

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**Podmínky vzniku a vlastnosti nádorových buněk a jejich
schopnosti unikat imunitnímu dozoru**

Bakalářská práce

2014

Autor: Klára Hošková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Hošková**
Osobní číslo: **C11232**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Podmínky vzniku a vlastnosti nádorových buněk a jejich schopnosti unikat imunitnímu dozoru**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

1. Téma práce bude rozděleno na tři dílčí kapitoly, nejprve se studentka zaměří na popis struktury, morfologie a vlastností nádorových buněk, všimne si rozdílu mezi maligně a benigně zvrhlými buňkami a provede základní přehled nádorů vzniklých z různých typů tkání. Cílem bude ujasnit si i terminologii používanou v klinické praxi.
2. Další část práce by se měla zaměřit na mechanismy identifikace a likvidace nádorových buněk imunitním systémem. Studentka popíše složky imunitního systému, které se protinádorové obrany účastní a popíše podrobně mechanismy jak rozpoznávání, tak odstraňování buněk z organismu.
3. V poslední části se studentka zaměří na mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním dozorem, jak nádorové buňky např. mění svůj fenotyp, expresi genů a tvorbu tlumících látek.
4. Studentka bude pravidelně konzultovat svoji práci se školitelem, předkládat dílčí texty a podle pokynů školitele upřesňovat obsah práce. Jako podklady k vypracování práce bude studentka používat recentní články v odborných časopisech, monografie v českém i anglickém jazyce.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce: **18. července 2014**


prof. Ing. Petr Ložák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2014

PROHLAŠUJI:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích 4. 7. 2014

Klára Hošková

Poděkování:

Velmi ráda bych poděkovala doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné konzultace, cenné rady, vstřícné jednání a velkou pomoc při vedení mé bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na vznik a vlastnosti nádorových buněk a jejich vztah k imunitnímu systému. V první kapitole této práce je stručný popis fyziologické eukaryotické buňky se zaměřením na buněčné děje, které se mutagenními vlivy mění a vznik a vlastnosti nádorové buňky. Další kapitola se zabývá morfologií a vlastnostmi nádorové tkáně a také základním rozdělením typů nádorů. Následuje kapitola o vzniku metastáz a významu cirkulujících nádorových buněk a diseminovaných nádorových buněk. A nakonec se poslední kapitola zabývá působením imunitního systému na nádorové buňky a mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním dozorem.

KLÍČOVÁ SLOVA

nádorové buňky, nádorová tkáň, metastáze, imunitní dozor, únik

ANOTATION

The bachelor thesis is focused on formation and properties of tumor cells and their relationship to the immune system. The first chapter describes briefly the physiological eukaryotic cells, focusing on the cellular events that are changing mutagenic effects and the formation and properties of tumor cells. Another chapter deals with the morphology and properties of tumor tissue and the basic division of tumor types. Followed by chapter on the development of metastases and significance of circulating tumor cells and disseminated tumor cells. The last chapter deals with the effects of the immune system on tumor cells and mechanisms of tumor cell escape immune surveillance.

KEYWORDS

tumor cells, tumor tissue, metastases, immune surveillance, escape

OBSAH

ÚVOD	10
1. VZNIK NÁDOROVÉ BUŇKY.....	11
1.1. EUKARYOTICKÁ BUŇKA	11
1.1.1 Viabilita buňky	11
1.1.2 Regulace buněčného cyklu	14
1.1.3 Diferenciace buněk a formování tkání.....	18
1.1.4 Buněčná smrt	20
1.2. NÁDOROVÁ BUŇKA	26
1.3. VZNIK NÁDOROVÉ BUŇKY	26
1.3.1 Onkogenní faktory - vnější	27
1.3.2 Onkogenní faktory – vnitřní	29
1.3.3 Vlastnosti nádorových buněk.....	30
1.3.4 Morfologické vlastnosti.....	30
1.3.5 Vlastnosti maligních buněk	32
1.3.6 Pěstování maligních buněk in vitro	36
2. TKÁŇ TVOŘENÁ NÁDOROVÝMI BUŇKAMI.....	38
2.1. MORFOLOGIE NÁDOROVÉ TKÁNĚ	38
2.2. VLASTNOSTI NÁDOROVÉ TKÁNĚ	39
2.3. CHARAKTER NÁDOROVÉ TKÁNĚ	39
2.3.1 Benigní nádorová tkáň.....	39
2.3.2 Maligní nádorová tkáň.....	39
3. CÍRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY S METASTATICKÝM POTENCIÁLEM 41	
3.1. VZNIK METASTÁZ	41
3.2. CÍRKULUJÍCÍ METASTATICKÁ BUŇKA	42
3.3. DISEMINOVANÁ METASTATICKÁ BUŇKA	43
4. ÚČAST IMUNITNÍHO SYSTÉMU V BOJI PROTI NÁDOROVÝM BUŇKÁM...44	
4.1. SLOŽKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU ÚČASTNÍCI SE PROTINÁDOROVÉ OBRANY	45
4.2. ROZPOZNÁNÍ NÁDOROVÝCH BUŇEK IMUNITNÍM SYSTÉMEM	48
4.3. LIKVIDACE NÁDOROVÝCH BUŇEK IMUNITNÍM SYSTÉMEM	48
4.4. MECHANISMY ÚNIKU NÁDOROVÝCH BUŇEK PŘED IMUNITNÍM DOZOREM	50
5. ZÁVĚR	53
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

SEZNAM ZKRATEK

AFP	Alfa-fetoprotein
APC	Antigen presenting cells; antigen prezentující buňky
ATP	Adenosintrifosfát
BCR	B-cell receptor; receptor B-lymfocytů
CAD	Caspase-activated DNase; kaspázou aktivovaná DNáza
CALLA	Common acute lymphocytic leukemia antigen; antigen akutní lymfatické leukémie
CDK	Cyclin-dependent kinase; cyklin-dependentní kináza
CEA	Cancer embryonic antigen; karcinoembryonální antigen
CTC	Circulating tumor cells; cirkulující nádorové buňky
CTL	Cytotoxin T-cells; cytotoxické T-lymfocyty
DC	Dendritic cells; dendritické buňky
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
DTC	Disseminated tumor cells; diseminované nádorové buňky
EBNA	Epstein-Barr virus nuclear antigen; nukleární antigen viru Epstein-Barr
EBV	Epstein-Barr virus
ECM	Extracellular matrix; extracelulární matrix
EMT	Epithelial mesenchymal transition; epiteliální mezenchymální přechod
EPCAM	Epithelial cell adhesion molekule; adhezní molekuly epitelových buněk
FGF	Fibroblast growth factor; růstový faktor fibroblastů
GADD45	Growth arrest and DNA damage genes
GAP	Glyceraldehyd-3-fosfát
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GTP	Guanosin-3-fosfát
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2; receptor lidského epidermálního růstového faktoru
HHV-8	Human herpesvirus 8; lidský herpesvirus 8
HPV	Human papillomavirus; lidský papillomavirus
HTLV-I/II	Human T-lymphotropic virus – I/II; lidský T-lymfotropní virus – I/II

ICAD	Inhibitor caspase-activated DNase; inhibitor DNázy aktivovanou kaspázou
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MAGE 1	Melanoma-associated antigen 1; s melanomem spojený antigen 1
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MEM	Minimum essential medium
MHC	Major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NLR	Nukleotide-binding oligomerization domain receptor
PAMP	Patogen-associated molecular patterns; s patogeny spojené molekulární struktury
PGE2	Prostaglandin E2
PSA	Prostatic specific antigen; prostatický specifický antigen
Rb	Retinoblastoma; retinoblastomový
RNA	Ribonukleotid acid; ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell park memorial institute medium
TAA	Tumor associated antigens; antigeny asociované s nádory
TCR	T-cell receptor; receptor T-lymfocytů
TERT	Telomerase reverse transcriptase; telomeráza reverzní transkriptázy
TGF- β	Transforming growth factor β ; transformující růstový faktor
TNF	Tumor necrosis factor; tumor nekrotizující faktor
TSA	Tumor specific antigens; antigeny specifické pro nádory
VEGF	Vascular endothelial growth factor; vaskulární endoteliální růstový faktor

ÚVOD

Nádorové onemocnění je v ČR druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Ročně umírá na nádorové onemocnění více než 27 tisíc osob. Nádory vznikají na základě mutací, při kterých dochází k opakovaným zásahům v DNA obsahující geny nebo jejich regulační oblasti řídící či ovlivňující buněčný cyklus. Zasažením těchto genů pak dochází k nekontrolovatelnému nádorovému bujení. Faktory vzniku mutací se nacházejí všude kolem nás, přes fyzikální, chemické, biologické vlivy ale další běžné věci jako je třeba životní styl. Následně vznikají mutované buňky, které mění svoji morfologii a vlastnosti a odlišují se tak od normálních buněk.

Proliferací nádorových buněk pak vzniká nádorová tkáň tvořící nádor. I nádorová tkáň se od normální liší svojí morfologií a vlastnostmi. Podle toho z jakého typu buněk a tkání nádor vzniká, můžeme určit několik druhů nádorů. Neméně důležité je i dělení podle invazivity nádoru na benigní a maligní, přičemž je důležité zohlednit i metastatický potenciál.

Organismus se z určité části dokáže proti vzniku nádoru chránit prostřednictvím imunitního systému tzv. protinádorovou imunitou. I když nádorové buňky vznikají po celý život, imunitní dozor je dokáže různými mechanismy rozpoznat a zlikvidovat. Může však nastat okamžik, kdy imunitní systém není plně funkční a dostatečně schopen na buňky reagovat. Takové riziko nastává u pacientů po transplantaci v důsledku podávání imunopresiv (např. cyklosporinu A). Imunosupresivní léky se podávají, aby nedošlo k rejekci transplantátu, a inhibují tak stimulaci T-buněk, které jsou důležité pro protinádorovou imunitu (Gaumann et al., 2008). Riziko vzniku maligních transformací je vyšší i u pacientů s primární imunodeficiencí, vznikající v důsledku deficitu funkce imunitního systému (např. u pacientů s těžkými kombinovanými imunodeficiencemi, běžnou variabilní imunodeficiencí) (Kersey et al., 1973). A neméně důležitým faktorem při rozvoji nádoru je i tzv. únik nádorových buněk před imunitním systémem, při kterém se nádorové buňky před imunitním systémem chrání různými mechanismy. V závislosti na všech faktorech následně dochází k rozvoji nádorového bujení.

1. VZNIK NÁDOROVÉ BUŇKY

1.1. Eukaryotická buňka

Eukaryotická buňka je základní stavební jednotkou tkáně a orgánů mnohobuněčných organismů. Diferencuje se z primární totipotentní nesespecializované kmenové buňky působením hormonů a růstových faktorů za vzniku strukturně i funkčně specializované buňky tvořící tkáně a orgány. Ačkoliv mají všechny diferencující se buňky stejný genom, různou aktivitou genů se formují na buňky morfologicky a funkčně odlišné (Alison et al., 2002). Taková buňka dorůstá do určité velikosti a tvaru se specifickými povrchovými znaky jako jsou receptory, transportní proteiny. Každá buňka po ukončené diferenciaci plní po určitý čas svoji funkci. Buňky metabolizují určité látky, jsou strukturní nebo stavební jednotkou tkání, sekretují do svého okolí signální molekuly, interagují s okolními buňkami. Po určitém čase je však buňka odstraněna. Smrt buňky a její efektivní odstranění je za fyziologických podmínek kontrolováno buněčnými složkami imunitního systému.

1.1.1 Viabilita buňky

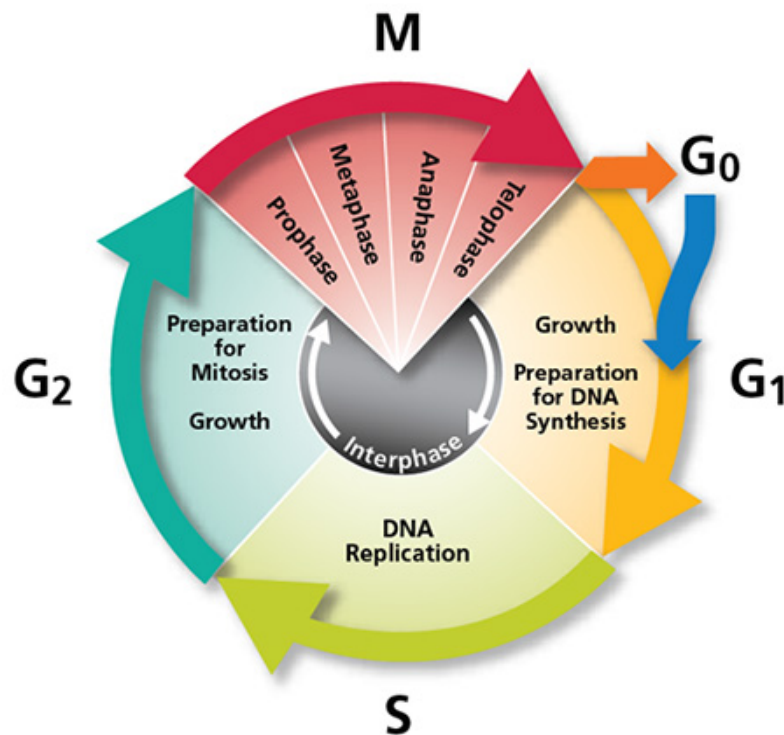
Metabolismus

Mezi projevy viability patří metabolismus, neboli zpracování a využití přijímaných látek pro syntézu nezbytně důležitých látek pro její existenci a také vylučování odpadních látek. Díky metabolismu získává buňka látky potřebné pro svůj růst a život, zpracováním přijatých látek v potravě. Většina přijatých látek je spotřebována a přeměněna na energii potřebnou i pro další pochody buňky. K úpravě a zpracování těchto látek dochází v enzymatických procesech. Nejvíce využívaná látka pro získání energie je glukóza, která je odbourávána procesem glykolýzy a oxidativní fosforylací až na ATP (adenosintrifosfát) anebo je ukládána ve formě glykogenu jako zásobní energie. Dalšími látkami jsou mastné kyseliny podléhající β oxidaci za vzniku ATP a ukládající se ve formě triacylglycerolů, jako rezervní forma energie. A neméně důležité jsou i aminokyseliny, z kterých se syntetizují bílkoviny. Ne všechny si umí buňka syntetizovat sama, proto se některé musí získávat v potravě. Při odbourávání a syntéze vzniká určité množství odpadních látek, které buňka upravuje a modifikuje, v dalších cyklech k těmto účelům určených, aby se v ní nehromadili, přičemž by jí škodili a vylučuje je ven. Příkladem takového procesu je ornitinový cyklus, kde se z amoniaku vzniklého odbouráváním aminokyselin syntetizuje močovina.

Dělení buňky

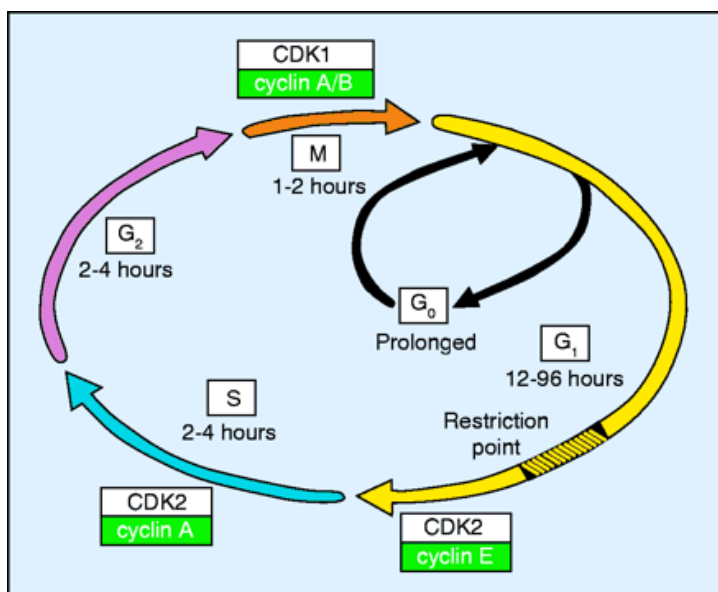
Dalším charakteristickým znakem buňky je uchování a přenos genetické informace. Genetická informace je dlouhodobě uchovávána a přenášena z generace na generaci ve formě DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina). Genetická informace je předávána dalším generacím, tedy z mateřské na dceřiné buňky, buněčným dělením. Při tomto ději je veškerý buněčný materiál zdvojen, včetně DNA a RNA molekul, a také specifických organel jakými jsou např. mitochondrie a ribozomy. Zkopírování a přenos genetické informace z jedné buňky na další generaci buněk probíhá v rámci přísně řízeného procesu neboli buněčného cyklu (Rosenthal, 1994).

V průběhu procesu musí být DNA přesně replikována a identické chromozomální kopie musí být rozděleny do dvou dceřiných buněk. Je to složitý proces, který zahrnuje řadu regulačních proteinů, řídících buňku prostřednictvím specifického sledu událostí vedoucích k mitóze a výrobě dvou dceřiných buněk (Israels & Israels, 2000). Buněčné dělení je cyklická souhra 4 fází, a to G₁-fáze, S-fáze, G₂-fáze a M-fáze (Obr. č. 1).



Obrázek 1- Buněčný cyklus (G₀ je klidová fáze, G₁ je 1. fáze buněčného cyklu kde dochází k růstu a přípravě buňky k syntéze DNA, S je 2. fáze kde probíhá replikace DNA, G₂ je 3. fáze kde dochází k růstu a přípravě buňky na mitózu, M je poslední fáze neboli mitóza) (převzato a modifikováno z [URL-1])

G1-fáze navazuje na mitózu neboli M-fázi. Je zpravidla nejdelším úsekem buněčného cyklu (Obr. č. 2). Uvádí se, že buněčný cyklus začíná v G1-fázi a to zvýšenou expresí cyklinu D. Cyklin D se pak spojuje s CDK4 a CDK6 a tvorba komplexu cyklin/CDK vede k fosforylaci a aktivaci CDK (cyklin-dependentní kináza). Aktivované CDK pak fosforylují Rb protein (retinoblastomový protein), který má rozhodující úlohu v regulaci G1-fáze, kdy může být cyklus odložen nebo opuštěn. Po fosforylaci Rb s CDK4/6, Rb disociuje s E2F, což umožňuje E2F přepsat množství reagujících genů (včetně cyklinu E) nutných pro přechod. Rb je udržován hyperfosforylovaný po zbytek cyklu. V pozdní G1-fázi pak dochází k zvýšené expresi cyklinu E, který se váže s CDK2 do komplexu cyklin E/CDK2, nutného pro přechod z G1-fáze do S-fáze. Následuje zvýšená exprese cyklinu A, která se vyskytuje v G1/S přechodu a přetrvává až do S-fáze (Israels & Israels, 2000). V jádře se tedy syntetizují všechny typy RNA, v cytoplasmě probíhá proteosyntéza a buňka roste (Vermeulen et al., 2003).



