

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Karolína Světlíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sledování exprese vybraných miRNA v progenitorových
buňkách nemalobuněčného karcinomu plic**

Bakalářská práce

Karolína Světlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Veronika Žižková

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně během bakalářského studia pod vedením Mgr. Veroniky Žižkové a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

Ve Strážnici, dne 5. 5. 2014

.....

SOUHRN

Plicní nádory patří mezi nejčastěji diagnostikované malignity, které celosvětově představují jednu z hlavních příčin úmrtí způsobených onkologickým onemocněním. Rakovina plic je vážné onemocnění agresivní povahy s obecně špatnou prognózou. Zhoubné plicní nádory jsou tvořeny buňkami v různém stupni vývoje a mohou být tvořeny také rozdílnými typy nádorové tkáně. Nemaalobuněčný karcinom plic tvoří převážnou většinu plicních karcinomů a z histologického hlediska je rozdělován na tři hlavní subtypy – adenokarcinom, spinocelulární a velkobuněčný karcinom. Nejčastější příčinou vzniku karcinomu plic je kouření a mezi další potenciálně rizikové faktory patří faktory vnějšího prostředí (azbest, radon, ionizující záření) nebo také častá chronická onemocnění plic.

Jako slibné terapeutické cíle nejen pro rakovinu plic se jeví krátké nekódující molekuly mikroRNA, jež se významně podílí na molekulárně-patologických procesech a slouží také jako potenciální biomarkery pro stanovení diagnózy, prognózy a predikce terapeutické odezvy. MikroRNA také slouží jako efektory v biologickém procesu RNA interference, který inhibuje funkci specifických genů. Díky své neobyčejné schopnosti regulace genové exprese má tento proces velký potenciál v terapii nejrůznějších onemocnění.

Cílem mé bakalářské práce bylo sledování exprese miR-21 a miR-205 v progenitorových buňkách nemaalobuněčného karcinomu plic u 20 pacientů různého pohlaví, věku a s různým subtypem nádoru i stadiem onemocnění.

Na základě experimentů a výpočtů nebyla pozorována zvýšená exprese miR-21 ani u jednoho z prověřovaných pacientů. V případě miR-205 byla vůči kontrole pozorována zvýšená exprese u 9 pacientů, avšak využití statistické metody neprokázaly tento vztah jako signifikantní.

SUMMARY

Lung tumours belong to the most often diagnosed malignancies which worldwide represent one of the main causes of death from cancer. Lung cancer is a serious disease of aggressive nature with generally poor prognosis. Malignant lung tumours are comprised of cells in various stages of development and may also be formed by different types of tumour tissue. Non-small cell lung carcinoma forms the vast majority of lung cancers and from the histological point of view it is divided into three main subtypes – adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. The most common cause of lung cancer is smoking and the other potential risk factors including environmental factors (asbestos, radon, ionizing radiation) as well as frequent chronic lung diseases.

Short non-coding microRNA molecules appear to be a promising therapeutic target not only for lung cancer. They significantly contribute to the molecular and pathological processes and also serve as potential biomarkers for diagnosis, prognosis and prediction of therapeutic response. MicroRNAs also serve as effectors in the process of RNA interference, which inhibits the function of specific genes. Due to its exceptional ability to control gene expression the process has great potential for the treatment of various diseases.

The aim of my bachelor thesis was monitoring the expression of miR-21 and miR-205 in progenitor cells in 20 patients with non-small cell lung cancer. The patients were of different sex, age, with different tumour subtypes and in different stages of the disease.

Based on the experiments and calculations the increased expression of miR-21 was not found in any of the examined patients. In the case of miR-205 the increased expression was monitored in 9 patients towards control but used statistical methods did not show this relationship as significant.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Veronice Žižkové za cenné rady, pomoc, trpělivost a čas, který mi věnovala během psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Márii Janíkové za její ochotu a pomoc a v neposlední řadě také Mgr. Martě Khoylou, Ph.D. za přípravu biologického materiálu. Můj dík patří i MUDr. et MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D. za poskytnutí klinických dat a statistických údajů ke zpracování praktické části této práce.

OSNOVA

1	Úvod	9
2	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Nemalobuněčný karcinom plic	10
2.1.1	Etiologie, symptomatologie	11
2.1.2	Histologické členění maligních plicních nádorů	11
2.1.3	Diagnostika a terapie	14
2.1.4	Komplikace v léčbě NSCLC	18
2.2	Kmenové buňky	19
2.2.1	Progenitorové buňky	22
2.2.2	Kmenové buňky a terapie	24
2.3	mikroRNA	24
2.3.1	Biogeneze miRNA	25
2.3.2	RNA interference	27
2.3.3	miR-21	27
2.3.4	miR-205	28
3	Cíl práce	29
4	Materiál a metodika	30
4.1	Materiál	30
4.2	Použité metody	30
4.2.1	Laserová mikrodisekce	30
4.2.2	Izolace celkové RNA z progenitorových buněk NSCLC	31
4.2.3	Měření koncentrace RNA	32
4.2.4	Reverzní transkripce	32
4.2.5	Preamplifikace s napoolovanými miRNA assays	33
4.2.6	Real-time PCR s preamplifikovanými vzorky	34
4.3	Vybavení laboratoře	36
5	Výsledky	37
5.1	Stanovení exprese miR-21 a miR-205 v progenitorových buňkách nemalobuněčného karcinomu plic	37
5.2	Stanovení relativní kvantifikace miR-21 a miR-205 výpočtem na základě výsledků z real-time PCR	37

6	Diskuse	39
7	Závěr	40
8	Literatura	41
9	Seznam použitých zkratek a symbolů	50
10	Přílohy	52

1 ÚVOD

Rakovina plic je v současné době jedním z největších zdravotních a sociálních problémů vyspělého světa a zahrnuje jak zhoubné nádory průdušek, tak i nádory vznikající v plicní tkáni. Plicní nádory patří mezi nejčastěji diagnostikované malignity a zároveň představují jednu z hlavních příčin úmrtí způsobených nádorovým onemocněním – jde o nejčastější příčinu smrti v důsledku zhoubných nádorů u mužů a čtvrtou nejčastější příčinu u žen. Nemalobuněčný karcinom plic je zhoubné nádorové onemocnění agresivní povahy. Jde o typ nádoru, jenž je málo citlivý na radioterapii i protinádorovou chemoterapii a představuje asi 80 % všech plicních karcinomů. Klíčem k úspěšné léčbě tohoto onemocnění je jeho včasné podchycení, což je i v dnešní době technických a terapeutických pokroků prakticky téměř nemožné. Zásadním a nejúčinnějším způsobem léčby nemalobuněčného karcinomu plic je chirurgická resekce, která dává pacientům největší šanci na přežití. Dalšími běžnými léčebnými modalitami jsou chemoterapie, radioterapie a v posledních letech i cílená léčba zaměřená na angiogenezi a signální dráhy patogeneze samotného karcinomu.

Do popředí se v rámci terapie nejen tohoto onemocnění čím dál více dostává také RNA interference. Tento konzervovaný molekulárně-biologický proces velkého potenciálu může být do budoucna klíčovou léčebnou modalitou pro širokou škálu onemocnění. Molekuly mikroRNA, jež se na procesu RNA interference mohou podílet, patří v posledních letech díky svým jedinečným regulačním schopnostem k velmi intenzivně studovaným objektům a jejich studium je jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí molekulární biologie.

Teoretickou část své bakalářské práce jsem věnovala stručné charakteristice nemalobuněčného karcinomu plic, příčinám vzniku a léčebným modalitám tohoto onemocnění. Další kapitola se věnuje problematice kmenových buněk a jejich spojitosti s rakovinou plic a vše uzavírá stručná kapitola zabývající se molekulami mikroRNA, které jsou také předmětem experimentální části této práce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Nemalobuněčný karcinom plic

Rakovina plic je ve světě nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění (odhaduje se, že je zodpovědná za jedno úmrtí z pěti v rámci všech onkologických onemocnění). Asi u 80 % pacientů s primární plicní malignitou je diagnostikován nemalobuněčný karcinom plic (Grinberg-Rashi *et al.*, 2009; <http://globocan.iarc.fr>).

Nemalobuněčný karcinom plic je heterogenní skupina zhoubného rakovinného onemocnění agresivní povahy postihující průdušnici a parenchym plic. Jedná se o malignitu, jež je závažným, nejen zdravotním problémem vyspělých zemí světa, patřící mezi nejčastěji diagnostikované rakovinné onemocnění. Tato skupina nádorů je v celosvětovém měřítku jednou z hlavních příčin úmrtí způsobených onkologickým onemocněním. Prognóza pacientů je zpravidla velmi nepříznivá – cca 40 % pacientů přežívá rok od diagnózy a asi jen 15 % se dožívá pěti let od diagnózy. Problémem je skutečnost, že je chorobu téměř nemožné podchytit v raném stadiu. Nejčastěji je výskyt nemalobuněčného karcinomu plic zaznamenán u pacientů ve věkovém rozmezí 55-80 let (Skřičková *et al.*, 2010).

Česká republika je zemí, která eviduje data o plicních malignitách a jejich incidencích. V roce 2002 byla ČR v první desítce zemí s nejvyšší incidencí plicních karcinomů, a to na 7. místě (Skřičková *et al.*, 2008). V roce 2009 bylo v ČR zaznamenáno u mužů přes 6 400 případů tohoto onemocnění (incidence v tomto případě byla 87,7/100 000), u žen pak 1 917 s incidencí 35,9/100 000. V posledních letech byl zaznamenán zejména u mužů mírný pokles počtu nových případů maligního plicního onemocnění. U mužů dlouhodobě klesá mortalita i incidence plicního karcinomu, zatímco u žen je pozorován mírný dlouhodobý nárůst (Marel, 2012). Výskyt maligního plicního onemocnění se v jednotlivých krajích ČR značně liší. Ze statistických údajů roku 2006 vyplývá, že mezi kraje s nejvyšší incidencí rakoviny plic u mužů patří kraj Plzeňský (115,7/100 000), nejnižší incidence (64,7/100 000) byla zaznamenána v kraji Zlínském (Pešek, 2009).

Ze statistik pro rok 2012 plyne, že rakovině plic podlehe 87 % pacientů s touto diagnózou. Geografickou oblastí s největší incidencí rakoviny plic je v rámci mužů střední a východní Evropa (53,5/100 000). U žen jde o Severní Ameriku (33,8/100 000) a v rámci obou pohlaví byl nejmenší výskyt tohoto onemocnění zaznamenán v západní a střední Africe (<http://globocan.iarc.fr>).

2.1.1 Etiologie, symptomatologie

Na vzniku a vývoji rakoviny plic se podílí celá řada exogenních či endogenních faktorů. V rámci exogenních činitelů riziko vzniku karcinomu plic zvyšuje např. ultrafialové a ionizující záření, azbest, těžké kovy, některé uhlovodíky, mechanické částice v prostředí, jako je prach, apod. (Skříčková *et al.*, 2008). Největším, a zároveň nejznámějším činitelem je kouření, se kterým souvisí více než 80 % onemocnění (Ginsberg, 2005). Tomuto riziku nejsou vystaveni jen aktivní kuřáci, ale i nekuřáci, kteří jsou dlouhodobě vystaveni pobytu v zakouřených prostorách (Skříčková *et al.*, 2008). Za další rizikový faktor je považován radon. Tento radioaktivní plyn vzniká při rozpadu izotopu radia 226, což vede k vyzářování částic, které mohou poškodit buňky, a zvýšit tak jejich potenciál pro přeměnu na buňky rakovinné. Radon se nachází v různém množství v půdě – může tak snadno dojít k jeho expozici do domů i jiných staveb (Ettinger *et al.*, 2006).

Mezi endogenní faktory řadíme genetické predispozice a chronická onemocnění plic jako je zápal plic, silné astma či tuberkulóza nebo jiná opakující se zánětlivá onemocnění dýchacích cest (Fraumeni, 1975; Janerich *et al.*, 1990).

Vzhledem k nenápadným příznakům této nemoci dochází v drtivé většině případů k odhalení onemocnění až v pokročilém stadiu. Symptomy karcinomu plic dělíme na lokální, pokročilé a paraneoplastické. Nejčastějším příznakem je kašel, a to v různých formách. Dále pak hemoptýza, dušnost, sípavé dýchání, bolest na hrudi, bolest zad, pleurální výpotek, syndrom horní duté žíly a chrapot. Mezi pokročilé příznaky onemocnění řadíme postižení lymfatických uzlin, neurologické problémy a metastatické projevy, zejména v centrální nervové soustavě a kostní dřeni. Paraneoplastické příznaky se vyskytují asi jen u 20 % případů nemalobuněčného karcinomu plic – jsou totiž typičtější pro malobuněčné karcinomy plic. Jedná se o vedlejší projevy související s nádorovým růstem např. redukce hmotnosti, nevolnost, ztráta chuti k jídlu, horečka, poruchy koagulace a neurologické či endokrinní poruchy (Skříčková *et al.*, 2008; Travis *et al.*, 2004).

