



Diagnostika a léčba nádorových onemocnění

Diagnostika,

Léčebné metody

Chemoprevence

Nutriční onkologie

Mechanismy působení protinádorových léčiv

Léková rezistence

Prediktivní markery, bioinformatika

Incidence a úmrtnost na nádorová onemocnění (USA)

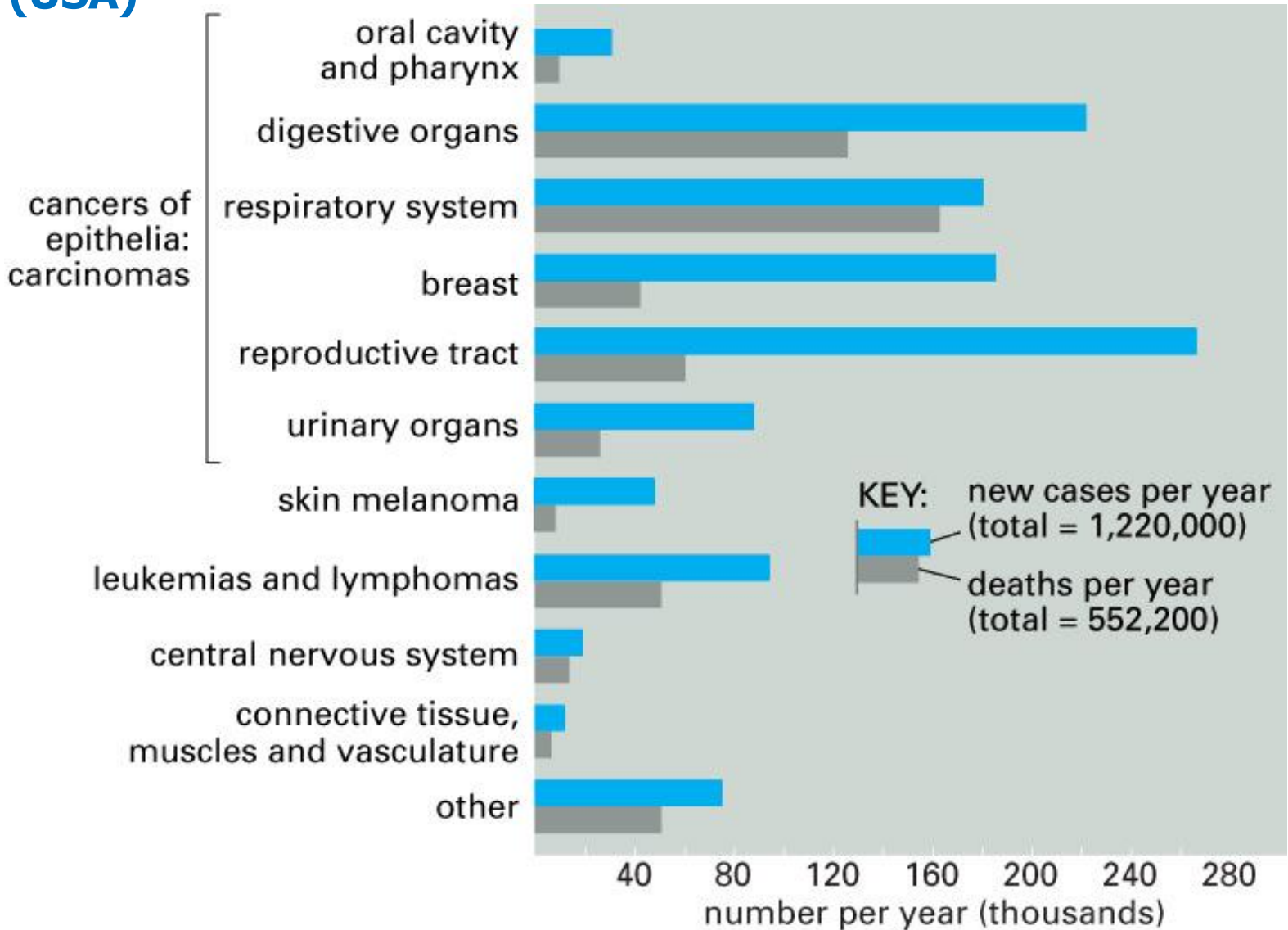


Figure 23–2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Diagnostika

- **Laboratorní vyšetření** (sedimentace erytrocytů, hematologické vyšetření, biochemická vyšetření)
- **Cytologické a bioptické vyšetření (pre- nebo postoperační)**

- **Nádorové markery** – laboratorně prokazatelné známky projevu specifických nádorových onemocnění (antigeny, emzymy, 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 imunosorpční (ELISA) (většinou komerční kity a automatické analyzátory)

- **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

Buněčný cyklus, ploidita, specifické markery, imunotypizace (CD antigeny)

- **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

❖ **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

Dědičnost nádorových onemocnění

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

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



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 diferenciacce

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)**

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 architektonika, 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.

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 diferenciace - využití růstových faktorů, genetické inženýrství - ovlivnění klíčových genů.
- **Angiogenní terapie** – cílená proti vaskularizaci nádorů

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

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 epidermálního růstového faktoru (EGF), inhibitory tyrozinových kináz, „antisense“ nukleotidy, vakcína proti receptoru nebo ligandu
- **Diferenciační terapie** (kyselina *all-trans* retinová, vitamin D3)
- **Inhibitory přenosu signálů**
 - Inhibitory tyrozinových kináz
 - Inhibitory cyklin-dependentních kináz – ovlivnění buněčného 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



- **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

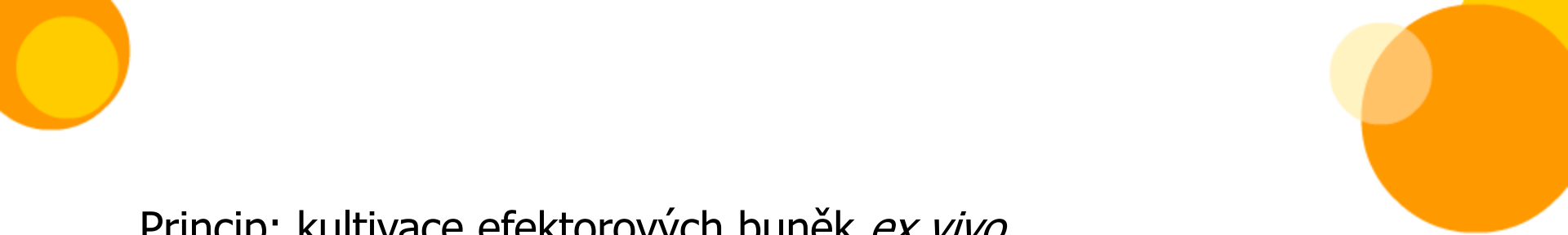
Imunoterapie

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

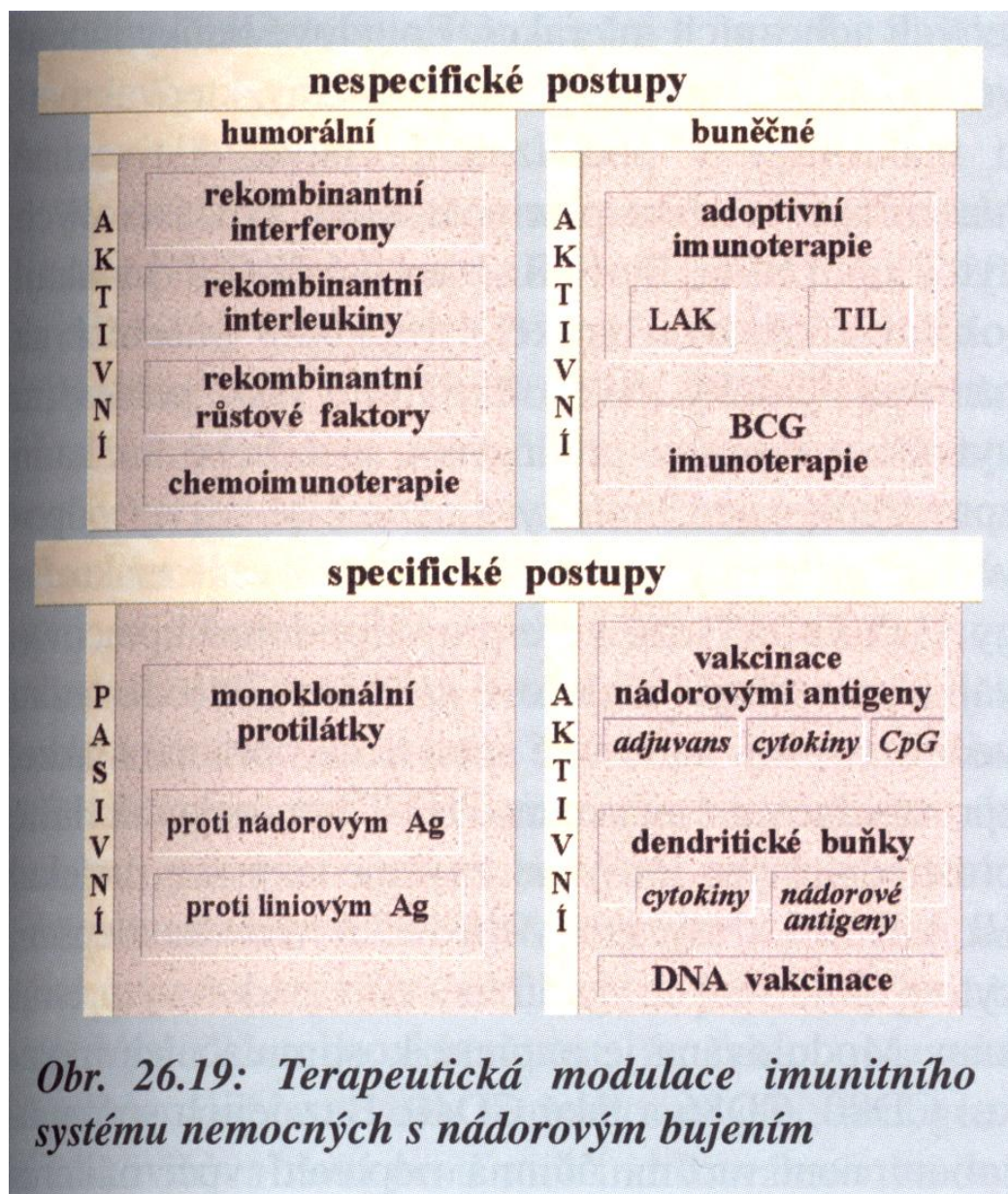


Princip: kultivace efektorových buněk *ex vivo*
s látkami, které aktivují nebo posilují jejich protinádorový účinek
(LAK buňky, NK-buňky, aktivované monocyty-makrofágy)

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

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

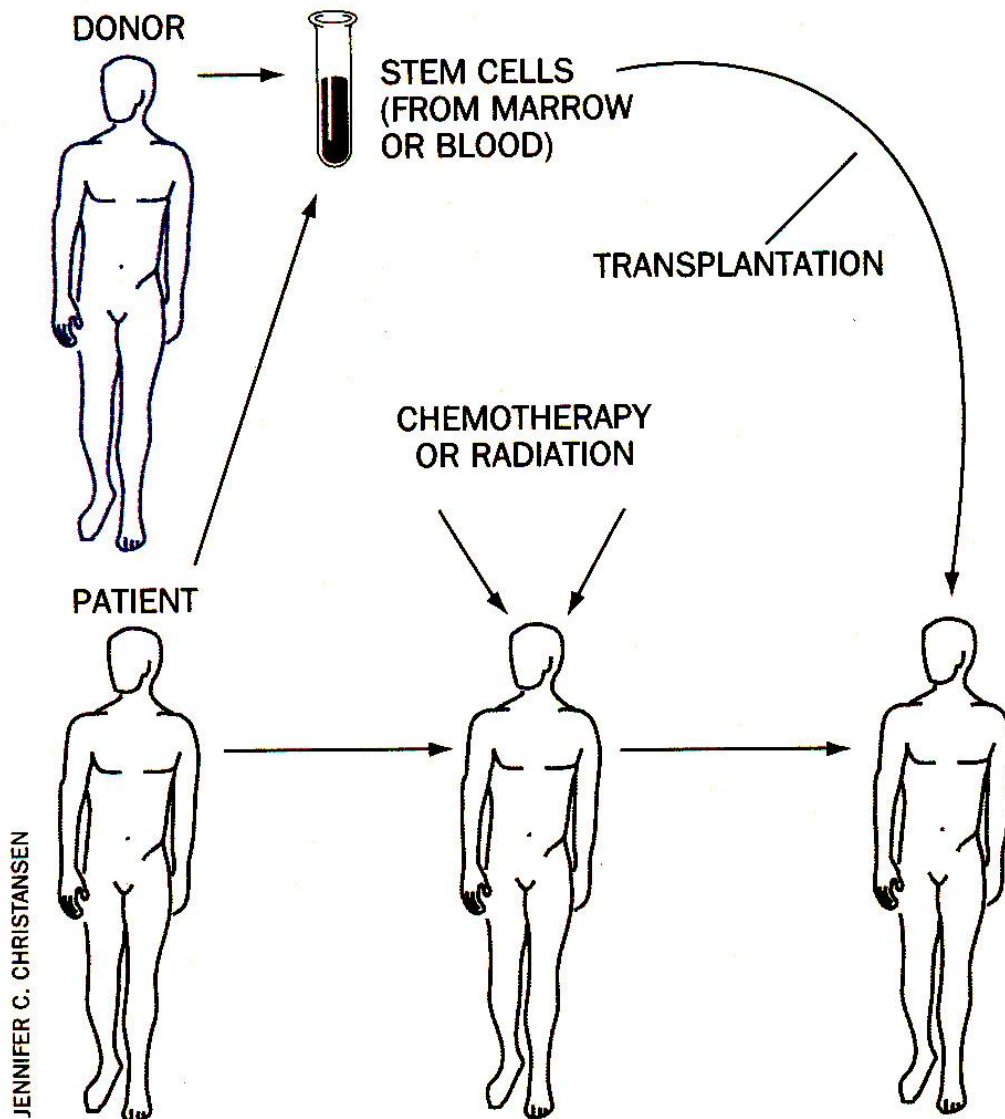
studium procesů související se vznikem a rozvojem chorob, a to na úrovni nukleových kyselin a proteinů, respektive jiných molekul, které jsou jimi regulovány.

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.

Zpětně přispívá k vývoji nových léčebných přístupů.

Transplantace

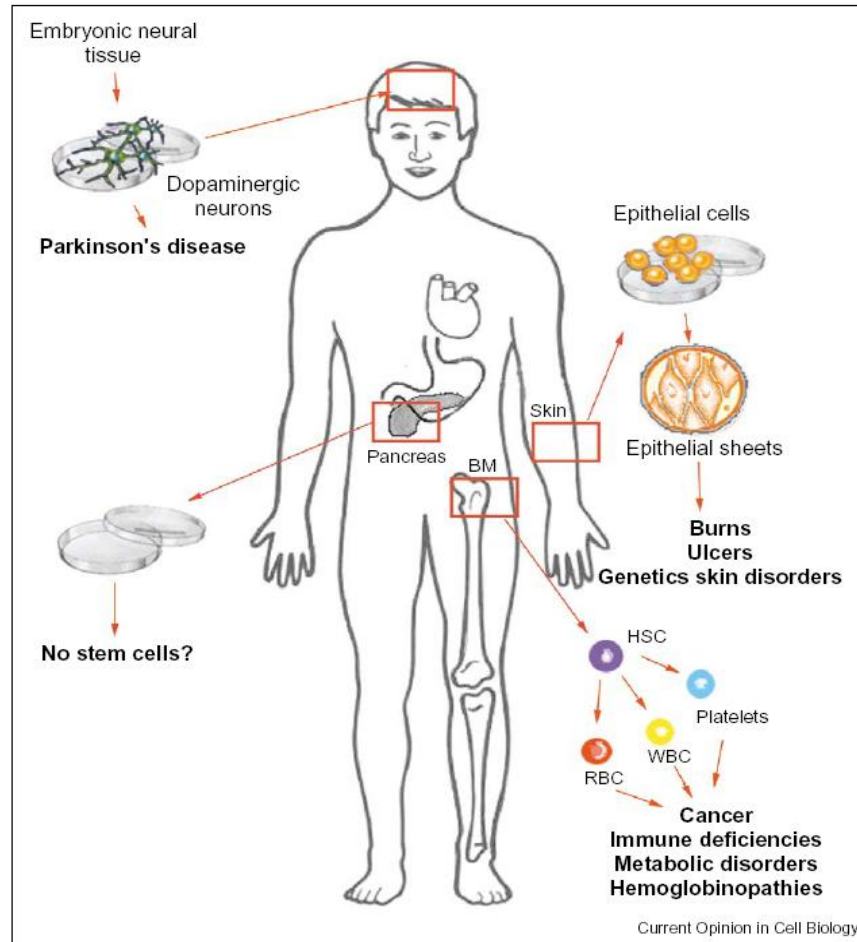


Autotransplantace

Před plánovanou radio- či chemoterapií nádorů (nehemopoetických). Odběr zdravé kostní dřeně nebo krve – izolace kmenových buněk či progenitorů (někdy s podporou příslušných růst. faktorů). Po léčbě zpětná transplantace pro obnovu krvetvorby.

