

**Univerzita Karlova  
1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**EXPRESSE A PROGNOSTICKÝ VÝZNAM mikroRNA U PACIENTEK S ČASNÝM KARCINOMEM  
PRSU**

**EXPRESSION AND PROGNOSTIC VALUE OF microRNAs IN PATIENTS WITH EARLY BREAST  
CANCER**

**MUDr. Marek Sochor**

Praha, 2018

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Onkologická klinika VFN a 1. LF UK Praha

Školitel: Doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Obsah	
Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	
1.1 Karcinom prsu	6
1.2 mikroRNA	8
1.3 Cílové mikroRNA projektu	9
2. Hypotézy a cíle práce	
2.1 Hypotéza	10
2.2 Cíle práce	10
3. Materiál a metodika	
3.1 Soubor pacientů	10
3.2 Sběr a zpracování krve	12
3.3 Statistické metody	13
4. Výsledky	
4.1 Expres mikroRNA v séru v jednotlivých fázích léčby	14
4.2 Expres mikroRNA podle rizikové skupiny a vývoj v závislosti na léčbě	16
4.3 Expres mikroRNA a jejich význam ve stanovení prognózy karcinomu prsu	18
4.4 Analýza exprese mikroRNA a klinicko-patologických markerů	20
4.5 Využití generalizovaného lineárního modelu k určení pravděpodobnosti relapsu	21
5. Diskuze	23
6. Závěry	26
7. Použitá literatura	27

## ABSTRAKT

Karcinom prsu je nejčastější zhoubné nádorové onemocnění žen, které je z hlediska prognózy velice heterogenní. Časný karcinom prsu má celkově vynikající prognózu, v této skupině se však vyskytují pacientky s vysoce nepříznivým vývojem a rizikem budoucího návratu nemoci. Vzhledem k účinným možnostem protinádorové léčby, je hlavním úkolem správného léčebného rozhodování určení rizika relapsu zhoubného onemocnění. Ke stanovení prognózy máme k dispozici markery klinické a patologické, všechny vykazují nízkou individuální specifitu a senzitivitu. Molekulární testy založené na vícegenovém hodnocení DNA nebo RNA vykazují vyšší senzitivitu a specifitu, ale jejich vzájemná shoda je nízká. Jedním z hlavních směrů výzkumu karcinomu prsu je hledání dostatečně specifických a senzitivních prognostických biomarkerů.

MikroRNA jsou malé, vysoce stabilní, nekódující RNA, které ovlivňují současně desítky mRNA a proteinů uvnitř buněk. V kancerogenezi mohou fungovat jako onkogeny nebo tumor supresorové geny a ovlivňují základní děje vzniku a udržení nádorového procesu. Jedním ze směrů výzkumu mikroRNA je jejich využití jako prognostické biomarkery. Bylo publikováno mnoho prací, které definovaly jejich využitelnost při určení prognostického rizika časného karcinomu prsu s velice rozdílnými daty.

Námi předkládaný projekt hodnotil expresi miR-155, miR-24, miR-181b a miR-19a v séru pacientek s časným karcinomem prsu v závislosti na různých fázích léčby. Všechny miR vykazovaly v době diagnózy významně vyšší hodnoty exprese oproti zdravým kontrolám. Po operačním odstranění nádoru a adjuvantní léčbě došlo k jejich poklesu a byla patrná tendence k normalizaci hodnot exprese všech miR s různou dynamikou. Pacientky ve skupině vysokého rizika měly významně vyšší expresi onkogenních miR v porovnání s pacientkami nízkého rizika a vykazovaly opožděný a méně hluboký pokles jednotlivých miR po protinádorové léčbě. U pacientek nízkého rizika docházelo po onkologické léčbě k normalizaci exprese mikroRNA, na rozdíl od pacientek vysokého rizika. Sérové hodnoty miR-155 a miR-24 významně zlepšovaly predikci pravděpodobnosti relapsu nemoci nezávisle na ostatních parametrech. Jediný marker, který zpřesňoval hodnocení rizika relapsu spolu s miR-155 a miR-24, je exprese proliferačního indexu Ki-67 > 20%. V multivariantské analýze jsme prokázali, že vliv chemoterapie, radioterapie a hormonoterapie na změny exprese miR-24, miR-155 a relapsy onemocnění nebyl signifikantní. Hodnoty miR-24 a miR-155 tak mohou představovat skutečný nezávislý prognostický biomarker.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer in women and is prognostically very heterogeneous. Early breast cancer has an excellent overall prognosis, in this group we can also find patients with highly unfavourable progress with a risk of future disease relapse. Due to effective anticancer treatment is a main task of precise clinical decision to determine risk of an individual patient in the term of cancer relapse. We can use clinical and pathological markers, all of them have low individual sensitivity and specificity. Molecular tests based on multigene DNA or RNA assays have higher sensitivity and specificity but their interrelated concordance is low. One of the main scientific task is to find almost specific and sensitive prognostic biomarkers.

microRNAs are small, highly stable, non-coding RNAs, which regulate tens of mRNAs and proteins inside cells. In cancerogenesis, they could act as oncogenes or tumor suppressors as well and affect main steps of initiation and progression of cancer. One of the scientific directions is to determine their prognostic significance. Many experimental and clinical studies defining prognostic significance of miRs in early breast cancer was published but their data were very different.

Our project analyzed expression of miR-155, miR-24, miR-181b a miR-19a in sera of patients with early breast cancer. All miRs were significantly over-expressed in time of diagnosis in comparison to healthy controls. After surgical tumor removal and adjuvant therapy declined and normalized expression of all miRs with different dynamics. High-risk patients had significantly higher expression of miRs in comparison with low-risk group. Patients in high-risk group had slower and less profound decline of miRs after anticancer treatment. Low-risk patients normalized miRNAs expression after anticancer treatment, but this wasn't visible in high-risk group. Serum expression of miR-155 and miR-24 improved prediction of cancer relapse independently of the other parameters. Only expression of Ki-67>20% specified relapse probability along with expression of miR-155 and miR-24. In multivariate analysis we confirmed that neither of chemotherapy, radiotherapy and hormonal therapy were able to significantly change expression of miR-24, miR-155 and affect disease relapse. Serum expression of miR-24 and miR-155 could act as independent prognostic biomarkers.

## 1. Úvod

### 1.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastější zhoubný nádor u žen s incidencí 130/100 000 žen a je nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění žen. Od začátku 90. let narostl počet záchytů ve stádiu I, pokles incidence je pozorovatelný ve stádiu II a III, stádium IV je relativně stabilní. Mortalita vykazuje v posledních 5 letech mírný pokles, v roce 2014 zemřelo na karcinom prsu 3000 žen. Stádium I, II a III je potenciálně kurativní, všechny postupy směřují k přesnému a individuálnímu určení rizika relapsu a optimalizaci komplexní onkologické léčby.

Diagnostika karcinomu prsu je v současnosti možná klinicky a zobrazovacími metodami. Všechny metody mají své limitace dané senzitivitou a specificitou, snaha o nalezení nových senzitivnějších a specifitějších metod časně detekce, včetně těch molekulárních, je důležitým faktorem, který může zlepšit prognózu pacientek.

Většina karcinomů prsu vzniká spontánně, nakupením náhodných mutací a epigenetickými vlivy, mezi geneticky podmíněné patří 10%-15% nádorů. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu je mezi 8%-12% podle populace. Hlavními rizikovými faktory jsou ženské pohlaví, věk a zvýšená expozice k estrogenním hormonům. Mezi další patří rodinná a osobní anamnéza karcinomu prsu a vaječníků, denzní prsní žláza, benigní prsní onemocnění, anamnéza ozáření hrudníku v dětském věku a adolescenci, obezita a zvýšené užívání alkoholu.

Mezi geneticky podmíněné faktory patří mutace v celé řadě genů s různě vyjádřeným rizikem - *BRCA1* a *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *p53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*. Nejvyšší riziko je u pacientek s mutacemi v genech *BRCA1/2*, proteiny produkované těmito geny slouží k opravě dvouřetězcových zlomů DNA. Při jejich chybění dochází k poruše oprav zlomů DNA a zvýšené genomové nestabilitě. Mutace v genech *BRCA1/2* představují přibližně 20%-25% hereditárních karcinomů prsu a 5%-10% všech karcinomů prsu. Riziko vzniku karcinomu prsu při mutaci *BRCA1* vzrůstá na 55%-65% a *BRCA2* na 45%-55% do 70 let věku.

Karcinom prsu je velice heterogenní onemocnění, morfoloogicky, molekulárně, prognosticky a léčebně (Polyak K. et al., 2011). Prognóza je určena hlavně klinickým stádiem v době diagnózy, molekulárními a patogenetickými charakteristikami onemocnění, nádorovou heterogenitou a efektivitou léčebných modalit.

Časný karcinom prsu má jako celek vynikající prognózu, nicméně v této skupině existují pacientky s vysokým rizikem návratu nemoci. Riziko relapsu onemocnění vykazuje dva výrazné vrcholy, které jsou patrné 1,5-2 roky od diagnózy a 5 let od diagnózy, poté se postupně snižuje. U pacientek s vysokým rizikem budoucího relapsu onemocnění je indikovaná intenzivnější protinádorová léčba, zpravidla kombinovaná chemo(bio)terapie. Pacientky s nízkým rizikem návratu nemoci je vhodné řešit méně agresivní a méně intenzivní onkologickou protinádorovou léčbou. Snaha o precizní určení prognózy jednotlivých pacientek je vedena vysokou toxicitou cytostatik s možnými trvalými následky. Co nejpřesnější stanovení prognózy u konkrétní pacientky v době záchytu onemocnění, je tak jedním z hlavních kroků ke skutečně individualizované léčbě karcinomu prsu. Prognostické markery lze rozdělit na klinické, patologické, biochemické a molekulární.

Hlavní klinickou determinantou prognózy je klinické stádium v době diagnózy. Celkové 5leté přežití karcinomu prsu ve stádiu I je kolem 87%, stádiu II 68%, stádiu III 41% a stádiu IV 10% (Siegel RL. et al., 2016). Průměrné 5ti a 10ti leté přežití při N1 postižení je 62% a 38% a při N2

postižení je 32% a 13%. Pacientky s negativními LU a nádory T1a-b přežívají bez recidivy 10 let v 91% a s nádory T1c v 83% (DeSantis C. et al., 2014).

Patologické prognostické markery představují histologický typ, grading, exprese estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR), proliferační index Ki-67 a amplifikace *HER2/neu* genu.

Důležitým prognostickým markerem je stupeň diferenciacie nádoru, pětileté přežití pacientek s nádory grade I je 90% oproti 53% u žen s grade III, desetileté přežití u grade I je 79% a grade III 25% (Schwartz AM. et al., 2014).

Prognosticky vykazují pacientky s nádory s pozitivitou HR lepší přežití a bývá méně časté postižení lymfatických uzlin, pětileté přežití je kolem 74% u HR pozitivních a 55% u HR negativních pacientek, inverzně to platí pro pravděpodobnost recidivy (33% vs 56%) (Prat A. et al., 2013, Sestak I. et al., 2013).

Nález onkogenu *HER2/neu* a jeho významu v patogenezi, prognóze a léčebném ovlivnění znamenal zásadní průlom v managementu karcinomu prsu. Zvýšená exprese nebo amplifikace HER2 bývá častější u HR negativních nádorů, nádorů s vyšší proliferační aktivitou a vyšším gradingem. Z toho vyplývá častější postižení lymfatických uzlin, kratší interval přežití bez progresu a nižší celkové přežití.

Posledním patologickým prognostickým markerem je proliferační index Ki-67. Jeho prognostická síla je v multivariantních analýzách nezávislá na ostatních parametrech, vysoké hodnoty zvyšují riziko recidivy a predikují benefit cytotoxické chemoterapie (Criscitello C. et al., 2014). Imunohistochemické stanovení proliferační aktivity pomocí Ki-67 je zatížené vysokou variabilitou a chybovostí, užitím různých metod a setů, intratumorovou heterogenitou exprese a dalšími (Denkert C. et al., 2014).

