

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Nejnovější údaje z odborné literatury o estrogenových
a progesteronových receptorech v karcinomu dělohy**

**The newest data from the research literature about estrogen
and progesterone receptors in the uterus cancer**

Diplomová práce



Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Garant: Mgr. Miroslav Kovařík

Hradec Králové 2011

Alena Ježková

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za všestrannou pomoc a cenné rady při tvorbě této diplomové práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Podpis:

OBSAH

1	SOUHRN	6
	SUMMARY	8
2	ÚVOD – ZADÁNÍ PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST – OBECNĚ O BUNĚČNÝCH REGULACÍCH NÁDORŮ	11
3.1	Kancerogeneze	11
3.1.1	Buněčný cyklus	13
3.1.1.1	Onkogeny.....	16
3.1.1.2	Mitogenní a antimitogenní signalizace	17
3.1.1.3	Apoptóza.....	20
3.1.1.4	Stárnutí buněk.....	21
3.2	Klinická klasifikace nádorů použitá v diplomové práci	22
4	PRAKTICKÁ ČÁST – BUNĚČNÉ REGULACE U ENDOMETRIÁLNÍCH KARCINOMŮ	26
4.1	Česká literatura	26
4.1.1	Diplomové a bakalářské práce školícího pracoviště	26
4.1.1.1	ER a jeho isoformy	26
4.1.1.2	Problematika PR	27
4.1.1.3	Artefakty při vyšetření ER a PR	28
4.1.1.4	Léčba.....	28
4.1.2	Česká internetová a časopisová literatura popisující molekulárně-biologické výsledky zahraničních studií o karcinomu endometria.....	30
4.1.3	Česká internetová a časopisová literatura o klinických a laboratorních výsledcích českých autorů.....	34
4.2	Zahraniční literatura	35
4.2.1	Zahraniční přehledné sdělení – klinicko-patologické faktory ve vztahu k morfologii ECs a prognóze	35
4.2.2	Zahraniční původní práce.....	40
4.2.2.1	Výskyt exprese ER a PR.....	40

4.2.2.2	Vliv histologického stupně nádoru na expresi ER, PR.....	40
4.2.2.3	Vliv věku na expresi ER a PR	41
4.2.2.4	Vliv ER a PR na přežití.....	41
4.2.2.5	Vliv přesně specifikované léčby na přežití v závislosti na expresi ER a PR	44
4.2.2.6	Vliv léčby na expresi ER a PR.....	47
5	DISKUSE.....	48
6	ZÁVĚR.....	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
8	SEZNAM LITERATURY	57

1 Souhrn

Touto prací navazujeme na předchozí práce školícího pracoviště, které jsou zaměřeny na ER, PR expresi v nádorech dělohy a jejich možné praktické využití. Tuto problematiku jsme zúžili pouze na karcinomy endometria, jelikož nádory cervixu jsou řešeny v bakalářské práci Lenky Nespěchalové.

Vyhledali jsme informace ze zahraniční a české literatury, kterými jsme obohatili dosavadní rešeršní přehledné práce školícího pracoviště. Bohužel česká literatura nedisponuje tak bohatým množstvím studií jako zahraniční. Pozorovali jsme trend snahy českých pracovišť publikovat studie na podkladě zahraničních prací. Naší prací jsme navázali především na diplomovou práci Mareškové B., 2008.

V zásadní problematice PR, ER jsme získali shodné údaje s Mareškovou. Důležité je nejenom stanovení totálních hladin steroidních receptorů, ale především poměrů jejich isoform PRA/PRB, ER α /ER β . Obecně progesterony mají ochranný antiproliferativní účinek na endometrium, v detailu se jedná především o transkripční represí zprostředkovanou PRA isoformou. PRB naopak aktivuje transkripci ER α , která je zodpovědná za zvýšenou proliferaci. Právě PRB je významným faktorem pro nasazení progestinové terapie. ER β disponuje antiproliferativním efektem prostřednictvím represe ER α .

Z tohoto důvodu jsme se dále zaměřili i na jiné molekulárně biologické markery (Ki-67, bcl-2, c-erbB2, p53, PTEN, K-ras, GPR30, EphA2 a další), které by mohly objasnit blíže proces kancerogeneze v nádorech endometria. Hodnoty některých z těchto markerů totiž určitým způsobem korelují s hladinami ER, PR nebo s dalšími klinicko-patologickými parametry (věk, stádium onemocnění, histologický typ, histologický grade, hloubka myometrální invaze, postižení lymfatických uzlin). Tudiž i tyto markery jsou prognostickými faktory, které by mohly napomoci k vytipování určitých skupin pacientek a jejich zařazení do léčebných programů. Jedná se především o nádory, u nichž jsou hladiny ER, PR velmi nízké nebo o nádory, kde steroidní receptory nejsou exprimovány. Ve studiích jsme však našli informace o markerech, které se značně odlišovaly nebo doposud nebyly zcela vyjasněny (např. Her-2-neu, c-myc). Jejich význam by mohl být předmětem výzkumu v budoucích studiích.

V české i zahraniční literatuře byl popsán tzv. dualistický model, který rozděluje karcinomy endometria na dvě skupiny - a to na podkladu hormonální dependence, tedy nádory kde jsou či nejsou exprimovány ER, PR a četnosti výskytu dalších významných markerů. Určení hladin ER, PR by pravděpodobně mohlo být u karcinomů endometria standardní vyšetřovací metodou vzhledem k možnostem překrývajících se vlastností endometrioidních karcinomů endometria s neendometrioidními. V naprosté většině studií jsou karcinomy endometria s pozitivitou steroidních receptorů považovány za nádory s dobrou prognózou. Většinou se jedná o adenokarcinomy vyskytující se u mladších žen, s nízkým stádiem, s dobrou diferencovaností, bez výrazné myometrální invaze. Zde je důležité citlivě stanovit hranice positivity, aby výsledky nebyly zatíženy chybou, stejně tak je důležité brát na vědomí možnost vnesení falešné positivity nebo falešné negativity PR nebo ER (způsobené vlivem hormonální terapie, menstruačního cyklu).

Summary

We take up previous thesis of place of supervizor workplace, which are targeted on ER, PR expression in uterus carcinomas and their potencional practical exploitation by this thesis. We have limited this broad issue for only endometrial carcinomas, because the cervix ones are tackled in a thesis of Lenka Nespěchalová.

We have searched out information from abroad and Czech literatures to upgrade previous review thesis of the supervizor workplace. Unfortunately the Czech literature doesn't dispose of so much clinical studies as foreign ones. We have observed tendency of Czech work places to publish the studies on the strength of foreign experiences. We have take up especially Marešková B. thesis, 2008 by this our one.

We have brought out the same data of our issue as Marešková. It's important not only to established total levels of steroid receptors, but as well as rates of individual isoforms PRA/PRB and ER α /ER β . Generally, progesterons are noted for their protective antiproliferative effect in endometrium, in detail the transcriptional repression is mediated by PRA isoform. On the contrary, PRB isoform activates the transcription of ER α , which causes the increased proliferation. Exactly PRB is supposed to be significant factor for progestin treatment. On the contrary, ER β disposes antiproliferative effect, caused by repression of ER α .

