

LÉČEBNÉ METODY

CHIRURGIE

OZAŘOVÁNÍ

CHEMOTERAPIE

BIOLOGICKÁ TERAPIE

Chemoterapeutické látky

- ▶ platinové deriváty
- ▶ antimetabolity (metotrexat, fluorouracil)
- ▶ inhibitory topoizomeráz (doxorubicin, etoposid)
- ▶ alkylační činidla (cyklofosfamid)
- ▶ rostlinné alkaloidy (vinblastin, paclitaxel)

Biologická terapie - hledání nových přístupů na základě poznání mechanismů

- ▶ Stimulace obranných mechanismů hostitele včetně specifických a nespecifických imunologických přístupů (imunoterapie)
- ▶ Strategie cílené přímo na změnu nádorového růstu a diferenciaci - využití růstových faktorů, genetické inženýrství - ovlivnění klíčových genů.
- ▶ Angiogenní terapie – cílená proti vaskularizaci nádorů

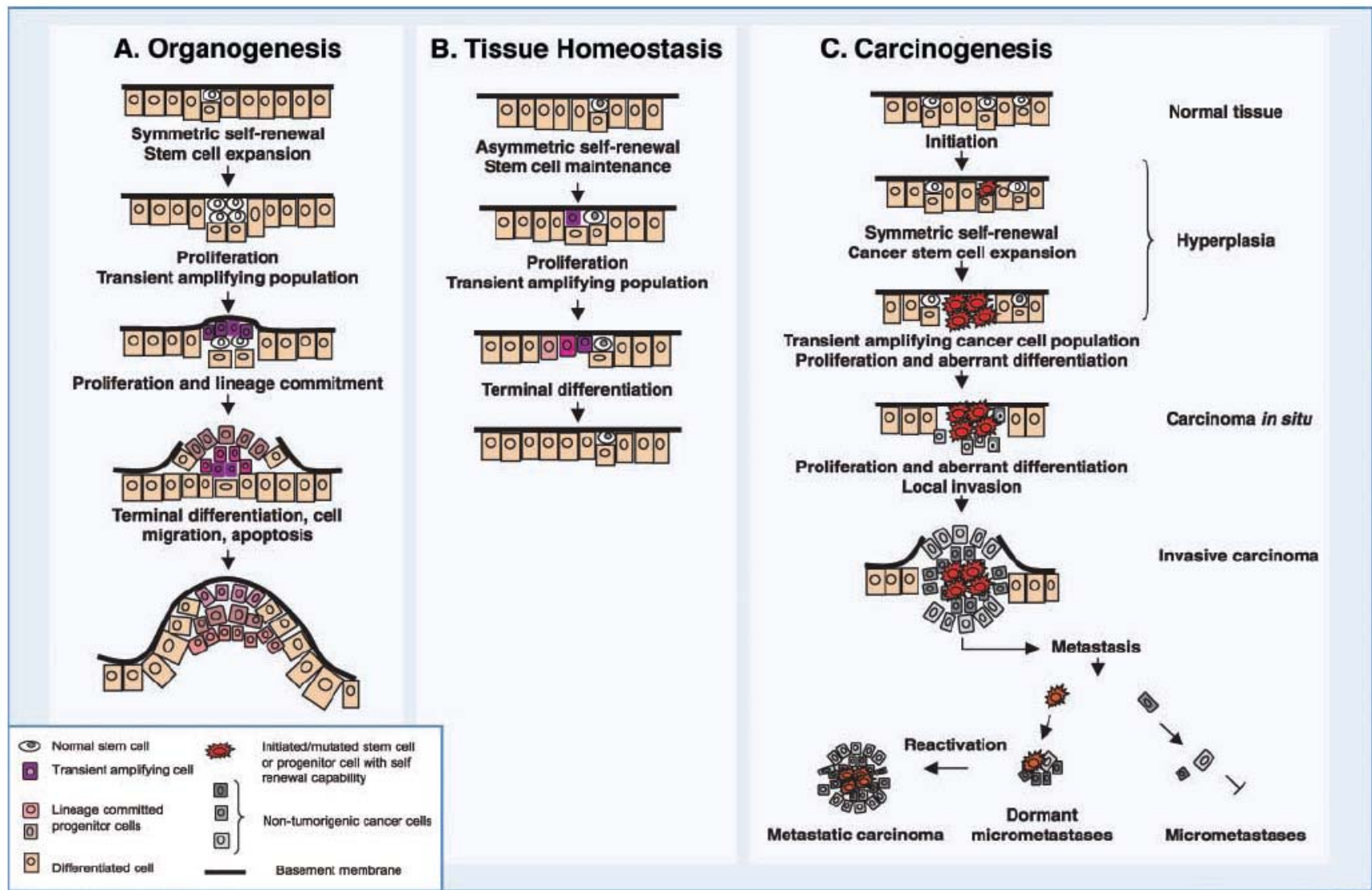


Figure 1. Stem cells in normal development, tissue homeostasis, and carcinogenesis. *A*, during normal development, symmetric stem cell self-renewal results in stem cell expansion. This process is tightly regulated by components of the stem cell niche. Stem cells differentiate into a transient amplifying population that undergoes further proliferation and lineage commitment followed by cell migration, terminal cell differentiation, and apoptosis of fully differentiated cells. *B*, during normal tissue homeostasis, asymmetric self-renewal of stem cells results in stem cell maintenance. Proliferation and differentiation of transient amplifying progenitor cells replaces normal cell loss resulting in tissue homeostasis. *C*, carcinogenesis may be initiated by stem cell expansion via symmetric self-renewal. Unlike normal organogenesis, this process is dysregulated resulting in cancer stem cell expansion. Aberrant differentiation of these cells generates tumor heterogeneity. Further mutations or epigenetic changes may accompany tumor invasion and metastasis. Metastases require the dissemination of cancer stem cells that may remain dormant and be reactivated resulting in tumor recurrence. In contrast, dissemination of differentiated tumor cells produces only micrometastasis that do not progress.

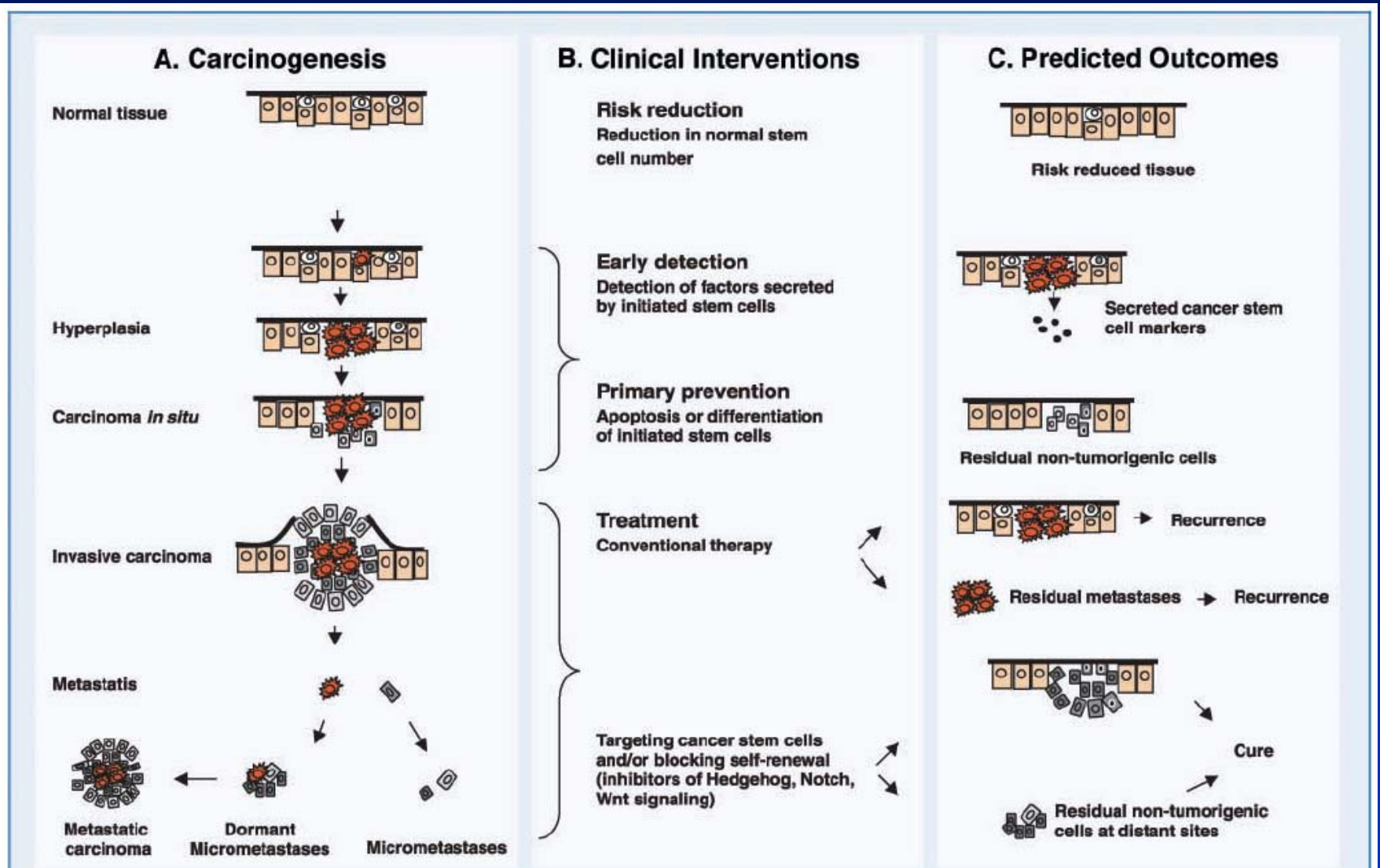


Figure 2. Clinical implications of cancer stem cell model. The cancer stem cell model has important implications for cancer risk reduction, early detection, prevention, and treatment. Interventions that reduce normal stem cell number may decrease cancer risk. Detection of factors secreted by initiated stem cells may allow for the earlier detection of cancers. Interventions that induce apoptosis or differentiation of initiated stem cells may be effective in cancer prevention. Conventional cancer therapies, including cytotoxic agents, selectively destroy differentiated cancer cells, sparing the cancer stem cell compartment resulting in cancer recurrence at primary or metastatic sites. Therapies that selectively eliminate cancer stem cells leave residual nontumorigenic cells resulting in potential cancer cures.

Podpůrná (symptomatická) léčba

Nemá za cíl smrt nádorových buněk, ale usiluje o co nejlepší kvalitu života nemocných (zmírnění obtíží vyvolaných nádorem a léčbou)

Paliativní léčba – komplexní podpůrná léčba u pacientů s pokročilým nevléčitelným onemocněním

Kurativní léčba – cílem je vyléčení nemocného

Nekurativní léčba – cílem je zabít nádorové buňky, ale nemá ambice vyhubit všechny (pokročilé onemocnění, rezistence na léčbu atd.)

Adjuvantní léčebné postupy –chemo- nebo radio-terapie – u těch nádorů, kde je předpokládána přítomnost mikrometastáz, nutná chemosenzitivita nádoru

Neoadjuvantní postupy – předoperační léčba s cílem zmenšit primární nádor před chirurgickým výkonem

Vznik a vývoj nádorů je složitý děj, který závisí na překonání řady restričních mechanismů na úrovni genomu, buňky, tkáně i celého organismu a který pro svou komplexnost vyžaduje při plánování terapie individuální přístup (tailoring therapy) - **využití poznanych biologických charakteristik**

Klinické – staging (jeden z nejsilnějších prognostických faktorů), sledování přežití a léčebné odpovědi

Orgánové – sledování odpovědi nádoru na léčbu

Tkáňové – histologická charakteristika, grading, tkáňová architektura, vaskularizace, expresní profily-imunohistochemie, *in situ* hybridizace

Buněčná – funkční testy, obsah DNA, proliferační a apoptická aktivita

Molekulární – cytogenetické a genetické charakteristiky nádorových a somatických buněk

Incidence nádorových onemocnění se stále zvyšuje. Přesto je dlouhodobá mortalita téměř konstantní díky výrazným léčebným a diagnostickým pokrokům.

Nové léčebné postupy, nová chemoterapeutika, kombinovaná terapie a aplikace nových poznatků o biologii nádorové buňky.

Hledají se nové prognostické/prediktivní faktory umožňující přesnější rozdělení nemocných do rizikových skupin.

Cancer incidence and mortality in the United States

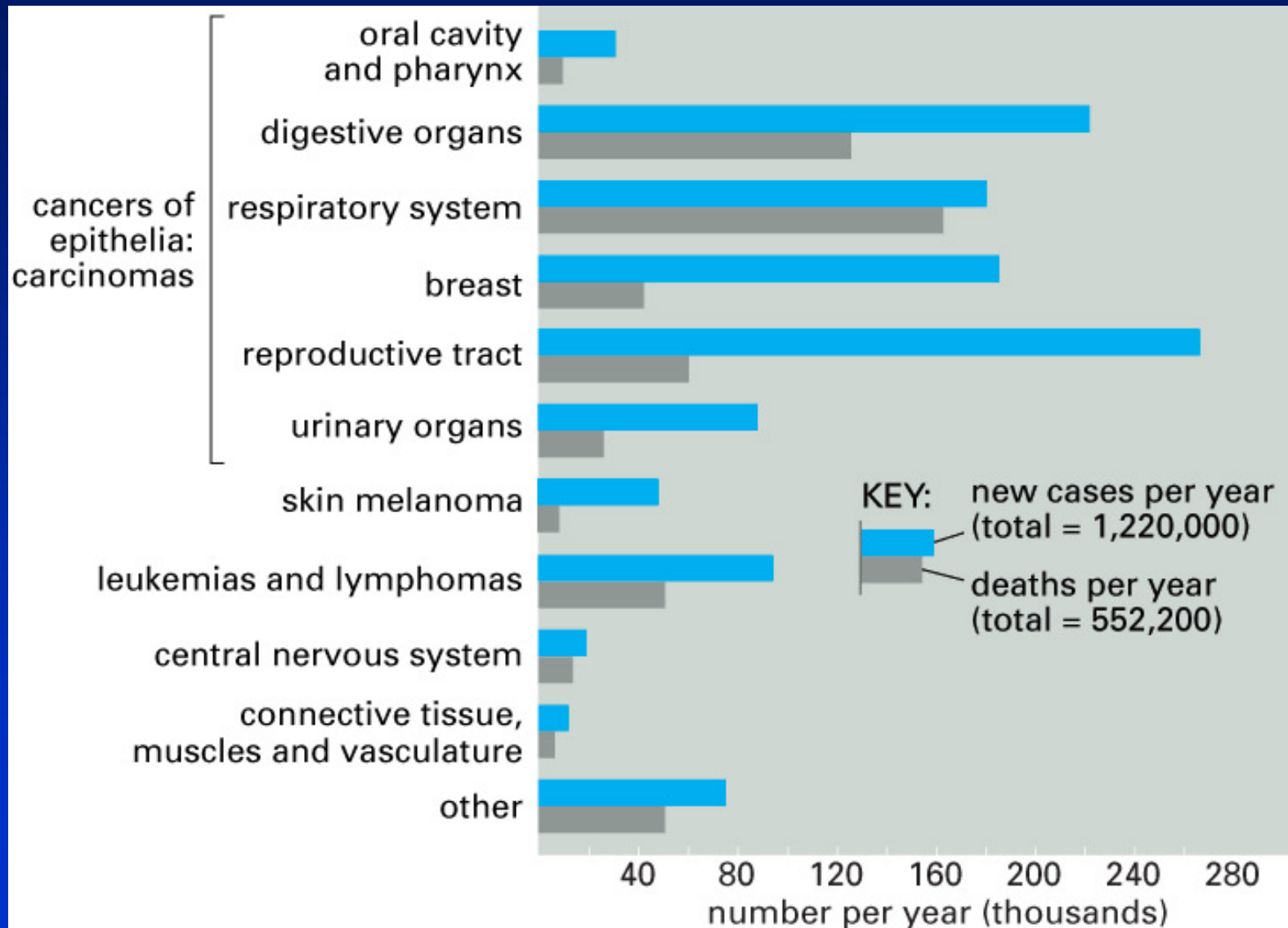


Figure 23-2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

DIAGNOSTIKA

Laboratorní vyšetření (sedimentace erytrocytů, hematologické vyšetření, biochemická vyšetření)

Nádorové markery – laboratorně prokazatelné známky projevu specifických nádorových onemocnění (antigeny, enzymy, hormony a jejich receptory)

Mohou odrážet proliferační aktivitu, mohou být sdružené s diferenciací nebo vznikají při destrukci buněk.

Patří sem i pro nádor charakteristické chromozomální abnormality.

Biochemické metody detekce: radioimunologická (RIA), enzym vázající imunisorpční (ELISA) (většinou komerční kity a automatické analyzátoary)

Vyšetření stavu buněčné kinetiky

Morfologie, sledování počtu mitóz – mitotický index

Metody autoradiografické (inkorporace 3H-tymidinu)

Metody cytochemické (speciální barvení, specifické protilátky proti antigenům spojeným s proliferací (Ki-67, PCNA), stanovení AgNOR

Průtoková cytometrie

Molekulárně biologické metody (Southern, Northern a Western blotting pro analýzu DNA, RNA a proteinů), polymerázová řetězová reakce – amplifikace malých fragmentů DNA, vytváření cDNA knihoven z malého množství mRNA (PCR, RT-PCR, real-time PCR)

Hybridizace in situ, microarrays

Cytologické a bioptické vyšetření (pre- nebo postoperační)

ZOBRAZOVACÍ METODY

Ultrasonografie – vyšetření ultrazvukem, neinvazivní

Rentgenové vyšetření – kontrastní vyšetření, mamografie – screening a diagnostika rakoviny prsu

Počítačová tomografie (CT) - odhalí až 90% ložisek menších než 1 cm

Magnetická rezonance (MR) – zejména vyšetření mozku a míchy

Radionuklidové vyšetřovací metody – využití izotopů (scintigrafie, emisní tomografie)

Endoskopické vyšetření – nádory v tělních dutinách

Klasifikace nádorových onemocnění

Určení rozsahu onemocnění důležité pro volbu léčebné strategie a pro odhad prognózy onemocnění.

Jednotný klasifikační systém TNM

T (tumor) 1-4 – rozsah primárního nádoru

N (noduli) 1-3, 0, X – stav regionálních mízních uzlin

M (metastases) 0, 1 – informace o metastázách

Histopatologický grading G1 – 4, X – stupeň diferenciacie

Další nezávazné deskriptory

Stadium choroby (staging) I. – IV.

Hodnocení tělesné zdatnosti (funkční staging)

U některých nádorů formulován soubor prognostických znaků, tzv. mezinárodní prognostický index (IPI)

PREDIKTIVNÍ ONKOLOGIE

klinicky orientovaný onkologický výzkum využívající metod buněčné a molekulární biologie.

Hledání nových léčebných postupů a léčiv směřovaných na klíčové genetické změny umožňující transformaci normální somatické buňky v nádorovou.

Jsou to především

- ▶ poruchy buněčného cyklu,
- ▶ poruchy v aktivitě/množství receptorů pro růstové faktory,
- ▶ exprese protiapoptických faktorů a
- ▶ nesmrtnost nádorových buněk vázaná či nevázaná na expresi telomerázy.

Chromozomální a genetická analýza nádorových buněk je důležitým faktorem pro prognózu a individualizaci léčby. Problémem jsou zvláště solidní nádory, kde jsou cytogenetické znalosti minimální např. ve srovnání s hematologickými malignitami. V praxi se jedná o stanovení ploidity DNA, chemosensitivity *in vitro*, cytogenetické a genetické vyšetření atd.

MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE

studium procesů související se vznikem a rozvojem chorob, a to na úrovni nukleových kyselin a proteinů, respektive jiných molekul, které jsou jimi regulovány.

Využívá technik molekulární biologie a výsledky jsou dávány do kontextu s nálezy dalších biomedicínských oborů. Umožňuje odhalovat počátky nemoci a nahlédnout až na genovou úroveň.

