0,02646079	0,03700271	0,090979123
HIF2a_HPRT_prechodna	20	46,81515809	12,3612251	19,2689218	38,05282601
HIF2a_Beta_actin_prechodna	20	0,332333746	0,09013785	0,24280226	0,560160773
HIF2a_ACTB_prechodna	20	0,451144562	0,20858578	0,52438108	1,053686116
HRAS_prechodna*	19	2,494677877	36,115	37,31	39,8619707
HRAS_GAPDH_prechodna	19	0,000353787	0,00015634	0,00036369	0,000609536
HRAS_HPRT_prechodna	18	0,238116819	0,03730598	0,12287288	0,405072381
HRAS_Beta_actin_prechodna	17	0,001440095	0,00055239	0,00084428	0,001722132
HRAS_ACTB_prechodna	16	0,001760093	0,00110678	0,00164789	0,00364742
JUN_prechodna*	23	3,193253383	30,52	31,905	34,53235654
JUN_GAPDH_prechodna	23	0,020096981	0,00506518	0,01478215	0,028656376
JUN_HPRT_prechodna	20	10,81407644	3,56067523	8,66266175	13,11905908
JUN_Beta_actin_prechodna	21	0,052569882	0,05445235	0,09087328	0,123197041
JUN_ACTB_prechodna	19	0,094256839	0,07502353	0,13212726	0,226671095
KDR_prechodna*	18	1,566435885	35,9515223	37,2076247	38,09625
KDR_GAPD_prechodna	18	0,000570614	0,00017173	0,00038478	0,000805344
KDR_HPRT_prechodna	16	0,347397203	0,07452156	0,22188197	0,307519888
gen	N	St. odchylnka	1. kvartil	medián	3. kvartil
KDR_Beta_actin_prechodna	18	0,004959013	0,00075609	0,00144796	0,004055288

KDR_ACTB_prechodna	17	0,005144035	0,00104519	0,00248076	0,008600768
MTOR_prechodna*	21	2,365067189	31,5105798	33,0396896	34,04461337
MTOR_GAPDH_prechodna	21	0,023602609	0,00312067	0,00541058	0,013078333
MTOR_HPRT_prechodna	20	3,780004563	1,73706693	3,75579665	8,193758231
MTOR_Beta_actin_prechodna	19	0,042564444	0,01657325	0,03066144	0,049206749
MTOR_ACTB_prechodna	18	0,084006368	0,03571244	0,05328751	0,082087438
PTEN_prechodna*	21	2,797462406	31,2125	32,675	33,75
PTEN_GAPDH_prechodna	21	0,010353293	0,00374142	0,00575886	0,011471145
PTEN_HPRT_prechodna	20	13,33544766	2,64817782	4,30203387	5,158841591
PTEN_Beta_actin_prechodna	19	0,068913824	0,0145282	0,04795699	0,08340913
PTEN_ACTB_prechodna	18	0,089574783	0,02413956	0,08914323	0,194034437
TP53_prechodna*	23	3,047504564	29,7967324	32,015	34,94
TP53_GAPDH_prechodna	23	0,055588978	0,00713947	0,01751822	0,071297732
TP53_HPRT_prechodna	19	34,64157481	2,37324093	5,19415627	26,81558831
TP53_Beta_actin_prechodna	22	0,33431097	0,04551728	0,15769773	0,223418566
TP53_ACTB_prechodna	22	0,215999683	0,09598487	0,24024098	0,319467537
VHL_prechodna*	23	2,53000301	33,8767774	34,4504438	36,92
VHL_GAPDH_prechodna	23	0,005172818	0,0011179	0,00208607	0,004062325
VHL_HPRT_prechodna	18	3,362904695	0,5625442	0,94771127	1,786849731
VHL_Beta_actin_prechodna	23	0,082750014	0,00643431	0,01393235	0,02694755
VHL_ACTB_prechodna	21	0,033654807	0,00931153	0,02303546	0,031935225

Tabulka 4 - Deskriptivní statistika u přechodné tkáně

* - hodnota exprese vztažená k celkové RNA

11.2 VYHODNOCENÍ EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ

Tabulky níže uvádějí statisticky signifikantní výsledky porovnání exprese sledovaných genů v nádorové a přechodné tkáni párových vzorků jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. Vyhodnocení bylo provedeno Wilcoxonovým párovým testem. V prvním sloupci je uveden sledovaný gen, ve sloupci „typ tkáně“ je uvedena tkáň, ve které byla hodnota exprese stanovena. Sloupec „počet pacientů“ uvádí počet pacientů pro příslušný typ tkáně. Ve sloupcích „1. kvartil“, „medián“ a „3. kvartil“ jsou uvedeny jim odpovídající hodnoty exprese. Ve sloupci „trend“ je znázorněn směr zvýšení exprese určený na základě hodnoty mediánu. Sloupec „p hodnota“ uvádí výsledek statistického porovnání obou typů tkáně. Jako statisticky signifikantně rozdílná exprese v porovnávaných tkáních byl hodnocen výsledek Wilcoxonova testu s p hodnotou $p \leq 0,05$.

11.2.1 HODNOTY EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ A POROVNÁNÍ EXPRESE TĚCHTO GENŮ MEZI NÁDOROVOU A PŘECHODNOU TKÁNÍ JATERNÍCH METASTÁZ KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY VHL/HIF (GENY VHL, HIF1A, HIF2A)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
VHL/ACTB	tumor	23	0,012913286	0,030980409	0,051296351	↑	0,033
	přechodná	21	0,009311527	0,023035457	0,031935225		

Tabulka 5 - porovnání hodnot exprese VHL/ACTB mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF1a/GAPDH	tumor	15	6,9238E-06	3,35111E-05	0,000139012	↑	0,011
	přechodná	17	1,67624E-05	3,05176E-05	0,000130218		

Tabulka 6 - Porovnání hodnot exprese HIF1a/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a	tumor	21	29,77459762	31,115	35,30064279	↓	0,017
	přechodná	23	28,90401559	30,31	32,295		

Tabulka 7 - Porovnání hodnot exprese HIF2a mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/GAPDH	tumor	21	0,015251321	0,025826572	0,073581046	↓	0,04
	přechodná	23	0,026460791	0,037002714	0,090979123		

Tabulka 8 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY PI3K/AKT/MTOR (GENY PTEN, AKT2, AKT3, MTOR)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT2/GAPDH	tumor	22	0,030123238	0,073960026	0,138358204	↑	0,027
	přechodná	23	0,036475495	0,064704058	0,139756216		

Tabulka 9 - Porovnání hodnot exprese AKT2/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
MTOR/GAPDH	tumor	19	0,00188865	0,004693891	0,009035241	↓	0,035
	přechodná	21	0,003120669	0,005410584	0,013078333		

Tabulka 10 - Porovnání hodnot exprese MTOR/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
MTOR/HPRT	tumor	17	0,957693676	2,611719574	5,402497404	↓	0,039
	přechodná	20	1,737066928	3,755796649	8,193758231		

Tabulka 11 - Porovnání hodnot exprese MTOR/HPRT mezi nádorovou a přechodnou tkání