Mezi biochemické markery řadíme CA 15-3 (Carbohydrate antigen 15-3) a CEA (Carcinoembryonic antigen), jejich předpovědní hodnota je nízká, vykazují nízkou senzitivitu i specificitu a využitelnost u časného karcinomu prsu je velice omezená (Duffy MJ. et al., 2010). Současné postavení CEA a CA 15-3 je v monitoraci metastatického karcinomu prsu, spolu s dalšími klinickými a zobrazovacími metodami (Sturgeon CM. et al., 2008).

Multigenové prognostické eseje vycházejí z genomického profilování, které definovalo pět základních podtypů karcinomu prsu – luminal A, luminal B, HER2, basal-like a claudin-low (Eroles P. et al., 2011, Prat A. et al., 2011). Jednotlivé molekulární subtypy se významně liší prognosticky a lze z nich odvodit i citlivost k různým typům léčby. Základ multigenových esejí tvoří geny estrogenové a progesteronové signalizace, proliferace a další genové klastry podle jejich významu u karcinomu prsu. Multiparametrické molekulární prognostické testy jsou aktuálně použitelné jako pomocný nástroj stanovení indikace adjuvantní chemoterapie u ER pozitivních nádorů s maximálně 3 pozitivními LU. Molekulární genomické eseje, i přes nesporný pokrok v porovnání s ostatními markery, nespĺňují zcela individualizovanou předpověď rizika relapsu (Gyorrfy B. et al., 2015).

V současnosti definujeme několik hlavních směrů výzkumu, které mohou vést ke snížení mortality na karcinom prsu. Jsou to 1) zlepšení detekce nádoru v časnějších fázích a identifikace vysoce rizikových pacientek, 2) stanovení prediktivních biomarkerů rezistence k hormonální terapii a anti-HER2 terapii, 3) stanovení biomarkerů k odlišení subtypů a

léčebných možností trojitě negativního karcinomu prsu a 4) definice prognostických biomarkerů a biomarkerů časně detekce metastatického onemocnění.

Shrnutě, dosavadní známé klinicko-patologické a molekulární markery jsou pouze částečně nezávislé jeden na druhém a významně selhávají u konkrétních pacientek a jejich individuální senzitivita a specifita jsou nízké. Pacientky s podobnými kombinacemi rizikových faktorů vykazují velice rozdílné léčebné výsledky a prognózu. Hledání nových prognostických a prediktivních markerů s dostatečnou senzitivitou a specificitou je tak, vedle hledání nových léčebných molekul, aktuálně hlavním směrem výzkumu karcinomu prsu.

## 1.2 MikroRNA

MikroRNA (miRNA, miR) patří do skupiny nekódujících RNA (Amorim M. et al., 2016). MikroRNA jsou endogenní, krátké, jednořetězcové RNA s délkou 18-25 nukleotidů (nt). MiRNA jsou klíčové regulátory řady biologických procesů působením na genovou expresi na posttranskripční úrovni a mohou současně regulovat stovky mRNA a proteinů (Di Leva G. et al., 2014).

MiRNA jsou přepisovány z genů za účasti vlastního promotoru pomocí RNA polymerázy II do transkriptu pri-miRNA (Ha M. et al., 2014). Zpracováním pri-miRNA Drosha ribonukleázou a proteinem DGCR8 vznikají pre-miRNA o délce přibližně 70 nt, které jsou následně exportovány z jádra do cytoplazmy pomocí exportinu 5 (XPO5) (Czech B. et al., 2011). V cytoplazmě jsou pre-miRNA štěpeny enzymem Dicer I (RNáza III) a vzniká dvouřetězcový miRNA-miRNA\* duplex. Následně jsou oba řetězce odděleny, zralé vodící miRNA jsou inkorporovány do RISC (RNA-induced silencing complex) a druhý řetězec (miRNA\*) je degradován nebo také zahrnut do RISC. RISC je tvořen miR, enzymem Dicer, proteiny TARBP2 (transactivation-responsive RNA-binding protein 2) a AGO2 (Protein Argonaute-2). Zralá miRNA navádí AGO protein ke komplementární sekvenci cílové mRNA a potlačuje její expresi. miRNA se váží na 3'UTR (untranslated region) mRNA, částečná komplementarita vede k blokadě translace a plná komplementarita k degradaci mRNA.

MikroRNA hrají důležitou roli v celé řadě buněčných pochodů – buněčném cyklu, diferenciaci, proliferaci, invazivitě, angiogenezi, apoptóze a migraci (Rutnam ZJ. et al., 2012). Během kancerogeneze mohou vstupovat do regulace molekulárních signálních cest maligní transformace vlivem na onkogeny a tumor supresorové geny. MikroRNA jsou transportované extracelulárně a díky extrémní stabilitě a malé molekule jsou detekovatelné v celé řadě tělesných tekutin, včetně séra a plazmy (Heneghan HM. et al., 2010).

Komplexní přehledy studia cirkulujících mikroRNA přinášejí značně odlišné výsledky mezi jednotlivými projekty, které mohou být částečně vysvětleny metodologickými rozdíly, které postihují všechny kroky analýzy miR od odběru vzorků po postanalytické kroky, je kladen důraz na precizní a standardizovaný odběr vzorků, jejich zpracování, skladování a analýzu (Khan J. et al., 2017).

MikroRNA působí u karcinomu prsu podle vlivu na buněčnou proliferaci jako onkogeny (onkomiR) nebo tumor supresorové miR, onkomiR potlačují expresi tumor supresorových genů a jsou u karcinomu prsu zvýšeně exprimované. Tumor supresorové miR zaměřují svůj účinek na onkogeny a jsou sniženě exprimované (Bertoli G. et al., 2015). MikroRNA působí na všechny základní děje přijímané teorie kancerogeneze vlivem na nádorové kmenové



buňky, buněčný cyklus, apoptózu, epiteliálně-mezenchymální tranzici a angiogenezu (Fan X. et al., 2017, Pileczki V, et al., 2016, Frixa T. et al., 2015, Abba ML. et al., 2016).

S ohledem na výše uvedené mohou být miR využity jako cirkulující diagnostické, prognostické a prediktivní biomarkery (Shen J. et al., 2013). Jejich použití v kombinaci s klinicko-patologickými a molekulárními markery může upřesňovat a individualizovat prognózu a predikovat účinnost terapie karcinomu prsu (Cava C. et al., 2014). I přes odhalení tisícovek mikroRNA, jejich cílů a signálních cest, jsou znalosti o jejich prognostickém významu, stratifikaci rizika a možnostech monitorace nádorových onemocnění zatím omezené (Armand-Labit V. et al., 2017).

### **1.3 Cílové mikroRNA projektu**

Pro náš projekt jsme vybrali miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b, které představují důležité molekuly nádorového růstu a agresivity karcinomu prsu (Eichelser C. et al., 2013). Jako normalizační kontrolu jsme zvolili let-7a, která vykazuje stabilní expresi mezi zdravými a nádorovými tkáněmi (Zhao H. et al., 2010).

MiR-155 byla popsána jako důležitý faktor vzniku, rozvoje a udržení nádorového procesu (Mattiske S. et al., 2012). Ve studiích byla popsána významně zvýšená exprese miR-155 u žen s karcinomem prsu, která korelovala s pokročilostí choroby a prognózou (Guo J. et al., 2016). Přehled publikovaných studií u karcinomu prsu určil přibližně 147 cílových genů miR-155 ve vztahu ke kancerogenezi, zahrnujících geny pro apoptózu, diferenciaci, angiogenezu, proliferaci a EMT (Mattiske S. et al., 2012).

Role miR-24 v kancerogenezi je vlivem na kmenové buňky, diferenciaci, proliferaci, apoptózu, adhezivitu a buněčnou migraci, podporuje růst, invazivitu a metastazování (Antonov AV. et al., 2013, Katoh M. et al., 2014).

MiR-19a představuje další onkogenní miR zvýšeně exprimovanou u karcinomu prsu. Její cíle představují nádorové kmenové buňky, cesty signální transdukce, EMT a další (Cascione L. et al., 2013, de Rinaldis E. et al., 2013).

MikroRNA miR-181b opět dokumentuje svůj onkogenní vliv působením na CSC, ovlivněním apoptózy, invazivity, migrace a metastazování (Mansueto G. et al., 2010, Pallante P. et al., 2008, Bisso A. et al., 2013, Wang L. et al., 2016).

MikroRNA let-7a byla vybrána jako kontrola, protože vykazuje minimální variabilitu v sérech pacientů se zhoubnými nádory, včetně karcinomu prsu (Cai WY. et al., 2013).

## 2. Hypotéza a cíle dizertační práce

### 2.1 Hypotéza

Onkogenní mikroRNA jsou zvýšeně exprimované v sérech pacientek s časným karcinomem prsu. Po odstranění nádoru a svodných lymfatik by jejich exprese měla klesat pod významnou hodnotu. Přetrvávání zvýšené exprese může být korelováno s dlouhodobými výsledky přežití a recidivami onemocnění a představovat cirkulující prognostický biomarker.

### 2.2 Konkrétní cíle navazující na hypotézu

- Detekovat expresi miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b v séru pacientek s časným karcinomem prsu
- Zjistit rozdíly exprese pro skupinu nízkého a vysokého rizika podle klinicko-patologických markerů
- Zjistit změny exprese mikroRNA v závislosti na fázích léčby karcinomu prsu
- Zjistit změny exprese mikroRNA před a po léčbě v závislosti na klinicko-patologických rizikových markerech
- Zjistit prognostický význam dlouhodobých změn exprese před a po léčbě časného karcinomu prsu
- Porovnat vztah exprese mikroRNA a klinicko-patologických markerů na určení prognózy karcinomu prsu

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Soubor pacientek a zdravých kontrol

Cílovou skupinou byly konsekutivní pacientky s časným karcinomem prsu indikované primárně k operačnímu řešení. Časný karcinom prsu je "karcinom *in situ* nebo invazivní karcinom, lokalizovaný v prsní žláze a/nebo svodných lymfatických uzlinách a zahrnuje klinická stádia I, IIA, IIB, IIIA".

V projektu byly definované 4 odběry krve na zpracování séra. První byl den před operačním výkonem (bod I, time point I), druhý za 14-28 dnů po operaci před zahájením protinádorové léčby (bod II, time point II) a třetí za 14-28 dnů po první léčebné modalitě (bod III, time point III). Čtvrtý bod odběru (bod IV, time point IV) byl v době záchytu recidivy onemocnění. Zdravé kontroly tvořilo 21 žen s věkovým rozmezím 25-60 let, bez zjevných známek onkologického onemocnění a bez onkologického onemocnění v osobní anamnéze.

Pacientky byly komplexně léčené podle aktuálních standardů léčby karcinomu prsu. Projekt a jeho výsledky nezasahovaly do léčebného onkologického rozhodování.

U pacientek jsme zaznamenali základní demografické údaje a rozdělili podle klinicko-patologických markerů do dvou rizikových skupin. Do skupiny vysokého rizika patřily všechny ženy s alespoň jedním z následujících markerů – trojitě negativní karcinom (ER, PgR a HER2 negativita), pozitivita LU, Ki-67 >20%, HER2 pozitivita, grade III. Do skupiny nízkého rizika patřily všechny ženy bez jakéhokoliv z výše uvedených faktorů.