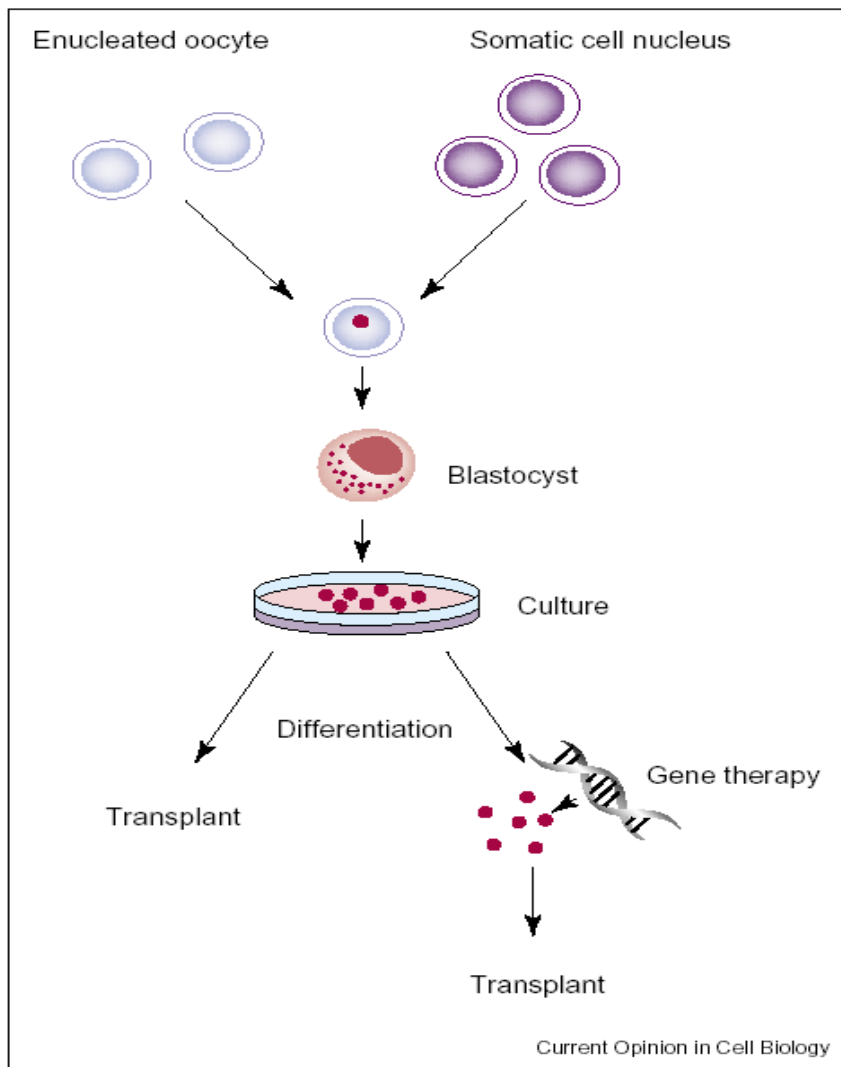
Transplantace od vhodného dárce – u hemopoetických malignit.

Využití transplantace tkáňově specifických kmenových buněk



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.

Možnost kultivace *in vitro*. Hemopoetické kmen. buňky z kostní dřeně (rekonstituce poškozené krvetvorby), epiteliální kmen. buňky (popáleniny, poškození kůže), dopaminergní neurony odvozené z embryonálních kmen. buněk (Parkinsonova choroba).

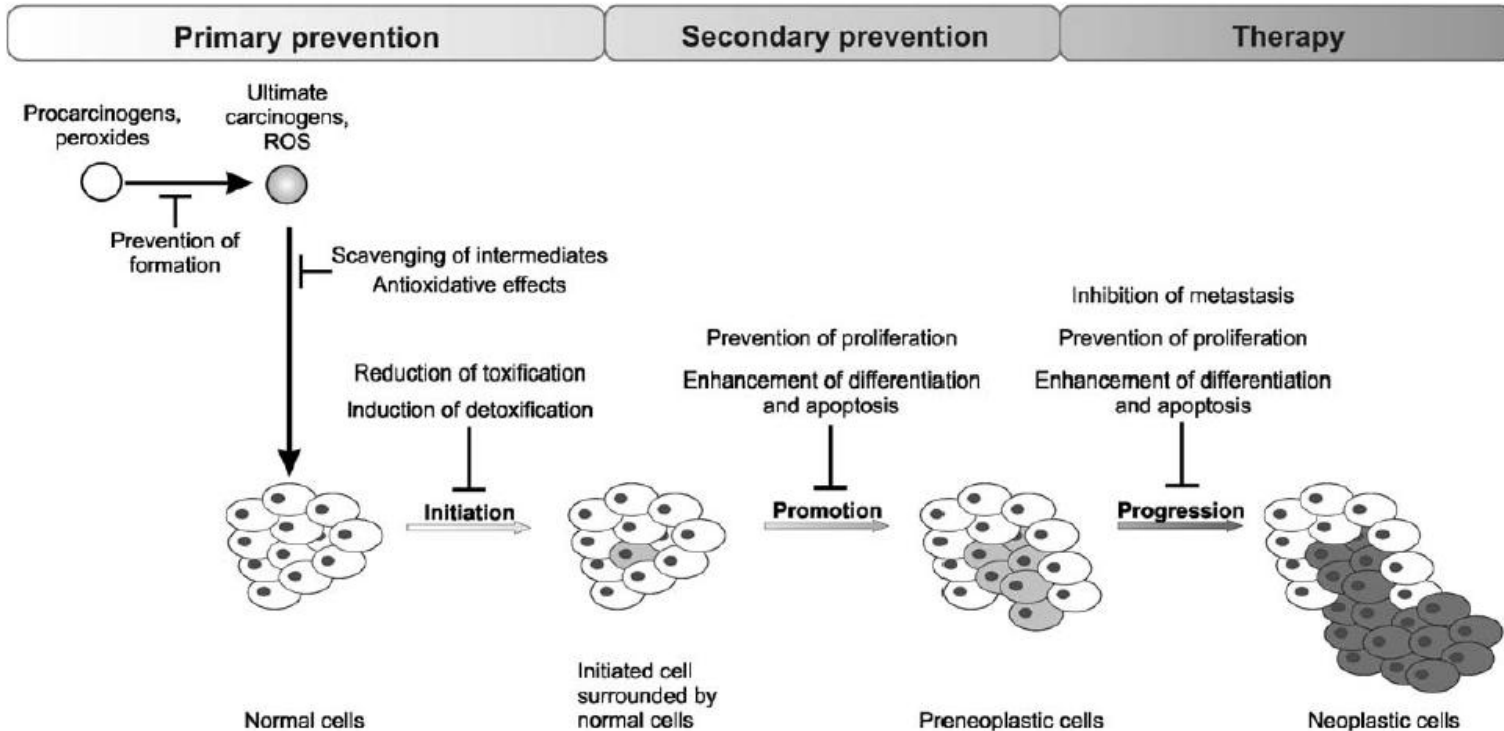


Tvorba emryonálních kmenových buněk přenosem jádra somatické buňky do enukleovaného oocyty.

Buňky získané z takto vytvořené blastocysty lze využít k transplantaci, příp. s využitím předchozí genové terapie k nápravě genetických poškození.

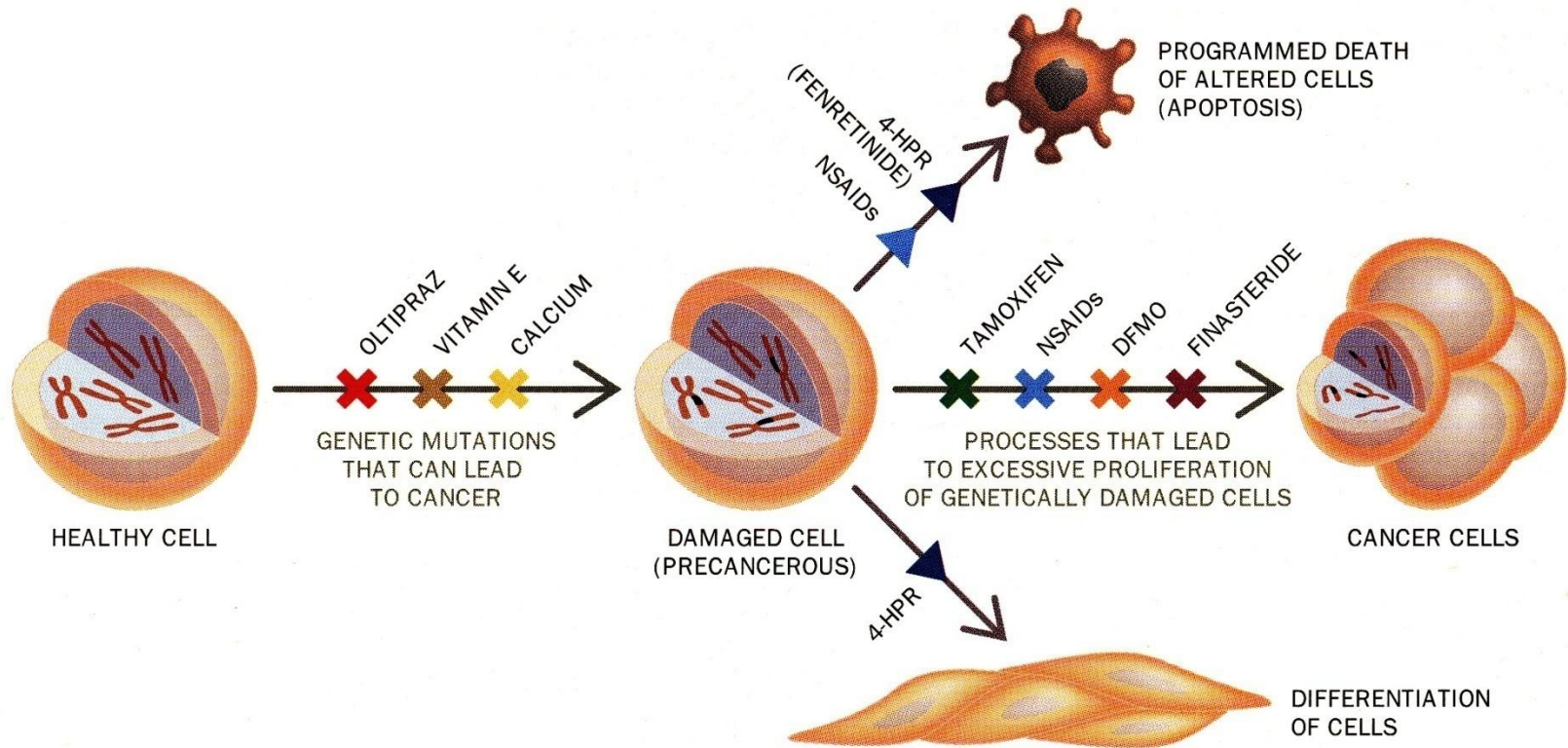
Nuclear transfer embryonic stem (NT ES) cells can be created by the transfer of a somatic cell nucleus into an enucleated oocyte. ES cells cultured from the ICM of a blastocyst created by NT can either be manipulated for transplantation or can undergo gene therapy before transplantation for the treatment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

PREVENCE A TERAPIE



Primární prevence – inhibuje iniciaci buněk redukcí toxicity nebo indukci detoxifikace
Sekundární prevence - redukuje přeměnu iniciovaných buněk v preneoplastické supresí proliferace nebo indukci diferenciaci nebo apoptózy
Terapie – se zaměřuje na omezení rozvoje onemocnění do progresivního stadia

Chemoprevention a chemoterapie



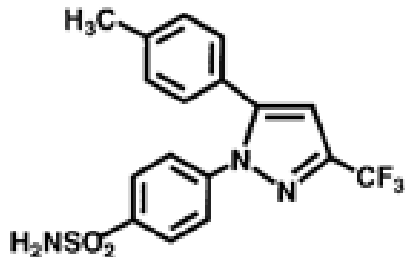
Chemoprevence

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 - difluorometylornitin (blokuje aktivitu ornitin dekarboxylázy) - prevence různých typů nádorů

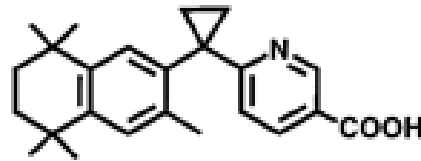
Příklady syntetických chemopreventivních látek

Selective COX-2 Inhibitors



Celecoxib

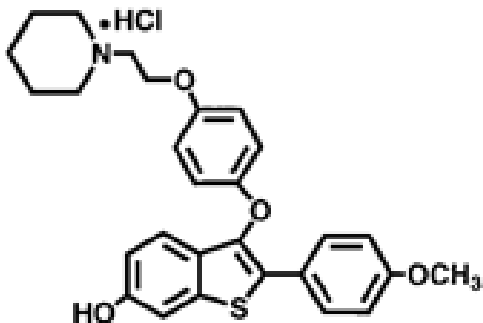
Selective Binding to RXR (Rexinoids)



LG 100268

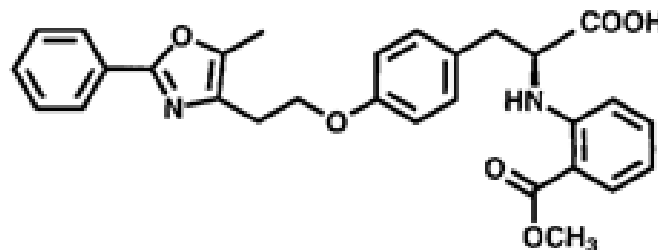
- Selektivní inhibitory COX-2
- Ligandy receptoru pro retinoidy
- sLigandy pro PPAR γ

SERMs



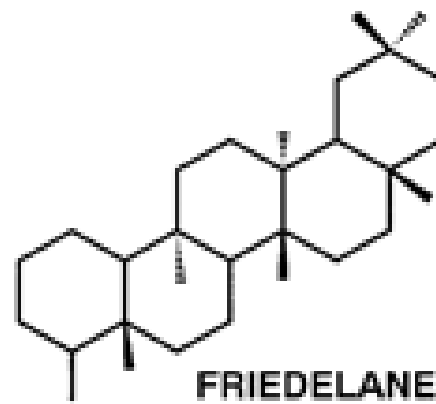
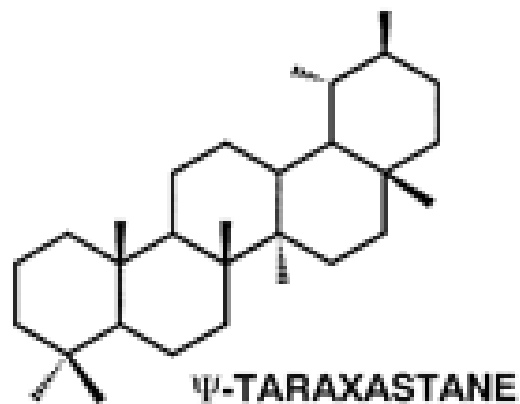
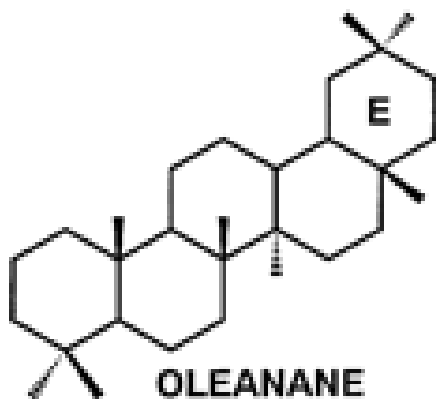
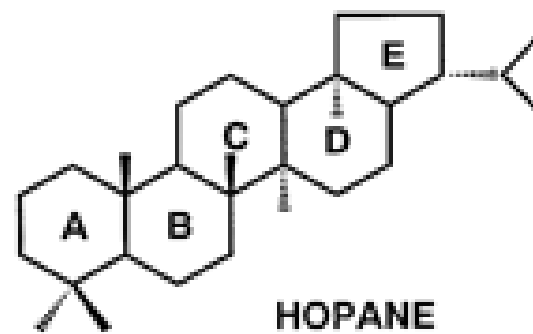
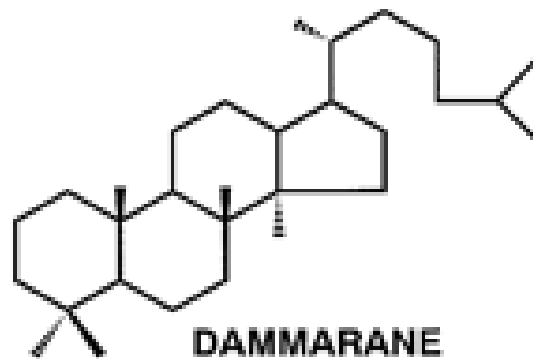
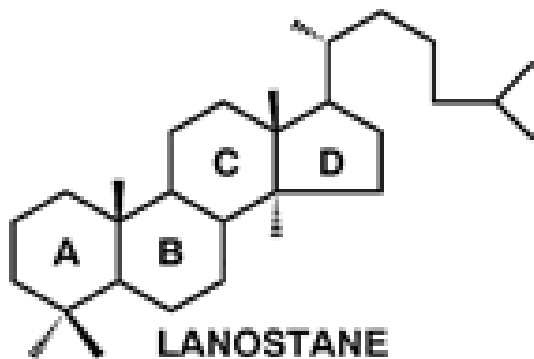
LY353381·HCl