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY RTK/MAPK (GENY VEGFA, EGFR, FLT1, KDR, HRAS, JUN, FOS)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
EGFR/GAPDH	tumor	19	0,002222917	0,006410816	0,014377932	↓	0,039
	přechodná	23	0,004876291	0,006633875	0,020977695		

Tabulka 12 - Porovnání hodnot exprese EGFR/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/GAPDH	tumor	15	8,54239E-05	0,000243739	0,000318813	↓	0,027
	přechodná	18	0,000171727	0,000384785	0,000805344		

Tabulka 13 - Porovnání hodnot exprese KDR/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOSr/GAPDH	tumor	22	0,014658876	0,041258667	0,093558599	↓	0,039
	přechodná	24	0,023354406	0,073428026	0,184443768		

Tabulka 14 - Porovnání hodnot exprese FOSr/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOS129/GAPDH	tumor	16	0,000514757	0,001840581	0,004759247	↓	0,009
	přechodná	17	0,001207174	0,005138567	0,030982688		

Tabulka 15 - Porovnání hodnot exprese FOS129/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOS129/HPRT	tumor	13	0,342100973	0,558643569	3,034791087	↓	0,05
	přechodná	15	0,732042848	4,578896642	14,07438521		

Tabulka 16 - Porovnání hodnot exprese FOS129/HPRT mezi nádorovou a přechodnou tkání

11.2.2 HODNOTY EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ A POROVNÁNÍ EXPRESE TĚCHTO GENŮ MEZI NÁDOROVOU TKÁNÍ JATERNÍCH METASTÁZ KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU A NORMÁLNÍ TKÁNÍ

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY VHL/HIF (GENY VHL, HIF1A, HIF2A)

gen	typ tkáně	počet pacientů	25. kvartil	medián	75. kvartil	trend	p hodnota
VHL	tumor	24	33,27610991	34,99893411	37,93125	↑	0,001
	normální	23	34,51	38,28	40,53		

Tabulka 17 - Porovnání hodnot exprese VHL mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	25. kvartil	medián	75. kvartil	trend	p hodnota
HIF1a/GAPDH	tumor	15.1	6,9238E-06	3,35111E-05	0,000139012	↓	0,009
	normální	11	0,000017167	4,85557E-05	0,000118522		

Tabulka 18 - Porovnání hodnot exprese HIF1a/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/GAPDH	tumor	21	0,015251321	0,025826572	0,073581046	↓	0,02
	normální	19	0,044338047	0,097751844	0,191221687		

Tabulka 19 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/ACTB	tumor	19	0,130760617	0,321157739	1,062396887	↓	0,016
	normální	17	0,699687789	1,753211443	6,079222249		

Tabulka 20 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY PI3K/AKT/MTOR (GENY PTEN, AKT2, AKT3, MTOR)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT2/ACTB	tumor	20	0,356127483	0,927939803	1,35830246	↓	0,03
	normální	17	0,571209188	1,42129842	3,72568055		

Tabulka 21 - Porovnání hodnot exprese AKT2/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT3	tumor	21	30,19132982	31,22163005	34,675	↑	0,022
	normální	16	30,94148964	32,88730659	35,2148451		

Tabulka 22 - Porovnání hodnot exprese AKT3 mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
MTOR/GAPDH	tumor	19	0,00188865	0,004693891	0,009035241	↓	0,019
	normální	15	0,003734161	0,009585166	0,018645871		

Tabulka 23 - Porovnání hodnot exprese MTOR/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
MTOR/ACTB	tumor	17	0,033441204	0,04972103	0,075400802	↓	0,013
	normální	15	0,058720172	0,10923677	0,254811095		

Tabulka 24 - Porovnání hodnot exprese MTOR/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY RTK/MAPK (GENY EGFR, FLT1, KDR, HRAS, JUN, FOS)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FLT1/GAPDH	tumor	19	0,000461942	0,001043033	0,002533138	↓	0,006
	normální	13	0,000983602	0,001694411	0,004220036		

Tabulka 25 - Porovnání hodnot exprese FLT1/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FLT1/ACTB	tumor	16	0,008318746	0,011687493	0,024231513	↓	0,008
	normální	12	0,010741527	0,026795132	0,098312324		

Tabulka 26 - Porovnání hodnot exprese FLT1/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/GAPDH	tumor	15	8,54239E-05	0,000243739	0,000318813	↓	0,022
	normální	14	0,00049885	0,000652423	0,001778371		

Tabulka 27 - Porovnání hodnot exprese KDR/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/BetaActin	tumor	15.1	0,000772011	0,001181635	0,004926075	↓	0,013
	normální	12	0,00471404	0,010089808	0,014755822		

Tabulka 28 - Porovnání hodnot exprese KDR/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/ACTB	tumor	15	0,001068646	0,002709984	0,005627819	↑	0,005
	normální	13	0,004773256	0,015040538	0,035383591		

Tabulka 29 - Porovnání hodnot exprese KDR/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
JUN/BetaActin	tumor	20	0,048366662	0,087329092	0,161871414	↓	0,047
	normální	18	0,060864091	0,192318489	0,777283043		

Tabulka 30 - Porovnání hodnot exprese JUN/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
JUN/ACTB	tumor	20	0,075040296	0,151556696	0,323898892	↓	0,03
	normální	21	0,10228107	0,192136527	0,910852386		

Tabulka 31 - Porovnání hodnot exprese JUN/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOSrn/BetaActin	tumor	21	0,148480838	0,501735874	0,890545686	↓	0,009
	normální	15	0,757422404	1,988508246	4,560430438		

Tabulka 32 - Porovnání hodnot exprese FOSrn/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOSrn/ACTB	tumor	21	0,230382398	0,468168764	1,533680304	↓	0,011
	normální	16	0,503225678	1,979013016	6,180329807		

Tabulka 33 - Porovnání hodnot exprese FOSrn/ACTB mezi nádorovou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOS129/BetaActin	tumor	16	0,007129946	0,021731435	0,053613927	↓	0,017
	normální	13	0,03081509	0,047655003	0,116076507		

Tabulka 34 - Porovnání hodnot exprese FOS129/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání

11.2.3 HODNOTY EXPRESE SLEDOVANÝCH GENŮ A POROVNÁNÍ EXPRESE TĚCHTO GENŮ MEZI PŘECHODNOU TKÁNÍ JATERNÍCH METASTÁZ KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU A NORMÁLNÍ TKÁNÍ

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY VHL/HIF (GENY VHL, HIF1A, HIF2A)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
VHL	přechodná	23	33,87677744	34,45044383	36,92	↑	0,005
	normální	23	34,51	38,28	40,53		

Tabulka 35 - Porovnání hodnot exprese VHL mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
VHL/ACTB	přechodná	21	0,009311527	0,023035457	0,031935225	↓	0,004
	normální	21	0,027063472	0,057262522	1,465222318		

Tabulka 36 - Porovnání hodnot exprese VHL/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/GAPDH	přechodná	23	0,026460791	0,037002714	0,090979123	↓	0,001
	normální	19	0,044338047	0,097751844	0,191221687		

Tabulka 37 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/GAPDH mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/HPRT	přechodná	20	12,36122509	19,26892178	38,05282601	↓	0,021
	normální	13	22,33791837	44,96819279	87,99939458		