Consequently we have targeted also on the importance of the other molecular biological markers (Ki-67, bcl-2, c-erbB2, p53, PTEN, K-ras, GPR30, EphA2 and the others), that could explain more the process of cancerogenesis of endometrial cancer. This is the cause of the fact, that the value of some higher described markers are associated in a specific way with levels of ER, PR or with clinical-patological characteristics (age, stage, histological type, grade, depth of myometrial invasion, infiltration of lymph nodes). That's why these markers are prognostic factors, that could facilitate to find out the specific groups of women and categorize them for different type of treatment. These groups include especially carcinomas, which are poor in ER, PR expression or carcinomas without expression of steroid receptors. Nevertheless, we have found information about some markers in different clinical studies, that where in contrast among each other or their signification have not been

made clear yet (for example Her-2-neu, c-myc). Their signification would be made clear probably in future clinical studies.

The so - called dualistic model was described there in abroad and as well as in Czech literatures, that classified endometrial tumors into two groups – according to hormonal dependence. It means – endometrial tumors in which ER or PR is or is not expressed and on the base of the frequency of the other significant markers. There is the possibility of an overlap of some characteristics of endometrioid and nonendometrioid endometrial tumors. Diagnosis of ER, PR should be standard laboratory screening method in endometrial tumors. Endometrial cancers with the positivity of steroid receptors are considered in absolute majority of studies as tumors with good prognosis. Most of cases are adenocarcinomas incident in younger women, with low stage, with the good (= high) differentiation, without significant myometrial invasion. It's very important to establish sensitively the correct boundaries (cut-of point) for the receptors positivity to prevent putting into outcome mistakes. In the same way it's necessary to know about possibility of false positivity or false negativity of ER or PR (caused by hormonal therapy, menstruation cycle).

2 Úvod – zadání práce

Cílem této práce je navázat na předešlé práce školícího pracoviště v problematice výskytu estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech dělohy, respektive nádorech endometria. Tato práce shromažďuje další, nové informace o nutnosti stanovování hladin ER, PR u nádorů dělohy. Mimo určení pozitivitu steroidních receptorů jsme se zajímali i o pozitivní nálezy jiných markerů a jejich případné korelace s ER, PR, které by mohly vést k bližšímu pochopení molekulárního pozadí endometriální kancerogeneze. Podstatou práce je shromáždění dat o dané problematice jak ze zahraničních zdrojů, tak českých a jejich srovnání. Výsledky této a podobných prací by měly sloužit jako podklad pro další výzkum v stále otevřených otázkách, cílenou identifikaci rizikových skupin pacientek, individualizaci léčby. Formou diplomové práce jsme se pokusili přispět k řešení otázky tím, že jsme vyhledali zahraniční poznatky o ER, PR a dalších markerech v karcinomech endometria, kterými by bylo vhodné ohohatit českou literaturu.

3 Teoretická část – obecně o buněčných regulacích nádorů

3.1 Kancerogeneze

Proces kancerogeneze je vícestupňový multietiologický proces, který je výsledkem působení jak vnitřních tak zevních faktorů. Přeměna zdravé buňky na buňku nádorovou vzniká v důsledku změn genetické informace na úrovni deoxyribonukleové kyseliny (DNA). K těmto mutacím dochází působením zevních faktorů (kancerogenních faktorů), kterými jsou ionizující záření, neionizující ultrafialové záření, kancerogeny a některé viry. Mezi kancerogenní faktory mimo jiné řadíme kokancerogeny (promotory), které samy o sobě nedisponují mutagenními schopnostmi, ale jsou schopné prohlubovat již vzniklé genetické změny a urychlit tak kancerogenezi. U dědičně podmíněných nádorů jsou genetické změny předávány skrze DNA v germinálních buňkách [38]. Další možností je spontánní tvorba v důsledku chybné kontroly buněčného cyklu, kdy dochází k několikanásobné mutaci základních regulačních oblastí (regulace proliferace, regulace apoptózy, regulace reparace DNA) [36].

Vyvolané genetické změny se však nemusí projevit funkčně. Existuje pouze minimální pravděpodobnost, že vznikne v buňce kombinace mutací v kritických genech, které způsobí selhání kontrolních mechanismů buněčné proliferace nebo buněčné smrti (apoptózy). Takto vzniklá progenitorová buňka při následujícím buněčném cyklu adekvátně nereaguje na zevní a vnitřní regulační mechanismy, způsobí vývoj klonu buněk s maligním potenciálem – klonální expanzi. Zhoubný nádor tedy není výsledkem pouze jediné somatické mutace, ale koincidence několika somatických mutací. Předpokládá se nutnost kumulace poruch 5 - 6 klíčových regulačních genů v jediné buňce, aby takováto buňka byla považována za nádorovou [38].

Proces kancerogeneze sestává ze čtyř hlavních fází: iniciace, promoce, neoplázie in situ a progresu. **Iniciace** je fáze, kdy dochází ke změně genotypu, který je přenosný na dceřiné buňky. Fenotyp buňky může být zcela beze změn. K iniciaci dochází vlivem onkogenních faktorů, anebo spontánně. Většina mutací je však

opravena nebo je buňka eliminována apoptoticky. **Promoce** může být definována narůstající buněčnou atypii, dediferenciací a dysplazií, což vyžaduje působení např. kokarcero-genů, růstových faktorů, virových infekcí apod. Ve třetí fázi, která se označuje jako **neoplázi in situ**, nacházíme atypické buňky s plnou genotypickou charakteristikou nádoru, kdy není zcela vyjádřen maligní fenotyp. Chybí především metastatická diseminace. Při **progresi** dochází k infiltraci do okolní tkáně a diseminaci do vzdálených tkání a orgánů (metastázy) [36]. Jiná nomenklatura definuje kokarcinogen tak, že jde o faktor totožný s komutagenem, který sám nezpůsobuje mutace, ale např. oslabuje reparaci DNA, čímž zesiluje účinky mutagenu. Kokarcinogen podle této nomenklatury není tedy promotorem. K promotorům se tedy řadí např. růstové hormony, neboť nemění genom (poznámka školitele).

Většina nádorů je monoklonálního původu - tzn. pochází z jediné transformované buňky. I přes tento původ se jednotlivé transformované buňky liší, hovoříme o nádorové heterogenitě, která je dána typickou nestabilitou genomu nádorové buňky a sníženou funkcí reparačního systému DNA. Tak vznikají nové mutace – v každé buňce jiná. Nádorová transformace je tedy nakonec procesem, který má za následek vznik populace nádorových buněk odvozených od několika klonů transformovaných buněk, které variabilně odpovídají na chemoterapii. V průběhu času dochází ke změnám v heterogenitě a tím změnám vlastností nádoru. Naopak: všechny zdravé somatické buňky jednoho organismu mají identický genom (výjimku tvoří např. lymfocyty).