Obrázek 2 – Schéma buněčného cyklu s uvedením účastí CDC kináz v rámci jednotlivých fází (G₁ fáze trvá cca 12 – 96 hodin a přechod do G₂ fáze umožňuje komplex CDK2/cyklin E, S fáze trvá cca 2-4 hodiny za regulace komplexu CDK2/cyklin A, G₂ fáze trvá 2-4 hodiny a M fáze trvá 1-2 hodiny za regulace komplexem CDK1/cyklin A/B) (převzato a modifikováno z Israels, 2000)

V S-fázi dochází k vazbě cyklinu A s CDK2 za vzniku komplexu cyklin A/CDK2. Tím se zahájí syntéza DNA. Ve druhé části S-fáze cyklin A asociuje s CDK1 za vzniku komplexu cyklin A/CDK1 (Israels & Israels, 2000). V jádře probíhá replikace DNA, čímž se po ukončení této fáze v jádře nachází dvojnásobné množství DNA (Vermeulen et al., 2003).

Během G2-fáze v buňce probíhá transkripce, translace a proteosyntéza, čímž buňka dále roste. Zdvojují se i některé organely a další buněčné struktury. Jedná se o přípravnou fázi k mitóze. Dochází ke zvýšené expresi cyklinu D, jehož hladina je pak udržována přes mitózu a G1-fázi (Stacey, 2003).

V M-fázi zvýšené hladiny cyklinů A a B v komplexu s CDK1 pohánějí buňku směrem k mitóze. Přitom je integrita genomu sledována transkripčním faktorem p53, který povoluje transkripci genomu nebo indukuje pochody potřebné pro opravu případně apoptózu (Israels & Israels, 2000). V tomto posledním cyklu probíhá samotná mitóza, kdy se rovnoměrně předává nezredukováná genetická informace dceřiným buňkám. Mitóza se skládá z profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Při profázi dochází k spiralizaci vláken DNA, čímž se zviditelní chromatidy a rozpadá se jaderná membrána. Při metafázi se chromozomy řadí v ekvatoriální rovině. Při anafázi jsou chromozomy v oblasti centromer napojeny na vlákna dělicího vřeténka, rozpadají se na jednotlivé chromatidy a ty jsou přitahovány k pólům vřeténka. Při telofázi se chromozomy nespiralizují, tvoří se jaderná membrána a buňka je zaškrvena za vzniku dvou dceřiných buněk (McIntosh & Koonce, 1989).

Pokud se buňka už dále nemá dělit, přechází v kontrolním bodě G1-fáze do G0-fáze, do klidové fáze. U takovýchto buněk se mohou vrátit zpátky do G1-fáze a dále se dělit (Vermeulen et al., 2003).

1.1.2 Regulace buněčného cyklu

Průběh buněčného cyklu je řízený a kontrolovaný různými mechanismy. Jednak je to geneticky řízená kontrola v tzv. kontrolních bodech, délka telomer, signální molekuly ve vazbě na receptory a molekuly syntetizované v průběhu cyklu kódované v genech. Kontrolní aparát se skládá ze dvou hlavních složek a to cyklinů a cyklin-dependentních kináz, přičemž kinázy jsou produkty důležitých genů buněčné regulace přenášející fosfátovou skupinu z ATP na jiné proteiny potřebné v průběhu buněčného cyklu. Působí jako spouštěče procesů probíhajících v jednotlivých fázích. Aktivita kináz je však závislá na činnosti cyklinů, které souvisí s přechody buňky jednotlivými fázemi. Přejít mezi fázemi je tedy řízen komplexem cyklin-dependentní kinázy. Jestli dojde ke vzniku komplexu, ovlivňuje koncentrace cyklinů uvnitř buňky, kde jsou stále přítomny. Je-li vysoká, vzniká aktivní komplex a působí na další substráty regulace tím, že je aktivuje nebo inaktivuje (Cordon-Cardo, 1995).

Kontrolní body buněčného cyklu jsou 3, a to v G1-fázi, G2-fázi a M-fázi. První kontrolní bod G1-fáze je nejdůležitější. Nachází se přesně mezi G1-fází a S-fází a je

především kontrolou stavu DNA případně v tomto okamžiku dochází k její opravě. Druhý kontrolní bod G2-fáze působí po ukončení replikace DNA, přičemž kontroluje, zdali je všechna DNA replikována. Následně spouští děje vedoucí k zahájení mitózy. Třetí kontrolní bod M-fáze je v metafázi a kontroluje, jestli jsou chromozomy správně připojeny k mitotickému vřeténku (Molinari, 2000).

Při buněčné regulaci se uplatňují i telomery. Telomery jsou opakující se sekvence DNA, nacházející se na koncích chromozomů. Při každém buněčném dělení se telomery zkracují. Když jsou telomery až dost krátké, buňky se přestávají množit a následuje buněčná smrt. Délka telomer má tedy význam ve stárnutí buněk (Hiyama & Hiyama, 2007). Telomery jsou tedy ribonukleoproteinové komplexy na koncích chromozomů, které jsou nezbytné pro ochranu chromozomů a stability genomu. Jsou tvořeny z tandemových opakování sekvence bohaté na G základny (TTAGGG) vázány komplexem šesti proteinů známých jako Shelterin DNA (Donate & Blasco, 2011).

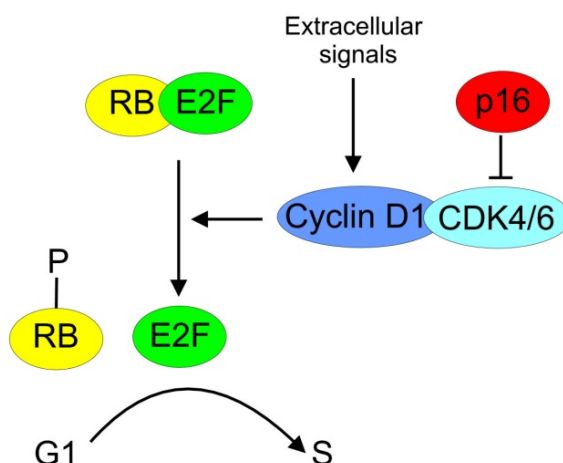
Stárnutí buňky ovlivňuje i telomeráza. Je to enzym s funkcí reverzní transkriptázy kódovaný TERT (telomerázové reverzní transkriptázy) geny. Telomeráza může přidat telomerové repetice na koncích chromozomů, zabráňuje replikaci v závislosti na ztrátě telomer a brání buněčnému stárnutí ve vysoce proliferativních buňkách zárodečné linie a ve většině nádorů. Aktivita telomerázy je tedy důležitá pro nesmrtelnost zárodečných buněk, embryonálních kmenových buněk a bohužel i nádorových buněk (Hiyama & Hiyama, 2007). Neustále vytváří na konci telomer stále se opakující sekvence TTAGGG, čímž buňka nezaniká (Donate & Blasco, 2011).

Před téměř 40 lety, Leonard Hayflick zjistil, že kultivované normální lidské buňky mají omezenou schopnost dělení, po které stárnou – fenomén je nyní známý jako „Hayflickův limit“ (Shay & Wright, 2000). Kultivované normální lidské a zvířecí buňky jsou předurčeny podstoupit nevratné funkční úbytky, které kopírují věkové změny v celém organismu. Při kultivaci in vitro lidských embryonálních fibroblastů se vyskytuje 50 ± 10 zdvojení populace. Jakmile buňky dosáhnou 50-ti dělení, začínají se dělit méně často, vzniká větší množství nepravidelností a chyb a poté nastává apoptóza. Hayflickův limit platí pro všechny somatické buňky kromě nádorových. Záleží také na aktuálním stáří buňky a přítomnosti telomerázy. U buněk izolovaných ze starých osob je daný počet dělení menší (Hayflick, 1979).

I některé geny jsou důležité pro regulaci buněčného cyklu. Říká se jim díky jejich funkci tumor-supresorové geny a uplatňují se při inhibici proliferace a růstu buněk. K těm nejdůležitějším patří gen pRb a gen p53 (Cordon-Cardo, 1995).

Gen pRb

Gen pRb (retinoblastomový) se nachází na dlouhém raménku chromozomu 13 a jeho produkt je protein Rb (pRb), který má zásadní úlohu při regulaci buněčného cyklu, během diferenciaci a při indukci apoptózy. Účastní se usměrňování přechodu z G1-fáze do S-fáze, přičemž aktivní je, když není fosforylovaný nebo jen málo. Když je aktivní váže se s transkripčními faktory E2F, čímž je buněčné dělení pozastaveno a buňka nemůže postoupit do S-fáze. Přijetím informací z vnějšího prostředí ve formě komplexu cyklin D + Cdk4/6 dochází k jeho fosforylaci (Obr. č. 3). Z pRb se uvolní faktory E2F, které spustí expresi cyklinů E a A, a enzymů replikace DNA. Tím je pRb neaktivní a buněčný cyklus se posunuje z prvního kontrolního bodu G1-fáze do S-fáze. Rb protein je v buňce přítomen v průběhu celého buněčného dělení, pouze se střídá jeho fosforylace (po dobu S-fáze, G2-fáze a M-fáze) a defosforylace (Sage, 2012).

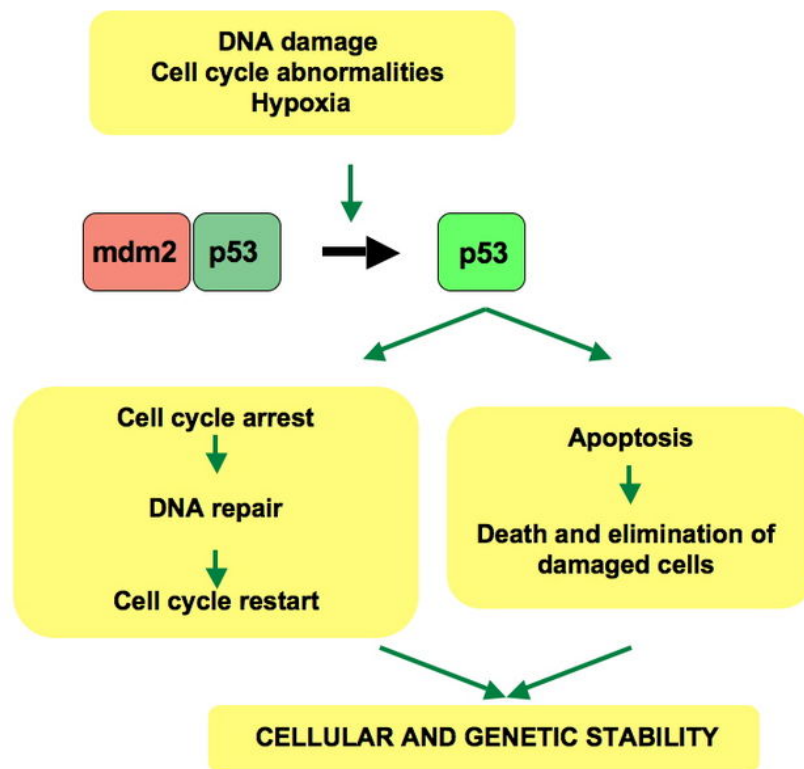


Obrázek 3 - Regulace přechodu G1/S buněčného cyklu přes cyklin D1, CDK4 a p16 (RB, retinoblastomový protein, CDK4/6, cyklin-dependentní kináza 4/6) (převzato a modifikováno z Peurala et al., 2013)

Gen p53

Gen p53 je také nazýván jako „strážce genomu“ a je lokalizován na krátkých raménkách chromozomu 17. Závisí na něm, zdali proběhne kontrola genetického materiálu mezi G1-fází a S-fází a případné opravy chyb. Také se podílí při kontrole genetického materiálu po replikaci mezi G2-fází a M-fází. Produktem genu je protein 53 (p53). Protein 53 je transkripční faktor, který se podle signálů aktivuje, váže se specificky na DNA a spouští transkripci genů, prostřednictvím kterých se podílí na apoptóze, zastavení růstu a degradaci

proteinů (Cordon-Cardo, 1995). Je to krátce žijící protein vyskytující se v nízkých hladinách u normálních buněk. Při poškození DNA se jeho hladiny rychle zvýší a následně dochází k inhibici buněčného růstu (Obr. č. 4). I exprese p53 je regulována pro normální růst a vývoj buněk a to proteinem Mdm2. Protein Mdm2 (lidský homolog Hdm2) inhibuje funkci p53 a pomáhá při jeho degradaci (Kubbutat & Vousden, 1997).



Obrázek 4 – Cesty proteinu p53 (aktivaci proteinu 53 spouští poškození DNA, abnormality v buněčném cyklu nebo hypoxie; protein 53 pak indukují buď zastavení buněčného cyklu následnou opravu a restart cyklu nebo indukují apoptózu a tedy smrt a eliminaci poškozené buňky; zajišťuje tak buněčnou a genetickou stabilitu) (převzato a modifikováno z [URL-2])

Mezi nejvýznamnější geny ovlivňující regulaci buněčného cyklu, jejichž expresi p53 ovlivňuje, jsou geny p21, GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage) a BAX. Protein 21 je cyklin-dependentní kinázový inhibitor tlumící replikaci. Jakmile p53 zjistí poškozené místo na DNA, spustí transkripci genu p21, který zastaví buněčné dělení, aby mohlo dojít k opravě DNA. Inhibuje aktivitu cyklinu D + CDK4/6, čímž dojde k dočasnému zastavení buněčného cyklu mezi G1/S-fází a DNA se může opravit (Harper et al., 1995).

Protein GADD45 zastavuje růst a vyvolává opravy DNA. Protein Bax je členem rodiny Bcl proteinů ovlivňujících apoptózu. Nachází se v cytoplazmě. Protein Bax je přímo proapoptotický protein, tedy při jeho zvýšené expresi vlivem p53 se zvýší propustnost vnější mitochondriální membrány, přičemž dojde k uvolnění cytochromu c do cytoplazmy. Tam

aktivuje proteolytické molekuly známé jako kaspázy, které specificky štěpí sekvenci aminokyselin DEVD klíčových pro provedení apoptózy. Naproti tomu protein Bcl-2 je antiapoptotický a brání vyvolání apoptózy. Zasahuje do aktivace kaspáz tím, že zabraňuje uvolňování cytochromu c z mitochondriální membrány (Rossé et al., 1998). Bcl-2 je integrální membránový protein nacházející se převážně na vnější membráně mitochondrií. Zvýšená exprese Bcl-2 zabraňuje buňce v provedení apoptózy tím, že zabraňuje odlivu cytochromu c z mitochondrií (Yang, 1997).

Regulace buněčného cyklu je i ovlivňována kontaktní inhibicí, což znamená zastavení dělení buněk po vzájemném dotyku. Nebo také nedostatkem růstových a energetických substrátů. Kontaktní inhibice buněčného růstu je nezbytná pro embryonální vývoj a udržování tkáňové architektury u dospělých organismů. Nedávno byla identifikována Hippo signální dráha související s kontaktní inhibicí a stejně tak s kontrolou velikosti orgánu. Komponenty této Hippo signální dráhy jsou nutné pro E-cadherin v závislosti na kontaktní inhibici proliferace. Cadheriny patří mezi tzv. homofilní adhezivní molekuly, což znamená, že se váží na stejný cadherin na sousední buňce. Jsou to transmembránové glykoproteiny, spojené prostřednictvím cateinů s cytoskeletem za přítomnosti Ca^{2+} , čímž vytváří mezi buňkami pevná spojení pro jejich komunikaci. E-cadheriny jsou exprimovány na epiteliálních buňkách a v mezibuněčných spojích. Ztrátou E-cadherinů je podpořena progresse nádoru a naopak zvýšenou expresí inhibice progresse nádoru (Kim et al., 2011).

1.1.3 Diferenciace buněk a formování tkání

Vývoj jednotlivých buněk do tkání a mnohobuněčných organismů zahrnuje řadu úprav. Buňky se stávají specializovanými a získávají různé funkce, které přispívají k přežití organismu. Chování jednotlivých buněk je také integrováno s podobnými buňkami, tak že jednají společným způsobem. K dosažení této integrace se buňky sestavují do specializovaných tkání, přičemž každá tkáň se skládá z buněk a mezibuněčného prostoru (Bernfield, 2014).

Diferenciace je plynule regulovaný proces, a interakce mezi buňkou a jejím okolím hraje hlavní úlohu při udržování stabilní exprese specifických diferenciačních genů. Důležitou složkou buněčného prostředí je extracelulární matrix (ECM) složený z glykoproteinů, proteoglykanů a glykosaminoglykanů, které jsou vylučovány a sestaveny na místě do organizované sítě držící buňky. I když je ECM součástí prostředí u všech typů buněk, liší se složením podle typu tkáně. ECM pak může buňky zcela obklopovat (např. u chondrocytů)

nebo může být v kontaktu s jednou stranou buněk (např. u epitelálních a endotelálních buněk) (Adams & Watt, 1993).

Extracelulární matrix

ECM je tedy složitá směs strukturálních a funkčních proteinů, glykoproteinů a proteoglykanů uspořádaných v jedinečné, tkáňově specifické trojrozměrné ultrastruktury. Tyto proteiny slouží k mnoha funkcím včetně poskytování strukturální podpory a pevnosti v tahu, jako připojovací místa pro buněčné povrchové receptory a jako rezervoár pro signalizační faktory, které modelují takové různorodé hostitelské procesy jako angiogeneze a vaskulogeneze, migrace buněk, buněčná proliferace a orientace, zánět, imunitní reakce a hojení ran. Jinak řečeno, ECM je zásadní, dynamická a nepostradatelná složka všech tkání a orgánů a je přirozeným lešením pro morfogenezi tkání a orgánů, pro údržbu a rekonstrukci po jejich úrazu (Badylak, 2002).

Ve většině orgánů jsou hlavní proteinové složky ECM kolageny, které jsou produkovány a vylučovány různými stromálními buňkami, i když převážně fibroblasty. Četné jiné proteiny také přispívají k specializované struktuře ECM, jako je například suterén membrány včetně lamininu, entactinu, kolagenu IV a různých růstových faktorů a proteáz (Rohrbach, 1993). Další třída molekul hrající zásadní roli ve složení ECM jsou proteoglykany navázané na glykoaminoglykany včetně chondroitinu, heparanu a keratin sulfátu (Iozzo, 1998).

Komunikace mezi buňkami

Při koordinaci svých činností v rámci tkání je důležitý povrch buněk. V plazmatické membráně každé buňky je řada proteinů, které interagují s povrchem jiných buněk nebo s jejich výměšky. Tyto proteiny umožňují buňkám rozpoznat okolní struktury a držet se extracelulárního matrixu a podobných buněk, přičemž tvoří populace odlišné od okolních buněk. Tyto interakce jsou klíčem k organizačnímu chování buněčných populací a k funkci normální tkáně v organismu dospělých (Bernfield, 2014).

Jedním z klíčových procesů souvisejících s morfogenezí je adheze buněk, která ale také řídí procesy, jako jsou dělení buňky a apoptóza, a tím představuje základ tvorby tkáně. Adheze buněk tak záleží na souhře mezi mobilními substráty a buňkami. Buněčné adhezní molekuly jsou většinou transmembránové molekuly včetně členů integrity, cadherinů, imunoglobulinů a proteoglykanové rodiny (Vleminckx & Kemler, 1999).

Obnova tkáně

Za normální obnovu tkání nebo regeneraci po poškození jsou zodpovědné kmenové buňky (Slack, 2000). Ty jsou definovány jako buňky, které mají schopnost udržovat se prostřednictvím vlastní obnovy a vytvářet zralé buňky zejména tkáně prostřednictvím diferenciací (Reya et al., 2001). Vlastní obnova je proces, při kterém se kmenové buňky dělí za vzniku jedné nebo dvou dceřiných buněk, které mají vývojový potenciál podobný mateřské buňce. Tato schopnost je nezbytná pro rozšíření jejich počtu během vývoje, pro udržování v dospělých tkáních a pro obnovení po zranění (He et al., 2009).

