UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

ZMĚNY EXPRESE DLOUHÝCH NEKÓDUJÍCÍCH RNA U HEPATOCELULÁRNÍHO KARCINOMU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Nekvindová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Bc. Magdaléna Krhutová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne …… ……...

podpis

Děkuji prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za vedení této diplomové práce a RNDr. Janě Nekvindové, Ph.D. za přínosné konzultace, které mi velmi pomohly při vypracovávání práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

Studentka: Bc. Magdaléna Krhutová

Školitel: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Změny exprese dlouhých nekódujících RNA u hepatocelulárního karcinomu

Hepatocelulární karcinom (HCC) je globálně jedním z vysoce prevalentních nádorových onemocnění, jehož počet případů, tak jako počet úmrtí na něj, každoročně narůstá. Molekulární mechanismy vzniku HCC jsou intenzivně studovány, avšak stále nejsou plně pochopeny. Mimo genetických vlivů se na patogenezi HCC podílí i vlivy epigenetické. Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jsou molekuly RNA bez schopnosti kódovat proteiny a s délkou minimálně 200 nukleotidů. Řada studií odhalila lncRNA zapojené do tumorigeneze prostřednictvím vazby na DNA, RNA i proteiny. Nové studie ukazují také na významné změny v expresi biotransformačních enzymů u HCC a i zde na interakce s mikroRNA (miRNA) a lncRNA.

Předkládaná diplomová práce se věnuje problematice dlouhých nekódujících RNA ve vztahu k HCC. Shrnuje epidemiologickou situaci, rizikové faktory, aktuální možnosti diagnostiky a terapie tohoto onemocnění. Dále se zabývá genetickými a epigenetickými mechanismy přispívajícími k rozvoji HCC, se zaměřením na miRNA a lncRNA. Předmětem studia této problematiky je také souvislost nádorem poškozené jaterní tkáně s alterací v expresi enzymů cytochromu P450 (CYP) a vzájemných interakcí mezi CYP a nekódujícími transkripty. Všechny tyto poznatky přibližují možnost identifikace nových biomarkerů pro včasnou či přesnější diagnostiku a nalezení či individualizaci léčebných postupů pro efektivní terapii HCC. Diplomovou práci uzavírají kapitoly věnující se základním metodám stanovení lncRNA a databázím, které shromažďují informace o této rozrůstající se skupině RNA.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Bc. Magdaléna Krhutová

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: The changes in expression of long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the highly prevalent cancers globally. A number of new cases of HCC and deaths rises every year. Molecular mechanisms of HCC are being intensively studied, yet they are not still fully understood. In addition to genetic alterations, epigenetics also plays an important role in HCC pathogenesis. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are RNA molecules that are not capable of coding proteins, and their length is 200 nucleotides or more. Various studies have already revealed lncRNAs involved in tumorigenesis through binding to DNA, RNA and proteins. New studies also demonstrate significant changes in the expression of biotransformation enzymes in HCC, and interactions with microRNAs (miRNAs) and lncRNAs.

This diploma thesis deals with the issue of long non-coding RNAs in relation to HCC. It summarizes the epidemiological situation, risk factors, and current possibilities of diagnosis and therapy of this disease. It also summarizes recently described genetic and epigenetic mechanisms contributing to the development of HCC, focusing on miRNAs and lncRNAs. A related aspect is the connection between tumor-damaged liver tissue and alterations in the expression of cytochrome P450 (CYP) enzymes and the interactions between CYPs and non-coding transcripts. In addition to the above, all these findings bring closer the possibility of identifying new biomarkers for early or more precise (molecular) diagnosis and finding or individualization of the treatments for effective HCC therapy. Last chapters describe basic methods for lncRNAs identification and analysis, and databases that gather information about this growing group of RNAs.

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK 9
2 ÚVOD A CÍL 15
3 TEORETICKÁ ČÁST 17
3.1 Játra a hepatocelulární karcinom 17
3.2 Epidemiologie 17
3.3 Klinické příznaky 19
3.4 Rizikové faktory 20
3.4.1 Hepatitida B 20
3.4.2 Hepatitida C 20
3.4.3 Alkoholová cirhóza jater 21
3.4.4 Metabolický syndrom a NASH/NAFLD 21
3.4.5 Aflatoxiny 22
3.4.6 Hemochromatóza 22
3.4.7 Další faktory 22
3.5 Genetické mechanismy vzniku hepatocelulárního karcinomu 24
3.5.1 Udržování délky telomer 24
3.5.2 TP53 24
3.5.3 Signální dráhy 25
3.5.3.1 Wnt/β-katenin cesta 25
3.5.3.2 Tyrozinkinázové receptory 26
3.5.3.3 MAPK signální dráha (Ras/Raf/MEK/ERK) 27
3.5.3.4 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR 27
3.6 Epigenetické alterace u hepatocelulárního karcinomu 29
3.6.1 Methylace DNA 29
3.6.2 Modifikace histonů a remodelace chromatinu 30
3.6.3 Nekódující RNA 31

3.6.3.1 MikroRNA 31
3.7 Diagnostika HCC 35
3.7.1 Screening 35
3.7.2 Stanovení diagnózy 36
3.8 Staging 37
3.9 Terapie 38
3.9.1 Kurativní léčba 38
3.9.1.1 Resekce jater 38
3.9.1.2 Transplantace jater 38
3.9.1.3 Perkutánní ablace 39
3.9.2 Paliativní léčba 40
3.9.2.1 Transarteriální chemoembolizace 40
3.9.2.2 Transarteriální radioembolizace 40
3.9.2.3 Systémová terapie 40
3.9.3 Symptomatická léčba 45
3.10 Role jater v metabolismu u hepatocelulárního karcinomu 46
3.10.1 Biotransformace xenobiotik 46
3.10.2 Význam cytochromu P450 u hepatocelulárního karcinomu 47
3.11 Dlouhé nekódující RNA 51
3.11.1 Vlastnosti a struktura dlouhých nekódujících RNA 51
3.11.2 Klasifikace dlouhých nekódujících RNA 51
3.11.3 Funkce a mechanismy dlouhých nekódujících RNA 52
3.11.4 Dlouhé nekódující RNA v patogenezi HCC 57
3.11.5 Metody stanovení dlouhých nekódujících RNA 67
3.11.6 Databáze dlouhých nekódujících RNA 69
3.11.7 Predikce interakcí dlouhých nekódujících RNA 70
4 DISKUSE 72

5 ZÁVĚR 76
6 LITERATURA 77

1 SEZNAM ZKRATEK

3' UTR	3' nepřekládaná oblast (3' untranslated region)
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AFB1	aflatoxin B1
AFP	alfa-fetoprotein
APC protein	adenomatous polyposis coli
aslncRNA	antisense dlouhá nekódující RNA (antisense non-coding RNA)
ASO	antisense oligonukleotidy
ATGL	adipose triglyceride lipase
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
CDK1	cyclin-dependent kinase 1
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CKI	cyklin-dependentní kinázový inhibitor (cyclin-dependent kinase inhibitor)
CLOCK	clock circadian regulator
c-Met = HGFR	cellular Met
CNV	variabilita počtu kopií segmentů DNA (copy number variation)
CREB	cAMP response element binding protein
CYP450	cytochrom P450
DCP	des-gamma-karboxyprotrombin
DINO	damage induced noncoding
DM	diabetes mellitus
DNMT1, 3A, 3B	DNA methyltransferáza 1, 3A, 3B
dUTP	deoxy-UTP
EASL	European Association for the Study of the Liver

EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
EMT	epitelo-mezenchymální tranzice
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru (fibroblast growth factor receptors)
FOXM1	forkhead box protein M1
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GAS5	growth arrest-specific transcript 5
GEO	Gene Expression Omnibus
GPC3	glypican-3
GSK3	glykogen syntáza kináza 3
HAT	histonová acetyltransferáza
HBV	virus hepatitidy B
HBx	protein X viru hepatitidy B
HCC	hepatocelulární karcinom
HCV	virus hepatitidy C
HDAC	histonová deacetyláza
HER	human epidermal growth factor receptor
HGFR, c-Met	receptor růstového faktoru hepatocytů (hepatocyte growth factor receptor)
HH	hereditární hemochromatóza
HIF	hypoxia-inducible factor

HMT	histonová methyltransferáza
hnRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA
HULC	highly up-regulated in liver cancer
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
IGFR	receptor pro růstový faktor podobný insulinu (insulin-like growth factor receptor)
IR	insulinový receptor
JPX	JPX transcript, XIST activator (non-protein coding)
KLF2	Krüppel-like factor 2
lincRNA	mezigenová dlouhá nekódující RNA (long intergenic non-coding RNA)
lncRNA	dlouhá nekódující RNA (long non-coding RNA)
LSD1	lysine-specific histone demethylase 1
LTBP3	latent transforming growth factor β-binding protein 3
MALAT1	metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MEG3	maternally expressed gene 3
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
miRNA, miR	mikroRNA
MMP-9	matrix metaloproteináza-9
mTOR	savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
NAFLD	nealkoholové postižení jater při steatóze (nonalcoholic fatty liver disease)

NASH	nealkoholová steatohepatitida (nonalcoholic steatohepatitis)
NEAT1, 2	nuclear enriched abundant transcript 1, 2
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NKILA	NF-kappaB interacting lncRNA
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)
PCAT1, 14	prostate cancer associated transcript 1, 14
PD-1	programovaná buněčná smrt-1 (programmed cell death-1)
PDGFR	receptor destičkového růstového faktoru (platelet-derived growth factor receptor)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase)
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)
piRNA	PIWI-interagující RNA (PIWI-interacting RNA)
PRAL	p53 regulation associated lncRNA
PRC2	polycomb repressive complex 2
PRKACB	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta
PS	performance status
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVT1	plasmacytoma variant translocation 1
qPCR, RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
R	arginin

Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC-loading complex
RNAP II, III	RNA polymeráza II, III
S	serin
SAM	S-adenosyl-methionin
SCFR	receptor růstového faktoru kmenových buněk (stem cell factor receptor)
SHARP	Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol
siRNA	malá interferující RNA (small interfering RNA)
sncRNA	malá nekódující RNA (small non-coding RNA)
SNHG15	small nucleolar RNA host gene 15
snoRNA	malá jadérková RNA (small nucleolar RNA)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
snRNA	malá jaderná RNA (small nuclear RNA)
SPKHK1	sphingosine kinase 1
SRA	Sequence Read Archive
TACE	transarteriální chemoembolizace (transarterial chemoembolization)
TARE	transarteriální radioembolizace (transarterial radioembolization)
TERC	telomerázový RNA komponent (telomerase RNA component)
TERT	telomerázová reverzní transkriptáza (telomerase reverse transcriptase)

TKR	tyrozinkinázový receptor
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
UCA1	urothelial carcinoma-associated 1
UCSF	University of California San Francisco
UDP	uridin difosfát
VEGFR	receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru (vascular endothelial growth factor)
XIST	X-inactive specific transcript
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1

2 ÚVOD A CÍL

Nádory jater jsou celosvětově šestým nejčastějším typem nádorových onemocnění a třetí nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu, zejména v Africe a východní Asii. Až 85 % z těchto případů představuje hepatocelulární karcinom (HCC) (Globocan 2019; Bray et al. 2018), mezi jehož typické rizikové faktory patří jaterní cirhóza, virová hepatitida B a C, nadměrná konzumace alkoholu a metabolický syndrom (El-Serag 2011). U pacientů v časné fázi onemocnění lze provádět chirurgickou, potenciálně kurabilní, resekci jater či transplantaci jater. V pokročilém stadiu se přistupuje k cílené léčbě, která je oproti klasické systémové šetrnější pro organismus, a která využívá znalosti o signálních drahách zapojených do patogeneze HCC. Nyní jsou schváleny tři preparáty ze skupiny multikinázých inhibitorů – sorafenib, lenvatinib a regorafenib, a imunoterapeutikum nivolumab (Chen et al. 2019). Navzdory snahám o účinnou léčbu HCC však období pěti let po stanovení diagnózy přežívá asi jen 17 % pacientů, jelikož ve velké části případů jsou diagnostikováni až v pokročilé fázi nemoci (Brodeur et al. 2019). Proto je cílem mnoha studií nalezení vhodných biomarkerů, které by umožnily včasnou a detailní diagnostiku, a efektivní terapii, individualizovanou na míru pacientovi, jeho celkovému zdravotnímu stavu, schopnosti aktivace či odbourávání konkrétního léčiva a přizpůsobené vlastnostem konkrétního nádoru. Zde se v posledních letech začaly uplatňovat a v budoucnu budou dále nabývat na významu genomické či jiné komplexní přístupy.

Hlavním terčem či objektem maligní transformace u HCC jsou hepatocyty, které jsou zároveň stěžejními buňkami v biotransformaci. Řada studií popsala změny exprese cytochromů P450 (CYP), hlavních enzymů metabolizujících jak endogenní látky, tak velké množství léčiv, např. i některé tyrozinkinázové inhibitory využívané k léčbě HCC.

V posledních letech se mimo studia genetických vlivů na rozvoj onemocnění zaměřuje pozornost vědců také na vliv epigenetický. Počáteční premisa, že pouze geny kódující proteiny zastávají důležité funkce se, díky výsledkům projektu ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), ukázala být chybnou (Deng a Sui 2013). S použitím vysokokapacitních sekvenačních technik byly objeveny také nekódující transkripty, mezi něž patří malé interferující RNA (siRNA), malé jadérkové RNA (snoRNA), malé jaderné RNA (snRNA), PIWI-interagující RNA (piRNA), mikroRNA (miRNA)

a dlouhé nekódující RNA (lncRNA), z nichž největší pozornosti se dostává miRNA a lncRNA (Fernandes et al. 2019). MikroRNA jsou dlouhé 18–25 nukleotidů a většinou fungují jako negativní regulátory exprese genů, pro dlouhé nekódující RNA je charakteristická délka více než 200 nukleotidů a je známa jejich role v negativní i pozitivní regulaci genové exprese. Obě tyto skupiny se podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy a jejich deregulace často vedou ke změnám v řadě biologických procesů. U HCC jsou asociovány s proliferací, invazí, apoptózou a metastazováním nádorových buněk (Li et al. 2015a). lncRNA interagují s DNA, RNA i s proteiny, čímž mohou ovlivňovat transkripci, alternativní sestřih, stabilitu a lokalizaci proteinů a v neposlední řadě také prostřednictvím interakcí s miRNA i stabilitu mRNA. Právě interakce mezi RNA molekulami jsou v této oblasti velkým a komplexním tématem, velká část lncRNA využívá ke svému působení mechanismus navazování miRNA molekul. Nové studie ukazují taktéž na interakce lncRNA, miRNA a CYP, jejichž znalost pomáhá odhalovat provázanost biologických pochodů odehrávajících se v organismu, např. pro klinickou praxi důležité lékové interakce. Údaje o vzájemných interakcích navíc přináší velký potenciál pro identifikaci nových biomarkerů a cílů pro terapii.

Cílem této diplomové práce je rešeršní zpracování aktuálních poznatků o významu dlouhých nekódujících RNA u hepatocelulárního karcinomu včetně souvislostí s biotransformačními enzymy a mikroRNA.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Játra a hepatocelulární karcinom

Játra jsou největším orgánem a žlázou lidského těla, s průměrnou hmotností 1,5 kg. Jsou uložena v pravé horní části dutiny břišní v těsné blízkosti bránice, ke které je fixuje vazivové pouzdro, jež zároveň celá játra pokrývá. Játra jsou anatomicky rozdělena na dva laloky. Základní funkční a stavební jednotkou je jaterní lalůček, který je tvořen trámci jaterních buněk (hepatocytů). Prostřednictvím *vena portae* do nich proudí krev obsahující nutrienty, toxické látky a střevní mikroorganismy. Jaterní tkáň tak zastává celou řadu pro organismus nepostradatelných funkcí – metabolismus proteinů, sacharidů, lipidů, dusíkatých sloučenin, tvorbu bílkovin, podílí se na obraně před mikroorganismy, má významnou detoxikační funkci (Wilhelm a Hegyi 2007; Hůlek a Urbánek 2018).

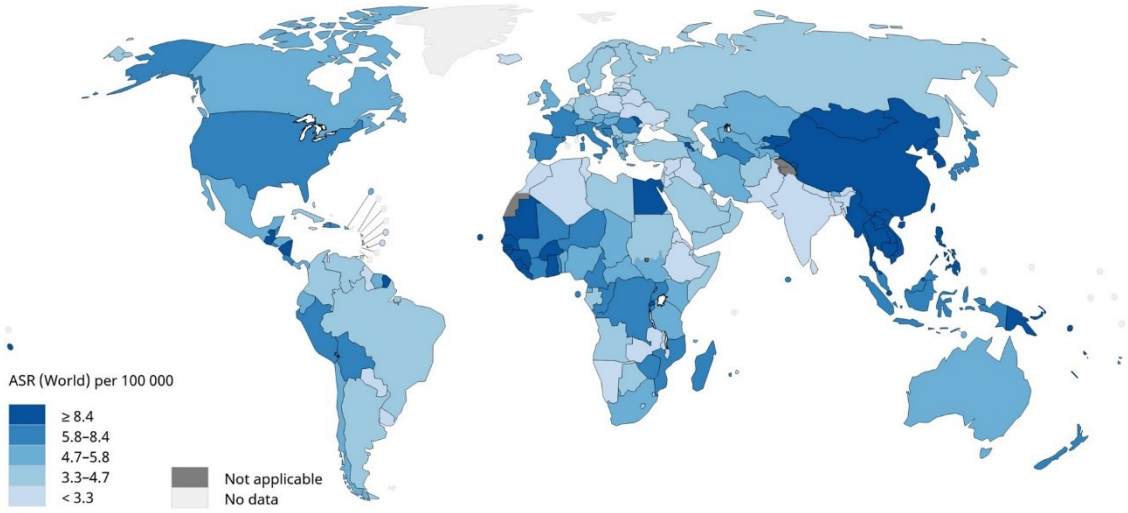
Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastějším typem primárních maligních nádorů jater (tvoří asi 75–85 % z nich), druhým nejfrekventovanějším je pak cholangiocelulární karcinom (10–15 %) (Bray et al. 2018). HCC bývá obvykle konečným důsledkem markantního poškození jaterního parenchymu, ať už např. vlivem virových infekcí, abúzu alkoholu, či dalších faktorů (viz kapitolu 3.4). Maligní transformace však může trvat i 20–30 let a diagnóza je u pacientů ve většině případů určena až v pozdní fázi onemocnění. Tento fakt značně přispívá k výši mortality, která se v rámci nádorových onemocnění řadí k jedněm z nejvyšších (Karin a Dhar 2016).

3.2 Epidemiologie

Počet případů nádorových onemocnění každoročně narůstá. V roce 2018 bylo dle GLOBOCAN databáze (projekt Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny – International Agency for Research on Cancer (IARC)) zachyceno přes 18 milionů nových onkologických pacientů a přes 9 a půl milionu úmrtí na rakovinu. Nejčastěji diagnostikovanými typy jsou nádory plic, prsu a kolorekta. Nádorům jater patří šesté místo.

Za rok 2018 bylo celosvětově zaznamenáno 841 080 nových případů nádorů jater, s počtem 781 631 jsou pak jaterní malignity třetí nejčastější onkologickou příčinou úmrtí (Globocan 2019). Jak již bylo zmíněno, nejčastějším typem primárních jaterních nádorů je HCC, který je zodpovědný až za 85 % z nich (Bray et al. 2018).

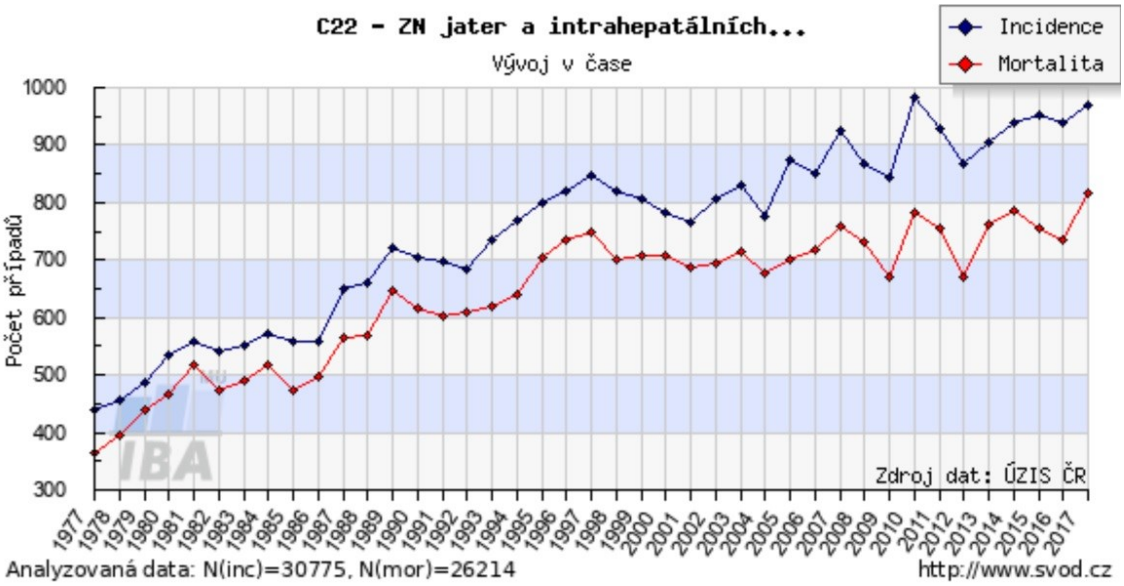
Globálně lze ve výskytu pozorovat značné geografické rozdíly, a to především z důvodu různé doby a úrovně expozice rizikovým faktorům a kvůli odlišnostem v úrovni a dostupnosti lékařské péče napříč zeměmi. Největší podíl na celkovém počtu případů mají méně vyspělé země. Jedná se zejména o oblast sub-saharské Afriky (nejvíce Egypt (32,2 na 100 000), Gambie (23,9) a Guinea (21,8)) a východní Asie (Mongolsko (93,7), Kambodža (21,8) a Vietnam (23,2)) (Yang et al. 2019b; Bray et al. 2018; IARC 2018). I věk, kdy dochází k propuknutí nemoci a medián doby přežití jsou v různých zemích odlišné. Ve věku nad 60 let je HCC většinou diagnostikován v Severní Americe, v zemích Evropy a v Japonsku, naopak v Africe a Asii je to nejčastěji již mezi 30.–60. rokem života. Nejkratší dobu přežití mají pacienti v sub-saharské Africe, a to průměrně 2,5 měsíců. Rovněž i zde hraje zásadní roli dostupnost a kvalita zdravotní péče a taktéž neexistence screeningových programů a limitované možnosti léčby. Více než 60 % pacientů v Severní Americe, Evropě, Koreji a Číně je diagnostikováno ve středně pokročilém či pokročilém stadiu HCC. Nejlepších výsledků při léčbě dosahují kliniky v Japonsku a na Taiwanu, kde se velmi dbá na dodržování prevence a více než 70 % případů HCC je zachyceno již v časné fázi (Yang et al. 2019b).



Obr. 1 ***Globální incidence jaterních nádorových onemocnění****. Rok 2018, obě pohlaví. Dostupné z: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map*

Česká republika se vyznačuje nízkou incidencí jaterních nádorových onemocnění (4,2 na 100 000 obyvatel pro rok 2018), tento typ rakoviny zaujímá až 20. místo ze všech malignit. Tak jako ve většině zemí světa však můžeme i zde pozorovat vzestupný trend v incidenci. Od roku 1977, kdy bylo hlášeno 438 nemocných, se počet

případů vyšplhal na číslo 968 v roce 2017, následující rok bylo diagnostikováno až 1063 nových pacientů – z toho 679 mužů a 384 žen. Nejčastěji bývá diagnóza stanovena ve věku 60+ (Dušek et al.).



Obr. 2 ***Trend incidence a mortality u nádorů jater a intrahepatálních žlučových cest od roku 1977 do roku 2017****. Počty případů jsou uvedeny na 100 000 obyvatel. Dostupné z: https://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#*

3.3 Klinické příznaky

Manifestace HCC se může lišit v závislosti na aktuální míře poškození jater a jejich funkčnosti. U pacientů s jaterní cirhózou, u nichž dojde k dekompenzaci, je třeba pamatovat na možnost HCC. V tomto případě bývá typickým příznakem ikterus a jaterní encefalopatie, taktéž ascites nebo krvácení z jícnových varixů. Necirhotičtí pacienti většinou neabsolvují na rozdíl od cirhotiků pravidelná preventivní vyšetření na HCC, diagnostikováni bývají v pozdějších stadiích onemocnění, tudíž má nádor více času pro svůj růst. Symptomy zahrnují pocit vyčerpanosti, nauzeu, anorexii, bolest v horní části břicha, pohmatem patrnou hepatomegalii (Bialecki a Di Bisceglie 2005).

3.4 Rizikové faktory

Až v 90 % případů vzniká hepatocelulární karcinom na podkladu cirhózy a chronických jaterních onemocnění. Nejmarkantnějšími rizikovými faktory HCC jsou virová hepatitida B (HBV), hepatitida C (HCV) a alkoholová cirhóza jater. Na vzniku onemocnění se může podílet také nealkoholová steatohepatitida (NASH), méně často vrozená hemochromatóza či porfyrie, rovněž je známa asociace HCC s expozicí aflatoxinům (El-Serag a Rudolph 2007; European Association for the Study of the Liver 2018).

3.4.1 Hepatitida B

Chronickou hepatitidou B trpí asi 257 milionů lidí po celém světě (Yang et al. 2019b). HBV je etiologickým agens více než poloviny případů HCC, a to zejména v zemích východní Asie a Afriky (European Association for the Study of the Liver 2018), kde se přenáší většinou z matky na dítě, tedy vertikálně. Téměř 80 % pacientů s chronickou hepatitidou B trpí taktéž cirhózou. HBV má však vlastní tumorigenní potenciál – DNA viru je schopna začlenit se do hostitelského genomu a potencovat karcinogenezi bez potřeby fibroticky změněné tkáně (El-Serag 2011; Fujiwara et al. 2018).