První část projektu zahrnovala hodnocení základních charakteristik stanovení mikroRNA v sérech pacientek s časným karcinomem prsu – aplikovatelnost vybraných analytických metod, získání základních údajů o expresi cílových mikroRNA v sérech a tumorech, změny jejich koncentrací v závislosti na léčbě a rozdíly mezi vysokým a nízkým rizikem dle klinicko-patologických faktorů. Do této kohorty bylo zařazeno celkem 63 pacientek (medián věku 58 let), které odevzdaly séra ve všech definovaných bodech. Medián sledování této kohorty byl v době statistického zpracování 27 měsíců (9,5-36,3 měsíců) (tab. 1).

Do hodnocení prognostického významu mikroRNA a korelace s klinicko-patologickými markery, jsme zařadili 133 pacientek, které odevzdaly alespoň vzorek I a II (tab. 2). Klinické rozhodování o adjuvantní léčbě se koná zpravidla 2-3 týdny po operaci, prognostický marker by proto měl být validován po operaci po odstranění tumoru a svodných lymfatických uzlin, v našem projektu v době odběru II.

Závěrečné statistické zpracování proběhlo v prosinci 2017, medián sledování souboru byl 73 měsíců (21,6-88 měsíců). V době zpracování jsme zaznamenali 13 recidiv karcinomu prsu (9,7%) (medián PFS 71 měsíců, rozmezí 12-88 měsíců). Byly zastoupeny všechny typy recidivy – lokální, druhostranný karcinom, vzdálené metastázy. V souboru ve sledovaném období zemřelo celkem 8 pacientek (6%), z toho 4 na progresi karcinomu prsu (3%) a 4 z neonkologických příčin.

**Tab. 1: Kohorta 1**

Počet pacientek (počet tumorů)	63 (64)
Doba sledování	medián 27 měsíců (9,5-36,3 měsíců)
Medián věku (rozptyl)	58 let (37-82 let)
Premenopauzální/postmenopauzální	16 (25%) / 47 (75%)
pT1a	1 (2%)
pT1b	10 (15%)
pT1c	32 (50%)
pT2	21 (33%)
G I	11 (18%)
G II	38 (62%)
G III	12 (20%)
Duktální / lobulární	50 (69%) / 11 (15%)
jiné	11 (15%)
Ki-67 0%-5%	21 (34%)
Ki-67 6%-19%	28 (45%)
Ki-67 20% a více	13 (21%)
ER +	54 (84%)
ER -	10 (16%)
PgR +	54 (84%)
PgR -	10 (16%)
HER2 0-1+	58 (90%)
HER2 2+	3 (5%)
HER2 3+	3 (5%)
N +	15 (23%)
N -	49 (77%)
Trojité negativní nádory	5 (8%)
Skupina nízkého rizika	29 (46%)
Skupina vysokého rizika	34 (54%)

**Tab. 2: kohorta 2**

Počet pacientek (počet tumorů)	133 (134)
Věk	medián 61.5 (37-84) roků
Doba sledování	medián 73 (21.6-88) měsíců
Premenopauzální/postmenopauzální	23/110
Histologie duktální /lobulární	97 (72%) / 10 (8%)
Histologie ostatní	27 (20%)
pT1a	3 (2%)
pT1b	21 (16%)
pT1c	70 (52%)
pT2	40 (30%)
pT3 /pT4	0
N +	26 (19%)
N -	108 (81%)
G I	27 (20%)
G II	72 (54%)
G III	27 (20%)
HR +	119 (89%)
HR -	15 (11%)
HER +	4 (3%)
HER -	125 (93%)
Ki-67 0-19%	100 (75%)
Ki-67 >20%	29 (21%)
Trojité negativní nádory	12 (9%)
Skupina nízkého rizika	65 (49%)
Skupina vysokého rizika	68 (51%)

### 3.2 Sběr a zpracování krve

Krev byla odebírána do 10 ml zkumavky s polymerovým gelem a aktivátorem srážení (BD Vacutainer SST™ tubes). Zkumavky se ponechaly při pokojové teplotě 30-60 minut, poté se odstředily při rychlosti 3000 ot./min. po dobu 10 minut, sérum rozplnilo do 200 ul alikvotů a okamžitě zmrazilo na -80°C.

RNA byla izolována z 200 µl séra (lyzováno 1 ml QIAzol® Lysis reagent) za užití kitu miRNeasy® Mini Kit (Qiagen) s několika modifikacemi:

a) intenzivní promíchání na míchačce vortex po přidání předchlazeného CHCl<sub>3</sub>; b) centrifugace při 4°C, 15 minut na 10800 otáček za minutu; c) přidání 1 µl glykogenu během ethanolové precipitace; d) opakované (3×) promytí 500 µl RPE puforem; e) eluce mRNA z kolonky pomocí 40 µl ddH<sub>2</sub>O bez nukleáz s RNA inhibitory.

K přepisu do cDNA bylo pužito 10 µl mRNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu v celkovém reakčním objemu 50 µl. Reverzní transkripce s miR-specifickými primery (Life Technologies) proběhla na přístroji Mastercycler Gradient.

Pro RT-qPCR reakci byly připraveny dvě oddělené směsi: cDNA-směs pro každý jednotlivý vzorek a primer-směs pro referenční let-7a a specifické mikroRNA (hsa-miR-155; hsa-miR-19a; hsa-miR-24; hsa-miR-181b). Následně byly tyto reakční směsi postupně napipetovány na destičku o 384 jamkách tak, aby do každé jamky byla napipetována kombinace jedné

cDNA směsi (4  $\mu$ l) a jedné primer směsi (4  $\mu$ l). Celkový objem RT-qPCR reakce na jednu jamku byl 8  $\mu$ l. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR) proběhla na přístroji 7900HT Fast Real-time PCR System. Každá RT-qPCR reakce (unikátní kombinace cDNA směsi a primer směsi) byla v daném experimentu napipetována v dubletu.

Složení PCR reakce s barvivem TaqMan (pro jednu jamku):

- 1) cDNA-směs: TaqMan Universal master Mix II 2  $\mu$ l; voda 1,2  $\mu$ l; cDNA 0,8  $\mu$ l
- 2) primer směs (let-7a; hsa-miR-155; hsa-miR-19a; hsa-miR-24; hsa-miR-181b): TaqMan Universal master Mix II 2  $\mu$ l; voda 1,6  $\mu$ l; primer 0,4  $\mu$ l;

Amplifikace probíhala inkubací v cykléru za následujících podmínek: Počáteční denaturace a aktivace AmpliTaq polymerázy (T = 95°C, 10 minut); 40 cyklů (Denaturace při 95°C po dobu 15 sekund; anelace primedrů a polymerace T = 60°C po dobu 1 minuta).

$C_T$  hodnoty pro specifický onkomiR (miR-155, miR-19a, miR-181b, miR-24) ( $C_{Tspec}$ ) byly odečteny od  $C_T$  hodnot pro referenční mikroRNA let-7a ( $C_{Tnorm}$ ). Relativní hodnota exprese mRNA u pacientek s EBC je vypočtena jako průměr hodnot  $2^{-(C_{Tnorm}-C_{Tspec})}$  v duplikátu pro každý vzorek s určením standardní chyby měření. Střední hodnoty a standardní odchylky dCT hodnot (každého vzorku a průměrného vzorku kontrol) referenční mikroRNA let-7a v patientských vzorcích v každém odběrovém bodě (I-III) a ve vzorcích kontrol dokumentovaly, že let-7a je stabilně exprimována ve vzorcích sér.

### 3.3 Statistické metody

Mnohorozměrná longitudinální analýza dat byla aplikována, aby stochasticky modelovala sérové hladiny každé mikroRNA. Pro náš projekt byla použita modifikace zobecněného lineárního modelu (generalized linear model, GLM) nazvaná zobecněné odhadovací rovnice (generalized estimating equations, GEE). Důvodem je to, že všechny klasické regresní přístupy vycházejí z předpokladu, že sérové hodnoty jednoho pacienta v odlišných časech jsou nezávislé. Nicméně tento předpoklad nemusí být v biostatistice pravdivý, resp. je minimálně otazný. Následující zobecněné odhadovací rovnice (generalized estimating equations, GEE) byly použity jako model:

$$E[miR_{i,t}] = \exp\{\beta_R(Patient_i \text{ relapsed}) + \beta_N(Patient_i \text{ not relapsed}) + \beta_I(Patient_i \text{ in I}) + \beta_{II}(Patient_i \text{ in II}) + \beta_{III}(Patient_i \text{ in III}) + \beta_{IV}(Patient_i \text{ in IV})\}.$$

V tomto vzorci je  $E[miR_{i,t}]$  očekávaná sérová hodnota  $miR_{i,t}$  pro každou pacientku s EBC identifikovanou  $i$  v časovém bodě  $t = I, II, III, IV$ . Distribuce sérových hodnot miR má Gamma rozdělení a autoregresní korelační struktura řádu jedna je zvolena pro modelování závislosti v rámci každého měření miR hodnoty v jednotlivých časových bodech. Interpretace matematických zápisů, např.  $(Patient_i \text{ in II})$ , je taková, že závorka je rovna jedné právě tehdy a jen tehdy, když  $i$ -tá pacientka je v časovém bodě II; jinak nula. Regresní koeficienty  $\beta$  představují kvantitativní vliv následného pravdivého/nepravdivého indikátoru v závorce. Například  $\beta_R$  kvantifikuje vliv relabované pacientky na odpovídající sérovou hodnotu miR.

Vlastní statistické zpracování bylo prováděno pomocí statistického softwaru R (<http://www.r-project.org>).

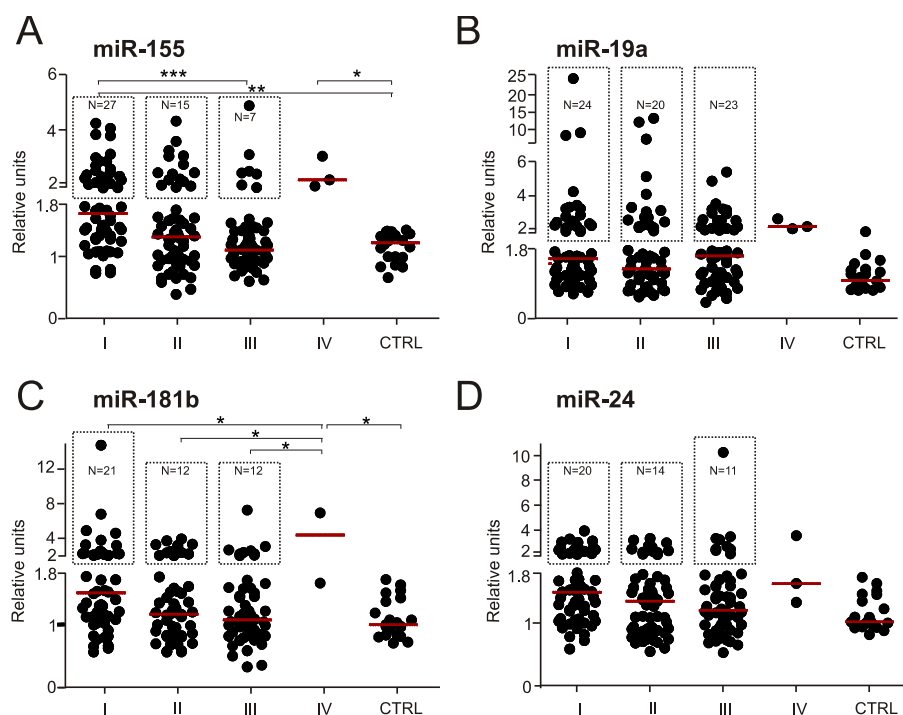
## 4. Výsledky

### 4.1 Exprese onkogenních mikroRNA v séru v jednotlivých fázích léčby

V první fázi jsme stanovili profily exprese miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b v séru 63 pacientek (tab. 1) v definovaných bodech a porovnali je s expresí miR v séru zdravých kontrol. Předoperačně (bod I) překračovaly hranici významnosti jednotlivé onkomiR následovně – miR-155 byla 1,8-4,2x více exprimovaná ve 43% (27 pac.), miR-19a byla 1,8-25,1x více exprimovaná ve 38% (24 pac.), miR-181b byla 1,8-14,7x více exprimovaná ve 33% (21 pac.) a miR-24 byla 1,8-3,7x více exprimovaná ve 32% (20 pac.) (obr. 1A-D).