Tabulka 38 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/HPRT mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/BetaActin	přechodná	20	0,090137852	0,242802258	0,560160773	↓	0,002
	normální	16	0,243915863	1,203536254	3,321266528		

Tabulka 39 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
HIF2a/ACTB	přechodná	20	0,208585781	0,52438108	1,053686116	↓	0,001
	normální	17	0,699687789	1,753211443	6,079222249		

Tabulka 40 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY PI3K/AKT/MTOR (GENY PTEN, AKT2, AKT3, MTOR)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT2	přechodná	23	27,98275613	29,46	31,715	↑	0,039
	normální	18	29,52375	30,6065976	34,42430216		

Tabulka 41 - Porovnání hodnot exprese AKT2 mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT2/BetaActin	přechodná	20	0,182785586	0,344234543	1,133523324	↓	0,002
	normální	16	0,485796391	1,210153921	2,27795783		

Tabulka 42 - Porovnání hodnot exprese AKT2/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT2/ACTB	přechodná	20	0,333172544	0,968501068	2,152681752	↓	0,008
	normální	17	0,571209188	1,42129842	3,72568055		

Tabulka 43 - Porovnání hodnot exprese AKT2/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT3/BetaActin	přechodná	19	0,024518253	0,067557204	0,205445544	↓	0,006
	normální	15	0,061499828	0,43077308	1,240251179		

Tabulka 44 - Porovnání hodnot exprese AKT3/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
AKT3/ACTB	přechodná	19	0,044966674	0,232599929	0,71449707	↓	0,005
	normální	15	0,207250701	0,49511412	1,627703101		

Tabulka 45 - Porovnání hodnot exprese AKT3/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

POROVNÁNÍ EXPRESE GENŮ SIGNÁLNÍ DRÁHY RTK/MAPK (GENY EGFR, FLT1, KDR, HRAS, JUN, FOS)

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
EGFR/BetaActin	přechodná	20	0,023513357	0,039990695	0,118171334	↓	0,019
	normální	15	0,037529529	0,181746565	0,325536276		

Tabulka 46 - Porovnání hodnot exprese EGFR/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FLT1/GAPDH	přechodná	20	0,000538049	0,00081861	0,001719379	↓	0,015
	normální	13	0,000983602	0,001694411	0,004220036		

Tabulka 47 - Porovnání hodnot exprese FLT1/GAPDH mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FLT1/BetaActin	přechodná	18.1	0,002579083	0,004333946	0,008656347	↓	0,008
	normální	12	0,007214787	0,014678055	0,047060616		

Tabulka 48 - Porovnání hodnot exprese FLT1/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FLT1/ACTB	přechodná	17.1	0,003847473	0,010586235	0,017476942	↓	0,004
	normální	11	0,010741527	0,026795132	0,098312324		

Tabulka 49 - Porovnání hodnot exprese FLT1/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/HPRT	přechodná	16.1	0,074521561	0,221881968	0,307519888	↓	0,015
	normální	10	0,197638267	0,352165695	0,865724648		

Tabulka 50 - Porovnání hodnot exprese KDR/HPRT mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/BetaActin	přechodná	18	0,000756086	0,00144796	0,004055288	↓	0,008
	normální		0,00471404	0,010089808	0,014755822		

Tabulka 51 - Porovnání hodnot exprese KDR/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
KDR/ACTB	přechodná	17.1	0,001045195	0,002480764	0,008600768	↓	0,008
	normální	12	0,00471404	0,010089808	0,014755822		

Tabulka 52 - Porovnání hodnot exprese KDR/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
JUN	přechodná	23	30,52	31,905	34,53235654	↑	0,033
	normální	23	31,59	35,42293311	38,11667		

Tabulka 53 - Porovnání hodnot exprese JUN mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
JUN/BetaActin	přechodná	21	0,054452351	0,090873282	0,123197041	↓	0,011
	normální	18	0,060864091	0,192318489	0,777283043		

Tabulka 54 - Porovnání hodnot exprese JUN/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
JUN/ACTB	přechodná	19	0,075023534	0,132127255	0,226671095	↓	0,011
	normální	22	0,10228107	0,192136527	0,910852386		

Tabulka 55 - Porovnání hodnot exprese JUN/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOSr _n /HPRT	přechodná	18.1	13,4533685	41,83655039	100,7939391	↓	0,011
	normální	11	41,06962872	71,74906584	143,5338216		

Tabulka 56 - Porovnání hodnot exprese FOSr_n/HPRT mezi přechodnou a normální tkání

gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOSr _n /BetaActin	přechodná	23	0,299369676	0,38958229	0,957674428	↓	0,03
	normální	15	0,757422404	1,988508246	4,560430438		

Tabulka 57 - Porovnání hodnot exprese FOSr_n/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání

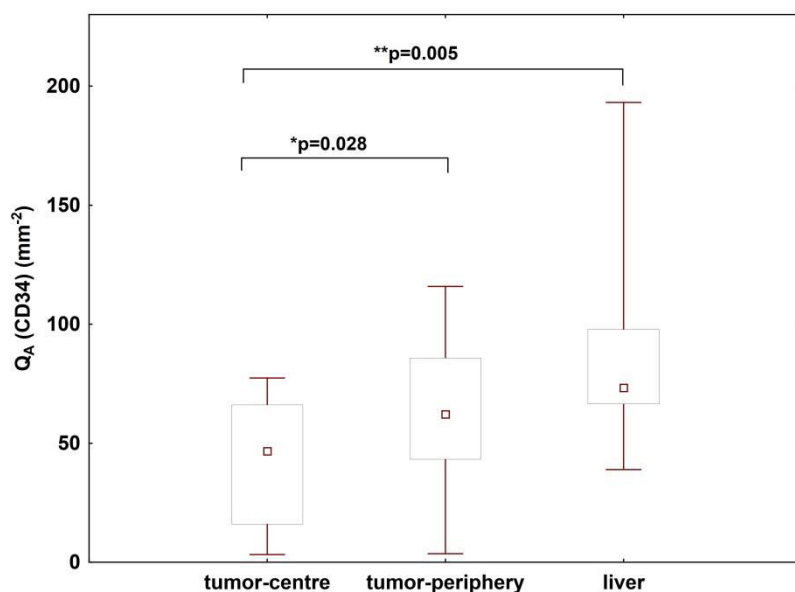
gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
FOSr _n /ACTB	přechodná	22	0,33404804	0,627633741	2,369807199	↓	0,027
	normální	16	0,503225678	1,979013016	6,180329807		

Tabulka 58 - Porovnání hodnot exprese FOSr_n/ACTB mezi přechodnou a normální tkání