Riziko HCC je u HBV pozitivních jedinců o to výraznější, pokud jsou vyššího věku, mužského pohlaví, infikováni již delší dobu, pokud mají HCC v rodinné anamnéze. Signifikantní je u těchto pacientů také alkoholismus a vystavení aflatoxinům. Z HBV genotypů se ukázaly být nejnebezpečnějšími z hlediska rozvoje HCC genotypy C (nejprevalentnější v Asii) a F (zejména Aljaška) (El-Serag 2011; Fujiwara et al. 2018).

3.4.2 Hepatitida C

Ročně se virem hepatitidy C nakazí na 170 milionů lidí, většinou se tak děje prostřednictvím krve a krevních derivátů (El-Serag a Rudolph 2007). HCV je vedoucím virovým původcem HCC v Evropě, Severní Americe, ale také v Japonsku, Mongolsku a v Egyptě (Yang et al. 2019b). Pravděpodobnost vzniku HCC u nemocných zvyšuje 15-20krát, a to podporou fibrotizace a následné progrese k cirhóze jater (El-Serag a Rudolph 2007; Jindal et al. 2019).

Vyššímu riziku rozvoje HCC napomáhá stejně jako v případě HBV infekce pokročilý věk pacienta, mužské pohlaví a pokud byl člověk nakažen v pozdějším věku.

Dalšími rizikovými faktory jsou koinfekce HBV, HIV a taktéž obezita či diabetes mellitus (DM) (El-Serag 2011).

3.4.3 Alkoholová cirhóza jater

Dlouhodobá nadměrná konzumace alkoholu může vést k jaterní cirhóze a následně tedy i k nádoru jater. Alkoholismus je tak jedním ze spouštěcích faktorů hepatocelulárního karcinomu, v Evropě a USA je jaterní cirhóza alkoholové etiologie dokonce druhým nejčastějším rizikovým faktorem vzniku HCC (Yang et al. 2019b). Podle metaanalýzy Turati et al. (2014) existuje souvislost mezi požívanou dávkou a mírou rizika onemocnění – při konzumaci třech či více alkoholických nápojů denně zaznamenali autoři 16% nárust rizika rakoviny jater oproti nekonzumentům. Alkohol se může na hepatokarcinogenezi podílet jak cestou nepřímou (přeměnou zdravé jaterní tkáně na cirhotickou), tak cestou přímou. Při oxidaci ethanolu vzniká acetaldehyd, prokázaný kancerogen. Během metabolismu se tvoří také kyslíkové radikály (ROS), které vedou k peroxidaci lipidů, jež jsou poté schopny modifikace proteinů a DNA (Na a Lee 2017). Souběžná virová (HBV, HCV) či metabolická (obezita, diabetes mellitus 2. typu) onemocnění vykazují při abúzu alkoholu synergický efekt a stávají se tak ještě významnějšími rizikovými faktory (Testino et al. 2014; Fujiwara et al. 2018).

3.4.4 Metabolický syndrom a NASH/NAFLD

Metabolický syndrom představuje v dnešní době velmi závažný globální zdravotní problém. Tuto diagnózu lze vyslovit, pokud jsou splněna alespoň tři z následujících kritérií:

Tab. 1 ***Diagnostická kritéria metabolického syndromu*** *(Hůlek a Dresslerová 2015)*

Sérový HDL cholesterol	< 1 mmol/l (muži)	< 1,3 mmol/l (ženy)
Obvod pasu	> 94 cm (muži)	> 80 cm (ženy)
Sérové triglyceridy	> 1,7 mmol/l	
Krevní tlak	> 130/85 mmHg	
Glukóza – nalačno	> 5,6 mmol/l	
	anebo DM 2. typu	

Překročení těchto hodnot u pacienta odpovídá klinickému obrazu zahrnujícímu hyperlipoproteinémii, nadváhu, arteriální hypertenzi, diabetes 2. typu a z toho vyplývající rozvoj jaterní steatózy (stav, kdy je tukem poškozeno více než 5 %

hepatocytů). Steatóza je sama o sobě reverzibilní, pokud však přejde vlivem zánětu do další fáze, nealkoholové steatohepatitidy (NASH – nonalcoholic steatohepatitis), pak jde již o stav nevratný, který prostřednictvím fibrotizace může vyústit v cirhózu, a tedy až v hepatocelulární karcinom. Tyto procesy jsou souhrnně označovány pojmem NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease, lze přeložit jako nealkoholové postižení jater při steatóze), což je vlastně jaterní manifestací metabolického syndromu (Hůlek a Dresslerová 2015).

3.4.5 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou hepatokarcinogenně působící mykotoxiny produkované houbami rodu *Aspergillus*, které často kontaminují potraviny – především kukuřici, skořápkové plody a sušené ovoce. Nejtoxičtějším typem je aflatoxin B1 (AFB1), tvořený druhy *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* (Jindal et al. 2019). Incidence intoxikace aflatoxiny je nejvyšší v západní části Afriky (hodnoty přesahují 90 %), nejnižší naopak v zemích západního světa, kde je skladování potravin na lepší úrovni.

AFB1 je v organismu metabolizován na epoxid, který se váže na DNA a způsobuje její poškození. Za charakteristický znak jaterního karcinomu způsobeného aflatoxiny lze považovat mutaci v kodonu 249 v tumor supresorovém genu *TP53*. Jedná se o jednonukleotidovou substituci (AGG → AGT) odpovídající v proteinu přeměně argininu (R) na serin (S). Tato R249S mutace se jen zřídka vyskytuje u nádorových onemocnění jiných než HCC a většina případů je zaznamenána v zemích s vysokým nutričním příjmem aflatoxinů. Velmi problematická je taktéž kombinace aflatoxinů s hepatitidou B, v jejímž důsledku je riziko rakoviny 30násobně vyšší (Kucukcakan a Hayrulai-Musliu 2015; Yang et al. 2019b).

3.4.6 Hemochromatóza

Hereditární hemochromatóza (HH), autosomálně recesivní onemocnění charakterizované střádáním železa v organismu, je také jedním z rizikových faktorů HCC. Ukládání železa omezuje správnou funkci jater, což může vést k cirhóze a následně k jaterními karcinomu. Hemochromatóza zvyšuje riziko HCC asi 20krát (Rawla et al. 2018).

3.4.7 Další faktory

Vyšší výskyt a taktéž mortalita jsou zřejmé u mužů, a to z důvodu vyšší koncentrace testosteronu, který je považován za pozitivní regulátor buněčného cyklu

hepatocytů, resp. regulátor cyklinu E, při přechodu z G1 fáze do S fáze cyklu (Pok et al. 2016). Také je známo, že kouření cigaret zvyšuje riziko vzniku HCC. V metaanalýze Baecker et al. (2018) autoři zjistili, že celosvětově má asi 13 % případů nádorů jater přímou souvislost s kouřením tabáku, častěji se tato skutečnost týká mužů.

3.5 Genetické mechanismy vzniku hepatocelulárního karcinomu

Metoda sekvenování nové generace (NGS, next generation sequencing) umožnila více porozumět molekulární podstatě mnoha onemocnění, HCC nevyjímaje. Odhalila a odhaluje klíčové body karcinogeneze a díky těmto znalostem rovněž vede k vývoji cílených léčiv, a tedy i k lepším výsledkům při léčbě pacientů (Zucman-Rossi et al. 2015). Díky NGS již bylo k dnešnímu dni odhaleno množství genetických i epigenetických změn (viz kapitolu 3.6), podílejících se na procesu vzniku HCC (Dhanasekaran et al. 2016). Následující kapitoly stručně popisují nejvýznamnější z nich.

3.5.1 Udržování délky telomer

Telomerami jsou nazývány sekvence v koncových částech chromozomů chránící je během buněčného dělení před zkrácením na kritickou délku. Telomerázy jsou enzymy, které udržují správnou délku telomer a v případě potřeby jsou schopny chybějící telomerickou DNA dosyntetizovat. Jedná se o komplexy tvořené telomerázovou reverzní transkriptázou (TERT) a telomerázovým RNA komponentem (TERC). Chronicky nemocná játra reagují masivní tvorbou nových hepatocytů, čímž dochází k rapidnímu zkracování telomer. Buňky stárnou, podléhají apoptóze, játra tak ztrácejí schopnost regenerace a přestávají být odolná k fibróze a cirhóze. Za fyziologického stavu je exprese telomerázy ve zralých hepatocytech potlačena. Při mutaci v enzymu však může dojít k jeho reaktivaci, která vede k nekontrolované buněčné proliferaci a maligní transformaci buněk. Ve více než 90 % případů HCC jsou nalézány mutace právě v telomerázovém komplexu – nejčastěji jde o mutace TERT promotoru (54–60 %), dále integrace HBV DNA do TERT promotoru (10–15 %) a TERT amplifikace (5–6 %) (Zucman-Rossi et al. 2015; Dhanasekaran et al. 2016).

3.5.2 TP53

Tumor supresorový gen *TP53* je u HCC rovněž častým terčem mutací. Jeho protein p53 je důležitým regulátorem buněčného cyklu, za normálních okolností je v případě destrukce poškozených buněk nebo potřeby jejich reparace schopen zástavy cyklu. Inaktivace p53 vede k nekontrolovanému buněčnému dělení. Mutace p53 se týká asi 12–48 % pacientů s HCC a je spojena s větší pravděpodobností vzniku méně diferencovaného HCC s vaskulární invazí (Dhanasekaran et al. 2016; Couri a Pillai 2019).

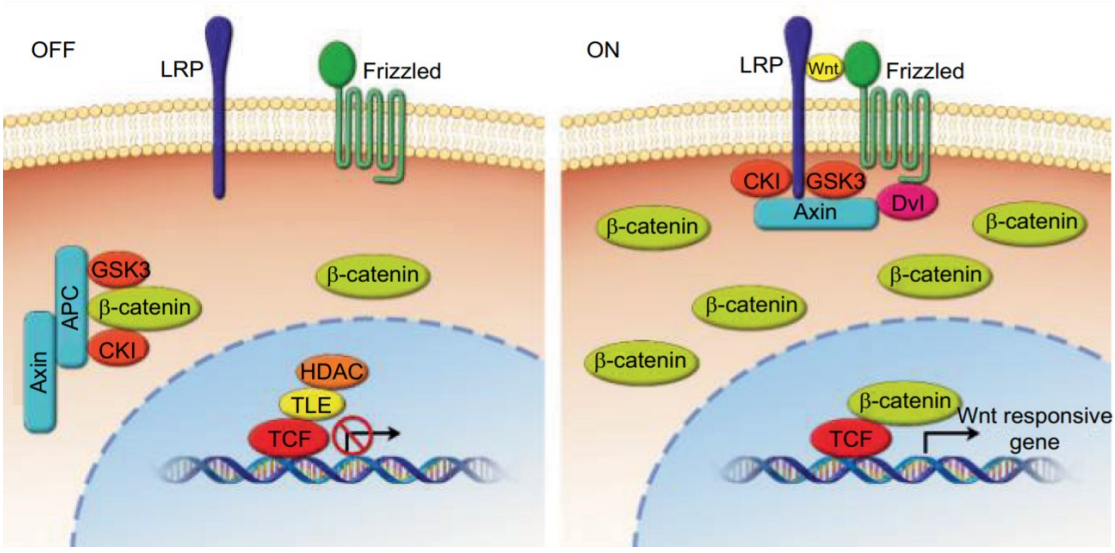
3.5.3 Signální dráhy

3.5.3.1 Wnt/β-katenin cesta

Wnt signální dráha hraje zásadní roli během embryonálního vývoje při buněčné proliferaci, diferenciaci, a při angiogenezi, také se podílí na tkáňové homeostáze. Zahrnuje cestu kanonickou (β-katenin dependentní) a nekanonickou (β-katenin nezávislá).

Wnt cesta je zahájena navázáním extracelulárních Wnt ligandů na membránové Frizzled receptory, které následně pošlou signál k uvolnění β-kateninu z proteazomového komplexu (APC protein, axin, glykogen syntáza kináza 3 (GSK3), cyklin-dependentní kinázový inhibitor (CKI)). V cytoplazmě nahromaděný β-katenin vstupuje do jádra, váže se na transkripční faktor a následně je schopen regulace transkripce cílových genů.

Mutace v *CTNNB1*, genu kódujícím β-katenin, může způsobit rezistenci β-kateninu k degradaci proteatozomovým komplexem. Stejně tak jsou již známy i mutace členů komplexu, vedoucí ke ztrátě jejich funkce a k hromadění β-kateninu v cytoplazmě a následné nadměrné onkogenní transkripci. *AXIN1* mutace se objevuje u 3–16 % případů a mutace *AXIN2* u 3 % všech případů HCC. Mutace *CTNNB1* byla zaznamenána v 11–46 % případech hepatocelulárního karcinomu (Khalaf et al. 2018; Couri a Pillai 2019).



Obr. 3 ***Přehled Wnt/β-katenin signální dráhy.*** *V klidovém stavu je β-katenin vázán v proteazomovém komplexu, který zprostředkovává jeho degradaci. Při dostatku Wnt se spouští signální kaskáda, vedoucí ke kumulaci β-kateninu v cytoplazmě a následně v jádře, kde reguluje transkripci (Khalaf et al. 2018).*

3.5.3.2 Tyrozinkinázové receptory

Tyrozinkinázové receptory (TKR) se účastní regulace buněčného růstu, migrace, diferenciace a metabolismu. Jsou to membránové receptory vážící hormony, růstové faktory, cytokiny a další molekuly. Patří mezi ně mimo jiné receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), receptor fibroblastového růstového faktoru (FGFR), insulinový receptor (IR) a receptor pro růstový faktor podobný insulinu (IGFR), receptor destičkového růstového faktoru (PDGF), receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGFR), receptor růstového faktoru hepatocytů (HGFR) a protoonkogenní c-KIT (receptor růstového faktoru kmenových buněk (SCFR)/CD117) (Regad 2015). Po jejich aktivaci dochází ke spuštění signálních drah PI3K/AKT/mTOR a Ras/Raf/MEK/ERK, dysregulace na některé úrovni těchto kaskád je spojena se vznikem mnoha onemocnění, zejména rakovinou (Couri a Pillai 2019).

EGF/EGFR

Skupina receptorů epidermálního růstového faktoru (HER) čítá čtyři členy, HER1 (EGFR/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4), jejichž nadměrná exprese byla zaznamenána u řady nádorových onemocnění (např. u karcinomu hlavy, pankreatu, žaludku, prostaty, ledvin a vaječníků). EGFR se podílí na regulaci fyziologického růstu buněk. Jeho nadměrná exprese je pozorována zejména u rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu a taktéž u HCC, míra exprese koreluje s agresivností nádoru. Incidence mutací EGFR se u HCC pohybuje mezi 4–66 % případů (Masopust 2006; Couri a Pillai 2019).

VEGF/VEGFR, PDGFR, FGFR

Pro svůj růst a pro schopnost metastazování potřebuje nádor cévní zásobení. V angiogenezi je zapojeno několik faktorů – angiopoetin, FGF, PDGF a VEGF, zejména pak VEGF působící na receptor 2 (VEGFR2). FGF a PDGF se podílí taktéž na regulaci buněčného růstu a invazi, angiogeneze se účastní především v reakci na anti-VEGF terapii, kdy na potlačení novotvorby cév reagují nádorové buňky nadexpresí VEGF a posléze i FGF a PDGF. Jejich nadměrná exprese je v přímém vztahu se zvýšenou tvorbou metastáz a s celkově horší prognózou HCC (Masopust 2007; Kudo 2012).

HGF/c-Met cesta

HGF je cytokin vázající se s vysokou afinitou na receptor c-Met (cellular Met; HGFR). Tato signální dráha zprostředkovává růst nádoru, jeho invazi, migraci a angiogenezi. Nadprodukci HGF lze zaznamenat asi u 33 % případů HCC, zvýšenou expresi c-Met u 20–48 % případů HCC (Venepalli a Goff 2013).

IGF/IGFR

Tvorba IGF1 a IGF2 je stimulována růstovým hormonem z adenohypofýzy. IGF1 fyziologicky reguluje buněčný růst a apoptózu během postnatálního vývoje a IGF2 růst plodu a vývoj placenty. V karcinogenezi apoptózu potlačují a mají vliv na nekontrolovanou proliferaci buněk a metastazování nádoru (Adamek a Kasprzak 2018).

3.5.3.3 MAPK signální dráha (Ras/Raf/MEK/ERK)

Signální kaskáda MAPK (mitogen-activated protein kinase) se skládá ze čtyř klíčových proteinkináz – Ras (rat sarcoma), Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma), MEK (mitogen-activated protein kinase) a ERK (extracellular signal-regulated kinase). Zodpovídá za správnou regulaci buněčné proliferace, diferenciace a přežívání. Kaskádu může spustit navázání např. růstových faktorů (EGFR, VEGFR, PDGFR) či hormonů na tyrozinkinázový receptor (Yang a Liu 2017). Na membránu vázaný Ras je v klidovém stavu ve formě Ras-GDP, po navázání ligandu na receptor přechází do aktivovaného stavu Ras-GTP. Ten poté fosforylací zahajuje kaskádovité aktivování dalších členů dráhy – Raf, MEK a ERK – což vede k aktivaci transkripčních faktorů v jádře vedoucí k mitogenezi (Yang a Liu 2017).

Mutace v protoonkogenu Ras jsou nejčastější u karcinomu pankreatu, kolorekta a štítné žlázy (Asati et al. 2016). Z jeho izoforem je nejčastěji mutována izoforma K-Ras, u HCC je však incidence pouze kolem 1 % (Chen et al. 2019). Stejně tak jsou vzácné i mutace v genu pro serin/threoninové kinázy Raf, byly ale zaznamenány případy hyperaktivace wild-type Raf (Kudo 2012).

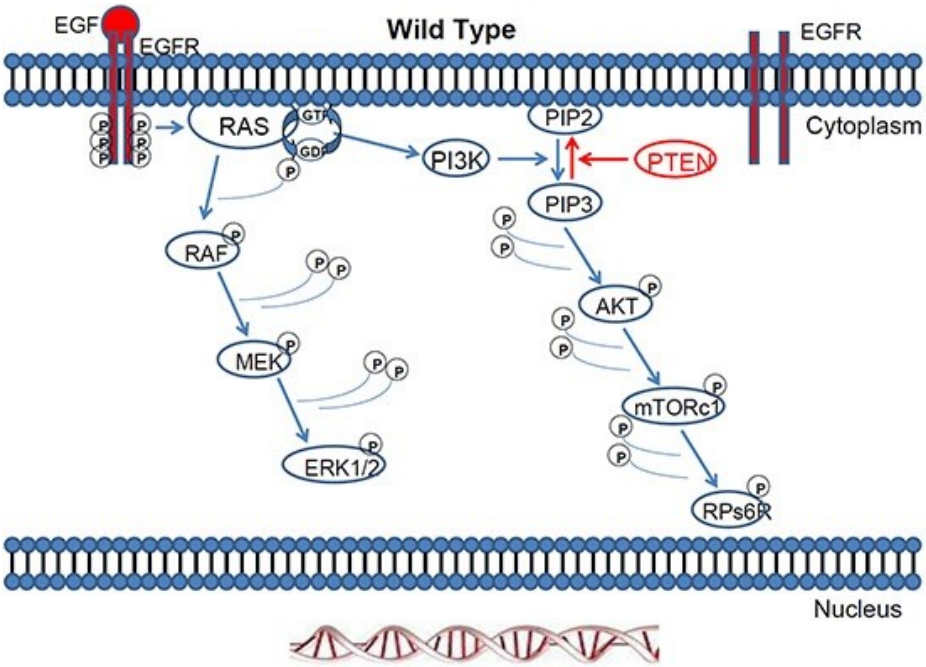
3.5.3.4 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR

Signální kaskáda PI3K/Akt/mTOR má klíčový význam při metabolismu, růstu a přežívání buněk, reguluje transkripci, průchod buněčným cyklem a translaci, má vliv na maligní transformaci buněk navozenou onkogeny nebo tumor supresorovými geny, na neovaskularizaci a tvorbu metastáz (Masopust 2006). Aktivována může být např.

růstovými faktory (VEGF, PDGF, EGF), hormony, ale reaguje i na stres a množství kyslíku ve vnějším prostředí. Je zahájena navázáním některého z ligandů na membránový receptor. PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) následně fosforyluje membránový fosfolipid PIP_2 (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát) na PIP_3 (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát), který se váže na serin/threoninovou kinázu Akt (proteinkináza B) a aktivuje ji. Akt přenáší signál dále na molekulu mTOR (savčí cíl rapamycinu – mammalian target of rapamycin; serin/threonin kináza), stěžejní regulátor celé signální kaskády reagující na nutrienty potřebné pro dělení buněk. Dráha pokračuje syntézou proteinů, které zprostředkovávají jednak translaci např. proteinů HIF (hypoxia-inducible factor) a c-Myc a cyklinu D1, což má v konečném důsledku nadměrnou tvorbu růstových faktorů (VEGF, PDGF, EGF), jednak translaci proteinů potřebných pro postup buňky z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu (Študentová a Melichar 2010; Kudo 2012).

PI3K je negativně regulována produktem tumor supresorového genu PTEN (phosphatase and tensin homolog), který defosforyluje PIP_3 na PIP_2 a ve fyziologickém stavu tak udržuje výše popsané procesy v normě. Inaktivace PTEN vyvolaná mutací či epigenetickou modifikací je jedním z nejčastějších patologických spouštěčů dráhy (Študentová a Melichar 2010). Dalšími známými příčinami hyperaktivace PI3K cesty jsou mutace v Ras a nadměrná exprese receptorů růstových faktorů (Karar a Maity 2011; Kudo 2012).

Vzhledem k významnosti mTOR jako regulátoru, jsou jeho deregulace častým příspěvkem v karcinogenezi HCC – bylo zjištěno, že se deregulace jeho a dalších molekul v kaskádě týká asi 40–50 % případů HCC a že je často spojena s nižším stupněm diferenciace nádoru, jeho časnou rekurencí a horší prognózou (da Motta Girardi et al. 2018).



Obr. 4 ***Signální dráhy Ras/Raf/MEK/ERK a PI3K/Akt/mTOR*** *(Oikonomou et al. 2014)*

3.6 Epigenetické alterace u hepatocelulárního karcinomu

Epigenetické změny jsou dědičné reverzibilní modifikace chromatinu a DNA, ovšem nezasahující do nukleotidové sekvence DNA (Csoka a Szyf 2009). Regulují expresi genů pomocí methylace DNA, modifikace histonů, remodelace chromatinu a také prostřednictvím interakcí s proteiny nekódujícími molekulami RNA (Ho et al. 2016).

K epigenetickým alteracím může docházet vlivem stárnutí, virových infekcí či chronických zánětlivých procesů. Mutace na těchto úrovních jsou taktéž často asociovány s nádorovým bujením, v posledních letech se mimo vlivu patologické methylace DNA a modifikace histonů na progresi HCC hovoří také o asociaci s aktivitou nekódujících RNA – mikroRNA (miRNA) a dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) (Saito et al. 2014; Dai et al. 2020).

3.6.1 Methylace DNA

Při methylaci DNA je přenášena methylová skupina z S-adenosyl-methioninu (SAM) na cytosinovou bázi CpG dinukleotidu (cytosin-fosfát-guanin). Jde o enzymatickou reakci katalyzovanou DNA methyltransferázami DNMT1 (methylace hemimethylovaných CpG dinukleotidů), DNMT3A a DNMT3B (methylace *de novo*). CpG dinukleotidy jsou kumulovány v tzv. CpG ostrůvcích – krátkých oblastech

bohatých na CpG, pokrývajících více než 50 % všech promotorů (Holčáková 2018; Toh et al. 2019).

Na methylační status DNA má vliv stres, kouření, dieta, působení xenobiotik a také stárnutí organismu, při němž se celková methylace DNA snižuje a v CpG ostrůvcích naopak zvyšuje (Skálová 2017). Aberantní methylace DNA je častým jevem u nádorových onemocnění, a to včetně HCC. Globální hypomethylace se týkají nekódujících oblastí (repetitivní sekvence, introny a retrotranspozony) a mají za následek genetickou a chromozomální nestabilitu, hypermethylace promotorových částí způsobují umlčování tumor supresorových genů (Saito et al. 2014; Dhanasekaran et al. 2016).

3.6.2 Modifikace histonů a remodelace chromatinu

Chromatin je DNA a proteiny zahrnující struktura, spiralizující až do podoby chromozomu. Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleosom tvořený oktamerovým jádrem histonů, obtočeným 147 bp dlouhým segmentem DNA. Uplatňují se zde čtyři typy histonových proteinů – H3, H4, H2A a H2B. Histony jsou bazické proteiny, jejichž z jádra vyčnívající konce s aminokyselinovými zbytky (zejm. lysinu a argininu) podléhají posttranskripčním úpravám (Audia a Campbell 2016).

Modifikace histonů má zásadní roli v regulaci struktury chromatinu. Ten v reakci na tyto změny dynamicky přechází z transkripčně aktivního euchromatinu na vysoce kondenzovaný transkripčně neaktivní heterochromatin a obráceně (Skálová 2017). V závislosti na konkrétním typu modifikace a histonovém zbytku, jenž se této přeměny účastní, vedou modifikace k aktivaci, anebo represi transkripce. Modifikace jsou zprostředkovávány enzymy methylujícími a acetylujícími lysinové a argininové zbytky, fosforylujícími serinové a threoninové zbytky či ubikvitinujícími zbytky lysinu. V těchto procesech se uplatňují např. histonové acetyltransferázy (HAT), deacetylázy (HDAC) a methyltransferázy (HMT) (Liu et al. 2014; Dhanasekaran et al. 2016).

