

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

Přednášející:

Mgr. **Pavel Bouchal**, Ph.D. (bouchal@chemi.muni.cz,
bouchal@mou.cz)

-proteomika, nádorová biochemie, organizační zajištění

Mgr. **Roman Hrstka**, Ph.D. (hrstka@mou.cz)

-biologie nádorové buňky, genomika

MUDr. **Petr Müller**, Ph.D. (muller@mou.cz)

-genová terapie, proteinové inženýrství, farmakologie

MUDr. **Rudolf Nenutil**, CSc. (nenutil@mou.cz)

-patologie

RNDr. **Bořivoj Vojtěšek**, DrSc. (vojtesek@mou.cz)

-exprese a purifikace proteinů, protilátky, spolupráce a kariéra ve vědě

Lidský genom...



Sekvenace: kompletní

Anotace: kompletní, nikoliv však definitivní

Funkce genových produktů a regulace exprese: ve výzkumu

Evoluce, výměna genetické informace a dělení miliard buněk během života organismu: probíhá

...a karcinogeneze

Karcinogeneze: vyvolána poškozením genomu

KARCINOGENEZE

Multifaktoriální a vícestupňový proces

- Fyzikální karcinogenní faktory
 - Chemické karcinogeny
 - Biologické karcinogenní faktory
 - Konstituční karcinogenní faktory
- } mutace DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a/nebo inaktivaci antionkogenů

Reparační mechanismy

- fungují → oprava DNA
- nefungují

pak buď
→ apoptóza

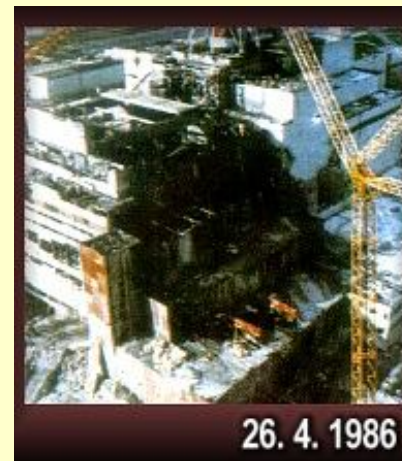
nebo
→ šíření mutací do dalších buněčných generací → karcinom

Fyzikální karcinogenní faktory: Radiační vlivy

- Ionizující záření
korpuskulární (částicové): α , β
elektromagnetické: γ , rtg
- UV záření

Ionizující záření:

- Chromosomální aberace: nestabilní (letální) vs. stabilní (přenášející se do dalších buněčných generací)
- Účinek záleží na dávce a době působení
- Nejohroženější: lymfatická tkáň
- Latence – různá – Hirošima:
leukémie ~ 8 let
ca. plic a BrCa: ~12-18 let



Přeživší z Hirošimy:

1 Sv... chromosomální aberace u 10% buněk

5 Sv... chromosomální aberace u 50% buněk

limit pro pracovníka se zářením **50 mSv/rok**

přírodní radiační pozadí občana ČR 2,5 až 3 mSv/rok

přírodní radiační pozadí občana Kerali v Indii 17 mSv/rok

přírodní radiační pozadí občana Guapari v Brazílii 175 mSv/rok (horniny)

přírodní radiační pozadí občana Ramsaru v Iránu 400 mSv/rok (horniny)

RTG střev 4 mSv

RTG žaludku 2,4 mSv

RTG kyčlí 1,7 mSv

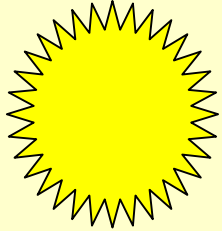
pracovník JE Dukovany obdrží 0,4 mSv/rok

obyvatelstvo v okolí JE Dukovany obdrží 0,005 mSv/rok

3 lety nadzvukovým letadlem Praha - USA 0,38 mSv/rok

SÚJB – osobní „účty“ ozáření

Fyzikální karcinogenní faktory: Radiační vlivy



UV záření

- tvorba pyrimidinových dimerů => eliminace => apyrimidinová místa
- jedno- a dvouřetězcové zlomy, spojování řetězců
- tvorba volných radikálů $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_3^-$
- adaptace na UV: pigmentace

→ aktivace onkogenů/deaktivace antionkogenů

→ ? karcinom

Fyzikální karcinogenní faktory: Mechanické vlivy



- Jednorázové mechanické poškození tkáně - v žádném případě není prokázána souvislost s karcinogenezí
- Karcinogeneze vyvolaná dlouhodobým působením (implantáty) prokázána u některých druhů zvířat, u jiných nikoliv (pravděpodobně iritace a indukce proliferace – promoční charakter)



Chemické karcinogeny

Vždy mutageny

Mechanismus účinku: elektrofilní látky – chemická reakce s DNA, RNA

Přímé (ultimátní) karcinogeny

- **alkylační** látky (cytostatika – cyklofosfamid, chlorambucil, busulfan nitrosurea, ...)
- **acylační** látky (1-acetyl-imidazol, dimethylsulfát, ...)