Nové směry vývoje protinádorové léčby

Cílem je přímo a cíleně zasáhnout do klíčových mechanismů karcinogeneze na buněčné úrovni (targeted therapy).

Často v kombinaci s konvenčními léčebnými postupy

- ▶ **Anti EFGR terapie** – monoklonální protilátky s vazbou na receptor, inhibitory tyrozinkináz, antisense nukleotidy, vakcína proti receptoru nebo ligandu
- ▶ **Diferenciační terapie** (kyselina all-trans retinová, vit D3)
- ▶ **Inhibitory přenosu signálů**

Inhibitory tyrozinkináz

Inhibitory cyklin-dependentních kináz – ovlivnění bun. cyklu

Inhibitory jiných kináz – např. MAP kinázy, JNK

Inhibitory farnesyltransferázy – inhibují onkoprotein ras – spojen s vnitřní stranou plazmatické membrány izoprenoidní lipidovou skupinou – farnesylem

Mutace protoonkogenu ras - častá u nádorů - vede k nekontrolované proliferaci, inhibici apoptózy a zvýšení angiogeneze

Imunoterapie

intervence do imunitních mechanismů s cílem obnovit nebo modifikovat funkce imunitního systému (substituční, supresivní nebo stimulační, aktivní vs. pasivní, specifická a nespecifická)

Buněčná imunoterapie – podání buněk imunitního systému s protinádorovou aktivitou – cílené zasažení nádorové tkáně a překonání tolerance a imunosuprese vyvolané nádorem.

Nádorové antigeny – vznik nových antigenů, kterými se nádorové buňky liší od normálních – terč pro imunitní reakci

Nespecifická buněčná imunoterapie – posílení protinádorové imunity nezávisle na specifických nádorových antigenech

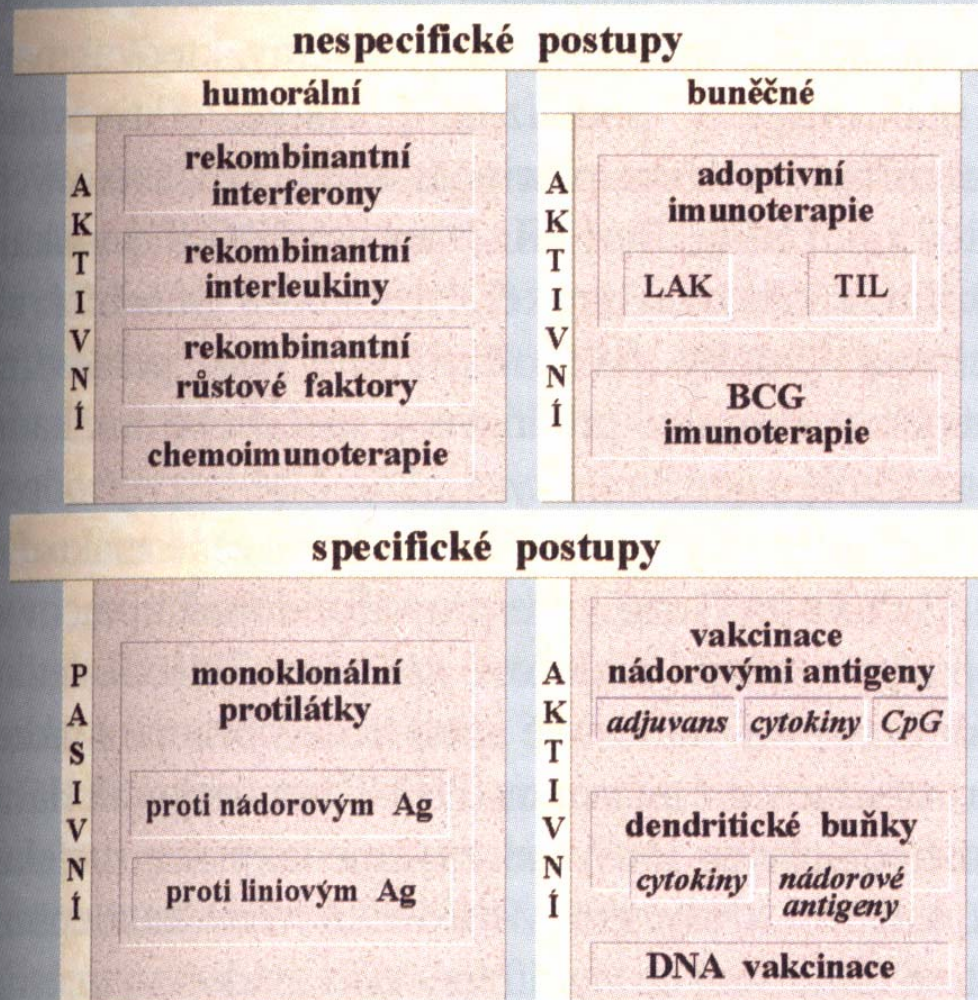
Princip: kultivace efektorových buněk *ex vivo* s látkami, které aktivují nebo posilují jejich protinádorový účinek (LAK buňky, NK-buňky, aktivované monocyty-makrofágy)

Zkoušeno přes 30 let – malé uplatnění v praxi

Specifická buněčná imunoterapie – adoptivní imunoterapie využívající specifický převod buněk (TIL)

Protinádorové vakcíny – navozují specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám v prim. nádoru i metastázách

Dendritické buňky



Obr. 26.19: Terapeutická modulace imunitního systému nemocných s nádorovým bujením

Genová terapie

Postup mající za cíl napravit genetickou odchylku způsobující vývoj nádorové buňky (p53, geny rezistence, sebevražedné geny, cytokiny)

Antisense oligonukleotidy

Angiogeneze a antiangiogenní terapie

inhibitory proteáz

inhibitory migrace a proliferace endotelu

inhibitory angiogenních růstových faktorů

chelátory mědi

HODNOCENÍ DAT – VÍCEROZMĚRNÉ ANALÝZY

Průnik metod molekulární biologie do onkologické diagnostiky vyžaduje zpracování multiparametrických (vícerozměrných) souborů dat.

Biomarkery, „surrogate biomarkers“ – „náhradní“ biomarkery

Patří mezi ně

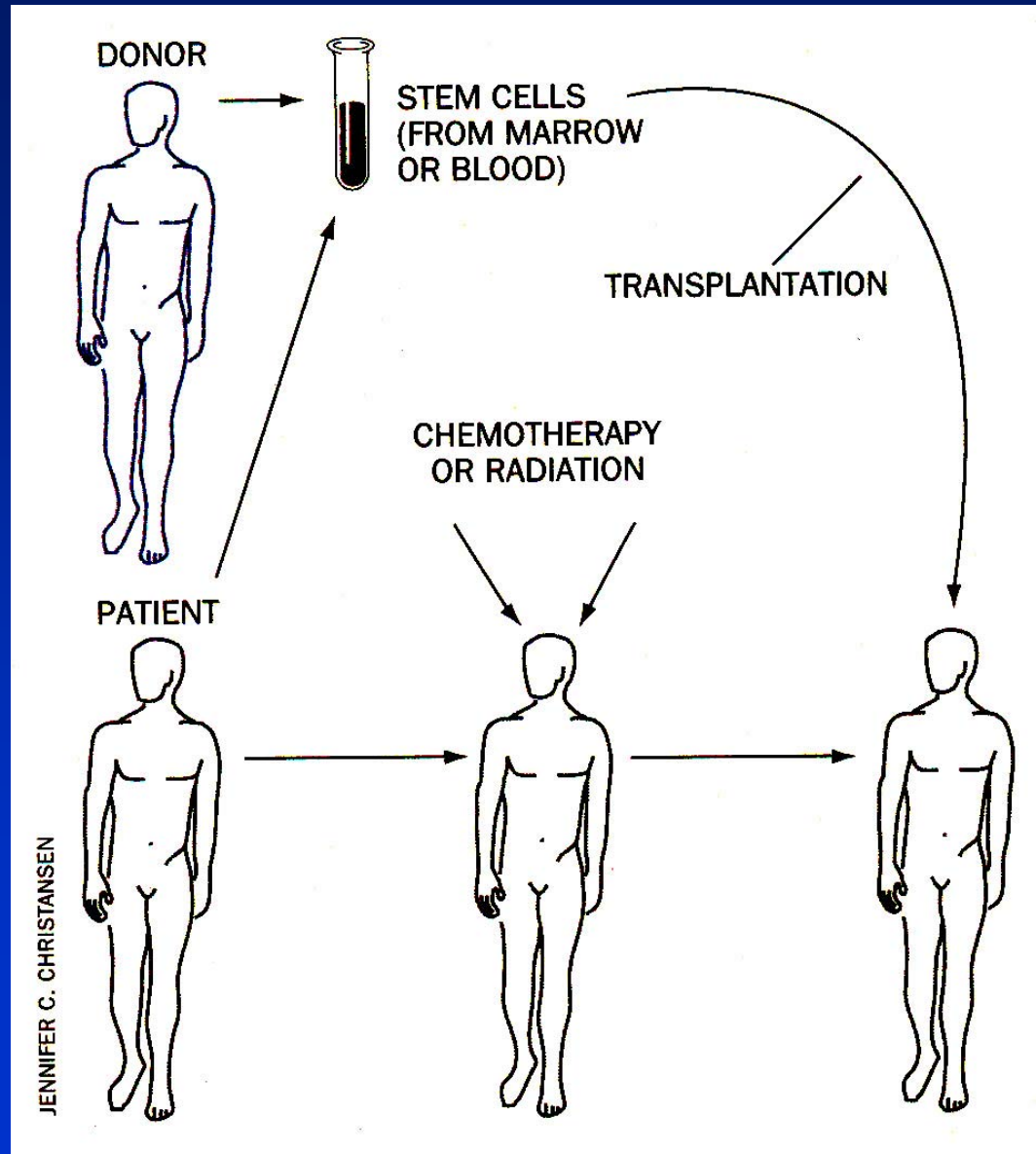
- ▶ důležité genetické a cytogenetické markery,
- ▶ exprese významných regulačních genů,
- ▶ aktivity enzymů,
- ▶ cytokinetické parametry,
- ▶ parametry angiogeneze, atd.

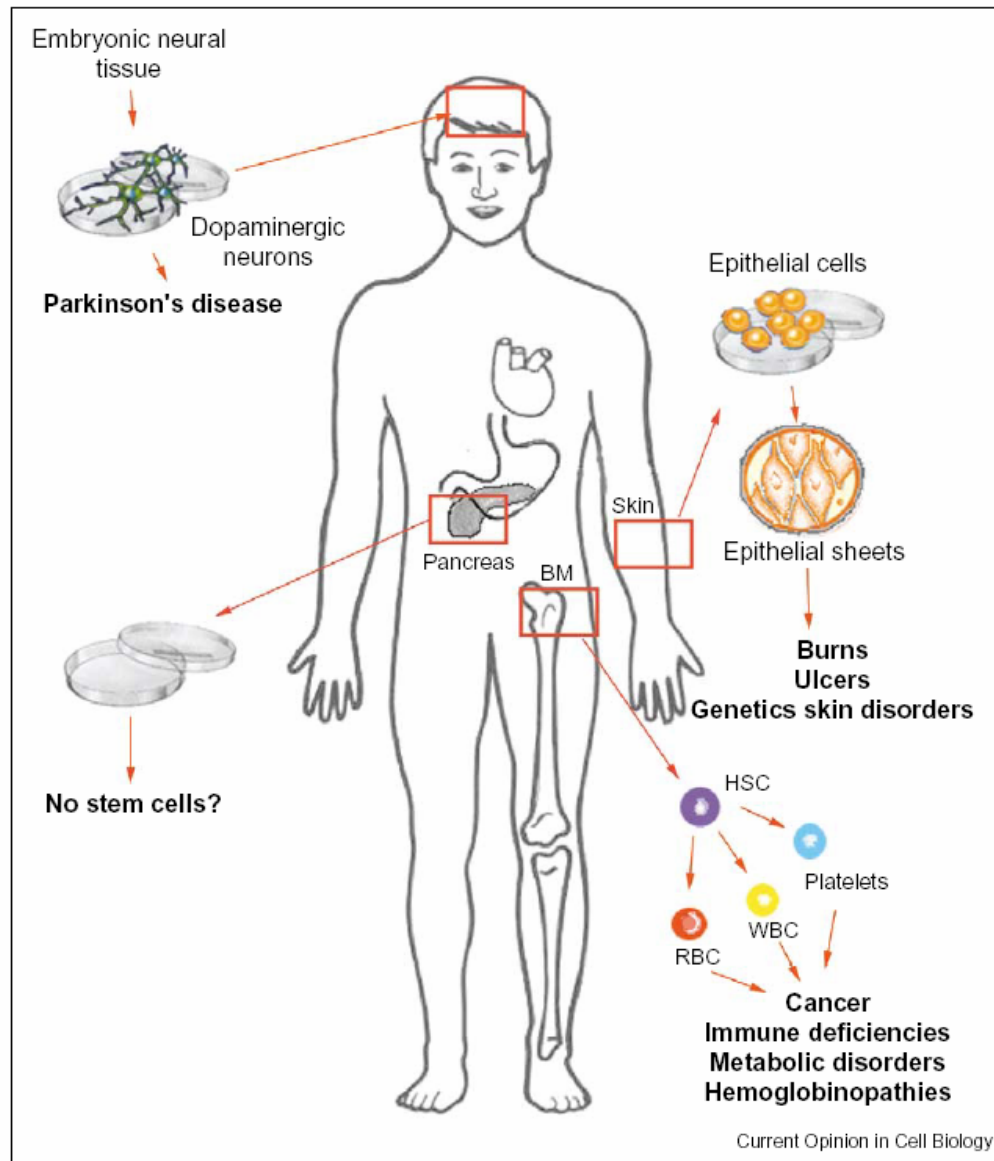
Vyšetření na chemorezistenci v testech *in vitro* (MTT test) a související znaky (exprese MRP, PGP).

Doplňují standardní klinická vyšetření a nespecifické ukazatele imunologického a fyziologického stavu pacienta.

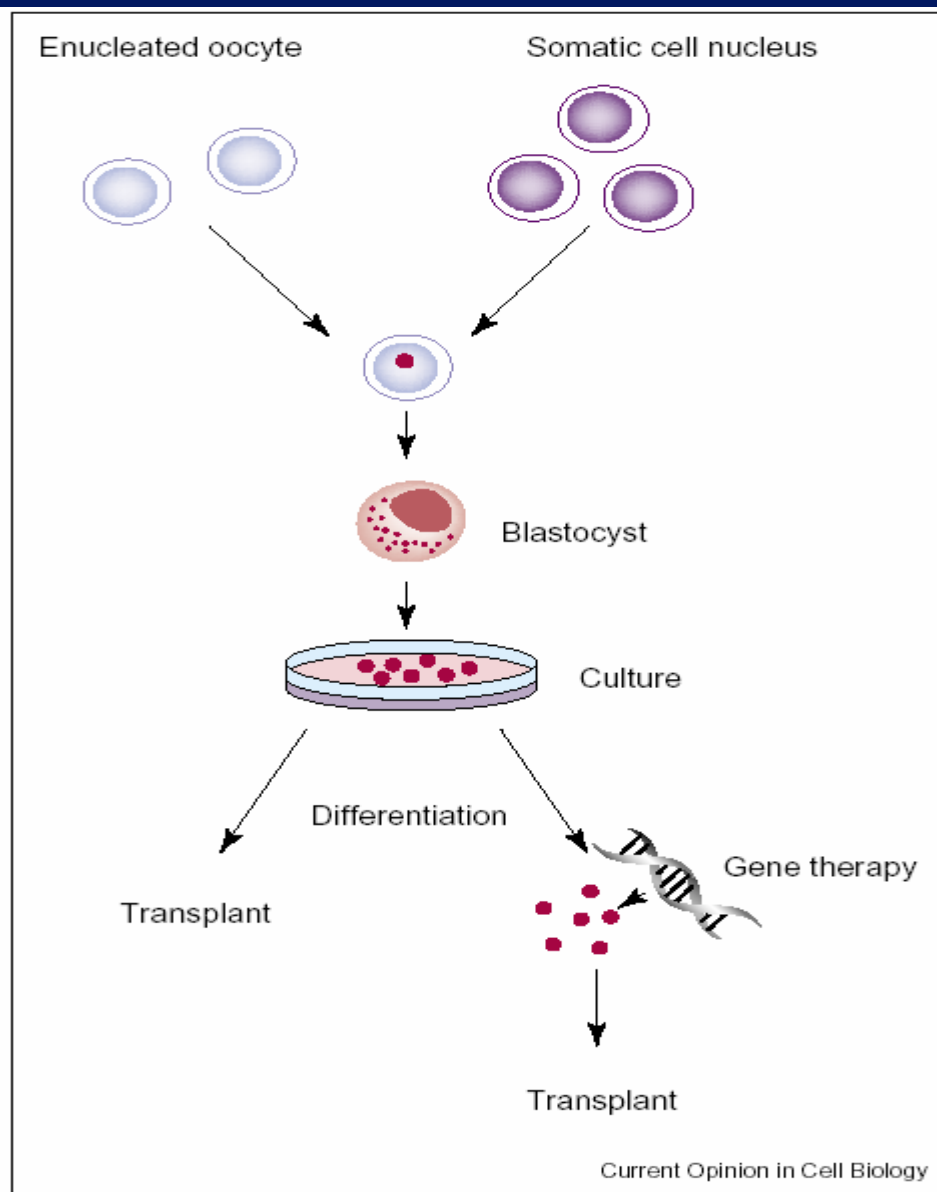
Je nutné vytvořit systém hodnocení takovýchto dat s cílem určit jejich prognostický význam a zajistit zpětnou vazbu lékaře k těmto hodnoceným datům – individualizace léčby – prospěch pro pacienta

Transplantace





Summary of therapeutic tissue-specific stem cell transplants. Purification of HSCs from bone marrow (BM) and subsequent transplantation can reconstitute the blood system, including red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs) and platelets, for the treatment of cancer, immunological deficiencies, metabolic disorders and hemoglobinopathies. Epithelial cells can be cultured and transplanted, creating an autologous source of epithelial stem cells to treat burns, ulcers and genetic skin disorders. Dopaminergic neurons derived from embryonic neural tissue can be transplanted to treat Parkinson's disease. Pancreatic stem cells have not been isolated.



Nuclear transfer embryonic stem (NT ES) cells can be created by the transfer of a somatic cell nucleus into an enucleated oocyte. ES cells cultured from the ICM of a blastocyst created by NT can either be manipulated for transplantation or can undergo gene therapy before transplantation for the treatment of genetic disorders.

Kontrola hemopoézy

▶ **pozitivní regulace** - využití hemopoetických tzv. kolonie stimulujících růstových faktorů (CSF)

erythropoetin, G-CSF - granulocytární růst. faktor, M-CSF - monocytární růst. faktor, GM-CSF - granulocytární-makrofágový růst. faktor, interleukin 3 (IL-3)

▶ **negativní regulace hemopoézy** - prevence poškození kmenových buněk při chemoterapii - TGF β

▶ **autokrinní růst** - blokáda přenosu růstových signálů antagonisty růstových faktorů, receptorů a inhibitory dalších stupňů přenosu signálů (inhibitory PKC, lipidového metabolismu, “antisense” látky, atd.)