V dospělém organismu je počet buněk a jejich fenotypický projev v neustálé dynamické rovnováze, na niž se podílí geneticky podmíněná proliferace, apoptóza a terminální diferenciacie buněk. Neoplastickou transformací dochází k narušení této rovnováhy, což se prezentuje jako nepoměr mezi proliferací a zánikem buněk s různými fenotypovými projevy, neomezenou replikační kapacitou (autonomní chování) a narušenou diferenciací (anaplazie). Většina neoplastických buněk je geneticky nestabilní kvůli snížené schopnosti reparace a náchylnosti k strukturálním chromozomálním aberacím. Neoplázie je tedy stav, kdy se buňky množí bez omezení a bez ohledu potřeb organismu a ztrácí kontrolu při kontaktu s okolními buňkami (kontaktní inhibice) – benigní neoplazie. V případě maligní neoplazie buňky

disponují schopností invazivity a kolonizací vzdálenějších lokalit (metastazování). Mezi základní vlastnosti každé nádorové buňky patří zvýšená proliferační aktivita, která není řízena regulujícími vnitřními ani vnějšími signály, buňka je navíc soběstačná v produkci růstových signálů. Programovaná buněčná smrt je značně potlačena a buňky nejsou schopny její aktivace. Všechny transformované buňky unikají z terminální diferenciaci (= z apoptózy). Schopnost dělení mají ve zdravém organismu (zjednodušeně řečeno) pouze nediferenciované buňky kmenové. Dělením kmenové buňky asymetrickou mitózou vzniká dceřiná buňka diferencovaná, z níž vzniká populace diferencovaných buněk a dceřiná buňka kmenová, která přechází do Go fáze. Plně diferencované zdravé buňky nejsou schopny dalšího mitotického dělení [36]. Proto pro růst i reparaci zdravých tkání je přítomnost kmenových buněk nezbytná. To samé však platí pro nádory. Jsou to právě kmenové buňky normálních tkání, které jsou častěji a snáze ovlivněny různými mutagenními vlivy [38].

U některých buněk se setkáváme s dalšími projevy: imortalita, zvýšená invazivita, neoangiogeneze, autonomie, nestabilita genomu. Takto pozměněné buňky exprimují jiné povrchové znaky – tedy abnormální glykolipidy, glykoproteiny, produkují jiné růstové faktory, hormony apod. [36].

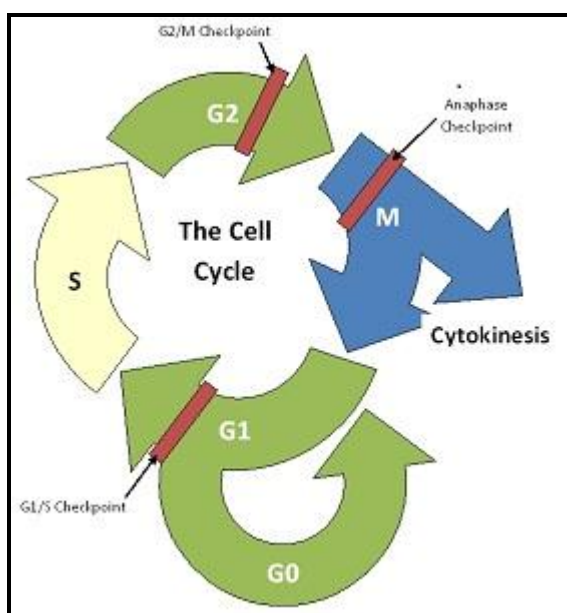
3.1.1 Buněčný cyklus

Buněčné dělení je jedním ze základních biologických fenoménů. Buněčný cyklus je obecnou vlastností každé buňky a ta je zakódována v její genetické informaci. Každá buňka tedy potenciálně disponuje s možností neomezené exponenciální reprodukce. U mnohobuněčného organismu musí být tento cyklus pod kontrolou mechanismů, které zajistí funkční integritu organismu jako celku. Regulace buněčného cyklu tedy závisí na vnějších faktorech, které označujeme jako signály z okolí [33]. Buněčná homeostáza dospělého organismu je dána neustálou rovnováhou mezi proliferační aktivitou a apoptózou.

Buněčný cyklus zahrnuje dvě klíčové fáze: **S - fázi** (syntéza DNA) a **M - fázi** (mitotické dělení). Mezi těmito fázemi se nacházejí 2 gap fáze (přípravné) - **G1**, která je charakterizována vysokou transkripční aktivitou a syntézou bílkovin, **G2**, která je charakterizována také zvýšenou syntézou proteinů (ale jiného typu) [36]. Tato doba se u různých buněk liší více než u buněk shodně diferencovaných,

ale právě u shodně diferencovaných jde převážně o variabilitu v délce G1 - fáze, v níž se nachází **hlavní kontrolní bod (uzel)**. Součet trvání S, G2 a M - fáze je v po sobě následujících děleních (tedy u stejných buněk) přibližně konstantní [33].

Buňky, které neproliferují, se nacházejí v G0 fázi - klidová fáze buňky (necyklující buňky). Neoplasticky transformovaná buňka se vymyká regulačním mechanismům buněčného cyklu – regulaci proliferace, regulaci apoptózy, regulaci reparace DNA. Buněčný cyklus disponuje třemi hlavními kontrolními body: na koncích gap fází a před anafází M – fází (viz. *obrázek 1*).

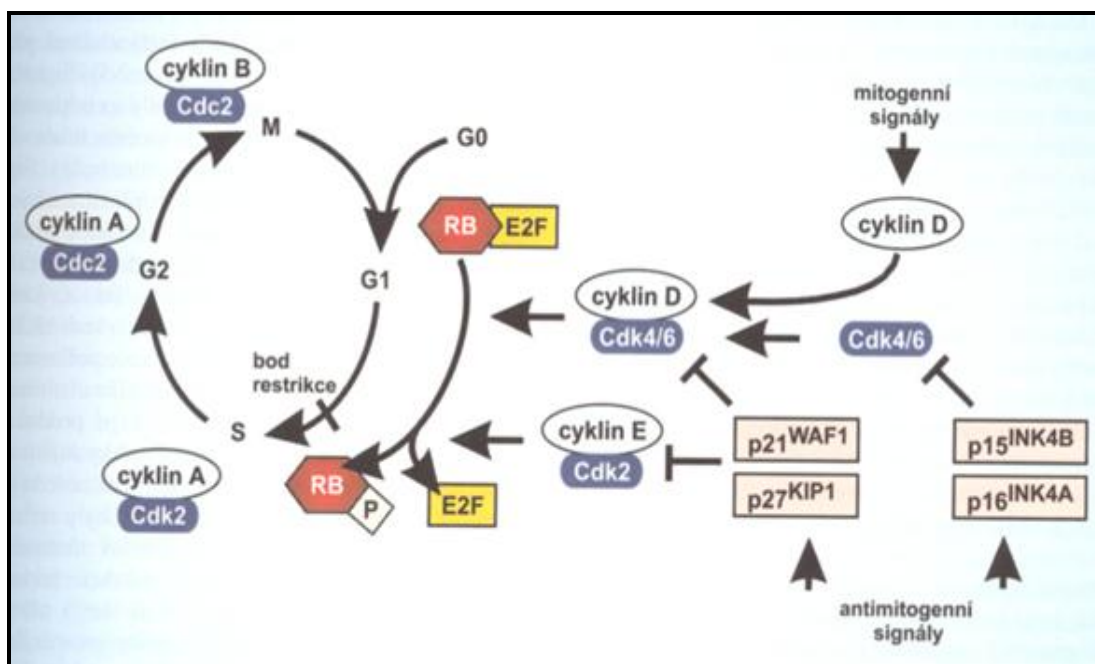


Obr. 1: Buněčný cyklus s kontrolními uzly [49]

Regulace je založena na dvou skupinách proteinů. První z nich jsou **cyklin dependentní kinázy (Cdk)**, což jsou enzymy, které fosforylují cílové proteiny v místě serinu a threoninu. Cdk se skládají z katalytické regulační podjednotky, přičemž katalytická funkce je vždy závislá - dependentní na přítomnosti pozitivního regulátoru **cyklinu**. Komplex cyklin - Cdk je schopen fosforylovat a tím aktivovat cílové substráty (např. DNA polymerázu). Hladiny Cdk jsou během buněčného cyklu relativně konstantní. Naopak hladina cyklinů kolísá v závislosti na fázi cyklu. Cykliny tedy fungují jako aktivátory Cdk a poté jsou rychle degradovány. Cyklické spojování a rozpad komplexu se během cyklu mění a tím je řízen buněčný cyklus [36], [1].