Prokarcinogeny (=proximální karcinogen) -> intermediární karcinogeny
-> finální (terminální) karcinogeny

- aromatické uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy, produkty plísní (aflatoxin), kovy (Cr, Ni, Co), As, azbest, insekticidy, fungicidy, ... viz tabulka

Hlavní skupiny (pro)karcinogenů

Skupina	Látka (příklady)	Postižený orgán, typ nádoru	Latence (roky)	Výskyt
Polycyklické aromatické uhlovodíky	3-metylcholantren, benzantracén, benzpyren, dibenzantracén atd.	Plíce, hrtan, kůže, močový měchýř (Ca)	9–20	Uhelný, cigaretový dehet, asfalt, roštované maso, uzené maso a ryby
		Terminální karcinogen: diol-epoxid		
Aromatické aminy, amidy, azo-barviva	Auramin, benzidin, α -, β -naftylamin, 4-aminodifenyl, 4-nitrodifenyl, dimethylaminoazobenzen	Močový měchýř, ureter, ledvina, játra (Ca)	13–30	Anilinové a potravinářské barvy (máslová žlut), gummy
		Terminální karcinogen: 2- amino-1-naftol		
Nitrozoaminy	Ultimátní karcinogen: dimethyl-nitrozoamin N-methyl-nitrozoamin N-etyl-nitrozourea N-methyl-nitrozouretan N-methyl-nitrozoguanidin	Játra, hrtan, plíce, žaludek, jícn (Ca)	10–20	Vznik v organismu z prokarcinogenu nitráty, nitrity (umělá hnojiva), rychlené uzeniny, rybí maso, atd.
		Terminální karcinogen: totožný s ultimátním		
Produkty rostlin a mykotoxiny	Alfatoxin (Aspergillus flavus) Islandotoxin (Penicillium Islandicum)	Játra (Ca)	2–5	Plíseň na zvlhlém obilí, luštěninách, arašidech, siláži atd.
		Terminální karcinogen: 2,3-dihydroxy-aflatoxin (2,3-epoxid)		
Kovy	Chrom Nikl Kobalt	Nosní dutina. Paranasální dutiny. Larynx, plíce (Ca, Sa)	15–25	Chromování. Výroba sklářská, acetylenu, linolea, autobaterií atd.
Jiné	Arzen	Kůže, plíce, játra, paranazální dutiny, močový měchýř (Ca)	10+	Hutnictví, svářectví, dřevařský průmysl
	Vinylchlorid	Játra (Ca)	20–30	Výroba plastů
	Benzen	Kostní dřev (LE)	6–14	Výroba výbušnin, lepidel, obuvi
	Azbest	Plíce, pleura, peritoneum (Ca, Sa, mezoteliom)	4–50	Výroba azbestových textilií, obkladů

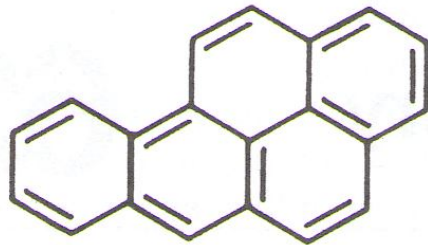
Enzymy odpovědné za karcinogenezi

E

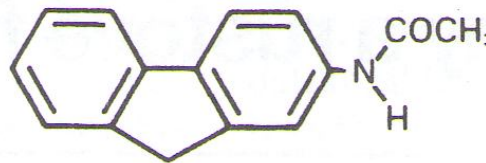
E

Prokarcinogen → intermediární karcinogen → terminální karcinogen

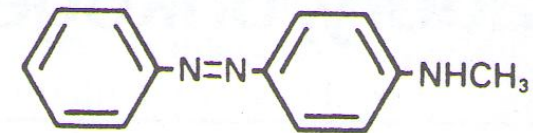
- **Monooxygenasy** ze systému **cytochromu P-450 (CYP)** (metabolismus xenobiotik – léčiv a škodlivin z vnějšího prostředí – funkčně heterogenní skupina)
- **Hydroxylasa aromatických uhlovodíků (cytochrom P-448)**



Benzo [a] pyren



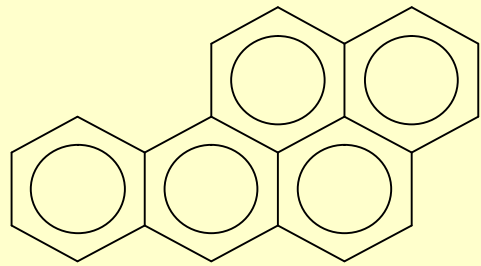
2-Acetaminofluoren



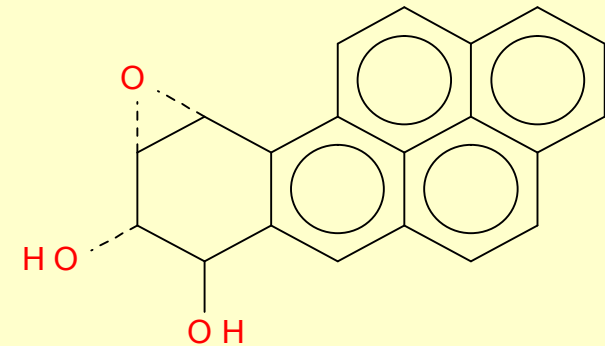
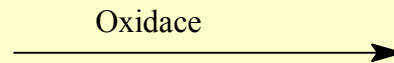
N-Methyl-4-aminoazobenzen

Obr. 62-1. Struktura 3 důležitých experimentálně užívaných chemických karcinogenů.

