

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav klinické a molekulární patologie

Laboratoř molekulární patologie



**Detekcia nových prediktorov mnohopočetnej
liekovej rezistencie u nemalobunkových
karcinómov pľúc s ohľadom na ich histogenézu.**

Dizertačná práca

Mgr. Mária Janíková

Študijný program: Lékařská biologie

Forma štúdia: Prezenční

Olomouc 2015

Školiteľ: MUDr. et MVDr. Jozef Škarda, Ph.D. et Ph.D.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto prácu vypracovala samostatne. Všetky literárne zdroje využité v tejto práci, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

V tejto práci sú uvedené výsledky imunohistochemickej analýzy, ktoré boli získané v spolupráci s prof. MUDr. Zdeňkom Kolářom, CSc. Na štatistickom spracovaní a interpretácii výsledkov sa podieľali Mgr. Lenka Radová, Ph.D. a MUDr. Gvantsa Kharaishvili, Ph.D. s manželom Mgr. Giorgim Mgebrishvilim.

Vznik tejto práce bol podporený grantami MŠMT MSM 6198959216, MŠMT 61875921, IGA MZ ČR 10259-3, IGA MZ ČR 9959-3, IGA MZ ČR NT13569, GAČR 303/09/H048, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, NPU I LO1304 a internými grantami UP 91110281, LF_2011_009, LF_2013_006 a LF_2014_003.

V Olomouci

.....

Mgr. Mária Janíková

SÚHRN

Mnohopočetná lieková rezistencia (MDR) predstavuje v liečbe karcinómov pľúc veľký problém. Preto pre pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) má mimoriadny význam cieľená terapia. Táto terapia im dokáže významne zlepšiť zdravotný stav, avšak je finančne náročná, a je vhodná len pre vybranú skupinu pacientov, majúcich vo svojom genóme určité zmeny. Preto väčšina pacientov s NSCLC stále podstupuje liečbu klasickými postupmi, a to hlavne rádioterapiou a chemoterapiou. Práve aktivácia MDR mechanizmov umožňuje nádorovým bunkám odolávať účinkom protinádorovej terapie. Medzi základné mechanizmy MDR patria napr. aktívny transport liečiva z bunky pomocou transportérových proteínov (napr. P-gp, MRP a LRP/MVP), podpora proliferácie a únik apoptóze, či aktivácia molekúl podieľajúcich sa na opravách poškodenej DNA (DDR). Preto, identifikácia molekúl schopných rozpoznať aktiváciu týchto MDR mechanizmov v ich počiatku by mohla pomôcť pri určovaní prognózy a odpovede pacientov na podávanú terapiu. V prvom rade je však nevyhnutné určenie správnej diagnózy a rozčlenenie do jednotlivých histologických podtypov (hlavne spinocelulárny karcinóm a adenokarcinóm), pretože od toho závisí nastavenie terapeutického režimu.

Jedným z cieľov tejto dizertačnej práce bola identifikácia nádorových kmeňových buniek (CSC), ktoré, podobne ako normálne kmeňové bunky, majú aktivované dráhy chrániace ich pred toxickými účinkami rôznych xenobiotík (teda aj pred chemoterapiou). CSC teda predstavujú skupinu buniek s prirodzene aktivovanými mechanizmami MDR. Navyše, tieto bunky bývajú väčšinou v dormantnom štádiu, a vďaka tomu dokážu odolávať účinkom bežne používanej protinádorovej terapie, účinkujúcej hlavne proti rýchlo sa deliacim bunkám. Pomocou imunohistochemie a dvojitej imunofluorescencie sme v tkanivách získaných od pacientov s NSCLC, a zaliatych do parafínu (FFPE), identifikovali bunky exprimujúce markery charakteristické pre nádorové kmeňové bunky – CD133 a Nestin. Ich výskyt svedčí o prítomnosti buniek, ktoré dokážu odolávať účinkom chemoterapie. To teda môže viesť k rekurencii ochorenia, resp. k založeniu metastáz.

Ďalším cieľom tejto práce bolo určiť význam novo-navrhovaných biomarkerov na poli mikroRNA (miRNA) u našich pacientov s NSCLC. MiRNA sú krátke, približne 22 nukleotidov dlhé, jednovláknové molekuly RNA. Slúžia ako post-transkripčné regulátory

Nepublikované výsledky

Záverom, naše výsledky poukazujú na to, že identifikácia CD133⁺/Nestin⁺ buniek by mohla byť využitá k potenciálnej detekcii CSC vo FFPE vzorkách pacientov s NSCLC. Tieto bunky môžu prispievať k rekurencii a k šíreniu ochorenia, resp. k odolávaniu účinkom chemoterapie.

Kľúčové slová: nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC), mnohopočetná lieková rezistencia (MDR), nádorové kmeňové bunky (CSC), mikroRNA (miRNA)

SUMMARY

Multidrug resistance (MDR) represents a major problem in treatment of lung cancer. Therefore, targeted therapy of patients with NSCLC is of crucial importance. This therapy is able to significantly improve health status of the patients but this treatment is expensive and it is suitable only for a selected group of patients having specific changes in their genomes. Therefore, the most patients with NSCLC still undergo conventional therapy, mainly radiotherapy and chemotherapy. Activation of MDR mechanisms allows tumour cells survive anti-tumour therapy. Examples of the basic mechanisms of MDR are active transport of the drug out of the cell by various transporter proteins (e.g. P-gp, MRP and LRP/MVP), support of proliferation and escape from apoptosis or activation of molecules involved in DNA damage response (DDR). Thus, identifying of molecules which are able to recognize activation of these MDR mechanisms in their beginnings could help with assessing prognosis and response of patients to the administered treatment. Firstly, it is necessary to determine the proper diagnosis and specification of individual histological subtypes of cancer (particularly squamous cell carcinoma and adenocarcinoma) because the setting of the therapeutic regimen depends on proper diagnosis.

One of the aims of this thesis was the identification of cancer stem cells (CSCs) which, similarly to normal stem cells, are able to protect themselves against the toxic effects of various xenobiotics (including chemotherapy). CSCs represent the group of cells with activated MDR mechanisms. Moreover, these cells are mostly in dormant stage enabling them resistance to commonly used anticancer treatment which predominantly targets rapidly proliferating cells. We identified cells expressing markers of CSCs - CD133 and Nestin by immunohistochemistry and double immunofluorescence on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues obtained from NSCLC patients. Their occurrence suggests the presence of cells which are able to resist the chemotherapy. It may lead to disease recurrence, respectively to establishment of metastases.

This thesis is also focused on determination of significance of the newly-proposed biomarkers in the field of microRNAs (miRNAs) in our patients with NSCLC. MiRNAs are short, circa 22 nucleotides in length, single stranded RNA molecules. They serve as post-transcriptional regulators of proteosynthesis. Thereby they participate in many biological processes and their deregulation has been associated with various diseases. They

Nepublikované výsledky

In conclusion, our results indicate that identification of CD133⁺/Nestin⁺ cells could be used for potential detection of CSCs in FFPE from NSCLC. These cells can contribute to the recurrence and spreading of the disease; respectively to the resistance to the chemotherapy.

Key words: non-small cell lung cancer (NSCLC), multidrug resistance (MDR), cancer stem cell (CSC), microRNA (miRNA)

Pod'akovanie

Predovšetkým by som chcela veľmi pekne poďakovať môjmu školiteľovi MUDr. *et* MVDr. Jozefovi Škardovi, Ph.D. *et* Ph.D. za jeho cenné rady, trpezlivosť, podporu a ochotu. Navyše, moje poďakovanie tiež patrí prof. MUDr. Jířimu Ehrmannovi, Ph.D., prof. MUDr. Zdeňkovi Kolářovi, CSc. a kolegom a priateľom z University of Birmingham z Veľkej Británie, ktorí mi pomohli prekonať najťažšie chvíle života. Bez ich pochopenia a ústretovosti by som v tejto práci nepokračovala. Rovnako ďakujem ostatným kolegom z Ústavu klinickej a molekulárnej patológie, ktorí po celé tie roky pri mne stáli, počúvali ma, radili mi, a pomáhali mi zvládať rôzne prekážky. Zároveň nemôžem zabudnúť na pomoc a podporu kolegov z iných pracovísk, ktorí sa ma ujali a prijali ma medzi seba, a to hlavne z Ústavu lekárskej genetiky, z Ústavu histológie a embryológie, a z Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, LF UP a FN Olomouc.

Z celého srdca tiež veľmi ďakujem mojim rodičom, ktorí po celé tie roky pri mne stáli „v dobrom i zlom“, podporovali a posilňovali ma, ako len mohli. Nemenej ďakujem aj celej mojej rodine, ktorá verila, že to zvládnem a tolerovala moju častú zaneprázdnenosť. V neposlednom rade tiež ďakujem mojim spolubývajúcim, priateľom a známym, ktorí mi pomáhali reštartovať sa a pravidelne ma povzbudzovali do ďalšieho boja.

1	Úvod	9
2	Súčasný stav riešenej problematiky	10
2.1	Nemalobunkový karcinóm pľúc	10
2.1.1	Klasifikácia NSCLC	10
2.1.2	Liečba NSCLC	12
2.2	Mnohopočetná lieková rezistencia	13
2.2.1	Transport liečiv	15
2.2.2	Nádorové kmeňové bunky (CSC)	19
2.3	MikroRNA	22
2.3.1	Objav mikroRNA a RNA interferencie	22
2.3.2	Biogenéza a funkcia miRNA	23
2.3.3	Úloha miRNA v nádoroch	25
2.3.4	miRNA ako biomarkery NSCLC	26
2.3.5	Využitie miRNA v terapii NSCLC	28
3	Ciele práce	30
4	Materiál a metodika	31
4.1	Biologický materiál a charakteristika pacientov	31
4.2	Príprava tkanivových mikroerejí	33
4.3	Imunohistochemické farbenie	34
4.4	Dvojité imunofluorescenčné farbenie	37
4.5	Relatívna kvantifikácia vybraných miRNA	38
4.5.1	Izolácia celkovej RNA	39
4.5.2	Reverzná transkripcia	40
4.5.3	Preamplifikácia	42
4.5.4	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qPCR)	42
4.6	Štatistická analýza	44
5	Výsledky	45
5.1	Identifikácia buniek nesúcich znaky nádorových kmeňových buniek v NSCLC	45
5.1.1	Imunohistochemia	45
5.1.2	Imunofluorescencia	48
5.1.3	Štatistická analýza	49
5.2	Možná úloha vybraných miRNA ako biomarkerov NSCLC	51
5.2.1	Relatívna kvantifikácia vybraných miRNA	51

5.2.2	Imunohistochemia	53
5.2.3	Štatistická analýza	55
6	Diskusia	62
6.1	Identifikácia buniek nesúcich znaky nádorových kmeňových buniek v NSCLC.....	62
6.2	Možná úloha vybraných miRNA ako biomarkerov NSCLC	67
7	Záver	71
8	Zoznam použitých skratiek	73
9	Prehľad publikácií autora	77
10	Referencie	83

1 ÚVOD

Nádorové ochorenia v súčasnosti predstavujú celospoločenský problém. Vďaka ich stúpajúcej incidencii je vyvíjaná obrovská snaha pomôcť takto trpiacim pacientom. V terapii solidných nádorov sa hľadajú nové možnosti vylepšenia diagnostiky, sledovania pacientov a účinnosti terapie, a samozrejme, i nové liečivá.

Kvalitná diagnostika umožňuje určiť konkrétny typ rakoviny, čo je podmienkou pre správny výber vhodného terapeutického režimu. Účinná terapia skvalitňuje a predlžuje život pacienta, a v niektorých prípadoch ho dokonca aj celkom zachráni. U niektorých pacientov však po určitom čase dôjde k relapsu ochorenia – hovoríme, že nádor sa stal rezistentný na danú terapiu. V prípade, že nemáme k dispozícii inú účinnú terapiu, pacient ochoreniu podľahne.

Na to, aby sme mohli sledovať vývoj a rast nádoru, účinnosť terapie a následný vznik rezistencie, potrebujeme poznať faktory, ktoré nám to umožnia. Označujú sa ako tzv. biomarkery. Diagnostické markery slúžia k presnej typizácii nádorov. Prognostické markery hovoria, ako sa bude ochorenie ďalej vyvíjať. Prediktívne markery predpovedajú odpoveď pacienta na určitú terapiu.

V biológii sú najčastejšie používané dva typy biomarkerov: proteínové a genetické. Ako proteínové markery sú označované rôzne molekuly (napr. enzýmy, štruktúrne a transportné proteíny, receptory alebo povrchové molekuly charakterizujúce jednotlivé bunkové typy). Medzi genetické markery zaraďujeme napr. informácie o sekvencii DNA.

V súčasnosti zaznamenal veľký rozmach výskum na poli nekódujúcich RNA. V rámci tejto rôznorodej skupiny molekúl sa ako vhodné biomarkery javia hlavne mikroRNA (miRNA). Ich funkciou je regulácia hladín proteínov v bunkách, vďaka čomu sú tiež navrhnuté za kandidátne molekuly pre využitie v cielej terapii. Po určení molekulárneho profilu pacienta by teda bolo možné „ušiť mu terapiu na mieru“, a tým mu zachrániť jeho život.

V tejto práci som sa zamerala na vyhľadávanie a identifikáciu nových markerov u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc. Ak by sa ich podarilo zaviesť do praxe, bolo by možné roztriediť pacientov do jednotlivých skupín, a tak vybrať vhodný liečebný režim, ktorý by umožnil predísť vzniku liekovej rezistencie.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 NEMALOBUNKOVÝ KARCINÓM PLŮC

Karcinóm pľúc je najčastejšou príčinou úmrtia na rakovinu vo svete i u nás [1, 2]. Základom pre výber vhodnej liečby je určenie presného histologického podtypu. V klinickej praxi sa ešte stále používa rozdelenie na dva základné typy, a to malobunkový (SCLC) a nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) [3]. NSCLC sa vyskytuje častejšie, predstavuje približne 80-85% prípadov karcinómov pľúc [4]. V závislosti od príslušnosti karcinómu do jednej z týchto dvoch skupín bola pacientom podávaná príslušná terapia. Pacienti so SCLC sú v prvých mesiacoch obzvlášť citliví ako na rádio-, tak aj na chemoterapiu, no po krátkom čase dochádza k relapsu ochorenia a k šíreniu metastáz založených už v skorých štádiách ochorenia. U pacientov s NSCLC má rádio- a chemoterapia nižšiu účinnosť [5].

V nedávnej dobe spôsobila revolúciu v liečbe rakoviny tzv. biologická (cielená) liečba. V prípade NSCLC sa využívajú buď monoklonálne protilátky alebo nízkomolekulárne tyrozín-kinázové inhibítory [6]. Táto liečba je drahá a účinná iba u určitej skupiny pacientov. Na ich identifikáciu je nutná presnejšia klasifikácia nádorov do jednotlivých podtypov.

2.1.1 KLASIFIKÁCIA NSCLC

Do skupiny NSCLC sa zaraďujú tieto histologické podtypy: skvamózny (spinocelulárny) karcinóm (SCC), adenokarcinóm (ADC), veľkobunkový karcinóm (LCC), adenoskvamózny karcinóm a sarkomatoidný karcinóm [7].

Navyše, podľa svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), sa pre presnú typizáciu nádoru využíva stanovenie stupňa („grading“) a štádia („staging“) ochorenia [8].

„Grading“

„Grading“ určuje stupeň diferenciacie nádoru a má prognostický význam. Rozoznáva sa:

- G1 – dobre diferencovaný
- G2 – stredne diferencovaný
- G3 – zle diferencovaný
- G4 – nediferencovaný [8]

„Staging „

„Staging“ určuje štádium ochorenia na základe tzv. TNM klasifikácie. „T“ označuje veľkosť nádoru, „N“ postihnutie lymfatických uzlín a „M“ prítomnosť/neprítomnosť vzdialených metastáz (Tab. 1) [4]. Podľa parametrov TNM vyjadrujúcich rozsah ochorenia sú jednoznačne definované klinické štádiá ochorenia (Tab. 2). Tieto sú rozhodujúce pre následnú liečbu (chirurgická terapia/rádioterapia/chemoterapia) [3, 9].

Tx	Pozitívna iba cytológia
T1	Nádor \leq 3 cm
T1a	Nádor \leq 2 cm
T1b	Nádor > 2-3 cm
T2	Nádor v hlavnom bronchu \geq 2 cm od kariny, invadujúci do viscerálnej pleury, parciálna atelektáza
T2a	Nádor > 3-5 cm
T2b	Nádor > 5-7 cm
T3	Nádor > 7 cm; postihuje hrudnú stenu, bránicu, perikard, mediastinálnu pleuru, hlavný bronchus < 2 cm od kariny, kompletná atelektáza, satelitný(é) nodulus(y) v tom istom laloku
T4	Postihnutie mediastina, srdca, veľkých ciev, kariny, trachey, pažeráka, stavcov; satelitný(é) nádorový(é) nodulus(y) v inom ipsilaterálnom laloku
N1	Uzliny ipsilaterálne peribronchiálne, ipsilaterálne hilové
N2	Uzliny subkarinálne, ipsilaterálne mediastinálne
N3	Uzliny kontralaterálne mediastinálne alebo hilové, skalenové alebo supraklavikulárne
M1	Vzdialené metastázy
M1a	Samostatný(é) nádorový(é) nodulus(y) v kontralaterálnom laloku; pleurálne noduly alebo malígy pleurálny alebo perikardiálny výpotok
M1b	Vzdialené metastázy

Tab. 1: TNM klasifikácia [4].

T – tumor, N – lymfatické uzliny, M – metastázy.

Okultný karcinóm	TX	N0	M0
Štádium 0	Tis	N0	M0
Štádium IA	T1a, b	N0	M0
Štádium IB	T2a	N0	M0
Štádium IIA	T2a	N0	M0
	T1a, b	N1	M0
	T2a	N1	M0
Štádium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Štádium IIIA	T1a, b, T2a, b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Štádium IIIB	T4	N2	M0
	Akékolvek T	N3	M0
Štádium IV	Akékolvek T	Akékolvek N	M1

Tab. 2: Klinické štádiá [4].

T – tumor, N – lymfatické uzliny, M – metastázy.

2.1.2 LIEČBA NSCLC

Na základe príslušnosti pacientov s NSCLC do jednotlivých klinických štádií sa rozhoduje o následnej terapii. U pacientov v klinických štádiách I a II je primárne indikovaná chirurgická resekcia nádoru s možnou následnou chemo- a rádioterapiou. Pacientom v klinickom štádiu IIIA sa, navyše, pred operáciou zvykne podávať neoadjuvantná liečba. Pacienti v klinickom štádiu IIIB dostávajú primárne chemoterapiu kombinovanú s rádioterapiou, chirurgické odstránenie nádoru býva indikované len vo výnimočných prípadoch. Pacientom s generalizovaným NSCLC v štádiu IV býva na základe ich klinického stavu podávaná rádio- a/alebo chemoterapia, avšak vo väčšine prípadov iba ako paliatívna metóda zmiernujúca symptómy ochorenia. Okrem spomínaných klasických liečebných postupov sa v súčasnosti rozšírilo používanie tzv. biologickej liečby [3, 5, 9].

Klasické chemoterapeutiká sú toxické látky účinkujúce systémovo na celý organizmus. Ich toxicita pre nenádorové bunky zapríčiňuje vznik nepríjemných, a často i nebezpečných vedľajších účinkov (napr. vypadávanie vlasov, zvracanie, hnačky, krvácanie, trombóza). Práve z tohto dôvodu sú vyvíjané stále nové chemoterapeutiká s vysokým účinkom a menšími nežiadúcimi účinkami. V súčasnosti sa pre liečbu NSCLC používajú látky radené do tretej generácie liečiv. Tieto poškodzujú DNA (cisplatina, karboplatina), zabraňujú syntéze nukleových kyselín (gemcitabin) alebo pôsobia ako mikrotubulárne jedy (paklitaxel, docetaxel, vinorelbin) [2, 10, 11].

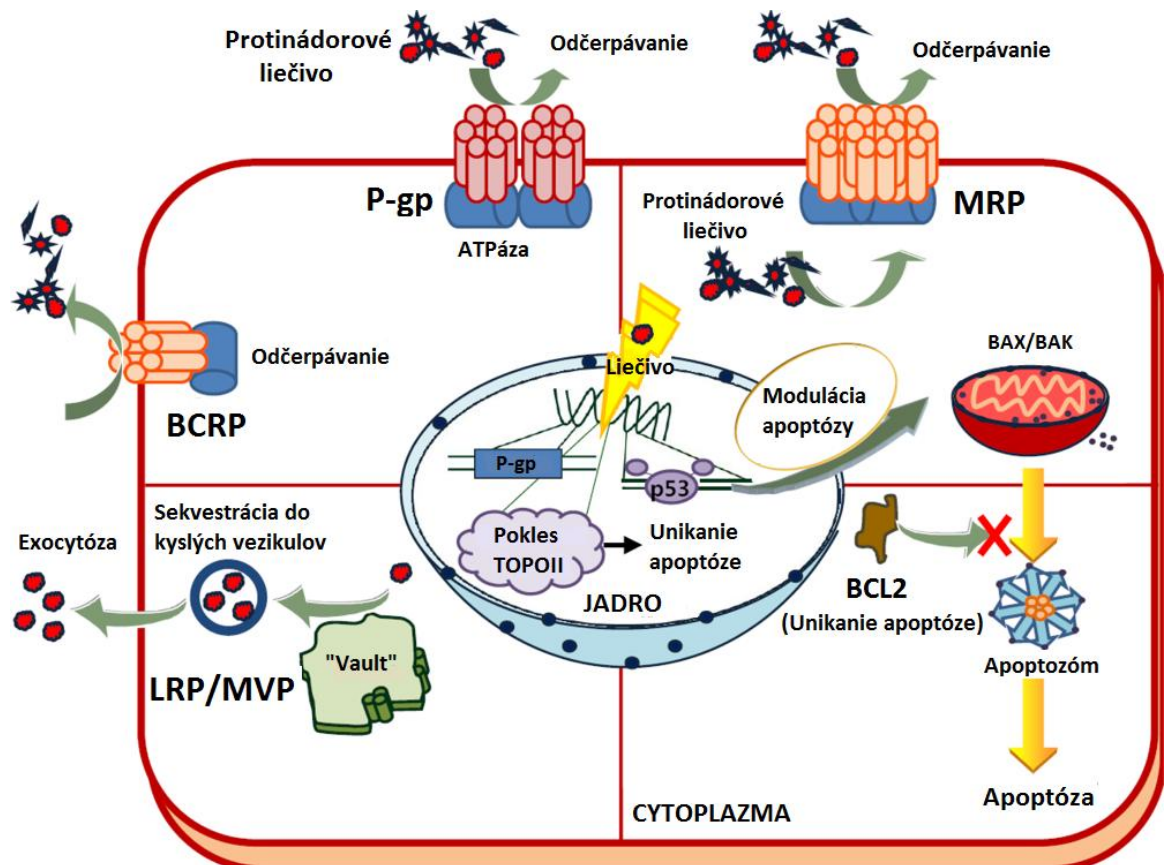
Za štvrtú generáciu liečiv sa považuje tzv. biologická liečba, ktorá, na rozdiel od klasickej chemoterapie, neúčinkuje systémovo, ale jej účinok je namierený priamo proti nádorovým bunkám charakterizovaným prítomnosťou molekuly, proti ktorej je táto liečba cieleňá. V prípade NSCLC sa využívajú nízkomolekulárne inhibítory tyrozín-kinázových receptorov (RTK) erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) a crizotinib (Xalkori), alebo monoklonálna protilátka bevacizumab (Avastin). Erlotinib a gefitinib inhibujú aktivovaný EGFR (receptor pre epidermálny rastový faktor), crizotinib je účinný u pacientov s chromozomálnymi prestavbami spojenými s translokáciou EML4-ALK (proteín podobný proteínu asociovanému s mikrotubulmi ostnantokožcov 4 – kináza anaplastického lymfómu) a zabraňujú tak proliferácii nádorových buniek. Bevacizumab inaktivuje VEGF (vaskulárny endotelový rastový faktor), čím blokuje angiogézu [2, 6, 11].

