

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Karolína Šusová

**Analýza významu genetických faktorů pro prognózu a
predikci léčby nádorových onemocnění**

**Significance of genetic factors for prognosis and prediction of
cancer therapy outcome**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

PRAHA 2014

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

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Pavlu Součkovi, CSc., za možnost účastnit se na výzkumné práci v jeho týmu, za udělení vlastního úkolu a za odborné vedení a rady při tvoření diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému týmu oddělení toxikogenomiky a zejména Ing. Simoně Šusové, bez které bych určitě nezvládla svůj úkol s takovou precizností, a také Mgr. Tereze Kunické za spolupráci a pomoc nejen při praktických, ale i teoretických částech. Práce byla podpořena grantovými projekty IGA 12025 – 4 a NT/14329 – 3.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| OBSAH | 4 |
| ABSTRAKT | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1. ÚVOD | 8 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ | 9 |
| 2.1.1 Obecná charakteristika | 9 |
| 2.1.2 Kancerogeneze | 10 |
| 2.1.3 Fáze kancerogeneze | 10 |
| 2.1.4 Klasifikace nádorů | 11 |
| 2.2 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM | 11 |
| 2.2.1 Epidemiologie | 11 |
| 2.2.2 Definice kolorektálního karcinomu | 12 |
| 2.2.3 Klasifikace | 13 |
| 2.2.4 Rizikové faktory vzniku nádoru | 13 |
| 2.2.5 Prevence a screening | 14 |
| 2.2.6 Etiologie | 16 |
| 2.2.7 Léčba | 18 |
| 2.3 LÉKOVÁ REZISTENCE | 24 |
| 2.4 TRANSPORTNÍ PROTEINY RODINY ABC | 25 |
| 2.4.1 ABCA podrodina | 30 |
| 2.4.2 ABCB podrodina | 30 |
| 2.4.3 ABCC podrodina | 31 |
| 2.4.4 ABCD podrodina | 32 |
| 2.4.5 ABCE a ABCF podrodina | 32 |
| 2.4.6 ABCG (White) podrodina | 32 |
| 2.5 FARMAKOGENOMIKA | 33 |
| 2.5.1 Exprese genů ABC transportérů | 33 |
| 2.5.2 Genetická variabilita ABC transportérů | 34 |
| 3. CÍL PRÁCE | 36 |
| 4. PRAKTICKÁ ČÁST | 37 |
| 4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE | 37 |
| 4.3 PACIENTI | 38 |
| 4.4 METODY | 39 |
| 4.4.1 Příprava tkání na izolaci RNA | 39 |
| 4.4.2 Izolace RNA | 39 |
| 4.4.3 Stanovení koncentrace RNA | 40 |
| 4.4.4 Ověření kvality a integrity RNA | 41 |
| 4.4.5 Syntéza cDNA | 42 |
| 4.4.6 Ověření kvality cDNA | 42 |
| 4.4.7 Kvantitativní PCR v reálném čase qPCR | 43 |
| 4.4.8 Statistické hodnocení | 46 |
| 5. VÝSLEDKY | 47 |
| 5.1 KONTROLA KVALITY VZORKŮ | 47 |
| 5.2 STANOVENÍ EXPRESE ABC TRANSPORTÉRŮ POMOCÍ qPCR | 49 |
| 5.3 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ | 50 |
| 6. DISKUZE | 58 |
| 7. ZÁVĚR | 62 |
| 8. SEZNAM ZKRATEK | 63 |
| 9. PŘÍLOHY | 67 |
| 10. LITERATURA | 70 |

ABSTRAKT

Kolorektální karcinom (KRK) je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění ve světě a v ČR. Existuje mnoho příčin tak vysoké prevalence a mortality. Obecně se dá říct, že úroveň povědomí o rizikových faktorech či primární prevenci je velice nízká. Léčbu KRK ztěžuje inoperabilita nádoru zapříčiněná diagnostikou v pozdním stádiu, což také snižuje dobu přežití. V chemoterapii KRK je zlatým standardem 5 – fluorouracil s leukovorinem. Velký úspěch má v paliativní terapii také cílená léčba, která prodlužuje dobu přežití. Avšak mnoho pacientů na indikovanou adjuvantní nebo paliativní chemoterapii nereaguje optimálně. Příčinou je léková rezistence. Jedním z mnoha faktorů způsobujících lékovou rezistenci je transport cytostatik z buňky ven, za což jsou odpovědní transportní proteiny nádorových buněk, tzv. ABC transportéry. V souvislosti s jinými typy nádoru se podařilo zjistit odlišné hladiny exprese genů ABC transportérů v nádorových tkáních. Cílem této studie je nalézt markery u kolorektálního karcinomu, které by zlepšili prognózu a léčbu pacientů. Na základě stanovení exprese genů ABC transportérů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase a statistických analýz byly identifikovány statisticky významné vztahy, které by mohli hrát roli v léčbě a prognostice u KRK. Exprese u většiny sledovaných genů byla nezměněna nebo snížena. Významně zvýšená exprese v nádorové tkáni oproti nenádorové byla nalezena u genů ABC transportérů: ABCB2, ABCC1, ABCC2 a ABCC10. Při porovnání expresí genů ABC transportérů s klinickými daty pacientů byla nalezena významná korelace exprese genů ABCA7, ABCC6, ACBE1, ABCF1, ABCG2, ABCG8 s věkem pacientů. Hladina exprese genu ABCB2 významně korelovala s lokalizací nádoru – exprese v nádorech tračníku byla větší než v nádorech rekta. A pacienti se zvýšenou hladinou exprese genu ABCD4 v nádoru vykazují kratší bezpříznakové přežití než pacienti s nižší hladinou exprese genu. Tato studie, ukazuje, že nejzajímavějším kandidátním, prognostickým markerem pro lokalizované stádium KRK je ABCD4. Následné studie budou orientovány na funkční analýzu tohoto markeru.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world and also in the Czech Republic. There are many reasons for such a high prevalence and mortality. In general, we can say, that the level of awareness of risk factors and primary prevention is very low. For example, the inoperability of the tumor, caused by the diagnosis of CRC at a late stage, makes therapy of patients difficult and reduces survival. 5 – Fluorouracil and leucovorin are the gold standard in the treatment of CRC. The targeted therapy has a great success in the palliative therapy and prolongs survival. However, many patients do not respond to adjuvant and palliative therapy well. This failure is often caused by drug resistance. Efflux of cytotoxic drugs out of cells caused by transport proteins of cancer cells. ABC transporters remain among the many elements of drug resistance. Deregulation of gene expression of ABC transporters in tumor cells was discovered in connection with other types of cancer. The aim of this study is to find prognostic markers for CRC and enable improvement of the therapy of patients with CRC. By help of qPCR and statistical analyses statistically significant changes in gene expression were identified that might influence the therapy and prognosis of CRC. Expression of the majority of investigated genes was decreased or unchanged in tumors compared with the non – cancer tissues. Significantly increased expression of ABCB2, ABCC1, ABCC2 and ABCC10 genes in tumor tissue compared to non – cancer tissue was found. After comparing the gene expression of ABC transporters in tumors with clinical data of patients, significant correlations of expression of ABCA7, ABCC6, ABCE1, ABCF1, ABCG2, ABCG8 genes with age was revealed. The expression of ABCB2 gene was significantly higher in tumors of the colon compared with those in rectum. Patients with increased ABCD4 expression in their tumors exhibited shorter disease free survival than patients with lower levels of expression. This study shows ABCD4 is the most interesting candidate, prognostic marker for patients with localized stage of CRC. Subsequent studies will be oriented on functional analysis of this marker.

1 ÚVOD

Kolorektální karcinom je jedno s nejčastějších nádorových onemocnění na světě a v České republice je na také na předních pozicích. Pokud je tento nádor zachycen včas, prognóza pacienta je velmi dobrá. Té se dá docílit dnes velmi populární prevencí a screeningem. Ovšem pokud se nepodchytí počáteční stádia, může být léčba hodně složitá, někdy pouze odstraňující symptomy způsobené rozrostlým a metastazujícím nádorem. Při léčbě se používá mnoho způsobů, které se odvíjí na základě lokalizace nádoru. Základem je chirurgická léčba spolu s chemoterapií, pro nádory střev a pro konečník je typická chirurgická léčba spojená s radiochemoterapií. Tento nádor je citlivý na cytostatická léčiva a zlatým standardem je zde 5 – fluorouracil, který se kombinuje nejčastěji s leukovorinem a dalšími cytostatiky, jako je oxaliplatin, kapecitabin, a irinotekan. Dále se zde uplatňuje i biologická léčba a to pro pacienty s inoperabilním nádorem.

Jako každá léčba i tato má svá úskalí. Pro léčbu nádorového onemocnění je velký problém léková rezistence, kdy pacient neodpovídá na léčbu a musí se hledat jiná alternativa, popřípadě zvýšit dávku, pokud to lze, což je spojeno s velmi nepříjemnými a závažnými nežádoucími účinky. Příčin lékové rezistence je mnoho. Jednou z nich je vylučování cytostatika z nádorové buňky, což způsobí neodpovídající koncentraci léčiva, a tím jeho neúčinnost. Je to způsobeno proteiny s transportní funkcí, konkrétně ABC transportéry, které mohou být v nádorových buňkách na základě genetické mutace ve vyšším množství a výrazně tím znemožňují léčbu kolorektálního karcinomu.

Tato práce je zaměřena na potvrzení úlohy vybraných transportérů, které byly odhaleny předchozí studií v lékové rezistenci KRK. Hlavním úkolem je porovnat exprese daných transportérů nádorové tkáně KRK a zdravé tkáně a zhodnotit, které transportéry by mohli hrát roli v léčbě KRK.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Nekontrolovatelné buněčné dělení, civilizační choroba, nádorové onemocnění či největší obava každého z nás, takto můžeme označit slovo rakovina. Je to jedno z nejčastějších onemocnění dnešní doby. Můžeme se s ní setkat stejně často jako například s diabetem nebo s chřipkou. Dle Světové zdravotnické organizace v roce 2012 přibylo 14,1 milionů nových případů nádorového onemocnění, z toho více jak polovina pacientů zemřela. Nejvyšší počty nemocných spadají do kategorie nádorů prsu u žen a prostaty u mužů. Další příčky obsadil nádor plic a tlustého střeva a konečníku – KRK (*Globocan* [cit. 2014-02-02] z: <http://globocan.iarc.fr>). Proto je třeba se na tento frekventovaný problém zaměřit a dobře poznat příčiny jeho vzniku a šíření, abychom ho dokázali odstranit, minimalizovat jeho dopady nebo je aspoň oddálit.

2.1.1 Obecná charakteristika

Nádorové onemocnění vzniká dlouhodobou kumulací škodlivých vnějších (např.: záření, infekce, životní prostředí) a vnitřních (genetický vliv) podnětů, které mohou přispět k tvorbě nádoru. Hlavní vlastností nádoru je nekontrolované dělení, a proto nádorové buňky vykazují poškození zejména v oblasti regulace buněčného dělení. Zdravá buňka funguje normálně, její dělení je pod kontrolou mnoha enzymů a proteinů a je zde nastolena rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí. Jestliže je však nějaký z regulačních mechanismů defektní nebo chybí, rovnováha je narušena, a následkem může být i kancerogeneze. Nejčastější změny v regulaci buněčného dělení se dějí na úrovni proliferačních a antiproliferačních genů.

Proliferační geny neboli protoonkogeny podporují dělení a růst buněk. Jestliže se mutací (změna genetické informace) aktivují na onkogeny, tak dále bez jakékoli kontroly stimulují dělení buněk. Oproti tomu antiproliferační geny neboli antionkogeny nebo tumor – supresorové geny za normálních okolností zabraňují nebo pozastavují dělení buněk. Pokud dojde k mutaci v těchto genech, dochází k podpoře dělení, a tím i ke vzniku vhodných podmínek pro kancerogenezi. Jedním z nejznámějších antionkogenů je *TP53* (OMIM: 191170) (Alberts a kol. 2005a, Alberts a kol. 2005b).

2.1.2 Kancerogeneze

Nádorová buňka má určité vlastnosti, díky kterým můžeme charakterizovat kancerogenezi. Základním předpokladem pro vznik nádorového onemocnění je nastolení a udržení proliferační signalizace, aby se buňky mohly neustále dělit. Další vlastností je schopnost omezit působení tumor – supresorových genů. Dále buňka může vlastnit mechanismy, které omezují či brání buněčné smrti, která představuje přirozenou bariéru právě proti nadměrnému buněčnému dělení. Nejčastějším mechanismem vzniku mnoha nádorů je právě ztráta funkce *TP53*. Ke kancerogenezi přispívá i tzv. replikační nesmrtelnost, která umožňuje buňce se neomezeně dělit bez známek stárnutí. Dochází k tomu, pokud buňka dokáže udržet telomerovou DNA v dostatečné délce a to díky deregulaci exprese enzymu telomerázy, která dokáže tuto délku neustále udržovat. Tudíž v prostředí nádoru můžeme změřit vysokou koncentraci tohoto enzymu. Aby nádorová tkáň přežila, musí se také nějak vyživovat. A proto mají nádorové buňky schopnost vytvářet nové cévy, které budou celou tkáň zásobovat díky zvýšeným proangiogenním signálům a jsou také schopny přeprogramovat energetický metabolismus glykolýzy zdravých buněk ve svůj prospěch. Díky tomu odebírají zdravým buňkám energii a využívají ji pro sebe. Poslední charakteristika nádorové buňky je její schopnost invaze do okolních tkání a tvorba ložisek (metastáz) mimo primární nádor. Je to vícestupňový proces, který probíhá u každého typu nádoru různě rychle. Buňky tuto vlastnost získávají v průběhu progresu nádoru. Zahrnuje prostup nádorových buněk nejdříve do krevních a lymfatických cév okolo nádoru, únik těchto buněk do oběhu a pak tvorbu dalších menších nádorů, které se mohou rozrůstat. Kvůli těmto vlastnostem je nádorové onemocnění v určitých stádiích velice těžko vyléčitelné (Hanahan a kol. 2011).

2.1.3 Fáze kancerogeneze

Vznik nádoru můžeme charakterizovat také podle toho, jak se vyvíjí v časové ose. Vývoj je rozdělen do několika fází. První fází je iniciace, což je přeměna normální zdravé buňky na základě kancerogenního podnětu a genetické mutace v iniciovanou buňku klonu. Tato změna je nevratná. Další fází je promoce, v níž hrají hlavní roli rizikové faktory. V této fázi dochází v buňce k poruše diferenciace. Dále dochází ke konverzi buněk, a to na základě stálého působení kancerogenních podnětů a rizikových faktorů. Buňka ztrácí kontrolu nad rovnováhou mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí. Fáze, kdy už z maligních buněk vzniká nádorová tkáň, se nazývá progres. Dále

buňka může získat určité vlastnosti, díky nim se může dále rozšiřovat a tvoří metastázy nádoru (Klener a Klener 2013a).

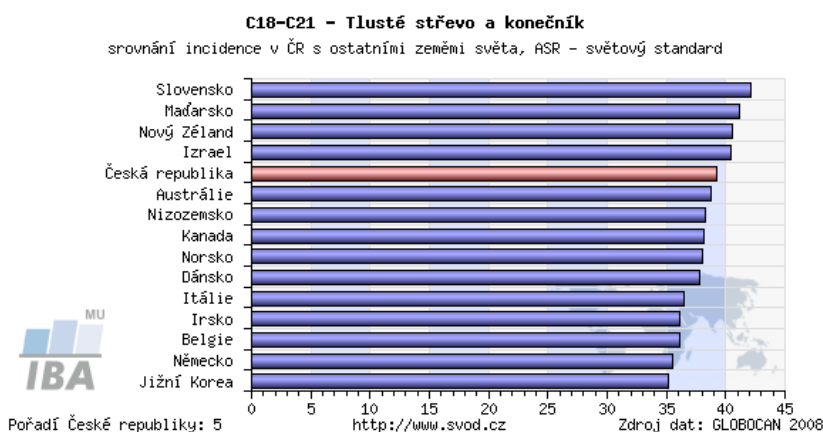
2.1.4 Klasifikace nádorů

Nádory obecně se dělí dle charakteru struktury a způsobu šíření do okolních tkání, a to na benigní a maligní. Benigní nádor je nezhoubný a jeho základní charakteristika je, že je ohraničený a kompaktní a strukturou je podobný orgánům. Proto je dobře odstranitelný. Jeho růst je velmi pomalý a neničí okolní tkáň. Maligní nádor (zhoubný) je charakteristický tím, že naopak není přesně ohraničená jeho struktura, napadá okolní tkáň, do kterých prostupuje, a proto se špatně odstraňuje. Obsahuje také enzymy, které mu napomáhají k ničení okolních struktur a rozšiřování se. Tento typ nádoru dokáže během kancerogeneze získat vlastnost metastazování (Rejtar 2002).

2.2 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

2.2.1 Epidemiologie

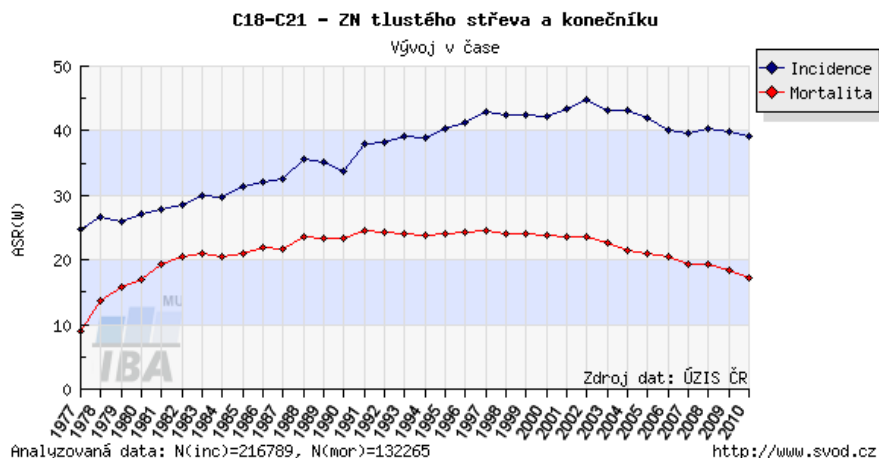
Celosvětově je kolorektální karcinom třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a druhým u žen. Více jak polovina případů se vyskytuje v rozvinutých oblastech světa a to především v Evropě (*Globocan* [cit. 2014-02-05] z: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Co se týče České republiky, jak můžeme vidět na obrázku 1, jsme na předních příčkách, co se týče incidence kolorektálního karcinomu.



Obr. 1 Srovnání incidence v České republice s ostatními zeměmi světa (*Globocan* [cit. 2014-02-05] z: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

Incidence v České republice neustále stoupá. Oproti tomu mortalita po období stagnace klesá. Větší výskyt KRK je u mužů než u žen. Po věkovém období 45 – 50 let

se riziko karcinomu mnohonásobně zvětšuje. Nejvyšší procento pacientů se nachází ve věkové skupině 70 – 74 let. Nejvyšší incidence je v krajích Praha, Plzeňském a Jihočeském (SVOD [cit. 2014– 02–08] z: www.svod.cz).



Obr. 2 Časový vývoj incidence a mortality kolorektálního karcinomu v České republice (SVOD [cit. 2014–02–08] z: www.svod.cz)

2.2.2 Definice kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom je podle Národního onkologického registru klasifikován dle anatomické lokalizace, a to jako nádor tračnicku C18 (colon), nádor rektosigmoideální (sigmoideum = esovitá klička spojující tračník a konečník) C19 a nádor konečníku (rectum), který končí análním kanálem C20 (canalis analis) (Sobin a kol. 2004, Holubec a kol. 2004a).

Většina typů KRK vzniká z adenomatózních polypů střevní sliznice či adenomů (výrůstky ze žlázového epitelu). Tyto léze jsou běžné, jen z některých se později vyvine nádor. Prevalence je v Evropě a Spojených státech amerických okolo 35 %, v Asii a Africe o něco menší 10 – 15 %. Adenomy můžeme rozdělit do několika typů podle histologie a to na tubulární, tubulovilózní a vilózní. Právě polypy vilózního typu mají vyšší maligní potenciál kvůli své velikosti (kolem 25 % je větší než 1 cm v průměru) a vysokému stupni epiteliální dysplazie (změna struktury). Odhaduje se, že okolo 5 % adenomatózní polypů se stane maligními, což trvá 5 – 10 let (Midgley a Kerr. 1999).

KRK vzniká jako důsledek postupného hromadění genetických a epigenetických změn, které řídí vývoj normálních epiteliálních buněk tlustého střeva a konečníku do

buněk adenokarcinomu. Tento proces trvá několik let a zahrnuje souběžně histologické a molekulární změny. Je to vícestupňový proces, který je v současné době charakterizován na molekulární úrovni a základem je genomová nestabilita přítomna v nádoru. V pozadí genomové nestability se nahromadí genetické a epigenetické změny, které spolupracují a řídí iniciaci a progresi KRK (Fearon a kol. 1990, Lengauer a kol. 1998, Kinzler a Vogelstein 1996).

2.2.3 Klasifikace

Existuje několik typů klasifikace KRK. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) rozděluje nádory na základě anatomické polohy. Většina klasifikací se ale zaměřuje na to, v jakém stádium (staging) je nádor nalezen a zda se už objevily metastázy. Nejstarší klasifikace dle stádia je Dukesova klasifikace, která označuje stádia nádoru A – D. Z této klasifikace vychází Astlerova – Kollerova klasifikace. Nejvíce se však využívá TNM klasifikace, která udává mnohem přesnější popis stádia nádoru. Základem jsou tři charakteristiky stádia a to T – velikost nádoru, N – rozsah postižení lymfatických uzlin a M – přítomnost vzdálených metastáz (Holubec a kol. 2004b).

Tab. 1 Srovnání TNM a Dukesovy klasifikace dle UICC (Sobin a kol. 2002)

| <i>UICC stádium</i> | <i>TNM klasifikace</i> | | | <i>Dukes</i> |
|---------------------|------------------------|------|----|--------------|
| 0 | Tis | N0 | M0 | |
| I | T1 | N0 | M0 | A |
| | T2 | N0 | M0 | |
| II | T3 | N0 | M0 | B |
| | T4 | N0 | M0 | |
| III | Tx | N1-3 | M0 | C |
| IV | Tx | Nx | M1 | D |

2.2.4 Rizikové faktory vzniku nádoru

Rizikové faktory jsou škodlivé vlivy, které mohou větší nebo menší mírou přispět ke vzniku nádorového onemocnění. KRK je typ nádorového onemocnění, kde je podíl vlivu rizikových faktorů velký. Některé ovlivnit nemůžeme (např. věk), ale některé můžeme samy ovlivnit.

- Věk, pohlaví a genetické vlivy

Tyto faktory patří do kategorie, které se nedají ovlivnit. Bohužel je řadíme mezi ty, které nejvíce zasahují do mechanismu kancerogeneze. Právě na základě vyššího věku se riziko nádorového onemocnění zvyšuje, jelikož se nám v těle nakumulovalo více mutací, které jsou předpokladem ke vzniku nádoru. Genetika hraje pravděpodobně nejvýznamnější roli pro vznik KRK. Některé genetické vady jsou dokonce 100 % faktorem pro jeho vývoj, např. familiární adenomatózní polypóza (Butterworth a kol. 2006, Fleshner a kol. 2001).

- Životní styl a stravování

Mezi tyto faktory patří alkohol a kouření, které jsou velmi škodlivé, protože podněcují mutace zdravých genů na onkogeny. V tabákovém kouří je vysoké množství karcinogenů. Dalším rizikem je vysoký BMI (body mass index), tzn. vyšší než 30. Vysoký BMI bývá spojován se zvýšeným příjmem kalorických jídel, červeného masa a uzenin, což jsou další škodlivé vlivy. Oproti tomu konzumace potravin s vysokým obsahem vlákniny (ovoce, zelenina, celozrnné pečivo, luštěniny), které napomáhají očistě střeva a jeho správné funkci, může příznivě ovlivnit vznik nádorového onemocnění. K vysokému BMI také přispívá sedavý způsob života, naopak fyzická aktivita je příznivým faktorem omezujícím riziko vzniku nádoru (Huxley a kol. 2009).

2.2.5 Prevence a screening

- Prevence

Prevence je základem úspěchu u jakéhokoliv onemocnění, a pokud se jedná o život ohrožující, tak je důležité se jí zabývat. Její stěžejní úkol je včasná diagnostika a v lepším případě předejití vzniku onemocnění. To pak umožňuje zlepšit prognózu a zamezit velmi těžkým komplikacím. Primární prevence se skládá z pravidelných preventivních prohlídek obecného charakteru a dodržování určitých stravovacích návyků a životního stylu s cílem vyvarovat se rizikovým faktorům (viz výše). Avšak mnohem větší důraz je kladen na sekundární prevenci. Jelikož nádorové onemocnění vzniká na základě genetických změn, je velmi těžké se jim nějak vyhnout. A tak druhá možnost, jak předejít vzniku a komplikacím je informovanost o tomto onemocnění. Zde hraje důležitou roli slovo lékaře a farmaceuta, který by měl pacientovi sdělit, zda spadá do rizikové skupiny a poučit o varovných symptomech. Na jejich základě se pacient dostaví k lékaři (Fait a kol. 2011a, Fait a kol. 2011b).

Varovné symptomy:

- Lokální: trvalé bolesti břicha či střevní disbalance, křeče v oblasti břicha, krev ve stolici, dlouhodobý průjem či zácpa
- Systémové: únava, hubnutí, nechutenství, zvracení, celkový zhoršený stav organismu

(Falterman a kol. 1974, Cappell a kol. 1992)

- Screening

Screening je aktivní vyhledávání jednotlivců nebo populace, která ještě netrpí daným onemocněním, pomocí testů a diagnostických metod. Hledané jednotky jsou v možném riziku vzniku daného onemocnění a jeho vznik je u nich pravděpodobný. A proto je důležité rozpoznat, zda u nich už onemocnění vzniklo nebo ne a nadále je monitorovat (Morrisson 1992).