▶ **imunomodulační látky** - ovlivnění imunitního systému hostitele (IL-2, interferon alfa a gama)

Erythropoetin

- stimulace erythropoézy po chemoterapii a transplantaci KD
- u některých lymfoproliferačních poruch jako jsou mnohočetné myelomy a chronická lymfocytární leukémie
- u anémií spojených s chronickým onemocněním (nádory, AIDS)
- v programech autologního odběru krve

Granulocytární kolonie stimulující faktor (G-CSF a GM-CSF)

- urychlení zotavení krvetvorby po chemoterapii
- zlepšení sběru progenitorů z periferní krve
- zvýšení účinnosti cytotoxických léčiv vybuzením klidových leukemických buněk

Nejběžnější využití CSF (colony stimulating factors)

- prevence a ovlivnění myelosuprese
- intenzifikace chemoterapeutických programů s nebo bez autologní podpory progenitorů z kostní dřeně (KD) nebo periferní krve
- rekonstituce krvetvorby po chemo- a radioterapii a autogenní nebo allogenní transplantace KD
- podpora a expanze progenitorů periferní krve
- stimulace hemopoézy u syndromů poruch v KD jako je cyklická neutropenie, aplastická anémie
- aktivace efektorových buněčných funkcí (AIDS, poruchy funkce leukocytů)
- pomocí růst. faktorů lze také buňky v G0 fázi, kdy jsou rezistentní k působení cytostatik posunout do buněčného cyklu

CML je klonální myeloproliferativní porucha primitivních hemopoetických kmenových buněk.

Zahrnuje myeloidní, erytroidní, megakaryocyt., B- někdy T-lymfoidní elementy, ale ne fibroblasty kostní dřeně (KD). Nemoc je silně heterogenní, má 2 až 3 fázový průběh, je přítomen chromoz. marker - Ph chromozom.

V minulosti byla prognóza pacientů s CML velmi špatná (stř. doba přežití 3 roky).

Nyní se prognóza zlepšila díky včasné diagnóze, zlepšující se terapii a podpůrné léčbě. Léčba hydroxyureou a busulfanem podporovaná IFN a autologní transpl. KD.

Nyní je stř. doba přežití asi 60-65 měsíců. S IFNalfa 20-25% pacientů přežívá.

Vedlejší účinky - horečka, nechutenství, svalové bolesti, dlouhodobější - ztráta váhy, deprese, nespavost atd.

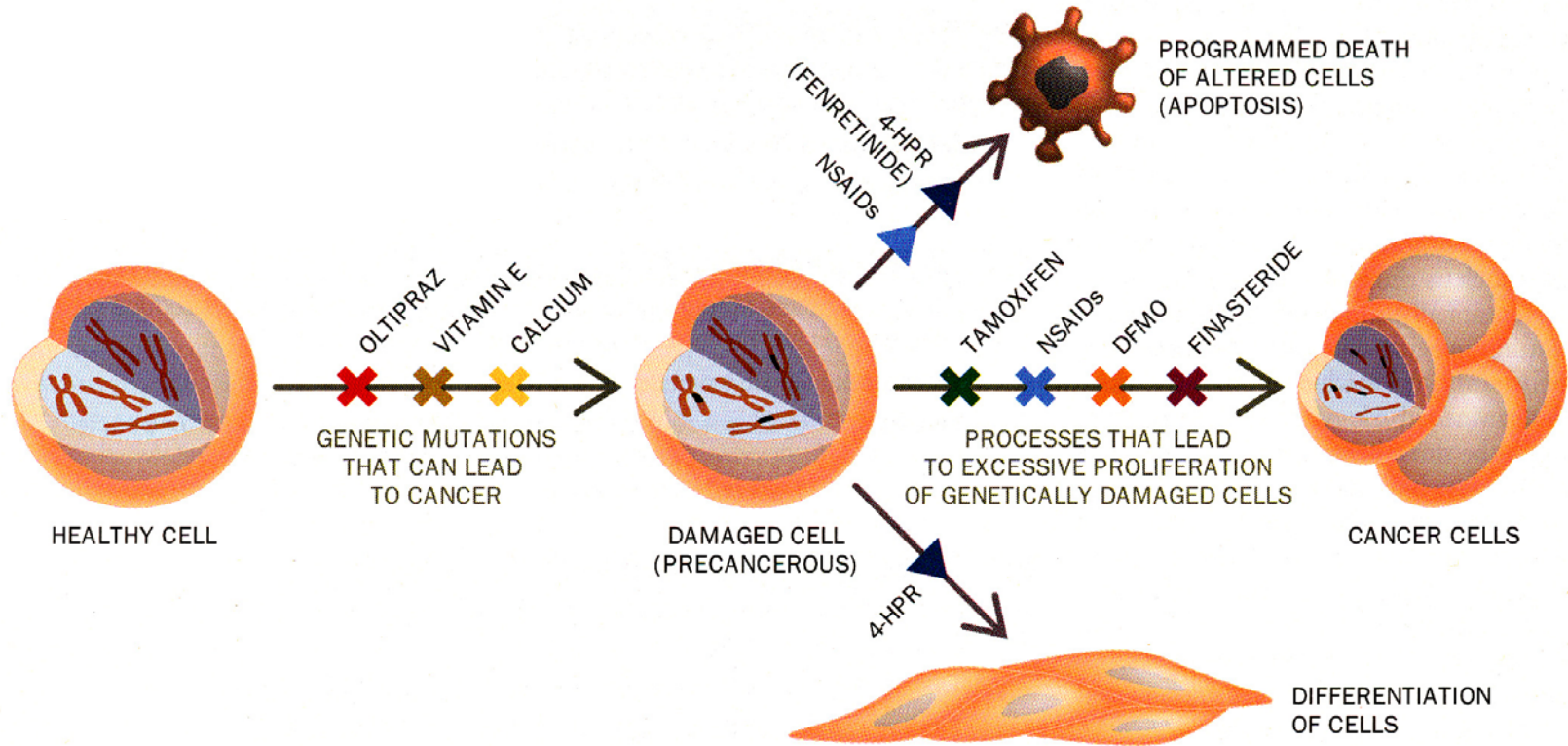
MDS je získaná klonální porucha kostní dřeně charakterizovaná kvantitativními i kvalitativními poruchami v hemopoéze (hodně u starších lidí - není možná drastická terapie)

Řada léčebných protokolů je zaměřena na využití diferenciačních látek k podpoře zrání blokových buněk. Existují *in vitro* modely, kde je možno pomocí retinové kyseliny, DMSO nebo vit D3 příp. G-CSF, GM-CSF. Avšak v praxi u pacientů nepřinášejí žádoucí výsledky.

Kyselina all-trans retinová (ATRA) je nyní efektivním lékem při léčbě akutní promyelocytární leukémie. Na MDS má však malý účinek (genetický důvod - absence translokace 15,17 důležité pravděp. pro klinický účinek ATRA).

Rekombinantní růst. faktory jako GM-CSF a IL-3 jsou u MDS pacientů úspěšně využívány ke zvýšení počtu cirkulujících bílých krvinek a destiček.

Chemoprevention a chemoterapie



DĚDIČNOST NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Genetika, mutace specifických genů – zvýšená náchylnost (susceptibility) k určitým typům nádorů

Prevence – „family trees“, cytogenetické analýzy, enzymové markery



CHEMOPREVENENCE

Přírodní nebo syntetické látky, zasahující v ranných fázích karcinogeneze. Aktivují detoxifikační enzymy, antioxidační účinky - laboratorní a epidemiologické studie

α -tokoferol, β -karoten, vitamin A a retinoidy - zelenina, ovoce

Dithiolthiony, sulforaphan - brokolice, květák, kapusta

Genistein - sója

Epigallocatechine gallate - zelený čaj

Curcumin - curry

Tamoxifen - antiestrogen - prevence u žen se zvýšeným rizikem vzniku nádoru prsu

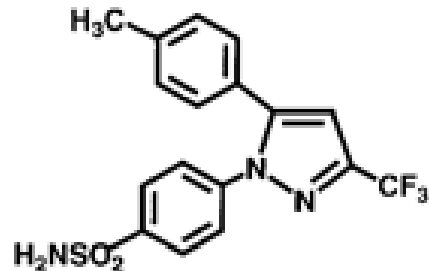
Nesteroidní antiflogistika (NSAID) - aspirin, piroxicam, sulindac - prevence kolorektálních nádorů

Finasteride (blokuje přeměnu testosteronu na androgen) - prevence nádorů prostaty

DFMO - difluorometylnitritin (blokuje aktivitu ornitin dekarboxylázy) - prevence různých typů nádorů

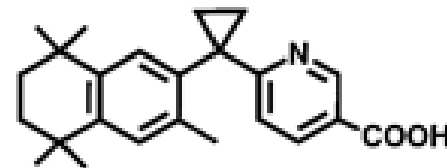
Representative members of four classes of new chemopreventive agents, whose mechanism of action is known

Selective COX-2 Inhibitors



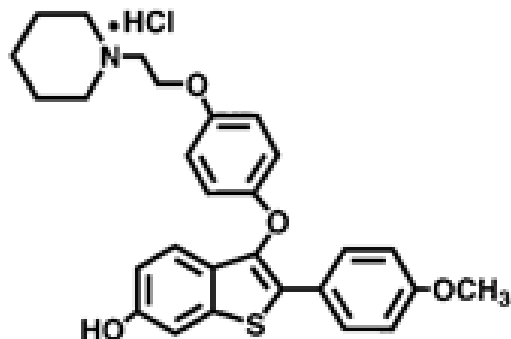
Celecoxib

Selective Binding to RXR (Retinoids)



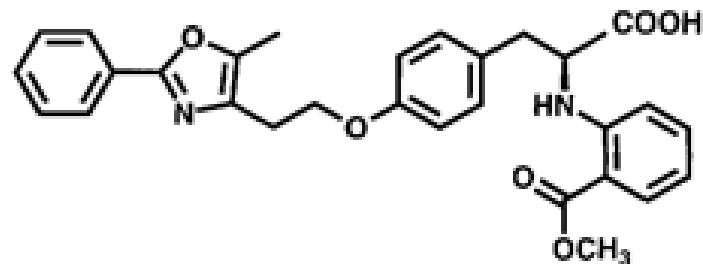
LG 100268

SERMs



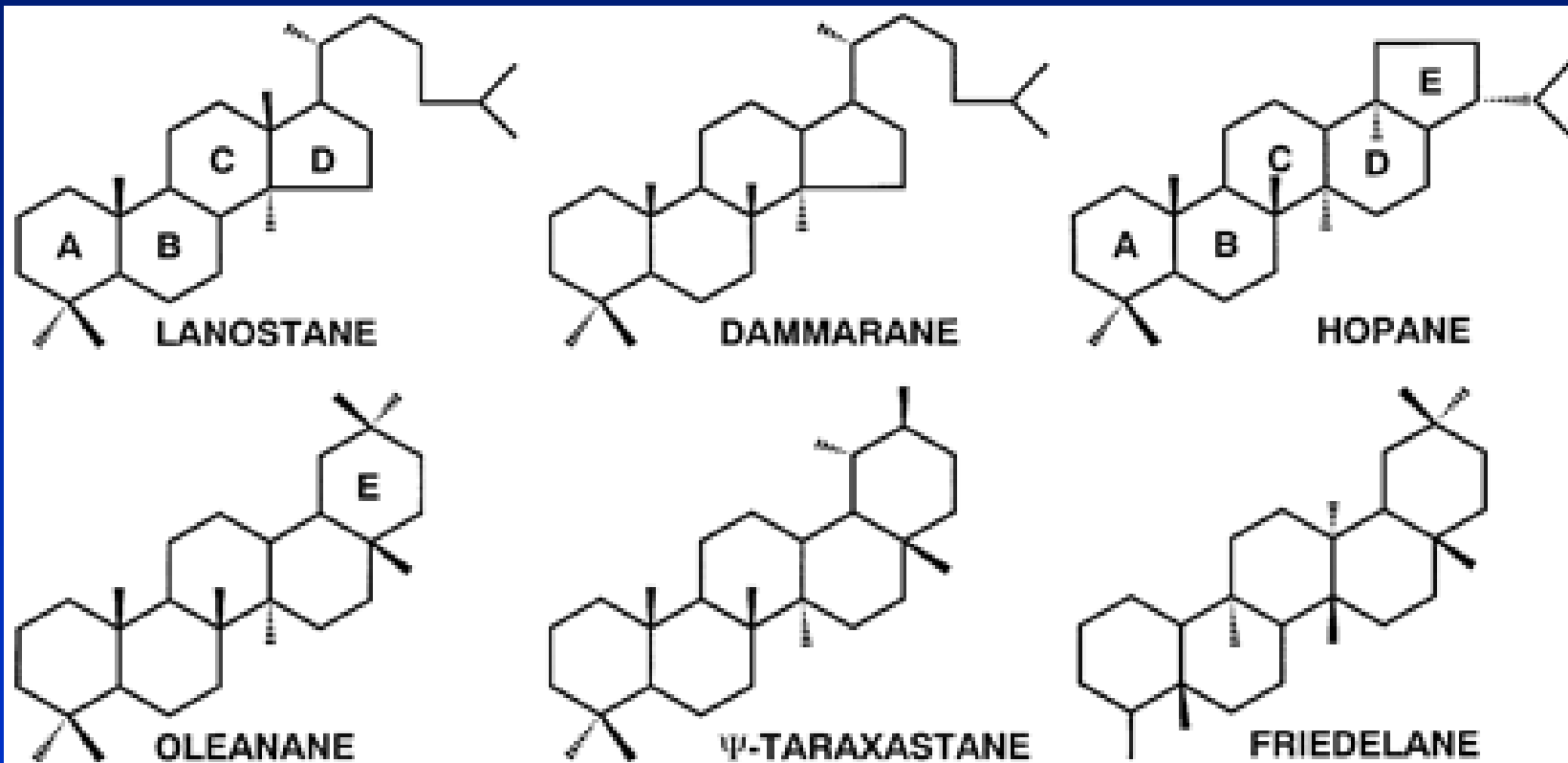
LY353381·HCl

PPAR- γ Ligands

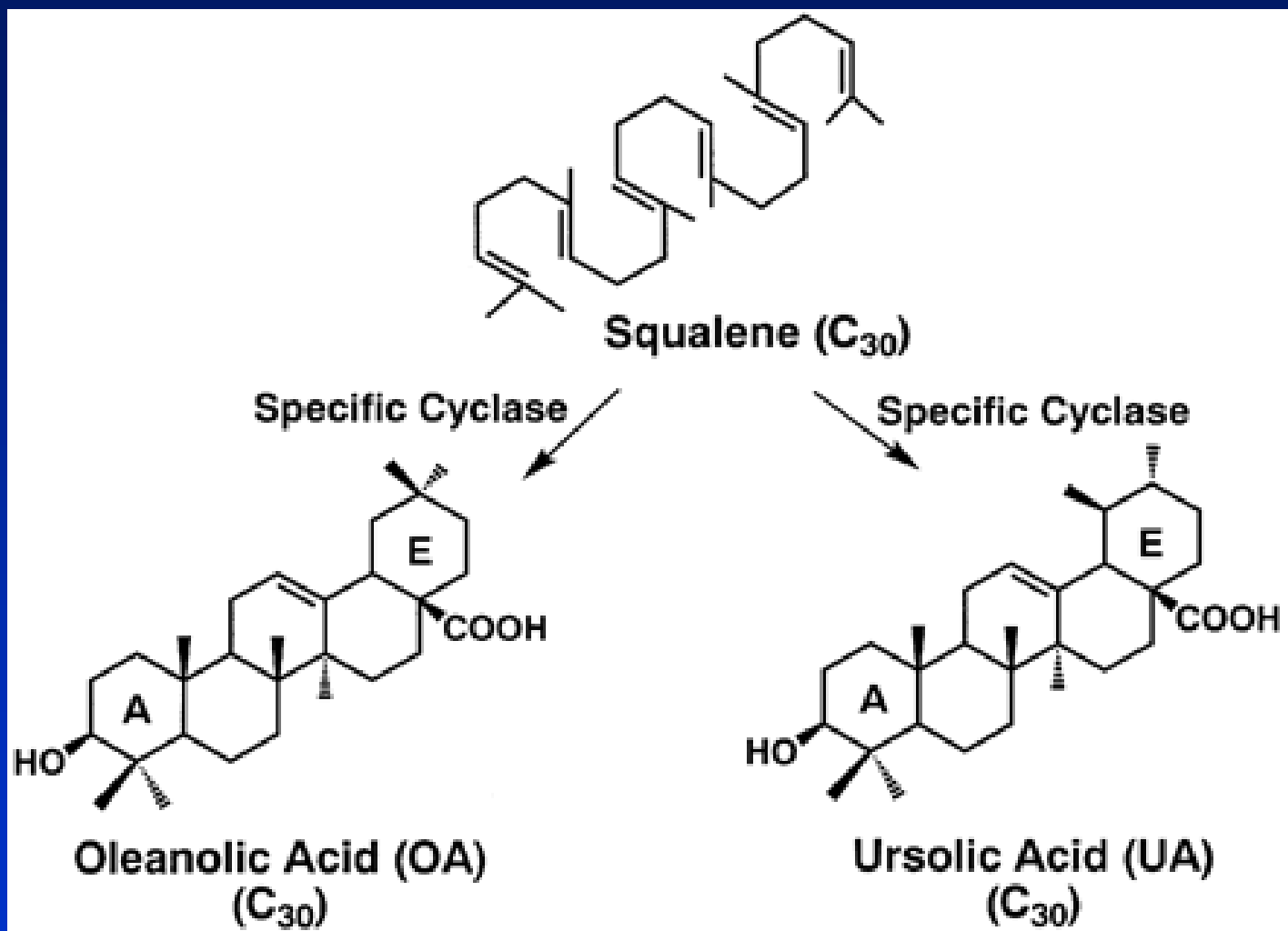


GW 7845

Six patterns for the cyclization of squalene are shown here; numerous other variations exist in nature



Oleanolic and ursolic acids

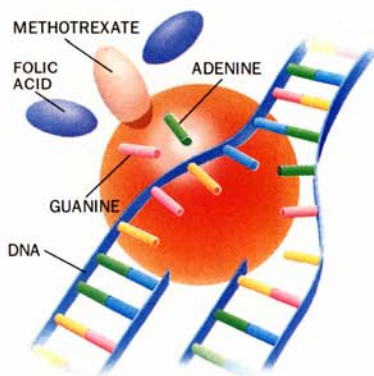


Oleanolic and ursolic acids, which have been used as chemopreventive agents, are both derived from squalene. Note that the two structures differ only in the location of the two methyl groups in the E-ring.

Families of Chemotherapeutic Drugs

ANTIMETABOLITES

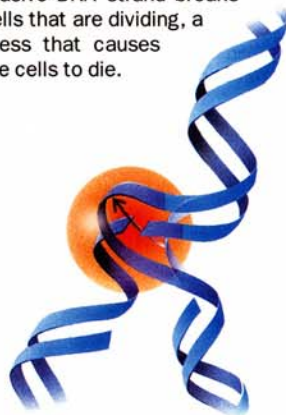
Some anticancer compounds act as false substances in the biochemical reactions of a living cell. A prime example of such a drug is methotrexate, which is a chemical analogue for the nutrient folic acid. Methotrexate functions, in part, by binding to an enzyme (*orange*) normally involved in the conversion of folic acid into two of the building blocks of DNA, adenine and guanine. This drug thus prevents cells from dividing by incapacitating their ability to construct new DNA.



Examples: methotrexate, fluorouracil, gemcitabine

TOPOISOMERASE INHIBITORS

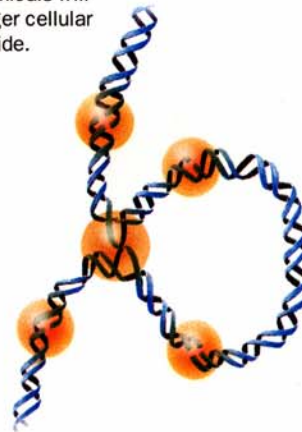
Replication of a cell's genetic material requires a means to pull the DNA double helix apart into two strands. This separation is typically accomplished with the aid of a special "topoisomerase" enzyme (*orange*) that temporarily cleaves one strand, passes the other strand through the break and then reattaches the cut ends together. Drugs that inhibit the ability of topoisomerase enzymes to reattach the broken ends cause pervasive DNA strand breaks in cells that are dividing, a process that causes these cells to die.