Acetylace histonů snižuje pozitivní náboj lysinových zbytků, čímž zeslabuje interakci histonů s negativně nabitou DNA, chromatin se stává méně kondenzovaným a umožňuje tak přístup transkripčním faktorům (Toh et al. 2019). Acetylace histonů, např. acetylace lysinu 9 a 27 na histonu H3 (H3K9ac a H3K27ac), je tedy spojena s aktivací genů, deacetylace naopak s tlumením genové exprese. Nerovnováha mezi těmito stavy a mezi aktivitou HAT a HDAC může vést k progresi různých onemocnění

– kupříkladu kardiovaskulárních či nádorových, vč. HCC (Skálová 2017; Dai et al. 2020).

Na rozdíl od acetylace histonů může mít jejich methylace účinek jak transkripci aktivující, tak inhibující. V transkripčně aktivních genových promotorech bývá např. zvýšená trimethylace lysinu 4 na histonu H3 (H3K4me3) a trimethylace lysinu 36 na tomtéž histonu (H3K36me3). V promotorových oblastech s tlumenou transkripcí jsou naproti tomu přítomny trimethylace H3K9 (H3K9me3), H3K27 (H3K27me3) a H3K20 (H3K20me3) (Nakamura et al. 2019; Toh et al. 2019). Studie He et al. (2012) prokázala korelaci zvýšené hodnoty trimethylovaného H3K4 s horší prognózou HCC a se zkrácením doby přežívání pacientů. Výsledky výzkumu Cai et al. (2011) ukázaly, že nadměrná exprese H3K27me3 podporuje agresivnější expanzi nádoru, zejm. vaskulární invazi HCC.

3.6.3 Nekódující RNA

Jen 2 % sekvencí DNA lidského genomu kódují proteiny, avšak více než 90 % je transkripčně aktivních. V roce 2012 zjistili vědci při mezinárodním projektu ENCODE (ENCyklopedia Of DNA Elements), že do té doby přezdívaná tzv. odpadní DNA má taktéž svou nezastupitelnou funkci, a to na úrovni RNA. Tyto nekódující RNA jsou významnými regulátory genové exprese a podle délky se rozdělují na malé nekódující RNA (sncRNA; 18–200 nukleotidů) a dlouhé nekódující RNA (lncRNA; více než 200 nukleotidů) (Deng a Sui 2013; Romano et al. 2017). V souvislosti s HCC stojí v popředí zájmu studium molekul mikroRNA a lncRNA, o molekulách lncRNA pojednává samostatná kapitola (viz kapitolu 3.11).

3.6.3.1 MikroRNA

MikroRNA (miRNA, miR) patří mezi malé nekódující RNA. Jsou to jednořetězcové molekuly RNA, jejichž délka se pohybuje mezi 18–25 nukleotidy. Působí nejčastěji jako negativní regulátory genové exprese (Deng a Sui 2013; Votavová a Brdička 2016).

V jádře jsou geny miRNA transkribovány prostřednictvím RNA polymerázy II na primární dlouhé transkripty pri-miRNA. Ribonukleáza Drosha následně tyto transkripty štěpí na vlásenkové prekurzorové pre-miRNA. Po transportu do cytoplazmy je pre-miRNA dále štěpena pomocí endonukleázy Dicer za vzniku duplexní miRNA. Jedno z vláken se inkorporuje do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex).

V této podobě je pak miRNA schopna vázat se na 3' nepřekládanou oblast (3' UTR) cílové mRNA a v případě úplné komplementarity ji degradovat, při komplementaritě neúplné inhibovat translaci této mRNA (Votavová a Brdička 2016).

Z důvodu stále přibývajících nově identifikovaných miRNA vzniklo již několik databází, z nichž nejpoužívanější je miRBase (*www.mirbase.org*). Jde o katalog zahrnující informace o dosud objevených miRNA u 271 organismů. Aktuálně, v únoru 2020, obsahuje miRBase data o 1917 prekurzorových vlásenkách miRNA a 2654 zralých molekulách miRNA u člověka (miRBase).

Role mikroRNA v onkogenezi a u hepatocelulárního karcinomu

miRNA regulují expresi asi dvou třetin lidských genů. Jedna molekula miRNA může regulovat expresi více než 200 cílových genů a zároveň daná cílová mRNA může být regulována více molekulami miRNA (Friedman et al. 2009; Fang et al. 2017). miRNA prostřednictvím tlumení exprese genů regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu, mohou se podílet na rozvoji a progresi nádoru, jeho metastazování a také ovlivňovat léčebnou odpověď organismu (Deng a Sui 2013; Nagy et al. 2018). Přímá souvislost miRNA s onkogenezí u člověka byla prokázána teprve v roce 2002 ve studii Calin et al., která zjistila, že miR-15a a miR-16-1 působí jako tumor supresorové geny u chronické lymfocytární leukemie, kdy jsou často deletovány nebo je snížena jejich exprese.

Ve vztahu k maligní transformaci lze rozlišovat onkogenní miRNA (cílí na tumor supresorové geny) a tumor supresorové miRNA (interagující s onkogeny). Toto rozdělení však nelze považovat za absolutní, neboť jedna konkrétní miRNA může být jak onkogenem, tak nádorovým supresorem, v závislosti na typu nádoru (Ling et al. 2017). Role miR-34 jako tumor supresoru, a tedy jeho snížená exprese, byla zaznamenána u rakoviny prsu, plic, ledvin, žaludku, prostaty, tlustého střeva a konečníku, taktéž u HCC (Imani et al. 2018). Nízká exprese miR-374a je spojena s kratší dobou přežívání pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Zvýšená exprese miR-185 a naopak snížená exprese miR-133b u kolorektálního karcinomu jsou asociovány s větším rizikem metastazování nádoru a s kratší dobou přežívání (Nagy et al. 2018). Intenzivně studovaným je také klastr miR17-92, který zahrnuje miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b a miR-92a, a jehož expresi potencuje onkogen c-Myc. Zvýšená exprese tohoto klastru je pozorována u celé řady nádorových onemocnění,

především u karcinomu plic, pankreatu, prsu, prostaty, u lymfomů (Fang et al. 2017) a taktéž u HCC, kdy např. Connolly et al. (2008) zaznamenali nadexpresi klastru u 100 % lidských vzorků.

Aktivity miRNA zapojených v onkogenezi HCC ovlivňují proliferaci, invazi, metastazování, apoptózu, angiogenezi a rezistenci vůči podávaným lékům. Prostřednictvím kontroly buněčného cyklu jsou kupříkladu miR-1468, miR-98, miR-195, miR-506 a miR-1299 zapojeny v regulaci buněčné proliferace a apoptózy (Xu et al. 2018). miR-1468 podporuje přechod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu a necitlivost k signálům pro apoptózu, u HCC byla zaznamenána její zvýšená exprese (Liu et al. 2018b). MiR-98, miR-195, miR-506 a miR-1299 působí na buněčný cyklus inhibičně a v HCC tkáních byla jejich exprese snížena. Metastazování nádoru je jednou z hlavních příčin úmrtí onkologických pacientů. miRNA s dysregulovanou expresí podílející se na tvorbě metastáz jsou například miR-25 a miR-1246, které jsou u HCC up-regulovány, a miR-195 a miR-212, které jsou naopak down-regulovány (Xu et al. 2018). Zvýšená exprese miR-21 je spojena s nízkou diferenciací nádorových buněk, s růstem a také s migrací těchto buněk a s metastazováním (Yamamoto et al. 2020). miRNA jsou taktéž zapojeny do procesu angiogeneze v HCC prostřednictvím regulace VEGF. Up-regulace hypoxií indukované miR-210 potencuje angiogenezi (Yang et al. 2016). Zvýšená exprese miR-638 a miR-146a působí supresivně na VEGF a tlumí tak tvorbu nových cév a metastáz.

Další oblastí ovlivňovanou působením miRNA je účinnost terapie HCC, konkrétně pak problematika lékové rezistence. Nalezení způsobu, jak rezistenci zvrátit či obejít a zlepšit celkovou efektivitu protinádorové terapie je předmětem mnoha studií. Účinnost sorafenibu, nejznámějšího léku pro terapii HCC, je značně limitována právě z důvodu získané rezistence (Xu et al. 2018). Slibnými molekulami pro řešení tohoto problému se zdají být miR-7 pro překonání rezistence (Kabir et al. 2018), miR-367-3p pro zvýšení efektivity sorafenibu potlačením metastazování (Xu et al. 2016).

Důležité miRNA zapojené do patogeneze HCC identifikovali také Wang et al. (2019). Z 317 studovaných miRNA bylo 262 up-regulovaných a 55 down-regulovaných, sedm z nich autoři označili za klíčové. Zaznamenali sníženou expresi miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-139-5p, miR-139-3p a miR-424-3p, tedy v případě HCC považovaných za nádorové supresory. Pravděpodobně onkogenní potenciál mají

miR-1269-b a miR-1269a, jejichž hladina byla u vyšetřovaných vzorků s HCC zvýšena. Tyto miRNA jsou v organismu zapojeny např. do regulace Wnt signální dráhy, dráhy FGFR, udržování délky telomer, aktivity MAP kinázy či komplexu RLC (RISC-loading complex), o nichž bylo pojednáno v předchozích kapitolách práce.

miRNA jako nádorové biomarkery a potenciální terapeutika HCC

Exprese miRNA je tkáňově a nádorově specifická, její hladina koreluje s progresí nádoru a s klinickým stavem pacienta. miRNA lze detekovat nejen ve tkáni, ale taktéž v tělních tekutinách – plazmě, séru, moči, slinách. Jsou velmi odolné vůči degradaci, vykazují mnohem vyšší stabilitu než mRNA. Tyto vlastnosti tak umožňují využití miRNA jakožto diagnostických i prognostických biomarkerů (Bartošík a Moráňová 2018). Např. podle Wang et al. (2019) mají potenciál slibných diagnostických markerů HCC miR-139-3p, miR-139-5p a miR-424-3p. miR-139-5p by mohla být též prognostickým ukazatelem. Autoři Zhu et al. (2019) na souboru 362 pacientů s HCC analyzovali změny v hladinách miR-139-3p. Snížená exprese byla spojena se špatnou prognózou a s časným stadiem nádoru, vyšší exprese miR-139-3p byla naopak asociována s dobrou prognózou a s delší dobou přežívání pacientů. Podle autorů by tak i miR-139-3p mohla dobře sloužit jako prognostický marker pro jaterní nádorová onemocnění.

miRNA mohou být rovněž využity při léčbě onemocnění, a to snížením onkogenní miRNA, nebo substitucí down-regulované tumor supresorové miRNA. V prvním případě se používají tzv. anti-miR se sekvencí komplementární k inhibované miRNA, v případě druhém jsou pomocí tzv. miRNA mimics nahrazovány chybějící miRNA. Velkým benefitem oproti klasické protinádorové léčbě je nižší toxicita pro organismus (Bartošík a Moráňová 2018). Nejdále v klinických studiích je miravirsen – upravený antisense oligonukleotid s komplementaritou k miR-122, s níž po navázání tvoří stabilní komplex inhibující její funkci. Tato miRNA je specifická pro jaterní tkáň a je známa svou schopností potencovat replikaci viru hepatitidy C. Podle klinické studie miravirsen prodloužil dobu rekurence virové RNA a mohl by být účinný pro léčbu HCC u pacientů s hepatitidou vyvolanou HCV (Janssen et al. 2013; Fu a Calin 2018). Jelikož je metabolizován nukleázami a ne např. cytochromy P450, je zde i menší riziko lékových interakcí, navíc je cílen na endogenní molekulu a ne na virus, tudíž také riziko vzniku rezistence je snížené (Skálová 2017).

3.7 Diagnostika HCC

3.7.1 Screening

Cílem screeningových vyšetření je u předem vytipovaných pacientů co nejčasnější odhalení onemocnění, neboť na fázi, během níž je diagnostikováno, velmi závisí jeho samotná prognóza – při zachycení HCC ještě před manifestací přežije období pěti let díky dříve nasazené léčbě více než 50 % pacientů, kdežto pacienti v pokročilé fázi HCC obvykle umírají ještě před uplynutím jednoho roku (Brůha et al. 2012; Fraňková a Šperl 2019).

Screening je určen jen pro rizikové kategorie pacientů, například v České republice se týká těchto skupin:

1) Pacienti s jaterní cirhózou
2) Pacienti s chronickou infekcí viru hepatitidy C a fibrózou/ pacienti s fibrózou při NASH (předstupeň cirhózy)
3) Pacienti s chronickou infekcí viru hepatitidy B (Brůha et al. 2012)

Aktuálně je doporučeno provádět vyšetření dvakrát ročně, a to pomocí ultrazvuku (senzitivita 58–70 %), dle konkrétních doporučení s nebo bez stanovení hodnoty alfa-fetoproteinu (AFP) v séru (Couri a Pillai 2019). Organizace AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) a EASL (European Association for the Study of the Liver) radí z důvodu nízké senzitivity a specificity AFP pro screening nepoužívat (Couri a Pillai 2019; Mak et al. 2018), může však sloužit pro monitoring již probíhající léčby (Brůha et al. 2012).

Výhody ultrazvuku jsou neinvazivnost, bezpečnost a relativní levnost metody, na druhou stranu má i toto vyšetření svá úskalí. Nevykazuje konzistentní výsledky u pacientů obézních a s NAFLD a ačkoliv je doporučeno pro primární záchyt HCC, u těchto limitujících skupin pacientů se lékaři mohou uchýlit rovnou k použití CT nebo MRI (Harris et al. 2019).

AFP je taktéž vytýkáno kolísání výstupních hodnot, zejména u HCV pozitivních jedinců, kdy zvýšené hodnoty mohou poukazovat na probíhající zánětlivou reakci v těle a nikoliv pouze na přítomnost nádoru (Harris et al. 2019).

Vedle AFP existují i další sérové biomarkery potenciálně využitelné pro screening. Jsou to kupříkladu osteopontin, izoforma alfa-fetoproteinu AFP-L3

a glypican-3 (GPC3; onkofetální protein, jenž je fyziologicky produkován ve střevě a játrech při vývoji fetu, patologicky je exprimován v buňkách HCC) (Harris et al. 2019; Honsová 2012). Berhane et al. (2016) vyvinuli statistický model GALAD, který má u pacientů s chronickým jaterním onemocněním sloužit k určení pravděpodobnosti přítomnosti HCC na základě znalosti pohlaví, věku a hodnot třech biomarkerů – alfa-fetoproteinu (AFP), AFP-L3 a des-gamma-karboxyprotrombinu (DCP). Tato metoda byla díky studii Yang et al. (2019a) porovnávající použití ultrazvuku a GALAD při detekci HCC validována ve Spojených státech.

3.7.2 Stanovení diagnózy

Konečnou diagnózu HCC lze určit na základě neinvazivních metod (CT, MRI) anebo patologie (Mak et al. 2018).

U cirhotických pacientů by měl být ultrazvukový nález nádoru přesahujícího velikost 1 cm následně dovyšetřen pomocí CT nebo MRI. Charakteristickým znakem svědčícím pro HCC je po podání kontrastní látky arteriální sycení a poté její vymývání v pozdní fázi (European Association for the Study of the Liver 2018). Obě tato vyšetření vykazují vyšší senzitivitu a specificitu – CT 81 % a 93 %, MRI 91 % a 95 % (Couri a Pillai 2019).

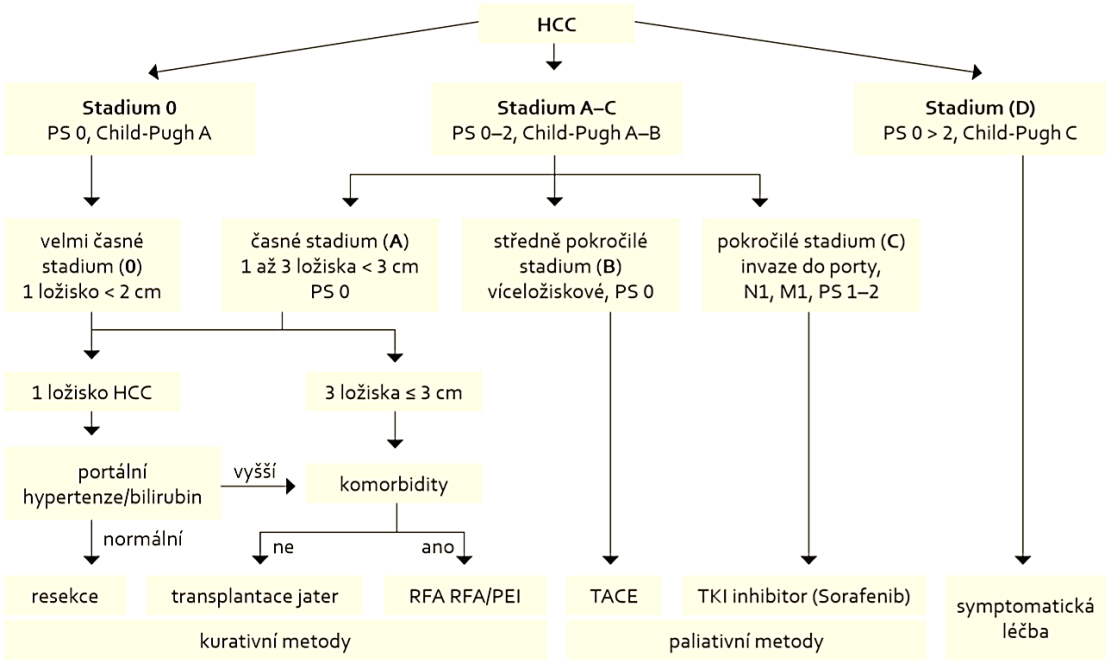
Pacienti, kteří nemají v anamnéze cirhózu jater, nebo pacienti s netypickým ultrazvukovým obrazem, podstupují vyšetření bioptické. Mnohdy je dostačující barvení hematoxylinem a eosinem, v některých případech je třeba přejít k metodám imunohistochemickým, zejména pak k průkazu glypicanu-3, který díky vysoké senzitivitě i specificitě (77 % a 96 %) při pozitivním výsledku znamená téměř jistý hepatocytový původ nádoru (Brůha et al. 2012; Honsová 2012; Mak et al. 2018).

3.8 Staging

Staging slouží k určení prognózy onemocnění a rozdělení pacientů pro různé typy léčby. Existuje několik stagingových systémů, nejpoužívanější je však barcelonský – BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer). Ten zahrnuje charakteristiku nejen nádoru, ale i pokročilosti jaterní cirhózy a celkového stavu nemocného (PS – performance status). K hodnocení pokročilosti cirhózy jater slouží Child-Pughova klasifikace (viz Tab. 2).

Tab. 2 ***Child-Pughova klasifikace*** *(Brůha et al. 2012)*

Počet bodů	**1**	**2**	**3**
Albumin (g/l)	> 35	28–35	< 28
Bilirubin (μmol/l)	< 35	35–50	> 50
Ascites	0	reverzibilní	ireverzibilní
Encefalopatie	0	mírná	zřetelná
INR	< 1,7	1,71–2,20	> 2,20
Hodnocení	*třída A: 5–6 bodů*	*třída B: 7–9 bodů*	*třída C: 10–15 bodů*



Obr. 5 ***BCLC systém s doporučeným léčebným postupem*** *(Brůha et al. 2012). PS – performance status*

3.9 Terapie

3.9.1 Kurativní léčba

Kurativní možnosti léčby zahrnují resekci jater, transplantaci jater a perkutánní ablaci. Jedná se o postupy, které jako jediné mohou vést k vyléčení nemoci, případně značně prodloužit dobu života nemocného. Lze je provádět pouze u pacientů velmi časného stadia (0) nebo časného stadia (A) onemocnění (Brůha et al. 2012; Couri a Pillai 2019).

3.9.1.1 Resekce jater

Jaterní resekce je první volbou u pacientů s jedním malým nádorovým ložiskem (< 2 cm). Může být indikována u pacientů cirhotických i necirhotických, vždy je však třeba posoudit aktuální stav jater, jejich funkčnost a schopnost regenerace, která je po tomto zákroku stěžejní. Při výběru správného způsobu léčby u konkrétního pacienta se přihlíží k hodnotám bilirubinu a tlaku krve ve *vena portae* (portální hypertenze je kontraindikací) (Brůha et al. 2012). Nejčastějšími komplikacemi mohou být krvácení, trombóza, zanesení infekce a selhání jater. Po resekci také existuje riziko rekurence HCC, které činí asi 50–70 % a je dáno metastazováním nádoru nebo rozvojem nového HCC z neodstraněné cirhotické tkáně. Doba přežití se pohybuje mezi 13–81 % pro období pěti let, záleží na celkovém zdravotním stavu pacienta a na stadiu nádoru (Vogel et al. 2018; Couri a Pillai 2019).

3.9.1.2 Transplantace jater

Transplantace jater umožňuje nejen odstranění nádorového ložiska, ale i celé cirhózou změněné tkáně (Couri a Pillai 2019). Většina zdravotnických zařízení používá k indikaci nemocných k transplantaci Milánská kritéria a jejich rozšířenou verzi, tzv. UCSF kritéria (University of California San Francisco), případně i tzv. Up-to-seven kritéria. Podle Milánských kritérií mohou transplantaci podstoupit pacienti s jedním ložiskem nádoru do velikosti 5 cm nebo nejvíce s třemi ložisky o maximální velikosti 3 cm každého z nich. UCSF kritéria říkají, že i pacienti s jedním ložiskem do 6,5 cm či maximálně s třemi ložisky s velikostí pod 4,5 cm a zároveň celkovou velikostí tumorů do 8 cm jsou vhodnými kandidáty pro transplantaci. Podle Up-to-seven kritérií nesmí součet počtu nádorů a velikosti největšího z nich přesahovat 7 cm. Rovněž musí být splněna nepřítomnost vaskulární invaze. Mazzaferro, autor Milánských kritérií, stojí i za projektem Metroticket (*http://www.hcc-olt-metroticket.org/*), který na základě hodnoty AFP, počtu a velikosti nádorů dokáže odhadnout délku potransplantačního

přežívání (Brůha et al. 2012; Couri a Pillai 2019). Obecně je uváděna menší než 10% pravděpodobnost rekurence nemoci a při dodržení Milánských kritérií asi 70% šance přežití období pěti let, tedy srovnatelná s přežíváním pacientů transplantovaných z jiných důvodů (Vogel et al. 2018; Brůha et al. 2012). Hlavní limitací pro indikaci k transplantaci je nejen nesplnění výše uvedených kritérií, ale i nedostatek vhodných jaterních štěpů, což vede k delším čekacím dobám na operaci, a tudíž i k dalšímu růstu nádoru. Poté již nádorové parametry nemusí splňovat daná kritéria a je třeba vybrat jinou metodu léčby, vhodnou i pro pokročilou fázi HCC (Vogel et al. 2018).

3.9.1.3 Perkutánní ablace

Mezi potenciálně kurabilní metody je řazena i lokální perkutánní ablace, nejhojněji užívané jsou radiofrekvenční ablace a mikrovlnná ablace, v minulosti byly často aplikovány i ethanolové injekce.

Při radiofrekvenční ablaci je pod kontrolou některé ze zobrazovacích technik prostřednictvím jehly přímo do ložiska nádoru veden proud, který následně způsobí nekrózu tkáně. Po zákroku se v 7–9 % případů mohou objevit komplikace, jako jsou břišní krvácení a infekce, může dojít k poškození žlučových cest nebo k rozsevu nádoru (Couri a Pillai 2019; Yang et al. 2019b). Radiofrekvenční ablace je indikována u pacientů s velmi časným a časným stadiem HCC, u kterých existují kontraindikace k resekci či transplantaci jater. Mohou ji tedy podstoupit i pacienti s třemi uzlíky (velikost do 3 cm), se zvýšenými hodnotami bilirubinu, s portální hypertenzí, i pacienti zatížení komorbiditami (Couri a Pillai 2019). Mikrovlnná ablace taktéž funguje na principu teplem zprostředkované nekrózy nádoru, teplo však generuje jiným způsobem a představuje tak v jistých směrem výhodnější techniku než je radiofrekvenční ablace – je metodou rychlejší a také účinnější při ablaci nádorů větších rozměrů (Yang et al. 2019b). Podle Izzo et al. (2019) by měla být preferována u tumorů velikosti 3 a více cm nebo pokud nádor leží blízko cév. I termální ablace mají své limitace. Neměly by se provádět u nádorů exofytických (hrozí rozsev nádoru) nebo lokalizovaných v bezprostředním okolí orgánů trávicího traktu, zejména tlustého střeva, a to kvůli riziku tepelného poškození jejich stěn. Dále například pokud leží ve vzdálenosti menší než 1 cm od hlavního žlučovodu, kde hrozí taktéž tepelné poškození se vznikem stenózy (Brůha et al. 2012).

Perkutánní ethanolové injekce byly rozšířeny dříve, v dnešní době jsou voleny spíše v případě omezených možností léčby. Metodou volby se však mohou stát, pokud tumor přiléhá ke žlučovodu nebo velkým jaterním cévám, které by byly po užití radiofrekvenční ablace nebo mikrovlnné ablace značně poškozeny (Yang et al. 2019b).

3.9.2 Paliativní léčba

3.9.2.1 Transarteriální chemoembolizace

Pro pacienty ve středně pokročilém stadiu HCC a s větším počtem ložisek je určena transarteriální chemoembolizace (TACE). Využívá faktu, že během svého růstu HCC vyžaduje pro výživu napojení na tepnu. TACE v sobě spojuje toxické působení chemoterapeutika a selektivní embolizaci arterie zásobující nádor vedoucí k ischemii a nekróze nádoru. Z chemoterapeutik se nejvíce používají cisplatina, doxorubicin či mitomycin C v emulzi s jodizovanou olejovou kontrastní látkou (Lipiodol), která má schopnost koncentrovat se v nádorové tkáni. Po TACE se může projevit tzv. postembolizační syndrom (nevolnost, zvracení, bolest břicha, horečka). K zákroku jsou kontraindikováni pacienti s trombózou *vena portae*, dekompenzovanou cirhózou a mimojaterní invazí (Couri a Pillai 2019).