1.1.4 Buněčná smrt

Buněčná smrt je souhrn procesů vedoucích ke konci života buňky. Může být naprogramovaná nebo i samovolná. Základní dělení buněčné smrti je na apoptózu a nekrózu. Je však i několik dalších typů buněčné smrti, které nejsou zas tak prozkoumané. Mnohobuněční živočichové se často potřebují zbavit buněk, které jsou v přebytku, v cestě, nebo potenciálně nebezpečné. Za tímto účelem se používají vyhrazené molekulární programy. Stejně důležité jako buněčné dělení a buněčná migrace, regulace (nebo programování) buněčné smrti umožňuje organismu, aby pevně řídil počet buněk a velikost tkáně, a chránil se tak před poškozenými buňkami, které rozvracejí homeostázu (Hengartner, 2000). Buněčná smrt je tedy součástí normálního vývoje a zrání cyklu, a je součástí odezvy živé tkáně na mnohé vzory cizorodých agens (tj. mikroorganismů a chemických látek), a endogenních modulací, jako je například zánět a narušené krevní zásobení. Je také důležitým faktorem ve vývoji rakoviny, prevenci rakoviny a terapie rakoviny (Kanduc et al., 2002).

Apoptóza

Apoptóza je hlavním mechanismem, kterým jsou buňky fyziologicky odstraněny u mnohobuněčných organismů (Obr. č. 5). Během apoptotické smrti jsou buňky přehledně prošpikovány kaspázami a zabaleny do apoptotických tělísek, aby se předešlo aktivaci imunitního systému (Edinger & Thompson, 2004). Termín apoptóza navrhl Kerr a spol. v roce 1972 k popisu konkrétního morfologického vzoru buněčné smrti pozorované u buněk, které byly odstraněny v průběhu embryonálního vývoje, normální obměny buněk u zdravých dospělých tkání a u atrofie po vysazení hormonů (Kerr et al., 1972).

Tento jev se vyznačuje jadernou kondenzací a buněčnou fragmentací do membránově vázaných fragmentů. Tyto fragmenty nebo apoptotická tělíska pak jsou přijata do jiné buňky a degradována ve fagozómech. Odstranění buněk s malým narušením tkání a bez zánětu umožňuje opětovného využívání buněčných komponent. Pojem apoptózy podporovalo hypotézu, že živé buňky jsou geneticky naprogramovány tak, aby obsahovaly složky metabolické kaskády, která při aktivaci, může vést k buněčné smrti. Časem byl navržen genetický základ pro tento program buněčné smrti a zjištěny genové produkty podílející se na buněčné smrti (Fink & Cookson, 2005).

Tyto genové produkty jsou nyní označovány jako kaspázy. Existují jako latentní zymogeny, které obsahují N-koncovou doménu a následně od oblasti tvořící dvě podjednotky katalytickou efektorovou doménu. I když se všechny členy rodiny kaspáz mají podobnost v aminokyselinové sekvenci a struktuře, liší se významně ve svých fyziologických rolích. Kaspázy lze rozdělit do dvou skupin: na ty, které jsou centrálně zapojeny do apoptózy (kaspázy-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) a ty, které souvisejí s kaspázou -1 (kaspázy-1, -4, -5, -13, -14, a myši -11, -12) jejichž hlavní úloha je v průběhu zpracování cytosinů při zánětlivých odpovědích (Creagh et al., 2003).

Kaspázy podmiňující apoptózu mohou být dále rozděleny do dvou skupin na základě jejich struktury a časových aspektů jejich aktivace v průběhu buněčné smrti. Iniciační kaspázy (-2, -8, -9, -10) mají dlouhé pro-domény a jsou primárně odpovědné za zahájení aktivace kaskády kaspáz. Efektorové kaspázy (-3, -6, -7), obvykle obsahují jen malé pro-domény a jsou zodpovědné za skutečné demontáže buňky štěpením buněčných substrátů. Aktivace iniciátoru kaspáz vyžaduje dimerizaci, která je zprostředkována vazbou jejich pro-domén k adaptéru molekuly přes kaspázy náboru domény, nebo motivy efektorových domén smrti. Po aktivaci iniciátoru kaspázy se množí signály smrti tím, že se aktivují následné efektorové kaspázy v kaskádě. Efektorové kaspázy jsou převedeny na jejich aktivní formy pomocí proteolýzy na vnitřních Asp zbytcích, což umožňuje montáž aktivních heterotetramerů skládajících se ze dvou podjednotek velkých a dvou malých podjednotek (Boatright & Salvesen, 2003).

Aktivaci domény kaspázy pro indukci smrti buněk mohou kooptovat infekční patogeny. Aktivované efektorové kaspázy selektivně štěpí omezenou sadu cílových proteinů produkujících morfologické a biochemické vlastnosti spojené s apoptózou. Jedním často používaným markerem apoptózy je DNA ladder produkovaný štěpením genomové DNA nukleozómů k výrobě fragmentů o délce odpovídající přibližně 180-ti párům bází. Nukleázy CAD (kaspázou-aktivované DNázy) zodpovědné za tento pochod jsou přítomné v živých

buňkách vázané na inhibitor (ICAD). K aktivaci CAD dochází prostřednictvím štěpení ICAD zprostředkované kaspázami – 3 a -7, což vede k uvolnění a aktivaci CAD (Sakahira et al., 1998).

Kaspázová proteolýza vysvětluje další morfologické změny. Proteinové lešení nukleární obálky je štěpeno efektorovými kaspázami, což vede k jadernému smršťování a fragmentaci. Ztráta celkového tvaru buňky je pravděpodobně způsobena štěpením proteinů cytoskeletu, jako je fodrin. Štěpením složek fokální adheze komplexu vede k uvolnění apoptotických buněk od svých sousedů a od bazální membrány. Výsledkem je zprohýbaná plazmatická membrána. Na tvorbě apoptotických tělísek se podílí i členy rodiny aktivovaných p21 kináz. Další postup kaspáz je expozice fosfatidylserinu, který je aktivně lokalizován na vnitřním listu plazmatické membrány u zdravých buněk. Jeho expozicí mohou být apoptotické buňky rozeznávány fagocyty jako signál pro pohlcení (Fink & Cookson, 2005).

Nekróza

Nekróza se v poslední době ukázala jako alternativní forma programované buněčné smrti, jejíž aktivace může mít důležité biologické důsledky, včetně indukce zánětlivé reakce (Edinger & Thompson, 2004). Jedná se však o nekontrolovanou neregulovanou smrt buněk v živém organismu, pozorovatelnou až v určitém časovém odstupu po biologické smrti buňky (Fink & Cookson, 2005) (Obr. č. 5). Nekróza buňky se projevuje jednak pyknózou, kdy se jádro srašťuje a tmavne, chromatin se hromadí na vnitřní straně jaderné membrány, také karyorhexí neboli rozpadem jádra na malé fragmenty a karyolýzou, kdy se úplně ztrácí barvitelnost jádra. Cytoplazma nekrotické buňky kondenzuje, ztrácí strukturu a fragmentuje a sledujeme intenzivní eozinofilii (Majno & Joris, 1995).

I když nekróza nemá vlastnosti apoptózy a autofagie, nedávný výzkum naznačuje, že průběh by mohl být přísně regulován. Po signalizaci nebo indukovaném poškození může nekróza obsahovat znaky řízených procesů, jako je mitochondriální dysfunkce, zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku, vyčerpání ATP, proteolýza kalpainu a katepsinu a prasknutí plazmatické membrány. Kromě toho může inhibice specifických proteinů podílejících se na regulaci apoptózy nebo autofagie změnit typ buněčné smrti k nekróze (Golstein & Kroemer, 2007).

Pyroptóza

Termín pyroptóza neboli kaspáza-1 dependentní buněčná smrt původně představoval popis konkrétní formy buněčné smrti v makrofázích, která je vyvolaná bakteriální infekcí a je

doprovázena aktivací kaspázy-1 (Obr. č. 5). Na rozdíl od apoptózy, která je zcela neimunogenní, byla povaha pyroptózy uznána jako prozánětlivá. Podobá se tedy spíše nekróze. Pyroptóza byla původně popsána jako buněčná smrt zprostředkovaná aktivací kaspázy-1 v závislosti na makrofázích infikovaných *S. typhimurium* (Kepp et al., 2010).

Pyroptóza je morfologicky a mechanicky odlišná od jiných forem buněčné smrti. V poslední době ji lze identifikovat jako cestu smrti hostitelské buňky, která je stimulována řadou mikrobiálních infekcí (např. *Salmonella*, *Francisella*, *Legionella*) a neinfekčními podněty produkovanými při infarktu. Funkci pyroptózy definuje kaspáza-1, která však není zapojena do apoptózy. Nabízí rychlé prasknutí plazmatické membrány a uvolnění prozánětlivého intracelulárního obsahu (Bergsbaken et al., 2009).

Aktivace biochemické kaskády je závislá na specifických PAMP (molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenních mikroorganismů). PAMP bakteriálního peptidoglykanu nebo flagellinu jsou detekovány NLR (oligomrizující doménou nukleotid vázajících receptorů), jako jsou NLRC4 a NLRP1. Další NLR jako NLRP3 detekuje nejen PAMP, ale také endogenní signály nebezpečí. K aktivaci kaspázy-1 může dojít i v inflammasomu, jehož je součástí. Podporuje tedy aktivaci zánětlivých procesů a to zraní zánětlivých cytokinů (interleukinů) IL-1 β a IL-18 (Kepp et al., 2010).

V buněčné membráně vznikají póry, což narušuje buněčný iontový gradient. Výsledné zvýšení osmotického tlaku způsobí příliv vody následované otokem buňky a roztržením. Ve stejné době se přes kanály pórů uvolní cytosolový obsah. Neaktivní prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-18 jsou dále štěpeny kaspázou-1 a aktivují se. Toll-like receptory mohou také zahájit signalizační kaskádu, která vede k buněčné aktivaci a produkci zánětlivých cytosinů, jako jsou TNF (tumor nekrotizující faktor), IL-6, IL-8 a IFN (interferon). Nod-like receptory zase registrují nebezpečné signály vstupující do cytosolu hostitelské buňky a opět spustí produkci zánětlivých cytokinů (Bergsbaken et al., 2009).

Výsledkem pyroptózy je mohutná produkce cytokinů a chemokinů podporujících aktivaci T-lymfocytů a makrofágů, čímž vzniká místní a systémový zánět (Kepp et al., 2010).

Onkóza

Pojem onkóza je odvozený od řeckého slova jako „bobtnání“ (Trump et al., 1997). Vzhledem k apoptóze se jedná o opačnou formu buněčné smrti. Při apoptóze dochází k smrštění buněk a následnému rozpadu, kdežto při onkóze dochází k otoku buňky a koagulaci cytoplazmy (Obr. č. 5). Jednoduše řečeno při apoptóze se buňka zmenšuje a při

onkóze zvětšuje a bobtná. Onkóza odkazuje na preletální fázi, která následuje po smrtícím poškození buněk jako je například kompletní ischemie nebo účinky mnoha chemických toxinů (Weerasinghe & Buja, 2012).

Do onkózy jsou zahrnuty časné změny v úpravě tvaru buňky a objemu, často se vyskytující v rámci sekund až minut po aplikaci zranění (Trump et al., 1997). Onkotická buněčná smrt zahrnuje tři etapy. V 1. fázi se buňka stává předurčenou k onkóze v důsledku poranění membrány s únikem iontů a vody v důsledku vyčerpání ATP a vede k otoku buňky, aniž by došlo ke všeobecnému zvýšení propustnosti membrány buňky. V průběhu 2. fáze se buňka dostává do bodu ztráty reverzibility a buněčná membrána se stává děravou. A 3. fáze představuje případné fyzikální narušení buněčné membrány, když je v nekrotické fázi (Weerasinghe & Buja, 2012).

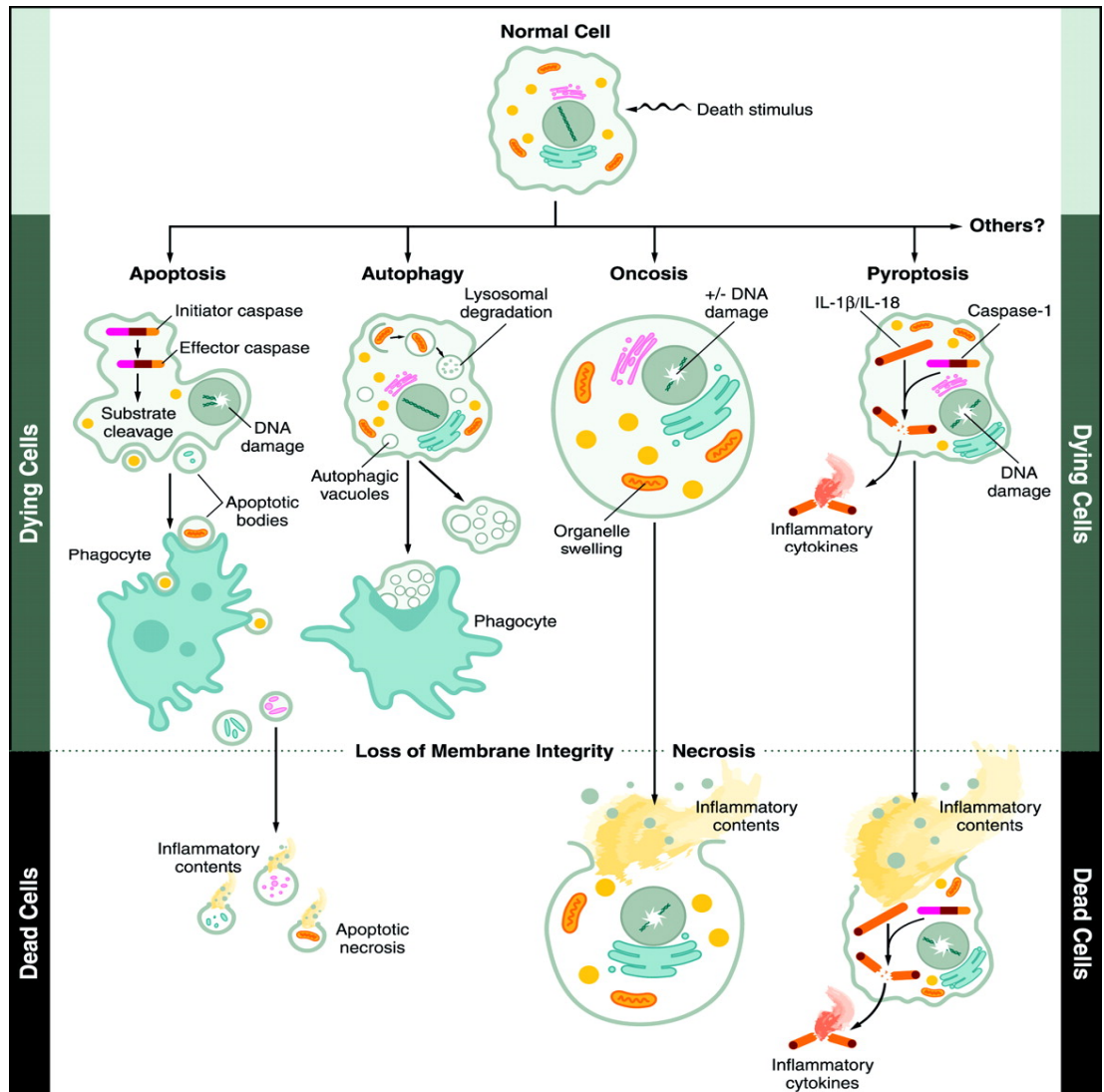
Důležitou biochemickou událostí onkózy, na rozdíl od apoptózy, je rychlý pokles intracelulárního ATP. Interference syntézy ATP rychle vede k deaktivaci Na^+K^+ -ATPázy na buněčné membráně, což vede ke zvýšení Na^+ a Cl^- spolu s přílivem vody. To vede k buněčnému otoku a rychlému nárůstu Ca^{2+} . Onkóza je tedy vztahována k vyčerpání energie vedoucímu k poškození iontových čerpadel buněčné membrány, otoku buňky, odstranění cytosolu, dilatace endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, mitochondriální kondenzaci, shlukování jaderného chromatinu a tvorbě cytoplazmatických váčků nebo puchýřů, které jsou bez organel (Weerasinghe & Buja, 2012).

Autofagie

Autofagie byla navržena jako možný mechanismus pro non-apoptotickou smrt navzdory mnoha druhům důkazů, které autofagii představují jako strategii pro přežití v dobách stresu (Edinger & Thompson, 2004).

Autofagie nabízí degradaci buněčných složek umírající buňky v autofagických vakuolách (Fink & Cookson, 2005) (Obr. č 5). Je tedy součástí naprogramované buněčné smrti. Jindy je využívána na subcelulární úrovni v období hladovění, kdy buňky potřebují k potravě neesenciální proteiny a organely a recyklují komponenty pro opakované použití v cytosolu. V eukaryotických buňkách jsou hlavními degradačními organelami lysozom nebo vakuoly. Tyto komponenty obsahují řadu hydroláz, které však nejsou schopné degradovat v podstatě žádné subcelulární složky (bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy). Proto autofagie probíhá zprvu ve speciálním váčku autofagosomu (Klionsky & Emr, 2000).

Morfologická charakteristika autofagie je vakuolizace, degradace cytoplazmatického obsahu a mírná kondenzace chromatinu. Stručně řečeno, autofagická cesta začíná sekvestrací cytoplazmatického materiálu v dvoumembránovém váčku známém jako autofagosom. Sekvestrace je proces pod kontrolou GTPás a fosfatidylinositolkinázy a zahrnuje systém ubiquitin-like konjugaci. Autofagosom se pak sloučí s lysozomem v závislosti na mikrotubulech a obsah je degradován. In vivo buňky procházející autofagií mohou být pohlceny sousedními buňkami (Fink & Cookson, 2005).



Obrázek 5 - Cesty vedoucí k buněčné smrti. Zdravé buňky reagují na smrt vyvolanou podněty tím, že zahájí řadu molekulárních drah, které vedou k buněčné smrti. Apoptóza je cesta vedoucí k buněčné smrti, která se vyznačuje aktivací iniciačních kaspáz, které aktivují efektorové kaspázy ke štěpení buněčných substrátů a následným vznikem apoptotických tělísek. Autofagie nabízí degradaci buněčných složek v rámci intaktní umírající buňky v autofagické vakuole. Onkóza je preletální cesta vedoucí k buněčné smrti v doprovodu buněčných organel, otoku a členění membrány, s eventuálním uvolněním zánětlivého buněčného obsahu. Pyroptóza je cesta buněčné smrti zprostředkovaná aktivací kaspázy – 1, protězy, která rovněž aktivuje zánětlivé cytokiny IL – 1 a IL – 8. (převzato a modifikováno z Fink & Cookson, 2005)

Anoikis

Anoikis je definována jako apoptóza, která je vyvolaná neadekvátní nebo nevhodnou interakcí buňka – extracelulární matrix. Je to tedy apoptóza způsobená ztrátou přilnavosti k podkladu. Podílí se na široké rozmanitosti tkání – homeostatických, vývojových a orogenních procesů (Frisch & Screaton, 2001). Anoikis je nezbytný mechanismus pro udržení správného postavení buněk v tkáni. Je zahájena různými způsoby, kterými buňka přijímá signály přes adhezní receptory regulující apoptózu (Gilmore, 2005).

