

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Bc. Andrea Štěpařová

**EXPRESE CYTOCHROMU P450 2C9 U JATERNÍCH MALIGNIT**

Diplomová práce

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Specialista: RNDr. Jana Nekvindová, Ph.D.

Hradec Králové 2015

**PROHLÁŠENÍ**

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

V Hradci Králové dne .....

.....

podpis

*Děkuji RNDr. Janě Někviňové, Ph.D. za odborné vedení po celý čas mé diplomové práce, cenné rady a připomínky.*

# Obsah

<b>OBSAH .....</b>	<b>9</b>
<b>1 ABSTRAKT .....</b>	<b>6</b>
<b>2 ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>3 ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>10</b>
<b>4 ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>5 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
5.1 JATERNÍ MALIGNITY .....	12
5.1.1 Rozdělení jaterních lézí .....	13
5.1.1.1 Fokální nodulární hyperplazie.....	13
5.1.1.2 Adenomy .....	13
5.1.1.3 Hemaingiom.....	14
5.1.1.4 Cholangiocelulární karcinom .....	14
5.1.1.5 Fibrolamelární typ hepatocelulárního karcinomu.....	15
5.1.1.6 Metastázy .....	15
5.2 EPIDEMIOLOGIE.....	16
5.3 ETIOLOGIE.....	17
5.3.1 HBV a HCV.....	18
5.3.2 Alkoholická cirhóza.....	19
5.3.3 Aflatoxin .....	19
5.3.4 Hemochromatóza .....	20
5.3.5 Nealkoholická steatohepatitida (NASH).....	20
5.3.6 Pohlaví, věk a etnický původ .....	20
5.4 BIOLOGIE TUMORU.....	21
5.4.1 Genetická epidemiologie .....	21
5.4.2 Molekulární mechanismy hepatokarcinogeneze.....	22
5.4.2.1 Chromozomální nestabilita – zkrácení telomery .....	22
5.4.2.2 Signální dráhy .....	23
5.4.2.3 Signální dráha epidermálního růstového faktoru (EGFR) .....	24
5.4.2.4 c-MET signalizace .....	25
5.4.2.5 IGF signalizace .....	25
5.4.2.6 P13k / Akt / mTOR .....	26
5.4.2.7 WNT / $\beta$ -katenin cesta .....	26
5.4.2.8 Rb/P16.....	27
5.4.2.9 Hedgehog signální dráha.....	27
5.4.2.10 Apoptotické cesty.....	28
5.4.3 Epigenetika a HCC.....	28
5.4.3.1 DNA methylace.....	28
5.4.3.2 Modifikace histonů v HCC .....	29
5.4.3.3 MikroRNA (miRNA) .....	32

5.5 KLINICKÉ PŘÍZNAKY NEMOCI.....	35
5.6 DIAGNOSTIKA .....	36
5.6.1 Laboratorní vyšetření (screening) .....	36
5.6.2 Zobrazovací vyšetření.....	37
5.6.2.1 Ultrazvuk.....	37
5.6.2.2 Klasické a spirální CT.....	37
5.6.2.3 CT hepaticografie.....	37
5.6.2.4 CT angioportografie jater (CTAP) .....	38
5.6.2.5 Multidetektorové CT.....	38
5.6.2.6 Angiografie .....	38
5.6.2.7 Magnetická rezonance.....	38
5.6.3 Bioptické vyšetření .....	39
5.6.4 Diferenciální diagnostika .....	39
5.7 LÉČBA.....	39
5.7.1 Stádia nemoci .....	40
5.7.2 Chirurgická léčba.....	42
5.7.2.1 Resekce jater .....	42
5.7.2.2 Transplantace jater .....	43
5.7.3 Paliativní léčba .....	43
5.7.3.1 Perkutánní ablace .....	43
5.7.3.2 Embolizační metody.....	45
5.7.3.3 Systémová chemoterapie.....	46
5.7.3.4 Radioterapie .....	47
5.7.3.5 Molekulární terapie a nové léky ve vývoji .....	47
5.8 PROGNÓZA .....	52
5.9 CYTOCHROMY P450.....	53
5.9.1 Faktory ovlivňující expresi CYP a jejich role v karcinogenezi .....	53
5.9.1.1 Genetické polymorfismy .....	54
5.9.1.2 Epigenetické vlivy na metabolismus léčiv .....	55
5.9.1.3 Negenetické faktory .....	55
<b>6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>61</b>
6.1 PARAMETRY STUDIE.....	61
6.2 IZOLACE RNA A REAL-TIME PCR (QPCR).....	63
6.2.1 Princip metody qPCR.....	63
6.2.2 Pracovní postup.....	64
6.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO WESTERN BLOT .....	67
6.3.1 Příprava lyzátů z tkání .....	67
6.3.2 Princip metody Western blot .....	68
6.3.3 Pracovní postup.....	69
6.4 VÝSLEDKY .....	71
<b>7 DISKUZE .....</b>	<b>75</b>

<b>8 ZÁVĚR .....</b>	<b>78</b>
<b>9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>79</b>
<b>10 LITERATURA.....</b>	<b>80</b>
<b>11 SEZNAMY OBRÁZKŮ A TABULEK .....</b>	<b>87</b>

# 1 ABSTRAKT

Bc. Andrea Štěpařová

Expresce cytochromu P450 2C9 u jaterních malignit

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalytika – Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cíl práce: Rakovina jater je celosvětově narůstajícím zdravotním problémem. Nejčastější primární malignitou jater je hepatocelulární karcinom (HCC). Jedná se o multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílí řada faktorů genetických i negenetických, mezi něž patří především virové infekce a toxická poškození (např. vlivem abúzu alkoholu). Cytochromy P450 (CYP) se účastní různých metabolických procesů v lidském těle. Některé formy hrají roli také v patogenezi nádorových chorob. V práci je rešeršně zpracovaná problematika jaterních malignit a problematika regulace genové exprese CYP a jejich možné role v hepatokarcinogenezi a farmakoterapii HCC. U vybrané formy enzymu, CYP2C9, byla provedena analýza exprese ve vzorcích hepatocelulárního karcinomu a okolní tkáni a stanovení exprese jeho hlavních regulátorů, nukleárních receptorů pregnanového X receptoru (PXR) a konstitutivního androstanového receptoru (CAR).

Metody: Vzorky tkání hepatocelulárního karcinomu a okolní nenádorové tkáně od 12 pacientů byly získány z biobanky Masarykova onkologického ústavu v Brně. Stanovení exprese CYP2C9, CAR a PXR na úrovni mRNA bylo pomocí metody real-time PCR. U vzorků, kde bylo dostatečné množství tkáně, bylo provedeno stanovení proteinu CYP2C9 metodou western blotting.

Výsledky: Expresce CYP2C9 byla u poloviny vzorků nádorové tkáně významně snížena o jeden až několik řádů oproti referenční nenádorové tkáni. V druhé polovině případů byla expresce CYP2C9 v nádoru srovnatelná s okolní tkání. Expresce CYP2C9 korelovala s expresí nukleárních receptorů PXR a CAR. Výsledky byly potvrzeny na úrovni proteinu a korelovaly s klinickým (histologickým) gradem nádoru (méně diferencované nádory měly nižší expresi CYP2C9 a nukleárních receptorů).

Závěr: Exprese CYP2C9 a nukleárních receptorů CAR a PXR v nádorové tkáni HCC je významně snížena přibližně u poloviny pacientů a koreluje s histologickým gradingem tumoru.



## 2 ABSTRACT

Bc. Andrea Štěpařová

Expression of cytochrome P450 2C9 in hepatic tumors.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Healthcare bioanalytics – Specialist in Laboratory Methods

*Background:* Liver cancer is a growing health problem worldwide. The most common primary hepatic malignancy is hepatocellular carcinoma (HCC). It is a multifactorial disease arising from multiple genetic and non-genetic alterations, most importantly viral infections and toxic injury (e.g. alcohol abuse). Cytochromes P450 (CYPs) participate on a plethora of metabolic processes in human body. Several CYPs play a role in tumorigenesis as well. This theses covers the topics of hepatic malignancies and regulation of cytochrome P450 expression to evaluate the possible relationship to the hepatocarcinogenesis and pharmacotherapy of HCC. In CYP2C9, which is one of the most important drug-metabolizing CYP forms, gene expression analysis was performed in HCC tumor and surrounding tissue, also including CYP2C9 major regulators – nuclear receptors PXR (pregnane-X-receptor) and CAR (constitutive androstane receptor).

*Methods:* Samples of hepatocellular carcinoma and surrounding non-cancerous tissue from 12 patients were obtained from the biobank of Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic. Gene expression of CYP2C9, CAR and PXR at the mRNA level was assessed using real-time PCR. Where there was a sufficient amount of tissue, protein analysis (immunoblotting) was performed to confirm the qPCR data.

*Results:* Expression CYP2C9 was half samples of tumor tissue is reduced by one to several orders of magnitude compared with the reference non-tumor tissue. In the other half of the cohort, CYP2C9 expression was similar to that in surrounding non-cancerous tissue. The expression was confirmed at the protein level and correlated with expression of nuclear receptors PXR and CAR and also with the tumor grade – tumors with grade 3-4 (less differentiated hepatic tissue) had significantly lower CYP2C9 expression.

Conclusions: The expression of CYP2C9 and nuclear receptor PXR and CAR in HCC tumor tissue is significantly reduced in about half of the patients and correlates with the histological grading of the tumor.

### **3 ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

1. Rešeršně zpracovat problematiku:

- jaterních malignit, především hepatocelulárního karcinomu, se zameřením na molekulární patogenezi a diagnostiku

- cytochromů P450, zejména CYP2C9 včetně faktorů ovlivňujících expresi CYP a potenciální roli CYP v hepatokarcinogenezi či farmakoterapii u pacientů s HCC

2. Analyzovat expresi CYP2C9 a hlavních nukleárních receptorů regulujících jeho expresi ve vzorcích tkáně hepatocelulárního karcinomu a okolní nenádorové tkáně

3. Získaná data zhodnotit v kontextu klinických parametrů

## 4 ÚVOD

Rakovina jater je pátou nejčastější diagnostikovanou rakovinou po celém světě. Ročně přibude přibližně 1 milion nových případů. Nejčastějším primárním zhoubným novotvarem jater je hepatocelulární karcinom. Jeho výskyt je geograficky rozdílný a více jak 80% případů HCC se vyskytuje ve Východní Asii, sub-saharské Africe a Číně, kde je nejčastější příčinou úmrtí. V zemích Jižní Evropy je výskyt HCC středně vysoký. V České republice incidence HCC představuje 8 případů/100 tisíc obyvatel a ve srovnání s ostatními zeměmi se pohybuje na 106. místě (El-Serag et al. 2007; Dušek et al. 2005).

Ačkoli HCC nepatří v České republice k onemocněním s vysokým výskytem, lze do budoucna očekávat zvyšující se výskyt v souvislosti s chronickým onemocněním jater především virové etiologie. Jedním z hlavních klinických problémů je, že onemocnění je často diagnostikováno v pokročilém stádiu, což omezuje možnosti léčby a vede ke špatné prognóze s mediánem přežití 6-9 měsíců. Důležitým faktorem pro zlepšení prognózy pacientů v budoucnu je vývoj nových markerů pro zlepšení screeningu pacientů s cirhózou (El-Serag et al. 2008) a nových protinádorových léčiv.

Cytochromy P450 (CYP) hrají hlavní roli v metabolismu léčiv a některých endogenních metabolických drahách (Nekvindová et al. 2013). Jejich aktivita ovlivňuje metabolismus léčiv včetně protinádorových, a může ovlivnit účinnost léčby. Některé formy jsou schopné aktivovat prokarcinogeny a podílet se tak na procesu karcinogeneze. Prostřednictvím komplexních mechanismů zasahují CYP do dalších procesů vč. např. zánětu a apoptózy, s potenciálními důsledky pro rozvoj nádorového onemocnění. Exprese a aktivita CYP enzymů je ovlivněna řadou faktorů, jako např. genetickými polymorfismy nebo interakcemi současně podávaných léčiv. (Nekvindová et al. 2013).

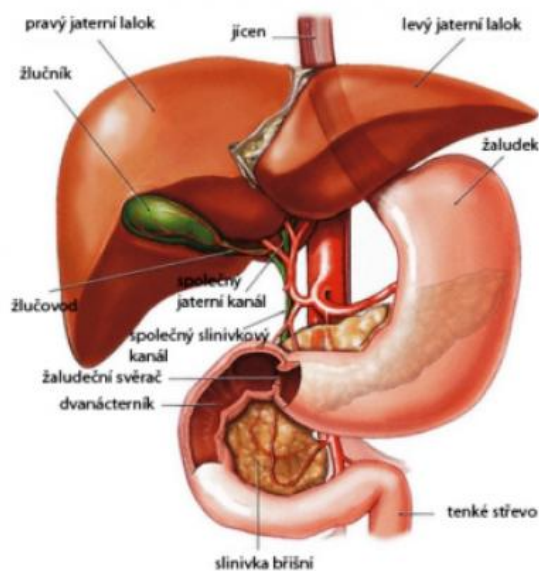
Během posledních let byly zkoumány vztahy mezi genetickými variantami CYP a rozvojem rakoviny. Bylo zjištěno, že polymorfismy genu CYP2C9 mohou hrát důležitou roli ve vývoji HCC (Yu et al. 2015). CYP2C9 je primárně exprimován v játrech a je druhou nejhojnější izoformou CYP. V několika studiích bylo popsáno snížení jeho exprese CYP2C9 a označeno jako biomarker HCC.

Tato diplomová práce se zabývá analýzou CYP2C9 ve vzorcích nádorové a nenádorové tkáně pacientů s hepatocelulárním karcinomem.

# 5 TEORETICKÁ ČÁST

## 5.1 JATERNÍ MALIGNITY

Rakovina jater je celosvětovým zdravotním problémem. Primární malignity jater tvoří převážně hepatocelulární karcinom (HCC), který představuje 85% - 90% primárních nádorů jater. Zbývajících přibližně 10% primárních nádorů zahrnuje cholangiocelulární karcinom, smíšený hepatocholangiocelulární karcinom a v dětském věku hepatoblastom. Výskyt primárních nádorů jater je poměrně vzácný. I když jsou maligní ložiska v játrech nalézána poměrně často, jedná se ve větší části případů o jaterní metastázy a to převážně metastázy kolorektálního karcinomu. Hepatocelulární karcinom metastazuje do plic a kostí (Adam et al. 2002; El- Serag et al. 2007).



**Obr. 1 Játra.** Jsou největší žlázou lidského těla. Průměrná váha je okolo 1,5 kg. Játra jsou uložena těsně pod bránicí. Rozdělují se na pravý lalok jaterní (lobus dexter), který vyplňuje celou pravou klenbu bránice a levý lalok jaterní (lobus sinister), který je pod levou klenbou a sahá až medioklavikulární čáře (vertikála spuštěna středem klíční kosti). Jaterní buňky (hepatocyty) jsou uspořádány do paprscitých trámčů, zvaných jaterní lalůčky. Mezi dvěma hepatocyty se vytváří mezilalůčkový vývod, kterým odtéká žluč. Tyto vývody se spojují v pravý a levý vývod jaterní (ductus hepaticus dexter a sinister), po jejichž spojení vzniká společný vývod jaterní (duktus hepaticus communis). Vývod jaterní se spojuje s vývodem žlučníku (ductus cysticus), vzniká žlučovod (ductus choledochu). (Čihák a Laichman 2002; Holibková a Laichman 2006).

### **5.1.1 Rozdělení jaterních lézí**

Nádory jater lze rozdělit na nezhoubné (benigní) a zhoubné (maligní) nádory. Vedlejší skupinu tvoří ještě jaterní cysty, jejichž převážná většina nevyžaduje léčbu, výjimkou jsou parazitární a symptomatické cysty. Podle původu tvoří benigní nádory dvě skupiny: jaterní léze epiteliální a mezenchymální. K epiteliálním patří fokální nodulární hyperplazie (FNH), hepatocelulární adenom a cholangiocelulární adenom. Mezi mezenchymální nádory se řadí hemangiom, jež vzniká z krevních cév, z tukové tkáně se tvořící angioliipom a ze svalové tkáně leiomyom. Potenciálním rizikem maligního zvratu z těchto novotvarů jsou pouze adenomy. Zhoubné jaterní malignity rozdělujeme na primární, kam patří hepatocelulární karcinom a cholangiocelulární karcinom a sekundární nádory jater – metastázy (Ehrmann 2014; Válek et al. 2006).

#### ***5.1.1.1 Fokální nodulární hyperplazie***

Vyskytuje se často u žen mezi 30-50 rokem a výskyt je často spojována s užíváním hormonální antikoncepce, ale tato teorie nebyla nikdy spolehlivě ověřena. Je druhým nejčastějším nezhoubným jaterním nádorem. Diagnostikuje se nejlépe pomocí kontrastního CT a MR. Chirurgicky jsou odstraňována jen velká symptomatická ložiska, která působí bolest z útlaku. Vyjímečně bývá prováděna resekce při nejistém rozlišení od zhoubného nádoru a to fibrolamelární formy hepatocelulárního karcinomu (Ehrmann 2014).

#### ***5.1.1.2 Adenomy***

Vznik adenomů je etiologicky spojen s užíváním hormonů, zejména estrogenů. Výskyt je vzácný, u žen dlouhodobě užívajících hormonální antikoncepci je četnost adenomu 4/100 000 obyvatel. Mohou se také vyskytovat u vzácných metabolických onemocnění (talasemie, diabetes, glykogenóza). Nejčastějším projevem je bolest a tlakové obtíže. Přibližně u 20 – 40 % nádorů je nebezpečí spontánního krvácení, které se může projevit jako náhlá břišní příhoda s hemoperitoneem. Až 10 % případů adenomu přechází do HCC. V diagnostice má hlavní postavení ultrazvuk, magnetická rezonance (MR) a počítačová tomografie (CT). Prognostickou výhodou má genetické vyšetření bioptického vzorku. Zvýšené riziko maligního zvratu mají adenomy s aktivovanou wnt/ $\beta$ -kateninovou dráhou a deficitem hepatocytárního nukleárního

faktoru (HNF-1 $\alpha$ ). Právě kvůli zvýšenému riziku malignity a krvácení je u většiny indikována resekce (Ehrmann 2014).

### **5.1.1.3 Hemaingiom**

Nejčastější nezhoubný nádor jater s přebažujícím výskytem u žen. Hemangiomy jsou stoprocentně nezhoubné a je známa jejich etiologická souvislost s hormonálními receptory. Rozdělují se na dva základní typy: kapilární, které jsou drobné a mají tendenci ke spontánní úzdravě a tzv. kavernózní hemangiomy, které mohou dosahovat velkých rozměrů. Tento typ nádoru je spolehlivě diagnostikován ultrazvukem a k diagnóze může přispět CT vyšetření a MR. Asymptomatické nádory nejsou indikovány k léčbě, není ani důvod k vysazení hormonální antikoncepce a vyvarování se těhotenství. Pouze gigantická asymptomatická ložiska mají malou pravděpodobnost krvácení. Anatomická resekce přichází v úvahu u pacienta se symptomy a sekundárně změněným nádorem (Ehrmann 2014).

### **5.1.1.4 Cholangiocelulární karcinom**

Cholangiocelulární karcinomy (CCA) jsou nádory vyrůstající z buněk biliárního stromu. Je méně častý než HCC a vyskytuje se více u starších lidí. Dělí se do tří skupin:

- intrahepatální (10 %) – vyrůstá z malých nitrojaterních žlučvodů
- hilový typ (Klatskinův tumor) – nádor v oblasti bifurkace žlučvodů
- karcinom extrahepatálních žlučvodů.

Intrahepatální typ nádoru roste ve srovnání s extrahepatálním rychleji. Cholangikarcinom tvoří asi 5 % maligních nádorů jater a postihuje více muže než ženy. Tento typ nádoru je častěji nacházen u chronických cholestáz, anomálií žlučových cest, kongenitální fibrózy jater, sklerozující cholangitidy. Asi 10x vyšší riziko vzniku CCA mají lidé s ulcerózní kolitidou. V čínské populaci je jeho výskyt vyšší, okolo 15 %. Studie z Hong Kongu prokazují, že více jak 65 % pacientů s intrahepatálním cholangiocelulárním karcinomem bylo infikováno parazitem žlučových cest *Clonorchis sinensis* (Válek et al. 2006).

Rozhodující zobrazovací metoda je endoskopická retrogradní cholangiopankreatikografie, která je schopna lokalizovat a do jisté míry i určit rozsah postiženého žlučového stromu. Mezi další vyšetřovací metody schopné poskytnout validní informace o lokalizaci a přítomnosti vaskulární invaze jsou CT-angiografie,

duplexní monografie nebo MRCP (magnetická resonance s cholangiopankreatikografií) (Ehrmann 2014). Prognóza cholangiokarcinomu je považována za tristní (Blechacz et al. 2015). Jelikož cholangiocelulární karcinomy vykazují chemorezistenci, je jedinou nadějí pro pacienty chirurgická resekce. Největší překážkou jsou Klatskinovy tumory. I když existují pracoviště, která u vybraných skupin nemocných s tímto typem cholangiokarcinomu provádějí transplantace jater, častěji vyžadují radikálnější léčbu rozsáhlou resekcí (Ehrmann 2014).

#### ***5.1.1.5 Fibrolamelární typ hepatocelulárního karcinomu***

Jedná se o hepatocelulární karcinom bez přítomnosti jaterní cirhózy. Je vzácnější formou HCC. Vyskytuje se spíše u mladších osob ve věku 20 – 30 let a obecně má lepší prognózu (Válek et al. 2006; Ehrmann 2014).

#### ***5.1.1.6 Metastázy***

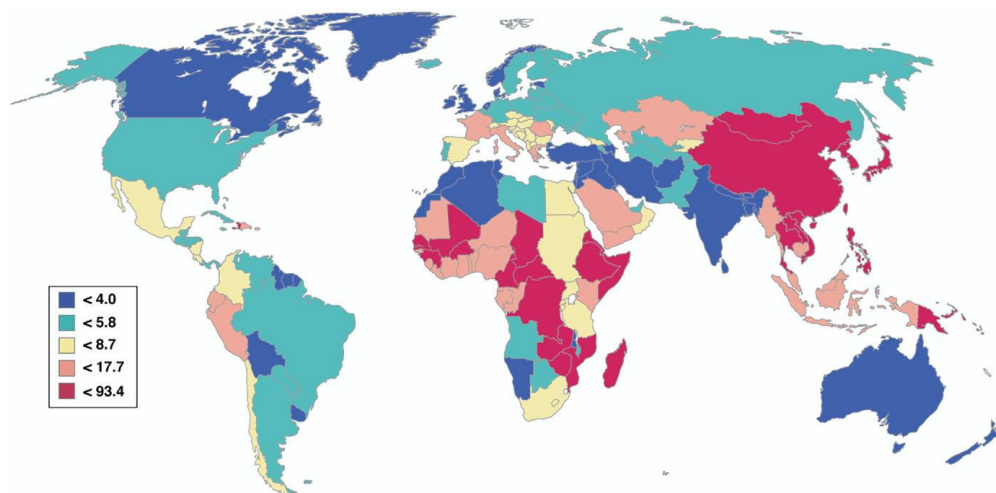
Játra jsou nejčastějším místem tvorby metastáz hned ze dvou důvodů. Prvním z nich je, že hrají ústřední roli v metabolismu a za druhé mají dvojí cévní zásobení. Nejčastěji se jedná o metastázy zhoubných nádorů zažívacího traktu (kolorektální karcinom a karcinom pankreatu), prsu, plic, ledvin, prostaty apod. (Ehrmann 2014). Hematogenní cestou v. portae se šíří většinou tumory gastrointestinálního traktu, lymfogenní cestou karcinom žlučových cest a pankreatu a arteriálním jaterním řečištěm mezastazují zejména plicní tumory. Metastázy mohou vykazovat velkou variabilitu a léze menší než 1 cm je obtížné běžnými technikami rozpoznat (Válek et al. 2006).



## 5.2 EPIDEMIOLOGIE

### Globální incidence hepatocelulárního karcinomu

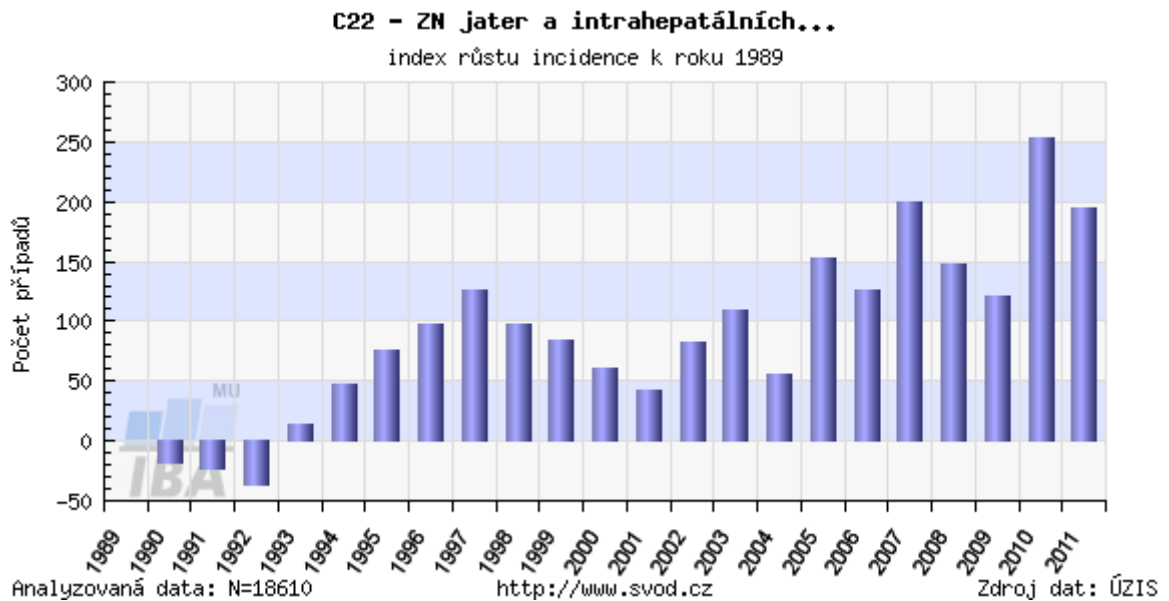
Rakovina jater je pátou nejčastější diagnostikovanou rakovinou a druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu u mužů po celém světě (Ma 2014). Ročně přibude s touto diagnózou okolo 1 milionu nových případů (Adam et al. 2002). Výskyt rakoviny jater není rovnoměrně rozložen po celém světě, naopak je charakteristický velkými geografickými rozdíly (Obr. 2). HCC je nejčastějším primárním zhoubným novotvarem jater a v úmrtnosti na zhoubné nádory je na čtvrtém místě. Více jak 80 % případů HCC se vyskytuje ve Východní Asii, sub-saharské Africe (Zimbabwe, Mosambik) a Číně, kde je nejčastější příčinou úmrtí. Čína sama o sobě představuje více než 50 % případů na světě. Výjimečnou převahu tvoří region Thajska Khon Kaen, který patří mezi jedno z míst s nejvyšším výskytem rakoviny jater na světě. Mezi další oblasti s vysokým výskytem HCC patří Senegal a Jižní Korea. V Severní a Jižní Americe, Severní Evropě a Oceánii je výskyt rakoviny jater u většiny populace nižší (1 – 2,5 % všech malignit). V zemích Jižní Evropy, jako je Itálie, Řecko a také sem spadá Španělsko je výskyt HCC středně vysoký. Nízkou incidencí jsou typické Kanada, Kolumbie, Velká Británie a Austrálie. (El-Serag et al. 2007).