Spomínaná terapia je veľmi efektívna, avšak postupom času, vo väčšine prípadov NSCLC, prestane účinkovať. Jav, kedy pacient neodpovedá na podávané liečivá s rôznymi mechanizmami účinku sa označuje ako mnohopočetná lieková rezistencia (MDR). Práve výskyt MDR je hlavnou príčinou zlyhania terapie s následným úmrtím pacientov s NSCLC [12].

2.2 MNOHOPOČETNÁ LIEKOVÁ REZISTENCIA

Jedným z najväčších problémov pri liečbe NSCLC je často pozorovaná MDR. Preto sú vyvíjané snahy o čo najskoršiu detekciu tohto javu, aby sa zabránilo úplnému zlyhaniu dostupnej terapie. Môže byť primárna (prirodzená) alebo sekundárna (získaná v priebehu liečby) [12, 13].

MDR je zapríčinená viacerými mechanizmami podieľajúcimi sa na transporte liečiv, na ich metabolizme, na podpore proliferácie, na zabraňovaní apoptózy, na opravách poškodenej DNA, atď. (Obr. 1) [13]. Určité mechanizmy MDR bývajú aktivované vo zvýšenej miere u tzv. nádorových kmeňových buniek (CSC), označovaných tiež ako bunky prežívajúce liečbu (DSC). Majú nezastupiteľný význam v procesoch karcinogenézy, metastázovania, a tiež v MDR [14, 15].



Obr. 1: Schématické znázornenie príkladov mechanizmov liekovej rezistencie [16].

P-gp – P-glykoproteín, MRP – proteín mnohopočetnej liekovej rezistencie 1, LRP/MVP – proteín spojený s rezistenciou pľúc/veľký “vault” protein, BCRP – proteín spojený s rezistenciou karcinómu prsníka, BCL2 – B-bunkový lymfóm 2, BAX/BAK – X proteín asociovaný s BCL2/homológ antagonistu/zabijaka BCL2, TOPOII – topoizomeráza typ II.

2.2.1 TRANSPORT LIEČIV

Pri podávaní akýchkoľvek liečiv je najdôležitejšie zabezpečiť ich dostupnosť pre bunky, ktorým je toto liečivo určené. Najjednoduchšou a najrýchlejšou cestou je krvné riečisko, preto sa väčšina chemoterapeutík podáva intravenózne. Tento spôsob zabezpečí transport liečiva do celého tela, čím je zaručené, že určitá dávka bude poskytnutá aj nádorovým bunkám. Z dôvodu vychytávania liečiv plazmatickými proteínmi (napr. albumíny, glykoproteíny a lipoproteíny), ako aj zdravými bunkami, je nutné podávať vyššie než účinné dávky chemoterapeutík. Ak dôjde k aktivácii mechanizmov MDR, je potrebné dávku dokonca eskalovať. Následkom býva zvýšená toxicita chemoterapie. Preto je treba jednotlivé dávky prispôbovať stavu pacientov a v prípadoch, kedy by podaná dávka mohla ohroziť život pacienta, radšej sa jej vyhnúť [10, 17].

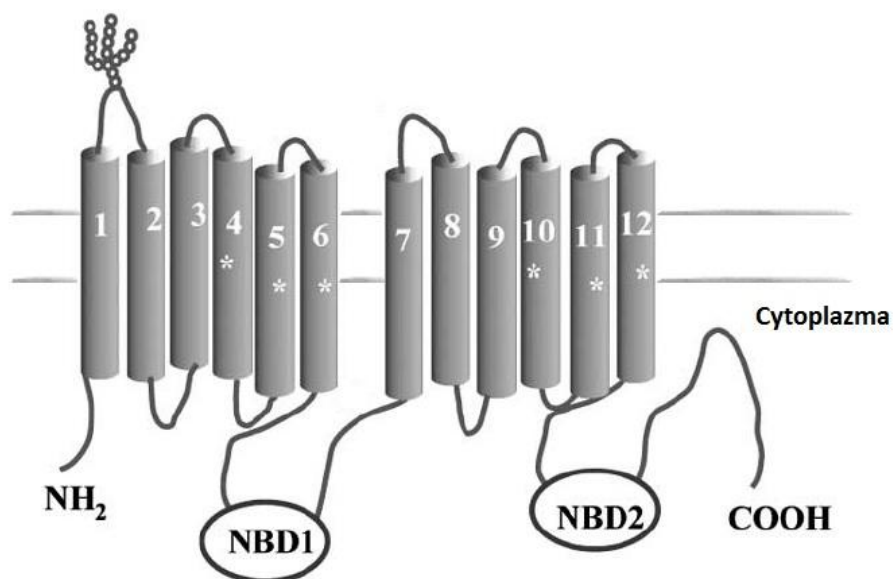
Transport liečiv do bunky závisí od ich polarít. Nepochopiteľne zlučujúce prechádzajú cytoplazmatickou membránou cez fosfolipidovú dvojvrstvu difúziou, polárne látky sú transportované pomocou kanálových prenášačov [18]. Bunka má však k dispozícii aj proteíny podieľajúce sa na transporte liečiv a xenobiotík z bunky von. Medzi hlavné transportéry podieľajúce sa na MDR u NSCLC patria ABC (ATP-väzobná kazeta) transportéry P-glykoproteín (P-gp), proteín mnohopočetnej liekovej rezistencie 1 (MRP) a proteín spojený s rezistenciou pľúc/veľký "vault" proteín (LRP/MVP) [12, 13, 19].

P-glykoproteín (P-gp)

P-gp, označovaný tiež ako MDR1 proteín, je zodpovedný za vznik tzv. typickej MDR, ktorá, na rozdiel od atypickej MDR, zahŕňa aj rezistenciu na vinca alkaloidy (vinorelbin) [12, 20]. Názov P-gp je odvodený od jeho pôvodne predpokladanej funkcie, a to zvýšenia permeability bunkovej membrány (P) [21]. Patrí do rodiny ABC-transportérových proteínov podieľajúcich sa na aktívnom transporte látok cez membránu [22].

P-gp o molekulovej hmotnosti 170 kDa je kódovaný génom *ABCB1*, lokalizovaným na chromozóme 7 (7q21.12) [21, 23]. Je zložený z dvoch homológnych jednotiek tvorených transmembránovou doménou (TMD) so šiestimi α -helixami a doménou viažúcou nukleotidy (NBD) (ABC doména), ktoré sú navzájom spojené tzv. spojovačom (obr. 2). V cytoplazmatickej membráne vytvára kanály (póry), ktorými sú z bunky exportované hydrofóbne, pozitívne nabité alebo neutrálne liečivá a xenobiotiká. Okrem transportu

spomínaných exogénnych látok sa P-gp podieľa aj na transporte endogénnych lipidov, na regulácii apoptózy a diferenciácie, a na imunitnej odpovedi [12, 24-27].



Obr. 2: Znáozornenie štruktúry P-gp [28].

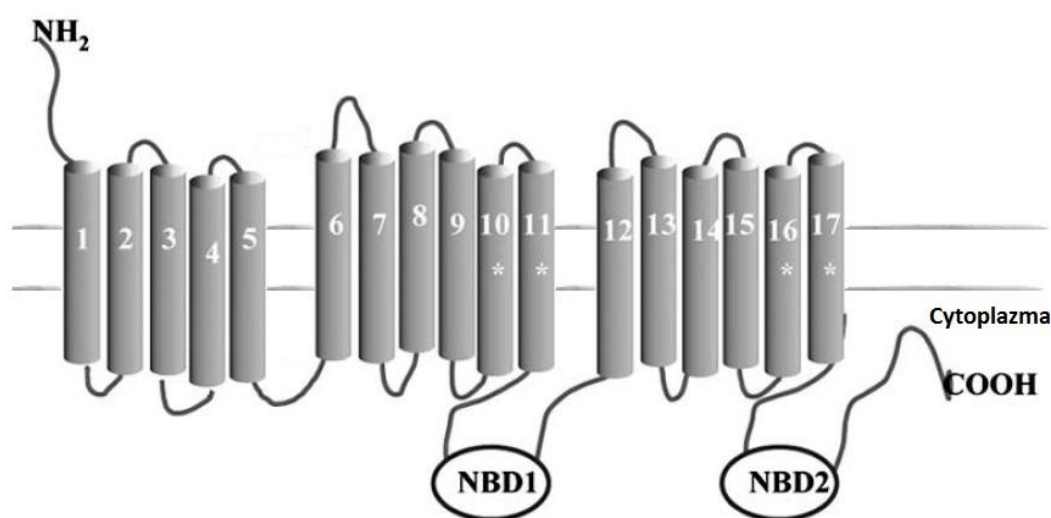
NBD – doména viažúca nukleotidy.

Prirodzene je P-gp exprimovaný v miestach, ktoré bývajú vystavené prítomnosti liečiv a xenobiotík. V črevnom a pľúcnom epiteli limituje absorpciu týchto látok do krvi, podieľa sa na ich vylučovaní z krvi (v pečeni do žlče a v obličkách do moču), a tiež ako súčasť hemato-encefalickej bariéry zabraňuje ich penetrácii do centrálného nervového systému (CNS). Rovnako býva exprimovaný v placentе, kde sa podieľa na ochrane plodu pred toxínmi [29-31]. Jeho expresia bola detegovaná aj v rôznych nádoroch, napr. v karcinómoch čreva, pľúc, pankreasu, pečene, obličiek, a tiež v hematologických malignitách [12, 32, 33].

Liečivá využívané v terapii NSCLC, ktoré sú exportované z nádorových buniek pomocou P-gp, sú paklitaxel, docetaxel, vinorelbin a gefitinib [34, 35]. V súčasnosti sú známe aj inhibítory P-gp, ktoré sú schopné senzitivizovať k chemoterapii bunky exprimujúce P-gp. Najznámejšie sú cyklosporín A (CsA), verapamil, chinín a chinidín. Ich použitie však býva spojené so zvýšenou toxicitou, a preto sa vyvíjajú nové generácie ich derivátov, ktorých kombinácia s chemoterapeutikami pacientom prinesie požadovaný účinok bez zvýšeného rizika intoxikácie [35, 36].

MRP

Rovnako ako P-gp, aj MRP patrí do rodiny tzv. ABC-transportérových proteínov. Je kódovaný génom *ABCC1* lokalizovaným na chromozóme 16 (16p13.1) [37]. Exprimovaný 190 kDa proteín vytvára v membráne póry, a podobne ako P-gp, je zložený z dvoch TMD so šiestimi α -helixami a z dvoch ABC domén vzájomne spojených tzv. spojovačom. Na rozdiel od neho má však na N-konci ďalšiu doménu tvorenú piatimi α -helixami (N-terminálna doména) (obr. 3) [38]. Slúži ako jednosmerná ATP-dependetná pumpa, ktorá sa podieľa na transporte záporne nabitých zlúčenín, hlavne glutatión-S-konjugátov [39].



Obr. 3: Znáozornenie štruktúry MRP [28].

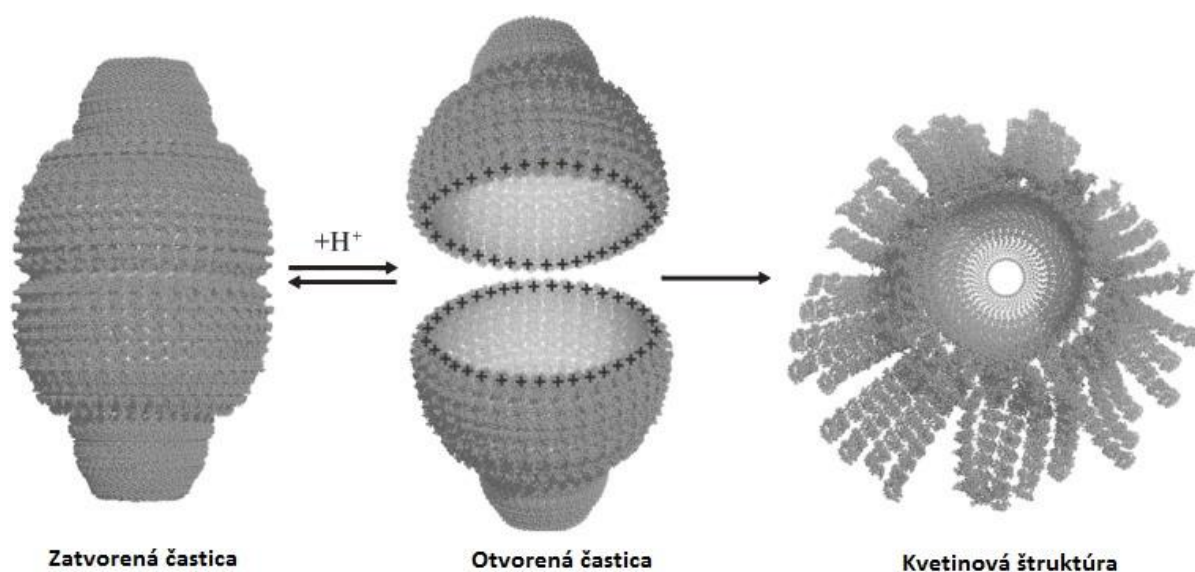
NBD – doména viažúca nukleotidy.

Prirodzene je MRP exprimovaný hlavne v pľúcach, čreve, nadobličkách, svaloch, semenníkoch, placentе, a je tiež súčasťou hemato-encefalickej bariéry [40, 41], čo dokladá jeho významnú úlohu pri ochrane buniek pred exotoxínmi. Medzi jeho substráty patria napr. leukotrién C4 (LTC₄), steroidné hormóny, soli žľčových kyselín a aktivovaný aflatoxín B1 [42- 44]. Jeho prítomnosť bola detegovaná vo viacerých nádoroch, napr. v karcinómoch pľúc (NSCLC) či štítnej žľazy, v neuroblastómoch, a tiež u rôznych foriem leukémií [33, 45, 46].

Z liečiv využívaných v terapii NSCLC sú pomocou MRP exportované vinorelbin a gefitinib [35]. Inhibítory MRP sa v praxi nepoužívajú, pretože ich podanie býva spojené s vysokou toxicitou [47].

LRP/MVP

Na rozdiel od predchádzajúcich proteínov, LRP/MVP nepatrí medzi ABC-transportéry, a ani nevytvára v membránach póry. Má molekulovú hmotnosť 110 kDa a je kódovaný génom *MVP* ležiacim na chromozóme 16 (16p11.2) [48, 49]. LRP/MVP je hlavnou zložkou subcelulárnych organel nazývaných „vaults“ (predstavuje viac než 70%). Vaults sú veľké ribonukleoproteínové častice vytvárajúce dutú, súmernú organelu v tvare súdka o molekulovej hmotnosti 13 MDa (obr. 4) [50-52]. Sú lokalizované na jadrovej membráne a v jadrových póroch, kde sa zúčastňujú na transporte rôznych substrátov medzi jadrom a cytoplazmou [50, 53].



Obr. 4: Znázornenie otvárania častice „vault“. Pri nízkom pH dochádza k neutralizácii acidických zvyškov na povrchu molekuly a k vzniku kladného náboja na rozhraní jednotlivých polovic. Tým dôjde k „rozbaleniu“ častice a k vzniku tzv. kvetinovej štruktúry [54].

Prirodzený výskyt LRP/MVP bol pozorovaný v tkanivách vystavených účinkom toxických látok a metabolitov, napr. v pľúcach, tráviacom trakte, obličkách a nadobličkách

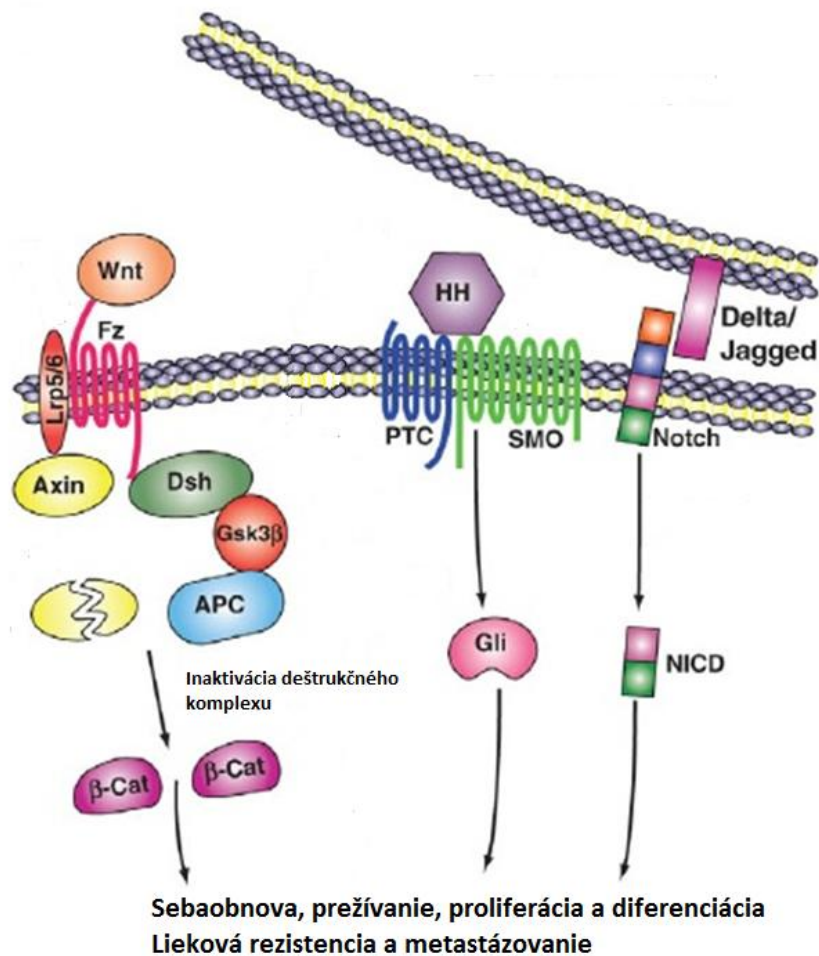
[55, 56]. Býva tiež exprimovaný v rôznych nádoroch, napr. v karcinómoch pľúc, čreva, obličiek, pankreasu a vaječníkov, ako aj v niektorých hematologických malignitách [55, 57].

Vzhľadom na lokalizáciu LRP/MVP v bunkách sa predpokladá, že vaults častice sa podieľajú na exporte liečiv účinkujúcich v jadre. V prípade chemoterapeutík užívaných v liečbe NSCLC sa teda jedná hlavne o platinové deriváty poškodzujúce štruktúru DNA (cisplatina a karboplatina) [50, 58].

2.2.2 NÁDOROVÉ KMEŇOVÉ BUNKY (CSC)

V roku 1994 bola prvýkrát pozorovaná existencia buniek, ktoré sú schopné iniciovať vznik leukémie [59]. Dá sa povedať, že vtedy sa začala éra štúdií kmeňových buniek v nádoroch. V súčasnosti už prevláda názor, že nádory vznikajú z nádorových kmeňových buniek, ktoré majú podobné vlastnosti ako progenitorové bunky. Konkrétne sa jedná o ich schopnosť diferenciacie a sebaobnovy, majú neobmedzený proliferatívny potenciál, a taktiež majú aktivované mechanizmy podieľajúce sa na detoxikácii buniek (napr. únik apoptóze, opravy poškodenej DNA (DDR), či prirodzená expresia efluxných transportérov). Vďaka týmto vlastnostiam, a tiež vďaka ich existencii v dormantnom stave, sú CSC chránené pred účinkami využívanej protinádorovej terapie, ktorá je primárne zameraná proti rýchlo sa deliacim bunkám [60]. Ďalším mechanizmom, ktorý CSC využívajú ako ochranu voči účinkom protinádorovej terapie, je produkcia rastových a angiogénnych faktorov. Angiogenéza a tvorba metastáz sú, aspoň z časti, riadené nikou [61]. Rádioterapia modifikuje nádorovú niku, čo vedie k zvýšeniu expresie alebo k aktivácii mnohých anti-apoptotických proteínov, pro-zápalových cytokínov, či faktorov podporujúcich rast nádoru [62]. Vďaka zmenám niky za hypoxických podmienok, ktoré bývajú indukované ako rádioterapiou, tak aj chemoterapiou, dochádza v CSC k aktivácii signálnej dráhy HIF1 a k zvýšenej expresii VEGFR. Dochádza k stimulácii proliferácie a angiogenézy, čo týmto bunkám umožňuje prežiť. Preto bývajú označované aj ako bunky prežívajúce liečbu (DSC) [14, 63].

V CSC sú aktivované signálne dráhy charakteristické pre kmeňové bunky, ako sú napr. Wnt, Notch a Hedgehog. Ich aktivácia vedie k expresii génov zodpovedných za rast, sebaobnovu, apoptózu, rezistenciu, metastázovanie, diferenciaciu či dediferenciaciu buniek (Obr. 5). Okrem toho, že tieto dráhy navzájom spolupracujú, a tak zabezpečujú udržovanie fenotypu CSC, sú tiež prepojené s ďalšími signálnymi dráhami podporujúcimi proliferáciu a únik apoptóze. Tým napomáhajú odolávaniu účinkom protinádorovej terapie [15].