Mechanismus anolis je stejný jako mechanismus apoptózy, takže dochází k jaderné kondenzaci, buněčné fragmentaci za vzniku apoptotických tělísek, která jsou přijata do jiné buňky a degradována ve fagozomech (Fink & Cookson, 2005). Ovšem probíhá jen u buněk s porušenou ztrátou přilnavosti (Frisch & Screaton, 2001).

1.2. Nádorová buňka

Při nádorové přeměně dochází k zásadním změnám v genetické kontrole buněčného dělení, způsobené opakovanými mutacemi, což má za následek nespoutanou buněčnou proliferaci. Mutace se vyskytují hlavně ve dvou třídách genů: protoonkogenů a tumor supresorových genů. V normálních buňkách působí produkty protoonkogenů na různých úrovních cest cyklu, které stimulují buněčnou proliferaci. Mutované verze protoonkogenů nebo onkogeny mohou podporovat růst nádoru. Inaktivace tumor supresorových genů, jako je pRb a p53 vede k dysfunkci jejich produkovaných proteinů, které za normálních okolností inhibují progresi buněčného cyklu. Dysfunkcí těchto proteinů je pak narušen proces iniciace buněčné smrti (Vermeulen et al., 2003). Stejně tak když buňka nereaguje na signály z okolí nebo přestane fungovat kontaktní inhibice (Kim et al., 2011). Procesy způsobující tyto změny jsou iniciovány genetickými poruchami vyvolanými faktory z vnějšího i vnitřního prostředí.

1.3. Vznik nádorové buňky

Základem vzniku nádorového bujení je mutace DNA v buňce. Nádorové bujení probíhá na molekulární úrovni a to zpočátku v jedné buňce, která se pak klonálně množí, až vytvoří nádorovou tkáň. Přeměna normální buňky na nádorovou je vícestupňový proces, při kterém dochází k hromadění mutací v genech DNA v průběhu buněčného dělení kmenové

buňky a následně k malignímu zvratu. Základní změny v buňce tedy probíhají v genetické výbavě DNA. Nádorové buňky jsou tedy geneticky změněné buňky tvořící nádor. Od normálních buněk se liší jak morfologicky tak i obsahem a aktivitou regulačních enzymů.

Mutace DNA můžou vzniknout jednak spontánně a jednak působením různých mutagenních vlivů. Spontánní mutace normální buňky se vyskytují jen vzácně a to na úrovni vad vznikajících při úpravě stability genetického materiálu (Goldsby et al., 2001). Důsledky poškození DNA jsou však minimalizovány různými cestami opravy DNA včetně vyřiznutí, elize nukleotidů a postreplikačních oprav. Tyto mechanismy opravy spoléhají na to, že DNA polymeráza vyplní mezery v DNA, které vznikly při odstranění poškozených bází. Pokud je poškození DNA neopravené, buňky ho tolerují a během replikace DNA pomocí specializovaných DNA polymeráz vkládají nesprávné báze opačných lézí a obchází tak poškození v procesu tzv. transláze syntézy DNA. Tento proces je zodpovědný za mnoho z bodových mutací a je obzvláště důležitý v hromadění bodových mutací (Lange et al., 2011).

Vznik abnormálních nebo poškozených buněk ihned odhalí imunitní systém na základě exprese různých molekul těchto buněk a likviduje je. Když se však k těmto změnám přiřadí další faktory podporující vznik nádoru, nebo selže imunitní systém (např. následkem genetické poruchy), příp. působí další faktory a imunitní systém neodpovídá, dochází hlavně k nekontrolovatelnému množení nádorově změněných buněk (Moretta et al., 2001).

1.3.1 Onkogenní faktory - vnější

Biologické faktory

Mutaci mohou způsobit různé faktory. Mezi biologické faktory patří zejména onkogenní viry. K neznámějším onkogenním DNA virům patří papilomavirus (HPV) způsobující rakovinu děložního čípku, virus Epstein-Barrové (EBV) způsobující Burkittův lymfom, Hodgkinův lymfom a T-buněčný lymfom a dále lidský herpesvirus 8 (HHV-8) vyvolávající Kaposiho sarkom (zur Hausen, 2001). K neznámějším onkogenním RNA virům patří lidský T lymfotropní virus I a II (HTLV-I/II) prokazovaný v souvislosti s T-buněčnou leukémií (Gallo, 2005).

Neméně důležité jsou i toxiny, které mohou také vyvolat nádorové bujení. Neznámějšími karcinogenními toxiny jsou aflatoxiny. Jsou to přirozeně se vyskytující mykotoxiny, které se najdou v potravinách, jako je kukuřice, arašidy, různé jiné ořechy a

bavlníková semena. Podezření na tento toxin je, že způsobuje hepatocelulární karcinom (Jackson & Groopman, 1999).

I některé bakterie svým působením mohou přispět ke vzniku nádoru. Mnoho bakterií produkuje toxiny, které specificky narušují buněčnou signalizaci a tím narušují regulaci buněčného cyklu, nebo přímo poškozují DNA. Tyto toxiny napodobují karcinogeny a nádorové promotory a můžou představovat vzor pro bakteriálně indukované karcinogeneze. Například infekce *Helicobacter pylori* podporuje vznik karcinomu žaludku, infekce *Salmonella typhi* zvyšuje riziko vzniku karcinomu jater a žlučovýchodů nebo infekce *Campylobacter jejuni* přispívá k lymfomu tenkého střeva (Lax, 2005).

Chemické faktory

Nejen biologické, ale i chemické faktory mají za následek působení vznik nádorové mutace. Mezi chemické faktory se řadí např. heterocyklické aminy vznikající v rámci vaření masa při vysoké teplotě a to prostřednictvím procesu pyrolýzy aminokyselin, bílkovin a kreatinu. Jedním z nejčastějších je 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol [4,5-b] pyridine indukující nádory prsu, tlustého střeva a prostaty. Dále polycyklické aromatické uhlovodíky vznikající při neúplném spalování organické hmoty, např. uzení potravin, nebo se běžně vyskytují benzantracene-3,4-benzopyren v tabáku při kouření. Vyvolávají tedy nejčastěji nádory plic. Také N-nitrosaminy vznikající z dusičnanů a dusitanů přispívají ke karcinogenezi. Například dusitan sodný se používá jako barvicí látka masa. Můžou tedy vyvolat rakovinu plic, jater, ledvin, mléčných žláz, žaludku, slinivky břišní, močového měchýře nebo jícnu. Mezi chemické faktory můžeme začlenit i alkohol, který je při zvýšené konzumaci významným rizikovým faktorem pro rakovinu horního zažívacího traktu včetně rakoviny hrtanu, hltanu, jícnu a jater (Sutandyo, 2010).

Fyzikální faktory

Fyzikální karcinogeny působí předáváním energie do biologického materiálu, čímž vznikají chemické změny vedoucí k poruše biologických funkcí. Záření je všudypřítomná součást našeho prostředí a jsme mu vystaveni neustále. Například ultrafialové záření ze slunce, γ záření z kosmického záření. I v běžném životě jsme vystaveni fyzikálním karcinogenům a to jednak rentgenu a ultrazvuku při léčebných postupech, mikrovlnné trouby a radiofrekvenčnímu záření z různého spotřebního zboží včetně mobilních telefonů. Hlavním nebezpečím v našem prostředí je UV záření způsobující nádory kůže či spinocelulární karcinom kůže. Ionizující záření vyvolává nádory téměř ve všech tkáních těla, ale citlivost se

liši v závislosti na specifitě tkání a orgánů. Obecně lze říci, že nejvíce citlivé jsou štítná žláza, ženský prs a některé krvetvorné orgány zatímco ledviny, kosti, kůže, mozek a slinné žlázy jsou méně citlivé (Schwartz, 2005). Můžeme tedy říct, že ionizující záření, rentgenové a gama záření, způsobuje hlavně leukémie, osteosarkomy a nádory kůže (Suzuki & Yamashita, 2012).

Ostatní faktory

I dlouhodobé užívání hormonů může maligní zvrát vyvolat, například hyperestrogenismus po menopauze způsobuje karcinom endometria (Zanetta et al., 2000) a hodně anabolik způsobuje karcinom jater. Ovšem i způsob stravování, životní styl a dědičnost mají určitý podíl na vzniku nádorových onemocnění.

Mutace v genech způsobují výše zmíněné faktory. Změnou nebo ztrátou genů v chromozomech pak dochází k syntéze mutovaných forem proteinů, ke ztrátě schopnosti apoptózy a tím k nekontrolovatelnému množení. Mutace působí hlavně při regulaci buněčného cyklu, když buňka přechází z G1-fáze do S-fáze. Působí tedy hlavně na protoonkogeny a tumor-supresorové geny.

1.3.2 Onkogenní faktory – vnitřní

Protoonkogeny

Protoonkogeny jsou geny, které řídí důležité funkce regulující buněčný růst a diferenciaci buněk. Produkty protoonkogenů jsou tedy růstové faktory, receptory růstových faktorů molekuly s proteinkinasovou aktivitou, zprostředkovávající přenos signálů mezi buňkami. Mutacemi změněné protoonkogeny se pak nazývají onkogeny. Onkogeny syntetizují onkoproteiny, které právě způsobují změny v regulaci buněčného dělení. Příklady protoonkogenů: *A)* Ras proteiny jsou guanin nukleotid vázající proteiny, které hrají klíčovou roli v regulaci normálního růstu buněk. Byly identifikovány tři druhy: H-Ras, K-Ras a N-Ras. Jsou klíčovým meziproduktem v signálních drahách zprostředkovávající proliferaci a jiné typy signálů převážně proud tyrosinkináz k receptorům (Rowinsky et al., 1999). *B)* Abl neboli Abelsonův protoonkogen je umístěn na 9. chromozomu a kóduje tyrosinkinázu, souvisí s Philadelphským chromozomem, který se vyskytuje u chronické myeloidní leukémie. Vzniká bcr-abl transkript reciproční translokací s 22. Chromozomem (Vardiman, 2009). *C)* Myc proteiny kódují skupinu jaderných fosfoproteinů, hrajících roli při růstu buněk a vzniku

nádorů (Zajac-Kaye, 2001). Geny Myc se nachází na 8. chromozomu. Translokací s 14. chromozomem vzniká Burkittův lymfom (Tomita, 2011).

Tumor-supresorové geny

Tumor-supresorové geny jsou geny, jejichž úlohou je syntéza produktů, které mají pozastavit množení buněk. Mutace způsobí změnu těchto genů, které tím ztrácí svoji funkci a nádorové buňky se množí bez jakéhokoliv omezení. Příklady tumor-supresorových genů: *A)* pRB neboli retinoblastomový gen se nachází na 13. chromozomu. Řídí proliferaci, diferenciaci a přežití kmenových a progenitorových buněk (Sage, 2012). *B)* p53 je gen podílející se na více centrálních buněčných pochodech, včetně transkripce DNA, opravy, genomové stability, stárnutí, regulace buněčného cyklu a apoptózy. Nachází se na 17. chromozomu. *C)* DCC neboli „Deleted in Colorectal Carcinoma“ je tumor-supresorový gen nacházející se na 18. chromozomu. Souvisí s kolorektálním karcinomem (Cho et al., 1994).

Na vzniku a hlavně množení nádorových buněk se podílí i selhání tzv. imunitního dozoru nebo spolupůsobení více rizikových faktorů, když už ani plně funkční imunitní systém není schopen účinně reagovat a zasáhnout (více viz. 4.4. Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem) (Swann et al., 2007).

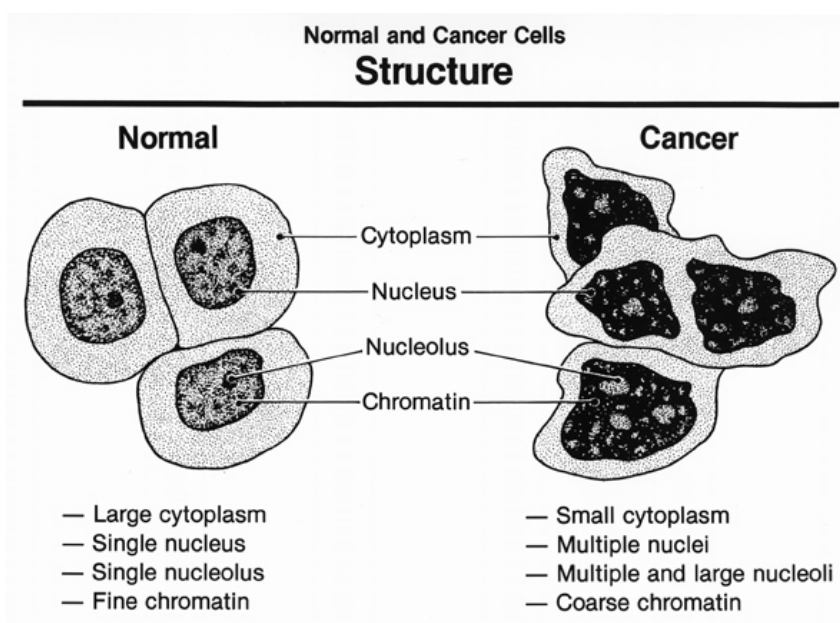
1.3.3 Vlastnosti nádorových buněk

Nádorové buňky se od zdravých buněk rozeznají díky svým změněným a upraveným vlastnostem. Od zdravých buněk se jednak liší v morfologii, která zohledňuje např. tvar a velikost buňky, zbarvení cytoplazmy a jiné. Dalším kritériem pro odlišení je chování nádorových buněk jako např. ovlivnění různými látkami, probíhá-li správně buněčné dělení nebo životaschopnost. U nádorových buněk můžeme zpozorovat oproti zdravým buňkám i jiné chování při pěstování in vitro a využít tak jejich vlastností k studování a vyvíjení protinádorové terapie.

1.3.4 Morfologické vlastnosti

Nádorové buňky se vyznačují velkým jádrem, které má nepravidelný tvar a velikost. Jádérka jsou výrazná a cytoplazma je intenzivněji zbarvená nebo naopak je bledá. Jádro hraje hlavní roli při posuzování maligních buněk. Je velké nepravidelné a má větší hustotu. Dochází

i ke změnám chromatinu (Obr. č. 6) a to, že heterochromatin je snížený, interchromatin zvýšený a v perichromatinu jsou granula. Je tedy celkově hrubý. To je způsobeno abnormálně zvětšeným počtem chromozomů. Jaderná membrána obsahuje více pórů. Jadérko je charakterizováno hypertrofií a zvýšeným počtem v jádře. Pohybují se směrem k jaderné membráně. Akumulací mRNA (mediátorové RNA) je cytoplazma bazofilní a často se vyskytují vakuoly. Mitochondrií je málo, ale jsou velké a v jejich matrixu jsou přítomné inkluze. Endoplazmatická retikula mají zjednodušenou strukturu a Golgiho aparát je špatně vyvinutý. V buňkách nádorů jater a ledvin můžeme vidět velké množství glykogenu (Baba & Catoi, 2007).



Obrázek 6 – Normální a maligní buňka (převzato z [URL-3])

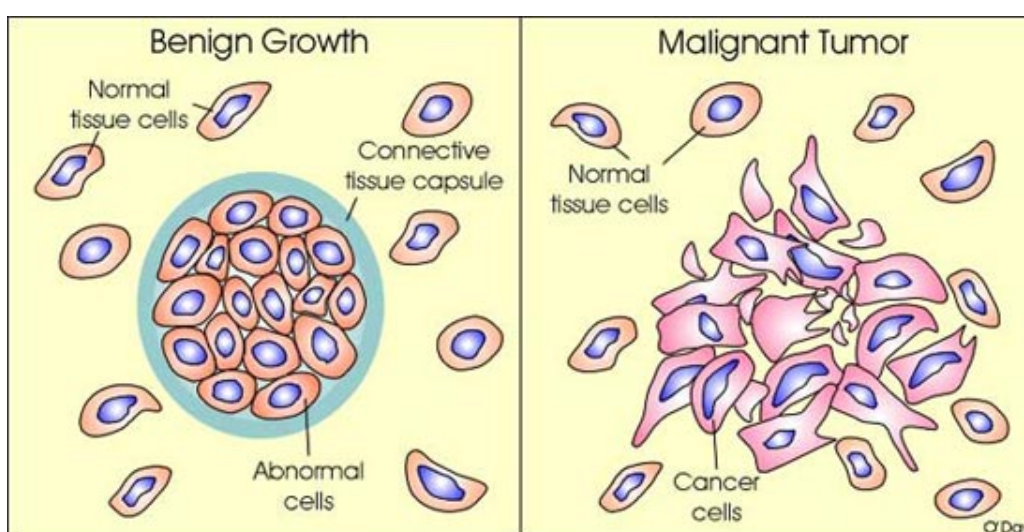
Mutacemi změněné nádorové buňky se liší svými biologickými vlastnostmi. Základním dělením podle biologických vlastností buněk je rozdělení na benigní a maligní nádorové buňky.

Benigní buňky

Alespoň přibližně zachovávají vzhled i funkci buněk normálních, od kterých jsou odvozeny (Obr. č. 7). Buňky proliferují pomalu, což je vidět na ojedinělých mitózách. Působí expanzivně na ostatní buňky, tak že je utlačují. Lokalizace jejich růstu je pouze v jednom místě. Tedy benigní buňky zůstávají v primárním místě, které je ohraničené a tím jsou izolované od okolí, nešíří se do dalších orgánů skrze krevní oběh a nevytvářejí tak metastázy (Daniels & Nicoll, 2012).

Maligní buňky

Maligně zvrhlé buňky ztrácí většinu vlastností buněk, od kterých jsou odvozeny. Vypadají spíš jako nezralé a špatně diferencované buňky. Mají různý tvar a velikost (Obr. č. 7). Dochází v nich k většímu množství atypických mitóz než u fyziologických buněk, což se projeví rychlou proliferací. Jejich růst je invazivní a infiltrační. Tedy buňky se oddělují od ostatních nahromaděných maligních buněk a prorůstají do okolní zdravé tkáně. Často se dostávají z místa vzniku až k jiným orgánům a tam způsobí vznik nové proliferace nádorových buněk. Mají tedy metastatické vlastnosti (Daniels & Nicoll, 2012).



Obrázek 7 – Benigní a maligní nádorové buňky (převzato z [URL-4])

1.3.5 Vlastnosti maligních buněk

Nádorové buňky nejsou závislé na růstových faktorech a to buď proto, že si syntetizují vlastní růstové faktory, anebo jsou receptory na jejich povrchu změněny tak, že k proliferaci nepotřebují jejich navázání na receptor. Příkladem může být mutace v genech kódujících Ras proteiny. Ras patří mezi protoonkogeny řídící buněčnou signalizaci a komunikaci mezi buňkami. Mutace způsobí blokaci GAP (glyceraldehyd-3-fosfátu) a hydrolýzu GTP (guanosin-3-fosfátu), čímž udržuje Ras proteiny v aktivované poloze (Rowinsky et al., 1999).