**Obr. 2** Regionální rozdíly v úmrtnosti na HCC (El-Serag et al. 2007). Hodnoty jsou uvedeny na 100 000 osob.

V České republice mezi lety 1989 a 1998 výskyt HCC vzrostl a v následujících letech stále stoupá (Obr. 3). Zatímco v roce 1989 bylo diagnostikováno 459 nově nemocných mužů a 264 žen, v roce 1998 to již bylo 518 mužů (10,3/100 000) a 292 žen

(5,5/100 000) (Adam et al. 2002). Ve srovnání s ostatními zeměmi světa se Česká republika v incidenci HCC pohybuje na 106. místě s číslem 4,3 oproti např. prvnímu Mongolsku s 9,4 (Dušek et al. 2005).



**Obr. 3 Počet případů HCC od roku 1989 do roku 2011 (Dušek et al. 2005)**

## 5.3 ETIOLOGIE

Na vzniku a rozvoji hepatocelulárního karcinomu se podílí řada faktorů. Mezi hlavní nejdůležitější rizikový faktor patří cirhóza jater, kterou má asi 80 – 90% pacientů s nádorem jater. Byla prokázána blízká souvislost mezi virovou hepatitidou B (HBV) a/nebo C (HCV) a výskytem karcinomu. Za přítomností HCC stojí také toxické expozice hepatotoxiny (aflatoxin), alkoholická cirhóza, hemochromatóza a porfyrie (Adam et al. 2002). Nicméně, význam těchto jednotlivých faktorů se liší podle různých zeměpisných oblastí. V poslední době bylo zjištěno, že na vznik HCC má vliv také etnický původ, pohlaví, věk a také může úzce souviset s obezitou, diabetem melitem 2. typu, tabakismem, perorální antikoncepcí, pitím kávy nebo dietou (Tang 2001; El-Serag et al. 2007).

### 5.3.1 HBV a HCV

Globálně je HBV nejčastější příčinou HCC, s odhadovaným počtem 300 milionů osob s chronickou infekcí po celém světě. Souvislost karcinomu jater a hepatitidy B byla potvrzena díky nálezům genů HBV integrovaných do genomu buněk karcinomu jater. Case-control studie ukázaly, že nosiči chronické hepatitidy B mají 5 až 15krát vyšší riziko HCC ve srovnání s běžnou populací. Zvýšené riziko karcinomu spojené s HBV infekcí platí zejména pro oblasti, kde je endemický výskyt HBV (Čína, Afrika). V těchto oblastech se obvykle přenáší z matky na novorozence, tzv. vertikální přenos. V zemích s nižším výskytem HBV se přenos děje sexuální nebo parenterální cestou, tzv. horizontální přenos (Befeler 2002).

Doba latence mezi infekcí a rozvojem hepatocelulárního karcinomu je 30 až 40 let. Nejúčinnějším opatřením k zabránění infekce hepatitidy B je očkování, čímž nedochází k onemocnění akutní hepatitidou, tím pádem ani chronické progresi onemocnění do jaterní cirhózy a následně do hepatocelulárního karcinomu (Adamet al. 2011).

Pravděpodobnost rozvoje HCC u HCV infikovaných osob je z důvodu nedostatku vhodných dlouhodobých studií obtížné určit. Virus hepatitidy C je za kancerogenní považován od roku 1994. RNA tohoto viru nemá schopnost se včlenit do hostitelského genomu jako tomu je u viru HBV. HCV vyvolá v těle chronický jaterní zánět, přičemž dochází k navození protilátkové a buněčné odpovědi imunitního systému (Adam et al. 2011). Zvyšuje riziko HCC podporou fibrózy a nakonec cirhózy. Z chronického stádia k rozvoji cirhózy napomáhá spolu s HCV také vyšší věk, vyšší věk v době získání infekce, mužské pohlaví, cukrovka, obezita, koinfekce virem lidské imunodeficience (HIV) nebo HBV. Lidé, u kterých se rozvinula cirhóza, mají dvacetkrát vyšší pravděpodobnost vzniku rakoviny jater (Ryder et al. 2003; El-Serag et al. 2007).

K přenosu HCV nejčastěji dochází u narkomanů při nitrožilní aplikaci drog, používání nesterilních zdravotnických pomůcek a krevních transfuzí. Na hepatitidu C neexistuje vakcína. Antivirová terapie u pacientů s HCV cirhózou léčených interferonem- $\alpha$  může snížit riziko HCC. Dalším používaným lékem je ribavirin (El-Serag et al. 2007).

### 5.3.2 Alkoholická cirhóza

V zemích, kde hepatitida není zcela běžná, je hlavní příčinou HCC cirhóza z nadměrné konzumace alkoholu. Není jasné, zda nízký nebo střední příjem alkoholu významně zvyšuje riziko HCC, ale je prokázáno, že vysoký příjem je silně spojen s rozvojem cirhózy. Nadměrný příjem alkoholu je definován jako více než 50 až 70 g / den po delší dobu užívání. Existuje jen málo důkazů o přímém karcinogenním účinku alkoholu. Pravděpodobně mají karcinogenní účinek reaktivní metabolity ethanolu jako je acetaldehyd. Řada experimentů zjistila nepříznivý vliv alkoholu na růst buněk, buněčnou diferenciaci a apoptózu. Alkohol působí také jako rozpouštědlo a tím může být zvýšena propustnost karcergenů do buněk. Nadměrné pití alkoholu společně s infekcí HBV nebo HCV zvyšují riziko HCC a podporují cirhózu (synergický efekt). Například Donato et al. uvádějí, že s denním příjmem alkoholu vyšším než 60g se riziko HCC lineárně zvyšuje. Nicméně, při současné přítomnosti HCV infekce byl nárůst rizika hepatocelulárního karcinomu dvojnásobný v porovnání se samotným příjmem alkoholu - tzv. pozitivní synergický efekt. U těžkých alkoholiků bývá strava často deficitní na řadu esenciálních živin a tkáň tak bývají citlivější ke kancerogenezi (El-Serag et al. 2007).

### 5.3.3 Aflatoxin

Spotřeba potravin kontaminovaných aflatoxinem B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) je dalším významným rizikovým faktorem hepatocelulárního karcinomu. AFB<sub>1</sub> je mykotoxin produkovaný houbami *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, které snadno kontaminují potraviny jako je kukuřice, arašídů nebo rýže, uložené v teplých, vlhkých podmínkách. Vysoké nebo chronické expozice aflatoxinu způsobují akutní jaterní nekrózu, která se později vyvíjí v cirhózu nebo karcinom jater. Pokusy na zvířatech ukázaly, že AFB<sub>1</sub> je silný hepatokarcinogen. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer - IARC) při Světové zdravotnické organizaci (WHO) jej klasifikovala jako karcinogenní (Adam et al. 2011).

Po požití je AFB<sub>1</sub> metabolizován na reaktivní meziprodukt epoxid, který se váže na DNA a způsobuje její poškození. V endemických oblastech (Čína) byla u 30 až 60 % HCC pozorována mutace v p53 tumor-supresorového genu (p53 249ser). Přesvědčivé důkazy o tom, že AFB<sub>1</sub> je rizikový faktor pro HCC dodaly studie, při nichž byly

detekovány metabolity a adukty AFB1 v moči, v séru a mutace ve tkáních (El-Serag et al. 2007).

### **5.3.4 Hemochromatóza**

Některé studie tvrdí, že nepříjemnou komplikací hemochromatózy je vznik cirhózy a až ve 30 % případů HCC. Podíl pacientů s HCC, kteří mají mutaci v genu HFE je zatím nejasný. Existují jen velmi malé množství odhadů založených na riziku HCC u jedinců s homozygotní formou HFE mutace a žádné informace o riziku u heterozygotního nosiče mutace (Ryder 2003; El-Serag et al. 2007).

### **5.3.5 Nealkoholická steatohepatitida (NASH)**

Nealkoholická steatohepatitida je kryptogenní forma cirhózy a HCC. Nelze říci, zda jde o specifickou nemoc nebo spíše o klinický syndrom provázející nejružnější patologické stavy. Studií, které by studovaly přechod NASH do HCC je zatím nedostatečný. Pouze nemnoho kazuistik popisuje vývoj HCC několik let po stanovení diagnózy NASH. Nejčastějšími příčinami NASH je obezita, některé léky a diabetes mellitus 2. typu. Jaterní steatóza není považována za progresivní, jen část pacientů s NASH dospěje do stádia fibrózy nebo cirhózy. Proto je důležité odstranit nebo zmírnit všechny uvedené rizikové faktory a tím zabránit změnám v játrech (Brotanová 2003).

### **5.3.6 Pohlaví, věk a etnický původ**

Téměř ve všech populacích je u mužů vyšší výskyt rakoviny jater než u žen. Důvodem je, že u mužů je více pravděpodobné, že budou infikováni HBV a HCV, konzumovat alkohol a kouřit cigarety. Ostatní faktory, které mohou nepříznivě ovlivnit mužské pohlaví jsou vyšší index tělesné hmotnosti a vyšší hladiny androgenních hormonů.

Věková hranice HCC se obecně liší podle oblasti, četnosti výskytu, pohlaví a etiologií. V populaci s nižším výskytem HCC, jako jsou Spojené státy americké, Velká Británie či Kanada, se věková hranice pohybuje okolo 75 let a více. Podobný vývoj je vidět u většiny asijské populace. Naproti tomu u mužů ve vysoce rizikových afrických populacích je věková hranice 60 až 65 let a klesá, u žen je 65 až 70 a klesá.

Incidence HCC může být u různých populací žijících ve stejné oblasti rozdílná. Důvodem pro tuto etnickou variabilitu je pravděpodobně rozdíl v prevalenci a době

působení hlavních rizikových faktorů onemocnění jater a HCC (El-Serag et al. 2007; Ryder 2003).

## **5.4 Biologie tumoru**

Na složitém procesu kancerogeneze a nádorové progresi se podílí velké množství faktorů, nicméně nádor je obecně hodnocen jako genetické onemocnění, za jehož vznikem a progresí stojí postupné hromadění genetických změn (mutací) v genech, které se uplatňují především v regulaci buněčné proliferace a přežití buňky, a pokud tedy dochází k jejich porušení, získává nádorová buňka růstové výhody (Ludvíková et al. 2009).

V celé řadě lidských malignit, včetně rakoviny jater, hrají důležitou roli také tzv. epigenetické změny (Herceg 2011). Toto téma je v současnosti intenzivně studováno. Játra jsou hlavním metabolickým orgánem, kde probíhá mnoho důležitých biochemických procesů. Bylo prokázáno, že některé metabolity působí jako substráty pro mnoho epigenetických modifikací. Nové studie měly za cíl zkoumat zásadní metabolické pochody vedoucí ke změnám toku klíčových metabolitů, důležitých pro epigenetické procesy, dále význam enzymů zodpovědných za modifikace chromatinu a samozřejmě i vliv v posledním desetiletí velmi aktuálních mikroRNA (Puszyk et al. 2013; Au et al. 2013).

### **5.4.1 Genetická epidemiologie**

Epidemiologické výzkumy přesvědčivě prokazují, že velká většina případů HCC v dospělosti je sporadická a že mnohé z nich jsou založené alespoň na jednom negenetickém faktoru jako je zneužívání alkoholu nebo chronické HCV a HBV infekce. Nicméně, u většiny lidí s těmito rizikovými faktory se cirhóza nebo HCC nemusí nikdy rozvinout, zatímco značná část případů HCC může vzniknout mezi jednotlivci i bez známých rizikových faktorů.

V poslední době je díky rychlým pokrokům v oblasti genomiky možné provádět rozsáhlé epidemiologické studie k vyhodnocení genetických variabilit jakožto rizikového faktoru HCC. Většina studií HCC byla prováděna v populacích s vysokou (asijská a africká populace) a střední mírou (evropská) incidence HCC a zkoumáno bylo několik polymorfismů v genech vybraných na základě několika kritérií. Jedním z nich je klíčová úloha detoxikační funkce jater, včetně I. a II. fáze metabolismu xenobiotik a

enzymů jako jsou cytochromy P450, N-acetyltransferázy a glutathion S-transferázy. Druhým kritériem je role v rámci biologické dráhy potenciálně odpovědné za chronické onemocnění jater a karcinogenezi a poslední je role při zmírňování nebo zhoršování vlastností účinku na určité etiologické rizikové faktory pro HCC (El-Serag et al. 2007).

Výsledky genetických epidemiologických studií hodnotících různé polymorfismy jako rizikové faktory pro HCC nebyly zcela jednoznačné. Ukázalo se, že některé nálezy mají pozitivní asociaci pouze v omezené podskupině populace nebo spolu vůbec nesouvisí. Jelikož dosavadní studie nespĺnily svá očekávání, tj. vytvoření základu pro efektivní genetický screening pro účely primární prevence, je důležité pokračovat v této oblasti výzkumu. (El-Serag et al. 2007; Llovet a Bruix 2008).

#### **5.4.2 Molekulární mechanismy hepatokarcinogeneze**

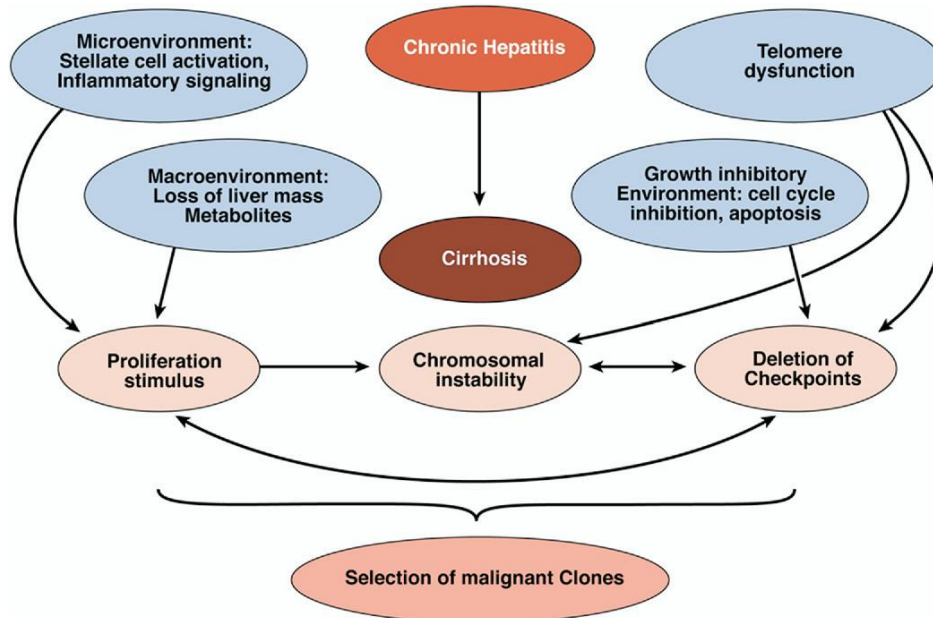
Hepatokarcinogeneze je proces progresivních genomických změn vedoucí ke vzniku nádorových buněk HCC. Nejběžněji je vznik karcinomu jater spojen s cirhózou. V průběhu chronického onemocnění jater zůstává riziko HCC nižší, ale exponenciálně se zvyšuje ve fázi cirhózy. Pro pochopení molekulární podstaty hepatokarcinogeneze je maximálně důležité dešifrovat molekulární mechanismy, které zvyšují tvorbu nádorů jater ve stádiu cirhózy (Facciorusso et al. 2012; El-Serag et al. 2007).

Genomické profilování hepatocelulárního karcinomu pomáhá lépe porozumět procesu karcinogeneze a identifikuje klíčové kroky na několika úrovních (např. molekulární dráhy), které mohou být potenciálním cílem pro léčbu a prevenci. Díky pokroku v technologii vědci doufají, že budou moci v blízké budoucnosti poskytnout skutečnou individuální léčbu této choroby (Hamed et al. 2013). Dalším z cílů je také zpřesnění klasifikace a prognózy nádorů jater (Facciorusso et al. 2012).

##### ***5.4.2.1 Chromozomální nestabilita – zkrácení telomery***

Cirhóza je charakterizována sníženou proliferací hepatocytů, což naznačuje vyčerpání jejich regenerační schopnosti. Jedním z možných mechanismů je zkrácení telomery, které omezuje proliferační kapacitu hepatocytů. Když telomery dosáhnou kriticky krátké délky, dochází k poškození signálů DNA, zastavení buněčného cyklu, senescenci nebo apoptóze. Dysfunkcí telomer se také aktivují dráhy DNA opravy, které vedou k fúzi chromozomů a vstupem do buněčného cyklu dochází k chromozomálním translokacím v dceřiných buňkách. Spekuluje se tedy o tom, že

dysfunkce telomery by mohla také vyvolávat chromozomální nestabilitu (Obr. 6) v lidských hepatocytech během cirhózy a tím zahájit vznik HCC (El-Serag et al. 2007). Aktivita telomerázy je zvýšena v téměř 90 % lidského HCC (Llovet a Bruix 2008).



**Obr. 4 Molekulární mechanismy indukující hepatokarcinogenezi ve fázi cirhózy.** Na obrázku jsou shrnuty molekulární mechanismy, které by mohly vysvětlit zvýšené riziko rakoviny ve stádiu cirhózy. Na vnitřní úrovni buňky je to cirhóza spojena se zkrácením telomery. Zkrácení telomery vede k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu a apoptózy, které omezují proliferační kapacitu hepatocytů a indukují chromozomální nestabilitu, která může být dále urychlena ztrátou funkce kontrolního bodu. Na vnější úrovni, cirhóza indukuje změny mikroprostředí včetně změněné sekrece cytokinů z aktivovaných hvězdicových buněk, stejně jako zánětlivé signály z imunitních buněk. Kromě toho, snížená funkce cirhotických jater by mohla zvýšit toxické metabolity v krevním séru (El-Serag et al. 2007).

#### 5.4.2.2 Signální dráhy

Jaterní cirhóza, která je výsledkem chronického onemocnění jater, vede ke smrti hepatocytů a aktivaci jaterních hvězdicových buněk (HSC). Aktivované HSC vylučují kolagen, tj. dochází k fibróze jater a změně funkce. Zánět spojený s proliferací cirhotických hepatocytů vede k akumulaci mutací a ke ztrátě epigenetické kontroly, které mohou vyústit v iniciaci a progresi HCC. Mezi tyto genetické a epigenetické události, které vedou k rozvoji HCC, patří somatické mutace, zkrácení telomery, změny v genové expresi a vedou ke změně narušení několika signálních drah (Enguita-Germán 2014).

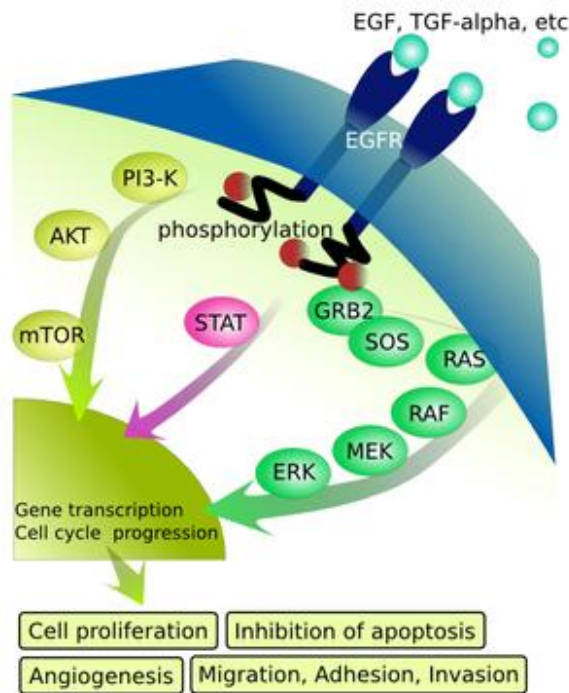


Klíčové signální dráhy, které se podílejí na patogenezi HCC zahrnují WNT- $\beta$  katenin, epidermální růstový faktor (EGF), receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a receptor (VEGFR), mitogen aktivující protein kinázy (MAPK) a fosfatidylinositol 3-kinázu (P13K), c-MET, inzulínu podobný růstový faktor (IGF) a Akt/mTOR signální dráhy. Další procesy zapojené do hepatokarcinogeneze jsou Jak-STAT, TGF- $\beta$ , interleukin 6 a Hedgehog signální dráha. Všechny tyto dráhy si vyžadují pozornost pro jejich potenciální léčebný význam (Cervello et al. 2012; Cornella et al. 2011).

#### ***5.4.2.3 Signální dráha epidermálního růstového faktoru (EGFR)***

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je členem rodiny čtyř spolu souvisejících členů (HER2(ErbB2), HER3(ErbB3) a HER4(ErbB4)), které po navázání ligandu spustí aktivitu tyrosinkinázy a následně zahájí přenos signálu (Obr. 7). Jedním z ligandů je EGF. Po navázání na receptor může aktivovat signální dráhy Ras/MAPK a indukovat transkripci genů rodiny AP1, což jsou klíčové prvky pro proliferaci buněk. K zesílení funkce EGFR klasicky dochází v důsledku bodových mutací. V HCC může aktivace Ras/MAPK dráhy způsobit aberantní signál (EGFR, IGF signalizace) nebo deaktivaci tumor supresorových genů. Mutace Ras a Raf jsou u HCC vzácné.

Efektivní blokády EGFR signální dráhy může být dosaženo za použití monoklonálních protilátek proti EGFR (cetuximab) nebo ErbB2 (trastuzumab). Cetuximab je schválen FDA pro léčbu pokročilých karcinomů hlavy a krku a kolorektálního karcinomu a trastuzumab pro karcinom prsu. Účinné léky blokující Ras/MAPK dráhu jsou stále ve fázi průzkumu s výjimkou sorafenibu, který má inhibiční účinnost B-Raf v nanomolárních koncentracích a je již v klinické praxi (Galuppo et al. 2014; Llovet a Bruix 2008).



**Obr. 5** Signální dráha epidermálního růstového faktoru. Převzato z:

<http://medicinaprakticky.blogspot.cz/2009/11/erlotinib.html> [Online]. Citováno dne: 2015-03-15

#### 5.4.2.4 *c-MET* signalizace

Růstový faktor hepatocytů (HGF) je klíčová molekula pro regeneraci poškozených hepatocytů. Je vylučován hvězdicovitými buňkami a váže se na c-Met receptor. Dysregulace c-Met a HGF jsou v HCC běžné, i když přesná úloha této dráhy v patogenezi HCC není úplně známa. Bylo vyvinuto několik sloučenin cílených na tuto dráhu, včetně protilátek proti HGF a/nebo MET receptoru nebo selektivní MET inhibitor (Mai et al. 2014; Llovet a Bruix 2008).

#### 5.4.2.5 *IGF* signalizace

Inzulinu podobný růstový faktor (IGF) má významnou úlohu při vývoji plodu, proliferaci, diferenciaci, buněčném růstu, apoptóze a je zapojen do rozvoje několika druhů malignit. IGF-I je spojen s vysokým rizikem rozvoje novotvaru, ale ne HCC. Překvapivě několik experimentů naznačuje, že v případě HCC může být exprese IGF-I antitumorgenní (Enguita-Germán 2014).

IGF-II je nadměrně exprimován asi u 16 % až 40 % HCC. Kromě toho koreluje nadměrná exprese IGF-II se zvýšenou proliferací buněk, a to jak v *in vivo* tak v *in vitro* modelech HCC, zatímco inhibice IGF-II podporuje apoptózu a snižuje buněčnou proliferaci. U pacientů s HCC je zvýšení intratumorové hladiny IGF-II spojeno s vyšším metastatickým potenciálem. Vzhledem k tomu zvýšení sérové hladiny IGF-II koreluje s přítomností extrahepatických metastáz. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese IGF-II může být důsledkem indukce např. aflatoxinem B1 (Enguita-Germán 2014).

V současné době je v klinických zkouškách několik monoklonálních protilátek blokujících IGF-1R. Interakce mezi IGF a EGF signalizací může působit jako mechanismus rezistence u některých nádorů (Llovet a Bruix 2008).

#### **5.4.2.6 P13k / Akt / mTOR**

P13K/Akt/mTOR hraje rozhodující roli v karcinogenezi. Akt může být aktivován prostřednictvím tyrosinkinásového receptoru (EGF nebo IGF signalizace). Další možností aktivace Akt je prostřednictvím aktivace P13K nebo ztráty funkce tumor supresorového genu PTEN pomocí epigenetického umlčení nebo somatických mutací. I když úloha Akt v HCC vyžaduje další zkoumání, nedávné studie naznačují horší prognózu pro nádory s aktivovaným Akt (Wei et al. 2013).

