

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Studium biomarkerů karcinomu prsu po neoadjuvantní léčbě

Breast cancer biomarkers after neoadjuvant therapy

MUDr. Helena Skálová

Praha, 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, PhD.

Školící pracoviště: Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Studničkova 2, Praha 2, 128 00

Školitel: Ing. Daniel Tvrdlík, Ph.D. (2010–2012), Prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc. (2012–2019)

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	6
1.1. Standardní markery karcinomu prsu (ER, PR, HER2, Ki67)	7
1.2. Claudiny a cadheriny	7
1.3. Role apoptózy v karcinogenezi a protinádorové léčbě	7
2. Hypotéza a cíle práce	8
3. Materiál a metody	9
3.1. Tkáňové vzorky	9
3.2. Histologické vyšetření	9
3.3. IHC vyšetření	9
3.4. Cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření HER2	9
3.5. Detekce apoptoticky zanikajících buněk	10
3.6. Molekulárně biologická analýza genů asociovaných s apoptózou	10
3.7. Statistická analýza	10
4. Výsledky	11
4.1. Vyšetření standardních markerů karcinomu prsu	11
4.1.1. Vyšetření HER2 pomocí IHC, FISH, qRT-PCR	11
4.1.2. IHC vyšetření hormonálních receptorů a proliferační aktivity	11
4.2. IHC analýza claudinů 1, 3 a 4 a E- a N-cadherinu	11
4.3. Geny apoptózy	12
4.3.1. Detekce apoptoticky zanikajících buněk	12
4.3.2. Profilování genové exprese	12
5. Diskuze	13
6. Závěr	17
7. Literatura	19
Seznam publikací autora	21

Abstrakt

Chemoterapie je jednou základních léčebných modalit karcinomu prsu, která chirurgickému odstranění nádoru může předcházet a/nebo jej následovat jako součást neoadjuvantní resp. adjuvantní léčby. Selektivní tlak chemoterapie na nádorové buňky však může vést ke změně jejich molekulárního a expresního profilu a následně i chemosenzitivity a zásadně tak ovlivnit další průběh léčby. Cílem této práce bylo zmapovat změny v expresi vybraných markerů v karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii, které by mohly přispět k porozumění, jakou roli tyto proteiny a geny sehrávají při odpovědi nádoru na léčbu a vzniku chemorezistence.

Imunohistochemická analýza exprese standardních markerů karcinomu prsu (estrogenových [ER] a progesteronových receptorů [PR], HER2 a proliferační aktivity [Ki67]) a proteinů mezibuněčných spojů (claudinů 1, 3 a 4, E- a N-cadherinu) před a po neoadjuvantní chemoterapii odhalila pokles exprese PR, Ki67 a claudinu 3 a zvýšení exprese claudinu 1. Exprese ER, HER2, claudinu 4, E- a N-cadherinu se významněji nezměnila. Stanovení exprese standardních markerů je součástí rutinního biotického vyšetření vzorků karcinomu prsu a je nezbytné pro indikaci léčby. Naše výsledky podporují současné doporučení pro opakování vyšetření před indikací adjuvantní chemoterapie. Claudiny a cadheriny se podílejí na regulaci epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), která ovlivňuje chemosenzitivitu nádoru. Změna v expresi claudinů 1 a 3 po léčbě by mohla svědčit pro jejich zapojení v odpovědi nádorové tkáně na chemoterapii. Exprese standardních markerů navíc korelovala s expresí claudinu 1 a N-cadherinu.

V další části práce jsme metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) stanovili transkripční profil 84 genů asociovaných s apoptózou, jejíž funkční mechanismus je pro chemosenzitivitu nádorových buněk zásadní. Panel 13 genů, jejichž exprese se po léčbě změnila (*MCL1*, *IGF1R*, *BCL2L10*, *BCL2A1*, *HRK*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70* a *CIDEB*), by mohl najít uplatnění jako součást multigenové eseje pro zpřesnění stratifikace pacientek dle očekávané prognózy.

Výsledky dizertační práce upozorňují na možné změny v expresním profilu karcinomu prsu po chemoterapii, které mohou ovlivnit průběh další léčby, a rozšiřují znalosti o konkrétních proteinech a genech, jejichž exprese může souviset s odpovědí nádoru na léčbu.

Klíčová slova: HER2, claudiny, cadheriny, apoptóza, karcinom prsu, chemoterapie

Abstract

Chemotherapy is one of the basic therapeutic procedures of breast cancer (BC) which may precede and/or follow the surgical resection of a tumor as a part of neoadjuvant or adjuvant therapy. However, the selective pressure of chemotherapy on tumor cells may change their molecular and expression profile and thus also their chemosensitivity. The aim of our work was to document the expression changes of selected markers in BC after neoadjuvant chemotherapy, which may contribute to the understanding of the role of these proteins and genes in tumor response to chemotherapy and the development of chemoresistance.

Immunohistochemical analysis of expression of standard BC markers (estrogen [ER] and progesterone receptors [PR], HER2 and proliferation activity [Ki67]) and intercellular junction proteins (claudin 1, 3 and 4, E- and N-cadherin) before and after neoadjuvant chemotherapy revealed a decrease of PR, Ki67 and claudin 3 expression and an increase of claudin 1 expression. The expression of ER, HER2, claudin 4, E- and N-cadherin proved to be stable. Assessment of standard BC markers is performed routinely during a bioptic investigation as a necessary factor for therapy indication. Our results support the current recommendations for the re-examination before indication of adjuvant chemotherapy. Claudins and cadherins participate in the regulation of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which affects tumor chemosensitivity. The changes of claudin 1 and 3 expression indicate their involvement in the response of BC to chemotherapy. Moreover, the expression of standard BC markers correlated with the expression of claudin 1 and N-cadherin.

Further, using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), we evaluated the transcriptional profile of 84 genes associated with apoptosis, which serves a key role in tumor chemosensitivity. We proposed a panel of 13 genes with different expression before and after therapy (*MCL1*, *IGF1R*, *BCL2L10*, *BCL2A1*, *HRK*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70* and *CIDEB*), which can be employed in multigene assays to provide a more precise estimation of the patient's prognosis.

Our work presents changes of the expression profile of BC after chemotherapy that might affect further course of treatment. Our results expand knowledge about proteins and genes involved in tumor response to therapy.

Key words: HER2, claudins, cadherins, apoptosis, breast cancer, chemotherapy

1. ÚVOD

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen a druhým nejčastějším vůbec, s vysokou incidencí zejména v rozvinutých zemích. Základem léčby je chirurgická resekce nádoru, v indikovaných případech doplněná o lymfadenektomii. Stále významnější roli však hraje předcházející, tzv. neoadjuvantní, či následná, tzv. adjuvantní chemoterapie, obvykle v kombinaci s radioterapií, hormonální terapií a ve vybraných případech tzv. cílenou biologickou léčbou. Neoadjuvantní chemoterapie cílí na redukci objemu primárního nádoru a případně uzlinových metastáz a umožnění tzv. prs šetřícího chirurgického výkonu. Adjuvantní chemoterapie cílí na reziduální ložiska nádoru, cirkulující nádorové buňky nebo incipientní metastázy, které se nacházejí mimo resekovanou oblast (Buchholz T. A. et al., 2003). U pacientek s agresivním typem nádoru výrazně snižují mortalitu, nicméně pacientky s nízkým rizikem relapsu z neo/adjuvantní chemoterapie neprofitují a při jejím podání by byly zbytečně vystaveny jejím vedlejším účinkům (Clarke M. et al., 2005).

Rozhodnutí o podání chemoterapie tedy závisí na odhadu rizika relapsu onemocnění (nízké, střední, vysoké). Odhad je založen na kombinaci klinických a patologických faktorů, které zahrnují věk pacientky, velikost primárního nádoru, počet postižených lymfatických uzlin, přítomnost vaskulární invaze, histologický typ nádoru, stupeň diferenciacce (grade) a imunohistochemické (IHC) znaky zahrnující proliferační aktivitu (Ki67), expresi estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PR) a HER2 (Goldhirsch A. et al., 2005).

Rutině používaný model má však své limity zejména u pacientek se středním stupněm rizika relapsu onemocnění, kdy není zřejmé, pro které z nich bude neo/adjuvantní chemoterapie přínosem a pro které zbytečnou zátěží. Navíc není dostatečný pro predikci odpovědi na konkrétní režim chemoterapie, která může být značně odlišná i u nádorů shodné morfologie a stadia (Pusztai L., 2009; Bauer K. et al., 2010). Tyto rozpory odráží značně heterogenní genetickou podstatu karcinomu prsu a nutnost rozšíření prognostických a prediktivních modelů pro individualizaci léčby (Pusztai L., 2009). Za tímto účelem byla vyvinuta řada multigenových esejí, které stanovují stupeň rizika relapsu onemocnění analýzou exprese stanoveného souboru genů asociovaných s nádorem.