Examples: doxorubicin, CPT-11

ALKYLATING AGENTS

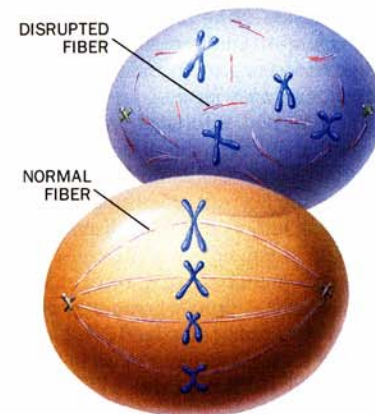
Certain compounds (*orange*) form chemical bonds with particular DNA building blocks and so produce defects in the normal double helical structure of the DNA molecule. This disruption may take the form of breaks and inappropriate links between (or within) strands. If not mended by the various DNA repair mechanisms available to the cell, the damage caused by these chemicals will trigger cellular suicide.



Examples: cyclophosphamide, chlorambucil

PLANT ALKALOIDS

Certain substances derived from plants can prevent cell division by binding to the protein tubulin. Tubulin, as its name implies, forms microtubular fibers (*pink*) that help to orchestrate cell division. These fibers pull duplicated DNA chromosomes to either side of the parental cell, ensuring that each daughter cell receives a full set of genetic blueprints. Drugs that interfere with the assembly or disassembly of these tubulin fibers can prevent cells from dividing successfully.



Examples: vinblastine, vinorelbine, paclitaxel, docetaxel

Expozice buněk velmi nízkými dávkami chemoterapeutik má minimální efekt na viabilitu nebo bun. cyklus díky dostatečným schopnostem reparačního systému opravit poškození.

Ve vyšších konc. v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti kontr. bodu v G1 (souvisejícího s expresí p53) se vyskytují 2 typy odpovědi:

► v případě funkčního kontr. bodu je bun. cyklus zastaven v G1 dokud nedojde k opravě poškození nebo dochází ke spuštění apoptózy při velkém rozsahu poškození (po vysokých konc.) nebo neúspěšné reparaci.

► jestliže je kontr. bod nefunkční (např. při mutaci p53) buňky vstupují do S fáze, ale postup (DNA replikace) je suprimována podle konc. látky.

- v případě buněk „primed“ k apoptóze, dojde k apoptóze rychle (3-6 h, „immediate apoptosis“) u prahových hodnot konc., slabě nad těmi, které kompletně inhibují progresi S fáze.

- v případě non-primed buněk prodloužená suprese průchodu bun. cyklem (defective progression) vede k růstové nerovnováze, sekundárním změnám, následnému nastartování a pozdní apoptóze. Tato apoptóza vykazuje často atypické vlastnosti, komplikované růstovou nerovnováhou a sekundárními změnami metabolismu.

- při ještě vyšších konc. překračujících farmakologickou dávku dochází k nekróze.

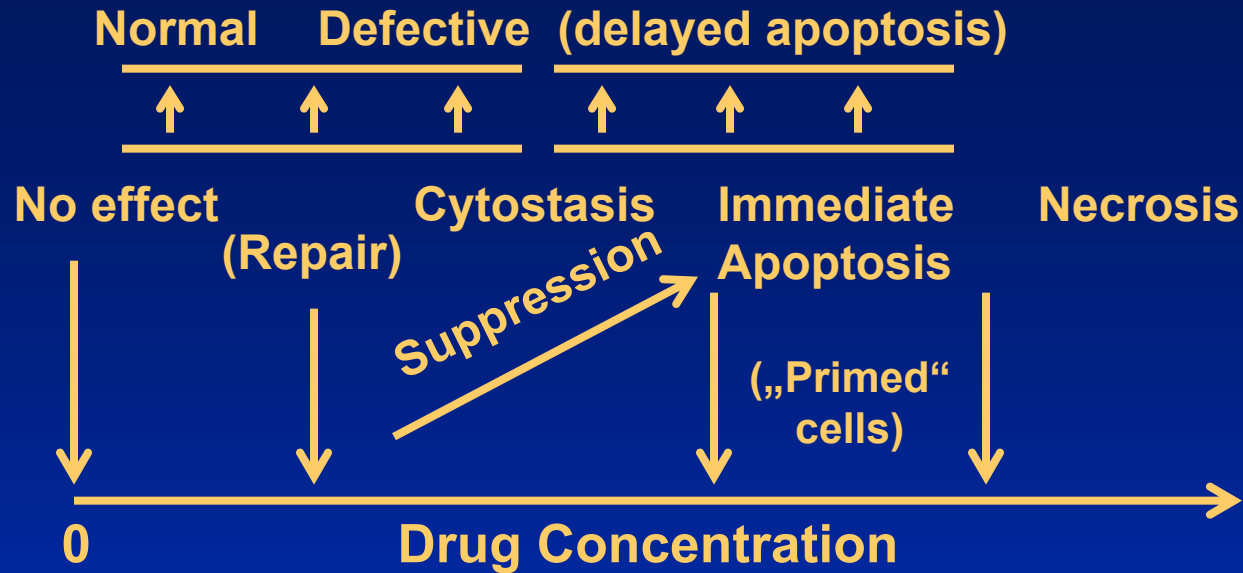
Nádorové tkáně mají, analogicky jako normální tkáně, proliferující část populace a část populace neproliferující, která se skládá z klidových buněk v G0 fázi nazývané někdy také populace kmenových neoplastických buněk. Tyto buňky je obtížné zničit, protože jsou rezistentní k cytostatickému působení záření nebo chemoterapeutik. Určitou dobu po ozáření nebo chemickém působení vstupují znovu do cyklu a jsou **zdrojem obnovy nádorového růstu.**

Opakovaná cytostatická terapie a kombinovaná terapie (s využitím humorálních faktorů, imunologickou indukci, atd.) představují hlavní přístupy jak dostat do cyklu i klidové buňky, a pak účinně inhibovat jejich růst. Klíčovou otázkou však zůstává volba nejvhodnějšího časového intervalu mezi jednotlivými aplikacemi (matematické modely). Klidové buňky přežívají mnohem lépe, protože během dlouhého časového intervalu mezi cytostatickým působením a DNA replikací a dělením chromosomů je poškozený genetický materiál reparován.

Rychle rostoucí nádory jsou citlivé na cytostatickou terapii, frakce neproliferujících buněk je malá, buňky mají krátkou generační dobu. Opakovaným působením lze převést G0 buňky do cyklu a účinně inhibovat růst (lymfomy, seminomy, některé leukémie).

Pomalou rostoucí nádory mají přechod buněk z G0 zásobní populace řízen negativní zpětnou vazbou. Tento mechanismus udržuje vždy minimální hladinu G0 buněk, ze kterých se populace vždy obnovuje. Tyto nádory jsou rezistentní na cytostatickou terapii a je velká pravděpodobnost vzniku rezistentních klonů. Buňky mají dlouhou generační dobu (karcinom tlustého střeva, žaludku, plic, sarkomy).

Cell Cycle Progression



Generalized scheme illustrating the effects of increasing concentrations of DNA damaging antitumor drugs, on cell cycle progression and apoptosis. Exposure of cells to very low drug concentrations has generally no, or minimal, effect on their viability or cell cycle, most likely due to the fact that the rate of DNA repair exceeds the rate of accumulation of the lesions. At higher drug concentrations, depending on the presence or absence of the G1 checkpoint (which is associated with expression of tumor suppressor gene p53) two types of responses occur: a) In the presence of a functioning checkpoint, cell progression through G1 is halted until the lesion is repaired. Alternatively, apoptosis is triggered when the damage is extensive (high drug concentration) or repair unsuccessful. b) If the G1 checkpoint is malfunctioning (e.g., as in the case of mutation of p53) the cells do enter S, but the rate of progression (rate of DNA replication) is suppressed proportionally to the drug concentration. In the case of cells „primed“ to apoptosis, apoptosis generally occurs very rapidly (3-6 h, „immediate apoptosis“) at the threshold drug concentration, slightly above that which completely halts their progression through S [Del Bino et al., 1991]. Cell priming to apoptosis may be associated with, among other factors, constitutive expression of c-myc. In the case of „nonprimed cells,“ prolonged suppression of cell cycle progression by the drug („defective progression“) leads to growth imbalance, secondary changes, their subsequent „priming“ (development of effectors), and delayed apoptosis. Delayed apoptosis may often have atypical features, complicated by growth imbalance and secondary changes in cell metabolism [Kung et al., 1990]. Necrosis is seen at still higher drug concentration, generally above its pharmacological level.

Table 2. Drug Inducers of Oxidative Stress

Anthracyclines

Epipodophyllotoxins

Camptothecins

Platinum coordination complexes

Bleomycins

Alkylating agents

Table 3. Potential Mechanisms for Aldehyde Interference of Cancer Therapy Effectiveness

Prolong G₁

Inhibit G₀ to G₁ transition

Checkpoint arrest

G₁

S

G₂

M

Restriction point block

Inhibit drug-induced apoptosis

Caspase inhibition

Death receptor binding

Vhodná strategie pro úspěšnou nádorovou terapii

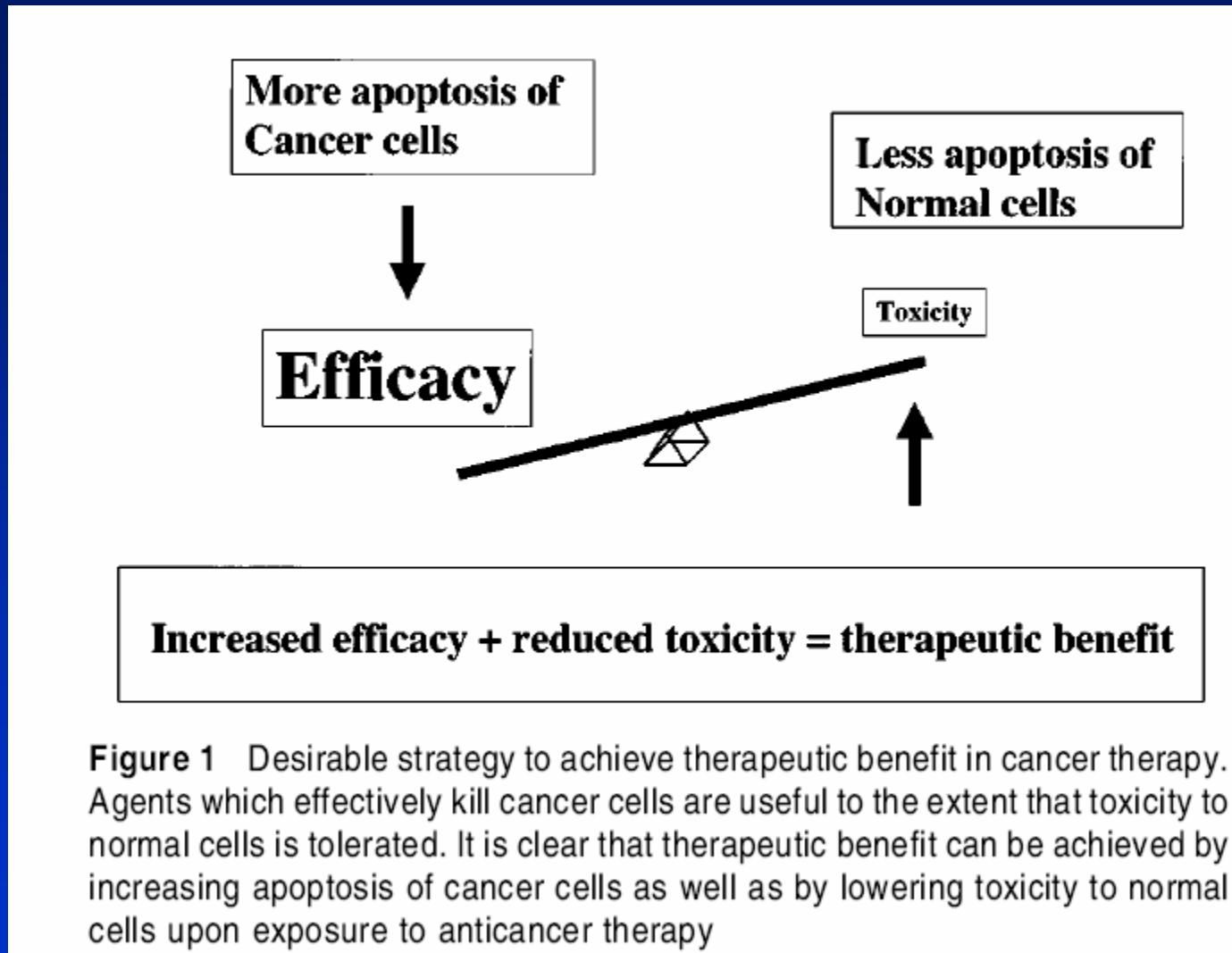
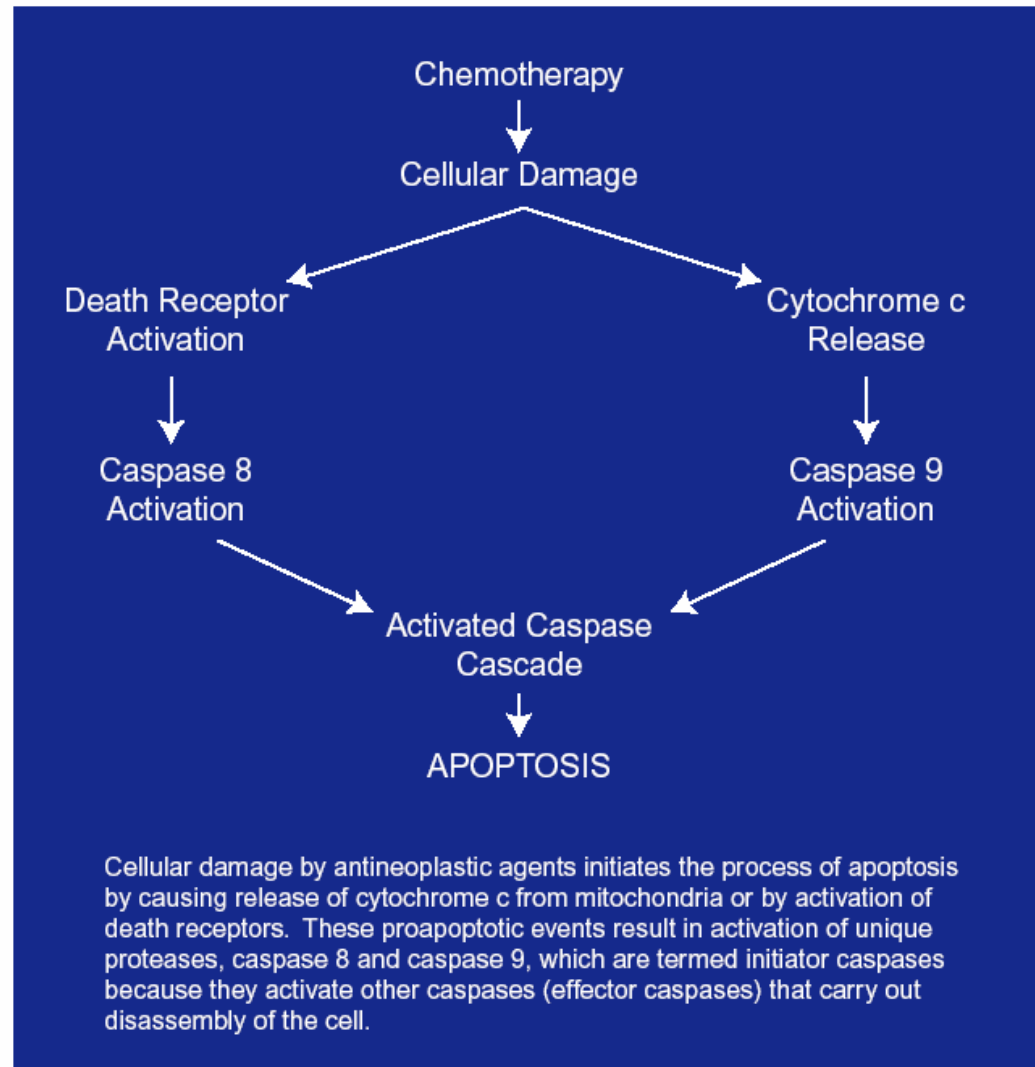


Figure 1 Desirable strategy to achieve therapeutic benefit in cancer therapy. Agents which effectively kill cancer cells are useful to the extent that toxicity to normal cells is tolerated. It is clear that therapeutic benefit can be achieved by increasing apoptosis of cancer cells as well as by lowering toxicity to normal cells upon exposure to anticancer therapy

Figure 2. Dual Apoptotic Pathways of Chemotherapy



Activation of Apoptosis Pathways by Anticancer Therapy

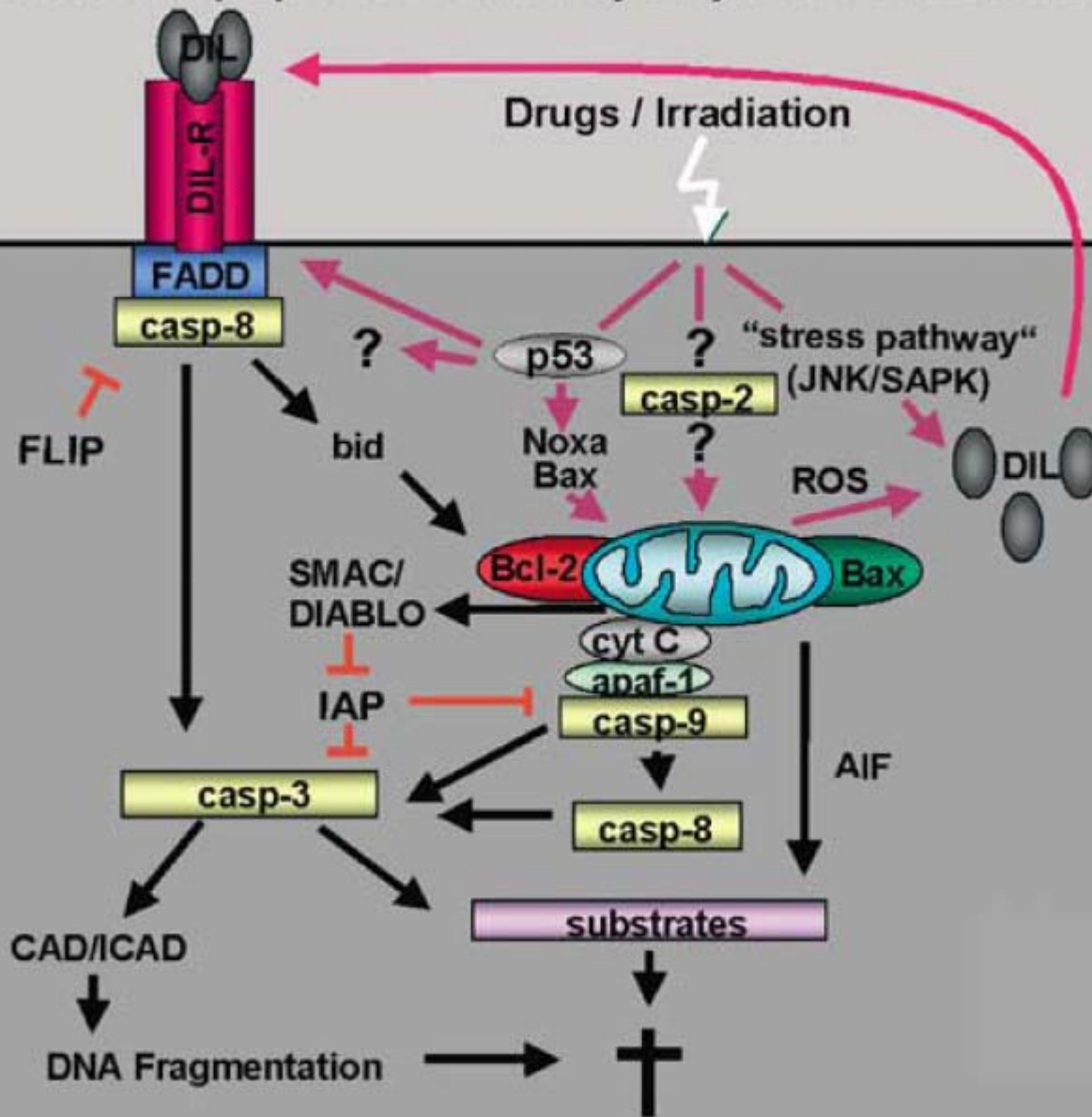


Figure 1 Apoptosis pathways in anticancer therapy. Apoptosis pathways can be triggered through different entry sites, for example, at the plasma membrane upon crosslinking of death receptors (receptor pathway) or at the mitochondria (mitochondrial pathway). Stimulation of death receptors of the TNF receptor superfamily (DIL-R) such as CD95 (APO-1/Fas) or TRAIL receptors by DIL results in receptor aggregation and recruitment of the adaptor molecule FADD and caspase-8 into a DISC. Caspase-8 becomes activated upon recruitment and initiates apoptosis by direct cleavage of downstream effector caspases. The mitochondrial pathway is initiated by the release of apoptogenic factors such as cytochrome *c*, or Smac from mitochondria into the cytosol. The release of cytochrome *c* into the cytosol triggers caspase-3 activation through the formation of the cytochrome *c*/Apaf-1/caspase-9-containing apoptosome complex. Smac promotes caspase activation through neutralizing the inhibitory effects to IAPs, while AIF causes DNA condensation. The receptor and the mitochondrial pathway can be interconnected at different levels, for example, through Bid, a BH3 domain-containing protein of the Bcl-2 family, which assumes cytochrome *c*-releasing activity upon cleavage by caspase-8. Activation of caspases is negatively regulated at the receptor level by FLIP, which block caspase-8 activation, at the mitochondria by Bcl-2 family proteins and by IAPs. AIF, released from mitochondria mediates caspase-independent large-scale DNA fragmentation after translocation to the nucleus