Důležitým mediátorem P13K-Akt dráhy je mTOR, který působí jako centrální regulátor buněčného růstu, proliferace, snímání stavu výživy a umožňuje progresi z G1 do S fáze. mTOR je aktivován v podskupině HCC a při jeho blokádě rapamycinem nebo everolimem dochází k inhibici růstu v HCC buněčných liniích a v experimentálních modelech. Rapamycin a everolimus jsou zatím schváleny pro léčení rakoviny ledvin a k imunosupresivní léčbě po transplantaci jater (Llovet a Bruix 2008).

#### **5.4.2.7 WNT / $\beta$ -katenin cesta**

Wnt- $\beta$ -katenin cesta je zapojena v rakovině tlustého střeva a HCC. Signální kaskáda je zahájena extracelulárně, když se Wnt ligandy naváží na Frizzled receptory, které signalizují odpojení  $\beta$ -kateninu od E-kadherinu. Po spuštění Wnt dráhy se indukuje přestup  $\beta$ -kateninu do jádra, kde reguluje specifické onkogeny, jako je *c-myc*, *cyklin D* a *survivin*. Aktivace Wnt kaskády bylo ukázáno v jedné třetině

HCC, zejména HCC indukované HCV. Tato abnormální aktivace může vyplývat ze somatických mutací v genech Wnt/ $\beta$ -katenin dráhy, které se vyskytují přibližně v 17 % případů, nebo dysregulací Wnt/ $\beta$ -katenin dráhy (Liu et al. 2015; Llovet a Bruix 2008).

Wnt dráha může být také aktivována aberantní metylací tumorsupresorů jako je komplex proteinů APC a E-kadherinu nebo zvýšenou auto/parakrinní sekrecí Wnt ligandů. Nové léky zaměřené na tuto cestu jsou zatím ve fázi vývoje (Llovet a Bruix 2008).

PROX1 (prospero homeobox protein 1) je cílem Wnt/ $\beta$ -katenin dráhy u kolorektálního karcinomu a zvýšená exprese PROX1 napomáhá maligní progresi. PROX1 podporuje proliferaci buněk HCC in vitro a růst xenoimplantovaného nádoru u myši. Hladiny PROX1 a  $\beta$ -katenin vykazují pozitivní korelaci v nádorových tkáních stejně jako v buňkách HCC. PROX1 může zvyšovat transkripci  $\beta$ -kateninu tím, že stimuluje promotor genu pro  $\beta$ -katenin a zvyšuje nukleární translokaci  $\beta$ -kateninu v HCC buňkách, což vede k aktivaci Wnt/ $\beta$ -katenin dráhy. Kromě toho, se ukazuje, že zvýšená exprese PROX1 činí HCC buňky odolnější na sorafenib, který je standardním lékem pro pokročilé HCC. PROX1 lze tedy označit jako kritický faktor aktivující Wnt/ $\beta$ -katenin dráhu v HCC, který podporuje HCC proliferaci a způsobuje resistenci na sorafenib (Liu et al. 2015).

#### **5.4.2.8 Rb/P16**

V lidském hepatocelulárním karcinomu je Rb cesta narušena u více než 80 % případů a nejčastější změnou je potlačení p16 pomocí methylace promotoru. Kromě toho se zvyšuje exprese gankyrinu (inhibitor p53 a Rb), což ve většině případů způsobuje dysfunkci Rb kontrolního bodu. Je možné, že znehodnocení Rb kontrolního bodu umožňuje expanzi hepatocytů s dysfunkcí telomer ve stádiu cirhózy (El-Serag et al. 2007).

#### **5.4.2.9 Hedgehog signální dráha**

Signální dráha Hedgehog má zásadní význam pro diferenciaci buněk, regeneraci a biologii kmenových buněk. Nadměrná exprese Hedgehog byla nedávno popsána v 60 % ze 115 HCC. Kromě toho může tumorgenní aktivace způsobit zvýšenou expresi *c-myc*, který hraje důležitou roli v hepatokarcinogenezi (Llovet a Bruix 2008).

#### **5.4.2.10 Apoptotické cesty**

Apoptóza je jedním z mechanismů buněčné smrti a vyhýbání se tomuto mechanismu je jedním z charakteristických znaků rakoviny. Cílem vývoje je tedy zaměřit se na několik proapoptických receptorů vnější cesty (Apo2L/TRAIL) a vnitřní cesty (BCL-2) apoptické dráhy. Například sorafenib ukázal, že zvyšuje citlivost rezistentních lidských nádorových buněk na TRAIL - indukované smrti (TRAIL – cytokin, fungující jako ligand v indukci buněčné apoptózy) (Llovet a Bruix 2008).

#### **5.4.3 Epigenetika a HCC**

Epigenetickými změnami jsou myšleny chemické změny, které postihují molekulu DNA nebo chromatin, ale nemají vliv na sekvenci nukleotidů (Ludvíková 2009). Existují tři hlavní mechanismy – methylace DNA, modifikace histonů a regulace exprese pomocí nekódujících RNA, zejména mikroRNA (miRNA) (Yang et al. 2003; Nekulová et al. 2006). Modifikace epigenomu způsobují změny funkčnosti genů (Herath et al. 2006).

##### **5.4.3.1 DNA methylace**

Methylace DNA je postreplikační úprava chromatinu, při níž se váže methylová skupina na nukleotidové báze (Ludvíková et al. 2009). Probíhá na cytosinu v dinukleotidech CpG. Připojení methylové skupiny je enzymatický proces, který je katalyzován DNA methyltransferázami (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B). Během methylace je methylová skupina přenesena z S-adenosyl metioninu (S-Adenosyl methionine -AdoMet), jakožto donoru, na uhlík v pozici 5 pyrimidinového kruhu cytosinu v CpG ostrůvcích (Ma 2014; Suchánková 2013). Oblasti většího výskytu CpG dinukleotidů jsou označovány jako CpG ostrůvky (Suchánková 2013). Ostrůvky jsou v genomu rozloženy nerovnoměrně a nacházíme je buďto v genech a jejich promotorech nebo integrovaných oblastech (Ludvíková et al. 2009). V průběhu buněčného dělení jsou epigenetické informace předávány dceřiným buňkám prostřednictvím DNMT1 pro udržení „buněčné paměti“ (Saito et al. 2013).

Methylace DNA vede k utlumení transkripce genu a to dvěma způsoby. Za prvé, methylace v CpG místech prostorově brání přístupu transkripčních faktorů k jejich přirozeným vazebným místům na příslušných genových promotorech. Druhý mechanismus zahrnuje přímé vazby mezi methyl-CpG a vazebnou doménou (MBD)-obsahující proteiny na methylované DNA, což způsobuje potlačení přepisu. Existuje několik důkazů, které ukazují, že změny v epigonu jsou spojeny s iniciací a progresí rakoviny jater. V procesu nádorové transformace se methylační změny mohou uplatňovat několika mechanismy: DNA methylace jako příčina bodových mutací, hypomethylace nebo hypermethylace (Ma 2014; Ludvíková et al. 2009).

#### *DNA methylace jako příčina bodových mutací*

Cytosin, který je methylován, může být spontánně deaminován na thymin. Pokud se tato C-T tranzice objeví v oblasti genů, jejíž funkcí je regulace buněčného růstu a přežití buňky, může tato změna funkce genů přispět k nádorové přeměně (Ludvíková et al. 2009).

#### *DNA hypomethylace*

Globální genomová hypomethylace je pro nádorové buňky typická. Vyvolává genomickou a chromozomální nestabilitu. Příčinou genomické nestability je aktivace dříve umlčených genů, která přispívá k rozvoji kancerogeneze. Zvýšení chromozomální nestability nastává díky poklesu methylace v repetitivních a pericentromálních oblastech, které jsou příčinou zlomů nebo numerických aberací chromozomů (Kulis a Esteller 2010; Ludvíková et al. 2009).

#### *DNA hypermethylace*

Hypermethylace vede k umlčení dříve aktivních genů. Inaktivace tumor-supresorových genů hypermethylací má veliký vliv na rozvoj kancerogeneze. DNA hypermethylace je proces reversibilní a v určitých nádorech mohou být hypermethylovány až stovky genů (Ludvíková et al. 2009).

### **5.4.3.2 Modifikace histonů v HCC**

Základní stavební jednotkou chromosomu jsou tzv. nukleosomy. Ty jsou tvořeny 8 histony (Obr. 4), které jsou ovinuty zhruba 145 páry bází molekuly DNA. Spiralizací

těchto nukleosomů vznikají chromatinová vlákna a další kondenzací těchto vláken vznikají již celé chromozomy. Histony jsou specifické bílkoviny, které tvoří komplex s DNA. Rozeznáváme 5 typů histonů: H1, H2A, H2B, H3 a H4 a v rámci jednoho nukleosomu je histonový oktamer tvořený dvojicí každého z těchto typů histonů: H2A, H2B, H3 a H4. N-konce histonů vyčnívající z nukleosomu jsou cíly mnoha typů posttranslačních modifikací, včetně acetylace a methylace lysinu a argininu, fosforylace serinu a threoninu a ubikvitinace lysinových zbytků (Ma 2014). Tyto modifikace histonů regulují transkripci genů, které hrají důležitou roli v buněčných procesech. Může vést k aktivaci nebo represi, např. tri-methylace lysinu 4 na histonu H3 (H3K4me3) je častější v oblastech transkripčně aktivních genů, naopak di- a tri-methylace H3K9 a tri-methylace H3K27 jsou přítomny v genových promotorech, které jsou transkripčně potlačovány (Saito et al. 2013).

Nedávné studie prokázaly, že konce histonů jsou abnormálně změněny v procesu hepatokarcinogeneze. Úroveň H3K27 tri-methylace byla významně zvýšena v HCC ve srovnání s okolní nenádorovou jaterní tkání. Zvýšená hladina H3K27 tri-methylace v HCC významně korelovala s velikostí nádoru, pokročilou klinickou fází, vaskulární invazí a zkrácenou dobou přežití pacientů s HCC. Tato zjištění naznačují, že zvýšená hladina H3K27 tri-methylace je nezávislým molekulárním markerem pro špatnou prognózu u nemocných s HCC (Saito et al. 2013).

### Acetylace histonů

Acetylace histonů je řízena dvěma rodinami enzymů: acetyltransferázami a deacetylázami. Histonové acetyltransferázy připojují acetylovou skupinu k  $\epsilon$ -aminoskupině lysinu, čímž se snižuje bazicita celé aminokyseliny. Neutralizuje se tím kladný náboj histonů, čímž se uvolňují těsné interakce mezi histony a DNA a dochází k rozvolnění chromatinu. Nízký stupeň acetylace způsobený deacetylázami (HDAC) naopak způsobuje vyšší bazicitu histonů a silnější vazbu s DNA. Hovoříme pak o kondenzovaném, transkripčně neaktivním chromatinu. Naopak acetylace je spojována s relaxovaným a transkripčně aktivním chromatinem (Ma 2014). Acetylace probíhá na dobře přístupných koncích histonů. Na histonu H3 jde o lysiny K9, K14, K18, K23, K27, K56 u H4 na lysinech K5, K8, K12 a K16 (Suchánková 2013).

### Methylace histonů

Enzymy zodpovědné za metylaci jsou lysinové a argininové methyltransferázy. Příkladem enzymu je proteinargininová methyltransferáza 1 (PRMT1), která má vysokou specifitu a methyluje výhradně arginin v pozici 27 histonu H4. Hlavním rozdílem je, že methylace je asociována jak s transkripčně aktivním (relaxovaným), tak i neaktivním (kondenzovaným) chromatinem. Děje se tak z důvodu, že methylová skupina je oproti acetylové neutrální (a navíc mnohem menší) a nezpůsobí změnu náboje histonu, ale vytváří vazebná místa pro enzymy, např. deacetylázy. Přesto však bývá rozvolněný chromatin spojován s H3K4, H3K36 a H3K79 a pro kondenzovaný je typická methylace H3K9, H3K27 a H4K20 (Suchánková 2013).

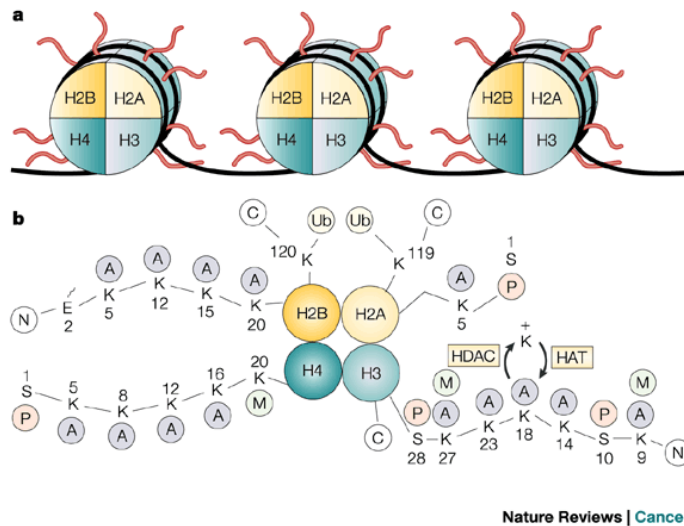
### Fosforylace histonů

Přenos fosfátové skupiny k histonu je katalyzován prostřednictvím AMP-dependentní kinázy. Následkem vazby je ovlivnění náboje a snížení bazicity histonu. Tímto způsobem je histon neutralizován a snižuje se jeho schopnost vzájemně působit se záporně nabitou DNA. Fosforylace, podobně jako acetylace, má pozitivní vliv na formování relaxované, transkripčně aktivní formy chromatinu. Snižuje tedy kondenzaci chromatinu během mitózy a meiózy a ovlivňuje transkripční aktivitu (Ludvíková et al. 2009). Nejznámější je fosforylace histonu H2AX, která je studována ve vztahu k reparaci DNA. Dále je například popsána fosforylace histonu H3 v pozici serinu 10 (H3S10ph), jež hraje hlavní roli v kondenzaci mitotických chromozomů (Suchánková 2013).

### Ubikvitinace histonů

Během procesu ubikvitinace vzniká kovalentní vazba mezi ubikvitinem a jinými proteiny. K ubikvitinaci dochází na histonu H2A a H2B. Vznik vazby katalyzují enzymy ubikvitinligázy a ve většině případů vzniká vazba mezi C-terminálním glycinem ubikvitinu a primární aminokyselinou lysinu. Ubikvitinace hraje důležitou roli v řadě buněčných procesů, ovlivňuje transkripci a reparaci DNA (Suchánková 2013).





**Obr. 6** Schéma histonu (Převzato z Marks et al. 2001). Obrázek histonů H2A, H2B, H3, H4 a z nich vybíhající aminoterminální řetězce (a). Na řetězcích jsou znázorněny aminokyseliny, které nejčastěji podléhají modifikacím. A- acetylce, M- methylce, P- fosforylace, Ub- ubikvitinace, E- kyselina glutamová, K- lysin, S- serin. N- začátek polypeptidového řetězce, C- konec polypeptidového řetězce (b).

#### 5.4.3.3 MikroRNA (*miRNA*)

MiRNA jsou přibližně 20 - 23 nukleotidů (nt) velké jednovláknové nekódující řetězce RNA. Působí jako posttranskripční regulátory vazbou na 3'-netranslatované oblasti (3'-UTR) z cílové RNA (mRNA). Mohou snižovat expresi různých cílových genů, tedy inhibují translaci určité mRNA v protein (Ma 2014).

MiRNA geny jsou přepsány v jádře do struktury vlásenky 70-100 nukleotidů dlouhé = pri-miRNA, která je uzavřena čepičkou na 5'konci a polyadenylovým koncem (AAAAA) na druhé straně. Přepis se děje za pomoci polymeráz a je katalyzován nukleázou Drosha a jinými proteiny. Tím vzniká komplex pre-miRNA. Po přemístění do cytoplazmy je štěpen endonukleázou Dicer na 19-25 nt velké miRNA duplexy. Jedna z částí duplexu je pak následně začleněna do RISC (RNA-induced silencing complex), kde miRNA snižuje expresi genových produktů prostřednictvím vazby na částečně komplementární sekvence na 3'-netranslatované oblasti cílové mRNA nebo řízenou degradací mRNA prostřednictvím vazby na dokonale komplementární sekvence (Obr. 5) Tímto jsou schopné regulovat (snižovat) výrobu proteinů, které tyto mRNA kódují (Saito et al. 2013).

### Aberantní exprese mikroRNA v HCC

MikroRNA hraje důležitou roli v základních biologických procesech, jako je buněčné dělení, proliferace, apoptóza, migrace a invaze. Proteiny kódující geny buněčného cyklu, apoptózy, metastázy jsou přímé cíle miR v HCC (Tab. 1), což naznačuje, že tyto miRNA mohou působit jako onkogeny urychlující rozvoj HCC (Saito et al. 2013). Microarray studie zjistila řadu miR, které jsou buď up- nebo down-regulovány. Down-regulace miRNA je běžný nálezn u HCC, což ukazuje, že některé mohou působit jako tumor-supresorové geny. Tumor-supresorové miR blokují buněčný cyklus, zvyšují apoptózu, snižují nádorovou angiogenezi a inhibují migraci metastáz. Naopak, tzv. onkomiRs (onkogenní miRNA) jsou v HCC up-regulovány. Experimentální potlačení onkomiRs napomáhá k obnovení exprese tumor-supresorových genů, které iniciují apoptózu, inhibují proliferaci buněk, angiogenezi a metastázy v HCC. OnkomiRs a jejich cílové geny v HCC jsou popsány v tabulce (Khare et al. 2013).

**Tab. 1 MicroRNA v HCC a jejich charakteristiky (Khare et al. 2013)**

onkomiR	Cíle	Charakteristika
<b>Down-regulace</b>		
miR-1	ET1	proliferace
miR-7a, -7b, -7c, -7d, -7f	Caspase-3, HMGA2, C-myc, Bcl-xl	proliferace, apoptóza
miR-101	Mcl-1, SOX-9, EZH2, EED, DNMT3A	proliferace, apoptóza
miR-122	Bcl-w, ADAM-1, Wnt-1	angiogenze, apoptóza, metastazování
miR-125a, -125b	MMP11, SIRT7, VEGF-A, LIN28B2, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w	angiogenze, apoptóza, metastazování, proliferace
miR-139	c-Fos, Rho-kinase-2	metastazování
miR-195	CDK6, E2F3, cyclinD1	proliferace, apoptóza, tumorigenicita
miR-199a-3P, -199-5p	c-Met, mTOR, PAK4, DDR1, caveolin-2	proliferace, metastazování
miR-214	HDGF, katenin	proliferace, angiogeneze, metastazování
<b>Up-regulace</b>		
miR-10a	EphA4, CADM1	metastazování
miR-21	Pten, RhoB, PDCD4	metastazování, léková rezistence
miR-221	Bmf, DDIT4, Arnt, CDKN1B/p27, CDKN1C/p57	angiogenze, apoptóza, proliferace
miR-224	Yin Yang1/Raf-1 kinase, NFκB pathways, apoptosis inhibitor-5	proliferace, apoptóza, metastazování

MiR-122 je specificky exprimována v hojném množství v lidských játrech. Nedávné studie prokázaly, že miR-122 může usnadňovat replikaci viru hepatitidy C, což naznačuje, že miR-122 je potenciálním cílem pro antivirovou terapii. U pacientů s HCC byly nižší hladiny miR-122 spojeny s kratší dobou do rozvoje recidivy (Saito et al. 2013).

#### MiRNA jako biomarkery v HCC

MiRNA mohou být brány jako markery HCC. Dow-regulace miRNA je spojena se špatnou prognózou, zvýšeným rizikem agresivní recidivy a kratším dobou do progresu onemocnění (progression free survival /PFS). Podobně up-regulace HCC

spojených s miR je spojena se špatnou prognózou. Studie ukázaly, že miRNA jsou chráněny před enzymatickým štěpením pomocí RNázy v krvi, a proto exprese miRNA v séru nebo v plazmě by mohla být také použita jako nový diagnostický marker. U HCC je takto studováno více než 20 perspektivních miRNA v séru a/nebo v plazmě (Khare et al. 2013).

#### MiRNA jako perspektiva pro terapii HCC

Slibnou možností léčby rakoviny je použití epigenetických léků, které inhibují růst nádorů několika mechanismy včetně obnovení exprese epigeneticky umlčených tumor-supresorových genů a miRNA (Saito et al. 2013).

Tumor-supresorové miRNA, které jsou exprimovány v normálních játrech, jsou down-regulovány v nádorových tkáních v průběhu vzniku nádoru a metastáz. Zdá se, že dobrou strategií pro léčbu pacientů s HCC by mohlo být doplnění těchto miRNA. Taková náhradní terapie byla prokázána na myších s použitím miR-26a, -122 a -124. Naopak, potlačení onkomiR-221 má za následek dlouhodobé přežití a snížení nádorů. Nicméně, vše je potřeba ještě ověřit u pacientů. Výhodou v porovnání s konvenční chemoterapií by měla být nižší toxicita vůči nenádorovým buňkám (Khare et al. 2013).

V nedávné době bylo také zjištěno, že inhibitor HDAC (histone deacetylase inhibitors) potlačil RNA replikaci viru hepatitidy C prostřednictvím epigenetických mechanismů v buňkách. Potlačení bylo vyvoláno indukcí apoptózy v nádorových buňkách jater prostřednictvím zvýšené exprese několika specifických miRNA. Toto zjištění naznačuje, že epigenetický přístup by mohl hrát důležitou roli nejen v protirakovinné léčbě, ale i antivirové léčbě HCC (Ma 2014; Saito et al. 2013).

Řada epigenetických léků v klinických studiích ukázala slibné výsledky. Nicméně i tyto léky mají některé problémy jako např. aktivace tzv. off-target genů, které mají opačné účinky. Proto je pro rozvoj léčby nezbytné vést další studie a zaměřit se na lepší identifikaci skupiny pacientů, kterým by předepsaná léčba nejvíce prospívala v závislosti např. na typu a stadiu onemocnění (Ma 2014).

## **5.5 KLINICKÉ PŘÍZNAKY NEMOCI**

Hepatocelulární karcinom má poměrně dlouhý doubling time - 1 až 19 měsíců s mediánem 4 - 6 měsíců. Proto příznaky vznikají pomalu a bohužel většina pacientů je

diagnostikována až v pozdější fázi onemocnění, kdy už se tumor šíří (Bialecki a Di Bisceglie 2005).

Klinické projevy onemocnění jsou závislé především na velikosti nádoru a funkčním stavu nepostižené části jater. Mezi klasické projevy hepatocelulárního karcinomu patří bolest v pravém horním kvadrantu břicha a hubnutí (El-Serag et al. 2007). Příznaky u pacientů s cirhózou a bez ní se liší. U pacientů s progredující cirhózou mohou být typické rysy jako např. žloutenka, palmární erytém, ascites, jaterní dekompenzace, encefalopatie, krvácení z jícnových varixů projevem HCC. Dále se může projevat anorexie, úbytek váhy, pocit plnosti a bolesti břicha. Při náhlém zhoršení stavu u jedince s cirhózou je důležité vždy myslet na hepatocelulární karcinom. U pacientů bez cirhózy mohou být příznaky HCC zpočátku nenápadné, projevit se začnou až při značné velikosti nádoru. Nejdříve se objevují necharakteristické trávící obtíže – abdominální dyskomfort, zvětšení objemu břicha, úbytek hmotnosti, ikterus a únava. (Adam et al. 2002). Vzácně se HCC může projevit i jako náhlá břišní příhoda (NBP) od prasknutí povrchového karcinomu s nitrobřišním krvácením nebo další jaterní projevy (např. hyperkalémie, hypoglykémie, tyreotoxikóza) (El-Serag et al. 2008).

## **5.6 DIAGNOSTIKA**

### **5.6.1 Laboratorní vyšetření (screening)**

Screening je doporučován u pacientů s vysokým rizikem HCC, jimiž jsou např. nosiči viru hepatitidy B, C, lidé s rodinnou anamnézou HCC, alkoholickou cirhózou, primární biliární cirhózou, asijské ženy od 50 let a muži od 40 let, afričané nad 20 let (El-Serag et al. 2008).

Existuje celá řada studií prokazující stanovení alfa-fetoproteinu (AFP,  $\alpha$ 1 globulin tumor marker) jako screeningové vyšetření, má však nízkou senzitivitu (Ryder 2003). Normální rozsah pro AFP je 10 až 20 ng/ml. Až u 30 % pacientů s chronickou virovou hepatitidou bývá falešně pozitivně zvýšená hodnota AFP. 40 % až 50 % případů HCC má hodnoty alfa-fetoproteinu v normě. Pozitivní prediktivní hodnota se výrazně zvyšuje (95% spolehlivost), když je AFP větší než 400 ng/ml. Právě proto je hodnota AFP spíše užitečná při monitorování odpovědi na léčbu a detekci recidivy po léčbě HCC, v případě, že AFP bylo zvýšeno před léčbou (El-Serag et al. 2008). Testování AFP společně s ultrazvukovým vyšetřením u rizikových pacientů je doporučováno v 6 měsíčních intervalech (Bruix a Sherman 2011).

K dispozici jsou i jiné testy, jako vyšetření markeru des-gamma-karboxyprotrombinu, ale nejsou žádné spolehlivé údaje o jeho účinnosti v HCC screeningu. Měření des-gamma-karboxyprotrombinu se zdá vhodné u osob s chronickým onemocněním jater a pro monitorování stavu po léčbě (Ikoma 2002).

## **5.6.2 Zobrazovací vyšetření**

Jakmile je screeningový test abnormální nebo existuje podezření, že pacient může mít HCC, je zobrazovací vyšetření velmi důležité pro diagnostiku a staging nádoru (El-Serag et al. 2008).