2.1.2 Histologické členění maligních plicních nádorů

Rakovina plic je obecně reprezentována skupinou neoplazií vznikajících z fenotypově odlišných buněk (Pine *et al.*, 2008). Maligní plicní nádory lze rozlišit na základě několika kritérií, mezi která patří místo výskytu, biologické vlastnosti a složení tkáně. V praxi se

rozlišují 2 základní formy plicního karcinomu – nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung carcinoma – NSCLC) a malobuněčný karcinom plic (small cell lung carcinoma – SCLC). Tyto dvě skupiny karcinomů se vzájemně liší biologickým chováním rakovinných buněk, z čehož vychází i odlišný způsob léčby (Skřičková *et al.*, 2008).

Malobuněčné karcinomy plic tvoří asi 20 % všech nálezů plicních karcinomů. Je pro ně typická rychlá růstová aktivita, časně šíření ve formě metastáz a vyšší citlivost k ozařování a chemoterapii. Nádor se však postupem času stává vůči dříve účinnému způsobu léčby rezistentním.

Nemalobuněčný karcinom plic tvoří asi 80 % všech nálezů. Je až na výjimky charakterizován pomalejším růstem i diseminací oproti malobuněčnému karcinomu plic, ale na rozdíl od SCLC hůře reaguje na protinádorovou radio- a chemoterapii (Slabý and Svoboda, 2012).

Mezi 4 hlavní histologické typy karcinomu plic patří adenokarcinom, spinocelulární karcinom, velkobuněčný karcinom a malobuněčný karcinom (Tabulka č. 1). Tyto 4 jmenované typy tvoří přibližně 99 % všech případů primárního rakovinného onemocnění a jejich incidence se v průběhu několika posledních let výrazně mění (Wahbah *et al.*, 2007).

Adenokarcinom (ADC) je maligní, značně heterogenní epiteliální tumor lokalizovaný zejména v periferních plicních oblastech. Tvoří až 40 % nálezů a je tak jedním z nejčastějších typů nemalobuněčného plicního karcinomu především u žen a nekuřáků. Charakteristickým rysem adenokarcinomu je přítomnost hlenu nebo glandulárních složek, pomalejší růst a rozsáhlé metastázování.

Skvamozní/spinocelulární karcinom (SCC) tvoří okolo 30 % všech nálezů a jeho výskyt je častější u mužů. Jedná se o centrální heterogenní nádor charakterizovaný pomalým růstem a lepší prognózou než jiné NSCLC. Nádor vzniká postupně z mezibuněčných můstků bronchiální sliznice nebo v důsledku jejího zrohovatění. S jeho vznikem je často spojován cigaretový kouř a arzen. Pozitivním faktorem je, že spinocelulární karcinom má na rozdíl od ostatních typů nemalobuněčného karcinomu plic nižší schopnost metastázovat do vzdálených orgánů (Brychtová and Hlobilková, 2008; Skřičková *et al.*, 2008; Travis *et al.*, 2004).

Velkobuněčný karcinom (LCC) je nediferencovaný, vysoce maligní plicní tumor, který je svou stavbou a cytologií blízký malobuněčnému či skvamocelulárnímu karcinomu. Vyskytuje se asi v 9 % případů a je charakteristický rychlým invazivním růstem spojeným s vysokou mitotickou aktivitou a špatnou prognózou pro pacienta (Brychtová and Hlobilková, 2008; Skříčková *et al.*, 2008).

Malobuněčný karcinom je vysoce zhoubný nádor, který rychle generalizuje a časně metastázuje. Je spojován s aktivním kouřením a tvoří asi 25 % plicních nádorů. Zpravidla se začíná nenápadně tvořit v oblasti bronchiálního hilu, kde tvoří drobné ložisko, jehož odhalení není snadné. Na léčbu chemoterapeutiky a radioterapii je zpočátku velmi citlivý. Tato senzitivita ale s postupem času přechází v rezistenci (Brychtová and Hlobilková, 2008; Skříčková *et al.*, 2008; Meerbeeck *et al.*, 2011).

Tabulka č. 1: Histologická klasifikace maligních epitelových nádorů plic (upraveno dle Skříčková *et al.*, 2008)

Nemalobuněčný karcinom	Adenokarcinom	Acinární
		Papilární
		Bronchoalveolární
		Solidní hlenotvorný
	Velkobuněčný karcinom	Obrovskobuněčný karcinom
		Karcinom z jasných buněk
	Smišené karcinomy	Adenoskvamózní karcinom
		Mukoepidermoidní karcinom
		Adenoidně cystický karcinom
	Skvamozní/spinocelulární karcinom	
Nediferencovaný karcinom		
Malobuněčný karcinom	Malobuněčný karcinom	
	Intermediární karcinom	
	Kombinovaný karcinom	

2.1.3 Diagnostika a terapie

Správné určení diagnózy a stadia NSCLC je nezbytné pro nejrychlejší a nejvhodnější způsob léčby. Nemoc je ale většinou odhalena příliš pozdě na to, aby mohla být vyléčena, a to i přes to, že v posledních letech dochází čím dál častěji k odhalení malignity již v raných stádiích. Důvodem je často obtížné odlišení příznaků od jiných chorob. Prognóza a léčba pacientů s rakovinou plic je závislá na věku, pohlaví, stadiu onemocnění, histologickém typu malignity a jeho rozsahu a na celkovém stavu pacienta. Samotné vyšetření zahrnuje několik fází. První z nich je vyšetření klinické (fyzikální) – pohledem, poslechem a pohmatem, kdy je lékařem sledován celkový stav pacienta. Hodnotí se poslechový nález (oslabené dýchání, pískot, atd.), pohmatem se kontrolují lymfatické uzliny, především v nadklíčkové a podpažní oblasti, a dále se provádí poklep páteře, hrudníku a břicha. V diagnostickém procesu se standardně využívá několika různých přístrojových vyšetření, jako je skiografie, pozitronová emisní tomografie, počítačová tomografie hrudníku a mozku, sonografie, scintigrafie kostry, magnetická rezonance, bronchoskopie a biopsie, ultrazvuk, mediastinoskopie, torakoskopie, spirometrie apod., přičemž mezi minimálně invazivní metody patří například fibrooptická bronchoskopie, endobronchiální ultrazvuk či transtorakální biopsie (Salomaa *et al.*, 2005; Skříčková *et al.*, 2008; White *et al.*, 2011).

U pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic rozlišujeme dle závažnosti několik klinických stadií, od kterých se odvíjí individuální strategie léčby tohoto onemocnění.

Stadium IA, IB

U těchto stadií se považuje za dostatečnou onkologickou terapii chirurgická resekce v podobě lobektomie. Po radikálním chirurgickém zákroku u stadia IA není potřeba aplikovat adjuvantní chemoterapii. V případě stadia IB jde ale o rozporuplnou věc – řada studií totiž v tomto stadiu nemoci neprokázala její přínos. U pacientů, kteří nejsou schopni podstoupit resekční výkon, je alternativou nechirurgické ošetření nádoru použitím např. stereotaktické radioterapie (Stolz *et al.*, 2010).

Stadium IIA, IIB

Standardním léčebným výkonem u tohoto stadia je chirurgická resekce. V případě zasažení uzlin lymfatického filtru interlobia je také nezbytná resekce všech hilových uzlin.

Po chirurgickém výkonu je zahájena adjuvantní chemoterapie, jejíž úloha je ale i v tomto případě nejednoznačná. U pacientů, kteří nemohou podstoupit resekční výkon, je indikována radioterapie (Klein, 2006; Skříčková *et al.*, 2008).

Stadium IIIA, IIIB

V případě stadia IIIA se přistupuje k chirurgické léčbě s následnou adjuvantní chemoterapií. U stadia IIIB se resekce tumoru zvažuje jen ve výjimečných případech (např. po úspěšné chemoterapii). Inoperabilní pacienti by měli podstoupit kombinovanou léčbu chemoterapie a radioterapie. Pacienti, pro které není chemoterapie vhodná, jsou léčeni pouze radioterapií (Becker *et al.*, 2005; Marek, 2010).

Stadium IV

Chirurgická léčba u IV. stadia není až na výjimky možná. Tyto výjimky se týkají pacientů s radikálně resekabilní primární lokalizací nádoru nebo těch, u kterých se objevila izolovaná metastáza na jediném orgánu. U pacientů v dobrém klinickém stavu se standardně využívá kombinované chemoterapie, jež je přínosná pouze pro pacienty v dobrém výkonostním stavu. Není vhodná pro pacienty staršího věku. V tomto případě se přistupuje k monoterapii nebo cílené biologické léčbě (Alušíková *et al.*, 2007).

K terapii NSCLC se využívá několika různých léčebných metod, které jsou často pro zefektivnění léčby kombinovány. Neexistuje však žádná univerzální léčebná modalita, jež by byla adekvátní pro každého pacienta. Z důvodu heterogenity tohoto maligního onemocnění, jeho různého stadia i rozsahu a kvůli individualitě pacientů, je pro každého stanovena odpovídající léčba, jejíž správné určení často není jednoduché. Prozatím neexistuje žádný způsob léčby, který by byl z organismu schopen odstranit všechny nádorové buňky a zamezil tak recidivě nemoci a vzniku sekundárních metastatických ložisek.

Chirurgická léčba

Klíčovým způsobem léčby NSCLC je léčba chirurgická, která zajišťuje možnost nejdelšího přežití nemocných, a to zejména v časných stadiích nemoci. Rozsah zákroku vždy odpovídá míře postižení a rozšíření nádoru. Za minimální a základní chirurgický zákrok

u NSCLC je považována lobektomie, při které jde o odstranění určitého plicního laloku. Další možností je bilobektomie, kdy jsou odstraněny 2 laloky orgánu nebo pneumonektomie, při které dochází k odstranění celé plíce. Každá radikální chirurgická resekce by měla být spojena s následným odstraněním lymfatických uzlin mediastina. Operativní odstranění nádoru je bohužel ve většině případů kvůli pozdní diagnóze a častému výskytu metastáz nemožné. Po chirurgickém zákroku dochází až v polovině případů k následné recidivě onemocnění v podobě metastáz ve vzdálených orgánech. Znovuobjevení nádoru je často pozorováno během následujících 2 let od operace. Neobvyklá není ani pooperační úmrtnost, která je úzce spojena s rozsahem chirurgického zákroku a věkem pacienta (Alušíková *et al.*, 2007; Pass *et al.*, 2010; Passlik *et al.*, 2002).

Radioterapie

Externí radiační záření má nejen v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic velký význam. Jde o léčebnou metodu vhodnou pro široké spektrum pacientů s tímto onemocněním a je rozhodujícím způsobem léčby zejména u inoperabilních pacientů a pacientů s rozšířenými metastázami. Většinou se jedná o zevní cílené ozařování schopné likvidovat dělicí se nádorové buňky. Pacient podstupuje tuto proceduru každý den po dobu 5-6 týdnů. Účelem radioterapie je s co největší přesností nasměrovat správnou dávku záření na požadované místo s minimálním dopadem na okolní zdravou tkáň. K radioterapii se často přistupuje po chirurgické resekcii nebo je aplikována v kombinaci s chemoterapií. Samotná léčba radioterapií nedokáže prodloužit přežití pacientů s NSCLC, ale je schopna zlepšit kvalitu jejich života (White *et al.*, 2011; Williams, 1992). Relativně novou perspektivní radiologickou metodou, jež vykazuje nízkou toxicitu, je stereotaktická ablační radioterapie (SABR). Zpravidla se SABR aplikuje u nádorů do průměru 5 cm. Tato moderní metoda cílené radiace je indikována zejména u inoperabilních případů, pacientů vyššího věku nebo rizikově nemocných a je revoluční terapií pro pacienty s časnými stadii NSCLC. Až 80 % pacientů se stadiem IA dosahuje po aplikaci SABR tříletého přežití (Loo, 2011; Marel, 2012).