Typy buněčné smrti po působení protinádorových terapeutik

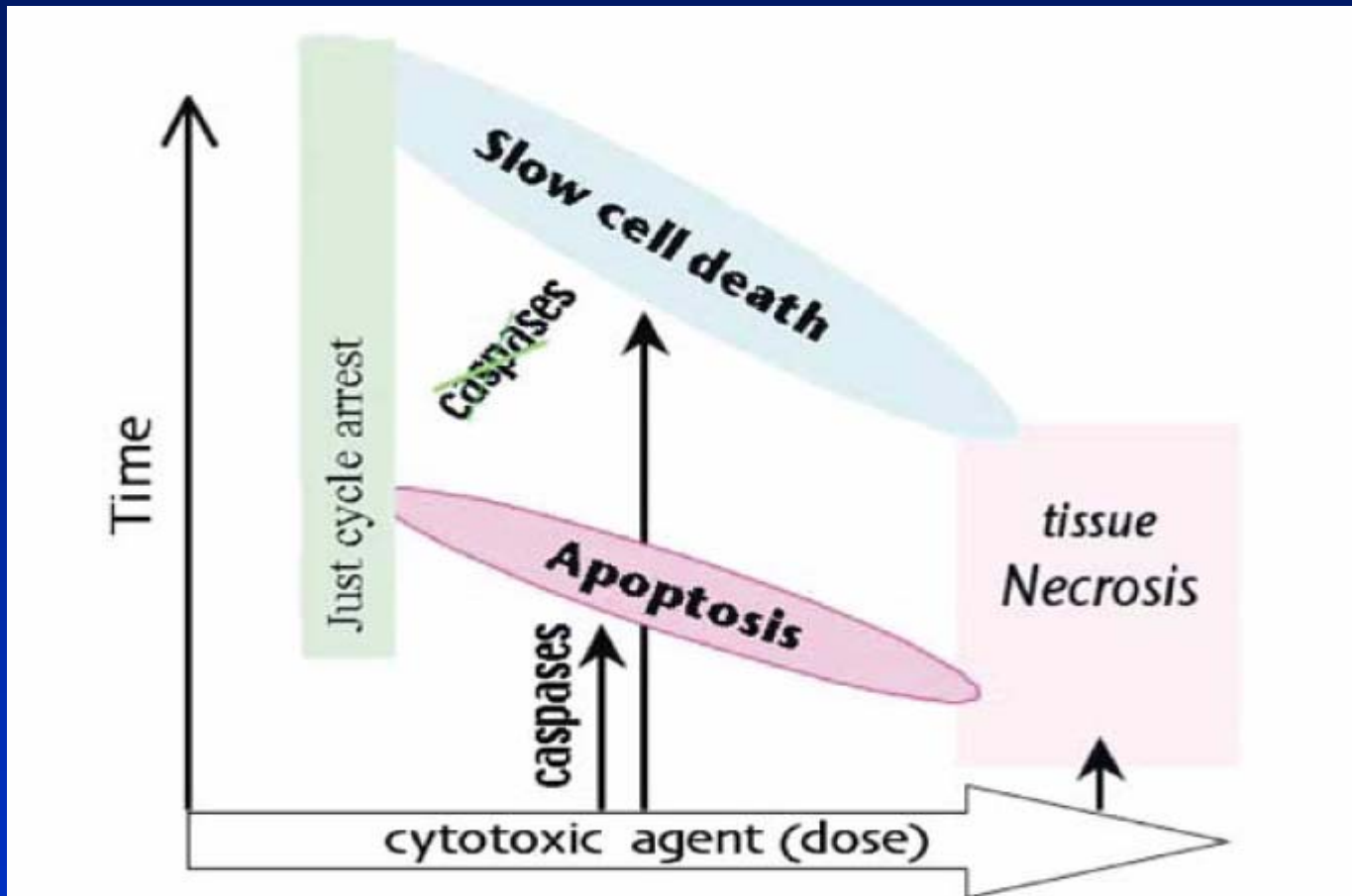


Figure 3 Forms of cell death caused by anticancer drugs (cytotoxic stimuli). At low (subcytotoxic) doses, a drug (or other cytotoxic agents) can arrest cell proliferation without significant cytotoxicity. At higher drug concentrations, apoptosis-prone cells undergo rapid cell death caused by caspase activation. Apoptosis-reluctant cells may either recover or undergo slow cell death. At maximal cytotoxicity, rapid necrosis may occur in any cell types

Mechanismy rezistence ke xenobiotikům

rezistence může být důsledkem

- ▶ snížené vnitrobuněčné koncentrace látky díky změněnému příjmu do nitra buňky, zvýšenému vylučování z buňky nebo rozložení v buňce
- ▶ zvýšené buněčné detoxifikace (inaktivace)
- ▶ kvalitativních nebo kvantitativních změn buněčného cíle (enzymu)
- ▶ neschopnosti přeměňovat látku na aktivní formu
- ▶ zvýšené inaktivace látky
- ▶ zvýšené reparace DNA
- ▶ poruch v drahách apoptózy

Mnoho těchto mechanismů může působit současně a jsou buď přirozeně přítomny v buňce nebo vznikají de novo během choroby a léčení.

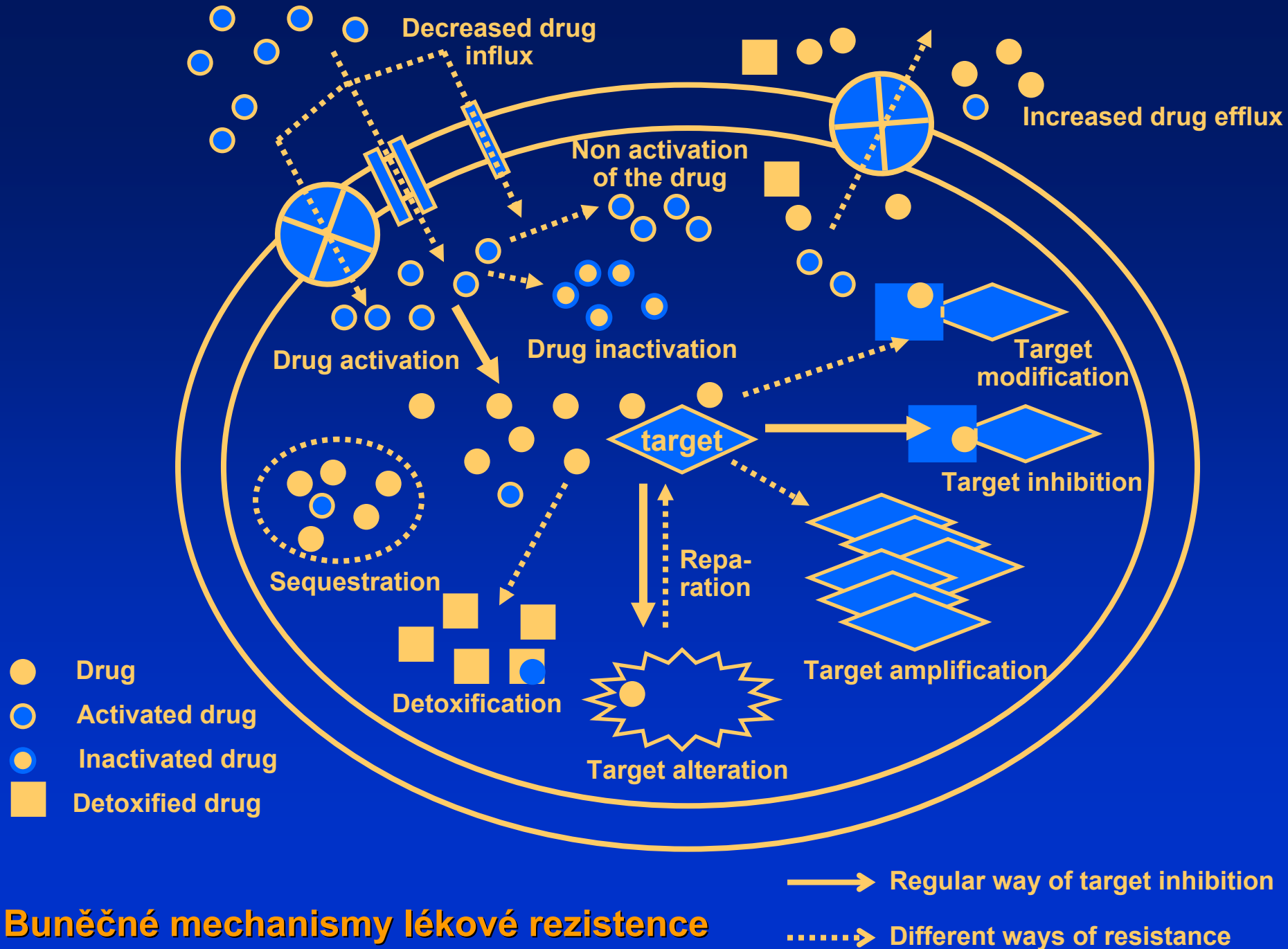
Vylučování látky z buňky je spojeno s aktivitou specifických proteinů nebo proteinových komplexů uvnitř cytoplasmatické membrány.

MDR - "multidrug resistance" k nádorové chemoterapii

spojené se zvýšenou expresí Pgp (P170) glykoproteinu - membránová adenosin trifosfatáza (ATPáza) se širokou specifitou. Transportuje endogenní substance (toxiny, metabolity, odpad, hormony atd.).

Farmakologická funkce spočívá v protekci proti cytotoxickým látkám.

Mechanismus MDR je posledních 10 let intenzívně studován. Byl izolován lidský gen MDR1 na chromosomu 7. Tento gen kóduje Pgp a jeho exprese je spojena s MDR fenotypem.



Buněčné mechanismy lékové rezistence

Buněčná detoxifikace

Základní roli v rezistenci nádorových buněk k různým cytotoxickým látkám hraje glutathion (GSH) - vnitrobuněčný tripeptid obsahující cystein a přítomný v savčích buňkách ve vysokých koncentracích. Zvýšená konjugace s GSH je hlavním mechanismem vývoje rezistence.

Glutathion-S-transferázy (GST) - čtyři známé izoenzymy - jsou hlavní skupinou detoxifikačních enzymů. Protože katalyzují konjugaci s GSH, je hladina jejich exprese hlavním faktorem určujícím senzitivitu buněk.

GSH i GST mohou způsobovat rezistenci i jinými mechanismy než konjugací, např. GSH může modulovat reparační funkce DNA a tak kontrolovat rezistenci např. k cisplatině.

Využití inhibitorů GSH - indometacin, piriprost

Rezistence k chemoterapii zprostředkovaná změnami buněčného cíle

Změny topoizomerázy - topoiz. II je zásadní pro replikaci DNA - cíl interkalačních látek jako je adriamycin, actinomycin D nebo neinterkalačních látek jako jsou etoposide nebo teniposide.

Rezistence může být způsobena změnou hladiny topoiz. II nebo expresí mutovaného enzymu.

Změny DHFR (dihydrofolátreduktázy) - cíl antifolátových látek - metotrexát. Zvýšená hladina DHFR je příčinou rezistence.

Změny tymidilát syntázy - cíl 5-fluorouracilu. Dva mechanismy rezistence - změny afinity TS k lékům díky substituci jedné aminokyseliny nebo zvýšená TS aktivita.

Zvýšené reparační funkce DNA

DNA je cílem různých cytotoxických látek. Přímou nebo nepřímou vazbou k DNA způsobují tyto látky změny v DNA a genomové poruchy vedoucí k buněčné smrti. Jednoduchá alkylační činidla se kovalentně váží k DNA - vnitro- i meziřetězcové vazby.

Deriváty kovů jako je cisplatina tvoří také podobné vazby. Cisplatina obecně porušuje DNA indukci vnitrořetězcových vazeb mezi N7 atomy dvou sousedních guaninů a v menší míře indukci meziřetězcových vazeb a monoadduktů.

Další cytotoxické látky jsou schopny nekovalentně se vmezeřovat do DNA. Ačkoliv všechny tyto interakce s DNA jsou potenciálně letální, rozsah buněčné smrti je ovlivňován rozdíly v rozsahu reparace.

Existuje inverzní vztah mezi buněčnou reparací a cytotoxickou senzitivitou.

Reparační procesy DNA jsou velmi komplexní a závisí na typu poškození. Jejich regulace se účastní na 200 různých genů. Mají velký význam pro nádorovou chemoterapii, protože jsou zahrnuty v rezistenci k velkému počtu cytotoxických látek, zejména těch, které nejsou ovlivněny MDR fenotypem.

Tři hlavní typy reparace DNA:

Reverze poškození - nejjednodušší biochemický pochod obnovující integritu DNA. O6 -alkylguanin DNA alkyltransferáza přispívá hlavním dílem k rezistenci k alkylačním činidlům - inhibice enzymu významně zesiluje cytotoxické účinky látek. Bohužel, tento zásah může na druhé straně indukovat nádory, protože tento enzym zabraňuje karcinogenním účinkům řady molekul.

Excise poškození specifickými glykosylázami po specifickém poškození bází s následným vyříznutím DNA a doplněním pomocí polymeráz a ligáz. Exprese těchto enzymů je u rezistentních buněk pozitivně regulována.

Postreplikační reparace umožňuje nápravu vážných poškození DNA. Jestliže nejsou před replikací opraveny, způsobují tato poškození replikační blok. Buňky obnovují syntézu DNA v jiném replikačním bodě.

Využití inhibitorů reparace DNA může zlepšit terapii. Inhibice specifických enzymů jako je DNA polymeráza nebo topoizomeráza II.

K úspěšnosti chemoterapie přispívá řada faktorů. Jsou to farmakologické faktory, které zabraňují adekvátní expozici látkou v místě působení:

způsob podávání léku - koncentrace a doba a dále morfologické podmínky - absorpce, metabolismus, vaskularita a okysličování tkáně.

Kromě těchto faktorů, které mohou být ovlivněny přizpůsobením režimu, existují různé buněčné mechanismy odpovědné za nízkou či vysokou hladinu rezistence.

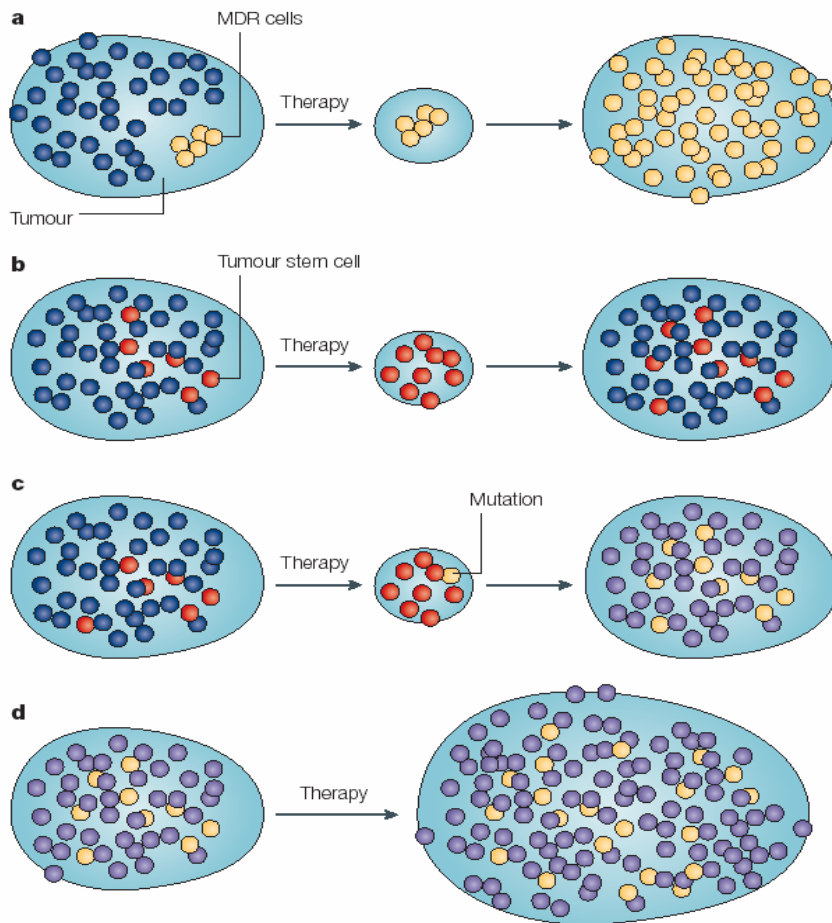


Figure 2 | **Models of tumour drug resistance.** **a** | In the conventional model of tumour-cell drug resistance, rare cells with genetic alterations that confer multidrug resistance (MDR) form a drug-resistant clone (yellow). Following chemotherapy, these cells survive and proliferate, forming a recurrent tumour that is composed of offspring of the drug-resistant clone. **b** | In the cancer-stem-cell model, drug resistance can be mediated by stem cells. In this model, tumours contain a small population of tumour stem cells (red) and their differentiated offspring, which are committed to a particular lineage (blue). Following chemotherapy, the committed cells are killed, but the stem cells, which express drug transporters, survive. These cells repopulate the tumour, resulting in a heterogeneous tumour composed of stem cells and committed but variably differentiated offspring. **c** | In the 'acquired resistance' stem-cell model, the tumour stem cells (red), which express drug transporters, survive the therapy, whereas the committed but variably differentiated cells are killed. Mutation(s) in the surviving tumour stem cells (yellow) and their descendants (purple) can arise (by mechanisms such as point mutations, gene activation or gene amplification), conferring a drug-resistant phenotype. As in model **a**, the stem cell with the acquired mutations could be present in the population before therapy. **d** | In the 'intrinsic resistance' model, both the stem cells (yellow) and the variably differentiated cells (purple) are inherently drug resistant, so therapies have little or no effect, resulting in tumour growth.