Je-li buňka v G0 fázi stimulována mitogenními signály, je indukována syntéza cyklinů D (D1, D2 či D3). **Cykliny D** asociují s **Cdk4 a Cdk 6** a zajišťují průchod buněčného cyklu fází G1. Cílem komplexu je fosforylace **RB** proteinu, čímž dochází k překlenutí bodu restrikce (1. kontrolní uzel). V pozdní fázi G1 je indukována syntéza **cyklinu E**, který tvoří komplex **E - Cdk2** a zajišťuje průchod S fází skrze hyperfosforylaci RB proteinu. Naopak hypofosforylovaný RB interaguje s transkripčními faktory z rodiny **E2F**, a tím blokuje jejich schopnost transkripce cílových genů, jejichž produkty jsou nutné pro S - fázi cyklu. Na počátku S - fáze se začíná syntetizovat **cyklin A**. Komplex **A - Cdk2** poté **A - Cdc2** jsou odpovědné za průběh G2 fáze. Na jejím konci se syntetizují **cykliny B**. Komplex **B - Cdc2** zahajují proces mitózy.

V případě antimitogenní signalizace dochází ke snižování hladiny cyklinů D, ale často také k vzrůstu hladiny některého z inhibitorů komplexů cyklin - Cdk (**p21**, **p27** apod.) nebo inhibitorů Cdk (**p15**, **p 16**). Těto koncepci odpovídá také skutečnost, že v mnoha buňkách v G0 - fázi jsou přítomny vysoké hladiny blokátorů p21 a p27 [1]. Regulace cyklu buňky je znázorněna na *obrázku 2*.



Obr. 2: Aktivace a inhibice cyklu buňky [1]

3.1.1.1 Onkogeny

Geny, jejichž translační produkty se podílejí na řízení buněčného cyklu a jejichž poškození vede ke kancerogenezi, řadíme do základních skupin: **1. protoonkogeny**, neboli zdravé geny regulující množení buněk **2. nádorové supresorové geny** (antionkogeny) [1]. **3.** důležitou skupinou potenciálních onkogenů jsou **geny odpovídající za stabilitu a opravy DNA** („strážci genomu“). K vzniku maligní transformace je v případě strážců genomu zapotřebí vyřazení obou kopií genů. Jejich mutace se však neprojeví v maligním fenotypu ihned, ale výrazně zvyšuje pravděpodobnost mutace protoonkogenů a antionkogenů [36]. Účinky produktů protoonkogenů a antionkogenů jsou protichůdné. Protoonkogeny kódují proteiny, které aktivují buněčný cyklus - stimulují proliferaci a diferenciaci, zatímco antionkogenní produkty je tlumí a udržují buňky v G0 - fázi [1]. Následkem mutace protoonkogenu může vzniknout promitotický signál způsobující rozvoj nádorového klonu. U protoonkogenů postačuje pro vznik aktivního onkogenu schopného nádorové transformace mutace jen v jedné ze dvou alel (tzv. **dominantní onkogen** nebo dominantní genotypový projev) [38]. Tyto aktivující mutace se vyskytují kromě několik málo výjimek pouze u somatických nádorových buněk [1]. Pro inaktivaci tumor supresorového genu je nezbytné funkční vyřazení obou alel (tzv. **recesivní onkogen**). Objev většiny nádorových supresorových genů je spojen s nalezením genů zodpovědných za vznik familiárních nádorů. Při těchto onemocněních dochází ke genetickému přenosu jedné mutované, nebo deletované alely tumor supresorového genu na potomka. Pro fenotypový projev onemocnění je nezbytné i poškození nebo delece alely genu od druhého rodiče, k čemuž dochází v průběhu života [38]. Tyto mutace se vyskytují jak v buňkách somatických, tak v heterozygotním stavu v buňkách zárodečných.

Mutace, které vedou k procesu kancerogeneze, lze rozdělit do 4 hlavních kategorií

➤ **Bodové mutace a malé změny v sekvenci nukleotidů** - jedná se o aberace, které zahrnují záměny, delece, inserce jedné nebo několika málo bází. Příkladem může být onkogen ras.

➤ **Amplifikace genů** - představují aberantní vytvoření více kopií téhož genu, který však nenesé jiné mutace [1]. Nejčastěji se jedná o chromozomální zlomy, kdy

odlomené části chromozómů postrádají centromeru, translokují se na jiný chromozom a při následujícím dělení je chybně rozdělen genetický materiál mezi buňky dceřiné, v jedné materiál chybí, v druhé je naopak amplifikován. Tyto mutace se často vyskytují u silně anaplastických a agresivních nádorů a pojí se se zhoršenou prognózou onemocnění. Jedná se např. o nadměrnou expresi N-myc u neuroblastomu a c-erb-2 u karcinomu prsu [38].

➤ **Aneuploidie** - změny v počtu chromozómů, a to ztrátou či získáním celých chromozómů. Jedná se o běžnou změnu, která navíc může reflektovat delecii nebo amplifikaci konkrétního genu. Příklad: ztráta chromozomu 10 u glioblastomu inaktivací nádorového supresoru PTEN.

➤ **Chromozomální translokace** - fúze různých chromozómů nebo jejich částí byla vysvětlena již u amplifikace nezměněných genů. Může však dojít i ke spojení (fúzi) normálního genu s přeneseným genem. Fúze dvou nesouvisejících genů mohou vést ke vzniku chimérického proteinu s transformovanými vlastnostmi [1]. Takovým příkladem je translokace genu abl z 9 chromozómu do oblasti genu bcr na chromozómu 22 u chronické myeloidní leukémie [38]. Onkogeny mohou být také vneseny do DNA prostřednictvím virového vektoru. Označení onkogenů je odvozeno jednak z typu nádoru, ve kterém jsou tyto geny aktivní, jednak z typu onkogenního viru, který onkogen vnáší do buňky. Onkogeny virového původu se označují předponou v- (**v-src**), onkogeny buněčné předponou c- (**c-myc**, **c-fos**, **c-ras**, **c-mos**,...). Dále se mohou onkogeny dělit podle toho, do kterého místa dráhy mitogenního signálu daný onkoprotein zasahuje.