Chemoterapie

Léčba cytostatiky (chemoterapie) je jednou ze základních léčebných modalit maligních rakovinných onemocnění, přičemž nemalobuněčný karcinom plic vykazuje vůči této léčbě nízkou citlivost. Chemoterapeutika jsou neselektivní léky s cytotoxickým účinkem syntetického nebo přírodního původu, jež jsou výsledkem chemických syntéz. Chemoterapie může být využita jako samostatná léčba, často se však kombinuje s jinými způsoby léčby v několika týdenních cyklech. Počet cyklů léčby je individuální dle stadia a rozsahu onemocnění. Cílem cytostatik je zasáhnout a narušit genetickou informaci dělicích se rakovinných buněk. Tyto léky působí globálně v celém organismu, což je výhodou především u pacientů s generalizovaným onkologickým onemocněním. Většinou se jedná o léky, jejichž základ tvoří deriváty platiny a jsou přijímány buď v podobě tablet, nebo intravenózně. Z důvodu zesílení účinku léčby jsou často kombinována různá cytostatika a odpověď pacientů na cytostatickou léčbu je velmi variabilní. V důsledku neselektivity těchto léčiv dochází k zasažení i nerakovinných buněk, nacházejících se ve fázi dělení. Od tohoto mechanismu se také odvíjí řada nepříjemných nežádoucích účinků chemoterapeutické léčby – alopecie, nevolnost, zvracení, pokles hematopoézy, atd. (Skřičková *et al.*, 2009; Vorlíčková and Sýkorová, 2007; Gkiozos *et al.*, 2007).

Biologicky cílená léčba NSCLC

Hlubší pochopení molekulární podstaty rakoviny plic v posledních letech vedlo k vývoji nového způsobu její léčby. Jde o subcelulární léčbu známou také pod názvem molekulární chemoterapie, jež je založena na ovlivnění klíčových signálních a regulačních drah buňky. K ovlivnění těchto mechanismů je v biologické léčbě využíváno buněčných efektorů, jako jsou nízkomolekulární inhibitory, imunoterapeutické přístupy, antisense oligonukleotidy či genová terapie, která je atraktivní léčebnou modalitou nejen v případě onkologických onemocnění (Gkiozos *et al.*, 2007).

Hlavním úkolem a také výhodou této terapie je schopnost ovlivnění konkrétních cílových struktur rakovinných buněk (např. inhibice aktivity abnormálních proteinů). Cílem této léčby jsou molekuly, které regulují angiogenezi buněk a také receptor tyrosinkinasy – receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Ten je asi u 40-80 % pacientů vlivem aktivačních mutací nadměrně exprimován, což podmiňuje progresi nádorového bujení a obecně tak značí špatnou prognózu. Jako inhibitory těchto cílových

molekul slouží například monoklonální protilátky nebo inhibitory tyrosinkinasy (Zatloukal 2010; Molina *et al.*, 2008).

Klinicky používanou monoklonální protilátkou v léčbě NSCLC je Bavacizumab, jenž má antiangiogenní účinky. Tato látka působí proti růstovému faktoru cévního endotelu (VEGF), který podmiňuje vznik a růst sítě cév v nádoru, inhibicí jeho signální dráhy. Inhibitory tyrosinkinasy cílené na EGFR jsou drobné molekuly, jež se snadno dostávají do vnitřního prostoru buňky, kde v několika krocích zabrání aktivaci buněčné signální kaskády. Nejznámějšími inhibitory tohoto typu využívané v klinické praxi jsou Erlotinib a Gefitinib, přičemž při léčbě těmito látkami v případě terapie druhé a třetí volby pokročilého stadia NSCLC bylo prokázáno lepší přežívání pacientů. Léčba inhibitory tyrosinkinasy by měla být primárně využita u pacientů s pokročilým stadiem nemoci, při recidivách a také u pacientů, kde nezabrala léčba cytostatiky. Výhodou biologicky cílené léčby je perorální užívání a také nižší toxicita než v případě cytostatik (Sasaki *et al.*, 2010; Raz *et al.*, 2007; Shepherd *et al.*, 2005; Dy and Adjei, 2002a; Dy and Adjei, 2002b, Zatloukal 2010).

2.1.4 Komplikace v léčbě NSCLC

Velkou komplikací v léčbě nádorových onemocnění je schopnost nádorových buněk tvořit metastázy ve vzdálených orgánech. Jedná se o druhotná ložiska rakovinných buněk, vzniklá na základě rozšíření a invaze buněk z primárního ložiska – z primárního nádoru přes okolní tkáň, přičemž k rozšíření dochází lymfatickou či krevní cestou. Proces tvorby nových krevních cév, které pronikají do nádoru a zároveň jej vyživují, se nazývá angiogeneze. Nové cévy nejsou jen zdrojem kyslíku a živin pro nádor, ale jsou právě také branou pro krevní šíření a vznik orgánových metastáz. Celý tento komplexní proces je často řízen extracelulárními angiogenetickými faktory produkovanými lokálními buňkami a regulován množstvím proangiogenních a antiangiogenních faktorů. Metastatické nádory jsou většinou maligní a v případě, že nedojde k zahájení léčby, výrazně přispívají k letalitě pacientů (Morgan, 2007; Ryška, 2012). Obecně platí, že většina úmrtí způsobených rakovinou souvisí s vývojem metastáz, nikoli s růstem primárního nádoru (Baccelli and Trumpp, 2012).

Rakovinné buňky NSCLC mají již v raném stadiu svého vývoje schopnost invaze do vzdálených orgánů. Metastázy se mohou u pacienta objevit po letech (i desetiletích) od diagnózy primárního nádoru a zároveň se od něj mohou lišit svými vlastnostmi. Celý proces vzniku je mimořádně složitý a několikastupňový. Aby se mohly rakovinné buňky

šířit a tvořit dceřiná nádorová ložiska, musí překonat řadu překážek – oddělení od primárního tumoru, průnik přes okolní tkáň a membrány, začlenění a přežití v krevním, lymfatickém a peritoneálním prostoru a následné začlenění do tkáň cílového orgánu. Prognóza pro pacienty, u kterých se vyskytují rozsáhlé metastázy, je velmi nepříznivá. Tyto případy se vyznačují mnohonásobně vyšší mortalitou nežli případy, u kterých je diagnostikován pouze primární lokalizovaný nádor. Pravděpodobnost vzniku metastáz u NSCLC je zejména u pozdních stadií velmi vysoká a prognóza pro pacienta je velice nepříznivá. Hlavním místem pro vznik metastáz NSCLC je centrální nervový systém a dále pak kosti, játra a nadledviny (Hunter *et al.*, 2008; Sleeman *et al.*, 2012; Skříčková *et al.*, 2008).

Standardní chemoterapie sice usmrtí většinu nádorových buněk, ale rakovinné kmenové buňky jsou schopny chemoterapii odolat a zůstat tak životaschopné. I malé množství těchto přeživších buněk může způsobit recidivu onemocnění i po několika letech od úspěšné léčby. Růst metastáz ve vzdálených orgánech a jejich buněčná heterogenita může být důsledkem diferenciac/dediferenciac a asymetrického dělení rakovinných kmenových buněk (Soltysova *et al.*, 2005).

Další závažnou komplikací a důvodem selhání léčby karcinomu plic je schopnost rezistence maligních rakovinných buněk vůči cytotoxickým léčebným látkám. Touto vlastností se mohou buňky vyznačovat již od začátku léčby, kdy mluvíme o přirozené (primární) rezistenci anebo v průběhu protinádorové léčby, kdy rakovinné buňky postupně přestávají odpovídat na léčbu a rezistenci tak získají – jde tak o rezistenci sekundární. Také může nastat situace, kdy při ztrátě senzitivity rakovinných buněk na konkrétní cytostatikum zůstávají buňky citlivé na jiná cytostatika. Pokud však dojde ke vzniku rezistence i na jiná, často složením příbuzná cytostatika, jde o takzvanou zkříženou rezistenci. Jestliže rezistence vzniká mezi cytostatiky rozdílnými ve složení i v mechanismu účinku, mluvíme o mnohočetné lékové rezistenci (Nosková *et al.*, 2000).

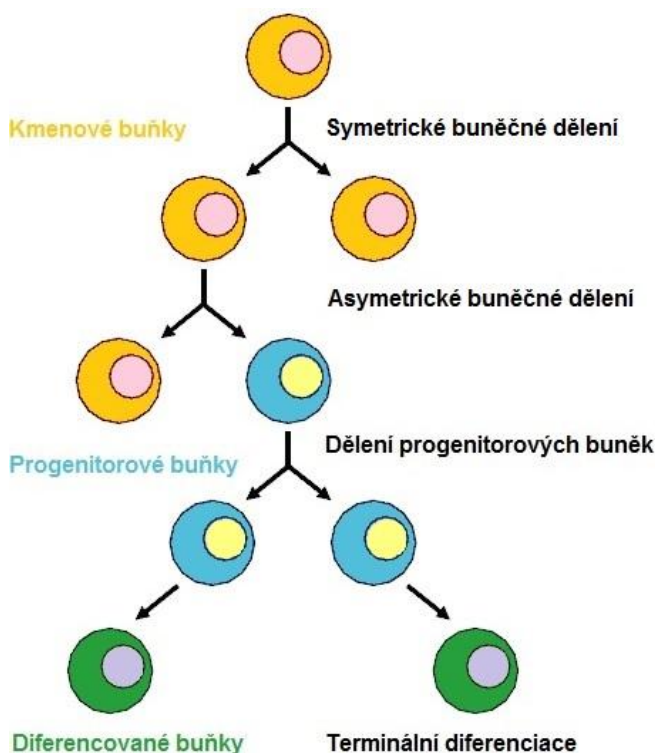
2.2 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které slouží jako prekurzory pro vznik terminálně diferencovaných buněk řady tkání a orgánů lidského těla. Mohou být charakterizovány také jako klonogenní buňky schopné jak sebeobnovy, tak mnohalinguové buněčné diferenciac. Jejich identifikaci často znesnadňuje jejich nedefinovaný vzhled. I když tyto buňky nejsou terminálně diferencované, jsou determinované a stabilně exprimují

několik proteinů regulujících geny, které zajišťují, že diferencované potomstvo kmenové buňky bude náležet k příslušnému typu. Častým případem je, že z jednoho typu kmenové buňky vzniká několik druhů diferencovaných dceřiných buněk, vykonávajících v těle specifické funkce – jde například o hematopoetické, nervové nebo střevní kmenové buňky (Koledová *et al.*, 2011; Weissman, 2000).

Kmenové buňky se vyznačují několika charakteristickými vlastnostmi. Jednou z nich je velká míra diferenciaci neboli schopnost tvorby velkého počtu různých buněk a dále také schopnost zdánlivě nekonečného počtu buněčných dělení. Vznikající dceřiné buňky mohou zůstat buď kmenovými buňkami, nebo mohou pokračovat v dalším vývoji a poté se terminálně diferencovat (Alberts *et al.*, 2008).

Embryonální kmenové buňky podléhají symetrickému buněčnému dělení, které dává vzniknout dvěma totožným rovnocenným buňkám. Druhým způsobem buněčného dělení, jež je důležité pro zachování buněčné různorodosti, je dělení asymetrické, jímž se dělí somatické kmenové buňky. Asymetrickým dělením vzniká z mateřské kmenové buňky jedna dceřiná buňka s identickými rodičovskými vlastnostmi a druhá dceřiná buňka, jež je tkáňově specifická (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Schéma dělení a diferenciaci kmenových buněk (upraveno dle Doubek, 2008)

Na základě diferenciačního potenciálu rozdělujeme kmenové buňky na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní (Cagle *et al.*, 2012).

Totipotentní charakter má zygota, jejíž buňky se mohou bez omezení dělit na kterýkoliv typ buňky včetně dalších totipotentních buněk. Jejich dceřinými buňkami jsou buňky pluripotentní, které mohou produkovat kromě totipotentních buněk všechny ostatní typy, což je vlastnost charakteristická např. pro embryonální kmenové buňky (Doubek, 2008).

Zvláštním typem pluripotence je multipotence. Multipotentní buňky produkují pouze buňky příbuzné danému typu tkáně.

Opakem pluripotence je unipotence. Z unipotentní buňky vzniká pouze jeden typ terminálních buněk.

Důležitým znakem je také vlastní sebeobnova těchto buněk, která zajišťuje zachování vlastností mateřské kmenové buňky v buňkách dceřiných. Díky těmto zásadním specifickým rysům mají tyto buňky schopnost regenerovat opotřebenou či poškozenou tkáň a stojí též za jejím růstem i udržováním optimálního stavu (Koledová *et al.*, 2011; Cherian *et al.*, 2011).

Veškeré tkáně živočichů vznikají z orgánově specifických kmenových buněk, které vznikají v průběhu ontogeneze každého jedince a jsou odvozeny od embryonálních kmenových buněk. Na základě původu členíme kmenové buňky do tří hlavních kategorií:

Embryonální kmenové buňky (ESCs) mají původ v nitrobuněčné masě blastocysty a jsou pluripotentní. Vyznačují se vysokým vývojovým potenciálem a jejich doživotní schopnost neomezené replikace je zajištěna aktivitou enzymu telomerasy. Lidské ESCs byly poprvé izolovány v roce 1998. Do této skupiny buněk patří také buňky trofoblastové. Ty jsou odvozeny od buněk trofoblastu blastocysty, jsou multipotentní a schopné diferencovat pouze do buněčných typů placenty (Soltysova *et al.*, 2005; Čedíková *et al.*, 2012; Koledová *et al.*, 2011).