Některé parametry lékové rezistence

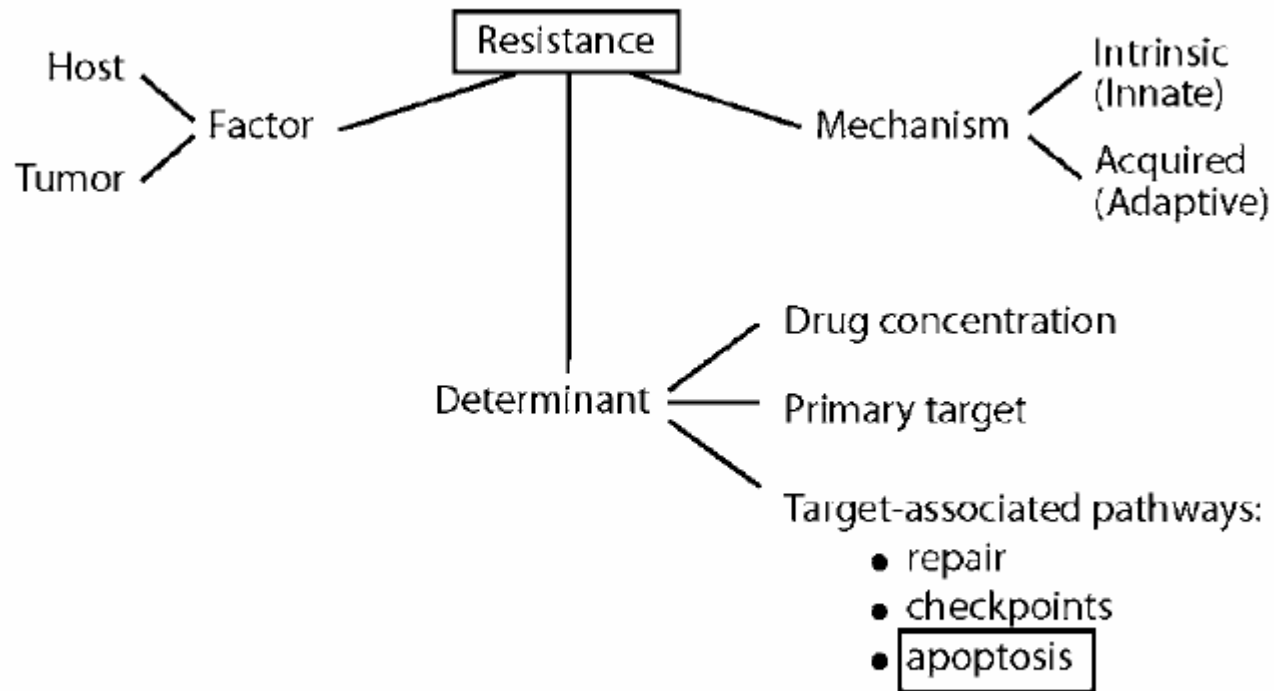
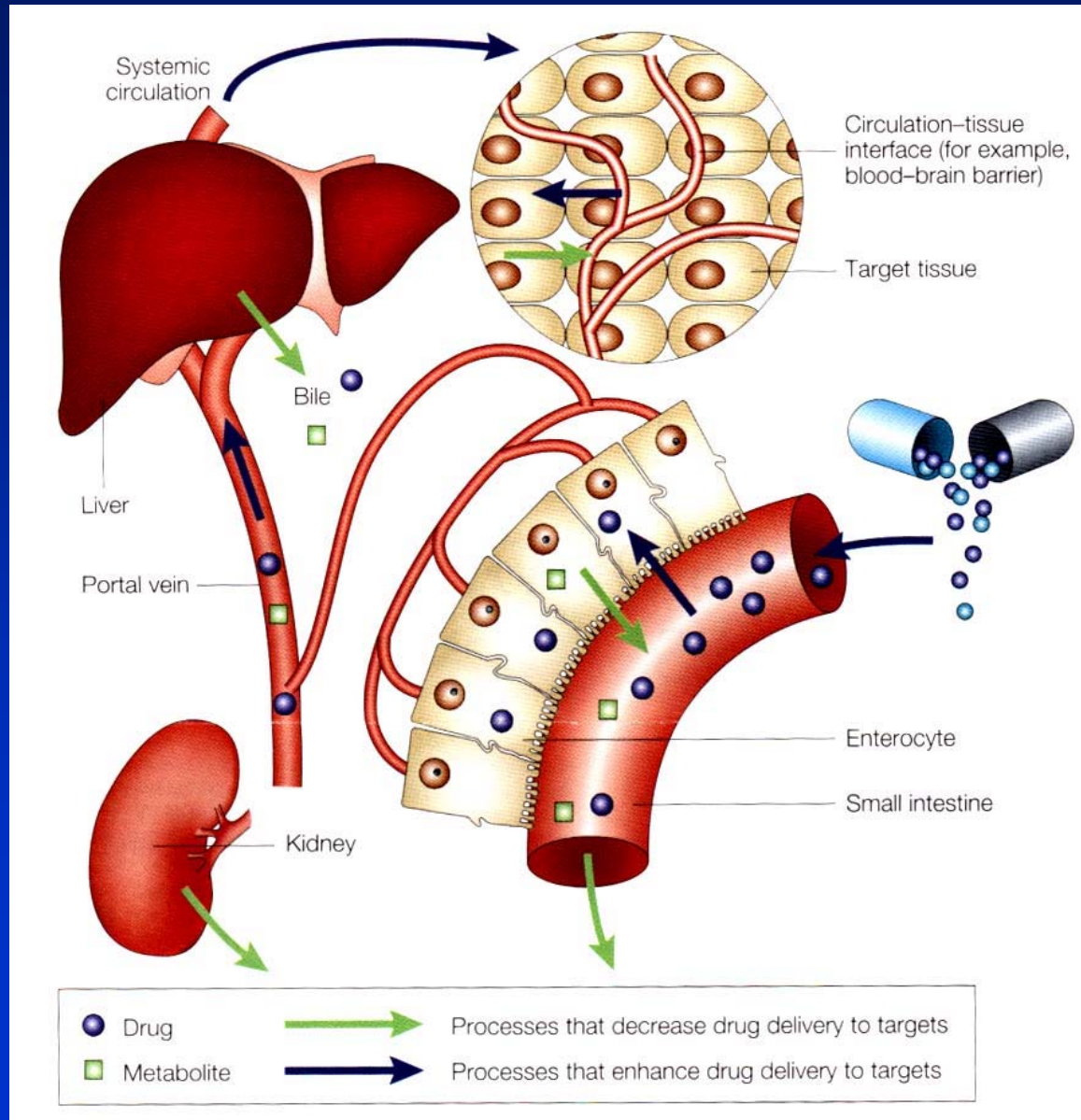
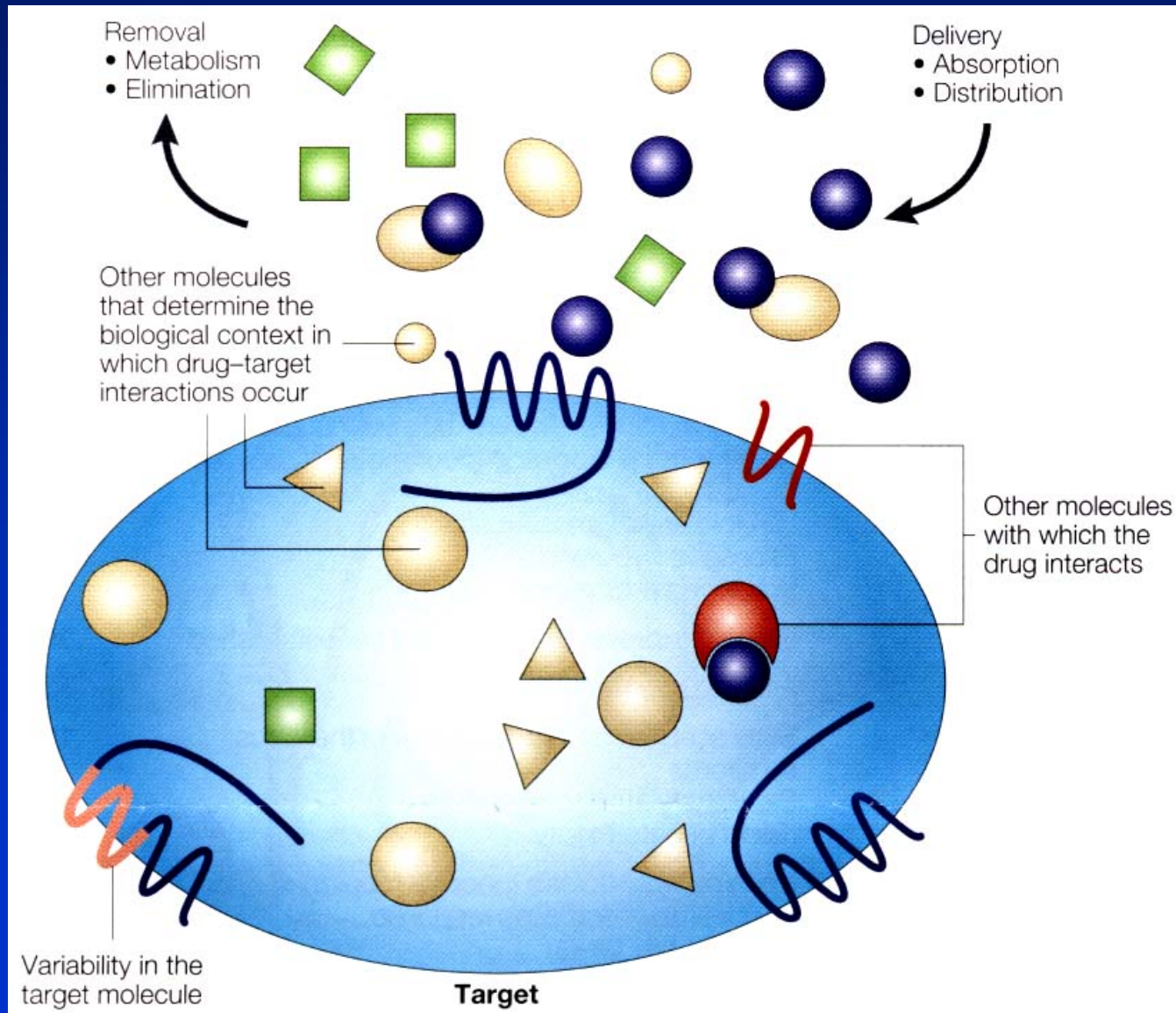


Figure 1 Some of the parameters involved in drug resistance

Determinanty dodání léku do cílového místa



Determinanty působení léku v cílovém místě



Neonkogenní a onkogenní léková rezistence

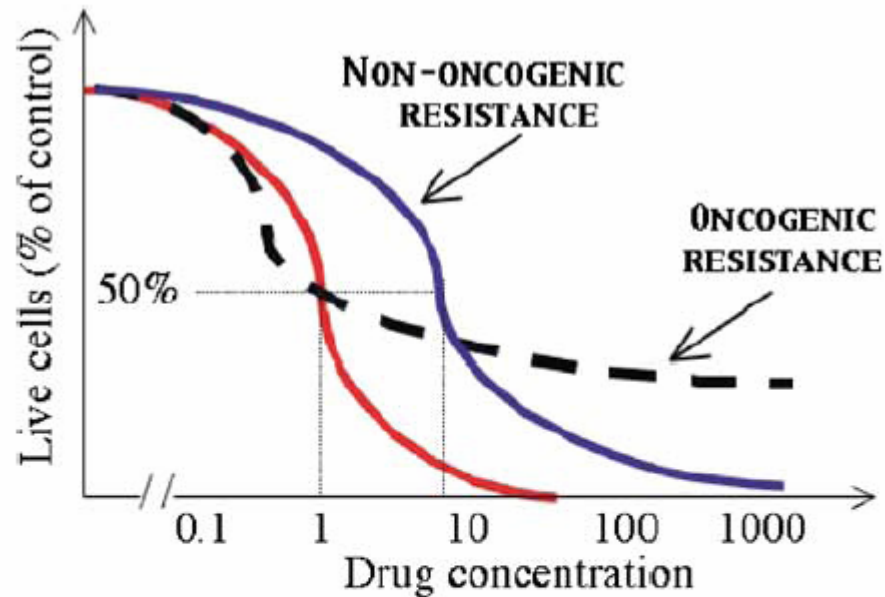


Figure 1 Nononcogenic and oncogenic drug resistance. Conventionally, drug resistance is measured by a drug concentration that inhibits cell growth and survival by a certain percent. For example, IC_{50} is a concentration that causes 50% decrease in cell survival (e.g. in drug-sensitive cells (red line), IC_{50} is 1). In nononcogenic (blue line) resistance, the dose-cytotoxicity curve is shifted to the right. An IC_{50} is increased due to a failure of a drug to inhibit its target. In contrast, in oncogenic resistance, IC_{50} is normal but IC_{70} is not achieved. The killing curve reaches a plateau, because a drug (although normally interacts with its target) does not kill the cells

Dvě cesty překonání lékové rezistence

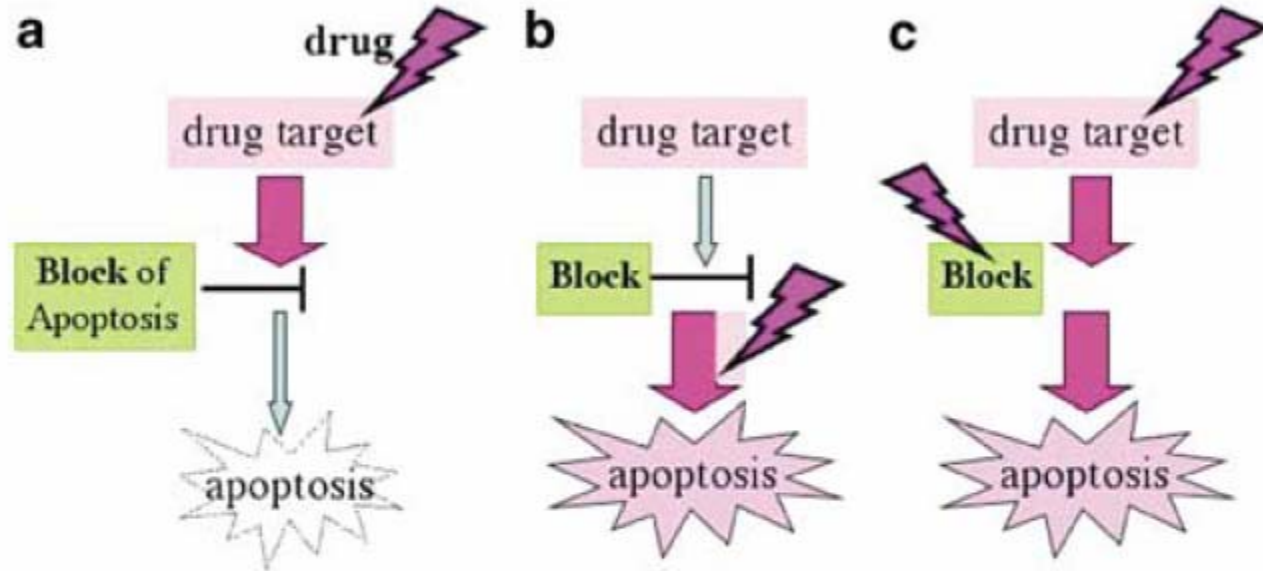


Figure 2 Two ways to overcome oncogenic resistance. **(a)** Oncogenic resistance. Inhibitors of apoptosis (block of apoptosis) prevent cell death, even though anticancer drug engage its target (e.g. microtubules, topoisomerases, DNA). **(b)** Targeting apoptotic pathways downstream of the block. **(c)** Inhibition of antiapoptotic pathways (releasing a block of apoptosis) restores sensitivity to anticancer drugs

Antiangiogenic therapy

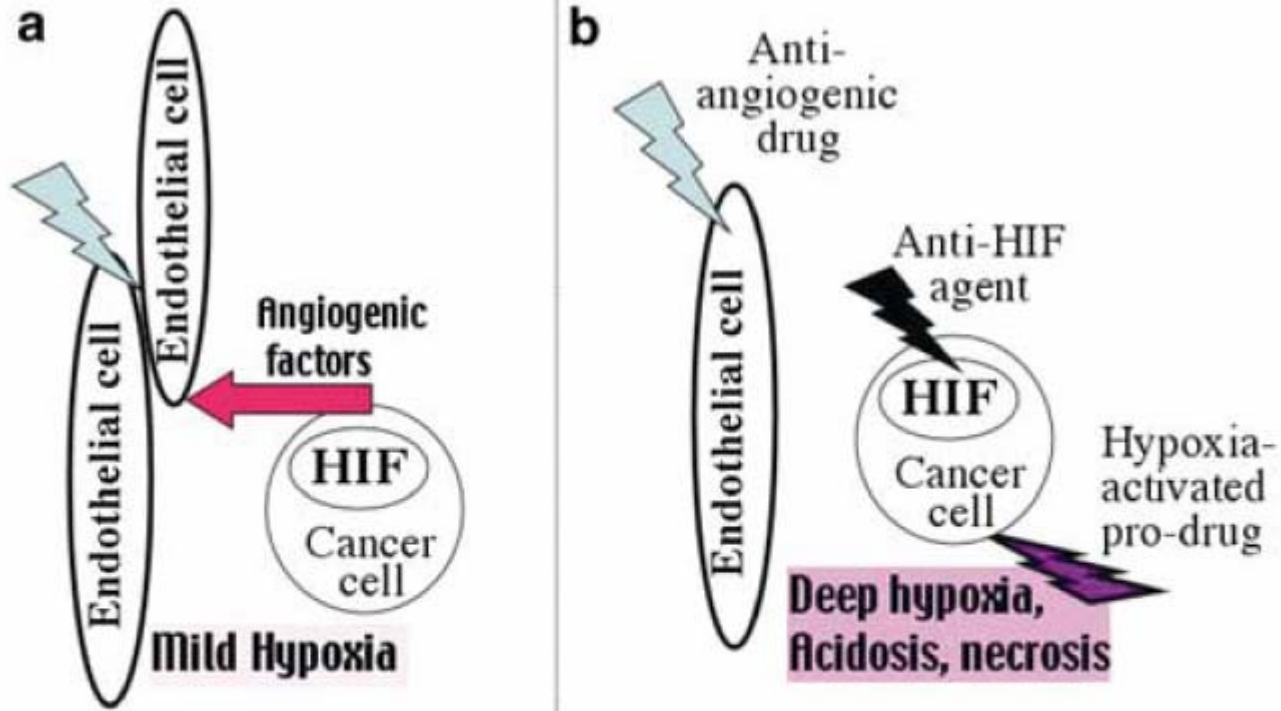


Figure 6 Antiangiogenic therapy. (a) Targeting endothelial cells causes a HIF-dependent response. Sensing hypoxia, cancer cells stimulate angiogenesis. (b) A combination of antiangiogenic and anti-HIF agents may cause profound anoxia and cancer cell death, which could be further enhanced by anoxia-activated prodrugs