Enzymy odpovědné za karcinogenezi: tvorba vysoce reaktivních epoxidů



Benzo[a] pyren



7,8-Diol-9,10-epoxy benzo[a]pyrenu

silné kancerogeny

Metabolická přeměna benzo[a]pyrenu hydroxylasou aromatických
uhlovodíků (cytochrom P-448)

Vícestupňový účinek chemických karcinogenů

Typický příklad:

iniciační agens: benzo[a]pyren

promoční agens: forbolové estery v krotonovém oleji,
např. terpen (=kokarcinogen)

Testování mutagenity: Amesův test

- kmen *Salmonella typhimurium* s mutací v genu enzymu zapojeného do syntézy His (His⁻)
- další mutace testovaným mutagenem:

?

His⁻ → His⁺

- mutovaný kmen je schopen růstu na médiu bez His
- problém: bakterie nemají monooxygenasy (simulace metabolické aktivace prokarcinogen → terminální karcinogen) – řešení: inkubace látky se supernatantem S-9 krysích jater
- schopnost detekce 90% známých karcinogenů

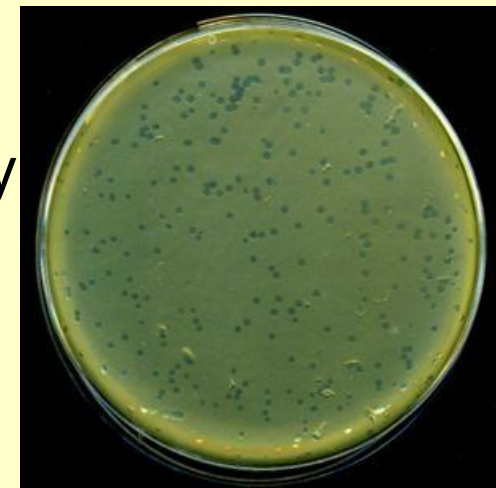


Kolonie *S. typhimurium*



Testování mutagenity *in vivo*

- Transgenní myším, v jejichž genomu je inkorporován bakteriofág λ nesoucí *lacI* gen, je podávána testovaná látka
- Po určité době je fág aktivován
- Fágové částice vneseny do *E. coli*
- Produkt *lacI* je represorem β -galaktosidasy, mutovaný produkt není funkční
- β -galaktosidáza štěpí analog laktosy X-gal za vzniku modrého zbarvení
- látka je mutagenní ... \rightarrow ... modré plaky
- látka není mutagenní ... \rightarrow ... bílé plaky



Látky ve stravě a kancerogeneze

Tab. 1.5.4 Vliv diety na karcinogenezi v semikvantitativním hodnocení

SKUPINA A LÁTKA	RIZIKO TRANSFORMACE	
	Zvyšuje:	Snižuje:
CELKOVÝ PŘÍRUS A VÝMĚNA ENERGIE:		
Obezita – vysoký BMI	◆◆◆	
pohybová aktivita		◆◆◆
CHEMICKY DEFINOVANÉ SLOŽKY STRAVY:		
základní nutrienty:		
jednoduché cukry	◆	
komplexní cukry		◆◆
tuky	◆◆◆◆	
vitaminy a minerály:		
karotenoidy		◆◆◆
vitamin C		◆◆◆
vitamin E		◆
selen		◆
fytochemikálie např.:		
allium (cibule, česnek), saponiny (soja) atd.		◆◆
KOMPLEXNÍ POTRAVINY A NÁPOJE:		
maso červené	◆◆◆	
vejce, mléko	◆	
zelenina		◆◆◆◆
ovoce		◆◆◆
alkohol	◆◆◆◆	
UCHOVÁNÍ A PŘÍPRAVA POTRAVIN:		
konzervace solením – kuchyňská sůl	◆◆◆	
konzervace uzením	◆◆	
konzervace zmrazováním		◆◆
Úprava – grilování, smažení	◆◆	

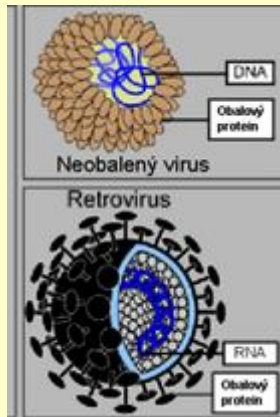
Biologické karcinogenní faktory: Virová transformace

Živé příčiny: viry

Helicobacter pylori – spojován s ca. žaludku

10% v současné době popsaných virů má onkogenní charakter, nádory i při prokázaném virovém původu však nelze považovat za infekční v pravém slova smyslu – mechanismus, hostitelské předpoklady

RNA viry x DNA viry



Retroviry= RNA-viry s reverzní transkriptázou

Retroviry obecně:

- transformující => vznik nádoru, nebo
- netransformující (chybí informace pro maligní přeměnu, bez cytopatického efektu)
- výjimečně způsobuje i nenádorové onemocnění – HIV (infekce lymfocytů)

Nesou

- strukturní a funkční geny
- reverzní transkriptázu
- LTR (long terminal repeat) úseky s funkcí promotoru a enhanceru – regulující transkripci v hostiteli (DNA → mRNA)

3 mechanismy transformace retroviru

- **silně onkogenní vir** - nese přímo onkogen (**v**-onc = virový onkogen, např. **v**-src, **v**-ras vs. **c**-ras)
- **slabě onkogenní vir**, nemusí obsahovat v-onc, transformuje prostřednictvím LTR inzerovaného v sousedství celulárního protoonkogenu (p-onc)
- vir nese **gen-tat** kódující protein, který zprostředkovává transaktivaci celulárních onkogenů

Transformace retrovirů: příklady

U člověka prokázána pouze transformace virem HTVL-1 (slabě onkogenní, nenesou v-onc, onemocní 1% nakažených 20-30 let po infekci, leukémie-Japonsko, Karibik, sporadicky)