Tato data dokumentují to, že onkomiR jsou zvýšeně exprimované v sérech pacientek v době diagnózy EBC, toto zvýšení není patrné u všech nemocných a potvrzuje tak heterogenitu karcinomu prsu.

**Obr. 1: Hodnoty sérové exprese onkomiR v jednotlivých časových bodech**



**Vysvětlivky obr. 1:** sérové hodnoty onkomiR u pacientek s EBC (N=63) a zdravých kontrol (N=21). 200 ul séra bylo užito k extrakci celkové RNA, která sloužila ke specifické reverzní transkripci a TaqMan PCR amplifikaci miR-155 (A), miR-19a (B), miR-181b (C) a miR-24 (D) a let-7a, která sloužila jako normalizační kontrola. Pacientky s EBC byly analyzovány v době diagnózy (I), po operaci (II) a po adjuvantní léčbě (III). 3 pacientky byly analyzovány také v době relapsu (IV). Osa Y představuje sérové hodnoty onkomiR vztažené k let-7a. Průměrné hodnoty zdravých kontrol byly vztažené k 1. ANOVA test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , průměry jsou označeny vodorovnou čarou. Počty pacientek s hodnotami miR > 1,8 jsou zvýrazněny v okénku.

Pro statistické zhodnocení vývoje exprese mikroRNA v jednotlivých fázích léčby jsme aplikovali model longitudinální mnohorozměrné analýzy dat (viz Statistické metody). Tento model umožnil analyzovat každou hodnotu exprese onkomiR v séru s ohledem na dobu odběru a rizikovou skupinu a definovat očekávanou hodnotu každé mikroRNA v každém bodě odběru. Parametry longitudinálního modelu jsou uvedené v tabulce 3A-D.

Jako první jsme hodnotili změny exprese onkomiR po operačním odstranění primárního nádoru a svodných lymfatických uzlin. Mezi bodem I a II hladiny miR-155, miR-181b a miR-24 signifikantně poklesly ( $p$ -hodnoty  $< 0,05$ , miR-155:  $1,89e-05$ , miR-181b:  $5,41e-06$ , miR-24:  $0,00638$ ) u všech pacientek nezávisle na rozdělení podle rizika (tab. 3). Naproti tomu jsme nezaznamenali po operaci (bod II) významný pokles miR-19a, tento fakt může svědčit pro její větší stabilitu. V dalším kroku jsme zjišťovali rozdíl exprese všech onkomiR před operací (bod I) a po první léčebné modalitě (bod III). Zde již došlo k signifikantně významnému poklesu všech 4 mikroRNA ( $p$ -hodnoty  $< 0,05$ , miR-155:  $1,32e-09$ , miR-19a:  $0,00869$ , miR-181b:  $8,80e-06$ , miR-24:  $0,02343$ ). Tento fakt nás vedl k závěru, že nesignifikantní pokles miR-19a po operaci reflektuje spíše její vyšší stabilitu, případně se může jednat o formu molekulární reziduální choroby, než produkci nezávislou na nádorové tkáni. Data jsou přehledně znázorněna na obrázku 1 a v tabulce 3.

**Tab. 3: Souhrn dat longitudinální multivariantní analýzy**

<b>A) miR-155</b>			
<b>Parametr</b>	<b>Odhad</b>	<b>Standardní odchylka</b>	<b><math>p</math>-hodnota</b>
$\beta_I$	0.61774	0.06440	$< 2e-16$
$\beta_{II}$	-0.24024	0.05617	1.89e-05
$\beta_{III}$	-0.34474	0.05684	1.32e-09
$\beta_C$	-0.51148	0.11103	4.10e-06
$\beta_L$	-0.18353	0.08245	0.026
<b>B) miR-19a</b>			
<b>Parametr</b>	<b>Odhad</b>	<b>Standardní odchylka</b>	<b><math>p</math>-hodnota</b>
$\beta_I$	0.60941	0.04843	$< 2e-16$
$\beta_{II}$	0.03224	0.03187	0.31183
$\beta_{III}$	0.09981	0.03804	0.00869
$\beta_C$	0.34506	0.11439	0.00256
$\beta_L$	0.15711	0.07041	0.02567
<b>C) miR-181b</b>			
<b>Parametr</b>	<b>Odhad</b>	<b>Standardní odchylka</b>	<b><math>p</math>-hodnota</b>
$\beta_I$	0.70370	0.05176	$< 2e-16$
$\beta_{II}$	0.17814	0.03917	5.41e-06
$\beta_{III}$	0.17263	0.03884	8.80e-06
$\beta_C$	0.27792	0.10095	0.0059
$\beta_L$	0.16588	0.07403	0.0250
<b>D) miR-24</b>			
<b>Parametr</b>	<b>Odhad</b>	<b>Standardní odchylka</b>	<b><math>p</math>-hodnota</b>
$\beta_I$	0.50276	0.06718	7.19e-14
$\beta_{II}$	-0.14807	0.05429	0.00638
$\beta_{III}$	-0.12527	0.05527	0.02343
$\beta_C$	-0.34034	0.11512	0.00311
$\beta_L$	-0.22631	0.08774	0.00990

**Vysvětlivky tab. 3:** Zobrazené jsou parametry k výpočtu podmíněně očekávané sérové hodnoty pro každou pacientku/kontrolu v určitém časovém bodě a jejich odhadované sérové hodnoty, standardní odchylky a  $p$ -hodnoty pro miR-155 (A), miR-19a (B), miR-181b (C), a miR-24 (D), všechny vztažené k let-7a. Parametry hodnot onkomiR:  $\theta_i$ : bod I,  $\theta_{II}$ : rozdíl mezi body I a II,  $\theta_{III}$ : rozdíl mezi body I a III,  $\theta_C$ : rozdíl mezi bodem I a zdravými kontrolami, a  $\theta_L$ : rozdíl mezi pacientkami vysokého a nízkého rizika. Odhadované hodnoty parametrů jsou užity k výpočtu podmíněného očekávání sérových hodnot jednotlivých mikroRNA pro každou pacientku v každém časovém bodě (viz Statistické metody). Pro vysvětlení modelu, predikce hodnoty miR-19a po léčbě vysoce rizikové pacientky, predikovaná hodnota je  $1/\{0.60941 + 0.09981\} \approx 1.410$  (viz odhad z tabulky 6B). Pro nízké riziko je odhad sérové hodnoty miR-24 po operaci  $\exp\{0.50276 + (-0.14807) + (-0.22631)\} \approx 1.137$  (tab. 3D).

Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že hodnoty onkomiR jsou signifikantně odlišné v době diagnózy a po operaci (bod I a II), mimo miR-19a, která se jeví stabilnější v bodě II a klesá po adjuvantní léčbě (bod III). Dále jsou hodnoty onkomiR zdravých žen signifikantně nižší než hodnoty onkomiR pacientek s karcinomem prsu v bodě III.

Dle dostupných dat exprese onkogenních miR je patrné, že část pacientek vykazovala v bodě III (po první protinádorové léčebné modalitě) zvýšené hladiny v porovnání se zdravými kontrolami. Jednalo se o pacientky bez detekovatelné choroby, měly odstraněný primární nádor a svodná lymfatika a byly po adjuvantní onkologické léčbě (chemoterapie nebo radioterapie). Zjevný zdroj produkce onkogenních miR by neměl být v této fázi v organismu přítomen. Vysvětlení může být dvojitý, první se týká větší stability konkrétních miR v cirkulaci. Vzhledem k tomu, že od operace většinou uběhla doba delší než 3 měsíce, se nezdá toto vysvětlení jako pravděpodobné. Mnohem pravděpodobnější se jeví důvod ten, že v organismu perzistovala reziduální nemoc ve formě jednotlivých cirkulujících nádorových buněk secernujících miR. Tyto cirkulující nádorové buňky mohou být dále eliminovány imunitním systémem a hormonální terapií, ale část může být základem pro budoucí relaps. Jeví se tak možný předpoklad užitečnosti monitorování cirkulujících mikroRNA na sledování aktivity nemoci a rizika relapsu (liquid biopsy).

V době vyhodnocování kohorty 1 byl relaps karcinomu prsu zaznamenán u 3 pacientek. Tyto 3 pacientky darovaly sérum v době relapsu před zahájením jakékoliv protinádorové léčby (bod IV). Stanovili jsme expresi všech 4 onkomiR podle předchozí metodiky a zjistili, že všechny mikroRNA vykazovaly zvýšenou expresi, která korelovala s návratem nemoci (obr. 1A-D).

#### 4.2 Exprese onkogenních mikroRNA podle rizikové skupiny a vývoj v závislosti na léčbě

Další otázkou našeho projektu bylo, zda pacientky vysokého rizika exprimují jednotlivé onkomiR odlišně v porovnání s pacientkami nízkého rizika a jak se tyto hodnoty mění v závislosti na léčbě. Pacientky s časným karcinomem prsu jsme si pro analýzu rozdělili podle klinicko-patologických markerů na dvě skupiny – nízkého a vysokého rizika.

Pacientky vysokého rizika vykazovaly signifikantně zvýšené hodnoty exprese jednotlivých onkomiR (miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24) oproti zdravým kontrolám ( $p$ -hodnota miR-155: 4.10e-06, miR-19a: 0.00256, miR-181b: 0.0059, miR-24: 0.00311).

Pacientky nízkého rizika vykazovaly signifikantně nižší hodnoty exprese oproti vysoce rizikovým pacientkám ( $p$ -hodnota miR-155: 0.026, miR-19a: 0.02567, miR-181b: 0.0250, miR-24: 0.00990).



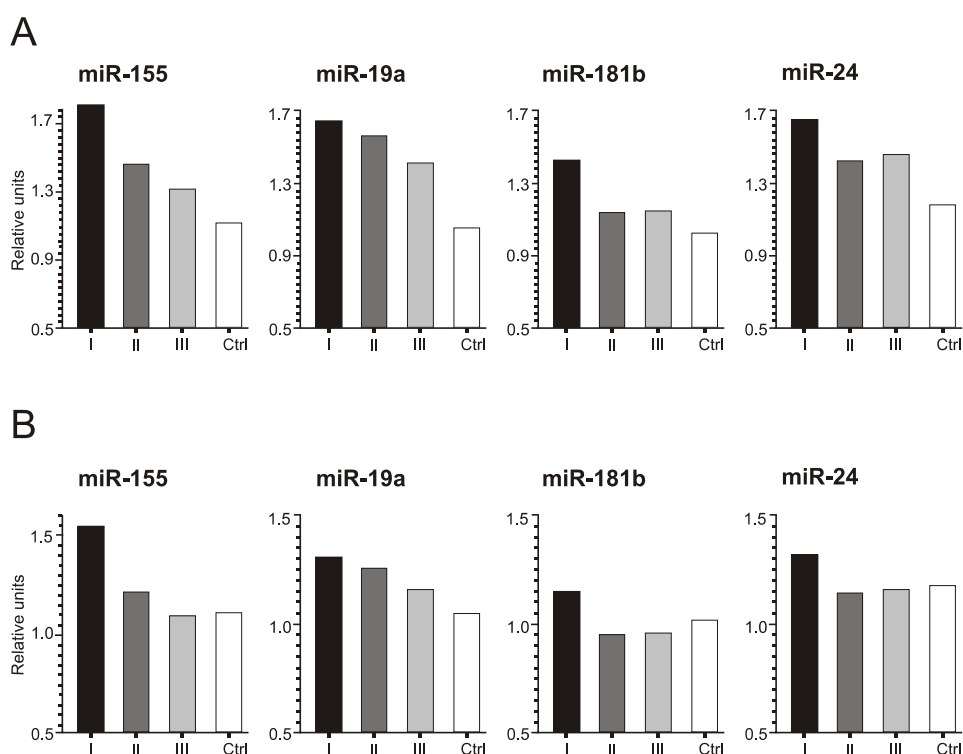
Z údajů vyplývá, že existuje definovatelná hodnota exprese jednotlivých onkomiR, která má diagnostický potenciál a dále rozlišuje pacientky vysokého a nízkého rizika. Klinicko-patologické charakteristiky rozdělující pacientky do rizikových skupin korelují signifikantně s hodnotami exprese všech miR (parametr  $\beta_L$  v tabulce 3A-D). Hodnoty významnosti byly pro všechny čtyři onkogenní mikroRNA méně než 0,05, tento fakt svědčí pro to, že na základě odlišné exprese jednotlivých onkomiR lze rozdělit pacientky s časným karcinomem prsu do nízkého a vysokého rizika.