Na základě jedné z multigenových esejí byla vyvinuta tzv. molekulární klasifikace karcinomu prsu, dosud však není ustálená a její klinický přínos je sporný (Perou C. M. et al., 2000; Ellis I. O. et al., 2016). Zejména v souvislosti s molekulární klasifikací karcinomu prsu vzrostl počet studií zabývajících se rodinou proteinů mezibuněčných těsných spojů, claudinů a jejich možného prognostického a prediktivního významu. Vzhledem k tomu, že jsou zřejmě zapojeny do regulace nádorových kmenových buněk a spolu s molekulami adhezních spojů, cadheriny, se podílejí na procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), jejich exprese může mít význam pro vznik chemorezistence nádoru (Kwon M. J., 2013). Některé z claudinů také představují slibný cíl protinádorové léčby, která by v budoucnu mohla podpořit efekt chemoterapie zejména u chemorezistentních nádorů (Walther W. et al., 2012). Další oblastí s velkým potenciálem pro predikci a ovlivnění odpovědi nádoru na léčbu je komplexní mechanismus apoptózy, jejíž změny jsou zcela klíčové jak při karcinogenezi, tak při odpovědi nádorových buněk na léčbu včetně vzniku chemorezistence (Wong R., 2011; Hassan M. et al., 2014).

Změny nádorové tkáně vyvolané léčbou se odehrávají jak na úrovni morfologické, tak molekulární. Selekcí tlak chemoterapie vede ke změně profilu exprese přežívajících nádorových buněk, které se tak mohou stát na aktuální léčbu rezistentní (Ryška A., 2015). Změna expresního profilu nádoru může být významná zejména u pacientek, které v průběhu léčby podstoupí jak neoadjuvantní, tak adjuvantní chemoterapii, a na těchto nádorech lze zároveň tyto změny zachytit porovnáním stavu před a po chemoterapii. Jejich mapování může

příspět k porozumění, jakou roli tyto geny a jejich produkty sehrávají při odpovědi nádorových buněk na léčbu.

V naší práci jsme se zaměřili na změny exprese vybraných proteinů/genů v nejčastějších histologických typech karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii. Zahrnuli jsme do ní jak standardně vyšetřované markery karcinomu prsu (ER, PR, HER2 a Ki67), z nichž všechny nesou významnou prognostickou i prediktivní výpovědní hodnotu, tak proteiny/geny, které by se mohly uplatnit v budoucnu jako součást prognosticko-prediktivních multigenových panelů či jako cíle biologické léčby v rámci komplexního individualizovaného přístupu (claudiny, cadheriny, geny asociované s apoptózou).

1.1. Standardní markery karcinomu prsu (ER, PR, HER2, Ki67)

Vyšetření exprese hormonálních receptorů je nezbytné pro indikaci hormonální terapie, na kterou jsou citlivé pouze karcinomy hormonálně dependentní, přičemž citlivost nádoru k terapii koreluje s intenzitou exprese obou receptorů. Obdobně, pouze pacientky s nádorem overexprimujícím HER2 budou profitovat z biologické léčby cílenou anti-HER2 protilátkou (Lakhani S. R. et al., 2012). Samostatně i v kombinaci umožňují tyto 4 markery odhad biologického chování nádoru, mají prognostický význam a spolu s dalšími výše uvedenými klinicko-patologickými faktory jsou nezbytné pro odhad rizika relapsu onemocnění a tedy indikaci chemoterapie (Eifel I. O. et al., 2001; Goldhirsch A. et al., 2005).

1.2. Claudiny a cadheriny

Claudiny a cadheriny patří mezi hlavní transmembránové molekuly mezibuněčných propojení, tzv. těsných a adhezních spojů nezbytných pro udržení homeostázy, pevnost i správnou funkci tkáně. Napojení claudinů na cytoskelet a schopnost přenosu signálu do buňky naznačují, že navíc pravděpodobně hrají zásadní roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze (Turksen K. et Troy T. C., 2011; Singh A. B. et Dhawan P., 2015).

Cadheriny, jakožto hlavní proteiny mezibuněčných adhezních spojů, hrají při karcinogenezi a progresi nádorového onemocnění klíčovou roli během EMT, při níž epiteliální nádorové buňky nabývají vlastností mezenchymálních buněk narušením mezibuněčných spojů, ztrátou polaritity a reorganizací cytoskeletu (Osanai M. et al., 2017). Tyto změny usnadňují a urychlují růst nádoru, invazi nádorových buněk do okolních tkání, invazi do cév a metastazování a jsou také považovány za faktor přispívající k chemorezistenci. Recentní studie naznačují zapojení claudinů v EMT spolu s cadheriny (Singh A. et Settleman J., 2010; Osanai M. et al., 2017).

1.3. Role apoptózy v karcinogenezi a protinádorové léčbě

Chyby v mechanismu apoptózy nádorovým buňkám prodlužují životnost, a tím umožňují nahromadění dalších genetických alterací, které deregulují proliferaci a diferenciaci, zvyšují invazivitu, schopnost metastazovat a odolat účinkům cytotoxické léčby. Kromě toho je defektní apoptóza podstatou resistance nádorových buněk na imunitní mechanismy cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk (Hassan M. et al., 2014). Změny, které umožňují nádorovým buňkám uniknout apoptóze, lze shrnout do tří hlavních oblastí: 1) vychýlení rovnováhy mezi pro- a protiapoptotickými faktory, 2) snížená aktivita kaspáz a 3) snížená signalizace přes receptory smrti (Wong R., 2011).

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Práce se zabývá studiem biomarkerů karcinomu prsu, a to jak standardních, používaných v rutinní praxi již desítky let (ER, PR, HER2, Ki67), tak experimentálních, které by se mohly uplatnit v budoucnu jako součást prognosticko-prediktivních multigenových panelů či jako cíle biologické léčby v rámci komplexního individualizovaného přístupu. Jednu skupinu zkoumaných markerů tvoří proteiny mezibuněčných těsných a adhezních spojů, claudiny a cadheriny, které se podílejí na regulaci EMT a mohly by tedy ovlivňovat chemosenzitivitu nádoru. Druhou skupinou jsou geny asociované s apoptózou, jejíž funkční mechanismus je pro chemosenzitivitu nádorových buněk zásadní.

Hypotéza: V nádorových buňkách dochází vlivem chemoterapie ke změnám expresního profilu. U konkrétního typu nádoru, v našem případě karcinomu prsu, se vyskytují častěji změny v expresi některých konkrétních proteinů/genů, které souvisejí nebo by mohly souviset s citlivostí nádoru na léčbu a jejichž změněná exprese by tedy mohla mít dopad na další průběh léčby.

Hlavním cílem práce je mapování změn exprese výše uvedených proteinů a genů po neoadjuvantní chemoterapii na základě porovnání jejich exprese v nádoru před a po aplikaci léčby a zhodnocení jejich významu v kontextu současných znalostí a v případě standardních markerů v kontextu současných doporučení pro standardizované bioptické vyšetření. U cludinů a cadherinů sledování změn po chemoterapii a jejich korelace se standardními markery může přispět k porozumění jejich role v odpovědi nádoru na chemoterapii, ale i v samotné karcinogenezi karcinomu prsu. Poslední část práce je věnována identifikaci genů asociovaných s apoptózou s potenciálním prognostickým významem.

Konkrétně lze cíle práce shrnout do těchto bodů:

- a) Analýza změn exprese ER, PR a Ki67 za použití IHC a HER2 za použití IHC, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) po neoadjuvantní chemoterapii.
- b) IHC analýza exprese cludinů 1, 3 a 4 a E- a N-cadherinu před a po neoadjuvantní chemoterapii.
- c) Vzájemná korelace exprese sledovaných cludinů, cadherinů a standardních markerů před a po chemoterapii na podkladě IHC analýzy.
- d) Molekulární analýza expresního profilu 84 genů asociovaných s apoptózou před a po neoadjuvantní chemoterapii za účelem identifikace genů zapojených do reakce nádorových buněk na chemoterapii. Návrh panelu markerů pro stratifikaci pacientek z hlediska prognózy.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Tkáňové vzorky

Archivované tkáňové vzorky karcinomů prsu pocházely od 82 pacientek, které podstoupily neoadjuvantní chemoterapii. Od každé pacientky byly vybrány dva vzorky – jeden z diagnostické punkční biopsie, odebraný před neoadjuvantní léčbou, a druhý z definitivního chirurgického resektátu, obsahující reziduální nádor po neoadjuvantní léčbě. Následně popsaná vyšetření byla vždy provedena na obou spárovaných vzorcích.