V důsledku transformace získávají schopnost nesmrtelnosti a tím i schopnost neomezeného růstu. Neomezenou proliferaci způsobují poruchy tzv. brzd proliferace, ke kterým patří geny Rb a 53. Přičemž poruchy nastávají už v prvním kontrolním bodě. Mutací genu Rb se ztrácí jeho regulující funkce v buněčném cyklu. Dochází k tomu, že pRb je

neustále v neaktivní formě a nemůže se vázat s transkripčními faktory E2F, aby se G1-fáze zastavila, čímž dochází k postupu do S-fáze a následné replikaci (Sage, 2012).

V případě p53 využívají mutacemi změněné buňky zvýšenou expresi Mdm2 proteinu, který se váže na p53 a způsobuje jeho inhibici. Gen p53 pak nespouští transkripci genů potřebných pro zastavení buněčného cyklu a reparaci DNA (p21, GADD45), případně k zahájení apoptózy (Bax) (Kubbutat & Vousden, 1997).

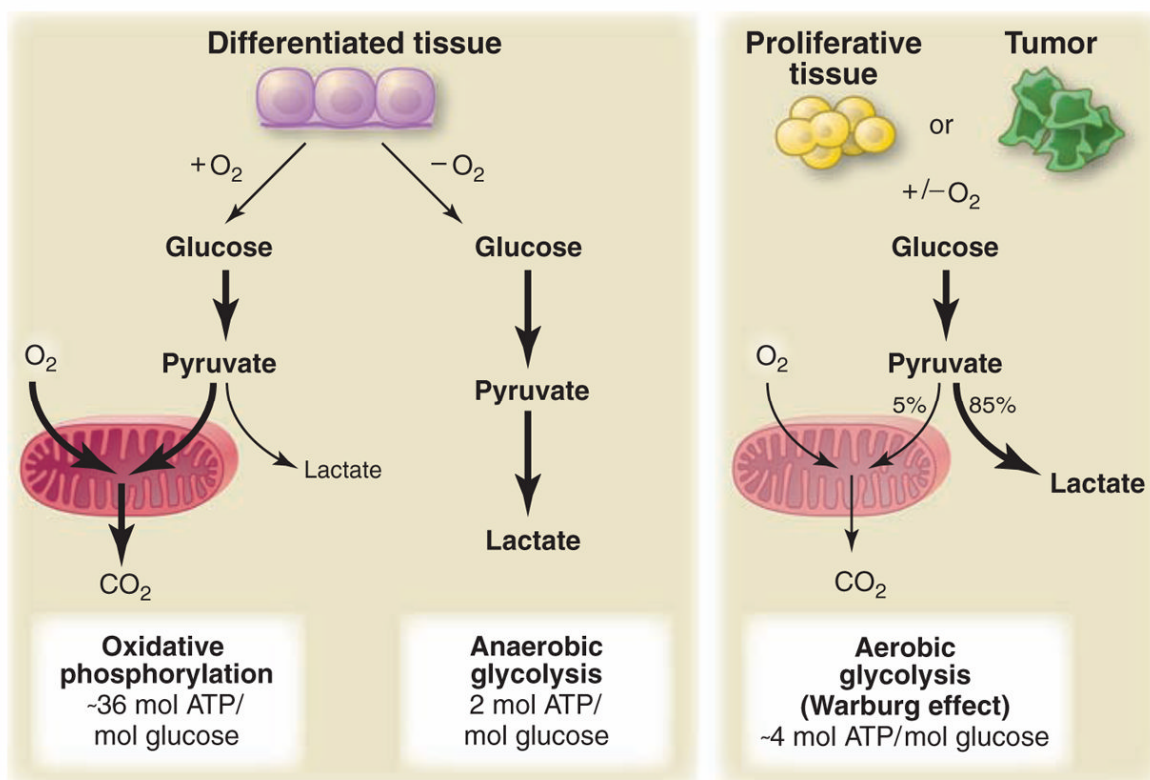
Také ztráta kontaktní inhibice podporuje neomezený růst. To má za následek, že buňky rostou v několika vrstvách na sobě a neorganizovaně (Kim et al., 2011). Obnovuje se i aktivita telomerázy – enzymu kompenzujícího zkracování chromozomů o telomery, čímž nedochází ke stárnutí buňky a ani k apoptóze (Hiyama & Hiyama, 2007).

Energetický metabolismus

V mnohobuněčných organismech je většina buněk vystavena konstantní dávce živin. Když dostupnost živin překračuje hodnoty potřebné pro podporu buněčného dělení, spustí se kontrolní systémy bránící individuální aberantní buněčné proliferaci. Nekontrolovatelné proliferaci je zabráněno stimulací růstových faktorů. Nádorové buňky tuto závislost překonávají (Vander Heiden et al., 2009). Onkogenní mutace tedy mohou vést k příjmu živin a to především glukózy, které splňují nebo překračují bioenergetické nároky buněčného růstu a proliferace. Tuto schopnost nádorových buněk metabolizovat glukózu způsobem, který je odlišný od buněk normálních tkání pozoroval Otto Warburg v roce 1924 (Warburg et al., 1924).

Nádorové buňky vykazují velké genetické, biochemické a histologické rozdíly vzhledem k normálnímu buněčnému typu. Převážně většina typů rychle rostoucích nádorových buněk má výrazně upravený energetický metabolismus ve srovnání s původními buňkami. Nejvíce známá změna energetického metabolismu nádorových buněk je zvýšená glykolytická kapacita i v přítomnosti vysoké koncentrace kyslíku (Moreno-Sánchez et al., 2007).

Spotřeba energie v metabolických aktivitách u normální buňky závisí především na mitochondriální oxidativní fosforylaci, která je efektivní a generuje více ATP než glykolýza (Zheng, 2012). Jednou z metabolických vlastností nádorových buněk je, že lačně přijímají glukózu, kterou fermentují na velké množství laktátu a to i v přítomnosti dostatečného množství kyslíku na rozdíl od normálních buněk, které laktát produkují za anaerobních podmínek jen málo (Obr. č. 8). Proto je tento metabolismus často označován jako aerobní glykolýza (Warburg, 1956).



Obrázek 8 – Schematické znázornění rozdílů mezi oxidativní fosforylací, anaerobní glykolýzou a aerobní glykolýzou (Warburg efekt). V přítomnosti kyslíku diferencované tkáni nejprve metabolizují glukózu na pyruvát prostřednictvím glykolýzy a pak oxidují pyruvát v mitochondriích na CO₂ v průběhu procesu oxidativní fosforylace. Vzhledem k tomu je kyslík konečný elektronový akceptor a je nezbytný pro tento proces. Je-li množství kyslíku omezeno, buňky mohou přeměňovat pyruvát generovaný glykolýzou za vzniku laktátu procesem anaerobní glykolýzy. Tato generace laktátu umožňuje i nadále minimální produkci ATP. Warburg zjistil, že nádorové buňky mají tendenci převést většinu glukózy na laktát, bez ohledu na to zda je přítomen kyslík. Tato vlastnost je společná normálním proliferujícím buňkám. Nicméně aerobní glykolýza je méně efektivní než oxidativní fosforylace pro generování ATP. (převzato a modifikováno z Vander Heiden et al., 2009)

Nádorové buňky mají větší potřebu energie a připravenou větší zásobu stavebních molekul, nezbytných pro syntézu makromolekul (nukleotidů, proteinů, lipidů), aby mohli rychle kopírovat genom a biomasu a rychleji proliferovat (Dell' Antone, 2012).

Důležitou vlastností jsou změněné antigenní struktury. Nádorové antigeny jsou buď nádorově specifické (TSA; tumor-specific antigens) vyskytující se pouze u nádorových buněk ale ne na normálních buňkách anebo nádorově asociované (TAA; tumor-associated antigens) vyskytující se i na normálních buňkách.

TSA

Do kategorie TSA patří: *A)* komplexy MHC (hlavní histokompatibilní komplex) glykoproteiny I. třídy s abnormálními fragmenty buněčných proteinů. MHC gp I. třídy tvoří normální buňka na svém povrchu, v tomto případě ve vazbě s abnormálními fragmenty proteinů, aby prezentovala tělu cizí proteiny a imunitní systém ji mohl zlikvidovat. Jako abnormální fragmenty proteinů označujeme produkty mutovaných genů, resp. produkty abnormálního štěpení normálních proteinů v nádorové buňce. Příkladem může být fúzní protein Bcr-Abl, který vzniká reciproční translokací dlouhých ramének chromozomů 9 a 22. Tento translokovaný chromozom se nazývá Philadelphský a vyskytuje se u chronické myeloidní leukémie (Vardiman, 2009). *B)* komplexy MHC glykoproteiny s fragmenty proteinů onkogenních virů. V tomto případě jsou na povrchu buňky v komplexu s MHC prezentovány proteiny onkogenních virů. Jako příklad může být EBNA1 (Epstein-Barr nukleární antigen). EBNA 1 je multifunkční protein kódovaný EBV. Udržuje EBV v latenci při proliferaci buněk, zprostředkovává syntézu EBV genomu a náhodně ho rozděluje do dceřiných buněk a reguluje virovou genovou transkripci (Westhoff Smith & Sugden, 2013). *C)* abnormální formy glykoproteinů. Glykosylace nádorové buňky je od normální odlišná a vznikají při ní pro normální buňku cizí glykoproteiny. Příkladem může být změna na úrovni N-glykanů, kterou způsobuje zvýšená aktivita enzymu N-acetylglucosaminyltransferáza V, spojovaného právě s vývojem rakoviny a metastáz (Mehta et al., 2012). *D)* idiotopy myelomů a lymfomů. Jsou to nádorové buňky vzniklé z T nebo B lymfocytů. Mají na povrchu klonotypické BCR (receptor B-lymfocytů), resp. TCR (receptor T-lymfocytů) (Weidanz et al., 2011).

TAA

Do kategorie TAA patří: *A)* onkofetální antigeny. Normálně se vyskytují na embryonálních buňkách, ale po narození mizí a vyskytují se na některých nádorových buňkách. Patří mezi ně α -fetoprotein (AFP) a karcinoembryonální antigen (CEA). Hladina AFP má význam při sledování onemocnění jater a hepatocelulárního karcinomu (Li et al., 2001). Zvýšená hladina CEA se využívá při stanovení rakoviny trávicího traktu a to zejména kolorektálního karcinomu (Duffy, 2001). *B)* některé melanomové antigeny. Ty jsou ve velké míře produkovány na melanomových buňkách. Patří mezi ně s melanomem asociované antigeny 1 (MAGE-1). Gen MAGE1 je exprimován u významného počtu nádorů různých histologických typů, ale ne v normálních buňkách s výjimkou mužských zárodečných buněk

(De Smet et al., 1996). *C*) antigeny HER2/neu (lidské růstové epidermální receptory 2). Jsou to receptory růstového faktoru epiteliálních buněk. V malé míře se vyskytují na normálních epiteliálních buňkách, ale ve velkém množství jsou na buňkách karcinomu prsu (Gutierrez & Schiff, 2011). *D*) PSA. Je prostatický specifický antigen využívaný jako tumor marker při diagnostice karcinomu prostaty. Je produkován epiteliálními buňkami prostaty (Štern et al., 2008). *E*) EPCAM. Jsou adhezivní molekuly epiteliálních buněk. Jsou to glykoproteiny s onkogenními vlastnostmi. Způsobují zvýšení c-myc a jejich silná exprese se vyskytuje při vzniku nádorů a metastáz karcinomů (Spizzo et al., 2011). *F*) diferenciační antigeny leukemických buněk. Jsou přítomné na normálních buňkách leukocytů, ze kterých vznikají leukemické buňky. Příkladem je antigen akutních lymfoblastických leukémií (CALLA). Je to glykoprotein exprimovaný při Non-Hodgkinově T akutní lymfoblastické leukémii a chronické myeloidní leukémii (Ritz et al., 1981).

1.3.6 Pěstování maligních buněk in vitro

Pěstování maligních buněk in vitro se provádí ve formě buněčných kultur, kdy se z nádoru odstraní jeho část a následně se umístí do umělého prostředí, které povede k jejich přežití a proliferaci. Základní požadavky pro optimální prostředí k růstu buněk jsou: řízená teplota, substrát pro uchycení buněk, vhodné růstové médium a inkubátor, který udržuje správné pH a osmolaritu. Nejdůležitější a rozhodující krok v buněčné kultivaci je výběr vhodného růstového média. Médium obvykle obsahuje vhodný zdroj energie a sloučeninu regulující buněčný cyklus. Typické kultivační médium se skládá z komplementu aminokyselin, vitaminů, anorganických solí, glukózy a séra jako zdroje růstových faktorů, hormonů a faktorů pro přichycení. Pro kultivaci nádorových buněk se nejčastěji používají média s označením MEM, DMEM a RPMI-1640 (Meenakshi, 2013).

Růst zhoubných nádorových buněk v kulturách mimo tělo byl prozkoumáván v mnoha experimentech, přičemž byly zkoumány různé druhy zvířecích a lidských nádorů (Carrel & Burrows, 1911).

Základem jsou primární buněčné kultury jako počáteční kultury vytvořené přímo z tělesné tkáně. Primární nádorové kultury mohou pocházet z různých typů tkání jako pevné nádorové fragmenty nebo nádorové buněčné suspenze, např. aspiráty, včetně peritoneálního ascitu nebo pleurálního výpotku. Rakovinné buňky se však liší od většiny běžných typů buněk ve svojí schopnosti růst v suspenzi, např. v agaru, ale zpravidla jsou kultury zahajovány tím, že se buňky zachytí na substrátu před proliferací. Když pak kultura obsadí celý povrch baňky

(pro jednovrstevné kultury), nebo se rozroste do bodu, kdy je médium ochuzené o živiny (suspensní kultury) tvoří se subkultura, která vytváří buněčné linie (Langdon, 2004).

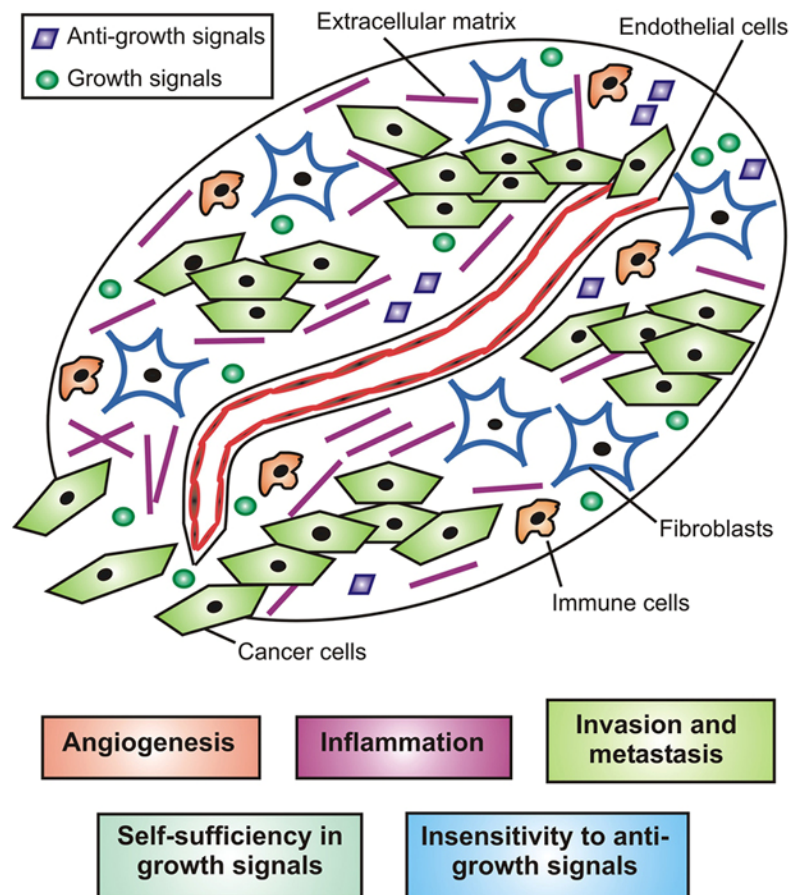
Získané nádorové buňky si při kultivaci *in vitro* dlouho dobu udržují mnoho za svých vlastností vykazujících *in vivo*. K těmto vlastnostem patří trojrozměrný růst, udržování organizace a struktury tkání včetně změn spojených s onkogenní transformací, retence funkce diferenciací, tumorigenicita a nárůst mnohonásobných typů buněk z jednoho nádoru (Freeman & Hoffman, 1986).

In vitro buněčné nádorové linie jsou široce používány pro studium biologie rakoviny a zkoumání faktorů, které ovlivňují reakci nádorů na terapeutické látky a režimy (Rockwell, 1980).

2. TKÁŇ TVOŘENÁ NÁDOROVÝMI BUŇKAMI

2.1. Morfologie nádorové tkáně

Nádorová tkáň je tvořena především různorodou populací nádorově změněných buněk, které se liší od ostatních jednak tvarem, velikostí, vzhledem a vlastnostmi (viz. 1.3.4. Morfologické vlastnosti). Nachází se zde i normální zdravé buňky, které fungují jako zdroj výživy pro nádorové buňky. Dále obsahuje i jiné typy buněk, které byly přijaty do mikroprostředí nádoru např. fibroblasty, přirozené imunitní buňky (makrofágy, neutrofil, žírné buňky, myeloidní supresorové buňky, dendritické buňky, NK buňky) a adaptované imunitní buňky (T a B lymfocyty) a buňky, které zprostředkovávají krevní a lymfatické zásobení. Prostor mezi těmito buňkami vyplňuje extracelulární matrix, který usnadňuje komunikaci buněk a uceluje nádorovou masu do kompaktní tkáně. (Tlstý & Coussens, 2006) (Obr. č. 9).



Obrázek 9 – Charakteristika nádorové tkáně. Mikroprostředí nádoru je komplexní lešení z extracelulárního matrixu a různých typů buněk. Kromě nádorových buněk přispívají k procesu karcinomu i endoteliální buňky, fibroblasty a buňky imunitního systému, jakož i molekuly extracelulárního matrixu (převzato a modifikováno z [URL-5]).

2.2. Vlastnosti nádorové tkáně

Vlastnosti a chování nádorové tkáně závisí na nádorových buňkách a projevuje se podobným způsobem. Vyšší schopnost množení a růstu, vyšší odolnost a delší životaschopnost (viz. 1.3.5. Vlastnosti maligních buněk). To znamená, že nádorová tkáň se neustále rozrůstá díky větší schopnosti nádorových buněk proliferovat. Důsledkem je pak zvětšení postiženého orgánu a změna jeho tvaru. Určitou vlastností může být i změna barvy tkáně opět způsobená morfologickou změnou nádorových buněk (viz. 1.3.4. Morfologické vlastnosti). Mezi chování bych i zařadila, že při svém růstu můžou narušovat funkce orgánů (např. obstrukce, tlaková atrofie, snížená produkce hormonu, snížení krvev tvorby atd.).

Důležitou vlastností je i podpora angiogeneze. Dosáhne-li nádor takové velikosti, kdy mu už nestačí živiny na další růst a dochází při tom k hypoxii nádorových buněk, začnou tyto buňky produkovat angiogenní faktory. Nejčastější faktory nádorové angiogeneze jsou FGF (růstový faktor fibroblastů) a VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) (Zetter, 1998).