PPAR- γ Ligands

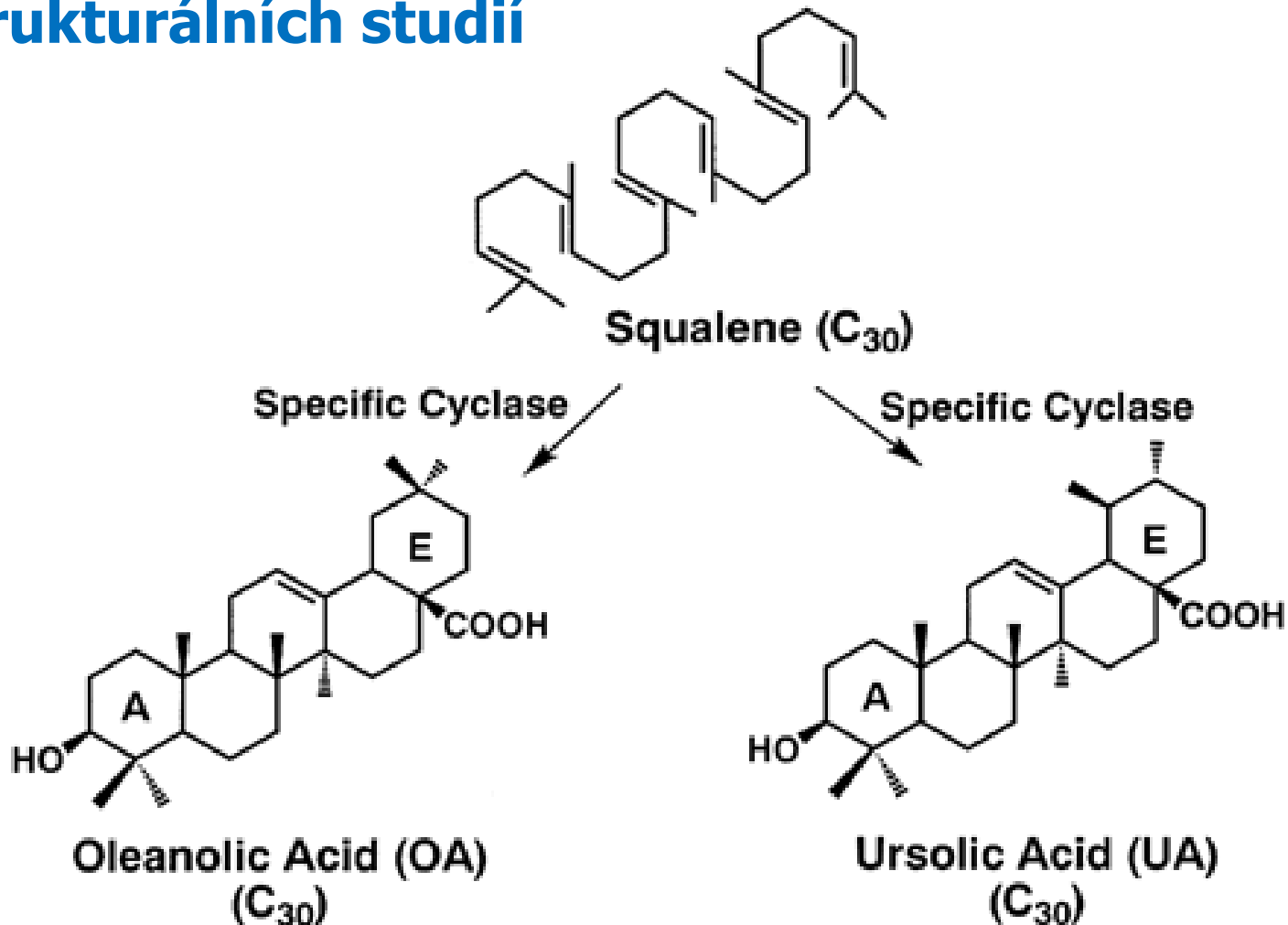


GW 7845

Příklad různých strukturálních podob skvalenu



Nové látky vznikající na základě strukturálních studií



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.



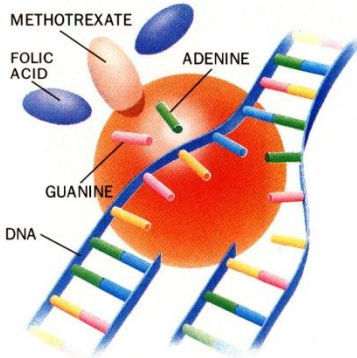
Mechanismy působení protinádorových léčiv

CHEMOTERAPEUTICKÉ LÁTKY

Families of Chemotherapeutic Drugs

ANTIMETABOLITES

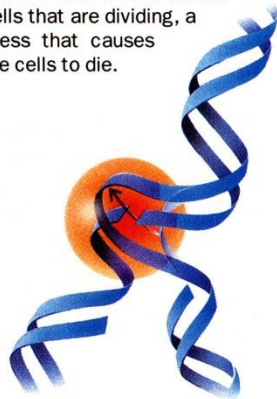
Some anticancer compounds act as false substances in the biochemical reactions of a living cell. A prime example of such a drug is methotrexate, which is a chemical analogue for the nutrient folic acid. Methotrexate functions, in part, by binding to an enzyme (*orange*) normally involved in the conversion 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

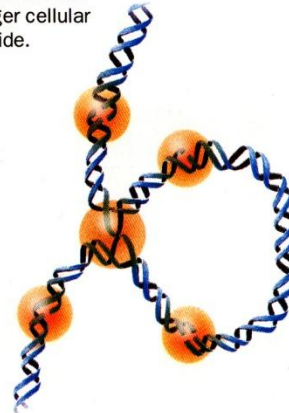
Replication of a cell's genetic material requires a means to pull the DNA double helix apart into two strands. This separation is typically accomplished with the aid of a special "topoisomerase" enzyme (*orange*) that temporarily cleaves one strand, passes the other strand through the break and then 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

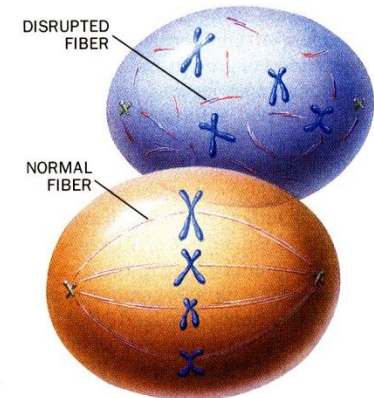
Certain compounds (*orange*) form chemical bonds with particular DNA building blocks and so produce defects in the normal double helical structure of the DNA molecule. This disruption may take the form of breaks and inappropriate links between (or within) strands. If not mended by the various DNA repair 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

TOMO NARASHIMA

Chemoterapeutika zabraňují množení buněk nebo indukují apoptózu různými mechanismy.

Antimetabolity, inhibitory topoizomeráz a alkylační činidla blokuji syntézu DNA
Rostlinné alkaloidy blokuji mitotické dělení

Chemoterapeutika vyvolávající oxidativní stres

Table 2. Drug Inducers of Oxidative Stress

Anthracyclines

Epipodophyllotoxins

Camptothecins

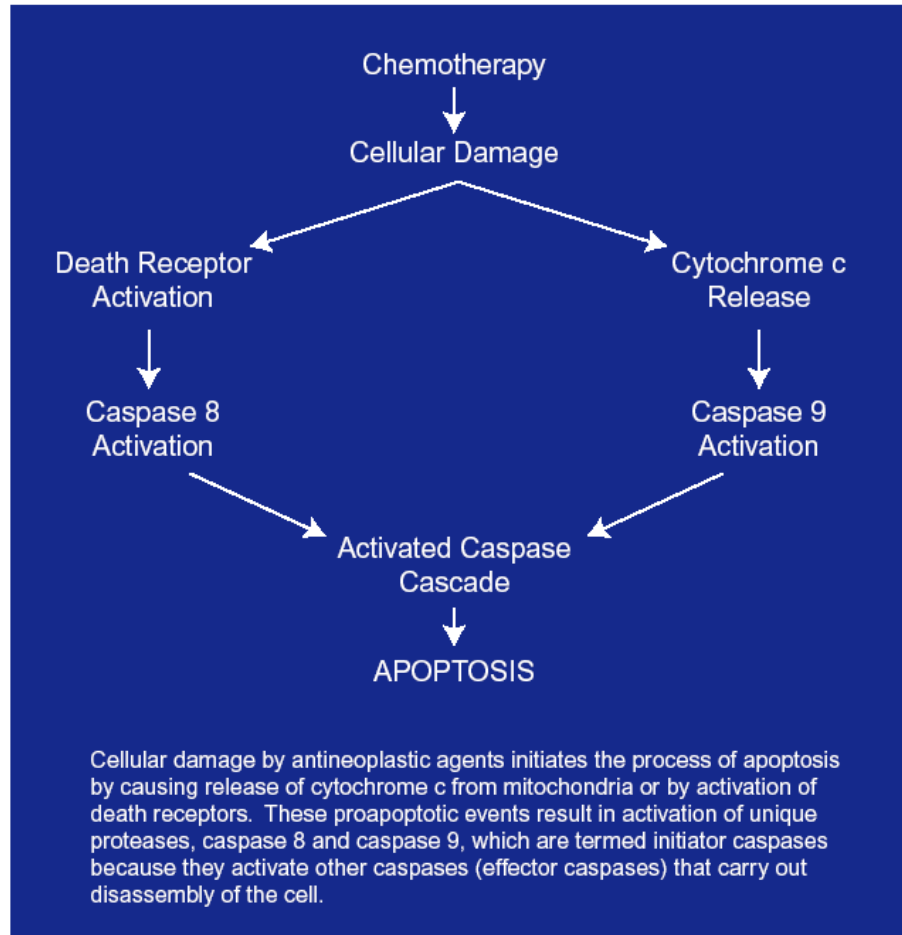
Platinum coordination complexes

Bleomycins

Alkylating agents

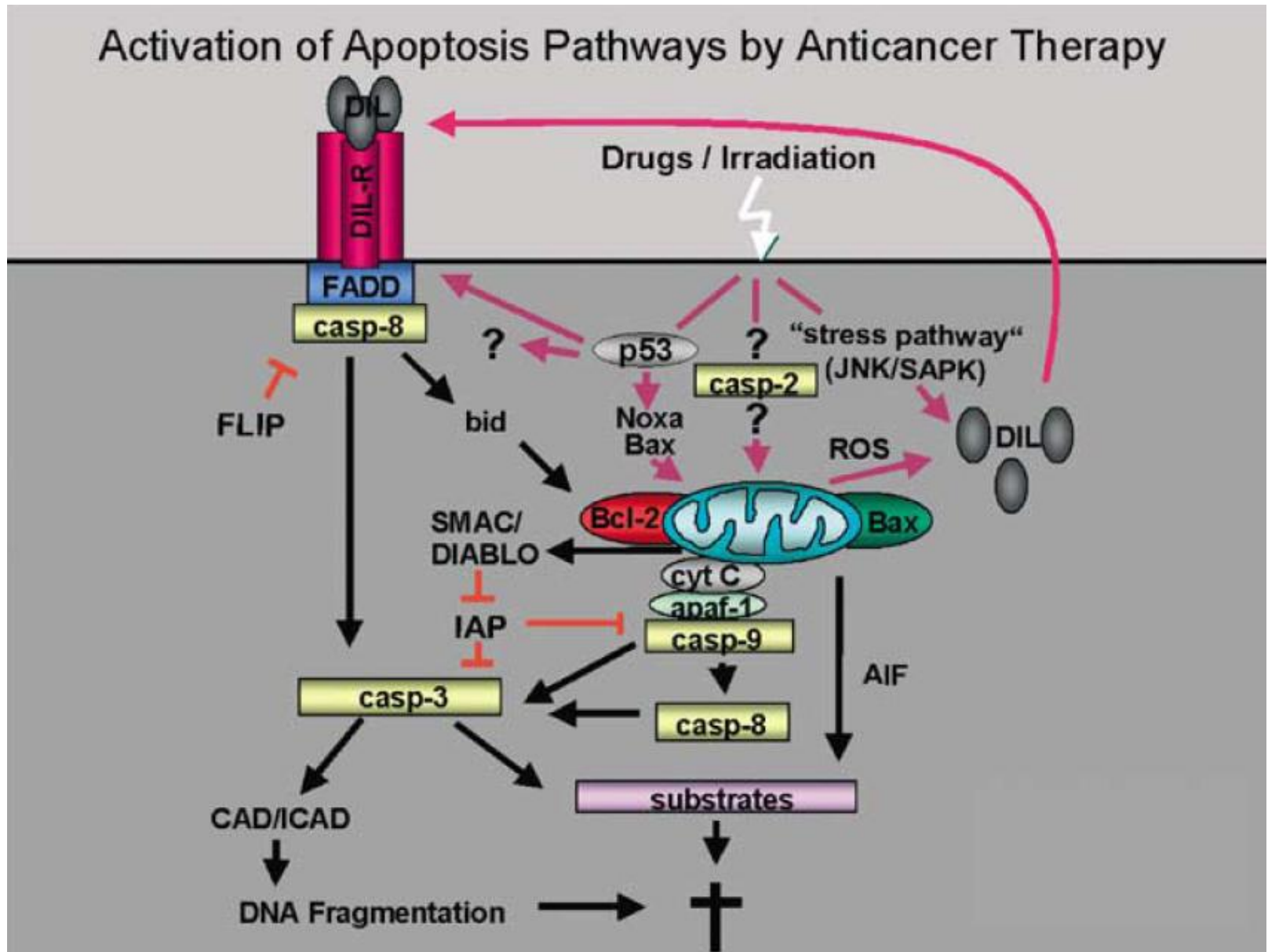
Dvě dráhy aktivace apoptózy chemoterapeutiky

Figure 2. Duel Apoptotic Pathways of Chemotherapy



Chemoterapeutika aktivují apoptózu přes mitochondriální dráhu nebo přes aktivaci receptorů smrti („death receptors“)

Signální dráhy apoptózy indukované chemoterapeutiky







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



Dávková závislost

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

Ve **vyšších koncentracích** v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti kontrolního 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**.

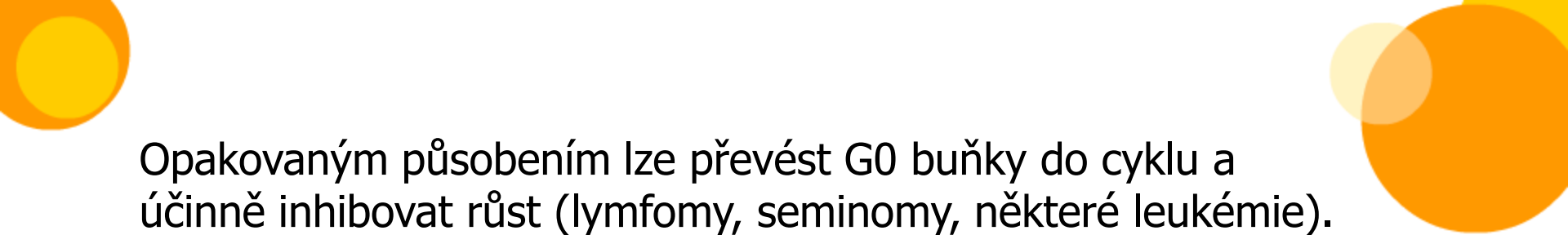
Opakovaná cytostatická terapie a kombinovaná terapie

(s využitím humorálních faktorů, imunologickou indukcí, atd.) představují hlavní přístupy jak dostat do cyklu i klidové buňky, a pak účinně inhibovat jejich růst.

Klíčovou otázkou však zůstává volba nevhodnějšího časového intervalu mezi jednotlivými aplikacemi (matematické modely).

Klidové buňky přežívají mnohem lépe, protože během dlouhého časového intervalu mezi cytostatickým působením, replikací DNA 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).

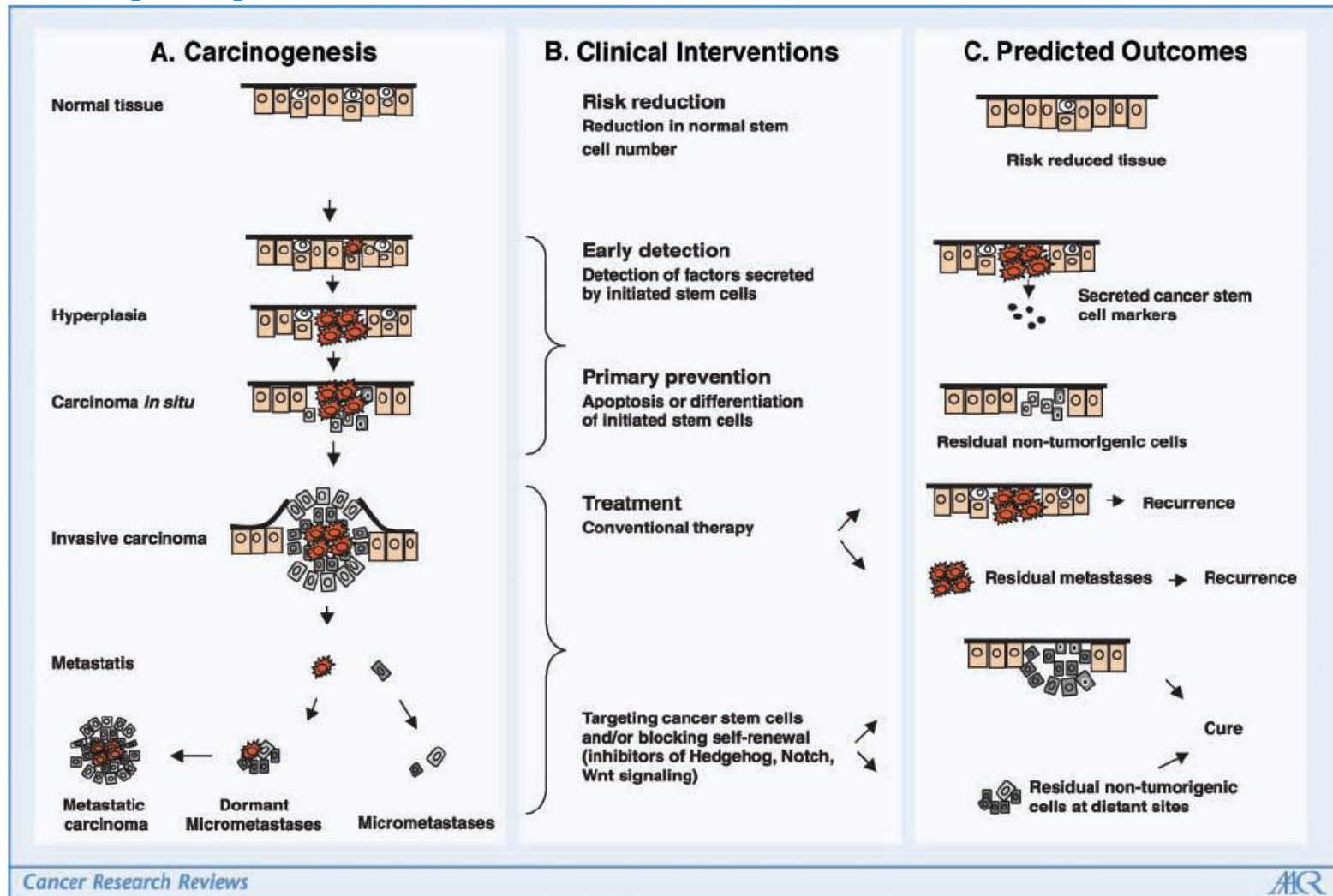
Pomalu rostoucí nádory mají přechod buněk z G0 zásobní populace řízen negativní zpětnou vazbou.