Jednotlivé části práce zahrnovaly následující počet pacientek:

- a) HER2 – 20 pacientek (40 vzorků)
- b) Geny asociované s apoptózou – 16 pacientek (32 vzorků)
- c) Claudiny, cadheriny, standardní markery (ER, PR, HER2, Ki67) – 62 (124 vzorků)

3.2. Histologické vyšetření

Všechny vzorky byly nejprve fixovány v 10% neutrálním pufovaném formalínu při pokojové teplotě 6-24 h a poté zality do parafínu. Histologické vyšetření bylo provedeno patologem na preparátech o tloušťce 3 μm , standardně barvených hematoxylinem eosinem (HE). Histologický typ nádoru, stupeň diferenciaci (grade) a rozsah histologicky hodnocených změn po terapii byly stanoveny dle standardizovaných postupů pro biotické vyšetření karcinomu prsu.

3.3. IHC vyšetření

Část vyšetření byla provedena na tkáňových mikročipech (TMA) zhotovených z původních parafinových bločků, ostatní vzorky byly zpracovány standardně. IHC vyšetření na 3 μm řezech z parafinových bločků zahrnovalo teplem indukované odhalení antigenů v 0,01M citrátovém pufru a blokování endogenní aktivity peroxidázy 3% roztokem H_2O_2 v metanolu.

Byly použity protilátky proti ER (monoklonální, myší, klon 6F11, 1:50, Leica Microsystems Inc., NCL-L-ER-6F11), PR (monoklonální, myší, klony PGR-312 a 16, 1:50, Leica Microsystems Inc., NCL-PGR-312 a ORG-8721), Ki67 (monoklonální, myší, klon Mib-1, 1:50, Agilent Technologies, M7240), claudinu 1 (polyklonální, králičí, 1:100, Cell Marque Corporation, 359A), claudinu 3 (polyklonální, králičí, 1:800, Abcam, ab15102), claudinu 4 (polyklonální, kozí, 1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-17664), E-cadherinu (monoklonální, myší, klon 4A2C7, 1:100, Thermo Fisher Scientific Inc., 18-0223) a N-cadherinu (monoklonální, myší, klon 6G11, 1:300, Agilent Technologies Inc., M3613).

Pro hodnocení míry exprese jednotlivých markerů jsme použili různé semikvantitativní skórovací systémy za účelem rozlišení kategorií s předpokládaným dopadem na biologické chování nádoru či jeho odpovědi na chemoterapii.

IHC vyšetření HER2 bylo provedeno s použitím HercepTestu (kompletní kit, originální ředění výrobcem, Agilent Technologies Inc., K5204) nebo monoklonální králičí protilátky anti-HER2 4B5 PATHWAY (originální ředění výrobcem, Ventana Medical Systems, 790-2991) na přístroji Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems). Úroveň exprese HER2 byla stanovena dle standardizovaného postupu.

3.4. Cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření HER2 – FISH, qRT-PCR

FISH byla provedena zejména na vzorcích, které byly IHC hodnoceny jako hraniční, tedy slabě pozitivní (2+), a v první části práce týkající se změn HER2 na spárovaných vzorcích v obou případech s výraznou změnou exprese HER2 po léčbě. K vyšetření byla použita sonda Path Vysion HER2 DNA Probe (Thermo Fisher Scientific Inc., 02J01) nebo ZytoLight

HER2/CEN 17 Dual Color Probe (ZytoVision Z-2077). Na fluorescenčním mikroskopu bylo zhodnoceno u každého vzorku minimálně 20 jader. Výsledek pozitivní pro amplifikaci HER2 byl definován jako poměr HER2 : CEP17 > 2.

V části práce sledující změny HER2 byly výsledky IHC a FISH u případů s výraznou změnou statusu ověřeny qRT-PCR. RNA byla extrahována pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104). Pro reverzní transkripci byl použit RevertAid – H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, K1632). Úroveň exprese mRNA HER2 byla kvantifikována pomocí LightCycler 480 (Roche Diagnostics) za použití LightMix Her2/neu kit (Tib MolBiol). mRNA HER2 byla normalizována vzhledem k produktu housekeepingového genu, ribozomálnímu proteinu L23 (RPL23). Výsledek pozitivní pro amplifikaci HER2 byl definován jako poměr HER2 : RPL23 > 2.

3.5. Detekce apoptoticky zanikajících buněk

Apoptoticky zanikající buňky byly detekovány 2 nezávislými metodami, a to IHC vyšetřením aktivované kaspázy 3 a TUNEL analýzou. IHC vyšetření bylo provedeno s protilátkou proti naštěpené kaspáze 3 (cleaved caspase 3) (polyklonální, králičí, 1:250, Cell Signaling Technology, Asp175). Jako pozitivní byly hodnoceny buňky s cytoplazmatickým zabarvením.

Na stejných vzorcích byla provedena analýza TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) s použitím fluorometrického TUNEL systému (Promega, G3250) dle návodu výrobce. DNA označená fluorescein-12-dUTP byla pozorována fluorescenčním mikroskopem. Pro kvantitativní zhodnocení apoptózy byl pro aktivovanou kaspázu 3 i TUNEL stanoven apoptotický index (AI), který je definován jako procento pozitivních jader k jejich celkovému množství.

3.6. Molekulárně biologická analýza genů asociovaných s apoptózou

Izolace RNA z parafinových řezů proběhla dle standardního postupu pomocí RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74104). Exprese 84 klíčových genů apoptózy byla vyprofilována pomocí RT² Profiler Apoptosis PCR Array (Qiagen, PAHS-012). PCR byla provedena na 96-jamkových destičkách na přístroji LightCycler 480 (Roche Diagnostics).

Získaná data byla analyzována RT² Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 (Qiagen) a relativní změny v expresi genů byly stanoveny metodou 2Delta-DeltaCt. Dvojnásobná změna v genové expresi byla stanovena jako práh pro hodnocení up- a downregulace. Nakonec byla porovnána exprese genů před a po terapii.

3.7. Statistická analýza

Q-PCR data z vyšetření HER2 jsou uvedena jako aritmetický průměr absolutního počtu kopií ± standardní odchylka od průměru. Analýza exprese sledovaných markerů byla provedena pomocí softwaru STATISTICA (verze 9.1 a 10, StatSoft Inc.) a programu RT² Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 (Qiagen). Rozdíly v expresi sledovaných markerů před a po léčbě byly zpracovány párovým t-testem a Wilcoxonovým párovým testem. Korelace exprese jednotlivých markerů byly hodnoceny pomocí χ^2 testu. Všechny testy byly oboustranné. Rozdíly s p-hodnotou (p-value) <0,05 byly vyhodnoceny jako statisticky významné.

4. VÝSLEDKY

4.1. Vyšetření standardních markerů karcinomu prsu

4.1.1. Vyšetření HER2 pomocí IHC, FISH a qRT-PCR

Do první části práce byly zahrnuty vzorky od 20 pacientek. Při IHC vyšetření zůstal po léčbě status HER2 nezměněný ve 12 případech (12/20, 60 %), k menším změnám došlo v 6 případech (6/20, 30 %). Ve 2 případech (2/20, 10 %) byla zaznamenána změna ze silné kompletní membránové pozitivita většiny buněk (3+) na negativní výsledek (1+ a 0).

U obou případů byly výsledky IHC ověřeny na úrovni DNA pomocí FISH a na úrovni RNA pomocí qRT-PCR. Oba výsledky FISH ze vzorků odebraných před chemoterapií byly vyhodnoceny jako pozitivní, oba po terapii jako negativní pro amplifikaci genu HER2. qRT-PCR v obou případech prokázala overexpresi genu HER2 před léčbou a downregulaci po léčbě ($p < 0,05$).

V další části práce, kde byly hodnoceny výsledky vyšetření HER2 u 62 pacientek, byl zaznamenán mírný nárůst exprese po neoadjuvantní chemoterapii, který však nebyl statisticky významný ($p > 0,05$). V tomto souboru nebyl zachycen žádný další případ ztráty exprese HER2 u původně silně pozitivního nádoru, nicméně zaznamenali jsme 4 případy, kdy se status HER2 změnil z negativního na pozitivní.