Obr. 5: Schématické znázornenie aktivácie diferenciačných signálnych dráh Wnt, Hedgehog a Notch. Wnt – kanonická dráha je aktivovaná po naviazaní Wnt ligandov na receptor Fz a ko-receptor LRP5/6. Dochádza k fosforylácii Dsh, čo vedie k inaktivácii deštruktívneho komplexu β -Cat, zloženého z Axinu, APC a GSK3 β . β -Cat je translokovaný do jadra, kde po asociácii s transkripčnými faktormi riadi transkripciu cieľových génov. V neprítomnosti Wnt ligandov GSK3 β fosforyluje β -Cat, čím ho predurčuje k ubiquitinyllácii, a teda k následnej degradácii v proteazóme. Hedgehog – PTC inhibuje aktivitu SMO. Po naviazaní HH ligandu je táto inhibícia zrušená a SMO riadi uvoľnenie transkripčných faktorov Gli, ktoré po translokácii do jadra riadia transkripciu cieľových génov. Notch – po interakcii Notch receptora s ligandami Delta/Jagged dochádza k odštiepeniu intracelulárnej domény NICD, ktorá je endocytózou transportovaná do jadra. Tu NICD asociuje s transkripčnými faktormi a dochádza k transkripcii cieľových génov [64].

Fz – frizzled, LRP5/6 – lipoproteíny podobné receptoru o nízkej denzite 5 a 6, Dsh – dishevelled, GSK3 β – glykogén syntáza kináza-3 β , APC – adenomatózna polypóza čreva, β -Cat – β -katenín, HH – hedgehog, PTC – patched, SMO – smoothed, NICD – intracelulárna doména Notch.

Identifikácia CSC v nádoroch je možná vďaka expresii tzv. markerov kmeňových buniek. Vhodným markerom na detekciu CSC v nádoroch sa zdá byť molekula CD133, ktorej prítomnosť bola zistená na membránach ako normálnych, tak aj nádorových kmeňových buniek. Býva tiež označovaná ako AC133 alebo Prominin 1, a je kódovaná génom *PROM1* na chromozóme 4 (4p15.32) (<http://www.genecards.org>). Expresia tohto povrchového antigénu, člena rodiny pentaspanových membránových proteínov, bola prvýkrát pozorovaná v hematopoetických kmeňových bunkách [65], neskôr i v solidných nádoroch (napr. v mozgu, pečeni, pankrease, obličkách, hrubom čreve, prostate, pľúcach či melanómoch) [66-73]. CD133⁺ bunky majú aktivované dráhy zodpovedné za sebaobnovu a diferenciáciu, podporujú neovaskularizáciu, a po ožiarení aktivujú DDR mechanizmy zodpovedné za rádiorezistenciu [69, 72, 74, 75].

V NSCLC bola pozorovaná rôzna frekvencia výskytu CD133⁺ buniek (0,3 – 22%). Zistilo sa však, že nie všetky CD133⁺ bunky majú schopnosť vyvolať vznik nádoru [76], a preto je nutné sledovať spoločnú expresiu viacerých markerov CSC.

Kvôli častému metastázovaniu NSCLC do mozgu sa ako ďalší vhodný marker CSC javí Nestin, ktorého spoločná expresia s CD133 je charakteristická pre CSC nádorov mozgu [77].

Intermediálny filament Nestin je kódovaný génom *NES*, lokalizovaným na chromozóme 1 (1q23.1) (<http://www.genecards.org>). Je zapojený do proliferácie, bunkového delenia a transportu látok v cytoplazme. Nestin je exprimovaný v kmeňových a v prekurzorových bunkách vyvíjajúcich sa a regenerujúcich sa tkanív (napr. v neuroepitelových kmeňových bunkách a v endotelových bunkách novo-vznikajúcich ciev, v semenníkoch) [78, 79], ako aj v mnohých nádoroch (napr. v gliómoch, melanómoch, gastro-intestinálnych stromálnych nádoroch a pľúcach) [80, 81]. Expresia Nestinu koreluje s agresivitou a metastatickým potenciálom nádorov, a tiež býva spájaná s vlastnosťami charakteristickými pre kmeňové bunky („stemness“) [80-82]. V diferencovaných bunkách býva Nestin spravidla nahradený Vimentinom alebo v gliálnych bunkách GFAP (kyslým gliálnym fibrilárnym proteínom) [83].

Spoločná expresia CD133 a Nestinu v CSC pacientov s glioblastómom bola pozorovaná hlavne v blízkosti kapilár. Endotelové bunky s týmito CD133⁺/Nestin⁺ bunkami selektívne interagujú a dodávajú im faktory, ktoré im umožňujú sebaobnovu a udržovanie v nediferencovanom stave [84].

Prítomnosť CSC v nádoroch je teda jedným z mechanizmov MDR. Na základe ich schopnosti chrániť sa pred účinkami protinádorovej terapie pomocou prirodzene aktivovaných mechanizmov MDR je zaistené ich prežitie i po podaní „účinnnej“ (nádor znižujúcej) terapii. Vďaka ich klonogénnemu potenciálu však na opätovný rast nádoru stačí veľmi malá populácia CSC, ktoré môžu dať vzniknúť ešte agresívnejšiemu, a na terapiu rezistentnejšiemu nádoru. Preto sa testujú liečivá schopné zacieliť CSC, napr. tariquidar (cieľi MDR proteín), iniparib (cieľi PARP) alebo GV1001 (inhibuje telomerázu) [85].

2.3 MIKRORNA

Od objavu DNA sa verilo, že všetko, čo sa v živote organizmu udeje, je zakódované v jej štruktúre. Relatívne nedávno sa však zistilo, že toto tvrdenie neplatí, pretože gény kódujúce proteíny (funkčné jednotky buniek, a teda i organizmu) zaberajú menej než 2% genómu. Predpokladalo sa, že zvyšných takmer 99% genómu slúži ako tzv. balastná DNA. Postupom času sa však zistilo, že i nekódujúce oblasti majú svoju funkciu. Boli objavené rôzne regulačné oblasti, ako promotory alebo enhancery, a tiež gény pre nekódujúce RNA molekuly. Tieto poznatky dali nový smer výskumu ľudského genómu a na ich základe bolo ustanovené konzorcium ENCODE (encyklopédia DNA elementov). Výsledky tohto projektu ukazujú, že viac než 80% genómu má nejakú biochemickú funkciu, a že približne 62% genómu predstavujú oblasti s RNA aktivitou [86]. V súčasnosti sú jednými z najštudovanejších nekódujúcich RNA molekúl práve mikroRNA (miRNA). Informácie o nich sú zhrnuté v najpoužívanejšej databáze miRBase. Posledná verzia miRBase 21, uvoľnená v júni 2014, sumarizuje dôležité informácie o 35828 známych zreloch miRNA z 223 rôznych druhov organizmov. U človeka je zatiaľ známych 2588 zreloch miRNA, avšak ich počet neustále narastá (<http://www.mirbase.org>) [87].

2.3.1 OBJAV MIKRORNA A RNA INTERFERENCIE

Prvýkrát boli miRNA pozorované v roku 1993 v hlístici *Caenorhabditis elegans*. Dr. Lee so spolupracovníkmi identifikovali krátku RNA označenú lin-4, ktorá pomocou antisense RNA-RNA interakcie reguluje transláciu lin-14 [88]. Niekoľko rokov sa ale molekulám miRNA nevenovala pozornosť, až kým v roku 2000 nebola identifikovaná let-7,

prvá miRNA, ktorá má svoj homológ aj u človeka [89]. Odvtedy sa miRNA stali predmetom intenzívneho skúmania. Zistilo sa, že miRNA majú nezastupiteľnú úlohu v regulácii biologických procesov, a tiež, že sa podieľajú na vzniku a vývoji rôznych ochorení. V roku 2002 bola pozorovaná deregulácia miR-15 a miR-16 u chronickej myeloidnej leukémie (CLL) [90] a v roku 2005 bol onkogén RAS identifikovaný ako cieľ let-7 u karcinómov pľúc [91].

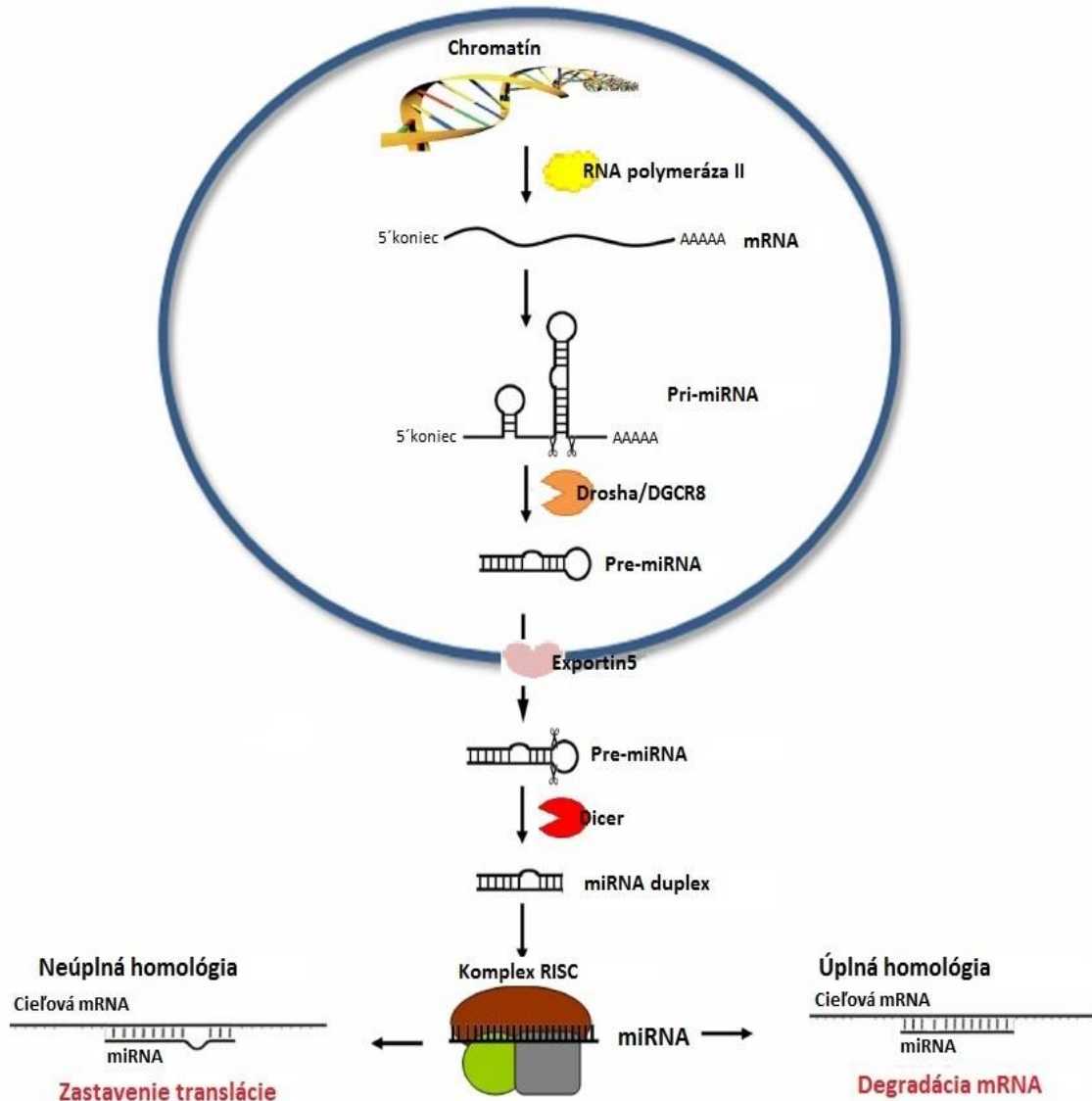
Samotný princíp RNA interferencie (RNAi) popísali v roku 1998 dr. Andrew Fire a dr. Craig Mello. Zistili, že dvojvláknová RNA (dsRNA) dokáže na základe homológie interferovať s mediátorovou RNA (mRNA), čím dôjde k inhibícii translácie na post-transkripčnej úrovni [92].

Objav miRNA a mechanizmu RNAi umožnil získať nový pohľad na reguláciu génovej expície a otvoril tak priestor pre ďalšie štúdium biologických procesov a rôznych ochorení.

2.3.2 BIOGENÉZA A FUNKCIA MIRNA

Gény kódujúce miRNA ležia buď medzi génmi kódujúcimi proteíny (intergénové miRNA), alebo priamo v nich (intrónové a exónové miRNA) [93]. Sú transkribované RNA polymerázou II za vzniku primárneho transkriptu (pri-miRNA) dlhého niekoľko kb. Po pôsobení mikroprocesorového komplexu Drosha, zloženého z RNáza-III endonukleázy Drosha a z DiGeorge syndróm kritickej oblasti génu 8 (DGCR8), vzniká, vo forme vlásky, približne 70 nt dlhá prekursorová miRNA (pre-miRNA). V prípade mirtrónov (intrón predstavuje priamo sekvenciu pre-miRNA) môže dochádzať k vynechaniu kroku spracovania pomocou mikroprocesoru Drosha tak, že pre-miRNA vznikajú priamo ako vedľajší produkt zstrihu intrónov [94]. Táto pre-miRNA je potom komplexom Exportin-5/Ran-GTP transportovaná z jadra do cytoplazmy, kde prebieha jej štiepenie na dvojvláknovú RNA dlhú približne 22 nt pomocou endonukleázy Dicer a jej ko-faktora TAR RNA väzobného proteínu (TRBP). Následne je jedno vlákno miRNA (označované miRNA*) odbúrané, a druhé vlákno, tzv. zrelá miRNA, je zabudované do ribonukleoproteínového RNA-indukovaného umlčovacieho komplexu (RISC). Tento komplex je zložený z proteínov rodiny Argonaut (AGO) a jeho úlohou je, na základe homológie so zabudovanou miRNA, rozpoznať komplementárne miesto väčšinou v 3' netranslatovanej oblasti (3' UTR) mRNA a nasadnúť naň. Následne dochádza buď k degradácii mRNA (v prípade úplnej homológie s 3' UTR koncom mRNA) alebo k zastaveniu translácie (v prípade neúplnej homológie s 3' UTR koncom mRNA) (Obr. 6) [88, 92, 95]. Vďaka tomu, že aktivácia RNAi mechanizmov

nevyžaduje kompletnú homológiu miRNA s 3'UTR koncom mRNA, môže jedna miRNA celiť niekoľko mRNA a naopak, jedna mRNA môže byť cieleňá viacerými miRNA [96]. K tejto regulácii dochádza na post-transkripčnej úrovni, čo umožňuje vysvetliť rozdielne hladiny mRNA a proteínov v bunkách.



Obr. 6: Schématické znázornenie biogenézy miRNA [97].

DGCR8 – DiGeorge syndróm kritickej oblasti génu 8.

Vďaka schopnosti inhibovať transláciu mRNA mechanizmom RNAi sú miRNA významnými regulátormi expície proteínov. Sú zapojené do rôznych biologických procesov, ako napr. vývoj organizmu a diferenciácia buniek, proliferácia a apoptóza, ale taktiež do vzniku a vývoja množstva ochorení. Medzi ne patrí aj rakovina. Oproti nenádorovým

tkanivám býva hladina miRNA v nádoroch zmenená [98, 99]. Kvôli tomu, a tiež, keďže vďaka svojej štruktúre sú miRNA pomerne stabilné molekuly, sú miRNA vhodnými kandidátmi na biomarkery. Využitie miRNA ako nádorových biomarkerov sa testuje v rôznych biologických materiáloch, ako napr. v tkanivách zaliatych do parafínu, v krvi, v sére, v spúte, v moči a v iných telesných tekutinách [100-106].

2.3.3 ÚLOHA MIRNA V NÁDOROCH

Nádory sú výsledkom nekontrolovanej proliferácie a prežívania poškodených buniek. Počas karcinogenézy dochádza k inaktivácii tumor-supresorových (TS) génov a k aktivácii onkogénov. Bolo dokázané, že charakter TS (negatívna regulácia onkogénov) a/alebo onkogénov (negatívna regulácia TS) majú aj miRNA [99].

Prvýkrát bola tumor-supresorová úloha miRNA pozorovaná u pacientov s CLL. Jednalo sa o častú deléciu lokusu 13q14, v ktorom sú lokalizované gény pre *miR-15a* a *miR-16* [90]. Tieto miRNA cieľia, okrem iného, anti-apoptotický proteín BCL2, a teda ich strata alebo znížená expresia vedú k zvýšenému prežívaniu nádorových buniek [107]. Ďalšími miRNA, ktorých hladiny bývajú v nádoroch často znížené, sú miRNA patriace do rodiny let-7. Ich gény sú lokalizované vo fragilných miestach chromozómov, ktoré bývajú v nádoroch (napr. nádory pľúc, prsníkov, ovárií alebo krčka maternice) veľmi často deletované. Cieľia rôzne onkogény, napr. RAS či Cyklín D2 (CCND2) [91, 108].

Na rozdiel od TS miRNA, bývajú gény pre onkogénne miRNA lokalizované v oblastiach, ktoré bývajú buď transkribované onkogénnymi transkripčnými faktormi (napr. c-MYC a *miR-155*) [109], alebo sú v nádoroch často amplifikované (napr. lokus 17q23.2 a *miR-21*) [110]. Cieľia hlavne TS, ako napr. proteín programovanej bunkovej smrti 4 (PDCD4) [111] alebo tkanivové inhibítory metaloproteináz (TIMP3) [112]. Zvýšená expresia miR-155 býva pozorovaná hlavne v lymfómoch, miR-21 takmer vo všetkých študovaných nádoroch (napr. nádory prsníkov, hrubého čreva, žalúdka, pankreasu, prostaty alebo pľúc) [113].

Niektoré miRNA sa správajú ako TS, ale zároveň aj ako onkogénny. Príkladom sú miR-23b, miR-26a, rodina miR-29, či klaster miR-17-92. To, ako sa budú chovať, závisí od tkaniva, v ktorom sú exprimované, bunkového stimulu a štádia ochorenia. Tieto faktory pravdepodobne určia, či dané miRNA budú rakovinu potláčať alebo podporovať [114, 115].

Nezastupiteľnú úlohu majú miRNA aj v procesoch metastázovania. Môžu slúžiť ako aktivátory (napr. miR-10b, miR-373 a miR-520c) [116, 117] alebo supresory (napr. miR-335 a miR-126) metastázovania [118]. MiR-23b cieľi ako aktivátory, tak aj supresory metastázovania, a to v závislosti od toho, v akom tkanive je exprimovaná [119, 120]. Medzi cieľe aktivátorov patria proteíny brániace vzniku metastáz (napr. Nischarin alebo povrchový receptor pre hyaluronan CD44) [117, 119], zatiaľ čo supresorové miRNA cieľia proteíny zapojené do procesov metastázovania (napr. represor E-kadherínu ZEB1, transkripčný faktor obsahujúci SRY-box (SOX4) alebo Tenascin C (TNC)) [118, 120].

Okrem už spomínaných úloh, majú miRNA význam aj pri vzniku chemo- a rádiorezistencie. Podieľajú sa na aktivácii anti-apoptotických mechanizmov, na DDR, či na regulácii signálnych dráh charakteristických pre kmeňové bunky (Wnt, Notch, Hedgehog signalizácia) [121, 122].

Vďaka takto širokému spektru pôsobenia miRNA je ich štúdium nevyhnutné pre pochopenie procesov prebiehajúcich v bunkách. Porozumenie mechanizmom ich účinku v nádoroch umožní aplikáciu miRNA do klinickej praxe.

2.3.4 *MIRNA AKO BIOMARKERY NSCLC*

Krátke molekuly miRNA sú oveľa stabilnejšie než mnoho proteínov a mRNA. Unikajú dokonca aj endogénnej aktivite RNáz, a preto sú detegovateľné v telesných tekutinách. Zároveň je možné ich sledovať i v parafínových vzorkách, čo ich predurčuje k tomu, aby mohli byť využívané ako biomarkery [102, 123, 124].

V minulosti sa mnohí vedci pokúšali určiť histogenetický pôvod nádoru na základe expresného profilu mRNA, avšak tieto výsledky nebolo možné aplikovať na všetky typy nádorov. Po objave miRNA sa zistilo, že každý jeden nádor vykazuje unikátny miRNA profil, na základe ktorého je možné nielen určiť histogenetický pôvod nádoru i v nediferencovaných a metastatických ložiskách, ale tiež sa dajú rozlíšiť jednotlivé histologické podtypy [125, 126].

V prípade NSCLC je nutné správne odlíšiť ADC od SCC, pretože v závislosti od príslušnosti k daným histologickým podtypom pacienti odpovedajú na podávanú liečbu. V súčasnosti používané imunohistochemické markery nevykazujú vo všetkých prípadoch jednoznačné výsledky. Zato ako veľmi sľubný marker, využiteľný i v parafínových vzorkách

a v peroperačných biopsiách, sa ukazuje miR-205. Viaceré štúdie ukazujú, že hladina miR-205 je zvýšená u SCC, a naopak znížená u ADC [127, 128].

Niektoré miRNA sa zdajú byť i vhodnými prognostickými markerami. Pacienti s NSCLC so zníženou expresiou let-7, či zvýšenou expresiou miR-21, mali horšiu prognózu než ostatní pacienti [100, 129]. Významnú úlohu v tom zohráva i fakt, že medzi cieľe rodiny let-7 patrí skupina RAS proteínov zodpovedných za nadmernú proliferáciu nádorových buniek [91], a že miR-21 negatívne reguluje hladinu TS PTEN [130]. Okrem toho miR-21 aktivuje dráhu RAS/MEK/ERK a inhibuje apoptózu. Takto aktivovaná EGFR signálna dráha ďalej zvyšuje expresiu miR-21, čím sa zvýrazňuje jej pôsobenie v nádoroch pľúc [131, 132]. V štúdiu dr. Markou bola zvýšená expresia miR-21 navrhnutá za nezávislý negatívny prognostický faktor prežívania pacientov s NSCLC [129].

V poslednej dobe sa ako ďalší sľubný prognostický marker javí miR-23b. Jej deregulácia bola pozorovaná vo viacerých nádoroch, kde v závislosti od typu tkaniva, býva jej zvýšená expresia spájaná buď s dobrou alebo s horšou prognózou. Konkrétne, pacienti so zvýšenou hladinou miR-23b v nádoroch prostaty, močového mechúra či štítnej žľazy mali lepšiu prognózu než pacienti so zníženou hladinou miR-23b [120, 133, 134]. Naopak, pacienti so zvýšenou hladinou miR-23b v nádoroch obličiek, prsníkov a pacienti s glioblastómom, mali prognózu horšiu než pacienti so zníženou hladinou miR-23b [119, 135, 136]. Jej úloha v nádoroch pľúc zatiaľ nebola študovaná.

Okrem spomínaných miRNA sú s prežívaním pacientov s NSCLC spájané i hladiny ďalších miRNA. Medzi nimi sú napr. zvýšená hladina klastra miR-17-92 inaktivujúceho proteín retinoblastómu (pRB) [137], či znížené hladiny miR-126 rozpoznávajúcej 3' UTR *VEGF* mRNA [138] alebo rodiny miR-34 zapojenej do apoptózy v úlohe člena p53 dráhy aktivovanej v odpovedi na DDR a onkogénny stres [139].