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.

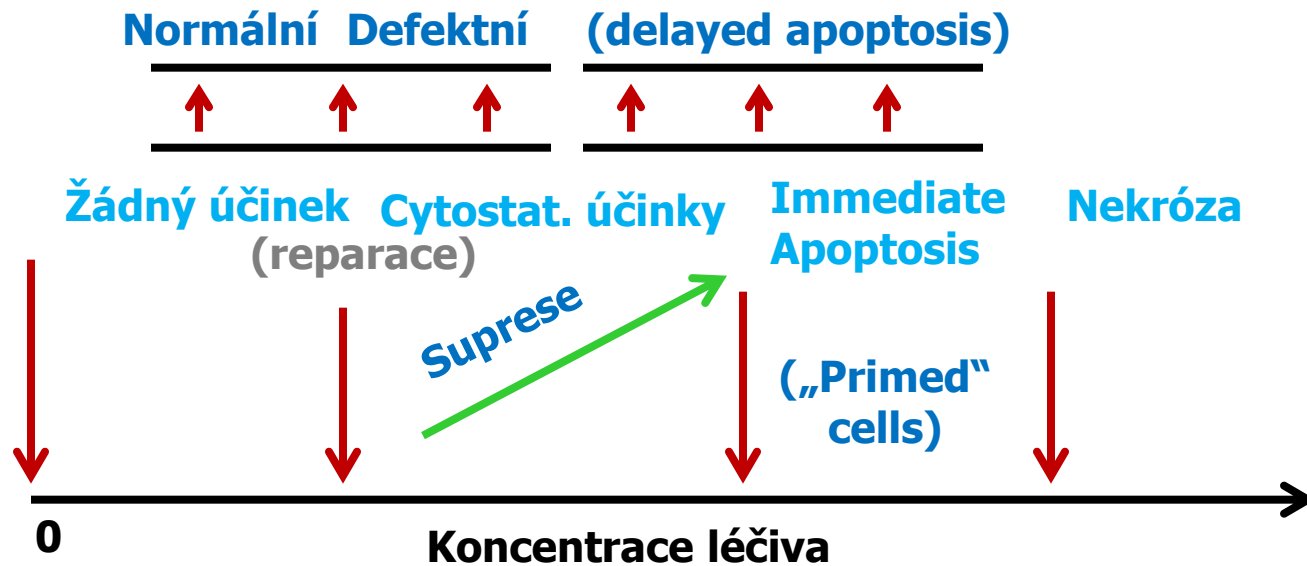
Buňky mají dlouhou generační dobu (karcinom tlustého střeva, žaludku, plic, sarkomy).

Klinická implikace modelu nádorových kmenových buněk (CSC)



CSC jsou důležité pro snížení rizika nádoru, brzkou detekci, prevenci i terapii. Redukce normálních kmenových buněk (SC) – snížení rizika nádoru. Detekce faktorů sekretovaných iniciovanými SC – brzká detekce. Indukce apoptózy či diferenciaci SC – prevence. Selektivní eliminace CSC – úspěšnější terapie. Wicha MS et al., Cancer Res. 2006

Průchod buněčným cyklem



Obecné schéma účinků vzrůstající koncentrace protinádorových látek poškozujících DNA na buněčný cyklus a apoptózu.

Velmi nízké koncentrace – žádné či minimální účinky díky dostatečné kapacitě reparačního systému

Vyšší koncentrace:

- funkční kontr. bod v G1- zástava a reparace poškození nebo apoptóza (při vysoké konc. léčiva nebo při neúspěšné reparaci).
- nefunkční kontr. bod (mutace p53) – vstup do S-fáze – průchod brzděn podle konc. léčiva „primed cells“- apoptóza během 3-6 h (immediate apoptosis) při hraniční koncentraci. Spojeno s dalšími faktory, např. konstitutivní expresí c-myc.

Prolongovaná suprese průchodu bun. cyklem („nonprimed cells“) vede k růstové nerovnováze, sekundárním změnám a zpožděné apoptóze (delayed apoptosis). Ta má často řadu atypických znaků.

Po příliš vysokých dávkách dochází k nekróze.

Typy buněčné smrti po působení protinádorových terapeutik jsou závislé na dávce

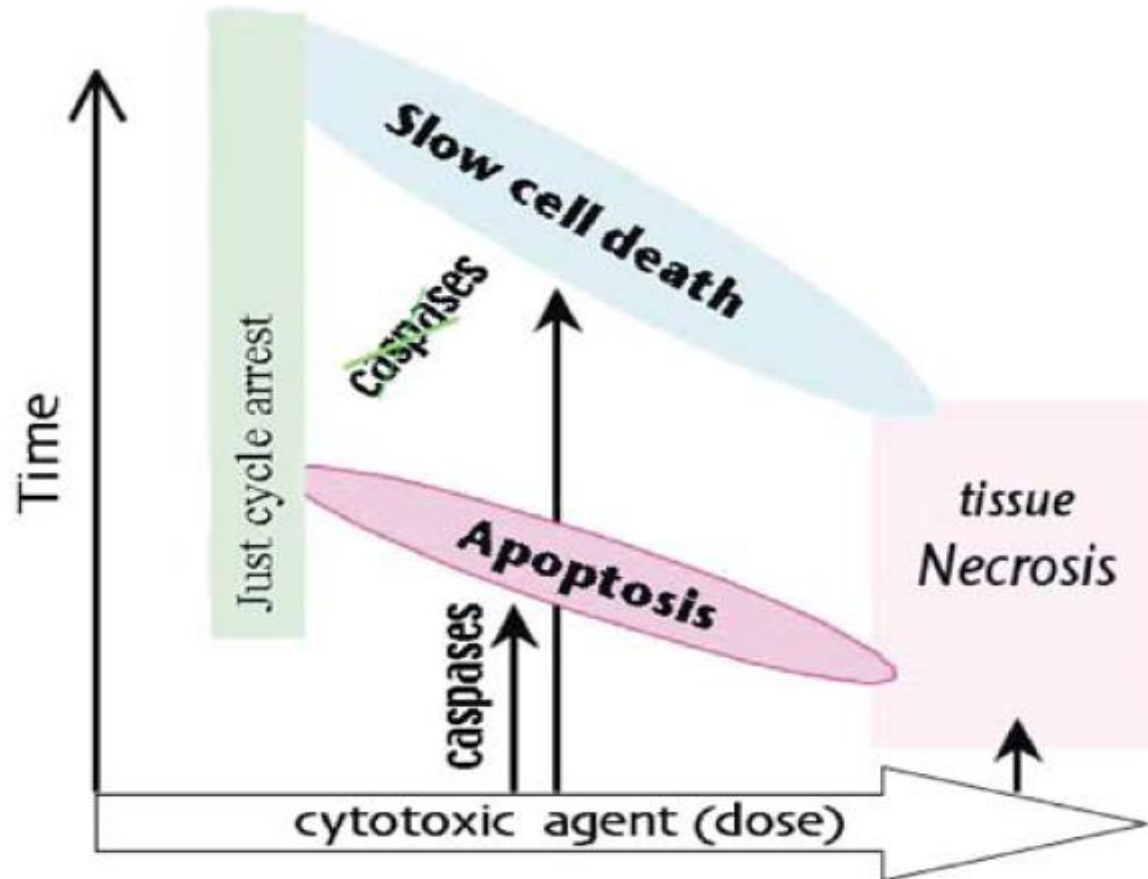


Figure 3 Forms of cell death caused by anticancer drugs (cytotoxic stimuli). At low (subcytotoxic) doses, a drug (or other cytotoxic agents) can arrest cell proliferation without significant cytotoxicity. At higher drug concentrations, apoptosis-prone cells undergo rapid cell death caused by caspase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

Vhodná strategie pro úspěšnou nádorovou terapii

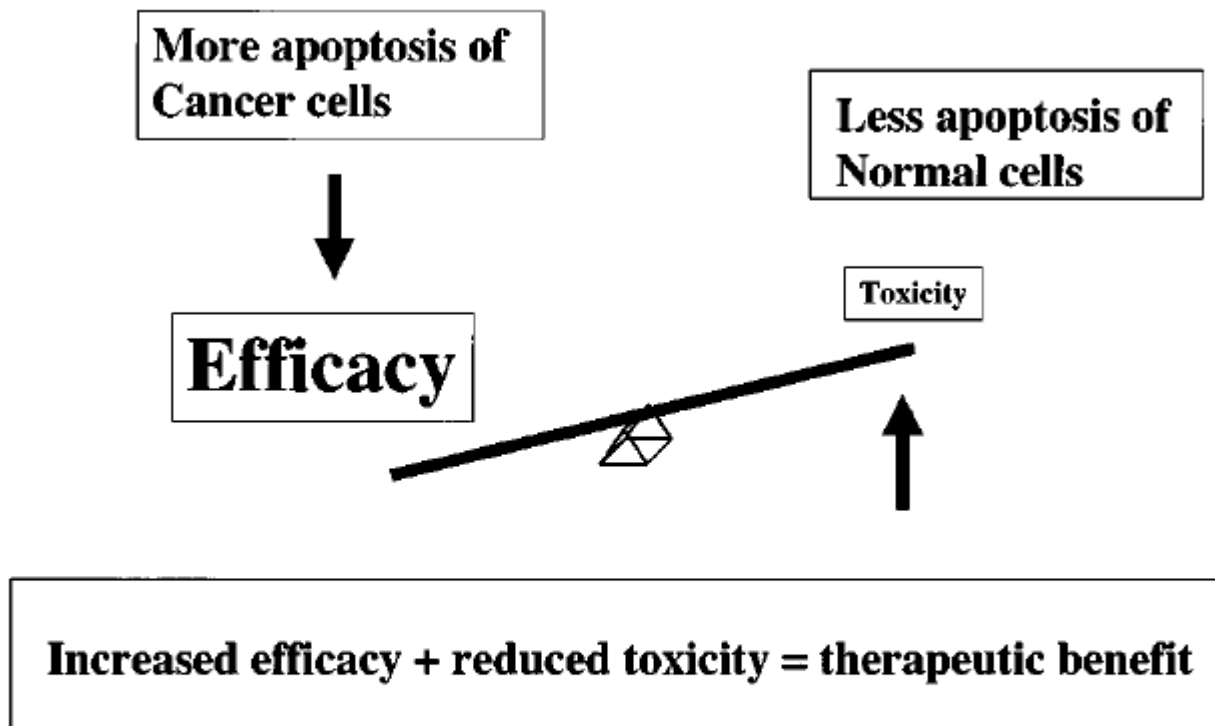


Figure 1 Desirable strategy to achieve therapeutic benefit in cancer therapy. Agents which effectively kill cancer cells are useful to the extent that toxicity to normal cells is tolerated. It is clear that therapeutic benefit can be achieved by increasing apoptosis of cancer cells as well as by lowering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

Optimální terapie – zvýšená apoptóza nádorových buněk a snížení toxicity pro normální buňky

The slide features a white background with decorative elements consisting of several overlapping circles in shades of orange and yellow. These circles are positioned in the corners: top-left, top-right, and bottom-left. The text is centered in the middle of the slide.

Léková rezistence

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.

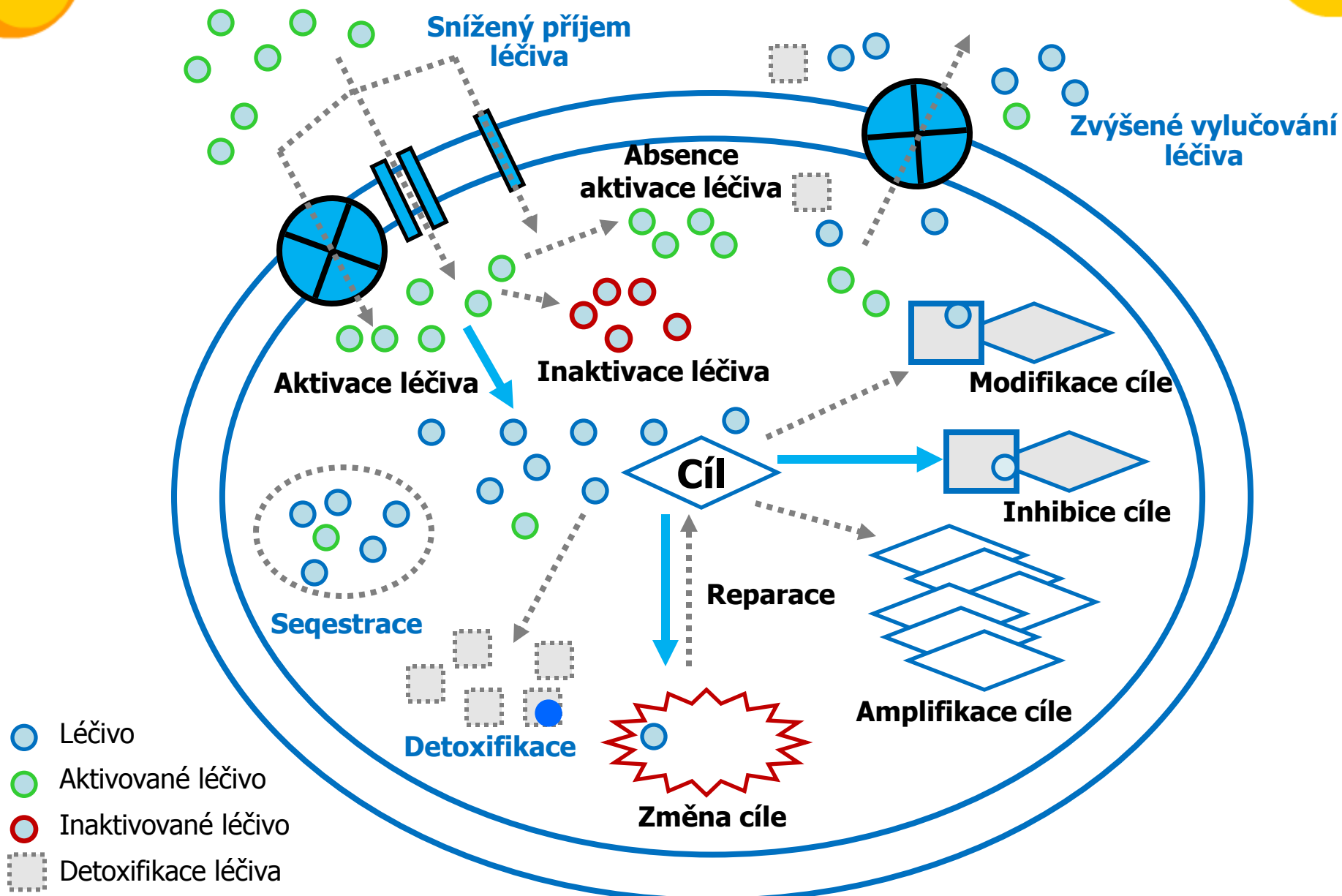
MDR - "multidrug resistance" k nádorové chemoterapii spojené se zvýšenou expresí Pgp (P170) glykoproteinu - membránová adenosin trifosfatáza (ATPáza) se širokou specifitou.

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



- Léčivo
- Aktivované léčivo
- Inaktivované léčivo
- Detoxifikace léčiva

→ Obvyklá dráha inhibice cíle → Různé typy rezistence

Buněčná detoxifikace

Základní roli v rezistenci nádorových buněk k různým cytotoxickým látkám hraje **glutation (GSH)** - vnitrobuněčný tripeptid obsahující cystein a přítomný v savčích buňkách ve vysokých koncentracích.

Zvýšená konjugace s GSH je hlavním mechanismem vývoje rezistence.

Glutation-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.

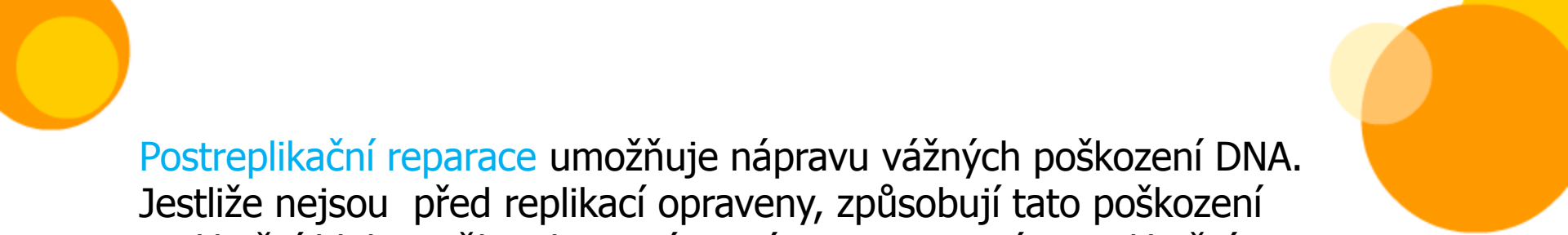
Reparační procesy DNA jsou velmi komplexní a závisí na typu poškození. Jejich regulace se účastní na 200 různých genů. Mají velký význam pro nádorovou chemoterapii, protože jsou zahrnuty v rezistenci k velkému počtu cytotoxických látek, zejména těch, které nejsou ovlivněny MDR fenotypem.

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 bazí 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
- 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**.