4.1.2. IHC vyšetření hormonálních receptorů a proliferační aktivity

Statistická analýza exprese před a po neoadjuvantní chemoterapii byla provedena na souboru 62 případů. Po léčbě došlo k významnému poklesu exprese PR ($p < 0,001$) a Ki67 ($p = 0,01$). Status ER ani zastoupení triple-negativních nádorů se zásadněji nezměnily ($p > 0,05$).

4.2. IHC analýza claudinů 1, 3 a 4 a E- a N-cadherinu

Před léčbou jevila většina nádorů vysokou expresi claudinů 3 a 4, nicméně u claudinu 1 převažovala nízká exprese. Přibližně čtvrtina nádorů před i po neoadjuvantní léčbě měla aberantní, tedy sníženou či chybějící, expresi E-cadherinu a u stejného počtu nádorů byla zaznamenána pozitivita N-cadherinu. Po léčbě došlo ke zvýšení exprese claudinu 1 ($p = 0,03$) a snížení exprese claudinu 3 ($p = 0,005$). Exprese claudinu 4, E- ani N-cadherinu se po léčbě výrazněji nezměnila ($p > 0,05$).

Na podkladě IHC analýzy byla dále provedena korelace exprese claudinů 1, 3 a 4, E- a N-cadherinu a standardních markerů karcinomu prsu, výsledky jsou však limitované velikostí souboru.

Negativní korelace mezi expresí claudinu 1 a ER byla zaznamenána u nádorů před léčbou ($p = 0,016$), ale nikoliv po léčbě. Vysoká exprese claudinu 1 negativně korelovala s expresí PR ($p = 0,031$) a HER2 ($p = 0,021$) a pozitivně s Ki67 ($p = 0,026$) u nádorů po léčbě, ale nikoliv před léčbou. Vysoká exprese claudinu 1 dále pozitivně korelovala s triple-negativními nádory před ($p = 0,038$) i po léčbě ($p = 0,015$).

V nádorech po léčbě exprese claudinu 3 pozitivně korelovala s expresí E-cadherinu ($p = 0,005$). Statistickou analýzu vztahu exprese claudinu 3 k ostatním sledovaným markerům před léčbou a exprese claudinu 4 k ostatním sledovaným markerům před i po léčbě nebylo možné provést z důvodu nerovnoměrného rozložení dat ve skupinách nádorů s nízkou a vysokou expresí.

Exprese N-cadherinu negativně korelovala s ER ($p = 0,010$) a PR ($p = 0,035$) v nádorech před léčbou a pozitivně s HER2 ($p = 0,011$) v nádorech po léčbě. Pozitivita N-cadherinu byla častější v hůře diferencovaných nádorech jak před léčbou ($p = 0,035$), tak po léčbě ($p = 0,011$).

4.3. Geny apoptózy

4.3.1. Detekce apoptoticky zanikajících buněk

Dobrá korelace obou metod použitých pro stanovení apoptotických indexů (AI) jednotlivých vzorků ($R=0,95$) svědčí pro jejich srovnatelnou spolehlivost.

Po léčbě byl u 1 pacienta (1/16, 6 %) zaznamenán nápadnější pokles AI, u 2 pacientů (2/16, 12 %) značné zvýšení a v 8 případech (8/16, 50 %) menší změny do 5 %. U 3 pacientů (3/16, 19 %) nemohly být z technických důvodů vzorky vyhodnoceny.

4.3.2. Profilování genové exprese

U všech spárovaných vzorků od 16 pacientek byl stanoven transkripční profil 84 klíčových genů apoptózy pomocí qRT-PCR. Nejprve jsme analyzovali vzorky odebrané před léčbou a porovnali je se skupinou 4 vzorků od pacientek s patologicky ověřenou kompletní remisí (pCR), která byla vybrána jako standard pro nádory s dobrou odpovědí na léčbu. U 13 genů byl prokázán prognostický význam ($p<0,05$). Data byla zpracována pomocí hierarchické shlukové analýzy a na jejím základě byly pacientky rozděleny do dvou skupin podle podobnosti transkripčního profilu s nádory pacientek s patologicky ověřenou kompletní remisí. Tyto dvě skupiny dobře korelovaly s údajem přežití bez progresu (PFS, progression-free survival) a odpovídaly tedy skupině pacientek s dobrou (6/12, 50%) a špatnou prognózou (6/12, 50%).

Následně byla provedena analýza změn exprese jednotlivých genů před a po chemoterapii. Ve skupině pacientek s dobrou prognózou jsme po léčbě zaznamenali downregulaci exprese genů *MCL1* a *IGF1R* a overexpresi genů *BCL2L10*, *BCL2A1*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *CIDEB*, *FADD*, *HRK*, *TNFRSF25*, *TNFSF8* a *CD70*. Ve skupině pacientek se špatnou prognózou byla nalezena pouze upregulace genu *IGF1R*, zatímco exprese ostatních genů se významněji nezměnila.

5. DISKUZE

Karcinom prsu je jedním z mála solidních nádorů, u kterých se IHC vyšetřované prediktivní markery používají v rutinní praxi již desítky let. Standardní IHC panel prediktivních markerů, zahrnující ER, PR, HER2 a Ki67 slouží jak k odhadu chemosenzitivity nádoru, tak k průkazu exprese hormonálních receptorů a overexprese HER2, který je pro indikaci hormonální, resp. cílené biologické anti-HER2 léčby nezbytný (Lakhani S. R. et al., 2012). Několik předcházejících studií porovnávalo expresi standardních IHC biomarkerů karcinomu prsu v diagnostické punkční biopsii a chirurgickém resekátu u pacientek po neoadjuvantní chemoterapii a většina odhalila mezi oběma vzorky podstatné změny. Zatímco ER jsou poměrně stabilní, exprese PR často po léčbě významně klesá, stejně jako v našem souboru vzorků (Yin H. F. et al., 2009; Kinsella M. D. et al., 2012). Vzhledem k tomu, že exprese PR je závislá na funkční signální dráze regulované ER, nádory exprimující ER, ale nikoliv PR, hůře odpovídají na hormonální terapii (Thakkar J. P. et al., 2011). Pokles exprese Ki67, který jsme zaznamenali, je obvyklý jev způsobený antiproliferačním účinkem cytotoxické léčby (Yoshioka T. et al., 2015).

Status HER2 se i přes zaznamenané změny projevil spíše jako stabilní faktor v souladu s dalšími studiemi (Taucher S. et al., 2003; D'Alfonso T. et al., 2010). Jednotlivé případy původně negativních nádorů, u kterých jsme zaznamenali pozitivitu po léčbě, mohou být způsobeny nerovnoměrnou overexpresí HER2, která v malém vzorku z core cut biopsie nemusela být zastižena (Davila E. et Amazon K., 2010). V další části naší práce byla v menším souboru pacientek zachycena poměrně neobvyklá ztráta exprese HER2 z původní silně pozitivní na negativní, ojediněle popsána i jinými autory (Varga Z. et al., 2005; Adams A. L. et al., 2008). Příčinou této neobvyklé situace mohla být koexistence 2 klonů v nádorové populaci buněk, z nichž jeden HER2 overexprimoval a odpovídal na léčbu chemoterapií a anti-HER2 protilátkou a druhý, který po léčbě převážil, nikoliv (Adams A. L. et al., 2008). Spárované vzorky, ve kterých se změna vyskytla, byly testovány pomocí 3 nezávislých metod IHC, FISH, qRT-PCR. Nyní již v praxi rutinně používaná metoda FISH detekuje amplifikaci genu na úrovni DNA a umožňuje odlišení prosté amplifikace genu HER2 a chromozomální duplikace. Metody kvantitativní PCR představují dostupnou alternativu pro FISH a umožňují detekci HER2 na úrovni DNA i RNA (Bieche I. et al., 1999). Pokud je nám známo, naše práce byla první, kde byl status HER2 vyšetřen na všech úrovních, tzn. proteinu, DNA a RNA. Dobrá korelace výsledků qRT-PCR s výsledky IHC a FISH byla následně ověřena na větším souboru vzorků (Tvrdík D. et al., 2012). V následujících letech další autoři navrhli využití qRT-PCR jako doplňující test v případech s hraničním nebo nejasným výsledkem FISH (Zoppoli G. et al., 2017).