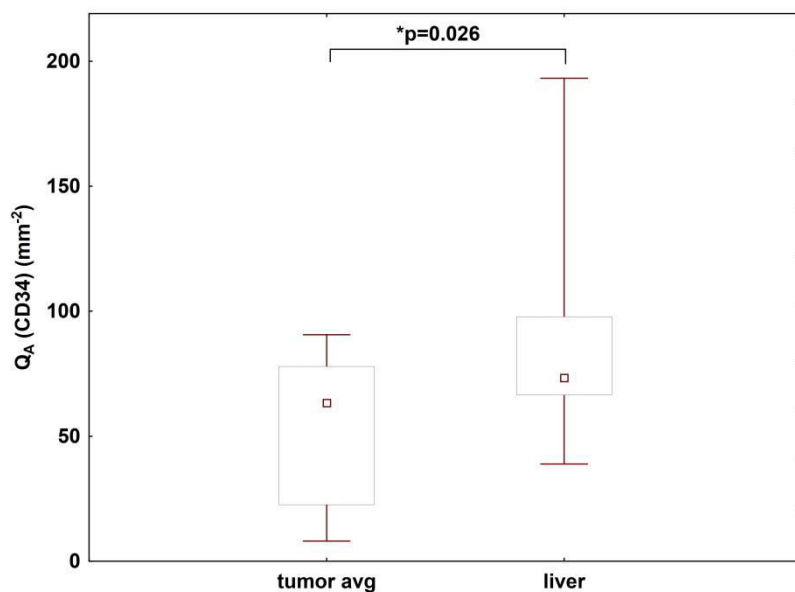
gen	typ tkáně	počet pacientů	1. kvartil	medián	3. kvartil	trend	p hodnota
TP53	přechodná	23	29,79673244	32,015	34,94	↑	0,047
	normální	16	31,82	33,94263616	36,8587525		

Tabulka 59 - Porovnání hodnot exprese TP53 mezi přechodnou a normální tkání

11.3 HODNOCENÍ VASKULARIZACE NA ZÁKLADĚ IMUNOHISTOCHEMICKÉHO STANOVENÍ EXPRESE MOLEKULY CD34



Obrázek 9 - Porovnání exprese molekuly CD34 jakožto markeru množství endotelových buněk mezi centrem nádoru, přechodovou zónou a normální tkání jater; zdroj: Králíčková, A., et al., 2014



Obrázek 10 - Porovnání exprese molekuly CD34 jakožto markeru množství endotelových buněk mezi nádorem jako takovým a normální tkání jater; zdroj: Králíčková, A., et al., 2014

12 DISKUSE

Cílem práce bylo stanovení exprese genů, jejichž produkty se podílejí na aktivaci angiogeneze v nádorové tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a porovnání s expresí s přechodnou tkání (nádor – normální tkáň) a normální tkání jater.

Dalším cílem bylo porovnání hodnot exprese genů, podílejících se na aktivaci angiogeneze, s poskytnutými daty o vaskularizaci příslušné tkáně. Vaskularizace byla stanovena na základě imunohistochemického stanovení markeru endotelových buněk CD34. Cílem tohoto porovnání bylo zjistit vztah mezi hodnotami genové exprese a fenotypem, tj. vaskularizací, a určit geny, jejichž produkty jsou potenciálními cíli antiangiogenní léčby.

Jako nejvhodnější pro stanovení exprese genů podílejících se na angiogenezi jsou FFPE vzorky, a to z důvodu možnosti provedení makrodisekce, kdy může být cíleně izolován pouze vybraný typ tkáně (např. nádorová tkáň), a to díky porovnání izolovaného vzorku s hematoxylineosinovým preparátem, na němž patolog vyznačil oblast příslušného typu tkáně. Úskalí tohoto stanovení spočívá v tom, že RNA v těchto vzorcích je velice degradovaná a tudíž výtěžnost izolace není vysoká a vlastní stanovení metodou RT real-time PCR vyžaduje speciální přístup, který umožňuje stanovit expresi sledovaných genů na základě krátkých fragmentů jejich mRNA. Tento přístup spočívá v designu primerů pro PCR tak, aby jednotlivé amplikony byly co nejkratší. Přes tato úskalí se podařilo u většiny vzorků stanovit hodnoty exprese všech genů až na VEGF, o němž však je jeho zásadní význam pro stimulaci angiogeneze znám.

Dalším problematickým bodem stanovení exprese metodou RT real-time PCR je normalizace výsledků. Pro získání co nejobjektivnějších výsledků byla exprese normalizována ke třem různým genům (GAPDH, HPRT, β Actin) a k celkové RNA. Všechny tyto přístupy jsou v současnosti používány, a protože nebylo možno říci, který z těchto přístupů je pro tento typ tkání nejvhodnější (jaterní tkáň a jaterní metastázy kolorektálního karcinomu), byly použity všechny.

Při porovnání exprese mezi nádorovou a přechodnou tkání jaterních metastáz kolorektálního karcinomu jsme v přechodné tkáni zjistili statisticky signifikantně vyšší expresi onkogenu HIF2 α , mTOR, EGFR, FOSr, FOS129, KDR a statisticky signifikantní snížení tumor-supresorového genu VHL. Tyto výsledky ukazují na větší zapojení signálních drah angiogeneze v přechodové tkáni, než spíše v centru nádoru. Obdobný

výsledek ukázalo i imunohistochemické stanovení exprese molekuly CD34 jakožto markeru endotelových buněk, kdy byla statisticky signifikantně vyšší exprese této molekuly v nádorové periférii oproti centru nádoru (viz Obrázek 9). Tento výsledek ukazuje na klíčovou roli periferie nádoru a přechodové zóny pro růst nádoru jako takového, kdy právě tato oblast je zřejmě zdrojem většiny, pro růst nádorové tkáně důležitých molekul (živiny, O₂). Zároveň tento výsledek ukazuje, že právě molekuly EGFR, KDR, FOSr α , FOS129 a HIF2 α by mohly být potenciálním cílem antiangiogenní léčby a mít vliv na potlačení růstu nádoru.

Dále byla porovnána exprese v nádorové tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a normální jaterní tkáni. Porovnáváme vlastní nádor s tkání, ve které se nachází. Je zde však zásadní problém, že nádorová tkáň nemá původ v jaterní tkáni, ale v epitelu kolorekta. Výsledky exprese ukázaly statisticky signifikantně vyšší hladinu molekul HIF1 α , HIF2 α , AKT2, mTOR, FLT1, KDR, JUN, FOSr α a FOS129 v jaterní tkáni, což odpovídá větší vaskularizaci této tkáně prokázané statisticky signifikantně vyšší expresí markeru CD34 (viz Obrázek 10). Porovnání exprese stanovovaných genů mezi přechodovou tkání jaterních metastáz kolorektálního karcinomu a normální tkání jater, ukázalo vyšší hladinu 8 z 12 protoonkogenů (AKT2, AKT3, EGFR, FOSr α , HIF2 α , JUN a KDR), tzn. zde genů podporujících angiogenezi.

Pokud by mělo být výše uvedené shrnuto, pro angiogenezi nádoru jako takového má zřejmě klíčový význam přechodová zóna nádoru a konkrétně exprese genů AKT2, AKT3, EGFR, FOSr α , HIF2 α , JUN a KDR. Lze proto uvažovat o cíleném farmakologickém ovlivnění hladiny těchto genů ve směru snížení jejich hladiny, jakožto způsobu potlačení angiogeneze jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. Dále se ukázala vyšší míra vaskularizace normální jaterní tkáně oproti jaterním metastázám kolorektálního karcinomu.

Pro potvrzení zjištěných výsledků by bylo vhodné provést kvantitativní stanovení aktivity jednotlivých signálních drah stanovením fosforylované formy vybraných přenašečů signálních drah VHL/HIF, PI3K/Akt/mTOR a RTK/MAPK metodou Western blott.