### **5.6.2.1 Ultrazvuk**

Sonografický obraz HCC závisí na velikosti, histologii a růstu léze. Pomocí něj lze objevovat i malé nádory (0,5 až 1 cm). Většina lézí menší než 3 cm je hypoechogenní, pravděpodobně v důsledku jejich homogenní buněčné struktury. Větší HCC obvykle mají nestejnoměrné ozvěny kvůli krvácení, nekróze nebo tukovým změnám. Barevný Dopplerův ultrazvuk může být velmi užitečný jak v diagnostice, tak při diagnostice komplikací. Sledování průtoku lézí může být užitečné při rozlišování HCC od jiných jaterních nádorů (Frazer 1999).

### **5.6.2.2 Klasické a spirální CT**

K detekci a charakterizaci HCC slouží různé CT techniky. Použití spirálových skenerů umožňuje velmi rychlé zobrazení jater po intravenózní infuzi kontrastních látek. V dnešní době se jedná o nejspolehlivější diagnostické testy (Frazer 1999; Befeler 2002). Jako kontrastní činidlo se využívá lipiodol, který se podává do a. hepatica a je selektivně zadržován v tumoru. Pomocí této metody lze získat informace o velikosti tumoru a objemu netumorózního parenchymu jater. Citlivost při CT je pro léze menší než 5 cm 82 % a pro léze menší než 2 cm 56 %. Lipiodolové CT má citlivost u tumoru do 5 cm 96 % a do 2 cm 93 %. Jedinou nevýhodou lipiodolu je, že není specificky zadržován jen v hepatocelulárním karcinomu (Adam et al. 2002).

### **5.6.2.3 CT hepatikografie**

Hepatikografie využívá kontrastního vyšetření jaterní tepny (arteria hepatica). Do arteria hepatica je vpravena kontrastní látka souběžně s CT vyšetřením a dochází

k vysycování HCC příznačně více než u metastázy nebo jiných jaterních patologických lézí (Adam et al. 2002).

#### **5.6.2.4 CT angioportografie jater (CTAP)**

Výpočetní tomografická angiografie jater je velmi citlivá metoda. Tato metoda je založena na zvýraznění jaterního parenchymu, ke kterému dochází po vstříkování kontrastního činidla do sleziny nebo do mezentrické tepny (a. mesenterica superior) za současného CT skenování náplně do portálního řečiště se zpožděním (Frazer 1999). Výsledkem je zobrazení jaterních ložisek, satelitních ložisek a zjištění velikosti tumoru, což jsou důležité informace k případnému nesekčnímu výkonu (Adam et al. 2002).

#### **5.6.2.5 Multidetektorové CT**

Multidetektorové CT (MDCT) využívá provedení obou těchto fází (Adam et al. 2002).

#### **5.6.2.6 Angiografie**

Angiografie je jednou z vysoce specifických diagnostických metod a lze pomocí ní odhalit malá ložiska. Vyšetření závisí do značné míry na charakteru růstu nádoru. Hepatocelulární karcinom má typický hypervaskularizovaný vzhled. V praxi se angiografie provádí samostatně jen zřídka, neboť je součástí výše uvedených vyšetření (Frazer 1999; Adam et al. 2002).

#### **5.6.2.7 Magnetická rezonance**

Magnetická rezonance (MRI) je diagnostická technika, která nabízí dobré rozlišení a citlivost v rozmezí od 33 % do 77 %. Hlavní problém není v diagnostice velkých nádorů, ale spíše malých nádorů (< 2 cm), protože do značné míry dochází k překrytí mezi benigními (regeneračními), hraničními (dysplastickými) a maligními uzlinami. Citlivost MRI pro detekci malých lézí je tedy nízká. MRI je cenově nákladná a indikována je pouze ve sporných případech (Taouli a Losada 2004).

### **5.6.3 Bioptické vyšetření**

Histologické vyšetření jaterní tkáně je důležitým prvkem v diagnostice HCC. U pacientů bez cirhotického poškození jater bývá prováděna skrz játra buďto pohmatem tzv. poslepu, nebo častěji pod radiologickým vedením pomocí ultrazvuku nebo CT. U pacientů s cirhózou se bioptické vyšetření neprovádí z důvodu rizika krvácení a zanesení rakovinových buněk do peritoneální dutiny a stěny břišní (Adam et al. 2002; Befeler 2002).

Materiál získaný aspirací jemnou jehlou může být hodnocen histologicky, cytologicky nebo pomocí obou metod v kombinaci. Někdy je obtížné odlišit dobře diferencovaný HCC od benigní transformace, fokulární nodulární hyperplazie a hepatocelulárního adenomu (Befeler 2002).

Negativní výsledek biopsie nemusí zcela vyloučit maligní onemocnění. Uzlík by měl být dále sledován v 3 až 6 měsíčních intervalech dokud nezmizí, nezvětší se nebo nezačne vykazovat vlastnosti HCC. Pokud se léze zvětší, ale zůstává atypická, doporučuje se opakování biopsie (El-Serag et al. 2008).

### **5.6.4 Diferenciální diagnostika**

Rozlišení hepatocelulárního karcinomu od nenádorových jaterních ložisek (absces, tukový infiltrát, hematoma) a benigních nádorů (fokální modulární hyperplazie, jaterní adenom, cystadenom, hemangiom, modulární regenerativní hyperplazie) má velký praktický význam s terapeutickými a prognostickými důsledky. Diferenciální diagnostika může být obtížná, protože metastázy v játrech, zejména adenokarcinomů, mohou napodobovat morfolonii a immunoexpresi hepatocelulárního karcinomu. Zejména rozlišení mezi malým hepatocelulárním karcinomem a velkými uzly při jaterní cirhóze může být dosti obtížné (Barshak et al. 2010).

## **5.7 LÉČBA**

HCC je heterogenní onemocnění, které vyžaduje multidisciplinární přístup. Jedním z hlavních klinických problémů je neschopnost detekovat HCC v raném stádiu. Pacienti jsou často diagnostikováni v pokročilém stádiu onemocnění, což omezuje



možnosti léčby a vede k jejímu nepříznivému výsledku a ke špatné prognóze. Mezi současné léčebné strategie patří: resekce a transplantace jater, ablace, chemoembolizace, systémová chemoterapie a radioterapie. Nicméně, tyto přístupy jsou omezeny nedostatkem dárců, malým procentem pacientů vhodným pro chirurgické odstranění, vysokou pooperační recidivou a souvisejícími komplikacemi (Ma 2014).

### 5.7.1 Stádia nemoci

Stagingovým systémem hepatocelulárního karcinomu je v současné době pTNM klasifikace (Tab. 2). Principem této klasifikace je hodnocení velikosti nádoru T (tumor), postižení lymfatických uzlin N (noduli), přítomnost vzdálených metastáz M, přítomnost vaskulární invaze, lobární distribuce primárního nádoru (Adam et al. 2011).

**Tab. 2 TNM klasifikace HCC. Převzato z (El-Serag et al. 2008)**

<b>T kategorie - Primární nádor</b>	
<b>TX</b>	Primární nádor nelze posoudit
<b>T0</b>	Žádné známky primárního nádoru
<b>T1</b>	Solitární nádor do 2 cm nebo méně bez invaze do cév
<b>T2</b>	Solitární nádor do 2 cm nebo méně s invazí do cév, nebo mnohočetné nádory ohraničené na jeden lalok, žádný není větší než 2 cm, bez invaze do cév
<b>T3</b>	Solitární nádor větší než 2 cm nebo méně s invazí do cév, nebo mnohočetné nádory ohraničené na jeden lalok do 2 cm s invazí do cév
<b>T4</b>	Mnohočetné nádory ve více než jednom laloku, nebo nádor prorůstá do větší větve vena portae nebo vena hepatica s přímou invazí do sousedních orgánů mimo žlučník nebo perforací do viscerálního peritonea
<b>N kategorie - Regionální mízní uzliny</b>	
<b>NX</b>	Regionální mízní uzliny nelze posoudit
<b>N0</b>	Žádné metastázy v regionálních mízních uzlinách
<b>N1</b>	metastázy v regionálních mízních uzlinách
<b>M kategorie - Vzdálené metastázy</b>	
<b>MX</b>	Přítomnost vzdálených metastáz nelze posoudit
<b>M0</b>	Žádné vzdálené metastázy
<b>M1</b>	Vzdálené metastázy

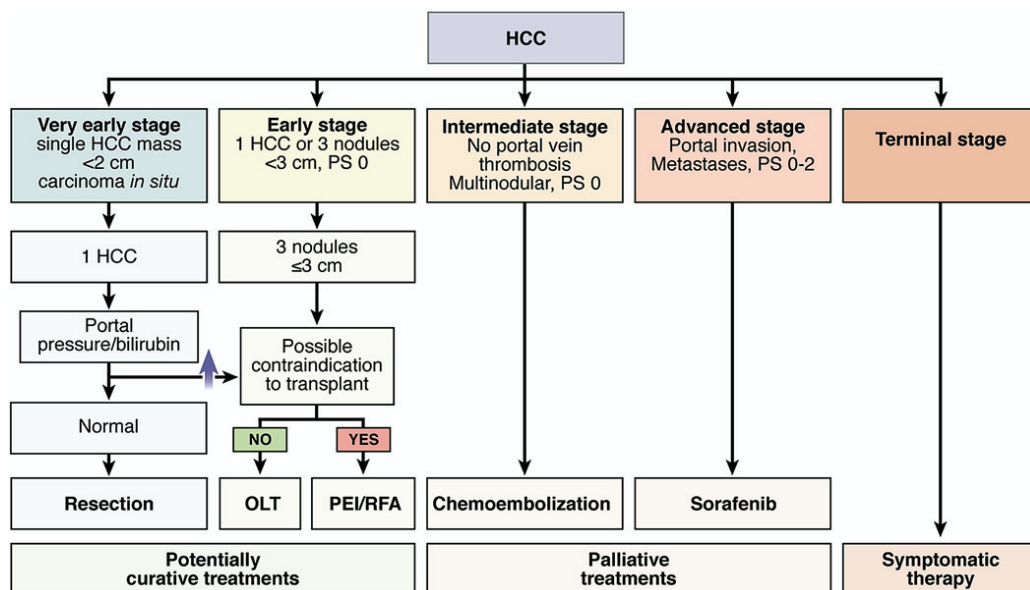
Stádia - Stádia podle kategorií TNM	
<b>Stádium I</b>	T1N0M0
<b>Stádium II</b>	T2N0M0
<b>Stádium IIIA</b>	T3N0M0
<b>Stádium IIIB</b>	T1N1M0 nebo T2N1M0 nebo T3N1M0
<b>Stádium IVA</b>	T4, M1 a žádné N
<b>Stádium IVB</b>	M1, žádné T a N

Při potřebě operace je nutné, aby lékař přihlédl k funkčnímu stavu jater (poškození) a vyhodnotil jednotlivá kritéria dle klasifikace *Child – Pugh* (Tab. 3) (Adam et al. 2002).

**Tab. 3 Klasifikace dle Child – Pugh. Převzato z (Adam et al. 2002)**

body			
parametr	1	2	3
<b>Encefalopatie</b>	nepřítomna	mírná	kóma
<b>Ascites</b>	nepřítomen	refrakterní	rezistentní
<b>Bilirubin (μmol/l)</b>	< 26	25 - 51	> 51
<b>Albumin (g/l)</b>	> 35	28 - 35	< 28
<b>Quick (%)</b>	> 65	40 - 65	< 40
<b>Stadia</b>	Stadium A - 5 až 6 bodů	Stadium B - 7 až 9 bodů	Stadium C - 10 až 15 bodů

HCC se liší od jiných druhů rakoviny, protože přežití není převážně založeno na biologii nádoru, ale také závisí na základní funkci jater. Příznaky jednotlivých etap HCC se do určité míry mohou navzájem překrývat. Každá z nich má ale také různé klinické projevy, které mohou napomoci při volbě léčby a určení prognózy (Obr. 8) (El-Serag et al. 2008).



Obr. 7 Algoritmus pro léčbu HCC (El-Serag et al. 2008). PS- stav výkonosti, OLT- ortopedická transplantace jater, PEI- perkutánní vstřikování ethanolu, RFA- radiofrekvenční ablace.

## 5.7.2 Chirurgická léčba

### 5.7.2.1 Resekce jater

Resekce jater léčí HCC odstraněním části jater zasažené rakovinou. Spolu s transplantací je druhou možností jak účinně odstranit rakovinu, ale má tu nevýhodu, že není schopna eliminovat riziko maligní transformace zbývající části jater (Befeler 2002). Resekce je vhodná pouze pro pacienty s vynikající funkcí jater (*Child-Pugh A*), vzhledem k vysokému riziku jaterní dekompenzace (Ryder 2003). Hlavním limitujícím faktorem pro provedení jaterní resekce je cirhóza, přesněji stav jaterního parenchymu postiženého cirhózou. Resekce nádoru je u cirhotických jater technicky proveditelná, ale cirhóza snižuje schopnost přežití pacienta. Proto vyžaduje pečlivou indikaci. Zásadním problémem je nejen fáze cirhózy, ale také zmenšení regenerační rezervy (El-Serag et al. 2008).

Lékař určí lokalizaci, velikost léze a funkční kapacitu jaterního parenchymu a až poté zvolí resekci jednoho nebo více jaterních segmentů. Velikost maximální resekce pro určitá stádia cirhózy se přesně hodnotí dle *Child-Pugh*. Mezi proměnné ovlivňující riziko recidivy po resekci jsou velikost tumoru, počet lézí, cévní invaze a šířka resekčního okraje. U recidivujících pacientů bylo po druhé resekci zjištěno delší přežití

než u pacientů bez další léčby. Studie ukazují, že roční přežití u operovaných pacientů je přibližně 76 % a tříleté přežití 31 % (Adam et al. 2002; El-Serag et al. 2008).

### **5.7.2.2 Transplantace jater**

Teoreticky optimální terapeutickou možností léčby HCC je transplantace jater (OLT). Současně je odstraněn primární nádor, zbývající jaterní tkáň, která představuje riziko vzniku rakoviny denovo a cirhóza, čímž se minimalizuje riziko opakovaného vzniku HCC (El-Serag et al. 2008).

Většina transplantačních center používá svá vlastní kritéria pro indikace a kontraindikace transplantace. V 80. letech tvořili indikační skupinu především pacienti s tumorem v málo pokročilé cirhóze a bez portální hypertenze. Zásadní změna nastala, když Bismuth et al. navrhli první indikační kritéria transplantace, kde vhodnými kandidáty byli pacienti s tumorem do 3 cm. Později v roce 1996 Mazzaferro et al. zveřejnil studii, která prokazovala dobrou prognózu a nízkou rekurenci po transplantaci u pacientů s malým HCC.

Kritéria pro výběr byla následně rozšířena jako tzv. Milánská kritéria, která povolovala jedno ložisko do velikosti 5 cm nebo 3 tumory menší než 3 cm. Tato kritéria splňovalo čím dál méně pacientů a tím byla jejich možnost transplantace odmítnuta. V současné době se OLT často posuzuje podle kritérií University of California v San Francisku (UCSF). Podle UCSF kritérií může být transplantace indikována u pacientů s jedním uzlem HCC do 6,5 cm anebo s maximálně třemi uzly, z nichž největší má velikost do 4,5 cm a součet všech uzlů je menší než 8 cm. Transplantace je kontraindikována v případě extrahepatálního rozšíření nádoru, IV. stádia onemocnění a agresivní hepatitidy B. V dnešní době se jednoroční přežívání po transplantaci jater přibližuje 90 % a některé studie udávají tříleté přežití u 80 % pro klinické stádium I (Šenkeříková 2014).

## **5.7.3 Paliativní léčba**

### **5.7.3.1 Perkutánní ablace**

Ablace je velmi dobrou alternativou léčby pro pacienty v časném stádiu HCC, protože je minimálně invazivní. Mezi široce používané metody, které indukují nekrózu nádoru, jsou perkutánní injekce alkoholu (PEI) a radiofrekvenční ablace

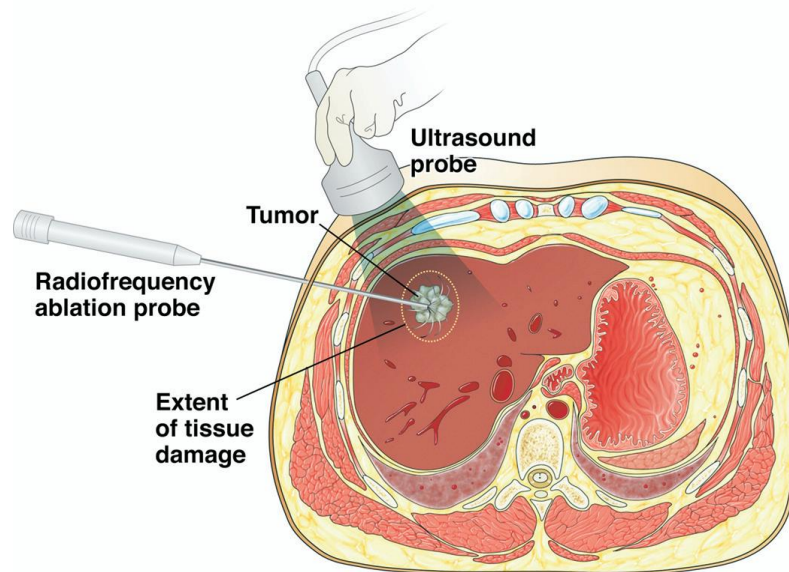
(RFA). Jiné, méně používané metody zahrnují injekci kyseliny octové, kryoterapii nebo mikrovlnou - PMC a laserovou - LITT terapii (Befeler 2002).

Principem PEI je perkutánní zavedení absolutního alkoholu přímo do lézí HCC, který denaturuje bílkoviny, způsobí dehydrataci buněk a následně jejich koagulační nekrózu.

Injekční jehla je do ložiska zaváděna pod kontrolou ultrazvuku. Výskyt komplikací je poměrně vzácný, ale může docházet k tvorbě implantačních metastáz v místě opakovaných vpichů jehly. Metoda alkoholizace má jednoduchou aplikaci a je časově a ekonomicky nenáročná (Kaplan 2005). Indikace PEI je u pacientů s ložisky do velikosti 4 – 5 cm a je možné ji v případě lokální recidivy opakovat. Výhodou je histopatologická struktura HCC, která je odlišná od okolního jaterního parenchymu a umožňuje tak velmi dobrou distribuci alkoholu dovnitř ložiska. Při kontaktu alkoholu s bohatým cévním zásobením nádoru dojde k ischemii a nekróze nádoru (Brown a Brady 2001).

Radiofrekvenční ablace HCC (Obr. 9) je relativně nový postup s použitím sondy umístěné do nádoru, obvykle perkutánně (Ryder 2003).

Principem je zavedení elektrody, která generuje vysokofrekvenční proud (100 – 500 kHz) do ložiska, kde je přeměněn na teplo. Následkem vznikajícího tepla dojde k ohřevu tkáně na teplotu 50 °C a více. Vysoká teplota způsobí rozpouštění buněčných membrán, denaturaci a nevratné poškození léze až do 5 cm (Kaplan 2005). RFA se provádí za kontroly ultrazvuku, CT nebo MNR. Rizika zahrnují krvácení z místa vpichu a podobně jako u perkutánní injekce alkoholu horečku, bolest břicha a přechodné zvýšení sérových transamináz (Befeler 2002).



**Obr. 8 Perkutánní ablace HCC pomocí radiové frekvence (El-Serag et al. 2008)**

### **5.7.3.2 Embolizační metody**

Jsou široce používané jako primární terapie pro neoperovatelné HCC. Základem embolizace je vyvolat ischemickou nekrózu nádoru přes akutní arteriální okluze. Embolizace může být provedena samostatně (prostá embolizace) nebo s podáním chemoterapie (transarteriální chemoembolizace - TACE) (El-Serag et al. 2008).

Principem TACE je uzavření krevního toku na arterio – kapilární úrovni za použití koloidního nosiče s navázaným cytostatikem. Cytostatikum navázané na nosič je vpraveno do artérie, která vyživuje tumor, a nosič způsobí zablokování drobných artérií a kapilár. Během toho se cytostatikum postupně uvolňuje do okolí. Látky nejčastěji používané k chemoembolizaci jsou např. *lipiodol s adriamycinem* nebo *doxorubicin, mitomycin*. Transarteriální chemoembolizace je první volbou terapie pro pacienty ve střední fázi HCC, která překračuje kritéria pro transplantaci jater. Kromě toho se TACE provádí v počáteční fázi HCC, kde nelze provést radiofrekvenční ablaci z důvodu umístění nádoru (v blízkosti žlučníku, žlučových cest nebo krevní cévy). Nežádoucí účinky chemoembolizace vyvolává většinou použité chemoterapeutikum a mohou se projevovat jako bolest břicha, horečka, nevolnost, zvracení, útlum kostní dřeně aj. (Ryder 2003; Kaplan 2005).

### 5.7.3.3 Systémová chemoterapie

Hepatocelulární karcinom se řadí mezi chemorezistentní nádory, jejichž citlivost na chemoterapeutika není moc velká. Je prokázáno, že systémové podání chemoterapie nemá statisticky významný vliv na dobu přežití (Adam et al. 2011). V nitrožilní chemoterapii je prozatím nejvíce používaným lékem 5 – fluorouracil nebo doxorubicin v kombinaci s jinými léky (Tab. 4) (Adam et al. 2002). 5 – fluorouracil inhibuje enzym thymidylátsyntézu, která je důležitá pro syntézu thymidinu. Zabudováním do struktury RNA blokuje její funkci a poškozuje syntézu molekul RNA a DNA (Lokich 1985; Kaplan 2005).

**Tab. 4 Chemoterapeutika používaná u HCC (Befeler 2002)**

---

5 – fluorouracil
Doxorubicin
Epirubicin
Cisplatina
Etoposid fosfát
$\alpha$ Interferon
Tamoxifen

---

K dnešnímu dni je v klinických zkouškách HCC k dispozici řada léčiv. Některé vědecké studie zkoumají aplikaci interferonu alfa v léčbě HCC. Tento terapeutický postup není prováděn v rámci standardní léčby, ale pouze experimentálně v klinických studiích (Adam et al. 2002).

Interferon alfa má širokou protinádorovou aktivitu a je známo, že je účinným způsobem léčby u některých hematologických malignit. Podávání interferonu může mít úlohu v prevenci HCC u cirhotických pacientů s hepatitidou C. První data ze dvou studií v Japonsku a Evropě ukázaly nižší riziko HCC u cirhotických pacientů s hepatitidou C, kteří dostávali léčbu interferonem ve srovnání s těmi, kteří léčení nebyli. Tento účinek byl viděn po léčbě trvající pouze tři měsíce. Tyto studie však mohou být do určité míry zkreslené a proto se v současné době doporučuje tuto terapii provádět pouze v rámci klinických studií. Interferon alfa má vysokou míru nežádoucích účinků (Ryder 2003).

#### **5.7.3.4 Radioterapie**

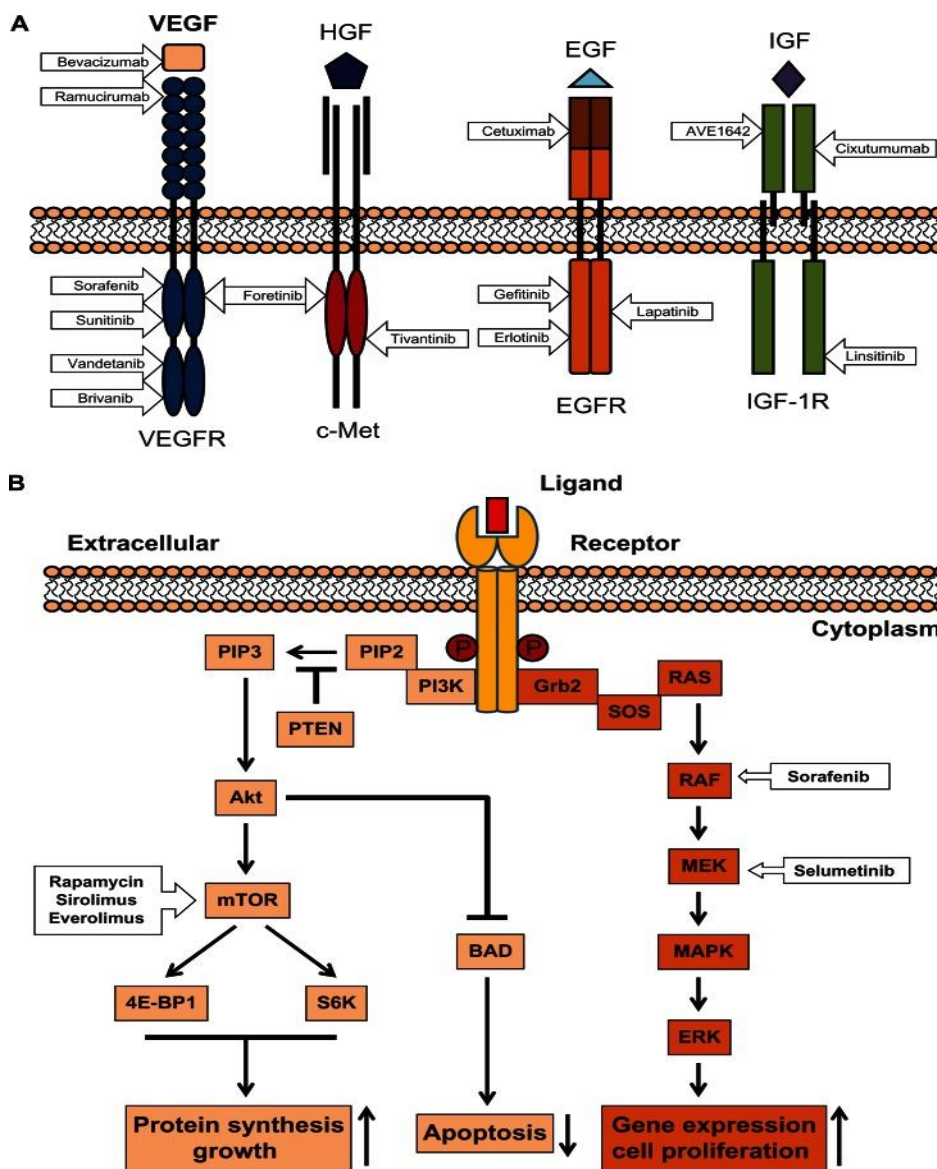
Radioterapie má při léčbě HCC omezené využití. Zdravý jaterní parenchym je totiž poměrně radiosenzitivní, zatímco hepatocelulární karcinom je více radiorezistentní. Pro zvýšení účinku zevní radiace a minimalizace škodlivých působení na zdravý jaterní parenchym je používána celá řada principů. Příkladem je cílená radioterapie, při níž se podávají protilátky proti antigenům nádoru s navázaným radioizotopem, který zajistí shromáždění radiace v nádorové tkáni. Tento postup léčby není však úplně standardní (Adam et al. 2002).