Na podkladě studií popisujících změny exprese standardních markerů po chemoterapii bylo v minulosti doporučeno IHC vyšetření provedené na vzorcích z core cut biopsie zopakovat na vzorcích z definitivních resekátů. V současné době se upouští od opakování vyšetření v případě jednoznačné positivity ER, PR a HER2 v core cut biopsii, u HER2 právě s výjimkou pacientek po neoadjuvantní chemoterapii, u kterých je výskyt výrazných změn pravděpodobnější. Přestože ztráta exprese PR je po chemoterapii častá, pro indikaci hormonální léčby je postačující pozitivita ER, jejichž exprese je stabilní (Goldhirsch A. et al., 2005). Vyšetření proliferací aktivity, která je přímo úměrná citlivosti nádoru na chemoterapii, je doporučeno opakovat vždy, vzhledem k tomu, že její pokles je v důsledku chemoterapie obvyklý.

Změny standardně vyšetřovaných markerů karcinomu prsu po chemoterapii byly tedy již popsány více autory, nicméně pokud je nám známo, dosud se žádná studie nezabývala stabilitou exprese claudinů, které byly v nedávné době navrženy jako další markery pro

rozšíření molekulární klasifikace karcinomu prsu. V naší práci jsme zaznamenali změny v expresi 2 ze 3 sledovaných claudinů. Expresie claudinu 1 po léčbě vzrostla, zatímco expresie claudinu 3 poklesla. V expresi claudinu 4 k významným změnám nedošlo.

Expresie claudinu 1 v karcinomu prsu je obvykle podstatně nižší než v nenádorových lumenálních buňkách prsní žlázy. Dle recentně publikovaných studií může *CLDN1* v průběhu karcinogeneze působit v závislosti na okolnostech buď jako tumor supresorový gen, nebo jako protoonkogen (Kwon M. J., 2013). V případě tumor supresivního účinku je jeho snížená expresie spojována s výraznější EMT a kolektivní migrací na invazivním okraji nádoru a pravděpodobně přispívá k chemorezistenci nádoru (Zhou B. et al., 2015). My jsme však po chemoterapii zaznamenali zvýšení jeho expresie naznačující zapojení jiných mechanismů, které by mohly souviset např. s vyšší proliferací aktivitou. Ta korelovala s vysokou expresí claudinu 1 po léčbě, přestože celkově došlo v našem souboru vzorků ke snížení expresie Ki67.

Vysokou expresi claudinu 1 jsme častěji pozorovali v nádorech ER-negativních, PR-negativních, HER2-negativních (při hodnocení jednotlivých markerů) a triple-negativních než v nádorech exprimujících hormonální receptory a/nebo HER2. Obdobnou souvislost s ER-negativními a triple-negativními karcinomy zaznamenaly také další studie (Blanchard A. A. et al., 2013; Zhou B. et al., 2015). Kombinace uvedených faktorů je charakteristická pro agresivnější, méně diferencované nádory, u kterých nelze očekávat odpověď na hormonální ani anti-HER2 léčbu, nicméně obvykle jsou alespoň na počátku terapie chemosenzitivní (Lakhani S. R. et al. 2012).

Asociace se standardními markery karcinomu prsu se projevila také u N-cadherinu. Jeho pozitivitu jsme pozorovali častěji u nádorů ER- a PR-negativních, HER2-pozitivních (při hodnocení jednotlivých markerů) a hůře diferencovaných než u ER- a/nebo PR-pozitivních a/nebo HER2-negativních a/nebo dobře diferencovaných. Získaná expresie N-cadherinu podporuje invazivní fenotyp a metastatický potenciál u středně až špatně diferencovaných karcinomů prsu, a ty také často ztrácejí expresi hormonálních receptorů a/nebo overexprimují HER2 (ElMoneim H. M. et Zaghoul N. M., 2011).

Claudiny 3 a 4 jsou příbuzné proteiny a pravděpodobně podléhají stejným regulačním mechanismům (Shang X. et al., 2012). Jejich expresie je v karcinomech prsu obvykle vysoká, stejně jako v lumenálních buňkách normální prsní žlázy (Kulka J. et Tokes A. M., 2005). Vysokou expresi obou claudinů jsme zastihli u většiny nádorů v obou skupinách. Oba claudiny se podílejí na zachování epiteliálního fenotypu modulací expresie hlavních EMT markerů, zejména podporou expresie E-cadherinu (Lin X. et al., 2013), a také naše výsledky naznačují korelaci mezi claudinem 3 a E-cadherinem.

Vzhledem k těmto interakcím mezi claudiny a cadheriny se můžeme domnívat, že snížení expresie claudinů 3 a 4 v nádorových buňkách zvýší jejich rezistenci k chemoterapii. Výsledky relevantních studií jsou často protichůdné, nicméně shrneme-li jejich závěry, více autorů se k této interpretaci přiklání s tím, že výsledný efekt je však zřejmě závislý na řadě dalších faktorů, např. typu nádoru a chemoterapeutika (Kwon, M. J., 2013).

Přestože většina invazivních karcinomů prsu NST intenzivně exprimuje claudiny 3 a 4 a E-cadherin, není známo, zda jejich expresie souvisí s některým ze standardních markerů. Některé studie zaznamenali u ER-negativních nádorů častější vysokou expresi claudinu 3 a 4 a sníženou expresi E-cadherinu, nicméně v jiných tyto souvislosti nalezeny nebyly (Kowalski P. J. et al., 2003; Blanchard A. A. et al., 2009; Kulka J. et al., 2009). Ani v našem souboru se souvislost mezi expresí claudinu 3 či E-cadherinu se standardními markery neprojevila. Pro statistickou analýzu korelace expresie claudinu 4 s expresí ostatních sledovaných markerů nebyla získána data dostatečná.

Role obou cadherinů v EMT naznačuje jejich možný vliv na chemosenzitivitu nádoru. Downregulace E-cadherinu podporuje chemorezistenci a obdobný efekt lze předpokládat u upregulace N-cadherinu (Nakamura T. et al., 2003; Wang W. et al., 2017). Naše studie však

po chemoterapii neprokázala významné změny ani v expresi E-cadherinu ani N-cadherinu. Přestože tzv. „cadherin switch“ je považován za hlavní znak EMT, nově nabytá exprese N-cadherinu nemusí být doprovázena ztrátou exprese E-cadherinu a ani v našem souboru vzorků jsme vzájemnou závislost obou markerů nepozorovali (Nieman M. T. et al., 1999; Rai H. et Ahmed J., 2014).

Apoptóza je přímým projevem účinku cytotoxických chemoterapeutik na nádorovou tkáň a její funkční mechanismus je pro chemosenzitivitu nádoru zásadní (Fulda S. et Debatin K. M., 2000-2003). Na základě analýzy expresního profilu 84 genů asociovaných s apoptózou bylo vybráno 13 genů s prognostickou výpovědní hodnotou, jejichž exprese se vlivem léčby změnila. Skupina zahrnuje geny pro jeden povrchový receptor s protiapoptotickou funkcí (*IGF1R*), členy rodiny *BCL2* (*MCL1*, *BCL2L10*, *BCL2A1*), protein regulující funkci některých *BCL2* proteinů (*HRK*), jeden ze superrodiny receptorů smrti (*TNFRSF25*), dva ligandy receptorů smrti (*TNFSF8*, *CD70*), jeden z prostředníků mezi receptory smrti a kaspázami (*FADD*), dále některé kaspázy včetně iniciátorové kaspázy 8 (*CASP8*, *CASP10*, *CASP14*) a proapoptotický protein z rodiny *CIDE* (*CIDEB*). Zatímco ve skupině pacientek s dobrou prognózou došlo ke změně exprese všech uvedených genů, ve skupině se špatnou prognózou se změnila pouze exprese *IGF1R*. Jejich zapojení v apoptóze a dalších signálních drahách může naznačovat mechanismus, jakým mohou ovlivnit citlivost nádoru na chemoterapii nebo být chemoterapií ovlivněny.

Jediný gen, jehož exprese se změnila v obou prognosticky významných skupinách, byl *IGF1R*, a to ve smyslu downregulace ve skupině s dobrou prognózou a upregulace ve skupině se špatnou prognózou. Příslušná funkční signální dráha je nezbytná pro správný vývoj prsní žlázy a zejména luminální diferenciaci, je regulovaná ER a pravděpodobně má podstatný vliv na vznik rezistence nádoru na standardní cílenou léčbu tamofixenem (antagonistou estrogenu) a trastuzumabem (anti-HER2 protilátkou) (Farabaugh S. M. et al., 2015).