Světová zdravotnická organizace stanovila určité podmínky pro zavedení screeningu KRK. Přispívá k časně diagnóze, která zvyšuje pětileté přežití. Tři randomizované studie prokázaly snížení mortality o 16 – 33 % u pacientů, kteří byli zařazení do tohoto programu. V České republice byl tento program zahájen v roce 2000. Přínos je pozvolný, ale znatelný protože se počet vyšetřených pacientů zvyšuje. V roce 2014 bylo zavedeno adresné zvaní pacientů, kteří v tomto roce dosáhli rizikového věku 50 let. Existuje několik screeningových metod (Seifert 2012)

1. Laboratorní metody: Test na okultní krvácení do stolice, Test DNA ve stolici
2. Zobrazovací metody: Kolonoskopie, Sigmoidoskopie, Irigografie, Virtuální kolonografie, Kapslová endoskopie (ve stádiu testování)

Základem screeningu jsou testy na okultní krvácení do stolice (TOKS). Jeden z nich je imunochemický test, který je založen na reakci hemoglobinu s protilátkou v testu. Jeho výsledek neovlivňuje potrava, je mnohem specifičtější než guajakový test, ale dokáže identifikovat patologické změny pouze v dolní části trávicího traktu (Ko a kol. 2003).

Mnohem používanější je guajakový test. Principem je reakce guajakové pryskyřice a hemoglobinu s pseudoperoxidázovou aktivitou. Je – li patologické množství krve přítomno ve stolici, test se po 30 sekundách zbarví do modra. Jeho výhodami jsou minimální nákladnost, jednoduchost, neinvazivita a bezpečnost. Na druhé straně test poskytuje mnoho falešně pozitivních a falešně negativních výsledků

(Macrae a kol. 1982). Ne všechny polypy totiž krvácejí a výsledky testu ovlivňuje také složení stravy či některé léky, například dlouhodobé užívání nesteroidních antiflogistik (Simon 1998).

V současné době je postup takový, že se každé dva roky provádí TOKS v 1 – 2 letém intervalu, pokud je test pozitivní, tak následuje kolonoskopické vyšetření. Ta se provádí buď jednou za život, nebo v intervalu 10 let (Seifert 2012).

2.2.6 Etiologie

Kolorektální karcinom je nejlépe prostudovaný komplex dějů, co se týče molekulární genetiky. Na základě studia dědičných forem se podařilo zjistit, jakými mechanismy vzniká i sporadická forma KRK. Hlavní roli hraje genetika. Mutace jsou zde přítomny jako dědičné zárodečné vady nebo vznikají v somatických buňkách na základě vlivů okolního prostředí. Nejvýznamnějšími dědičnými syndromy v oblasti KRK jsou Familiární adenomatózní polypóza (FAP = Familial adenomatous polyposis) a Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC = Hereditary non – polyposis colorectal cancer). Jsou zde i další syndromy, které nejsou tak četné a zbylé případy KRK se etiologicky řadí do sporadické formy KRK (Midgley a Kerr 1999).

2.2.6.1. Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantní dědičný syndrom, který je charakterizován výskytem stovek až tisíců adenomatózních polypů. Ty se tvoří už během puberty, a pokud nejsou odstraněny, je vysoce pravděpodobné, že se z nich vyvine nádor do 40. roku života. FAP tvoří méně než 1 % z celkového počtu KRK. Příčinou je zárodečná mutace *APC* (adenomatous polyposis coli) genu (OMIM: 611731), který je lokalizovaný na chromozomu 5q, a ta podporuje vznik velkého množství polypů po celém povrchu epitelu tlustého střeva. Jeho funkcí je regulovat růst buněk a zabezpečovat buněčnou smrt v epitelu tlustého střeva (Grodén a kol. 1991, Kinzler a kol. 1991, Kinzler a Vogelstein 1996). Mimo jiné je s FAP spojen výskyt nádoru mimo tlusté střevo jako jsou osteomy, nádory nadledvin, jater a štítné žlázy. Jedním z podtypů FAP je Turcotův syndrom, pro který je charakteristický výskyt KRK s nádory mozku (Burt 2003, Hamilton a kol. 1995). Další formou FAP je tzv. atenuovaná FAP, která je slabší formou syndromu. Je způsobena mutací na 5'konci nebo 3'konci *APC* genu a projevuje se pouze 10 – 100 adenomatózními polypy (Knudsen a kol. 2003, Heppner a kol. 2002).

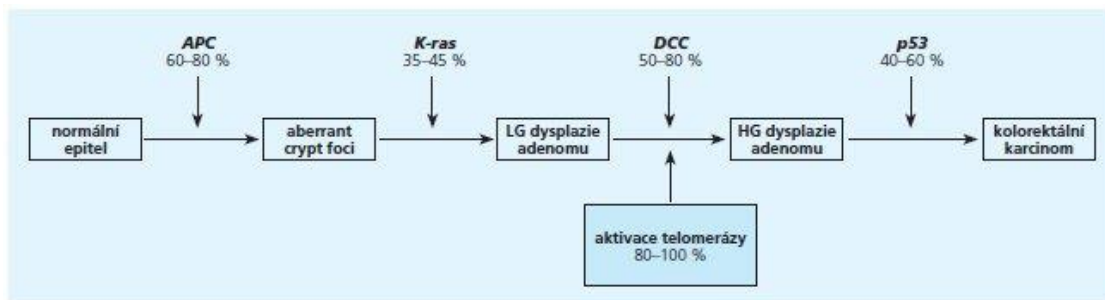
2.2.6.2. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

HNPCC je autozomálně dominantní syndrom KRK, kterému chybí velké množství polypů jako je u FAP. Tvoří 6 % z celkových forem KRK. Je klasifikován na dva typy, a to Lynchův syndrom I, kde jsou nádorové buňky přítomny pouze ve střevě a Lynchův syndrom II, kde se ke KRK přidají další typy nádorů jako nádor endometria, vaječníků, žaludku a hepatobiliárního traktu. Pro diagnostiku tohoto onemocnění jsou definovaná tzv. Amsterodamská kritéria (Midgley a Kerr 1999). Je to nepolypózní forma a projevuje se v relativně nízkém věku (před 50. rokem života), je zde typická zvýšená frekvence špatně diferencovaných mucinózních nádorů s vysokým sklonem k invazivitě (Vasen a kol. 1991). Je způsobena mutací jednoho z mismatch repair genů human Mut S Homolog: *hMSH6* (OMIM: 600678), *hMLH3* (OMIM: 604395), *hPMS1* (OMIM: 600258), *hPMS2* (OMIM: 600259), nejčastěji *hMSH2* (OMIM: 609309) a *hMLH1* (OMIM: 120436), které se vyskytují na několika chromozomech. Rozpoznávají chyby v nukleotidech odpovídající komplementárnímu chromozomovému vláknu a zahajují vyřazení chybného vlákna. Buňky s mutovaným genem nemohou opravovat chyby v DNA, daná mutace se postupně hromadí a replikuje se DNA s chybou. To způsobuje genetickou hypermutabilitu a chaos. Tento jev se označuje jako mikrosatelitová nestabilita a je snadno detekovatelná (Ivanovich a kol. 1999, Robbins a Itzkowitz 2002, Chung a Rustgi 1995). Mutace se dále akumulují v onkogenech a tumor-supresorových genech, což může vést ke KRK.

2.2.6.3. Sporadická forma

Nejen předchozí syndromy, ale i sporadická forma KRK je způsobena kaskádou genetických mutací, což vede k deregulaci replikace DNA a zrychlení proliferace kolonocytů (epitelová buňka sliznice tlustého střeva). Progresivní akumulace více genetických mutací vyústí v přechod normálních buněk sliznice na benigní adenomy a může vést až k dysplazii nádoru. K tvorbě KRK přispívají z 15 % mutace mismatch repair genů a z 80 % mutace *APC* genu (Suraweera a kol. 2002). Mutace *DCC* (deleted in colorectal carcinoma, OMIM: 120470) se také podílí na vzniku KRK, a to na přechodu meziprojektu v pozdní adenom. Tato přeměna bývá podpořena častou delecí alely *DCC* genu (Vogelstein a kol. 1988). Tento gen kóduje adhezivní molekulový receptor pro nervové buňky a za normálních podmínek podporuje buněčnou smrt a nádorové supresory (Cappell 2005). Dalším činitelem je *TP53* gen, jehož normální funkcí je zpomalovat buněčný cyklus, pokud dojde k chybě v DNA je provedena

oprava, a je-li chyba závažná, navodí buněčnou smrt. Ztráta funkce *TP53* genu může podpořit genovou nestabilitu a tím přispět k přeměně adenomu na nádor. U 75 % KRK se nachází mutace *TP53* v nádorových buňkách (Robbins a Itzkowitz 2002, Baker a kol. 1989). Funkcí genu *K-ras* (OMIM: 190070) je kódovat protein podílející se na přenosu mitogenních signálů z buněčné membrány do jádra (Slebos a Rodenhuis 1992). Specifická mutace tohoto genu může vyústit v zesílení těchto signálů a zvýšit replikaci kolonocytů, dále pak vede k růstu adenomů a přeměně na KRK (Yashiro a kol. 2001). 50 % KRK má takovou mutaci (Vogelstein a kol. 1988). Kromě genetických změn jsou zde přítomny i epigenetické změny jako je DNA metylace. Methylace DNA v oblasti promotoru může utišit genovou expresi bez DNA mutace (Brenner a kol. 2004). Konkrétně, DNA metylace může deaktivovat supresorové geny, a tím podporovat vznik nádoru (Moyohanen a kol. 1998). Na KRK se podílí také metylace genu *CDKN2A*, která reguluje *p53* dráhu.



Obr. 4. Vícestupňový genetický model kolorektální karcinogeneze. Uvedeny jsou pouze základní genové alterace (upraveno dle^{27, 37}).
 Fig 4 Multistep genetic model for colorectal carcinogenesis. Only basic gene alterations are shown (according to^{27, 37})

Obr. 3 Vícestupňový genetický model kolorektální karcinogeneze (Fearon a Vogelstein 1990, Yan a kol. 1999)

2.2.7 Léčba

Základem léčby nádorových onemocnění je: chirurgické řešení, radioterapie a chemoterapie. Dnes je standardním přístupem kombinace všech složek, která dosahuje nejvýraznějších výsledků. Předoperační radioterapie či chemoterapie je používána tam, kde je cílem zmenšení nádoru, inaktivace nádorových buněk, lepší operabilita a snížení rizika metastáz. Pooperační léčba pak snižuje riziko vzniku recidivy nádoru a prodlužuje dobu přežití. Každá léčba se řídí na základě lokalizace a stádia KRK nádoru (Hawk a kol. 2005). Následující schéma je zpracováno podle Vyzuly a kol. (2013).

Stádium 0

- Chirurgická léčba, adjuvantní chemoterapie není indikována

Stádium I

- Chirurgická léčba, adjuvantní chemoterapie není indikována

Stádium II

- Chirurgická léčba
- Adjuvantní chemoterapie pro střevo a rektum, pro rektum rovněž radioterapie (někdy konkomitantní chemoradioterapie)
- Neoadjuvantní chemoterapie a radioterapie pro rektum

Stádium III

- Chirurgická léčba
- Adjuvantní chemoterapie pro colon a rektum, pro rektum + radioterapie
- Neoadjuvantní chemoterapie + radioterapie pro rektum

Stádium IV + lokálně pokročilé inoperabilní onemocnění

- Systémová paliativní chemoterapie
- Cílená biologická léčba
- Radioterapie

2.2.6.4. Chirurgická léčba

Chirurgická léčba se uplatňuje v oblasti diagnostiky nádoru, profylaktické léčbě, jako je kolektomie u mnohočetných adenomatózních polypů a jako kurativní léčba. Zde je však jasné kritérium, a to nádor, který je přesně ohraničen a chirurgickou léčbou dojde k úplnému odstranění nádorové tkáně (Bland a kol. 1995). Základem kurativní léčby KRK, bez ohledu v jaké je fázi, je chirurgická resekce (operativní odstranění) postiženého střeva s jasnými okraji, spolu s přílehlým mesenteriem a nejméně 12 regionálními lymfatickými uzlinami. Konkrétní postup závisí na anatomickém umístění nádoru, ale většinou se provádí hemikolektomie (odstranění poloviny tlustého střeva). Pro rektální nádory je doporučena celková mezorektální excize (odstranění) společně s 2 cm okolní tkáně nádoru (Hodgson a kol. 2001). Velice nadějná metoda resekce KRK je laparoskopie. Je to neinvazivní zásah, což redukuje výskyt pooperační koliky a

bolestí a kratší dobu k zotavení. Uplatňuje se také při paliativní léčbě (The Clinical Outcomes 2004). Dále se chirurgická léčba rovněž využívá při paliativní terapii, kdy je odstraněn primární nádor. Vede to nejen k usnadnění léčby, protože pro další léčbu se zmenší počet nádorových buněk, ale i k odstranění komplikací a obtíží spojených s nádorovým onemocněním, například obstrukce trávicí trubice či močového měchýře (Pešková 1998).

2.2.6.5. Radioterapie

Dalším léčebným postupem je radioterapie. Principem této metody je ionizující záření různého původu, kterému je pacient vystaven. Může být ozářen celý pacient nebo jen oblast s nádorem. Bezprostředně po ozáření až po dobu 3 měsíců od ozáření se projevuje akutní toxicita radioterapie, které souvisí s poškozením ozářené tkáně a jejího okolí. Nejzávažnějšími projevy jsou mutagenita záření, která se projeví sekundárními malignitami (Leibel a Phillips 1998).

Radiační léčba se aplikuje pro snížení rizika recidivy nádoru. K ozáření se doporučuje přidat infúzi 5 – fluorouracilu jako podpora efektivity. Má uplatnění především u nádorů rekta, zejména jako předoperační radioterapie (Hawk a kol. 2005).

2.2.6.6. Chemoterapie

Chemoterapie je léčba pomocí chemických sloučenin, které se obecně označují jako cytostatika. Mechanismem účinku cytostatik je zásah do dělení buňky a destrukce nádorových buněk. Bohužel ničí i rychle se dělící zdravé buňky kostní dřeně, epitelu trávicí trubice, buňky vlasových folikulů, zárodečné pohlavní buňky a embryonální tkáň. To má za následek různé druhy toxicity a to hematologickou, kdy se snižuje počet buněk vznikajících z krvetvorné tkáně, gastrointestinální, která se může projevit po celé délce trávicí trubice. Nejčastějšími projevy je nauzea a zvracení a průjem či zácpa. Dále u kůže a kožních adnexů. Nejvyšším projevem toxicity je teratogenita, mutagenita a kancerogenní potenciál cytostatik (Hickman a Tritton 1993, Klener 1999, Perry a kol. 1992). Léčbu cytostatiky lze podávat perorálně, pokud je léčivo dostatečně stabilní vůči trávicím enzymům a nedráždí sliznici gastrointestinálního traktu. Mnohem častější způsob podání je parenterální díky 100% biologické dostupnosti, rychlému průniku a přesnému dávkování. Jsou další možná podání například inhalační či subkutánní (Raaf 1994).

Jako základ chemoterapie KRK se už dlouhá léta používá 5 – fluorouracil (5 – FU). Je to proléčivo, které se v buňce přemění na různé metabolity, které inhibují

klíčový enzym syntézy thymidinu, a tím replikaci DNA a transkripci RNA. Podává se spolu s leukovorinem (kyselina foliniová = folinic acid (FA)), což zvyšuje stupeň inhibice thymidilátsyntázy, snižuje koncentraci thymidinu v buňce a navozuje buněčnou smrt. Dalším léčivem u KRK je irinotekan, což je kamtotecinový analog, který inhibuje DNA topoisomerázu I, což vede ke zpomalení replikace a ke zlomům vláken DNA. Oxaliplatina je platinový analog 3. generace patřící mezi alkylační látky. Ty se váží kovalentními vazbami na nukleotidy v DNA a brání oddělení řetězců při replikaci. Kapecitabin je perorální proléčivo 5 – FU. V chemoterapii se využívají cytostatika v monoterapii nebo v kombinaci. Pro neoadjuvantní, adjuvantní či paliativní terapii se používají různé režimy (Midgley a Kerr 1999, Klener a Klener 2013b).

Tab. 2 Přehled kombinací cytostatik používaných v léčbě KRK (Vyzula a kol. 2013)

| REŽIM | CYTOSTATIKUM |
|-------------------|---|
| FU/FA (Mayo) | 5 – FU leukovorin (oba bolus) |
| FU/FA (DeGramont) | 5 – FU – infúze leukovorin- bolus |
| Machover | 5 – FU (infúze 5min) leukovorin |
| FOLFOX | oxaliplatina leukovorin 5 – FU (i. v. infúze) 5 – FU (i. v. bolus) |
| FOLFORI | irinotekan leukovorin 5 – FU |
| AIO | leukovorin (120min infúze) 5 – FU (24h. infúze) |
| XELOX | Kapecitabin oxaliplatina |
| XELIRI | Kapecitabin irinotekan |

| | |
|----------------------------|---|
| FLOX | 5 – FU leukovorin oxaliplatina |
| FOLFOXIRI alias FOLFIRINOX | oxaliplatina irinotekan leukovorin 5 – FU (bolus) 5 – FU (infúze) |

Neoadjuvantní chemoterapie

Neoadjuvantní chemoterapie je předoperační léčba, která hraje velkou roli především u nádorů rekta. Dále se využívá při léčení pacientů s jaterními metastázami (Bosset a kol. 2006, Gruenberger a kol. 2008).

Adjuvantní chemoterapie

Cílem adjuvantní terapie je odstranit veškeré zbylé nádorové buňky po resekci nádoru, a tím zabránit recidivě a vzniku metastáz. Základními cytostatiky jsou zde 5 – FU a leukovorin a jsou doporučena pro II. a III. klinické stádium (Klener a kol. 2002a). Schéma adjuvantní léčby je na obrázek 15 (viz Přílohy).

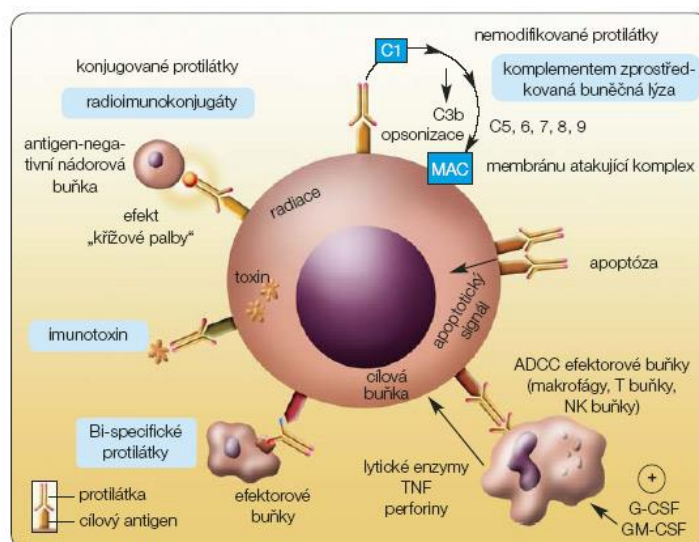
Paliativní chemoterapie

Paliativní léčba je indikována v pokročilých stádiích KRK. Existují dvě možnosti jak postupovat dle toho zda je pacient schopen absolvovat intenzivní léčbu nebo nikoliv. Velice dobré uplatnění zde našla cytostatika z kategorie Cílená léčba. Schémata paliativní léčby v obou případech jsou na obrázcích 16, 17 a 18 (viz Přílohy).

2.2.6.7. Cílená léčba

Cílená léčba se během posledních let stala důležitou součástí léčby KRK. Používané látky lze rozdělit do dvou hlavních skupin – 1/ protilátky proti povrchovým receptorům nádorových buněk, např.: EGFR nebo VEGF a 2/ chemické molekuly, které pronikají dovnitř buněk a blokují funkční domény receptorů a protein kináz.

Uplatňuje se především v paliativní chemoterapii metastatického kolorektálního karcinomu v kombinaci s dalšími cytostatiky. Zde se používají monoklonální protilátky bevacizumab, cetuximab a panitumumab.



Obr. 7 Schéma účinku monoklonálních protilátek

(ADCC = antibody dependent cell-mediated cytotoxicity); C = komplement, G-CSF = granulocyte colony stimulating factor, GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, MAC = membrane attack complex, NK = natural killer, TNF = tumor necrosis factor

Obr. 4 Schéma účinku monoklonálních protilátek (Remedia [cit. 2014–03–24] z: <http://www.remédia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20060516045931.jpg>)

Bevacizumab (léčivo Avastin, B) je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka, která účinkuje proti všem typům vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF – A) (Ferrana a kol. 2004). VEGF reguluje vaskulární proliferaci a permeabilitu v nádorových cévách. Jelikož řečiště nádorů, je velice neuspořádané a má vysokou permeabilitu, dostávají se cytostatika do nádoru ne zcela účinně. Použitím B při terapii se řečiště stabilizuje, a tím mohou cytostatika pronikat do nádoru efektivněji (Jain 2005, Jain 2001, Inai a kol. 2004). B je indikován v 1. linii léčby metastatického KRK, kde byli zjištěny lepší odpovědi pacientů na léčbu, zvýšení mediánu přežití a prodloužení doby do progresu než při léčbě bez B (Hurwitz a kol. 2004). Při použití B v léčbě inoperabilního karcinomu došlo k ústupu nádorové masy, což umožnilo u těchto pacientů použít radikální chirurgickou resekci (Berry a kol. 2007). Jako nejúčinnější se zde ukázala kombinace s oxaliplatinou. B se používá i v 2. linii v kombinaci FOLFOX/B (Giantonio a kol. 2007). B má dobrou toleranci a ovlivnitelnou toxicitu. Nejčastějším nežádoucím účinkem je hypertenze a nejzávažnějšími je proteinurie, krvácení a špatné hojení ran (Hurwitz a kol. 2004).

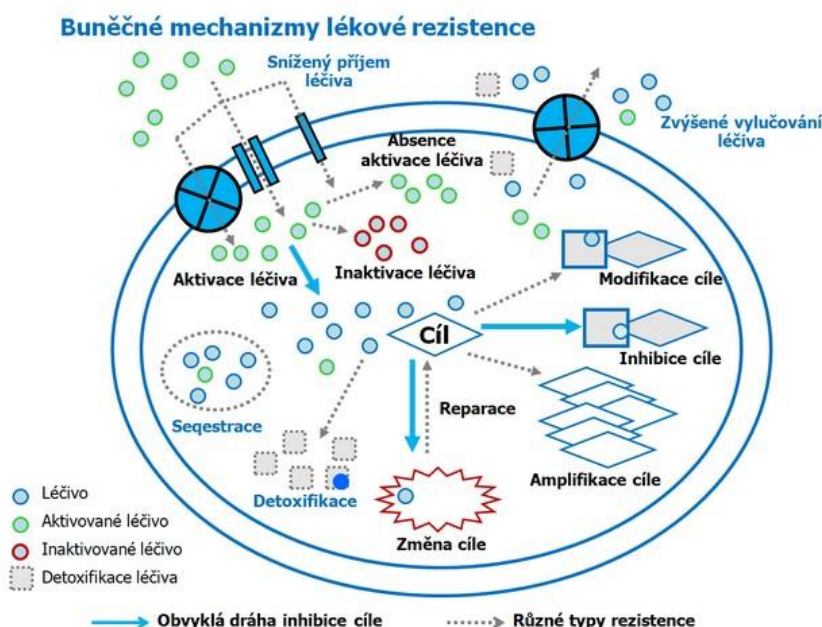
Cetuximab (Ce) je chimérická monoklonální protilátka, která inhibuje receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), a tím inhibuje přenos signálů do jader buněk. Zastavuje tak buněčného dělení, adhezi, diferenciaci, tvorbu nových cév a podporuje

buněčnou smrt (Ullrich a Schlessinger 1990, Ginson a kol. 1999, Lemmon a kol. 1997). Jeho indikací je metastatický KRK jak v 1. linii v kombinaci FOLFIRI/Ce, tak v 2. linii irinotekan/cetuximab pouze u pacientů bez mutace v genu *K – ras*. Zvyšuje odpověď na léčbu, prodlužuje bezpříznakové období a medián přežití, a tím zvyšuje kvalitu života pacientů (Cunningham a kol. 2004, Van Cutsem a kol. 2007).

Panitumumab, je lidská monoklonální protilátka proti EGFR, která rovněž blokuje vazbu na TGF – α a inhibuje také proces fosforylace. Má vyšší afinitu k EGFR než cetuximab a lepší odpověď na léčbu u pacientů (Foon a kol. 2004).

2.3 LÉKOVÁ REZISTENCE

Účinnost chemoterapie je ovlivněna mnoha faktory, z nichž hlavním je rezistence neboli necitlivost na léčbu cytostatiky (Klener a kol. 2002b). Rezistence může být primární, která je dána genetickou výbavou pacienta před léčbou nebo sekundární (získaná), která je indukovaná léčbou (O'Connor 2007). Je to vícestupňový proces a může mít mnoho mechanismů. Ovlivňuje dávku, stabilitu a funkci cytostatik (Mellor a Callaghan 2008). Příčiny lékové rezistence jsou metabolická inaktivace léčiva nebo nedostatečná aktivace pro léčiva, zvýšené vylučování léčiva v nádorových buňkách, snížený příjem léčiva, zvýšená reparace DNA v nádoru a nefungující apoptóza v nádoru (Klener a Klener 2013c).