Na základe expresie niektorých miRNA je možné predpovedať odpoveď pacientov s NSCLC na terapiu. Bolo pozorované, že zvýšená hladina miR-135a je spojená s rezistenciou na paclitaxel [140], a že miR-181b a miR-497 dokážu senzitivizovať bunky A549 k účinkom cisplatiny vďaka redukcii hladiny anti-apoptotického proteínu BCL2 [141, 142]. Tieto príklady ukazujú, že miRNA zohrávajú úlohu v chemosenzitivite a v rezistencii, a tiež, že dokážu modulovať odpoveď na chemoterapiu.

V súčasnosti je snahou vedcov nájsť biomarkery, ktoré by bolo možné využívať i z neinvazívne získaných vzoriek (krv alebo spútum pacientov s NSCLC). Bolo identifikovaných viacero miRNA, ktoré sa zdajú mať diagnostický, prognostický, či dokonca

prediktívny význam (napr. miR-25, miR-1 alebo miR-152) [102, 143, 144]. Keďže sú ale miRNA uvoľňované i z normálnych buniek, a nie je objasnený mechanizmus ich transportu a prežívania v telesných tekutinách, je nevyhnutné pokračovať vo výskume, ktorý by umožnil ich uvedenie do klinickej praxe [145].

Na základe doterajších výskumov sa miRNA javia ako vhodné biomarkery pre identifikáciu rizikových skupín, skorú diagnostiku, predpovedanie prognózy pacientov a ich odpovede na liečbu. Okrem toho sa zdá, že vďaka možnosti regulácie hladín miRNA môžu tieto molekuly nájsť uplatnenie i v samotnej terapii pacientov s NSCLC [106, 146].

2.3.5 VYUŽITIE MIRNA V TERAPII NSCLC

Terapeutický potenciál miRNA je daný ich významnou úlohou v nádoroch, a tiež možnosťou regulácie ich hladín v biologických systémoch. Preto sa vedci sústreďujú na aplikáciu analógov TS-ových miRNA, resp. inhibítorov onkogénnych miRNA, pacientom trpiacim rôznymi ochoreniami. Táto snaha je sprevádzaná viacerými problémami, z ktorých najvýznamnejšie sú nestabilita RNA molekúl, ich transport do cieľových orgánov/buniek, či aktivácia imunitnej odpovede alebo vysoká toxicita [147]. Preto sa vyvíjajú rôzne chemicky modifikované molekuly a ich transportné systémy.

Ako najstabilnejšie a najmenej toxické RNA molekuly sa javia „anti-sense“ oligonukleotidy uzamknutých nukleových kyselín (LNA), ktoré sú vďaka svojej štruktúre rezistentné voči endonukleázovej aktivite, vykazujú nízku toxicitu a adekvátnu distribúciu v organizme [148, 149]. Okrem nich sa na inhibíciu miRNA využívajú i „antagomir“ [150], či špongie miR („miR sponges“) [151]. Na zvýšenie hladín vybraných miRNA v bunkách sa využívajú napodobeniny miRNA („miRNA mimics“) [152] alebo expresné vektory miRNA [153]. Pre terapeutické využitie sú najvhodnejšími inhibítormi miRNA jednovláknové LNA „anti-miR“, zatiaľ čo najvyhovujúcejšími molekulami zvyšujúcimi hladiny miRNA sú dvojitovláknové „miRNA mimics“ [147].

Príjem modifikovaných i nemodifikovaných modulátorov miRNA je zabezpečený pomocou vírusových alebo nevírusových transportných systémov. Ako vírusové vektory, ktoré kódujú „miRNA mimics“, sa využívajú napr. lentivírusy [154], adenovírusy [155] alebo adeno-asociované vírusy [156]. Ich nevýhodou však je, že sú potenciálne imunogénne a môžu

buď aktivovať onkogény alebo inaktivovať TS gény [149]. Preto sa častejšie využívajú nevírusové transportné systémy, ako lipozómy [157], biodegradovateľné polyméry [158] alebo atelokolagén [159].

Prvou miRNA spojenou so solidnými nádormi (konkrétne s NSCLC) je let-7, preto je pochopiteľné, že po zistení jej zníženej expzie v nádoroch a objasnení jej TS-ovej funkcie, je navrhnuté jej terapeutické využitie u pacientov s NSCLC. Bolo zistené, že intratracheálna, intranazálna i intratumorálna aplikácia let-7 zastavuje rast nádoru v pľúcach [154, 155, 160]. Podobné účinky malo aj systémové podanie ďalšej známej TS-ovej miRNA, a to miR-34a [161]. Intratumorálne podanie napodobeniny miR-145, okrem spomenutého zastavenia rastu nádoru, tiež inhibovalo metastázovanie a zvýšilo citlivosť k chemo- a rádioterapii [158].

Cesta k využitiu modulátorov miRNA na liečbu pacientov s NSCLC je ešte dlhá, ale neustále snahy vedcov o prekonanie prekážok spojených s podávaním RNA molekúl dávajú nádej, že čoskoro bude nájdený účinný a bezpečný spôsob liečby týmito látkami. Mnoho z nich sa v súčasnosti testuje na preklinickej úrovni, no nedávno prvé miRNA modulátory postúpili aj do klinických skúšok. Konkrétne sa jedná o inhibítor LNA-anti-miR-122 (Miravirsén, Santaris Pharma) na liečbu hepatitídy C, ktorý postúpil do II. fázy klinických skúšok (<http://clinicaltrials.gov>; identifikátor NCT01200420), a prvý protinádorový miRNA liek „miR-34 mimic“ (MRX34, Mirna Therapeutics) na liečbu pacientov s hepatocelulárnym karcinómom, ktorý v apríli 2013 vstúpil do I. fázy klinických skúšok (<http://clinicaltrials.gov>; identifikátor NCT01829971).

3 CIELE PRÁCE

I. Identifikácia buniek nesúcich znaky nádorových kmeňových buniek v NSCLC na základe spoločnej expresie známych markerov kmeňových buniek CD133 a Nestinu

- a) Príprava tkanivových mikroerejí (TMA) z parafínových bločkov pacientov s NSCLC
- b) Imunohistochemická detekcia CD133 a Nestinu v parafínových rezoch z TMA
- c) Imunofluorescenčná detekcia spoločnej expresie CD133 a Nestinu v parafínových rezoch z TMA
- d) Analýza prežívania pacientov s NSCLC s ohľadom na expresiu CD133 a Nestinu.

II. Možná úloha vybraných miRNA ako biomarkerov NSCLC

Nepublikované údaje

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL A CHARAKTERISTIKA PACIENTOV

V rámci tejto práce boli použité fixované a do parafínu zaliate (FFPE) vzorky pacientov s NSCLC, získané v rokoch 1996-2000 z 1. chirurgickej kliniky, a uchovávané v archíve Ústavu klinické a molekulárnej patológie, ktoré sú súčasťou Fakultní nemocnice Olomouc (FN) a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (LF UP). Ich použitie pre výskumné účely bolo schválené etickou komisiou FN a LF UP Olomouc. Každá vzorka bola hodnotená podľa klasifikácie WHO nezávisle dvoma patológmi [4, 162]. Podľa doporučenia medzinárodnej organizácie pre štúdium nádorov pľúc (IASLC) bola v roku 2012 vykonaná reklasifikácia vzoriek [163]. Z týchto vzoriek boli pripravené tkanivové mikroereje. V rámci štúdie zameranej na identifikáciu CSC, bol pre imunohistochemickú (IHC) a imunofluorescenčnú (IF) detekciu Nestinu a CD133 analyzovaný súbor 121 pacientov s NSCLC (95 mužov a 26 žien), z toho 82 SCC a 39 ADC. Prognostický význam Nestinu bol sledovaný u 114 pacientov s NSCLC (92 mužov a 22 žien), z toho 79 SCC a 35 ADC. Vybrané miRNA boli kvantifikované vo vzorkách od 62 pacientov (55 mužov a 7 žien), z toho 26 SCC, 30 ADC a 6 LCC. Niekoľko pacientov podstúpilo chemoterapeutickú liečbu, väčšina z nich absolvovala liečbu derivátmi platiny v kombinácii s ďalšími chemoterapeutikami. Zvyšní pacienti obdržali kombinácie iných liečiv, napr. taxany, doxorubicin, či fluorouracyl. Vzorky od pacientov, u ktorých bol analyzovaný prognostický význam nestinu, boli odobraté pred začiatkom podávania chemoterapie (s výnimkou vzoriek mozgových metastáz). Charakteristika pacientov je zhrnutá v tabuľke 3. Klinicko-patologické parametre, ako čas do progresie (PFS) a celkové prežívanie (OS) pacientov, boli sledované maximálne po dobu 175 mesiacov.

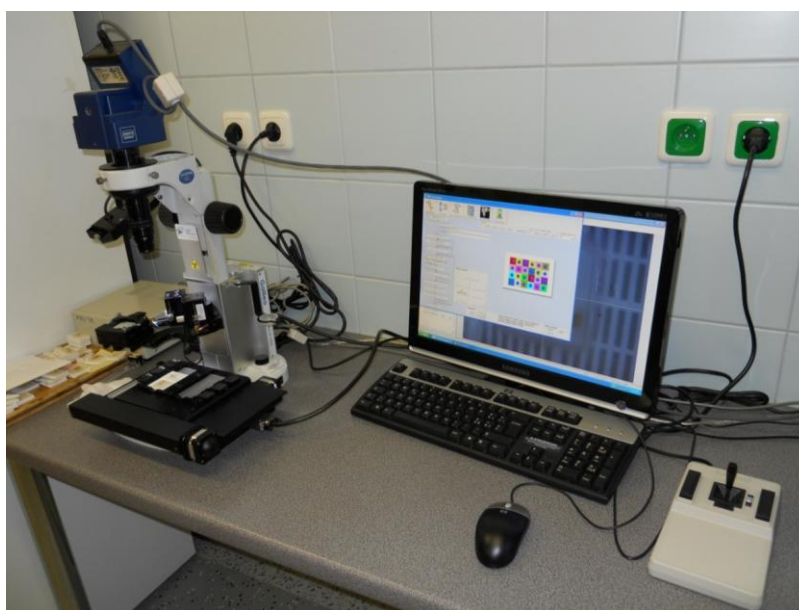
Charakteristika	Podskupina	Štúdiá CD133 + Nestin		Štúdiá prognostického významu Nestinu		Štúdiá expresie miRNA	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
Pohlavie	Muži	95	78,5	92	80,7	55	88,7
	Ženy	26	21,5	22	19,3	7	11,3
Vek v rokoch	< 60	60	49,6	57	50	31	50
	≥ 60	61	50,4	57	50	31	50
Histologický podtyp	ADC	39	32,2	35	30,7	30	48,4
	SCC	82	67,8	79	69,3	26	41,9
	LCC	0	0	0	0	6	9,7
Štádium	I	29	24	31	27,2	13	21
	II	10	8,3	27	23,7	5	8,1
	IIIA	45	37,2	56	49,1	20	32,3
	IIIB	11	9,1	0	0	5	8,1
	IV	11	9,1	0	0	8	12,9
	Neurčené	15	12,4	0	0	11	17,7
Metastázy v uzlinách	Prítomné	66	54,5	68	59,6	32	51,6
	Nepřítomné	55	45,5	46	40,4	30	48,4
Vzdialené metastázy	Prítomné	33	27,3	35	30,7	20	32,3
	Nepřítomné	88	72,7	79	69,3	42	67,7
Chemoterapia	Áno	28	23,1	-	-	22	35,5
	Nie	79	65,3	-	-	31	50
	Neurčené	14	11,6	-	-	9	14,5
Celkom		121	100	114	100	62	100

Tab. 3: Charakteristika pacientov v štúdiách CD133/Nestin, prognostický význam Nestinu a expresia miRNA.

ADC – adenokarcinóm, SCC – spinocelulárny karcinóm, LCC – veľkobunkový karcinóm.

4.2 PRÍPRAVA TKANIVOVÝCH MIKROEREJÍ

Tkanivové mikroereje (TMA) boli zkonštruované z FFPE vzoriek pacientov s NSCLC pomocou polo-automatického systému Galileo TMA CK 3500 (Integrated Systems Engineering S.r.l., Taliansko) (Obr. 7). Oblasti, z ktorých boli do TMA vybrané valčeky tkaniva, boli označené patológom na mikroskopických preparátoch ofarbených základným farbením hematoxylín-eozín. Zvlášť bola vyznačená nádorová časť, a zvlášť nenádorová. Z každej vyznačenej oblasti donorového bloku boli od každého pacienta zbrané 2 valčeky tkaniva o priemere 2 mm a prenesené do čistého, recipientného parafinového bloku, podľa vopred zadaných koordinát. Pre kontrolu boli do recipientných blokov zabudované i nenádorové oblasti, a pre určenie správnej orientácie rezu pri vyhodnocovaní boli využité valčeky tkanív iných, než pľúca (lymfatická uzlina, slezina, pečeň, oblička a srdce). Aby sa novo-vložené valčeky tkanív spojili s parafínom z recipientných blokov, boli takto pripravené recipientné bloky, podložené podložnými sklíčkami, vložené do termostatu na cca. 30 min pri 56 °C. Výsledný recipientný blok obsahoval spolu 24 valčekov tkanív, čiže vzorky z 12 rôznych donorových blokov (resp. oblastí). Vzorky pacientov s NSCLC pritom predstavovali 20 valčekov a dve odlišné, orientačné vzorky boli umiestnené vo zvyšných štyroch pozíciách (Obr. 8). Pre imunohistochemickú a imunofluorescenčnú analýzu boli z týchto blokov narezané 4 µm hrubé rezy.



Obr. 7: Galileo TMA CK 3500 systém.

Donor1 orient srdce	Donor2 Vzorka 1	Donor3 Vzorka 2	Donor4 Vzorka 3	Donor5 Vzorka 4	Donor7 Vzorka 5
Donor8 Vzorka 6	Donor9 Vzorka 7	Donor6 orient slezina	Donor10 Vzorka 8	Donor3 Vzorka 2	Donor11 Vzorka 9
Donor12 Vzorka 10	Donor4 Vzorka 3	Donor2 Vzorka 1	Donor7 Vzorka 5	Donor1 orient srdce	Donor10 Vzorka 8
Donor9 Vzorka 7	Donor11 Vzorka 9	Donor5 Vzorka 4	Donor8 Vzorka 6	Donor12 Vzorka 10	Donor6 orient slezina

Obr. 8: Príklad usporiadania vzoriek v TMA blokoch.

4.3 IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE

Rezy z TMA blokov, hrubé 4 μm , boli natiahnuté na podložné sklá Superfrost Plus[®] (Thermo Scientific, MA, USA). Následne boli vložené do termostatu a pri 56 °C tam boli ponechané do druhého dňa. Takto pripravené preparáty boli potom farbené pomocou nepriamej imunohistochemickej metódy. Použité primárne protilátky, s ich riedením a spôsobom odmaskovania antigénu, sú zhrnuté v tabuľke 4.

Protilátka	Druh (Pôvod, zdroj) protilátky	Antigén	Odmaskovanie antigénov	Riedenie	Výrobca
Rabbit polyclonal to CD133 – Stem Cell Marker	králik	CD133	Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako, Dánsko) 98 °C, 20 min	1:100	Abcam, UK
Mouse anti-nestin human specific monoclonal antibody, clone 10C2	myš	Nestin	citrátový pufer (pH = 6) 120 °C, 15 min	1:100	Chemicon International, USA
ABCB1 / P Glycoprotein Mouse anti-Human Monoclonal (UIC2) Antibody	myš	P-gp	žiadne [164]	1:200	LifeSpan Biosciences, Inc., USA
Monoclonal Antibody to MRP1 (human) (MRPm5)	myš	MRP	Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako, Dánsko) 98 °C, 20 min	1:200	Enzo Life Sciences. Inc., USA
Monoclonal Antibody to MVP/LRP (human), mAb (MVP-37) (LMR5)	myš	LRP/MVP	citrátový pufer (pH = 6) 120 °C, 15 min	1:200	Enzo Life Sciences. Inc., USA

Tab. 4: Zoznam použitých primárnych protilátok.

P-gp - P-glykoproteín, MRP – proteín mnohopočetnej liekovej rezistencie 1, MVP/LRP – veľký “vault” protein/proteín spojený s rezistenciou pľúc.

Postup:

Rezy boli odparafinované v xyléne 2x po 10 min, zavodené cez zostupnú etanolovú radu (96%, 80% a 70%) po 5 min a opláchnuté v deionizovanej vode 3x po 5 min. Po odmaskovaní antigénov (viď Tab. 4) a vychladnutí preparátov (20 min pri izbovej teplote) boli rezy natrávené Proteinázou K 10 min pri 37 °C a opláchnuté v deionizovanej vode. Následne bola pomocou 6% peroxidu vodíka, po dobu 15 min, blokována aktivita endogénnej peroxidázy. Rezy potom boli opláchnuté najskôr v deionizovanej vode, potom 2x po 5 min

v 1x TRIS pufri a 5 min v pufri 1x TRIS + Tween-20. Po dôkladnom oplachu bola pri izbovej teplote, po dobu 1 hodiny, aplikovaná primárna protilátka nariedená v Dako REAL™ Antibody diluent (Dako, Dánsko) vo vhodnom pomere (vid' Tab. 4). Preparáty boli znova opláchnuté 2x po 5 min v 1x TRIS pufri a 5 min v pufri 1x TRIS + Tween-20, a potom bola pri izbovej teplote, po dobu 1 hodiny, aplikovaná sekundárna protilátka značená peroxidázou zo systému EnVision™+ Dual Link (Dako). Nasledovala vizualizácia pomocou diaminobenzidínu (DAB) zo systému EnVision™+ Dual Link (Dako) po dobu maximálne 10 min a oplach pod tečúcou vodovodnou vodou 3 min. Potom boli pomocou kamencového hematoxylínu, po dobu približne 1 min, dofarbené jadrá, a následne boli preparáty opláchnuté najskôr vo vodovodnej vode, potom vo vodovodnej vode s pár kvapkami čpavku, a opäť vo vodovodnej vode. Po odvodnení preparátov vo vzostupnej etanolovej rade (70%, 80% a 96%), acetóne a acetón-xyléne (po 3 min) a prejasnení v xyléne (3 min), boli preparáty zamontované do média nerozpustného vo vode (kanadský balzam alebo pertex).

Výsledné preparáty boli pozorované pomocou optického mikroskopu (Olympus, Japonsko). Vyhodnotenie bolo prevedené nezávisle dvoma patológmi a boli určené intenzita farbenia, resp. tzv. H-skóre (percento pozitívnych buniek x intenzita farbenia). Intenzita expresie sledovaných proteínov bola hodnotená ako 0 - veľmi nízka ($\leq 0,1$), 1 - nízka ($\leq 0,3$), 2 - stredná ($\leq 0,6$) a 3 - vysoká ($> 0,6$). Ako negatívne kontroly boli použité nafarbené preparáty, na ktoré neboli aplikované primárne protilátky.

Príprava roztokov:

0,001 M Citrátový pufer, pH = 6,0

Bolo zmiešaných 9 ml roztoku A (21,01 g kyseliny citrónovej v 1 l deionizovanej vody) a 41 ml roztoku B (29,41 g citrátu sodného v 1 l deionizovanej vody), a doplnených do 500 ml deionizovanou vodou. pH bolo upravené na hodnotu 6,0 pomocou roztokov A a B.

EDTA, pH = 8,0

0,37 g Chelatonu III bolo rozpustených v 1 l deionizovanej vody a pH bolo upravené na hodnotu 8,0 pomocou 0,1N NaOH.

TRIS pufer, pH = 7,6

Zásobný 10x koncentrovaný TRIS bol pripravený rozpustením 61 g TRIS–(hydroxymetyl)aminometánu v 1 l deionizovanej vody. pH bolo upravené na hodnotu 7,6 pomocou koncentrovanej HCl.

Roztok 1x TRIS + Tween-20 bol pripravený zmiešaním 1 l 1x TRIS pufru a 500 µl Tween-20.

4.4 DVOJITÉ IMUNOFLUORESCENČNÉ FARBENIE

Aby rezy z TMA blokov lepšie priľnuli k povrchu, boli nanosené na podložné sklá Superfrost Plus[®] (Thermo Scientific) potreté poly-L-lyzínom (Sigma Aldrich, MO, USA). Táto kombinácia bola zvolená z dôvodu, že pri použití samotných skiel Superfrost Plus[®] bola pri následnom spracovávaní preparátov väčšina vzoriek tkanív z TMA odplavená. Rovnako, ako v prípade IHC, boli rezy ponechané v termostate pri 56 °C do druhého dňa. Z dôvodu vysokej autofluorescencie FFPE rezov bolo nutné nájsť spôsob „zhasnutia“ autofluorescencie. Vhodný pre tieto účely sa ukázal byť filtrovaný 0,5% roztok sudanovej čiernej (Sudan Black) v 70% etanole.

Postup dvojitej IF:

Po odparafinovaní, zavodnení a oplachu v deionizovanej vode (rovnaký postup ako v prípade IHC) boli antigény odmaskované 20 min pri 98 °C v Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako). Po vychladnutí preparátov minimálne 20 min pri izbovej teplote a oplachu 5 min v deionizovanej vode bol, kvôli „zhasnutiu“ autofluorescencie, na preparáty aplikovaný 0,5% roztok sudanovej čiernej v 70% etanole po dobu 5 min. Následne boli preparáty opláchnuté 3 min pod tečúcou vodovodnou vodou a umiestnené do pufru 1x PBS + Tween-20. Nešpecifická väzba sekundárnych protilátok Alexa-Fluor bola blokována pomocou Image-iT[™] FX Signal Enhancer (Invitrogen, CA, USA) vo vlhkej komôrke po dobu 30 min. Po oplachu v 1x PBS + Tween-20 (4x 5 min) bola na preparáty aplikovaná zmes primárnych protilátok rabbit polyclonal to CD133 – Stem Cell Marker (Ab16518, Abcam) a mouse antinestin human specific monoclonal antibody (MAB5326, Chemicon International) nariedených v Dako REAL[™] Antibody diluent (Dako) v pomere 1:100. Po inkubácii 1 hod pri izbovej teplote nasledoval opäť oplach v 1x PBS + Tween-20 4x po 5 min. Následne bola aplikovaná zmes sekundárnych protilátok Alexa Fluor[®] 488 goat

anti-rabbit IgG (H+L) (A11034, Invitrogen) a Alexa Fluor[®] 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11032, Invitrogen) nariadených v Dako REAL[™] Antibody diluente (Dako) v pomere 1:200 (od tohto kroku boli preparáty spracovávané v tme). Po 30min inkubácii pri izbovej teplote boli preparáty opláchnuté v 1x PBS + Tween-20 (4x 5 min) a montované do Fluorecence Mounting Medium (Dako) obsahujúceho 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI).