3.9.2.2 Transarteriální radioembolizace

Při transarteriální radioembolizaci (TARE) je arterie vyživující nádor vystavena účinku na mikročástice navázaných radioaktivních izotopů ^{90}Y (yttria), ^{131}I (jódu) nebo ^{188}Re (rhenia), což vede po jejich absorbování k radiační nekróze tkáně. Velkou výhodou oproti TACE je zanedbatelný embolický efekt, a proto lze tuto metodu použít i u pacientů s trombózou portální žíly nebo s HCC již invadujícím mimo játra (Couri a Pillai 2019; Yang et al. 2019b).

3.9.2.3 Systémová terapie

Pacienti s pokročilým HCC, kteří jsou dosud v celkově dobrém stavu, ale již nejsou vhodnými kandidáty pro chirurgické řešení, podstupují systémovou onkologickou léčbu. Dříve byla k dispozici pouze cytostatika jako 5-fluorouracil, cisplatina nebo doxorubicin, která však nevykazovala uspokojivé výsledky. Proto bylo třeba zaměřit se na vývoj léků pro účinnější cílenou terapii. V roce 2007 byl představen přípravek sorafenib, který se ukázal být v léčbě HCC efektivním, a stal se tak metodou první volby v této kategorii (Brůha et al. 2012; European Association for the Study of the Liver 2018). V dnešní době jsou pro léčbu pokročilé fáze HCC schváleny tři

multikinázové inhibitory (pro první linii léčby již zmíněný sorafenib, dále pak lenvatinib a pro druhou linii léčby regorafenib) a imunoterapeutikum nivolumab (Chen et al. 2019). Jim a dalším potenciálním lékům jsou věnovány následující odstavce.

První linie léčby

Sorafenib je multikinázový inhibitor s antiangiogenním, antiproliferativním a apoptotickým účinkem. Blokuje signální dráhu Ras/Raf/MEK/ERK na úrovni Raf a tyrozinkinázové receptory VEGFR a PDGFR (Doycheva a Thuluvath 2019). Jeho schopnost prodloužení doby přežití pacientů s HCC byla prokázána ve dvou velkých zkouškách. Studie SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol, 2008) zaznamenala medián přežití 10,7 měsíců u pacientů léčených sorafenibem a 7,9 měsíců u pacientů užívajících placebo, celkově tedy 37% nárůst doby přežívání. Studie Asia-Pacific (2009) přinesla výsledky 6,5 měsíců (sorafenib) vs. 4,2 měsíce (placebo) přežití (Chen et al. 2019). Nežádoucími účinky mohou být projevy kožní toxicity – tzv. hand-foot skin reakce (bolest a mravenčení kůže, citlivost kůže, pocit pálení, zarudnutí, otok, odlupování pokožky, tvorba puchýřů) – a také průjem (oba asi v 8–16 % případů). Sorafenib je s výhodou používán k léčbě pacientů s HCV, s dobrou funkcí jater a bez mimojaterního šíření tumoru (Bednaříková a Kocák 2010; European Association for the Study of the Liver 2018; Kudo 2019).

Lenvatinib je taktéž multikinázový inhibitor. Cílem jeho přímého účinku jsou VEGFR1–4, PDGFRα a FGFR1–4, jejichž inhibice by měla bránit neovaskularizaci, invazi a metastazování nádorů. Studie Kimura et al. (2018) navíc prokázala na myších HCC modelech imunomodulační účinek lenvatinibu přispívající k jeho protinádorovému působení. Lenvatinib byl schválen v roce 2018 na základě výsledků REFLECT studie. Ta porovnávala účinnost lenvatinibu proti sorafenibu na 954 pacientech (z toho 67 % z asijsko-pacifického regionu) bez předchozí systémové terapie a došla ke zjištění, že lenvatinib vykazuje lepší výsledky (13,6 měsíců přežívání pro lenvatinib a 12,3 měsíců pro sorafenib). Mezi vedlejšími účinky léčby se objevila především hypertenze, hypotyreoidismus a proteinurie, které lze korigovat vhodnou přidruženou léčbou, naproti tomu u skupiny pacientů léčených sorafenibem převažovala nežádoucí hand-foot skin reakce, alopecie a průjem. Z tohoto důvodu je lenvatinib považován za šetrnější léčivo, které je pacienty mnohem lépe snášeno (Kudo 2019). Dle EASL doporučení by měla být léčba lenvatinibem preferována u pacientů, u nichž

nedošlo k infiltraci *vena portae* a u pacientů s jinou než HCV etiologií karcinomu (European Association for the Study of the Liver 2018).

Druhá linie léčby

Deset let po vývoji sorafenibu, v roce 2017, prošel třetí fází klinického hodnocení lék **regorafenib**, který tak byl potvrzen pro druhou linii léčby HCC (Bruix et al. 2019). V této placebem kontrolované studii (RESORCE) byli zahrnuti pouze pacienti do té doby léčení sorafenibem a čísla vykazovala 10,6 měsíců přežívání (regorafenib) vs. 7,8 měsíců přežívání (placebo). U nemocných se objevovaly vedlejší reakce jako hypertenze (13 %), únava (6 %), hand-foot skin reakce (13 %), průjem (2 %) (Kudo 2019). V dodatečné analýze RESORCE byly hodnoceny výsledky na sebe navazující léčby sorafenib-regorafenib – medián doby přežití od začátku léčby sorafenibem byl 26 měsíců (regorafenib) a 19 měsíců (placebo) (Finn et al. 2018). Tato analýza se ukázala být velmi významnou. Doba přežití (26 měsíců) je srovnatelná s výsledky léčby pomocí TACE. Vezmeme-li v úvahu, že TACE, která je nyní určena pro pacienty se středně pokročilým HCC, a sekvenční terapie sorafenib-regorafenib s indikací pro pokročilý HCC, umožňují podobnou délku přežívání, možná by bylo na místě přehodnocení načasování zahájení léčby sorafenibem (např. i z důvodu lepšího stavu jater před progresí do pokročilého stadia HCC). Regorafenib je tak jako dva předchozí inhibitory taktéž kinázový inhibitor, lišící se od molekuly sorafenibu pouhým navázáním atomu fluoru. Je zaměřen na VEGFR1–3, PDGFR, Raf a KIT (Kudo 2019).

Jelikož existuje i skupina pacientů intolerantních nebo rezistentních vůči léčbě sorafenibem, bylo potřeba alternativy pro druhou linii léčby. V roce 2018 proběhly nakonec úspěšné klinické studie dvou léčiv (Kudo 2019).

Účinek **cabozantinibu** na prodloužení doby přežití jako léku druhé linie léčby pokročilého HCC byl potvrzen v CELESTIAL studii. Pacienti zahrnutí v této studii byli předešle léčeni pomocí sorafenibu a během studie dosáhli doby prodloužení života 10,2 měsíců (cabozantinib) a 8 měsíců (placebo). Mezi nežádoucími reakcemi byla zaznamenána hand-foot skin reakce (17 %), hypertenze (16 %), průjem (10 %), únava (10 %) a snížená chuť k jídlu (6 %) (Kudo 2019). Cabozantinib je dalším ze skupiny multikinázových inhibitorů, inhibuje aktivitu VEGFR2, c-Met (da Motta Girardi et al. 2018).

Ramucirumab je rekombinantní monoklonální protilátka třídy IgG1, která již byla schválena pro léčbu rakoviny žaludku, nemalobuněčného karcinomu plic a kolorektálního karcinomu (Liu et al. 2019). Je zaměřen proti VEGFR2, jehož inhibice vede k inhibici proliferace, migrace a přežívání buněk endotelu, čímž je blokována i neovaskularizace nádoru. Výsledky studie REACH (ramucirumab vs. placebo u pacientů nereagujících na léčbu sorafenibem) neukázaly požadovaný benefit v užívání ramucirumabu, avšak u skupiny pacientů s hodnotami AFP ≥ 400 ng/ml bylo zaznamenáno významné prodloužení doby přežití (7,8 měsíců vs. 4,2 měsíce), což vedlo k zahájení studie REACH-2. Do ní byli zahrnuti pouze pacienti s hodnotami AFP ≥ 400 ng/ml a s vaskulární invazí nádoru a prodloužení doby jejich přežití činilo 8,5 měsíců (ramucirumab) a 7,3 měsíců (placebo). Nejvíce pacientů trpělo během léčby zejména hypertenzí, dále pak trombocytopenií, neutropenií a jaterní encefalopatií (Kudo 2019). Na základě výsledků třetí fáze klinické studie RESORCE-2 byl rovněž ramucirumab schválen pro druhou linii léčby (po předešlé terapii sorafenibem) pokročilého HCC (Personeni et al. 2019).

Imunoterapie

Imunitní systém má význam nejen v boji proti infekcím, ale rovněž zprostředkovává obranu protinádorovou. Jeho úkolem je zde rozpoznávat na povrch buněk exprimované nádorové antigeny, které se často strukturou velmi podobají antigenům tělu vlastním nebo jsou exprimovány ve snížené míře, čímž své rozpoznávání značně znesnadňují (Vitásková a Melichar 2015). Je třeba, aby imunitní systém rozeznával a ničil patogeny, a zároveň, aby toleroval vlastní orgány a tkáně. Jinými slovy, je potřeba vyváženosti stimulačních a inhibičních signálů. Při vývoji protinádorových imunoterapeutik je pozornost věnována i blokaci inhibičních receptorů, v kontextu léčby HCC jde zejména o receptor PD-1 (Šťastný a Říhová 2015).

PD-1 (programovaná buněčná smrt-1) je transmembránový receptor exprimovaný především na T buňkách, B buňkách, NK a NKT buňkách, na makrofázích a dendritických buňkách a fyziologicky tak reguluje jejich toleranci imunitním systémem. Zároveň se má však za to, že taktéž nádorové buňky vystavují receptor PD-1 na svůj povrch, aby je organismus vnímal jako vlastní, a tlumí tak protinádorovou odpověď T buněk. Snahou dnešních dnů je tedy proti těmto receptorům namířit vyvíjené protilátky, které blokací PD-1 receptorů blokují jejich interakci s ligandy PD-L1 a PD-L2 a zesilují aktivitu T buněk a lýzu buněk maligních.

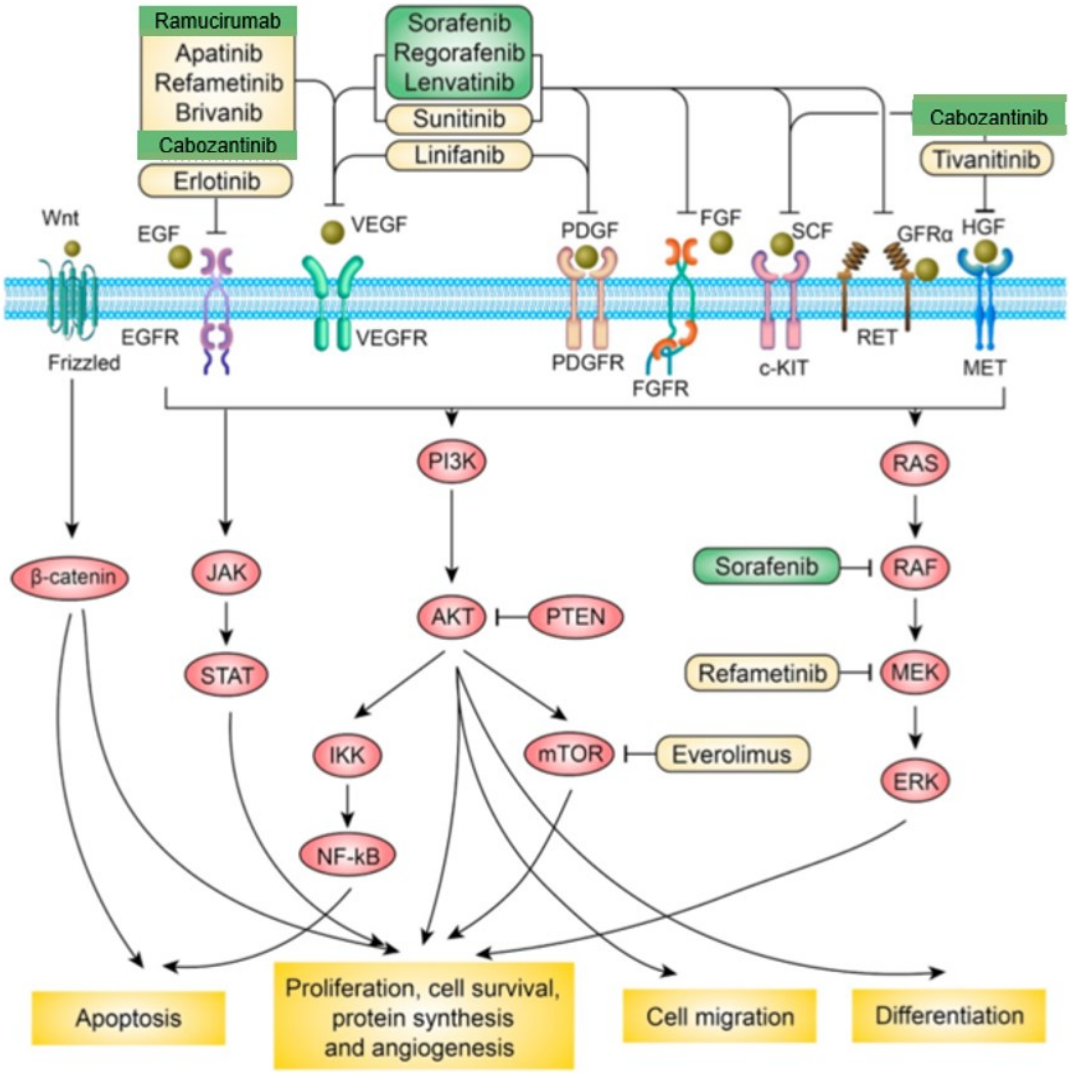
Momentálně jsou k dispozici dva inhibitory (tzv. checkpoint inhibitory) PD-1 – nivolumab a pembrolizumab (Šťastný a Říhová 2015; Doycheva a Thuluvath 2019).

Nivolumab je rekombinantní monoklonální lidská protilátka IgG4, která byla jako první schválena pro imunoterapii pokročilého HCC u pacientů po předchozí léčbě sorafenibem (Kudo 2019). Studie CheckMate 459 pak měla porovnat účinnost nivolumab vs. sorafenib u pacientů bez předchozí systémové léčby. Podle výsledků pacienti snášeli nivolumab lépe než sorafenib, doba přežití byla rovněž delší u nivolumabu, avšak nebyla vyhodnocena jako statisticky významná (Yau et al. 2019).

Tak jako nivolumab je i **pembrolizumab** rekombinantní monoklonální protilátkou třídy IgG4 specifickou proti PD-1. Pro druhou linii léčby pokročilého HCC byl potvrzen na základě výsledků druhé fáze studie KEYNOTE-224 (Doycheva a Thuluvath 2019).

Anti-mTOR

Jelikož je mTOR klíčovým regulátorem signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, jejíž deregulace jsou u HCC velmi časté, je snaha o vývoj selektivního inhibitoru této molekuly (Kudo 2012). **Everolimus**, analog rapamycinu, sice dle některých studií dokázal oddálit rekurenci nádoru po transplantaci jater (Monaco 2009; Thorat et al. 2017), neprošel však třetí fází placebem kontrolované klinické studie hodnotící jeho účinek jako léku pro druhou linii léčby (European Association for the Study of the Liver 2018).



Obr. 6 ***Přehled možností cílené terapie HCC včetně signálních drah****. Zelené podbarvení značí již schválená léčiva, oranžově podbarvené jsou léčivy potenciálními. Upraveno podle (Chen et al. 2019).*

3.9.3 Symptomatická léčba

Pacienti v konečném stadiu HCC se dožívají asi 3–4 měsíců. U nich již terapie není cílena na odstranění nádoru, nemocným lze nabídnout pouze paliativní péči, například prostřednictvím tlumení bolesti, poskytování potřebné výživy či psychické podpory (European Association for the Study of the Liver 2018).

3.10 Role jater v metabolismu u hepatocelulárního karcinomu

S organickými sloučeninami po vstupu do lidského těla může být naloženo různými způsoby – jako s živinami (intermediární metabolismus), mohou být přímo exkretovány z těla, či chemicky modifikovány a až poté exkretovány. Látky bez nutričního potenciálu (xenobiotika) většinou podléhají enzymy zprostředkovaným biotransformačním reakcím, které mohou vést k biodegradaci těchto látek, či naopak k jejich bioaktivaci (Dostálek 2006; Lyubimov 2012). Proces biotransformace je potřebný pro udržování homeostázy buněk i celého organismu. Pro biotransformaci jsou stěžejními buňkami jaterní hepatocyty, jejichž poškození může vyvolat změny v biotransformačním procesu a ovlivňovat tak i odpověď organismu na léčbu (Nekvindova et al. 2020).

3.10.1 Biotransformace xenobiotik

Velká část látek, jak exogenních, tak endogenních, je lipofilního charakteru, což znesnadňuje jejich eliminaci organismem. Biotransformační reakce mají za cíl vznik hydrofilního produktu, který je již tělo schopno vyloučit (Wilhelm a Hegyi 2007).

Biotransformace zahrnuje dvě fáze, které na sebe většinou navazují. Není to však pravidlem – někdy látky přechází rovnou do fáze II, anebo nepodléhají reakcím první ani druhé fáze a opouští organismus v nezměněném stavu.

Smyslem první fáze je zvýšení polarity sloučenin, jež usnadňuje výslednou exkreci ledvinami či játry. Typickými reakcemi ve fázi I jsou zejména oxidace, redukce a hydrolýza, při nichž dochází k odkrytí polární funkční skupiny potřebné k proběhnutí reakce v další fázi. Zásadní úlohu při biotransformaci má cytochrom P450 (CYP450) (Dostálek 2006), viz dále.

V druhé fázi biotransformace jsou xenobiotika či metabolity konjugovány s endogenními molekulami obsahujícími ionizovatelné skupiny. Těmito konjugačními činidly jsou nejčastěji kyselina glukuronová (resp. UDP-glukuronát; glukuronidace), kyselina sírová (resp. aktivní PAPS – 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát; sulfonace), acetyl-CoA (acetylace), z aminokyselin především glutamin a glycin, dále pak např. glutathion. Reakce jsou katalyzovány enzymy, jako jsou např. UDP-glukuronosyltransferázy, sulfotrasferázy, acetyltransferázy a glutathion-S-transferázy (Ledvina et al. 2004).

3.10.2 Význam cytochromu P450 u hepatocelulárního karcinomu

Cytochrom P450 (CYP) je velká rodina enzymů účastnících se metabolismu endogenních látek (tvorba žlučových kyselin a cholesterolu a metabolismus kyseliny arachidonové – tvorba tromboxanu A_2 a prostacyklinů). Taktéž hraje zásadní roli v metabolismu léků a dalších lipofilních xenobiotik (Dostálek 2006), kde se kromě odbourávání těchto látek může podílet na aktivaci potenciálně (pro)karcinogenních a mutagenních substancí (Yan et al. 2015a).

Existuje nejméně 57 lidských CYP genů, u 18 z nich byla prokázána schopnost metabolizace xenobiotik. CYP450 jsou přítomny ve všech tkáních lidského těla, nejvíce koncentrované jsou však v játrech a gastrointestinálním traktu, nezanedbatelné množství je také v ledvinách a plicích (Skálová 2017).

Velká inter- a intraindividuální variabilita v expresi CYP způsobuje různorodost reakcí organismu na vnější faktory, včetně citlivosti organismu na nemoci a odpovědi na jejich léčbu (Li et al. 2019a). Expresi CYP ovlivňuje pohlaví, věk, přijímaná potrava jedince, pak také hladiny hormonů a akutní či chronická onemocnění, zejm. ta poškozující jaterní tkáň. Nádorová onemocnění obecně biotransformaci snižují, jelikož nádorové buňky mají oproti buňkám zdravým nižší biotransformační potenciál (Skálová 2017). Z pohledu genetického způsobují alterace v expresi CYP především jednonukleotidové polymorfismy (SNP) a variability v počtu kopií segmentů DNA (CNV). Epigenetické faktory regulující expresi CYP zahrnují modifikaci histonů, methylaci DNA i regulaci prostřednictvím nekódujících RNA, především mikroRNA a dlouhých nekódujících RNA (Li et al. 2019a).

V průměrné lidské jaterní tkáni jsou vysoce exprimovány zejm. CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E a CYP3A, které jsou zodpovědné až za 80 % reakcí první fáze biotransformace u 90 % existujících léčiv (Yan et al. 2015a). Znalost konkrétních forem CYP450 exprimovaných v nádorových tkáních by mohla poskytnout vhodné cíle pro léčbu HCC, pomoci v managementu individualizované terapie a také by mohla objasnit některé mechanismy lékové rezistence (Yan et al. 2015a).

Nekvindova et al. (2020) popsali na kohortě evropských pacientů s HCC významné alterace v expresi genů pro xenobiotika metabolizující CYP. S použitím mikročipové analýzy byl získán profil exprese genů pro CYP u 20 pacientů s HCC a údaje z mikročipů byly validovány pomocí qPCR ze vzorků od 33 pacientů.

Asi u poloviny pacientů byla zjištěna mírná down-regulace, u 25 % velmi výrazná, pouze v pár případech byla změna exprese CYP genů oproti přilehlé zdravé tkáni nevýznamná. Mezi nejvíce down-regulovanými byly CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4 a CYP26A1. Silná asociace se stupněm vyzrálosti nádoru byla zřejmá u CYP2C9 a CYP2E1 – exprese těchto forem byla u nádorů v pokročilém stadiu značně potlačena. Autoři navíc využili údaje z mikročipové analýzy, v níž mělo 12 pacientů velmi sníženou expresi genů pro CYP a 8 pacientů téměř normální expresi genů pro CYP, pro vyhledání genů a lncRNA, které by se mohly podílet na alteraci exprese CYP. Velmi zajímavým výstupem je skupina lncRNA rozdílně exprimovaných mezi tkáněmi pacientů se sníženou a normální expresí CYP. Například lnc-SOX11-3, lnc-ZNF485-3, lnc-BBOX1-1, lnc-MAGEA8-2, lnc-C6orf103-1, lnc-AHNAK-4 nebo lnc-UCHL3-3 ukázaly výraznou změnu v expresi, z čehož se dá usuzovat, že by mohly inhibovat expresi CYP.

Analýza exprese enzymů z rodiny CYP u HCC s cílem nalezení vhodných biomarkerů včasné diagnostiky HCC byla tématem studie Brodeur et al. (2019). Autoři provedli globální analýzu hladin exprese všech 57 dosud známých genů pro CYP450 – 17 z nich vykazovalo minimálně čtyřnásobnou změnu v expresi oproti referenční tkáni. Významně zvýšeně exprimovány byly CYP1B1, CYP7A1, CYP17A1 a CYP19A1, významně potlačena pak byla exprese CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 a CYP26A1. Za nejvhodnější kandidáty s nejvyšší senzitivitou a specifitou pro včasný záchyt HCC byly, po měření na úrovni mRNA (qPCR) i proteinu (imunohistochemie), zvoleny 3 down-regulované CYPy – CYP2B6, CYP1A2 a CYP2C19.

Na druhou stranu, jak podotýkají Yan et al. (2015a), exprese CYP450 v jaterní tkáni je sice vcelku dobře popsána z obecného hlediska, avšak tumor každého pacienta se může chovat rozdílně a taktéž expresní profil CYP může být poněkud odlišný mezi konkrétními pacienty. Proto autoři zdůrazňují důležitost individuálního přístupu v léčbě HCC a navrhují využití techniky LC-MS/MS bez izotopového značení pro měření hladiny proteinů CYP u každého pacienta s HCC. Ve studii tuto možnost demonstrovali na měření exprese sedmi hlavních enzymů CYP účastnících se metabolismu léků – CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 – které byly v nádorové tkáni oproti normální přilehlé tkáni značně down-regulovány.

Tyrozinkinázové inhibitory využívané k cílené léčbě HCC jsou metabolizovány majoritně prostřednictvím cytochromu P450 3A4 (CYP3A4). Cabozantinib je metabolizován v menší míře taktéž CYP2C9, lenvatinib enzymem aldehydoxidázou. Sorafenib a regorafenib po první biotransformační fázi přecházejí i do fáze druhé, během níž tato léčiva podléhají konjugaci zprostředkované UDP-glukuronosyltransferázou 1A9 (UGT1A9) (National Center for Biotechnology Information; Keating a Santoro 2009). Sorafenib je navíc inhibitorem CYP2B6, CYP2B8, CYP2C9 a UGT1A1. Klinický dopad těchto interakcí zatím není vyjasněn, je třeba obezřetnosti při předepisování léků metabolizovaných těmito enzymy pacientům již užívajícím sorafenib (Gong et al. 2017).

Hu et al. (2019) ve své studii analyzovali expresi genů účastnících se metabolismu u HCC. Klíčové geny zapojené do metabolismu a exkrece sorafenibu a regorafenibu, tedy geny pro enzymy CYP3A4 a UGT1A9, vykazovaly významné snížení exprese. Jejich down-regulace může zpomalit metabolismus, a tedy i vylučování sorafenibu a regorafenibu, a tudíž zvýšit efektivitu terapie. Nicméně taktéž došlo ke značnému snížení exprese genů pro influx transportéry (*SLCO1B1*, *SLCO1B3*, *SLC22A1*), což naopak snižuje buněčný příjem a tím pádem i efektivitu léčby.