Některé parametry lékové rezistence

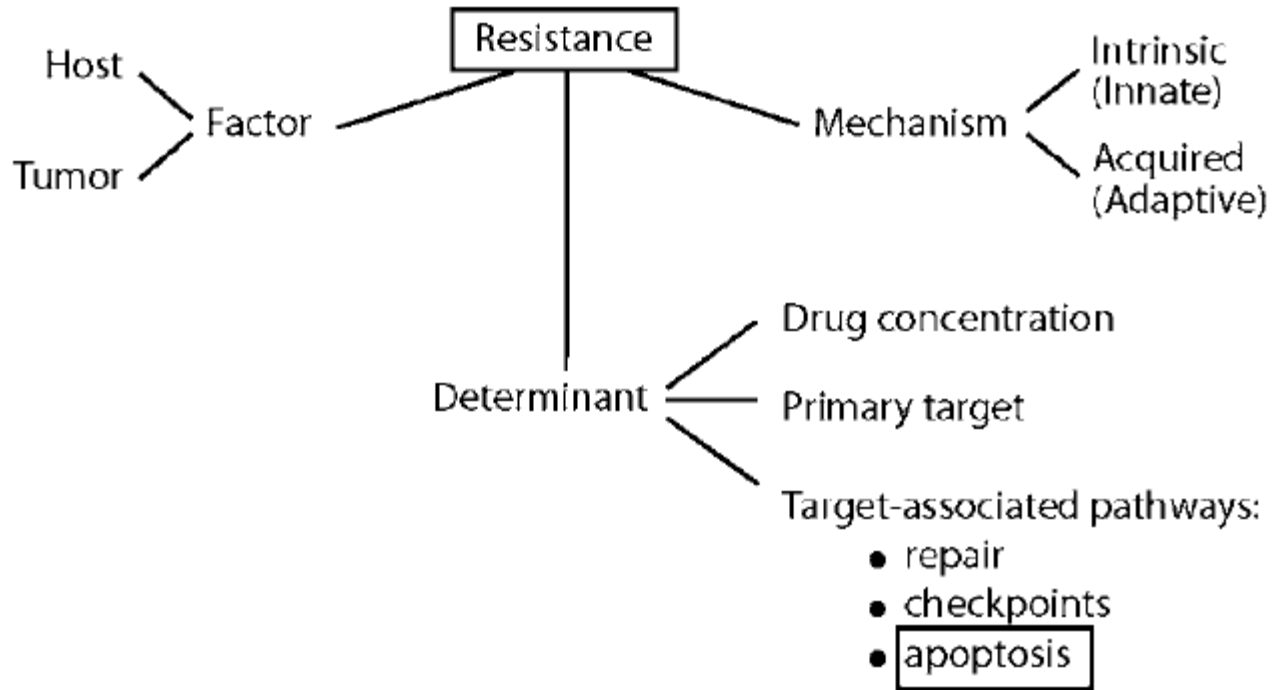


Figure 1 Some of the parameters involved in drug resistance

Vnitřní (intrinsic) a získaná (acquired) rezistence

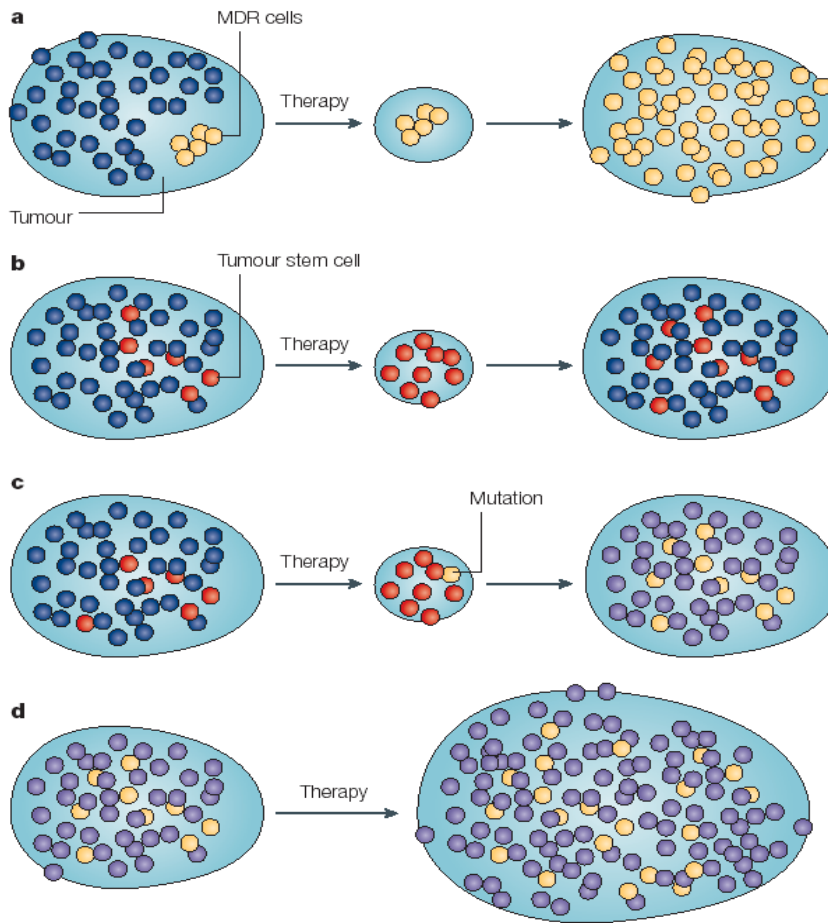
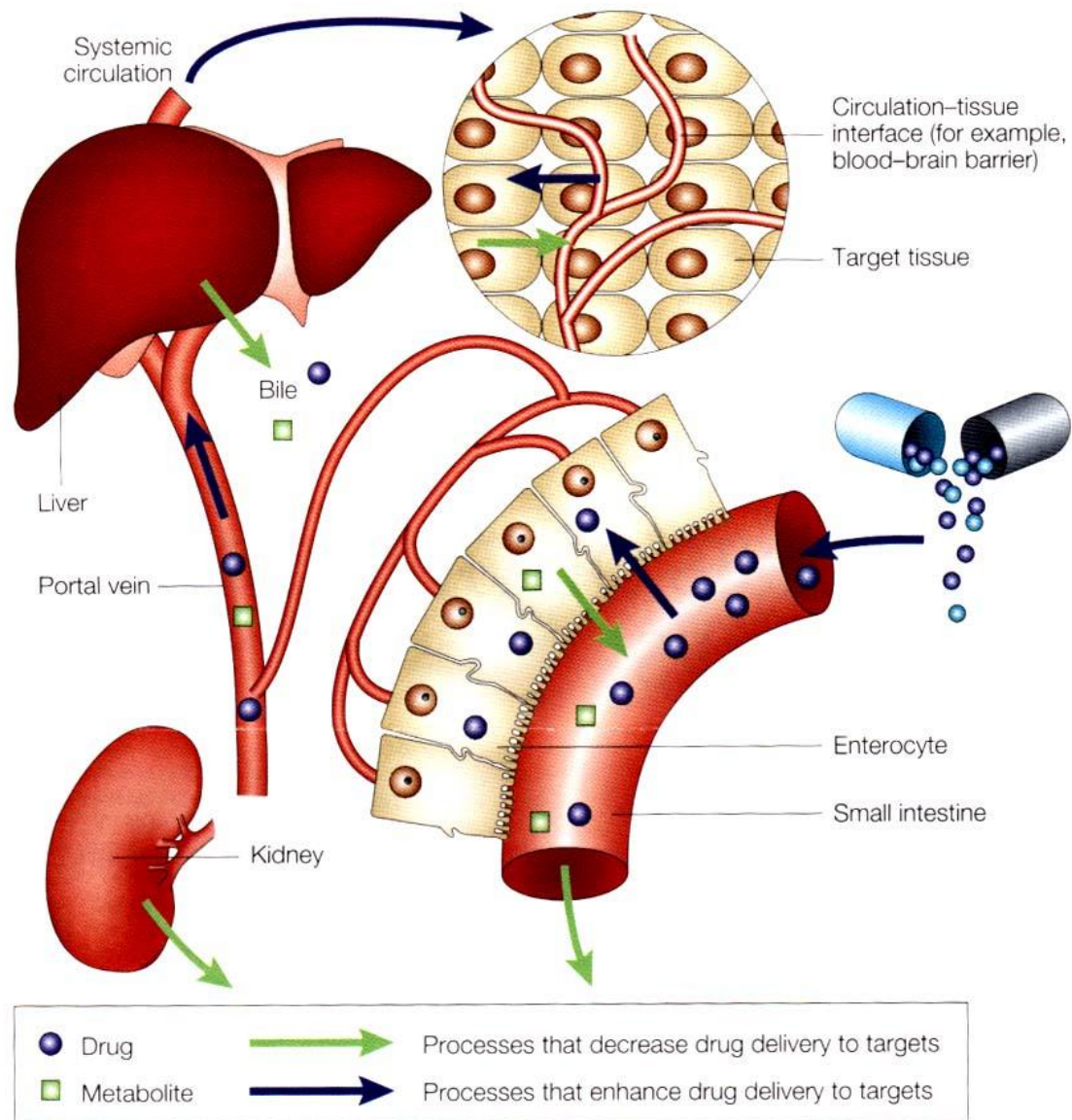


Figure 2 | **Models of tumour drug resistance.** **a** | In the conventional model of tumour-cell drug resistance, rare cells with genetic alterations that confer multidrug resistance (MDR) form a drug-resistant clone (yellow). Following chemotherapy, these cells survive and proliferate, forming a recurrent 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.

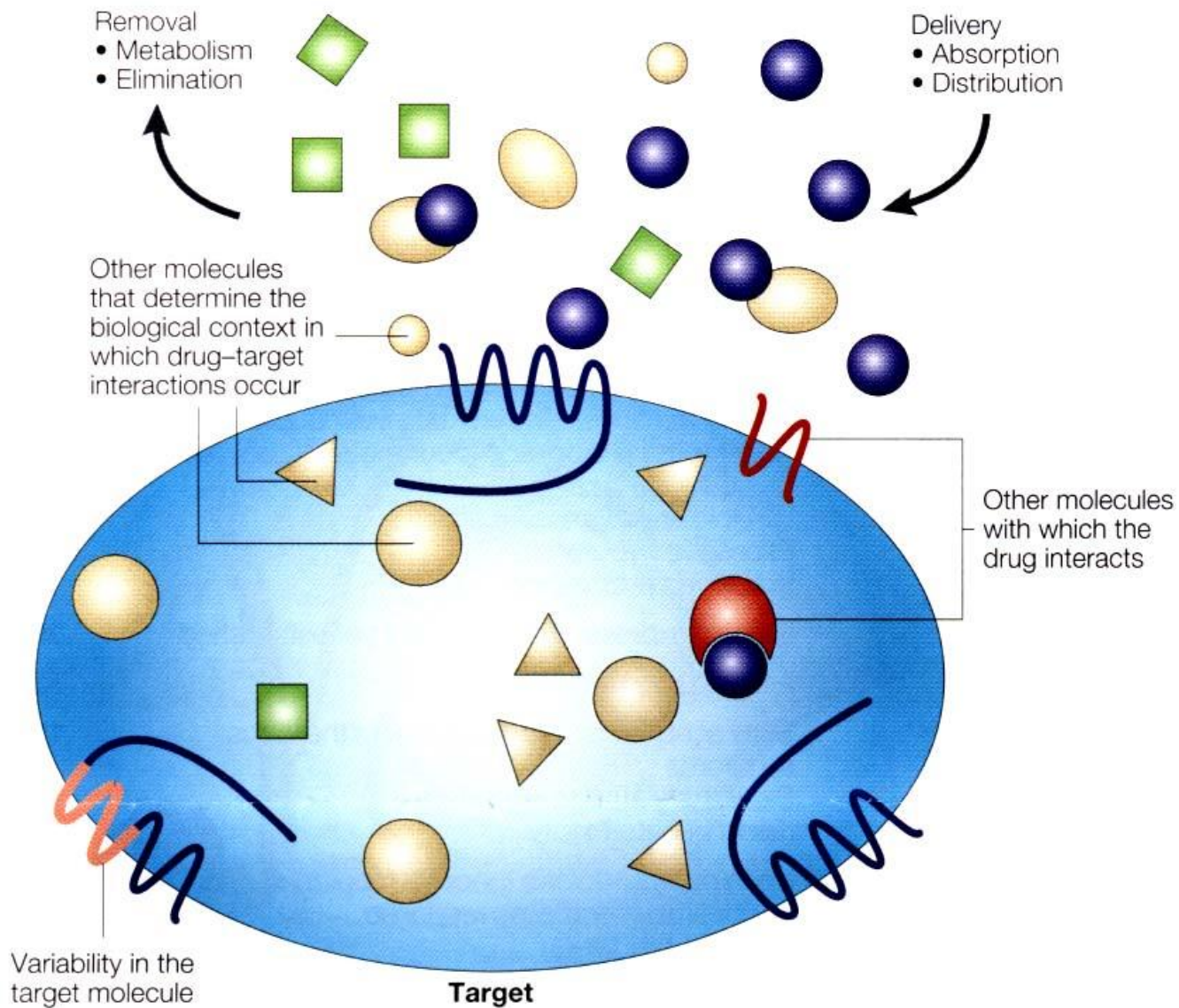
Různé modely lékové rezistence

- genetická změna v nádorové buňce indukuje MDR (multidrug resistance) a vytváří se rezistentní klon.
- malá populace kmen. buněk v nádoru exprimující transportéry léčiva přežívá chemoterapii a repopuluje nádor.
- získaná rezistence - kmenová buňka exprimující transportéry přežívá terapii, kdežto komitované buňky hynou. Mutací pak vzniká v populaci přežívajících kmen. buněk rezistentní fenotyp.
- Vnitřní rezistence – jak kmen. buňky tak různě diferencované buňky jsou dědičně rezistentní, takže terapie má malý efekt.

Determinanty dodání léku do cílového místa



Determinanty působení léku v cílovém místě



Neonkogenní a onkogenní léková rezistence

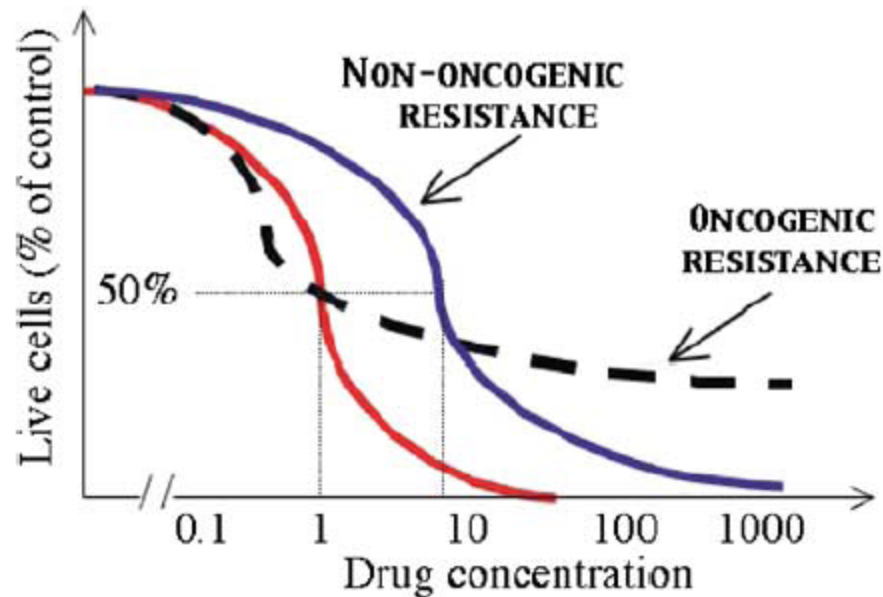


Figure 1 Nononcogenic and oncogenic drug resistance. Conventionally, drug resistance is measured by a drug concentration that inhibits cell growth and survival by a certain percent. For example, IC_{50} is a concentration that causes 50% decrease in cell survival (e.g. in drug-sensitive cells (red line), 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

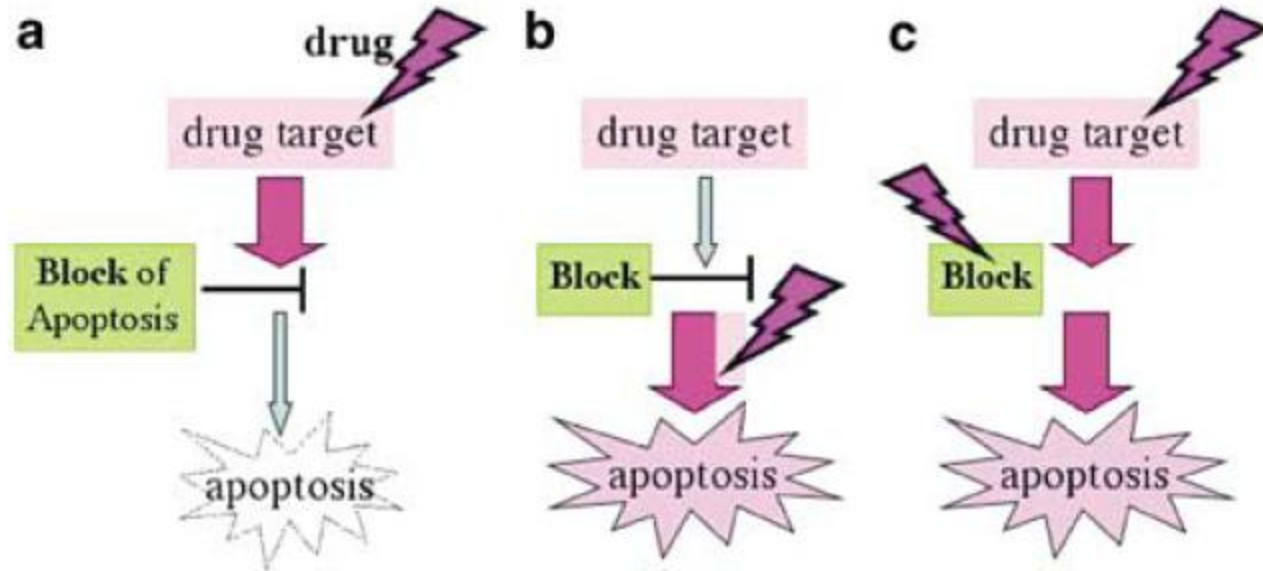


Figure 2 Two ways to overcome oncogenic resistance. **(a)** Oncogenic resistance. Inhibitors of apoptosis (block of apoptosis) prevent cell death, even though anticancer drug engage its target (e.g. microtubules, topoisomerases, DNA). **(b)** Targeting apoptotic pathways downstream of the block. **(c)**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