2.3. Charakter nádorové tkáně

2.3.1 Benigní nádorová tkáň

Tkáň tvořící benigní nádor neboli nezhoubný, roste v uzavřeném prostoru obvykle zapouzdřena do kapsle tvořené vláknitou pojivovou tkání vypadající jako vazivové pouzdro. To má za následek, že se nádor jeví jako kulovitý útvar. Tempo růstu benigního nádoru je obvykle pomalejší. Na rozdíl od maligního nádoru nemá schopnost napadnout okolní tkáň nebo se šířit do vzdálených míst a proto je neinvazivní. Ačkoliv jsou benigní nádory neinvazivní, můžou způsobit určité příznaky v závislosti na jejich anatomické poloze a typu tkáně. Rostou směrem ven za vzniku velkých zaoblených mas, které mohou způsobit kompresi místních tkání nebo orgánů. Dají se chirurgicky odstranit.

2.3.2 Maligní nádorová tkáň

Tkáň tvořící maligní nádor neboli zhoubný je více agresivnější a invazivnější než benigní. Projevuje se rychlejším růstem v důsledku množení abnormálních buněk se schopností rychlého dělení. Maligní tkáň inklinuje a přímo napadá okolní tkáň a struktury,

což vede k jejich poškození. Většina maligních nádorů má schopnost metastazovat a tedy šířit se do vzdálených částí a orgánů v těle. Tvar maligního nádoru je nepravidelný a mívá laločnatý tvar. Chirurgicky nebývá odstraněn celý a často se objevují recidivy.

Dále jsou nádory klasifikovány podle histogeneze, tzn. podle jejich histologického (mikroskopického) vzhledu (Tab. č. 1).

Tabulka 1 - Rozdělení nádorů podle histogeneze (převzato a modifikováno z Mačák et al., 2012)

Typy nádoru	Typy postižených tkání	Chování		Krvetvorná tkáň
		Benigní	Maligní	
<i>mezenchymové</i>	pojivová tkáň, tuková tkáň, svalovina, cévy a krvetvorná tkáň (kostní dřeň, lymfatické uzliny, slezina)	fibrom, lipom, chondrom, osteom, myom, myxom, angiom	liposarkom, maligní fibrózní histiocytom, fibrosarkom,	leukémie, myeolodysplastický syndrom, myeloproliferativní neoplazie, lymfomy, nádory z plazmatických buněk
<i>epitelové</i>	povrchový epitel, žláznový epitel	papilom, adenom	karcinom	
<i>neuroektodermové (z nervové tkáně)</i>	mozek a mícha (gangliové buňky, nervová vlákna, podpůrné buňky, ependym), periferní nervový systém, melanom	oligodendrogliomy, astrocytomy, ependymomy, meningiomy, neurofibromy, feochromocytom	glioblastom, meduloblastom, neuroblastom, melanom	
<i>smíšené</i>	2 nebo více histologicky odlišných struktur	fibroadenom		
<i>teratomy</i>	zárodečné buňky (vaječníku a varlete)			
<i>nádory trofoblastu</i>	placenta	mola hydatidosa, mola proliferans	choriokarcinom	

3. CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY S METASTATICKÝM POTENCIÁLEM

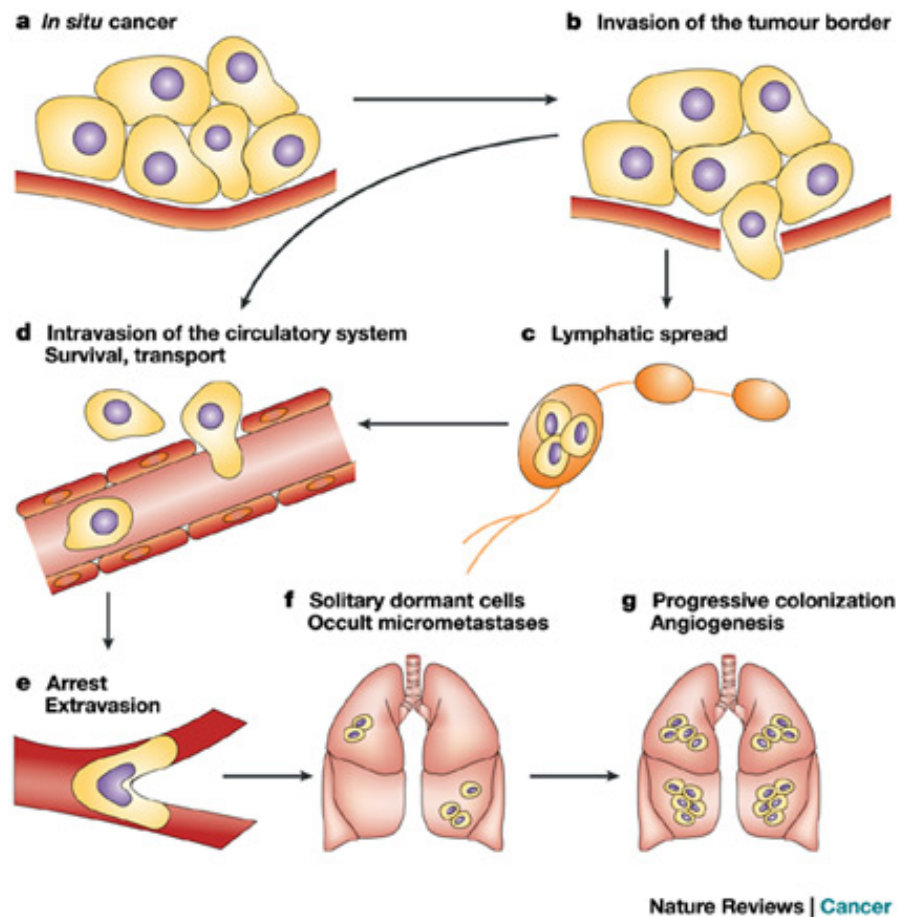
Z počátku dochází u fyziologické buňky k hromadění mutací, čímž vznikne nádorová buňka. Takto zvrhlá nádorová buňka mění svůj tvar, nereaguje na růstově inhibiční signály a získává schopnost nekontrolovatelně se dělit. Proliferací buněk pak vzniká nádorová tkáň tedy nádor. Následkem toho dochází k utlačování okolní tkáně a tím i poškozování. Může docházet i k překonávání bariér jednotlivých orgánů a metastazovat.

3.1. Vznik metastáz

Během proliferace nádorových buněk primárního nádoru vznikají průkopnické buňky, které se pohybují ven z nádorové tkáně, napadají okolní tkáň a cestují do vzdálených míst, kde mohou uspět v založení nové kolonie nádorových buněk (Obr. č. 10). Tyto průkopnické buňky se nazývají metastatické a způsobují rozvoj metastáz, což jsou druhotná ložiska nádorových buněk (Hanahan & Weinberg, 2000).

Tyto metastázy vznikají šířením nádorových buněk z primárního nádoru, buď lokálně, což vede k místním metastázám nebo prostřednictvím lymfatických cév na regionální mízní uzliny nebo hematogenně do vzdálených orgánů. Nový nádor vytvořený z těchto vycestovaných buněk je pak metastazující neboli sekundární a je nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje výsledný stav pacientů s invazivní rakovinou (Lin et al., 2010).

Vznik metastáz je stále velkou neznámou, ale velkou roli ve vzniku hraje schopnost buněk podstoupit epiteliální mezenchymální přechod (EMT). Metastatické buňky musejí nejprve projít určitými genetickými změnami, aby mohli tvořit metastázi. Nejlépe charakterizující změnou EMT je inaktivace či ztráta E-cadherinů, adhezivních molekul, které zprostředkovávají adhezni spoje mezi sousedními buňkami (Hanahan & Weinberg, 2011). Následně translokace β -kateinů z membrány do jádra, zvýšená exprese vimentinu, vylučování enzymů metaloproteinázové matrice a exprese různých EMT vyvolávajících transkripčních faktorů (Balic et al., 2013).



Obrázek 10 – Metastáza je komplexní, vícestupňový proces. Schéma metastatického procesu, počínaje *a*) rakovina je in situ obklopena neporušenou bazální membránou *b*) Invaze vyžaduje reverzibilní změny v přilnavosti mezi buňka-buňka a buňka-extracelulární matrix, destrukci proteinů v matrixi a stromatu a pohyblivost. Metastazující buňky mohou *c*) vstupovat pomocí lymfatického systému nebo *d*) přímo vstupují do cirkulace *e*) Doba přežití a zastavení nádorových buněk následujícím způsobem ovlivňuje extravazaci oběhového systému. *f*) Metastatické kolonizace na vzdáleném místě progredují prostřednictvím jedné buňky, která by mohla zůstat ve vegetačním klidu po mnoho let, na okultní mikrometastázy a *g*) postupně rostou v angiogenní metastázy (převzato a modifikováno z Steeg, 2003).

3.2. Cirkulující metastatická buňka

Nádorové buňky, které opustili své primární místo a dostali se do krevního oběhu, označujeme jako cirkulující nádorové buňky (CTC). Jsou to tedy buňky cirkulující v krevním řečišti, přičemž po uhníždění mohou iniciovat klonální metastatické léze. Potenciální mechanický základ pro intravazaci CTC z primárních nádorů do vzdálených ložisek má EMT. Jejich přesné složení není známo a jsou mimořádně vzácné (odhaduje se na jednu CTC z miliardy normálních krvinek v oběhu pacienta s pokročilým nádorovým onemocněním). I přes omezené izolační metody CTC byly zjištěny ve většině epitelálních nádorů, včetně prsu, prostaty, plic a tlustého střeva (Yu et al., 2011).

Detekce CTC není jednoduchá, ale stávající technologie využívají různých vlastností CTC pro průkaz, z nichž každá má jedinečné výhody a omezení. Mohou být považovány za „tekuté biopsie“, které odhalují metastázy v akci a poskytují aktuální informace o pacientově stavu onemocnění. Detekce cirkulujících nádorových buněk může mít důležité prognostické a terapeutické důsledky (Yu et al., 2011).

3.3. Diseminovaná metastatická buňka

Diseminované nádorové buňky (DTC) jsou buňky uvolněné z primárního nádoru a jsou roztroušené zejména v kostní dřeni. Na rozdíl od cirkulujících nádorových buněk přetrvávají na jednom místě a nekolují v organismu. Rané DTC existují jako metabolicky aktivní buňky, ale nějakým způsobem potlačují nebo vystupují z buněčného cyklu, čímž jsou udržovány v klidovém období se sníženým metabolismem neboli dormancí. To má za následek, že DTC se jeví jako spící, sice přežívají a vytrvávají, ale neproliferují. Mechanismus podílející se na přechodu do proliferačního klidu nejsou úplně známy stejně jako mechanismus zrušení vegetačního klidu (Patel et al., 2011). DTC byly velmi často pozorovány a extrahovány z kostní dřene u pacientů s nádorovým onemocněním prsu. Přítomny byly již v časných fázích onemocnění (Janni et al., 2011).

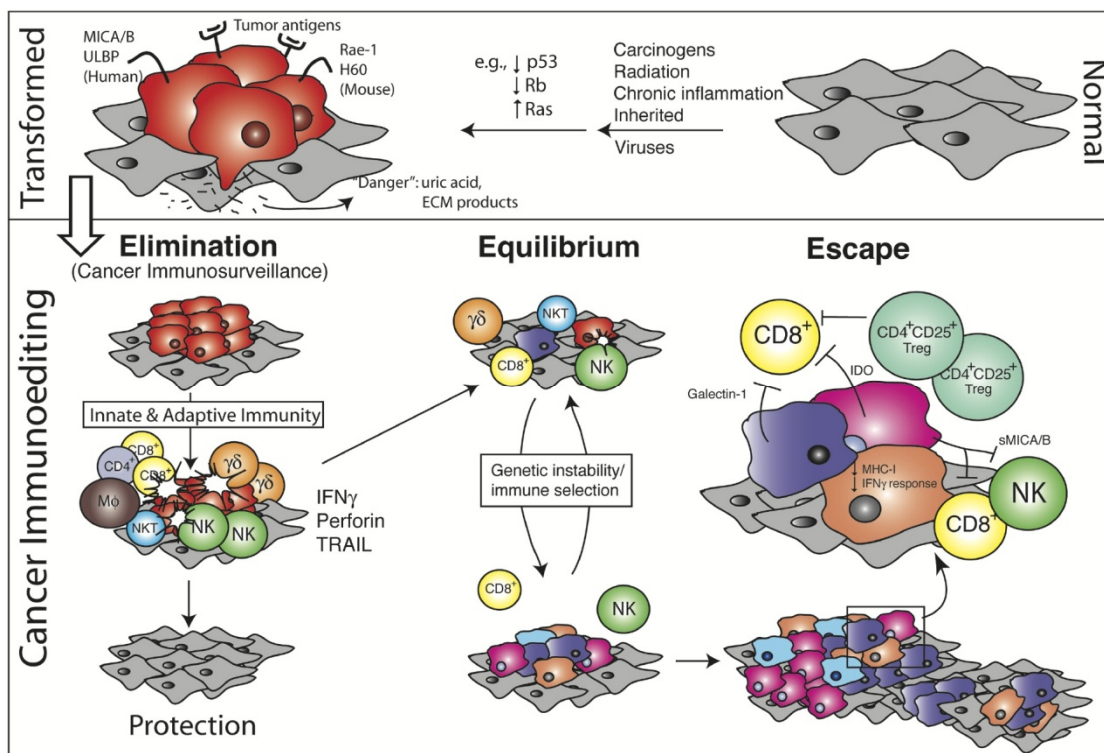
V posledních letech byly vyvinuty různé testy k detekci DTC u karcinomu prsu a jiných typů karcinomů. Jedním z hlavních přístupů k identifikaci DTC z kostní dřeni zahrnuje centrifugaci podle hustotního gradientu s následným imunocytochemickým barvením za použití monoklonální protilátky proti epiteliálním nebo s nádorem spojenými antigeny (Wölfle et al., 2006).

Bylo prokázáno, že DCT nebo CTC mohou být přítomné i u pacientů, kteří podstoupili kompletní odstranění primárního nádoru, a že tento jev je základem pro použití systémové adjuvantní chemoterapie (Lin et al., 2010). Nicméně přítomnost nádorových buněk mimo primární nádor a v orgánech příslušných pro následnou tvorbu metastáz, jako jsou kosti, kostní dřev, může být i klinicky užitečná. Jednak pro jednoznačný důkaz raného šíření nádorových buněk, také jako relativní faktor pro následné metastázy a tím i špatnou prognózu a jako marker pro monitorování léčby (Braun & Naume, 2005).

4. ÚČAST IMUNITNÍHO SYSTÉMU V BOJI PROTI NÁDOROVÝM BUŇKÁM

Imunitní systém má schopnost identifikovat a zničit vznikající nádorové buňky nebo jejich malé shluky a tím slouží jako primární obrana proti vzniku nádorů. Imunitní systém má tři hlavní role, jimiž v organismu zajišťuje dozor nad vznikem nádorových buněk. Za prvé, imunitní systém, tím že chrání organismus proti virovým infekcím, chrání nepřímo i buňky před jejich infekcí, průnikem virové DNA do sensitivních buněk a tím se snižuje pravděpodobnost maligního zvratu. Tento efekt je nejvíce zřetelný u infekcí tzv. onkogenními viry. Za druhé, včasné odstranění patogenů z organismu a rychlá odpověď na zánětlivé podněty může zabránit vzniku zánětlivého prostředí, které by mohlo podpořit rozvoj nádorů. Za třetí, imunitní systém dokáže identifikovat a odstranit nádorové buňky na základě exprese jejich nádorových antigenů, specifických molekul nebo změnou density určitých povrchových molekul, tzv. up nebo down-regulace. (Swann & Smyth, 2007).

Protinádorová imunita je dynamický proces skládající se ze tří fází. Fáze imunitního dozoru neboli „elimination“, dále fáze rovnováhy neboli „equilibrium“ a fáze úniku z imunitního dozoru neboli „escape“ (Obr. č. 11). Fáze imunitního dozoru představuje klasický koncept protinádorové imunity, kdy je imunitní systém schopen rozeznat a zničit transformovanou nádorovou buňku, čímž nedojde k rozvoji nádoru. Fáze rovnováhy značí stav, kdy už imunitní systém pouze mírně reguluje množství intenzivně proliferujících buněk nebo už není schopen zničit nádorové buňky, které nicméně zůstávají v konstantním množství, ale pod úrovní detekovatelnosti. A fáze úniku z imunitního dozoru značí, že nádorové buňky už vytvořili kompaktní masu nádorových buněk, tzv. primární nádor, který již není pod kontrolou imunitního systému. (Hatina, 2005)(Dunn et al., 2004).



Obrázek 11 – Editace nádoru imunitním systémem (Normální buňky na počátku podléhají mutacím. Transformované buňky v závislosti na imunitním systému pak procházejí fázemi eliminace, rovnováhy a úniku před imunitním systémem. (převzato a modifikováno z Dunn, 2004))

4.1. Složky imunitního systému účastníci se protinádorové obrany

Mikroprostředí nádoru obsahuje jednak nádorové buňky, ale také buňky vrozené imunity (včetně makrofágů, neutrofilů, žírných buněk, myeloidních supresorových buněk, dendritických buněk a NK buněk), buňky adaptované imunity (T- a B-lymfocyty) a samozřejmě extracelulární matrix. Tyto různé buňky mezi sebou komunikují prostřednictvím přímého kontaktu nebo pomocí cytokinů, čímž kontrolují a formují růst nádoru (de Visser, 2006).

Při vzniku a vývoji nádoru hraje zásadní úlohu zánětlivá reakce. Ta jednak může podporovat proliferaci nádorových buněk, stejně jako jejich invazivitu a následnou schopnost metastazování, ale také může podnítit imunitní systém k likvidaci nádorových buněk. K zánětlivé reakci v místě nádoru dochází v závislosti na hypoxii a nekróze. Nejprve tedy dochází k hypoxii následkem vyšší spotřeby kyslíku nádorovými buňkami a nedostatečným cévním zásobením (Schmaltz et al., 1998). Pak vlivem produkce TNF-β imunitními buňkami přítomnými v mikroprostředí nádoru (fibroblasty, myelomové buňky,...), který působí jako inhibitor angiogeneze, nádorové buňky a buňky v okolí podléhají nekróze. TNF-β je tedy

schopen navodit apoptózu u nádorových buněk a indukovat syntézu dalších cytokinů a růstových faktorů, které aktivují efektorové buňky, což se projeví vznikem zánětu (Chu, 2013).

Buňky imunitního systému mají tedy za úkol vyhledat a zničit zmutované nádorové buňky na odpovídající signál, ale také jsou využívány nádorovými buňkami pro svoji potřebu, jako je výživa, růst a potlačení imunitního dozoru. Imunitní systém jako celek má tedy schopnost blokovat rozvoj nádoru ale také podporovat karcinogenezi, progresi nádoru a metastáz. Která z těchto funkcí bude převažovat závisí na rovnováze pro a proti-nádorových mediátorů jak přirozené tak adaptivní imunity (Ostrand-Rosenberg, 2008). Buněčné složky imunitního systému účastníci se protinádorové imunity jsou vypsány dále (Tab. č. 2).