Ve stejné studii navíc autoři hodnotili hladiny exprese 12 miRNA, aby otestovali hypotézu, že up-regulované miRNA budou snižovat expresi svých cílových genů zapojených do metabolismu u HCC. Většina z miRNA byla v nádorové tkáni skutečně up-regulována, což naznačuje jejich možné zapojení do regulace těchto genů. Konkrétně studie ukázala na vzájemné vztahy mezi miR-132 a *CYP1A2*, miR-128-3p a *CYP2C9*, miR-130b a *CYP2C9*, miR-25 a *CYP2B6*, miR-27a a *CYP3A4*, miR-103-5p a *CYP2C8*, miR-107 a *CYP2C8*, miR-378a a *CYP2E1*. Popsané inhibice všech těchto CYP genů navazováním miRNA jsou v souladu s výsledky předešlých studií (Chen et al. 2017c; Yu et al. 2015; Rieger et al. 2015; Jin et al. 2016; Shi et al. 2015; Zhang et al. 2012; Mohri et al. 2010).

Chen et al. (2017c) již dříve zjistili supresivní efekt miR-132-5p na CYP1A2 v buněčných liniích HepG2 a Huh7. Tato miRNA by navíc mohla hrát roli při lékových interakcích mezi lansoprazolem a flutamidem. Lansoprazol, který indukuje CYP1A2, je užíván ke snížení tvorby žaludeční kyseliny, často k úlevě od vedlejších účinků (nevolnost a zvracení) léku proti rakovině prostaty – flutamidu. Ten je znám svou

hepatotoxicitou. V této studii tedy byla *in vitro* demonstrována schopnost miR-132-5p inhibicí CYP1A2 snížit toxicitu flutamidu.

CYP2C9 je enzym metabolizující např. warfarin, ale také se účastní bioaktivace karcinogenů, u HCC je však typická snížená exprese *CYP2C9*. Yu et al. (2015) prokázali v HepG2 buňkách, že může být down-regulován miR-128-3p, Rieger et al. (2015) odhalili v buňkách Huh7 negativní regulaci vazbou miR-130b.

Jin et al. (2016) poukázali na supresi CYP2B6 prostřednictvím miR-25-3p a Mohri et al. (2010) prokázali, že miR-378a snížila hladinu enzymu CYP2E1. Shi et al. (2015) jako první demonstrovali inhibiční efekt miR-27a na CYP3A4, a to *in vitro* v buňkách Hep3B a taktéž ve vzorcích jaterní tkáně 26 čínských pacientů. Zhang et al. (2012) přinesli poznatek, že CYP2C8 je pravděpodobně posttranskripčně regulován miR-103 a miR-107. Hladiny exprese měřené na souboru 31 vzorků lidské jaterní tkáně těchto miR inverzně korelovaly s hladinou CYP2C8. V HepG2 buňkách se autorům CYP2C8 nepodařilo zachytit, exprese miR-103 a miR-107 však byla v této linii více než dvojnásobně zvýšena oproti expresi ve vzorcích tkáně jater.

Studium dlouhých nekódujících RNA (viz kapitolu 3.11 a dále) v souvislosti s metabolismem léčiv je v samých počátcích. Dosud zveřejněné studie se zabývaly především jejich rolí v metabolismu endogenních látek. Například Lan et al. (2016) zaznamenali, že *lnc-HC* negativně reguluje metabolismus cholesterolu v hepatocytech. Po vytvoření komplexu s hnRNPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1) se váže na mRNA myších genů *Cyp7a1* a *Abca1* a snižuje jejich expresi. CYP7A1 je zodpovědný za přeměnu cholesterolu na žlučové kyseliny a ABCA1, jakožto transportní protein, za eflux cholesterolu z buňky. Tlumení jejich exprese má za následek snížené vylučování cholesterolu z buněk (Wang et al. 2020c).

3.11 Dlouhé nekódující RNA

Jak bylo zmíněno již v kapitole o nekódujících molekulách RNA (viz kapitolu 3.6.3), více než 90 % lidského genomu je transkripčně aktivních. Asi 68 % transkriptomu tvoří dlouhé nekódující RNA (lncRNA), molekuly postrádající schopnost kódovat proteiny a dosahující délky nejméně 200 nukleotidů (El Khodiry et al. 2018; Mai et al. 2019).

Dlouhé nekódující RNA se podílejí na regulaci metabolismu, na vývoji organismu (role při imprintingu), na regulaci exprese genů a v neposlední řadě na patologických procesech v organismu a na rozvoji mnohých patologických stavů – metabolických poruch, autoimunitních a kardiovaskulárních onemocnění a na rozvoji a progresi nádorových onemocnění (Li et al. 2019a). Objev prvních lncRNA sahá do 90. let minulého století, kdy byly identifikovány lncRNA XIST (X-inactive specific transkript), který způsobuje inaktivaci chromozomu X v samičích buňkách savců při embryonálním vývoji, a H19 (Abbastabar et al. 2018).

3.11.1 Vlastnosti a struktura dlouhých nekódujících RNA

Pro molekuly lncRNA je charakteristická délka nejméně 200 nt, převážně se však pohybuje mezi 1 000–10 000 nt (Dai et al. 2019). Jsou v mnohém podobné molekulám mRNA. Biogeneze je zajištěna RNA polymerázou II (RNAP II). V případě lncRNA, které regulují aktivitu RNAP II, jsou transkribovány RNA polymerázou III (RNAP III), lncRNA mohou podstupovat sestřih (splicing) a posttranskripční úpravy – polyadenylaci na 3′ konci a dodání methyl-guanosinové čepičky na 5′ konci RNA (5′-capping). Molekuly lncRNA ale bývají kratší než mRNA, typická je exprese v nižších hladinách a také menší počet exonů. Sekvence jsou mezi druhy málo konzervované (Ayers 2013; Lanzafame et al. 2018).

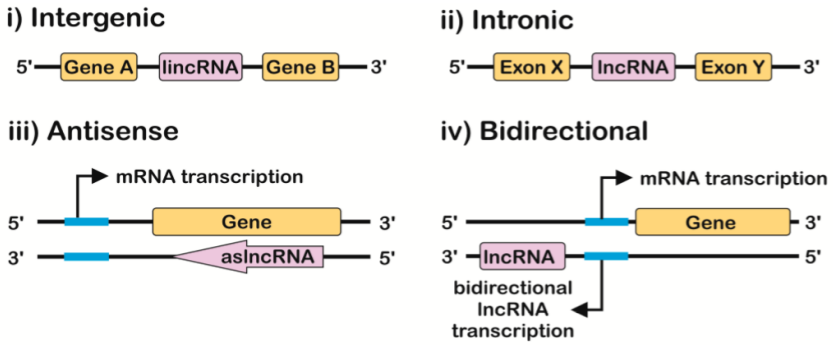
Velká část lncRNA je lokalizována výhradně v jádře, nicméně řada těchto molekul byla nalezena taktéž v cytoplazmě, mitochondriích a ribozomech a některé se mohou nacházet i ve více kompartmentech buňky. Některé lncRNA mohou svou lokalizaci v reakci na infekci či jiné podněty z vnějšího prostředí přechodně měnit (Jarroux et al. 2017; Lanzafame et al. 2018).

3.11.2 Klasifikace dlouhých nekódujících RNA

Vzhledem k rozmanitosti jejich vlastností a funkcí lze lncRNA klasifikovat podle různých kritérií, nejzákladnější dělení, na němž se shoduje většina autorů, je

podle lokalizace v genomu ve vztahu ke genům kódujícím proteiny. **Mezigenové lncRNA (lincRNA)** se nacházejí mezi dvěma geny kódujícími proteiny. **Intronové lncRNA** jsou lokalizovány v oblasti intronu protein kódujícího genu. **Antisense lncRNA (aslncRNA)** jsou transkribovány z vlákna komplementárního k vláknu vedoucímu. **Obousměrné lncRNA** jsou taktéž transkribovány z vlákna komplementárního ke kódujícími, ale zároveň jsou umístěny v promotorové oblasti, kterou sdílí s protein kódujícím genem ležícím na protějším vláknu (Fernandes et al. 2019).

***Cis*-lncRNA** ovlivňují expresi sousedících genů, ***trans*-lncRNA** regulují expresi genů vzdálených (Dai et al. 2019).



Obr. 7 ***Dělení lncRNA podle genomové lokalizace.*** *i) mezigenové lncRNA (lincRNA), ii) intronové lncRNA, iii) antisense lncRNA (aslncRNA), iv) obousměrné lncRNA (Fernandes et al. 2019).*

3.11.3 Funkce a mechanismy dlouhých nekódujících RNA

RNA jsou velmi variabilní a dynamické molekuly. Mohou být rychle transkribovány i degradovány, jsou schopny interagovat s ostatními nukleovými kyselinami a taktéž s proteiny a dokáží tak regulovat genovou expresi na úrovni transkripční, posttranskripční a také na úrovni proteinové (Lanzafame et al. 2018). Repertoár reakcí molekul lncRNA se odvíjí od jejich umístění v rámci buňky (tzn. např. jaderné lncRNA budou asociované s chromatinem, cytoplazmatické lncRNA budou regulovat translaci mRNA) a od sekundární a terciární struktury (Fernandes et al. 2019).

Z dosud získaných poznatků lze molekulární mechanismy působení popsat prostřednictvím následujících čtyř modelů, které dané lncRNA většinou různě kombinují.

1. *Signál (Signal)*

Transkripce lncRNA je tkáňově a časově specifická a reaguje na konkrétní podněty. Molekuly lncRNA tak mohou fungovat jako molekulární signály pro expresi genů v daném místě a čase. lncRNA využívající tento mechanismus plní většinou regulační funkci, případně jsou meziprodukty transkripce.

2. *Návnada (Decoy)*

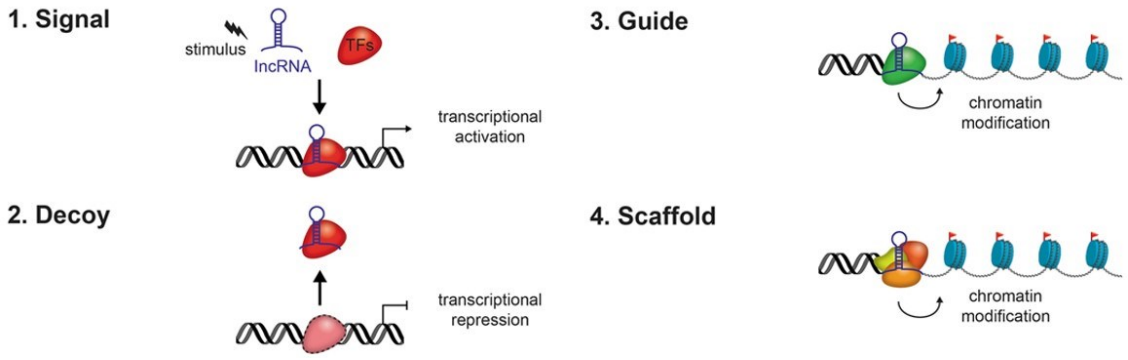
Transkript lncRNA se váže na transkripční faktory, modifikátory chromatinu či další proteiny a zabraňuje jim tak plnit své funkce, spadají sem taktéž interakce s molekulami miRNA (viz dále).

3. *Průvodce (Guide)*

Cílem lncRNA je zde navádění transkripčních faktorů nebo komplexů modifikujících chromatin na konkrétní místa genomu, aby bylo docíleno aktivace, či naopak inhibice transkripce daných genů.

4. *Lešení (Scaffold)*

Některé lncRNA mají schopnost seskupit různé proteiny a vytvořit komplexy ribonukleoproteinů s vlastní funkcí. Komplexy pak mohou zasahovat do struktury chromatinu a modifikovat histony a zvyšovat genovou expresi (Wang a Chang 2011; Dai et al. 2019; Li et al. 2019a).



Obr. 8 ***Funkční mechanismy lncRNA****. 1. signál, 2. návnada, 3. průvodce, 4. lešení. Upraveno podle: Achour a Aguilo (2018).*

Regulace transkripce

Molekuly lncRNA mohou regulovat transkripci genů pomocí **remodelace struktury chromatinu**. Interagují s komplexy modifikujícími chromatin a navádí je do konkrétních oblastí genomu. Příkladem je lncRNA HOTAIR (HOX transcript antisense RNA), jejíž interakce s methyltransferázou PRC2 (polycomb repressive complex 2), resp. její podjednotkou EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), katalyzuje trimethylaci H3K27 (H3K27me3) (Dai et al. 2019). Ta je znakem transkripčně neaktivního chromatinu a nadbytek této modifikace již byl spojen s progresí HCC (Cai et al. 2011). Umlčení transkripce způsobuje také lncRNA XIST, která, jak již bylo řečeno, inaktivuje chromozom X v savčích samičích buňkách. Po transkripci v dosud aktivním chromozomu X rekrutuje PRC2 a H3K27me3, důsledkem je pak změna struktury chromatinu celého chromozomu X (Dai et al. 2019).

Dalším způsobem regulace transkripce je schopnost antisense lncRNA **přímo inhibovat transkripci** svých protilehlých (tedy sense) transkriptů. Inhibice dosahují prostřednictvím kompetice o RNAP II (Lanzafame et al. 2018), tvorbou RNA-DNA-DNA triplexů, které zamezují navázání komplexů zahajujících transkripci (Li et al. 2016b), či navazováním se na transportní proteiny transkripčních faktorů a blokováním jejich exportu z jádra (Lanzafame et al. 2018).

Posttranskripční regulace

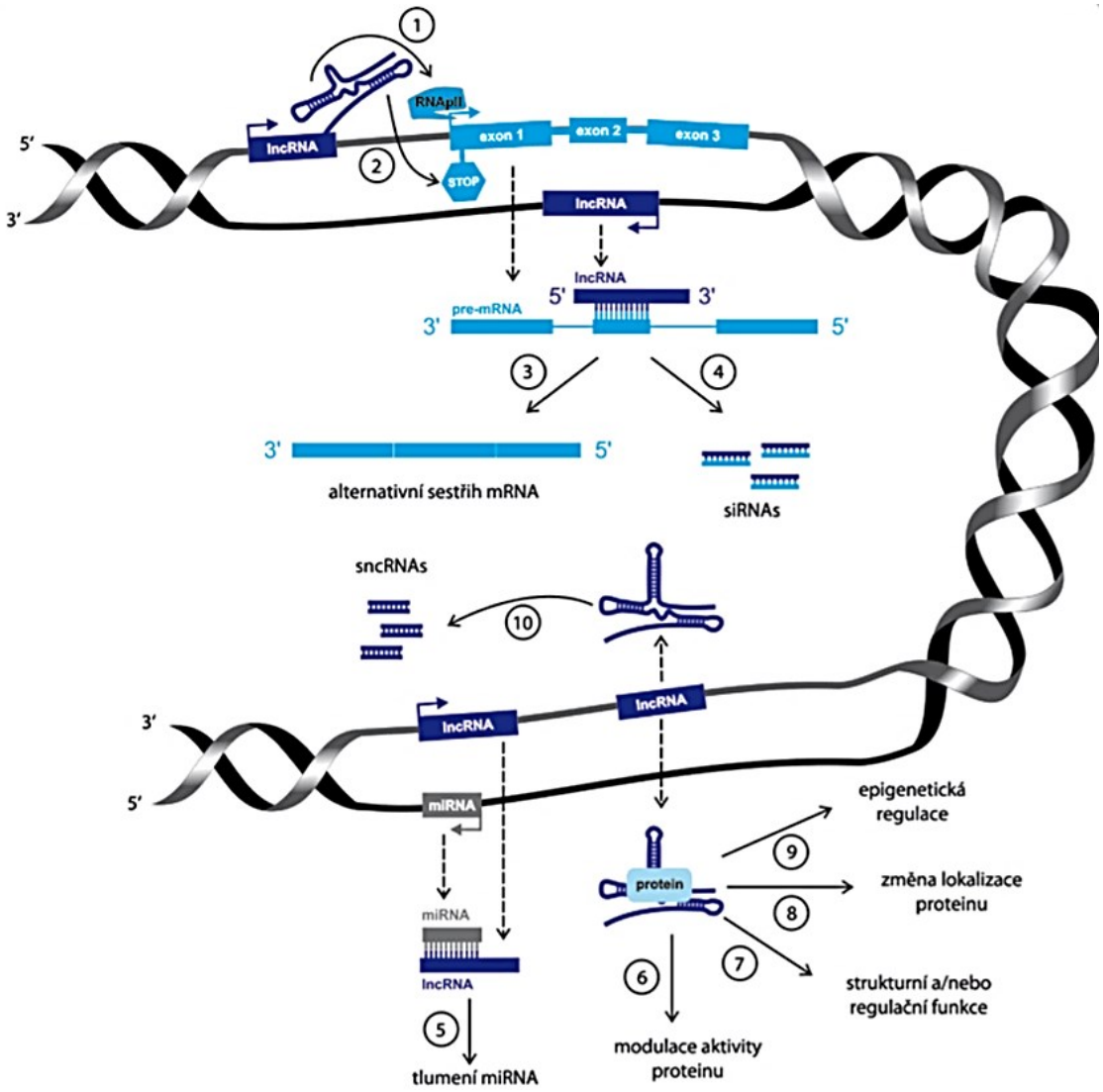
Alternativního sestřihu dosahují lncRNA interakcemi přímo se sestřihovými (splicing) faktory či tvorbou duplexů antisense lncRNA s mRNA (Fernandes et al. 2019). lncRNA MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) moduluje hladinu serin/arginin splicing faktorů. Interakcí s těmito faktory mění jejich distribuci v jaderných skvrnách (tzv. nuclear speckles), substrukturách v jádře, která jsou typické nahromaděnými splicing faktory (Tripathi et al. 2010). Podobných způsobem funguje také NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1) (Hutchinson et al. 2007).

Stabilitu mRNA mohou ovlivňovat lncRNA, které soutěží s mRNA o vazbu na miRNA. Tzv. „**miRNA sponging**“ je častým mechanismem působení lncRNA. Ty na základě komplementarity sekvence hybridizují miRNA a snižují tak jejich inhibiční působení na expresi genů (Lanzafame et al. 2018). Typickým příkladem lncRNA takto působících je HULC (highly up-regulated in liver cancer), který down-reguluje

miR-372. Snížení exprese miR-372 prostřednictvím interakce s HULC bylo zaznamenáno u osteosarkomu (Li et al. 2020), karcinomu děložního hrdla (Tornesello et al. 2020) i u HCC (Wang et al. 2010). Wang et al. navíc později (2017) prokázali, že interakce miR-372 s lncRNA PCAT14 (prostate cancer associated transcript 14) způsobuje methylaci této miRNA a vede k progresi HCC. Dalšími příklady lncRNA interagujícími s miRNA jsou již zmiňované NEAT1 a MALAT1 (Lanzafame et al. 2018). Některé lncRNA aktivují proteiny, které jsou schopny způsobit rozpad mRNA (Yao et al. 2019).

Na **stabilitu proteinů**, potažmo jejich množství, mají dopad lncRNA přímo modifikující tyto proteiny. Například lncRNA DINO (damage induced noncoding) stabilizuje známý tumor supresorový p53, jenž hraje klíčovou roli při regulaci buněčného dělení. Na proteinové úrovni regulace ovlivňují lncRNA taktéž **lokalizaci proteinů**. Například nukleární receptory, aby mohly zastávat svou funkci transkripčních faktorů, musí být přemisťovány do jádra. NF-κB (nukleární faktor kappa B) je transkripční faktor mnoha genů, který je za normálních okolností v cytoplazmě. Po stimulaci (např. cytokiny) je jedna z jeho podjednotek fosforylována a degradována. Další z podjednotek putuje do jádra, kde po navázání na specifickou sekvenci DNA může spouštět transkripci genů (He et al. 2019). NKILA (NF-kappaB interacting lncRNA) díky interakcím s NF-κB tvoří stabilní komplex a zabraňuje kináze tento transkripční faktor fosforylovat (Liu et al. 2015).

lncRNA mohou být také dále zpracovávány za tvorby sncRNA, zejm. pak miRNA (Achour a Aguilo 2018).



Obr. 9 ***Přehled funkcí lncRNA v lidském organismu****. 1, 2 – lncRNA regulují genovou expresi inhibicí RNA polymerázy II nebo remodelací chromatinu. 3, 4 – lncRNA mohou po navázaní na prekurzorovou mRNA (pre-mRNA) zapříčinit alternativní sestřih této mRNA nebo po štěpení pre-mRNA ribonukleázou Dicer vznik molekul malých interferujících RNA (siRNA). 5 – Hybridizace lncRNA s miRNA („miRNA sponging“) může způsobit tlumení funkcí miRNA. 6, 7, 8, 9 – lncRNA po vytvoření komplexu s proteinem mohou měnit aktivitu tohoto proteinu, jeho strukturu a lokalizaci a mohou regulovat epigenetické procesy. 10 – lncRNA mohou být taktéž prekurzory pro malé nekódující RNA (sncRNA) (Šána et al. 2012).*

3.11.4 Dlouhé nekódující RNA v patogenezi HCC

Ačkoliv narůstá počet nově objevovaných molekul lncRNA zapojených do patogeneze HCC, tak jako množství informací o nich, stále je známo poměrně málo o jejich přesné funkci a významu. Většina z nich je při analýzách u HCC up-regulována, vykazuje tedy onkogenní potenciál a podílí se na buněčné proliferaci, invazi a migraci (Lanzafame et al. 2018). Následující odstavec uvádí některé s HCC související lncRNA zapojené do patogeneze i jiných nádorových onemocnění, další řádky představují dosud nejlépe charakterizované lncRNA. Kapitolu uzavírají tabulky (viz Tab. 3 a Tab. 4) s výčtem nejčastěji u HCC deregulovaných lncRNA a molekulárních mechanismů jejich působení.

Výzkumy lncRNA MALAT1 ukázaly up-regulaci u karcinomu prostaty, prsu, plic, rakoviny pankreatu, kolorektálního karcinomu, osteosarkomu a dalších (El Khodiry et al. 2018; Sun a Ma 2019). Dysregulace H19 je významná při rozvoji rakoviny močového měchýře, prsu, plic, prostaty, cervikálního a kolorektálního karcinomu (Iempridee 2017; El Khodiry et al. 2018; Wang et al. 2020b). Exprese HOTAIR je markantně zvýšena zejména u karcinomu prsu a je silně asociována s invazí a metastazováním nádoru (Recillas-Targa 2015; Biswas a Desai 2017). Vysoké hodnoty exprese ANRIL byly zjištěny u karcinomu prostaty a žaludku (Zhao et al. 2018; Kangarlouei et al. 2019). Naproti tomu MEG3 díky inhibici proliferace, invaze a migrace působí jako tumorový supresor u rakoviny pankreatu a cervikálního karcinomu (Chen a Qu 2018; Ma et al. 2018b). GAS5 u rakoviny prsu a prostaty stimuluje apoptózu, chová se tedy také jako nádorový supresor (El Khodiry et al. 2018).

Onkogenní lncRNA u hepatocelulárního karcinomu

Jednou z dosud nejlépe charakterizovaných lncRNA podílejících se na vzniku HCC je **HOTAIR** (HOX transcript antisense RNA). Gen leží na chromozomu 12q13.13 uvnitř HOXC klastru. Váže komplexy LSD1 (lysine-specific histone demethylase 1) a PRC2, navádí je do místa působení a koordinuje demethylaci H3K4 a trimethylaci H3K27 cílových genů (Hajjari a Salavaty 2015). Yang et al. (2011) na souboru 110 vzorků od 60 pacientů s HCC po transplantaci jater hodnotili expresi HOTAIR pomocí kvantitativní reverzní real-time PCR transkripce (RT-qPCR). Hladina exprese ve vzorcích nádorové tkáně byla oproti zdravé tkáni značně zvýšena a její hodnota byla asociována s kratší dobou přežívání bez známek recidivy. Autoři jej vyhodnotili jako potenciální biomarker predikce rekurence HCC a jako možný cíl při terapii. Možnost

využití HOTAIR při cílení léčby potvrdili i Gao et al. (2016), exprese HOTAIR zde navíc korelovala s tvorbou metastáz, nízkou diferenciací nádoru a taktéž s časnou rekurencí.

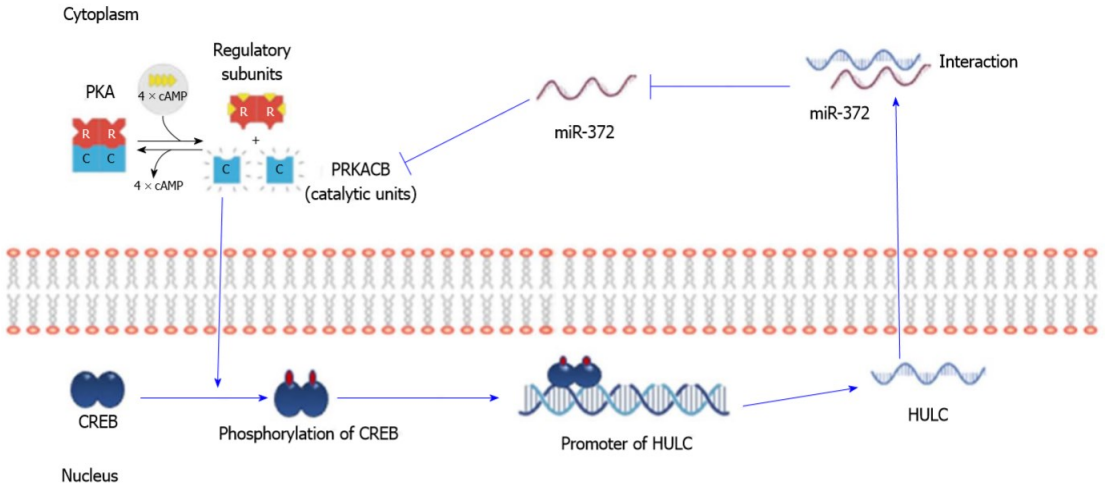
Up-regulace HOTAIR podporuje progresi, migraci a rekurenci tumoru prostřednictvím regulace Wnt/β-katenin signální dráhy (Gao et al. 2016). V jiné studii byla patrná asociace zvýšené exprese HOTAIR s metastazováním do lymfatických uzlin a *in vitro* testy ukázaly zapojení matrix metaloproteinázy-9 (MMP-9) a VEGF do progrese HCC (Geng et al. 2011). Nadměrná trimethylace H3K27, kterou HOTAIR katalyzuje, je taktéž spojena s progresí HCC, zejm. s vaskulární invazí a špatnou prognózou (Cai et al. 2011). Zvýšená exprese HOTAIR může být u HCC provázena supresí miR-122. Cheng et al. (2018) prokázali, že HOTAIR epigeneticky tlumí expresi miR-122 pomocí DNA methyltransferázou zprostředkované DNA methylace a navrhli regulační dráhu HOTAIR/mir-122 za cíl molekulární terapie HCC. Zajímavý poznatek o roli HOTAIR v glukózovém metabolismu přinesli Wei et al. (2017), kteří ve výsledcích studie uvádí, že HOTAIR stimuluje v HCC buňkách glykolýzu up-regulací glukózového transportéru GLUT1 aktivací mTOR dráhy nebo přímou vazbou na GLUT1.