Antiangiogenní terapie

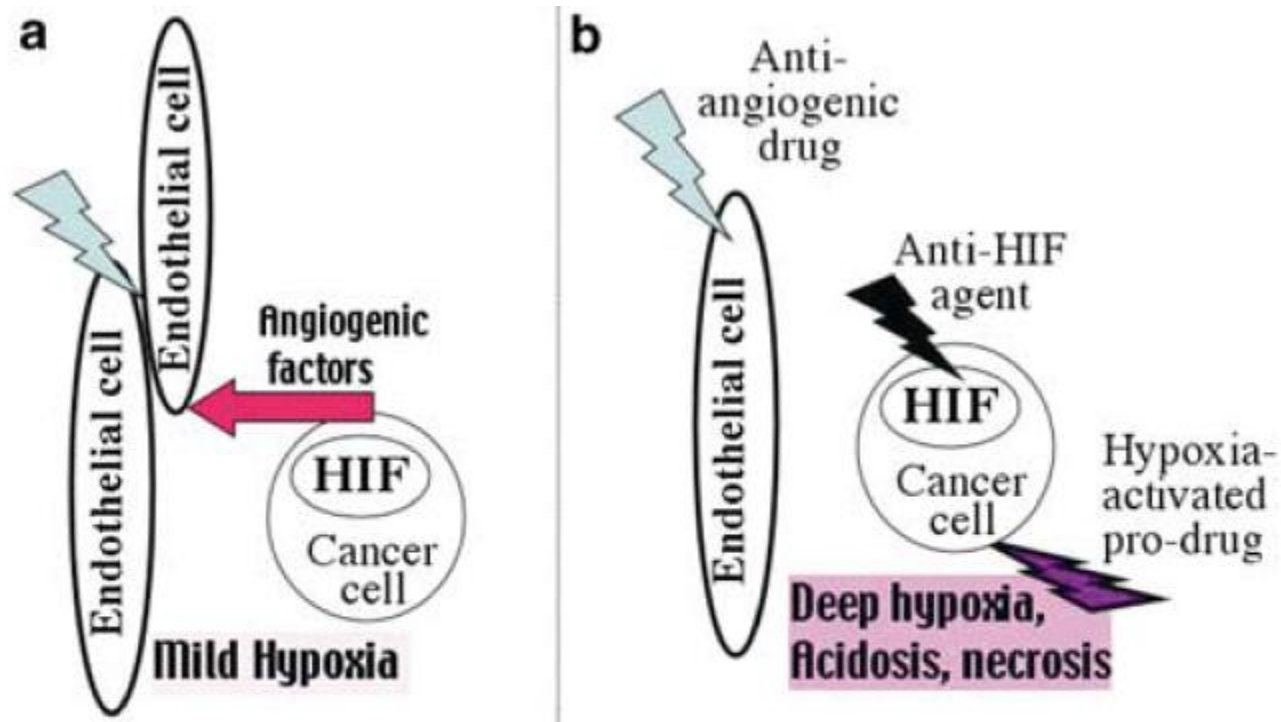


Figure 6 Antiangiogenic therapy. (a) Targeting endothelial cells causes a HIF-dependent response. Sensing hypoxia, cancer cells stimulate angiogenesis. (b) A combination of antiangiogenic and anti-HIF agents may cause profound anoxia and cancer cell death, which could be further enhanced by anoxia-activated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

Cílená proti tvorbě nových cév v nádoru (proti endoteliálním buňkám). Výhodná kombinace antiangiogenních a antihypoxických látek posiluje smrt nádorových buněk.

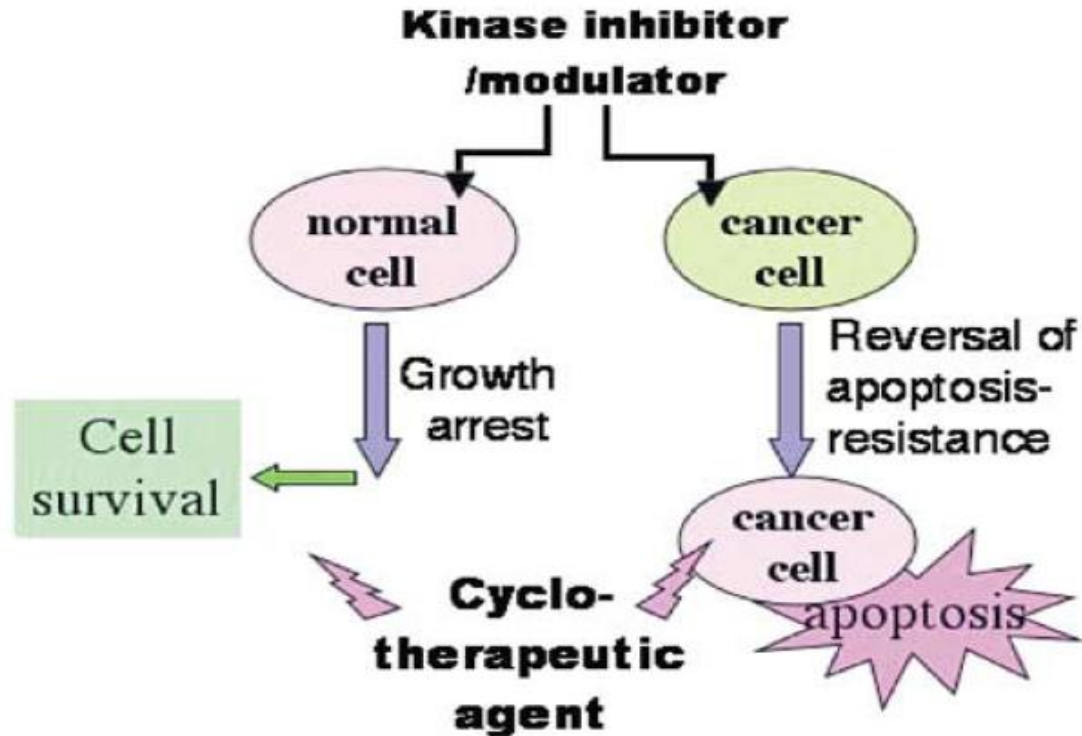


Figure 5 Cyclotherapy. Initially, a normal cell is apoptosis prone, whereas a cancer cell is apoptosis reluctant and resistant to cyclotherapeutic agent. A modulator such as a kinase inhibitor reverses resistance of cancer cells (see Figure 2c). Simultaneously, cells with normal cell cycle control are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

Modulací pomocí inhibitorů kináz se stává nádorová buňka citlivá k apoptóze. Zároveň je normální buňka zastavena v buněčném cyklu a chráněna před účinky léčiva.

Liposomy a genová terapie

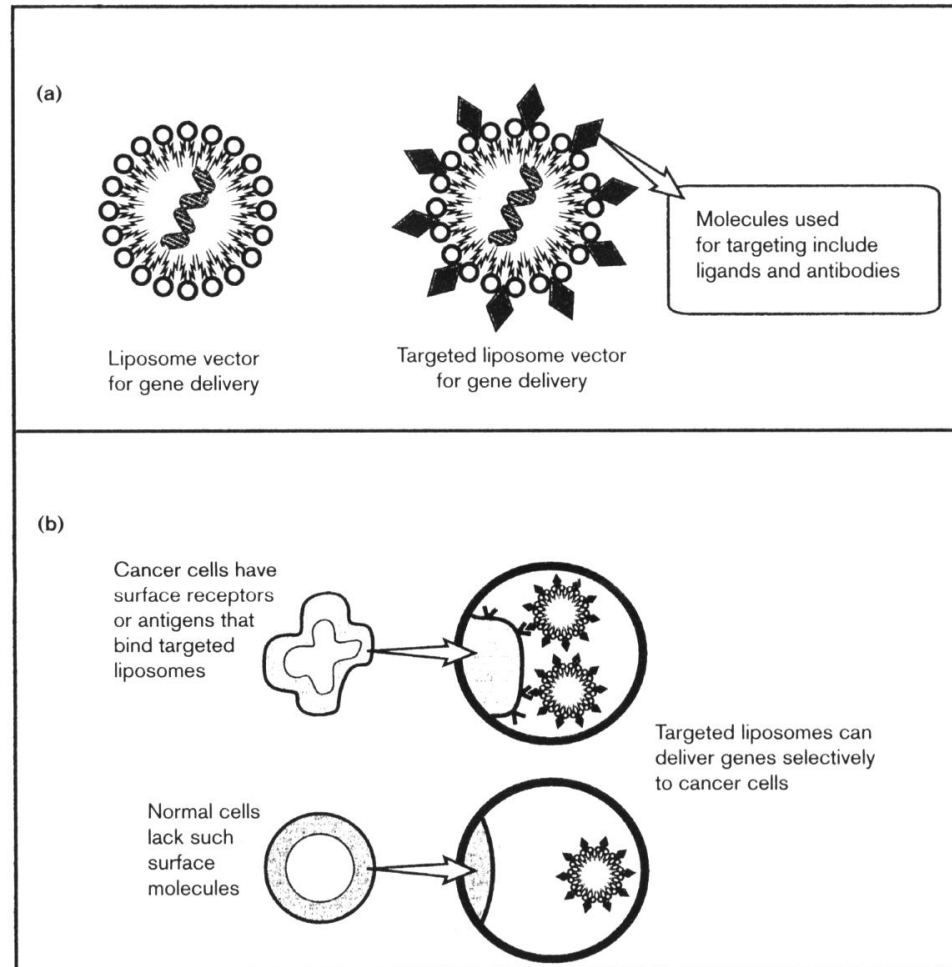
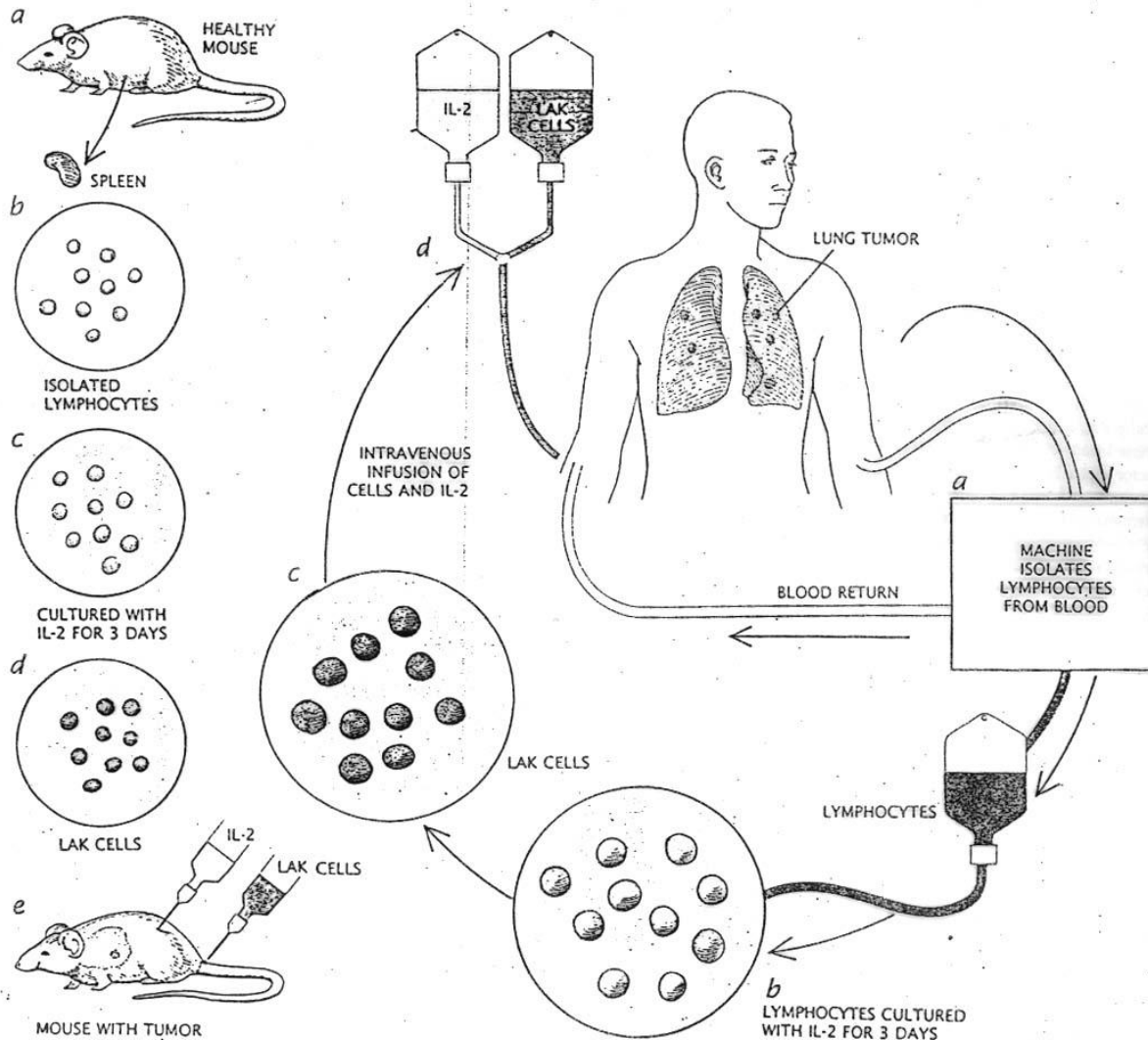


Figure 3. (a) Liposomes for gene therapy. (b) Targeting gene delivery via cellular receptors.

Liposomy jsou využívány k cílenému dodání látky k nádorovým buňkám (majícím příslušné povrchové receptory či antigeny).

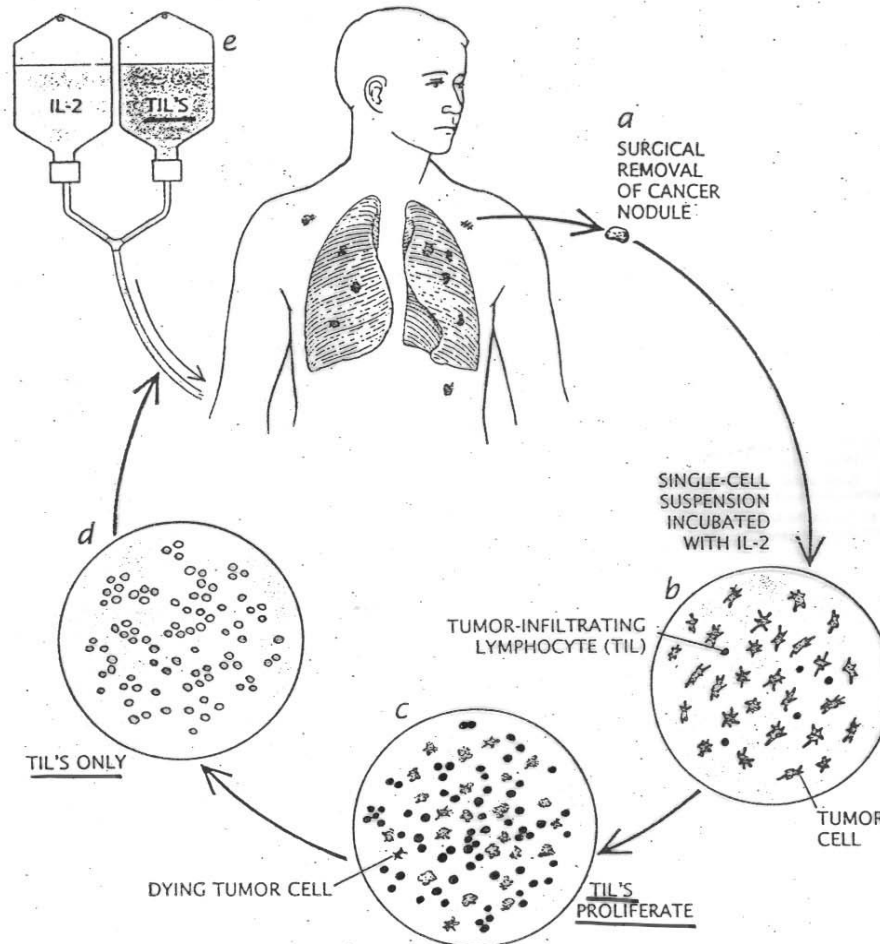
Využití LAK (lymphokine-activated killer) buněk v protinádorové terapii



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 represí 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.