Obr. 5 Buněčné mechanismy lékové rezistence

(<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/img/obr16-26.jpg> [2014–03–03])

Klíčem ke správné léčbě je dosáhnout odpovídající cílové koncentrace cytostatika v nádorové buňce (Mellor a Callaghan 2008). To nám ale znemožňují efluxní pumpy, které jsou uloženy v membráně nádorové buňky a vypuzují cizorodé látky včetně léčiva z buňky ven. Bylo rozpoznáno mnoho takových pump, jako například OATPs (organic anionic transport proteins). Jednou z nejvýznamnějších rodin transportních proteinů je rodina ABC (ATP-binding cassette) transportérů (Klener a Klener 2013c).

2.4 TRANSPORTNÍ PROTEINY RODINY ABC

Tab. 3 Přehled vlastností proteinů z rodiny ABC transportérů (*Genenames* [cit. 2014–03–03] z: www.genenames.org/genefamilies/ABC, Krus 2013)

| Symbol (používané názvy) | Lokalizace | Délka genu/ Počet AMK | Tkáňová exprese | Biologická funkce |
|--|------------|--------------------------|--------------------------------|---|
| ABCA (ABC1) podrodina | | | | |
| ABCA1(TGD, HDLTD1,CERP) | 9q31 | 6,9 kB 2261 AMK | většina tkání | regulace buněčného cholesterolu a homeostáza fosfolipidů |
| ABCA2 | 9q34 | 8 kB 2435 AMK | mozek, ledviny, plíce, srdce | transport cholesterolu a fosfolipidů, MDR fenotyp |
| ABCA3 (ABC – C) | 16p13.3 | 6,5 kB 1704 AMK | plíce a další tkáně | transport lipidů, účast na produkci surfaktantu |
| ABCA4 (ABCR, RP19, ABC10 FFM, STGD,RIM, RMP) | 1p22 | 7,3 kB 2273 AMK | retina, buňky receptorů | zprostředkování transportu molekul receptoru přes buněčnou membránu fotoreceptoru |
| ABCA5 | 17q24.3 | 6,5 kB 1642 AMK | svaly, srdce, varlata | nejasná úloha v endolysosomálním systému |
| ABCA6 | 17q21 | 5,3 kB 1617 AMK | játra | transport lipidů |
| ABCA7 | 19p13.3 | 6,6 kB 2146 AMK | leukocyty, thymus, kostní dřeň | homeostáza lipidů v buňkách imunitního systému |
| ABCA8 | 17q24 | 5,7 kB 1581 AMK | vaječníky | neznámá |
| ABCA9 | 17q24 | 6 kB 1624 AMK | srdce | transport lipidů |
| ABCA10 | 17q24 | 6,18kB 1543 AMK | svaly, srdce | účast v transportu cholesterolu |
| ABCA12 | 2q34 | 7 kB 2595 AMK | žaludek | součást lamelárních granulí závislých na lipidovém exportu |
| ABCA13 | 7q12.3 | 450 kB 5058 AMK | trachea, varlata, kostní dřeň | neznámá |
| ABCB (MDR/TAP) podrodina | | | | |

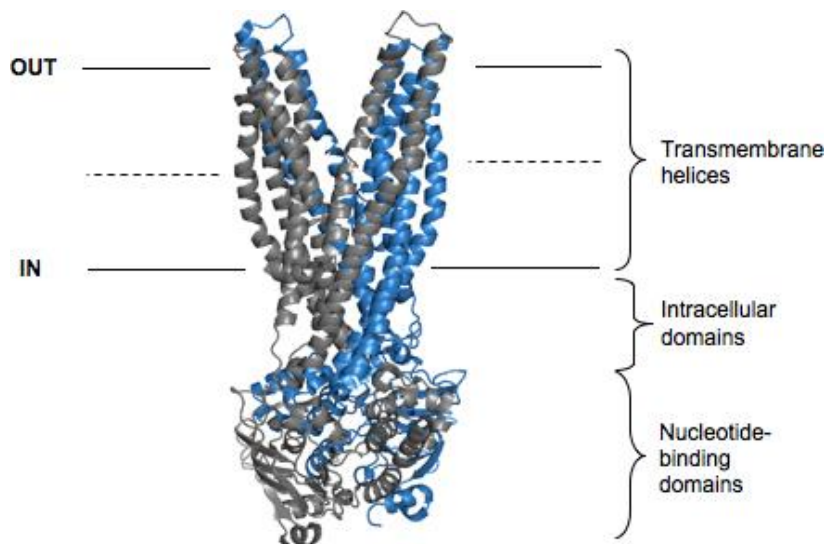
| | | | | |
|---|---------|--------------------|--|---|
| ABCB1 (PGY1, MDR1, P – GP, GP170) | 7q21.12 | 4,5 kB 1280 AMK | většina tkání, především s funkcí bariéry (játra, mozek, ledviny, střeva a placenta) | efluxní pumpa pro řadu xenobiotik, vysoká exprese zodpovědná za rozvoj rezistence vůči cytostatikům |
| ABCB2 (TAP1, PSF1, RING4, APT1, D6S114E) | 6q21.3 | 2,5 kB 808 AMK | většina tkání | transport peptidů |
| ABCB3 (TAP2, PSF2, RING4, APT1, D6S114E) | 6q21.3 | 2,8 kB 686 AMK | většina tkání | transport peptidů |
| ABCB4 (PGY3, MDR2/3, MDR3, PFIC – 3, ABC21) | 7q21 | 4,5 kB 1286 AMK | hepatocyty | biliární sekrece fosfatidylcholinu z hepatocytů |
| ABCB5 | 7q14 | 7,5 kB 812 AMK | všudypřítomný | léková rezistence, účast na regulaci buněčného dělení |
| ABCB6 (ABC14, UMAT, MTABC3) | 2q36 | 2,4 kB 842 AMK | mitochondrie buněk | účast na transportu železa |
| ABCB7 (ATM1P, ASAT) | Xq13.3 | 2,4 kB 752 AMK | mitochondrie buněk | transport hemu z mitochondrií do cytosolu |
| ABCB8 (M – ABC1) | 7q36.1 | 2,4 kB 735 AMK | mitochondrie buněk | transport hemu z mitochondrií do cytosolu a fosfolipidů v buňkách |
| ABCB9 (TAPL) | 12q24 | 3,5 kB 766 AMK | srdce, mozek, lysozomy | neznámá |
| ABCB10 (M – ABC2, MTABC2) | 1q32 | 4,1 kB 738 AMK | mitochondrie buněk | účast na transportu železa |
| ABCB11 (BSEP, SPGP, PFIC2, PGY4, ABC16) | 2q24 | 5,4 kB 1321 AMK | hepatocyty | aktivní transport žlučových solí |
| ABCC (CFTR/MRP) podrodina | | | | |
| ABCC1 (MRP1, MRP, ABCC, GS-X, ABC29) | 16q13.1 | 6,5 kB 1531 AMK | mnoho tkání, zejména plíce, varlata | multispecifický transportér, substráty jsou GSH, LTC ₄ , aflatoxin B1, glukuronidy, sulfátové konjugáty ster. hormonů a žluč. solí, některá léčiva |
| ABCC2 (MRP2, CMOAT) | 10q24 | 5,5 kB 1545 AMK | játra, střeva, ledviny | biliární transport xenobiotik, např. vinblastin |
| ABCC3 (MRP3) | 17q21 | 6,5 kB 1527 AMK | játra, střeva, ledviny | biliární a střevní exkrece organických aniontů |
| ABCC4 (MRP4) | 13q31 | 6,5 kB 1325 AMK | většina tkání | transport cyklických nukleotidů, nukleosidových monofosfátových analogů a prostaglandinů |
| ABCC5 (MRP6) | 3q27 | 6,6 kB 1437 AMK | většina tkání, zejména játra | transport cyklických nukleotidů, nukleosidových |

| | | | | |
|-------------------------------|----------|--------------------|---|---|
| | | | | monofosfátových analogů |
| ABCC6 (MRP6) | 16q13.11 | 6,5 kB 1503 AMK | ledviny, hepatocyty | transport peptidů a GSH konjugátů |
| ABCC7 (CFTR) | 7q31-q32 | 6 kB 1480 AMK | plice, střeva, cholangiocyty | chloridový kanál |
| ABCC8 (SUR1) | 11p15.1 | 5 kB 1581 AMK | slinivka | modulátor draselných kanálů |
| ABCC9 (SUR2) | 12p12.1 | 5 kB 1549 AMK | srdce a kosterní svalstvo, nízké hladiny v ostatních tkáních | modulátor draselných kanálů |
| ABCC10 (MRP7) | 6p12.3 | 5,5 kB 1492 AMK | nízké hladiny ve všech tkáních | transport lipofilních aniontů, MDR |
| ABCC11 (MRP8) | 16q12 | 4,6 kB 1382 AMK | všechny tkáně, hlavně játra a prsní tkáň | transport nukleotidů |
| ABCC12 | 16q12.1 | 5 kB 1359 AMK | nízké hladiny ve všech tkáních | neznámá |
| ABCC13 | 21q11.2 | 1,1 kB 274 AMK | kostní dřev a periferní výskyt | pseudogen – neaktivní |
| ABCD (ALD) podrodina | | | | |
| ABCD1 (ALD, ALDP) | Xq28 | 2,8 kB 745 AMK | peroxisomy | peroxisomální transport mastných kyselin |
| ABCD2 (ALDL1, ALDR) | 12q12 | 3,5 kB 740 AMK | peroxisomy | peroxisomální transport mastných kyselin |
| ABCD3 (PXMP1, PMP70) | 1p21.3 | 3,3 kB 659 AMK | peroxisomy | peroxisomální transport mastných kyselin |
| ABCD4 (PXMP1L, P70R) | 14q24 | 2,9 kB 606 AMK | peroxisomy | peroxisomální transport mastných kyselin |
| ABCE (OABP) podrodina | | | | |
| ABCE1 (RNASEL1, OABP) | 4q31 | 2,9 kB 599 AMK | vaječníky, varlata | recyklace ribozomů |
| ABCF (GCN20) podrodina | | | | |
| ABCF1 (ABC50) | 6p21.33 | 3,14 kB 845 AMK | všechny tkáně | úloha ve zvýšení proteosyntézy při zánětlivých procesech |
| ABCF2 | 7q36.1 | 2,2 kB 623 AMK | všechny tkáně | neznámá |
| ABCF3 | 3q27.1 | 2,8 kB 709 AMK | všechny tkáně | neznámá |
| ABCG (White) podrodina | | | | |
| ABCG1 (ABC8, White) | 21q22.3 | 2,7 kB 678 AMK | mozek, plíce | transport cholesterolu |

| | | | | |
|-----------------------------|--------|-------------------|--------------------------------|--|
| ABCG2 (BCRP1, MXR, ABCP) | 4q22.1 | 2,4 kB 655 AMK | placenta, srdce, játra, střevo | transport xenobiotik, steroidů, organických aniontů, úloha v rozvoji resistance vůči mitoxantronu a anthracyklinům |
| ABCG4 (White 2) | 11q23 | 3,5 kB 646 AMK | makrofágy, mozek, oko | neznámá |
| ABCG5 (White, Sterolin 1) | 2p21 | 2,3 kB 651 AMK | játra, tenké střevo | transport sterolů |
| ABCG8 (White 4, Sterolin 2) | 2p21 | 2 kB 673 AMK | játra, tenké střevo | transport sterolů |

ATP-binding cassette (ABC) geny hrají hlavní roli v MDR, řada z nich je spojována s transportem cytostatik, také je to nejpočetnější rodina transmembránových proteinů (Borst a kol. 2000, Dean 2002, Gottesman a kol. 2002). Existuje více jak 100 ABC transportérů nacházejících se v organismech prokaryotických až po člověka. V lidských buňkách je přítomno 48 ABC genů, z nichž 14 souvisí s rozvojem genetických chorob. V posledních letech se počet těchto nemocí zvyšuje. A to například cystická fibróza, která je spojena s defektem CFTR/ABCC7 (Dean a kol. 2001a, Efferth 2001). ABC geny se exprimují ve zdravé i nádorové tkáni, účastní se vstřebávání a vylučování iontů, cukrů, aminokyselin, vitamínů, tuků, antibiotik a léčiv a větších molekul např. oligosacharidů a oligopeptidů. Některé ABC transportéry fungují jako hydrofobní čistič, vyhánějící nepolární sloučeniny z buněčné membrány ven, a jsou poháněny energií z hydrolýzy ATP (Sgarom a kol. 2001, Higgins 1992). Kromě transportních funkcí se účastní mnoho dalších důležitých procesů. Tím je třeba prezentace antigenu, příjem živin či sekrece molekul.

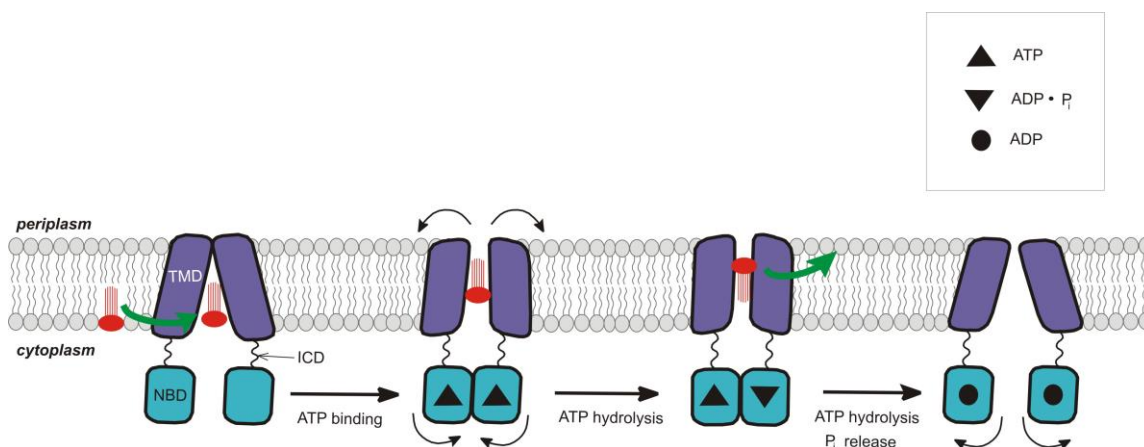
Základní strukturální jednotky ABC tvoří 2 hydrofobní transmembránové domény (TMDs) a 2 hydrofilní nukleotid vázající domény (NBDs). TMDs jsou umístěny v buněčné membráně a NBDs jsou k nim připevněny a vyčnívají do cytoplasmy. TMDs tvoří kanál pro průchod substrátů. Motorem ABC transportérů jsou NBDs, na které se váže a hydrolyzuje ATP, které se skládají ze dvou domén, RecA – like a spirálové domény, které jsou specifická pro každý typ ABC transportéru. V monomeru NBD je ATP – vazebné místo tvořeno dvěma konzervovanými sekvencemi (Walker A a Walker B motifs), které jsou přítomny v řadě ATP – vazebných proteinů. Mohou obsahovat i přídavné domény, například extracytoplasmatická doména (Biemans – Oldehinkel a kol. 2006).



Obr. 6 Struktura ABC transportéru

(http://www.phar.cam.ac.uk/research/vanveen/rikpics/hwv_fig2.jpg [cit. 2014–03–04])

ABC transportér je aktivní efluxní pumpa, která váže substrát na vnitřní stranu plazmatické membrány. Dále se na ABC naváže i ATP, které je motorem celého přenosu. Vazba ATP způsobí nejprve konformační změny v NBDs, které spolu utvoří dimer, následně způsobí konformační změny i v TMDs. Substrátový kanál se poté otevře směrem na vnější stranu plazmatické membrány a vypustí substrát ven z buňky. Aby tyto konformační změny mohli proběhnout, je třeba, aby došlo k hydrolýze ATP, která uvolňuje dostatečnou energii, pro tento proces. Po rozštěpení ATP na ADP a P_i a jejich odpojení z transportéru, dojde ke konformačním změnám do původního stavu pumpy, která je znovu připravena k dalšímu přenosu. (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/4/41/Abc_exporter.jpg [2014–03–04])



Obr. 7 Mechanismus transportu ABC transportéru

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/4/41/Abc_exporter.jpg [cit. 2014–03–04])

2.4.1 ABCA podrodina

Jako první byly objeveny Abca1 a Abca2 v myších buňkách. Dnes už je známo 12 lidských ABC – A transportérů. Selektivně se exprimují v retině, ale vyskytují se v mnoha dalších tkáních. Vyvinuly se z jednoho prapůvodního genu, ale dnes jsou rozesety po celém genomu. Jsou spojovány s mnoha monogeními chorobami. Jejich strukturní specifita je dána přítomností regulační domény, podobné R doméně v ABCC7/CFTR. Je rozdělena na dvě poloviny hydrofóbním segmentem HH1 mezi TMD5 a TMD6 (Dean a Annilo 2005, Broccarso a kol. 1999, Luciani a kol. 1994).

ABCA1 se podílí na syndromu deficiencie HDL a na vývoji aterosklerotických lézí. Ovlivňuje homeostázu tuků, nachází se v makrofázích, Golgiho aparátu a lysozomech (Langmann a kol. 1999, Brousseau a kol. 2001, Lutucuta a kol. 2001). ABCA3 se nachází v lamelárních těliscích, které jsou umístěny v pneumocytech a podílejí se na transportu stavebních kamenů pro plicní surfaktant. Na základě jeho defektu umírá řada dětí v důsledku deficitu surfaktantu, kvůli nedostatečné funkci plic a z toho plynoucím nedostatkem kyslíku (Yamano a kol. 2001, Veldhuizen a Possmayer 2004). ABCA4 se nachází ve fotoreceptorech retiny a jeho defekt způsobuje degeneraci retiny ve velmi nízkém věku. Zvyšuje totiž koncentraci toxických produktů metabolismu retinoidů, které ničí fotoreceptory (Sun a kol. 1999, Meta a kol. 2000). ABCA12 se podílí na poruchách keratinizace. Projevem je kongenitální lamelární ichtyóza a její nejčastější forma je Harlequin, která se projevuje velice tenkou vrstvou pokožky u plodu, která po porodu nedokáže dostatečně zabezpečit své funkce klasické kůže (Parmntier a kol. 1999, Kelsell a kol. 2005). ABCA2 se nachází v krevních leukocytech, účastní se lipidového metabolismu v buňkách imunitního systému a nervového systému (Vulevic a kol. 2001, Ile a kol. 2004). A6 – like ABC transportéry (ABCA5, A6, A8, A9, A10) se nacházejí na stejném chromozomu 17 q a uplatňují se v transportu lipidů (Kaminski a kol. 2001, Wenzel a kol. 2003). ABCA7 se účastní transportu cholesterolu a spolu s exonem *HA – 1* (OMIM: 601155) genu, který se podílí na prezentaci tělu nevlastních antigenů imunitního systému, např. při darování orgánů, hrají roli v autoimunitních chorobách a chronickém zánětu (Kaminski a kol. 2000, Harangi a kol. 2005).

2.4.2 ABCB podrodina

ABC – B transportéry jsou označovány jako MDR (mutli – drug resistance), jelikož u ABCB1 byla jako první objevena souvislost s rezistencí léčiv. Tato skupina

má 11 transportérů z toho 4 mají obecnou strukturu celého transportéru a ostatní jsou poloviční dimery. Tento jev se vyskytuje pouze u ABC – B (Dean a kol. 2001b). ABCB1 (MDR1/P – GP) je první objevený ABC transportér. Vyskytuje se zejména ve střevních buňkách, v hematoencefalické bariéře a játrech (Di Pietro a kol. 1999). Účastní se transportu mnoha endogenních molekul a také mnoha léčiv např. paklitaxelu, kolchicinu, vinblastinu, digitoxinu, doxorubicinu, verapamilu, loperamidu atd. (Fromm 2002) Jeho defekt ovlivňuje nejen biologickou dostupnost uvedených léčiv (Choi 2005). Je složen z 12 TMDs a 2 NBDs, které spojují TMDs (Hyde a kol. 1990). ABCB4 a ABCB11 se účastní na sekreci fosfatidylcholinu a žlučových solí. Jejich defekt zapříčiňuje vznik familiární intrahepatitické cholestázy a selhání jater u dětí (Van Helvoort a kol. 1996, Alonso a kol. 1994). ABCB2 a ABCB3 spolu vytváří heterodimery, které se účastní transportu peptidů do endoplazmatického retikula. Jejich defekt přispívá k potlačení imunitního systému v zásadní části imunitního procesu rozpoznávání (Momburg a kol. 1994). Další transportéry jsou také poloviční dimery. ABCB9 se nachází na lysozomech. ABCB6, ABCB7, ABCB8 a ABCB10 se nachází v mitochondriích. ABCB7 je lokalizován na X – chromozomu a jeho mutace zapříčiňuje vznik X-linked sideroblastické anémie a ataxie (Allikmets a kol. 1999). ABCB9 se podílí na homeostáze železa a vzniku proteinů Fe/S v cytosolu (Kipsal a kol. 1997).

2.4.3 ABCC podrodina

ABC – C podrodina obsahuje 12 klasicky strukturálně tvořených transportérů. Účastní se transportu iontů, vylučování toxinů a přenosu signálů. Jedním z významných transportérů je ABCC7(CFTR), jehož defekt vede ke vzniku cystické fibrózy. Je to cAMP – regulovaný chloridový kanál (Quinton 1999). Jeho funkcí je, čistit buňky od bakteriálních patogenů. Pokud nefunguje, způsobuje neadekvátní sekreci pankreatických enzymů, což způsobuje nutriční deficit, bakteriální infekci plic a obstrukci chánovodů, což vede k mužské neplodnosti (Dean a kol. 1990, Cohn a kol. 1998). ABCC8 je spojen s familiární perzistentní hyperinzulinovou hypoglykemií v raném dětství, což je neregulovaná sekrece inzulínu, která vede k hypoglykémii. Tento transportér je také spojen s vysokou afinitou k derivátům sulfonylurey, což jsou léčiva pro diabetes typu II (Thomas a kol. 1995). Další transportéry jsou MRP neboli Multidrug – resistance related protein, které se podílejí na rezistenci mnoha léčiv u různých typů rakovin např. plic, prostaty nebo prsu. ABCC1 je protein přenášející glutathionové konjugáty a také mnohé toxiny a léčiva jako antimetabolity,

anthracykliny, vinca alkaloidy, antiandrogeny. Účastní se transportu leukotrienů C₄ (Robbiani a kol. 2000). ABCC2 a ABCC3 zabezpečují transport dalších organických aniontů v játrech. Mutace ABCC6 způsobuje poruchy pojivové tkáně. Dochází k ukládání zvápenatělých depozit do elastinových vláken v arteriích, pak dochází ke krvácení např. v gastrointestinálním traktu či retině (Le Saux a kol. 2000). ACBC4, ABCC5, ABCC11 a ACBC12 jsou menší než ostatní z důvodu chybějící N – koncové domény. Tento rozdíl však nehraje v transportní funkci žádnou roli – ACBC4 a ABCC5 se podílejí na rezistenci vůči nukleosidovým analogům (Bakos a kol. 2000, Dean a kol. 2001).

2.4.4 ABCD podrodina

Všechny 4 geny se exprimují jako poloviční transportéry na peroxizomech. ABCD1 je odpovědný za X – linked formu adrenoleukodystrofie, což je neurodegenerativní onemocnění a adrenální deficit vznikající v dětství, kvůli hromadění nerozvětvených satureovaných mastných kyselin (Mooser a kol. 1993). Ostatní ABC – D transportéry zasahují do metabolismu mastných kyselin a obecně do lipidového metabolismu buňky. Sdílí s ABCA a ABCG citlivost k jaderným receptorům typu PPAR a RXR (Albet a kol. 1997, Berger a kol. 1999, Pujol a kol. 2000).

2.4.5 ABCE a ABCF podrodina

Tyto podrodiny jsou úzce spojeny s ABC transportéry, ale nemají transportní funkci a neobsahují žádnou TMDs doménu. ABCE1 je známý také jako OABP (oligoadenylate binding protein). Rozeznává oligoadenylát, který je produkován interferonem při virové infekci. Některé viry blokují ABCE1, a tím antivirovou aktivitu organismu. ABCF1 obsahuje pár NBDs a je součástí komplexu ribozomů (Marton a kol. 1997).

2.4.6 ABCG podrodina (White)

Poprvé byly nalezeny tyto transportéry v *Drosophila White*, proto se označují jako White. Existuje 5 lidských ABC – G transportérů, které mají obrácenou orientaci skladebních jednotek než všechny ostatní (Morgan 1910). ABCG1 se nachází v makrofázích a ABCG4 v mozku. ABCG5 a ABCG8 jsou spojeny se sitosterolemií, což je defekt v transportu rostlinných a rybích sterolů ze střeva do jater (Berge a kol. 2001, Lee a kol. 2001). ABCG2 je transportér označovaný jako BCRP (breast cancer resistance protein) a je spojován s MDR u celé řady nádorových onemocnění např.: u

karcinomu prsu a plic. ABCG2 odstraňuje toxiny jako mixantron a mnoho další např. anthracykliny, topotekan, etoposid, paklitaxel atd. z buňky. ABCG2 se vyskytuje v placentě, ale také v kmenových buňkách hematopoetického systému a také v kmenových buňkách nádorových buněk (Allikmets a kol. 1998, Miyake a kol. 1999, Doyle a kol. 1998, Wu a kol. 2011).

2.5 FARMAKOGENOMIKA

2.5.1 Exprese ABC transportérů v normálních a nádorových tkáních

Exprese genů ABC transportérů v normálních tkáních ovlivňuje dostupnost mnoha léčiv včetně cytostatik. Zjistilo se, že tyto geny jsou exprimovány i v nádorových buňkách. Studie se doposud zaměřovaly nejvíce na ABC transportéry ABCB1, ABCC1, ABCC2 a ABCG2 (Szakács a kol 2004).