HULC (highly up-regulated in liver cancer) byla první objevenou vysoce exprimovanou lncRNA u HCC (Panzitt et al. 2007). Nadměrně exprimována je i v séru pacientů, tudíž by mohla být slibným neinvazivním markerem časné diagnózy HCC (Xie et al. 2013; Li et al. 2015b). Podle zjištění Matouk et al. (2009) je nadexprese HULC asociována taktéž s jaterními metastázami u kolorektálního karcinomu.

Chronická hepatitida B je častou příčinou HCC a protein X viru hepatitidy B (HBx), který je virem produkován a je potřebný pro jeho replikaci, se podílí i na rozvoji HCC (Zhang et al. 2006). Proto se Du et al. (2012) zabývali otázkou, zda je HULC zapojený do hepatokarcinogeneze i prostřednictvím tohoto virového proteinu. Podle jejich výsledků je souvislost následující – HBx díky interakcím s transkripčním faktorem CREB (cAMP response element binding protein) up-reguluje expresi HULC, což vede cestou inhibice tumor supresorového p18 k nadměrnému množení buněk. HULC se také často váže na miRNA a reguluje tak celou řadu signálních drah. Potlačováním aktivity miR-372 lze docílit zvýšení exprese PRKACB (protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta) vedoucí k fosforylaci faktoru CREB, který se

ve fosforylované formě váže na promotor HULC a aktivuje jeho expresi (Wang et al. 2010). Právě popsané aktivity lze shrnout do autoregulační smyčky CREB/HULC/miR-372/PRKACB/CREB/HULC, která je v konečném důsledku zodpovědná za buněčnou proliferaci (El Khodiry et al. 2018). Schematické znázornění smyčky předkládá Obr. 10. Další miRNA, na kterou se HULC váže, je miR-200a-3p. Její supresí zprostředkovává HULC up-regulaci ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) a následně epitelo-mezenchymální tranzici (EMT). Ta je mechanismem v normálním stavu fyziologickým, při deregulaci však přispívá k metastazování transformovaných buněk krevním oběhem do různých tkání a podílí se tedy na progresi HCC (Li et al. 2016a). Angiogenezi nádoru může HULC potencovat inhibicí miR-107. Ta up-reguluje transkripční faktor E2F1 a nakonec aktivuje SPKHK1 (sphingosine kinase 1) (Lu et al. 2016). Další mechanismus hepatokarcinogeneze popsali Xin et al. (2018). Podle nich HULC potlačuje expresi a dozrávání miR-15a a aktivuje signální dráhu PI3K/Akt/mTOR inhibicí jejího stěžejního regulátoru PTEN.

HULC se může podílet na karcinogenezi i regulací genů cirkadiánních rytmů. Vazbou k 5′ UTR mRNA cirkadiánního regulátoru CLOCK (clock circadian regulator) jej up-reguluje a narušuje tak v hepatocytech pravidelnost jeho exprese (Cui et al. 2015).



Obr. 10 ***Autoregulační smyčka CREB/HULC/miR-372/PRKACB/CREB/HULC vedoucí k proliferaci buněk*** *(El Khodiry et al. 2018)*

MALAT 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) neboli NEAT2 (nuclear enriched abundant transcript 2) je lokalizován zejména v jaderných skvrnách (nuclear speckles). Jeho funkce při regulaci genové exprese spočívá v regulaci distribuce pre-mRNA sestřihových faktorů v jaderných skvrnách (Tripathi et al. 2010). Zvýšená exprese MALAT1 je spojena s časnou rekurencí HCC po transplantaci jater, *in vitro* došlo po inhibici MALAT1 v buněčné linii HepG2 ke snížení motility, životnosti a invazivity buněk a ke zvýšení jejich citlivosti k apoptóze (Lai et al. 2012).

Tak jako HULC, i MALAT1 se může podílet na proteinem HBx mediované karcinogenezi. Ve studii Hou et al. (2017) byla exprese MALAT1 v HCC tkáních zvýšena a korelovala s hladinou exprese HBx. Autoři také popsali jeden z mechanismů karcinogeneze – MALAT1 stimuluje expresi proteinu LTBP3 (latent transforming growth factor β-binding protein 3), ten je up-regulován i virovým proteinem HBx, tudíž lze hovořit o regulační ose HBx–MALAT1/LTBP3, jejíž aktivace podněcuje růst a metastazování nádoru.

MALAT1 také reguluje expresi ZEB1 vazbou na miR-143-3p, čímž podporuje invazi a migraci HCC buněk (Chen et al. 2017b), supresí miR-146b-5p přispívá k růstu a metastazování nádoru, jelikož fyziologicky tato miRNA vazbou na TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) inhibuje fosforylaci Akt (Li et al. 2017b).

Mimo regulace tumorigeneze u HCC hraje MALAT1 roli také v průchodu buněčným cyklem hematopoetických buněk. Při *in vitro* experimentu stimuloval přestup z G1 do S fáze buněčného cyklu, potažmo tedy proliferaci hepatocytů. Během normálního postupu buněčným cyklem však nebyla jeho hladina abnormální. Proto se zdá, že lncRNA MALAT1 je důležitá i pro regeneraci jater. Podle této studie dosahuje MALAT1 proliferace buněk cestou aktivace Wnt/β-katenin signální dráhy, konkrétně supresí axinu a APC, čímž se snižuje stabilita proteazomového komplexu, β-katenin je z něj uvolněn a přesouvá se do jádra, kde zesiluje transkripci c-Myc a cyklinu D1. Navíc se ukázalo, že by s MALAT1 mohl být asociován protein p53, neboť během regenerace jater jej down-reguloval (Li et al. 2017a).

Imprintovaný gen pro lncRNA **H19** je ve vazbě s genem pro IGF2 a leží na chromozomu 11p15.5. *H19* je normálně exprimován z maternální alely, *IGF2* z paternální alely. H19 je exprimován při embryogenezi, ale poté je fyziologicky ve většině tkání jeho exprese potlačena. V postnatálním období je H19 exprimován ve velkém množství v játrech, podílí se tedy pravděpodobně na jejich vývoji. Je prekurzorem pro miR-675. Hraje roli při regulaci buněčné proliferace a diferenciace (Pope et al. 2017).

Ačkoliv již byla up-regulace H19 spojena s růstem a metastazováním řady nádorů, dosud není zcela jasné, zda jej v patogenezi HCC zařadit spíše do kategorie onkogenů, či nádorových supresorů. Zhang et al. (2013) došli ke zjištění, že lncRNA H19 se může asociovat s proteinovým komplexem hnRNP U/PCAF/RNAPol II a acetylací histonů aktivovat členy rodiny miR-200 (miR-200a, miR200b, miR-200c, miR-141 a miR-429). Tito down-regulují své cílové geny *ZEB1* a *ZEB2*, což může následně vést k inhibici EMT a metastazování. Jiná studie (Lv et al. 2014) ukázala, že down-regulace H19 a miR-675 může vést k migraci a invazi buněk HCC. Naproti tomu výsledky z analýzy 457 vzorků spojily zvýšenou expresi H19 s agresivitou nádoru – konkrétně s migrací a invazí HCC buněk cestou aktivace osy H19/miR-193b/MAPK1 (Ye et al. 2020). Podle Li et al. (2019b) H19 interakcí s miR-22 podporuje rozvoj HCC vzniklého na podkladu hepatitidy B. Up-regulace v nádorové tkáni pozitivně korelovala s metastázami a negativně s dobou přežití.

Tumor supresorové lncRNA u hepatocelulárního karcinomu

MEG3 (maternally expressed gene 3) je běžně exprimován v normálních tkáních, naopak jeho snížená exprese je spojena s množstvím nádorových onemocnění. I u HCC je jeho exprese potlačena. Transkripční faktor NF-κB může vazbou na promotorovou oblast MEG3 přímo regulovat transkripci MEG3. Při up-regulaci MEG3 vazbou na miR-664 inhibuje proliferaci HCC buněk (He et al. 2017). Ve studii Li et al. (2017d) byla společně s MEG3 v HCC tkáních snížena i exprese miR-26a. miR-26a má zde charakter nádorového supresoru, který cestou down-regulace DNA methyltransferázy 3B (DNMT3B) a následnou up-regulací MEG3 inhibuje migraci, proliferaci a invazi HCC buněk. Podobně miR-29a může regulovat expresi MEG3 modulací DNMT1 a DNMT3 (Braconi et al. 2011).

Zhang et al. (2019) se zaměřili na objasnění vztahu MEG3 a miR-10a-5p k progresi HCC. Exprese MEG3 byla, tak jako v ostatních studiích, v HCC tkáních snížena, exprese miR-10a-5p byla v nádorové tkáni, oproti zdravé tkáni, zvýšena. Nadexprese MEG3 snížila proliferaci, migraci a invazi HCC buněk *in vitro* a taktéž stimulovala apoptózu těchto buněk. Dále podpořila expresi PTEN a proteinu p53 a snížila expresi Akt, miR-10a-5p a matrix metaloproteinázy-2 a -9. miR-10a-5p vazbou na 3′ UTR mRNA PTEN tlumila expresi proteinu PTEN. Autoři tedy objasnili další mechanismus přispívající k rozvoji HCC, který lze shrnout MEG3 regulovanou osou PTEN/Akt/MMP-2/-9, včetně interakce MEG3 s miR-10a-5p. Rovněž podle Zhu et al. (2015) MEG3 interaguje s proteinem p53, čímž stimuluje jeho aktivitu při regulaci transkripce jeho cílových genů.

GAS5 (growth arrest-specific transcript 5) je lncRNA zapojená do kontroly průchodu buněčným cyklem a do procesu apoptózy. Snížená exprese je spojena s horší prognózou, s akcelerovaným růstem a s nižší diferenciací tumoru a s metastazováním, včetně tvorby metastáz v lymfatických uzlinách (Li et al. 2017c). Nadexprese GAS5 vedla k významnému útlumu proliferace a invaze a stimulovala apoptózu HCC buněk. V téže studii navíc autoři demonstrovali, že GAS5 negativně reguluje expresi vimentinu, jež následně vede k supresi proliferace HCC buněk (Chang et al. 2016). Vimentin patří do rodiny proteinů intermediárních filament a jeho hlavní funkcí je udržování integrity buněk a tkání. Je hojně exprimován v mezenchymálních buňkách, a proto jej lze považovat za marker EMT. Může přispívat k invazivitě nádoru a k horší prognóze nádorových onemocněních (Satelli a Li 2011). GAS5 plní svou roli nádorového supresoru například také inhibicí miR-21, jejíž cílovou molekulou je PTEN. Zvýšená exprese PTEN vedla k supresi invaze a migrace HCC buněk (Hu et al. 2016; Wang et al. 2020a).

Tab. 3 ***Onkogenní lncRNA u hepatocelulárního karcinomu***

lncRNA	Třída	Lokalizace	Archetyp	Fenotyp HCC	Molekulární mechanismus	Reference
ANRIL	antisense	9p21.3	lešení, průvodce, návnada	proliferace, invaze	ANRIL/PRC2/KLF2 (Krüppel-like factor 2) ANRIL/miR-122-5p ANRIL/miR-144/PBX3 → blokace PI3K/Akt dráhy	(Huang et al. 2015) (Ma et al. 2018a) (Ma et al. 2019)
CCAT1	mezigenová	8q24.21	návnada	proliferace, migrace, invaze	CCAT1/let-7/HMGA2 a c-Myc CCAT1/miR-490-3p/CDK1 (cyclin-dependent kinase 1)	(Deng et al. 2015) (Dou et al. 2017)
CCAT2	mezigenová	8q24.21	návnada	proliferace, invaze, metastazování	CCAT2/vimentin, Snail2 → EMT CCAT2/miR-134a/ FOXM1 (forkhead box protein M1) CCAT2/miR-145/MDM2 (mouse double minute 2 homolog)	(Xu et al. 2017) (Chen et al. 2017a) (Niu et al. 2020)
DANCR	mezigenová	4q12	návnada	invaze, metastazování	DANCR/*CTNNB1* (resp. β-katenin) → blokace represivního účinku miR-214, miR-320a, miR-199a na *CTNNB1*	(Yuan et al. 2016)

H19	mezigenová	11p15.5	návnada, lešení	migrace, invaze	H19/miR-193b/MAPK1 → migrace a invaze H19/miR-22	(Ye et al. 2020) (Li et al. 2019b)
HOTAIR	antisense	12q13.13	lešení	migrace, invaze, metastazování	HOTAIR/Wnt a β-katenin HOTAIR/MMP-9 a VEGF → metastazování HOTAIR/miR-122/cyklin G1 HOTAIR/mTOR/GLUT1 nebo HOTAIR/GLUT1 → stimulace glykolýzy	(Gao et al. 2016) (Geng et al. 2011) (Cheng et al. 2018) (Wei et al. 2017)
HULC	mezigenová	6p24.3	návnada, lešení	proliferace, metastazování, angiogeneze	HBx–CREB/HULC/p18 → proliferace HULC/miR-372/PRKACB/CREB/HULC → proliferace HULC/miR-200a-3p/ZEB1 → EMT HULC/miR-107/E2F1/SPKHK1 → angiogeneze HULC/miR-15a HULC/PTEN/PI3K/Akt/mTOR HULC/CLOCK	(Du et al. 2012) (Wang et al. 2010) (Li et al. 2016a) (Lu et al. 2016) (Xin et al. 2018) (Xin et al. 2018) (Cui et al. 2015)

MALAT1	mezigenová	11q13.1	návnada	migrace, proliferace, invaze, metastazování	(HBx–)MALAT1/LTBP3 → růst a metastazování MALAT1/miR-143-3p/ZEB1 → invaze a migrace MALAT1/miR-146b-5p/TRAF6/Akt → růst a metastazování MALAT1/p53	(Hou et al. 2017) (Chen et al. 2017b) (Li et al. 2017b) (Li et al. 2017a)
NEAT1	mezigenová	11q13.1		proliferace, metastazování, invaze	NEAT1/miR-485/STAT3 → migrace, invaze NEAT1/miR-124-3p/ATGL (adipose triglyceride lipase) → narušení lipolýzy v HCC buňkách NEAT1/miR-139-5p/TGF-β1 → migrace, invaze, růst HCC buněk	(Zhang et al. 2018) (Liu et al. 2018a) (Tu et al. 2018)
PVT1	mezigenová	8q24.21	lešení	proliferace, invaze, migrace	PVT1/miR-186-5p PVT1/EZH2/miR-214	(Lan et al. 2017) (Gou et al. 2017)
XIST	mezigenová	Xq13.2	průvodce, návnada	proliferace, invaze, metastazování	XIST/ miR-194-5p/MAPK1 XIST/miR-181a/PTEN	(Kong et al. 2018) (Chang et al. 2017)

Tab. 4 ***Tumor supresorové lncRNA u hepatocelulárního karcinomu***

lncRNA	Třída	Lokalizace	Archetyp	Fenotyp HCC	Molekulární mechanismus	Reference
GAS5	antisense	1q25.1	návnada, lešení	proliferace, metastazování, invaze, migrace	GAS5/vimentin → apoptóza, suprese metastazování (EMT) GAS5/miR-21/PTEN → suprese invaze a migrace	(Chang et al. 2016) (Hu et al. 2016; Wang et al. 2020a)
H19	mezigenová	11p15.5	návnada, lešení	metastazování, migrace, invaze	H19/hnRNP U/PCAF/RNAPol II/miR-200/ZEB1 a ZEB2 → inhibice EMT a metastazování H19/miR-675 → suprese migrace a invaze	(Zhang et al. 2013) (Lv et al. 2014)
MEG3	mezigenová	14q32.2	návnada, lešení	proliferace, invaze, metastazování	MEG3/miR-664 → inhibice proliferace miR-26a/DNMT3B/MEG3 →inhibice migrace, proliferace a invaze miR-29a/DNMT1 a DNMT3/MEG3 MEG3/PTEN/Akt/MMP-2/-9 MEG3/miR-10a-5p MEG3/p53	(He et al. 2017) (Li et al. 2017d) (Braconi et al. 2011) (Zhang et al. 2019) (Zhang et al. 2019) (Zhu et al. 2015)
XIST	mezigenová	Xq13.2	návnada	proliferace, invaze, metastazování	JPX/XIST/miR-155-5p	(Lin et al. 2018)

3.11.5 Metody stanovení dlouhých nekódujících RNA

Zpočátku byla nejužívanější metodou k analýze exprese genů kvantitativní PCR (qPCR). Nyní je také velmi používanou metodou (viz dále), avšak je vhodná spíše pro analýzu menšího množství genů. Čipové technologie (microarrays), jež jsou založeny na hybridizaci nukleové kyseliny s komplementárními sondami umístěnými na pevném podkladu, naproti tomu přinesly možnost i celogenomové analýzy exprese. Metody založené na mikročipech jsou levné a poskytují velké množství dat, na druhou stranu však skýtají riziko nespecifické vzájemné cross-hybridizace při velké podobnosti sekvencí a riziko snížené přesnosti detekce kvantity při analýze velmi slabě či naopak velmi vysoce exprimovaných genů. Navíc je u těchto metod třeba znát zkoumanou sekvenci, což je vylučuje pro identifikaci nových RNA. Ke značnému posunu v transkriptomice došlo po představení **sekvenování nové generace (NGS)**, které umožnilo přímé sekvenování všech transkriptů buňky. RNA-seq, jak je toto sekvenování označováno, je dnes nejčastější metodou při identifikaci nových lncRNA. Mimo analýzy genové exprese a objevu nových RNA umožňuje tato technika také detailnější detekci genů podléhajících alternativnímu sestřihu a detekci alelově specifické exprese (Kukurba a Montgomery 2015; Chatterjee et al. 2018). Navíc ji lze využít taktéž pro studium interakcí RNA s proteiny a dalšími RNA molekulami, což také pomáhá prohlubovat znalosti o translaci a transkripci a získávat informace o struktuře těchto molekul (Stark et al. 2019).

Detaily v postupu při RNA-seq se mezi jednotlivými experimenty mohou lišit, základní princip však zůstává. Po extrakci RNA z biologického materiálu směřuje další zpracování k vytvoření sekvenační knihovny. Podtypy RNA jsou izolovány podle různých parametrů v závislosti na požadovaném typu RNA. Na základě velikosti lze izolovat RNA pro sekvenování miRNA, výběr RNA s poly(A) koncem umožňuje sekvenaci mRNA. Odstranění ribosomální RNA (ribo-depletion), která zaujímá přes 95 % z RNA v buňce, je vhodné pro sekvenování mRNA, pre-mRNA a ncRNA (Kukurba a Montgomery 2015).

Získaná RNA je poté reverzní transkripcí konvertována na komplementární DNA (cDNA). Ta je fragmentována na úseky určité délky a na 5′ i 3′ konce fragmentů jsou navázány adaptéry. Jeden z nich slouží k přichycení na skleněnou destičku, adaptér na druhém konci fragmentu pak k detekci při následné amplifikaci prováděnou PCR metodou (Kukurba a Montgomery 2015). Rozšířenou platformou NGS užívanou

ve výzkumných laboratořích je technologie Illumina. K amplifikaci používá můstkovou PCR, která generuje klastry jednotlivých fragmentů DNA. Po vytvoření klastrů již lze přistoupit k samotnému sekvenování. Fluorescenčně značené nukleotidy (A, T, C, G) jsou inkorporovány do nově vznikajícího řetězce a zároveň jsou v tomto okamžiku i detekovány. V každém cyklu je začleněn pouze jeden z nich, což je zajištěno terminačním označením každého z dodávaných nukleotidů. Po detekci je fluorescenční značka enzymaticky odštěpena, což umožňuje další kolo inkorporace (Illumina, Inc. 2017).

Během klasického postupu, kdy jsou knihovny tvořeny z obou cDNA vláken, se při sekvenování informace o orientaci vláken ztrácí. Pro analýzu nových transkriptů je však rozlišení sense a antisence vlákna potřeba a lze jej docílit např. označením druhého vlákna cDNA během jeho syntézy pomocí deoxy-UTP (dUTP) (Kukurba a Montgomery 2015). Také nízkou hladinu exprese lncRNA je třeba mít na paměti, proto se při jejich identifikaci provádí hluboké sekvenování s obvykle kolem 100–150 miliony, příp. i více, čteními (ready) (Fang a Fullwood 2016).

Po sekvenování následuje analýza získaných dat. Hrubá data mohou být uložena do archivů databáze NCBI – Gene Expression Omnibus (GEO, *https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/*) nebo Sequence Read Archive (SRA, *https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra*), kde jsou jim přiřazena identifikační čísla a mohou být použita i v dalších experimentech jiných autorů. Hrubá výstupní data jsou po sekvenování upravována a filtrována (odstranění adaptérů a readů s nízkou kvalitou). Krátké ready jsou poté mapovány na referenční genom nebo transkriptom. Pokud není k dispozici referenční sekvence, jsou spojovány překrývající se konce *de novo* (Kulski 2016; Chatterjee et al. 2018). Identifikace lncRNA probíhá na základě filtrování podle konkrétních kritérií, např. odstranění transkriptů kratších než 200 bp či transkriptů s protein kódujícím potenciálem (Pu et al. 2020).

Dalším krokem je zisk informace o míře exprese transkriptů/genů, kterou spočítá software na základě počtu readů na ně namapovaných a normalizovaných na jejich délku a na celkový počet readů. Hlavním cílem většiny RNA-seq je analýza diferenciální exprese, tedy identifikace genů odlišně exprimovaných mezi dvěma či více skupinami, např. mezi tkání nádorovou a zdravou kontrolní (Krejčí et al. 2015; Chatterjee et al. 2018).

Pro validaci identifikovaných lncRNA po RNA-seq může posloužit **kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR)**, jež je metodou velmi citlivou. Zároveň jde však o metodu nízkokapacitní a jak již bylo zmíněno, vhodnější pro analýzu exprese menšího množství genů (Chatterjee et al. 2018). Při svých experimentech ji pro detekci a stanovení exprese konkrétních lncRNA také využívala většina autorů příslušných prací citovaných v této diplomové práci.

Běžným postupem je extrakce RNA z nádorové a přilehlé nenádorové tkáně a syntéza cDNA, která slouží jako templát pro PCR reakci. Díky genově specifickým primerům je pak amplifikován požadovaný úsek cDNA. Real-time PCR je klasickou PCR metodou, avšak cycler zde zaznamenává množství DNA kontinuálně během každého cyklu. Detekován je fluorescenční signál, který vyzařují fluorescenčně značené sondy vždy při navázání na DNA, jeho síla koresponduje s množstvím výchozího templátu. Obvykle se provádí relativní kvantifikace, která slouží k porovnání hladin exprese genů mezi např. tkání nádorovou a nenádorovou a hodnotí se jako x-násobná změna exprese nebo jako významná a nevýznamná změna exprese. Funkci vnitřní kontoly zastávají referenční geny (nebo také „housekeeping“ geny), které pomohou korigovat výsledky při nestejném množství použitého vstupního materiálu (Wagner 2013). Při analýze exprese lncRNA autoři používají většinou jako referenční geny GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) nebo β-aktin (Fu et al. 2019; Wang et al. 2010; Xin et al. 2018).

3.11.6 Databáze dlouhých nekódujících RNA

Kvůli kumulaci nově experimentálně identifikovaných lncRNA a informací o jejich funkcích, expresních profilech a interakcích je třeba veřejně dostupných databází, které budou tato data přehledně shromažďovat a poskytovat kvalitní zdroj informací pro další výzkumy v oblasti lncRNA (Iwakiri et al. 2016).

Nejobsáhlejší databází genů je **GENCODE** (*https://www.gencodegenes.org/*), jež je součástí projektu ENCODE, a jejímž cílem je identifikace všech genů lidského a myšího genomu. Lidská verze, GENCODE 33 (16. 01. 20), obsahuje celkem 60 662 genů, z toho 17 952 lncRNA genů pro 48 438 lncRNA transkriptů. Myší databáze verze M24 obsahuje 13 197 lncRNA genů a 18 864 transkriptů lncRNA. **NONCODE** (*http://www.noncode.org/*) je největší databází zaměřenou na nekódující RNA (s výjimkou tRNA a rRNA) čítající informace o ncRNA 17 druhů – např. člověk,

šimpanz, myš, prase, krysa, kráva, háďátko obecné. Poskytuje základní údaje typu lokalizace, počet exonů, délka, sekvence, ale také expresní profil či předpokládané funkce a spojitost s onemocněními. Tyto informace získává z jiných databází, veřejně dostupné literatury a ze starších verzí NONCODE. Verze 5.0 obsahuje 172 216 lncRNA u lidí transkribovaných z 96 308 lncRNA genů (Fang et al. 2018). Další obsáhlou databází pro lncRNA je např. **LncRBase** (*http://bicresources.jcbose.ac.in/zhumur/lncrbase/*).