Mezi členy rodiny genů *BCL2* došlo k upregulaci exprese genů *BCL2L10* a *BCL2A1* a downregulaci exprese genu *MCL1* ve skupině pacientek s dobrou prognózou. Mnohé studie popsaly overexpresi protiapoptotických a/nebo redukci exprese proapoptotických členů *BCL2* rodiny na různých nádorových buněčných liniích, u kterých se často navíc projevila rezistence k chemoterapii (Wong R., 2011). *MCL1* reguluje apoptózu v závislosti na transkripční variantě, obvykle je však jeho exprese spojena s inhibicí apoptózy, stejně jako u *BCL2L10* a *BCL2A1* (Fagerberg L. et al., 2014).

TNFRSF25 (*DR3*), u kterého došlo k upregulaci exprese ve skupině s dobrou prognózou, kóduje povrchový receptor z TNF superrodiny, který spouští signální dráhu jak přes *FADD*, tak *TRADD* adaptorové molekuly, a vede tak k aktivaci kaspáz (Kitson J. et al., 1996). Vzhledem k tomu, že jej exprimují především aktivované T-lymfocyty, hraje klíčovou roli při zánětu. Stimulace *TNFRSF25* by mohla mít obdobný efekt jako blokáda molekul *PD-1* a *CTLA-4*, která se uplatňuje v imunologické léčbě solidních nádorů (Fagerberg L. et al., 2014). Další upregulované geny *TNFSF8* (*CD153*) a *CD70* (*TNFSF7*) produkují ligandy receptorů smrti (*CD30*, resp. *CD27*), exprimované aktivovanými B- a T-lymfocyty, nicméně aberantní exprese *CD70* byla popsána u celé řady solidních zhoubných nádorů včetně karcinomu prsu (Petrau C. et al., 2014).

FADD, u kterého došlo k upregulaci exprese ve skupině s dobrou prognózou, kóduje jeden z adaptorových proteinů, které svými doménami smrti (*DD*, death domain) a efektorovými doménami smrti (*DED*, death effector domain) propojují aktivované TNF receptory, např. Fas receptor, a prokaspázy 8 a 10, aby vytvořily *DISC* (death-inducing signaling complex). Figuruje však i v dalších cestách indukce apoptózy, v regulaci nekroptózy a navíc hraje roli v regulaci buněčného cyklu a proliferaci, což výrazně ztěžuje porozumění jeho úloze v karcinogenezi a rezistenci na terapii a relevantní studie zatím nepřinesly jednotné výsledky (Wang L. et al., 2010; Wajant H. et al., 2013).

Kaspáza 8 hraje zcela zásadní roli v aktivaci zevní dráhy apoptózy jako spouštěč kaspázové kaskády a aktivuje i druhou iniciátorovou kaspázu 10. Obě pak štěpením aktivují efektorové kaspázy, včetně kaspázy 14 (Fagerberg L. et al., 2014). Snížená nebo nedetekovatelná aktivita iniciačních i efektorových kaspáz byla popsána mimo jiné i u karcinomu prsu a nízká aktivita kaspázy 8 může navíc vyvolat rezistenci nádoru k apoptóze indukované cytotoxickou protinádorovou léčbou (Kim P. K. et al., 2001). V naší studii došlo po chemoterapii k upregulaci exprese genů všech 3 popsaných kaspáz ve skupině pacientek s dobrou prognózou.

U některých popsaných genů asociovaných s apoptózou již s odstupem od publikace našich výsledků došlo k významnému nárůstu znalostí o jejich roli v karcinogenezi, vztahu ke karcinomu prsu a vzniku rezistence k protinádorové léčbě. Specifické protilátky proti některým z popsaných proteinů či jejich inhibitory a antagonisty je již možné využít v kombinované léčbě zejména chemorezistentních malignit (např. inhibice MCL1) (MacCallum D. E. et al. 2005), další jsou v klinické a preklinické fázi studií (např. protilátka anti-IGF1R, anti-CD70) (Farabaugh S. M. et al. 2015; Jacobs J. et al. 2015).

6. ZÁVĚR

Výsledky vyšetření standardních markerů karcinomu prsu, konkrétně stabilita ER a HER2 a snížení exprese PR a Ki67 po léčbě, podporují současná doporučení pro opakování vyšetření těchto markerů v definovaných případech při standardizovaném zpracování bioptických vzorků karcinomu prsu. Při hodnocení statusu HER2 je však nutné s určitými změnami po neoadjuvantní léčbě počítat, ať už jsou skutečně způsobeny samotnou léčbou nebo jen nedostatečnou reprezentativností malého vzorku diagnostické biopsie.

Pokud je nám známo, naše práce byla první, kde byl status HER2 vyšetřen na všech úrovních, tzn. proteinu, DNA a RNA, s velmi dobrou korelací výsledků všech 3 metod (IHC, FISH, qRT-PCR). Metoda qRT-PCR by mohla být vhodnou alternativou k testování HER2 za předpokladu získání dostatečného množství kvalitní RNA z nádorové tkáně.

V další části práce jsme prokázali zvýšení exprese claudinu 1 a snížení exprese claudinu 3 po léčbě, zatímco exprese claudinu 4 se významněji nezměnila. Interpretace zvýšené exprese claudinu 1 po léčbě je obtížná vzhledem ke složitosti dosud popsáných souvisejících regulačních mechanismů, které navíc mohou mít v závislosti na konkrétní situaci protichůdný výsledek. Kombinace negativních hormonálních receptorů a HER2 a vysoké proliferativní aktivity, které pozitivně korelovaly s vysokou expresí claudinu 1, je obvyklým imunohistochemickým fenotypem agresivnějších, méně diferencovaných nádorů, u kterých nelze očekávat odpověď na hormonální ani anti-HER2 léčbu, nicméně obvykle jsou alespoň na počátku terapie chemosenzitivní. Snížení exprese claudinu 3 v nádorech z resektátů po léčbě by mohla odpovídat vyššímu zastoupení nádorových buněk méně citlivých na léčbu. Výsledky analýzy dat po léčbě svědčí pro pozitivní korelaci mezi claudinem 3 a E-cadherinem. Přestože je exprese claudinu 3 i E-cadherinu v invazivním karcinomu prsu NST obvykle vysoká, není dosud zřejmé, zda souvisí s některým ze standardně vyšetřovaných markerů karcinomu prsu, a naše studie ani u jednoho z nich takovou souvislost neprokázala.

Expresí hlavních markerů EMT, E- a N-cadherinu, se projevila jako stabilní a vzájemně nezávislá. Kombinace negativních hormonálních receptorů, overexpresí HER2 a nízké diferenciace, které korelovaly s pozitivitou N-cadherinu, je častější u agresivnějších nádorů, které však mají díky overexpresi HER2 širší možnosti léčby.

Pro analýzu změn exprese genů asociovaných s apoptózou byly pacientky rozděleny do dvou skupin dle prognózy. Ve skupině pacientek s dobrou prognózou po neoadjuvantní chemoterapii došlo ke změně exprese 13 genů. Jednalo se o 9 genů s převážně proapoptotickým efektem, jejichž exprese po chemoterapii vzrostla (*CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *HRK*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70*, *CIDEB*) a 2 geny s převážně protiapoptotickým efektem, jejichž exprese po chemoterapii klesla (*MCL1*, *IFG1R*). Změny v expresi těchto 11 genů by mohly svědčit pro chemoterapií vyvolanou indukci proapoptotického fenotypu nádorových buněk, u nichž se dá předpokládat lepší odpověď na následnou adjuvantní chemoterapii, a jsou v souladu s lepší prognózou pacientek ve skupině. Tomu odpovídá i zvýšení exprese spíše protiapoptoticky působícího *IGF1R* ve skupině pacientek se špatnou prognózou. Vyšší exprese obou genů produkujících ligandy receptorů smrti *TNFSF8* a *CD70* ve skupině pacientek s dobrou prognózou ovšem může souviset s infiltrací nádoru aktivovanými lymfocyty, která je obvyklou tkáňovou reakcí na regresivní změny po chemoterapii, a mohla by tedy indikovat příznivou protinádorovou stimulaci imunitního systému. Význam zvýšené exprese protiapoptotických genů *BCL2L10* a *BCL2A1* ve skupině s dobrou prognózou je nejasný.