RNA viry u zvířat:

Tab. 1.5.5 Příklady onkogenů retrovirů

Virus	Hostitel	Nádor	Onkogen
Abelsonův myší leukemický	Hlodavci – myš	leukemie	v-abl
Moloneyův myší sarkomový	Hlodavci – myš	sarkomy měkkých tkání	v-mos
FBJ myšího osteosarkomu	Hlodavci – myš	osteosarkom	v-fos
Rousův sarkomový	Ptáci	sarkomy měkkých tkání	v-src
Ptačí myelocytomatózy	Ptáci	leukemie	v-myc
Ptačí myeloblastózy	Ptáci	myeloblastóza	v-myb
Ptačí erytroblastózy	Ptáci	erytroleukemie	v-erb B
Harveyův potkaní sarkomový	Hlodavci – potkan	sarkomy měkkých tkání	v-H-ras
Kirstenův potkaní sarkomový	Hlodavci – potkan	sarkomy měkkých tkání	v-K-ras
Kočí sarkomový	Kočka	sarkomy měkkých tkání	v-fms
Simian (opičí) sarkomový	Pavián	sarkomy měkkých tkání	v-sis

DNA-onkogenní viry

Nižší transformační potenciál (méně agresivní) než RNA-viry, ale epidemiologicky závažnější

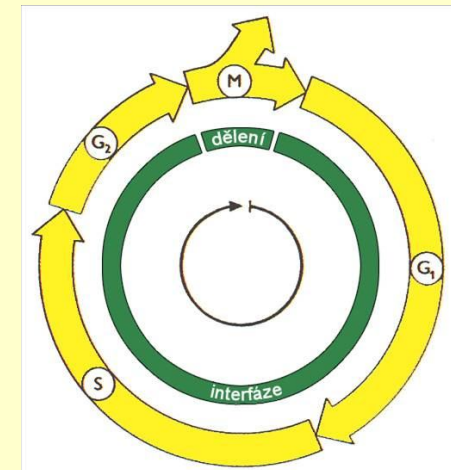
V jádře napadené buňky replikace virové DNA, permanentní přechod buněk z G₀ a G₁ fáze do S fáze

Příklady:

HPV – human papillomavirus (ca. děložního čípku,...) – proteiny E6 a E7: blokáce antionkogenů p53 (E6) a RB1 (E7)

EBV – Epstein-Barrové virus (Burkittův lymfom; mononukleóza)

HBV – hepadnavirus (hepatocelulární ca.; hepatitida B)



Konstituční karcinogenní faktory: protoonkogeny, onkogeny a antionkogeny

celulární protoonkogeny (p-onc) a onkogeny (c-onc)

Aktivace p-onc:

- Inzerční onkogeneze: Inzerce LTR retroviru do sousedství p-onc (inzerce promotoru nebo enhanceru)
- Přestavba chromosomu: Translokace nebo delece vedoucí k přiblížení aktivního promotoru a p-onc
- Bodová mutace: c-H-ras (Gly->Val, N-nitroso-N-methyl močovina)
- Genová amplifikace onkogenu → karyotypické odchylky

Onkogeny → onkoproteiny

Regulační funkce v buněčném dělení a diferenciaci

Antionkogeny: RB1, p53

KARCINOGENEZE

Multifaktoriální a vícestupňový proces

- Fyzikální karcinogenní faktory
- Chemické karcinogeny
- Biologické karcinogenní faktory
- Konstituční karcinogenní faktory

} mutace DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a/nebo inaktivaci antionkogenů