U nádoru prsu byl potvrzen význam exprese genu ABCG2. U pacientů léčených doxorubicinem byla zjištěna rezistence na základě zvýšené exprese ABCG2. (Natarajan a kol. 2012) U nádoru tlustého střeva a jater se tento gen vyznačuje sníženou expresí v nádorové tkáni oproti kontrolní (Doyle a kol. 1998). ABCB1 hraje roli v léčbě pacientů s nádorem prsu. Ve studii zabývající se neoadjuvantní chemoterapií nádoru prsu a možnou spojitostí s expresí ABCB1, bylo zjištěno, že u pacientů léčených neoadjuvantně vykazovaly vzorky nádorové tkáně zvýšenou expresi než u pacientů bez adjuvantní léčby ($p = 0,0024$). Také byla nalezena významnost mezi expresemi nádorové tkáně ABCB1 pacientek s rakovinou prsu neléčených neoadjuvantně a věkem ($\rho = 0,41$, $p = 0,005$). Ale nebyl nalezen signifikantní vztah mezi zvýšenými hladinami exprese ABCB1 pacientek, které podstoupili neoadjuvantní terapii a DFS ($p = 0,22$) (Kim a kol. 2013). Zvýšená hladina exprese ABCB1 byla nalezena i v nádorech prostaty, kde pacienti s rezistencí na chemoterapii mají zvýšené hladiny ABCB1 až po vystavení chemoterapii (Sánchez a kol. 2009). Zvýšená hladina ABCC1 byla nalezena u mnoha nádorů hematologického původu, dále u solidních nádorů např. plic, prostaty, prsu i tlustého střeva (Bakos a kol. 2006). Právě u nádoru prostaty byla potvrzena souvislost zvýšených hladin ABCC1 s rezistencí po chemoterapii (Sánchez a kol. 2009). Pro nádor tlustého střeva a konečníku jsou také publikovány studie o vlivu exprese ABCC2, kde byla nalezena signifikantní korelace exprese nádorové mRNA ABCC2 s odpovědí na léčbu cisplatinou ($p < 0,05$) (Hinoshita a kol. 2000). Ve studii byly sledovány hladiny exprese genů ABC transportérů na tkáních lačnicku zdravých lidí. Výše hladiny exprese byla nalezena v tomto sledu: $ABCC2 > ABCB1 \approx ABCC3 >$

ABCC5 a ABCC1 > ABCC4 (Taipalensuu a kol. 2001). Bylo zjištěno, že ABCC2 je regulován pomocí hormonů. Po podání ethynylestradiolu krysám významně klesla hladina exprese Abcc2 v játrech ($p < 0,05$). Také bylo potvrzeno, že pokud exprese ABCC2 pacientek s rakovinou vaječníků nebyla výrazně zvýšená, tyto pacientky vykazovaly nižší riziko progresu nádoru a delší dobu přežití bez progresu (Lage 2008).

Existuje řada in vitro studií, v nichž byly studovány podrobněji i další ABC transportéry z hlediska rezistence na chemoterapii. Studie Tetsuyy a kol. (2008) potvrdila ABCC10 jako prediktivní marker pro rezistenci paklitaxelu v léčbě nemalobuněčného nádoru plic (NSCLC – non-small cell lung cancer). Byla zde nalezena signifikantní korelace mezi hladinou exprese ABCC10 a citlivostí nádorových buněk na léčbu paklitaxelem ($p < 0,05$). Klony buněk NSCLC (SK – LC6/VNB a H23/VNB) rezistentních na vinorelbin, které byly vystaveny inhibitoru ABCC10 (sulfinpyrazon) před chemoterapií, vykazovali vyšší odpověď na léčbu vinorelbinem (Tetsuya a kol. 2008).

Studie Zhanga a kol. (2012) zjistila u nádoru slinivky zvýšenou expresi ABCC4. Zde se podařilo nalézt souvislost s buněčným růstem a mírou exprese ABCC4. Nádorové buňky pankreatu byly infikovány lentivirem a byl u nich pozorován snížený růst než u kontrolních buněk bez lentiviru in vitro. Přítomnost lentiviru vedla ke zpomalení G1 fáze buněčného cyklu a tím k inhibici buněčného růstu nádorových buněk in vitro. Tuto skutečnost je možné využít jako nadějný cíl pro genovou terapii karcinomu slinivky, kdy při snížení exprese ABCC4 by mohlo dojít ke zlepšení odpovědi na léčbu u pacientů s nádorem slinivky (Zhang a kol. 2012).

U nádorů vaječníku byla potvrzena in vitro zvýšená exprese u ABCB1 a ABCB4, která limituje léčbu v souvislosti s rezistencí. Ve studii Duana a kol. (2004) byla zkoušena siRNA (small interfering RNA), což je dvouvláknová molekula RNA indukující degradaci specifické sekvence homologní jednovláknové RNA. Bylo prokázáno, že paklitaxel – rezistentní buněčné linie (SKOV – 3_{TR} a OVCAR8_{TR}) nádorových buněk vaječníku, do kterých byla vložena siRNA vykazovali sníženou expresi mRNA a proteinů ABCB1 a ABCB4, což by mohlo zlepšit prognózu pacientů s nádorem vaječníku (Duan a kol. 2004).

2.5.2 Genetická variabilita

Genetická variabilita (polymorfismus) je výskyt variant DNA s frekvencí alespoň 1% a vyšší ve sledované populaci (<http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni->

[materily/bc-skripta/kapitola09.pdf](#) [cit. 2014–03–24]). Mezi genetické polymorfismy patří mikrosatelity, makrosatelity a jednobodové nukleotidové polymorfismy SNPs (single nucleotide polymorphisms). Právě SNPs tvoří 90 % genetických změn v lidské populaci. Jsou to bodové mutace, kde dochází k záměně jednoho nukleotidu za jiný. Nejčastější se zaměňuje cytosin za thymin. Tyto změny mohou být příčinou genetického onemocnění nebo se vyskytují v blízkosti místa, které způsobuje dané onemocnění.

Používají se jako biologické markery v diagnostice dědičných onemocnění. SNPs se vyskytují i v genech ABC transportérů, kde mohou být příčinou odlišné odpovědi pacientů na chemoterapii (<http://biol-lf1.duni.cz/ucebnice/farmkogenetik.htm> [cit. 2014–03–24], Efferth a Volm 2005). Nejvíce prozkoumaný je ABCB1, v jehož genu je známo více než 1000 SNPs (Hodges a kol. 2011). V souvislosti s terapií KKRK byli studovány tři SNPs: 1236 (C > T), 2677 (G > A/T) a 3435 (C > T), které hrají roli při léčbě irinotekanem, a to že snižují vylučování irinotekanu a jeho metabolitů ledvinami, což bylo uvedeno ve studii Siy a kol. (2003), kde bylo pozorováno 49 polymorfismů ABCB1 u 149 japonských pacientů. Byla identifikována snížená clearance irinotekanu ($p < 0,05$) (Sia a kol. 2003). V další studii zabývající se polymorfismy ABCB1, která byla provedena na pacientech NSCLC, kterým byly odebrány vzorky krve, byla potvrzena zvýšená efluxní aktivita 2677TT a 3435TT polymorfismů ($p = 0,006$) (Han a kol. 2007).

3 CÍL PRÁCE

Hlavním záměrem studie bylo hledat rozdíly v expresi genů interagujících s výsledkem léčby KRK mezi nádorovými tkáněmi pacientů dobře odpovídajících a tkáněmi pacientů špatně odpovídajících na komplexní terapii KRK. Pro naplnění cíle této práce bylo potřeba izolovat zdravou a nádorovou tkáň a připravit si odpovídající vzorky pro měření genové exprese. Dále byly sledovány exprese genů ABC transportérů vybraných na základě předchozí dizertační práce Krusové (2013), za účelem validace dříve získaných výsledků. Experimentální výsledky byly korelovány s klinickými markery prognózy s úmyslem nalézt marker nebo profil, který pacienty predisponuje k progresi onemocnění. Tento poznatek by mohl optimalizovat léčbu KRK a zlepšit prognózu pacientů. Identifikované kandidátní geny budou dále detailně analyzovány z hlediska mechanismu působení, což přispěje k případnému navržení ověřovací preklinické studie. Práce probíhala v souladu s grantovými projekty IGA 12025 – 4 a NT/14329 – 3.

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Chloroform (Penta, Praha, ČR)

Nuclease – free voda (Top-Bio, Praha ČR)

Isopropanol

Ethanol 70% (Penta, Praha, ČR)

Quant – iTTM Ribogreen® RNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)

RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litva)

Primery přímé a zpětné (Sigma Genosys, Steinheim, Německo)

2x Combi PPP Master Mix (Top – Bio, Praha, ČR)

Boric Acid (Ridel – de Haën, Hannover, Německo)

EDTA (Ridel – de Haën, Hannover, Německo)

Trizma base (Sigma Genosys, Steinheim, Německo)

Agarosa – for routine use (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Phi X174 DNA – HaeIII Digest marker (New England Biolabs, Ipswich, USA)

Ethidium bromid 0,1 ug/ml (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Taqman Pre – Developed Assay Reagents (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Kit Agilent RNA 6000 NanoKit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Taqman PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA)

4.2 Použité přístroje

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

„Biohazard box“ EN 12469 (Schoeller Instruments, Praha, Česká Republika)

Centrifuga Hettich Mikro 200R (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Německo)

Elektroforetický zdroj Owl EC – 105 Compact (Thermo Scientific, Waltham, USA)

GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)

Inkubátor Dry bath incubator (Major science, Saratoga, USA)

Inkubátor Techne DRI – Block (Techne, Staffordshire, Anglie)

Real – Time PCR cycler Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie)
 Sterilizátor Chirana HS 62 A (LABO-MS, Praha, Česká Republika)
 Transluminátor Benchtop 2UV™ (UVP, Upland, USA)
 ViiA™ 7 Real – Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)
 SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA)

4.3 Pacienti

Do této práce bylo zahrnuto 60 pacientů s KRK sledovaných v letech 2008 – 2011, kteří podstoupili komplexní onkochirurgickou léčbu ve Fakultní nemocnici Plzeň. Většina pacientů byla pouze aktivně sledována, po chirurgickém zákroku. Řada vzorků byla bez záznamu o léčbě. Co se týče chemoterapie, byl použit režim De Gramont, FOLFOX 4, kapecitabin (Xeloda) a u jednoho pacienta byla nasazena terapie v kombinaci s bevacizumabem (Avastin). Všichni pacienti poskytli informovaný souhlas s odběrem vzorků do této studie. Byly jim odebrány vzorky zdravé a nádorové tkáně, které byly zpracovány dle metod uvedených v kapitole Metody.

Tab. 4: Klinická data pacientů souboru UICCII

| | |
|-----------------------|-------|
| Počet pacientů | 60 |
| Věk | |
| medián | 70,6 |
| rozsah | 46-86 |
| Pohlaví | |
| žena | 20 |
| muž | 40 |
| T klasifikace | |
| T3 | 56 |
| T4 | 4 |
| N klasifikace | |
| N0 | 60 |
| M klasifikace | |
| M0 | 60 |
| Grading | |
| G1 | 8 |
| G2 | 43 |
| G3 | 6 |
| neuvedeno | 3 |
| Lokalizace | |
| tračník | 42 |
| rektum | 9 |
| CHT režim | |
| radioterapie | 9 |
| chemoterapie | 9 |

| | |
|---------------------------|----|
| konkomitantní AT + CHT | 3 |
| Relaps/Remise | 10 |
| Úmrtí | 7 |

4.4 Metody

Jelikož se zde zachází s citlivým materiálem, který je náchylný na znehodnocení vlastní či jinou DNA/RNA a zejména kontaminaci RNázami, které degradují RNA, tak se po celou dobu pracuje ve sterilních latexových rukavicích a v čistém pracovním oděvu v přísně sterilních podmínkách. Pracovní pomůcky jsou sterilizované ve sterilizátoru – plast při 120°C 5 hodin a kov a sklo při 180°C 2 hodiny.

4.4.1 Příprava tkání na izolaci RNA

Izolace RNA byla prováděna v sterilním laminárním boxu. Byla použita metoda klasického drcení. Pro tuto metodu je charakteristický následující postup. V laminárním boxu jsou připraveny všechny nástroje (viz výše) a laminární box je zapnut 20 minut před drcením z důvodu ustálení vnitřní sterilní cirkulace vzduchu. Pro přípravu tkání na izolaci RNA jsou použity zkumavky Eppendorf (2ml) a popsány následujícími vzorky. Do zkumavek se napipetuje 1 ml Trizolu, což je reagent, který nám dále umožňuje během izolace udržet integritu RNA. A po dobu drcení je uchováván v chladicím stojánku. Nádobí a další potřebné pomůcky, které jsou používány při práci s tkání, jsou předem nachlazeny pomocí dusíku, který je používán i během drcení k uchování tkáně v chladu. Po vyndání vzorků z mrazáku (-80°C) se může začít s izolací. Do třecí misky jsou vzorky po jednom vyndávány z krabice se suchým ledem, v které jsou transportovány z úložného mrazáku a zpět. Vzhled vzorků je zkontrolován a zaznamenán do protokolu. Malá část vzorku je odštěpena a rozdrcena. Vzorek musí být neustále chlazen doplňováním kapalného dusíku do třecí misky. Po úplném rozdrcení se přenesou drť pomocí nachlazeného kopyčka do zkumavky s Trizolem. Směs se zcentrifuguje (10sec) a je uložena na led a dále do mrazáku (-80°C). (převzato z pracovního manuálu pro TRIzol Reagent od Invitrogen).

4.4.2 Izolace RNA

Izolace RNA se provádí v laminárním boxu. Tato izolace byla provedena pomocí fenol/chloroformové extrakce s guanidin-isothiokyanátem pomocí TRIzol Reagent. Před začátkem izolace se uvede do provozu a vychladí centrifuga na 4 °C a ohřívací blok, který se nechá vytemperovat na 60°C. Již připravené vzorky, zamražené

v TRIzol, se rozmrazí a přidá se 200 ul chloroformu, který mi zajistí dvoufázové prostředí. Směs se po zamíchání (Vortex) inkubuje 3 minuty při pokojové teplotě. Takto připravené vzorky se zcentrifugují (15 min, 12000ot/min, 4 °C). Dále jsou připraveny 1,5 ml zkumavky pro daný počet vzorků. Z centrifugy se vzorky opatrně přenesou na stojánek a uloží do lednice. Pracuje se s nimi jednotlivě. Centrifugací se směs rozdělila na tři fáze, a to na vodnou, organickou a mezifázi. Pro náš účel se izoluje RNA, která se nachází v horní, průhledné, vodné fázi. Tato část je přenesena do připravené zkumavky. Tento úkon se musí provádět velice opatrně, protože se nesmí stát, že se nabere i mezifázi, kde jsou pro mě v tuto chvíli nežádoucí a kontaminující části např. DNA. Tyto části se mohou uchovat pro následnou izolaci DNA či vyhodit. K vodné odpipetované části, která obsahuje RNA, se přidá stejný objem isopropanolu a celý objem zkumavky se několikrát zamíchá otáčením a inkubuje 10 min při pokojové teplotě. Dále se provede centrifugace (15 min, 12000ot/min, 4 °C), ze zkumavek se slije isopropanol a promyje se peleta 500ul ledového 70 % etanolu. Dále se provádí centrifugace (5min, 12000ot/min, 4 °C). Odebere se 70% etanol a zbytek se vysuší v bloku při 60 °C cca 15 min. Po úplném vysušení se přidá voda prostá nukleáz. Množství volíme dle velikosti pelety. Promíchá se otáčením a pak inkubuje 15 min v bloku při 60 °C. Dále se vzorek krátce promíchá na vortexu, centrifuguje a rozdělí se na 20 ul alikvoty do 0,2 ml zkumavek a zamrazí (-80 °C).

4.4.3 Stanovení koncentrace RNA

Pro stanovení koncentrace nukleových kyselin, zde konkrétně RNA, se používá fluorometrické měření pomocí barviva RiboGreen na přístroji Infinite 200. Pro provedení měření byl použit kit Quant – iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit, který zahrnuje RiboGreen RNA reagent, 20x TE pufr (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,5 ve vodě ošetřené DEPC (diethyl pyrocarbonate) – nespecifický inhibitor ribonukleáz) a Ribosomal RNA Standard. Před samotným měřením se musí nejdříve připravit roztoky na požadovanou koncentraci a množství měřených vzorků minimálně 4 hodiny předem. 20x TE pufr se naředí smísením koncentrovaného pufru a vody prosté nukleáz (viz. Tabulka). Množství pufru se řídí podle množství měřených vzorků. Do tohoto pufru se přidá RiboGreen, který se musí uchovávat v obalu, který ho chrání před světlem. Přehled těchto roztoků je uveden v tabulce 5.

Tab. 5 Příprava roztoků pro měření koncentrace RNA

| | | | |
|---------------|-------|-------------------------|---------------|
| | 1x TE | Quant – iT RiboGreen | Standardy RNA |
| Ředění | 20x | 200x | 50x |
| Použitá látka | NFW | 1x TE | 1x TE |

Obvyklé ředění roztoku vzorku RNA je 199 ul 1xTE + 1 ul RNA, dle velikosti RNA peletky lze množství RNA upravit velikostí.

Nejdříve se do platíčka rozpipetují standardy RNA dle tabulky 5 pak do každé jamky pro vzorek 90 ul 1x TE pufr a 10 ul roztoku RNA. Vše je v duplikátech. Na konec se přidáno každé jamky 100 ul RiboGreen. Takto hotová destička se nechá třepat ve tmě 5 minut. Pak se vloží do přístroje Infinite 200 a změří se koncentrace RNA. Fluorescence byla měřena při excitaci 480 nm a emisi 520 nm.

Tab. 6 Ředění RNA standardů použité k sestavení kalibrační křivky

| 1x TE (ul) | Standard RNA 2,0 ul/ml (ul) | Koncentrace RNA (ng/ml) |
|------------|-----------------------------|-------------------------|
| 0 | 100 | 1000 |
| 50 | 50 | 500 |
| 90 | 10 | 100 |
| 98 | 2 | 20 |
| 100 | 0 | 0 |

Po naměření hodnot se sestaví graf s kalibrační křivkou, z které se určí stanovené koncentrace metodou lineární regrese. Rovnice, která je dána přímkou je charakterizována vztahem $Y = KX + Q$, kde Y odpovídá hodnotám fluorescence a X je mnou hledaná koncentrace RNA. K a Q jsou hodnoty charakterizující tu danou přímku. Jako kontrolu přesnosti měření se využije hodnota koeficient determinace R^2 . Tento koeficient může být menší nebo roven 1. Čím více se blíží jedné, tím je měření považováno za přesnější a tudíž i věrohodnější.

4.4.4 Ověření kvality a integrity RNA

Pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer bylo stanoveno „RNA integrity number“ (RIN), což je hodnota, která ukazuje stupeň poškození RNA. Na základě této hodnoty se dá posoudit kvalita RNA daného vzorku. Za použití kitu Agilent RNA 6000

Nano kit a této metody, založené na kapilární gelové elektroforéze, se změní hodnota RIN. Tato hodnota je v rozmezí 0 – 10, kde číslo 10 značí nejvyšší kvalitu a je vypočítána na základě poměru signálu ribozomálních podjednotek 28S:18S a úrovně signálu před markerem v 5S oblasti.

4.4.5 Syntéza cDNA

Komplementární DNA byla připravována pomocí reverzní transkripce využitím RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit. V prvním kroku se ke každému vzorku 0,5 ug RNA v 0,2 ml zkumavkách přidá 1 ul směsi náhodných hexamerů (0,2 ug/ul) jako primeru. Tato směs je doplněna vodou prostou nukleáz do objemu 14 ul. Obsah zkumavek se promíchá, zcentrifuguje a inkubuje 5 min. při 70⁰C, aby se denaturovala sekundární struktura RNA. Po zchlazení se ke vzorkům přidá mix skládající se ze 4 ul 5x reakčního pufru, 2 ul 10 nM dNTP a 1 ul inhibitoru ribonukleáz (20 ug/ul). Znovu se směs promíchá, zcentrifuguje a inkubuje 5 min. při pokojové teplotě, která umožní nasednutí primerů. Dále se odeberou 2 ul jako negativní kontrola, pro posouzení kontaminace genomovou DNA. Kromě těchto kontrol pro každý vzorek, se vytvoří i kontrola bez RNA, pro zjištění možné kontaminace reakčních činidel. Po ochlazení se přidá do směsi (kromě negativní kontroly) 1 ul reverzní transkriptázy (200 ug/ul). Vzorky se inkubují 10 min. při pokojové teplotě a dále 60 min. při 42^o C v termobloku, kde probíhá samotná reverzní transkripce. Celý proces je ukončen inkubací 10 min. při 70^o C v termobloku degradací transkriptázy. Po ukončení experimentu se vzorky ochladí, zcentrifugují a uloží do mrazáku (-20^o C).

4.4.6 Ověření kvality cDNA

Pro zjištění kvality daných vzorků se použije metoda, založená na amplifikaci fragmentu kontrolního genu ubiquitin C pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce). K 0,5 ul cDNA se přidá směs komponentů o složení 4,7 ul vody prosté nukleáz, 0,4 ul 10 nM přímého primeru, 0,4 ul 10 nM zpětného primeru (sekvence popsány v publikaci Souček a kol. 2005) a 5,0 ul Combi PPP Master mixu. Pro zjištění případné kontaminace se přidá ještě do jedné zkumavky pouze připravená směs bez cDNA, tzv. negativní kontrola, a k vzorkům s cDNA se přidají negativní kontroly vyrobené v předchozím kroku (syntéza cDNA). Reakční směs má objem 10 ul (0,5 ul cDNA + 9,5 ul připravená směs). PCR probíhá v termocykleru, který dokáže střídat rychle teploty během jednoho cyklu. Tato reakce běží dle následujícího programu:

94° C – 5min (počáteční denaturace DNA)//38 cyklů: 94° C – 30s (rozvolnění cDNA)/ 64° C – 30s (nasednutí primerů)/ 72° C – 30s (prodlužování řetězců)// 72° C – 5min (polymeráza dosyntetizuje fragment DNA)// 8° C (udržování teploty, při které vzorky nejsou poškozeny, dokud se nezanalyzují). Produkty PCR se nanosí na 3% agarózový gel, který je v elektroforetické lázni v TE pufru a kde proběhne elektroforéza při 100V, dokud vzorky nedomigrují na konec gelu. Gelová elektroforéza je separační metoda, díky ní můžeme oddělit nukleové kyseliny a proteiny. Principem je pohyb iontů od kladného k zápornému pólu. V tomto případě separujeme záporně nabitou DNA. Jako marker je použit 10 ul Phi X174 DNA – HaeIII digest, dle kterého můžeme určit velikost dělených částic. Aby se vzorky detekovaly, obarví se gel v lázni, skládající se z ředěného ethidium bromidu, cca 10 min. Po obarvení je gel nasvícen UV zářením, které detekuje ethidium bromid navázaný mezi vlákny DNA, pomocí transluminátoru a vyfocen fotoaparátem KODAK DC290 Zoom Digital Camera. Pokud se produkty PCR zastavili ve stejné vzdálenosti jako marker, což je 190 bp (párů bází), považujeme syntézu cDNA za úspěšnou. Objeví-li se na gelu proužek jiné velikosti, je náš vzorek kontaminován fragmenty DNA (1009 bp) a je nutno jej přechistit. Jestliže je jakýkoliv produkt tam, kde byla umístěna kontrola PCR, je kontaminovaná směs pro PCR reakci. Kontaminované vzorky do studie zařazeny nebyli.

4.4.7 Kvantitativní PCR v reálném čase qPCR

Tato metoda je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. U klasické PCR se detekuje až finální produkt. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu (fluoroforu), který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou tedy sbírána během celého PCR procesu na speciálních „termocyklerech“ s optikou umožňující excitaci fluoroforů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Sondy, které jsou složeny z oligonukleotidových řetězců komplementárních vůči sledovanému úseku cDNA, obsahují fluorofor (R) a zhasič (quencher – Q) pracují na základě principu FRET (fluorescence resonance energy transfer). Nárůst fluorescenční aktivity je způsoben excitací charakteristické fluorescence po dokončení polymerizace a rozštěpení sondy polymerázou. Hlavní výhodou metody oproti klasické PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např. kontrolní), nebo absolutní, tj. pomocí kalibrační křivky

standartní DNA o známém množství. Při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku (např. cDNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Já jsem použila metodu relativní

A. Cyklofilin A

Zde jsem použila metodu qPCR pro potvrzení kvality vzorku. V přístroji RotorGene 6000 je zvolen program: 50° C – 2min/ 95° C – 10 min// 50 cyklů: 95° C – 15s/ 58° C – 60s//. Pro provedení reakce se použije mix o složení: voda prostá nukleáz 2 ul, Taqman primer a probe mix 0,5 ul, Taqman PCR Master Mix 5 ul. Do mikrozkušavek se napipetuje 5x naředěná cDNA v objemu 2,5 ul a 7,5 ul mixu. Směs v mikrozkušavkách se vloží do přístroje a nechá se proběhnout reakce. Vycházíme z předpokladu, že cyklofilin A se exprimuje ve všech tkáních. Díky jeho expresi se dá zhodnotit, jak kvalitní je produkt, podle toho v jakém cyklu se daný vzorek bude exprimovat.

B. Referenční a cílové geny (ViiA™ 7 Real – Time PCR System)

Další qPCR bylo provedeno s konkrétně vybranými vzorky, které byly zvoleny na základě qPCR s cyklofilinem A a RIN (≥ 5). Tyto vzorky se předem naředí vodou prostou nukleáz 8x. Pro kalibrační křivku byl vybrán vzorek 267V, díky kvalitní expresi vyzkoušené na genu PPIA. Pro metodu byl použit mix skládající se z: voda prostá nukleáz 0,25 ul, Taqman Gene Expression Assay 0,25 ul, Taqman Gene Expression Master Mix 2,5 ul. Do platíčka na 384 vzorků se prvně pipetuje 3 ul mixu s vynecháním prvního sloupce pro kalibrační křivku a pak vzorky cDNA 2 ul. Pro kontrolu mixu je pro každý gen použita i negativní kontrola. Všechny vzorky jsou měřeny v duplikátech. Pro amplifikaci byl zvolen tento program: 50° C – 2min// 95° C – 10min//50cyklů: 95° C – 15s/60° C – 60s//. Z naměřených hodnot se jako výsledek používá hodnota C_T (cycle threshold), což je číslo odpovídající cyklu, kdy fluorescence dosáhne prahové hodnoty (threshold). Tento cyklus odpovídá exponenciálnímu růstu koncentrace produktu.