V naší práci jsme prokázali, že chemoterapie významně ovlivňuje expresi řady sledovaných proteinů/genů v karcinomu prsu. V případě standardních markerů naše výsledky podporují současný doporučený postup pro IHC vyšetření bioptických vzorků. Změny

v expresi claudinu 1 a 3 svědčí pro jejich úlohu v odpovědi nádorových buněk na chemoterapii. Některé zastižené korelace exprese claudinů a cadherinů s expresí standardních markerů se v karcinomech prsu pravděpodobně vyskytují častěji, vzhledem k tomu, že byly recentně popsány i dalšími autory. Zaznamenali jsme však i dosud nepopsané korelace, které by mohly být nápomocné při porozumění roli claudinů a cadherinů v karcinogenezi karcinomu prsu a jeho odpovědi na léčbu. Navržený panel genů asociovaných s apoptózou by mohl najít uplatnění v rámci multigenových esejí cílených na přesnější stratifikaci pacientek se středním stupněm rizika relapsu nádorového onemocnění, která by v rámci této heterogenní skupiny umožnila větší individualizaci léčby. Uvedené výsledky statistických analýz jsou nicméně limitované velikostí testovaných souborů vzorků a pro jejich validaci a odhalení souvisejících regulačních mechanismů jsou nezbytné další studie zahrnující větší soubory.

7. LITERATURA

Adams, A. L., I. Eltoun, H. Krontiras, W. Wang and D. C. Chhieng. The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and HER2/neu status in breast carcinoma. *Breast J.* 2008;14(2):141-146

Bauer, K., C. Parise and V. Caggiano. Use of ER/PR/HER2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breast cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:228

Bieche, I., P. Onody, I. Laurendeau, M. Olivi, D. Vidaud, R. Lidereau and M. Vidaud. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem.* 1999;45(8 Pt 1):1148-1156

Blanchard, A. A., X. Ma, K. J. Dueck, C. Penner, S. C. Cooper, D. Mulhall, L. C. Murphy, E. Leygue and Y. Myal. Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC Cancer.* 2013;13:268

Blanchard, A. A., G. P. Skliris, P. H. Watson, L. C. Murphy, C. Penner, L. Tomes, T. L. Young, E. Leygue and Y. Myal. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.* 2009;454(6):647-656

Buchholz, T. A., K. K. Hunt, G. J. Whitman, A. A. Sahin and G. N. Hortobagyi. Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: multidisciplinary considerations of benefits and risks. *Cancer.* 2003;98(6):1150-1160

Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor and Y. Wang. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;366(9503):2087-2106

D'Alfonso, T., Y. F. Liu, S. Monni, P. P. Rosen and S. J. Shin. Accurately assessing her-2/neu status in needle core biopsies of breast cancer patients in the era of neoadjuvant therapy: emerging questions and considerations addressed. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(4):575-581

Davila, E. and K. Amazon. The Clinical Importance of the Heterogeneity of HER2 neu. *Case Rep Oncol.* 2010;3(2):268-271

Ding, L., Z. Lu, Q. Lu and Y. H. Chen. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res.* 2013;5:367-375

Eifel, P., J. A. Axelson, J. Costa, J. Crowley, W. J. Curran, Jr., A. Deshler, S. Fulton, C. B. Hendricks, M. Kemeny, A. B. Kornblith, T. A. Louis, M. Markman, R. Mayer and D. Roter. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(13):979-989

Ellis, I. O., P. Carder, S. Hales, A. H. S. Lee, S. E. Pinder, E. Rakha, T. Stephenson, S. Al-Sam, R. Deb, A. Hanby, R. Liebmann, E. Provenzano, D. Rowlands, C. A. Wells, N. Anderson, A. Girling, M. Ibrahim, E. Mallon and C. Quinn. Pathology reporting of breast disease in surgical excision specimens incorporating the dataset for histological reporting of breast cancer. The Royal College of Pathologists. 2016

ElMoneim, H. M. and N. M. Zaghoul. Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(10):1765-1771

Fagerberg, L., B. M. Hallstrom, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpour, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjostedt, E. Lundberg, C. A. Szigartyo, M. Skogs, J. O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten and M. Uhlen. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(2):397-406

Farabaugh, S. M., D. N. Boone and A. V. Lee. Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:59

Goldhirsch, A., J. H. Glick, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thurlimann and H. J. Senn. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005;16(10):1569-1583

Fulda, S. and K. M. Debatin. Caspase activation in cancer therapy. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]; Austin (TX): Landes Bioscience © 2000-2003*

Hassan, M., H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba and N. Sakuragi. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;150845

Hazan, R. B., G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton and S. A. Aaronson. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 2000;148(4):779-790

Jacobs, J., V. Deschoolmeester, K. Zwaenepoel, C. Rolfo, K. Silence, S. Rottey, F. Lardon, E. Smits and P. Pauwels. CD70: An emerging target in cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther.* 2015;155:1-10

Kim, P. K., R. Mahidhara and D. W. Seol. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 2001;4(5):293-296

Kinsella, M. D., A. Nassar, M. T. Siddiqui and C. Cohen. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post- neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: a single institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(6):530-536

Kitson, J., T. Raven, Y. P. Jiang, D. V. Goeddel, K. M. Giles, K. T. Pun, C. J. Grinham, R. Brown and S. N. Farrow. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature.* 1996;384(6607):372-375

Kowalski, P. J., M. A. Rubin and C. G. Kleer. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 2003;5(6):R217-222

Kulka, J. and A. M. Tokes. Claudin expression in breast tumors. *Hum Pathol.* 2005;36(7):859-860

Kulka, J., A. M. Szasz, Z. Nemeth, L. Madaras, Z. Schaff, I. A. Molnar and A. M. Tokes. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2009;15(1):59-64

Kwon, M. J. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):18148-18180

Lakhani, S. R., I. O. Ellis, S. J. Schnitt, P. H. Tan and M. J. van de Vijver. *WHO Classification of Tumours of the Breast.* IARC, Lyon. 2012

Lin, X., X. Shang, G. Manorek and S. B. Howell. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4. *PLoS One.* 2013;8(6):e67496

MacCallum, D. E., J. Melville, S. Frame, K. Watt, S. Anderson, A. Gianella-Borradori, D. P. Lane and S. R. Green. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.* 2005;65(12):5399-5407

Myal, Y., E. Leygue and A. A. Blanchard. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010;956897

Nakamura, T., Y. Kato, H. Fuji, T. Horiuchi, Y. Chiba and K. Tanaka. E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. *Int J Mol Med.* 2003;12(5):693-700

Nieman, M. T., R. S. Prudoff, K. R. Johnson and M. J. Wheelock. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 1999;147(3):631-644

Osanai, M., A. Takasawa, M. Murata and N. Sawada. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch.* 2017;469(1):55-67

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-752

Petrau, C., M. Cornic, P. Bertrand, C. Maingonnat, V. Marchand, J. M. Picquenot, F. Jardin and F. Clatot. CD70: A Potential Target in Breast Cancer? *J Cancer.* 2014;5(9):761-764

- Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He and C. M. Perou. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68
- Pusztai, L.. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11(Suppl 3):S11
- Rai, H. and J. Ahmed. N-cadherin: A marker of epithelial to mesenchymal transition in tumor progression. *The Internet Journal of Oncology.* 2014;10(1)
- Ryška, A., E. Hovorková, F. Sobande, T. Rozkoš, J. Laco and H. Hornychová. Naděje a úskalí molekulární klasifikace karcinomu prsu. *Cesk Patol.* 2015;51(1):26-32
- Shang, X., X. Lin, E. Alvarez, G. Manorek and S. B. Howell. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia.* 2012;14(10):974-985
- Singh, A. and J. Settleman. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-4751
- Singh, A. B. and P. Dhawan. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;42:58-65
- Taucher, S., M. Rudas, R. M. Mader, M. Gnant, E. Sporn, P. Dubsy, S. Roka, T. Bachleitner, F. Fitzal, D. Kandioler, C. Wenzel, G. G. Steger, M. Mittlbock and R. Jakesz. Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of HER2/neu in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82(3):207-213
- Thakkar, J. P., D. G. Mehta. A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *Oncologist.* 2011;16(3):276-285
- Turksen, K. and T. C. Troy. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(1):73-79
- Tvrdik, D., L. Stanek, H. Skalova, P. Dundr, Z. Velenska and C. Povysil. Comparison of the IHC, FISH, SISH and qPCR methods for the molecular diagnosis of breast cancer. *Mol Med Rep.* 2012;6(2):439-443
- Varga, Z., R. Caduff and B. Pestalozzi. Stability of the HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch.* 2005;446(2):136-141
- Wajant, H., J. Gerspach and K. Pfizenmaier. Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2013;332(2):163-174
- Walther, W., S. Petkov, O. N. Kuvardina, J. Aumann, D. Kobelt, I. Fichtner, M. Lemm, J. Piontek, I. E. Blasig, U. Stein and P. M. Schlag. Novel *Clostridium perfringens* enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther.* 2012;19(5):494-503
- Wang, W., L. Wang, A. Mizokami, J. Shi, C. Zou, J. Dai, E. T. Keller, Y. Lu and J. Zhang. Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin J Cancer.* 2017;36(1):35
- Wong, R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):87
- Yin, H. F., Y. H. Wang, X. Q. Qin, H. Zhang, T. Li, J. M. Ye and Y. H. Liu. Effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade and expression of biological markers in breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2009;31(11):858-862
- Yoshioka, T., M. Hosoda, M. Yamamoto, K. Taguchi, K. C. Hatanaka, E. Takakuwa, Y. Hatanaka, Y. Matsuno and H. Yamashita. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer.* 2015;22(2):185-191
- Zhou, B., A. Moodie, A. A. Blanchard, E. Leygue and Y. Myal. Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *J Clin Med.* 2015;4(12):1960-1976
- Zoppoli, G., A. Garuti, G. Cirmena, L. V. di Cantogno, C. Botta, M. Gallo, D. Ferraioli, E. Carminati, P. Baccini, M. Curto, P. Fregatti, E. Isnaldi, M. Lia, R. Murialdo, D. Friedman, A. Sapino and A. Ballestrero. Her2 assessment using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction reliably identifies Her2 overexpression without amplification in breast cancer cases. *J Transl Med.* 2017;15(1):91