Výsledné preparáty boli hodnotené pomocou fluorescenčného mikroskopu a obrázky boli vyfotené pomocou fotoaparátu DP71 (Olympus, Japonsko). Ako negatívne kontroly boli použité nafarbené preparáty, na ktoré neboli aplikované primárne protilátky.

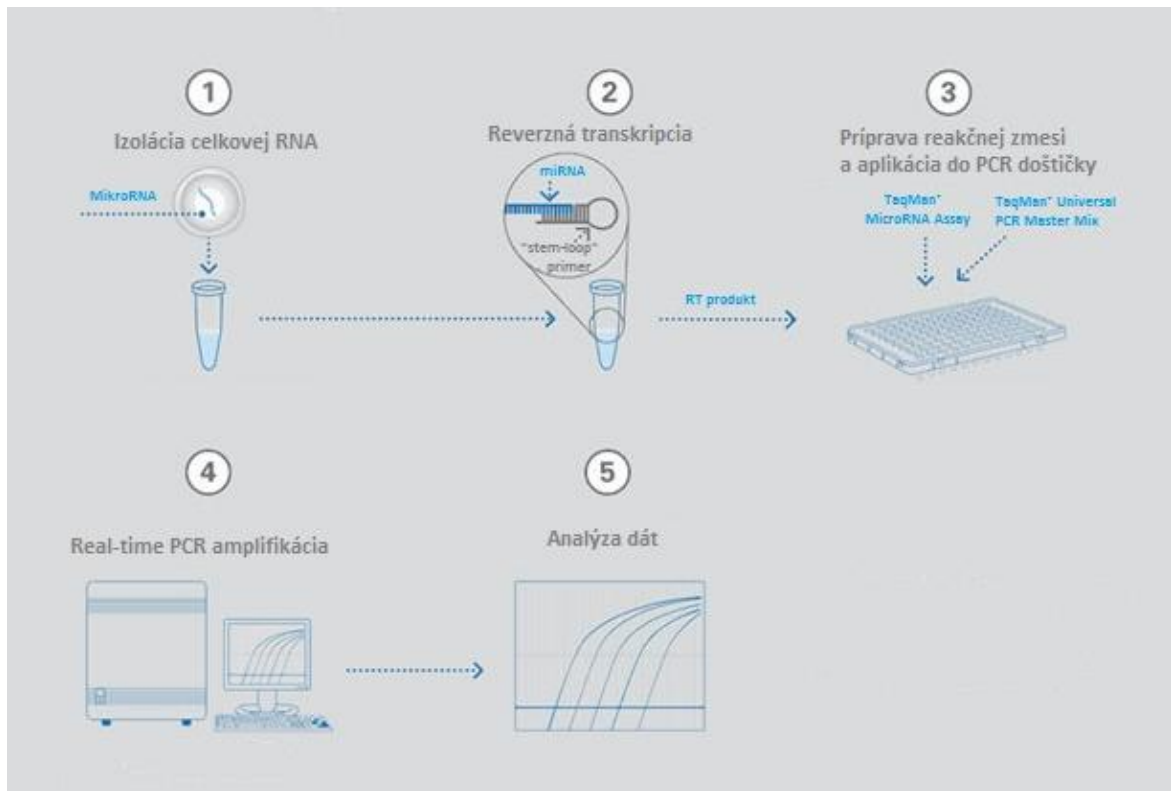
Príprava roztoku:

1x PBS + Tween-20, pH = 7,4

V 800 ml deionizovanej vody bolo rozpustených 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ a 0,24 g Na₂HPO₄. pH bolo upravené na hodnotu 7,4 pomocou koncentrovanej HCl. Pufer bol doplnený do 1 l deionizovanou vodou a následne bolo pridaných 500 µl Tween-20.

4.5 RELATÍVNA KVANTIFIKÁCIA VYBRANÝCH MI RNA

Vybrané miRNA boli kvantifikované s využitím kitov a reagensí k tomu určených od firmy Applied Biosystems (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA) a systému LightCycler[®] 480 (Roche, CT, USA) podľa nasledujúcej schémy (Obr. 9).



Obr. 9: Schéma základného pracovného postupu relatívnej kvantifikácie miRNA s využitím TaqMan® MicroRNA Assay (<http://www.lifetechnologies.com>).

4.5.1 IZOLÁCIA CELKOVEJ RNA

Nepublikované údaje

Nepublikované údaje

4.5.2 REVERZNÁ TRANSKRIPCIA

Nepublikované údaje

Nepublikované údaje

4.5.3 *PREAMPLIFIKÁCIA*

Nepublikované údaje

4.5.4 *KVANTITATÍVNA POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA V REÁLNO M ČASE (QPCR)*

Nepublikované údaje

Nepublikované údaje

4.6 ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

V rámci štatistickej analýzy boli použité softvéry SPSS (verzia 20.0) a program R (analýza CD133 a Nestinu). Pre určenie vzťahov medzi dvoma premennými bol použitý Pearsonov Chí-kvadrát test, zatiaľ čo pre hodnotenie rozdielov medzi skupinami bol použitý Mann-Whitneyho test. Pre analýzu prežívania pacientov bola použitá Kaplan-Meierova metóda, výsledné krivky boli porovnané pomocou log-rank testu. Hodnotilo sa celkové prežitie pacientov (OS) a čas do progresie ochorenia (PFS), resp. v prípade CD133 a Nestinu, dĺžka bezpríznakového obdobia (DFS). Následne bol pre hodnotenie rizika úmrtia pacientov a/alebo relapsu ochorenia vytvorený Coxov regresný model. Štatistická hladina významnosti bola určená hodnotou $P < 0,05$, resp. $P < 0,1$ v prípade CD133 a Nestinu.

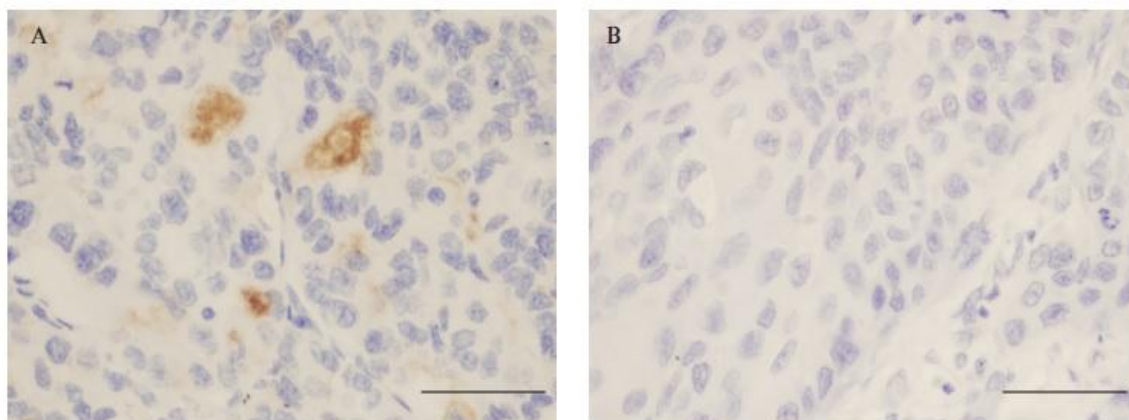
5 VÝSLEDKY

5.1 IDENTIFIKÁCIA BUNIEK NESÚCICH ZNAKY NÁDOROVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK v NSCLC

5.1.1 IMUNOHISTOCHÉMIA

Pomocou dvojstupňovej imunohistochemickej metódy boli na rezoch získaných z TMA detegované proteíny CD133 a Nestin, ktoré bývajú spájané s CSC. Celkovo bolo analyzovaných 19 TMA blokov, pozostávajúcich zo vzoriek získaných od 121 pacientov s NSCLC. Kvôli strate materiálu počas spracovania TMA bola expresia CD133 hodnotená u 116 pacientov, a expresia Nestinu len u 112 pacientov. Prognostický význam Nestinu bol hodnotený z iných 18 TMA blokov, pripravených zo vzoriek získaných od 114 pacientov.

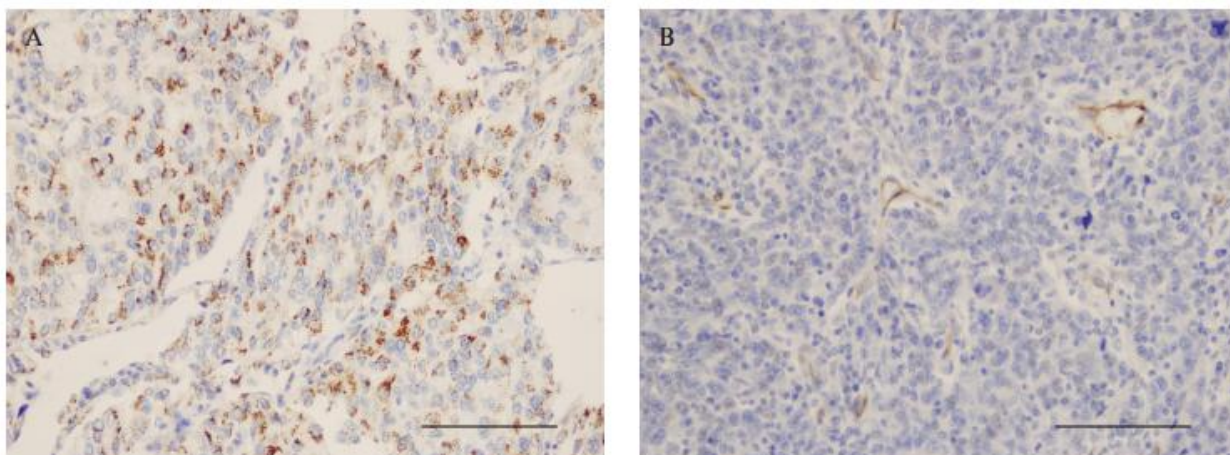
Expresia CD133 bola pozorovaná u 22 pacientov (19 %). U väčšiny z nich (17 pacientov) bola molekula CD133 exprimovaná len v ojedinelých bunkách, avšak u zvyšných 5 pacientov bola expresia CD133 podstatne vyššia (> 20 % pozitívnych buniek) (Obr. 11). Vzhľadom k špecifickému „vzoru“ expresie molekuly CD133 vo vzorkách, nebolo v tomto prípade stanovované histoskóre.



Obr. 11: Imunohistochemická detekcia CD133 vo vzorkách NSCLC. A – príklad pozitívneho farbenia v ADC, B – príklad negatívneho farbenia v SCC. Zväčšenie 400x.

NSCLC – nemalobunkový karcinóm pľúc, ADC – adenokarcinóm, SCC – spinocelulárny karcinóm.

Pri sledovaní úlohy Nestinu, ako markera CSC, bola jeho expresia hodnotená zvlášť v epitelových bunkách, a zvlášť v bunkách endotelových. V epitelových bunkách bol Nestin detegovaný u 74 pacientov (66 %), z toho u 33 pacientov (29 %) bola jeho expresia vysoká. U 78 pacientov (70 %) bola expresia Nestinu pozorovaná v endotele ciev, z toho u 53 pacientov (47 %) bola jeho expresia vysoká (Obr. 12). Expresia Nestinu v jednotlivých vzorkách pacientov je zhrnutá v tabuľke 8.



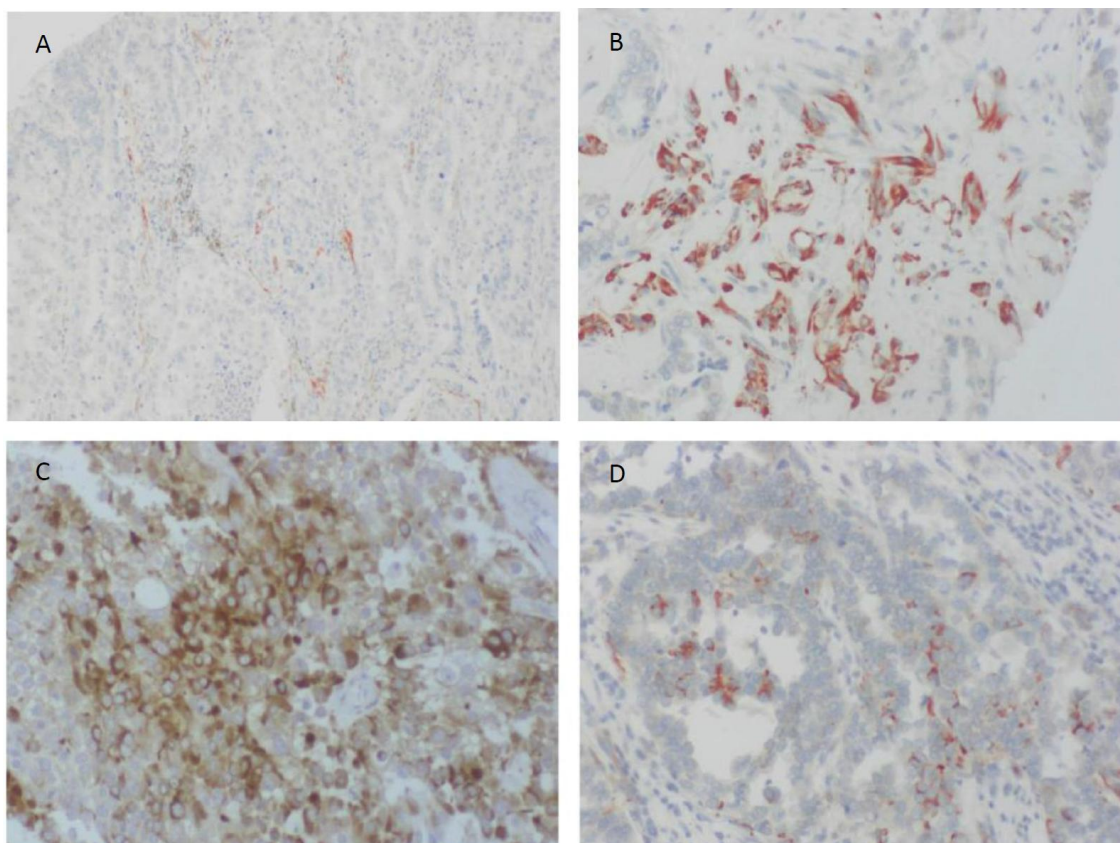
Obr. 12: Imunohistochemická detekcia Nestinu vo vzorkách NSCLC. A – príklad pozitívneho farbenia epitelových buniek v ADC, B – príklad pozitívneho farbenia endotelu ciev v SCC. Zväčšenie 200x.

NSCLC – nemalobunkový karcinóm pľúc, ADC – adenokarcinóm, SCC – spinocelulárny karcinóm.

Intenzita expresie	Nestin			
	Epitelové bunky		Cievny endotel	
	Počet pacientov	%	Počet pacientov	%
Veľmi nízka (< 0,1)	38	34	34	30
Nízka (< 0,3)	26	23	12	11
Stredná (< 0,6)	15	13	13	12
Vysoká ($\geq 0,6$)	33	29	53	47
Celkom	112	100	112	100

Tab. 8: Expresia Nestinu v epitelových bunkách a v bunkách endotelu ciev NSCLC.

Pri určovaní prognostického významu Nestinu bola jeho expresia v primárnych nádoroch detegovaná u 40 pacientov (35,1 %), pričom u 9 pacientov (7,9 %) bola pozorovaná prítomnosť Nestinu v bunkách endotelu ciev. Expresia nestinu bola častejšie pozorovaná vo vzorkách metastáz (85,7 % prípadov), než vo vzorkách primárnych nádorov (35,1 % prípadov) (Obr. 13). V tabuľke 9 je zhrnutá expresia Nestinu v jednotlivých histologických podtypoch a štádiách, a v mozgových metastázach.



Obr. 13: Imunohistochemická detekcia Nestinu vo vzorkách z primárnych NSCLC a z mozgových metastáz. Príklad pozitívneho farbenia endotelu ciev v primárnom nádore (A) a v metastáze (B). Príklad pozitívneho farbenia Nestinu v metastáze z SCC (C) a z ADC (D). Zväčšenie 200x (A), 400x (B-D).

ADC – adenokarcinóm, SCC – spinocelulárny karcinóm.

Charakteristika		Celkový počet pacientov	Nestin+			
			Celková		Cievny endotel	
			Počet pacientov	%	Počet pacientov	%
Histologický podtyp	ADC	35	15	42,8	3	8,6
	SCC	79	25	31,6	6	7,6
Celkom		114	40	35,1	9	7,9
Štádium	I	31	7	22,6	1	3,2
	II	27	9	3,3	1	3,7
	IIIa	56	24	42,9	7	12,5
Celkom		114	40	35,1	9	7,9
Mozgové metastázy	ADC	24	19	79,2	1	4,2
	SCC	11	11	100	1	9,1
Celkom		35	30	85,7	2	5,7

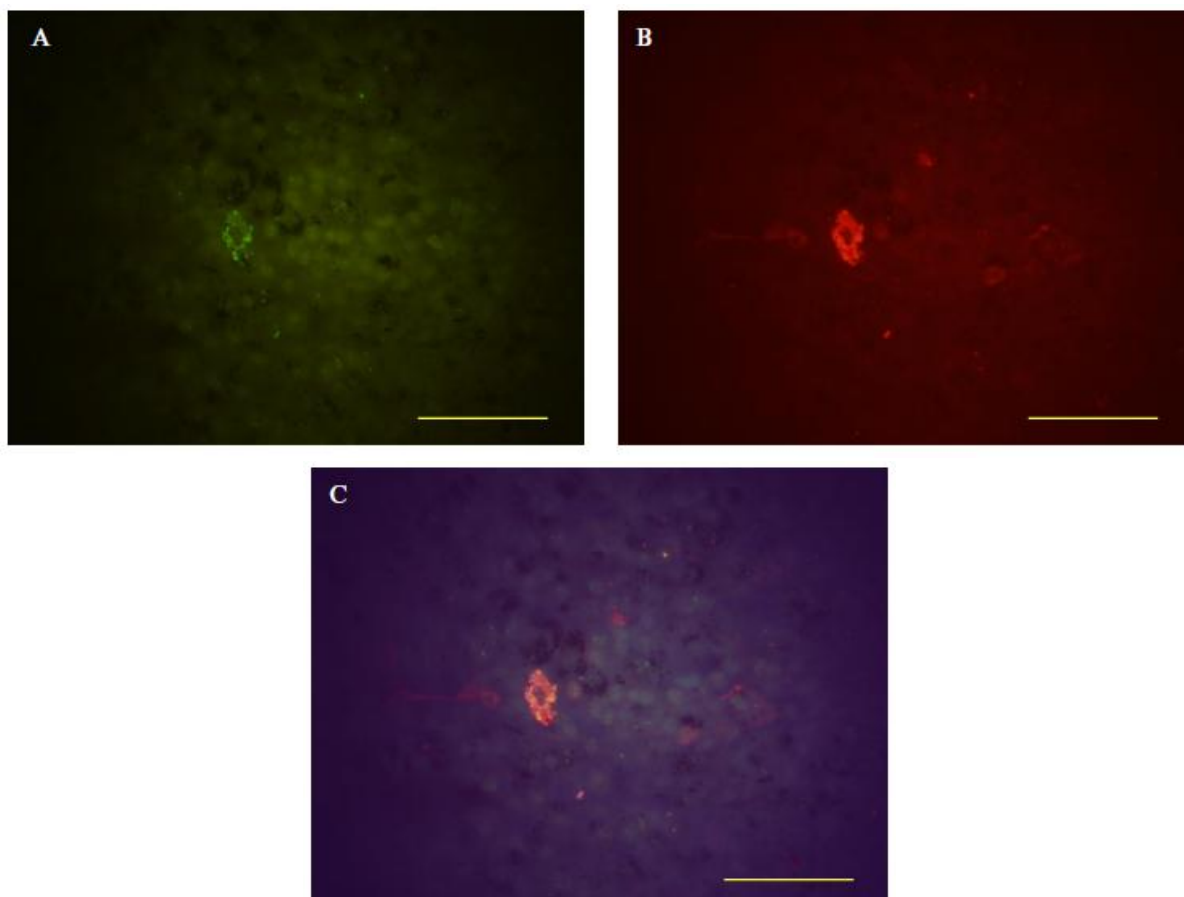
Tab. 9: Expresia Nestinu v jednotlivých histologických podtypoch a štádiách NSCLC, a v mozgových metastázach.

ADC – adenokarcinóm, SCC – spinocelulárny karcinóm.

5.1.2 IMUNOFLUORESCENCIA

Dvojité IF farbenie bolo použité pre detekciu spoločnej expresie CD133 a Nestinu v nádorových bunkách NSCLC. Tieto bunky sú považované za bunky majúce charakter kmeňových buniek. IF analýza bola vykonaná na rovnakom súbore pacientov ako IHC analýza.

Spoločná expresia CD133 a Nestinu bola zaznamenaná u 21 pacientov (17 %) (Obr. 14). Tieto bunky sa vyskytovali veľmi sporadicky (1 – 5 buniek/rez) (< 1 %), čo by mohlo nasvedčovať tomu, že sa skutočne jedná o CSC.

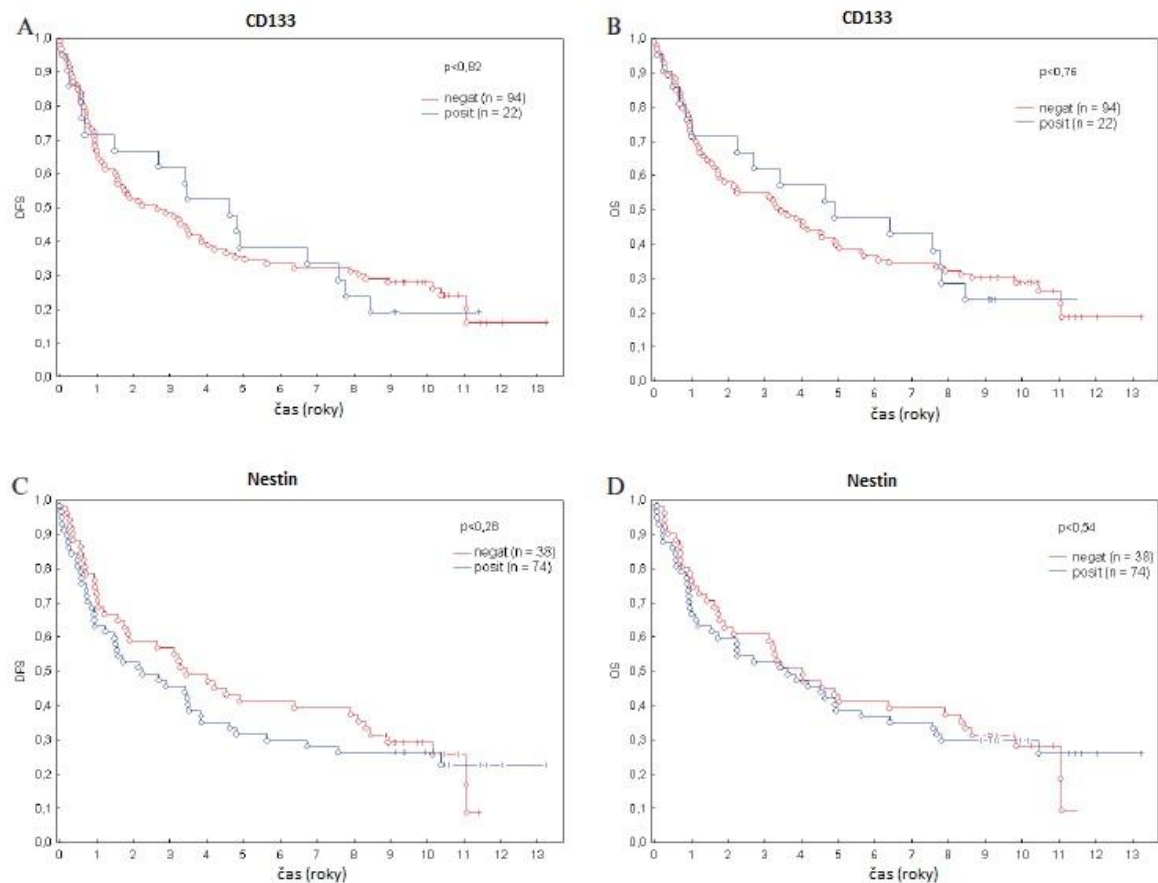


Obr. 14: Imunofluorescenčná detekcia CD133⁺/Nestin⁺ buniek vo vzorkách NSCLC. A – príklad pozitívneho farbenia CD133 (zelená), B – príklad pozitívneho farbenia Nestinu (červená), C – príklad prekryvu CD133 a Nestinu (žltá). Zväčšenie 400x.