Tab. 7 Použité geny pro moji práci

| Označení genu | OMIM číslo | Assay ID | Ref Seq | Exon boundary | Délka amplikonu |
|---------------|------------|---------------|-------------|---------------|-----------------|
| EIF2B1 | 606686 | Hs00426752_m1 | NM_001414.3 | 4 – 5 | 75 |

| | | | | | |
|--------|--------|---------------|----------------|---------|-----|
| MRPL19 | 611832 | Hs00608519_m1 | NM_014763.3 | 2 – 3 | 72 |
| POLR2A | 180660 | Hs03047082_s1 | NM_000937.4 | 1 – 2 | 61 |
| PSMC4 | 602707 | Hs00197826_m1 | NM_006503.2 | 6 – 7 | 83 |
| ABCA7 | 605414 | Hs00185303_m1 | NM_019112.3 | 40 – 41 | 80 |
| ABCA12 | 607800 | Hs00292421_m1 | NM_015657.3 | 1 – 2 | 77 |
| ABCA13 | 607807 | Hs01110169_m1 | NM_152701.3 | 32 – 33 | 80 |
| ABCB1 | 171050 | Hs00184491_m1 | M14758.1 | 23 – 24 | 110 |
| ABCB2 | 170260 | Hs00388677_m1 | NM_000593.5 | 5 – 6 | 60 |
| ABCB3 | 170261 | Hs00241060_m1 | NM_000544.3 | 5 – 6 | 66 |
| ABCB4 | 171060 | Hs00240956_m1 | NM_000443.3 | 2 – 3 | 73 |
| ABCB6 | 605452 | Hs00180568_m1 | NM_005689.2 | 14 – 15 | 60 |
| ABCB9 | 605453 | Hs00608640_m1 | NM_203444.2 | 9 – 10 | 75 |
| ABCB11 | 603201 | Hs00184824_m1 | NM_003742.2 | 21 – 22 | 63 |
| ABCC1 | 158343 | Hs00219905_m1 | NM_004996.3 | 24 – 25 | 74 |
| ABCC2 | 601107 | Hs00166123_m1 | NM_000392.3 | 25 – 26 | 75 |
| ABCC3 | 604323 | Hs00358656_m1 | NM_001144070.1 | 8 – 9 | 98 |
| ABCC4 | 605250 | Hs00195260_m1 | NM_005845.3 | 25 – 26 | 86 |
| ABCC5 | 605251 | Hs00981089_m1 | NM_001023587.1 | 4 – 5 | 68 |
| ABCC6 | 603234 | Hs00184566_m1 | NM_001171.5 | 17 – 18 | 56 |
| ABCC7 | 602421 | Hs00357011_m1 | NM_000492.3 | 21 – 22 | 93 |
| ABCC8 | 600509 | Hs00165861_m1 | NM_000352.3 | 16 – 17 | 137 |
| ABCC10 | 612509 | Hs00375716_m1 | NM_033450.2 | 16 – 17 | 142 |
| ABCC11 | 607040 | Hs01090768_m1 | NM_032583.3 | 26 – 27 | 76 |
| ABCD4 | 603214 | Hs00245340_m1 | NM_005050.3 | 11 – 12 | 117 |
| ABCE1 | 601213 | Hs01009190_m1 | NM_001040876.1 | 1 – 2 | 91 |
| ABCF1 | 603429 | Hs00153703_m1 | NM_001025091.1 | 20 – 21 | 69 |
| ABCF2 | 612510 | Hs00606493_m1 | NM_005692.3 | 14 – 15 | 113 |
| ABCG1 | 603076 | Hs00245154_m1 | NM_004915.3 | 5 – 6 | 58 |
| ABCG2 | 603756 | Hs00184979_m1 | NM_004827.2 | 5 – 6 | 92 |
| ABCG5 | 605459 | Hs00223686_m1 | NM_022436.2 | 10 – 11 | 60 |
| ABCG8 | 605460 | Hs00223690_m1 | NM-022437.2 | 6 – 7 | 63 |

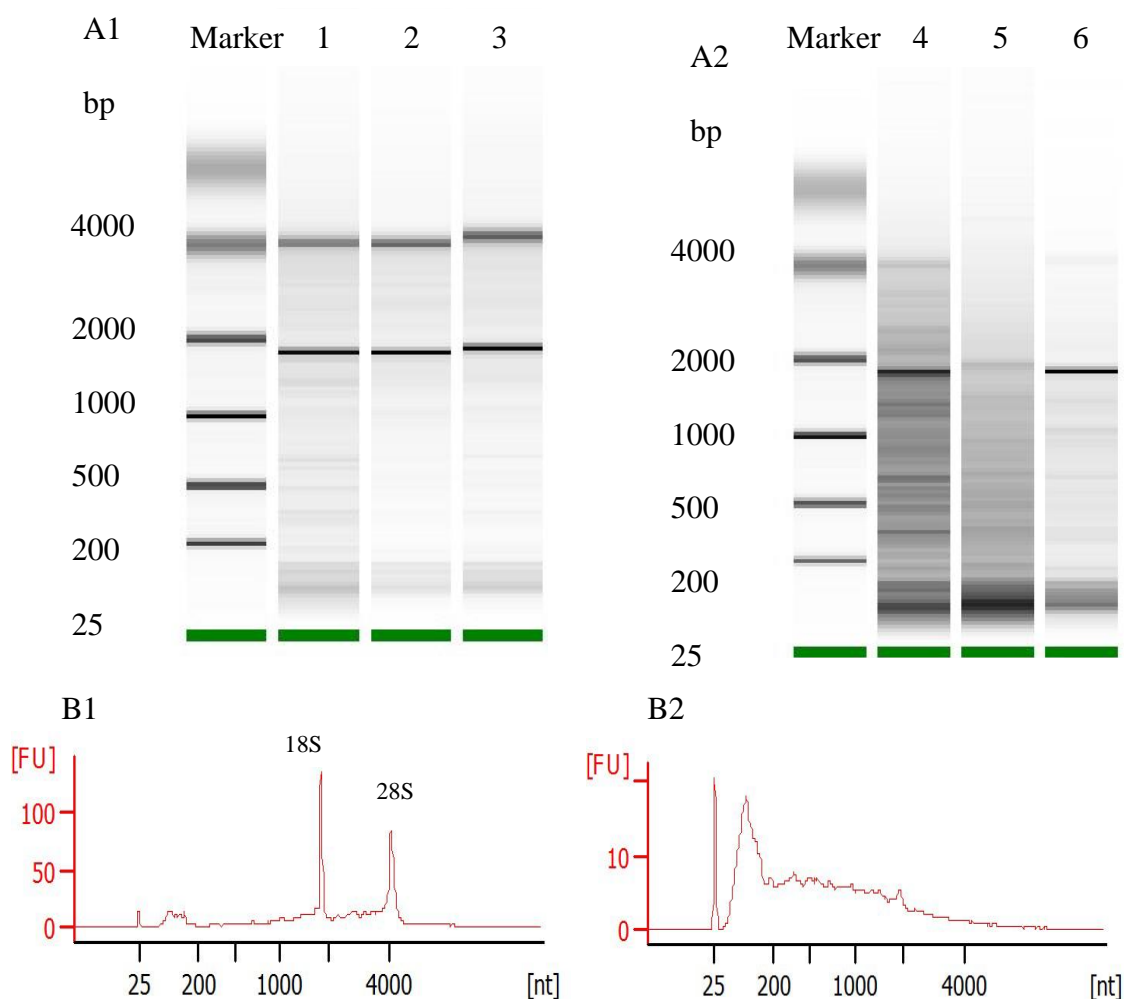
4.4.8 Statistické hodnocení výsledků

Pro zhodnocení výsledků byla provedena řada statistických testů programem SPSS. Rozdělení dat bylo testováno – Kolmogorov – Smirnov Testem, kde hodnoty signifikance $< 0,05$, signalizují odchylky od normálního rozdělení a potřebu využití neparametrických testů. Toto byl případ naší studie. Pro analýzu kontinuálních veličin (věk a expresní hladiny) byl použit neparametrický test Spearmanův. Pro analýzu vztahů faktoriálních (nádor vs. nenádor a většina klinických dat) k expresním hladinám byl použit neparametrický test Kruskal – Wallisův. Expresní hladiny byly porovnány s klinickými daty (pohlaví, klinická diagnóza, TNM a grading). Na závěr byla provedena analýza přežívání Kaplan – Meier testem. Jako statisticky významné byly považovány výsledky se signifikací (p) nižší než 0,05 a jsou uvedeny v části Výsledky. Výsledky byly rovněž hodnoceny testem Bejamini-Hochbergovým pro zvážení vlivu mnohočetného testování.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kontrola kvality vzorků

Po izolaci celkové RNA proběhla kontrola kvality RNA změřením tzv. „RNA integrity number“ (RIN). Ta se nachází v rozmezí 0 – 10. Čím vyšší je hodnota, tím je vyšší kvalita RNA. Do práce byly zahrnuty vzorky s RIN v rozmezí 5 – 8,4. Na základě hodnoty RIN bylo vyřazeno 9 tumorů a 11 zdravých tkání. Obrázek 8.



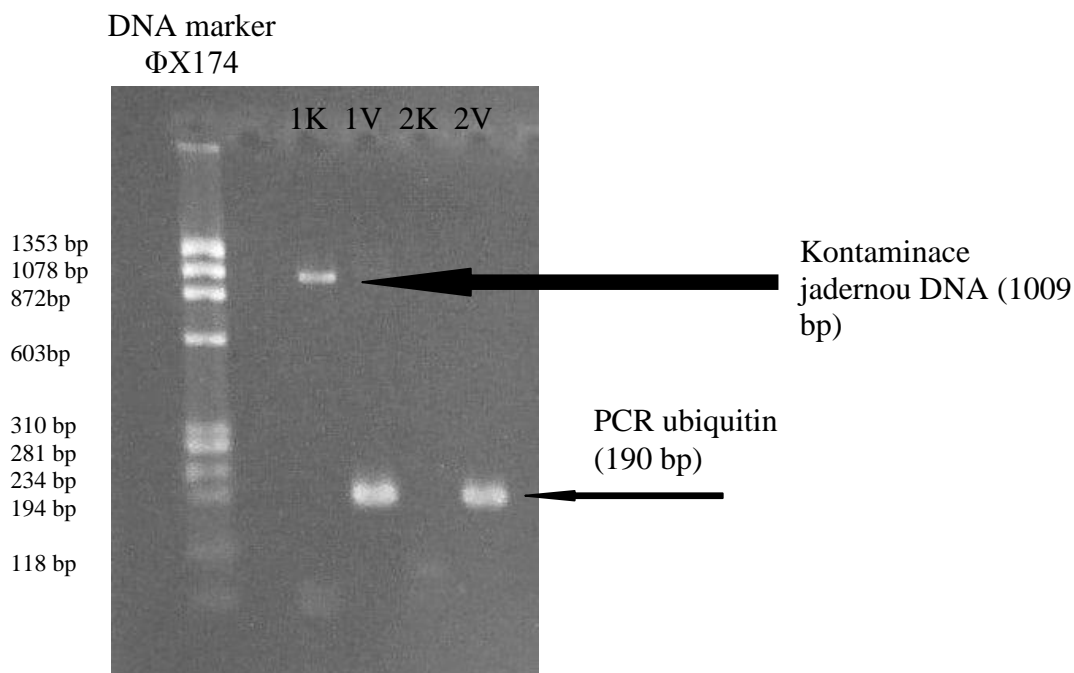
Obr. 8 Zobrazení výsledků kontroly kvality RNA pomocí RIN

V části A1 je elektroforetický profil 3 vzorků, jejichž RIN dosahuje hodnot RIN1 = 6,3; RIN2 = 7,4; RIN3 = 7,5. Jsou to velice kvalitní vzorky. Oproti tomu v části B2 jsou vzorky s nižší hodnotou. RIN4 = 3,4; RIN5 = 2,5 a RIN number pro vzorek č. 6 nebyl přístrojem ani vyhodnocen. V grafu B1 je znázorněn vzorek č. 2, v grafu B2 vzorek č. 5. V grafu B1 jsou vidět píky ribosomální RNA 18S a 28S (Svedberg units), což jsou

fragментů měřené RNA, jejichž poměr se používá k hodnocení integrity. Ideální poměr 28S/18S je 2:1.

Pozn. FU = intenzita normalizované fluorescence, nt = bp

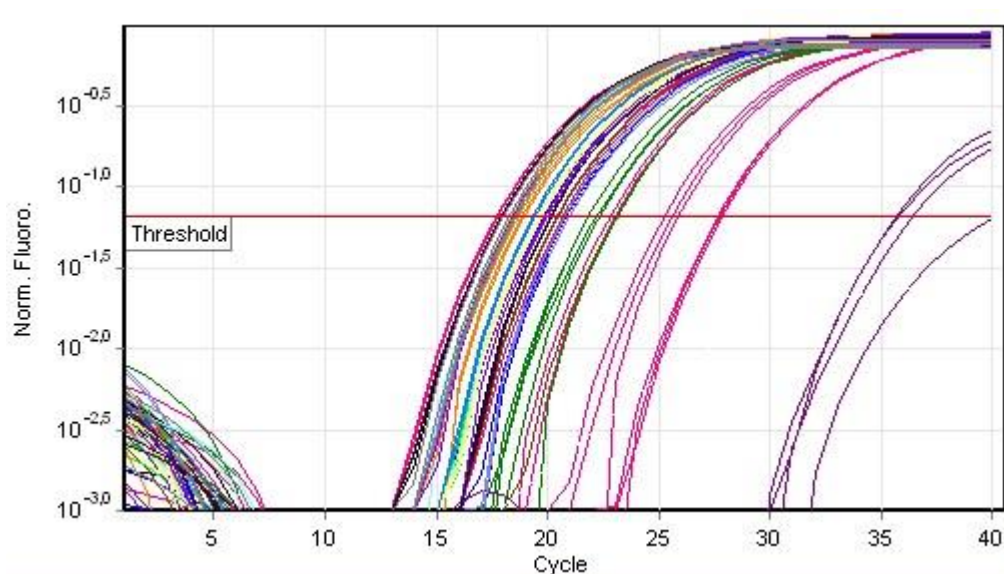
Dále byla RNA převedena na cDNA. Pro kontrolu cDNA byly prováděny testy kvality metodou PCR na ubiquitin. Obrázek 9.



Obr. 9 Gel s produkty reakce PCR, zobrazené díky obarvení ethidium bromidem s následným nasvícením pomocí UV záření.

Vzorky cDNA: 1V, 2V kde V je vzorek obsahující cDNA. Kontroly: 1K, 2K kde K je vzorek negativní kontroly připravený při syntéze cDNA, který neobsahuje reverzní transkriptázu. Přítomnost produktu 190 bp ve vzorku V ukazuje na úspěšnou syntézu cDNA a přítomnost produktu o 1009 bp v kontrole pak ukazuje na kontaminaci genomovou DNA. Zde je dobře vidět, že vzorek č. 1 je kontaminován jadernou DNA, což je zobrazeno v kontrole 1K.

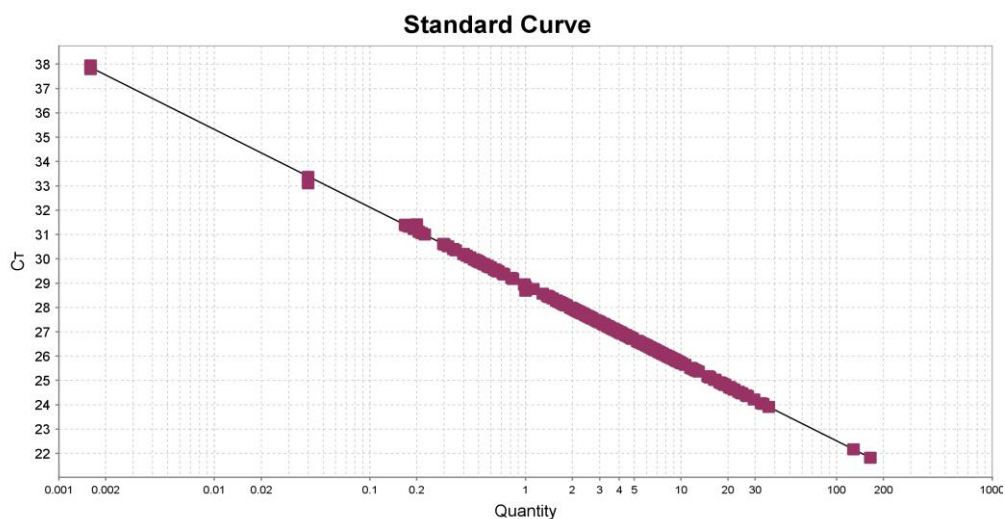
Další kontrola relativní kvantifikace byla provedena pomocí qPCR, kde byl jako referenční gen použit cyklofilin (PPIA). Tento gen se exprimuje ve všech tkáních. Vzhledem k používanému ředění cDNA jsme předpokládali jako optimální, pokud se hodnota C_T mean pohybovala kolem 20 (plus minus 2 cykly). Vzorky s hodnotou C_T mean do hodnoty 26 byly zařazeny do dalšího měření a považovány za kvalitní. Obrázek 10.



Obr. 10 Výstup z programu RotorGene – kvantifikace genové exprese u PPIA
 Pozn.: Norm. Fluoro. = normalizovaná fluorescence, Cycle = počet cyklů (C_T). Fialově označené vzorky s $C_T > 26$ byly ze studie vyřazeny.

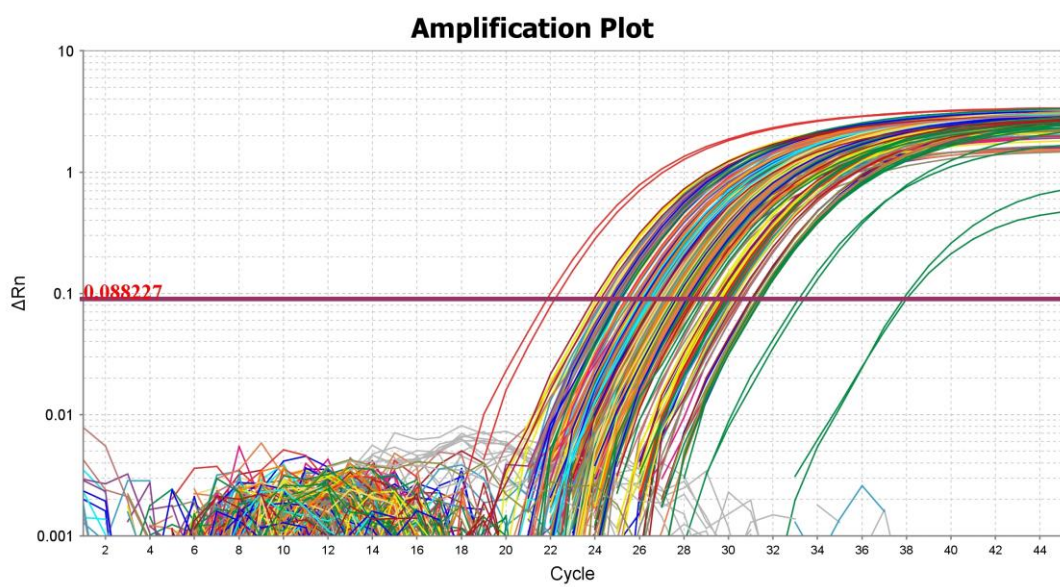
5.2 Stanovení exprese genů ABC transportérů pomocí qPCR

Pro stanovení exprese byly vybrány jen kvalitní vzorky na základě výše uvedených metod. Vzorek 267V byl použit ke konstrukci kalibrační křivky. Vzorky se pro kalibrační křivku připravovaly vždy před každým měřením, kvůli zvýšenému riziku degradace vzorků během skladování. Jednotlivé geny, které byly změřeny, jsou v tabulce 7. Výstupem byla hodnota C_T mean, která byla použita pro statistické vyhodnocení. C_T je cyklus, v němž signál fluorescence překročil přednastavenou prahovou hodnotu (určenou fluorescenční hladinu) a začal exponenciálně růst. Vzorky s hodnotou C_T mean vyšší jak 35, byly považovány za exprimované na hranici detekce metody a vyřazeny. Pokud se u vzorků lišila hodnota dvojnásobně o 0,5 C_T a výše, byly hodnoty expresí přeměřeny.



Obr. 11 Kalibrační křivka qPCR genu ABCC1 – linearita reakce je vyjádřena hodnotou $R^2 = 0,997$ a účinnost reakce $E = 105\%$ (sklon křivky).

Pozn.: C_T = viz výše, Quantity = množství použitého standardu



Obr. 12 Výstup z programu ViiA7 po qPCR reakci. Zde je uveden gen ABCC1.

Pozn.: ΔR_n = rozdíl fluorescence, Cycle = počet cyklů, zvolený limit pro odečet C_T je znázorněn červenou hodnotou

5.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro relativní kvantifikaci genové exprese byly vybrány referenční geny EIF2B1, MRPL19, POLR2A a PSMC4, z předchozí práce Krusové (2013). Tyto geny vykazovaly nejvyšší stabilitu exprese při hodnocení rozdílu mezi nádorovými a nenádorovými tkáněmi pacientů. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota

C_T exprese těchto genů a použita jako hodnota ENDO. Dále byly vypočítány průměry každého z měřených genů a byly použity do vzorce relativní kvantita – C_T měřeného genu/ENDO. Tyto hodnoty se pak zadávaly do statistických testů k hodnocení s klinickými daty. Čím jsou vyšší hodnoty poměru C_T měřeného genu/ENDO, tím nižší je skutečná hladina exprese daného genu v porovnávaných vzorcích.

Jako první vyhodnocení bylo provedeno srovnání hladin exprese nádorové tkáně s nenádorovými vzorky. U většiny genů byla exprese v nádorové tkáni oproti nenádorové nižší nebo nezměněná. Významné snížení bylo zaznamenáno u necelé poloviny měřených genů. Významně zvýšená exprese byla nalezena u genů ABCB2, ABCC1, ABCC2 a ABCC10. V tabulce 8 jsou uvedeny jednotlivé geny s hodnotou významnosti a směrem deregulace exprese v nádoru. Na obrázku 13 jsou zobrazena rozložení exprese v tumorech vs. zdravé tkáni pro jednotlivé geny.