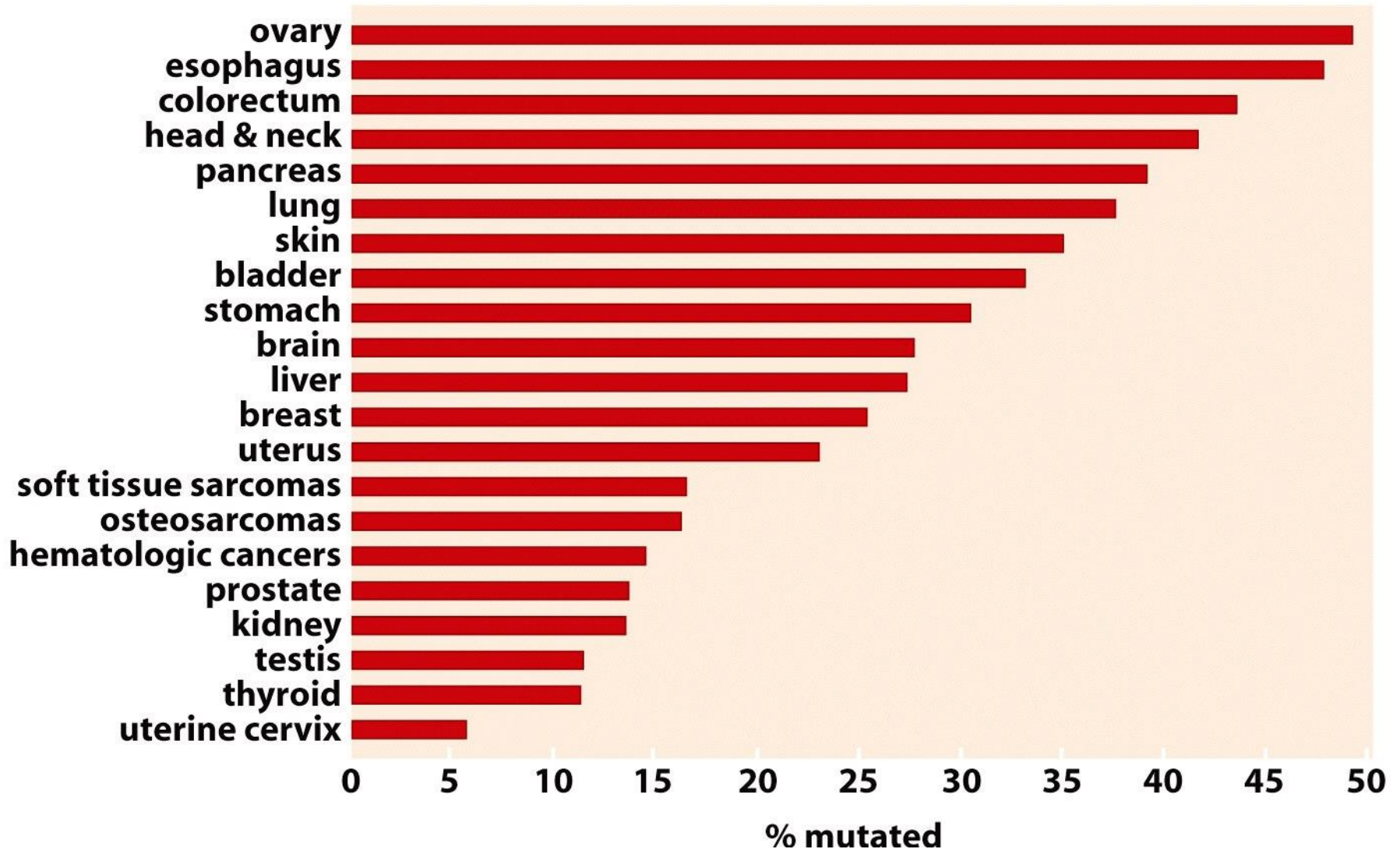
Ukazuje se, že účinky změněného statusu p53 na chemosenzitivitu závisejí na buněčném kontextu.

Porucha funkce p53 u normálních buněk může spíše zvyšovat než snižovat chemosenzitivitu.

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

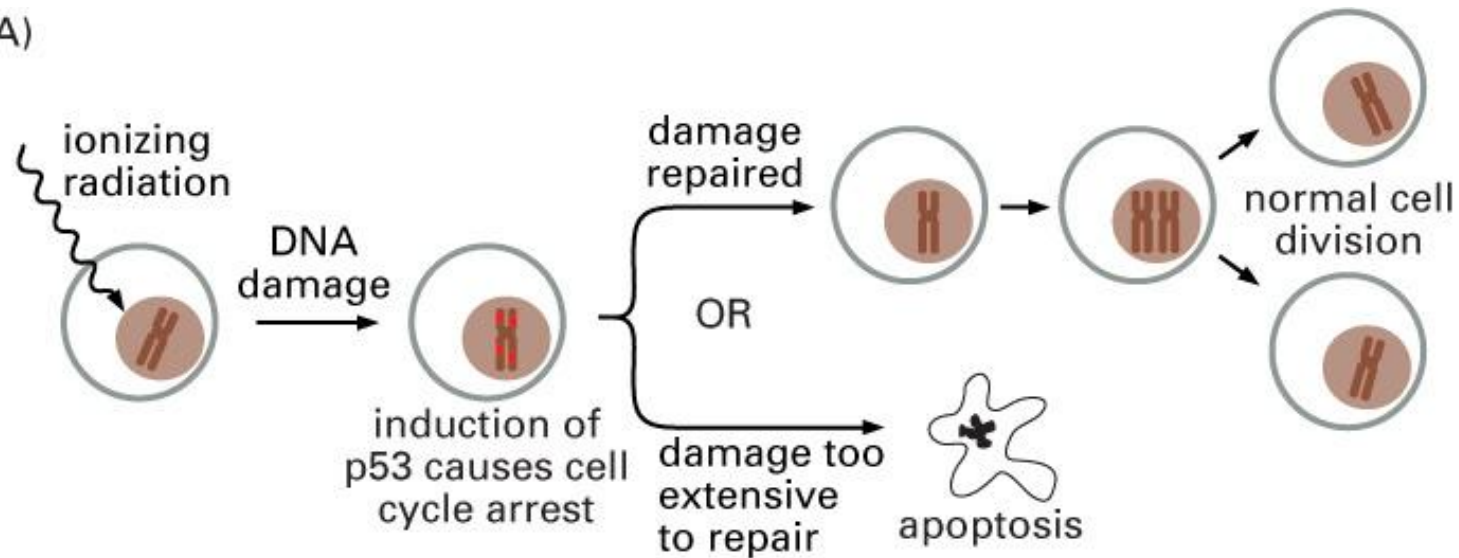
Frekvence mutovaného p53 u různých typů nádorů

TP53 mutation prevalence (as recorded in the IARC Database, R7)



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

(A)



(B)

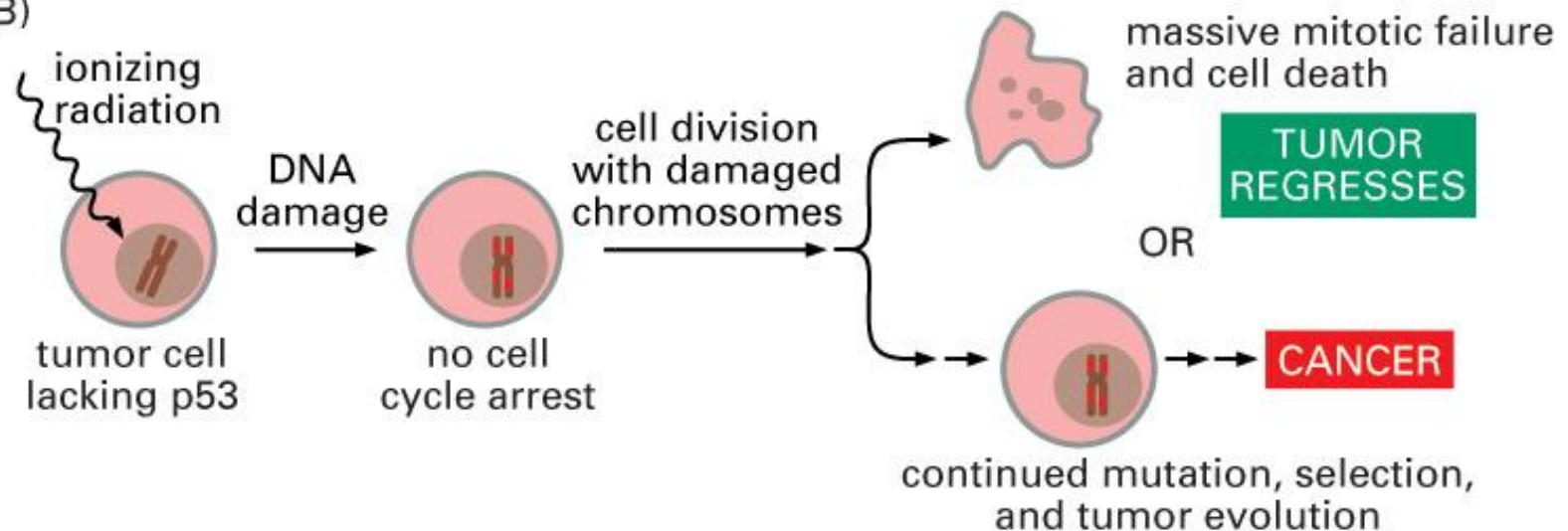


Figure 23-43. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Přežívání u nádorů s různým statusem p53

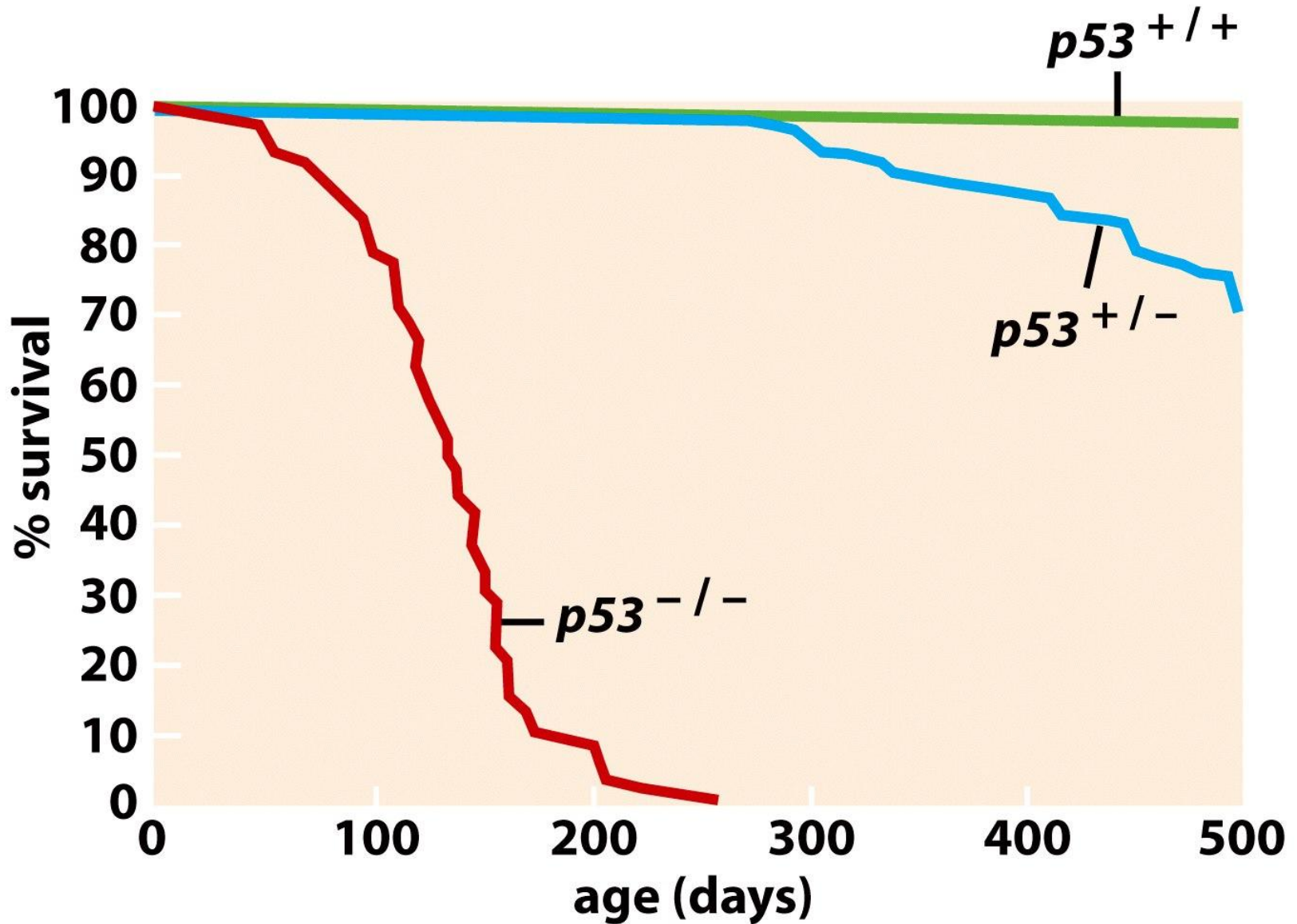


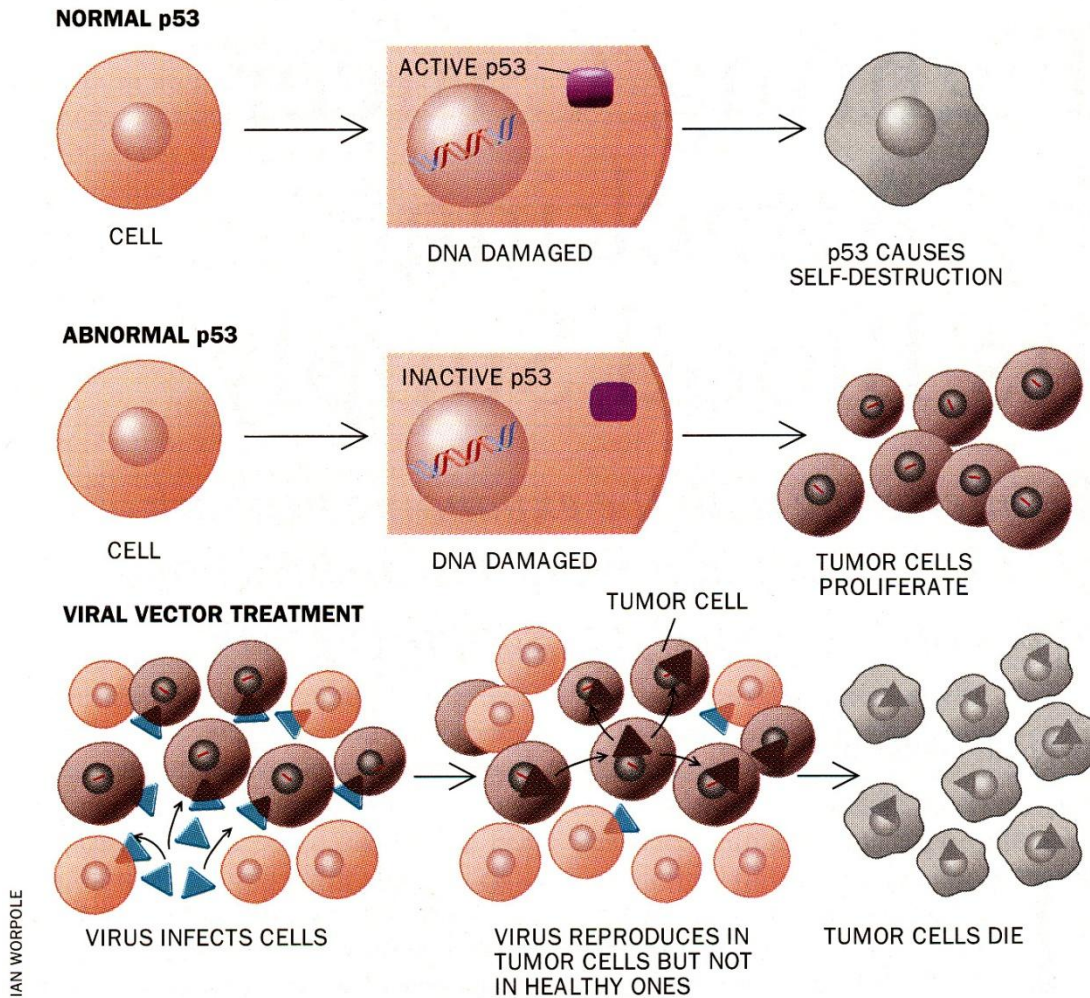
Figure 9.5 *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

Cílové geny působení p53 a jejich funkce

Table 9.2 Examples of p53 target genes according to function The expression of genes in this table is induced by p53 unless otherwise indicated.

Class of genes	Name of gene	Function of gene product
p53 antagonist Growth arrest genes	<i>MDM2/HDM2</i>	induces p53 ubiquitylation
	<i>p21^{Cip1}</i>	inhibitor of CDKs, DNA polymerase
	<i>Siah-1</i>	aids β -catenin degradation
	<i>14-3-3σ</i>	sequesters cyclin B–CDC2 in cytoplasm
DNA repair genes	<i>Reprimo</i>	G ₂ arrest
	<i>p53R2</i>	ribonucleotide reductase—biosynthesis of DNA precursors
	<i>XPE/DDB2</i>	global NER
	<i>XPC</i>	global NER
	<i>XPG</i>	global NER, TCR
	<i>GADD45</i>	global NER ?
	<i>DNA pol κ</i>	error-prone DNA polymerase
Regulators of apoptosis	<i>BAX</i>	mitochondrial pore protein
	<i>PUMA</i>	BH3-only mitochondrial pore protein
	<i>NOXA</i>	BH3-only mitochondrial pore protein
	<i>p53AIP1</i>	dissipates mitochondrial membrane potential
	<i>Killer/DR5</i>	cell surface death receptor
	<i>PIDD</i>	death domain protein
	<i>PERP</i>	pro-apoptotic transmembrane protein
	<i>APAF1</i>	activator of caspase-9
	<i>NF-κB</i>	transcription factor, mediator of TNF signaling
	<i>Fas/APO1</i>	death receptor
	<i>PIG3</i>	mitochondrial oxidation/reduction control
	<i>PTEN</i>	reduces levels of the anti-apoptotic PIP ₃
	<i>Bcl-2</i>	(repression of) its expression
<i>IGF-1R</i>	(repression of) its expression	
Anti-angiogenic proteins	<i>IGFBP-3</i>	IGF-1–sequestering protein
	<i>TSP-1</i> (thrombospondin)	antagonist of angiogenesis

Využití funkce p53 proteinu k selektivní likvidaci nádorových buněk pomocí geneticky modifikovaného viru



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 ones. In principle, the virus would move unchecked only through tumor cells, killing them.