Embryonální kmenové buňky se vyznačují specifickou regulací buněčného cyklu. Tyto buňky se na rozdíl od somatických buněk dělí mnohem rychleji, a to díky velmi krátké G1 fázi buněčného cyklu. Na základě několika studií bylo prokázáno, že zkrácená G1 fáze je nezbytná pro zachování pluripotence ESCs. Poškození DNA embryonální kmenové buňky na začátku buněčného cyklu nevede k zastavení cyklu, jako je tomu u somatických kmenových buněk, z důvodu absence G1 kontrolního bodu. U ESCs dochází buď k navození apoptózy, nebo diferenciaci buňky s poškozenou DNA na buňky, které ztratí schopnost

dalšího dělení. Těmito mechanismy embryonální kmenové buňky předchází vzniku mutací ve svém genetickém materiálu (Koledová *et al.*, 2011; White and Dalton, 2005).

Zárodečné (germinální) kmenové buňky jsou odvozeny od primárních zárodečných vrstev embrya a diferencují do podoby progenitorových buněk, které jsou dále schopny produkovat specifické orgánové buňky. Nacházejí se také v gonádách, kde jsou základem pro tvorbu vajíček a spermií (Jiang *et al.*, 2002; Masopust, 2008).

Somatické (adultní) kmenové buňky (ASCs) mají menší replikační schopnost nežli buňky embryonální, a to z důvodu snížené aktivity enzymu telomerasy. Jsou tkáňově specifické a vyskytují se v již diferencovaných tkáních a orgánech. Dále je můžeme členit na mezenchymální a hematopoetické kmenové buňky. Výskyt mezenchymálních kmenových buněk převládá v kostní dřeni. Mohou diferencovat do různých mezenchymálních tkání, jako jsou kosti, chrupavky, svaly či tuková tkáň. Hematopoetické kmenové buňky pak představují progenitory pro všechny typy krevních elementů (Sagar *et al.*, 2007; Keith, 2004).

Relativně novou skupinou kmenových buněk, které se ale v organismu přirozeně nevyskytují, jsou indukované pluripotentní kmenové buňky, jež jsou uměle vytvořené. Vznikají reprogramováním diferencovaných buněk na buňky kmenové. Jejich vznik je podmíněn navozením exprese klíčových genů pluripotentních buněk v již diferencovaných buňkách, do kterých se tyto geny vnesou pomocí vektorové DNA. Změnu genové exprese lze realizovat i pomocí mikroRNA – v tomto případě mluvíme o pluripotentních kmenových buňkách indukovaných prostřednictvím mikroRNA (Koledová *et al.*, 2011; Čedíková *et al.*, 2012).

2.2.1 Progenitorové buňky

Progenitorové buňky jsou nediferencované proliferující buňky s omezenou schopností sebeobnovy, jež v příslušných tkáních produkují konečné zralé typy buněk. Představují jakýsi přechod mezi kmenovými a zralými specializovanými buňkami. Jsou produkovány kmenovými buňkami, se kterými jsou často zaměňovány, přičemž vznikají jejich asymetrickým dělením. Mezi těmito dvěma typy buněk existují určité funkční a diferenciacní rozdíly. Zatímco kmenová buňka se vyznačuje neomezenou schopností sebeobnovy a diferenciaci, diferenciaci progenitorových buněk je užšího charakteru. Schopnost dělení

těchto buněk je omezena a s jeho zvyšující se četností se snižuje jejich schopnost diferenciaci. Po buněčném dělení buňka buď diferencuje, nebo zaniká (Seaberg and van der Kooy, 2003; Masopust, 2008; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.2.1.1 Plicní kmenové buňky a jejich souvislost s rakovinou plic

Kmenové buňky jsou lokalizovány v oblasti celých dýchacích cest a i když dosud nebyly přesně identifikovány, některé studie dokládají existenci regionálních progenitorových buněk, jako jsou například bronchoalveolární kmenové buňky, bazální sekreční bronchiální progenitorové buňky a neuroendokrinní kmenové buňky, které udržují homeostázu a hrají roli v reparaci tkáně. V případě poškození plicní tkáně, včetně účinků toxických látek, se populace těchto buněk rozšiřují, ale nestávají se tumorigenními, dokud nedojde k vlivu alespoň jednoho genetického či epigenetického podnětu – příkladem může být tabákový kouř (Shostak, 2011).

I přes relativně rychlé tempo výzkumu rakovinných kmenových buněk (CSCs) řady solidních nádorů zůstává tento pokrok v rámci rakoviny plic částečně pozadu z důvodu neúplného pochopení hierarchie kmenových buněk plicního epitelu a kvůli celkové heterogenitě tohoto onemocnění (Sullivan *et al.*, 2010). Právě z důvodu obrovské heterogenity celého onemocnění (etiologie, buněčný původ, patologie, molekulárně-biologická patogeneze) jsou velmi kontroverzním tématem i molekulární markery CSCs rakoviny plic (Shostak, 2011). CSCs jsou pro identifikaci a studium jejich chování izolovány z nádorů na základě exprese určitých markerů charakteristických pro nediferencované buňky a klíčových komponent signálních drah zapojených do jejich regulace. Jako marker pro identifikaci kmenových buněk z normálních a nádorových tkání se ve velké míře používá antigen CD-133. Tento membránový glykoprotein, který je exprimován diferencovanými epitelovými buňkami různých orgánů, je jedním z markerů rakovinných kmenových buněk (Alison *et al.*, 2011; Wu and Wu, 2009; Slabý *et al.*, 2012).

Brzká expanze plicních nádorů je způsobena přítomností kmenových buněk v nádoru. Tyto buňky jsou ve srovnání s ostatními buňkami schopny iniciovat vznik rakovinného onemocnění a udržet rakovinotvorný charakter včetně vysoké proliferační kapacity, multipotentní diferenciaci, lékové rezistence a dlouhé viability. Plicní CSCs mají několik společných vlastností s normálními kmenovými buňkami, jakými jsou multipotence, schopnost sebeobnovy nebo lokalizace v dýchacích cestách (Pine *et al.*, 2008; Salama *et al.*, 2012).

2.2.2 Kmenové buňky a terapie

Kmenové buňky znamenají pro vědu a zejména medicínu obrovský potenciál v rámci nových způsobů léčby, a jsou proto v centru zájmu v současnosti rychle se rozvíjejících oborů, jakými jsou regenerační medicína a tkáňové inženýrství.

Skutečnost, že se kmenové buňky mohou vyvíjet ve specifické buněčné typy, předurčuje jejich využití pro buněčnou terapii různých onemocnění – mohou tak být využity v místech, kde určitý typ buněk chybí nebo tam, kde je poškozena jejich funkce např. diabetes, Parkinsonova choroba nebo poranění míchy. Zavedení jednoho z různých typů geneticky modifikovaných kmenových buněk do nemocné či poškozené tkáně je alternativní metodou genové terapie. Na základě schopnosti sebeobnovy a diferenciaci mohou tyto buňky znovu osídlit cílovou tkáň a regenerovat ji. Terapeutické uplatnění kmenových buněk v poúrazové reparaci tkání, neurodegenerativních chorobách, rakovině, rozsáhlých degenerativních onemocněních kloubů, transplantacích a dalších abnormalitách je však spojeno s řadou nevyřešených komplikací, jakou je etika nebo nekontrolovatelný růst kmenových buněk spojený s přeměnou na buňky nádorové (Koledová *et al.*, 2011; McLennan *et al.*, 2013).

2.3 mikroRNA

Objev první mikroRNA (miRNA) spadá do roku 1993, kdy Victor Ambros se svými kolegy identifikoval u *Caenorhabditis elegans* (hád'átko obecné) první miRNA, známou pod názvem *lin-4*, jež se podílí na larválním vývoji tohoto živočicha. Až sedm let po objevu *lin-4* došlo u téhož organismu k objevu druhé molekuly s podobnou funkcí, a to miRNA *let-7*, která řídí přechod z pozdního larválního stadia v dospělce. Objev miRNA znamenal nový směr ve vědě a zejména v posledním desetiletí se tyto molekuly staly intenzivním předmětem zájmu mnohých výzkumných skupin (Almeida *et al.*, 2011; Bartel, 2004).

MikroRNA tvoří velkou skupinu jednovláknových nekódujících RNA o délce asi 22 nukleotidů, jež vznikají ve dvoustupňovém procesu z prekurzorových molekul primárních transkriptů miRNA (pri-miRNA) a prekurzorových miRNA (pre-miRNA). Jedná se o evolučně konzervované molekuly s různými funkcemi ve vývoji, buněčné diferenciaci, metabolismu a mnoha chorobných procesech včetně rakoviny (Mendelsohn *et al.*, 2008).

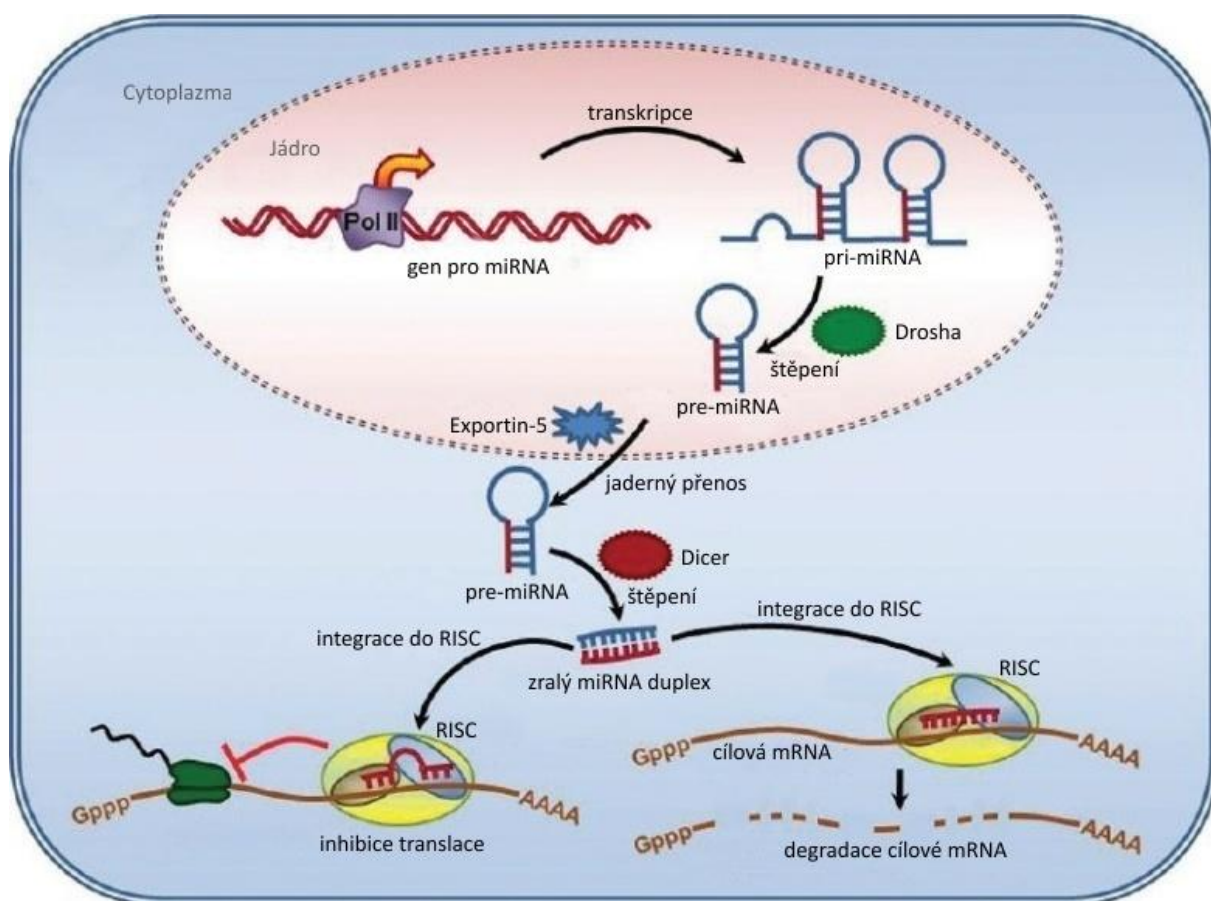
Molekuly miRNA se vyznačují vysokou stabilitou a oproti mediátorové RNA (mRNA) mají značnou výhodu v tom, že zůstávají intaktní i ve formálním fixovaném biologickém materiálu uloženém např. v parafinových bločcích, což umožňuje rozsáhlé retrospektivní studie. Hrají významnou roli v regulaci buněčné proliferace, přežívání, apoptóze a metabolismu a fungují také jako aktivátory onkogenních či antionkogenních signálů (Wang *et al.*, 2012). Podílí se též na regulaci kmenových vlastností buněk, imunitního systému či nádorové transformaci, přičemž stěžejní funkcí těchto RNA je post-transkripční regulace genové exprese u živočichů, rostlin i hub, která vede buďto k degradaci cílové mRNA, nebo k represí její translace a poté k snížení hladiny jejího proteinového produktu.