NSCLC – nemalobunkový karcinóm pľúc

5.1.3 ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Na základe IHC expresie CD133 a Nestinu, vo vzorkách analyzovaných z dôvodu identifikácie buniek nesúcich znaky CSC, bola urobená analýza prežívania pacientov s NSCLC (štatistická hladina významnosti bola určená hodnotou $P < 0,1$). Pomocou Kaplan-Meierovej analýzy bolo zistené, že ako expresia CD133, tak ani expresia Nestinu v epitelových bunkách, nemá vplyv na dĺžku bezpríznakového obdobia a celkové prežitie pacientov s NSCLC ($DFS_{CD133} < 0,82$, $OS_{CD133} < 0,76$; $DFS_{Nestin} < 0,28$, $OS_{Nestin} < 0,54$) (Obr. 15).



Obr. 15: Kaplan-Meierova analýza na základe IHC expresie CD133 (A a B) u 116 pacientov s NSCLC a Nestinu (C a D) u 112 pacientov s NSCLC.

NSCLC - nemalobunkový karcinóm pľúc, DFS – dĺžka bezpríznakového obdobia, OS – celkové prežitie.

Na ďalšom súbore pacientov bol určovaný vzťah expresie Nestinu k jednotlivým histologickým podtypom a štádiám NSCLC. Bolo zistené, že expresia Nestinu je signifikantne vyššia v mozgových metastázach pôvodom z SCC, než v metastázach z ADC ($P \leq 0,003$), avšak u primárnych nádorov nebol zistený rozdiel v jeho expresii u jednotlivých histologických podtypov ($P = 0,30$). Taktiež bolo pozorované, že expresia Nestinu a prítomnosť Nestin⁺ endotelu ciev boli častejšie detegované u pacientov v štádiu IIIA, než u pacientov v štádiách I a II ($P \leq 0,04$; $P \leq 0,02$).

5.2 MOŽNÁ ÚLOHA VYBRANÝCH MIRNA AKO BIOMARKEROV NSCLC

5.2.1 *RELATÍVNA KVANTIFIKÁCIA VYBRANÝCH MIRNA*

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

6 DISKUSIA

Identifikácia nových biomarkerov u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc predstavuje v súčasnosti veľkú výzvu. Napriek získavaniu nových poznatkov z oblasti biomarkerov a nových sľubných terapeutických možností na poli NSCLC, podľa údajov z roku 2010, 5 rokov od stanovenia diagnózy sa dožije menej než 11 % pacientov [4]. Toto zlepšené prežívanie sa dosiahlo aj vďaka používaniu cielenej terapie, najmä erlotinibu, gefitinibu a crizotinibu. Väčšina pacientov je však i naďalej liečených konvenčnou terapiou. Aj napriek intenzívnym štúdiám nových potenciálnych prognostických a prediktívnych markerov NSCLC, sa nedarí týchto pacientov uspokojivo stratifikovať do efektívnejších chemoterapeutických režimov. Zároveň je nutné brať do úvahy, že pacienti bývajú diagnostikovaní až v pokročilejších štádiách (hlavne III a IV), kedy dochádza k výraznému rozvoju nádorovej heterogenity. Okrem uvedeného, u týchto pacientov veľmi často dochádza k rozvoju liekovej rezistencie, čím sa podávaná terapia stáva neúčinnou. Doteraz tiež neboli identifikované žiadne markery, ktoré by jednoznačne dokázali u pacientov s NSCLC určiť nástup aktivácie MDR mechanizmov, a tak umožniť v správnom čase upraviť a optimalizovať liečbu postihnutých pacientov. Preto som sa v tejto dizertačnej práci zamerala na identifikáciu nových možných biomarkerov u pacientov s NSCLC, a to hlavne na identifikáciu buniek nesúcich znaky nádorových kmeňových buniek s predpokladaným vzťahom k vzniku rezistencie a k rekurencii ochorenia, a tiež na molekuly miRNA, ktorých význam v oblasti biomarkerov stále stúpa, a ktoré sa javia ako veľmi sľubné molekuly umožňujúce ako určenie správnej diagnózy, tak aj stanovenie prognózy pacientov s nádorovými ochoreniami.

6.1 IDENTIFIKÁCIA BUNIEK NESÚCICH ZNAKY NÁDOROVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK V NSCLC

Identifikácia CSC v jednotlivých typoch nádorov je dnes pomerne rozšírená. Predpokladá sa, že tieto bunky stoja za vývojom nádorového ochorenia, a tiež za vznikom metastáz, a za rekurenciou nádorov. CSC majú veľa spoločných vlastností s normálnymi tkanivovými kmeňovými bunkami. Vďaka týmto ich vlastnostiam, a tiež preto, že CSC sa väčšinou vyskytujú v dormantnom stave a súčasná protinádorová terapia je zameraná

hlavne proti rýchlo proliferujúcim bunkám, býva problém ich zacieliť a zlikvidovať. Preto sa skúšajú aplikovať rôzne stratégie, ktoré by dokázali zacieliť ako proliferujúce, tak aj dormantné CSC [170]. Keďže sa predpokladá, že tieto bunky môžu stáť aj za vznikom vzdialených metastáz, má ich štúdium značný význam. Z dôvodu najčastejšieho metastázovania NSCLC do mozgu sme sa rozhodli identifikovať bunky nesúce markery charakteristické pre CSC glioblastómov (CD133 a Nestin), ktoré, vďaka ich agresívnosti, sú v súčasnosti pravdepodobne najpreskúmanejšími CSC vôbec. Samozrejme, okrem nich CSC exprimujú aj ďalšie molekuly charakteristické pre kmeňové bunky, ako napr. transkripčné faktory podieľajúce sa na udržovaní fenotypu kmeňových buniek (tzv. „stemness“) Okt4/3 a homeoboxový proteín Nanog, detoxifikačný enzým glutatión S-transferázu (GST), efluxné transportéry ABCB1 a ABCG2, a tiež proteín CXCR4 zodpovedný za motilitu kmeňových buniek. Viaceré štúdie naznačujú, že tieto molekuly prispievajú k zlyhaniu protinádorovej terapie a k vzniku liekovej rezistencie a vzdialených metastáz [171-173].

Keďže molekuly CD133 a Nestin sú v súčasnosti vo všeobecnosti považované za markery CSC, a ich spoločná expresia býva využívaná k identifikácii a k separácii CSC z rôznych typov nádorov [174-177], priklonili sme sa k stanoveniu ich expresie v parafínových vzorkách získaných od 121 pacientov s NSCLC. K detekcii ich samostatnej expresie sme využili metódu dvojstupňovej imunohistochemie. Z dôvodu straty materiálu pri spracovávaní sme expresiu CD133 určovali len u 116 pacientov, a expresiu Nestinu u 112 pacientov.

Molekulu CD133 sme detegovali u 22 pacientov. U 5 z nich bola expresia CD133 pozorovaná vo viac než 20 % nádorových buniek, u zvyšku pacientov len v ojedinelých bunkách. Podobne, veľmi nízku expresiu CD133 vo vzorkách NSCLC, až na pár výnimiek, pozorovali i dr. Eramo s kolektívom [76]. Zistili však, že len 5 až 30 % CD133⁺ buniek má tzv. tumorogénny potenciál, čiže dokáže vyvolať tvorbu nového nádoru. Preto populáciu CD133⁺ buniek rozdelili na dve skupiny: na populáciu buniek podobných kmeňovým bunkám s „tumorogénnym“ potenciálom a na populáciu prekurzorových, či progenitorových buniek, ktoré nový nádor nevytvárajú. Autori tiež zistili, že časť CD133⁺ buniek exprimuje epitelový antigén Ep-CAM. Na základe toho usúdili, že populácia CD133⁺ buniek v karcinómoch pľúc obsahuje značné množstvo nediferencovaných epitelových buniek. Aby sa teda zabránilo kontaminácii populácie CD133⁺ pľúcnych buniek hematopoetickými a endotelovými prekurzormi, viacerí autori na izoláciu pľúcnych buniek s „tumorogénnym“ potenciálom využili dvojité značenie pomocou molekúl CD133 a Ep-CAM. Populácie takto vyizolovaných

CD133⁺ buniek mali schopnosť tvorby nádorových sfér, a po subkutánnom podaní imunokompetentným myšiam dokázali iniciovať vývoj nádoru, vykazujúceho rovnaké morfológické vlastnosti ako pôvodný nádor pacientov [76, 178]. Dr. Bertolini s kolektívom tiež zistili, že CD133⁺ bunky sú rezistentné k cisplatine. Po aplikácii cisplatinovej liečby myšiam s xenograftami nádorov u nich došlo k výraznému zväčšeniu podielu CD133⁺ buniek. Vďaka tomu, že po terapii dochádzalo k selekcii chemorezistentných CD133⁺ klonov majúcich vlastnosti kmeňových buniek, zvyšovala sa aj expresia génov zapojených do metastázovania, liekovej rezistencie, proliferácie či sebaobnovy, ako napr. ABCG2, CXCR4, Nanog, Okt4/3 a α -6 integrínu [171]. Okrem toho bolo zistené, že CD133⁺ bunky majú vzťah aj k rádiorezistencii, takže bežne používanou liečbou je ťažké ich eradikovať [179].

Naopak, Dr. Cui s kolektívom tvrdia, že na základe ich experimentov vykonaných na bunkových líniiach odvodených z rôznych typov karcinómov pľúc, molekula CD133 nie je markerom CSC u NSCLC, ale len u SCLC. Keďže z línii odvodených z NSCLC nezískali CD133⁺ frakciu, *in vivo* experimenty na myšiach vykonali len s CD133⁺ frakciou získanou z línie predstavujúcej SCLC [180]. Avšak, v ďalších štúdiách bola molekula CD133 využitá k identifikácii a k separácii CSC z bunkových populácií získaných z NSCLC, a tieto CD133⁺ bunky sa ukázali mať pomerne vysoký „tumorigénny“ potenciál [171, 181]. Preto sme sa aj my priklonili k názoru, že povrchový antigén CD133 by mohol byť považovaný za vhodný marker CSC u NSCLC.

Keďže CD133⁺ frakcia, nezávisle od expresie Ep-CAM, stále obsahuje bunky, ktoré nemajú schopnosť vytvoriť nový nádor [76], na identifikáciu CSC u rôznych typov solidných nádorov sa využíva expresia ďalších proteínov charakteristických pre kmeňové bunky. Sú to hlavne molekuly diferenciačných signálnych dráh aktívnych v kmeňových bunkách (napr. Sox2, Oct4, Nanog), detoxyfičné enzýmy (napr. ABCG2, ALDH1), alebo molekuly tvoriace štruktúry nediferencovaných buniek (napr. Nestin, ktorý je v diferencovaných bunkách nahradený Vimentinom, resp. GFAP) [83, 175, 182, 183]. Preto sme aj my vybrali ďalší, všeobecne využívaný marker – Nestin, a ako prví sme sledovali jeho spoločnú expresiu s CD133 u pacientov s NSCLC.

Expresia Nestinu bola u vyšetovaných pacientov s NSCLC výrazne vyššia než expresia CD133. Preto sme zvlášť hodnotili imunohistochemickú expresiu v nádorových cievach, a zvlášť v epitele. Epitelové bunky vykazovali pozitívne farbenie na Nestin u 74 pacientov (66 %), zatiaľ čo 78 pacientov (70 %) malo Nestin⁺ cievny endotel. Podobne,

expresiu Nestinu u polovice, či dokonca u väčšiny pacientov s NSCLC, pozorovali aj iní autori [81, 82, 184]. Avšak, výsledky tejto našej štúdie nenaznačili žiadny vzťah expresie Nestinu, a dokonca ani molekuly CD133, k prežívaniu pacientov s NSCLC. Vzhľadom k tomu, že cieľom tejto štúdie bola identifikácia CD133⁺/Nestin⁺ buniek, nebol na tomto súbore pacientov analyzovaný vzťah expresie daných proteínov k jednotlivým histologickým podtypom či štádiám. Napriek tomu, niektoré štúdie naznačujú, že expresia Nestinu má pre pacientov prognostický význam. Jeho expresia bola spojená s výskytom metastáz do lymfatických uzlín a pleury, a tiež so zvýšenou proliferáciou a novotvorbou ciev ako krvného, tak aj lymfatického systému [81, 184, 185]. Tieto tvrdenia podporujú aj naše výsledky, získané na odlišnom súbore pacientov, u ktorých bol zisťovaný prognostický význam expresie Nestinu. Ukázali, že expresia Nestinu a novotvorba Nestin⁺ ciev sú častejšie prítomné u pacientov vo vyššom štádiu ochorenia (IIIA), než u pacientov v skorších štádiách (I a II) ($P \leq 0,003$), a teda môže byť spojená s horšou prognózou pacientov. K podobnému záveru došla aj skupina dr. Ahmeda, ktorá na vzorkách pacientov s ADC detegovala výrazne zvýšenú expresiu Nestinu u pacientov v pokročilejších štádiách ochorenia [186]. Naša štúdia tiež poukazovala na podstatne vyššiu expresiu Nestinu vo vzorkách získaných z metastáz, než vo vzorkách z primárnych nádorov (85,7 % vs. 35,1% prípadov), a jeho expresia bola signifikantne vyššia v metastázach z SCC, než z ADC ($P \leq 0,003$). Tieto pozorovania sú tiež v zhode s už spomenutými prácami [81, 184, 185].

Horšia prognóza pacientov s Nestin⁺ nádormi je pravdepodobne zapríčinená jeho vzťahom k proteínom riadiacim proliferáciu a zastavenie bunkového cyklu. Dr. Chen s kolektívom dokázali, že umlčanie expresie Nestinu vedie k inhibícii aktivácie AKT a GSK3 β , čím môže byť inhibovaná proliferácia nádorových buniek [82]. Okrem toho, dr. Narita s kolektívom zistili, že inhibícia expresie Nestinu v bunkách odvodených od pľúcnych adenokarcinómov znižuje proliferáciu, migráciu, inváziu a zabraňuje tvorbe sfér. Tiež prišli na to, že AKT inhibítor IV, vďaka deregulácii SOX2, efektívne znižuje expresiu Nestinu. Tieto ich výsledky teda naznačujú, že agresivnosť a vlastnosti charakteristické pre kmeňové bunky, spojené s expresiou Nestinu, môžu byť zacielené cez inhibíciu AKT/SOX2, čím by sa mohla dosiahnuť eradikácia CSC v pľúcnych ADC [81]. Preto význam štúdia Nestinu, ako markera CSC u NSCLC, stále stúpa, a náš zámer identifikovať bunky vykazujúce spoločnú expresiu dvoch významných uznávaných markerov CSC, sa javí ako veľmi vhodný.

Na určenie spoločnej expresie CD133 a Nestinu u pacientov s NSCLC sme využili metódu dvojitej imunofluorescencie. Prítomnosť CD133⁺/Nestin⁺ buniek sme detegovali u 21 pacientov (17 %), avšak tieto bunky boli pozorované len veľmi ojedinele a reprezentovali < 1 % buniek v reze. Keďže doteraz nebola publikovaná žiadna práca, v ktorej by bola sledovaná spoločná expresia CD133 a Nestinu v NSCLC, môžeme naše výsledky porovnávať len s výsledkami získanými z iných typov solidných nádorov.

Ako už bolo spomenuté vyššie, pravdepodobne najlepšie preskúmané CSC, a teda aj spoločná expresia CD133 a Nestinu, je u glioblastómov. K rovnakému záveru ako my v našej prvej štúdií o CSC, že ani expresia CD133, ani expresia Nestinu nemá vzťah k prognóze pacientov s glioblastómom, došla i skupina dr. Kima. Napriek tomu, že vo všeobecnosti býva expresia markerov CSC, pre ktoré je charakteristická prirodzená rezistencia voči chemo- i rádioterapii, spájaná s horšou prognózou pacientov, autori tejto štúdie dokonca pozorovali o niečo dlhšie prežitie CD133⁺ pacientov, v porovnaní s CD133⁻ pacientami. Tento nesúlad expresie markerov CSC s prežívaním pacientov vysvetľujú tým, že ako CD133, tak aj Nestin, môžu byť samostatne exprimované aj v niektorých menej diferencovaných nádorových bunkách. Vďaka tomu, že nádory môžu vznikáť nie len z progenitorových, ale i z tkanivových kmeňových buniek, túto fenotypovú diverzitu nádorových buniek, podľa autorov, nejde vystihnúť jednotlivými markerami CSC, ale je nutná kombinácia viacerých molekúl [187]. Naopak, iné štúdie vykonané na pacientoch s touto diagnózou tvrdia, že pacienti exprimujúci tieto molekuly (obzvlášť Nestin) majú horšiu prognózu, než pacienti nevykazujúci ich expresiu [77, 188]. Pomocou experimentov na bunkových líniiach odvodených z glioblastómov bolo tiež zistené, že CD133⁺/Nestin⁺ bunky vykazujú charakter kmeňových buniek, čiže majú aktivované diferenciačné signálne dráhy Wnt, Notch a Hedgehog, podieľajúce sa na udržiavaní ich „stemness“ potenciálu a na riadení diferenciácie [189-191]. Okrem toho, sú tieto bunky rezistentné voči chemoterapii a rádioterapii, majú angiogénny potenciál, a po ich implantácii experimentálnym myšiam sú u nich schopné vyvolať vznik nového nádoru [192, 193]. Ďalší autori prišli na to, že expresia CD133 a Nestinu sa zvyšuje za hypoxických podmienok [194, 195], čo podporuje teóriu o CSC schopných prežiť nepriaznivé podmienky v dormantnom štádiu [170].

Doteraz získané informácie o charakteristike molekúl CD133 a Nestinu, zhrnuté v predchádzajúcich odstavcoch, boli potvrdené aj na mnohých ďalších typoch nádorov. Jedná sa hlavne o retinoblastóm [196], osteosarkóm [197], melanóm [198-201], rhabdomyosarkóm

[202], kostný sarkóm [203], karcinóm žľazníka [204], duktálny adenokarcinóm pankreasu [177, 205, 206] a karcinóm ovária [183, 207].

6.2 MOŽNÁ ÚLOHA VYBRANÝCH MIRNA AKO BIOMARKEROV NSCLC

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

Nepublikované výsledky

7 ZÁVER

- Podarilo sa nám identifikovať CD133⁺/Nestin⁺ bunky v rezoch získaných z TMA blokov. Tieto bunky boli zastúpené s podstatne nižšou frekvenciou než bunky CD133⁺ či Nestin⁺, čo by mohlo svedčiť o ich možnej úlohe nádorových kmeňových buniek.
- Nepodarilo sa nám v tejto práci potvrdiť, že by expresia sledovaných proteínov významne ovplyvňovala prežívanie vyšetrovaných pacientov.
- Podarilo sa nám potvrdiť pravdepodobný prognostický význam expresie Nestinu, spojenej s vyšším štádiom ochorenia a s tvorbou metastáz.