Další analýza byla zaměřená na změny exprese jednotlivých onkomiR v různých fázích léčby v závislosti na rizikové skupině. Sérová exprese miR-155 a miR-19a u pacientek vysokého rizika klesají v průběhu celé léčby a zůstávají zvýšené oproti zdravým kontrolám (obr. 2, horní panel A). Naproti tomu miR-181b a miR-24 poklesnou po operačním odstranění nádoru a poté zůstávají stabilní a zvýšené oproti zdravým kontrolám.

Pacientky nízkého rizika vykazují nevýznamný pokles exprese onkomiR po chirurgickém odstranění nádoru a následně zůstávají prakticky konstatní v průběhu léčby s přibližně stejnými hodnotami jako kontroly (obr. 2, dolní panel B).

Shrnuto, hodnoty exprese onkogenních miR u pacientek vysokého rizika klesají rychleji a významněji než u pacientek nízkého rizika (tabulka 3A-D). Pacientky vysokého rizika nedosáhnou po onkologické léčbě normálních hodnot exprese onkomiR na rozdíl od pacientek nízkého rizika.

**Obr. 2: Vývoj exprese onkogenních miR pro jednotlivé fáze léčby v závislosti na rizikové skupině**

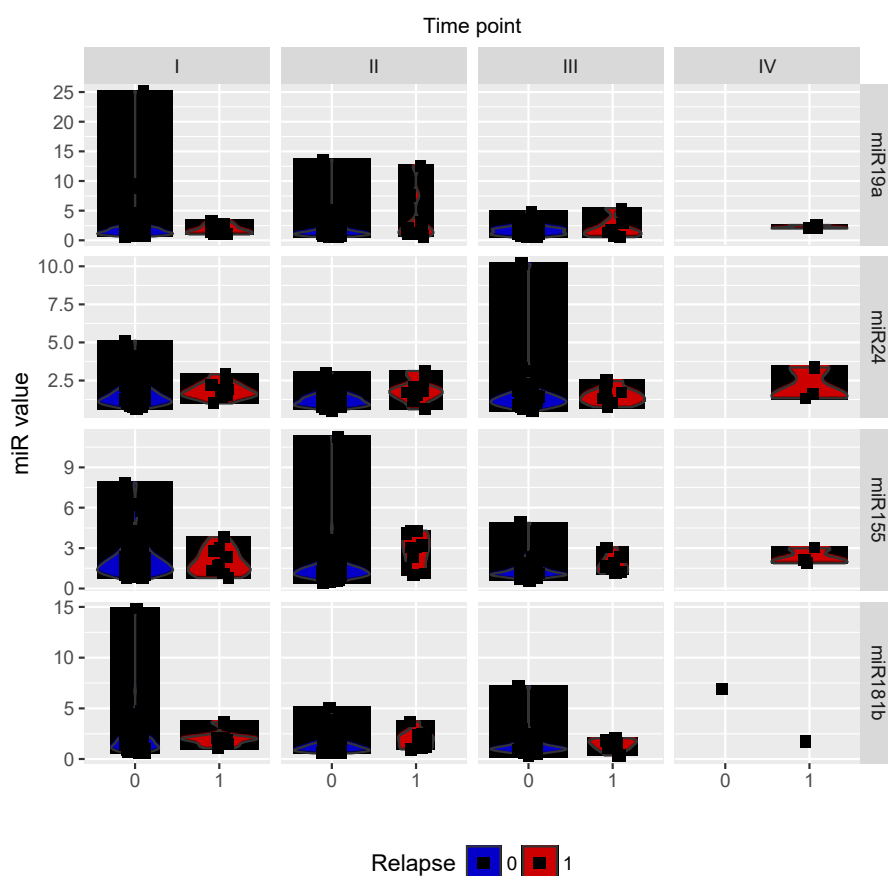


**Vysvětlivky obr. 2:** A – pacientky vysokého rizika, B – pacientky nízkého rizika, I-III – body odběru krve, Ctrl – kontroly

### 4.3 Exprese onkogenních mikroRNA a jejich význam ve stanovení prognózy karcinomu prsu

Pro hodnocení prognostického významu exprese mikroRNA jsme kohortu rozšířili na 133 pacientek (tab. 2), které darovaly séra alespoň před a po operaci (bod I a II). Stanovili jsme hladiny miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 vztahované k let-7a v sérech 133 pacientek v definovaných bodech a získali skupiny hodnot z každého bodu, pro každou miR a pacientku. Tyto hodnoty ukazují, že relabující pacientky zřetelně zvýšeně exprimují v bodech II-IV miR-155 a miR-24 (obr. 3).

**Obr. 3:** Exprese onkomiR v jednotlivých bodech podle přítomnosti relapsu



**Vysvětlivky obr. 3:** hodnoty exprese miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 v bodech odběru I-IV, zobrazeno odděleně pro pacientky s relapsem a bez relapsu.

Ke statistickému zhodnocení jsme použili longitudinální multivariantní analýzu dat, konkrétně zobecněné odhadovací rovnice (GEE) (viz Statistické metody). Tento model umožnil analyzovat hodnotu konkrétní onkomiR v sérech pacientek s ohledem na bod odběru a přítomnost relapsu choroby. Dále jsme měli za cíl definovat očekávanou hodnotu každé jednotlivé onkomiR v každém bodě odběru podle pravděpodobnosti rizika relapsu.

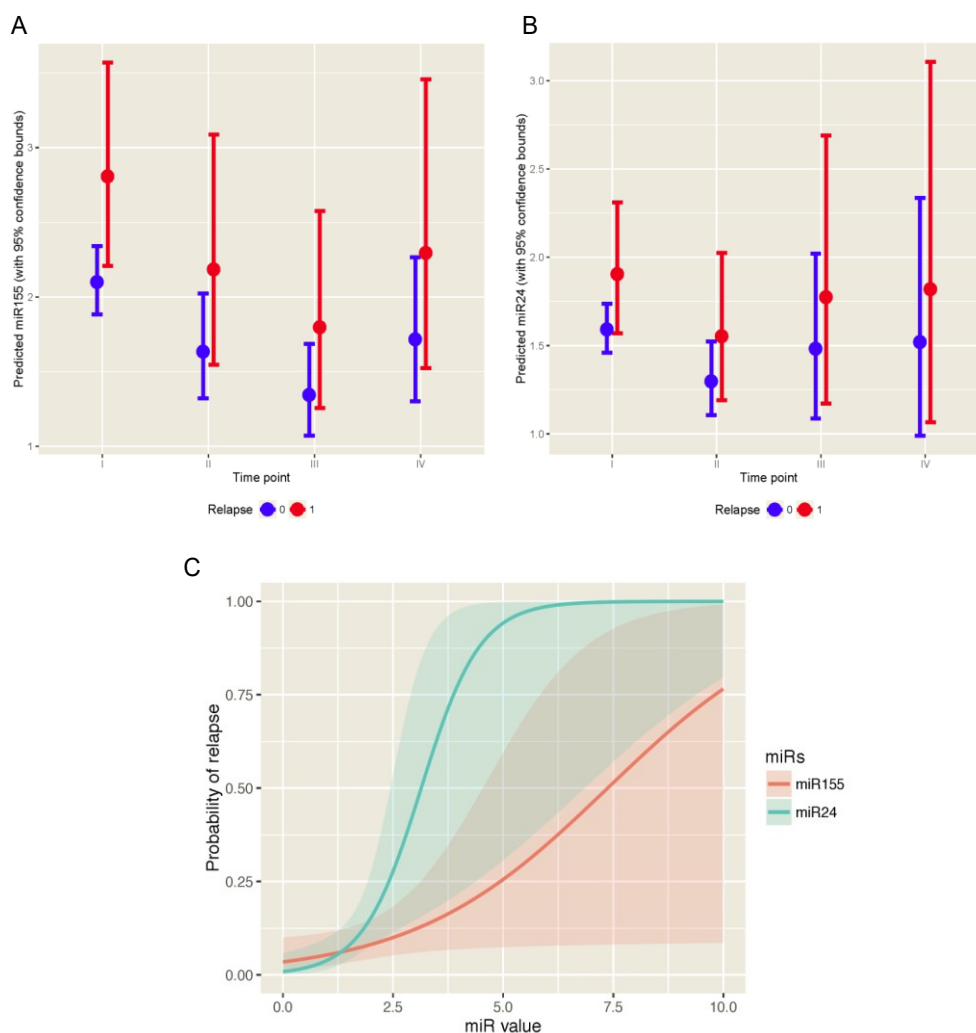
Multivariantní GEE model prokázal, že miR-155 a miR-24 byly prognostické z hlediska relapsu ve všech bodech odběru ( $p= 0,025$  a  $0,041$ ). Hodnoty miR-155 a miR-24 jsou přehledně

znázorněny odděleně pro pacientky s relapsem a bez relapsu na obr. 4A,B.

Měřením hodnot miR-155 a miR-24 po operaci (bod II) získáme signifikantní údaje pro stanovení pravděpodobnosti rizika relapsu ( $p=0,028$  a  $0,020$ ). Pravděpodobnost předpovědi rizika relapsu měřením hodnot miR-155 a miR-24 v bodě II může být získána pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM, generalized linear model) s Bernoulliho distribucí a je znázorněna graficky na obrázku 4C.

Sérové hodnoty exprese miR-19a a miR-181b měřené ve všech bodech nejsou z hlediska odhadu rizika relapsu signifikantní ( $p=0,250$  a  $0,240$ ) (obr. 6). Nesignifikantní z hlediska předpovědi pravděpodobnosti relapsu zůstávají i hodnoty miR-19a a miR-181b měřené specificky v bodě II ( $p=0,054$  a  $0,062$ ).

**Obr. 4: Změny exprese miR-155 a miR-24 v jednotlivých bodech dle relapsu**



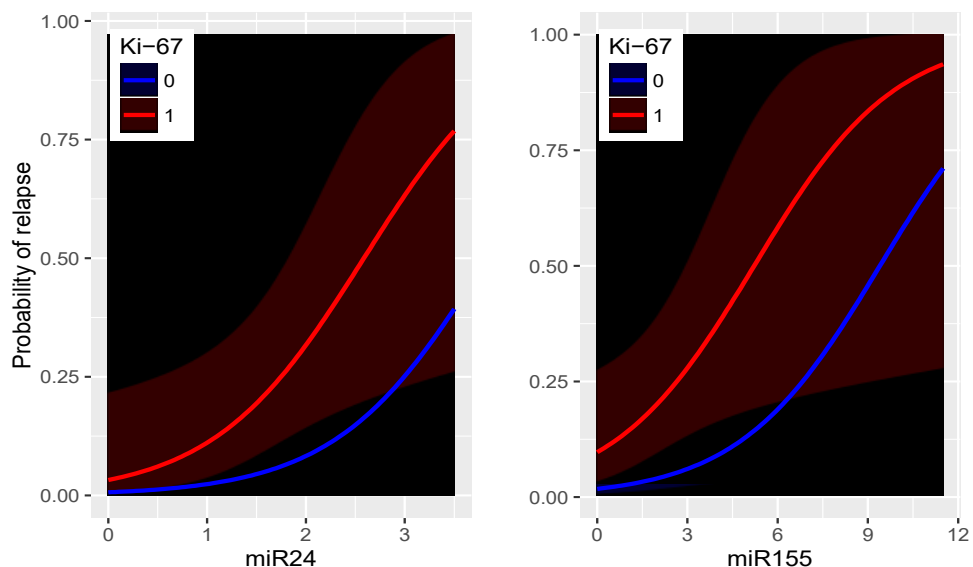
**Vysvětlivky obr. 4:** miR-155 a miR-24 jsou prediktivní z hlediska relapsu ( $p=0,025$ , resp.  $0,041$ ). Predikované hodnoty miR-155 (A) a miR-24 (B) v bodech I-IV s 95% intervalem spolehlivosti pro relabované (červený interval, 1) a nerelabované pacientky (modrý interval, 0) založené na GEE modelu. (C) hodnoty miR-155 a miR-24 zvyšují pravděpodobnost určení rizika relapsu ( $p=0,028$  resp.  $0,020$ ).