ZÁVĚR

- 1) Úspěšně byla izolována RNA z FFPE tkáně v kvalitě použitelné pro metodu RT real-time PCR u 70 vzorků. U dvou vzorků přes opakované izolace nebylo možno získat dostatečné množství RNA v kvalitě pro realizaci molekulárního genetického stanovení.
- 2) Byla stanovena exprese 15ti genů signálních drah aktivujících angiogenezi a tři referenčních genů.
- 3) Expres byla vyhodnocena jednak relativně (ve vztahu k referenčním genům) a dále ve vztahu k celkové RNA. Takto získaná data byla statisticky vyhodnocena metodou Wilcoxonova párového testu.
- 4) Porovnáním exprese signálních drah aktivujících angiogenezi s imunohistochemicky stanovenou přítomností molekuly CD34, markeru endotelu, byla zjištěna souvislost mezi velikostí vaskularizace hodnocenou markerem CD34 a aktivitou signálních drah, aktivujících angiogenezi v přechodové tkáni jaterních metastáz kolorektálního karcinomu.
- 5) Geny, jejichž produkty se ukázaly být vhodnými cíli antiangiogenní protinádorové léčby jsou geny EGFR, KDR, FOSr, FOS129 a HIF2 α .

RESUMÉ

The aim of the thesis was to determine the expression of genes, whose products are involved in the activation of angiogenesis in colorectal carcinoma of the liver metastases and comparison with expression with transient tissue (tumor - normal tissue) and normal liver tissue.

RNA from FFPE tissue was successfully isolated using the RT real-time PCR method in 70 samples. In two samples, despite repeated isolation, it was not possible to obtain sufficient amount of RNA in the quality to perform the molecular genetic assay.

Expression of 15 angiogenesis activating signal genes and three reference genes was determined.

By comparing the expression of angiogenesis activating signaling pathways with the immunohistochemically determined presence of the CD34 molecule, the endothelium marker, a relationship was established between the size of the vascularization assessed by the CD34 marker and the activity of signaling pathways activating angiogenesis in transient tissue of colorectal carcinoma liver metastases.

The genes whose products have proved to be suitable targets for anti-angiogenic antitumor therapies are the EGFR, KDR, FOSr α , FOS129 and HIF2a genes.

SEZNAM LITERATURY

1. ADAM, Zdeněk, KREJČÍ, Marta a VORLÍČEK, Jiří. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-648-9.
2. ADAM, Zdeněk, KOPTÍKOVÁ, Jana a VORLÍČEK, Jiří. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 787 s. ISBN 80-247-0677-6.
3. *AllPrep®DNA/RNA FFPE, Handbook*. QUIAGEN, 2010. 42 s.
4. BISHOP, M. James a WEINBERG, A. Robert. *Molecular oncology*. New York: Scientific American, Inc., 1996.
5. CAPUANO, Floriana, MÜLLEDER, Michael, KOK, Robert, BLOM, Henk J. a RALSER, Markus. *Cytosine DNA Methylation Is Found in Drosophila melanogaster but Absent in Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Other Yeast Species*. Analytical Chemistry 2014 86 (8), 3697-3702, DOI: 10.1021/ac500447w.
6. CIBULA, David a Luboš PETRUŽELKA. *Onkogynekologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.
7. CZYZYK-KRZESKA, M.F. a MELLER, J. (April 2004). "von Hippel–Lindau tumor suppressor: not only HIF's executioner". *Trends in Molecular Medicine*. 10 (4): 146–9. PMID 15162797. doi:10.1016/j.molmed.2004.02.004.
8. DURAN, Ivan, LAMBEA, Julio, MAROTO, Pablo et al. *Resistance to Targeted Therapies in Renal Cancer: The Importance of Changing the Mechanism of Action*. *Targ Oncol* (2017) 12: 19.
9. DUŠEK, Ladislav, MUŽÍK, Jan, KUBÁSEK, Miroslav, KOPTÍKOVÁ, Jana, ŽALOUĐÍK, Jan a VYZULA Rostislav. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2017-3-24]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
10. FEDI, Paolo, TRONICK, R. Steven a AARONSON A. Stuart. *Growth factors*. In *Cancer Medicine*, HOLLAND, J.F., BAST, R.C., MORTON, D.L., FREI, E., UFE, D.W. a WEICHSELBAUM, R.R. 1997, Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
11. FÖLSCH, R. Ulrich, Kurt KOCHSIEK a Robert F. SCHMIDT. *Patologická fyziologie*. Vyd. 1. Přeložil Richard ROKYTA, přeložil Jan MAREŠ. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0319-X.

12. FRANZISKA, Michor a POLYAK, Kornelia. *The Origins and Implications of Intratumor Heterogeneity*. Cancer Prevention Research, 2010.
13. GERLINGER, Marco a kolektiv. *Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing*. The New England Journal of Medicine, vol. 366, no. 10, 2012.
14. HANAHAN, Douglas a WEINBERG, A. Robert. *The Hallmarks of Cancer*. Cell vol. 100, 57-70. Cell Press, 2000.
15. HANAHAN, Douglas a WEINBERG, A. Robert. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review. PubMed PMID: 21376230.
16. HARRIS, C. Curtis. *p53 tumor supressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective*. Carcinogenesis 17, 1996.
17. HERBST, R.S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology". International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. 59 (2 Suppl): 21-6. PMID 15142631. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.11.041.
18. HOLMES, K., ROBERTS, O.L., THOMAS, A.M. a CROSS, M.J. (October 2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition". Cell Signal. 19 (10): 2003-2012. PMID 17658244. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013.
19. CHIN, Rebecca, YOSHIDA, Taku, MARUSYK, Andriy, BECK, Andrew H., POLYAK, Kornelia a TOKER, Alex. *Targeting Akt3 Signaling in Triple-Negative Breast Cancer*. Cancer. Res February 1 2014 (74) (3) 964-973; **DOI:** 10.1158/0008-5472.CAN-13-2175.
20. CHEN, Z., TROTMAN, L.C., SHAFFER, D., LIN, H.K., DOTAN, Z.A., NIKI, M., KOUTCHER, J.A., SCHER, H.I., LUDWIG, T., GERALD, W., CORDON-CARDO, C., PANDOLFI, P.P. (August 2005). *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. Nature. 436 (7051): 725–30. PMC 1939938 . PMID 16079851. doi:10.1038/nature03918.
21. CHIOSEA, S.I., MILLER, M. a SEETHALA, R.R. (Jun 2014). "HRAS mutations in epithelial-myoepithelial carcinoma". Head and Neck Pathology. 8 (2): 146-50. PMC 4022927. PMID 24277618. doi:10.1007/s12105-013-0506-4.
22. JABLONSKÁ, Markéta a kol. *Kolorektální karcinom – časná diagnóza a prevence*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 456 s. + 8 s. barevné přílohy. ISBN 80-7169-777-X.