#### **5.7.3.5 Molekulární terapie a nové léky ve vývoji**

Existuje rostoucí počet klinických studií hodnotících účinnost molekulární terapie v HCC, jak samotné tak v kombinaci s klasickou chemoterapií. Nejslibnější strategie pro systémovou léčbu je cílená terapie. Úspěšná cílená léčba musí inhibovat dráhy, které jsou nezbytné pro růst nádoru a to i v pozdních stádiích rakoviny. P16/Rb, IGFR2, stejně jako změny telomeráz, c-myc, Wnt/ $\beta$ katenin, P13K/Akt, Hedgehog atd. se nejčastěji podílejí na lidské hepatokarcinogenezi (Zender 2008).

Látky, které specificky narušují molekulární dráhy v HCC jsou navrženy a testovány k potlačení rozvoje rakoviny jater. Existují dva typy těchto činidel: monoklonální protilátky a malomolekulární inhibitory (Wei et al. 2013).





**Obr. 9 Molekulární cílená léčba:** ( A ) tyrosin kinázové receptory a jejich ligandy, ( B ) léky namířené proti cílům signálních drah (Wei et al. 2013).

Anti-VEGFR dráha

V současné době jsou nejvíce atraktivním cílem pro molekulární terapii HCC inhibitory angiogeneze. V HCC byla prokázána zvýšená exprese pro-angiogenních faktorů, jako je VEGF, PDGF a angiopoietin 2. Experimentální studie ukazují, že cílené studium angiogeneze je perspektivní (Bronte et al. 2014).

Mezi hlavní látky testované v klinických studiích patří bevacizumab, sunitinib, sorafenib, brivanib a vandetanib. Bevacizumab je monoklonální protilátka neutralizující biologickou aktivitu VEGF (Obr. 10). Byl schválen pro léčbu

rakoviny prsu a jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. Mechanismus účinku této sloučeniny u HCC je sporný, doporučuje se používat pro vybraný okruh pacientů (Hasehm 2008; Llovet, Bruix 2008). U 46 vybraných pacientů ve 2. fázi klinické studie se ukázaly slibné výsledky: u 13 % došlo k částečné odpovědi a 65 % se onemocnění stabilizovalo po dobu až 6 měsíců. Hlavním nežádoucím účinkem byly těžké krvácivé komplikace. U dvou pacientů se objevilo krvácení do gastrointestinálního traktu, které u jednoho vedlo ke smrti (Wei et al. 2013).

Jediným lékem, u kterého se prokázalo zlepšení celkového přežití u pacientů s pokročilým HCC je sorafenib (Nexavar). Sorafenib byl v roce 2007 ve Spojených Státech schválen pro léčbu pokročilého hepatocelulárního karcinomu (Ma 2014). Je to multikinázový inhibitor, který působí tak, že narušuje dráhu receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) v nádorové proliferaci a angiogenezi. V posledních dvou velkých klinických studiích se ukázalo, že medián celkového přežití byl 10,7 měsíců a snížil relativní riziko úmrtí o 31 %. Přestože tolerance k sorafenibu byla obecně dobrá, objevily se i nežádoucí účinky jako průjem, únava, ztráta hmotnosti a kožní reakce (Pang a Poon 2007; Giaccone a Soria 2007). Podrobné mechanismy protinádorového účinku sorafenibu zůstávají nejasné a to zejména přímé molekulární účinky na buňky HCC. I když není pochyb o klinické účinnosti sorafenibu v tom, že zlepšuje přežití, je velice závažný také projev nežádoucích účinků a jaterní dysfunkce (Honma et al. 2014; Germano et al. 2013).

Jiné probíhající studie zkoumají užívání sorafenibu v kombinaci s jinými léky. Podle dokončené 2. fáze klinické studie bylo při podávání sorafenibu v kombinaci s doxorubicinem celkové přežití 13,7 měsíců ve srovnání s 6,5 měsíci u pacientů léčených doxorubicinem samotným. Některé další zkoumané látky v kombinaci se sorafenibem jsou AVE1642, erlotinib, linsitinib, cixutumab (Wei et al. 2013).

#### Anti-HGF / c MET cesta

Foretinib je perorální selektivní inhibitor c-MET a VEGFR-2. Vzhledem k tomu, že zvýšená exprese c-MET v HCC dobře koreluje s vývojem této nemoci, se obecně předpokládá, že cílená léčba pomocí foretinibu mohla přinést přínos. Tento inhibitor vykazuje inhibiční účinek na angiogenezi, proliferaci buněk a nádorových metastáz na preklinických modelech HCC. Dalším podobným zkoumaným selektivním inhibitorem c-MET je tivantinib.

### Anti-EGFR cesta

Gefitinib je molekulární inhibitor tyrozin kinázy EGFR a inhibuje její aktivitu vazbou na ATP-vazebné místo a blokuje signální dráhy Ras. Byl vyvinut k léčbě typů rakoviny, ve kterých je nadměrně exprimován EGFR, jako je rakovina plic a prsu. I když se prokázala schopnost zabránit rozvoji HCC v myších modelech, při použití v klinické studii výsledky nesplňily kritéria pro druhou fázi a autoři dospěli k závěru, že tento lék nevykazuje protinádorovou aktivitu u pacientů s pokročilým HCC.

### Anti-IGF-1R cesta

Lidská monoklonální protilátka AVE1642, která specificky blokuje IGF-1R signalizaci vazbou na extracelulární doménu. Fáze I klinické studie uvádí, že AVE1642 může být spojen s podáváním sorafenibu. Tato kombinace nezasahovala do farmakokinetiky jednotlivých dvou léků a dosáhla střední doby přežití bez progresu 13,3 týdnů u většiny pacientů.

### Anti-mTOR

Sirolimus a everolimus jsou analogy ramapycinu a selektivní inhibitory mTOR kinázy. Vzhledem k tomu, že mTOR hraje klíčovou roli v přenosu signálu mnoha tyrozinkinázových signálních drah, inhibice mTOR by měla mít protinádorový účinek proti širokému spektru nádorů.

Experimentální studie používající ramapycin a jeho analog everolimus u HCC ukazují významný vliv na snížení růstu nádorových buněk a zlepšení přežívání buněk. Několik probíhajících studií pacientů s HCC se snaží určit účinky těchto léků v kombinaci se sorafenibem a konvenčními chemoterapeutiky.

**Tab. 5 Klasifikace léku a dráhy, které ovlivňují (Wei et al. 2013).** TKI – malé molekuly tyrosin kinázové inhibitory, Mab – monoklonální protilátky.

Lék	Klasifikace	Cíl	Stupeň
Sorafenib	TKI	VEGFR, PDGFR, Raf	Schválený
Vandetanib	TKI	VEGFR, EGFR	Fáze I / II
Brivanib	TKI	VEGFR, EGFR	Fáze III
Sunitinib	TKI	VEGFR, PDGFR	Fáze III
Bevacizumab	Mab	VEGFR	Fáze II
Ramucirumab	Mab	VEGFR	Fáze II / III
Foretinib	TKI	c-MET, VEGFR	Fáze I / II
Tivantinib (ARQ197)	TKI	c-MET	Fáze I / II
Gefitinib	TKI	EGFR	Fáze II
Erlotinib	TKI	EGFR	Fáze I / II
Lapatinib	TKI	EGFR	Fáze II
Cetuximab	Mab	EGFR	Fáze II
Linsitinib (OSI-906)	TKI	IGF-1R	Fáze II
AVE1642	Mab	IGF-1R	Fáze I / II
Cixutumumab	Mab	IGF-1R	Fáze II
Sirolimus	Mab	m-TOR	Fáze II
Everolimus	TKI	m-TOR	Fáze I / II
Selumetinib (AZD6244)	TKI	MEK	Fáze I / II

Důležitým faktorem pro zlepšení terapie HCC v budoucnu je vývoj nových markerů pro zlepšení screeningu pacientů s cirhózou a správný výběr pacientů, u kterých by měl větší prospěch chirurgický zákrok nebo chemoterapie. Používání nových prediktivních markerů je zatím testováno v klinických studiích (El-Serag et al. 2008).

## 5.8 PROGNÓZA

Přesný staging onemocnění může pomoci rozhodnout o prognóze, stejně však volba terapie s největším potenciálem pro přežití. Neléčený HCC má špatnou prognózu s mediánem přežití 6-9 měsíců (EL-Serag et al. 2008).

**Tab. 6 Okudova prognostická klasifikace nemocných s HCC. Převzato z (Adam et al. 2002)**

	body
Velikost tumoru do 50 % jater	0
Velikost tumoru nad 50 % jater	1
Ascites nepřítomen	0
Ascites přítomen	1
Albuminemie nad 30 g/l	0
Albuminemie pod 30 g/l	1
Bilirubinemie pod 50 µmol/l	0
Bilirubinemie nad 50 µmol/l	1
<b>Okuda I = 0 bodů – přežívání 8 měsíců</b>	
<b>Okuda II = 1 a 2 body – přežívání 2-3 měsíce</b>	
<b>Okuda III = 3 a 4 body - několik týdnů</b>	

## 5.9 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou skupina enzymů, které se podílejí na různých buněčných procesech v lidském těle. Kromě jejich nejvíce diskutované role v metabolismu léčiv a jiných xenobiotik, hrají CYP důležitou roli v endogenních metabolických drahách, včetně metabolismu nebo biosyntézy cholesterolu, žlučových kyselin, steroidů, vitamínu D3, kyseliny arachidonové a jejich derivátů (eikosanoidů, např. prostaglandinu) (Nekvindová et al. 2013). Jejich schopnost katalyzovat oxidativní biotransformaci většiny léků a jiných lipofilních xenobiotik je zvláště důležitá pro klinickou farmakologii.

Je známo 57 funkčních lidských CYP, které se řadí do 1, 2 a 3 CYP-rodiny, z nichž každá je spojena s jinou řadou léčiv. Kromě toho, stále existuje poměrně mnoho CYP s dosud neznámou funkcí. Nejvíce forem CYP se vyskytuje v játrech a jsou to CYP 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 a 1A2, zatímco 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 a 3A5 jsou v játrech méně hojné a CYP 2J2, 1A1 a 1B1 jsou exprimovány extrahepatálně v respiračním a trávicím traktu. (Zanger et al. 2013).

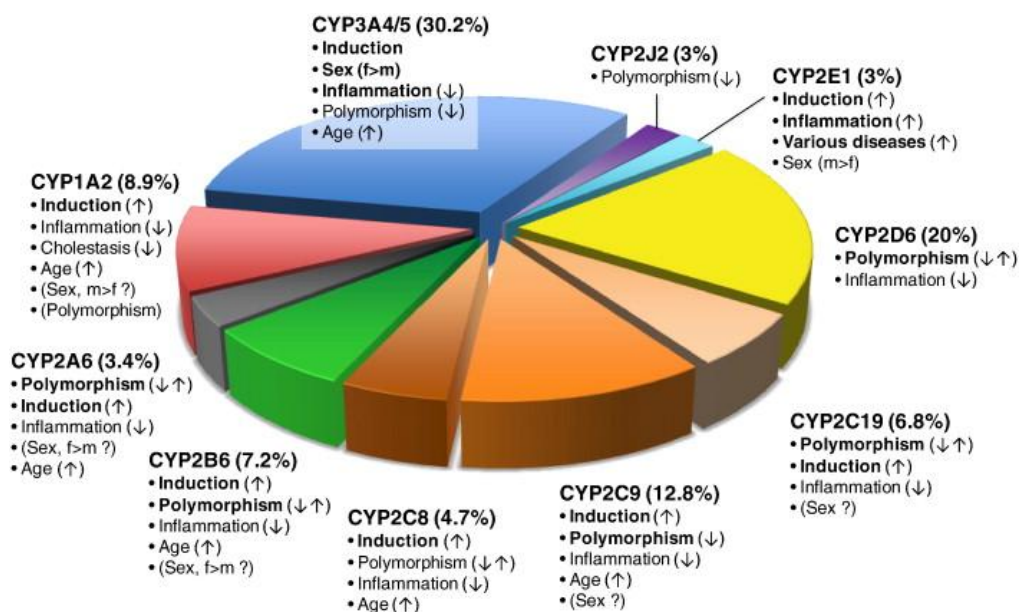
Jaterní CYP se také podílejí na patogenezi mnoha jaterních chorob. CYP zprostředkovaná aktivace toxických metabolitů léků indukuje hepatotoxicitu. Známé příklady zahrnují např. paracetamol. V některých případech kovalentní vazba toxického metabolitu k CYP vede k tvorbě protilátek proti CYP (Villeneuve a Pichete 2004).

### 5.9.1 Faktory ovlivňující expresi CYP a jejich role v karcinogenezi

Exprese CYP enzymů je ovlivněna řadou endogenních faktorů, jako jsou genetické polymorfismy, pohlaví, věk a hladiny hormonů, ale také vnějšími faktory, např. léčivy, chemickými látkami, životním prostředím i psychopatologickými podmínkami (Obr. 11). Znalost vnitřních a vnějších faktorů, které ovlivňují expresi a funkci odpovědných enzymů je tedy předpokladem pro předpovídání variabilní farmakokinetiky a reakce na lék. Funkční změny lidských izoenzymů P450 se podílejí na lékové toxicitě, jako např. v případě warfarinu (CYP2C9), kodeinu, mitrazapinu a tramadolu (CYP2D6), paracetamolu a alkoholu (CYP2E1), methadonu (CYP2B6), klopidoogrelu a desipraminu (CYP2C19) a takrolimu (CYP3A5) (Chen et al. 2014; Zanger et al. 2013).

CYP rodina zahrnuje 57 funkčních genů a 58 pseudogenů. Mutace nebo genetické variace CYP genů vedou k poruše konkrétní enzymatické aktivity, což může

mít za následek vznik vrozených metabolických poruch nebo závažné změny metabolismu léčiv. Metabolity produkované CYP enzymy se mohou podílet na vzniku rakoviny. Neúmyslná aktivace prokarcinogenů nebo tvorba reaktivních meziproductů zvyšují genotoxický stres buněk a mohou vyvolat iniciaci nádoru. Kromě toho mají CYP vliv také na zánětlivé procesy a signální dráhy, které se účastní buněčného cyklu a apoptózy. Následkem ovlivnění signálních drah dochází k propagaci a progresi nádoru (Nekvindová et al. 2013).



**Obr. 10** Procentuální porovnání izoform P450 podle jejich podílu na metabolismu léčiv a faktory ovlivňující jejich variabilitu. (Zanger et al. 2013)

### 5.9.1.1 Genetické polymorfismy

Polymorfismy CYP enzymů mají největší dopad na farmakokinetiku léčiv. CYP2D6, 2C19 a 2C9 polymorfismy jsou zodpovědné za většinu variability v první fázi metabolismu léčiv, protože téměř 80 % dnes používaných léků je metabolizováno těmito enzymy. Přibližně 5-14 % bělochů, 0-5 % Afričanů a 0-1 % Asiátů chybí aktivita CYP2D6 a tito jedinci jsou známí sníženým metabolismem (poor metabolizer). CYP2C9 je další klinicky významný enzym, u kterého je známo několik genetických variant a funkční vliv na účinnost léku a vedlejší účinky. Rozsáhlé polymorfismy se také vyskytují v jiných CYP genech, jako je CYP1A1, 2A6, 2A13, 2C8, 3A4 a 3A5 a vedou k rozlišení farmakogentických fenotypů. Vzhledem k tomu, některé z těchto CYP (CYP1A1 a 1A2) hrají roli v bioaktivacích prokarcinogenů, mohou polymorfismy

těchto enzymů ovlivňovat karcinogenezi. Multialelické genetické polymorfismy jsou závislé na etnickém původu (Zhou et al. 2009; Zanger et al. 2013).

### ***5.9.1.2 Epigenetické vlivy na metabolismus léčiv***

Vliv epigenetických procesů na farmakologicky významné geny a jejich reakce na lék je poměrně nová oblast výzkumu, která byla popsána nedávno. Například, globální analýza diferenciální genové exprese v buněčné linii lidského hepatomu HepG2 po léčbě 5-aza-2'-deoxycytidinu, který slouží k inhibici methylace DNA a trichostatinu A pro inhibici deacetylace histonů, prokázala rozsáhlé účinky na více než 500 genů, včetně indukce CYP3A genů a dalších cytochromů P450, stejně jako několik transkripčních faktorů. K podrobněji studovaným příkladům patří především CYP1 geny. Ačkoli je pole epigenetické regulace metabolismu léčiv a genů ovlivňující léky relativně nové, tyto příklady ukazují významný vliv na regulaci genů a potenciální význam na lékovou odpověď (Zanger et al. 2013).

### ***5.9.1.3 Negenetické faktory***

Pohlaví ovlivňuje řadu farmakokineticky důležitých parametrů, včetně tělesné hmotnosti, distribuce tuku, průtoku krve játry, stejně jako expresi enzymů metabolizující léčiva. Pohlavně-specifické exprese cytochromů P450 jsou běžné u laboratorních krys a myši, u lidí jsou rozdíly menší a jejich význam v užívání léků je předmětem neustále diskuze. Většina klinických studií ukazuje, že ženy metabolizují léky rychleji než muži. To je zejména případ látek, které jsou biotransformovány cytochromem P450 3A4 (př. antipyrin, erythromycin, midazolam). Analýzy CYP3A4 v lidských játrech prokázaly dvojnásobně vyšší hladiny u žen než u mužů. Pro ostatní CYP nebyla otázka pohlaví dostatečně vyjasněna.

Vlivným faktorem pro metabolismus léčiv je věk. U novorozenců je kapacita metabolismu léků nižší kvůli nezralosti systému cytochromu P450, který se plně rozvíjí až v průběhu prvního roku života. Ve starší populaci je schopnost odstraňovat léky opět nižší. To je důležité pro léky s úzkým terapeutickým indexem (antipsychotika, antidepresiva, antikoagulancia a betablokátory). Studie v lidských játrech našly mírný nárůst exprese a aktivity pro většinu CYP během života, zejména CYP2C9. Dalším důvodem snížení lékové clearance u starších pacientů je



polypragmazio, tj. inhibice enzymů kvůli současnému příjmu několika interagujících léků, stejně jako snížení jaterního krevního oběhu a funkce ledvin.

Na metabolismus léčiv mají obecně negativní vliv také chorobné stavy. Změněná stavba jater u cirhózy vede ke snížení průtoku krve, funkční ztrátě hepatocytů, snížení exprese enzymů a tím nižší kapacitě metabolismu léčiv a snížení syntézy sérových proteinů, což způsobuje snížení clearance a zvýšení hladin nenavázaných léků. Alkoholické a nealkoholické ztučnění jater (NAFLD) jsou stavy charakterizované hromaděním velkého množství triglyceridů v tukových váčcích. NAFLD je spojeno s cukrovkou, obezitou, metabolickým syndromem a ve vážných případech postupuje do steatohepatitidy. Podle dostupných údajů je exprese CYP enzymů mírně snížená, ale ne ve všech 3 rodinách CYP. Průběh infekce, zánětu, rakoviny nebo cirkulace prozánětlivých cytokinů vyvolávají změny genové exprese v játrech a mohou vést k downregulaci mnoha enzymů (Chen et al. 2014; Zanger et al. 2013).

### **5.9.2 Cytochrom P450 2C9**

CYP2C9 je primárně exprimován v játrech a podle úrovně exprese je uváděn jako druhá nejhojnější forma CYP, hned po CYP3A4. Patří mezi nejdůležitější cytochromy, protože metabolizuje četné substráty. Mezi léky, které metabolizuje, patří hlavně fenytoin, tamoxifen, warfarin, fluvastin a mnoho nesteroidních protizánětlivých léků (NSAID), jako je aspirin a ibuprofen (SNPedia 2007). Odhaduje se, že je zodpovědný za metabolismus až 15-20 % všech léčiv v 1. fázi biotransformace. Bylo prokázáno, že rifampicin indukuje CYP2C9 a zvyšuje clearance léku, které jsou CYP2C9 eliminovány. Naopak léky jako amniodarón, flukonazol, sulphaphenazol aktivitu CYP2C9 inhibují. Nebezpečí při léčbě může nastat u léku s úzkým terapeutickým rozmezím, jako je např. warfarin, kdy snížená aktivita enzymu způsobí zvýšené množství warfarinu v séru pacienta a následně může dojít až k předávkování a krvácivým projevům (Narjoz et al. 2009; Van Booven et al. 2010).

Během posledních desetiletí byly díky pokročilým technologiím zkoumány vztahy mezi genetickými variantami, profily genové exprese a rozvojem rakoviny. Bylo zjištěno, že genetické polymorfismy genů CYP jako je např. CYP2C9 ale i CYP2A6, CYP3A5, CYP2E1 mohou hrát důležitou roli ve vývoji HCC (Yu et al. 2015).

Cytochromy P450 katalyzují tvorbu reaktivních metabolitů, které způsobují poškození DNA, RNA nebo proteinu. Změny v expresi CYP genů mohou mít vliv na účinnost detoxikace xenobiotik a také na tvorbu molekul, které regulují signální dráhy transdukce, což má paradoxní vliv na karcinogenezi. Z toho důvodu se dá spekulovat o tom, že dysregulace CYP genů mohou být zapojeny do hepatokarcinogeneze. Jak již bylo řečeno, CYP2C9 se podílí na metabolismu mnoha léků ale také karcinogenů. Potlačení exprese CYP2C9 bylo již popsáno v několika studiích a označeno jako biomarker HCC; nicméně, mechanismus poruchy regulace CYP2C9 prostřednictvím mikroRNA (miRNA) není v HCC zcela objasněn.

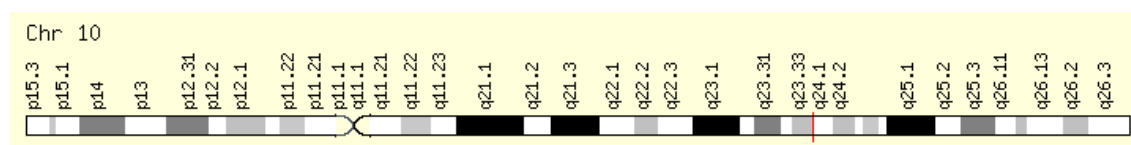
Modulace genu prostřednictvím miRNA vede k podstatným změnám fenotypu a takové změny mohou mít vliv na rozvoj rakoviny a jiných chorob. Například, CYP1B1 je regulován miR-27b a pokles exprese miR-27b je nepřímo spojen se zvýšenou hladinou proteinu CYP1B1 u pacientu s karcinomem prsu. Existuje několik set miRNA exprimovaných v lidských tkáních, a charakterizace miRNA v lidských nádorových tkáních odhaluje ty, které jsou spojené se zahájením progresu nádoru, metastázami, prognózou, reakcí na léčbu a přežitím. Stále však neexistují jednoznačné informace o úloze miRNA v modulaci genů metabolizujících léčiva a patogenezi HCC (Yu et al. 2015).

Důležitý se zdá být nález jedné studie, která ukázala zvýšenou regulaci hsa-miR-128-3p exprese a významnou korelaci s expresí CYP2C9 (potlačení) v tkáních HCC, což naznačuje, že hsa-miR-128-3p v kombinaci s CYP2C9 jsou potenciálními biomarkery pro HCC diagnózu (Yu et al. 2015).

CYP2C9 má schopnost účastnit se metabolismu benzo[a]pyrenu a tím aktivovat některé karcinogeny. Dochází k tvorbě 9-hydroxybenzo[a]pyren-oxidu a benzo[a]pyren-diol-epoxidu, které jsou reaktivní a podílejí se na tvorbě DNA aduktu (Yu et al. 2015).

Gen CYP2C9 leží na chromozomu 10q24 a skládá se z 9 exonů. CYP2C9 kóduje protein o velikosti 490 aminokyselin a je vysoce polymorfní, známo je více než 30 variant. Divoký typ (wild type) alely CYP2C9\*1 je spojen s normální aktivitou enzymu. Jedinci, kteří jsou homozygotní pro CYP2C9\*1 metabolizují léky normálně (Zanger et al. 2013, Zhou et al. 2009). Vysoká aktivita CYP2C9\*1 je spojena se zvýšeným rizikem rakoviny tlustého střeva (Yu et al. 2015). Dvě nejběžnější alelické varianty spojené se sníženou aktivitou enzymu jsou CYP2C9\*2 (Arg144Cys) a CYP2C9\*3 (Ile359Leu). Frekvence těchto CYP2C9 alel se liší mezi různými

etnickými skupinami. \*2 alela je častější u bělošské populace (10-20%) než asijské (1-3%), nebo africké (0-6%) populace. \*3 alela je méně častá (<10% ve všech populacích) a velmi vzácná u africké populace. U afrických Američanů je pravděpodobné, že se vyskytují další CYP2C9 varianty jako je CYP2C9\*5, \*6, \*8 a \*11 přispívají k variabilitě v odpovědi pacienta na warfarin (Zanger 2013; Zhou et al. 2009). Varianty CYP2C9\*4 a \*6 jsou vzácné a byly zjištěny u pacientů, kteří měli nežádoucí účinky na fenytoin. CYP2C9 \*5, \*6, \*8, \*11 jsou spojeny se sníženým metabolismem fenytoinu v černošské populaci (Van Booven et al. 2010).