Tab. 8 Statisticky významné rozdíly hladin transkriptů ABC transportérů mezi nádorovými a nenádorovými tkáněmi (Kruskal – Wallis Test)

| Gen | ABCA7 | ABCA12 | ABCA13 | ABCB1 | ABCB2 | ABCB3 | ABCB4 |
|-----------------------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|
| p – hodnota | 0,198 | 0,362 | 0,163 | < 0,001 | < 0,001 | 0,277 | < 0,001 |
| q – hodnota | 0,0304 | 0,0429 | 0,0286 | 0,0054 | 0,0143 | 0,0375 | 0,0107 |
| exprese nádoru | NS | NS | NS | snížení | zvýšení | NS | snížení |

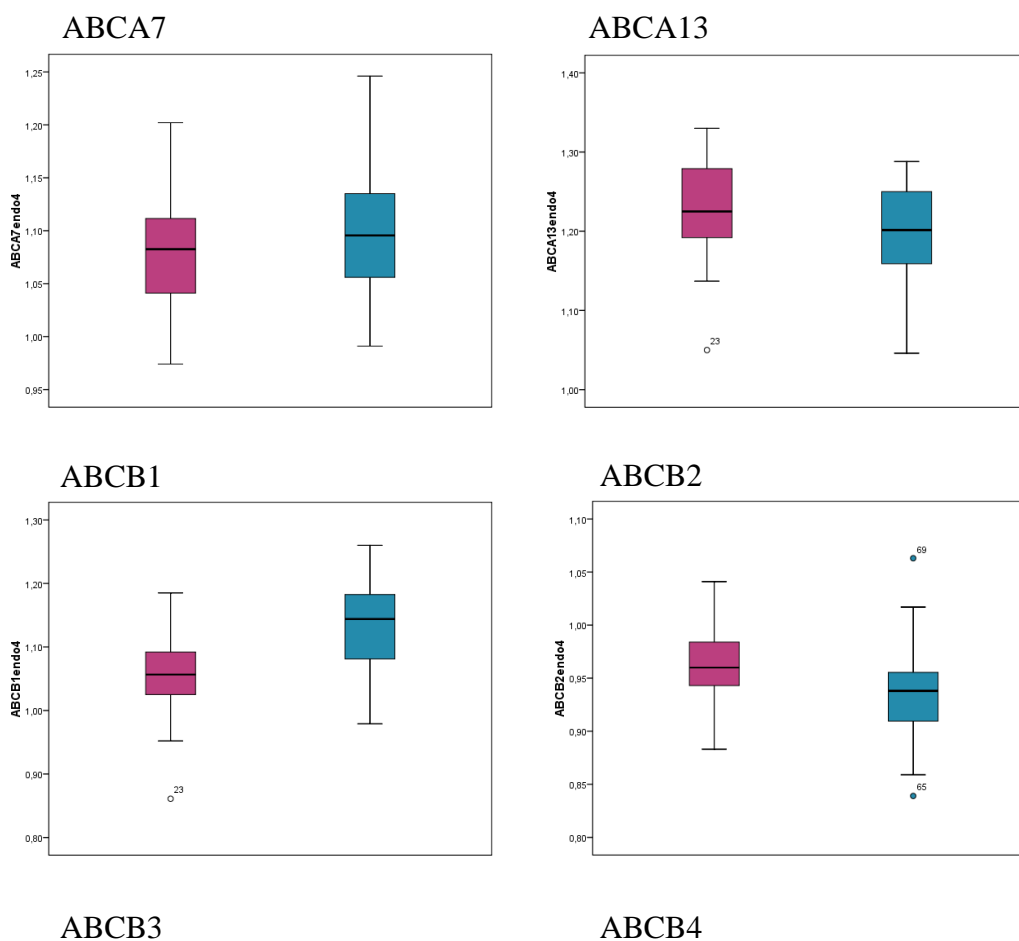
| Gen | ABCB6 | ABCB9 | ABCB11 | ABCC1 | ABCC2 | ABCC3 | ABCC4 |
|-----------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
| p – hodnota | 0,149 | 0,204 | < 0,001 | < 0,001 | 0,019 | < 0,001 | 0,160 |
| q – hodnota | 0,0250 | 0,0321 | 0,0071 | 0,0036 | 0,0214 | 0,0089 | 0,0268 |
| exprese nádoru | NS | NS | snížení | zvýšení | zvýšení | snížení | NS |

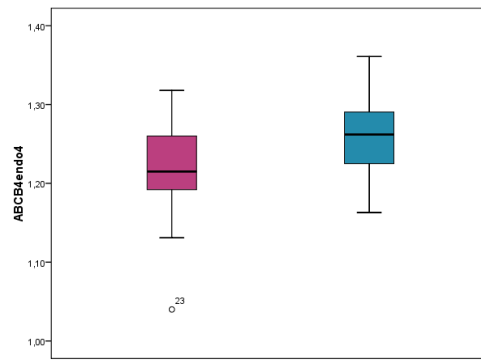
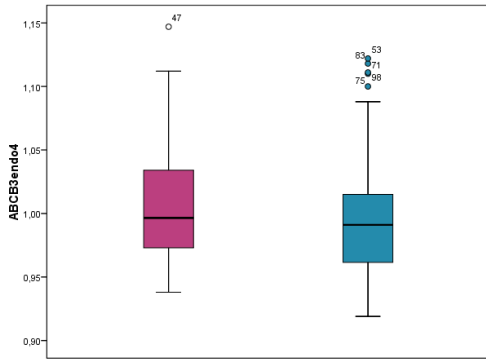
| Gen | ABCC5 | ABCC6 | ABCC7 | ABCC8 | ABCC10 | ABCC11 | ABCD4 |
|-----------------------|--------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|
| p – hodnota | 0,102 | < 0,001 | 0,008 | 0,469 | 0,017 | 0,242 | 0,005 |
| q – hodnota | 0,0232 | 0,0125 | 0,0179 | 0,0446 | 0,0196 | 0,0339 | 0,0161 |
| exprese nádoru | NS | snížení | snížení | NS | zvýšení | NS | snížení |

| Gen | ABCE1 | ABCF1 | ABCF2 | ABCG1 | ABCG2 | ABCG5 | ABCG8 |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| p – hodnota | 0,694 | 0,579 | 0,336 | 0,244 | < 0,001 | 0,615 | 0,313 |
| q – hodnota | 0,0500 | 0,0464 | 0,0411 | 0,0357 | 0,0018 | 0,0482 | 0,0393 |
| exprese nádoru | NS | NS | NS | NS | snížení | NS | NS |

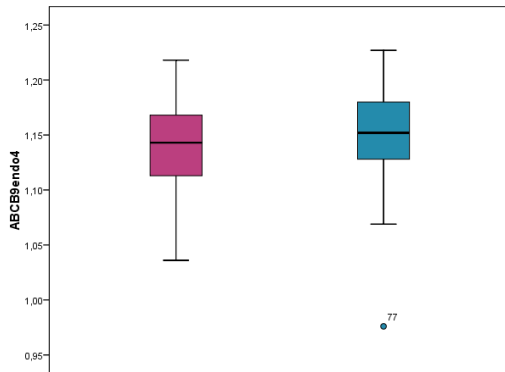
Pozn.: p = hodnota významnosti, NS = nesignifikantní hodnota (nonsignificant)

q = parametr zohledňující mnohočetné testování podle Benjaminiho a Hochberga (1995) – pokud je hodnota $p < q$ je vztah významný; zelená barva označuje významně sníženou hladinu exprese v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni a oranžová barva označuje významně zvýšenou hladinu exprese v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni

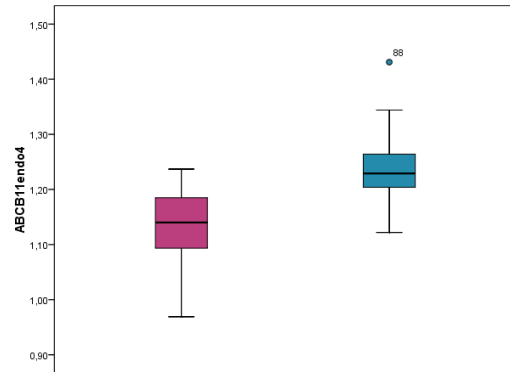




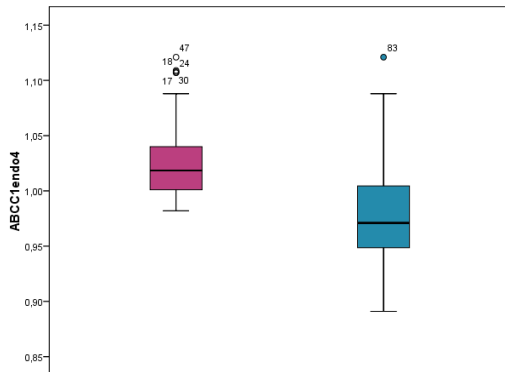
ABCB9



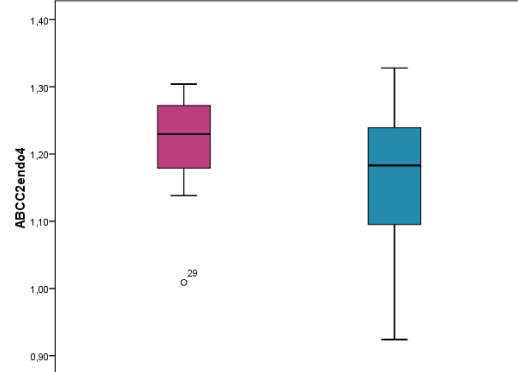
ABCB11



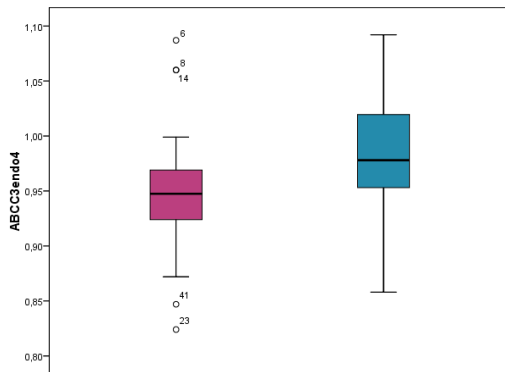
ABCC1



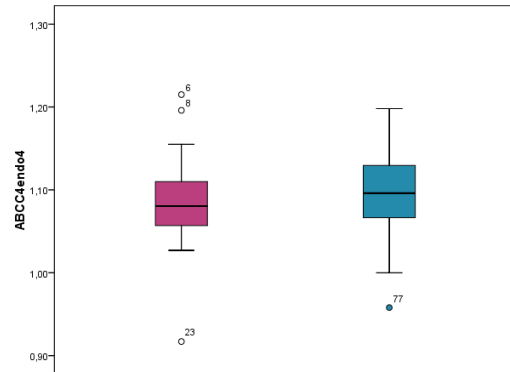
ABCC2



ABCC3

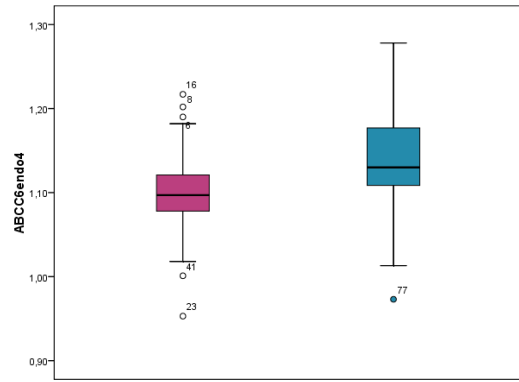
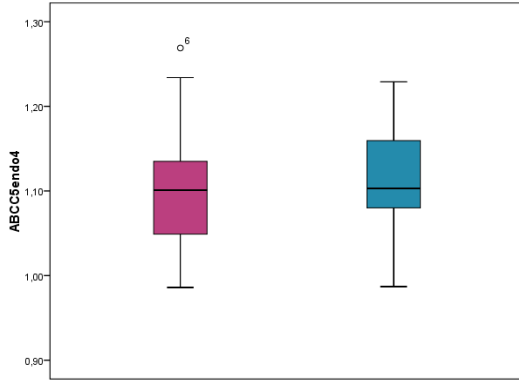


ABCC4

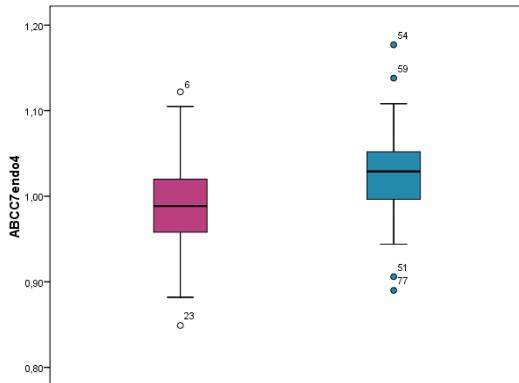


ABCC5

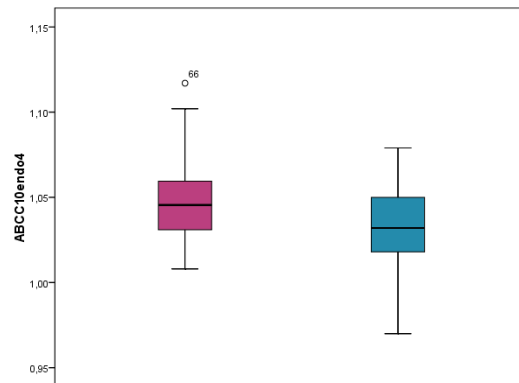
ABCC6



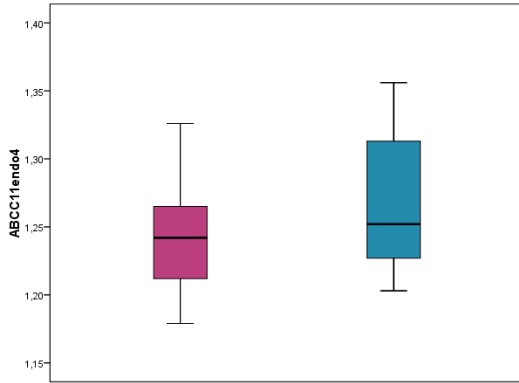
ABCC7



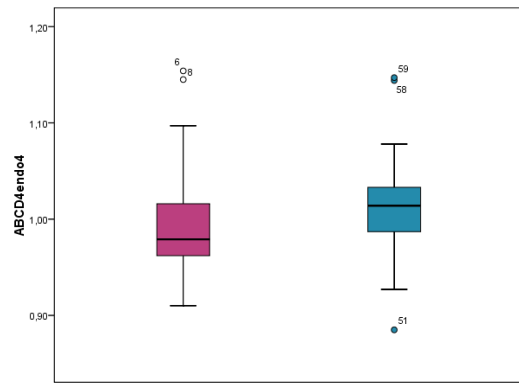
ABCC10



ABCC11

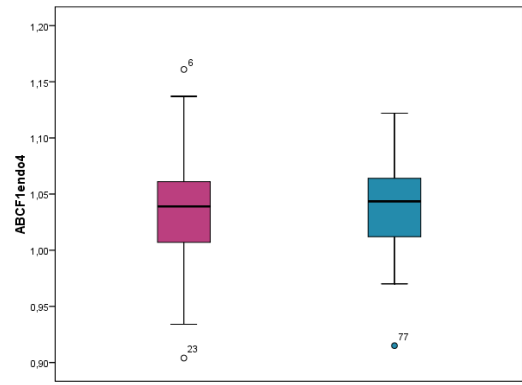
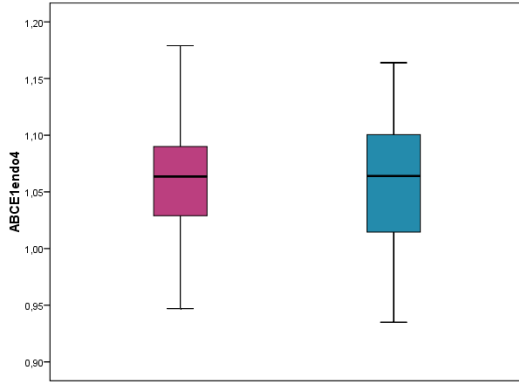


ABCD4

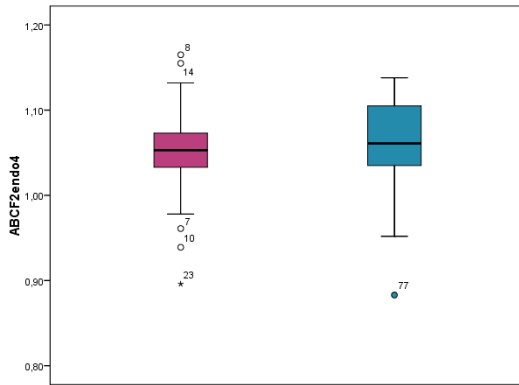


ABCE1

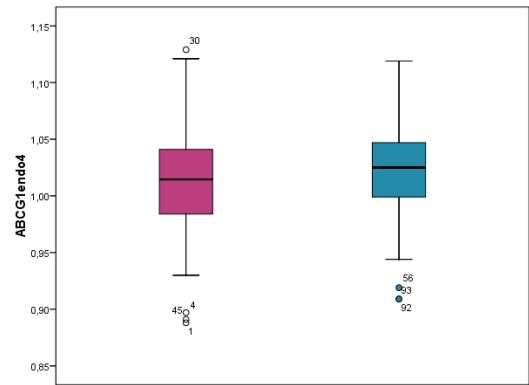
ABCF1



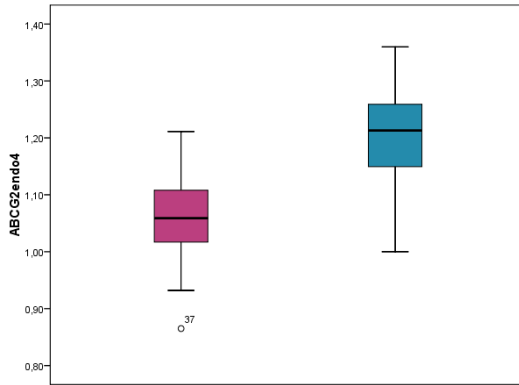
ABCF2



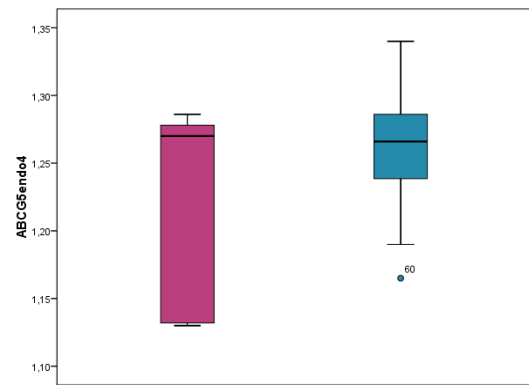
ABCG1

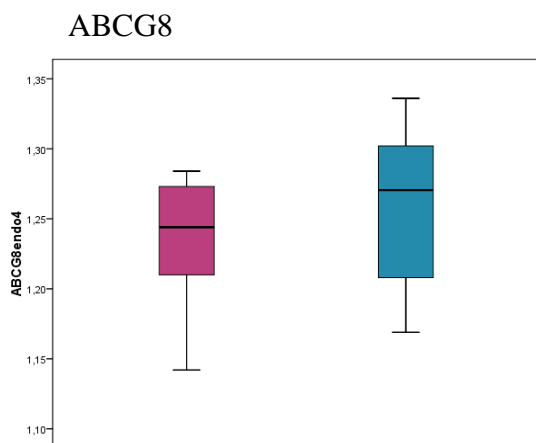


ABCG2



ABCG5





Obr. 13 Srovnání genové exprese v nádorové a zdravé tkáni u jednotlivých genů, kdy osa x představuje typ tkáně: fialová = zdravá tkáň, modrá = tumor a osa y představuje hodnoty poměru exprese měřeného genu/ENDO. Čím vyšší je poměr gen/ENDO, tím nižší je hladina exprese genu.

Pozn.: Pro geny ABCA12 a ABCC8 není uvedeno rozložení exprese z důvodu chybějících dat.

Dále byly analyzovány vztahy genové exprese ABC transportérů v nádorové tkáni ke klinickým datům pacientů. Hladina ABCA7, ABCC6, ABCE1, ABCF1, ABCG2 a ABCG8 významně korelovala s věkem. Dále významně korelovala exprese genu ABCB2 s lokalizací nádoru (rektum vs. tračník). Významné vztahy mezi hladinami genové exprese jednotlivých genů a pohlavím pacientů nebo agresivitou nádoru (grade) nalezeny nebyly.

Tab. 9 Statisticky významné rozdíly hladin transkriptů ABC transportérů v nádorové tkáni pacientů rozdělených podle klinických dat

VĚK (Spearman Test)

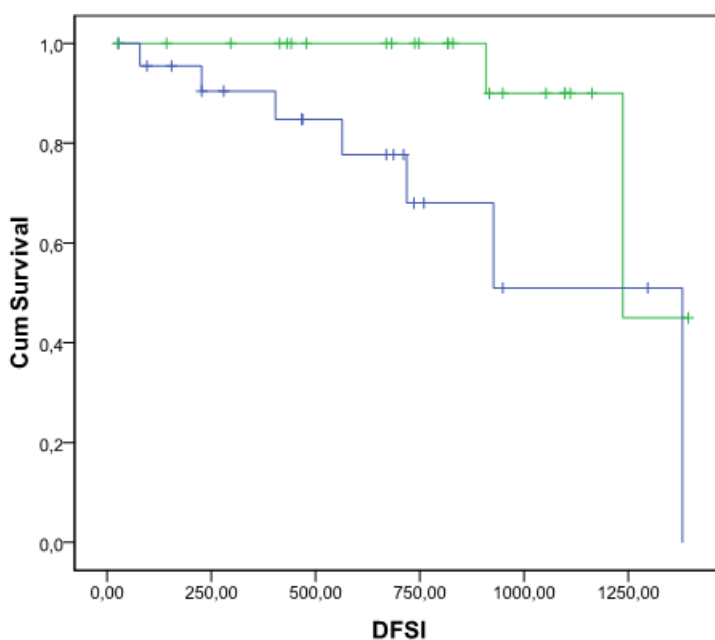
| Gen | ABCA7 | ABCC6 | ABCE1 | ABCF1 | ABCG2 | ABCG8 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| ρ – hodnota | 0,280 | 0,389 | 0,385 | 0,306 | 0,478 | -0,561 |
| p – hodnota | 0,049 | 0,005 | 0,005 | 0,030 | 0,002 | 0,037 |

LOKALIZACE (Kruskal–Wallis Test)

| Gen | ABCB2 |
|-------------------------------------|---------|
| p – hodnota | 0,031 |
| exprese v nádoru rekta vs. tračníku | snížení |

Pozn. ρ hodnota = korelační koeficient, udávající statistickou korelaci mezi dvěma veličinami (Spearmanovo rho); p – hodnota = hodnota významnosti

Statistické hodnocení přežívání pacientů bylo provedeno Kaplan-Meier testem. Pro tento test jsme použili hodnotu bezpříznakového přežívání pacientů (disease free survival), která byla počítána ode dne operace do poslední kontroly pacienta bez relapsu nebo úmrtí. Hodnoty exprese měřených genů/ENDO byly rozděleny na dvě skupiny, dle výše hodnoty poměru C_T měřeného genu/ENDO. Hodnoty přiřazené do skupiny 0 byly vyšší než průměr poměru expresí C_T měřeného genu/ENDO, tzn., že vzorky pacientů zařazených do skupiny 0 mají nižší hladiny exprese. Hodnoty přiřazené do skupiny 1 byly nižší než průměr poměru expresí C_T měřeného genu/ENDO, tudíž vzorky pacientů ve skupině 1 mají vyšší hladiny exprese. Pacienti s hladinou nádorové exprese genu ABCD4 nižší než průměr (pacienti patřící do skupiny 0) vykazují kratší dobu bezpříznakového přežívání než pacienti ve skupině 1 ($p = 0,027$).



Obr. 14 Kaplan – Meierův graf bezpříznakového přežívání pro gen ABCD4, kde na ose x je hodnota DFS ve dnech a na ose y je frakce přežívajících pacientů. Modrá křivka označuje pacienty s nižší hladinou a zelená křivka pacienty s vyšší hladinou ABCD4 v nádoru než je průměr.

6 DISKUZE

KRK je velmi závažné onemocnění, kterému podléhá velké procento lidí nejen ve světě, ale i v ČR. Jejich prognóza není příznivá, nádor je často diagnostikován v pozdních stádiích a na léčbu pozitivně reaguje jen 12 % pacientů absolvujících paliativní léčbu. U pacientů s adjuvantní terapií recidivuje do tří let více jak polovina pacientů. Proto je třeba se zaměřit na příčiny selhání chemoterapie. Jednou z příčin může být variabilita genů, které interagují s mechanismem účinku cytostatik. Tato práce sledovala, zda může být míra odpovědi pacientů na léčbu a jejich prognóza ovlivněna odlišnou expresí genů ABC transportérů v nádorové a zdravé tkáni. ABC transportéry mají mnoho funkcí, jednou z nich je vylučování jak fyziologických tak cizorodých látek ve zdravých tkáních. V nádorové tkáni mohou ABC transportéry ovlivňovat koncentraci cytostatik v buňce tím, že je exportují ven z buněk.

Mým úkolem bylo navázat na pilotní studii Krusové (2013) zabývající se problematikou exprese ABC transportérů v nádorových tkáních pacientů s KRK. Cílem této studie bylo mezi geny ABC transportérů validovat dříve nalezené, eventuálně nové markery, které by mohly zlepšit prognózu a predikci výsledku terapie u pacientů s KRK. V pilotní studii Krusové (2013) i v mé práci byly porovnávány genové exprese ABC transportérů ve zdravé a nádorové tkáni a hledány statisticky významné souvislosti s klinickými daty pacientů.

Do mé práce bylo zařazeno 60 pacientů s diagnózou KRK druhého stádia, kteří podstoupili onkochirurgickou léčbu. Vzorky těchto pacientů byly zpracovány dle popsané metodiky. Na základě výsledků statistických testů bylo zjištěno, že necelá polovina genů vykazuje sníženou expresi nádoru oproti zdravé tkáni. Významné zvýšení exprese bylo odhaleno u genů ABCB2, ABCC1, ABCC2 a ABCC10.

V literatuře jsou zatím jen omezené zdroje, které mohly potvrdit nebo vyvrátit naše výsledky. Jedním s nich je studie De Iudicibusové a kol. (2008) zaměřená na genový polymorfismus a expresi ABCB1 v KRK. Výsledky studie De Iudicibusové a kol. (2008) ukazují významné snížení hladiny ABCB1 v nádorové tkáni KRK oproti nenádorové ($p < 0,001$, Mann–Whitney rank test). Naše výsledky tento nálezní potvrdily. Snížená hladina exprese byla v naší studii nalezena i pro gen ABCG2, což potvrzuje studie Gupty a kol. (2006) V této studii byla exprese genu ABCG2 zhruba 6,6 krát vyšší ve zdravé tkáni tlustého střeva oproti nádorové ($p < 0,001$). Takto významné snížení hladiny exprese ABCG2 bylo nalezeno i u dalších tumorů, např. plic, prsou, tenkého střeva, rekta, děložního čípku či jater (Gupta a kol. 2006). Ve studii Hinoshity a kol.

(2000) byla nalezena snížená exprese ABCC3 ($p < 0,05$) v nádorové tkáni KRK oproti nenádorové tkáni, podobně jako v naší studii.

Studie Hinoshity a kol. (2000) se zabývala expresí genů ABCB1, ABCB4, ABCC1, ABCC2 a ABCC3 u pacientů s KRK a ukázala více než 3 krát zvýšenou expresi ABCC2 v nádorové tkáni oproti nenádorové ($p < 0,05$). Tento výsledek je v souladu s naší studií, avšak naše výsledky se liší ohledně hladin exprese ABCC1, kde autoři udávají nezměněnou hladinu (Hinoshita a kol. 2000).

Ve studii Krusové (2013) byla sledována hladina exprese všech ABC transportérů ($n = 48$) v nádorových i zdravých tkáních pacientů s KRK. Významně snížená exprese v nádorových tkáních byla zaznamenána u více než poloviny genů ABC transportérů. Vyšší exprese v nádorové tkáni byla nalezena u genů ABCA12 ($p < 0,001$), ABCA13 ($p = 0,002$), ABCB6 ($p = 0,004$), ABCC1 ($p < 0,001$), ABCC2 ($p < 0,001$) a ABCE1 ($p < 0,001$). Současná studie, na nezávislém souboru pacientů, potvrdila jednak dříve nalezenou sníženou hladinu většiny studovaných ABC transportérů v nádoru tak významně zvýšenou expresi genů ABCC1 a ABCC2 v nádorové tkáni pacientů s KRK (Krus 2013).