Reparační mechanismy

- fungují → oprava DNA
- nefungují

pak buď
→ apoptóza

nebo

→ šíření mutací do dalších buněčných generací → karcinom



Jakými mechanismy??...
Viz přednáška o signálních dráhách - R.Hrstka

Morfologické změny u transformovaných buněk

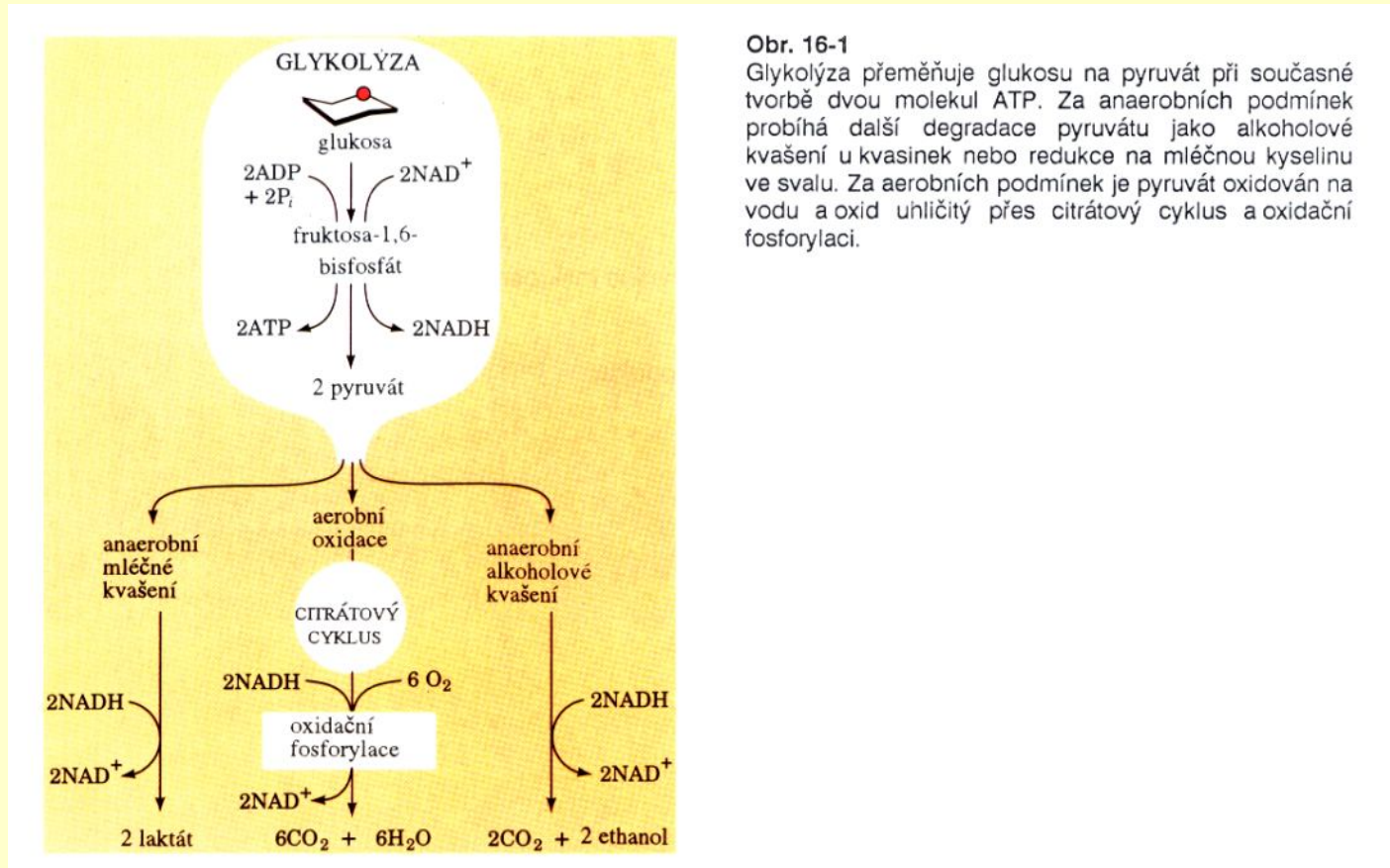
- Změny morfologie: oblejší tvar
- Ztráta závislosti na přichycení
- Ztráta inhibice růstu vzájemným kontaktem
- Změny cytoskeletálních struktur (aktinová filamenta)
- Změny v povrchových antigenech

Biochemické změny u transformovaných buněk

Hypoxie, její příčiny a důsledky

- Rychlý růst nádorových buněk a proto rychlejší metabolismus
- Vyžadují zásobování kyslíkem
- Vyšší hladina hemoglobinu v nádorových buňkách
- Za nedostatku kyslíku může nastat přechod na **anaerobní glykolýzu**, ovlivnění pH (laktát), syntéza enzymů pufrujících pH
- Podpora **angiogeneze** pro lepší zásobování buněk kyslíkem

Změny v metabolismu sacharidů



Obr. 16-1

Glykolýza přeměňuje glukosu na pyruvát při současně tvorbě dvou molekul ATP. Za anaerobních podmínek probíhá další degradace pyruvátu jako alkoholové kvašení u kvasinek nebo redukce na mléčnou kyselinu ve svalu. Za aerobních podmínek je pyruvát oxidován na vodu a oxid uhlíčitý přes citrátový cyklus a oxidační fosforylaci.

Glykolýza – anaer. (katabolismus)