#### 4.4 Multivariantní analýza exprese onkogenních mikroRNA a klinicko-patologických markerů

Po zjištění statisticky významného vlivu hodnocení exprese miR-155 a miR-24 na predikci pravděpodobnosti relapsu onemocnění jsme následně provedli multivariantní analýzu exprese onkomiR s klinicko-patologickými markery zvýšeného rizika (TNBC, HER+, grade III, LN+, Ki-67>20%) a léčbou (chemoterapie, radioterapie a hormonoterapie). Statistickým zpracováním nevykazovaly TNBC, HER2 pozitivita, grade III a pozitivní lymfatické uzliny statisticky významný dopad na předpověď pravděpodobnosti relapsu (všechny  $p$ -hodnoty nad 0,05 pokud byly simultánně hodnoceny s hodnotami exprese miR-155 a miR-24). Lze tak dokumentovat nezávislost samostatného hodnocení miR-155 a miR-24 na predikci pravděpodobnosti relapsu, miR-155 a miR-24 tak mohou představovat nezávislé prognostické markery. Jediný rizikový faktor, který statisticky významně predikoval pravděpodobnost relapsu (spolu s hodnotami miR-155 a miR-24) byl proliferační index Ki-67>20% ( $p$ -hodnota miR-155: 0,013 a miR-24: 0,023). Společné hodnocení miR-155, miR-24 a Ki-67 tak zpřesňuje předpověď rizika relapsu onemocnění (obr. 5). Na obr. 6 je uvedeno grafické znázornění pro onkomiR bez statistické significance – miR-181b a miR-19a.

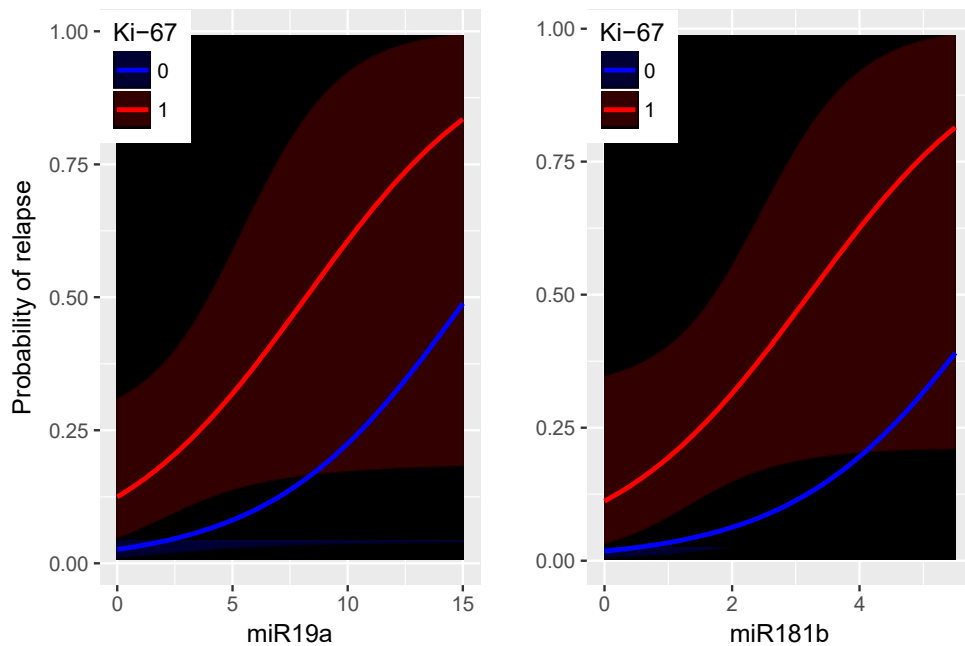
Abychom vyloučili vliv absolvované léčby na hodnoty exprese miR, provedli jsme multivariantní analýzu také s chemoterapií, hormonoterapií a ozařováním a žádný z parametrů nevykazoval signifikantní vliv. Hodnoty  $p$  jsou následující – chemoterapie a miR-24: 0,55, chemoterapie a miR-155: 0,35, radioterapie a miR-24: 0,63, radioterapie a miR-155: 0,17, hormonoterapie a miR-24: 0,60, hormonoterapie a miR-155: 0,18.

**Obr. 5: Multivariantní analýza vlivu hodnot Ki-67, miR-24 a miR-155 na riziko relapsu**



**Vysvětlivky obr. 5:** Predikovaná pravděpodobnost relapsu s ohledem na hodnoty exprese miR-155 a miR-24 v bodě II se započtením Ki-67 (>20% = 1, <20% = 0), znázorněné 95% intervaly spolehlivosti,  $p=0,013$  v případě miR-155/Ki-67,  $p=0,023$  v případě miR-24/Ki-67.

**Obr. 6: Multivariantní analýza vlivu hodnot Ki-67, miR-19a a miR-181b na riziko relapsu**



**Vysvětlivky obr. 6:** Predikovaná pravděpodobnost relapsu s ohledem na hodnoty exprese miR-181b a miR-19a v bodě II se započtením Ki-67 (>20% = 1, <20% = 0), znázorněné 95% intervaly spolehlivosti,  $p=0,240$  v případě miR-181b/Ki-67,  $p=0,249$  v případě miR-19a/Ki-67

#### 4.5 Využití generalizovaného lineárního modelu k určení pravděpodobnosti relapsu EBC

Vedle uvedených analýz byl další záměr projektu směřován k výpočtu rizika relapsu měřením hodnot miR-155 a miR-24. Tyto výpočty slouží k určení rizika relapsu onemocnění od 0 do 100% z hodnot exprese miR-155, miR-24 a naopak lze definovat jaká hodnota exprese onkomiR je nutná pro určité riziko relapsu (0-100%). Ke konstrukci rovnic byl využit zobecněný lineární model (GLM), který lze rozdělit do třech možností:

a. Je k dispozici pouze hodnota miR-155

$$Probability[Relapse_i] = 1/[1 + \exp\{4.019 - 0.428(miR155II_i) - 1.788(Ki67_i \geq 20\%)\}].$$

b. Je k dispozici pouze hodnota miR-24

$$Probability[Relapse_i] = 1/[1 + \exp\{5.023 - 1.311(miR24II_i) - 1.633(Ki67_i \geq 20\%)\}].$$

c. Jsou k dispozici hodnoty miR-155 a miR-24 současně

$$Probability[Relapse_i] = \frac{1}{[1 + \exp\{5.687 - 0.396(miR155II_i) - 1.206(miR155II_i) - 1.605(Ki67_i \geq 20\%)\}]}.$$

Například,  $miR155II_i$  znamená měření v bodě II pro  $i$ -tého pacienta.

Jako návod užití vzorce si stanovíme pacientku s Ki-67<20% a hodnotou miR-24 v bodě II 2.00, v tom případě je riziko relapsu 8,31% (podle b). Pokud chceme znát hodnotu exprese

miR-155 v bodě II u pacientky s Ki-67>20% a rizikem relapsu 90%, vyjde nám podle  $\alpha$  hodnota 10.3.

Shrnutím lze konstatovat, že standardně stanovená hodnota Ki-67 spolu s expresí miR-155 a miR-24 nám může pomoci definovat pravděpodobnost rizika relapsu (0-100%) a zároveň určit konkrétní hodnotu miR podle rizika relapsu (5%, 10%, ..., 90%). Kompletní kvantifikace odhadovaného efektu rizikových charakteristik spolu s odpovídajícími hodnotami standardních odchylek a  $p$  hodnot je uvedena v tabulce 4.

**Tab. 4: Predikce pravděpodobnosti relapsu**

**A. je dostupná hodnota miR-155**

<i>Rizikové charakteristiky</i>	<i>Odhad</i>	<i>Stand. odchylka</i>	<i>P-hodnota</i>
Intercept	4.019	0.715	<0.001
miR-155	-0.428	0.194	0.028
Ki67>=20%	-1.788	0.717	0.013
TNBC	-0.093	1.937	0.961
HER2 pozitivní	-0.536	1.865	0.774
Grade III	-0.960	0.897	0.284
Pozitivní LN	-0.113	1.035	0.913
Chemoterapie (ano)	-1.738	1.163	0.135
Radioterapie (ano)	1.600	1.188	0.178
Hormonální terapie (ano)	0.936	1.674	0.576

**B. je dostupná hodnota miR-24**

<i>Rizikové charakteristiky</i>	<i>Odhad</i>	<i>Stand. odchylka</i>	<i>P-hodnota</i>
Intercept	5.023	1.038	<0.001
miR-24	-1.311	0.565	0.020
Ki67>=20%	-1.633	0.719	0.023
TNBC	1.444	2.287	0.528
HER2 pozitivní	-0.030	2.047	0.988
Grade III	-0.991	0.875	0.258
Pozitivní LN	-0.593	1.007	0.556
Chemoterapie (ano)	-2.364	1.239	0.056
Radioterapie (ano)	1.526	1.174	0.194
Hormonální terapie (ano)	1.682	1.968	0.393

**C. Jsou dostupné hodnoty miR-155 a miR-24 současně**

<i>Rizikové charakteristiky</i>	<i>Odhad</i>	<i>Stand. odchylka</i>	<i>P-hodnota</i>
Intercept	5.687	1.179	<0.001
miR-155	-0.396	0.190	0.038
miR-24	-1.206	0.591	0.041
Ki67>=20%	-1.605	0.743	0.031
TNBC	0.681	2.331	0.770
HER2 pozitivní	-0.282	2.028	0.889
Grade III	-1.197	0.949	0.207
Pozitivní LN	-0.369	1.117	0.741
Chemoterapie (ano)	-3.005	1.549	0.052
Radioterapie (ano)	1.709	1.337	0.201
Hormonální terapie (ano)	1.298	1.939	0.503

**Vysvětlivky tab. 4:** Odhadovaný efekt rizikových faktorů se standardními odchylkami a hodnotami  $p$  (A) zahrnujeme hodnoty exprese miR-155; (B) zahrnujeme hodnoty exprese miR-24; nebo (C) zahrnujeme hodnoty exprese miR-155 a miR-24 současně.

## 5. Diskuze

Časný karcinom prsu je nejčastější zhoubné nádorové onemocnění u žen a nejčastější příčina úmrtí žen. Pacientky s časným karcinomem prsu mají obecně prognózu dobrou, ale lze nalézt podskupiny s výrazně nepříznivým vývojem nemoci a vysokým rizikem budoucího relapsu. Tento fakt je dán významnou heterogenitou karcinomu prsu z hlediska patologického, molekulárního a léčebného. Hlavním cílem, který stojí na začátku léčebného rozhodování, je definovat co nejindividuálněji rizikovou skupinu a odlišit ty pacientky, které mají zvýšené riziko recidivy onemocnění.