Podle databáze miRBase lidský genom obsahuje 1872 prekurzorových a 2578 zralých miRNA (<http://www.mirbase.org>). Ty mohou být lokalizovány buď mezi genovými sekvencemi – mezigenové miRNA, nebo v intronech – intronové miRNA. Předpokládá se, že miRNA mohou regulovat více než polovinu kódujících genů lidského genomu, přičemž každá miRNA je schopna regulovat řádově až stovky cílových mRNA. Z tohoto důvodu jsou tyto malé molekuly považovány za hojné a velmi výkonné regulační faktory. Díky svému potenciálu a funkci mají miRNA velký význam v molekulární patologii nádorových onemocnění, v diagnostice a terapii a v neposlední řadě jsou také významným předmětem pro farmaceutický průmysl vyvíjející léky cílené na miRNA. Průlom ve vývoji takových léků nastal v roce 2010, kdy do 2. fáze klinických testů vstoupil první lék na bázi miRNA. Využitelnost vybraných miRNA a jejich expresních profilů zejména ke stanovení přesné diagnózy a prognózy nádorových onemocnění nabývá čím dál většího významu (Slabý and Svoboda, 2012; Slabý *et al.*, 2008; Pecorino, 2008).

2.3.1 Biogeneze miRNA

Biogeneze miRNA je dvojstupňový proces, ve kterém molekuly miRNA vznikají z vlásečkových prekurzorů pri-miRNA a pre-miRNA. Syntéza miRNA probíhá v buněčném jádře (u živočichů také v cytoplazmě) za současného působení ribonukleas III, přičemž úkolem těchto enzymů je štěpit výše uvedené prekurzory na kratší molekuly. Mechanismus syntézy miRNA se u rostlin a živočichů liší. Zatímco u živočichů jde o dvojstupňový proces, který probíhá v jádře i cytoplazmě za působení dvou ribonukleas Drosha (působí v jádře) a Dicer (působí v cytoplazmě), u rostlin dochází k realizaci obou kroků pouze v jádře s uplatněním jediného proteinu DCL1.

Princip biogeneze miRNA u živočichů (Obrázek č. 2) spočívá v tom, že gen pro miRNA je v buněčném jádře transkribován do pri-miRNA (tyto primární transkripty bývají dlouhé i několik kilobází). Pri-miRNA jsou pomocí ribonukleasy Drosha našťipány asi na 70 nukleotidů dlouhé pre-miRNA, které vytváří nedokonalé vlásenkové struktury, jež jsou pomocí Exportinu-5 transportovány přes jaderné póry do cytoplazmy. Zde dojde vlivem aktivity ribonukleasy Dicer k rozštěpení molekuly pre-miRNA a následnému vzniku zralého miRNA duplexu o velikosti přibližně 22 bází. Následně dojde k integraci jednoho z vláken miRNA duplexu do multiproteinového komplexu RISC a druhé vlákno je okamžitě degradováno. Vzniklý komplex RISC-miRNA může buď inhibovat translaci, nebo degradovat cílové molekuly mRNA (Wahid *et al.*, 2010; Slabý *et al.*, 2008).



Obrázek č. 2: Schéma biogeneze miRNA u živočichů (upraveno dle Joshi *et al.*, 2011)

2.3.2 RNA interference

První popis RNA interference (RNAi) u živočichů, konkrétně u *C. elegans*, pochází z roku 1995. Jde o konzervovaný biologický jev patrný u hub, rostlin i živočichů, při němž se jako efektor uplatňují jednořetězcové nekódující RNA o délce 21-23 nukleotidů, které jsou komplementární k cílové mRNA. Těmito efektorovými molekulami mohou být miRNA nebo malé interferující RNA (siRNA). Po navázání efektorové molekuly na mRNA dojde ke vzniku dvouvláknové RNA (dsRNA), a tím k blokaci exprese genu, který je s touto dsRNA alespoň z části homologní. Tento způsob posttranskripční genové regulace probíhá v organismu přirozeně, ale může být navozen i uměle. Vědci se domnívají, že celý mechanismus RNAi vznikl jako obrana buněk proti virovým infekcím.

RNAi může být využita k přerušení průběhu biologických procesů inhibicí funkce specifických genů, a je tak jednou ze strategií genové terapie, jež je hojně využívána k umlčování genů v buňkách i celých organismech. Vzhledem k tomu, že RNAi může být použita pro regulaci genové exprese v určitých buněčných typech, má tento mechanismus do budoucna obrovský terapeutický potenciál například pro léčbu onkologických onemocnění či virových infekcí. Rozšířená schopnost eukaryotických organismů regulovat genovou expresi pomocí RNAi umožnila vědcům studovat následky RNAi u široké škály organismů včetně těch, jejichž genetická analýza je obtížná, pomalá nebo nemožná. RNAi se v současnosti používá k analýze funkce genů u ryb, hlodavců i lidí a také u jednodušších modelových organismů jakými jsou *C. elegans*, *D. melanogaster* (octomilka obecná) a *A. thaliana* (huseníček rolní) (Slabý and Svoboda, 2012; Snustad and Simmons, 2009; Appasani, 2005; Knowles and Selby 2005).

2.3.3 miR-21

Gen pro miR-21 je lokalizován na 17. chromozómu člověka v lokusu 17q23.2. Tato onkogenní miRNA je nadměrně exprimována u většiny solidních nádorů a působí jako onkogen, jenž je zaměřený na mnoho tumor-supresorových genů souvisejících s proliferací, apoptózou a invazivitou. *In vivo* a *in vitro* studie dokazují, že miR-21 může sloužit jako diagnostický a prognostický marker lidských malignit. Důležitá role této miRNA byla identifikována také v protinádorové lékové rezistenci, a stala se tak molekulárním cílem pro chemoterapii (Pan *et al.*, 2010). Další studie ukázaly, že kontroluje buněčný růst na základě inhibice apoptózy (Markou *et al.*, 2008). Bylo také prokázáno, že miR-21 vykazuje

zvýšenou expresi u karcinomu plic, prsu a glioblastomu. Nadměrná exprese miR-21 vede k deregulaci signální dráhy *Bcl-2* a změně prostředí rakovinných kmenových buněk, což má za následek zvýšení růstu nádoru a snížení apoptózy. Zvýšená exprese protoonkogenu *Bcl-2* vede ke zvyšování počtu kmenových buněk i rakovinných kmenových buněk a vyznačuje se anti-apoptotickým efektem. MiR-21 je tak příkladem miRNA se schopností regulace rakovinných kmenových buněk (Shostak, 2011).

2.3.4 miR-205

Gen pro miR-205 je lokalizován na 1. lidském chromozómu v lokusu 1q32.2. Tato miRNA je nadměrně exprimována především v nádorech hlavy, krku a děložního čípku. Její zvýšená exprese je evidentní i u karcinomu dělohy, rakoviny vaječníků či spinocelulárního karcinomu plic. V závislosti na typu buněčné linie může miR-205 fungovat jako onkogen nebo tumor supresorový gen (Markou *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012). Tento duální charakter dokládá i to, že miR-205 působí proti procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) a nádorové invazi, zatímco v nádorových buňkách vykazuje zvýšenou expresi a iniciuje růst a proliferaci nádoru. V rámci tkáňové exprese je miR-205 potencionálním biomarkerem pro rozlišení adenokarcinomu od spinocelulárního karcinomu plic (Aushev *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2013).

Jedním z cílů miR-205 jsou geny *ZEB1* a *ZEB2*, pomocí nichž je nepřímou regulována exprese adhezního glykoproteinu E-kadherinu. Jeho snížená exprese vede k vývoji rakovinného onemocnění a vzniku metastáz. MiR-205 společně s rodinou miR-200 inhibuje EMT regulací výše uvedených genů. Proces EMT je charakteristický redukcí buněčných adhezí a změnou polarizace epiteliálních buněk, jež později podléhají přeměně na více pohyblivé a invazivní mezenchymální buňky. Proces EMT je spojován s progresí rakovinného onemocnění, je charakterizován změnami v několika molekulárních drahách a je také považován za jeden ze zásadních faktorů pro vznik metastáz (Tellez *et al.*, 2011; Slabý and Svoboda, 2012; Qi and Mu, 2012).

3 CÍL PRÁCE

Cíle bakalářské práce lze shrnout do těchto bodů:

1. Vypracovat rešerši na téma: Sledování exprese vybraných miRNA v progenitorových buňkách nemalobuněčného karcinomu plic
2. Stanovit expresi miRNA (miR-21, miR-205) ve vzorcích pacientů s NSCLC
3. Zpracovat získané výsledky a stanovit prognostický význam exprese miRNA pro pacienty s NSCLC

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

Jako biologický materiál pro praktickou část bakalářské práce byly použity progenitorové buňky nemalobuněčného karcinomu plic 20 pacientů (Tabulka č. 2), získané z dehydratovaných preparátů pomocí laserové mikrodisekce, přičemž výchozím materiálem byly formalínem fixované a do parafínu zalité vzorky NSCLC. Všichni pacienti byli odoperováni na 1. Chirurgické klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc v letech 1997-2000.

Tabulka č. 2: Charakteristika a klinická data pacientů s NSCLC

Počet pacientů	Pohlaví		Věk		Typ nádoru		
	♂	♀	<60	≥60	ADC	SCC	LCC
20	18	2	11	9	10	8	2

4.2 Použité metody

4.2.1 Laserová mikrodisekce

Metodou laserové mikrodisekce (LCM) byly vyselektovány progenitorové buňky nemalobuněčného karcinomu plic 20 pacientů z dehydratované tkáně fixované na podložním sklíčku. Samotné LMC předcházela vizualizace progenitorových buněk NSCLC pomocí protilátky CD-133. Poté byly cílové buňky získány pomocí laserového mikrodisektoru – inverzního mikroskopu se zabudovaným nízko výkonnostním infračerveným laserem. Nejprve bylo na dehydratovaný preparát položeno víčko s termoplastickou membránou. Vlivem laserového pulzu na cílové buňky v předem vybraných oblastech preparátu došlo k vyřezání těchto buněk a k jejich následnému přilnutí na povrch víčka (Obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Vážky po LCM s přichycenými cílovými buňkami. Bílé okrsky na středech jednotlivých vážek představují vyselektované progenitorové buňky NSCLC.

4.2.2 Izolace celkové RNA z progenitorových buněk NSCLC

Z buněk získaných laserovou mikrodisekcí byla izolována RNA pomocí RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kitu AM 1975 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Vzorky postupně prošly štěpením proteasou, izolací nukleové kyseliny, štěpením a finální purifikací.

Prvním krokem izolace bylo štěpení pomocí proteasy. K jednotlivým vzorkům bylo do 1,5 ml zkumavky připipetováno 100 μ l štěpícího pufru a 2 μ l proteasy. Následovala krátká centrifugace a poté byly vzorky inkubovány 1,5 h v termobloku při 50 °C a následně dalších 15 min při 80 °C.

Po inkubaci bylo ke každému vzorku připipetováno 120 μ l izolačního aditiva, 275 μ l 100% etanolu a následovalo promíchání pipetováním. Dle počtu vzorků byly připraveny sběrné zkumavky s kolonkou, na kterou bylo napipetováno 700 μ l vzorku. Následovala centrifugace po dobu 30 s při 10 000 rpm při pokojové teplotě (RT), aby kapalina prošla přes kolonku a byla následně odstraněna.

Poté bylo na kolonku napipetováno 700 μ l promývacího roztoku Wash 1 a následovala opětovná centrifugace po dobu 30 s při 10 000 rpm při RT, aby kapalina prošla přes kolonku a mohla být odstraněna. Dále bylo na kolonku napipetováno 500 μ l promývacího roztoku Wash 2/3, byla provedena stejná centrifugace, jako v předchozích krocích a následné odstranění filtrátu. Prázdňá zkumavka s kolonkou byla podrobena další centrifugaci za stejných podmínek, aby byla odstraněna veškerá tekutina.