K získání informací o struktuře lncRNA může sloužit **LNCipedia** (*https://lncipedia.org/*), která poskytuje informace o 127 802 transkriptech a 56 946 genech (verze 5.2). Mimo základních údajů je to navíc potenciál ke kódování proteinů, konzervace lokusu a informace o sekundární struktuře a vazebných místech pro miRNA (Volders et al. 2019).

Databáze **LncRNADisease** (*http://www.rnanut.net/lncrnadisease/*) je zaměřena na propojení konkrétních lncRNA s onemocněními a mapuje interakce mezi lncRNA, miRNA a mRNA. Data získává z experimentálních prací nebo pomocí výpočetních metod. Verze 2.0 obsahuje celkem 19 166 lncRNA z člověka, myši, potkana a kura, 10 564 experimentálně podpořených asociací lncRNA s onemocněními, z nichž 94,68 % se týká člověka. Nejčastější asociace jsou zde s nádorovými (44,2 %), kardiovaskulárními (11,6 %) a neurodegenerativními onemocněními (7,3 %) (Bao et al. 2019).

3.11.7 Predikce interakcí dlouhých nekódujících RNA

Funkce lncRNA a jimi zprostředkované regulace různých buněčných procesů mohou být charakterizovány díky poznatkům o interakcích s proteiny a interakcích s dalšími RNA, především s miRNA. Ty jsou umožněny existencí vazebných míst pro miRNA lokalizovaných v 3' UTR oblastech lncRNA (Yotsukura et al. 2017).

MiRcode (*http://www.mircode.org/*) je jedním z nástrojů pro predikci miRNA vazebných míst u lncRNA. Vychází z komplementarity s vazebnou oblastí, evoluční konzervace a anotací z databáze GENCODE. Nyní (verze MiRcode 11) obsahuje více než 10 000 lidských genů pro lncRNA (Yotsukura et al. 2017).

Pro predikci interakcí mezi lncRNA-lncRNA a lncRNA-mRNA u myší nebo lidí lze využít **LncRRIsearch** (*http://rtools.cbrc.jp/LncRRIsearch/*). Tento nástroj navíc

poskytuje data o tkáňově specifické expresi a subcelulární lokalizaci daných lncRNA (Fukunaga et al. 2019).

Uživatelsky příjemnou volbou je **spongeScan** (*http://spongescan.rc.ufl.edu/*), což je webová aplikace, která identifikuje a vizualizuje vazebná místa v lncRNA, pomocí nichž se mohou vázat k miRNA (Furió-Tarí et al. 2016).

DIANA-LncBase (*https://diana.e-ce.uth.gr/lncbasev3*) je databází, která sbírá data o interakcích z již publikovaných článků. Verze 3 obsahuje asi 240 000 lncRNA-miRNA buněčně a tkáňově specifických interakcí u lidí a myší. Ty jsou předloženy v podobě textové i interaktivní grafické (Karagkouni et al. 2020).

Nástrojem specializovaným na interakce lncRNA s proteiny je **lncPro** (*http://bioinfo.bjmu.edu.cn/lncpro/*), který predikuje vazby na základě výpočtů vycházejících ze sekundární struktury, vodíkových vazeb a Van der Waalsových interakcí (Lu et al. 2013).

4 DISKUSE

Pokroky v sekvenování nové generace poskytují možnost charakterizovat etiologické faktory mnohých onemocnění, a to z oblasti genomiky i epigenetiky. Oblasti epigenetiky, zejména v souvislosti s nádorovými onemocněními, je v posledních letech věnována velká pozornost, nejinak je tomu u nejčastějšího primárního tumoru jater, hepatocelulárního karcinomu. Velmi studovanou a poměrně krátkou dobu známou skupinou molekul jsou dlouhé nekódující RNA, jimž je tato práce věnována. Oblastem mikroRNA a cytochromů P450 byl v práci také vyčleněn prostor, neboť se prolínají s hlavním tématem. Informace byly získány zejména z aktuálních přehledových článků a původních publikací převážně zahraničních expertů.

Dlouhé nekódující RNA regulují expresi genů na úrovni transkripční i posttranskripční. Podílejí se na regulaci proliferace, invaze, migrace i na kontrole apoptózy. Jejich hladina v tkáních či tělních tekutinách je často deregulovaná u nádorových onemocnění a koreluje s progresí nádoru. Vzhledem k účasti v uvedených procesech se mohou lncRNA chovat jako onkogeny nebo nádorové supresory. Výzkumné týmy postupně odhalují molekulární mechanismy jejich působení a často se jedná o příklady potvrzené pouze jednotlivými studiemi. Mezi všemi dosud identifikovanými lncRNA, jichž je aktuálně dle databáze NONCODE 172 216 (z 96 308 lncRNA genů) (Fang et al. 2018), patří mezi nejlépe charakterizované onkogenní HOTAIR, HULC a MALAT1 se zvýšenou hladinou exprese a tumor supresorové MEG3 a GAS5, jejichž hladiny bývají u HCC snížené.

I v případě lncRNA s poměrně bohatými daty o molekulárních mechanismech působení však jsou i takové, u nichž se autoři neshodují na jejich základní roli v patogenezi HCC. Zajímavé je například nejasné zařazení lncRNA H19, jelikož podle výsledků některých studií podporuje rozvoj karcinomu (Li et al. 2019b; Ye et al. 2020), podle jiných působí naopak jako protektivní faktor (Zhang et al. 2013; Lv et al. 2014). Tyto diskrepance by mohly být z důvodu rozdílného designu studií, např. použití různých buněčných linií nebo vzorků od malého počtu pacientů, navíc např. ve studii Zhang et al. (2013) byla H19 exprimována výrazněji v okolí nádorové tkáně, tedy dalším důvodem může být různá míra exprese v různých částech analyzovaných tkání. U genetických analýz nádorových vzorků je v každém případě nesmírně důležité použití relevantní referenční tkáně či např. genomu – nejlépe s nádorem nezastižené okolní

tkáně, či tkání s pro daného pacienta normálním genomem (pro odlišení patologických somatických mutací).

S přibývajícími studiemi je stále jasnější, že lncRNA fungují v rámci velmi složitých regulačních sítí, v nichž interagují s dalšími RNA, s DNA i proteiny. Velký význam v odhalování těchto interakcí asociovaných s určitými patologickými stavy pak spočívá v pochopení molekulární podstaty jejich působení. To je jedním z předpokladů pro identifikaci molekul použitelných pro diagnostiku a pro vývoj nových cílených léků, které by zlepšily prognózu onemocnění.

Na základě informací získaných během psaní této práce by potenciálními biomarkery pro včasnou diagnostiku HCC mohla být teoreticky většina s HCC asociovaných lncRNA, pokud jejich expresní hladiny korelují s klinickými a patologickými nálezy pacientů. V praxi by pak byly velmi vhodnou volbou lncRNA cirkulující v krevním oběhu (Klingenberg et al. 2017).

Mimo již vcelku dobře charakterizované lncRNA, jako jsou např. HOTAIR (Yang et al. 2011; Gao et al. 2016), HULC (Li et al. 2015b) a MALAT1 (Lai et al. 2012), jsou zde i další lncRNA, které by potenciálně mohly sloužit pro diagnostiku či predikci vývoje HCC. Kupříkladu zvýšené hladiny SNHG15 (small nucleolar RNA host gene 15) (Shuai et al. 2020), UCA1 (urothelial carcinoma-associated 1) (Zheng et al. 2018), PCAT1 (prostate cancer associated transcript 1) (Yan et al. 2015b), PVT1 (plasmacytoma variant translocation 1) (Yu et al. 2016) korelovaly se závažností klinických příznaků a se špatnou prognózou.

Také byly pro tento účel navrženy kombinace více ukazatelů. Podle Li et al. (2015b) má HULC společně s lncRNA Linc00152, jejichž plazmatické hladiny byly ve studii velmi zvýšeny, senzitivitu 79,8 % a specificitu 90,4 %. V kombinaci s AFP by měly ještě lepší schopnost diagnostiky HCC. Měření PVT1 společně s uc002mbe.2 v séru ukázalo senzitivitu 60,6 % a specificitu 90,6 %, navíc v kombinaci s měřením hladiny AFP by dosáhla čísel vyšších (Yu et al. 2016). Kamel et al. (2016) provedli analýzu exprese lncRNA UCA1, WRAP53 a AFP v séru. Obě lncRNA měly senzitivitu 95,1 %, specificitu 82,1 % a přidání hodnoty AFP zvýšilo senzitivitu dokonce na 100 %.

Potenciál pro využití v léčbě HCC mají lncRNA také. Jejich exprese je tkáňově specifická, v porovnání s mRNA je nízká, což umožňuje podání nižších terapeutických

dávek a zmírnit tak případnou toxicitu (Klec et al. 2019). Jedním z možných přístupů je inhibice onkogenních lncRNA mířením na jejich primární strukturu. K tomuto by mohly být využity malé interferující RNA (siRNA) nebo antisense oligonukleotidy (ASO). Lennox a Behlke (2016) zjistili, že v jádře lokalizované lncRNA (MALAT1 a NEAT1) byly účinněji potlačeny při použití ASO a cytoplazmatické lncRNA (DANCR a OIP5-AS1) efektivněji inhibovaly siRNA. To by mohlo souviset s tím, že RNáza H, která štěpí DNA-RNA komplex vytvořený po vazbě ASO s lncRNA, bývá primárně umístěna v jádře. Naopak RISC, komplex proteinu AGO2 a siRNA, který následně down-reguluje cílovou lncRNA, se uplatňuje převážně v cytoplazmě (Huang et al. 2020). Alternativou pro inhibici onkogenních lncRNA by mohlo být využití tumor supresorových funkcí některých lncRNA. Například Zhou et al. (2016) při svém výzkumu demonstrovali terapeutický potenciál lncRNA PRAL (p53 regulation associated lncRNA). Její gen byl pomocí adenovirového vektoru vnesen do tkáně napadené HCC u myši a stabilizoval protein p53.

Cheng et al. (2018) zjistili, že HOTAIR inhibuje miR-122 a navrhli využití těchto molekul jako cílů pro molekulární terapii HCC. mir-122 je zároveň cílem anti-HCV léčiva miravirsen (zatím ve fázi klinických studií), neboť bylo prokázáno, že podporuje replikaci viru v jaterních buňkách. Vyvstává zde tedy otázka, zda by na HOTAIR mohlo být mířeno při léčbě virové hepatitidy C nebo při léčbě HCC. Navíc při dlouhotrvající terapii existuje riziko vzniku rezistence na miravirsen, tudíž by teoreticky lncRNA HOTAIR mohla být schopna rezistenci překonat (Fu a Calin 2018).

Cytochromy P450 jsou hlavními enzymy první fáze biotransformace, která zprostředkovává detoxifikaci nebo aktivaci endogenních i exogenních látek a ovlivňuje tak biologické účinky těchto sloučenin. Při poškození jaterní tkáně při HCC může být biotransformace narušena aberantní expresí CYP. CYP3A4 a CYP2C9 jsou hlavními enzymy metabolizujícími tyrozinkinázové inhibitory užívané při léčbě HCC. Alterace v expresi těchto i dalších CYP jsou také předmětem studia některých prací s cílem nalezení vhodných biomarkerů a cílů pro léčbu HCC nebo efektivní cesty k individualizaci terapie (Yan et al. 2015a). Nové studie navíc naznačují, že CYP mohou být regulovány nekódujícími RNA. Hu et al. (2019) potvrdili u HCC interakce mezi 12 miRNA a CYP. Exprese těchto miRNA byla zvýšena a exprese jejich cílových genů pro CYP naopak snížena. Roli lncRNA při interakcích s CYP se zatím věnoval pouze zlomek autorů. Podle Lan et al. (2016) by mohla lnc-HC tlumit v hepatocytech

metabolismus cholesterolu inhibicí CYP7A1, což demonstrovali na myším modelu. V souvislosti s HCC vyšla snad jen jediná studie, která odhalila některé lncRNA, které by mohly inhibovat CYP. Byla to skupina lncRNA odlišně exprimovaných v tkáních pacientů s tlumenou a s normální expresí CYP. Kupříkladu se jednalo o lnc-SOX11-3, lnc-ZNF485-3, lnc-BBOX1-1, lnc-MAGEA8-2, lnc-C6orf103-1, lnc-AHNAK-4 nebo lnc-UCHL3-3, které dosud nebyly s HCC spojeny (Nekvindova et al. 2020).

5 ZÁVĚR

Hepatocelulární karcinom zůstává jedním z nejagresivnějších nádorových onemocnění. Špatná prognóza je stále aktuálním problémem, jenž neřeší zatím ani množství dostupných léčebných postupů. Celá řada studií se zabývá rolí nekódujících lncRNA, miRNA a nově také změnami v expresi CYP v hepatokarcinogenezi.

Nekódující RNA se nepřekládají do proteinů, ale fungují v podobě RNA molekul. MikroRNA většinou negativně regulují genovou expresi vazbou na mRNA. Dlouhé nekódující RNA jsou také důležitými regulátory v řadě biologických procesů, jejich deregulace jsou spojovány s patologickými stavy a taktéž s HCC. Interakcemi s DNA, RNA nebo s proteiny regulují pozitivně či negativně expresi genů na úrovni transkripční i posttranskripční. Do patogeneze zapojené lncRNA se podílejí na regulaci proliferace, invaze, metastazování i apoptózy. Enzymy CYP jsou zodpovědné za metabolismus endogenních látek i velkého množství léčiv. Autoři přicházejí s novými důkazy o vzájemných interakcích lncRNA, miRNA a CYP, což prohlubuje porozumění jejich funkcím v rámci lidského organismu a lze očekávat, že mnohé mechanismy budou popsány či potvrzeny i u HCC.

Přibývající informace o těchto molekulárních mechanismech v budoucnu patrně povedou k jejich použití v diagnostice a v terapii. Avšak stále je o této oblasti známo poměrné málo a zcela jistě bude potřeba dalších výzkumů.

6 LITERATURA

Abbastabar M, Sarfi M, Golestani A, Khalili E. lncRNA involvement in hepatocellular carcinoma metastasis and prognosis. EXCLI J. 2018;17:900–13.

Adamek A, Kasprzak A. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(5).

Achour C, Aguilo F. Long non-coding RNA and Polycomb: an intricate partnership in cancer biology. Front Biosci Landmark Ed. 2018;23:2106–32.

Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. Eur J Med Chem. 2016;109:314–41.

Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8(4).

Ayers D. Long Non-Coding RNAs: Novel Emergent Biomarkers for Cancer Diagnostics. J Cancer Res Treat. 2013;1(2):31–5.

Baecker A, Liu X, La Vecchia C, Zhang Z-F. Worldwide Incident Hepatocellular Carcinoma Cases Attributable to Major Risk Factors. Eur J Cancer Prev. 2018;27(3):205–12.

Bao Z, Yang Z, Huang Z, Zhou Y, Cui Q, Dong D. LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. Nucleic Acids Res. 2019;47(Database issue):D1034–7.

Bartošík M, Moráňová L. Současné metody analýzy mikroRNA. Klin Onkol. 2018;31(Suppl. 2):93–101.

Bednaříková D, Kocák I. Hand-foot syndrom po podání inhibitorů tyrozinkinázové aktivity. Klin Onkol. 2010;23(5):300–5.

Berhane S, Toyoda H, Tada T, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, et al. Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. Clin Gastroenterol Hepatol. 2016;14(6):875-886.e6.

Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. HPB. 2005;7(1):26–34.

Biswas A, Desai KV. The LncRNA HOTAIR-expression, regulation and function in cancer. The Nucleus. 2017;60(2):155–64.

Braconi C, Kogure T, Valeri N, Huang N, Nuovo G, Costinean S, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer. Oncogene. 2011;30(47):4750–6.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.

Brodeur CM, Thibault P, Durand M, Perreault J-P, Bisaillon M. Dissecting the expression landscape of cytochromes P450 in hepatocellular carcinoma: towards novel molecular biomarkers. Genes Cancer. 2019;10(3–4):97–108.

Brůha R, Šperl J, Urbánek P, Špičák J, Kiss I, Válek V, et al. Doporučený postup pro léčbu a diagnostiku hepatocelulárního karcinomu. Gastroenterol Hepatol. 2012;66(2):83–92.

Bruix J, da Fonseca LG, Reig M. Insights into the success and failure of systemic therapy for hepatocellular carcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019;16(10):617–30.

Cai M-Y, Hou J-H, Rao H-L, Luo R-Z, Li M, Pei X-Q, et al. High Expression of H3K27me3 in Human Hepatocellular Carcinomas Correlates Closely with Vascular Invasion and Predicts Worse Prognosis in Patients. Mol Med. 2011;17(1–2):12–20.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524–9.

Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, et al. Elevated Expression of the miR-17–92 Polycistron and miR-21 in Hepadnavirus-Associated Hepatocellular Carcinoma Contributes to the Malignant Phenotype. Am J Pathol. 2008;173(3):856–64.

Couri T, Pillai A. Goals and targets for personalized therapy for HCC. Hepatol Int. 2019;13(2):125–37.

Csoka AB, Szyf M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. Med Hypotheses. 2009;73(5):770–80.

Cui M, Zheng M, Sun B, Wang Y, Ye L, Zhang X. A Long Noncoding RNA Perturbs the Circadian Rhythm of Hepatoma Cells to Facilitate Hepatocarcinogenesis. Neoplasia N Y N. 2015;17(1):79–88.

Dai Q, Zhang C, Yuan Z, Sun Q, Jiang Y. Current discovery strategies for hepatocellular carcinoma therapeutics. Expert Opin Drug Discov. 2020;15(2):243–58.

Dai X, Kaushik AC, Zhang J. The Emerging Role of Major Regulatory RNAs in Cancer Control. Front Oncol. 2019;9.

Deng G, Sui G. Noncoding RNA in Oncogenesis: A New Era of Identifying Key Players. Int J Mol Sci. 2013;14(9):18319–49.

Deng L, Yang S-B, Xu F-F, Zhang J-H. Long noncoding RNA CCAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by functioning as let-7 sponge. J Exp Clin Cancer Res CR. 2015;34:18.

Dhanasekaran R, Bandoh S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. F1000Research. 2016;5.

Dostálek M. Farmakokinetika. Praha: Grada; 2006.

Dou C, Sun L, Jin X, Han M, Zhang B, Li T. Long non-coding RNA colon cancer-associated transcript 1 functions as a competing endogenous RNA to regulate cyclin-dependent kinase 1 expression by sponging miR-490-3p in hepatocellular carcinoma progression. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. 2017;39(4):1010428317697572.

Doycheva I, Thuluvath PJ. Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: An Update of a Rapidly Evolving Field. J Clin Exp Hepatol. 2019;9(5):588–96.

Du Y, Kong G, You X, Zhang S, Zhang T, Gao Y, et al. Elevation of Highly Up-regulated in Liver Cancer (HULC) by Hepatitis B Virus X Protein Promotes Hepatoma Cell Proliferation via Down-regulating p18. J Biol Chem. 2012;287(31):26302–11.

El Khodiry A, Afify M, El Tayebi HM. Behind the curtain of non-coding RNAs; long non-coding RNAs regulating hepatocarcinogenesis. World J Gastroenterol. 2018;24(5):549–72.

El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. N Engl J Med. 2011;365(12):1118–27.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. Gastroenterology. 2007;132(7):2557–76.

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2018;69(1):182–236.

Fang L-L, Wang X-H, Sun B-F, Zhang X-D, Zhu X-H, Yu Z-J, et al. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). Int J Mol Med. 2017;40(6):1624–30.

Fang S, Zhang L, Guo J, Niu Y, Wu Y, Li H, et al. NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. Nucleic Acids Res. 2018;46(Database issue):D308–14.

Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2016;14(1):42–54.

Fernandes JCR, Acuña SM, Aoki JI, Floeter-Winter LM, Muxel SM. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. Non-Coding RNA. 2019;5(1).

Finn RS, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, Pracht M, et al. Outcomes of sequential treatment with sorafenib followed by regorafenib for HCC: Additional analyses from the phase III RESORCE trial. J Hepatol. 2018;69(2):353–8.

Fraňková S, Šperl J. Rizikové faktory a surveillance hepatocelulárního karcinomu. Vnitř Lék. 2019;65(9):583–7.

Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 2009;19(1):92–105.

Fu C, Xu X, Lu W, Nie L, Yin T, Wu D. Increased expression of long non-coding RNA CCAT2 predicts poorer prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. Medicine (Baltimore). 2019;98(42).

Fu X, Calin GA. miR-122 and hepatocellular carcinoma: from molecular biology to therapeutics. EBioMedicine. 2018;37:17–8.

Fujiwara N, Friedman SL, Goossens N, Hoshida Y. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. J Hepatol. 2018;68(3):526–49.

Furió-Tarí P, Tarazona S, Gabaldón T, Enright AJ, Conesa A. spongeScan: A web for detecting microRNA binding elements in lncRNA sequences. Nucleic Acids Res. 2016;44(W1):W176-180.

Gao J-Z, Li J, Du J-L, Li X-L. Long non-coding RNA HOTAIR is a marker for hepatocellular carcinoma progression and tumor recurrence. Oncol Lett. 2016;11(3):1791–8.

Geng YJ, Xie SL, Li Q, Ma J, Wang GY. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. J Int Med Res. 2011;39(6):2119–28.

Gong L, Giacomini MM, Giacomini C, Maitland ML, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: Sorafenib Pathways. Pharmacogenet Genomics. 2017;27(6):240–6.

Gou X, Zhao X, Wang Z. Long noncoding RNA PVT1 promotes hepatocellular carcinoma progression through regulating miR-214. Cancer Biomark. 2017;20(4):511–9.

Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. Cancer Biol Med. 2015;12(1):1–9.

Harris PS, Hansen RM, Gray ME, Massoud OI, McGuire BM, Shoreibah MG. Hepatocellular carcinoma surveillance: An evidence-based approach. World J Gastroenterol. 2019;25(13):1550–9.

He C, Xu J, Zhang J, Xie D, Ye H, Xiao Z, et al. High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Hum Pathol. 2012;43(9):1425–35.

He J-H, Han Z-P, Liu J-M, Zhou J-B, Zou M-X, Lv Y-B, et al. Overexpression of Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells via Negative Modulation of miRNA-664. J Cell Biochem. 2017;118(11):3713–21.

He R-Z, Luo D-X, Mo Y-Y. Emerging roles of lncRNAs in the post-transcriptional regulation in cancer. Genes Dis. 2019;6(1):6–15.

Ho DW-H, Lo RC-L, Chan L-K, Ng IO-L. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. Liver Cancer. 2016;5(4):290–302.

Holčáková J. Vliv metylace DNA na vznik nádorových onemocnění. Klin Onkol. 2018;31(Suppl. 2):41–5.

Honsová E. Histopatologická diagnóza hepatocelulárního karcinomu. Gastroenterol Hepatol. 2012;66(2):93–8.

Hou Z, Xu X, Fu X, Tao S, Zhou J, Liu S, et al. HBx-related long non-coding RNA MALAT1 promotes cell metastasis via up-regulating LTBP3 in hepatocellular carcinoma. Am J Cancer Res. 2017;7(4):845–56.

Hu DG, Marri S, McKinnon RA, Mackenzie PI, Meech R. Deregulation of the Genes that Are Involved in Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion in Hepatocellular Carcinoma. J Pharmacol Exp Ther. 2019;368(3):363–81.

Hu L, Ye H, Huang G, Luo F, Liu Y, Liu Y, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via miR-21. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. 2016;37(2):2691–702.

Huang M, Chen W-M, Qi F-Z, Xia R, Sun M, Xu T-P, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation by epigenetic silencing of KLF2. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 29 2015;8(1):57.

Huang Z, Zhou J-K, Peng Y, He W, Huang C. The role of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma. Mol Cancer. 2020;19(1):77.

Hůlek P, Dresslerová I. Nealkoholové ztučnění jater v klinické praxi (NAFL). Interní Medicína Praxi. 2015;17(5):224–6.

Hůlek P, Urbánek P. Hepatologie. 3. vydání. Praha: Grada Publishing; 2018.

Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. BMC Genomics. 2007;8(1):39.

Chang L, Li C, Lan T, Wu L, Yuan Y, Liu Q, et al. Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by regulating vimentin. Mol Med Rep. 2016;13(2):1541–50.

Chang S, Chen B, Wang X, Wu K, Sun Y. Long non-coding RNA XIST regulates PTEN expression by sponging miR-181a and promotes hepatocellular carcinoma progression. BMC Cancer. 2017;17(1):248.

Chatterjee A, Ahn A, Rodger EJ, Stockwell PA, Eccles MR. A Guide for Designing and Analyzing RNA-Seq Data. Methods Mol Biol. 2018;1783:35–80.

Chen F, Bai G, Li Y, Feng Y, Wang L. A positive feedback loop of long noncoding RNA CCAT2 and FOXM1 promotes hepatocellular carcinoma growth. Am J Cancer Res. 2017a;7(7):1423–34.

Chen L, Yao H, Wang K, Liu X. Long Non-Coding RNA MALAT1 Regulates ZEB1 Expression by Sponging miR-143-3p and Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression. J Cell Biochem. 2017b;118(12):4836–43.

Chen S, Cao Q, Wen W, Wang H. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Challenges and opportunities. Cancer Lett. 2019;460:1–9.

Chen X, Qu J. Long non-coding RNA MEG3 suppresses survival, migration, and invasion of cervical cancer. OncoTargets Ther. 2018;11:4999–5007.

Chen Y, Zeng L, Wang Y, Tolleson WH, Knox B, Chen S, et al. The expression, induction and pharmacological activity of CYP1A2 are post-transcriptionally regulated by microRNA hsa-miR-132-5p. Biochem Pharmacol. 2017c;145:178–91.

Cheng D, Deng J, Zhang B, He X, Meng Z, Li G, et al. LncRNA HOTAIR epigenetically suppresses miR-122 expression in hepatocellular carcinoma via DNA methylation. EBioMedicine. 2018;36:159–70.