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

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

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 – plořidita, vyřhodnocování % 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. Nepřiliš 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

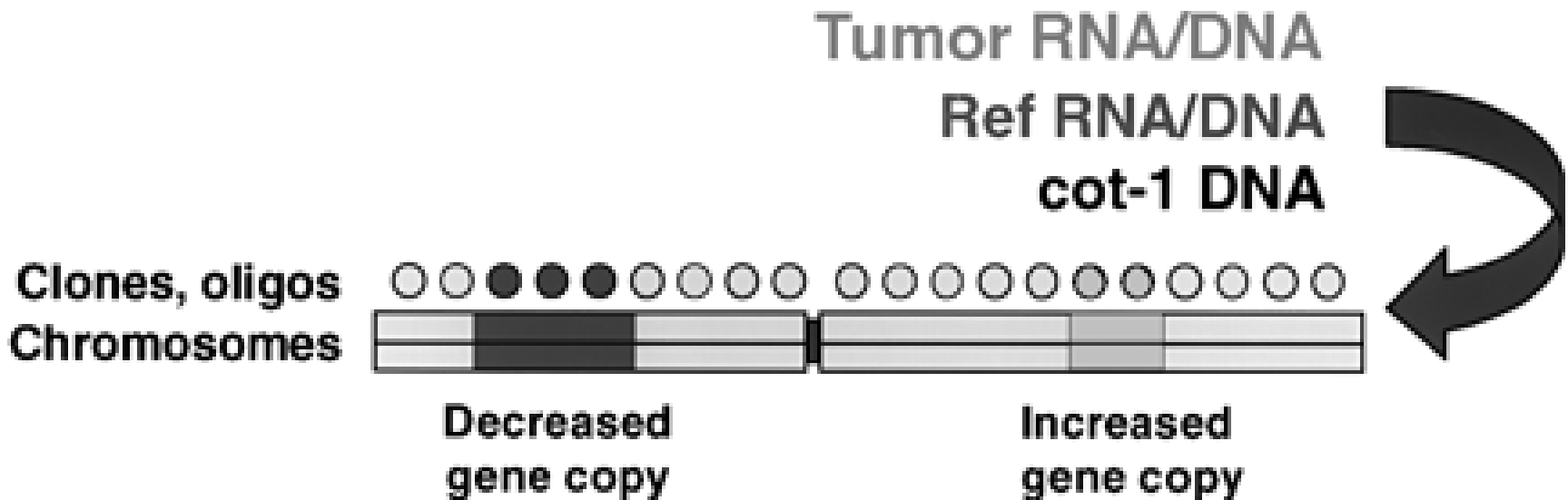
Markery neproliferujících a klidových buněk: statin

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

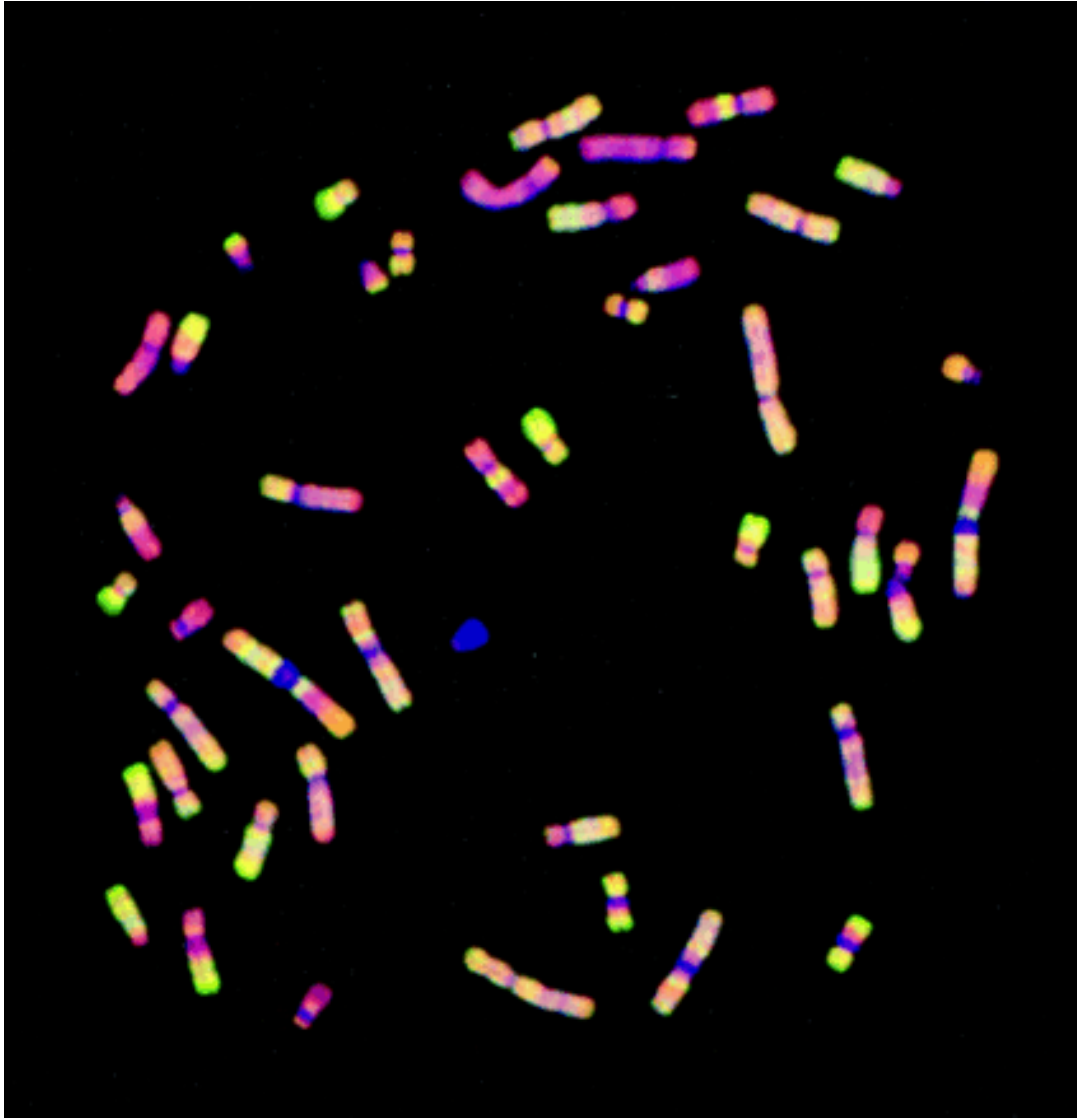
Srovnávací genomová hybridizace a expresní microarray analýza

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

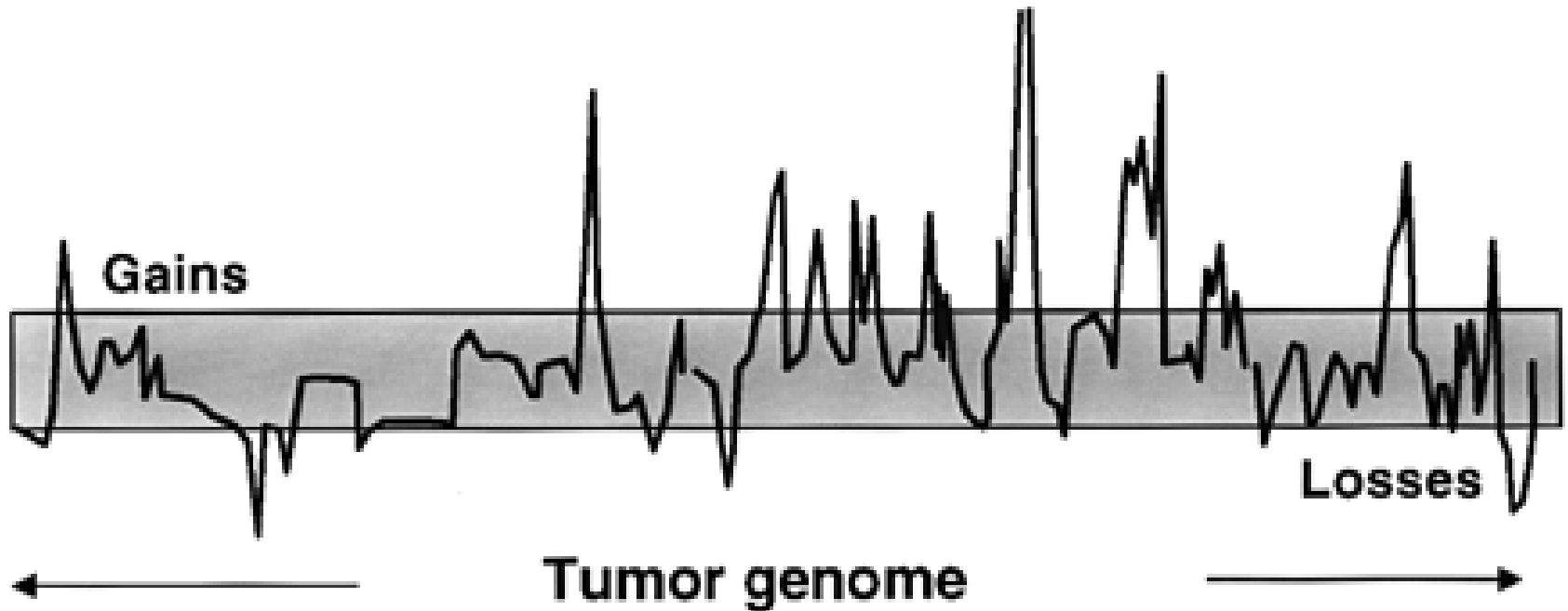


CF7 DNA was labeled green and normal reference DNA was labeled red.

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.

Hodnocení dat – vícerozměrné analýzy

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

Bioinformatika – data z „array“ analýz (DNA, proteiny), lipidomická data

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

Biomarkery, „surrogate biomarkers“ – „náhradní“ biomarkery

Patří mezi ně:

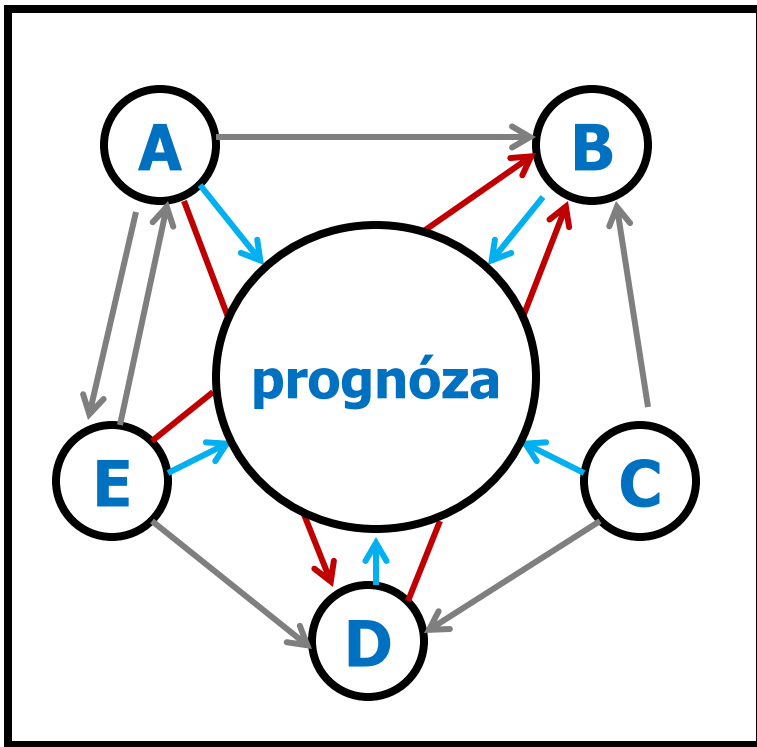
- důležité genetické a cytogenetické markery,
- exprese významných regulačních genů,
- aktivity enzymů,

- cytokinetické parametry,
- parametry angiogeneze, atd.

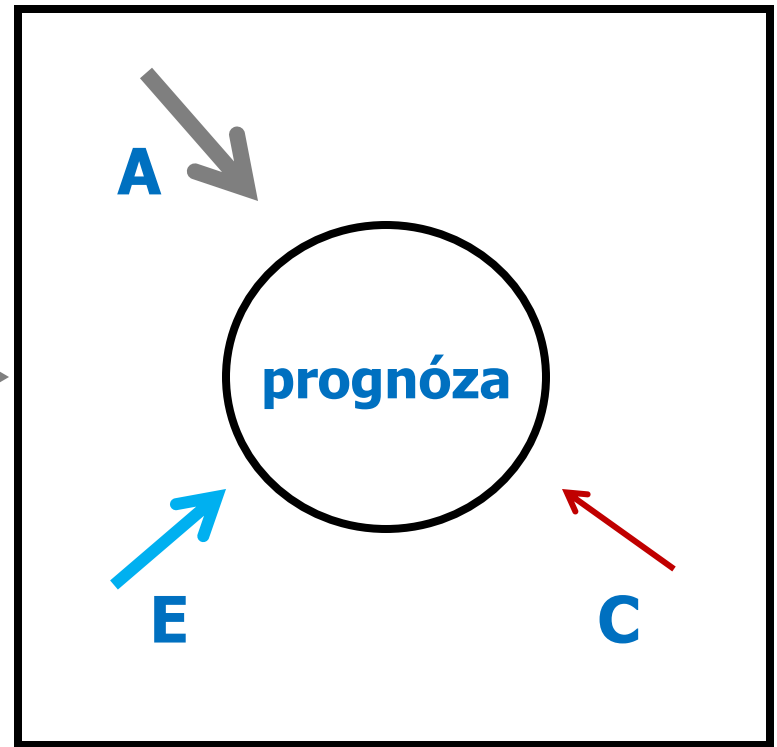
Vyšetření na chemorezistenci v testech *in vitro* (MTT test) a související znaky (exprese MRP, PGP).

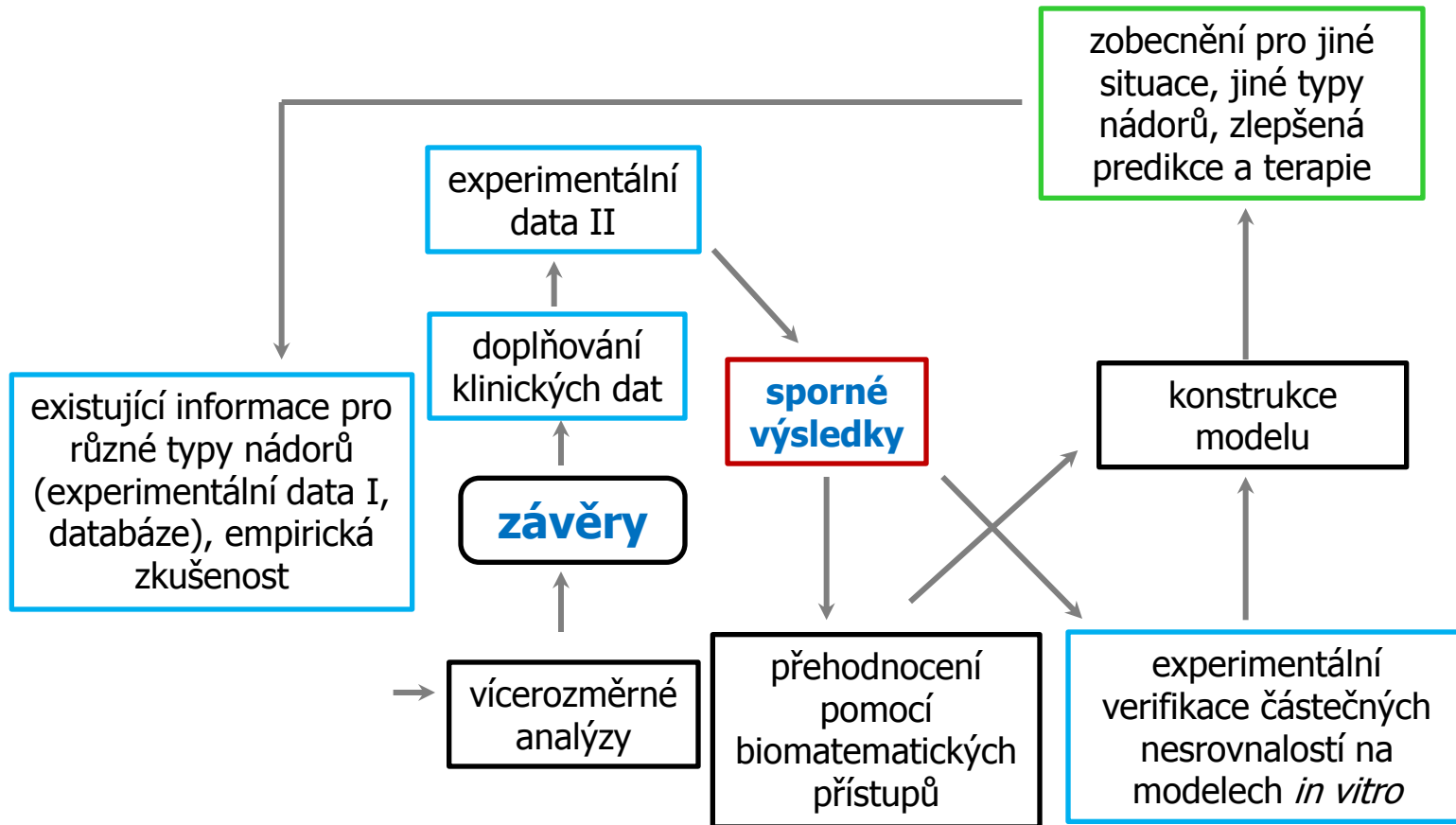
Doplňují standardní klinická vyšetření a nespecifické ukazatele imunologického a fyziologického stavu pacienta.

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



multi-
variační
analýza





Výukovou pomůcku zpracovalo Servisní středisko pro e-learning na MU

<http://is.muni.cz/stech/>

Technické řešení této výukové pomůcky je spolufinancováno Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