Nepublikované výsledky

Perspektívy do budúcnosti:

Táto dizertačná práca v sebe zhrňa výsledky pilotných štúdií zameraných na identifikáciu buniek nesúcich znaky CSC a nových biomarkerov u pacientov s NSCLC. Vďaka tomu by mohla byť nápomocná pri určovaní správnej diagnózy, a tiež pri určovaní prognózy

pacientov s NSCLC. Stáva sa tak podkladom pre ďalší výskum, ktorý by mohol prispieť k individualizovanému prístupu k pacientom s NSCLC. Jej výsledky je však nutné overiť na väčšom súbore pacientov.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABC	ATP-väzobná kazeta (ATP-binding cassette)
ADC	adenokarcinóm (adenocarcinoma)
ADP	adenozíndifosfát (adenosine diphosphate)
AGO	argonaut (argonaut)
AKT	v-akt homológ onkogénu vírusu myšieho tymómu (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)
ALDH1	aldehyd dehydrogenáza 1 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1)
APC	adenomatózna polypóza čreva (adenomatous polyposis coli)
ATP	adenozíntrifosfát (adenosine triphosphate)
BAK	homológ antagonistu/zabijaka BCL2 (BCL2 homologous antagonist/killer)
BAX	X proteín asociovaný s BCL2 (BCL2-associated X protein)
BCL2	B-bunkový lymfóm 2 (B-cell lymphoma 2)
BCRP	proteín spojený s rezistenciou karcinómu prsníka (breast cancer resistance protein)
CCND2	cyklín D2 (cyclin D2)
CD	diferenciačný klaster (cluster of differentiation)
cDNA	komplementárna DNA (complementary DNA)
CI	konfidenčný interval (confidence interval)
CLL	chronická lymfocytová leukémia (chronic lymphocytic leukemia)
c-MYC	v-myc homológ onkogénu vírusu vtáčej myelocytomatózy (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)
CNS	centrálny nervový systém (central nervous system)
CsA	cyklosporín A (cyclosporine A)
CSC	nádorová kmeňová bunka (cancer stem cell)
Ct	prahový cyklus (cycle threshold)
CXCR4	chemokínový receptor s C-X-C motívom 4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4)
Da	dalton (dalton)
DAB	3, 3'-diamobenzidín (3, 3'-diaminobenzidine)
DDR	odpoveď na poškodenie DNA (DNA damage response)

DEPC	dietylpyrokarbonát (diethylpyrocarbonate)
DFS	bezpríznakové obdobie (disease-free survival)
DGCR8	DiGeorge syndróm kritickej oblasti génu 8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfát (deoxyribonucleoside triphosphate)
DSC	bunka prežívajúca liečbu (drug surviving cell)
Dsh	dishevelled (dishevelled)
dsRNA	dvojvláknová RNA (double-stranded RNA)
EDTA	kyselina etyléndiamín tetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFR	receptor pre epidermálny rastový faktor (epidermal growth factor receptor)
EML4-ALK	proteín podobný proteínu asociovanému s mikrotubulmi ostnantokožcov 4 – kináza anaplastického lymfómu (echinoderm microtubule-associated protein-like 4 - anaplastic lymphoma kinase)
ENCODE	encyklopédia DNA elementov (encyclopedia of DNA elements)
Ep-CAM	adhézna molekula epitelovej bunky (epithelial cell adhesion molecule)
FFPE	vo formalíne fixované, do parafínu zaliate (formalin-fixed, paraffin-embedded)
Fz	frizzled (frizzled)
G	stupeň (grade)
GFAP	kyslý gliálny fibrilárny proteín (glial fibrillary acidic protein)
GSK3 β	glykogén syntáza kináza-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta)
GST	glutatión S-transferáza (glutathione S-transferase)
GTP	guanozíntrifosfát (guanosine triphosphate)
HH	hedgehog (hedgehog)
HR	podiel rizika (hazard ratio)
IASLC	medzinárodná organizácia pre štúdium nádorov pľúc (International association for the study of lung cancer)
IF	imunofluorescencia (immunofluorescence)
IHC	imunohistochemia (immunohistochemistry)
LCC	veľkobunkový karcinóm (large cell carcinoma)
LNA	uzamknutá nukleová kyselina (locked nucleic acid)
LRP/MVP	proteín spojený s rezistenciou pľúc/veľký “vault” proteín (lung resistance-related protein/major vault protein)

LRP5/6	lipoproteíny podobné receptoru o nízkej denzite 5 a 6 (low-density lipoprotein-related receptors 5 and 6)
LTC4	leukotrién C4 (leukotrien C4)
M	metastázy (metastasis)
MDR	mnohopočetná lieková rezistencia (multidrug resistance)
miRNA/miR	mikroRNA (microRNA)
MM	master mix (master mix)
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MRP	proteín mnohopočetnej liekovej rezistencie 1 (multidrug resistance-associated protein 1)
N	lymfatické uzliny (lymph nodes)
NBD	doména viažúca nukleotidy (nucleotide binding domain)
NES	nestin (nestin)
NICD	intracelulárna doména Notch (Notch intracellular domain)
NSCLC	nemalobunkový karcinóm pľúc (non-small cell lung cancer)
OS	celkové prežitie (overall survival)
P	hladina pravdepodobnosti (probability level)
PARP	poly ADP-ribóza polymeráza (poly ADP-ribose polymerase)
PBS	fosfátový pufer (phosphate-buffered saline)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PDCD4	proteín programovanej bunkovej smrti 4 (programmed cell death protein 4)
PFS	čas do progresie (progression-free survival)
P-gp	P-glykoproteín (P-glycoprotein)
pRB	proteín retinoblastómu (retinoblastoma protein)
PTC	patched (patched)
PTEN	homológ fosfatázy a tenzínu (phosphatase and tensin homolog)
qPCR	kvantitatívna PCR (quantitative PCR)
RAS	homológ onkogénu vírusu krysieho sarkómu (rat sarcoma viral oncogene homolog)
RISC	RNA-indukovaný umlčovací komplex (RNA-induce silencing complex)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RNAi	RNA interferencia (RNA interference)
RR	relatívne riziko (relative risk)

RT	reverzná transkripcia (reverse transcription)
RTK	tyrozín-kinázový receptor (receptor tyrosine kinase)
S	štádium (stage)
SCC	skvamózny (spinocelulárny) karcinóm (squamous cell carcinoma)
SCLS	malobunkový karcinóm pľúc (small cell lung cancer)
SMO	smoothened (smoothened)
SOX4	SRY-box 4 (SRY-box 4)
SRY	pohlavie určujúci region Y (sex determining region Y)
T	tumor (tumour)
TIMP3	TIMP inhibítor metalopeptidáz 3 (TIMP metallopeptidase inhibitor 3)
TMA	tkanivová mikroerej (tissue microarray)
TMD	transmembránová doména (transmembrane domain)
TNC	tenascin C (tenascin C)
TOPOII	topoizomeráza typ II (type II topoisomerase)
TRBP	TAR RNA väzobný proteín (TAR RNA binding protein)
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometán (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
TS	tumor-supresor (tumour-supressor)
UTR	netranslatovaná oblasť (untranslated region)
VEGF	vaskulárny endotelový rastový faktor (vascular endothelial growth factor)
WHO	svetová zdravotnícka organizácia (world health organisation)
ZEB1	zinkový prst E-box viažúci homeobox 1 (zinc finger E-box binding homeobox 1)
β -Cat	β -katenín (β -catenin)

9 PREHĽAD PUBLIKÁCIÍ AUTORA

1. Práce súvisiace s dizertačnou prácou:

a) Pôvodné vedecké publikácie *in extenso* v danom odbore uverejnené v časopisoch s IF

Janikova M, Skarda J, Dziechciarkova M, Radova L, Chmelova J, Krejci V, Sedlakova E, Zapletalova J, Langova K, Klein J, Grygarkova I, Kolek V. Identification of CD133+/nestin+ putative cancer stem cells in non-small cell lung cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2010; 154:321-326. IF 0,761

Skarda J, Kolar Z, **Janikova M**, Radova L, Kolek V, Fridman E, Kopolovic J. Analysis of the prognostic impact of nestin expression in non-small cell lung cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2012; 156:135-142. IF 0,990

Janikova M, Zizkova V, Skarda J, Kharashvili G, Radova L, Kolar Z. Prognostic significance of miR-23b in combination with P-gp, MRP and LRP/MVP expression in NSCLC. V recenznom konaní časopisu Biomed Res Int. IF 2,706

b) Prehľadové/súborné vedecké práce v danom odbore uverejnené v časopisoch s IF

Janikova M, Skarda J. Differentiation pathways in carcinogenesis and in chemo- and radioresistance. Neoplasma. 2012; 59:6-17. IF 1,574

c) Publikované abstrakty

Janíková M, Škarda J, Kolář Z, Chmelová J, Krejčí V, Zapletalová J, Langová K, Klein J, Grygárková I, Kolek V, Fridman E, Kopolovic J. Analysis of the prognostic impact of nestin expression in non-small cell lung cancer. Sborník abstraktů a přednášek. Seminář MŠM 6198959261, Hustopeče u Brna, 2009.

Škarda J, Kolar Z, **Janikova M**, Chmelova J, Krejci V, Zapletalova J, Langova K, Klein J, Grygarkova I, Kolek V, Fridman E, Kopolovic J. Analysis of the prognostic impact of nestin expression in nonsmall cell lung cancer. *Virchows Arch.* 2009; 455:344-344. 22nd European Congress of Pathology, Florence, Italy, 2009. IF 2,305

Škarda J, Kolář Z, **Janíková M**, Chmelová J, Krejčí V, Zapletalová J, Langová K, Klein J, Grygárková I, Kolek V, Fridman E, Kopolovic J. Analysis of the prognostic impact of nestin expression in non-small cell lung cancer. *The 6th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 94th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 2nd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians.* Olomouc, 2010, ISBN 978-80-87327-07-4.

Janíková M, Škarda J, Žižková V, Lužná P, Radová L. Význam miR-21, miR-126 a miR-205 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. *Edukační sborník XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, Brno, 2011, ISBN 978-80-86793-17-7.

Janíková M, Škarda J, Žižková V, Lužná P, Radová L. MiR-21, miR-126 and miR-205 expression in NSCLC patients. *Sborník abstrakt. Konference: Nová léčiva závažných lidských onemocnění.* Kouty nad Desnou, 2011.

Janíková M, Škarda J, Žižková V, Lužná P, Radová L. Expres miR-21, miR-126 a miR-205 u pacientů s NSCLC. *Sborník abstrakt. Konference vědeckých prací studentů DSP.* Olomouc, 2011. ISBN 978-80-244-2847-5.

Janikova M, Škarda J, Žižková V, Lužná P, Radová L. Importance of miR-21, miR-126 and miR-205 detection in archived FFPE samples in NSCLC patients. *Biopreserv & Biobanking.* 2011; 9:299, Abstract No. HR-07. *ESBB's Inaugural Conference*, Marseille, France, 2011. IF 1,294

Janíková M, Škarda J, Žizková V, Lužná P, Radová L. The Importance of miR-21, miR-126, and miR-205 in NSCLC Patients. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155:S2. Konference projektu 303/09/H048, Drnovice, 2011, ISSN 1213-8118. IF 0,702.

Janikova M, Zizkova V, Skarda J, Luzna P, Radova L. Correlation of Specific MiRNAs Expression With Survival and Drug Resistance Related Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancer. Eur J Cancer. 2012; 48:S5:S200-S201, Abstract No. 836. 22nd Biennial Congress of the European-Association-for-Cancer-Research, Barcelona, Spain, 2012. IF 5,061.

Skarda J, **Janikova M**, Zizkova V. Regulation of multidrug resistance in NSCLC by miRNAs. Virchows Arch. 2012; 461:S1:S160-S161. 24th European Congress of Pathology, Prague, Czech Republic, 2012. IF 2,676

Skarda J, **Janikova M**, Zizkova V. The role of miRNA expressions in multidrug resistance in NSCLC. Lung Cancer. 2012; 77:S1:S14-S15. 13th Central European Lung Cancer Conference, Prague, Czech Republic, 2012. IF 3,392

Janikova M, Zizkova V, Luzna P, Radova L, Skarda J. The role of miR-21, miR-126 and miR-205 in P-glycoprotein, MRP1 and LRP/MVP mediated drug resistance in non-small cell lung cancer. Sborník abstrakt. 3Rd ICCTI Workshop –MikroRNA v onkologii, Brno, 2012.

Janikova M, Zizkova V, Skarda J, Radova L. The role of selected miRNA in MDR caused by P-gp, MRP1 and LRP/MVP in NSCLC patients. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2012; 156:S3:121. Konference projektu 303/09/H048, Drnovice, 2012, ISSN 1213-8118. IF 0,990

Škarda J, **Janíková M**, Žizková V, Kolek V, Kolář Z. Korelace exprese miRNA s expresí proteinu odpovědných za reparaci DNA u nemalobunečných karcinomu plic. Sborník abstrakt, XXXVII. Brněnské onkologické dny a XXXVII. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno 2013, ISBN 978-80-904596-9-4.

Zizkova V, **Janikova M**, Luzna P, Skarda J, Radova L, Kolek V, Kolar Z. The relationship of selected miRNAs to P-glycoprotein, MRP1 and LRP/MVP mediated drug resistance in non-small cell lung cancer. Sborník abstrakt. The 9th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 99th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 5th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2013, ISBN 978-80-7471-022-3.

Janíková M, Žižková V, Radová L, Škarda J, Kolář Z. Identifikácia nových biomarkerov MDR u pacientov s NSCLC pomocou prístupu *in silico*. Sborník abstrakt. XVII. celostátní konference DNA diagnostiky, Dolní Morava, 2013.

Janíková M, Žižková V, Radová L, Škarda J, Kolář Z. Identification of new MDR biomarkers in NSCLC patients using *in silico* approach. Sborník abstrakt: Konference Chemické biologie a genetiky. Kouty nad Desnou, 2014.

d) Zoznam prednášok/posterov prednesených uchádzačom na verejných odborných fórach

Janíková M, Škarda J, Žižková V. Využití parafinových bloků k izolaci miRNA. The 7th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 96th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 3rd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2011, ISBN 978-80-87327-59-3.

Janíková M, Škarda J. Dvojitá imunofluorescence na parafinových řezech. The 9th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 99th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 5th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2013, ISBN 978-80-7471-022-3.

2. Ostatné publikácie

a) Pôvodné vedecké publikácie *in extenso* v danom odbore uverejnené v časopisoch s IF

Hapkova I, Skarda J, Rouleau C, Thys A, Notarnicola C, **Janikova M**, Bernex F, Rypka M, Vanderwinden JM, Faure S, Vesely J, de Santa Barbara P. High expression of the RNA-binding protein RBPMS2 in gastrointestinal stromal tumors. *Exp Mol Pathol*. 2013; 94:314-321. IF 2,881

Škarda J, Gachechiladze M, Tichý T, Kolek V, Grygárková I, Klein J, Mgebrishvili G, Kharaisvili G, **Janíková M**, Pitson S, Gomez-Brouchet A, Cuvillier O. The prognostic role of sphingosine kinase-1 and S1P lyase protein expression in patients with non-small cell lung cancer. V recenznom konaní časopisu *Am J Cancer Res*. IF 3,968

b) Publikované abstrakty

Überall I, Škarda J, Sedláková E, **Janíková M**, Radová L, Kolek V, Klein J, Grygárková I, Hajdúch M, Kolář Z. Príspevek ke studiu role proteínu p53 v autofagii. *Onkologie*. 2009; 3(1),16. V. dny diagnostické, prediktívni a experimentálnej onkologie. II. symposium o cílenej biologickej liečbe, Olomouc, 2009. ISSN 1803-5922.

Škarda J, **Janíková M**, Srovnal J, Radová L, Dziechciarková M, Fridman E. Sledování prognostického a prediktivního významu exprese E-cadherinu a beta kateninu u nemalobuněčného karcinomu plic. *Onkologie*. 2010; 4:SA:16. VI. dny diagnostické, prediktívni a experimentálnej onkologie. Olomouc, 2010. ISSN 1803-5922.

Tomanová R, Dvořáčková J, Mačák J, Buzrla P, Ehrmann J, Brychtová S, Krhutová V, Tavandzis S, **Janíková M**. Přehled gastrointestinálních stromálních tumorů diagnostikovaných na Ústavu patologie FN Ostrava v letech 2010 až 2012. The 9th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 99th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 5th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2011, ISBN 978-80-7471-022-3.

Janíková M. Mutační analýza pacientů s GIST. *Onkologie*. 2011; 5:SB:22-23. VII. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. XIX. Sjezd českých a slovenských patologů. XCVII. Diagnostický seminář české divize iap. XIX. Sjezd české společnosti histologických laborantů. Olomouc, 2011. ISSN 1802-4475.

Škarda J, Gachechiladze M, Kolek V, Klein J, Mgebrishvili G, Kharashvili G, **Janíková M**, Tichý T, Cuvillier O. The immunohistochemical expression of sphingosine kinase 1 and S1P lyase in non-small cell lung cancer: a tissue microarray study. *Pathology*. 2014; 46:S2:S110-S111, Abstract No. 231. XXXth Congress of the International Academy of Pathology, Bangkok, Thailand, 2014. IF 2,620

c) Zoznam prednášok/posterov prednesených uchádzačom na verejných odborných fórach

Janíková M, Škarda J, Tichý M, Ehrmann J jr. Current methods in molecular pathology used in diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. The 6th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 94th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 2nd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians. Olomouc, 2010. ISBN 978-80-87327-07-4.

Janíková M, Škarda J, Tichý M, Ehrmann J jr. Súčasná metódy molekulárnej patológie využívané v diagnostike GIST. Meziregionální mezioborový seminář patologů a histologických laborantů v rámci české sekce IAP, Opava, 2010.

Janíková M, Kratochvílová R, Godava M, Vodička R, Vrtěl R. Genetická analýza génov *BRCA1* a *BRCA2*. The 10th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 100th Olomouc Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 6th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2014.

10 REFERENCIE

1. Le Chevalier T. Non-small cell lung cancer: the challenges of the next decade. *Front Oncol.* 2011; 1:29.
2. Petruželka, L. Vočka, M. Personalizovaný přístup k farmakoterapii nemalobuněčných plicních karcinomů v éře cílené (terčové) biologické léčby. *Postgraduální medicína.* 2012; 4:396-401.
3. Kolek, V. Karcinom plic - současná léčebná strategie z pohledu pneumoonkologa. *Postgraduální medicína.* 2010; 3:338-352.
4. D'Addario G, Früh M, Reck M, Baumann P, Klepetko W, Felip E; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010; 21 Suppl 5:v116-119.
5. Skříčková J, Špelda S, Kaplanová J, Merta Z, Pálková I, Salajka F, Vomela J. Bronchogenní karcinom. In: Adam Z, Vorlíček J, editors. *Speciální onkologie.* Brno: Masarykova univerzita; 2002; p. 34-53.
6. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, Shepherd FA. Non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 2011; 378:1727-1740.
7. Stanek L, Lisova S, Povysil C. Úskalí diagnostiky karcinomu plic – jak patolog přispívá k výběru správné terapie. *Postgraduální medicína.* 2012; 4:392-395.
8. Dvořák K, Lukáš Z, Fabián P, Doubek M, Dvořáková D, Adam Z. (2004): Patomorfologie maligních chorob. In: Adam Z, Vorlíček J, editors. *Obecná onkologie.* Brno: Masarykova univerzita; 2004; p. 50-71.
9. Skříčková J, Čoupek P, Babičková L, Tomíšková M, Kaplanová J, Princ D, Kadlec B, Špelda S. Léčebné postupy u nemalobuněčného karcinomu plic. *Klin onkol.* 2008; 6:317-328.

10. Adam Z, Vorlíček J, Táborská E, Sedláčková Š, Šmardová J, Doubek M, Tomáška M, Elbl L, Král Z, Nekulová M, Pospíšilová Š, Chlupová G. Protinádorová chemoterapie. In: Adam Z, Vorlíček J, editors. *Obecná onkologie*. Brno: Masarykova univerzita; 2004; p. 178-202.
11. Gandara DR, Mack PC, Li T, Lara PN Jr, Herbst RS. Evolving treatment algorithms for advanced non-small-cell lung cancer: 2009 looking toward 2012. *Clin Lung Cancer*. 2009; 10:392-394.
12. Nosková V, Hajdúch M, Mihál V, Cwiertka K. Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, I. typická MDR. *Klin onkol*. 2000; 13(speciál 2):4-9.
13. Stewart DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010; 75:173-234.
14. Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells: Cytokine Network, Tumorigenic and Metastatic Properties. *PLoS ONE*. 2008; 3:e3077.
15. Janikova M, Skarda J. Differentiation pathways in carcinogenesis and in chemo- and radioresistance. *Neoplasma*. 2012; 59:6-17.
16. Oh KT, Baik HJ, Lee AH, Oh YT, Youn YS, Lee ES. The reversal of drug-resistance in tumors using a drug-carrying nanoparticulate system. *Int J Mol Sci*. 2009; 10:3776-3792.
17. McElnay JC, D'Arcy PF. Protein binding displacement interactions and their clinical importance. *Drugs*. 1983; 25:495-513.

18. Almers W, Edwards R, Hille B, Jan L, Nicoll R, Stroud R, Williamson P. Membrane Transport of Small Molecules and the Electrical Properties of Membranes. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Rafi M, Roberts K, Walter P, editors. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. New York and Abington: Garland science, Taylor & Francis Group; 2008; p. 651-694.
19. Chen ZJ, Le HB, Zhang YK, Qian LY, Sekhar KR, Li WD. Lung resistance protein and multidrug resistance protein in non-small cell lung cancer and their clinical significance. *J Int Med Res*. 2011; 39:1693-1700.
20. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*. 1983; 221:1285-1288.
21. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 455:152-162.
22. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001; 11:1156-1166.
23. Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet*. 1987; 77:142-144.
24. Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol*. 1997; 8:135-142.
25. Jones PM, George AM. A new structural model for P-glycoprotein. *J Membr Biol*. 1998; 166:133-147.
26. Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM, Smyth MJ. A role for P-glycoprotein in regulating cell death. *Leuk Lymphoma*. 2000; 38:1-11.
27. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci*. 2000; 25:1-6.

28. Teodori E, Dei S, Martelli C, Scapecchi S, Gualtieri F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). *Curr Drug Targets*. 2006; 7:893-909.
29. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84:265-269.
30. Demeule M, Régina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A, Béliveau R. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*. 2002; 38:339-348.
31. Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S, Mori S. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res*. 1988; 48:1926-1929.
32. Grandjean-Forestier F, Stenger C, Robert J, Verdier M, Ratinaud MH. (2009): The P-glycoprotein 170: Just a multidrug resistance protein or a protean molecule? In: Boumendjel A, Boutonnat J, Robert J, editors. *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009; p. 17-46.
33. Bernaudin JF, Fajac A, Fleury-Feith J, Kerrou K, Lacave R. ABC proteins and oncology: Expression, detection, and implication of ABC proteins in solid tumors. In: Boumendjel A, Boutonnat J, Robert J, editors. *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009; p. 143-176.
34. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73:592-604.
35. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008; 9:105-127.
36. Robert J, Jarry C. Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem*. 2003; 46:4805-4817.

37. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992; 258:1650-1654.
38. Váradi A, Tusnády GE, Bakos E, Sarkadi B. Membrane topology of the human multidrug resistance-associated protein (MRP) and its homologs. *Cytotechnology*. 1998; 27: 71-79.
39. Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27:438-446.
40. Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol*. 1996; 148:1237-1247.
41. Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience*. 2004; 129:349-360.
42. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem*. 1994; 269: 27807-27810.
43. Lautier D, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol*. 1996; 52:967-977.
44. Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG, Cole SP. ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol Pharmacol*. 1997; 51:1034-1041.
45. Nooter K, Bosman FT, Burger H, van Wingerden KE, Flens MJ, Scheper RJ, Oostrum RG, Boersma AW, van der Gaast A, Stoter G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 1996; 7:75-81.

46. Burger H, Nooter K, Zaman GJ, Sonneveld P, van Wingerden KE, Oostrum RG, Stoter G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia*. 1994; 8:990-997.
47. Boumendjel A, Florin A, Boutonnat J. Reversal agents of multidrug resistance mediated by multidrug resistance-associated proteins (MRPs). In: Boumendjel A, Boutonnat J, Robert J editors. *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009; p. 261-288.
48. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P, Meijer CJLM, Pinedo HM. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*. 1993; 53:1475-1479.
49. Slovak ML, Ho JP, Cole SP, Deeley RG, Greenberger L, de Vries EG, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ. The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res*. 1995; 55:4214-4219.
50. Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med*. 1995; 1:578-582.
51. Kedersha NL, Rome LH. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol*. 1986; 103:699-709.
52. Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC, Rome LH. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol*. 1991; 112:225-235.
53. Kickhoefer VA, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ, Rome LH. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem*. 1998; 273:8971-8974.