Iempridee T. Long non-coding RNA H19 enhances cell proliferation and anchorage-independent growth of cervical cancer cell lines. Exp Biol Med Maywood NJ. 2017;242(2):184–93.

Imani S, Wu R-C, Fu J. MicroRNA-34 family in breast cancer: from research to therapeutic potential. J Cancer. 2018;9(20):3765–75.

Iwakiri J, Hamada M, Asai K. Bioinformatics tools for lncRNA research. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech. 2016;1859(1):23–30.

Izzo F, Granata V, Grassi R, Fusco R, Palaia R, Delrio P, et al. Radiofrequency Ablation and Microwave Ablation in Liver Tumors: An Update. The Oncologist. 2019;24(10):e990–1005.

Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. N Engl J Med. 2013;368(18):1685–94.

Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. In: Rao MRS, editor. Long Non Coding RNA Biology. Singapore: Springer; 2017. s. 1–46. (Advances in Experimental Medicine and Biology).

Jin Y, Yu D, Tolleson WH, Knox B, Wang Y, Chen S, et al. MicroRNA hsa-miR-25-3p suppresses the expression and drug induction of CYP2B6 in human hepatocytes. Biochem Pharmacol. 2016;113:88–96.

Jindal A, Thadi A, Shailubhai K. Hepatocellular Carcinoma: Etiology and Current and Future Drugs. J Clin Exp Hepatol. 2019;9(2):221–32.

Kabir TD, Ganda C, Brown RM, Beveridge DJ, Richardson KL, Chaturvedi V, et al. A microRNA-7/growth arrest specific 6/TYRO3 axis regulates the growth and invasiveness of sorafenib-resistant cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatol Baltim Md. 2018;67(1):216–31.

Kamel MM, Matboli M, Sallam M, Montasser IF, Saad AS, El-Tawdi AHF. Investigation of long noncoding RNAs expression profile as potential serum biomarkers in patients with hepatocellular carcinoma. Transl Res. 2016;168:134–45.

Kangarlouei R, Irani S, Noormohammadi Z, Memari F, Mirfakhraie R. ANRIL and ANRASSF1 long noncoding RNAs are upregulated in gastric cancer. J Cell Biochem. 2019;120(8):12544–8.

Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, Skoufos G, Karavangeli A, Pierros V, et al. DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D101–10.

Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. Front Mol Neurosci. 2011;4.

Karin M, Dhar D. Liver carcinogenesis: from naughty chemicals to soothing fat and the surprising role of NRF2. Carcinogenesis. 2016;37(6):541–6.

Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. Drugs. 2009;69(2):223–40.

Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, et al. Role of Wnt/β-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. J Hepatocell Carcinoma. 2018;5:61–73.

Kimura T, Kato Y, Ozawa Y, Kodama K, Ito J, Ichikawa K, et al. Immunomodulatory activity of lenvatinib contributes to antitumor activity in the Hepa1-6 hepatocellular carcinoma model. Cancer Sci. 2018;109(12):3993–4002.

Klec C, Gutschner T, Panzitt K, Pichler M. Involvement of long non-coding RNA HULC (highly up-regulated in liver cancer) in pathogenesis and implications for therapeutic intervention. Expert Opin Ther Targets. 2019;23(3):177–86.

Klingenberg M, Matsuda A, Diederichs S, Patel T. Non-coding RNA in hepatocellular carcinoma: Mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. J Hepatol. 2017;67(3):603–18.

Kong Q, Zhang S, Liang C, Zhang Y, Kong Q, Chen S, et al. LncRNA XIST functions as a molecular sponge of miR-194-5p to regulate MAPK1 expression in hepatocellular carcinoma cell. J Cell Biochem. 2018;119(6):4458–68.

Krejčí A, Müller P, Vojtěšek B. Bioinformatika a sekvenování nové generace. Klin Onkol. 2015;28(Suppl 2):2S91–6.

Kucukcakan B, Hayrulai-Musliu Z. Challenging Role of Dietary Aflatoxin B1 Exposure and Hepatitis B Infection on Risk of Hepatocellular Carcinoma. Open Access Maced J Med Sci. 2015;3(2):363–9.

Kudo M. Signaling pathway/molecular targets and new targeted agents under development in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2012;18(42):6005–17.

Kudo M. Targeted and immune therapies for hepatocellular carcinoma: Predictions for 2019 and beyond. World J Gastroenterol. 2019;25(7):789–807.

Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. Cold Spring Harb Protoc. 2015;2015(11):951–69.

Kulski JK. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and "Omic" Applications. In: Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges. InTech; 2016. s. 3–60.

Lai M, Yang Z, Zhou L, Zhu Q, Xie H, Zhang F, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Med Oncol. 2012;29(3):1810–6.

Lan T, Yan X, Li Z, Xu X, Mao Q, Ma W, et al. Long non-coding RNA PVT1 serves as a competing endogenous RNA for miR-186-5p to promote the tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. 2017;39(6):1010428317705338.

Lan X, Yan J, Ren J, Zhong B, Li J, Li Y, et al. A novel long noncoding RNA Lnc-HC binds hnRNPA2B1 to regulate expressions of Cyp7a1 and Abca1 in hepatocytic cholesterol metabolism. Hepatology. 2016;64(1):58–72.

Lanzafame M, Bianco G, Terracciano LM, Ng CKY, Piscuoglio S. The Role of Long Non-Coding RNAs in Hepatocarcinogenesis. Int J Mol Sci. 2018;19(3).

Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. Biochemie pro studující medicíny. 2. díl, kapitola 14-23. Praha: Karolinum; 2004. (Učební texty Univerzity Karlovy v Praze).

Lennox KA, Behlke MA. Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. Nucleic Acids Res. 2016;44(2):863–77.

Li C, Chang L, Chen Z, Liu Z, Wang Y, Ye Q. The role of lncRNA MALAT1 in the regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. Int J Mol Med. 2017a;39(2):347–56.

Li C, Chen J, Zhang K, Feng B, Wang R, Chen L. Progress and Prospects of Long Noncoding RNAs (lncRNAs) in Hepatocellular Carcinoma. Cell Physiol Biochem. 2015a;36(2):423–34.

Li C, Miao R, Liu S, Wan Y, Zhang S, Deng Y, et al. Down-regulation of miR-146b-5p by long noncoding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer growth and metastasis. Oncotarget. 2017b;8(17).

Li D, Tolleson WH, Yu D, Chen S, Guo L, Xiao W, et al. Regulation of cytochrome P450 expression by microRNAs and long noncoding RNAs: Epigenetic mechanisms in environmental toxicology and carcinogenesis. J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2019a;37(3):180–214.

Li J, Wang X, Tang J, Jiang R, Zhang W, Ji J, et al. HULC and Linc00152 Act as Novel Biomarkers in Predicting Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2015b;37(2):687–96.

Li L, Han T, Liu K, Lei C-G, Wang Z-C, Shi G-J. LncRNA H19 promotes the development of hepatitis B related hepatocellular carcinoma through regulating microRNA-22 via EMT pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019b;23(12):5392–401.

Li S-P, Xu H-X, Yu Y, He J-D, Wang Z, Xu Y-J, et al. LncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway. Oncotarget. 2016a;7(27):42431–46.

Li W, Li N, Shi K, Chen Q. Systematic review and meta-analysis of the utility of long non-coding RNA GAS5 as a diagnostic and prognostic cancer biomarker. Oncotarget. 2017c;8(39):66414–25.

Li Y, Liu J-J, Zhou J-H, Chen R, Cen C-Q. LncRNA HULC induces the progression of osteosarcoma by regulating the miR-372-3p/HMGB1 signalling axis. Mol Med Camb Mass. 2020;26(1):26.

Li Y, Ren M, Zhao Y, Lu X, Wang M, Hu J, et al. MicroRNA-26a inhibits proliferation and metastasis of human hepatocellular carcinoma by regulating DNMT3B-MEG3 axis. Oncol Rep. 2017d;37(6):3527–35.

Li Y, Syed J, Sugiyama H. RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs. Cell Chem Biol. 2016b;23(11):1325–33.

Lin XQ, Huang ZM, Chen X, Wu F, Wu W. XIST Induced by JPX Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Sponging miR-155-5p. Yonsei Med J. 2018;59(7):816–26.

Ling H, Girnita L, Buda O, Calin GA. Non-coding RNAs: the cancer genome dark matter that matters! Clin Chem Lab Med. 2017;55(5):705–14.

Liu B, Sun L, Liu Q, Gong C, Yao Y, Lv X, et al. A cytoplasmic NF-κB interacting long noncoding RNA blocks IκB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. Cancer Cell. 2015;27(3):370–81.

Liu M, Jiang L, Guan X-Y. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. Protein Cell. 2014;5(9):673–91.

Liu X, Liang Y, Song R, Yang G, Han J, Lan Y, et al. Long non-coding RNA NEAT1-modulated abnormal lipolysis via ATGL drives hepatocellular carcinoma proliferation. Mol Cancer. 2018a;17(1):90.

Liu Z, Lin Y, Zhang J, Zhang Y, Li Y, Liu Z, et al. Molecular targeted and immune checkpoint therapy for advanced hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res CR. 2019;38.

Liu Z, Wang Y, Dou C, Sun L, Li Q, Wang L, et al. MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR-γ-mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res CR. 2018b;37.

Lu Q, Ren S, Lu M, Zhang Y, Zhu D, Zhang X, et al. Computational prediction of associations between long non-coding RNAs and proteins. BMC Genomics. 2013;14:651.

Lu Z, Xiao Z, Liu F, Cui M, Li W, Yang Z, et al. Long non-coding RNA HULC promotes tumor angiogenesis in liver cancer by up-regulating sphingosine kinase 1 (SPHK1). Oncotarget. 2016;7(1):241–54.

Lv J, Ma L, Chen X-L, Huang X-H, Wang Q. Downregulation of LncRNAH19 and MiR-675 promotes migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells through AKT/GSK-3β/Cdc25A signaling pathway. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2014;34(3):363–9.

Lyubimov AV. Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions. Wiley; 2012. (Vol. 1).

Ma J, Li T, Han X, Yuan H. Knockdown of LncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2018a;144(2):205–14.

Ma L, Wang F, Du C, Zhang Z, Guo H, Xie X, et al. Long non-coding RNA MEG3 functions as a tumour suppressor and has prognostic predictive value in human pancreatic cancer. Oncol Rep. 2018b;39(3):1132–40.

Ma Y, Zhang H, Li G, Hu J, Liu X, Lin L. LncRNA ANRIL promotes cell growth, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via sponging miR-144. Anticancer Drugs. 2019;30(10):1013–21.

Mai H, Zhou B, Liu L, Yang F, Conran C, Ji Y, et al. Molecular pattern of lncRNAs in hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):198.

Mak L-Y, Cruz-Ramón V, Chinchilla-López P, Torres HA, LoConte NK, Rice JP, et al. Global Epidemiology, Prevention, and Management of Hepatocellular Carcinoma. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2018;(38):262–79.

Masopust J. Cílové molekuly pro terapii nádorů (1. část). Labor Aktuell. 2006;(4):4–10.

Masopust J. Cílové molekuly pro terapii nádorů (2. část). Labor Aktuell. 2007;(1):4–9.

Matouk IJ, Abbasi I, Hochberg A, Galun E, Dweik H, Akkawi M. Highly upregulated in liver cancer noncoding RNA is overexpressed in hepatic colorectal metastasis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009;21(6):688–92.

Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. Biochem Pharmacol. 2010;79(7):1045–52.

Monaco A. The Role of mTOR Inhibitors in the Management of Posttransplant Malignancy. Transplantation. 2009;87(2):157–63.

da Motta Girardi D, Correa TS, Crosara Teixeira M, Dos Santos Fernandes G. Hepatocellular Carcinoma: Review of Targeted and Immune Therapies. J Gastrointest Cancer. 2018;49(3):227–36.

Na H-K, Lee JY. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. Int J Mol Sci. 2017;18(6).

Nagy Á, Lánczky A, Menyhárt O, Győrffy B. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. Sci Rep. 2018;8.

Nakamura M, Chiba T, Kanayama K, Kanzaki H, Saito T, Kusakabe Y, et al. Epigenetic dysregulation in hepatocellular carcinoma: an up-to-date review. Hepatol Res. 2019;49(1):3–13.

Nekvindova J, Mrkvicova A, Zubanova V, Hyrslova Vaculova A, Anzenbacher P, Soucek P, et al. Hepatocellular carcinoma: Gene expression profiling and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450. Biochem Pharmacol. 2020;177:113912.

Niu C, Wang L, Ye W, Guo S, Bao X, Wang Y, et al. CCAT2 contributes to hepatocellular carcinoma progression via inhibiting miR-145 maturation to induce MDM2 expression. J Cell Physiol. 2020;

Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? differential signalling and therapeutic implications. Oncotarget. 2014;5(23):11752–77.

Panzitt K, Tschernatsch MMO, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. Gastroenterology. 2007;132(1):330–42.

Personeni N, Pressiani T, Bozzarelli S, Rimassa L. Targeted agents for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma. World J Gastrointest Oncol. 2019;11(10):788–803.

Pok S, Barn VA, Wong HJ, Blackburn AC, Board P, Farrell GC, et al. Testosterone regulation of cyclin E kinase: A key factor in determining gender differences in hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2016;31(6):1210–9.

Pope C, Mishra S, Russell J, Zhou Q, Zhong X-B. Targeting H19, an Imprinted Long Non-Coding RNA, in Hepatic Functions and Liver Diseases. Diseases. 2017;5(1).

Pu Y, Zhang Y, Zhang T, Han J, Ma Y, Liu X. Identification of Novel lncRNAs Differentially Expressed in Placentas of Chinese Ningqiang Pony and Yili Horse Breeds. Animals. 2020;10(1).

Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P, Raj JP. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. Contemp Oncol. 2018;22(3):141–50.

Recillas-Targa F. Chapter 13 - Long noncoding RNAs and carcinogenesis. In: Epigenetic Gene Expression and Regulation. Oxford: Academic Press; 2015. s. 291–312.

Regad T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. Cancers. 2015;7(3):1758–84.

Rieger JK, Reutter S, Hofmann U, Schwab M, Zanger UM. Inflammation-associated microRNA-130b down-regulates cytochrome P450 activities and directly targets CYP2C9. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2015;43(6):884–8.

Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. Carcinogenesis. 2017;38(5):485–91.

Saito Y, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2014;44(1):31–42.

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci CMLS. 2011;68(18):3033–46.

Shi Y, Liu Y, Wei Z, Zhang Y, Zhang L, Jiang S, et al. Hsa-miR-27a is involved in the regulation of CYP3A4 expression in human livers from Chinese Han population. Pharmacogenomics. 2015;16(12):1379–86.

Shuai Y, Ma Z, Lu J, Feng J. LncRNA SNHG15: A new budding star in human cancers. Cell Prolif. 2020;53(1):e12716.

Skálová L. Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum; 2017.

Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. Nat Rev Genet. 2019;20(11):631–56.

Sun Y, Ma L. New Insights into Long Non-Coding RNA MALAT1 in Cancer and Metastasis. Cancers. 2019;11(2).

Šána J, Vychytilová P, Svoboda M, Slabý O. Dlouhé nekódující RNA a jejich význam u nádorových onemocnění. Klin Onkol. 2012;25(4):246–54.

Šťastný M, Říhová B. Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. Klin Onkol. 2015;28:4S28–37.

Študentová H, Melichar B. Nový mechanizmus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR - nová cílová struktura. Onkologie. 2010;4(3):185–8.

Testino G, Leone S, Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: A review and a point of view. World J Gastroenterol WJG. 2014;20(43):15943–54.

Thorat A, Jeng L-B, Yang H-R, Yeh C-C, Hsu S-C, Chen T-H, et al. Assessing the role of everolimus in reducing hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation for patients within the UCSF criteria: re-inventing the role of mammalian target of rapamycin inhibitors. Ann Hepato-Biliary-Pancreat Surg. 2017;21(4):205–11.

Toh TB, Lim JJ, Chow EK-H. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. Clin Transl Med. 2019;8.

Tornesello ML, Faraonio R, Buonaguro L, Annunziata C, Starita N, Cerasuolo A, et al. The Role of microRNAs, Long Non-coding RNAs, and Circular RNAs in Cervical Cancer. Front Oncol. 2020;10:150.

Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. Mol Cell. 2010;39(6):925–38.

Tu J, Zhao Z, Xu M, Lu X, Chang L, Ji J. NEAT1 upregulates TGF-β1 to induce hepatocellular carcinoma progression by sponging hsa-mir-139-5p. J Cell Physiol. 2018;233(11):8578–87.

Turati F, Galeone C, Rota M, Pelucchi C, Negri E, Bagnardi V, et al. Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Ann Oncol. 2014;25(8):1526–35.

Venepalli NK, Goff L. Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. Int J Hepatol. 2013;2013.

Vitásková D, Melichar B. Imunoterapie v léčbě solidních nádorů. Onkologie. 2015;9(1):10–2.

Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet J, Meyer T, et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2018;29(Suppl 4):iv238–55.

Volders P-J, Anckaert J, Verheggen K, Nuytens J, Martens L, Mestdagh P, et al. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D135–9.

Votavová H, Brdička R. Nekódující RNA – od nepotřebných po nepostradatelné. Časopis Lékařů Čes. 2016;155(7):370–6.

Wagner EM. Monitoring Gene Expression: Quantitative Real-Time RT-PCR. In: Freeman LA, editor. Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. s. 19–45. (Methods in Molecular Biology; roč. 1027).

Wang C, Ke S, Li M, Lin C, Liu X, Pan Q. Downregulation of LncRNA GAS5 promotes liver cancer proliferation and drug resistance by decreasing PTEN expression. Mol Genet Genomics MGG. 2020a;295(1):251–60.

Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. Nucleic Acids Res. 2010;38(16):5366–83.

Wang J, Sun J, Yang F. The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer. Oncol Lett. 2020b;19(1):7–16.

Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Mol Cell. 2011;43(6):904–14.

Wang X, Gao J, Zhou B, Xie J, Zhou G, Chen Y. Identification of prognostic markers for hepatocellular carcinoma based on miRNA expression profiles. Life Sci. 2019;232:116596.

Wang Y, Fang Z, Hong M, Yang D, Xie W. Long-noncoding RNAs (lncRNAs) in drug metabolism and disposition, implications in cancer chemo-resistance. Acta Pharm Sin B. 2020c;10(1):105–12.

Wang Y, Hu Y, Wu G, Yang Y, Tang Y, Zhang W, et al. Long noncoding RNA PCAT-14 induces proliferation and invasion by hepatocellular carcinoma cells by inducing methylation of miR-372. Oncotarget. 2017;8(21):34429–41.

Wei S, Fan Q, Yang L, Zhang X, Ma Y, Zong Z, et al. Promotion of glycolysis by HOTAIR through GLUT1 upregulation via mTOR signaling. Oncol Rep. 2017;38(3):1902–8.

Wilhelm Z, Hegyi P. Fyziologie jater. Prakt Lékárenství. 2007;3(5):242–5.

Xie H, Ma H, Zhou D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. BioMed Res Int. 2013;2013:136106.

Xin X, Wu M, Meng Q, Wang C, Lu Y, Yang Y, et al. Long noncoding RNA HULC accelerates liver cancer by inhibiting PTEN via autophagy cooperation to miR15a. Mol Cancer. 2018;17(1):94.

Xu J, Lin H, Li G, Sun Y, Chen J, Shi L, et al. The miR-367-3p Increases Sorafenib Chemotherapy Efficacy to Suppress Hepatocellular Carcinoma Metastasis through Altering the Androgen Receptor Signals. EBioMedicine. 2016;12:55–67.

Xu X, Tao Y, Shan L, Chen R, Jiang H, Qian Z, et al. The Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. J Cancer. 2018;9(19):3557–69.

Xu Y, Wang B, Zhang F, Wang A, Du X, Hu P, et al. Long non-coding RNA CCAT2 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma and promotes tumor metastasis by regulating Snail2-mediated epithelial-mesenchymal transition. OncoTargets Ther. 2017;10:1191–8.

Yamamoto Y, Kohama I, Ochiya T. miRNAs and Hepatocellular Carcinoma. In: The Liver. John Wiley & Sons, Ltd; 2020. s. 183–94.

Yan T, Lu L, Xie C, Chen J, Peng X, Zhu L, et al. Severely Impaired and Dysregulated Cytochrome P450 Expression and Activities in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Personalized Treatment in Patients. Mol Cancer Ther. 2015a;14(12):2874–86.

Yan T-H, Yang H, Jiang J-H, Lu S-W, Peng C-X, Que H-X, et al. Prognostic significance of long non-coding RNA PCAT-1 expression in human hepatocellular carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015b;8(4):4126–31.

Yang JD, Addissie BD, Mara KC, Harmsen WS, Dai J, Zhang N, et al. GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score. Cancer Epidemiol Prev Biomark. 2019a;28(3):531–8.

Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019b;16(10):589–604.

Yang S, Liu G. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. Oncol Lett. 2017;13(3):1041–7.

Yang Y, Zhang J, Xia T, Li G, Tian T, Wang M, et al. MicroRNA-210 promotes cancer angiogenesis by targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 in hepatocellular carcinoma. Oncol Rep. 2016;36(5):2553–62.

Yang Z, Zhou L, Wu L-M, Lai M-C, Xie H-Y, Zhang F, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. Ann Surg Oncol. 2011;18(5):1243–50.

Yao R-W, Wang Y, Chen L-L. Cellular functions of long noncoding RNAs. Nat Cell Biol. 2019;21(5):542–51.

Yau T, Park JW, Finn RS, Cheng A-L, Mathurin P, Edeline J, et al. LBA38_PRCheckMate 459: A randomized, multi-center phase III study of nivolumab (NIVO) vs sorafenib (SOR) as first-line (1L) treatment in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC). Ann Oncol. 2019;30(Supplement_5).

Ye Y, Guo J, Xiao P, Ning J, Zhang R, Liu P, et al. Macrophages-induced long noncoding RNA H19 up-regulation triggers and activates the miR-193b/MAPK1 axis and promotes cell aggressiveness in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett. 2020;469:310–22.

Yotsukura S, duVerle D, Hancock T, Natsume-Kitatani Y, Mamitsuka H. Computational recognition for long non-coding RNA (lncRNA): Software and databases. Brief Bioinform. 2017;18(1):9–27.

Yu D, Green B, Marrone A, Guo Y, Kadlubar S, Lin D, et al. Suppression of CYP2C9 by MicroRNA hsa-miR-128-3p in Human Liver Cells and Association with Hepatocellular Carcinoma. Sci Rep. 2015;5(1):1–9.

Yu J, Han J, Zhang J, Li G, Liu H, Cui X, et al. The long noncoding RNAs PVT1 and uc002mbe.2 in sera provide a new supplementary method for hepatocellular carcinoma diagnosis. Medicine (Baltimore). 2016;95(31):e4436.

Yuan S, Wang J, Yang F, Tao Q, Zhang J, Wang L, et al. Long noncoding RNA DANCR increases stemness features of hepatocellular carcinoma by derepression of CTNNB1. Hepatol Baltim Md. 2016;63(2):499–511.

Zhang L, Yang F, Yuan J, Yuan S, Zhou W, Huo X, et al. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis. 2013;34(3):577–86.

Zhang S-Y, Surapureddi S, Coulter S, Ferguson SS, Goldstein JA. Human CYP2C8 is post-transcriptionally regulated by microRNAs 103 and 107 in human liver. Mol Pharmacol. 2012;82(3):529–40.

Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. J Lab Clin Med. 2006;147(2):58–66.

Zhang X-N, Zhou J, Lu X-J. The long noncoding RNA NEAT1 contributes to hepatocellular carcinoma development by sponging miR-485 and enhancing the expression of the STAT3. J Cell Physiol. 2018;233(9):6733–41.

Zhang Y, Liu J, Lv Y, Zhang C, Guo S. LncRNA meg3 suppresses hepatocellular carcinoma in vitro and vivo studies. Am J Transl Res. 2019;11(7):4089–99.

Zhao B, Lu Y-L, Yang Y, Hu L-B, Bai Y, Li R-Q, et al. Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF-β1/ Smad signaling pathway. Cancer Biomark Sect Dis Markers. 2018;21(3):613–20.

Zheng Z-K, Pang C, Yang Y, Duan Q, Zhang J, Liu W-C. Serum long noncoding RNA urothelial carcinoma-associated 1: A novel biomarker for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. J Int Med Res. 2018;46(1):348–56.

Zhou C, Yang F, Yuan S, Ma J, Liu F, Yuan J, et al. Systemic genome screening identifies the outcome associated focal loss of long noncoding RNA PRAL in hepatocellular carcinoma. Hepatol Baltim Md. 2016;63(3):850–63.

Zhu J, Liu S, Ye F, Shen Y, Tie Y, Zhu J, et al. Long Noncoding RNA MEG3 Interacts with p53 Protein and Regulates Partial p53 Target Genes in Hepatoma Cells. PloS One. 2015;10(10):e0139790.

Zhu Y, Zhou C, He Q. High miR-139-3p expression predicts a better prognosis for hepatocellular carcinoma: a pooled analysis. J Int Med Res. 2019;47(1):383–90.

Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology. 2015;149(5):1226-1239.e4.

Elektronické zdroje

Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [Internet]. SVOD Analýza. [citován 29. duben 2020]. Dostupné z: https://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#

Globocan. All cancers fact sheet [Internet]. 2019. Dostupné z: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf

IARC. Cancer today [Internet]. 2018 [citován 29. duben 2020]. Dostupné z: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map

Illumina, Inc. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology [Internet]. 2017. Dostupné z: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

miRBase. Homo sapiens miRNAs (1917 sequences) [GRCh38] [Internet]. [citován 21. únor 2020]. Dostupné z: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa

National Center for Biotechnology Information. Cabozantinib [Internet]. PubChem. [citován 4. únor 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25102847