3.1.1.2 Mitogenní a antimitogenní signalizace

Mitogenní bílkovinné signály tvořící komplikovanou a komplexní síť, které řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci, mají určitou funkci, stejně jako onkoproteiny v procesu kancerogeneze. Jde o signály:

- Růstových faktorů
- Receptorů pro růstové faktory
- Membránových přenašečů signálu
- Proteinkináz
- Transkripčních regulačních faktorů

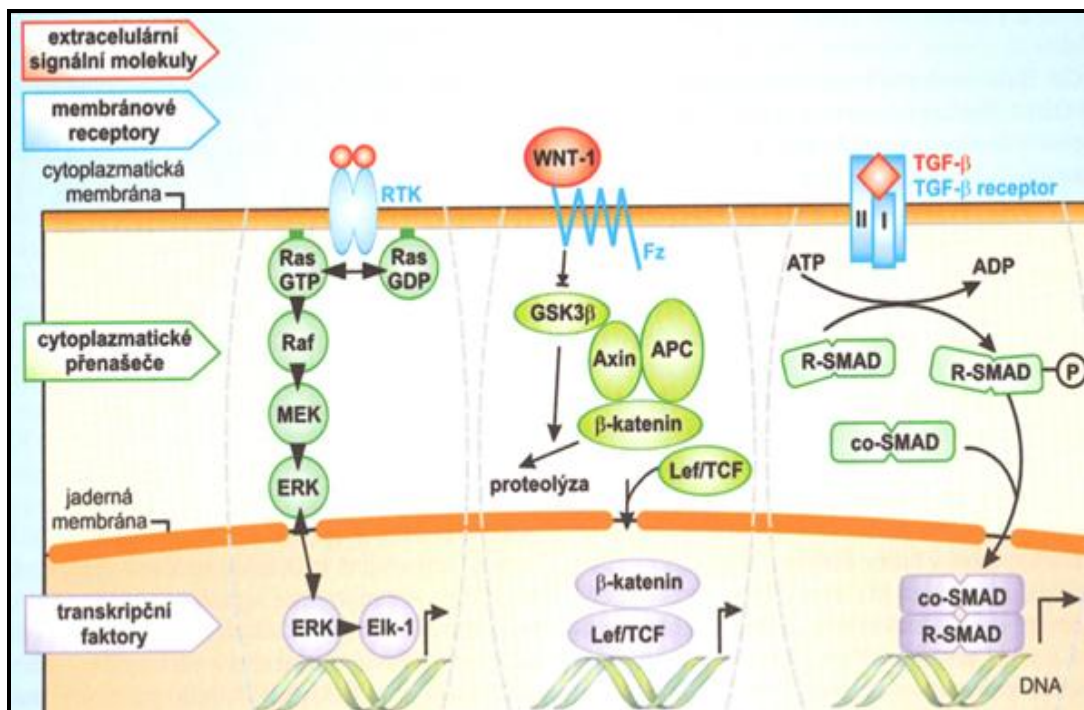
- Inhibitorů supresorových genů
- Blokátorů apoptózy [33]

Signální dráha začíná vazbou signální molekuly na membránový receptor. Receptor je vazbou ligandu aktivován a vysílá signál do nitra buňky. Signál je dále přenášen kaskádou cytoplazmatických intracelulárních přenašečů (signální transducery) a konečným akceptorem signálu je vlastní realizátor signální dráhy a tedy - transkripční faktor ovlivňující transkripci cílových genů.

Jednou z možností, jak se buňka může uvolnit ze závislosti na mitogenní signalizaci, je produkce vlastních růstových faktorů. Buňka je tak trvale stimulována k dělení aniž by reflektovala potřeby organismu. Příkladem může být produkce faktoru **PDF** („platelet derived growth factor“) či **TGF** („tumor growth factor“) [1].

Na úrovni membránového receptoru, jmenujme např. **EGFR** (receptor pro epidermální růstový faktor), **PDGFR** (receptor pro destičkový růstový faktor), **IGFR** (receptor pro inzulínu podobný růstový faktor), **NGFR** (receptor pro nervový růstový faktor), **CSFR** (receptor pro kolonie stimulující faktor), může dojít k několika různým mutacím. Nejznámější příčinou karcinogeneze na této membránové úrovni je patologická amplifikace receptoru, která neefektivně vychytává extracelulární signál. Příkladem je **EGFR/ErbB** (nádory žaludku, mozku, prsu) či **HER2/Neu** (nádory prsu, žaludku). Druhým případem je pozměněná struktura membránového receptoru. Receptor se tak stává nezávislým na vazbě ligandu, trvale tak vysílá signál do nitra buňky (např. zkrácené varianty EGFR) [1], [38]. Typickou onkogenní mutací vnitrobuněčného transduceru je mutace některého z genů **ras**, jehož produkt je součástí klíčové centrální mitogenní dráhy **MAP kináz** (taktéž dráha ERK kináz). Aktivace této dráhy vede k indukci exprese cyklinu D1. Mutace ras vede k trvalé aktivaci dráhy **Ras - Raf - MAPK**. Jako další příklad mutace na úrovni signální dráhy může sloužit WNT/ β -katenin (poškozena u kolorektálního karcinomu). Membránový receptor **Fz** je aktivován vazbou extracelulárního faktoru **WNT-1**, tím dochází k vstupu **β -kateninu** do jádra, kde spouští transkripci genů pro aktivní dělení buňky. Bez pozitivní signalizace je volný β -katenin v cytoplazmě degradován **APC** proteinem, ten však může být mutován. APC není tedy přenašečem signálu, ale jedná se o nádorový supresor. Signální dráha WNT/ β -katenin může být i příkladem poškození na úrovni transkripčního faktoru

(protoonkogenu) β -kateninu. Je způsobeno necitlivostí β -kateninu k APC a permanentní aktivaci transkripce cílových genů nezávislou na WNT-1 (viz. obrázek 3).



Obr. 3: Mitogenní a antimitogenní signalizace buňky [1]

Antimitogenní signalizace inhibuje proliferaci a posunuje buňky do G0 nebo klidové fáze. Regulace vstupu buněk do klidových stádií může být spojena s regulací buněčné diferenciace. Příkladem může být onkoprotein **Myc**. Signály indukující diferenciaci jsou za normálního stavu zprostředkovány komplexem transkripčních faktorů **Mad - Max**. V důsledku nadprodukce proteinu Myc může dojít k vytěsnění proteinu Mad a jeho nahrazení proteinem Myc. Vznikem komplexu Myc - Max dochází k zvrácení procesu diferenciace [1]. Mezi transkripčními faktory nalezneme kromě produktu onkogenu **c-myc** dále např. **c-fos** či **c-jun** nebo transkripční faktor **Ki-67** [38].

Signalizace extracelulárním růstovým faktorem **TGF- β** je příkladem další antimitogenní dráhy. Faktor asociuje s TGF- β receptorem a následně tak aktivuje cytoplazmatické proteiny **SMAD** k translokaci proteinů SMAD do jádra, kde indukují expresi některých inhibitorů buněčného cyklu (**p 15**, **p 21**). K poškození této

dráhy může dojít v několika různých krocích, podstatou jednotlivých mutací je však rezistence buněk k antiproliferačním signálům (viz. *obrázek 3*).

Významným nádorovým supresorem je tzv. “strážce genomu“ gen **p53**, jedná se o transkripční faktor, který reguluje transkripci řady svých cílových genů, k nimž patří inhibitor komplexů cyklin/ Cdk p21 či **mdm2**. Protein Mdm2 vazbou na p53 zprostředkovává jeho odbourávání a tím udržuje určitou nízkou aktivní hladinu p53. Aktivace p53 nefyziologickou aktivací onkogenů je zprostředkována genem **p14**. Na aktivaci p53 poškozením DNA se podílejí kinázy **Chk1**, **Chk2**, **ATM**, **ATR**. V případě mutace výše jmenovaných proteinů či amplifikací **mdm2** dochází k neregulované proliferaci buněk.