54. Tanaka H, Tsukihara T. Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012; 88:416-433.
55. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol.* 1996; 148:877-887.
56. Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, Itoyama S. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett.* 1997; 112:23-31.
57. List AF, Spier CS, Grogan TM, Johnson C, Roe DJ, Greer JP, Wolff SN, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ, Dalton WS. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1996; 87:2464-2469.
58. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Shoemaker RH, Rome LH, Scheper RJ. Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology.* 1996; 19:191-197.
59. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367:645-648.
60. Park CY, Tseng D, Weissman IL. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther.* 2009; 17:219-230.
61. Kaur S, Bajwa P. A 'tête-à tête' between cancer stem cells and endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *Clin Transl Oncol.* 2014; 16:115-121.
62. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130:1091-1103.

63. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*. 2005; 8:99-110.
64. Alison MR, Islam S, Wright NA. Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J Cell Sci*. 2010; 123:2357-2368.
65. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90:5002-5012.
66. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003; 63:5821-5828.
67. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*. 2007; 132:2542-2556.
68. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007; 6:92-97.
69. Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, Graziano ME, Ferrando U, Camussi G. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2006; 169:2223-2235.
70. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445:106-110.
71. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005; 65: 10946-10951.

72. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2004; 57:965-959.
73. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2007; 20:102-107.
74. Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008; 214:3-9.
75. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006; 444:756-760.
76. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008; 15:504-514.
77. Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, Fang J. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27:85.
78. Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, Saito N, Nakazato Y, Sasaki T, Takeuchi T. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest.* 2002; 82:345-351.
79. Lobo MV, Arenas MI, Alonso FJ, Gomez G, Bazán E, Paíno CL, Fernández E, Fraile B, Paniagua R, Moyano A, Caso E. Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell Tissue Res.* 2004; 316:369-376.
80. Yang XH, Wu QL, Yu XB, Xu CX, Ma BF, Zhang XM, Li SN, Lahn BT, Xiang AP. Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol.* 2008; 61:467-473.

81. Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 2014; 44:1118-1130.
82. Chen Z, Wang J, Cai L, Zhong B, Luo H, Hao Y, Yu W, Wang B, Su C, Lei Y, Bella AE, Xiang AP, Wang T. Role of the stem cell-associated intermediate filament nestin in malignant proliferation of non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2014; 9:e85584.
83. Brychtová S, Fiurásková M, Brychta T, Hirnák J. [The role of intermedial filament nestin in malignant melanoma progression]. *Cesk Patol.* 2005; 41:143-145.
84. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007; 11:69-82.
85. Gottschling S, Schnabel PA, Herth FJ, Herpel E. Are we missing the target? Cancer stem cells and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012; 9:275-286.
86. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012; 489:57-74.
87. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Database issue):D152-157.
88. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75:843-854.
89. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403:901-906.

90. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:15524-15529.
91. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005; 120:635-647.
92. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391:806-811.
93. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*. 2010; 222:540-545.
94. Chan SP, Slack FJ. And now introducing mammalian mirtrons. *Dev Cell*. 2007; 13:605-607.
95. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008; 9:102-114.
96. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005; 3:e85.
97. Reddy SD, Gajula RP, Pakala SB, Kumar R. MicroRNAs and cancer therapy: the next wave or here to stay? *Cancer Biol Ther*. 2010; 9:479-482.
98. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011; 12:861-874.
99. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:259-269.

100. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004; 64:3753-3756.
101. Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig F, Scheffler M, Huwer H, Lenhof HP, Meese E. miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer.* 2009; 9:353.
102. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008; 18:997-1006.
103. Xie Y, Todd NW, Liu Z, Zhan M, Fang H, Peng H, Alattar M, Deepak J, Stass SA, Jiang F. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010; 67:170-176.
104. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol.* 2010; 28:655-661.
105. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5473-5477.
106. Gao W, Xu J, Shu YQ. miRNA expression and its clinical implications for the prevention and diagnosis of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med.* 2011; 5:699-709.

107. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:13944-13949.
108. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*. 2007; 67:7713-722.
109. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 39:167-169.
110. Haverty PM, Fridlyand J, Li L, Getz G, Beroukhi R, Lohr S, Wu TD, Cavet G, Zhang Z, Chant J. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 47:530-542.
111. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008; 27:2128-2136.
112. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*. 2008; 28:5369-5380.
113. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:2257-2261.

114. Donadelli M, Dando I, Fiorini C, Palmieri M: Regulation of miR-23b expression and its dual role on ROS production and tumour development. *Cancer Lett.* 2014; 349:107-113.
115. Esquela-Kerscher A. (2011): MicroRNAs Function as Tumor Suppressor Genes and Oncogenes. In: Slack FJ, editor. *MicroRNAs in Development and Cancer*. London: Imperial College Press; 2011; p. 149-184.
116. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* 2007; 449:682-688.
117. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:202-210.
118. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature.* 2008; 451:147-152.
119. Jin L, Wessely O, Marcusson EG, Ivan C, Calin GA, Alahari SK: Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF- α in breast cancer. *Cancer Res.* 2013; 73:2884-2896.
120. Majid S, Dar AA, Saini S, Deng G, Chang I, Greene K, Tanaka Y, Dahiya R, Yamamura S: MicroRNA-23b functions as a tumor suppressor by regulating Zeb1 in bladder cancer. *PLoS One.* 2013; 8:e67686.
121. Wan G, Mathur R, Hu X, Zhang X, Lu X. miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36:478-484.
122. Slabý O, Rádová M, Svoboda M. MikroRNA v patogenezi nádorových onemocnění. In: Slabý O, Svoboda M, editors. *MikroRNA v onkologii*. Praha: Galén; 2012; p. 47-77.

123. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:10513-10518.
124. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007; 13:1668-1674.
125. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435:834-838.
126. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006; 9:189-198.
127. 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, Mansukhani M. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27:2030-2037.
128. Bishop JA, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:610-619.
129. Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem*. 2008; 54:1696-1704.

130. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta*. 2010; 411:846-852.
131. Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell*. 2010; 18:282-293.
132. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM, Harris CC. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:12085-12090.
133. Majid S, Dar AA, Saini S, Arora S, Shahryari V, Zaman MS, Chang I, Yamamura S, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R: miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Res*. 2012; 72:6435-6446.
134. Dettmer MS, Perren A, Moch H, Komminoth P, Nikiforov YE, Nikiforova MN: MicroRNA profile of poorly differentiated thyroid carcinomas: new diagnostic and prognostic insights. *J Mol Endocrinol*. 2014; 52:181-189.
135. Chen L, Han L, Zhang K, Shi Z, Zhang J, Zhang A, Wang Y, Song Y, Li Y, Jiang T, Pu P, Jiang C, Kang C: VHL regulates the effects of miR-23b on glioma survival and invasion via suppression of HIF-1 α /VEGF and β -catenin/Tcf-4 signaling. *Neuro Oncol*. 2012; 14:1026-1036.
136. Zaman MS, Thamminana S, Shahryari V, Chiyomaru T, Deng G, Saini S, Majid S, Fukuhara S, Chang I, Arora S, Hirata H, Ueno K, Singh K, Tanaka Y, Dahiya R. Inhibition of PTEN gene expression by oncogenic miR-23b-3p in renal cancer. *PLoS One*. 2012; 7:e50203.

137. Ebi H, Sato T, Sugito N, Hosono Y, Yatabe Y, Matsuyama Y, Yamaguchi T, Osada H, Suzuki M, Takahashi T. Counterbalance between RB inactivation and miR-17-92 overexpression in reactive oxygen species and DNA damage induction in lung cancers. *Oncogene*. 2009; 28:3371-3379.
138. Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer*. 2009; 66:169-175.
139. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007; 26:745-752.
140. Holleman A, Chung I, Olsen RR, Kwak B, Mizokami A, Saijo N, Parissenti A, Duan Z, Voest EE, Zetter BR. miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2011; 30:4386-4398.
141. Zhu W, Shan X, Wang T, Shu Y, Liu P. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2010; 127:2520-2529.
142. Zhu W, Zhu D, Lu S, Wang T, Wang J, Jiang B, Shu Y, Liu P. miR-497 modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2. *Med Oncol*. 2012; 29:384-391.
143. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28:1721-1726.
144. Xie L, Chen X, Wang L, Qian X, Wang T, Wei J, Yu L, Ding Y, Zhang C, Liu B. Cell-free miRNAs may indicate diagnosis and docetaxel sensitivity of tumor cells in malignant effusions. *BMC Cancer*. 2010; 10:591.

145. Zandberga E, Kozirovskis V, Ābols A, Andrējeva D, Purkalne G, Linē A. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52:356-369.
146. Markou A, Liang Y, Lianidou E. Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49:1591-1603.
147. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12:847-865.
148. Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol*. 2003; 21:74-81.
149. Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CM. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discov Today*. 2013; 18:282-289.
150. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005; 438:685-689.
151. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007; 4:721-726.
152. Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*. 2011; 18:1121-1126.
153. Wu X, Ding B, Gao J, Wang H, Fan W, Wang X, Zhang W, Wang X, Ye L, Zhang M, Ding X, Liu J, Zhu Q, Gao S. Second-generation aptamer-conjugated PSMA-targeted delivery system for prostate cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:1747-1756.
154. Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:3903-3908.

155. Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas JB, Brown D, Bader AG, Slack FJ. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle*. 2008; 7:759-764.
156. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*. 2009; 137:1005-1017.
157. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther*. 2011; 19:1116-1122.
158. Chiou GY, Cherng JY, Hsu HS, Wang ML, Tsai CM, Lu KH, Chien Y, Hung SC, Chen YW, Wong CI, Tseng LM, Huang PI, Yu CC, Hsu WH, Chiou SH. Cationic polyurethanes-short branch PEI-mediated delivery of Mir145 inhibited epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cancer stem-like properties and in lung adenocarcinoma. *J Control Release*. 2012; 159:240-250.
159. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*. 2010; 18:181-187.
160. Rai K, Takigawa N, Ito S, Kashihara H, Ichihara E, Yasuda T, Shimizu K, Tanimoto M, Kiura K. Liposomal delivery of MicroRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistance in lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10:1720-1727.
161. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, Bader AG. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res*. 2010; 70:5923-5930.

162. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, editors. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura. Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004.
163. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011; 6:244-285.
164. Kennedy BG, Mangini NJ. P-glycoprotein expression in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 2002; 8:422-430.
165. Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol.* 2008; 9:3.
166. Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S, Shu Y. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother.* 2010; 64:399-408.
167. Roa W, Brunet B, Guo L, Amanie J, Fairchild A, Gabos Z, Nijjar T, Scrimger R, Yee D, Xing J. Identification of a new microRNA expression profile as a potential cancer screening tool. *Clin Invest Med.* 2010; 33:E124.

168. Liu XG, Zhu WY, Huang YY, Ma LN, Zhou SQ, Wang YK, Zeng F, Zhou JH, Zhang YK. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med Oncol.* 2012; 29:618-626.
169. Gao W, Lu X, Liu L, Xu J, Feng D, Shu Y. MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13:330-340.
170. Kleffel S, Schatton T. Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin? *Adv Exp Med Biol.* 2013; 734:145-179.
171. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo Vullo S, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabrò E, Pastorino U, Sozzi G. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:16281–16286.
172. Yamamoto A, Shofuda T, Islam MO, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Kanemura Y. ABCB1 is predominantly expressed in human fetal neural stem/progenitor cells at an early development stage. *J Neurosci Res.* 2009; 87:2615–2623.
173. Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 2010; 126:950–958.
174. Dell'Albani P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res.* 2008; 33:2407-2415.
175. Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S, Kristensen BW. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol.* 2013; 6:334-348.
176. Veselska R, Skoda J, Neradil J. Detection of cancer stem cell markers in sarcomas. *Klin Onkol.* 2012; 25 Suppl 2:2S16-20.
177. Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. *Med Mol Morphol.* 2012; 45:59-65.

178. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:755-768.
179. Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *MAbs*. 2009; 1:12-25.
180. Cui F, Wang J, Chen D, Chen YJ. CD133 is a temporary marker of cancer stem cells in small cell lung cancer, but not in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2011; 25:701-708.
181. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*. 2008; 3:e2637.
182. Salama R, Tang J, Gadgeel SM, Ahmad A, Sarkar FH. Lung Cancer Stem Cells: Current Progress and Future Perspectives. *J Stem Cell Res Ther*. 2012; S7:007.
183. He QZ, Luo XZ, Wang K, Zhou Q, Ao H, Yang Y, Li SX, Li Y, Zhu HT, Duan T. Isolation and characterization of cancer stem cells from high-grade serous ovarian carcinomas. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 33:173-184.
184. Chen Z, Wang T, Luo H, Lai Y, Yang X, Li F, Lei Y, Su C, Zhang X, Lahn BT, Xiang AP. Expression of nestin in lymph node metastasis and lymphangiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Hum Pathol*. 2010; 41:737-744.
185. Ryuge S, Sato Y, Wang GQ, Matsumoto T, Jiang SX, Katono K, Inoue H, Satoh Y, Masuda N. Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer. *Chest*. 2011; 139:862-869.
186. Ahmed MB, Nabih ES, Louka ML, Abdel Motaleb FI, El Sayed MA, Elwakiel HM. Evaluation of nestin in lung adenocarcinoma: relation to VEGF and Bcl-2. *Biomarkers*. 2014; 19:29-33.

187. Kim KJ, Lee KH, Kim HS, Moon KS, Jung TY, Jung S, Lee MC. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology*. 2011; 31:494-502.
188. Dahlrot RH, Hansen S, Jensen SS, Schrøder HD, Hjelmborg J, Kristensen BW. Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7:3739-3751.
189. Wang J, Wang X, Jiang S, Lin P, Zhang J, Wu Y, Xiong Z, Ren JJ, Yang H. Partial biological characterization of cancer stem-like cell line (WJ(2)) of human glioblastoma multiforme. *Cell Mol Neurobiol*. 2008; 28:991-1003.
190. Shiras A, Chettiar ST, Shepal V, Rajendran G, Prasad GR, Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma. *Stem Cells*. 2007; 25:1478-1489.
191. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*. 2007; 25:2524-2533.
192. Qiang L, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, Qi Q, Lu N, Tao L, Wang XT, You QD, Guo QL. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 2009; 279:13-21.
193. Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatozzolo C, Ciusani E, Sciacca FL, Ottolina A, Parati EA, La Porta C, Alessandri G, Marras C, Croci D, De Rossi M. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia*. 2006; 54:850-860.
194. McCord AM, Jamal M, Shankavaram UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res*. 2009; 7:489-497.

195. Kolenda J, Jensen SS, Aaberg-Jessen C, Christensen K, Andersen C, Brüner N, Kristensen BW. Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. *J Neurooncol.* 2011; 103:43-58.
196. Zhong X, Li Y, Peng F, Huang B, Lin J, Zhang W, Zheng J, Jiang R, Song G, Ge J. Identification of tumorigenic retinal stem-like cells in human solid retinoblastomas. *Int J Cancer.* 2007; 121:2125-2131.
197. Veselska R, Hermanova M, Loja T, Chlapek P, Zambo I, Vesely K, Zitterbart K, Sterba J. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer.* 2008; 8:300.
198. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, Demurtas P, Ugalde J, Ribatti D, Sirigu P. The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol Rep.* 2010; 23:17-24.
199. Sharma BK, Manglik V, Elias EG. Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J Surg Res.* 2010; 163:e11-15.
200. Sabet MN, Rakhshan A, Erfani E, Madjd Z. Co-expression of putative cancer stem cell markers, CD133 and Nestin, in skin tumors. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:8161-8069.
201. Magnoni C, Giudice S, Pellacani G, Bertazzoni G, Longo C, Veratti E, Morini D, Benassi L, Vaschieri C, Azzoni P, De Pol A, Seidenari S, Tomasi A, Pollio A, Ponti G. Stem cell properties in cell cultures from different stage of melanoma progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014; 22:171-181.
202. Sana J, Zambo I, Skoda J, Neradil J, Chlapek P, Hermanova M, Mudry P, Vasikova A, Zitterbart K, Hampl A, Sterba J, Veselska R. CD133 expression and identification of CD133/nestin positive cells in rhabdomyosarcomas and rhabdomyosarcoma cell lines. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011; 34:303-318.

203. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, Pirozzi G, Papaccio G. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J*. 2011; 25:2022-2030.
204. Shi CJ, Gao J, Wang M, Wang X, Tian R, Zhu F, Shen M, Qin RY. CD133(+) gallbladder carcinoma cells exhibit self-renewal ability and tumorigenicity. *World J Gastroenterol*. 2011; 17:2965-2971.
205. Kim HS, Yoo SY, Kim KT, Park JT, Kim HJ, Kim JC. Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012; 5:754-761.
206. Vizio B, Mauri FA, Prati A, Trivedi P, Giacobino A, Novarino A, Satolli MA, Ciuffreda L, Camandona M, Gasparri G, Bellone G. Comparative evaluation of cancer stem cell markers in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2012; 27:69-76.
207. Qin Q, Sun Y, Fei M, Zhang J, Jia Y, Gu M, Xia R, Chen S, Deng A. Expression of putative stem marker nestin and CD133 in advanced serous ovarian cancer. *Neoplasma*. 2012; 59:310-315.
208. Peiró-Chova L, Peña-Chilet M, López-Guerrero JA, García-Giménez JL, Alonso-Yuste E, Burgues O, Lluch A, Ferrer-Lozano J, Ribas G. High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Arch*. 2013; 463:765-774.
209. Võsa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *Int J Cancer*. 2013; 132:2884-2893.
210. Zhu W, Xu B. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9:e103373.
211. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007; 72:397-402.

212. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, You J, Hu XQ. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep.* 2009; 21:673-679.
213. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, Wang X, He X, Zhao Y, Zhao Y. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41:1245-1253.
214. Wang XC, Du LQ, Tian LL, Wu HL, Jiang XY, Zhang H, Li DG, Wang YY, Wu HY, She Y, Liu QF, Fan FY, Meng AM. Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011; 72:92-99.
215. Ma Y, Xia H, Liu Y, Li M. Silencing miR-21 sensitizes non-small cell lung cancer A549 cells to ionizing radiation through inhibition of PI3K/Akt. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:617868.
216. Nielsen BS, Jørgensen S, Fog JU, Søkilde R, Christensen IJ, Hansen U, Brüner N, Baker A, Møller S, Nielsen HJ. High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients. *Clin Exp Metastasis.* 2011; 28:27-38.
217. Voortman J, Goto A, Mendiboure J, Sohn JJ, Schetter AJ, Saito M, Dunant A, Pham TC, Petrini I, Lee A, Khan MA, Hainaut P, Pignon JP, Brambilla E, Popper HH, Filipits M, Harris CC, Giaccone G. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2010; 70:8288-8298.
218. Zhang YK, Zhu WY, He JY, Chen DD, Huang YY, Le HB, Liu XG. miRNAs expression profiling to distinguish lung squamous-cell carcinoma from adenocarcinoma subtypes. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138:1641-1650.
219. Feng R, Chen X, Yu Y, Su L, Yu B, Li J, Cai Q, Yan M, Liu B, Zhu Z. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 2010; 298:50-63.

220. Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, Nuovo G, Marsh CB, Nana-Sinkam SP. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373:607-612.
221. Sun Y, Bai Y, Zhang F, Wang Y, Guo Y, Guo L. miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391:1483-1489.
222. Yang J, Lan H, Huang X, Liu B, Tong Y. MicroRNA-126 inhibits tumor cell growth and its expression level correlates with poor survival in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One.* 2012; 7:e42978.
223. Jusufović E, Rijavec M, Keser D, Korošec P, Sodja E, Iljazović E, Radojević Z, Košnik M. let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non--small--cell lung cancer. *PLoS One.* 2012; 7:e45577.
224. Kim MK, Jung SB, Kim JS, Roh MS, Lee JH, Lee EH, Lee HW. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Virchows Arch.* 2014; 465:463-471.
225. Donnem T, Lonvik K, Eklo K, Berg T, Sorbye SW, Al-Shibli K, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Bremnes RM, Busund LT. Independent and tissue-specific prognostic impact of miR-126 in nonsmall cell lung cancer: coexpression with vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer.* 2011; 117:3193-3200.
226. Lønvik K, Sørbye SW, Nilsen MN, Paulssen RH. Prognostic value of the MicroRNA regulators Dicer and Drosha in non-small-cell lung cancer: co-expression of Drosha and miR-126 predicts poor survival. *BMC Clin Pathol.* 2014; 14:45.
227. Xu L, Huang Y, Chen D, He J, Zhu W, Zhang Y, Liu X. Downregulation of miR-21 increases cisplatin sensitivity of non-small-cell lung cancer. *Cancer Genet.* 2014; 207:214-220.

228. Liu ZL, Wang H, Liu J, Wang ZX. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Mol Cell Biochem.* 2013; 372:35-45.
229. Zhu X, Li H, Long L, Hui L, Chen H, Wang X, Shen H, Xu W. miR-126 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to anticancer agents by targeting vascular endothelial growth factor A. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012; 44:519-526.
230. Lei L, Huang Y, Gong W. miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. *Oncol Rep.* 2013; 30:2897-2902.
231. Park YT, Jeong JY, Lee MJ, Kim KI, Kim TH, Kwon YD, Lee C, Kim OJ, An HJ. MicroRNAs overexpressed in ovarian ALDH1-positive cells are associated with chemoresistance. *J Ovarian Res.* 2013; 6:18.
232. Berger W, Setinek U, Hollaus P, Zidek T, Steiner E, Elbling L, Cantonati H, Attems J, Gsur A, Micksche M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005; 131:355-363.
233. Dingemans AM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Apolinario RM, Scheper RJ, Postmus PE, Giaccone G. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann Oncol.* 1996; 7:625-630.
234. Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG, Suurmeijer AJ. Drug resistance associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:2798-2805.
235. Pohl G, Filipits M, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D, Pirker R. Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer. *Anticancer Res.* 1999; 19:5051-5055.

236. Miyatake K, Gemba K, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Shibayama T, Takigawa N, Kawaraya M, Tanimoto M. Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2003; 23:2829-2836.
237. Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorcken JB, van der Valk P, Beliën JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P, et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:1230-1237.
238. Filipits M, Drach J, Pohl G, Schuster J, Stranzl T, Ackermann J, Königsberg R, Kaufmann H, Gisslinger H, Huber H, Ludwig H, Pirker R. Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:2426-2430.
239. Filipits M, Stranzl T, Pohl G, Heinzl H, Jäger U, Geissler K, Fonatsch C, Haas OA, Lechner K, Pirker R. Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis. *Leukemia.* 2000; 14:68-76.
240. Castilla MÁ, Moreno-Bueno G, Romero-Pérez L, Van De Vijver K, Biscuola M, López-García MÁ, Prat J, Matías-Guiu X, Cano A, Oliva E, Palacios J. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol.* 2011; 223:72-80.

Internetové odkazy

<http://www.genecards.org>

<http://www.mirbase.org>

<http://clinicaltrials.gov>

<http://www.lifetechnologies.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>