**Obr. 11 Grafické znázornění chromozomu 10 a umístění genu CYP2C9.** Převzato z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2C9> [Online]. Citováno dne: 2015-03-20

#### **Alela CYP2C9\*2 (430C>T)**

U této alely je v pozici 430 exonu 3 cystein nahrazen thyminem. Touto substitucí dochází na úrovni proteinu v pozici 144 k záměně výchozí aminokyseliny argininu za cystein a proto se může pro tento polymorfismus používat nomenklatura Arg144Cys nebo na úrovni nukleotidů C430T. (Dean 2012; Mlčochová 2012).

#### **Alela CYP2C9\*3 (1075A>C)**

Alela CYP2C9 \*3 zahrnuje A/C substituci v exonu 7 a nukleotidové pozici 1075. V této substituci je adenin nahrazen cytosinem a způsobuje tak v pozici 359 záměnu původní aminokyseliny izoleucinu za leucin. Z toho vyplývá nomenklatura Ile359Leu nebo A1075C (Mlčochová 2012).

Obě varianty bývají spojovány se sníženým metabolismem warfarinu. Ve srovnání s normálním metabolismem, pacienti, kteří zdědí jednu nebo dvě kopie \*2 nebo \*3 jsou citlivější na warfarin, vyžadují nižší počáteční dávky a jsou ve větším riziku krvácení při léčbě warfarinem. U CYP2C9 \*3 ve srovnání s wild type je snížena i clearance S-ibuprofenu (Dean 2012; Van Booven et al. 2010). Kromě toho, snížená

aktivita CYP2C9\*2 je spojena se zvýšeným rizikem kolorektálního karcinomu a rakoviny plic.

### 5.9.3 CYP a protirakovinná terapie

Zvýšená exprese P450s v nádorové tkáni je velmi významná a důležitá pro pochopení vývoje a progresu nádoru. To se týká hlavně exprese tkáňově specifických enzymů P450, jejichž zkoumání a studium struktury a mechanismu jejich účinku je základem pro vývoj nových diagnostických a terapeutických strategií (Murray 2000). Možností v prevenci a terapii rakoviny se zdá být zaměření na přírodní nebo syntetické malé molekuly namířené proti těmto enzymům (Bruno a Njar 2007).

První úspěšná strategie cílené CYP léčby rakoviny byla u enzymů CYP17 a CYP19. Ty jsou vyjádřeny ve varlatech, vaječnicích a nadledvinách a jsou zodpovědné za produkci androgenů a estrogenů. Nicméně byl zjištěn i výskyt CYP19 v tukové tkáni prsu a nepřímé důkazy ukazují, že CYP17 může být vyjádřena rovněž v tukové tkáni.

Po několik let byl standardní farmakologickou léčbou rakoviny prsu tamoxifen, který měl ale řadu nežádoucích účinků. Vývoj účinných inhibitorů aromatázy (CYP19) pro léčbu rakoviny prsu odstartoval novou éru v hormonální terapii rakoviny závislé na estrogenu a připravil půdu pro podobné strategie, tj. inhibici CYP17 u rakoviny prostaty. Inhibice CYP17 vyvolá potlačení produkce testosteronu. Ketokonazol, antifungální látka, která specificky inhibuje širokou škálu CYP enzymů, byl ověřován k léčbě pokročilého karcinomu prostaty. Vzhledem k působení na větší množství enzymů, působil toxicitu. I přes překážky je zřejmé, že inhibitory aromatáz představují první úspěšnou třídu onkologických léčiv speciálně navržených, aby působily cíleně proti CYP enzymům (Bruno a Njar 2007).

Dalšími členy CYP rodiny, které se vyznačují nádorově specifickou expresí, jsou CYP1B1 a CYP2W1. CYP2W1 byl prokázán jako tumor-specifický CYP v kolorektální a nadledvinové rakovinové tkáni. Zatím se funkci tohoto enzymu moc neví, ale mohl by být potenciálním cílem, ať už prostřednictvím inhibice nebo aktivace prodrug, pro prevenci nebo léčbu kolorektálního karcinomu a rakoviny nadledvin (Bruno a Njar 2007).

CYP1B1 podporuje tumorigenezi nejen zvýšenou expresí ale také jeho schopností aktivovat několik karcinogenů jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy a aromatické aminy. Nedávné studie zjistily spojení

CYP1B1 a polymorfismů se zvýšeným nebo sníženým rizikem vzniku některých typů rakoviny. Větší význam má CYP1B1 v metabolismu estradiolu a může hrát roli v estrogenové tumorigenezi. Produkty metabolismu mohou vázat DNA a vytvářet nestabilní adukty vedoucí k mutacím. Tato cesta by tedy mohla být cílem inhibice v terapii (Bruno a Njar 2007; Chun a Kim 2003). Mezi látky mající schopnost přímo inhibovat enzymovou aktivitu CYP1B1 patří resveratrol. Jedná se o neaktivní proléčivo, které je aktivováno CYP1B1 na piceatannol v rakovinových buňkách. Bohužel u něj byla prokázána jen omezená protirakovinná aktivita (Bruno a Njar 2007).

# 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6.1 Parametry studie

Do studie bylo zahrnuto 12 pacientů Masarykova onkologického ústavu v Brně, u kterých byl v rozmezí od roku 2006 do roku 2012 diagnostikován hepatocelulární karcinom, z toho 2 ženy a 10 mužů. Průměrný věk pacientů v období diagnózy byl 67 let (61-77). Velikost nádoru se pohybovala od 29 mm až po větší léze dosahující v jednom případě 100 mm. Všichni pacienti byly dle klasifikace Child-Pugha diagnostikovány ve stádiu A. Z histologického hlediska se podle stupně diferenciaci nejčastěji jednalo o nádor středně diferencovaný (7x), nízce diferencovaný (3x), dobře diferencovaný (1x) a nediferencovaný nádor (1x).

Vzorky pocházely z nádorové a referenční tkáně podle histologického hodnocení zkušeného patologa. Studie byla schválena etickou komisí Masarykova onkologického ústavu v Brně.

Klinická data byla získána z nemocničního informačního systému Masarykova onkologického ústavu a zahrnovala následující informace: ročník narození pacienta, pohlaví, typ tumoru, typ referenční tkáně, velikost nádoru (mm), metodu stanovení velikosti (CT/UZ/PAT), laboratorní výsledky:  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), gama-glutamyltransferázu (GGT), alaninaminotransferázu (ALT), aspartátaminotransferázu (AST), alkalickou fosfatázu (ALP), bilirubin, albumin, protrombinový čas vyjádřený mezinárodním normalizovaným poměrem (INR), (ne)přítomnost ascitu, klasifikaci nádoru dle Child-Pugha, stupeň vyzrállosti nádoru (grade), (ne)přítomnost vaskulární invaze, dobu přežití, chirurgii: radiofrekvenční ablaci (RF), radioterapii (RT), chemoterapii (CT), transarteriální chemoembolizaci (TACE), jinou patologii, léčbu sorafenibem.

### Stručná charakteristika jednotlivých případů:

- Vzorek č. 1 (muž, 61 let, žijící)
  - nízce diferencovaný HCC v prostředí jaterní cirhózy
  - velikost nádoru 70 mm
  - současně přítomnost vaskulární invaze a hepatitidy A, B

- Vzorek č. 2 (muž, 77 let)
  - středně diferencovaný karcinom v terénu steatózy
  - velikost nádoru 70 mm
  - doba přežití od diagnózy 33 měsíců
  
- Vzorek č. 3 (muž, 71 let)
  - středně diferencovaný nádor
  - velikosti nádoru 80 mm
  - přítomnost vaskulární invaze
  - doba přežití 52 měsíců
  
- Vzorek č. 4 (muž, 64 let, žijící)
  - středně diferencovaný nádor v prostředí steatózy
  - velikost nádoru 50 mm
  - přítomnost vaskulární invaze a hepatitidy B
  
- Vzorek č. 5 (muž, 66 let, žijící)
  - dobře diferencovaný nádor v terénu jaterní cirhózy
  - velikost nádoru 42 mm
  
- Vzorek č. 6 (žena, 61 let, žijící)
  - středně diferencovaný karcinom
  - velikost nádoru 90 mm
  - přítomnost vaskulární invaze
  - chronická venostáza
  
- Vzorek č. 7 (muž, 63 let, žijící)
  - málo diferencovaný HCC v prostředí steatózy
  - velikost nádoru 100 mm
  
- Vzorek č. 8 (žena, 72 let, žijící)
  - středně diferencovaný nádor v přítomnosti cirhózy
  - velikost nádoru 29 mm

- hepatitida B
  
- Vzorek č. 9 (muž, 61 let, žijící)
  - středně diferencovaný nádor
  - velikost nádoru 38 mm
  
- Vzorek č. 10 (muž, 68 let, žijící)
  - málo diferencovaný nádor v prostředí fibrózy
  - velikost nádoru 32 mm
  
- Vzorek č. 11 (muž, 76 let)
  - středně diferencovaný nádor s přítomností cirhózy
  - velikost nádoru 44 mm
  - doba přežití od stanovení diagnózy 23 měsíců
  
- Vzorek č. 12 (muž, 62 let)
  - nediferencovaný typ nádoru
  - velikost nádoru 80 mm
  - doba přežití od stanovení diagnózy 98 měsíců

## **6.2 Izolace RNA a Real-Time PCR (qPCR)**

### **6.2.1 Princip metody qPCR**

Metoda Real-time PCR slouží pro kvantifikaci DNA, v tomto případě cDNA (copyDNA) získané přepisem (reverzní transkripcí) RNA. Je založena na klasické PCR, ovšem s využitím speciálního cycleru, který v průběhu každého cyklu PCR kontinuálně zaznamenává intenzitu fluorescence monitorující množství syntetizované DNA. Jedná se o citlivou metodu a za použití specifických sond také vysoce specifickou.



## 6.2.2 Pracovní postup

### Izolace RNA

Vzorky nádorové a nenádorové tkáně byly homogenizovány ve zkumavkách obsahujících keramické kuličky (SeptiFast Lys Kit, Roche, Švýcarsko), do kterých byl přidán 1 ml roztoku TRIzol (Life Technologies, USA). Homogenizace poté proběhla v homogenizátoru MagNA Lyser (Roche, Švýcarsko) po dobu 60 s.

Za použití fenol-chloroformové extrakce s guanidin izothiokyanátem byla z tkáňového lyzátu vyizolována RNA. K 1 ml lyzátu v TRIzolu bylo přidáno 200 µl chloroformu s isoamylalkoholem. Během následné inkubace proběhla buněčná lýza. Následně byla provedena centrifugace v chlazené centrifuze MIKRO 200R (Hettich Lab Technologies, Německo) při 10 000 g. Jednotlivé buněčné složky roztoku (DNA, RNA a proteiny) se oddělily. Z horní vodné fáze byla posléze extrahována RNA precipitací s isopropanolem. K 400 µl vodní fáze bylo přidáno 400 µl studeného isopropanolu. Celá směs se přes noc nechala vysrážet při teplotě -20°C. Po centrifugaci se sediment RNA přečistil 500 µl 70% ethanolu a vysušená peleta RNA byla resuspendována v 20 µl vody pro injectio. Na spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) byla změřena kvalita a kvantita RNA. Nukleové kyseliny mají absorbní maximum v oblasti okolo 260 nm, proteiny mají maximum v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty se stanoví z poměru absorbance při 260 nm a 280 nm.

### Reverzní transkripce

U vyizolované RNA byla ihned provedena reverzní transkripce. 1 µg celkové RNA byl transkribován do komplementární cDNA pomocí komerčně dostupného master mixu SuperScript VILO (Life Technologies, USA) obsahujícího reverzní transkriptázu, ribonukleázové inhibitory, náhodné primery, MgCl<sub>2</sub> a deoxynukleotidy dNTP. K cDNA ze vzorků byly přidány 2 negativní kontroly. Jedna kontrola byl vzorek bez templátové cDNA a druhá vzorek s deaktivovanou reverzní transkriptázou. V konečné fázi byla cDNA ošetřena RNázou H. K provedení reverzní transkripce byl použit cykler GeneAmp PCR System9700 (Applied Biosystems, USA). Složení jednotlivých reakčních směsí a teplotní profily jsou uvedeny v tabulkách 7, 8.

**Tab. 7 Premix pro reverzní transkripci vzorků pacientů**

SuperScript Vilo MM	4 $\mu$ l
ředěná RNA (1 $\mu$ g)	x $\mu$ l
voda ošetřená DEPC	do 20 $\mu$ l
Celkový objem	20 $\mu$ l

**Tab. 8 Protokol pro negativní kontrolu RT-**

SuperScript Vilo MM	4 $\mu$ l
voda ošetřená DEPC	20 – x $\mu$ l
inkubace 10min při 65°C	
RNA	x $\mu$ l
Celkový objem	20 $\mu$ l

**Teplotní profil pro reverzní transkripci**

- 10 min / 25°C, 60 min / 42°C, 5 min / 85°C
- zchladit na ledu
- + 0.5  $\mu$ l RNase H
- 40 min při 37°C

**Real-Time PCR**

Real-time PCR, kvantitativní PCR (qPCR), je založena na detekci a kvantifikaci fluorescenčního signálu. Signál je snímán po dobu celého procesu PCR. Intenzita vzniklé fluorescence je úměrná množství naamplifikovaných produktů v každém cyklu. Umožňuje dynamicky sledovat průběh syntézy amplikonů. Součástí reakční směsi jsou sondy, které jsou na 5' konci značeny fluorescenčním barvivem a na 3' konci zhášecem. Během procesu PCR je sonda rozštěpena, molekuly se oddálí a fluorescence barviva může být detekována.

Pro kvantifikaci cDNA pomocí qPCR byl použit 2X koncentrovaný Master Mix PCR (Generi Biotech, Česká republika), který obsahuje enzym hot-start *Taq*DNA polymerázu, dNTP a PCR pufr s obsahem 4mM MgCl<sub>2</sub>, a 10X koncentrované PCR assaye hCYP2C9\_Q2 pro gen CYP2C9, pro PXR assay hNR1I2\_Q8 a pro CAR assay hNR1I3\_Q2 (Generi Biotech, Česká republika). Jako referenční gen byla použita hypoxantin fosforibosyltransferáza 1 - 20X koncentrovaná assay HPRT1 (Applied Biosystems, USA). Pro kvantifikaci cDNA byl do reakce přidán TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA). Složení reakční směsi a teplotní

profily jsou uvedeny v tabulkách 9, 10, 11, 12. Všechny vzorky byly analyzovány v triplikátech.

**Tab. 9 Reakční směs pro real-time PCR pro CYP2C9, PXR, CAR**

Master Mix PCR	10 $\mu$ l
qPCR Assay	2 $\mu$ l
ředěná cDNA (1 $\mu$ g)	8 $\mu$ l
Celkový objem	20 $\mu$ l

**Tab. 10 Reakční směs pro real-time PCR pro HPRT1**

TaqMan Gene Expression	
Master Mix	10 $\mu$ l
qPCR Assay	1 $\mu$ l
PCR grade voda	1 $\mu$ l
ředěná cDNA (1 $\mu$ g)	8 $\mu$ l
Celkový objem	20 $\mu$ l

**Tab. 11 Teplotní profil real-time PCR pro CYP2C9, PXR, CAR**

počáteční denaturace		3 min	95 °C
50 cyklů	denaturace	10 s	95 °C
	annealing + elongace	20 s	60 °C

**Tab. 12 Teplotní profil real-time PCR pro HPRT1**

inkubace		2 min	50 °C
aktivace enzymu		10 min	95 °C
40 cyklů	denaturace	15 s	95 °C
	annealing + elongace	1 min	60 °C

PCR reakce byla prováděna pomocí real-time PCR cykleru Rotor-Gene 6000 2-plex (Qiagen, Nizozemí). Výsledná analýza byla provedena programem Rotor-Gene series 6000 software 1.7, ve kterém se zjistily hodnoty Ct (Cycle treshold) pro všechny vzorky. Následně byla vypočítána relativní kvantifikace pomocí metody  $\Delta\Delta Ct$  v programu MS Excel 2003:

$$\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{HPRT1}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{nádor} - \Delta Ct_{ref}$$

Hodnota násobku změny exprese v nádorové tkáni oproti nenádorové byla získána dosazením do následujícího vzorce:  $x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 6.3 Příprava vzorků pro Western blot

### 6.3.1 Příprava lyzátů z tkání

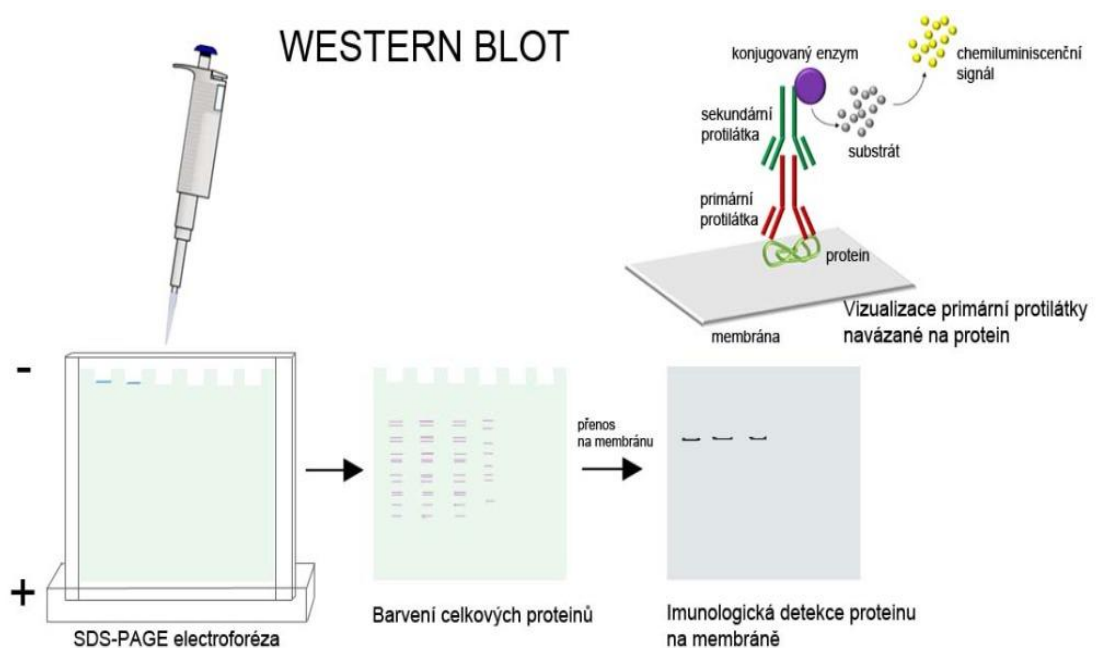
Pro přípravu lyzátu byla použita kombinace PhosSTOP Tablets a cOmplete ULTRA Tablets firmy ROCHE pro minimalizaci nežádoucí aktivity proteáz a fosfatáz. Obě tablety se rozpustily v 10 ml lyzačního pufru.

- Příprava Nonidet-P40 (NP40) pufru:
  - 606 mg Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan
  - 877 mg NaCl
  - 50 ml destilované H<sub>2</sub>O
  - 6M HCl pro pH 8,0
  - 10% Triton X100
  - doplnit do 100 ml
- Vlastní příprava lyzátů
  - provedení v boxu s RNA nástroji
  - přibližně 5 mg zmražené tkáně důkladně podrtit na prášek a v eppendorfově zkumavce smíchat s 300 µl vychlazeného lyzačního pufru
  - zkumavku se vzorkem krátce a důkladně zvortexovat a míchat 2 hodiny při 4°C
  - důležité dodržet poměr tkáň/pufr v rozmezí 1-5 mg/ml
  - následně vzorek centrifugovat při 4°C 20 minut na 12 000 otáček/ min.
  - po centrifugaci vzorky umístí na led a supernatant odebrat do čisté eppendorfky
  - do 0,5 ml eppendorfky odebrat aliquot na měření proteinu (22,5 µl MQ + 2,5 µl vzorku) a zamrazit
  - vzorky proteinů před vlastním western blotem uchovávat při -20°C (pro dlouhodobější uchování při -80°C)

### 6.3.2 Princip metody Western blot

Western blot (Obr. 13) je analytická technika používaná pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve složité směsi. Provedení této techniky využívá 3 kroků:

- Elektroforetické separace proteinů v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), kde se proteiny dělí na základě jejich molekulové hmotnosti.
- Přenosu separovaných proteinů (blotting) na pevný nosič (nitrocelulózová membrána nebo polyvinylidendifluoridová membrána). Přítomnost proteinu na membráně je detekována pomocí primární protilátky specifické vůči danému proteinu. V dalším kroku je přidána značená sekundární protilátka namířena proti primární protilátce navázané na protein.
- Fluorescenční nebo chemiluminiscenční detekce proteinů. Velikost signálu je porovnávána se signálem standardu.



Obr. 12 Schéma jednotlivých kroků western blottingu

### 6.3.3 Pracovní postup

#### Příprava vzorku:

1. Smíchat 10  $\mu$ l vzorku + 10  $\mu$ l nanášecího pufru (4% SDS, 10% 2-merkaptoetanol, 20% glycerol, 0,004% bromfenolová modř). Testovaný vzorek by měl obsahovat 20-40  $\mu$ g celkového proteinu. Vzorek denaturovat 5 minut při 95°C.
2. Dle velikosti separovaných molekul připravit separační gel s vhodnou koncentrací. Sestrojit elektroforetickou aparaturu. Roztok gelu ihned promíchat a nalít do aparatury. Gel převrstvit vrstvou vody nebo isopropanolu a nechat polymerizovat ve vertikální poloze asi 30 min. Připravit roztok zaostřovacího gelu. Odsát izopropanol a přidat opatrně roztok gelu. Vložit hřeben a zkontrolovat, že nejsou žádné vzduchové bubliny.

#### Elektroforéza:

1. Nalít elektroforetický pufr (Tris-glycin pufr) do elektroforetické aparatury a zkontrolovat, že pufr pokrývá gel úplně. Opatrně vyjmout hřeben.
2. Pipetovat do první jamky 6  $\mu$ l markeru a do dalších 20  $\mu$ l vzorku/STD.
3. Připojit elektroforetickou aparaturu ke zdroji napětí tak, že záporný pól je nahoře a kladný dole. Napětí mezi elektrodami nastavit na 150V.
4. Ve chvíli, kdy se bromfenolová modř dostane ke spodnímu okraji gelu, elektroforézu ukončit. Rozložit elektroforetickou aparaturu a gel překloupit na filtrační papír. Pro pozdější orientaci gelu, jeden roh gelu odstříhnout.

#### Přenos:

1. Připravit polyvinylovou membránu (PVDF) membránu: membránu namočit do 100% methanolu na 20 sec, poté vložit do dH<sub>2</sub>O na 2 min a poté do 1x Transfer pufru na 5 min.
2. Vytvořit sendvič: gel, 3 filtrační papíry, membrána, 3 filtrační papíry. Přemístit sendvič na elektroblot, který musí být chlazen a zajistit, že sendvič je pokryt puftrem. Přenos po dobu 90 minut při konstantím proudu 350mA.

#### Blokování a inkubace protilátek

1. Membránu inkubovat 1-3 hodiny v blokovacím roztoku (1x PBS, 5% sušeného, odtučněného mléka, 0,05% Tween 20). Membrána nesmí uschnout. Promýt 3x5 min v 1x PBS, 0,05% Tween 20.
2. Inkubace s primární protilátkou (ředění 1:1000 v 1x PBS, 5% sušeného mléka + 0,05% Tween 20). Inkubace 1 hodinu při 4 °C.
3. Promýt 3x5 min v 1x PBS + 0,05% Tween 20 za pokojové teploty. Inkubace v 1x PBS + 10% sušeného mléka + 0,05% Tween 20 po dobu 10 min. Inkubace se sekundární protilátkou (ředění 1:5000), po dobu 30 min za pokojové teploty v 1x PBS, 5% sušeného mléka, 0,05% Tween 20). Promýt 3x5 min v 1x PBS + 0,05% Tween 20 za pokojové teploty.
4. ECL detekce výsledků v temné místnosti.

## 6.4 Výsledky

Analýza genové exprese CYP2C9 a příslušných nukleárních receptorů pomocí kvantitativní PCR s reverzní transkripcí prokázala významné snížení hladiny mRNA v nádorové tkáni hepatocelulárního karcinomu ve srovnání s okolní nenádorovou tkání.

Hladina mRNA pro CYP2C9 byla u poloviny pacientů snížena o jeden až téměř čtyři řády, což v některých případech znamená prakticky nulovou expresi genu. U druhé poloviny pacientů byla exprese CYP2C9 v nádoru přibližně stejná jako v okolní nenádorové tkáni. Exprese nukleárních receptorů CAR (constitutive androstane receptor) a PXR (pregnane X receptor) na úrovni mRNA byla u většiny pacientů snížena, přičemž u CAR se s výjimkou jednoho pacienta, kde došlo k poklesu o přibližně tři řády, jednalo o mírné snížení hladiny mRNA, zatímco u PXR byly rozdíly mezi pacienty větší a celkový pokles exprese byl o něco výraznější. V číselných hodnotách jsou výsledky zobrazeny v tabulce 13, jedná se o relativní expresi stanovenou metodou delta delta vůči referenčnímu (housekeepingovému) genu HPRT 1 (primární výsledky byly získány v technických triplikátech). Vzhledem k malému počtu pacientů nelze z výsledků provádět kvalitní statistické analýzy, nicméně rozdíly v expresi v nádorové a nenádorové tkáni jsou dramatické a evidentní.