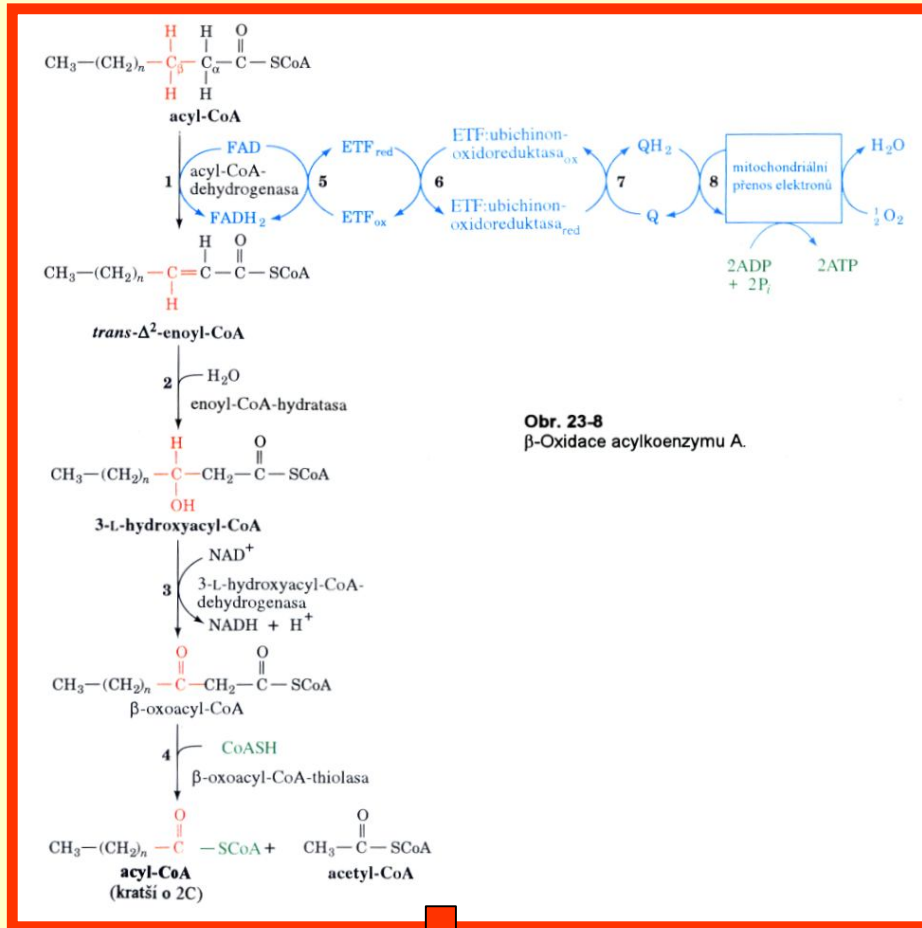
Glukosa



Glukoneogeneze (anabolismus)



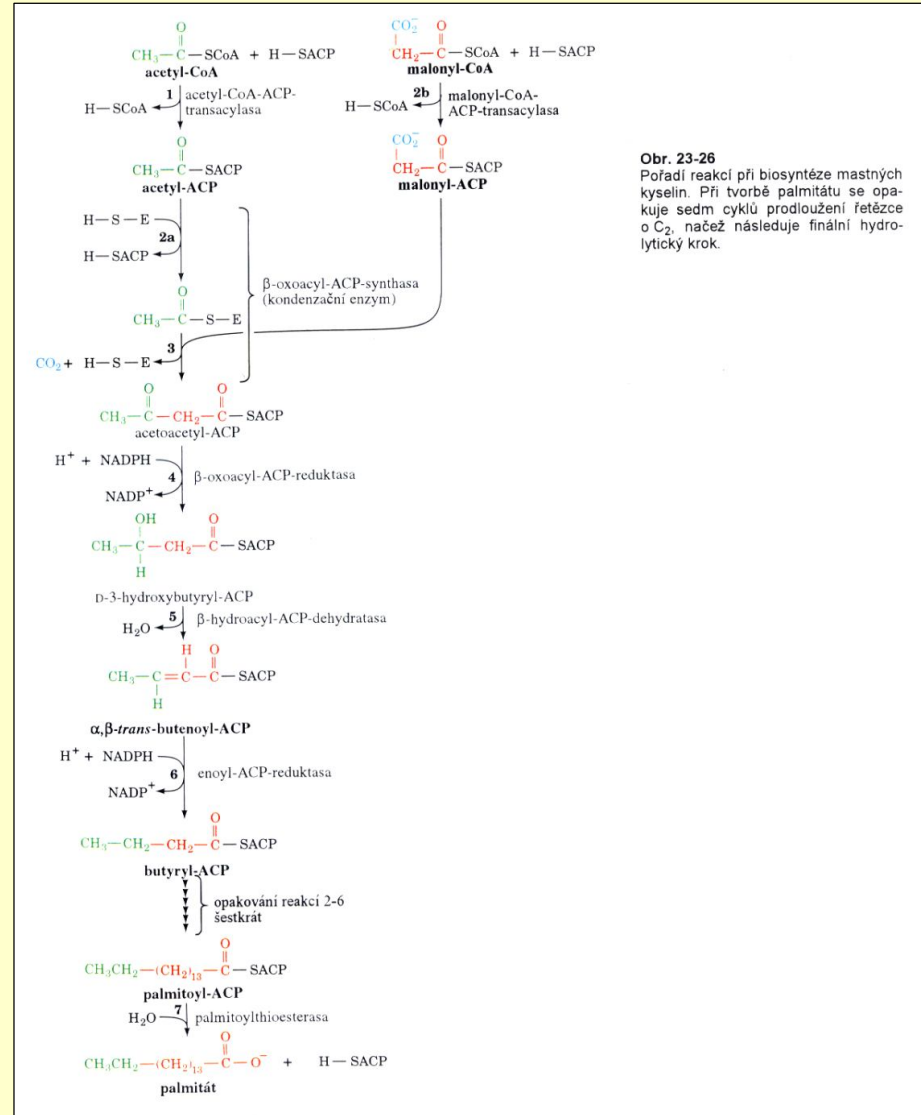
Změny v metabolismu lipidů



Obr. 23-8
β-Oxidace acylkoenzymu A.