23. JIAO, X., KATYIAR, S., WILLMARTH, N.E., LIU, M., MA, X., FLOMENBERG, N., LISANTI, M.P. a PESTELL, R.G. (March 2010). "*c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion*". J. Biol. Chem. 285 (11): 8218–26. PMC 2832973. PMID 20053993. doi:10.1074/jbc.M110.100792.
24. KANNAN, Kalpana, COARFA, Cristian, CHAO, Pei-Wen, LUO, Liming, WANG, Yan, BRINEGAR, Amy E., HAWKINS, Shannon M., MILOSAVLJEVIC, Aleksandar, MATZUK, Martin M. a YEN, Laising. *Recurrent BCAM-AKT2 fusion gene leads to a constitutively activated AKT2 fusion kinase in high-grade serous ovarian carcinoma*. PNAS 2015 112 (11) E1272-E1277; published ahead of print March 2, 2015, doi:10.1073/pnas.1501735112.
25. KARP, Gerald. *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. 5th ed. Chichester: John Wiley, 2008. ISBN 978-0-470-04217-5.
26. KLENER, Pavel a KLENER jr., Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 232 s. ISBN 978-80-247-2808-7.
27. KRÁLÍČKOVÁ, Anna, DAUM, Ondřej, LIŠKA, Václav, MÍRKA, Hynek, KRÁLÍČKOVÁ, Milena a TONAR, Zbyněk. *Correlation of histopathological markers of angiogenesis with perfusion CT in hepatic metastases of colorectal carcinoma*. 25th ESC, 17-20 Sept 2014 Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany.
28. KULDA, V., TOPOLČAN, O., KUČERA, R., KRIPNEROVÁ, M., SRBEČKA, K., HORA, M., HES, O., KLEČKA, J., BABUŠKA, V. a ROUSAROVÁ, M. BENSON V a PEŠTA, Martin. *Prognostic Significance of TMPRSS2-ERG Fusion Gene in Prostate Cancer*. Anticancer Res. 2016 Sep;36(9):4787-93. PubMed PMID: 27630329.
29. MILDE-LANGOSCH, K. (November 2005). "*The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis*". Eur. J. Cancer. 41 (16): 2449–61. PMID 16199154. doi:10.1016/j.ejca.2005.08.008.
30. PEŠTA, Martin, JAVŮREK, Jan. *Současná izolace DNA a RNA ze vzorku nádorové tkáně zalité v parafinovém bločku [videozáznam]*. Plzeň: Centrum informačních technologií LFUK Plzeň, 2014. 3 DVD Video (50min 14s).

31. PERCY, M.J., BEER, P.A., CAMPBELL, G., DEKKER, A.W., GREEN, A.R., OSCIER, D., RAINEY, M.G, VAN WIJK, R., WOOD, M., LAPPIN, T.R., McMULLIN, M.F. a LEE, F.S. (June 2008). *Novel exon 12 mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. Blood. III (11): 5400–2. PMC 2396730. PMID 18378852. doi:10.1182/blood-2008-02-137703.*
32. POZAROWSKA, Dorota a POZAROWSKI, Piotr. *The rea of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy.* Central European Journal of Immunology, 2016.
33. RANKIN, B. Erinn a GIACCIA, J. Amato. *Hypoxic control of metastasis.* Science, 2016.
34. REJTHAR, Aleš a VOJTĚŠEK, Bořivoj. *Obecná patologie nádorového růstu.* Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0238-X.
35. ROBBINS, L. Stanley, Vinay KUMAR a Ramzi S. COTRAN. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* 8th ed. / Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2010. ISBN 978-1-4160-3121-5.
36. SHIBUYA, M. (2007). "*Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis*". *Angiogenesis.* 9 (4): 225–30; discussion 231. PMID 17109193. doi:10.1007/s10456-006 9055-8.
37. SKOBE, Mihaela a FUSENIG, E. Norbert. *Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation.* 1995, Proc Natl. Acad. Sci. USA.
38. SLABÝ, Ondřej a SVOBODA, Marek. *MikroRNA v onkologii.* Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-587-1
39. SMOLOVÁ, Barbora. *Srovnání kvantity a kvality nukleových kyselin izolovaných z histologických řezů různého stáří.* Plzeň, 2016. Bakalářská práce. ZČU. Vedoucí práce Martin Pešta.
40. SPORN, B. Michael (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.
41. STEINER, Petr, HORA, Milan, STEHLÍK, Jan, MARTÍNEK, Petr, VANĚČEK, Tomáš, PETERSSON, Fredrik, MICHAL, Michal, KORÁBEČNÁ, Marie, TRÁVNÍČEK, Ivan a HES, Ondřej. *Tubulocystic renal cell carcinoma: is there a*

rational reason for targeted therapy using angiogenic inhibition? Analysis of seven cases. Virchows Arch. 2013 Feb;462(2):183-92.

42. WEINBERG, A. Robert. *The retinoblastoma protein and cell cycle control.* 1995, Cell 81, str. 323-330.
43. WONG, W., GOEHRING, A.S., KAPILOFF, M.S., LANGEBERG, L.K. a SCOTT, J.D. (December 2008). *mAKAP compartmentalizes oxygen-dependent control of HIF-1alpha.* Science Signaling. 1 (51): ra18. PMC 2828263. PMID 19109240. doi:10.1126/scisignal.2000026

SEZNAM ZKRATEK

ABL	Abelsonův protoonkogen
AKT	serin-threoninová kináza – proteinkináza B
ALT	alternativní délka telomer
APC	adenomatous polyposis coli
AP1	activator protein 1
BCR	breakpoint cluster region
BRAF	gen pro serin-threoninovou kinázu B-Raf
BRCA1	breast cancer 1
BRCA2	breast cancer 2
CDC20	cell-division cycle protein 20
Cdk	cyklin-dependentní kináza
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CD34	hematopoietic progenitor cell antigen CD34
CEP	endoteliální progenitory (carboxyethylpyrrole protein)
CpG	cytosin-fosfát-guanin
Ct	crossing threshold, cycle threshold
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina deoxyribonucleic acid
DNMTi	DNA methyltransferase
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EP	endoteliální prekurzory
EPAS-1	endothelial PAS domain-containing protein 1
ERG	transkripční faktor podporující růst (ETS-related gene)
ETS	transkripční faktor (erythroblast transformation-specific)
E2F	E2F transkripční faktor
FAP	familial adenomatous polyposis

FFPE	formalínem fixované, ve formaldehydu zalité
FGF	fibroblastový růstový faktor
HCC	hepatocelulární karcinom
HIF-1 α	hypoxií indukovaný faktor 1 α
HIF-2 α	hypoxií indukovaný faktor 2 α
HRAS	Harvey rat sarcoma
ICAM-1	vascular cell adhesion molecule
KDR	kinase insert domain receptor
KRAS	Kirsten rat sarcoma
MAD2	mitotic arrest deficient 2
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
Max	myc associated factor X
MMR	mismatch repair
mRNA	mediátorová RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
Myc	transkripční faktor (c-Myc)
NER	nukleotidová excisní oprava
NF-1	neurofibromin 1 gene
NF-2	neurofibromin 2 gene
PC	personal computer
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI3K	fosfoinositidová 3-kináza
PTEN	phosphatase and tensin homologue
p107	protein 107
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAF	protooncogene serine/threonine-protein kinase
ras protein	rat sarcoma protein
Rb (pRb)	retinoblastoma gene (protein) - retinoblastomový gen (protein)
RFA	radiofrequency ablation - radiofrekvenční ablace