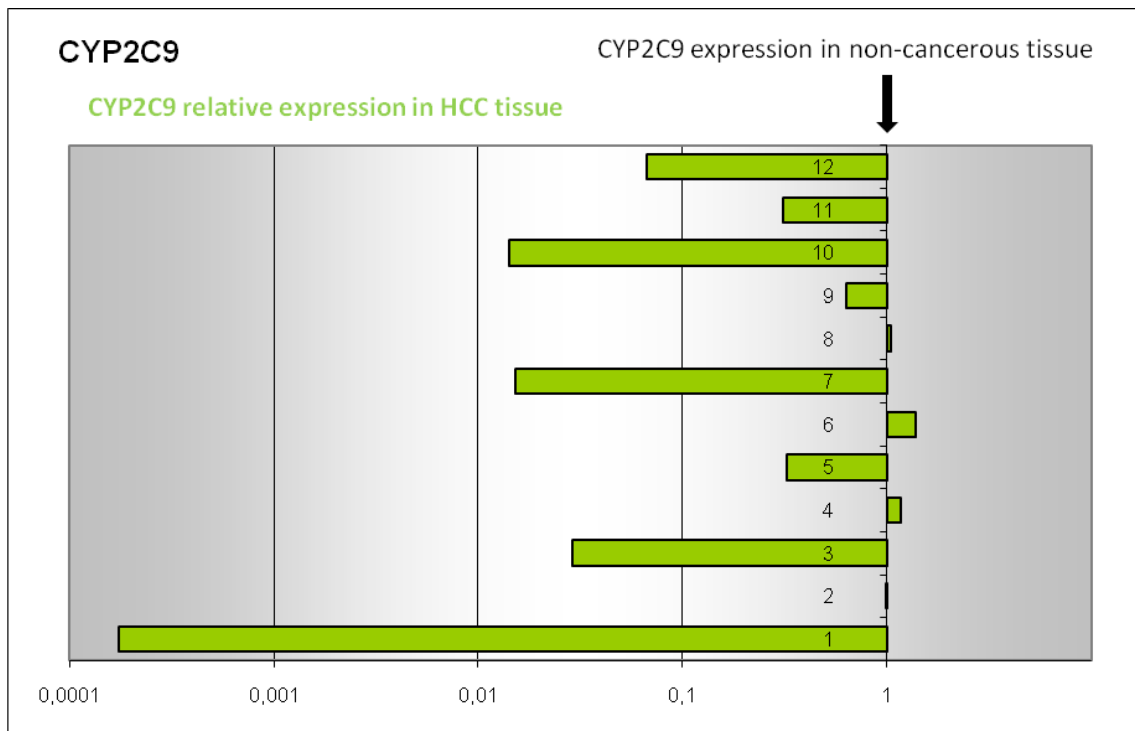
**Tab. 13 Výsledky měření exprese CYP2C9, PXR a CAR ve vzorcích HCC. Relativní exprese v nádorové tkáni vůči nenádorové (exprese v nenádorové tkáni = 1 (100 %))**

Pořadové číslo	CYP2C9	PXR (NR1I2)	CAR (NR1I3)
1	0,00017	0,00107	0,00137
2	0,99268	0,36684	0,65211
3	0,02879	0,04244	0,39472
4	1,16878	1,72285	3,90456
5	0,32319	2,83290	0,59043
6	1,37713	0,22221	0,93088
7	0,01523	0,79187	0,76666
8	1,04006	0,66561	0,53655
9	0,62851	0,20766	0,87641
10	0,01412	0,05332	0,81755
11	0,31136	0,96344	0,92434
12	0,06668	0,53465	0,68066

CYP2C9 – cytochrom P450 2C9, PXR (pregnane X receptor) – nukleární receptor, CAR (constitutive androstane receptor) – nukleární receptor.

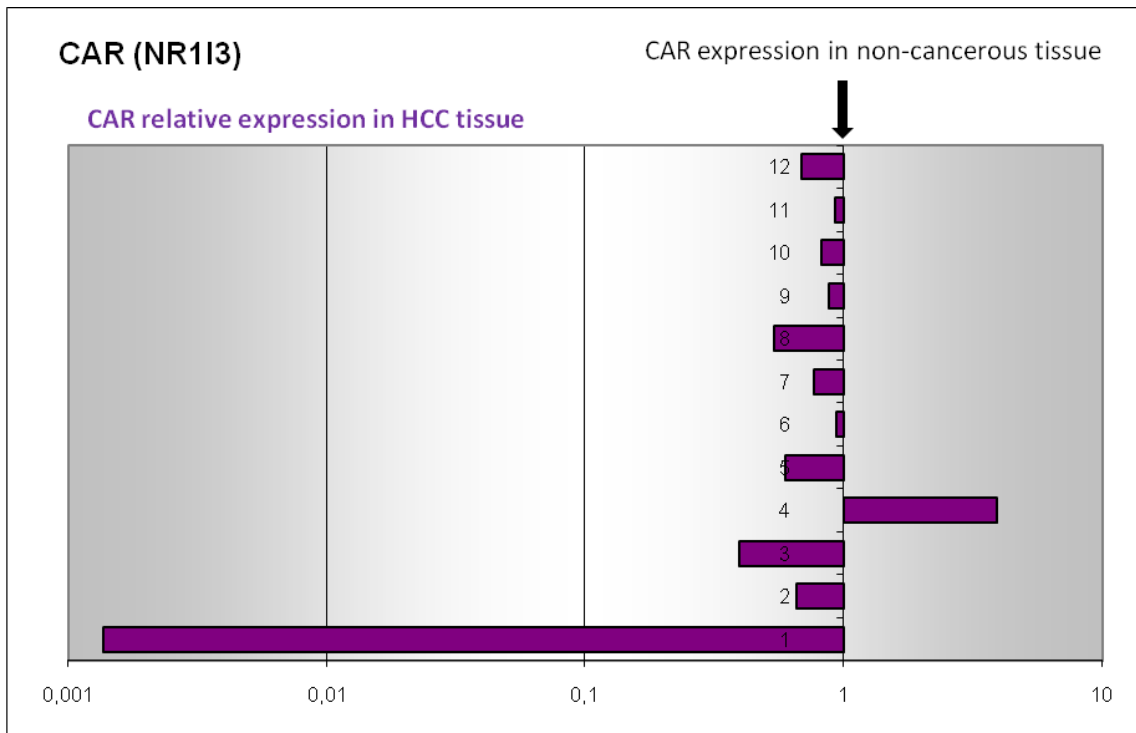


Grafické znázornění exprese CYP2C9, CAR a PXR je provedeno v následujících grafech č. 1, 2 a 3. Expze daného genu v nenádorové tkáni byla položena rovna jedné a graf zobrazuje míru snížení expze stanovovaného genu, v případě prvního grafu CYP2C9.

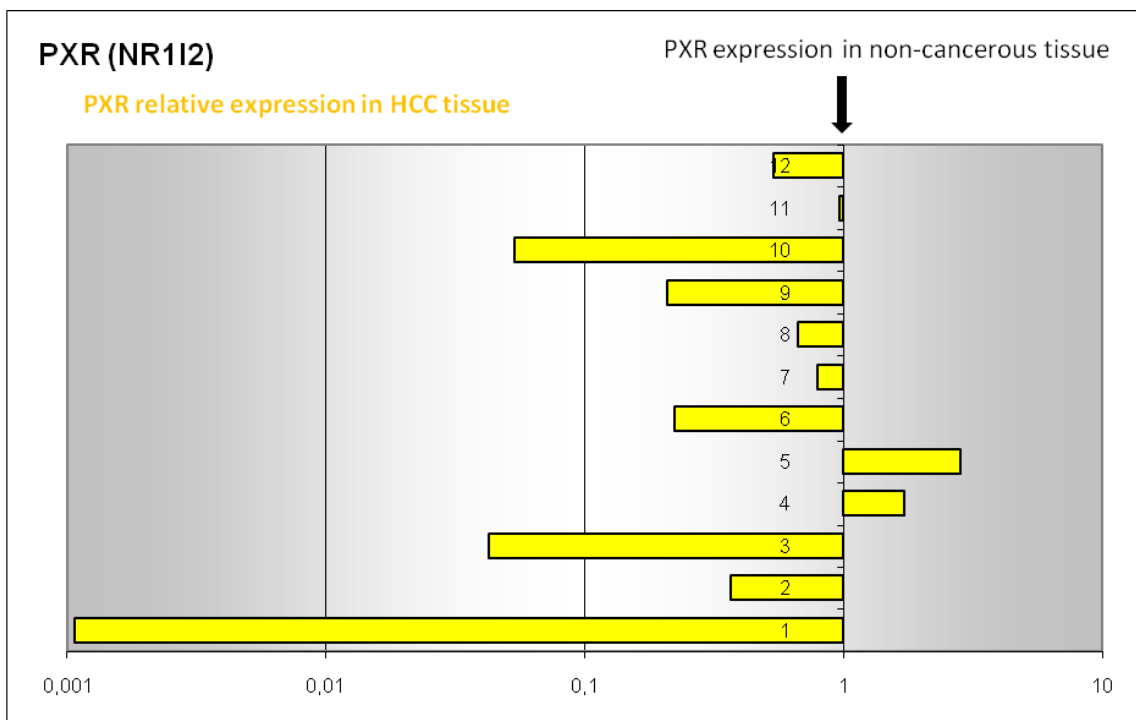


**Graf 1** Znázornění relativní expze CYP2C9 v nádorové tkáni vůči nenádorové (expze v nenádorové tkáni = 1 (100 %)).

Na grafech 2 a 3 je znázorněna expze nukleárních receptorů CAR a PXR v testovaných vzorcích. Výsledky ukazují, že expze CAR a PXR je v nádorové tkáni také snižená.



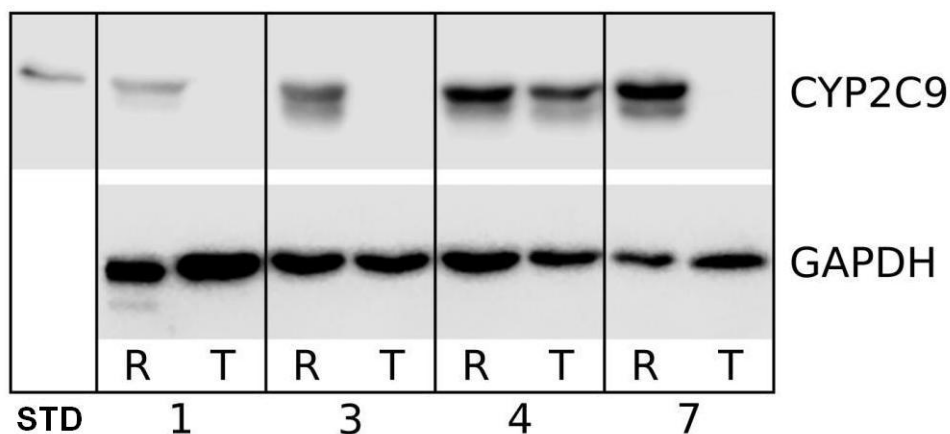
**Graf 2** Znáznornění relativní exprese nukleárního receptoru CAR v nádorové tkáni vůči nenádorové (exprese v nenádorové tkáni = 1 (100 %)).



**Graf 3** Znáznornění relativní exprese nukleárního receptoru PXR v nádorové tkáni vůči nenádorové (exprese v nenádorové tkáni = 1 (100 %)).

U vzorků, kde bylo dostatečné množství tkáně, bylo provedeno stanovení proteinu metodou western blot (Obr. 14) pro ověření výsledků kvantitativní PCR. Pro kontrolu nanášení vzorků a kvantity proteinu byla paralelně stanovována GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Výsledná fotografie blotu znázorňuje expresi CYP2C9 a GAPDH v nádorové (tumor - T) a referenční tkáni (R).

Ve vzorcích 1, 3 a 7 je vidět významné snížení exprese CYP2C9 v nádorové tkáni – vymizení proužků z blotu. U vzorku číslo 4 snížená exprese pozorována nebyla - výsledky přesně odpovídají výsledkům stanovení genové exprese na úrovni mRNA.



**Obr. 13** Exprese CYP2C9 a GAPDH stanovená pomocí SDS-PAGE a western blotu ve vzorcích hepatocelulárního karcinomu. STD – standard, R – referenční tkáň, T – nádorová tkáň.

V další části analýzy bylo provedeno srovnání exprese CYP2C9 a nukleárních receptorů CAR a PXR a vyhodnocení výsledků v kontextu níže uvedených klinických dat.

**Tab. 14 Souhrnná tabulka vzorků a klinických parametrů**

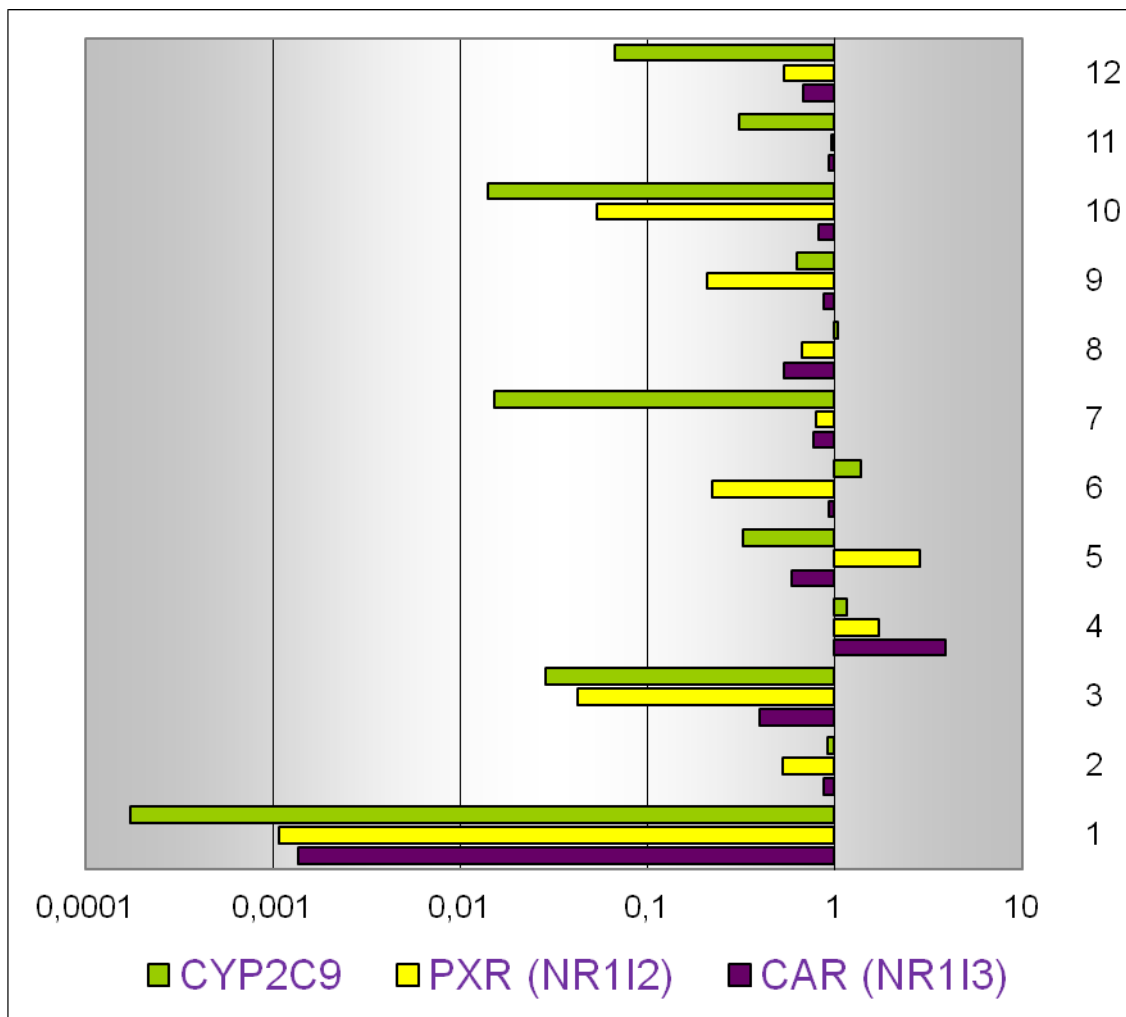
	Referenční tkáň	Pohlaví	Věk	Velikost nádoru (mm)	Metoda stanovení velikosti	pTMN	AFP (µg/l)	GMT	ALT	AST	ALP	bilirubin	albumin	ALBI score	ALBI grade
<b>1</b>	cirhóza	m	61	40	PAT	T2 (40 mm)	530	0,94	0,89	0,83	0,98	25	47	-3,072	1
<b>2A</b>	steatóza	m	77	70	MR	T1 (60 mm)	909	1,87	0,27	0,33	1,44	6	27	-1,781	2
<b>3</b>	normální	m	71	80	PAT	T3a	38	1,34	1,91	0,74	2,24	6	43	-3,141	1
<b>4</b>	steatóza	m	64	50	CT	T1	N/A	1,11	0,39	0,46	1,44	9	45	-3,195	1
<b>5</b>	cirhóza	m	66	42	PAT	T1 (42 mm)	11,4	4,61	1,73	1,04	1,32	12	45	-3,113	1
<b>6</b>	chron. venostáza	f	61	90	CT	T4	2,6	0,64	13,7	20,2	1,06	16	42	-2,775	1
<b>7</b>	steatóza	m	63	100	CT	T1	159,5	8,75	0,82	0,68	3,79	11	44	-3,053	1
<b>8</b>	cirhóza	f	72	29	CT	T1 (30 mm)	1128	0,37	0,36	0,63	0,65	6	36	-2,546	2
<b>9</b>	normální	m	61	38	CT	T1 (40 mm)	1,6	0,45	0,25	0,32	0,94	14	47	-3,239	1
<b>10</b>	lehce fibrózní portobilia	m	68	32	PAT	T2 (35 mm)	3,5	0,93	0,21	0,36	1,62	9	44	-3,11	1
<b>11</b>	steatóza až ciróza	m	76	41x30x35	PAT	T2 (41 mm)	14,7	2	0,9	0,93	1,75	10	41	-2,825	1
<b>12</b>	normální	m	62	55 m a 80	PAT	T3	3,3	1,23	0,22	0,42	1,41	11	39	-2,628	1

**Tab. 14** Souhrnná tabulka vzorků a klinických parametrů - pokračování

	INR	ascites	Child-Pugh	Grade	Vask. invaze	Doba přežití (měs. od diagnózy)	Chirurgie	RFA	RT	CHT	TACE	Sorafenib	Hepatitida
<b>1</b>	1,03	0	A	3	1	žijící	1	0	1	2	0	1	A,B
<b>2A</b>	1,7	0	A	2	0	33	2	0	0	0	0	0	0
<b>3</b>	0,96	0	A	2	1	52	2	0	0	0	0	8/13-11/13	0
<b>4</b>	1	0	A	2	1	žijící	1	0	0	0	0	0	B
<b>5</b>	1,06	0	A	1	0	žijící	1	0	0	0	0	0	0
<b>6</b>	1,21	0	A	2	1	žijící	1	0	0	0	0	0	0
<b>7</b>	1,02	0	A	3	0	žijící	1	0	0	0	0	0	0
<b>8</b>	1,05	0	A	2	0	žijící	1	0	0	0	0	0	B
<b>9</b>	1,11	0	A	2	0	žijící	1	0	0	0	0	0	0
<b>10</b>	0,93	0	A	3	0	žijící	1	0	0	0	0	0	0
<b>11</b>	1,11	0	A	2	0	23	1	0	0	0	0	1	0
<b>12</b>	1,26	0	A	4	0	98	1	0	0	0	0	0	0

**Legenda tab. 14:** pTNM - klasifikace (T – tumor, N – postižení lymfatických uzlin, M – metastázy), AFP –  $\alpha$ -fetoprotein, GMT – gama-glutamyltransferáza, ALT - alaninaminotransferáza, AST - aspartátaminotransferáza, ALP - alkalická fosfatáza, ALBI skóre – albumin-bilirubin skóre, ALBI grade – albumin-bilirubin stupeň, INR – mezinárodní normalizovaný poměr pro vyjádření protrombinového času, grade – stupeň vyzrállosti nádoru, RFA - radiofrekvenční termoablace, RT- radiotherapie, CHT - chemoterapie, TACE - transarteriální chemoembolizace

Vynesení mRNA exprese všech tří genů do společného grafu ukázalo společné trendy v expresi CYP2C9 a jeho regulátorů (graf 4).

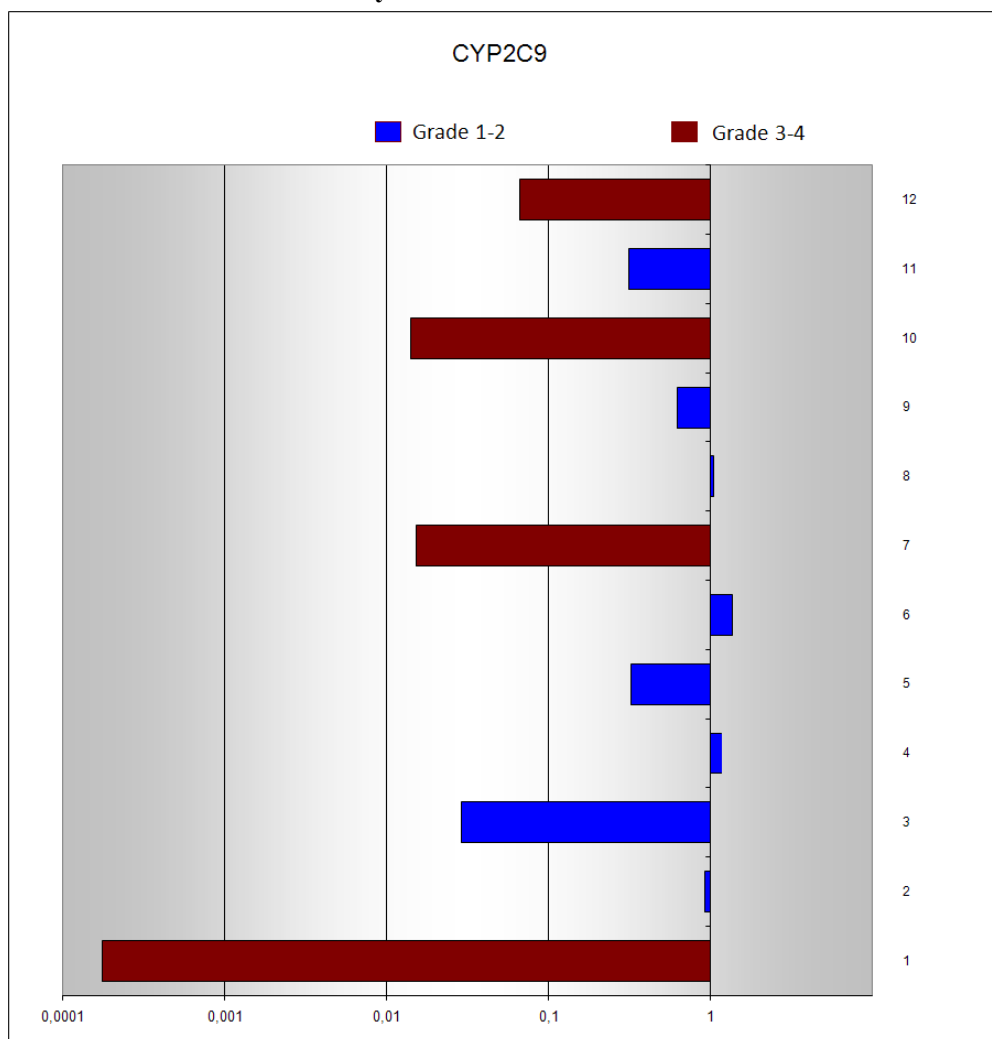


**Graf 4** Vzájemné porovnání exprese CYP2C9, CAR a PRX v nádorové tkáni.

Klinická data byla hodnocena kvalitativně. U jednotlivých parametrů byly hledány kategorie typu normální vs. zvýšené hladiny jaterních enzymů, různé stupně gradingu či jiné klasifikace, přítomnosti či nepřítomnosti vaskulární invaze, absolvování cílené léčby apod. a tyto kategorie byly hodnoceny ve srovnání s hladinou exprese CYP2C9. I přes omezený počet pacientů byla zřejmá souvislost mezi stupněm diferenciací a expresí CYP2C9.

Ze zkoumaného souboru bylo osm nádorů klasifikováno dle stupně diferenciací jako G1 a G2 (středně a dobře diferencované), u čtyř pacientů byly nádory klasifikovány gradem G3 a G4 (málo diferencované a nediferencované). Rozdílná exprese CYP2C9 pro tyto kategorie je znázorněna v grafu 5. Jiné významné asociace nebyly v daném souboru pozorovány.

**Graf 5 Porovnání závislosti stupně vyžrálosti nádoru na hodnotách CYP2C9. Ve vzorcích málo diferencovaných a nediferencovaných nádorů je exprese CYP2C9 nižší než u vzorků nádorů více diferencovaných.**



## 7 DISKUZE

Hepatocelulární karcinom je nejčastějším primárním zhoubným novotvarem jater. Jeho výskyt za poslední roky celosvětově vzrůstá. Na vzniku a rozvoji hepatocelulárního karcinomu se podílí řada faktorů. Jedním z klinických problémů HCC je problematická diagnóza karcinomu v raném stádiu, což omezuje možnosti léčby a vede k nepříznivým výsledkům. Neléčený HCC má špatnou prognózu s mediánem přežití 6 až 9 měsíců. Cílem současných studií je vytvořit základ pro efektivní genetický screening primární prevence, zlepšení diagnostiky a léčby karcinomu s ohledem na rostoucí výskyt a mortalitu (El-Serag et al. 2007; Llovet a Bruix 2008).