Následně bylo na střed každé kolonky napipetováno 60 μ l roztoku složeného z 50 μ l nuclease-free water, 6 μ l 10x DNase pufru a 4 μ l DNasy. Poté se zavřené zkumavky nechaly inkubovat 30 min při RT. Po inkubaci došlo k napipetování 700 μ l promývacího roztoku

Wash 1 na kolonku, inkubaci po dobu 30 s při RT a následné centrifugaci 30 s při 10 000 rpm při RT. Filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 500 μ l promývacího roztoku Wash 2/3. Poté byla provedena stejná centrifugace a odstranění filtrátu. Promytí pomocí roztoku Wash 2/3 bylo provedeno ještě jednou, stejně jako centrifugace a odstranění kapaliny. Následně byly sběrné zkumavky společně s kolonkami centrifugovány 1 min při 10 000 rpm při RT, kvůli odstranění zbývající kapaliny.

Na kolonky, které byly přemístěny do nových sběrných zkumavek, bylo napipetováno 60 μ l elučního roztoku. Po minutové inkubaci při RT následovala centrifugace po dobu 1 min při 14 680 rpm při RT. Získaný eluát obsahoval vyizolovanou RNA.

4.2.3 Měření koncentrace RNA

Vyizolovaná RNA byla podrobena spektrofotometrickému měření koncentrace na nanodropu. Samotnému měření koncentrace RNA předcházela optimalizace přístroje pomocí 1 μ l elučního roztoku. Pro měření koncentrace byl použit 1 μ l eluátu získaný izolací. Množství RNA v izolátu bylo zhodnoceno na základě poměrů hodnot absorbance při vlnových délkách 260/280 nm a 260/230 nm. Optimálně by se měl poměr vlnových délek 260/280 pohybovat v rozmezí hodnot 1,8-2,0.

4.2.4 Reverzní transkripce

Touto enzymatickou reakcí byla z vyizolované RNA získána komplementární DNA. Nejprve bylo potřeba napoolovat příslušné RT primery (miR-21, miR-205 a RNU6B) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) smícháním jejich stejných objemů. Následně byl připraven master mix obsahující tyto chemikálie: nuclease-free water, Reverse Transcription Buffer, 100 mol/l dNTPs, MultiScribeTM Reverse Transcriptase a RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Objemy výše uvedených komponent na přípravu master mixu pro 1 vzorek jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Po napipetování všech chemikálií do zkumavky byl celý objem jemně zvortexován a centrifugován. K 7 μ l master mixu bylo následně napipetováno 5 μ l vyizolované RNA o koncentraci 2 ng/ μ l a 3 μ l napoolovaných RT primerů. Obsah v mikrozkuhavce byl zvortexován, zcentrifugován a poté 5 minut inkubován na ledě. Po inkubaci byla mikrozkuhavka vložena do termocykléru, kde došlo k procesu reverzní transkripce (Tabulka č. 4).

Tabulka č. 3: Složení master mixu pro 1 vzorek

Chemikálie	Objem [μ l]
Nuclease-free water	4,16
Reverse Transcription Buffer	1,50
100 mM dNTPs	0,15
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	1,00
RNase Inhibitor	0,19

Tabulka č. 4: Cyklizační schéma reverzní transkripce

Reverzní transkripce	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]
1. krok	16	30
2. krok	42	30
3. krok	85	5
Chlazení	4	∞

4.2.5 Preamplifikace s napoolovanými miRNA assays

Pro provedení preamplifikace bylo za potřeby napoolovat TaqMan[®] MicroRNA assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) napipetováním 5 μ l miR-21, miR-205 a RNU6B do jedné zkumavky a doplněním vodou na objem 500 μ l. Celý obsah zkumavky byl následně krátce zvortexován. Dále bylo nutno připravit master mix složený z těchto chemikálií TaqMan[®] PreAmp Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), napoolované miRNA assays a cDNA získaná reverzní transkripcí (Tabulka č. 5). Po smíchání všech odpovídajících objemů potřebných komponent bylo provedeno zvortexování a centrifugace zkumavky. Poté byl vzorek vložen do termocykléru, kde proběhla preamplifikace (Tabulka č. 6).

Tabulka č. 5: Složení master mixu pro 1 vzorek

Chemikálie	Objem [μ l]
TaqMan [®] PreAmp Master Mix (2x)	12,5
Napoolované TaqMan [®] MicroRNA assays	6,25
cDNA	6,25

Tabulka č. 6: Cyklizační schéma preamplifikace

Preamplifikace	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10	
Denaturace	95	0,25	14
Annealing + elongace	60	4	
Chlazení	4	∞	

4.2.6 Real-time PCR s preamplifikovanými vzorky

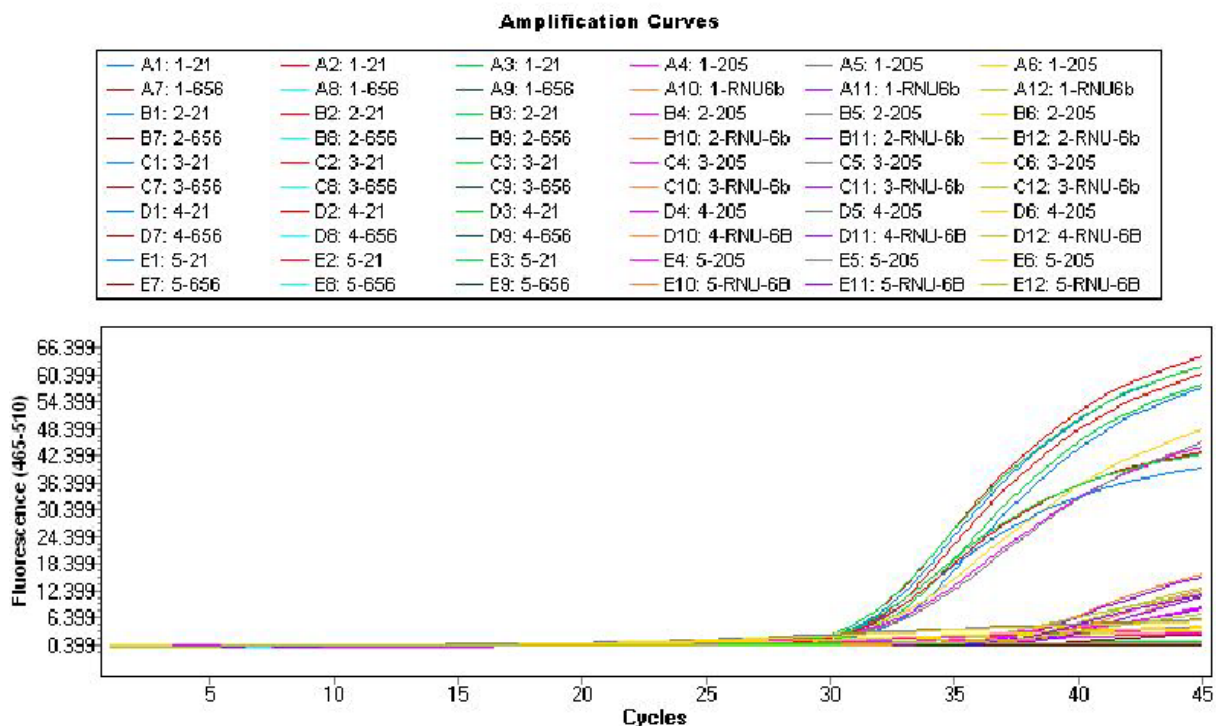
Pro realizaci tohoto kroku bylo nejprve nutno připravit master mix z těchto chemikálií: TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a nuclease-free water (Tabulka č. 7). Master mix byl poté rozpipetován po 21 μ l do stripů, jejichž počet odpovídal počtu sond a vzorků. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo následně k master mixu připipetováno 8,25 μ l příslušného preamplifikačního produktu, který bylo nejprve potřeba naředit v poměru 1:20 vodou a následně zvortexovat a zcentrifugovat. Následovalo připipetování 1,65 μ l odpovídajících TaqMan[®] MicroRNA assays (miR-21, miR-205, RNU6B) do jednotlivých mikrozkušavek. Poté bylo provedeno zvortexování, centrifugace a rozpipetování po 10 μ l do 96 jamkové mikrotitrační destičky. Každý vzorek byl napipetován do 3 jamek destičky. Destička byla zaizolována fólií, centrifugována 2 min při 1200 rpm a při RT a vložena do LightCycleru, kde proběhla real-time PCR (Tabulka č. 8).

Tabulka č. 7: Složení master mixu pro 1 vzorek

Chemikálie	Objem [μl]
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	5
Nuclease-free water	2

Tabulka č. 8: Cyklizační schéma real-time PCR

Preamplifikace	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10	
Denaturace	95	0,25	45
Annealing + elongace	60	1	
Chlazení	4	∞	



Obrázek č. 4: Ukázka výsledných amplifikačních křivek pro jednotlivé vzorky a příslušné sondy. Jde o závislost míry fluorescence na počtu cyklů, které proběhly při real-time PCR.

4.3 Vybavení laboratoře

Pro realizaci jednotlivých kroků praktické části bakalářské práce bylo využito tohoto laboratorního vybavení:

DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR	(Biosan)
Centrifuga LMC-3000	(Biosan)
Centrifuga 5424	(Eppendorf)
Hlubokomrazicí box Jouan VX 490 F	(Trigon-plus)
Laserový mikrodisektor VERITAS	(Arcturus)
LightCycler [®] 480 II	(Roche)
Kombinovaná chladnička	(Bosch)
Mikrocentrifuga PCV-2400	(Grant-bio)
Mikrocentrifuga Uni-fuge	(Carl Roth)
Mikropipety Eppendorf Research [®] Plus 0,1 až 1000 µl	(Eppendorf)
Mikropipety AgilePipettor [™] 1 až 1000 µl	(ACT Gene)
Nanodrop ND-1000	(Technologies)
Termocyklér AG 6325	(Eppendorf)
Termostat Accu block [™]	(Labnet)
Třepačka Vortex-genie 2	(Scientific Industries)

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení exprese miR-21 a miR-205 v progenitorových buňkách nemalobuněčného karcinomu plic

Pomocí laserové mikrodisekce byly vyselektovány progenitorové buňky nemalobuněčného karcinomu plic 20 pacientů. Z těchto buněk byla poté vyizolována celková RNA, která byla následně reverzní transkripcí převedena na cDNA. Dále byla tato cDNA preamplifikována s napoolovanými miRNA assays a po preamplifikaci byly vzorky podrobeny real-time PCR. Veškeré výsledky z real-time PCR jsou uvedeny v příloze.

5.2 Stanovení relativní kvantifikace miR-21 a miR-205 výpočtem na základě výsledků z real-time PCR

Relativní kvantifikace:

$$\Delta C_T = C_T \text{ vzorku} - C_T \text{ kalibrátoru}$$

Na základě tohoto výpočtu byla přesně srovnána exprese genu v jednotlivých vzorcích vůči kalibrátoru. Jako kalibrátor byla zvolena malá jaderná RNA U6B (RNU6B) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

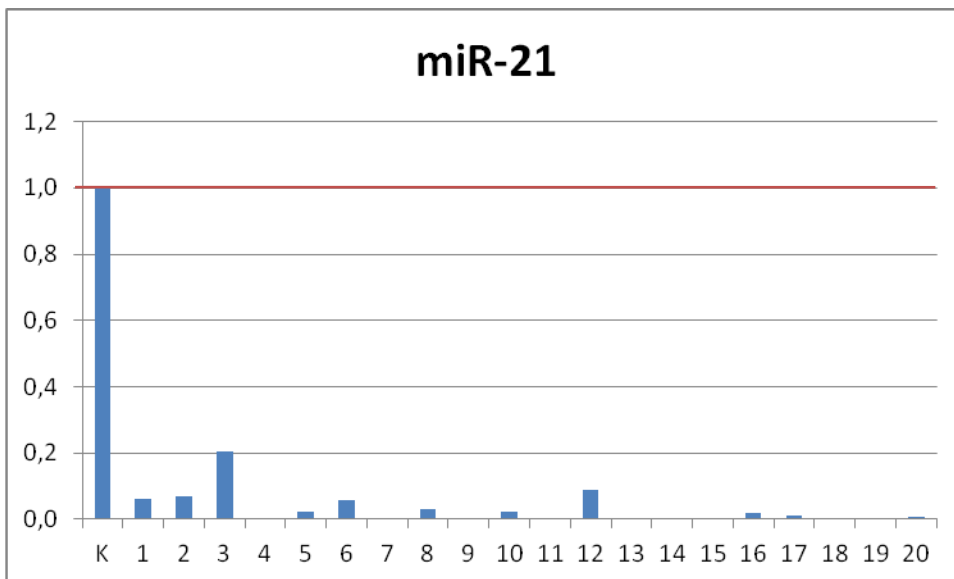
Relativní normalizovaná kvantifikace:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ refer. kontroly}) \text{ kalibrátoru} - (C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ refer. kontroly}) \text{ vzorku}$$