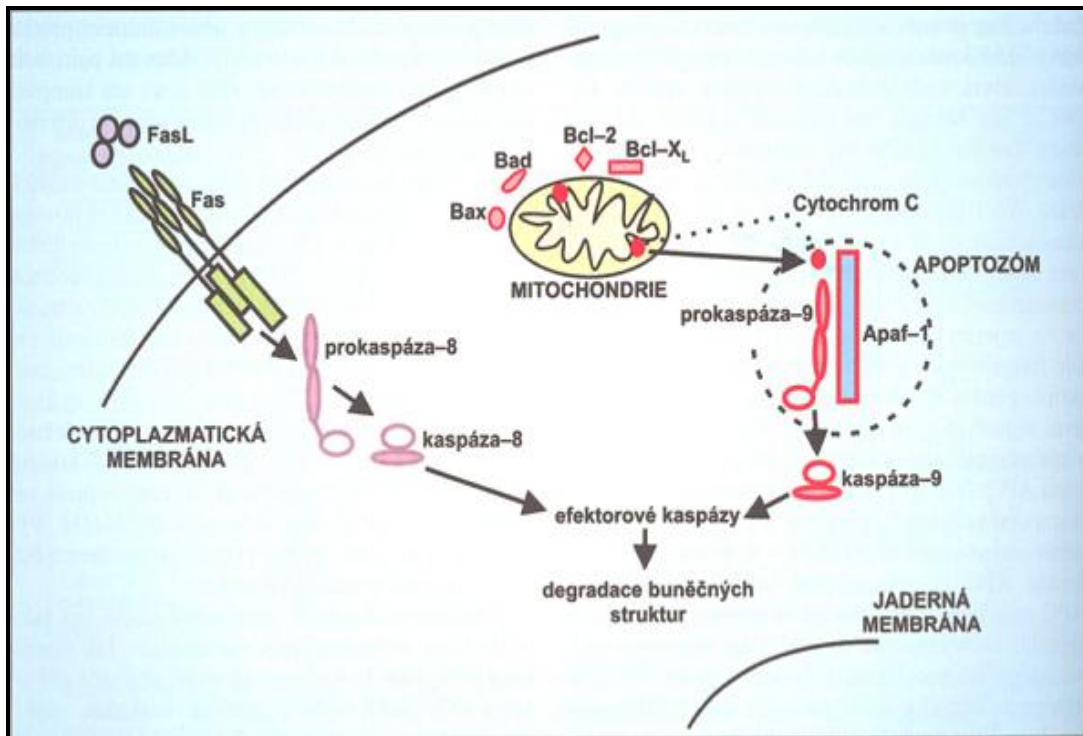
3.1.1.3 Apoptóza

K tomu aby buňka dospěla ke klonální expanzi je zapotřebí nejenom její vyvázání z regulace buněčného cyklu, nezávislost na mitogenních faktorech a rezistence k antimitogenní signalizaci, ale i poškození procesu apoptózy. Apoptotický program je latentně přítomen ve všech typech buněk. Jeho signalizační dráha je znázorněna na *obrázku 4*. Apoptóza je aktivována ve chvíli, kdy dojde k poškození jakéhokoliv procesu během buněčného cyklu extracelulárními signály. Vlastními efektory apoptózy jsou především intracelulární proteázy nazývané kaspázy, které jsou samy aktivovány proteolytickým štěpením iniciačními kaspázami. Signály, které spouštějí proces apoptózy, přicházejí buď z vnějšího prostředí či intracelulárních senzorů detekujících vlastní stav buňky.

Vnější dráha apoptózy je aktivována asociací extracelulárního ligandu (**FasL**, **TNF**) s receptorem smrti (**CD95/FAS**, **TNFR1**). Signál z aktivních receptorů smrti vede k aktivaci iniciační **prokaspázy-8** zahajující kaspázovou kaskádu. Senzitivita k apoptóze může být poškozena mutací např. Fas receptoru.

Vnitřní dráha apoptózy souvisí s permeabilitou mitochondriální membrány pro **cytochrom C**, což je iniciující protein této dráhy. Permeabilita je ovlivňována pro- a antiapoptotickými signály. Mezi negativní regulátory patří proteiny protoonkogenů z rodiny **Bcl-2** (**Bcl-2**, **Bcl-XL**). Do opačné skupiny řadíme proteiny nádorových supresorů **Bax**, **Bad**, **Bak**. Jestliže převyšuje proapoptotický potenciál, dochází k zvýšenému uvolňování cytochromu C. Ten je ve volném stavu nezbytný

spolu s proteinem **Apaf-1** a **prokaspázou 9** k vytvoření aktivního apoptozomu a spuštění kaspázovou kaskádou [1].



Obr. 4: Apoptotické signální dráhy [1]

3.1.1.4 Stárnutí buněk

Zdravé eukaryotní buňky mají v sobě zabudovaný vnitřní program, který je zcela autonomní, nezávislý na mezibuněčné signalizaci a ochraňuje tak buňku před nadměrnou replikací. Mitotické dělení je limitováno počtem 60 - 80 cyklů díky existenci telomer, což jsou repetitivní nekódující sekvence na koncích lineárních chromozómů. U člověka jsou tvořeny hexanukleotidy **TTAGGG**. Tyto sekvence se při každém dalším buněčném cyklu zkracují o 50 až 200 bází. Při dosažení kritické mitózy dochází k aktivaci signálních drah p53 a RB, kterými se cyklus zastavuje. Sekvence telomer však mohou být dosyntetizovány pomocí enzymu telomerázy, která je však ve zdravých lidských buňkách inaktivní. U 85 - 90 % maligních nádorových buněk dochází však k jejich reaktivaci. Zbývajících 10 - 15 % nádorových buněk s neaktivní telomerázou používá alternativní mechanismus k udržování délky telomer, jde o rekombinaci DNA - **ALT** (alternative telomere lengthening) [1], [33].

3.2 Klinická klasifikace nádorů použitá v diplomové práci

Nádory endometria z hlediska histogeneze:

Epiteliální nádory

- Adenokarcinom
 - Endometrioidní
 - Papilární
 - Sekreční
- Adenokarcinom s dlaždicovou složkou
- Clear cell karcinom
- Serózní papilární karcinom
- Spinocelulární karcinom (raritní)

Sarkomy těla děložního

- Leiomyosarkom (low a high grade)
- Endometrální stromální sarkom (low a high grade)
- Smíšené mesodermální nádory
 - Adenosarkom
 - Smíšený Mülleriánský (karcinosarkom) homologní
 - Smíšený Mülleriánský (karcinosarkom) heterologní [11]

Vyprávání nádorů (grading)

Diferenciace je jeden ze základních prognostických kritérií ke klasifikaci nádorů (viz. *tabulka 1*). Nádory vykazující menší diferenciaci jsou většinou senzitivní k chemické, radiační terapii, ale jejich chování je velmi agresivní a ohrožuje pacientův život v krátké budoucnosti. U sarkomů má grading nadřazené postavení před stagingem.

Tbl. 1: Grading nádorů [34]

GX	Stupeň diferenciaci nelze určit
G1	Dobře diferencovaný
G2	Středně diferencovaný
G3	Málo diferencovaný
G4	Nediferencovaný

Rozsah nádorů (staging)

Staging je základem pro utváření léčebné strategie a většinou určuje prognózu nemoci [38].