V poslední době je díky rychlým pokrokům v oblasti genomiky možné provádět rozsáhlé studie k vyhodnocení genetických variabilit. Genomické profilování hepatocelulárního karcinomu nám pomáhá lépe porozumět procesu karcinogeneze a identifikuje klíčové kroky na několika úrovních (např. molekulární dráhy), které mohou být potenciálním cílem pro léčbu a prevenci (Hamed et al. 2013). Expresse biotransformačních enzymů u hepatocelulárního karcinomu však dosud nebyla systematicky studována, což je překvapivé. Lze předpokládat, že maligní transformace hepatocytu bude mít dopad na jeho funkční kapacitu, minimálně v oblasti exprese biotransformačních enzymů, jak lze pozorovat u nádorových buněčných linií, ale i primárních hepatocytů kultivovaných ve 2D kulturách, kde postrádají architekturu jaterní tkáně a intenzivní komunikaci s okolními hepatocyty. Malignita vycházející z hlavní jaterní buňky by potenciálně mohla ovlivnit jaterní funkce, v případě léčby samotného nádoru by mohla ovlivnit hladinu chemoterapeutika či cíleného léčiva v nádorových buňkách prostřednictvím změněné rychlosti jeho metabolické aktivace či eliminace. Již bylo zkoumáno několik polymorfismů v genech vybraných enzymů.

CYP2C9 je obecně brán jako jeden z nejdůležitějších CYP v lidském těle. Je druhou nehojnější formou CYP. Během posledních let byly zkoumány vztahy mezi genetickými variantami, profily genové exprese a rozvojem rakoviny. Bylo zjištěno, že genetické polymorfismy genu CYP2C9 mohou hrát důležitou roli ve vývoji HCC. V recentní studii bylo popsáno potlačení exprese CYP2C9 a označeno jako biomarker HCC (Yu et al. 2015). Výsledky analýz prezentované v této práci s publikovanými daty



souhlasí a ukazují na další korelace, konkrétně s expresí nukleárních receptorů, regulujících expresi CYP2C9 a také s gradem (stupněm diferenciacie) nádoru.

Výsledky ukázaly, že exprese CYP2C9 byla v polovině případů o několik řádů nižší ve vzorcích nádorové tkáně oproti nenádorové tkáni. V druhé polovině případů byla exprese v nádoru zachována na srovnatelné úrovni jako okolní tkáni. Ve třech vzorcích (č. 4, 6, 8), byla exprese CYP2C9 lehce zvýšená. Ve vzorcích vyšetřovaných metodou western blot bylo vidět snížení exprese CYP2C9 v nádorové tkáni. V referenční tkáni u všech čtyř vzorků byl CYP2C9 normálně exprimován. Co se týká výsledků exprese nukleárních receptorů CAR a PXR v testovaných vzorcích, tak ty ukázaly také sníženou expresi v nádorové tkáni, s podobnými trendy s expresí CYP2C9. Při porovnání výsledků CYP2C9 a nukleárních receptorů CAR a PXR byla zjištěna korelace, což může naznačovat, že snížená exprese a aktivita CYP2C9 je způsobena následkem snížené exprese PXR a CAR, které fungují jako regulátory CYP2C9. Podobně toto zjištění uvádí Chen (Chen a Pichtette 2014) ve své studii, kde byla zkoumána exprese pěti genů CYP2 rodiny a CAR v čínské populaci, včetně CYP2C9. Všechny geny CYP2 rodiny byly ve vzorku HCC oproti zdravé tkáni dramaticky down-regulovány a výrazný pokles CYP2C9 byl patrný u nemocných v konečném stádiu onemocnění.

Vzniká otázka, z jakého důvodu je v některých nádorech exprese CYP2C9 snížena a v některých nikoliv. Také korelace s expresí nukleárních receptorů není kompletní odpovědí. Je pravděpodobné, že se zde projevují i další mechanismy, například dysregulace mikroRNA a/nebo další epigenetické mechanismy. Každopádně byla zjištěna významné rozdíly mezi expresí CYP2C9 v nádorech s vyšším stupněm diferenciacie a nádorech méně diferencovaných. Ze zkoumaného souboru vzorků byl u osmi z nich nádor klasifikován jako G1 a G2 (středně a dobře diferencovaný), u čtyř pacientů G3 a G4 (málo diferencovaný a nediferencovaný). Ve vzorcích málo diferencovaných a nediferencovaných nádorů byla exprese CYP2C9 nižší než u vzorků nádorů více diferencovaných. To odpovídá předpokladu, neboť menší podobnost s normální jaterní tkání by měla znamenat méně jaterních funkcí včetně exprese biotransformačních enzymů a metabolické aktivity. Souvislost s jinými klinickými parametry, ať už se jednalo o hladiny aminotransferáz a bilirubinu, přítomnost virové

infekce, typ primárního poškození jater (poškození okolní tkáně cirhózou, steatózou apod.) či charakteristiku pacientů a jejich karcinomů, nebyla v tomto souboru prokázána.

Získané výsledky jsou významné a přesvědčivé a vytváří prostor pro další výzkum v této oblasti - směrem k analýze dalších biotransformačních enzymů, studiu mechanismů jejich dysregulace v hepatocelulárním karcinomu, validace výsledků na větších kohortách, epigenetické analýzy, srovnání s jinými nádory jater (cholangiokarcinomem apod.), sledování účinnosti léčiv (např sorafenibu), které jsou metabolizovány cytochromy P450. Problémem zůstává získávání vzorků, neboť v České Republice je incidence HCC velmi nízká a jen málo pacientů je zde odoperováno. V archivech a biobankách jsou většinou deponovány pouze vzorky diagnostických jehlových biopsií ve formě formalinem fixované tkáně zalité do parafínu, takže je možno získat pouze velmi malé množství tkáně s degradovanými nukleovými kyselinami, navíc bez odpovídající nenádorové tkáně. Na druhou stranu technologický pokrok v molekulární biologii přináší nové možnosti analýz i u komplikovaných vzorků.

## 8 ZÁVĚR

V prezentované studii byla zjištěna signifikantně snížená exprese jednoho z hlavních biotransformačních enzymů první fáze metabolismu léčiv, cytochromu P450 2C9, v tkáni hepatocelulárního karcinomu ve srovnání s okolní nenádorovou jaterní tkání.

Snížení exprese bylo prokázáno na úrovni mRNA i proteinu, exprese CYP2C9 navíc korelovala s expresí regulačních nukleárních receptorů CAR (konstitutivní androstanový receptor) a PXR (pregnanový X receptor).

Výsledky jasně ukazují, že geny CYP2C9 jsou ve tkáni hepatocelulárního karcinomu silně down-regulovány, zejména v nádorech s nízkým stupněm buněčné diferenciaci.

Korelace s dalšími klinickými parametry nebyla v této studii pozorována.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFB1	aflatoxin B1
AFP	alfa-fetoprotein
Akt	protein kináza B
CCA	cholangiocelulární karcinomy
CT	počítačová tomografie
CYP	cytochrom P450
DNMT	DNA methyltransferáza
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FNH	fokální modulární hyperplazie
HB	hepatitida B
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HCC	hepatocelulární karcinom
HDAC	histone deacetylase
HFE gene	gen hemochromatózy
HGF	růstový faktor hepatocytů
HIV	virus lidského imunodeficitu
HNF-1 $\alpha$	hepatocytární nukleární faktor
HSC	hvězdicové buňky
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
MAPK	mitogen aktivovaná protein kináza
miRNA	mikro RNA
MBD	vazebná doména
MR	magnetická resonance
MRCP	magnetická resonance s cholangiopankreatikografií
Myc	myc protoonkogen protein
NFALD	nealkoholické ztučnění jater
NASH	nealkoholická steatohepatitida
PEI	perikutání injekce ethanolu
PRMT 1	proteinargininová methyltransferáza
PROX1	prospero homeoboxprotein 1
RAF	serin/treonin specifická protein kináza
RFA	radiofrekvenční ablace
RISC	RNA-induced silencing complex
TACE	transarteriální chemoembolizace
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru
WNT	wingless/Int-1

## 10 LITERATURA

1. ADAM, Zdeněk, Jiří VORLÍČEK a Jiří VANÍČEK. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 604 s. ISBN 80-716-9792-3.
2. ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 394 s. ISBN 978-807-2627-158.
3. AU, Sandy Leung-Kuen, Irene Oi-Lin NG, Chun-Ming WONG a Hoy-kam TAM. Epigenetic dysregulation in hepatocellular carcinoma: focus on polycomb group proteins. *Frontiers of Medicine*. 2013, vol. 7, issue 2, s. 231-241. DOI: 10.5353/th\_b4645542.
4. BARSHACK, Iris, et al. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microRNA expression. *The International Journal of Biochemistry*. 2010, vol. 42, issue 8, s. 1355-1362. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.02.021
5. BEFELER, Alex S., Adrian M. di BISCEGLIE, Henri-Marcel HOOGEWOU, Rajagopal N. ARAVALLI a Clifford J. STEER. Hepatocellular carcinoma: Diagnosis and treatment. *Gastroenterology*. 2002, vol. 122, issue 6, s. 7-13. DOI: 10.1007/978-3-319-09414-4\_3.
6. BIALECKI, E. S., & Di BISCEGLIE, A. M.. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB : The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2005 ;7(1), 26–34. doi:10.1080/13651820410024049
7. BLECHACZ, Boris, YezazAhmed GHOURI a Idrees MIAN. Cancer review: Cholangiocarcinoma. *Journal of Carcinogenesis*. 2015, vol. 14, issue 1, s. 2283-2283. DOI: 10.1007/978-3-540-47648-1\_4445.
8. BRODANOVÁ, M. *Interní medicína pro praxi: NEALKOHOLICKÁ STEATOHEPATITIDA* [online]. Solen, 2003/6. ISSN 1803-5256.
9. BRONTE, F, G BRONTE, S CUSENZA, E FIORENTINO, C ROLFO, G CICERO, E BRONTE, V DI MARCO, A FIRENZE, G ANGARANO, T FONTANA a A RUSSO. Targeted therapies in hepatocellular carcinoma. 2014, s. 966-74.
10. BROWN, K.T., L.A. BRODY (2001). Percutaneous methods for ablation of hepatic neoplasms. In: Blumgart, L.H. *Surgery of the liver and biliary tract*. Churchill Livingstone, Edinburgh, p.1566-1575. ISBN 0-7020-25011.
11. BRUIX, J. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002, vol. 35, issue 3, s. 519-524. DOI: 10.1053/jhep.2002.32089.

12. BRUIX, Jordi a Morris SHERMAN. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*. 2011, vol. 53, issue 3, s. 1020-1022. DOI: 10.1002/hep.24199.
13. BRUNO, Robert D. a Vincent C.O. NJAR. Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development. *Bioorganic*. 2007, vol. 15, issue 15, s. 5047-5060. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.05.046.
14. CERVELLO M, MCCUBREY JA, CUSIMANO A, LAMPIASI N, AZZOLINA A, MONTALTO G. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget*. 2012;3(3):236-260.
15. CORNELLÀ, Helena, Clara ALSINET a Augusto VILLANUEVA. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2011, vol. 35, issue 5, s. 821-825. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01406.x.
16. ČIHÁK, Radomír a Stanislav LAICHMAN. *Anatomie 2*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2002, 470 s. ISBN 80-247-0143-X.
17. DEAN L. *Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) [online]. 2012 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84174/>
18. DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUŠÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2015-1-06]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
19. EHRMANN, Jiří. *Hepatologie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 859-404-9240-272
20. EL-SERAG, Hashem B., Jorge A. MARRERO, Lenhard RUDOLPH a K. Rajender REDDY. Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2008, vol. 134, issue 6, s. 1752-1763. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.090. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508004265>
21. EL-SERAG, Hashem B., K. Lenhard RUDOLPH, Bentham Science Publisher Bentham Science PUBLISHER, Yasunobu MATSUDA, Toshifumi WAKAI, Jing-hsiung OU, Donna L. WHITE a Hashem B. EL-SERAG. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007, vol. 132, issue 7, s. 51-73. DOI: 10.1007/978-1-4419-6082-5\_4.
22. ENGUITA-GERMÁN, Mónica. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*. 2014, vol. 6, issue 10. DOI: 10.4254/wjh.v6.i10.716.
23. FACCIORUSSO, A, MC, NACCHIERO, R, ROSANIA, G, LAONIGRO, F, GIORGIO, V, DEL PRETE, C, PANELLA a E IERARDI. Pathways and gene

- expression profiles in hepatocellular carcinoma. 2012, s. 35-48. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419003>
24. FRAZER, Christopher. Imaging of hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 1999, 14.8: 750-756. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1440-1746.1999.01946.x/pdf>
  25. GALUPPO, Roberto, Dinesh RAMAIAH, Oscar Moreno PONTE, Roberto GEDALY, Brian I. CARR a Susan KRALIAN. Molecular Therapies in Hepatocellular Carcinoma: What Can We Target?. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014, vol. 59, issue 8, s. 589-614. DOI: 10.1007/978-1-60327-376-3\_22.
  26. GANAPATHY-KANNIAPPAN S, KUNJITHAPATHAM R, GESCHWIND J-F. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: A Promising Target for Molecular Therapy in Hepatocellular Carcinoma. Oncotarget*. 2012;3(9):940-953. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3660062/#>
  27. GERMANO, D, V TINESSA, E BARLETTA, L CANNELLA a B DANIELE. Targeted therapy for advanced hepatocellular cancer in the elderly: focus on sorafenib. 2013, s. 887-92. DOI: 10.1007/s40266-013-0124-6.
  28. GIACCONE, G. The Potential of Antiangiogenic Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007, vol. 13, issue 7, s. 1961-1970. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-06-2186.
  29. GIACCONE, Giuseppe a Jean-Charles SORIA. *Targeted therapies in oncology*. New York: Informa Healthcare, 2007, ix, 412 p. ISBN 08-493-9371-X.
  30. HAMED, O, ET, KIMCHI, M, SEHMBEY, NJ, GUSANI, JT, KAIFI a K STAVELEY-O'CARROLL. Impact of genetic targets on cancer therapy: hepatocellular cancer. 2013, s. 67-90. DOI: 10.1007/978-1-4614-6176-0\_4.
  31. HERATH, NIRMITHA I, BARBARA A LEGGETT a GRAEME A MACDONALD. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2006, vol. 21, issue 1, s. 15-21. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2005.04043.x.
  32. HERCEG, Zdenko a Anupam PALIWAL. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: How environmental factors influence the epigenome. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2011, vol. 727, issue 3, s. 55-61. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138357421100007X>
  33. HOLIBKOVÁ, Alžběta a Stanislav LAICHMAN. *Přehled anatomie člověka*. 4. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2006, 140 s. ISBN 80-244-1480-5.
  34. HONMA, Yuichi, Masaru HARADA a Ka-ho TAM. A New Therapeutic Strategy for Hepatocellular Carcinoma by Molecular Targeting Agents via Inhibition of

- Cellular Stress Defense Mechanisms. *Journal of UOEH*. 2014, vol. 36, issue 4, s. 229-235. DOI: 10.5353/th\_b4150847.
35. CHEN, Hong a V. PICHETTE. Expression of P450 and nuclear receptors in normal and end-stage Chinese livers. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, vol. 20, issue 26, s. 273-282. DOI: 10.3748/wjg.v20.i26.8681. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
36. CHEN, Hong. Expression of P450 and nuclear receptors in normal and end-stage Chinese livers. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, vol. 20, issue 26. DOI: 10.3748/wjg.v20.i26.8681.
37. CHUN, Young-Jin a Sanghee KIM. Discovery of cytochrome P450 1B1 inhibitors as new promising anti-cancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 2003, vol. 23, issue 6, s. 657-668. DOI: 10.1002/med.10050.
38. IKOMA, J., et al. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des-gamma-carboxy prothrombin: a prospective study. *Hepato-gastroenterology*, 2002, 49.43: 235.
39. KAPLAN, Zdeněk. *Radiofrekvenční ablace jaterních malignit*. Masarykův onkologický ústav, Brno, 2005. Disertační práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Igor Penka.
40. KHARE, S., ZHANG, Q., & IBDAH, J. A. (2013). Epigenetics of hepatocellular carcinoma: Role of microRNA. *World Journal of Gastroenterology : WJG*,19(33), 5439–5445. doi:10.3748/wjg.v19.i33.5439
41. KULIS, Marta a Manel ESTELLER. DNA Methylation and Cancer. 2010, s. 27. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.
42. LIU, Y, X YE, J-B ZHANG, H OUYANG, Z SHEN, Y WU, W WANG, J WU, S TAO, X YANG, K QIAO, J ZHANG a LIU. PROX1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and sorafenib resistance by enhancing  $\beta$ -catenin expression and nuclear translocation. *Oncogene*. 2015.
43. LLOVET, Josep M. a Jordi BRUIX. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008, vol. 48, issue 4, s. 1312-1327. DOI: 10.1002/hep.22506.
44. LOKICH, Jacob J. *Liver Cancer: Chemotherapy of Liver Cancer*. Springer US: Springer Verlag, 1985. ISBN 978-146-1296-256.
45. LUDVÍKOVÁ, M, M PEŠTA, L HOLUBEC a D KALFEŘT. Česko-slovenská patologie: Nové aspekty patobiologie nádorů. 2009, č. 4, s. 94-99.
46. MA, Li. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: An update and future therapy perspectives. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, vol. 20, issue 2, s. 333-. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.333. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i2/333.htm>



47. MAI, E., Z. ZHENG, Y. CHEN, J. PENG, C. SEVERIN, E. FILVAROFF, M. ROMERO, W. MALLETT, S. KAUR, T. GELZLEICHTER a NIJEM. Nonclinical evaluation of the serum pharmacodynamic biomarkers HGF and shed MET following dosing with the anti-MET monovalent monoclonal antibody onartuzumab. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014-02-09, vol. 13, issue 2. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0494.
48. MARKS P., RIFKIND R.A., RICHON V.M., BRESLOW R., MILLER T., KELLY W.K. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 1: 194-202.
49. MLČOCHOVÁ, Hana. *Vývoj farmakogenetického prostředku pro určení dávky warfarinu*. Brno, 2012. 73 l. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Radek Horváth.
50. MURRAY, Graeme I. The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy. *The Journal of Pathology*. 2000, vol. 192, issue 4, s. 419-426. DOI: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::aid-path750>3.3.co;2-s.
51. NARJOZ, Céline, Laetitia MARISA, Sandrine IMBEAUD, Alain PARIS, Hervé DELACROIX, Philippe BEAUNE a Isabelle De WAZIERS. Genomic Consequences of Cytochrome P450 2C9 Overexpression in Human Hepatoma Cells. *Chemical Research in Toxicology*. 2009, vol. 22, issue 5, s. 408-408. DOI: 10.1007/978-3-540-38918-7\_5509.
52. NEKULOVÁ, M, M ŠIMÍČKOVÁ a D VALÍK. *Klinická biochemie a metabolismus: Nádorové markery a epigenetické faktory*. 2006, č. 3, s. 152-156.
53. NEKVINDOVÁ, Jana, Alvin GOMEZ, M, KARLGEN, P, ANZENBACHER, M, INGELMAN-SUNDBER. *CYP2W1 in colorectal cancer: Nádorová biologie/imunologie/genetika a buněčná terapie* [online]. 2013 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/5874/>
54. PANG, Roberta W.C. a Ronnie T.P. POON. From Molecular Biology to Targeted Therapies for Hepatocellular Carcinoma: The Future Is Now. *Oncology*. 2007, vol. 72, issue 1, s. 30-44. DOI: 10.1159/000111705.
55. PUSZYK, William Matthew, Thu Le TRINH, Sarah J CHAPPLE a Chen LIU. Linking metabolism and epigenetic regulation in development of hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation*. 2013, vol. 93, issue 9, s. 983-990. DOI: 10.1038/labinvest.2013.94.
56. RYDER, S D, Rajagopal N. ARAVALLI, Clifford J. STEER, Abdullah JIBAWI a David CADE. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults. *Gut*. 2003, vol. 52, issue 90003, s. 321-324. DOI: 10.1093/med/9780199558278.003.0042. Dostupné z: [http://m.gut.bmj.com/content/52/suppl\\_3/iii1.full.pdf](http://m.gut.bmj.com/content/52/suppl_3/iii1.full.pdf)

57. SAITO, Yoshimasa, Sana HIBINO a Hidetsugu SAITO. Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2013, vol. 44, issue 1, s. 31-42. DOI: 10.1111/hepr.12147.
58. SNPedia: CYP2C9. [online]. 2007, 20 July 2014 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://www.snpedia.com/index.php/CYP2C9>
59. SUCHÁNKOVÁ, J. *Reparace DNA a epigenetické procesy*. Brno, 2013. Diplomová práce. Masarykova univerzita.
60. ŠENKEŘÍKOVÁ, R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma, long-term outcomes and risk factors of tumour recurrence (single-centre experience). 2014, s. 139-145.
61. TANG, Zhao-You. Hepatocellular Carcinoma-Cause, Treatment and Metastasis. *World Journal of Gastroenterology*. 2001 ;7(4):445-454. ISSN 1007-9327.
62. TAOULI, Bachir, Mariela LOSADA, et al. Magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma: Multidetector-Row Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Gastroenterology*. 2004, vol. 127, issue 5, s. 221-235. DOI: 10.1007/978-1-4020-9804-8\_16.
63. VÁLEK, Vlastimil, Zdeněk KALA a Igor KISS. *Maligní ložiskové procesy jater: diagnostika a léčba včetně minimálně invazivních metod* /. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 416 s. ISBN 80-247-0961-9.
64. VAN BOOVEN D, MARSH S, MCLEOD H, et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. Pharmacogenetics and genomics. 2010;20(4):277-281. doi:10.1097/FPC.0b013e3283349e84.
65. VILLENEUVE, J.-P. a V. PICHETTE. Cytochrome P450 and Liver Diseases. *Current Drug Metabolism*. 2004-06-01, vol. 5, issue 3, s. 273-282. DOI: 10.2174/1389200043335531. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
66. VLAHOVÁ, V., K. ŠMERKOVÁ, M. VACULOVIČOVÁ a R. KIZEK. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies: MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství*. 2014, č. 1, s. 18-22.
67. WEI, Yuan, Cataldo DORIA, Yuan LIU, Yuan WEI, Cataldo DORIA, Yuan LIU, Luigi BOLONDI a Luigi BOLONDI. Targeted Therapies in the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2013, s. 2-5. DOI: 10.2217/ebo.11.307.
68. YANG, Bin, Mingzhou GUO, James G. HERMAN a Douglas P. CLARK. Aberrant Promoter Methylation Profiles of Tumor Suppressor Genes in Hepatocellular Carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2003, vol. 163, issue 3. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63469-4.

69. YANG, Ping-Chang a Tahrin MAHMOOD. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012, vol. 4, issue 9. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
70. YU, Dianke, Bridgett GREEN, April MARRONE, Yongli GUO, Susan KADLUBAR, Dongxin LIN, James FUSCOE, Igor POGRIBNY a Baitang NING. Suppression of CYP2C9 by MicroRNA hsa-miR-128-3p in Human Liver Cells and Association with Hepatocellular Carcinoma. *Scientific Reports*. 2015, vol. 5. DOI: 10.1038/srep08534.
71. ZANGER, Ulrich M., Matthias SCHWAB, Piotr CZEKAJ a Rafa SKOWRONEK. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology*. 2013, vol. 138, issue 1, s. 103-141. DOI: 10.5772/27817.
72. ZENDER, Lars, Stefan KUBICKA a Junji FURUSE. Molecular Pathogenesis and Targeted Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Onkologie*. 2008, vol. 31, issue 10, s. 10-10. DOI: 10.5772/29781.
73. ZHOU, Shu-Feng, Jun-Ping LIU a Balram CHOWBAY. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews*. 2009, vol. 41, issue 2, s. 89-295. DOI: 10.1080/03602530902843483.

# 11 SEZNAMY OBRÁZKŮ A TABULEK

- Obr. 1 Játra
- Obr. 2 Regionální rozdíly v úmrtnosti na HCC
- Obr. 3 Přepočet případů HCC od roku 1989 do roku 2011
- Obr. 4 Molekulární mechanismy indukující hepatokarcinogenezi ve fázi cirhózy
- Obr. 5 Signální dráha epidermálního růstového faktoru
- Obr. 6 Schéma histonu
- Obr. 7 Algoritmus pro léčbu HCC
- Obr. 8 Perkutánní ablace HCC pomocí radiové frekvence
- Obr. 9 Molekulární cílená léčba
- Obr. 10 Procentuální porovnání izoform P450 podle jejich podílu na metabolismu léčiv a faktory ovlivňující jejich variabilitu
- Obr. 11 Grafické znázornění chromozomu 10 a umístění genu CYP2C9
- Obr. 12 Schéma jednotlivých kroků western blottingu
- Obr. 13 Výsledné schéma exprese CYP2C9 získané pomocí SDS-PAGE a western blotu
- 
- Tab. 1 MicroRNA v HCC a jejich charakteristiky
- Tab. 2 TNM klasifikace HCC
- Tab. 3 Klasifikace dle Child Pugha
- Tab. 4 Chemoterapeutika používaná u HCC
- Tab. 5 Klasifikace léků a dráhy, které ovlivňují
- Tab. 6 Okudova prognostická klasifikace nemocných s HCC
- Tab. 7 Premix pro reversní transkripci vzorků pacientů
- Tab. 8 Protokol pro negativní kontrolu RT-
- Tab. 9 Reakční směs pro real-time PCR pro CYP2C9, CAR, PXR
- Tab. 10 Reakční směs pro real-time PCR pro HPRTI
- Tab. 11 Teplotní profil pro real-time PCR pro CYP2C9, CAR, PXR
- Tabl. 12 Teplotní profil pro real-time PCR pro HRPTI
- Tab. 13 Výsledky měření exprese CYP2C9, PXR a CAR ve vzorcích HCC
- Tab. 14 Souhrnná tabulka vzorků a klinických parametrů

- Graf 1 Znázornění relativní exprese CYP2C9 v nádorové tkáni vůči nenádorové (exprese v nenádorové tkáni = 1 (100 %))
- Graf 2 Znázornění relativní exprese CAR v nádorové tkáni vůči nenádorové (exprese v nenádorové tkáni = 1 (100 %))
- Graf 3 Znázornění relativní exprese PXR v nádorové tkáni vůči nenádorové (exprese v nenádorové tkáni = 1 (100 %))
- Graf 4 Vzájemné porovnání exprese CYP2C9, CAR a PRX v nádorové tkáni
- Graf 5 Graf závislosti stupně vyzrállosti nádoru na hodnotách CYP2C9