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace, které jsou podkladem dizertace:

- **Skalova H.**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, L. Petruzelka, D. Tvrdik. Study of the effect of neoadjuvant chemotherapy on the status of Her2/neu. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(5):191-9. **IF=1,151**
- Tvrdik D., **H. Skalova**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, A. Berkova, L. Stanek, L. Petruzelka. Apoptosis-associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment. *Med Sci Monit*. 2012;18(1):BR60-67. **IF=1,699**
- **Skalova H.**, N. Hajkova, B. Majerova, M. Bartu, C. Povysil, I. Ticha. The impact of chemotherapy on the expression of claudins and cadherins in invasive breast cancer. *Exp Ther Med*. 2019;18(4):3014-3024. **IF=1,448**

Publikace bez vztahu k tématu dizertace:

a) s IF:

- Spacek J., M. Vocka, I. Netikova, **H. Skalova**, P. Dundr, B. Konopasek, E. Zavadova, L. Petruzelka. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunol Invest*. 2018;47(7):643-653
- Pagès F., B. Mlecnik, F. Marliot, G. Bindea, F. S. Ou, C. Bifulco, A. Lugli, I. Zlobec, T. T. Rau, M. D. Berger, I. D. Nagtegaal, E. Vink-Börger, A. Hartmann, C. Geppert, J. Kolwelter, S. Merkel, R. Grützmann, M. Van den Eynde, A. Jouret-Mourin, A. Kartheuser, D. Léonard, C. Remue, J. Y. Wang, P. Bavi, M. H. A. Roehrl, P. S. Ohashi, L. T. Nguyen, S. Han, H. L. MacGregor, S. Hafezi-Bakhtiari, B. G. Wouters, G. V. Masucci, E. K. Andersson, E. Zavadova, M. Vocka, J. Spacek, L. Petruzelka, B. Konopasek, P. Dundr, **H. Skalova** K. Nemejcova, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, G. Ciliberto, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, T. Fredriksen, B. Buttard, M. Angelova, A. Vasaturo, P. Maby, S. E. Church, H. K. Angell, L. Lafontaine, D. Bruni, C. El Sissy, N. Haicheur, A. Kirilovsky, A. Berger, C. Lagorce, J. P. Meyers, C. Paustian, C. Feng Z, Ballesteros-Merino, J. Dijkstra, C. van de Water, S. van Lent-van Vliet, N. Knijn, A. M. Muşină, D. V. Scripcariu, B. Popivanova, M. Xu, T. Fujita, S. Hazama, N. Suzuki, H. Nagano, K. Okuno, T. Torigoe, N. Sato, T. Furuhashi, I. Takemasa, P. S. Itoh, P. S. Patel, H. N. Vora, B. Shah, J. B. Patel, K. N. Rajvik, S. J. Pandya, S. N. Shukla, Y. Wang, G. Zhang, Y. Kawakami, F. M. Marincola, P. A. Ascierto, D. J. Sargent, B. A. Fox, J. Galon. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;26;391(10135):2128-2139
- K. J. Werkstetter, I. R. Korponay-Szabó, A. Popp, V. Villanacci, M. Salemme, G. Heilig, S. T. Lillevang, M. L. Mearin, C. Ribes-Koninckx, A. Thomas, R. Troncone, B. Filipiak, M. Mäki, J. Gyimesi, M. Najafi, J. Dolinšek, S. Dydensborg Sander, R. Auricchio, A. Papadopoulou, A. Vécsei, P. Szitanyi, E. Donat, R. Nenna, P. Alliet, F. Penagini, H. Garnier-Lengliné, G. Castillejo, K. Kurppa, R. Shamir, A. C. Hauer, F. Smets, S. Corujeira, M. van Winckel, S. Buderus, S. Chong, S. Husby, S. Koletzko; **ProCeDE study group**. Accuracy in diagnosis of celiac disease without biopsies in clinical practice. *Gastroenterology*. 2017;153(4):924-935
- Dundr P., K. Nemejcova, J. Laco, **H. Skalova**, L. Bauerova, R. Matej, D. Fischerova. Anastomosing hemangioma of the ovary: a clinicopathological study of six cases with stromal luteinization. *Pathol Oncol Res*. 2017;23(4):717-722

- Ulrych J., V. Fryba, **H. Skalova**, Z. Krska, T. Krechler, D. Zogala. Premalignant and malignant lesions of the heterotopic pancreas in the esophagus: a case report and review of the literature. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015;24(2):235-9
- Zavadova E., Vocka M., Spacek J., Francis N., Konopasek B., Fucikova T., **Skalova H.**, Dundr P., Petruzelka L., Rau T. T., Geppert C., Hartmann A. Immune monitoring in patients with colorectal cancer stage II. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2015;3(Suppl 2):266
- Tvrđík D., L. Stanek, **H. Skalova**, P. Dundr, Z. Velenska, C. Povysil. Comparison of the IHC, FISH, SISH and qPCR methods for the molecular diagnosis of breast cancer. *Mol Med Report.* 2012;6(2):439-43

b) bez IF:

- Zavadova E., J. Spacek, M. Vocka, B. Konopasek, T. Fucikova, I. Netikova, P. Dundr, **H. Skalova**, L. Petruzelka. Immunoscore and its predictive value for colorectal cancer. *Klin Onkol.* 2015;28 Suppl 4:4S82-5
- **Skalova H.**, C. Povysil, J. Hofmanova, B. Goldova, R. Jaksa, K. Jandova, J. Galko. Histopathological autoptotic findings in 8 patients with pandemic influenza A (H1N1) pneumonia. *Cesk Patol.* 2012;48(3):161-164
- **Skalova H.** and C. Povysil. Intrapericardial teratoma as a cause of fetal death - a case report. *Cesk Patol.* 2011;47(4):189-91
- Povysil C., P. Dungl, **H. Skalova**, J. Vaculik, M. Horak, V. Povysilova. Histopatologické změny skeletu u pacientů se zlomeninou krčku kosti stehenní; *Ortopedie.* 2009;3:280-283
- Belohlavek J., J. Horak, V. Dytrych, K. Gorican, T. Palecek, P. Kuchynka, O. Smid, **H. Skalova**, V. Rohn, A. Linhart. Katetrizační uzávěr defektu komorového septa při infarktu myokardu; *Cor Vasa.* 2008;50(12):486-487

Abstrakta autora související s dizertací:

- **Skalova H.**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, L. Petruzelka, D. Tvrđík. Altered expression of Her2/neu after neoadjuvant treatment of breast cancer – a case study. VI. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Praha, 2010
- **Skalova H.**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, A. Berkova, L. Stanek, Z. Dlouha, L. Petruzelka, D. Tvrđík. Role of apoptosis associated genes in predicting clinical outcome of breast cancer. The 7. symposium and workshop on molecular pathology and histochemistry, Olomouc, 2011
- Tvrđík D., **H. Skálová**, P. Dundr, L. Stanek, C. Povýšil, L. Petruželka. Apoptosis associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer therapy. European Congress of Patology, Praha, 2012

Přednáška autora související s dizertací:

- Změny exprese Her2/neu v karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii. 13. studentská vědecká konference, Praha, 2012