Katabolismus

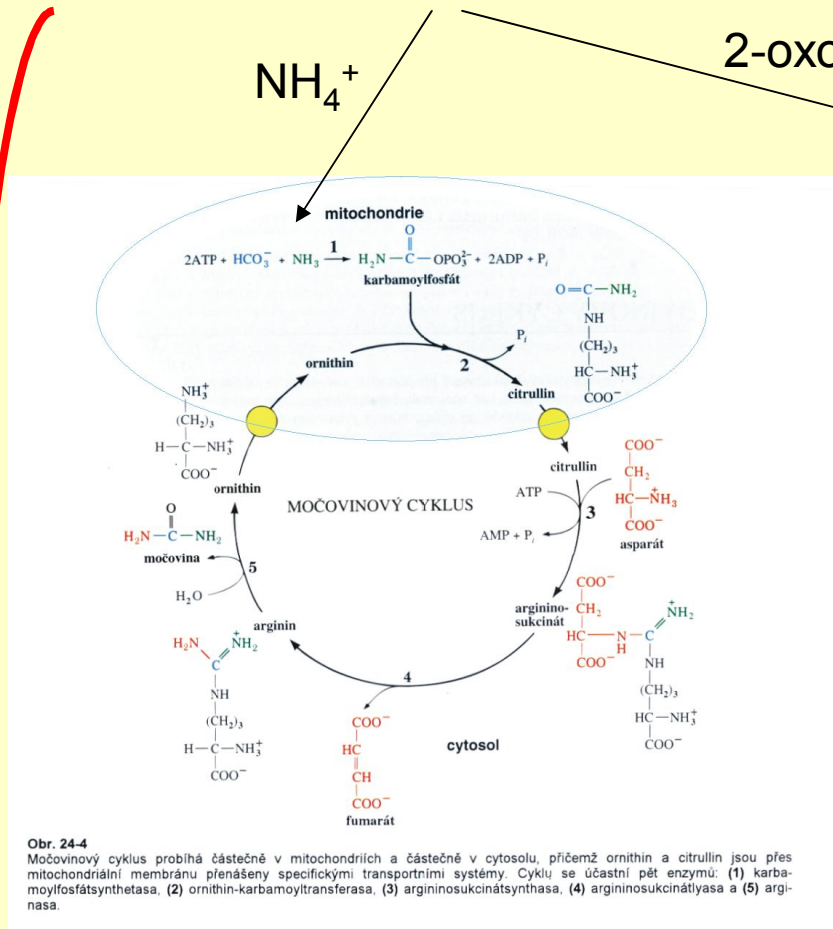


Obr. 23-26
Pořadí reakcí při biosyntéze mastných kyselin. Při tvorbě palmitátu se opakuje sedm cyklů prodloužení řetězce o C₂, načež následuje finální hydrolytický krok.

anabolismus

Změny v metabolismu bílkovin, dusíku a AK

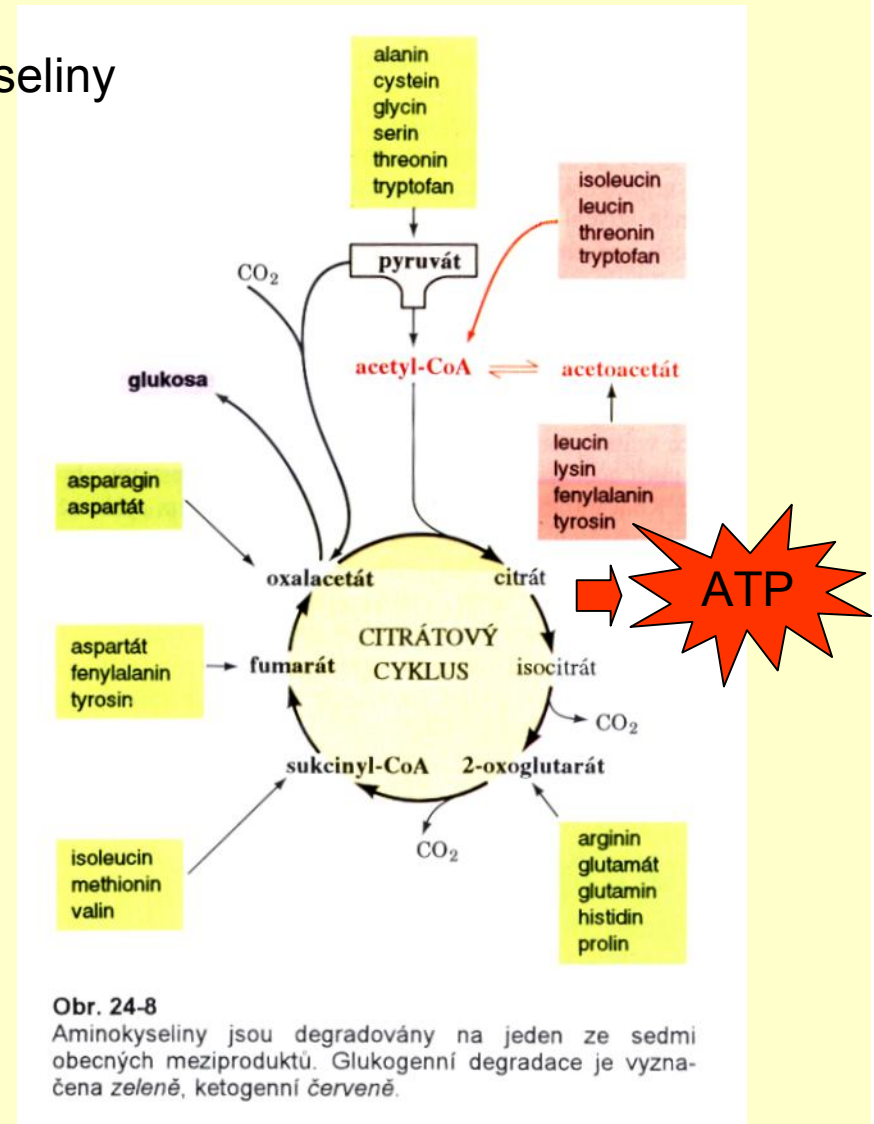
Proteolýza → Transaminace



Obr. 24-4
Močovinový cyklus probíhá částečně v mitochondriích a částečně v cytosolu, přičemž ornithin a citrullin jsou přes mitochondriální membránu přenašeny specifickými transportními systémy. Cyklu se účastní pět enzymů: (1) karbamoylfosfátsynthetasa, (2) ornithin-karbamoyltransferasa, (3) argininosukcinátsynthetasa, (4) argininosukcinátlyasa a (5) argininaasa.

volné AK jako stavební složky nově syntetizovaných proteinů

2-oxokyseliny



Obr. 24-8
Aminokyseliny jsou degradovány na jeden ze sedmi obecných meziproduktů. Glukogenní degradace je vyznačena zeleně, ketogenní červeně.