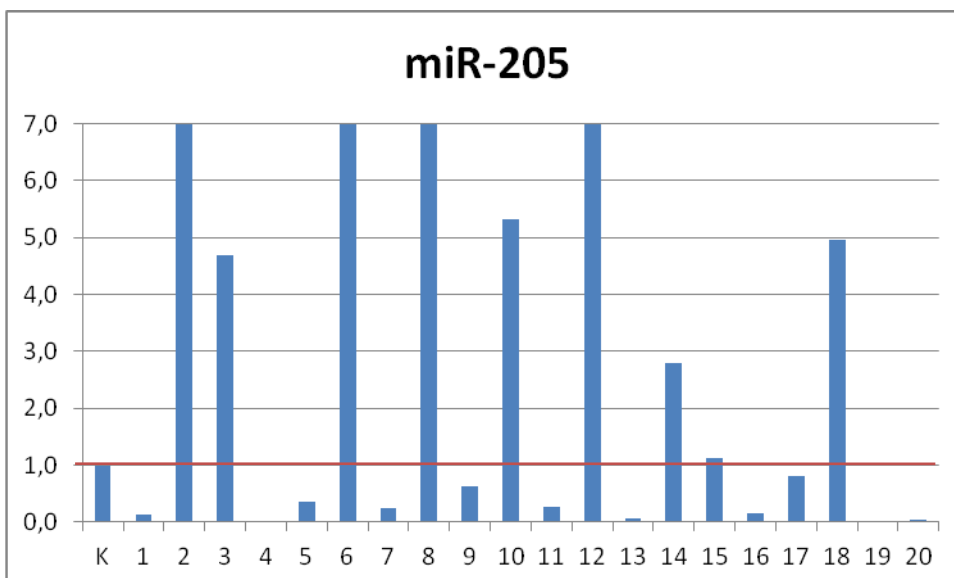
$$2^{\Delta\Delta C_T} = \text{relativní normalizovaná kvantifikace}$$

Tato rovnice je určena k normalizaci exprese cílového genu vůči referenčnímu genu. Jako referenční kontrola byla použita Human Lung Total RNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Výsledky výpočtů jsou uvedeny v příloze.

Výsledky kvantifikace exprese miR-21 a miR-205 u všech 20 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic získané užitím obou výše uvedených vzorců byly zaznamenány do grafů (Obrázek č. 5-6).



Obrázek č. 5: Relativní normalizovaná kvantifikace exprese miR-21 u 20 pacientů s NSCLC. V případě miR-21 nebyla ani u jednoho z 20 pacientů pozorována zvýšená exprese miR-21 vůči kontrole K (Human Lung Total RNA).



Obrázek č. 6: Relativní normalizovaná kvantifikace exprese miR-205 u 20 pacientů s NSCLC. V případě miR-205 byla pozorována zvýšená exprese vůči kontrole K (Human Lung Total RNA) u 9 pacientů.

6 DISKUSE

MiRNA jsou výkonné regulační molekuly, které mají neobyčejný význam v molekulární patologii nádorových onemocnění, jejich diagnostice i terapii. Ke stanovení přesné prognózy a diagnózy nádorových onemocnění je v posledních letech často využíváno expresních profilů klíčových miRNA.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo stanovit expresi miR-21 a miR-205 v progenitorových buňkách nemalobuněčného karcinomu plic 20 pacientů, zpracovat výsledky a poté na základě statistických metod stanovit prognostický význam exprese daných miRNA pro sledované pacienty.

MiR-21 je onkogenní miRNA, jejíž zvýšená exprese je prokázána nejen u pacientů s NSCLC. V rámci sledované skupiny 20 pacientů však nebyla prokázána zvýšená exprese miR-21 vůči kontrole (Human Lung Total RNA) u žádného z nich. Z tohoto důvodu nelze předpokládat její prognostický význam pro žádného ze sledovaných pacientů.

MiR-205 byla klasifikována jako vysoce specifický biomarker pro spinocelulární karcinom plic (Lebanony *et al.*, 2009), což umožňuje histologické rozlišení adenokarcinomu od spinocelulárního karcinomu, který oproti ADC vykazuje zvýšenou expresi této miRNA. V případě miR-205 byla prokázána zvýšená exprese vůči kontrole (Human Lung Total RNA) u 9 sledovaných pacientů. S využitím statistických metod však nebyl tento vztah prokázán jako signifikantní, a proto nemůže být stanoven ani prognostický význam exprese této miRNA. Signifikance nebyla pravděpodobně prokázána z důvodu málopočetné skupiny sledovaných pacientů, jež byla navíc značně heterogenní.

Athina Markou *et al.* (2008) ve své studii stanovili negativní prognostický význam zvýšené exprese miR-21 v NSCLC, kdy zvýšenou expresi této miRNA spojují se sníženým celkovým přežíváním pacientů. Wen Gao *et al.* (2010) pozorovali významnou souvislost mezi vysokou expresí miR-21 a kratším pooperačním přežíváním pacientů s NSCLC. Tým A. Markou dále přišel také k závěru, že zvýšená exprese miR-205 nebyla signifikantně spojena s celkovým přežíváním sledovaných pacientů. Pro účely své studie použili 48 párů čerstvě zmražené tkáně NSCLC odebrané v době chirurgické resekce a před chemoterapií.

Vzorky použité k výše uvedené studii se od vzorků použitých v této bakalářské práci liší formou (tkáň/progenitorové buňky), stářím a zpracováním biologického materiálu, což může být také důvodem rozdílných závěrů.

7 ZÁVĚR

První část mé bakalářské práce je věnována problematice nemalobuněčného karcinomu plic, jeho etiologii, histologii, diagnostice a terapii, ale také komplikacím v léčbě tohoto agresivního onemocnění, které je v současné době jedním z největších zdravotních, ale i sociálních problémů vyspělého světa. Dále je pozornost věnována kmenovým buňkám, jež jsou v rámci rakoviny plic velmi kontroverzním a svým způsobem stále záhadným tématem. Poslední kapitola se zabývá významnými regulátory genové exprese – molekulami mikroRNA, kterým je pro jejich obrovský potenciál v posledních letech věnována značná pozornost mnohých vědeckých skupin.

Praktická část této práce je zaměřena na sledování exprese miR-21 a miR-205 v progenitorových buňkách nemalobuněčného karcinomu plic 20 pacientů a také na stanovení prognostického významu exprese příslušných miRNA pro tyto pacienty. Na základě experimentů a následných výpočtů byla zvýšená exprese vůči referenční kontrole prokázána pouze v případě miR-205, a to u 9 prověřovaných pacientů. Naopak exprese miR-21 byla v rámci všech testovaných pacientů vůči referenční kontrole snížena. Prognostický význam exprese příslušných miRNA nebylo možné určit u žádného z pacientů.

8 LITERATURA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, USA, 1601 s

Alison, M.R., Lim, S.M.L., and Nicholson, L.J. (2011): Cancer stem cells: problems for therapy? *Journal of Pathology* 2011; 223: 147-161

Almeida, M.I., Reis, R.M., and Calin, G.A. (2011): MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research*; 717: 1-8

Alušíková, M., Mladá, J., Kotulková, M., Pospíšilová, B., Alušík, S., Fanta, J., Fendrich, Z., Haber, J., and Kramlová, J. (2007): Farmakoterapie karcinomu plic. *Farmakoterapeutické informace* 6/2007: 1-4

Appasani, K. (ed.) (2005): RNA interference technology from basic science to drug development. Cambridge University Press, New York, 561 s

Aushev, V.N., Zborovskaya, I.B., Laktionov, K.K., Girard, N., Cros, M., Herceg, Z., and Krutovskikh, V. (2013): Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*; 8: e78649

Bacelli, I., and Trumpp, A. (2012): The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The journal of cell biology*; 198: 281-293

Bartel B.P., (2004): MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*; 116: 281-297

Becker, H.D., Hohenberger, W., Junginger, T., and Schlag, P.M. (2005): Chirugická onkologie. Grada publishing, Praha, 880 s

Brychtová, S., and Hlobilková, A. (2008): Histopatologický atlas. Grada publishing, Praha, 112 s

Cagle, P.T., Allen, T.C., Beasley, M.B., Chirieac, L.R., Dacic, S., Borczuk, A.C., and Kerr, K.M. (2012): Molecular pathology of lung cancer. Springer, New York, 216 s

Čedíková, M., Krakorová, K., Miklíková, M., Hronová, M., Balandová, A., Pitule, P., and Králíčková, M. (2012): On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů. Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, 37 s

Doubek, M. (2008): Kmenové buňky a onkologie. *Onkologická péče* 02/08: 18-21

Dy, K.D., and Adjei, A.A. (2002a): Novel Targets for Lung Cancer Therapy: Part I. *Journal of Clinical Oncology*; 20: 2881-2894

Dy, K.D., and Adjei, A.A. (2002b): Novel Targets for Lung Cancer Therapy: Part II. *Journal of Clinical Oncology*; 20: 3016-3028

Ettinger, D.S., Bepler, G., Bueno, R., Chang, A., Chang, J.Y., Chirieac, L.R., D'Amico, T.A., Demmy, T.L., Feigenberg, S.J., Grannis, F.W. Jr., Jahan, T., Jahanzeb, M., Kessinger, A., Komaki, R., Kris, M.G., Langer, C.J., Le, Q.T., Martins, R., Otterson, G.A., Robert, F., Sugarbaker, D.J., and Wood, D.E. (2006): Non-small cell lung cancer clinical practice guidelines in oncology. *National comprehensive cancer network*; 4: 548-582

Fraumeni, J.F. (1975): Respiratory carcinogenesis: an epidemiologic appraisal. *Journal of the National Cancer Institute*; 55: 1039-1046

Gao, W., Yu, Y., Cao, H., Shen, H., Li, X., Pan, S., and Shu, Y. (2010): Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristic or patient prognosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 64: 399-408

- Ginsberg, M.S.** (2005): Epidemiology of lung cancer. *Seminars in rentgenology*; 40: 83-89
- Gkiozos, I., Charpidou, A., and Syrigos, K.** (2007): Developments in the treatment of non-small cell lung cancer. *Anticancer research*; 27: 2823-2828
- Grinberg-Rashi, E., Ofek, E., Perelman, M., Škarda, J., Yaron, P., Hajdúch, M., Jasmin, J.H., Amariglio, N., Krupsky, M., Simansky, D.A., Ram, Z., Pfeffer, R., Galernter, I., Steinberg, D.M., Ben-Dov, I., Rechavi, G., and Izraeli, S.** (2009): The expression of three genes in primary non-small cell lung cancer is associated with metastatic spread to the brain. *Clinical cancer research*: 1755-1761
- Hunter, K.W., Crawford, N.P.S., and Alsarraj, J.** (2008): Mechanisms of metatstasis. *Breast cancer research* 2008: 1-10
- Cherian, E., Nandhini, G., Kurian, A., and Rajkumar, K.** (2011): Stem cells. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, India, 133 s
- Janerich, D.T., Thompson, W.D., Varela, L.R., Greenwald, P., Chorost, S., Tucci, C., Zaman, M.B., Melamed, M.R., Kiely, M., and McKneally, M. F.** (1990): Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *The New England Journal of Medicine*; 323: 632-636
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., and Verfaillie, C.M.** (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- Joshi, S.R., McLendon, J.M., Comer, B.S., and Gerthoffer, W.T.** (2011): MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular dinase. *Pulmonary Circulation*; 1: 357-364
- Keith, W.N.** (2004). From stem cells to cancer: balancing imortality and neoplasia. *Oncogene*; 23: 5092-5094

Klein, J. (2006): Chirurgie karcinomu plic. Grada publishing, Praha, 220 s

Knowles, M., and Selby, P. (eds.) (2005): Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press Inc., New York, 532 s

Koledová, Z., Divoký, V., Horváthová, M., and Fellnerová, I. (2011): Kmenové buňky využití ve výzkumu a klinické praxi. Univerzita Palackého v Olomouci, 54 s

Lebanony, D., Benjamin, H., Gilad, S., Ezagouri, M., Dov, A., Ashkenazi, K., Gefen, N., Izraeli, S., Rechavi, G., Pass, H., Nonaka, D., Li, J., Spector, Y., Rosenfeld, N., Chajut, A., Cohen, D., Aharonov, R. and Mansukhani, M. (2009): Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *Journal of Oncology*; 27: 2030-2037

Loo, B.W. (2011): Stereotactic ablative radiotherapy (SABR) for lung cancer: What does the future hold? *Journal of Thoracic Disease* 2011; 3: 150-152

Lüllmann-Rauch, R. (2012): Histologie. Grada publishing, Praha, 576 s

Marek, J. (ed.) (2010): Farmakoterapie vnitřních nemocí. Grada publishing, Praha, 808 s