RNA	ribonukleová kyselina
RS	růstové signály
RT real-time PCR	reverse transcription real-time polymerase chain reaction
RTK	receptor s tyrosin-kinázovou aktivitou
SPS III	SuperScript III
TAF	tumor angiogenesis factor
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGF α	transformující růstový faktor α
TGF β	transformující růstový faktor β
TKRa	tyrosin-kinázové receptory
TMPRSS2	transmembránová proteáza serinového typu 2
TNF	tumor nekrotizující faktor
TP53	gen pro tumor protein p53
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
VHL	gen pro Von Hippel–Lindau
WT1	gen pro Wilms tumor gene
XP-A	xeroderma pigmentosum A
XP-G	gen pro xeroderma pigmentosum B

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ

Obrázek 1 – Charakteristické fenotypové vlastnosti nádorové tkáně, jejichž získání vede k přeměně normálních buněk v buňky maligního nádoru; zdroj: autor.....	17
Obrázek 2 – Průběh angiogeneze; znázorněny jsou 3 hlavní fáze angiogeneze: vaskulogeneze, remodelace, stabilizace a nejdůležitější faktory, které se podílejí na jejich průběhu; zdroj: upraveno dle Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003	23
Obrázek 3 - Aktivace angiogeneze je výsledkem převahy aktivátorů angiogeneze, nad jejími inhibitory; zdroj: upraveno dle Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J., et al., 2003	24
Obrázek 4 – Incidence a mortalita na nádory jater a intrahepatálních žlučových cest (diagnóza C22) v České republice mezi lety 1977-2014; zdroj: www.svod.cz	36
Obrázek 5 - Incidence a mortalita na nádory jater a intrahepatálních žlučových cest (diagnóza C22) v České republice, rozdělení dle věkové struktury pacientů; zdroj: www.svod.cz	36
Obrázek 6 – Obrázek ukazuje hlavní signální dráhy (VHL/HIF, PI3K/AKT/mTOR a RTK/MAPK) podílející se na aktivaci angiogeneze a receptory a jejich přenašeče signálů, jejichž exprese byla stanovena; zdroj: autor.....	38
Obrázek 7 – Záznam PCR v reálném čase, stanovení exprese genu JUN. Osa X znázorňuje počty cyklů, osa Y ukazuje fluorescenci, která koresponduje s množstvím kopií sledovaného genu ve stanovovaném vzorku; zdroj: autor.....	52
Obrázek 8 - Záznam PCR v reálném čase, vyhodnocení stanovení exprese genu JUN. Tabulka zobrazuje hodnotu fluorescence pro threshold a k tomu odpovídající hodnoty Ct pro jednotlivé vzorky na přístroji Stratagene Mx3005p; zdroj: autor	53
Obrázek 9 - Porovnání exprese molekuly CD34 jakožto markeru množství endotelových buněk mezi centrem nádoru, přechodovou zónou a normální tkání jater; zdroj: Králíčková, A., et al., 2014	70
Obrázek 10 - Porovnání exprese molekuly CD34 jakožto markeru množství endotelových buněk mezi nádorem jako takovým a normální tkání jater; zdroj: Králíčková, A., et al., 2014.....	70

Tabulka 1 – Geny, jejichž exprese byla stanovena a jejich předpokládaný efekt v nádorové tkáni	38
Tabulka 2 – Deskriptivní statistika u nádorové tkáně	58
Tabulka 3 – Deskriptivní statistika u normální tkáně.....	60
Tabulka 4 – Deskriptivní statistika u přechodné tkáně	62
Tabulka 5 - porovnání hodnot exprese VHL/ACTB mezi nádorovou a přechodnou tkání.	63
Tabulka 6 - Porovnání hodnot exprese HIF1a/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	63
Tabulka 7 - Porovnání hodnot exprese HIF2a mezi nádorovou a přechodnou tkání	63
Tabulka 8 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	63
Tabulka 9 - Porovnání hodnot exprese AKT2/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 10 - Porovnání hodnot exprese MTOR/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 11 - Porovnání hodnot exprese MTOR/HPRT mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 12 - Porovnání hodnot expreseEGFR/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 13 - Porovnání hodnot exprese KDR/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 14 - Porovnání hodnot exprese FOSr/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 15 - Porovnání hodnot exprese FOS129/GAPDH mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 16 - Porovnání hodnot exprese FOS129/HPRT mezi nádorovou a přechodnou tkání	64
Tabulka 17 - Porovnání hodnot exprese VHL mezi nádorovou a normální tkání.....	65
Tabulka 18 - Porovnání hodnot exprese HIF1a/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání	65
Tabulka 19 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání	65
Tabulka 20 - Porovnání hodnot exprese HIF2a/ACTB mezi nádorovou a normální tkání.	65
Tabulka 21 - Porovnání hodnot exprese AKT2/ACTB mezi nádorovou a normální tkání.	65
Tabulka 22 - Porovnání hodnot exprese AKT3 mezi nádorovou a normální tkání.....	65
Tabulka 23 - Porovnání hodnot exprese MTOR/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání	65
Tabulka 24 - Porovnání hodnot exprese MTOR/ACTB mezi nádorovou a normální tkání	65
Tabulka 25 - Porovnání hodnot exprese FLT1/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání	66
Tabulka 26 - Porovnání hodnot exprese FLT1/ACTB mezi nádorovou a normální tkání..	66
Tabulka 27 - Porovnání hodnot exprese KDR/GAPDH mezi nádorovou a normální tkání	66
Tabulka 28 - Porovnání hodnot exprese KDR/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání	66
Tabulka 29 - Porovnání hodnot exprese KDR/ACTB mezi nádorovou a normální tkání...	66
Tabulka 30 - Porovnání hodnot exprese JUN/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání	66