Další biochemické změny u transformovaných buněk

- Metabolické změny – sekundárním důsledkem obvykle zvýšené proliferace, nelze použít např. k diagnostice
- Zvýšená aktivita ribonukleotidreduktasy
- Zvýšená syntéza DNA a RNA
- Snížený katabolismus pyrimidinů
- Ztráta diferencovaných biochemických funkcí (syntéza specializovaných proteinů)
- Nadměrná syntéza některých růstových faktorů a hormonů

Znalost fenotypových změn u transformovaných buněk je zásadní pro nalezení účinné chemoterapie

Látky užívané v chemoterapii nádorů

Tab. 62–11. Některé léky užívané v chemoterapii nádorů.

Třída látek	Příklad	Místo účinku	Užití v léčbě
Alkylační látky	Melfalan	Alkyluje DNA a ostatní molekuly	Myelom
Antimetabolity Antagonisté purinů	Merkaptopurin	Mění se na „podvodné“ nukleotidy a inhibuje syntézu purinů	Akutní myelocytová leukemie
Antagonisté pyrimidinů	Fluoruracil	Mění se na „podvodné“ nukleotidy a inhibuje thymidylátsynthetasu	Kolorektální karcinom
Antagonisté folátu Protinádorová antibiotika	Methotrexát Doxorubicin	Inhibují dihydrofolátreduktasu Vmežeňuje se do DNA a stabilisuje komplex DNA-topoisomerasa II	Choriokarcinomy Hodgkinova choroba
Ostatní látky	Cisplatina	Způsobuje zlomy v řetězci DNA	Karcinom plic
	Hydroxyurea	Inhibuje ribonukleotid-reduktasu	Chronická myelocytová leukemie
Rostlinné látky	Vinblastin	Váže tubulin a inhibuje tvorbu mikrotubulů	Kaposiho sarkom
Pohlavní hormony	Estrogeny	Blokují efekty androgenů u nádorů prostaty	Rakovina prostaty
Kortikosteroidy	Prednison	Inhibuje proliferaci lymfocytů	Myelom

Mnohé výše uvedené látky jsou užívány s ostatními v kombinované chemoterapii a nejsou nezbytně metodou volby pro indikované případy. Existují též další třídy chemoterapeutických látek, jako jsou modifikátory biologické odpovědi (např. interferony).

Léková rezistence a její příčiny

Tab. 62–13. Některé biochemické mechanismy lékové rezistence nalezené u nádorových buněk.¹

Obecný mechanismus	Lék(y)	Specifický příklad
Snížený vstup Zvýšený výstup Nedostatečná aktivace Zvýšená inaktivace léku	Methotrexát Některé protinádorové léky Cyklofosfamid Cytosinarabinosid	Mutantní přenašečový systém Zprostředkováno P glykoproteinem Snížení aktivujících molekul cytochromu P-450 Zvýšená aktivita deaminas působících na cytosin
Sekvestrace léku Mutace v cílovém enzymu Zvýšení cílového enzymu Rychlý reparační mechanismus	Cisplatina Methotrexát Methotrexát Některé methylační látky	Zvýšení jednoho typu metalothioneinu ² Mutantní DHFR ³ Amplifikace genu pro DHFR ³ Zvýšení specifického reparačního enzymu (O ⁶ -alkylguanin-DNA-alkyltransferasy)

¹Údaje z Hays J. D., Wolf C. R.: Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J.* 1990,**22**:281.

²Metalothioneiny jsou nízkomolekulární cytosolové metalloproteiny, bohaté na cystein, které jsou přítomné ve vysokých množstvích v játrech a ledvinách, které vážou a tím detoxikují různé kovy (např. Zn, Cu, Hg a Cd). Indukují se po expozici těmto kovům.

³DHFR, dihydrofolátreduktasa.

Některé klinicky užívané nádorové markery

Tab. 62–15. Klinicky užitečné nádorové markery.¹

Marker	Nádor
Karcinoembryonální antigen (CEA)	Tlusté střevo, plíce, prs, pankreas
Alfa-fetoprotein (AFP)	Játra, zárodečné buňky
Lidský choriogonadotropin (hCG)	Trofoblast, zárodečné buňky
Kalcitonin (CT)	Štítná žláza (medullární karcinom)
Prostatická kyselá fosfatasa (PAP) ²	Prostata

¹Převzato se souhlasem z McIntire K. R.: Tumor markers: How useful are they? *Hosp. Pract*(Dec) 1984,19:55.

²Měření prostatického specifického antigenu (PSA) je užitečné pro monitorování znovuobjevení nebo přetrvávání rakoviny prostaty po chirurgickém zákroku. Zvýšení PAP obecně indikuje místní rozšíření nebo metastasy.

Literatura k tématu

(současně zdroje obrázků)

- Rejthar A., Vojtěšek B.: Obecná patologie nádorového růstu. Grada Publishing, 2002, str. 67-90.
- Murray R.K., Harperova biochemie. Nakladatelství a vydavatelství H&H, 2002, str. 749-769.