Tabulka 2 - Role různých podtypů imunitních a zánětlivých buněk v protinádorové imunitě a nádorové podpoře (převzato a modifikováno z Grivennikov et al., 2010)

Typy buněk	Protinádorové vlastnosti	Tumor-podporující vlastnosti
<i>Makrofágy, dendritické buňky, myeloidní supresorové buňky</i>	prezentace antigenu; produkce cytokinů (IL-12 a IFN typu I)	imunosuprese; produkce cytokinů, chemokinů, růstových faktorů, proteáz a angiogenních faktorů
<i>Žírné buňky</i>		produkce cytokinů
<i>B-buňky</i>	produkce protilátek proti nádoru	produkce cytokinů a protilátek; aktivace žírných buněk; imunosuprese
<i>CD8+ T-buňky</i>	přímá lýza nádorových buněk; produkce cytotoxických cytokinů	produkce cytokinů
<i>CD4+ Th2 buňky</i>		výchova makrofágů; produkce cytokinů; aktivace B buněk
<i>CD4+ Th1 buňky</i>	nápověda pro cytotoxické T lymfocyty (CTL) při nádorovém odmítnutí; produkce cytokinů(IFN- γ)	produkce cytokinů
<i>CD4+ buňky Th17</i>	aktivace CTL	produkce cytokinů (IL-17-zhoršuje zánět)
<i>CD4+ Treg buňky</i>	potlačení zánětu (cytokiny a jiné tlumivé mechanismy)	imunosuprese (blokace aktivace CTL); produkce cytokinů
<i>NK buňky</i>	přímá cytotoxicita rakoviných buněk; produkce cytotoxických cytokinů	
<i>NK T-buňky</i>	přímá cytotoxicita rakoviných buněk; produkce cytotoxických cytokinů	
<i>Neutrofily</i>	přímá cytotoxicita; regulace odpovědí CTL	produkce cytokinů, proteáz, a ROS

4.2. Rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem

Předpokladem pro rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem jsou antigeny, které jsou exprimovány na jejich povrchu a přitom nebývají přítomné na normálních buňkách. Pro imunitní systém jsou tyto antigeny cizí nebo nějak abnormální a jejich přítomnost tak způsobuje útok imunitních buněk na zmutované nádorové buňky.

Nádorové antigeny jsou prezentovány v malých fragmentech peptidů na povrchu nádorové buňky, které pak rozpoznají receptory aktivovaných cytotoxických T-lymfocytů. Jsou také prezentovány na molekulách MHC I. třídy podobně jako virové antigeny, což umožňuje zabíječským T-lymfocytům rozpoznat nádorové buňky jako abnormální (Garcia-Lora et al., 2003).

Také jsou prezentovány po pohlcení profesionální antigen prezentující buňkou (dendritickou buňkou) ve formě fragmentů s molekulami MHC I. nebo II. třídy na jejím povrchu. Takto vystavenými antigeny jsou aktivovány naivní CD4⁺ T-lymfocyty a CD8⁺ T-lymfocyty po jejich vyvázání s TcR.

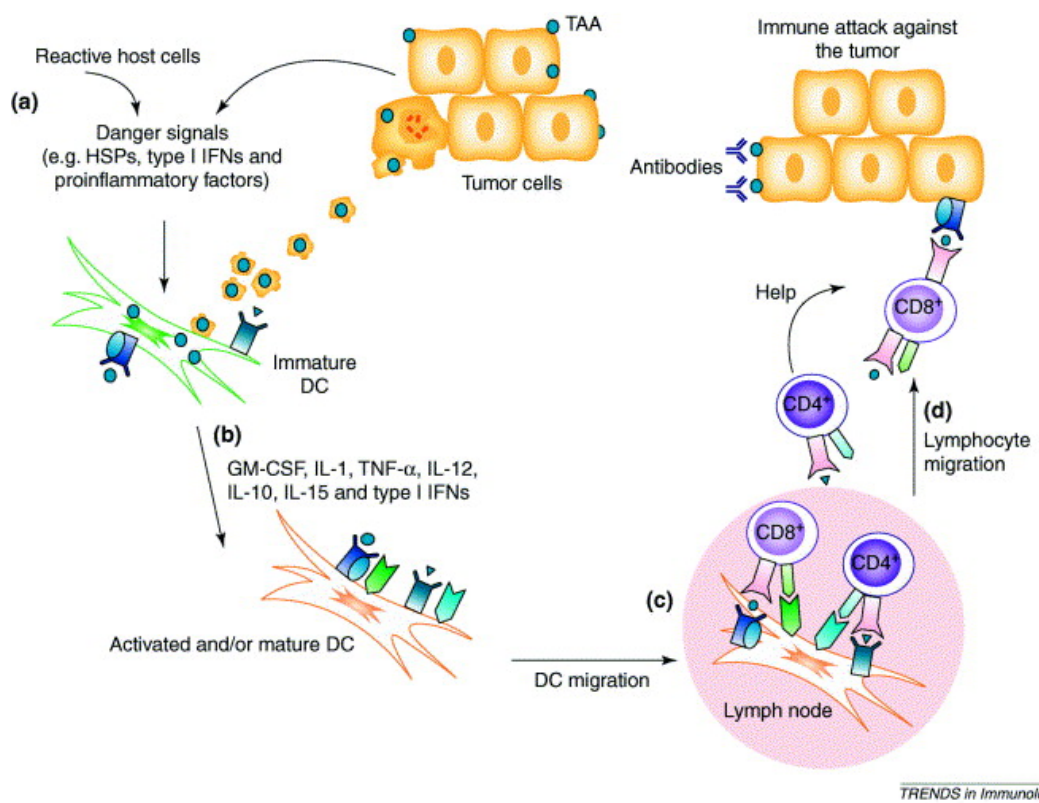
Nádorové antigeny se rozdělují do 2 skupin. Jednak na nádorově specifické antigeny vyskytující se pouze u nádorových buněk ale ne na normálních buňkách a na antigeny s nádorem asociované vyskytující se i na normálních buňkách (více viz. 1.3.5 Vlastnosti maligních buněk; TSA, TAA).

Tyto antigenní struktury jsou rozeznávány efektorovými složkami specifické imunitní odpovědi, tj. humorální imunity, jejímiž antigenními receptory jsou imunoglobuliny produkované B-lymfocyty, a buněčné imunity, u níž antigen rozeznávají T-buněčné receptory na povrchu aktivovaných T-lymfocytů a to zejména cytotoxických T-lymfocytů (CTL) (Hatina, 2005).

4.3. Likvidace nádorových buněk imunitním systémem

Likvidace nádorových buněk má několik mechanismů. Jednak buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu a jednak cytotoxické humorální působení. Mezi cytotoxické buňky se řadí cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky. CD8⁺ CTL rozpoznávají nádorovou buňku na základě antigenů, které jsou v komplexu s MHC gp I. třídy na antigen prezentujících buňkách (APC). Naváží se na tento komplex svým receptorem a nádorovou buňku přímo lyzují (Toes et al., 1999). CD8⁺ CTL jsou tedy aktivovány pomocí APC, které prezentují na svém povrchu antigeny z rozpadlých nádorových buněk (Obr. č. 12). APC

prezentují tyto antigeny na svém povrchu v komplexu s MHC gp I. třídy, na kterých se naváže receptor prekurzoru CTL, čímž dochází k jeho proliferaci a diferenciaci na zralé CTL. Pro jejich diferenciaci je však důležitý IL-2 produkovaný Th1 buňkami. $CD4^+$ Th buňky jsou důležité i pro stimulaci APC, aby mohli podnítit vznik zralých CTL. Tato stimulace probíhá vyvázáním TcR naivních $CD4^+$ T-buněk s komplexem antigenu s MHC II. třídy na povrchu antigen prezentující buňky a přes adhezivní a signalizační molekuly CD40L na povrchu aktivované Th buňky a CD40 na povrchu APC se z Th stává Th1. Ten pak aktivuje APC a stimuluje jí k expresi kostimulačních molekul (CD80, CD86) a tvorbě cytokinů (IL-1, IL-12), které následně stimulují CTL (Heath & Carbone, 2001) (Cella et al., 1996).



Obrázek 12 - Schéma událostí probíhající v průběhu imunitní reakce proti nádorovým buňkám (a) nebezpečné signály působí na prekurzory dendritických buněk (DC), (b) cytokiny podporují diferenciaci DC a aktivitu mnoha mechanismů, (c) antigeny jsou prezentovány v lymfatických uzlinách $CD4^+$ a $CD8^+$ T-buňkám, (d) $CD4^+$ a $CD8^+$ T-buňky migrují do místa nádoru a vzniká protinádorový útok (převzato a modifikováno z Belardelli, 2002)

Lýzu buněk následně způsobují proteiny perforiny a proteázy granzymy, které se uvolní z cytotoxických granul v cytoplazmě CTL při procesu degranulace. Perforiny vytvoří v cytoplazmatické membráně póry, kterými se dovnitř nádorové buňky dostanou granzymy štěpící kaspázy, čímž se aktivují a zahájí apoptózu (Berke, 1994). $CD8^+$ CTL mohou zabít transformované buňky i jiným mechanismem, a to prostřednictvím proteinu FasL

nacházejícím se na jejich povrchu. Tento protein se váže na „apoptotický receptor“ Fas (CD95) na různých buňkách a aktivuje apoptotickou smrt buňky (Lynch et al., 1995).

NK buňky rozeznávají nádorové buňky na základě jejich nízké exprese MHC gp I. třídy. NK buňky mají na svém povrchu stimulační receptory, které se vyvazují se strukturami na nádorových buňkách. Po navázání na transformovanou buňku dochází stejně jako u CTL k degranulaci a uvolnění perforinů a granzymů, které nastartují apoptotickou smrt (Lanier, 2005). Jedním ze stimulačních receptorů NK buněk je i Fc receptor CD16, který se vyvazuje s Fc částí IgG. Nádorová buňka může být těmito IgG opsonizována a tím následně dochází k jejímu vyvázání s NK buňkou s Fc receptorem a spuštění apoptózy. Tento proces je nazýván jako cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC) (Fast et al., 1981).

Do protinádorového humorálního působení můžeme zařadit působení cytokinů. Ty mohou působit jako takový první „nebezpečný signál“ pro upozornění imunitního systému. Cytokiny jsou hlavními mediátory obrany hostitele v tom, že regulují komunikaci mezi APC, lymfocyty a dalšími buňkami imunitního systému. Jejich neméně důležitá funkce je, že spojují vrozenou a adaptivní imunitu, přičemž v posledních letech nejvíce používanými cytokiny v protinádorové terapii byly GM-CSF (granulocyty a makrofágy stimulující růstový faktor), IL-12 a IFN- α . Cytokiny proto mohou být využívány jako silné přírodní pomocné látky pro vývoj vakcíny rakoviny, tím že podporují diferenciaci a aktivaci APC, prezentaci antigenu a T-buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď (Belardelli & Ferrantini, 2002).

4.4. Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním dozorem

V organismu dochází k neustálému vzniku transformovaných nádorových buněk, přičemž plně funkční imunitní systém je schopen tyto buňky rozpoznat a zlikvidovat, čímž se zamezí vzniku nádoru. Existuje však několik mechanismů, kterými nádorové buňky unikají před imunitním systémem. To pak má za následek, že imunitní systém nemůže efektivně působit proti zvrhlým buňkám a dochází tak k nekontrolovatelnému nádorovému bujení. Některé z těchto mechanismů jsou vypsány níže.

Porucha prezentace antigenu

Jednou ze strategií jak uniknout imunitnímu dozoru je porucha prezentace antigenu, která je výraznější u metastatických lézí než u primárních nádorů. Ta může být způsobena mutací nebo sníženou expresí nádorových antigenů, ale také mutací nebo sníženou expresí

MHC genů. Pokud nevznikají nádorové antigeny, buňky imunitního systému nerozeznají, že se jedná o transformovanou buňku a tím ani nereagují. Ovšem sníženou expresí MHC gp I. třídy jsou aktivovány NK buňky, proto musí mít nádorové buňky další mechanismy, které zabrání cytolytickému působení NK buněk. Případně může docházet i ke špatnému zpracování antigenu způsobeného mutací v genech β_2 -mikroglobulinů nebo v genech kódujících podjednotky proteazomu (Igney & Krammer, 2002).

Ignore

Také nedostatek nebezpečných signálů a nádorových antigenů v lymfoidních orgánech důležitých pro prezentaci na APC a aktivaci T-buněk, je jedním z mechanismů úniku, kdy imunitní systém nádorové buňky ignoruje. Stejně tak nedostatek kostimulačních signálů, které nádorové buňky neposkytují buňkám imunitního systému, může u T-buněk vyvolat ignorování až toleranci nádorových buněk. Tyto kostimulační signály jsou důležité pro plnou aktivaci a působení buněk imunitního systému (Fuchs & Matzinger, 1996) (Ochsenbein, 2001).

Expese imunosupresivních faktorů a molekul

Nejčastěji produkováný imunosupresivní faktor u nádorových buněk je transformující růstový faktor β (TGF- β). Nádorové buňky používají TGF- β na únik z imunitního dozoru v závislosti na ztrátě kontroly inhibice růstu. TGF- β tedy působí na CTL a specificky inhibuje expresi genových produktů a to, perforinu, granzymu A, granzymu B, Fas ligandu a interferonu- γ , které jsou společně zodpovědné za cytotoxicitu zprostředkovanou CTL (Thomas & Massagué, 2005). Druhým nejčastějším imunosupresivním faktorem je interleukin – 10 (IL-10), který inhibuje funkci makrofágů, Th a CTL. Obecně tedy tlumí imunitní a zánětlivé reakce (Salazar-Onfray, 1999).

Inhibice funkce nebo zrání dendritických buněk

Pokud nejsou dendritické buňky (DC) správně diferencovány nebo neplní efektivně svoji funkci, nedochází tak k adekvátní prezentaci nádorových antigenů a produkci IL-12, které jsou důležité pro vyvolání imunitní odpovědi zprostředkované Th a CTL. Příčinou těchto poruch vyžívání a funkce je, že nádorové buňky produkují cytokiny inhibující funkci DC. K těm nejčastějším patří IL-10, TGF- β a prostaglandin E2 (PGE2) (Vicari et al., 2002). Inhibici DC může způsobovat i oxid dusnatý produkováný nádorovými buňkami (Paolucci et

al., 2000) nebo VEGF, který působí inhibičně už na prekurzory DC v kostní dřeni (Gabrilovich et al., 1996).

Exprese FasL

Některé nádorové buňky exprimují na svém povrchu protein FasL, který se váže s receptorem Fas a následně dochází k aktivaci apoptotické smrti buňky. Fas je exprimován i na aktivovaných T-buňkách, čímž mohou nádorové buňky po vyvázání FasL exprimovaném na svém povrchu a Fas vyvolat apoptotickou smrt T-buněk. Fas je také konstitutivně exprimován i v různých lidských orgánech jako je srdce, játra a plíce, přičemž játra jsou velmi citlivá na Fas zprostředkovanou indukci apoptózy (Lynch et al., 1995) (Nagao et al., 1991).

Stimulační účinek protinádorových protilátek

Stimulační účinek protinádorových protilátek spočívá v tom, že tvoří imunitní komplexy s nádorovými antigeny, a tím podporují degradaci matrixu a angiogenezi (Barbera-Guillem et al., 1991).

Působení regulačních T-lymfocytů

Regulační T-buňky mohou být definované jako T-buněčná populace, která funkčně potlačuje imunitní reakci. Klasické regulační T-buňky (T_{reg}) jsou odvozené z thymu s fenotypem $CD4^+$, $CD25$ a expresí IL-2. Také produkují transkripční faktor FOXP3. Jako potenciální selhání protinádorové imunity zprostředkované T_{reg} bylo navrženo potlačení TAA, na které pak neodpovídají $CD8^+$ CTL. Stejně tak produkce cytokinů IL-10 a TGF- β potlačuje funkci APC, T-buněk a NK buněk. To naznačuje, že T_{reg} mohou tlumit jak adaptivní tak vrozenou imunitu (Zou, 2006).

5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na vznik nádorových buněk a jejich působení na imunitní systém. Na vzniku nádorového bujení se podílí několik faktorů, a to přes biologické chemické, fyzikální a jiné až po různé náhodné mutace genů DNA a bezprostředně i stav imunitního systému. Následkem mutací vznikají morfologicky a fyziologicky odlišné buňky, které se nekontrolovatelně množí, až vytvoří nádorovou tkáň a samotný nádor. Nádor pak následně utlačuje a poškozuje okolní tkáň, případně může metastazovat do dalších míst, čímž negativně působí na organismus a způsobuje častá úmrtí.

Ke spontánním mutacím DNA dochází v průběhu celého života, stejně tak i k působení mutagenních faktorů. Proto potencionální nádorové buňky vznikají v menší míře neustále. Proti těmto buňkám se organismus z určité míry dokáže bránit a to imunitním systémem. Forma imunitního systému odstraňující nádorové buňky se označuje jako imunitní dozor. Ten je při plnohodnotném stavu imunitního systému schopen nádorové buňky vyhledat a zničit. Pokud však není imunitní systém plně funkční a vyskytují se deficity na úrovni složek účastnících se protinádorové imunity, nejsou zmutované buňky odstraněny a rozvíjí se nádor. Samotné nádorové buňky také používají mechanismy, kterými imunitnímu systému unikají.

Aktuálním tématem je léčba nádorových onemocnění, která se neustále vyvíjí a vylepšuje. Dnes ještě nejsou zcela známé postupy, které by vedly k úplnému uzdravení onkologických pacientů. Rakovina je druhým nejčastějším onemocněním v ČR s následnou letalitou.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, J. C., & Watt, F. M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development-Cambridge*, roč. 117, č. 4, s. 1183-1198, PMID: 8404525.
- Alison, M. R., Poulson, R., Forbes, S., & Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells. *The Journal of pathology*, roč. 197, č. 4, s. 419-423, doi: 10.1002/path.1187.
- Baba, A. I., & Câtoi, C. (2007). Chapter 3, Tumor cell morphology. V A. I. Baba, & C. Câtoi, *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, ISBN: 9780732714577.
- Badylak, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in cell & developmental biology*, roč. 13, č. 5, s. 377-383, doi: 10.1016/S1084952102000940.
- Balic, M., Williams, A., Lin, H., Datar, R., & Cote, R. J. (2013). Circulating tumor cells: From bench to bedside. *Annual review of medicine*, roč. 64, s. 1-17, doi: 10.1146/annurev-med-050311-163404.
- Barbera-Guillem, E., May Jr., K. F., Nyhus, J. K., & Nelson, M. B. (1991). Promotion of tumor invasion by cooperation of granulocytes and macrophages activated by anti-tumor antibodies. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, roč. 1, č. 5, s. 453-460, PMID: 10933061.
- Belardelli, F., & Ferrantini, M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends in Immunology*, roč. 23, č. 4, s. 201-208, doi: 10.1016/S1471-4906(02)02195-6.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, roč. 7, č. 2, s. 99-109, doi: 10.1038/nrmicro2070.
- Berke, G. (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annual review of immunology*, roč. 12, s. 735-773, doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.003511.