Cykloterapia

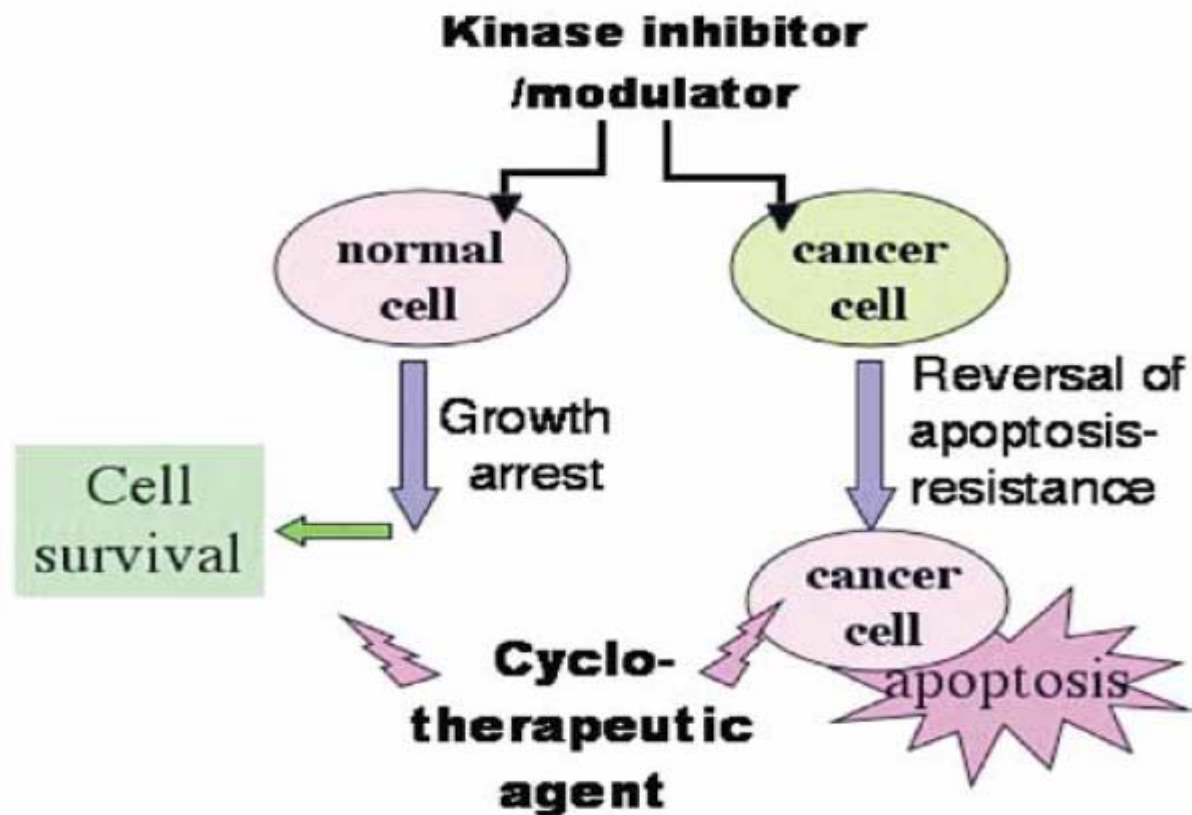


Figure 5 Cyclotherapy. Initially, a normal cell is apoptosis prone, whereas a cancer cell is apoptosis reluctant and resistant to cyclotherapeutic agent. A modulator such as a kinase inhibitor reverses resistance of cancer cells (see Figure 2c). Simultaneously, cells with normal cell cycle control are arrested by the same modulator and therefore 'escape' a cyclotherapeutic agent

Liposomes and gene therapy

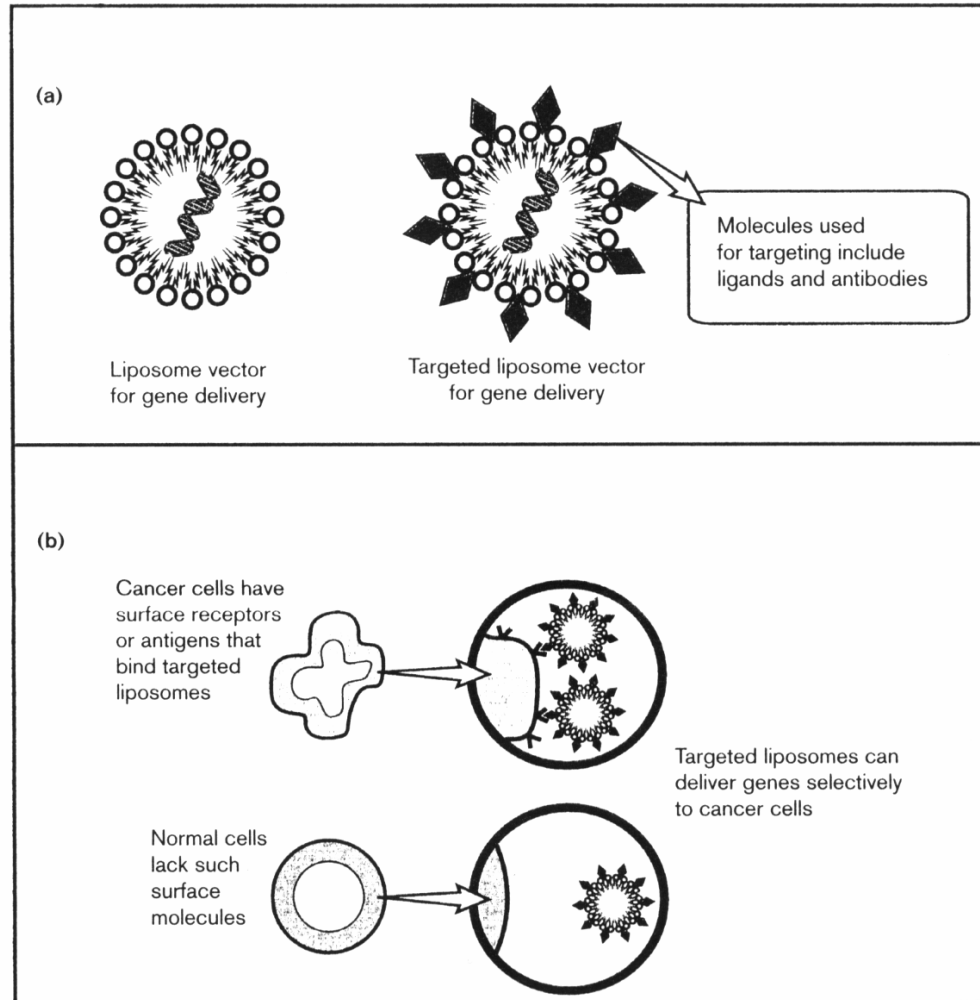
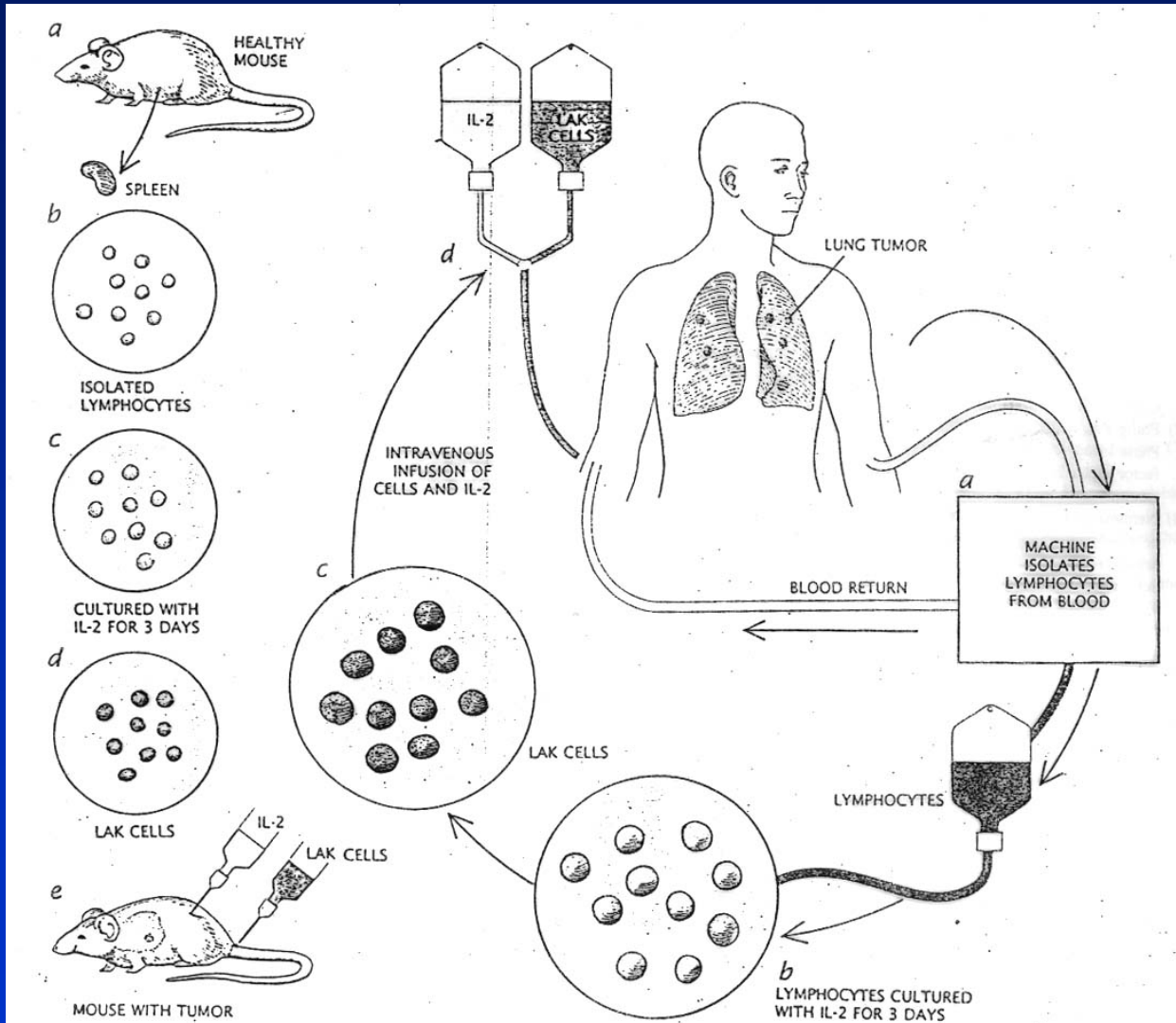


Figure 3. (a) Liposomes for gene therapy. (b) Targeting gene delivery via cellular receptors.

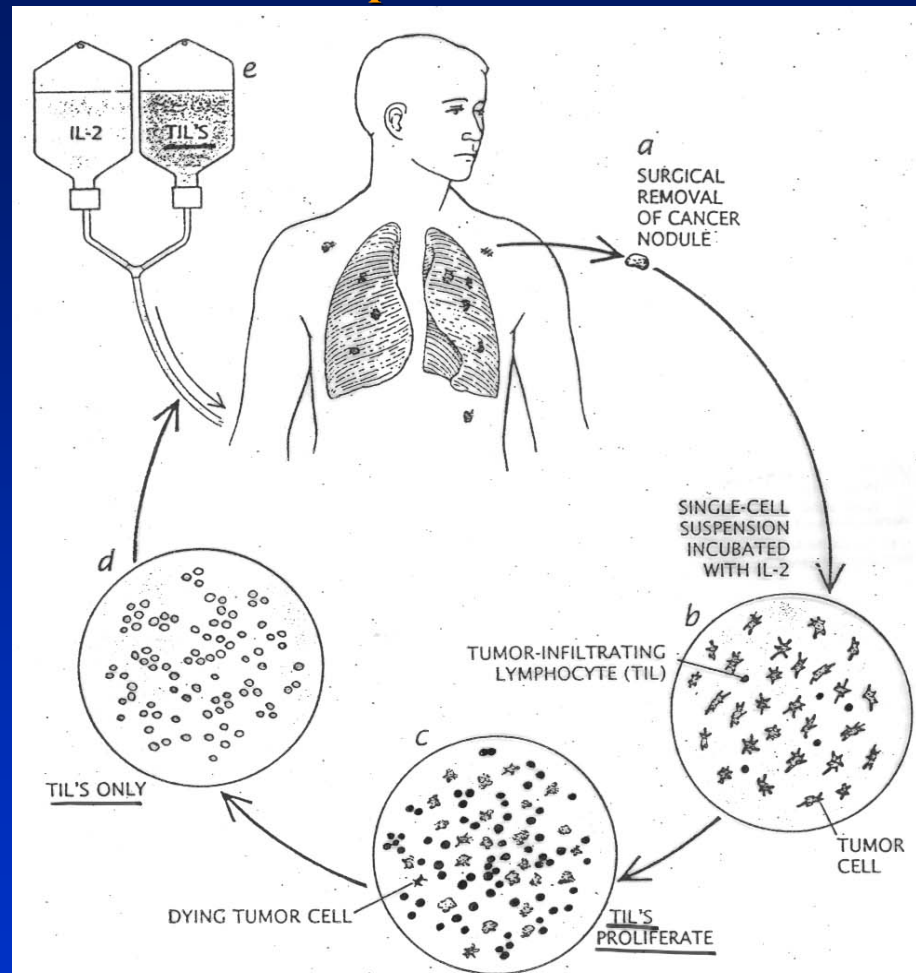
Využití LAK (lymphokine-activated killer) buněk v protinádorové terapii



LAK CELLS (lymphokine-activated killer cells), which were first described in 1980, are another experimental anticancer weapon. For study in mice (left), production begins with the removal of the spleen from healthy animals (a). The lymphocytes in the spleen are isolated (b) and cultured for three days with interleukin-2 (IL-2) (c), a hormonelike product of T cells. During that time the interleukin-2 causes certain lymphocytes known as

null cells to become LAK cells (d), which can recognize and attack a variety of cancers. In studies (e) the LAK cells, together with interleukin-2, are injected into tumor-bearing mice. For study in humans (right), lymphocytes are isolated from the bloodstream (a) and cultured with interleukin-2 (b) to generate LAK cells (c). When patients are treated (d), about 50 billion LAK cells are infused intravenously along with interleukin-2.

TIL'S (tumor-infiltrating lymphocytes) vyžadují víc než měsíc přípravy před aplikací pacientům



TIL'S, which seem to be more potent than LAK cells, take a month or more to generate for administration to patients. After a nodule of cancerous tissue is removed from a patient (a), cells in the nodule are separated from one another by enzymes and then cultured with interleukin-2 (b). Under the influence of the interleukin-2, lymphocytes scattered throughout the tumor—the TIL's (blue)—begin to proliferate rapidly and to attack the cancer cells (c). After a total of 30 to 45 days, the lymphocytes in the culture completely replace the tumor cells (d). Two-hundred billion of these replacement TIL's are then infused into the patient along with additional interleukin-2 (e).

Úloha p53 v predikci odpovědi k chemoterapii

p53 je 53-kD jaderný fosfoprotein (393 aminokyselin) - funguje jako transkripční faktor produkt 20-kb genu lokalizovaného na krátkém rameni lidského chromosomu 17 - nádorově supresorový gen

Hlavní fyziologické funkce:

- ▶ regulace bun. cyklu v kontrolních bodech G1/S a G2/M
- ▶ indukce apoptózy
- ▶ stabilizace genomu

p53 kontroluje odpověď buněk na genotoxický stres indukovaný různými podněty.

Ovlivňuje růst a viabilitu přes transkripční aktivaci nebo represi řady genů - p21 (zástava růstu), gadd-45 (reparace DNA), bax, bcl-2, bcl-x, cd95 (apoptóza), mdm2 (zpětnovazebná regulace aktivity p53).

Asi 60 % nádorů obsahuje mutovaný typ p53 - zvýšená stabilita, neaktivní

Ztráta divokého typu (wild-type) aktivity p53 je hlavním prediktorem absence odpovědi na radioterapii a chemoterapii u různých typů nádorů.

p53 zvyšuje chemosenzitivitu podporou apoptózy na transkripci nezávislými nebo závislými mechanismy - aktivuje transkripci proapoptických genů bax nebo suprimuje transkripci antiapoptických genů bcl-2.

Indukce smrti přes CD95(Fas, FasL) ligandový systém může také zahrnovat cesty kontrolované p53.

p53 může snižovat chemosenzitivitu podporou

- a) zástavy růstu závislou nebo nezávislou na p21,
- b) reparace DNA a diferenciaci,
- c) zvyšováním transkripce antiapoptických genů jako je bcl-x.

Ukazuje se, že účinky změněného statusu p53 na chemosenzitivitu závisejí na buněčném kontextu. Porucha funkce p53 u normálních buněk může spíše zvyšovat než snižovat chemosenzitivitu.

Transformované buňky, které mají wild-type p53 mají tendenci stát se rezistentními.

Účinky ionizujícího záření na normální (A) a nádorové buňky (B)

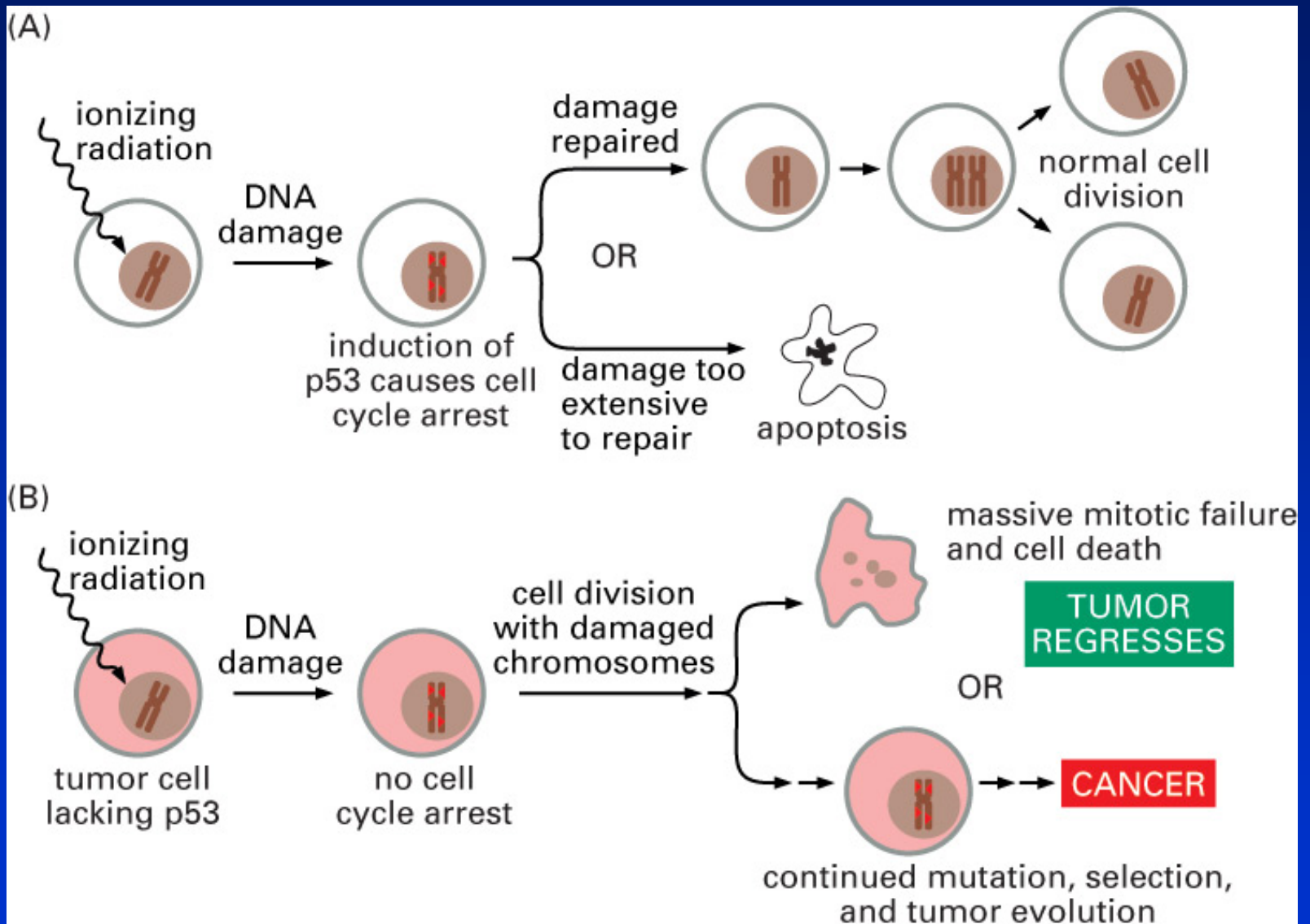
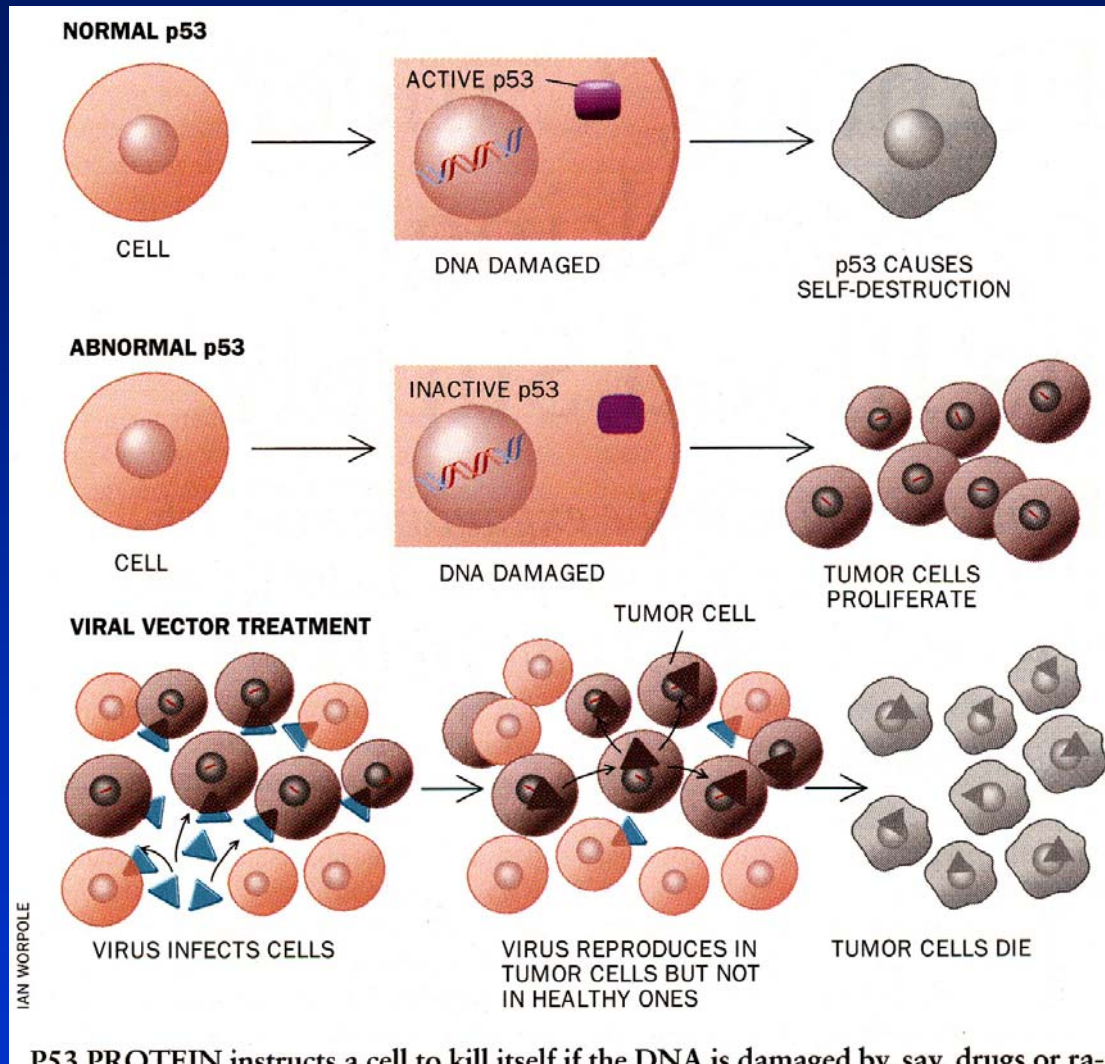


