

Studium biomarkerů karcinomu prsu po neoadjuvantní léčbě

MUDr. Heleny Skálové

účastníka doktorského studijního programu v biomedicině 1. LF UK v Praze

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Oponent: prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc., Ústav klinické a molekulární patologie & Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 77515 Olomouc

Obecná charakteristika

Disertační práce o rozsahu 61 stran textu a 1 titulní strany, 1 strany bibliografického záznamu, 1 strany poděkování, 1 strany prohlášení o samostatném vypracování disertace, 2 stran souhrnů v českém a anglickém jazyce, 2 stran obsahu, 1 strany seznamu použitých zkratk, 3 stran seznamu tabulek a obrázků, 14 stran použité literatury zahrnující 153 záznamů, 4 stran seznamu všech publikací autorky a 3 příloh obsahujících kopie vlastních publikací souvisejících s tématem disertace. Do textu disertace je vloženo 6 tabulek a 12 obrázků. Formální úprava a členění textu odpovídají požadavkům kladeným na tento typ disertace. Jednotlivé kapitoly tvoří přehledné celky, které stručně a vyčerpávajícím způsobem informují o zvolené problematice. Literární odkazy jsou vhodně vybrány, obrazové přílohy jsou přiměřené.

Práce se zabývá aktuální onkologickou problematikou související se studiem biomarkerů karcinomu prsu po neoadjuvantní léčbě. Hlavní pozornost je přitom v disertaci věnována kromě standardních markerů, jako jsou receptory pro steroidní hormony a HER2 i claudinům, cadherinům a mechanismům regulujícím apoptózu. V úvodní kapitole (celkem o rozsahu 6 stran) se autorka zabývá obecným přehledem informací o karcinomu prsu, jeho léčbě a standardních biomarkerech určujících způsob jeho terapie. V následující krátké kapitole o rozsahu cca 2 stran podává stručné informace o molekulárních subtypech karcinomů prsu a posléze přistupuje na 2 stranách k popisu významu některých adhezních molekul, jako jsou claudiny a cadheriny, a jejich spojitosti s epitelovo-mezenchymovou transicí (EMT), aby na následujících 3 stranách informovala o roli apoptózy v karcinogenezi a protinádorové léčbě.

Cíle práce

Hlavním cílem disertační práce bylo ověření hypotézy, že v nádorech dochází vlivem chemoterapie ke změnám exprese molekul ovlivňujících citlivost nádoru na léčbu respektive vznik rezistence na určitý druh léčiv. Změny jejich exprese by případně mohly sloužit k monitorování výsledku terapie a k predikci odpovědivosti nádoru na terapii, stejně jako být potenciálním cílem nové biologické léčby. Ve své práci se autorka zaměřila především na

sledování molekul regulujících EMT a apoptózu. Konkrétně šlo o posouzení změn exprese standardních znaků, jako jsou ER, PR, HER2 a Ki67, změn exprese claudinů 1, 3 a 4, E- resp. N-cadherinů a 84 genů asociovaných s apoptózou před a po neoadjuvantní terapii. Vzájemná korelační analýza sledovaných znaků měla doplnit získané výsledky. Cíle disertace byly vytýčeny jasně a srozumitelně.

Použitá metodika

Metodický přístup k řešení problematiky byl adekvátní. Použité postupy zahrnovaly celou škálu laboratorních a statistických metod souvisejících se způsobem získání tkáňových vzorků, jejich histologickým a imunohistochemickým vyšetřením, vyšetřením amplifikace genu *HER2* metodou FISH, exprese mRNA *HER2* pomocí qRT-PCR, apoptózy buněk metodami stanovení kaspázy 3 a TUNEL i analýzou exprese 84 apoptotických genů pomocí „Real-Time PCR Array (Qiagen, PAHS-012).