- Bernfield, M. R. (2014). *Cell: The extracellular matrix*. Získáno 14. Duben 2014, z Encyclopaedia Britannica Online Academic Edition: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/101396/cell/37432/The-extracellular-matrix?anchor=ref313804>
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, roč. 15, č. 6, s. 725-731, doi: 10.1016/j.ceb.2003.10.009.
- Braun, S., & Naume, B. (2005). Circulating and disseminated tumor cells. *Journal of clinical oncology*, roč. 23, č. 8, s. 1623-1626, doi: 10.1200/JCO.2002.10.073.
- Carrel, A., & Burrows, M. T. (1911). Cultivation in vitro of malignant tumors. *The Journal of experimental medicine*, roč. 13, č. 5, s. 571-575, PMID: 19867439.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine*, roč. 184, č. 2, s. 747-752, doi: 10.1084/jem.184.2.747..
- Cordon-Cardo, C. (1995). Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *The American journal of pathology*, roč.147, č. 3, s. 545-560, PMCID: PMC1870966.
- Creagh, E. M., Conroy, H., & Martin, S. J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological reviews*, roč. 193, č. 1, s. 10-21, doi: 10.1034/j.1600-065X.2003.00048.x.
- Daniels, R., & Nicoll, L. H. (2012). *Contemporary Medical-Surgical Nursing, Volume 1, Second Edition*. New York: Clifton Park, NY: Delmar, Cengage Learning, ISBN: 978-1-439-05866-4.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., & Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, roč. 93, č. 14, s. 7149-7153, PMID: 8692960.
- de Visser, K. E. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, roč. 6, č. 1, s. 24-37, doi: 10.1038/nrc1782.

- Dell'Antone, P. (2012). Energy metabolism in cancer cells: How to explain the Warburg and Crabtree effects? *Medical hypotheses*, roč. 79, č. 3, s. 388-392, doi: 10.1016/j.mehy.2012.06.002.
- Donate, L. E., & Blasco, M. A. (2011). Telomeres in cancer and ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, roč. 366, č. 1561, s. 76-84, doi: 10.1098/rstb.2010.0291.
- Duffy, M. J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful? *Clinical chemistry*, roč. 47, č. 4, s. 624-630, PMID: 11274010.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, roč. 21, č. 2, s. 137-148, doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017.
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, roč. 16, č. 6, s. 663-669, doi: 10.1016/j.ceb.2004.09.011.
- Fast, L. D., Hansen, J. A., & Newman, W. (1981). Evidence for T cell nature and heterogeneity within natural killer (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effectors: a comparison with cytolytic T lymphocytes (CTL). *The Journal of Immunology*, roč. 127, č. 2, s. 448-452, PMID: 6788841.
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, roč. 73, č. 4, s. 1907-1916, doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1915.2005.
- Freeman, A. E., & Hoffman, R. M. (1986). In vivo-like growth of human tumors in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, roč. 83, č. 8, s. 2694-2698, PMID: 3458228.
- Frisch, S. M., & Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Current opinion in cell biology*, roč. 13, č. 5, s. 555-562, doi: 10.1016/S0955-0674(00)00251-9.
- Fuchs, E. J., & Matzinger, P. (1996). Is cancer dangerous to the immune system? *Seminars in immunology*, roč. 8, č. 5, s. 271 - 280, doi: 10.1006/smim.1996.0035.

- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., a další. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine*, roč. 2, č. 10, s. 1096-1103, doi: 10.1038/nm1096-1096.
- Gallo, R. C. (2005). The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTVL-2. *Retrovirology*, roč. 2, č. 1, s. 17, doi: 10.1186/1742-4690-2-17.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., & Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology*, roč. 195, č. 3, s. 346-355, doi: 10.1002/jcp.10290.
- Gaumann, A., Schlitt, H. J., & Geissler, E. K. (2008). Immunosuppression and tumor development in organ transplant recipients: the emerging dualistic role of rapamycin. *Transplant International*, roč. 21, č. 3, s. 207-217, doi: 10.1111/j.1432-2277.2007.00610.x.
- Gilmore, A. (2005). Anoikis. *Cell death and differentiation*, roč. 12, s. 1473-1477, doi: 10.1038/sj.cdd.4401723.
- Goldsby, R. E., Lawrence, N. A., Hays, L. E., Olmsted, E. A., Chen, X., Singh, M., a další. (2001). Defective DNA polymerase- δ proofreading cause cancer susceptibility in mice. *Nature Medicine*, roč. 7, č. 6, s. 638-639, doi: 10.1038/88963.
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, roč. 32, č. 1, s. 37-43, doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.001.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, roč. 140, č. 6, s. 883-899, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
- Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2 Biology, Detection, and Clinical Implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*, roč. 135, č. 1, s. 55-62, doi: 10.1043/2010-0454-RAR.1.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, roč. 144, č. 5, s. 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, roč. 100, č. 1, s. 57-70, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.-H., Zhang, P., a další. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Molecular biology of the cell*, roč. 6, č. 4, s. 387-400, doi: 10.1091/mbc.6.4.387.
- Hatina, J. (2005). Imunologie nádorů - současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenetiky. Část I - Interakce nádoru a imunitního systému. *Klinická onkologie*, roč. 18, s. 119-125.
- Hayflick, L. (1979). The cell biology of aging. *The Journal of Investigative Dermatology*, roč. 73, č. 1, s. 8-14, doi: 10.1111/1523-1747.ep12532752.
- He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, roč. 25, s. 377-406, doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113248.
- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annual review of immunology*, roč. 19, č. 1, s. 47-64, doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.47.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, roč. 407, č. 6805, s. 770-776, doi: 10.1038/35037710.
- Hiyama, E., & Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*, roč. 96, č. 7, s. 1020-1024, doi: 10.1038/sj.bjc.6603671.
- Cho, K. R., Oliner, J. D., Simons, J. W., Hedrick, L., Fearon, E. R., Preisinger, A. C., a další. (1994). The DCC Gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics*, roč. 19, č. 3, s. 525-531, doi: 10.1006/geno.1994.1102.
- Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, roč. 328, č. 2, s. 222-225, doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.014.
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology*, roč. 71, č. 6, s. 907-920, PMID: 12050175.
- Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual review of biochemistry*, roč. 67, č. 1, s. 609-652, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609.

- Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The cell cycle. *The oncologist*, roč. 5, č. 6, s. 510-513, doi: 10.1634/theoncologist.5-6-510.
- Jackson, P. E., & Groopman, J. D. (1999). Aflatoxin and liver cancer. *Baillière's best practice & research. Clinical Gastroenterology*, roč. 13, č. 4, s. 545-555, doi: 10.1053/bega.1999.0047.
- Janni, W., Vogl, F. D., Wiedswang, G., & al., e. (2011). Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--A European pooled analysis. *Clinical Cancer Research*, roč. 17, č. 9, s. 2967-2976, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2515.
- Kanduc, D., Mittelman, S. R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., Santacrose, R., a další. (2002). Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, roč. 21, č. 1, s. 165-170, doi: 10.3892/ijo.21.1.165.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2010). Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *European journal of immunology*, roč. 40, č. 3, s. 627-630, doi: 10.1002/eji.200940160.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, roč. 26, č. 4, s. 239-257, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Kersey, J. H., Spector, B. D., & Good, R. A. (1973). Primary immunodeficiency diseases and cancer: The immunodeficiency-cancer registry. *International Journal of Cancer*, roč. 12, č. 2, s. 333-347, doi: 10.1002/ijc.2910120204.
- Kim, N.-G., Koh, E., Chen, X., & Gumbiner, B. M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, roč. 108, č. 29, s. 11930-11935, doi: 10.1073/pnas.1103345108.
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, roč. 290, č. 5497, s. 1717-1721, doi: 10.1126/science.290.5497.1717.
- Kubbutat, M. H., N., J. S., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, roč. 387, č. 6630, s. 299-303, doi: 10.1038/387299a0.

- Langdon, S. P. (2004). *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., ISBN: 9781588290793.
- Lange, S. S., Takata, K.-i., & Wood, R. D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nature reviews. Cancer*, roč. 11, č. 2, s. 96-110, doi: 10.1038/nrc2998.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annual review of immunology*, roč. 23, č. 1, doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
- Lax, A. J. (2005). Bacterial toxins and cancer - a case to answer? *Natur Reviews. Microbiology*, roč. 3, č. 4, s. 343-349, doi: 10.1038/nrmicro1130.
- Li, D., Mallory, T., & Satomura, S. (2001). AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clinica chimica acta*, roč. 313, č. 1-2, s. 15-19, doi: 10.1016/S0009-8981(01)00644-1.
- Lin, H., Balic, M., Zheng, S., Datar, R., & Cote, R. J. (2010). Disseminated and circulating tumor cells: Role in effective cancer management. *Critical reviews in oncology/ hematology*, roč. 77, č. 2011, s. 1-11, doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.04.008.
- Lynch, D. H., Ramsdell, F., & Alderson, M. R. (1995). Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunology today*, roč. 16, č. 12, s. 569-574, doi: 10.1016/0167-5699(95)80079-4.
- Mačák, J., Mačáková, J., & Dvořáčková, J. (2012). *Patologie - 2., doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing a. s., ISBN: 9788024735306.
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, roč. 146, č. 1, s. 3-15, PMID: 7856735.
- McIntosh, J. R., & Koonce, M. P. (1989). Mitosis. *Science*, roč. 246, č. 4930, s. 622-628, doi: 10.1126/science.2683078.
- Meenakshi, A. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Labome, Materials and Methods*, roč. 3, č. 175, doi: 10.13070/mm.en.3.175.
- Mehta, A., Norton, P., Liang, H., Comunale, M. A., Wang, M., Rodemich-Betesh, L., a další. (2012). Increased levels of tetra-antennary N-linked glycan but not core fucosylation are

associated with hepatocellular carcinoma tissue. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, roč. 21, č. 6, s. 925-933, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-1183.

Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell proliferation*, roč. 33, č. 5, s. 261-274, doi: 10.1046/j.1365-2184.2000.00191.x.

Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*, roč. 274, č. 6, s. 1393-1418, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., a další. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, roč. 19, č. 1, s. 197-223, doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197.

Nagao, M., Nakajima, Y., Hisanaga, M., Kayagaki, N., Kanehiro, H., Aomatsu, Y., a další. (1991). The alteration of fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: How do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo? *Hepatology (Baltimore, Md.)*, roč. 30, č. 2, s. 413-421, doi: 10.1002/hep.510300237.

Ochsenbein, A. F. (2001). Roles of tumor localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature*, roč. 411, č. 6841, s. 1058-1064, doi: 10.1038/35082583.

Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Immune surveillance: A Balance between pro- and anti-tumor immunity. *Current opinion in genetics & development*, roč. 18, č. 1, s. 11-18, doi: 10.1016/j.gde.2007.12.007.

Paolucci, C., Rovere, P., De Nadai, C., Manfredi, A. A., & Clementi, E. (2000). Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor -regulated endocytosis of human dendritic cells in cyclic GMP-dependent way. *The Journal of Biological Chemistry*, roč. 275, č. 26, s. 19638-19644, doi: 10.1074/jbc.M000511200.

Patel, L. R., Camacho, D. F., Shiozawa, Y., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2011). Mechanisms of Cancer Cell Metastasis to the Bone. *Future Oncology*, roč. 7, č. 11, s. 1258-1297, doi: 10.2217/fon.11.112.

- Peurala, E., Koivunen, P., Haapasaari, K.-M., Bloigu, R., & Jukkola-Vuorinen, A. (2013). The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, roč. 15, č. 1, s. 1-10, doi: 10.1186/bcr3376.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, roč. 414, č. 6859, s. 105-111, doi: 10.1038/35102167.
- Ritz, J., Nadler, L. M., Bhan, A. K., Notis-McConarty, J., Pesando, J. M., & Schlossman, S. F. (1981). Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. *Blood*, roč. 58, č. 3, s. 648-652, PMID: 6973348.
- Rockwell, S. (1980). In vivo-in vitro tumour cell lines: characteristics and limitations as models for human cancer. *The British journal of cancer. Supplement 4.*, roč. 41, č. 4, s. 118-122, PMID: 6932914.
- Rohrbach, D. H. (1993). *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes: Cell Biology*. 1250 Sixth Avenue, San Diego, California 92101-4311: Academic Press, ISBN: 9780125931656.
- Rosenthal, N. (1994). DNA and the genetic code. *The New England journal of medicine*, roč. 331, č. 1, s. 39-41, doi: 10.1056/NEJM199407073310109.
- Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., a další. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, roč. 391, č. 6666, s. 496-499, doi: 10.1038/35160.
- Rowinsky, E. K., Windle, J. J., & Von Hoff, D. D. (1999). Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *Journal of clinical oncology*, roč. 17, č. 11, s. 3631-3652, PMID: 10550163.
- Sage, J. (2012). The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes & development*, roč. 26, č. 13, s. 1409-1420, doi: 10.1101/gad.193730.112.
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, roč. 391, č. 6662, s. 96-99, doi: 10.1038/34214.

- Salazar-Onfray, F. (1999). Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Medical oncology and tumor pharmacotherapy*, roč. 16, č. 2, s. 86-94, doi: 10.1007/BF02785841.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, roč. 1, č. 12, s. 72-76, doi: 10.1038/35036093.
- Schmaltz, C., Harrigan Hardenbergh, P., Wells, A., & Fisher, D. E. (1998). Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Molecellar and cellular biology*, roč. 18, č. 5, s. 2845-2854, PMID: 9566903.
- Schwartz, J. L. (2005). Physical casues of cancer. V J. L. Schwartz, *The cancer handbook* (s. 1-8). Chichester, UK: John Wiley & Sons, ISBN: 9780470018521, doi: 10.1002/9780470025079.chap22.pub2.
- Slack, J. M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science*, roč. 287, č. 5457, s. 1431-1433, PMID: 10688782.
- Spizzo, G., Fong, D., Wurm, M., Ensinger, C., Obrist, P., Hofer, C., a další. (2011). EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *Journal of clinical pathology*, roč. 64, č. 5, s. 415-420, doi: 10.1136/jcp.2011.090274.
- Stacey, D. W. (2003). Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Current opinion in cell biology*, roč. 15, č. 2, s. 158-163, doi: 10.1016/S0955-0674(03)00008-5.
- Steeg, P. S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, roč. 3, č. 1, s. 55-63, doi: 10.1038/nrc967.
- Sutandyo, N. (2010). Nutritional carcinogenesis. *Acta Medica Indonesiana*, roč. 42, č. 1, s. 36-42, PMID: 20305331.
- Suzuki, K., & Yamashita, S. (2012). Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. *Japanese journal of clinical oncology*, roč. 42, č. 7, s. 563-568, doi: 10.1093/jjco/hys078.
- Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, roč. 117, č. 5, s. 1137-1146, doi: 10.1172/JCI31405.

- Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, roč. 117, č. 5, s. 1137-1146, doi: 10.1172/JCI31405.
- Štern, P., Vranovský, K., & Šafarčík, K. (2008). Karcinom prostaty - molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence. *Klinická biochemie a metabolismus*, roč. 16, č. 37, s. 19 - 26.
- Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, roč. 8, č. 5, s. 369-380, doi: 10.1016/j.ccr.2005.10.012.
- Tlsty, T. D., & Coussens, L. M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *The Annual Review of Pathology*, roč. 1, s. 119-150, doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R., & Melief, C. J. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *The Journal of experimental medicine*, roč. 189, č. 5, s. 753-753, doi: 10.1084/jem.189.5.753.
- Tomita, N. (2011). BCL2 and MYC Dual-Hit Lymphoma/Leukemia. *Journal of clinical and experimental hematopathology*, roč. 51, č. 1, s. 7-12, doi: 10.3960/jslrt.51.7.
- Trump, B. E., Berezesky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology*, roč. 25, č. 1, s. 82-88, doi: 10.1177/019262339702500116.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, roč. 324, č. 5930, s. 1029-1033, doi: 10.1126/science.1160809.
- Vardiman, J. W. (2009). Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. *American journal of clinical pathology*, roč. 132, č. 2, s. 250-260, doi: 10.1309/AJCPUN89CXERVOVH.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, roč. 36, č. 3, s. 131-149, doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.

- Vicari, A., Caux, C., & Trinchieri, G. (2002). Tumor escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Seminars in cancer biology*, roč. 12, č. 1, s. 33-42, doi: 10.1006/scbi.2001.0400.
- Vleminckx, K., & Kemler, R. (1999). Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, roč. 21, č. 3, s. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199903)21:3<211::AID-BIES5>3.0.CO;2-P.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, roč. 123, č. 3191, s. 309-314, PMID: 13298683.
- Warburg, O., Posener, K., & Negelein, E. (1924). Über den stoffwechsel der tumoren. *Biochemische Zeitschrift*, roč. 152, č. 1, s. 319-344.
- Weerasinghe, P., & Buja, M. L. (2012). Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Experimental and molecular pathology*, roč. 93, č. 3, s. 302-308, doi: 10.1016/j.yexmp.2012.09.018.
- Weidanz, J. A., Hawkins, O., Verma, B., & Hildebrand, W. H. (2011). TCR - like biomolecules target peptide/MHC Class I complexes on the surface of infected and cancerous cells. *International reviews of immunology*, roč. 30, č. 5-6, s. 328-340, doi: 10.3109/08830185.2011.604880.
- Westhoff Smith, D., & Sugden, B. (2013). Potential Cellular Functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) of Epstein-Barr Virus. *Viruses*, roč. 5, č. 1, s. 226-240, doi: 10.3390/v5010226.
- Wölfle, U., Müller, V., & Pantel, K. (2006). Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance. *Future oncology*, roč. 2, č. 4, s. 553-561, doi: 10.2217/14796694.2.4.553.
- Yang, J. e. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, roč. 275, č. 5303, s. 1129-1132, doi: 10.1126/science.275.5303.1129.
- Yu, M., Statt, S., Toner, M., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2011). Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *The Journal of cell biology*, roč. 192, č. 3, s. 373-382, doi: 10.1083/jcb.201010021.

Zajac-Kaye, M. (2001). Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung cancer*, roč. 34, s. 43-46, doi: 10.1016/S0169-5002(01)00343-9.

Zanetta, G. M., Webb, M. J., Li, H., & Keeney, G. L. (2000). Hyperestrogenism: a relevant risk factor for the development of cancer from endometriosis. *Gynecologic oncology*, roč. 79, č. 1, s. 18-22, doi: 10.1006/gyno.2000.5905.

Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual review of medicine*, roč. 49, č. 1, s. 407-424, doi: 10.1146/annurev.med.49.1.407.

Zheng, J. (2012). Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncology letters*, roč. 4, č. 6, s. 1151-1157, doi: 10.3892/ol.2012.928.

Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Natur reviews. Immunology*, roč. 6, č. 4, s. 296-307, doi: 10.1038/nri1806.

zur Hausen, H. (2001). Oncogenic DNA viruses. *Oncogene*, roč. 20, č. 54, s. 7820 - 7823, doi: 10.1038/sj.onc.1204958.

Seznam internetových zdrojů

[URL-1]

http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/apoptosis_analysis_cellcycle_phases_lrg.jpg,
24. 6. 2014, 21:59

[URL-2]

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:P53_pathways.jpg#file, 25. 6. 2014, 15:37

[URL-3]

<http://fagoniacreticaforcancer.com/whole-story-of-cancer-cells.aspx>, 25. 2. 2014, 12:06

[URL-4]

<http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio315/picts/lectures/lecture20/CancerBenignMalig1.jpg>,
27. 6. 2014, 9:42

[URL-5]

<http://www.bioscience.org/2008/v13/af/3173/fulltext.php?bframe=figures.htm>, 13. 3. 2014,
18:07