Figure 23-43. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

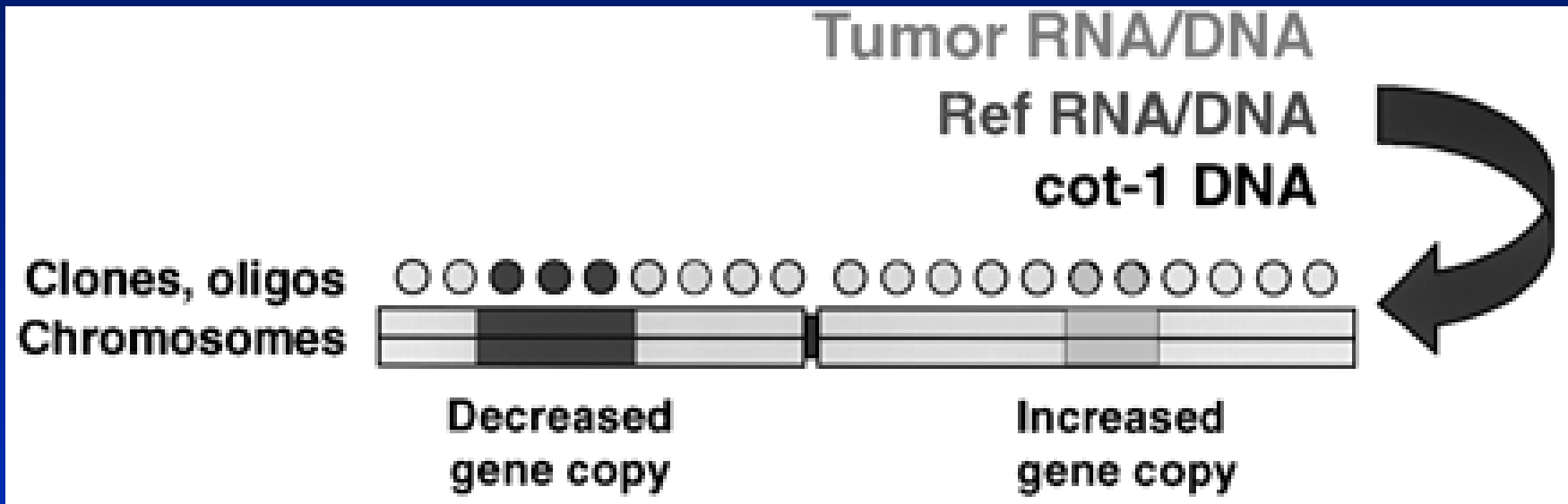
p53 protein



P53 PROTEIN instructs a cell to kill itself if the DNA is damaged by, say, drugs or radiation. But if p53 is abnormal, it may not stop a cell with bad DNA from replicating. One way of treating tumor cells is through viruses genetically engineered so that they reproduce in cells with abnormal p53 but not in healthy cells. In principle, the virus would move unchecked only through tumor cells, killing them.

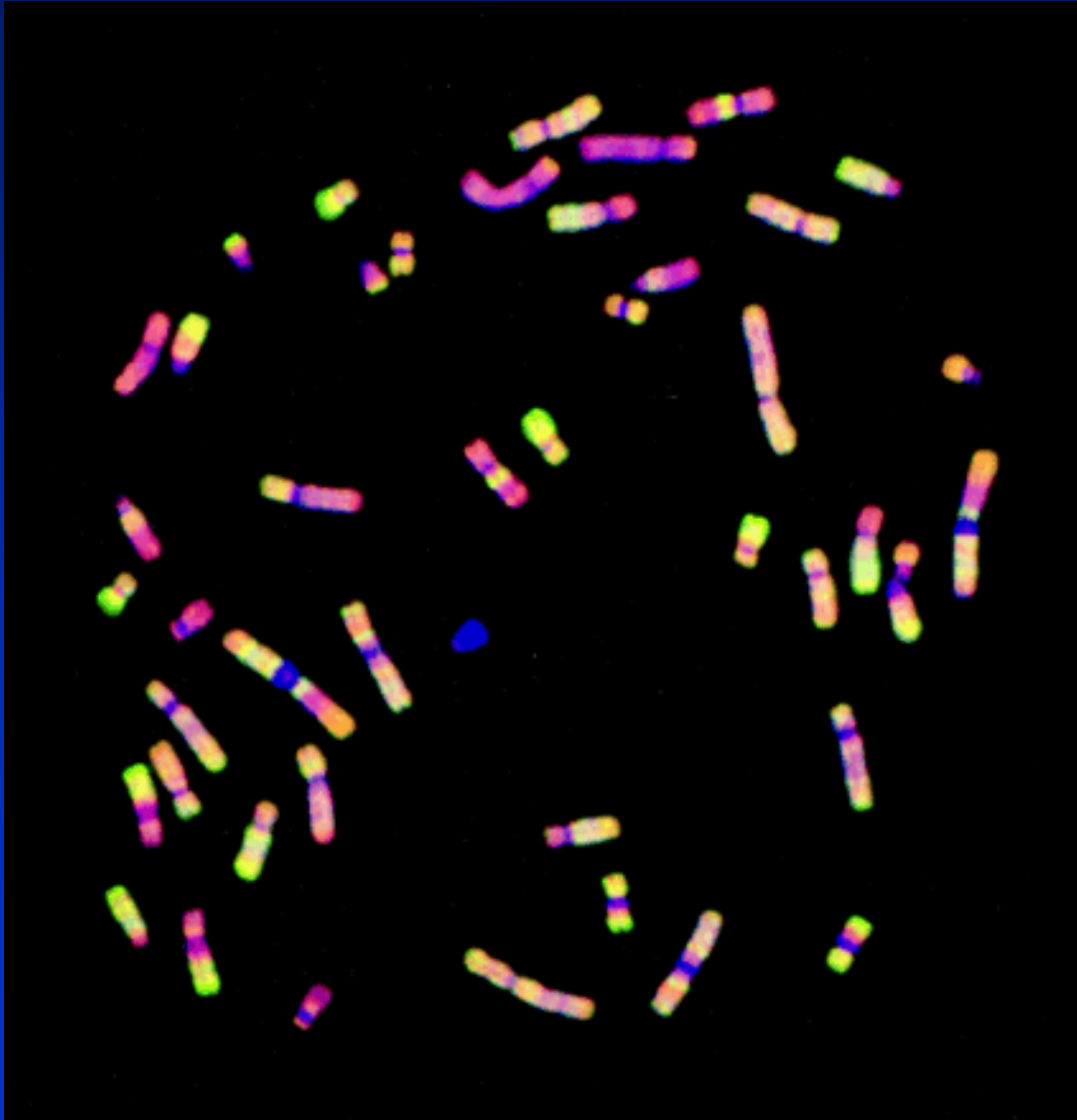
Srovnávací genomová hybridizace a expresní microarray analýza

Základní komponenta je fluorescenční poměrná hybridizace



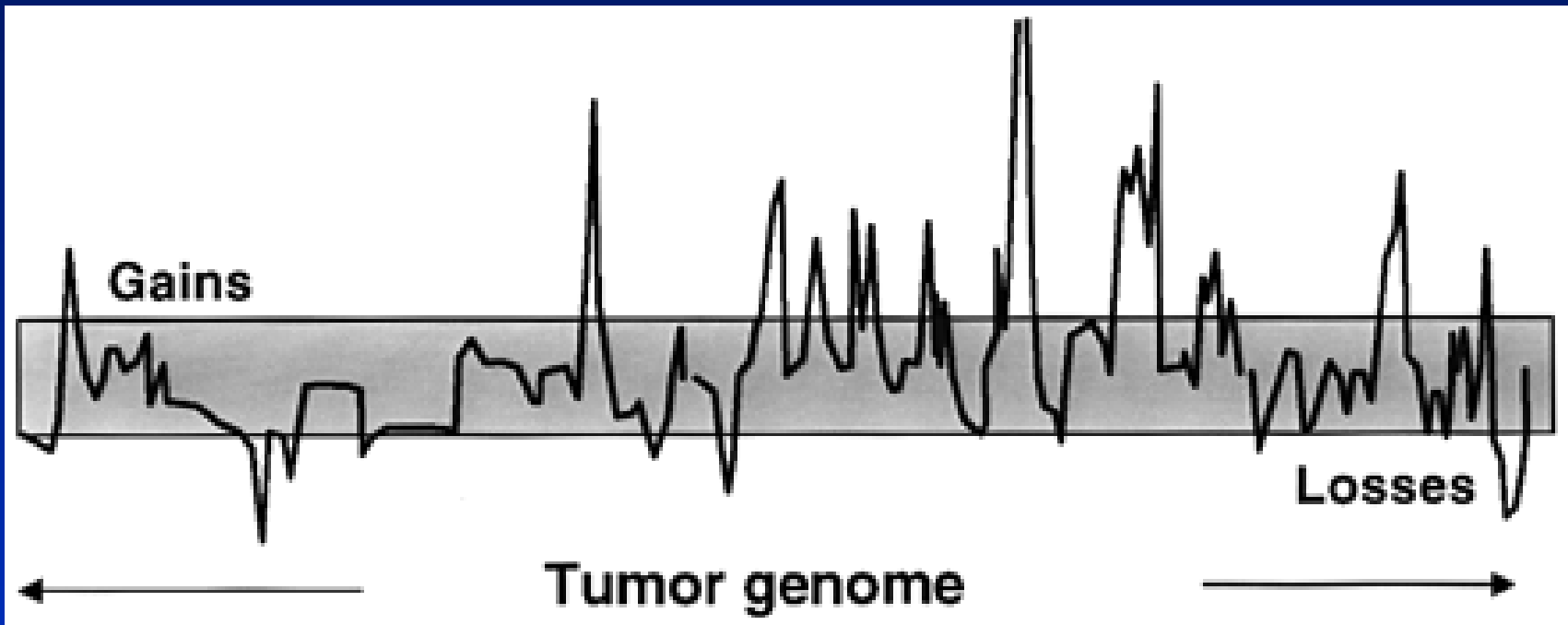
In these processes, two nucleic acid samples to be compared are differentially labeled with reagents that fluoresce at different wavelengths. They are then hybridized along with excess, unlabeled repeat rich DNA, to the representation of the genome onto which information is to be mapped. In CGH, the representation may be either metaphase chromosomes or arrays of cloned probes. In expression microarray analysis, the representation may be arrays of cDNA clones or oligonucleotides.

Fluorescenční mikrofotografie z výsledků CGH analýzy lidské línie z nádoru prsu MCF7



CF7 DNA was labeled green and normal reference DNA was labeled red. The chromosomes were counterstained with DAPI. Thus, regions of weak hybridization appear blue, regions of increased copy number appear green and regions of decreased copy number appear red.

CGH analýza pokročilého nádoru prsu



The data are arranged along the x-axis with chromosome 20pter to the left and chromosome 22qter to the right. The green:red CGH ratio is plotted along the y-axis. The gray band indicates the region of normal variability. Thus, values above the band show significant increases in copy number and values below the band show significant decreases in copy number.

PREDIKTIVNÍ MARKERY

Proliferační aktivita a nádorový růst

Růst vyjadřuje celkové zvýšení počtu buněk jako výsledek nárůstu buněk proliferační aktivitou a ztráty buněk apoptózou nebo nekrózou.

Proliferační aktivita je výsledkem průchodu buněk bun. cyklem. Mechanismus odpovědný za proliferační aktivitu (P) je rychlost buněčného cyklu, která je v inverzním vztahu ke generační době (T) na jedné straně a na druhé straně je ve vztahu k podílu buněk vstupujících do cyklu - růstová frakce (G).

Matematické vyjádření vztahu je $P = G/T$

Vysoká proliferační aktivita je tak důsledkem buď velké růstové frakce nebo krátké gener. doby nebo obojího.

Čas zdvojení (Td doubling time) nádoru (bez ztráty buněk) je definován jako

$$Td = T (\log 2 / \log (G+1))$$

Krátký čas zdvojení je tedy výsledkem buď krátkého bun. cyklu nebo vysoké růstové frakce nebo obojího.

PROLIFERAČNÍ MARKERY

techniky inkorporace značených analogů nukleotidů do DNA

³H tymidin (autoradiografie) nebo bromdeoxyuridin (BrdU, imunohistochemie)
markery buněk v S-fázi bun. cyklu, tj. syntetizujících DNA.

Nevýhody: omezené použití in vivo, radioaktivita, dlouhé časy pro vyhodnocení, subjektivní kritéria

mitotický index (MI) - nejstarší metoda vyhodnocování proliferace - mikroskopické počítání mitotických figur na preparátech, do budoucna - markery pro FCM.

Mitózy však představují jen část proliferujících buněk a délka mitózy je variabilní zejména u aneuploidních nádorů.

MI jen částečně koreluje s dalšími markery proliferace

procento buněk v S-fázi

flow cytometrie - fluorescenční barvení DNA - měření fluorescence v suspenzi buněk
image (static) cytometry - absorpční barvení (Feulgenova reakce) - měření buněk na sklíčku

Histogramy vyjadřující obsah DNA - vyhodnocování % buněk v jednotlivých fázích bun. cyklu - počítačové programy

SPF - S-phase fraction - celkem koreluje s dalšími markery (např. MI nebo Ki67)

imunohistochemické stanovení antigenů spojených s proliferací

PCNA - proliferating cell nuclear antigen - zvýšená exprese u proliferujících buněk - koreluje s ostatními markery, ale ne vždy. Nepříliš vhodný u nádorů, zvýšený i při reparaci DNA.

Ki67 - kódovaný genem na chrom. 10 je exprimován v G1, S a G2 fázi u proliferujících buněk - částečně koreluje s dalšími markery.

DNA topoizomeráza II - exprese se rychle zvyšuje při přechodu S a G2 a snižuje se na konci mitózy.

Organizátory jadérka (NORs) - segmenty DNA spojené s jadérky, které obsahují geny kódující ribozomální DNA. Přispívají k regulaci syntézy proteinů. Jsou vizualizovány barvením stříbrem - metoda AgNOR. Koreluje s SPF, Ki67 a MI

MARKERY BUNĚČNÉ SMRTI

AI - apoptický index

Metody detekce apoptózy: morfologické hodnocení - světelná a fluorescenční mikroskopie,

flow cytometrie (subdiploidní pík bun. cyklu, annexin V, TUNEL)

Další markery:

Molekuly na buněčném povrchu:

proliferace: CD71 - receptor pro transferin, receptory pro specifické růstové faktory

apoptóza: CD95 (Fas)

Změny protoonkogenů a nádorově supresorových genů - fosforylace RB proteinu, p53 (wild type, mutace), antiapoptický bcl-2 a proapoptický bax

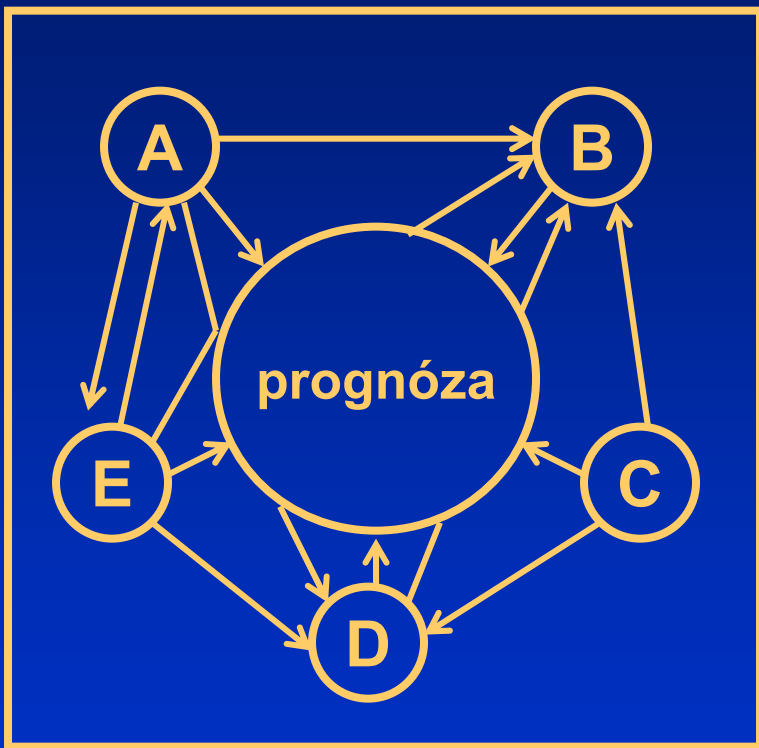
Změny cytoskeletonu

Markery neproliferujících a klidových buněk: statin

Důležité:

- ▶ Otázka interpretace a klinické využitelnosti jednotlivých markerů
- ▶ Standardizace metod a hodnocení mezi laboratořemi
- ▶ Problematika heterogenity nádorů
- ▶ Statické vs. dynamické stanovení parametrů, časový rozvoj
- ▶ Exprese a změny různých onkogenů mohou podmiňovat též citlivost nádorových buněk k chemo- a radioterapii
- ▶ Postižení vzájemných vztahů jednotlivých markerů
- ▶ Predikce odpovědí na léčbu

Využití multivariačních analýz pro predikce - analýza základních (principal) component a diskriminační analýza.



multi-
variální
analýza