Mezi nejpoužívanější systémy v určení rozsahu nádorů jsou FIGO a TNM klasifikace, které shrnuje *tabulka 3*. Definice kategorií T, N, M odpovídají stádiím FIGO. Stádia FIGO jsou založena na chirurgickém stagingu a TNM stádia jsou založena na klinické a/nebo patologické klasifikaci. Klasifikace se používá pro karcinomy a maligní smíšené mezodermální nádory. Diagnóza by měla být histologicky ověřena a založena na podkladě vyšetření vzorků získaných biopsií endometria, s rozdělením karcinomů do podskupin dle histologického typu a gradingu. Kategorie T, N, M jsou stanoveny na podkladě daných vyšetření, které jsou popsány v *tabulce 2*.

Tbl. 2: Vyšetřovací metody pro klasifikaci TNM [34]

Kategorie T	Klinické vyšetření, zobrazovací vyšetřovací metody včetně urografie a cystoskopie
Kategorie N	Klinické vyšetření, zobrazovací vyšetřovací metody včetně urografie
Kategorie M	Klinické vyšetření, zobrazovací vyšetřovací metody

Klasifikace TNM, FIGO

T - Primární nádor

Tbl. 3: FIGO a TNM klasifikace [34]

TNM		FIGO
T1	Omezení na dělohu	
T1a	Preklinický invazivní nádor diagnostikovaný mikroskopicky	IA
T1a1	Stromální invaze ≤ 3 mm vertikálně a ≤ 7 mm horizontálně	IA1
T1a2	Stromální invaze > 3 mm a ≤ 5 mm vertikálně a ≤ 7 mm horizontálně	IA2
T1b	Klinicky viditelná léza ohraničená na dělohu	IB
T1b1	≤ 4 cm	IB1
T1b2	> 4 cm	IB2
T2	Šíření mimo dělohu, ne na distální třetinu pochvy, ale ne k pánevní stěně	II
T2a	Šíření na proximální 2/3 pochvy	IIA
T2a1	≤ 4 cm	IIA1
T2a2	> 4 cm	IIA2
T2b	Šíření do parametrií	IIB
T3	Šíření mimo dělohu, rozvoj hydronefrózy, afunkce ledviny	III
T3a	Šíření na distální třetinu pochvy, ne k pánevní stěně	IIIA
T3b	Šíření k pánevní stěně a/nebo hydronefróza, a/nebo snížená funkce ledvin	IIIB
T4	Šíření na sliznici močového měchýře/sliznici rekta/mimo malou pánev	IVA
N1	Postižení regionálních uzlin	IIIB a výše
M1	Vzdálené metastázy	IVB

N - Regionální mízní uzliny (jejich hodnocení shrnuje *tabulka 4*)

- Uzliny pánevní
 - Hypogastrické (obturatorní a vnitřní ilické)
 - Společné a zevní ilické
 - Parametriální a sakrální
- Uzliny paraaortální

M - Vzdálené metastázy (jejich hodnocení shrnuje *tabulka 4*)

Tbl. 4: Postižení regionálních mízních uzlin a vzdálené metastázy [34]

N - Regionální mízní uzliny	
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	V regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	Metastázy v regionálních
M - Vzdálené metastázy	
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Nejsou vzdálené metastázy
M1	Vzdálené metastázy

pN0 - jsou - li mízní uzliny negativní, ale nebylo dosaženo standardně vyšetřovaného počtu (10 a více mízních uzlin získaných z pánevní lymfadenektomie), klasifikujeme je jako pN0.

Kombinace jednotlivých symbolů T, N, M tvoří stádia s rozdílnou prognózou nemoci (viz. *tabulka 5*) [34].

Tbl. 5: Stádia dle TNM [34]

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
Stadium IB	T1b	N0	M0
Stadium IC	T1c	N0	M0
Stadium IIA	T2a	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N0	M0
Stadium IIIA	T3a	N0	M0
Stadium IIIB	T3b	N0	M0
Stadium IIIC	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IVA	T4	Jakékoliv N	M0
Stadium IVB	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

4 Praktická část – buněčné regulace u endometriálních karcinomů

4.1 Česká literatura

4.1.1 Diplomové a bakalářské práce školícího pracoviště

Diplomová práce Mareškové (2008) pojednává o aplikaci některých poznatků z oblasti léčby nádoru prsu na léčbu endometriálního karcinomu (hormonálně závislého), opírá se o řadu podložených klinických studií a výzkumů. Cílem je doplnit českou odbornou literaturu o poznatky zahraničních prací, které se touto problematikou zabírají detailněji.

K tomu, aby byla léčba úspěšná, je třeba zhodnotit dané parametry, které indikují jednotlivé pacientky k určité terapii, ale mají i důležité predikční opodstatnění. Jedná se mimo jiné o určení ER (estrogenových receptorů) a PR (progesteronových receptorů); tedy hormonální závislost karcinomu a jejich isoform [53], [42], [27].

Pozitivita nádoru na ER nás informuje o vysoké diferencovanosti a tedy velmi dobré prognóze, která je typická pro mladší pacientky. Naopak, u starších žen se častěji setkáváme s karcinomem ER (-), s vysokým gradingem a se špatnou prognózou [19], [27]. Tato fakta o endometriálním karcinomu však nemůžeme aplikovat na karcinom cervixu, kde bylo zatím ve starších pracích prokázáno, že receptorový stav (ER i PR) nevykazuje korelaci s délkou přežití [29], [27]. Z hlediska novějších prací o karcinomech krčku se tímto problémem zabývá zatím nehotová bakalářská práce Lenky Nespěchalové.

4.1.1.1 ER a jeho isoformy

ER však existují ve dvou isoformách - alfa, beta sestávajících z několika strukturních a funkčních jednotek. Z hlediska regulace je ER alfa odpovědný za vyšší invazivitu karcinomu prsu. ER beta je jakýmsi regulátorem proliferativního potenciálu ER alfa ve smyslu snížené proliferace [51], [27]. Důležitý je fakt, že ER α se nachází na chromozómu 6q, zatímco ER β je lokalizován na chromozómu 14q [14], [23].

Isoformy ER jsou však v různých poměrech exprimovány v jednotlivých tkáních. Ligandy pro tyto receptory mají různou afinitu k receptorovému místu, dále se liší změnou efektorové oblasti ER, která vede k spuštění transkripce (AF-1, AF-2). Většina selektivních modulátorů ER (SERM) aktivuje ER β isoformu a spouští transkripci skrze AF-1 [40], [27]. AF-1 je tzv. transaktivační, ligandově nezávislá doména, která obsahuje koregulační oblast vázající koaktivátory i korepresory. Ty poté modifikují transkripci ER. Tato funkční doména může být aktivována např. cAMP, dopaminem, EGF, IGF atd.

Zásadní význam má také proces heterodimerizace (ER β /ER α), díky kterému buňka může limitovat okamžitou odpověď na neestrogenní signály, a tudíž potlačit signalizaci růstovými faktory zprostředkovanou ER α . ER β obvykle disponuje slabou na ligandu nezávislou transkripční aktivitou ve srovnání s homodimerem ER α /ER α . AF-2 doména obsahuje represorové estrogenové aktivity (REA) a mimo jiné jsou zde opět lokalizována vazebná místa pro koregulatory a korepresory [14], [23].