Prognóza nádorů tračnicku a rekta je odlišná dle rozsahu onemocnění (Lee a kol. 2013). Kromě anatomické lokalizace může být jedním z důvodů i rozdílná exprese genů, které interagují s chemoterapií, např.: ABC transportérů. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na hledání rozdílů v expresi sledovaných genů dle lokalizace nádoru. V nádorové tkáni tračnicku jsme našli významně zvýšenou expresi genu ABCB2 ve srovnání s nádorem rekta. Enzym ABCB2 se podílí na prezentaci antigenů a může souviset s rekrutováním cytotoxických T – lymfocytů a tudíž imunitní odpovědí těla na nádorové buňky (De Miranda a kol. 2009).

V souvislosti s lokalizací nádoru byly publikovány studie, ve kterých byla studována distribuce exprese genů ABC transportérů v tkáních lidského zdravého střeva, konkrétně ABCB1, ABCC1, ABCC2 ve studii Berggrenové a kol. (2006) a ABCG2 ve studii Gutmanna a kol. (2005). Ve studii Berggrenové a kol. (2006) byla nalezena zvýšená hladina exprese mRNA genů ABCB1 a ABCC2 v jejunu, která se snižovala směrem k distální části tlustého střeva. Distribuce exprese genu ABCC1 byla naopak rovnoměrná v celém tenkém a tlustém střevě (Berggren a kol. 2006). Klesající trend směrem k distální části byl zaznamenán i ve studii Gutmanna a kol. (2005) pro expresi genu ABCG2, která byla nejvyšší v duodenu a klesala směrem ke konečníku.

Distribuce exprese genů ABC transportérů ve zdravé tkáni byla studována i v práci Krusové (2013). Exprese genů ABCA12, ABCC7 a ABCC8 významně klesala směrem od tlustého střeva ke konečníku a opačný trend vykazovala exprese genů ABCB9, ABCB11, ABCG5 a ABCG8. Genová exprese ABCA12, ABCC7 a ABCC8 významně klesala směrem od tlustého střeva ke konečníku i v nádorové tkáni (Krus 2013). Tyto výsledky nebyly dosud potvrzeny současnou ani jinými studiemi. Rozdíl v expresi ABCB2 mezi tračníkem a rektum nalezený současnou studií rovněž. Lze jej považovat za unikátní, protože nebyl dosud publikován. Rozdíly v genové expresi Abcb2, Abcb9, Abcg5 a Abcg8 mezi duodenem, jejunem, ileem a střevem byly však pozorovány u myši (Muth a kol. 2004), což naznačuje, že rozdíly sledované v současné i předchozí (Krus 2013) studii mohou být biologicky relevantní a nikoliv pouze náhodným zjištěním.

Nejzajímavější výsledek této studie přineslo srovnání bezpříznakového přežívání pacientů s KRK podle genové exprese ABC transportérů. Pacienti s hladinou ABCD4 v nádoru vyšší než je průměr přežívali významně delší dobu bez příznaků návratu onemocnění ve srovnání s pacienty s nižší hladinou. Soubor pacientů byl z hlediska klinických prognostických faktorů homogenní (všichni pacienti ve stádiu II) a proto jsme neprováděli multivariantní analýzu. Studie Krusové (2013) porovnávala bezpříznakové přežívání s hladinami exprese ABC transportérů v nádorové tkáni pacientů (n = 26, stádia II a III), kterým byl radikálně odstraněn KRK, a podstoupili adjuvantní chemoterapii. Pacienti významně déle přežívali bez příznaků, pokud měli v nádorech vyšší hladinu exprese genů ABCA7 (p = 0,033), ABCA13 (p = 0,011), ABCB4 (p = 0,003), ABCC11 (p = 0,016) nebo ABCD4 (p = 0,023). Současná studie tedy na větším a homogennějším vzorku pacientů potvrzuje výsledky předchozí studie a ukazuje na důležitou úlohu genové exprese ABCD4 v prognóze KRK. Tento gen je exprimován v peroxizomech a účastní se transportu a metabolismu lipidů v buňce, konkrétně beta-oxidace mastných kyselin. Tato fyziologická funkce ABCD4 transportéru může mít zásadní vliv na přežívání nádorových buněk, jelikož ovlivňuje energetické poměry v buňce (Wanders a kol. 2007). Na druhou stranu se nám nepodařilo potvrdit dříve naznačenou úlohu genu ABCC11 v prognóze KRK (Krus 2013).

Vztahy mezi věkem pacientů a genovou expresí ABC transportérů v nádorech kolorektálního karcinomu zatím nebyly publikovány. Naše výsledky ukazující na vztah exprese genů ABCA7, ABCC6, ABCE1, ABCF1, ABCG2 a ABCG8 s věkem pacientů,

jsou tedy zatím unikátní a je třeba jejich význam potvrdit nebo vyvrátit na nezávislých souborech pacientů s KRK. Studie Filipitsa a kol. (1997), zatím jako jediná, srovnávala klinická data pacientů s KRK imunohistochemicky a RT-PCR stanovenou expresí genu ABCC1/MRP1 (ABCC1 = gen, MRP1 = protein). U vzorků nádorové tkáně KRK, u kterých bylo nalezeno silné barvení monoklonálními protilátkami proti MRP1 proteinu, však nebyla nalezena žádná souvislost s věkem pacientů, což souhlasí s našimi výsledky (Filipitsa a kol. 1997).

Ve studii Krusové (2013), zabývající se expresí genů ABC transportérů u KRK, spojitost hladin genových expresí ABC transportérů s věkem pacientů nalezena nebyla.

Lze konstatovat, že také jako další podobné studie i tato přinesla řadu rozporuplných dat, jmenovitě nepotvrzení řady významných vztahů nalezených v předchozí studii Krusové (2013), např.: souvislost genové exprese ABCC10 se stupněm diferenciací nádoru nebo ABCC11 s přežíváním pacientů s KRK. Vzhledem k tomu, že postup od zpracování vzorků až k výsledku qPCR byl v laboratoři prováděn v souladu s kritérii MIQE (Bustin a kol. 2009) jak v této, tak i v předchozí studii (Krus 2013), nelze hledat příčiny odlišností v laboratorním zpracování vzorků. K výhodám studie rovněž patří to, že všechny vzorky do obou studií byly odebrány zkušeným klinickým týmem složeným z chirurgů a patologů. Zdá se nepravděpodobné, že by logistika odběru vzorků hrála podstatnou roli. Na druhou stranu se obě studie zabývaly výzkumem pacientů s odlišnou prognózou. Předchozí studie hodnotila převážně pacienty s pokročilým onemocněním stádií II až IV a tato studie čistě pacienty s lokalizovaným onemocněním stádia II. Zjistit úlohu stádia v prognóze založené na genetických markerech byl i jeden z cílů této studie.

Tato studie potvrdila dříve sledovaný (Krus 2013) komplexní profil genové exprese ABC transportérů v nádorech KRK (snížená exprese ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC3, ABCC6, ABCC7, ABCD4 a ABCG2 a zvýšená exprese ABCC1 a ABCC2). Řada z těchto enzymů se podílí na lékové rezistenci. K nadějným nálezům, které mohou inspirovat další výzkum, rovněž patří vztah ABCD4 k přežívání pacientů s KRK. Tento vztah by bylo vhodné v další studii validovat na hladině proteinu.

7 ZÁVĚR

Léčba pacientů s KRK je ovlivněna mnoha faktory. U pacientů léčených chemoterapeutiky, kteří neodpovídají na léčbu, je hlavní příčinou neúspěchu léková rezistence. Jedním z mnoha mechanismů lékové rezistence je export léčiva ven z nádorové buňky. Transport léčiv zprostředkují ABC transportéry. Kvůli nízké koncentraci léčiva v nádorové buňce dochází u mnoha pacientů k relapsu onemocnění. V současnosti se hledají markery, např. ve skupině ABC transportérů, které by mohly být využity k predikci výsledku terapie a ke zlepšení prognózy pacientů s KRK.

Tato studie je zaměřena na analýzu genové exprese 28 ABC transportérů a hledání souvislostí těchto expresí s výsledky léčby KRK. Tato studie navazuje na výsledky dizertační práce Krusové (2013), která naznačila řadu nadějných souvislostí. Všechny potenciální markery je třeba verifikovat na nezávislých skupinách pacientů a tím ověřit jejich aplikační potenciál.

K naplnění cíle byla použita metoda kvantitativní PCR v reálném čase – qPCR. Hladiny exprese jednotlivých genů ve zdravé i nádorové tkáni se hodnotily pomocí statistické analýzy a dále se srovnávaly s klinickými daty pacientů.

Hladiny exprese většiny sledovaných genů ABC transportérů v nádorových tkáních vykazovaly nižší nebo nezměněnou expresi oproti tkáni zdravé. Významně zvýšená hladina exprese v nádorech byla nalezena u genů ABCB2, ABCC1, ABCC2 a ABCC10. Dále byly identifikovány významné souvislosti genové exprese v nádorové tkáni s klinickými daty pacientů. Hladina genu ABCB2 byla významně vyšší v nádoru tračnicku ve srovnání s nádorem rekta. Hladiny ABCA7, ABCC6, ABCF1, ABCG2 a ABCG8 významně korelovaly s věkem. Pacienti s vysokými hladinami ABCD4 v nádorech přežívali delší dobu bez progresu než pacienti s nízkou expresí ABCD4.

Tato studie potvrdila některé výsledky uvedené v předchozí dizertační práci Krusové (2013) ohledně expresního profilu nádorové tkáně KRK. Dále byly identifikovány nové geny související s věkem a lokalizací nádoru. Tyto geny by měly být předmětem dalších ověřovacích studií, směřujících k odhalení mechanismu jejich působení na prognózu a průběh KRK.

Tato studie, ve shodě s předchozí studií Krusové (2013), ukazuje, že nejzajímavějším kandidátním, prognostickým markerem pro lokalizované stádium KRK je ABCD4. Následné studie budou orientovány na funkční analýzu tohoto markeru.

8 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| 5 – FU | 5 – fluorouracil |
| A | adenin (6 – aminopurin; purinová báze) |
| ABC | transportní proteiny rodiny ABC vázající ATP (ATP – binding cassette transporters) |
| ABC1 | synonymum ABCA |
| ABCA | transportní proteiny podrodiny ABCA |
| ABCB | transportní proteiny podrodiny ABCB |
| ABCC | transportní proteiny podrodiny ABCC |
| ABCD | transportní proteiny podrodiny ABCD |
| ABCE | transportní proteiny podrodiny ABCE |
| ABCF | transportní proteiny podrodiny ABCF |
| ADP | adenosindifosfát |
| ALD | synonymum ABCD |
| AMK | aminokyselina |
| APC | gen APC (adenomatous polyposis coli) |
| ATP | adenosintrifosfát |
| B | bevacizumab |
| BCRP | synonymum ABCG2 (breast cancer resistant protein) |
| BMI | index tělesné hmotnosti (body mass index) |
| bp | párů bází (base pair) |
| C | cytosin (2 – amino – 6 – hydroypurin; purinová báze) |
| C18 | karcinom tlustého střeva |
| C19 | karcinom rektosigmoideálního spojení |
| C20 | karcinom konečníku |
| Ce | cetuximab |
| cAMP | cyklický adenosinmonofosfát |
| CDKN2A | cyklin dependentní kinázový inhibitor 2A |
| cDNA | komplementární DNA |
| CFTR | synonymum ABCC7 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) |
| CRC | colorectal carcinoma |
| DCC | gen DCC (deleted in colorectal carcinoma) |

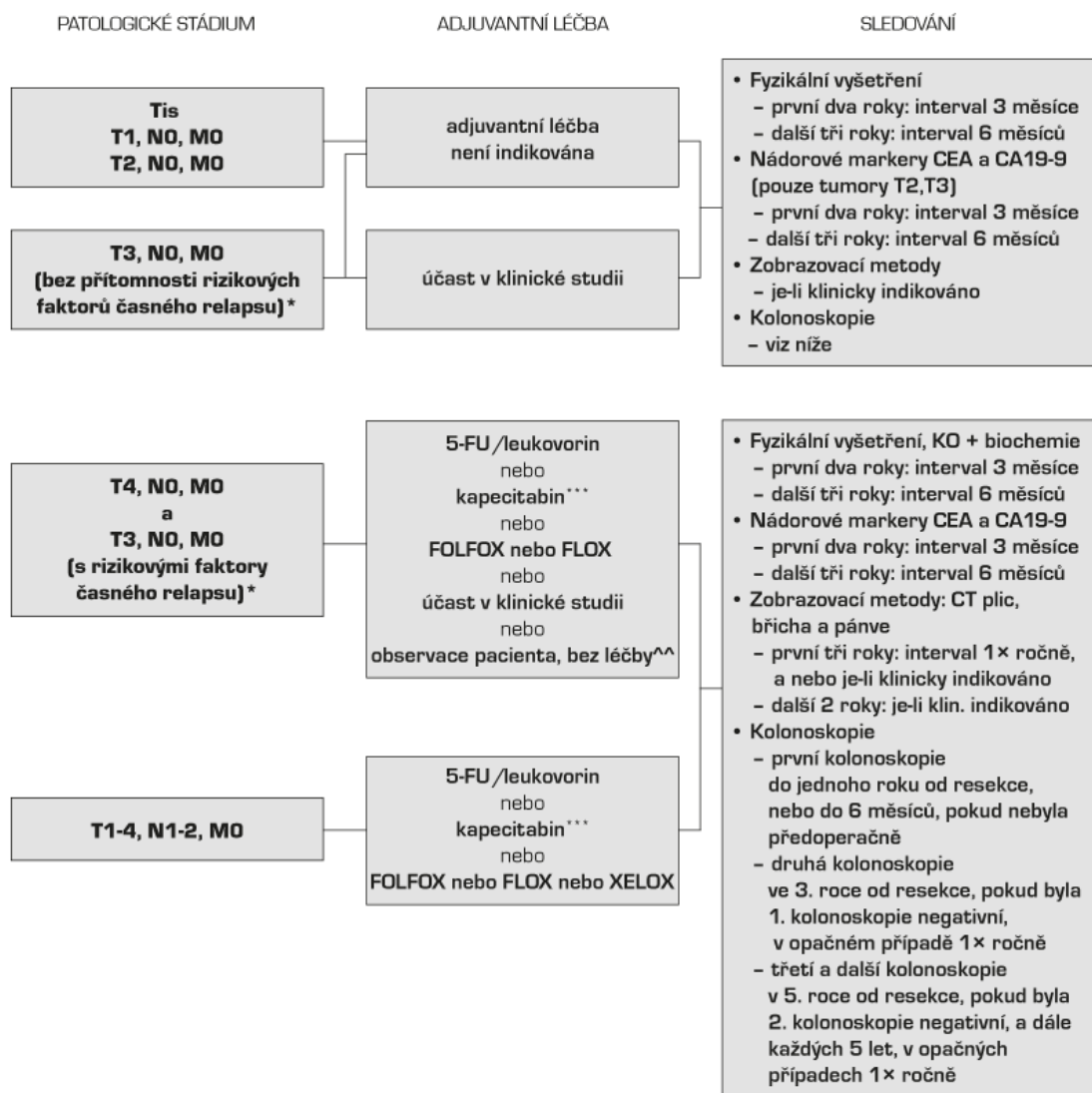
| | |
|------------------|---|
| DEPC | diethyl pyrokarbonát |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DSF | celkové bezpříznakové přežití (disease free survival) |
| dNTP | deoxynukleotidtrifosfát |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EGFR | receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor) |
| FA | foliniová kyselina/leukovorin |
| FAP | familiární adenomatózní polypóza |
| Fe | železo |
| FRET | fluorescenční rezonanční přenos energie |
| G | guanin (2 – oxo – 4 – aminopyridin; pyrimidinová báze) |
| GSH | glutathion |
| HA – 1 | histokompatibilní antigen 1 |
| HDL | lipoproteiny o vysoké hustotě (high – density lipoprotein) |
| HH1 | hydrofilní histon 1 |
| hMLH1 | lidský homolog 1 genu mutL, nepolypózního karcinomu kolorekta, typ 2 (E.coli) |
| hMSH2 | lidský homolog 2 genu mutS, nepolypózního karcinomu kolorekta, typ 1 (E.coli) |
| HNPCC | hereditární nepolypózní karcinom kolorekta |
| hPMS1 | DNA mismatch repair protein PMS1, lidský homolog genu mutL (kvasinky) |
| K – ras | gen K – ras (V–Ki–ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog) |
| KRK | kolorektální karcinom |
| LTC ₄ | leukotrien C ₄ |
| MDR | mnohočetná léková rezistence (multi – drug resistance) |
| mRNA | mediátorová RNA (messenger RNA) |
| MRP | synonymum ABCC (multi – drug resistance related protein) |
| NBDs | domén vázající nukleotidy (nucleotide binding domain) |
| NS | nonsignificant |
| NSCLC | nemalobuněčný nádor plic (non – small cell lung cancer) |
| OABP | synonymum ABCE (oligoadenylate binding protein) |

| | |
|----------------|---|
| OATPs | organické anionické transportní proteiny (organic anionic binding proteins) |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance In Man – databáze všech známých onemocnění spolu s jejich genetickými komponentami |
| p | hodnota signifikance |
| p53 | tumor protein 53 |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| P – GP | P – glykoprotein |
| P _i | fosfát |
| PPAR | nitrojaderné receptory ovlivňující transkripci a expresi genů (peroxisome proliferator – activated receptor) |
| PPIA | cyklofilin (peptidylpropylizomeráza A) |
| q | opravená hodnota významnosti |
| qPCR | kvantitativní PCR v reálném čase |
| RIN | hodnota integrity RNA (RNA integrity number) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RXR | retinoidní receptor X (retinoid X receptor) |
| S | sulfát |
| siRNA | malá interferující RNA (small interfering RNA) |
| SNPs | jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms) |
| T | thymin (2,6 – dihydroxy – 5 – methylpyrimidin; pyrimidinová báze) |
| TE pufr | Tris/EDTA pufr |
| TGF – α | transformující růstový faktor alfa (transforming growth factor alpha) |
| TMDs | transmembránové domény (transmembrane domains) |
| TNM | klasifikace nádorového onemocnění dle T – tumor (rozsah primárního nádorů), N – nodes (výskytu metastáz v regionálních lymfatických uzlinách), M – metastasis (výskytu vzdálených metastáz) |
| TOKS | test okultního krvácení ve stolici |
| TP53 | gen TP53 (tumor protein p53) |

| | |
|------|---|
| Tris | 2 – amino – 2 – hydroxymethyl – propan – 1,3 – diol |
| UICC | mezinárodní unie proti rakovině (Union Internationale Contre le Cancer) |
| VEGF | růstový faktor cévního endotelu (vascular endothelial growth factor) |

9 PŘÍLOHY

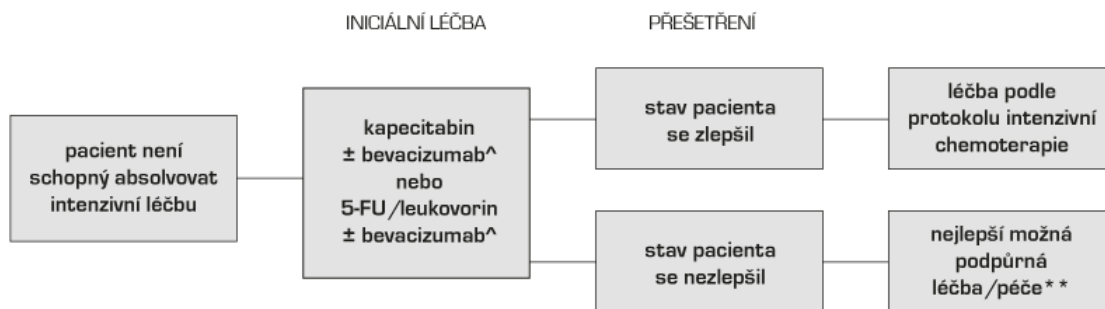
ADJUVANTNÍ SYSTÉMOVÁ LÉČBA KARCINOMU TLUSTÉHO STŘEVA (mimo rektum)



Obr. 15 Schéma adjuvantní systémové léčby KRK - mimo rektum (Vyzula a kol. 2013)

Pozn.: Rizikové faktory relapsu KRK jsou: nízký počet resekovaných uzlin (< 12), nízký stupeň diferenciacce (grade 3,4), prorůstání nádoru přes celou stěnu střeva (stádium T4), perforace nebo obstrukce tlustého střeva jako první projev nádoru, angioinvaze, lymfangioinvaze, perineurální invaze, neznámé resekční okraje.

PALIATIVNÍ SYSTÉMOVÁ LÉČBA KARCINOMU TLUSTÉHO STŘEVA A KONEČNÍKU Pacient není schopen absolvovat intenzivní léčbu



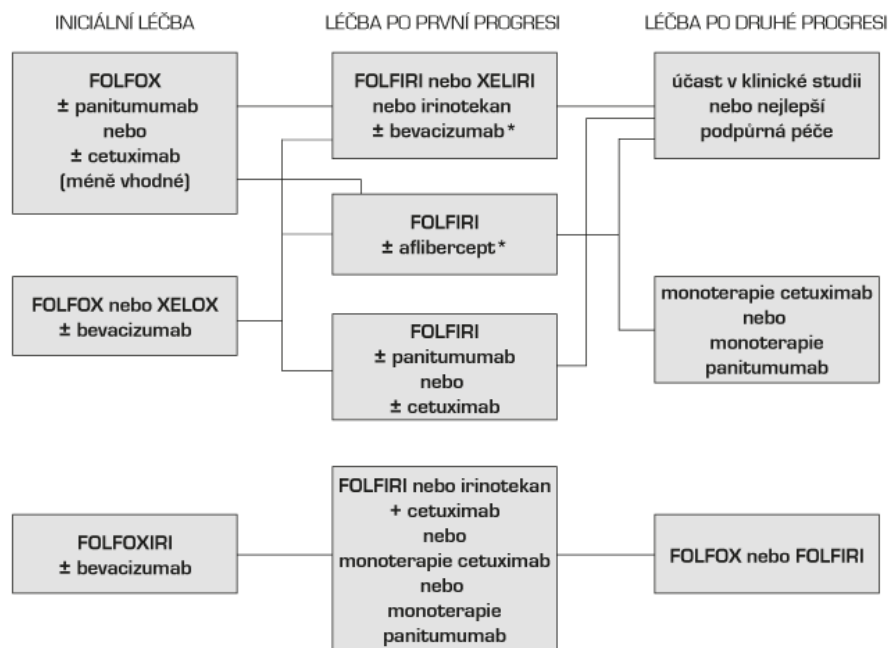
POZNÁMKA:

^Kontraindikace k podání bevacizumabu jsou: alergie na bevacizumab, těhotenství a kojení

**Při zvážení všech rizik a přínosu léčby, interkurencí, předpokládané délky života

Obr. 16 Schéma paliativní systémové léčby KRK, kdy pacient není schopen absolvovat intenzivní léčbu, tzn. stav, špatný stav pacienta nebo výskyt nežádoucích účinků (Vyzula a kol. 2013)

PALIATIVNÍ SYSTÉMOVÁ LÉČBA KARCINOMU TLUSTÉHO STŘEVA A KONEČNÍKU Pacient je schopný absolvovat intenzivní léčbu 1. linie na bázi oxaliplatinu



POZNÁMKA:

*O úhradě léčby bevacizumabem po první progresi při použití bevacizumabu v první linii léčby nebylo k 1. 8. 2013 rozhodnuto.

O úhradě afliberceptu nebylo k 1. 8. 2013 rozhodnuto.

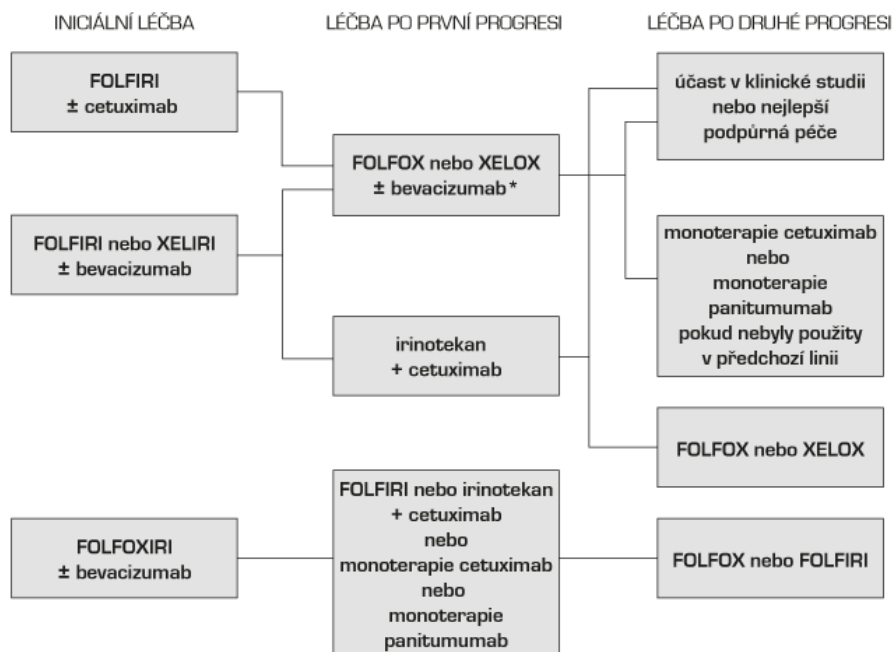
Použití panitumumabu je podmíněno vyloučením mutací RAS, u cetuximabu KRAS.

Monoterapie panitumumabem nebo cetuximabem je možná až po selhání chemoterapie na bázi fluoropyrimidinů, oxaliplatinu, irinotekanu.

Další linie po FOLFOXIRI volit individuálně, především pokud bylo dosaženo léčebné odpovědi a dlouhého PFS při 1. linii léčby.