Marel, M. (2012): Vývojové trendy a léčba nemalobuněčného plicního karcinomu. *Postgraduální medicína 08/2013*: 61

Markou, A., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulis, V., and Lianidou, E.S. (2008): Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clinical Chemistry*; 54: 1696-1704

Masopust, J. (2008): Kmenové buňky a vznik nádorového onemocnění. Tumorigeneze jako onemocnění kmenových buněk (1. část). *Labor Aktuell 01/08*: 4-8

McLennan, A., Bates, A., Turner, P., and White, M. (2013): Molecular biology. Garland Science, New York, 382 s

Meerbeeck, J.P., Fennell, D.A., and Ruyscher, D.K.M. (2011): Small-cell lung cancer. *The Lancet*; 378: 1741-1755

Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., and Thompson, C.B. (eds.) (2008): The molecular basis of cancer. Saunders, Philadelphia, 757 s

Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., and Adjei, A.A. (2008): Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*; 83: 584-594

Morgan, D.O. (2007): The cell cycle: Principles of kontrol. New Science Press Ltd, London, 297 s

Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., and Cwierka, K. (2000): Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. I. Typická MDR. *Klinická onkologie, zvláštní číslo 2/2000*: 4-9

Pan, X., Wang, Z., and Wang R. (2010): MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biology & Therapy*; 10: 1224-1232

Pass, H.I., Carbone, D.P., Johnson, D.H., Minna, J.D., Scagliotti, G.V., and Turrisi, A.T. (2010): Principles and Practice of Lung Cancer: The Official Reference Text of the IASLC. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1040 s

Passlik, B., Kubuschock, B., Siemel, W., Thetter, O., Pantel, K., and Izbicki, J.R. (2002): Mediastinal lymphadenectomy in non- small cell lung cancer: effectiveness in patients with or without nodal micrometastases- results of a preliminary study. *European Journal Cardio-Thoracic Surgery* 2002; 21; 520-526

Pecorino, L. (2008): Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford University Press Inc., New York, 316 s

Pešek, M. (2009): Bronchogenní karcinom a jeho prognostické a prediktivní faktory. *Onkologie* 2009; 3: 209-302

Pine, S.R., Marshall, B., and Varticovski, L. (2008): Lung cancer stem cells. *Disease Markers*; 24: 257-266

Qi, J., and Mu, D. (2012): MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications. *Frontiers of Medicine*; 6: 134-155

Qin, A.Y., Zhang, X.W., Liu, L., Yu, J.P., Li, H., Wang, S.Z.E., Ren, X.B. and Cao, S. (2013): MiR-205 in cancer: An angel or a devil? *European Journal of Cell Biology*; 92: 54-60

Raz, D.J., Kim, J.Y., and Jablons, D.M. (2007): Diagnosis and treatment of bronchioloalveolar carcinoma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2007; 13: 290-296

Ryška, A. (2012): Terapeutické ovlivnění nádorové angiogeneze – lze predikovat odpověď na antiangiogenní léčbu? *Labor Aktuell*; 1: 6-12

Sagar, J., Chaib, B., Sales, K., Winslet, M., and Seifalian, A. (2007). Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell International*; 7: 9

Salama, R., Tang, J., Gadgeel, S.M., Ahmad, A., and Sarkar, F.H. (2012): Lung cancer stem cells: Current progress and future perspectives. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*; special 2012; 2: 1-7

Salomaa, E.R., Sa'llinen, S., Hiekkanen, H., and Liippo, K. (2005): Delays in the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *Chest Journal* 2005; 128: 2282-2288

Sasaki, T., Rodig, S.J., Chirieac, L.R., and Jänne, P.A. (2010): The biology and treatment of *EML4-ALK* non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*; 46: 1773-1780

Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2003): Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences*; 26: 125-131

Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabárbara, P., and Seymour, L. (2005): Erlotinib in previously treated non small cell lung cancer. *The new England journal of medicine*; 353: 123-132

Shostak, S. (2011): Cancer stem cells theories and practice. InTech, Rijeka, 442 s

Skříčková, J., Čoupek, P., Babičková, L., Tomíšková, M., Kaplanová, J., Princ, D., Kadlec, B., and Špelda, S. (2008): Léčebné postupy u nemalobuněčného karcinomu plic. *Klinická onkologie*; 21: 317-328

Skříčková, J., Babičková, L., and Špeldová, J. (2009): Postavení chemoterapie v léčbě karcinomu plic. *Onkologie* 2009; 3: 285-291

Skříčková, J., Tomíšková, M., Babičková, L., Kadlec, B., and Špeldová, J. (2010): Karcinom plic – aktuální stav léčby. *Lékařské listy, Zdravotnické noviny* 1: 25-28

Slabý O., Křekáč D., Hrstka R., Svoboda M. and Vyzula R. (2008): Zapojení mikroRNA do patogeneze nádorových onemocnění a možnosti jejich využití v diagnostické a prediktivní onkologii. *Časopis lékařů českých*; 147: 25-31

Slabý, O., and Svoboda, M. (eds.) (2012): MikroRNA v onkologii. Galén, Praha, 324 s

Sleeman, J.P., Christofori, G., Fodde, R., Collard, J.G., Berx, G., Decraene, C., and Rüegg, C. (2012): Concepts of metastasis in flux: The stromal progression model. *Seminars in Cancer Biology*; 22: 174-186

- Snustad, D.P., and Simmons, M.J.** (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno, 871 s
- Soltysova, A., Altanerova, V., and Altaner, C.** (2005): Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005; 52: 435-440
- Stolz, A., Pafko, P., Bicek, V., Lischke, R., Schützner, J., and Šimonek, J.** (2010): Komplikace v plicní chirurgii. Grada publishing, Praha, 240 s
- Sullivan, J.P., Minna, J.D., and Shay, J.W.** (2010): Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Review*; 29: 61-72
- Tellez, C.S., Juri, D.E., Do, K., Bernauer, A.M., Thomas, C.L., Damiani, L.A., Tessema, M., Leng, S., and Belinsky, S.A.** (2011): EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer Research*; 71: 3087-3097
- Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H.K., and Harris, C.C.** (2004): Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press, Lyon, 344 s
- Vorlíčková, H., and Sýkorová, Z.** (2007): Protinádorová chemoterapie. *Onkologická péče*; 2: 17-18
- Wahbah, M., Boroumand, N., Castro, C., El-Zeky, F., and Eltorkey, M.** (2007): Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Annals of Diagnostic Pathology*; 11: 89-96
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. and Kim, Y.Y.** (2010): MicroRNA: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*; 1803: 1231-1243

Wang, Q., Wang, S., Wang, H., Li, P., and Ma, Z. (2012): MicroRNAs: novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment. *Experimental Biology and Medicine*; 237: 227-235

Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*; 100: 157-168

White, B., Baker, M., Baldwin, D., Barnard, S., Braybrooke, J., Cane, P., Entwisle, J., Fox, J., Haswell, T., Hatton, M., Knoyle, D., Neal, R., Page, R., Park, B., Pascoe, S., Peake, M., Rintoul, R., Wilcock, A., and Yohannes, A. (2011): The diagnosis and treatment of lung cancer (update). National Collaborating Centre for Cancer, Cardiff, 178 s

White, J., and Dalton, S. (2005): Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*; 1: 131-138

Williams, C. (1992): Lung cancer, the facts. Oxford University Press, London, 148 s

Wu, Y. and Wu, P.Y. (2009): CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem cells and development* 06/2009; 18: 1127-34

Xie, H., Zhao, Y., Caramuta, S., Larsson, C., and Lui, W. (2012): miR-205 expression promotes cell proliferation and migration of human cervical cancer cells. *PLoS ONE*; 7: e46990

Zatloukal, P. (2010): Cílená léčba nemalobuněčného karcinomu plic. *Medical Tribune* 6/2010: B6-B7

Internetové zdroje:

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADC	adenocarcinoma (adenokarcinom)
ASCs	adult stem cells (adultní kmenové buňky)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementární deoxyribonukleová kyselina)
CSCs	cancer stem cells (rakovinné kmenové buňky)
DCL1	endoribonuclease Dicer-like 1 (endoribonukleasa Dicer-like 1)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate (deoxynukleosid 5'-trifosfát)
dsRNA	double-stranded RNA (dvouvláknová RNA)
EGFR	epidermal growth factor receptor (receptor pro epidermální růstový faktor)
EMT	epithelial mesenchymal transition (epiteliálně-mezenchymální tranzice)
ESCs	embryonic stem cells (embryonální kmenové buňky)
LCC	large cell carcinoma (velkobuněčný karcinom)
LCM	laser capture microdissection (laserová mikrodisekce)
mRNA	messenger ribonucleic acid (mediátorová ribonukleová kyselina)
miRNA	microRNA (mikroRNA)
NSCLC	non-small cell lung carcinoma (nemalobuněčný karcinom plic)
PCR	polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
pre-miRNA	precursor microRNA (prekurzorová mikroRNA)
pri-miRNA	primary transcript of microRNA (primární transkript mikroRNA)
RISC	RNA-induced silencing complex (multiproteinový komplex asociovaný s miRNA)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RNAi	RNA interference
RT	room temperature/reverse transcription (pokojová teplota/reverzní transkripce)

SABR	stereotactic ablative radiotherapy (stereotaktická ablační radioterapie)
SCC	squamous cell carcinoma (skvamozní/spinocelulární karcinom)
SCLC	small cell lung carcinoma (malobuněčný karcinom plic)
siRNA	small interfering RNA (malá interferující RNA)
VEGF	vascular endothelial growth factor (růstový faktor cévního endotelu)

10 PŘÍLOHY

orientační číslo	histologické číslo pacienta	miR-21	$\Delta\text{Ct } 21$	$\Delta\Delta\text{Ct } 21$	$2^{\Delta\Delta\text{Ct } 21}$ =poměr gen ku kalibrátoru	miR-205	$\Delta\text{Ct } 205$	$\Delta\Delta\text{Ct } 205$	$2^{\Delta\Delta\text{Ct } 205}$ =poměr gen ku kalibrátoru	RNU6B
K	K3 (Human Lung Total RNA)	16,93	-10,32	0,00	1,000000000	25,41	-1,84	0,00	1,000000000	27,25
1	H14137/98RCH	31,96	-6,25	-4,07	0,059539875	39,27	1,06	-2,90	0,133971683	38,21
2	H7803/00A	31,13	-6,42	-3,90	0,066985841	32,48	-5,07	3,23	9,382679594	37,55
3	H6677/00G	30,83	-8,03	-2,29	0,204475515	34,79	-4,07	2,23	4,691339797	38,86
4	H14162/00D	30,92	-1,22	-9,10	0,001822330	35,71	3,57	-5,41	0,023519480	32,14
5	H1706/99E	30,95	-4,96	-5,36	0,024348893	35,55	-0,36	-1,48	0,358488812	35,91
6	H21222/99E	30,99	-6,23	-4,09	0,058720172	31,82	-5,40	3,56	11,794153738	37,22
7	H6662/98B	33,34	1,61	-11,93	0,000256278	31,92	0,19	-2,03	0,244855074	31,73
8	H7785/98C	31,82	-5,28	-5,04	0,030395467	31,91	-5,19	3,35	10,196485019	37,10
9	H12595/00D	32,22	0,33	-10,65	0,000622344	30,74	-1,15	-0,69	0,619853850	31,89
10	H12813/00X	27,80	-4,94	-5,38	0,024013675	28,49	-4,25	2,41	5,314743256	32,74
11	H21119/99CH	29,88	-1,82	-8,50	0,002762136	31,71	0,01	-1,85	0,277392368	31,70
12	H14019/97A	30,62	-6,79	-3,53	0,086569342	29,93	-7,48	5,64	49,866533098	37,41
13	H19530/99B	31,28	-0,03	-10,29	0,000798732	33,38	2,07	-3,91	0,066523136	31,31
14	H9109/00G	30,58	-2,15	-8,17	0,003472042	29,41	-3,32	1,48	2,789487333	32,73
15	H16503/99J	29,39	-2,47	-7,85	0,004334256	29,85	-2,01	0,17	1,125058485	31,86
16	H3322/00D	26,56	-4,46	-5,86	0,017217267	31,85	0,83	-2,67	0,157126672	31,02
17	H11805/00A	29,02	-3,52	-6,80	0,008974206	31,02	-1,52	-0,32	0,801069878	32,54
18	H19078/00D	29,88	-2,13	-8,19	0,003424241	27,86	-4,15	2,31	4,958830800	32,01
19	H23171/00D	30,53	-1,70	-8,62	0,002541683	36,73	4,50	-6,34	0,012344395	32,23
20	H12813/00D	29,99	-3,24	-7,08	0,007391075	36,28	3,05	-4,89	0,033725882	33,23