Dosažené výsledky

Výsledky zahrnují analýzu 3 souborů pacientek. V prvním souboru (n=20 pacientek) byly sledovány změny exprese *HER2*, ve druhém (n=16 pacientek) byly sledovány změny exprese genů asociovaných s apoptózou a ve třetím (n=62 pacientek) změny exprese claudinů a cadherinů. Detailní výsledkové údaje byly prezentovány v Tabulkách 1-3. Vyplývá z nich, že v prvním souboru došlo vlivem neoadjuvantní terapie ke zmenšení tumoru nebo snížení stadia nemoci u 40 % pacientek, progresse nastala u 15 % pacientek a ke změně nedošlo u 35 % pacientek (u 10 % pacientek nebyl efekt léčby hodnocen z důvodu úmrtí nebo nemožnosti vyšetřit definitivní tkáňový vzorek). V druhém souboru se příznivý efekt terapie projevil u 50 % pacientek, progresse nastala u 25 % pacientek a stav zůstal nezměněn u 25 % pacientek. Ve třetím souboru nastalo zlepšení u 50 % pacientek, zhoršení u 18 % pacientek a stav se nezměnil u 27 % pacientek (u 5 % pacientek nebyl údaj dostupný). Pozorované změny stupně diferenciacie nádorů nebyly statisticky významné. Autorka hodnotí stupeň regresivních změn po neoadjuvanci stupnicí dle Chevalliera a zaznamenává u 70 % nádorů stupeň 3 (residuální invazivní nádor se zřetelnými regresivními změnami) a u 25 % nádorů stupeň 4 (jen minimální regresivní změny a perzistence nádoru). Významný efekt neoadjuvance (stupeň 1 a 2) byl zjištěn jen u 5 % nádorů. Proliferační aktivita po léčbě zřetelně klesala. Co se týká změn exprese *HER2* hodnocené imunohistochemicky, docházelo ke změně exprese jen v ojedinělých případech a to jak ve smyslu snížení, tak i zvýšení exprese. Celkově se výsledky hodnocení exprese *HER2* významně neměnily. Případy se změnami exprese byly vyšetřeny alternativními metodami (FISH, qRT-PCR) se stejnými výsledky (průkaz amplifikace před léčbou a ztráta amplifikace po léčbě). Změny exprese hormonálních receptorů (o více než 10 % pozitivních buněk) se týkaly v prvním souboru 65 % vyšetřovaných případů, výrazná ztráta vedoucí až k negativitě exprese PR byla pozorována u 2 případů. V souboru 62 pacientek se neprojevily signifikantní změny exprese ER, ale docházelo ke snížení exprese PR. Zajímavé výsledky byly dosaženy při sledování exprese claudinů a cadherinů. Před léčbou byla pozorována silná exprese claudinů 3 a 4 i nízká exprese claudinu 1, asi 25 % případů jevílo sníženou nebo chybějící expresi E-cadherinu a pozitivitu N-cadherinu. Po léčbě došlo ke zvýšení exprese claudinu 1 a snížení exprese claudinu 3 i nesignifikantnímu snížení exprese claudinu 4. Exprese obou cadherinů se po léčbě výrazněji neměnila. Přestože v žádném z vyšetřených vzorků před chemoterapií nebyla zachycena současná nízká exprese všech 3 claudinů, po léčbě se objevila ve 4 případech (4/62, 6 %), doprovázená současnou ztrátou exprese E-cadherinu. Pouze jeden z těchto nádorů byl však zároveň triple-negativní a jediný tedy splňoval navržená IHC kritéria pro podskupinu „claudin-low“. Další 3 triple-negativní nádory (3/62, 5 %) v souboru vzorků po léčbě splňovaly tato kritéria částečně, vzhledem k tomu, že studie nezahrnovala claudin 7. Dále bylo zaznamenáno 11 nádorů (11/62, 18 %) před