V současnosti máme pro rozhodování o komplexní onkologické léčbě k dispozici markery klinické, patologické a molekulární. Jak bylo uvedeno v úvodu, není jejich přesnost a citlivost dostatečně individuální a rozdělení pacientek do rizikové skupiny skutečně personalizované. Jedním z hlavních směrů výzkumu v oblasti karcinomu prsu představuje hledání dostatečně senzitivních a specifických markerů určení rizika budoucího relapsu. Vedle markerů prognostických je zároveň další směr výzkumu cílen na dostatečně přesné markery určené k monitoraci odléčených pacientek. Zde hledáme markery reziduální choroby s potenciálem znovupropuknutí nemoci a rizika metastazování.

V současnosti jsou nejdále molekulární metody zaměřené na genomické a transkriptomické monitorování. Jedná se o genomické eseje, jejich limitace je v použití pouze na tumorové tkáni, není to tedy skutečný marker použitelný opakovaně v průběhu léčby. Nadějnější jsou metody analýzy cirkulující nádorové DNA (ctDNA), které umožňují opakované hodnocení na začátku i v průběhu léčby. Opakovaná analýza ctDNA zároveň umožňuje detekovat rozvoj rezistentních mutací a cílenou léčbu dále personalizovat.

V těchto mezích se ubírala rozvaha o našem projektu, který zde předkládáme. Hlavním cílem bylo hledání použitelného a dostatečně citlivého cirkulujícího biomarkeru, který bude schopen definovat, spolu s ostatními rizikovými markery, s dostatečným předstihem rizikost jednotlivých pacientek z hlediska budoucího rizika recidivy karcinomu prsu. Zvolili jsme konkrétní onkogenní mikroRNA (miR-155, miR-24, miR-19a, miR-181b), které působí na základní děje kancerogeneze vlivem na buněčný cyklus, apoptózu, epiteliálně-mezenchymální tranzici a nádorové kmenové buňky.

V první fázi projektu se potvrdila zvýšená hodnota exprese onkogenních miR v době diagnózy karcinomu prsu pro celou populaci pacientek v porovnání se zdravými kontrolami. Zvýšená exprese nebyla přítomna u všech miR a u všech pacientek, to dokumentuje významnou heterogenitu karcinomu prsu. Podobné údaje lze nalézt v dalších projektech, které studovaly diagnostický potenciál mikroRNA. Po operaci a v dalších fázích léčby karcinomu prsu dochází k poklesu miR s jednotlivými odlišnostmi podle druhu miR. I přes tendenci k poklesu exprese zůstává u části pacientek hodnota exprese zvýšená v porovnání se zdravými kontrolami. Vzhledem k tomu, že u pacientek v té době nebyl přítomen zjevný zdroj produkce (nádorová tkáň), lze odvozovat, že se jedná o formu molekulární reziduální choroby. Jejím zdrojem mohou být jednotlivé cirkulující (CTC) nebo diseminované (DTC) nádorové buňky. Tyto nádorové buňky představují potenciální zdroj budoucího relapsu

onemocnění a na jejich eradikaci je zaměřena správně naplánovaná pooperační protinádorová léčba (chemo-, bio-, hormonoterapie). Citlivé metody detekce molekulární reziduální choroby tak představují prognostický marker v určení zvýšeného rizika relapsu a zároveň marker definující potřebu vyšší intenzity protinádorové léčby.

V další fázi jsme rozdělili pacientky na skupinu nízkého a vysokého rizika (viz Metody) a hodnotili rozdíly v expresi miR a vývoj v jednotlivých fázích léčby. Pacientky vysokého rizika zvýšeně exprimovaly onkogenní miR v porovnání s pacientkami nízkého rizika a zdravými kontrolami. Po operaci a v dalších fázích léčby byla dynamika vývoje hodnot exprese pro obě skupiny zcela odlišná. Pacientky nízkého rizika vykazovaly zcela minimální pokles exprese a hodnota se dále příliš neměnila a byla srovnatelná se zdravými kontrolami. Pacientky vysokého rizika snižovaly progresivně hodnoty exprese v každém bodě odběru (po operaci a po první protinádorové léčbě), ale častěji zůstávaly hodnoty exprese zvýšené v porovnání se zdravými kontrolami a pacientkami nízkého rizika. Tento nálezný dokumentuje možnost definovat určitou hodnotu exprese miR, která odlišuje zdravé a nemocné a dále rozděluje pacientky podle rizikové skupiny. Při analýze jednotlivých pacientek bylo zjevné, že jejich určení do rizikové skupiny podle klinicko-patologických markerů neodpovídalo rizikové skupině podle molekulárních charakteristik. To je pozitivní nálezný, protože molekulární metody mají upřesňovat a individualizovat rozdělení do rizikových skupin podle současných klinicko-patologických markerů. Pokud by molekulární metody pouze potvrzovaly rozdělení podle současných kritérií byl by jejich výzkum zbytečný a jejich použití, i s ohledem na cenu, velice sporné.

Poslední fáze projektu byla zaměřena na zjištění prognostického významu hodnocení exprese onkogenních miR. Tato fáze projektu byla časově náročná, protože pacientky recidivují nejčastěji mezi 2.-5. rokem od primární diagnózy a léčby. Medián sledování našeho souboru byl 73 měsíců což představuje dostatečnou dobu. V tomto období jsme zachytili celkem 13 recidiv, mohli jsme tak výsledky exprese porovnat v rámci multivariantní longitudinální analýzy s vývojem nemoci. Prognosticky významné v určení rizika budoucího relapsu byly miR-155 a miR-24, miR-181b a miR-19a svůj prognostický význam neprokázaly. Onkogenní miR-155 a miR-24 vykazovaly svůj prognostický potenciál ve všech bodech odběru a specificky i v bodě II (po operaci), ve kterém nastává určení rizikové skupiny a stanovení intenzity protinádorové léčby. Pro obě onkogenní miR s prognostickým významem jsme nepotvrdili vliv chemoterapie, radioterapie nebo hormonoterapie na hodnoty exprese, jedná se tak o nezávislé biomarkery. Zároveň jsme v rámci multivariantní analýzy porovnali vliv klinicko-patologických markerů (TNBC, HER2, grade III, Ki-67>20%, pozitivní LU) na prognostický potenciál miR. Pouze Ki-67>20% zpřesňovalo predikci rizika relapsu určeného pomocí miR-155 a miR-24. To potvrzuje význam sledování proliferačního indexu Ki-67 zmíněné v obecném úvodu. Nepřítomnost prognostického významu miR-181b a miR-19a byla překvapením, protože obě působí na důležité děje kancerogeneze u karcinomu prsu.

Porovnání našeho projektu s literaturou je komplikované, protože diagnostickému, prognostickému a prediktivnímu potenciálu miR se věnuje celá řada publikací. Problémem je to, že jednotlivé projekty se liší podle zaměření a cílů, sledovaných kohort, vychozího materiálu (tkáň, krev), analytických a statistických metod a hlavně počtem a spektrem hodnocených miR. V projektech byly hodnoceny samostatné miR, nebo jejich klastry se zcela minimálním překryvem studovaných miR. Častěji byla hodnocena exprese v tumorech, což nesplňuje dostatečně podmínku použitelného cirkulujícího biomarkery, který byl záměrem



našeho projektu. Velká část projektů hodnotila miR jednorázově, bez dynamiky vývoje po léčbě, případně nebyla provedena korelace s léčbou a dalšími rizikovými faktory. Zjištěné literární údaje, jejich systematické přehledy a metaanalýzy potvrzují diagnostický potenciál miR v odlišení zdravých a nemocných. Dále projekty zaměřené na prognostický význam potvrzují jejich užitečnost ve stanovení rizika relapsu. A v neposlední řadě může sledování hodnot exprese miR po onkologické léčbě s předstihem upozornit na hrozící recidivu onemocnění (Huo D. et al., 2016, Madhavan D. et al., 2016, Bertoli G. et al., 2015, Guo J. et al., 2016)

Je nutné zmínit některé limitace našeho projektu. První spočívá ve velikosti souboru, náš soubor činil 133 pacientek a 13 recidiv. I přes statisticky možné zhodnocení je velikost nedostatečná pro reálnou klinickou aplikaci. Pokud by měly naše výsledky sloužit pro každodenní klinickou praxi, musí být validovány na souborech s počty v jednotkách tisíců. Naším záměrem a aktuální snahou je provést validaci na archivních materiálech ze sérových bank některých onkologických center v ČR. Druhou limitací je pouze omezený počet definovaných bodů odběru, který byl dán primárním záměrem projektu. Do budoucna bychom rádi sledovali sérové exprese onkogenních miR u odléčených pacientek pravidelně s cílem definovat včasné hrozící recidivu onemocnění. Zde neukázaná data svědčí pro významnou elevaci onkogenních miR u pacientek s potvrzenými recidivami. Pravidelná monitorace exprese tak může s předstihem, oproti zobrazovacím metodám, určit relaps onemocnění, který může být v časných fázích potenciálně vyléčitelný.

Námi předkládaný projekt představuje část z bohaté mozaiky aplikovaného výzkumu v oblasti karcinomu prsu. Skládání těchto jednotlivých projektů může určovat další směry, které mohou vést ke zlepšení celkové prognózy nejčastějšího onemocnění žen.

## 6. Shrnutí závěrů dizertační práce

1. Naše data prokázala signifikantně vyšší expresi miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b v sérech pacientek s časným karcinomem prsu v době diagnózy v porovnání se zdravými kontrolami.
2. Expese onkomiR je významně vyšší v nádorové tkáni karcinomu prsu v porovnání s okolní nenádorovou tkání. Zvýšená expese koreluje s významně vyšší expresí v sérech pacientek (data nezobrazena, jsou součástí plné verze dizertační práce).
3. Expese onkomiR klesá odlišně v různých fázích léčby. Onkogenní miR miR-155, miR-24 a miR-181b klesaly k normě po operačním zákroku. Onkogenní miR-19a jevila tendenci k normalizaci až po skončení protinádorové léčby.
4. Pacientky ve skupině vysokého rizika na základě klinicko-patologických markerů vykazovaly významně vyšší expresi onkogenních mikroRNA v porovnání s kontrolami a pacientkami nízkého rizika. Pacientky vysokého rizika vykazovaly opožděný a méně hluboký pokles jednotlivých mikroRNA po protinádorové léčbě. U pacientek nízkého rizika docházelo po onkologické léčbě k normalizaci exprese mikroRNA. U některých pacientek vysokého rizika i přes pokles v onkomiR nedošlo k jejich normalizaci po onkologické léčbě.
5. Hodnoty miR-155 a miR-24 měřené v sérech pacientek s časným karcinomem prsu po odstranění nádoru a svodných lymfatik zlepšují predikci pravděpodobnosti relapsu nemoci nezávisle na ostatních parametrech. Hodnoty miR-155 a miR-24 mohou představovat nezávislý cirkulující biomarker.
6. Jediný klinicko-patologický marker, který dále zpřesňuje hodnocení rizika spolu s miR-155 a miR-24 je exprese proliferčního markeru Ki-67 > 20%. V multivariální analýze jsme neprokázali vliv chemoterapie, radioterapie, hormonoterapie na změny exprese miR-24, miR-155 a relapsy onemocnění.