Obr. 17 Schéma paliativní léčby KRK – 1. linie na bázi oxaliplatinu (Vyzula a kol. 2013)

PALIATIVNÍ SYSTÉMOVÁ LÉČBA KARCINOMU TLUSTÉHO STŘEVA A KONEČNÍKU
Pacient je schopný absolvovat intenzivní léčbu
1.. linie na bázi irinotekanu



POZNÁMKA:

*O úhradě léčby bevacizumabem po první progresi při použití bevacizumabu v první linii léčby nebylo k 1. 8. 2013 rozhodnuto.

Použití panitumumabu je podmíněno vyloučením mutací RAS, u cetuximabu KRAS.

Monoterapie panitumumabem nebo cetuximabem je možná až po selhání chemoterapie na bázi fluoropyrimidinů, oxaliplatinu, irinotekanu.

Další linie po FOLFOXIRI volit individuálně, především pokud bylo dosaženo léčebné odpovědi a dlouhého PFS při 1. linii léčby.

Obr. 18 Schéma paliativní léčby KRK – 1. linie na bázi irinotekanu (Vyzula a kol. 2013)

Pozn.: Tyto dva režimy mají velice podobné léčebné účinky. Tudíž nezáleží na tom, v jakém pořadí jsou indikovány. Většinou se doporučuje začít s režimem na bázi oxaliplatinu, který má nižší výskyt nežádoucích účinků.

10 LITERATURA

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M. (kol.) (2005a) *Základy buněčné biologie*, Espero publishing, Ústí nad Labem, 571– 590.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M. (kol.) (2005b) *Základy buněčné biologie*, Espero publishing, Ústí nad Labem, 618 – 621.

Albet S., Causeret C., Bentejac M., Mandel J.L., Aubourg P., Maurice B. (1997) Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP – binding transport proteins of the peroxisomal membrane. *FEBS Letters* 405, 394 – 7

Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., Romano – Spica V., Dean M. (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Research* 58, 5337 – 5339

Allikmets R., Raskind W.H., Hutchinson A., Schueck N.D., Dean M., Koeller D.M. (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABCB7) in X – linked sideroplastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Human Molecular Genetics* 8, 743 – 9

Alonso E.M., Snover D.C., Montag A., Freese D.K., Whittington P.F. (1994) Histologic pathology of the liver in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 18, 128 – 133

Baker S.J., Fearon E.R., Nigro J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Jessup J.M. (kol.) (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217 – 221

Bakos E., Evers R., Calenda G., Tusnady G.E., Syakacs G., Varadi A., Sarkadi B. (2000) Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *Journal of Cell Science* 113, 4451 – 4461

Bakos E., Homolya L. (2006) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflügers Arch.* 453, 621 – 641

Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B* 57, 289 – 300

Berger J., Albet S., Bentejac M., Netik A., Holzinger A., Roscher A.A., Bugaut M., Forss – Petter S. (1999) The four murine peroxisomal ABC – transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *European Journal of Biochemistry* 265, 719 – 727

Berge K.E., Tian H., Graf G.A., Yu L., Grishin N.V., Schultz J., Kwiterovich P., Shan B., Barnes R., Hobbs H.H. (2001) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771 – 1775

Berggren S., Gall CH., Wollnitz N., Ekelund M., Karlbom U., Hoogstraate J., Schrenk D., Lennernäs H. (2006) Gene and Protein Expression of P-Glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the Small and Large Human Intestine. *Molecular Pharmaceutics* 4, 252 – 7

Berry S., Cunnigham D., Michael M. (kol.) (2007) Preliminary efficacy of bevacizumab with viset line FOLFOX, XELOX, FOLFIRI, and fluoropyrimidines for MCRC: First BEAT. ECCO, Abstrakt 3020

Biemans – Oldehinkel E., Doeven M.K., Poolman B. (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Letters* 580, 1023-1035

Bland K.I., Karakousis C.P., Copeland C.M. (1995) Atlas of surgical oncology, WB Saunders, Philadelphia

Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1295 – 1302

Bosset J.F., Collette L., Calais G., Mineur L., Maingon P., Radosevic – Jelic L., Daban A., Bardet E., Beny A., Ollier J.C. (2006) Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 355, 1114 – 1123

Brenner D.A. (kol.) (2004) Gastroenterology. *Gastrointestinal basic science 2002 – 2003: the year in review. Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2, 9 – 13

Broccardo C., Luciani M.F., Chimini G. (1999) The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 395 – 404

Brousseau M.E., Bodzioch M., Schaefer E.J., Golgkamp A.L., Kielar D., Probst M., Ordovas J.M., Aslanidis C., Lackner K.J., Bloomfield Rubins H., Collins D., Robins S.J., Wilson P.W., Schmitz G. (2001) Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 154, 607 – 611

Burt R.W. (2003) Gastric fundic gland polyps. *Gastroenterology* 125, 1462 – 9

Bustin S.A., V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611 – 622

- Butterworth** A.S., Higgins J.P., Pharoah P. (2006) Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *European Journal of Cancer* 42, 216 – 227
- Cappell** M.S. a Goldberg E.S. (1992) The relationship between the clinical presentation and spread of colon cancer in 315 consecutive patients: a significant trend of earlier cancer detection from 1982 through 1988 at a university hospital. *Journal of Clinical Gastroenterology* 14, 227 – 235
- Cappell** M.S. (2005) The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. *Medical Clinics of North America* 89, 1 – 42
- Cohn** J.A., Friedman K.J., Noone P.G., Knowles M.R., Silverman L.M., Jowell P.S. (1998) Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *The New England Journal of Medicine* 339, 653 – 8
- Cunningham** D., Humblet Y., Siena S. (kol.) (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 351, 337 – 345
- De Iudicibus** S., Pellegrin A., Stocco G., Bartoli F., Bussani R., Decorti G. (2008) ABCB1 Gene Polymorphisms and Expression of P – glycoprotein and Long – term Prognosis in Colorectal Cancer. *Anticancer Research* 28, 3921 – 8
- De Miranda** N.F., Nielsen M., Pereira D., van Puijenbroek M., Vasen H.F., Hes F.J., van Wezel T., Morreau H. (2009) MUTYH-associated polyposis carcinomas frequently lose HLA class I expression – a common event amongst DNA-repair-deficient colorectal cancers. *The Journal of Pathology* 291, 69 – 76
- Dean** M., White M.B., Amos J., Gerrard B., Stewart C., Khaw K.T., Leppert M. (1990) Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 61, 863 – 870
- Dean** M., Hamon Y., Chimini G (2001a) The human ATP – binding cassette (ABC) transporter superfamily. *The Journal of Lipid Research* 42, 1007 – 1017
- Dean** M., Hamon Y., Chimni G. (2001b) The human binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* 42, 1007-1017
- Dean** M. (2002) The human ATP-binding cassette (ABC) transporters superfamily. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology, USA
- Dean** M. a Annilo T. (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6, 291 – 9

Di Pietro, Dayan G., Conseil G., Steinfelds E., Krell T., Tromprier D., Baubichon – Cortay H., Jault J. (1999) P – glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 925 – 939

Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao X., Rishi A.K., Ross D.D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF – 7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95, 15665 – 15670

Duan Z., Brakor K.A., Seiden M.V. (2004) Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 833 – 8

Efferth T. (2001) The human ATP – binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Current Molecular Medicine* 1, 45 – 6

Efferth T., Volm M. (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* 107, 155 – 176

Fait T., Vrablík M., Češka R. (kol.) (2011a) *Preventivní medicína*, Maxdorf Jessenius, Praha, 28 – 31

Fait T., Vrablík M., Češka R. (kol.) (2011b) *Preventivní medicína*, Maxdorf Jessenius, Praha, 339 – 346

Falterman K.W., Hill C.B., Markey J.C., Fox J.W, Crohn I. Jr. (1974) Cancer of the colon, rectum, and anus: A review of 2313 cases. *Cancer* 34, 951 – 9

Fearon E. a Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759 – 767

Ferrana N., Hillan K.J., Gerber H.P. (kol.) (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti – VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 2335 – 2342

Filipits M., Suchomel R.W., Dekan G., Stuglbauer W., Haider K., Depisch D., Pirker R. Ex (1997) expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in colorectal carcinomas. *British Journal of Cancer* 75, 208 – 212

Fleshner P., Slater G., Aufses A.H. Jr. (2001) Age and sex distribution of patients with colorectal cancer. *Cancer Detection and Prevention Journal* 25, 55 – 61

Foon K.A., Yang X – D. Werner L.M. (kol.) (2004) Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti – epidermal growth factor receptor antibody. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physiology* 58, 984 – 990

Fromm M.F. (2002) The influence of MDRI polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 1295 – 1310

Giantonio B.J., Catalano P.J., Metropol N.J. (kol.) (2007) Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leukovorin (FOLFOX 4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1539 – 1544

Ginson S., Tu S., Oyer R. (kol.) (1999) Epidermal growth factor receptor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 17612 – 8

Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP – dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2, 48 – 58

Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H. (kol.) (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589 – 600

Gruenberger B., Tamandel J., Schuller J., Scheithauer W., Zielinski Ch., Herbst F., Gruenberger T. (2008) Bevacizumab, Capecitabin, and Oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patient with potentially curable metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26, 1830 – 1835

Gupta N., Martin P.M., Miyauchi S., Ananth S., Herdman A.V., Martidale R.G., Podolsky R., Ganapathy V. (2006) Down – regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343, 571 – 7

Gutmann H., Hruz P., Zimmermann CH., Beglinger Ch., Drewe J. (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochemical Pharmacology* 70, 695 – 9

Hamilton S.R., Liu B., Parsons R.E., Papadopoulos N., Jen J., Powell S.M. (kol.) (1995) The molecular basis of Turcot’s syndrome. *The New England Journal of Medicine* 332, 839 – 847

Han J.Y., Lim H.S., Yoo Y.K., Shin E.S., Park Y.H., Lee S.Y., Lee J.E., Lee D.H., Kim, H.T., Lee J.S. (2007) Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 10, 138 – 147

Hanahan D., Wienberg R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 645 – 674

- Harangi M.**, Kaminski W.E., Fleck M., Orsó E., Zeher M., Kiss E., Szekanez Z., Zilahi E., Marienhagen J., Aslanidis C., Paragh G., Bolstad A.I., Jonsson R., Schitz G. (2005) Homozygosity for the 168His variant of the minor histocompatibility antigen HA – 1 is associated with reduced risk of primary Sjogren’s syndrome. *European Journal of Immunology* 35, 305 – 317
- Hawk E.T.** (kol.) (2005) Prevention and therapy of colorectal cancer. *The Medical Clinics of the North America* 89, 85 – 110
- Heppner G.K.**, Trzepacz C., Tuohy T.M., Groden J. (2002) Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 8161 – 6
- Hickman J.A.** a Tritton T.R. (1993) *Cancer chemotherapy*, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Higgins C.F.** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8, 67 – 113
- Hinoshita E.**, Uchiyama T., Taguchi K. (kol.) (2000) Increased Expression of an ATP – binding Cassette Superfamily Transporter, Multidrug Resistance Protein 2, in Human Colorectal Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 6, 2401 – 7
- Hodges L.M.**, Markova S.M., Chinn L.W., Gow J.M., Kroetz D.L., Klein T.E., Altman R.B. (2011) Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P – glycoprotein). *Pharmacogenetic genomics* 21, 152 – 161
- Hodgson D.C.**, Fuchs C.S., Ayanian J.Z. (2001) Impact of patient and provider characteristics on the treatment and outcomes of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 501 – 515
- Holubec L.** (kol.) (2004a) *Kolorektální karcinom – současné možnosti diagnostiky a léčby*, Grada, Praha, 103 – 7.
- Holubec L.** (kol.) (2004b) *Kolorektální karcinom – současné možnosti diagnostiky a léčby*, Grada, Praha, 31 – 5
- Hurwitz H.I.**, Fehrenbacher L., Novotny W. (kol.) (2004) Bevacicimab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 350, 2335 – 2342
- Huxley R.R.**, Ansary – Moghaddam A., Clifton P., Czernichow S., Parr C.L., Woodward M. (2009) The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of epidemiological evidence. *International Journal of Cancer* 125, 171 – 180

Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F. (1990) Structural model of ATP – binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362 – 5

Choi Ch.H. (2005) ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 5:30

Chung D.C. a Rustgi A.K. (1995) DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 109, 1685 – 1699

Ile K.E., Davis W. Jr., Boyd J.T., Soulika A.M., Tew K.D. (2004) Identification of a novel first exon of the human ABCA2 transporter gene encoding a unique N – terminus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1678, 22 – 32

Inai, T. Macusco M., Hashizume H. (kol.) (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *The American Journal of Pathology* 165, 35 – 52

Ivanovich J.L., Read T.E., Ciske D.J., Kodner I.J., Whelan A.J. (1999) A practical approach to familial and hereditary colon cancer. *American Journal of Medicine* 107, 68 – 77

Jain R.K. (2001) Normalizing tumor vaskulature with antiangiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine* 7, 987 – 989

Jain R.K. (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58 – 62

Kaminski W.E., Piehler A., Schmitz G. (2000) Genomic organization of the human cholesterol-responsive ABC transporter ABCA7: tandem linkage with the minor histocompatibility antigen HA – 1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 782 – 9

Kaminski W.E., Wenzel J.J., Piehler A., Langman T., Schitz G. (2001) ABC6, a novel a sbuclass ABC transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 1295 – 1301

Kelsel D.P., Norgett E.E., Unsworth H., Teh M.T., Cullup T., Mein C.A., Dopping – Hepenstal P.J., Dale B.A., Tadini G., Fleckman P., Stephens K.G., Sybert V.P., Mallory S.B., North B.V., Witt D.R., Sprecher E., Taylor A.E., Ilchyshyn A., Kennedy C.T., Goddyear H., Moss C., Paige D., Harper J.I., Young B.D., Leigh I.M., Eady R.A.,

- O'Toole E.A. (2005) Mutations in ABCA12 underlie the severe congenital skin disease harlequin ichthyosis. *The American Journal of Human Genetics* 76, 794 – 803
- Kim B.**, Fatayer H., Hanby A.M., Horgan K., Perry S.L., Valleley E.M.A., Verghese E.T., Williams B.J., Thorne J.L., Hughes T.A. (2013) Neoadjuvant chemotherapy induces Expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease free survival in breast cancer. *PLoS ONE* 8, e62766
- Kinzler K.W.**, Nilbert M.C., Su L.K., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B. (kol.) (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661-5
- Kinzler K.W.** a Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159 – 170
- Kipsal G.**, Csere P., Guiard B., Lill R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Letters* 418, 346 – 350
- Klener P.** (1999) Chemotherapy side effects and their management: In Klastersky J., Schimpff S.C., Senn H.J. (kol.) *Supportive care in cancer*, Marcel Dekker, New York, 279 – 296
- Klener P.** (kol.) (2002a) *Klinická onkologie*, Galén, Praha, 407 – 415
- Klener P.** (kol.) (2002b) *Klinická onkologie*. Galén, Praha, 195 – 198
- Klener P.Jr.** a Klener P. (2013a) *Principy systémové protinádorové léčby*, Grada, Praha, 15 – 17
- Klener P.**, Klener P. Jr. (2013b) *Principy systémové protinádorové léčby*, Grada, Praha, 51 – 3
- Klener P.**, Klener P. Jr. (2013c) *Principy systémové protinádorové léčby*, Grada, Praha, 167 – 9
- Knudsen A.L.**, Bisgaard M.L., Bulow S. (2003) Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a review of the literature. *Familial Cancer* 2, 43 – 55
- Ko C.W.**, Dominitz J.A., Nguyen T.D. (2003) Fecal occult blood testing in a general medical clinic: comparison between guaiac-based and immunochemical-based tests. *American Journal of Medicine* 115, 111 – 4
- Krus Ivona** (2013): *Vliv biotransformace a transportu xenobiotik na incidenci rakoviny kolorekta a účinky chemoterapie*. Dizertační práce, 3. Lékařská fakulta Univerzita Karlovy, Praze
- Lage H.** (2008) An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3145 – 3167

Langmann T., Klucken J., Reil M., Liebisch G., Luciani M.F., Chimini G., Kaminski W.E., Schmitz G. (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol – dependent regulation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 257, 29 – 33

Le Saux O., Urban Z., Tschuch C., Csiszar K., Bacchelli D., Quaglino D., Pasquali – Ronchetti I., Pope F.M., Richards A., Terry S., Bercovitch L., de Paepe A., Boyd C.D. (2000) Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elastinum. *Nature Genetics* 25, 223 – 7

Lee M.H., Lu K., Hazard S., Yu H., Shulenin S., Hidaka H., Kojima H., Allikments R., Sakuma N., Pegoraro R., Srivastava A.K., Salen G., Dean M., Patel S.B. (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genetics* 27, 79 – 83

Lee Y.C., Lee Y.L., Chuang J.P., Lee L.C. (2013) Differences in survival between colon and rectal cancer from SEER data. *Plos One* 8, 78709

Leibel S.A., Phillips T.L. (1998) Textbook of radiation oncology, WS Sanders, Philadelphia

Lemmon M.A., Bu Z., Ladbury J.E. (kol.) (1997) Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGRF dimer. *Embo Journal* 16, 281 – 294

Lengauer C., Kinzler K., Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643 – 9

Luciani M.F., Denizot F., Savary S., Mattei M.G., Chimini G. (1994) Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21, 150 – 9

Lutucuta S., Ballantyne C.M., Elghannam H., Gotto A.M. Jr., Marian A.J. (2001) Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circulation Research* 88, 1198– 1206

Macrae F.A. a St. John D.J. (1982) Relationship between patterns of bleeding and Hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. *Gastroenterology* 82, 891 – 8

Marton M.J., Vazquez de Aldana C.R., Qiu H., Chakraborty K., Hinnebusch A.G. (1997) Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2 α kinase GCN2. *Molecular and Cellular Biology* 17, 4474 – 4489

- Mata N.L., Weng J., Travis G.H. (2000)** Biosynthesis of a major lipofuscin fluophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 97, 7154 – 9
- Mellor H.R. a Callaghan R. (2008)** Rezistance to Chemotherapy in Cancer: A complex and Integrated Cellular Responce. *Pharmacology* 81, 275 – 300
- Midgley R. a Kerr D. (1999)** Colorectal cancer. *Lancet* 353, 391 – 9
- Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger I., Dean M., Fojo T., Bates S.E. (1999)** Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research* 59, 8 – 13
- Momburg F., Roelse J., Howard J.C., Butcher G.W., Hammerling G.J., Neefjes J.J. (1994)** Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human mouse and rat. *Nature* 367, 648 – 651
- Mooser J., Douar A.M., Sarde C.O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A.M., Mandel J.L., Aubourg P. (1993)** Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726 – 710
- Morgan T.H. (1910)** Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32, 120 – 2
- Morrisson A.S. (1992)** Screening in chronic diseases, Oxford University Press, New York
- Muth D.M., Anderle P., Fiaux M., Mansourian R., Vidal K., Wahli W., Williamson G., Roberts M.A. (2004)** Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract. *Physiological Genomics* 17, 11 – 20
- Myohanen S.K., Baylin S.B., Herman J.G. (1998)** Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Research* 58, 591 – 3
- Natarajan K., Xie Y., Baer M.R., Ross D.D. (2012)** Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Phrmcology* 83, 1084–1103
- O'Connor R. (2007)** The pharmacology of Cancer Resistance, Anticancer research, Dublin, 1267 – 127
- Parmentier L., Clepet C., Boughdene – Stambouli O., Lakhdar H., Blanchet – Bardon C., Dubertret L., Wunderle E., Pulcini F., Fizames C., Weissenbach J. (1999)** Lamellar ichthyosis: further narrowing, physical and aexpression mapping of the chromosome 2 candidate locus. *European Journal of Human Genetics* 7, 77 – 87
- Perry M.C. (kol.) (1992)** Toxicity of chemotherapy, Williams and Wilkins, Baltimore

- Pešková M. (1998)** Paliativní chirurgická onkologie. In Jakoubková J. (kol.): Paliativní medicína, Galén, Praha, 21 – 30
- Pujol A., Troffer – Charlier N., Metzger E., Chimini G., Mandel J.L. (2000)** Characterization of the adrenoleukodystrophy related (ALDR, ABCD2) gene promoter: inductibility by retinoic acid and forskolin. *Genomics* 70, 131 – 9
- Quinton P.M. (1999)** Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiological Reviews* 79, S3 – S22 (1999)
- Raaf J.H. (1994)** Administration of chemotherapeutic agents. Techniques and controversies, *Support Care Cancer*, 335 – 346
- Rejtar A. a Vojtěšek B. (2002)** Obecná patologie nádorového růstu, Grada, Praha, 28 – 30
- Robbiani D.F., Finch R.A., Jager D., Muller W.A., Sartorelli A.C., Randolph G.J. (2000)** The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP – 3beta, ELC) – dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103, 757 – 768
- Robbins D.H. a Itzkowitz S.H. (2002)** The molecular and genetic basis of colon cancer. *Medical Clinics of North America* 86, 1467 – 1495
- Wanders J.A.R., Visser W.F., van Roemund C.W.T., Kemp S., Waterham H.R. (2007)** The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch – European Journal of Physiology* 453. 719 – 734
- Sánchez C., Mendoza P., Contreras H.R., Vergana J., McCubrey J.A., Huidobro Ch., Castellón E. (2009)** Expression of Multidrug Resistance Proteins in Prostate Cancer Is Related With Cell Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs. *The Prostate* 69, 1448 – 1459
- Seifert B. (2012)** Screening kolorektálního karcinomu, Maxdorf Jessenius, Praha, 42-92
- Sgarom F.J., Liu R., Qu Q., Romsicki Y. (2001)** Exploring the structure as fluorescence spectroscopic tools. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12, 257 – 265
- Sia K., Kaniwa N., Itoda M., Saioto Y., Hasegawa R., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Shirao K., Minami H., Ohtsu A., Yoshida T., Saijo N., Kitamura N., Ozawa S., Sawada J. (2003)** Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 13, 741 – 751
- Simon J.B. (1998)** Fecal occult blood testing: clinical value and limitations. *Gastroenterologist* 6, 66-78
- Slebos R.J. a Rodenhuis S. (1992)** The ras gene family in human non – small – cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monography* 13, 23 – 9 (1992)

- Sobin L.H.**, Wittekind Ch. (kol.) (2004) TNM Classification of malignant tumours, Wiley-Liss, New York.
- Sun H.**, Molday R.S., Nathans J. (1999) Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified *h*nat reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 8269 – 8281
- Suraweera N.**, Duval A., Reperant M., Vaury C., Furlan D., Leroy K. (kol.) (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123, 1804 – 1811
- Szakács G.**, Annereau J.P., Lababidi S., Shankavaram U., Arciello A., Bussey J.K., Reinhold W., Guo Y., Krah D.G., Reimers M., Weinstein N.J., Gottesman M.M. (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 129 – 137
- Taipalensuu J.**, Tornblom H., Lindberg G., Einarsson C., Sjöqvist F. (kol.) (2001) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299, 164 – 170
- Tetsuya O.**, Hiroaki O., Takehiro U. (kol.) (2008) MRP7/ABCC10 expression is a predictive biomarker for the resistance to paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 1150 – 5
- The Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group** (2004) A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 350, 2050 – 9
- Thomas P.M.**, Cote G.J., Wohlk N., Haddad B., Mathew P.M., Rabl W., Aguilar – Bryan L., Gagel R.F., Bryan J. (1995) Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268, 426 – 9
- Ullrich A.** and Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203 – 212
- Van Cutsem E.**, Nowacki M., Lang I. (kol.) (2007) Randomised phase III study of irinotecan and FUFA with or without cetuximab in the first – line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): The CRYSTAL trial. *Journal of Clinical Oncology*, Abstract 4000
- Van Helvoort A.**, Smith A.J., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel A.H., Borst P., van Meer G. (1996) MDR1 P – glycoprotein is a lipid translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507 – 517

- Vasen H.F., Mecklin J.P., Khan P.M., Lynch H.T. (1991)** The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Diseases of the Colon and Rectum* 34, 424 – 5
- Veldhuizen R., Possmayer F. (2004)** Phospholipid metabolism in lung surfactant. *Sibcellular Biochemistry* 37, 359 – 388
- Volgestein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M. (kol.) (1988)** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine* 319, 525 – 532
- Vulevic B., Chen Z., Boyd J.T., Davis W. Jr., Walsh E.S., Belinsky M.G., Tew K.D. (2001)** Cloning and characterization of human adenosine 5'- triphosphate-binding cassette, sub – family A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Research* 61, 3339 – 3347
- Vyzula R. (kol.) (2013)** *Modrá kniha České onkologické společnosti, Masarykův onkologický ústav, Brno*, 62 – 78
- Wenzel J.J., Kaminski W.E., Peihler A., Heimerl S., Langmann T., Schmitz G. (2003)** ABCA10, a novel cholesterol – regulated ABC6 – like ABC transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 1089 – 1098
- Wu Ch.P., Hsieh Ch.H., Wu Y.S. (2011)** The Emergence of Drug Transporter-Mediated Multidrug Resistance to Cancer Chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics* 8, 1996 – 2011
- Yamano Y., Funahashi H., Kawanami O., Zhao L.X., Ban N., Uchida Y., Morohoshi T., Ogawa J., Shioda S., Inagaki N. (2001)** ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Letters* 508, 221 – 5
- Yan P., Saraga E.P., Bouzourene H. (kol.) (1999)** Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *The Journal of Pathology* 189, 207 – 212
- Yashiro M., Carethers J.M., Laghi L., Saito K., Slezak P., Jaramillo E. (kol.) (2001)** Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Research*, 2676 – 2683
- Zhang Z., Wang J., Shen B., Peng CH., Zheng M. (2012)** The ABCC4 gene is a promising target for pancreatic cancer therapy. *Gene* 491, 194 – 9