Tabulka 31 - Porovnání hodnot exprese JUN/ACTB mezi nádorovou a normální tkání....	66
Tabulka 32 - Porovnání hodnot exprese FOSr α /BetaActin mezi nádorovou a normální tkání	66
Tabulka 33 - Porovnání hodnot exprese FOSr α /ACTB mezi nádorovou a normální tkání	66
Tabulka 34 - Porovnání hodnot exprese FOS129/BetaActin mezi nádorovou a normální tkání	67
Tabulka 35 - Porovnání hodnot exprese VHL mezi přechodnou a normální tkání.....	67
Tabulka 36 - Porovnání hodnot exprese VHL/ACTB mezi přechodnou a normální tkání .	67
Tabulka 37 - Porovnání hodnot exprese HIF2 α /GAPDH mezi přechodnou a normální tkání	67
Tabulka 38 - Porovnání hodnot exprese HIF2 α /HPRT mezi přechodnou a normální tkání	67
Tabulka 39 - Porovnání hodnot exprese HIF2 α /BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	67
Tabulka 40 - Porovnání hodnot exprese HIF2 α /ACTB mezi přechodnou a normální tkání	67
Tabulka 41 - Porovnání hodnot exprese AKT2 mezi přechodnou a normální tkání.....	68
Tabulka 42 - Porovnání hodnot exprese AKT2/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 43 - Porovnání hodnot exprese AKT2/ACTB mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 44 - Porovnání hodnot exprese AKT3/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 45 - Porovnání hodnot exprese AKT3/ACTB mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 46 - Porovnání hodnot exprese EGFR/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 47 - Porovnání hodnot exprese FLT1/GAPDH mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 48 - Porovnání hodnot exprese FLT1/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	68
Tabulka 49 - Porovnání hodnot exprese FLT1/ACTB mezi přechodnou a normální tkání	69
Tabulka 50 - Porovnání hodnot exprese KDR/HPRT mezi přechodnou a normální tkání .	69
Tabulka 51 - Porovnání hodnot exprese KDR/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	69
Tabulka 52 - Porovnání hodnot exprese KDR/ACTB mezi přechodnou a normální tkání .	69
Tabulka 53 - Porovnání hodnot exprese JUN mezi přechodnou a normální tkání.....	69
Tabulka 54 - Porovnání hodnot exprese JUN/BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	69
Tabulka 55 - Porovnání hodnot exprese JUN/ACTB mezi přechodnou a normální tkání..	69
Tabulka 56 - Porovnání hodnot exprese FOSr α /HPRT mezi přechodnou a normální tkání	69
Tabulka 57 - Porovnání hodnot exprese FOSr α /BetaActin mezi přechodnou a normální tkání	69
Tabulka 58 - Porovnání hodnot exprese FOSr α /ACTB mezi přechodnou a normální tkání	69
Tabulka 59 - Porovnání hodnot exprese TP53 mezi přechodnou a normální tkání	70

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I – přístrojové vybavení laboratoře pro izolaci RNA a DNA

Příloha II – přístrojové vybavení laboratoře pro izolaci RNA a DNA

Příloha III – přístrojové vybavení laboratoře PCR

Příloha IV – přístrojové vybavení laboratoře PCR

Příloha V – přístrojové vybavení laboratoře PCR

Příloha VI – tabulka naměřených hodnot exprese metodou RT real-time PCR stanovovaných genů v nádorové a přechodné tkáni metastáz jater kolorektálního karcinomu a ve zdravé tkáni jater

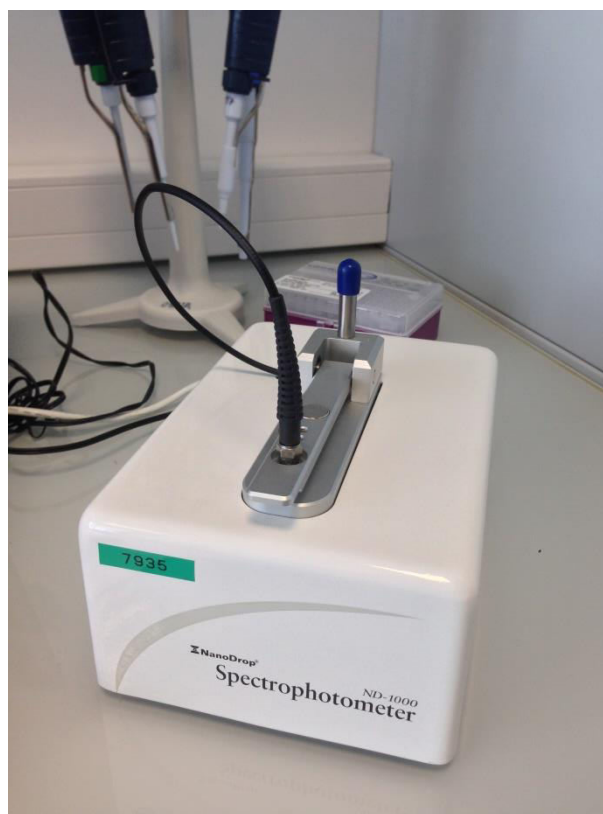
PŘÍLOHY

Příloha I – přístrojové vybavení laboratoře pro izolaci RNA a DNA



Obrázek 1 – Celkové zařízení pro měření koncentrace pomocí spektrofotometru *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000*; zdroj: autor

Příloha II – přístrojové vybavení laboratoře pro izolaci RNA a DNA



Obrázek 1 – Spektorofotometr *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000*; zdroj: autor



Obrázek 2 – *VELP® Scientifica, TX4 Digital IR Vortex Mixer* a *VWR, Micro Start 17* zdroj: autor

Příloha III – přístrojové vybavení laboratoře PCR



Obrázek 1 – Ochranný box pro přípravu vzorků pro PCR, Scie-Plas, „UV 4 PCR“; zdroj: autor

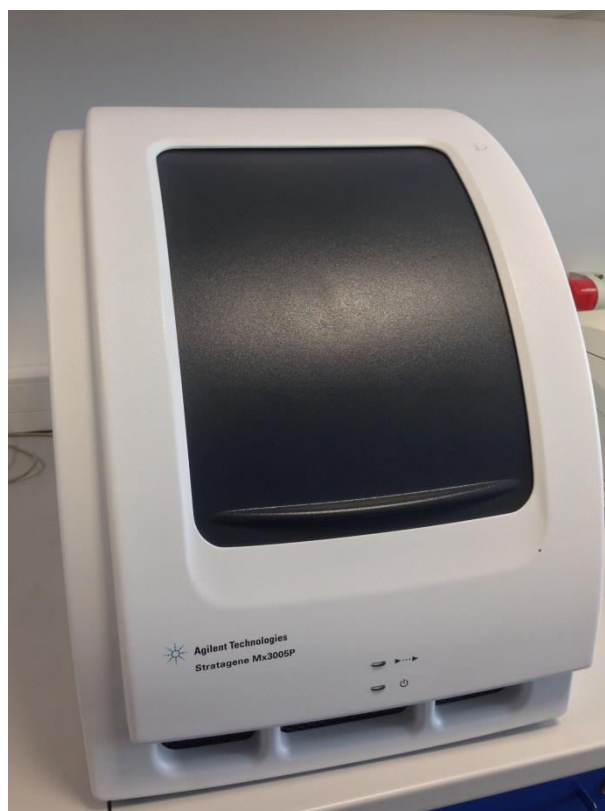


Obrázek 2 - Termocykler *BIO RAD T100™ Thermal Cycler*; zdroj: autor

Příloha IV – přístrojové vybavení laboratoře PCR



Obrázek 1 – Termocykler *BIO RAD T100™ Thermal Cycler*; zdroj: autor



Obrázek 2 – Přístroj umožňující stanovení real-time PCR, *Stratagene Mx3005P*; zdroj: autor

Příloha V – přístrojové vybavení laboratoře PCR



Obrázek 1 – Přístroj umožňující stanovení real-time PCR *Stratagene Mx3005P*; zdroj: autor

Příloha VI - tabulka naměřených hodnot exprese metodou RT real-time PCR stanovovaných genů v nádorové a přechodné tkáni metastáz jater kolorektálního karcinomu a ve zdravé tkáni jater

Tato příloha je vložena do diplomové práce.

Pro snadnou orientaci uvádím, že hodnoty exprese u markerů jako takových (např. GAPDH) jsou hodnoty Ct, a hodnoty exprese poměru cílových genů ku referenčním genům, jsou hodnoty ΔCt .