a 10 (10/62, 16 %) po chemoterapii s vysokou expresí claudinů 1 a 4 a současně absencí exprese ER, které odpovídaly navrženým IHC kritériím podskupiny „claudin-high“. Dva „claudin-high“ nádory (2/11, 17 %) nadměrně exprimovaly HER2 před léčbou a 1 (1/10, 6 %) po léčbě. Při hodnocení korelace mezi expresí claudinů, cadherinů a standardních prediktivních markerů byly získány jen výsledky bez jednoznačné interpretace. Za povšimnutí stojí nálezy negativní korelace mezi expresí N-cadherinu a hormonálních receptorů před léčbou, nebo pozitivní korelace mezi expresí N-cadherinu a HER2 po léčbě. Co se týká výsledků hodnotících efekt neoadjuvance na apoptózu pozorovala autorka nesignifikantní korelaci mezi expresí kaspázy 3 a pozitivitou buněčných jader při vyšetření apoptotického indexu (AI) metodou TUNEL. Pouze část těchto buněk však jevila morfologické známky odpovídající apoptóze. Po léčbě docházelo k různě výraznému zvýšení AI, u jednoho nádoru však došlo i k jeho výraznému poklesu. Při testování exprese 84 vybraných v apoptóze zapojených genů byly nejdříve analyzovány vzorky nádorů odebrané před léčbou a porovnávána 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 ze sledovaných 84 genů byl v souboru vzorků prokázán prognostický význam ($p < 0,05$). Nakonec byla provedena analýza změn exprese jednotlivých prognosticky významných genů před a po chemoterapii. Ve skupině pacientek s dobrou prognózou bylo po léčbě zaznamenáno snížení exprese genů *MCL1* a *IGF1R* a zvýšení exprese genů *BCL2L10*, *BCL2A1*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *CIDEB*, *FADD*, *HRK*, *TNFRSF25*, *TNFSF8* a *CD70*. Ve skupině pacientek se špatnou prognózou bylo nalezeno pouze zvýšení exprese genu *IGF1R*, zatímco exprese ostatních genů se významněji nezměnila.

Splnění cílů

Předložená práce přesvědčivě dokumentuje, že chemoterapie u sledovaných souborů karcinomu prsu významně ovlivňuje expresi řady znaků. Některé z nich mohou sloužit jako prediktory reakce na určitou terapii. Tím byly stanovené cíle splněny. Disertační práce MUDr. Heleny Skálové je hodnotným příspěvkem, akcentujícím současné trendy onkologického výzkumu a přinášejícím nové podněty pro práci kliniků.

Poznámky a otázky

- 1) Jak autorka posuzuje význam punkční biopsie z hlediska určení expresního profilu celého nádoru?
- 2) Jak autorka posuzuje efekt nejednotné neoadjuvantní terapie na expresní profil? Nemohly být některé pozorované změny výsledkem rozdílného způsobu vedení neoadjuvantní chemoterapie?
- 3) Byly některé z pacientek před operací v rámci neoadjuvance léčeny také inhibitory HR nebo steroidogeneze? Na některých pracovištích se tento terapeutický způsob vedoucí ke zmenšení HR pozitivních nádorů používá.
- 4) Překvapivý byl poměrně malý efekt neoadjuvantní terapie na velkou část sledovaných nádorů. Nemůže tato skutečnost svědčit pro níže nastavenou koncentraci chemoterapeutik a dalších parametrů léčby?
- 5) V Tabulce 1 na straně 37 by přehlednosti prospělo, kdyby bylo vyznačeno, jaké změny exprese HER2 u HER2 + i HER2- nádorů nastaly po léčbě (% pozitivních buněk s úplnou i neúplnou membránovou pozitivitou). Podobně v Tabulce 4 na str. 46 by prospělo uvádění statistické významnosti změn exprese všech hodnocených znaků.
- 6) Jak autorka vysvětluje rozdílné výsledky týkající se exprese HER2 v souboru 20 pacientek a jiném souboru 62 pacientek?
- 7) Pro hodnocení změn exprese claudinů a cadherinů byl použitý soubor 62 případů invazivních karcinomů NST. I tak se však jedná o značně morfologicky heterogenní skupinu nádorů. Byla dg. stanovena jen z punkčních biopsií, nebo se přihlíželo i

k morfologii celých nádorů získaných operačně (i když v některých případech změněných regresívními změnami).

Závěr

MUDr. Helena Skálová předložila kvalitní disertační práci, která svědčí o schopnosti samostatné vědecké práce a přiměřené kritičnosti. Autorka dosáhla několika prioritních poznatků a prokázala svůj tvůrčí potenciál i hluboké teoretické a odborné znalosti. Disertace odpovídá požadavkům, které stanovuje paragraf 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb., a proto navrhuji, aby po absolvování obhajoby jí byl udělen akademický titul doktor, ve zkratce Ph.D.

Autorka prokázala tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu a práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce v daném oboru.

V Olomouci dne 10. ledna 2020

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.