## 7. Použitá literatura

- Abba ML**, Paul N, Leupold JH, et al. MicroRNA regulation of epithelial to mesenchymal transition. *J Clin Med* 2016;5:8
- Amorim M**, Salta S, Henrique R, Jerónimo C. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. *J Transl Med* 2016;14:265-279
- Antonov AV**, Knight RA, Melino G, Barlev NA, Tsvetkov PO. MIRUMIR: an online tool to test microRNAs as biomarkers to predict survival in cancer using multiple clinical data sets. *Cell death and differentiation* 2013;202:367
- Armand-Labit V**, Pradines A. Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *BioMol Concepts* 2017;8(2):61-81
- Bertoli G**, Cava C, Castiglioni I. microRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5:1122–43
- Bisso A**, Faleschini M, Zampa F, Capaci V, De Santa J, Santarpia L, Piazza S, Cappelletti V, **Daidone M**, Agami R. Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer. *Cell Cycle* 2013; 12(11):1679–1687
- Cai WY**, Wei TZ, Luo QC, Wu QW, Liu QF, Yang M, Ye GD, Wu JF, Chen YY, Sun GB. The Wnt-beta-catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 13):2877–2889
- Cascione L**, Gasparini P, Lovat F, et al. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple-negative breast cancer. *PLoS One* 2013;8(2):e55910
- Cava C**, Bertoli G, Ripamonti M et al. Integration of mRNA expression profile, copy number alterations, and microRNA expression levels in breast cancer to improve grade definition. *PLoS One* 2014;9:c97681
- Cricitello C**, Disalvatore D, De Laurentiis M et al. High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in Luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 2014; 23[1], 69-75
- Czech B**, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 2011;12:19-31
- Denkert C**, von MG. Reply to Ki67 in breast cancer: a useful prognostic marker! *Ann Oncol* 2014; 25: 542-3
- de Rinaldis E**, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, et al. Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics*. 2013;14:64
- DeSantis C**, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2014;64:52-62
- Di Leva G**, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014;9:287-314
- Duffy MJ**, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* 2010;411:1869-1874
- Eichelsner C**, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem* 2013; 59(10):1489–1496

**Fan X**, Chen W, Fu Z, Zeng L, et al. MicroRNAs, a subpopulation of regulators, are involved in breast cancer progression through regulating breast cancer stem cells. *Oncol Lett* 2017;14(6):5069-5076

**Frixa T**, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers (Basel)* 2015;7(4):2466-2485

**Guo J**, Jiang W, Xu X, Zheng X. Serum microRNA-155 in early diagnosis and prognosis of breast cancer. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(6):10289-10296

**Gyorffy B**, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Research* 2015;17:11

**Ha M**, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cel Biol* 2014;15:509-524

**Heneghan HM**, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 25: 499-505

**Huo D**, Clayton WM, Yoshimatsu TF, Chen J, Olopade OI. Identification of an circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. *Oncotarget* 2016;7:55231-55248

**Kato M**. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases. *Front Cell Dev Biol* 2014 Oct 16;2:61

**Khan J**, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:608-621

**Madhavan D**, Peng C, Wallwiener M, Zucknick M, et al. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis* 2016;37(5):461-470

**Mansueto G**, Forzati F, Ferraro A, Pallante P, Bianco M, et al. Identification of a new pathway for tumor progression: MicroRNA-181b up-regulation and CBX 7 down-regulation by HMGA I protein. *Genes and Cancer* 2010; 1(3): 210-224

**Mattiske S**, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF The Oncogenic Role of miR-155 in Breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(8):1236-1243

**Pileczki V**, Cojocneanu-Petric R, Maralani M, Neagoe B, Sandulescu R. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med* 2016;89(1):50-55

**Polyak K**. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* 2011; 121: 3786-3788

**Prat A**, Cheang MC, Martin M et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 203-9

**Rutnam ZJ**, Yang BB. The involvement of microRNAs in malignant transformation. *Histol Histopathol* 2012;27:1263-1270

**Sestak I**, Dowsett M, Zabaglo L et al. Factors Predicting Late Recurrence for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *JNCInstitute* 2013; 105: 1504- 11

**Shen J**, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* 2013;329:125-136

**Schwartz AM**, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic Grade Remains a Prognostic Factor for Breast Cancer Regardless of the Number of Positive Lymph Nodes and Tumor Size. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1048-1052

**Siegel RL**, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30

**Sturgeon C**, Duffy MJ, Stenman UK, Lilja H, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast and ovarian cancers. Clin Chem 2008;54:e11-79

**Wang L**, Wang YX, Chen LP, Ji ML. Upregulation of microRNA-181b inhibits CCL18-induced breast cancer cell metastasis and invasion via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Oncol Lett 2016;12:4411-4418

**Zhao H**, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. PLoS One 2010; 5(10):e13735

#### **Publikace autora vztahující se k tématu dizertace**

1. Oncogenic MicroRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 Enable Monitoring of Early Breast Cancer in Serum

Sochor M., Basova P., Pesta M., Dusilkova N., Bartos J., Burda P., Pospisil V, and Stopka T. BMC Cancer 2014;14(1):448 (IF 3.33)

2. Prediction potential of serum miR-155 and miR-24 for relapsing early breast cancer

Bašová P., Pešta M., Sochor M., Stopka T.

International Journal of Molecular Sciences 2017;18:2116;doi:10.3390/ijms18102116 (IF 3,226)

#### **Publikace autora bez vztahu k tématu dizertace**

##### **S IF**

1. Pseudomembranous clostridium after autologous bone marrow transplantation

Kavan, P., Sochor, M., Nyč, O., Lochmann, O., Koutecký, J., McClain, KL., Skala, JP.

Bone Marrow Transplantation 1998;21(5):521-523 (IF 3.541)

##### **Bez IF**

1. Pozdní následky po transplantaci hematopoetických kmenových buněk u dětí se zhoubnými nádorovými onemocněními

Kavan, P., Koutecký, J., Pecková, M., Staňková, J., Sochor, M., Gajdoš, P., Skala, JP.

Klinická onkologie, 3 (9), 91-97, 1996

2. Mykotické komplikace u dětí po transplantaci kostní dřeně (Zkušenosti Kliniky dětské onkologie z let 1992-1995)

Pecková, M., Kavan, P., Nyč, O., Lochmann, O., Koutecký, J., Sochor, M., Staňková, J., Šmelhaus, V., Skala, JP.

Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2 (8), 193-198, 1996

3. Bakteriální infekce u neutropenických dětských pacientů po transplantaci kostní dřeně  
Kavan, P., Pecková, M., Nyč, O., Sochor, M., Koutecký, J., Staňková, J., Lochmann, O.  
Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2 (8), 199-205, 1996
4. Zkušenosti s léčbou maligního lymfogranulomu u dětí protokoly VAMP/VEPA  
Kavan, P., Kabíčková, E., Sochor, M., Koutecký, J., Šmelhaus, V., Gajdoš, P., Kodet, R.  
Klinická onkologie, 6 (9), 191-194, 1996
5. Ex-vivo čištění hematopoetických kmenových buněk deferoxaminem  
Kavan, P., Staňková, J., Koutecký, J., Hrubá, A., Kobylka, P., Sochor, M., Fales, I., Vodvářková, Š., Eckschlager, T., Mališ, J., Boček, P., Gajdoš, P., Skala, JP.  
Transfúze dnes, 1, 3-6, 1997
6. Klostridiová pseudomembranózní kolitida po autologní transplantaci kostní dřeně u třináctiletého chlapce s Hodgkinovou chorobou  
Sochor, M., Kavan, P., Nyč, O., Lochmann, O., Koutecký, J.  
Remedia - Klinická mikrobiologie, 1 (1), 16-18, 1997
7. Zkušenosti s transplantací kostní dřeně u dětí s neuroblastomem ex-vivo čištěné deferoxaminem  
Kavan, P., Koutecký, J., Sochor, M., Staňková, J., Gajdoš, P., Kobylka, P., Hrubá, A., Holdová, J., Eckschlager, T., Mališ, J., Šmelhaus, V., Kaiserová, E., Mojžešová, A., Skala, JP.  
Hematológia a transfúziológia, 1 (7), 39-46, 1997
8. Kongenitální myotonická dystrofie - kazuistika a přehledný článek  
Sochor, M., Liška, K.  
Neonatologické listy, 4 (3), 308-316, 1997
9. Vertikální přenos HIV infekce - rizikové faktory, diagnostika, možnosti prevence a léčby, přehled literatury  
Sochor, M., Staňková, M., Liška, K.  
Neonatologické listy, 2 (4), 83-88, 1998
10. HIV/AIDS v porodnictví a neonatologii  
Sochor, M., Liška, K., Staňková, M.  
Lékařské listy, 50, 1998
11. Metastazující karcinom prsu  
Sochor, M., Bartoš, J., Beran, J. a kol.  
Referátový výběr z onkologie, 1, 2007
12. Primární germinální tumor mediastina u dospělého pacienta  
Sochor, M., Lazarov, P. P., Bartoš, J. a kol.  
Referátový výběr z onkologie, 1, 2007

13. Pětileté přežití pacienta s karcinomem pankreatu  
Sochor, M., Barsová, L., Bartoš, J.  
Referátový výběr z onkologie, 3+4, 80-82, 2008
14. Paliativní chemoterapie a nové trendy systémové léčby u nádorů močového měchýře  
Bartoš J., Richter I., Sochor M.  
Ces Urol, 13 (1): 58-59, 2009
15. Prevence a včasné rozpoznání rizik: jak poznat pacienta, kterého je vhodné poslat do centra chirurgické či onkologické péče  
Bartoš J., Sochor M.  
Farmakoterapie, Kolorektální karcinom 2009
16. Antiangiogenní léčba metastatického karcinomu prsu – kazuistiky a přehled současných znalostí působení antiVEGF terapie u karcinomu prsu a možností její predikce  
Sochor M., Stankuš I.  
Breast Cancer News, 2012; 2 (1): 27-31
17. Septické komplikace intravenozních portových systémů – kazuistiky a přehled literatury  
Sochor M., Pelikánová Z., Šercl M., Mellanová V., Lazarov P. P., Fáčková D.  
Klinická onkologie, 2012;25(5):375-381
18. Antiangiogenní bioterapie a chemoterapie v terapii karcinomu prsu: kazuistika a přehled literatury a kazuistika  
Sochor M., Chlebus P.  
Klinická onkologie, 2013;26(2):91-98
19. Léčba infekcí u pacientů v paliativní symptomatické a terminální fázi onkologického onemocnění  
Sochor M.  
Klinická onkologie, 2013;26(5):323-330
20. Paliativní péče jako součást komplexní onkologické péče  
Sláma O., Sochor M.  
Postgraduální medicína, 2014;16(3):335-337
21. Management chronické a akutní bolesti u pacientů s nádorovými chorobami  
Sochor M., Sláma O.  
Klinická onkologie, 2015;28(2):94-98
22. Časná integrace paliativní péče do standardní onkologické péče – benefit, limitace, bariéry a druhy paliativní péče  
Sochor M., Sláma O., Loučka M.  
Klinická onkologie, 2015;28(3):171-176

23. Transmukózní fentanyl v léčbě průlomové bolesti u pacientů s nádorovými chorobami  
Sochor M.  
Remedia 2016;26(2):1-6
24. Léčba metastazujícího HER2 pozitivního karcinomu prsu  
Sochor M.  
Breast Cancer News 2016; 6 (2):8-10
25. Management vybraných symptomů v onkologické paliativní péči - Syndrom nádorové anorexie a kachexie  
Sochor M.  
Remedia 2017;27(4):333-338
26. Management symptomů v onkologické paliativní péči – Nevolnost a zvracení  
Sochor M.  
Remedia 2017;27(5):483-488
27. Management vybraných symptomů v onkologické paliativní péči – Zápcha a průjem  
Sochor M.  
Remedia 2017;27(6):569-575
28. Paliativní péče aplikovaná společně s onkologickou léčbou u pacientů s pokročilými nádory  
Sochor M., Bartoš J  
Onkologická revue 2017;6(2):44-48
29. Časná integrace paliativní péče v onkologii  
Sochor M.  
Časopis lékařů českých, 2018;157(1):13-18
30. Prevence a léčba nevolnosti a zvracení vyvolaných chemoterapií  
Sochor M.  
Remedia 2018;28(1):83-89