Pokud půjdeme do detailů, ER beta má ještě pět sestřihových variant, z nichž jediná ER beta2/bcx nemá DNA-aktivační funkci (AF-2), čímž ovlivňuje negativně funkce ER alfa. Právě u karcinomů endometria byla hodnota koncentrace ER beta2/bcx v poměru k ostatním prokazatelně snížena [17], [27].

Přestože bylo identifikováno velké množství alternativních sestřihových forem, pouze nepatrné procento je přeloženo translací do jazyka proteinů, což se odráží v nízkém množství nalezených mutací. ER β bcx má potenciálně klinický význam jak na úrovni mRNA tak i proteinu. Stejně jako většina alternativních splicingových (= sestřihových) forem, má i ER β bcx fyziologickou funkci. Jeho hladiny se mění během menstruačního cyklu. V lamina functionalis se snižují a opačně je tomu ve vrstvě bazální. Existuje také řada sestřihových variant druhé isoformy. Splicingová varianta ER α s delecí exonu 5 je kromě karcinomu prsu také ve značné míře nacházena v endometriálním karcinomu [14], [23].

4.1.1.2 Problematika PR

Naopak literatura o PR vychází ze základního faktu, že progesteron má ochrannou funkci proti hyperplazii navozené estradiolem, pakliže hovoříme o karcinomu endometria. Stimulace PR vede k snížení hladiny ER v periferních

tkáních [2], [27]. V případě karcinomu prsu či cervixu jsou však progestiny účinné jako kofaktory kancerogenity [32], [27]. Rizikovým faktorem pro vznik karcinomu endometria je dlouhodobá stimulace samotnými estrogény. Proto je v dnešní době hormonální substituční terapie (HRT) kombinována vždy s odpovídající dávkou gestagenů. Problém nastává i u žen, u kterých menopauza nastupuje ve vyšším věku, jelikož jsou delší dobu vystaveny působení endogenních estrogenů. Dlouhodobá terapie kombinovanou hormonální antikoncepcí (HAK) má signifikantně protektivní vliv na vznik karcinomu endometria [4], [27].

Důležitým faktorem pro použití progestinové terapie je poměr PRA : PRB. Snížená hladina PRB poukazuje na obraz špatně diferencovaného nádoru, kde bude špatná odpověď na progestinovou terapii [24], [27]. PRA vede k nadměrné proliferaci a inhibuje aktivitu PRB, který je cílovým receptorem pro ochranný vliv progestinů [7], [3], [27]. Nejefektivnější by tedy bylo vyšetřovat hladiny PRB.

4.1.1.3 Artefakty při vyšetření ER a PR

Vyšetření receptorů může být zatíženo určitými chybami. Jde například o vliv některých hormonů při HRT na hladiny receptorů. Totéž se týká rozdílů funkce vaječnicků mezi mladými a starými pacientkami [19], [27]. Význam nepostrádá ani vliv menstruačního cyklu na hladiny ER a PR, kdy výsledky mohou vyjít falešně negativní či pozitivní. Během fáze proliferativní se hladiny snižují naopak je tomu u sekreční fáze [37], [15]. U karcinomu prsu premenopauzálních žen je operace naplánována na to stádium ovariálního cyklu, které je nejvhodnější. U karcinomu endometria se naopak může stát, že operace je vynucena život ohrožujícím krvácením bez ohledu na to, ve kterém stádiu cyklu by byla nejvhodnější [9].

4.1.1.4 Léčba

Současná léčba se odvíjí od charakteru karcinomu endometria. Standartem je chirurgický výkon, který je u rizikových pacientek doplňován radioterapií [4], [27]. V případě dobře diferencovaného nádoru, pokud jde o recidivy a pokročilé stádium, je volena dlouhodobá hormonální terapie gestageny. Megestrol acetát tlumí sekreci hypofyzárních hormonů a má přímý cytotoxický efekt. Nejběžněji používaný je medroxyprogesteron acetát. Vysoký grading, metastatické formy či selhávající

hormonální terapie jsou indikací pro chemoterapii [19], [27]. Pozitivita PR předurčuje pacientky k progestinové léčbě, která je prakticky v případě karcinomu dělohy (narozdíl od prsu) zatím jedinou hormonální farmakoterapií v praxi, ostatní se zatím nacházejí ve fázi klinických studií [2], [22], [27].

V klinickém výzkumu se nachází řada nadějných léčiv působících na ER. Mezi ně patří SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) druhé a třetí generace, které se používají v léčbě rakoviny prsu - (raloxifen), arzoxifen, ERA 923, EM 652. Mají estrogen antagonistický efekt v endometriu a prsu, ale agonistický efekt v lipidovém a kostním metabolismu [40], [27].

Velmi nadějným se zdá být i čistý antiestrogen ICI 182, 780 (fulvestrant), který má vliv mimo jiné na angiogenezi. To vede k názoru možného použití nejen u ER (+), ale i u non - hormon dependentního karcinomu endometria [25], [39], [27].

Tamoxifen, který je hlavním zástupcem SERM (1. generace), není použitelný v léčbě karcinomu endometria, jelikož zvyšuje pravděpodobnost jeho vzniku u pacientek s karcinomem prsu s původně zdravou dělohou [2], [27]. Otázkou je, zda - li tomu tak je z důvodu agonistického efektu na ER či přímého genotoxického efektu [16], [27]. Podle pokusů na holých bezbrzlíkových myších má tamoxifen slabý estrogení efekt, protože u hormon-dependentního nádoru endometria zrychloval jeho růst téměř jako 17 beta - estradiol. A taktéž zvyšoval hladinu PR [43], [35], [27]. U pacientek tento efekt nebyl tak výrazný, ale přesto u postmenopauzálních žen byla zjištěna snížená koncentrace ER v porovnání s ostatními, což vypovídá o mírném estrogenům podobném charakteru [5], [27]. Z důvodu zvýšení hladiny PR se někteří autoři domnívali, že by mohla být vhodná kombinovaná léčba s progestiny, tato teorie však selhala [12], [43], [27]. Tamoxifen byl prohlášen za karcinogen I. třídy pro člověka, poté co vyvolal opakovaně v potkaních jaterních buňkách vznik mikrojader a dále v MCL-5 buňkách in vitro a v játrech potkana in vivo chromozomální aberace. U toremifenu, analogu tamoxifenu, byla prokázána tatáž genotoxicita, ale vliv na ER endometria nikoliv [16], [27].

Další skupina léků, která by mohla být vhodná pro terapii, jsou inhibitory aromatázy především třetí generace. Studie potvrdily, že nejeví žádné nežádoucí účinky vůči endometriu [31], [27]. Mechanismus účinku je založen na inhibici

konverze androgenů aromatizací na estradiol a estron v periferních tkáních, vaječnicích, nadledvinkách a v diskutovaných nádorech [25], [27].

Potlačit tvorbu estrogenů je také možné pomocí inhibice steroidní sulfatázy. Avšak předchozí diplomantky doposud nenašly údaj, ve kterém by byly tyto inhibitory použity v praxi. Jedná se o enzym, který svým hydrolytickým účinkem převede estrogen - sulfát na aktivní formu narozdíl od estrogen sulfotransferázy, jež tento hormon inaktivuje zpět. Proto nás zajímá poměr SS : EST (steroidní sulfatáza : estrogen sulfotransferáza), který odpovídá klinickým výsledkům pacientek. Avšak korelace tohoto poměru s dalšími faktory (grading, Ki-67, ER, PR) nebyly prokázány [50], [27].

V léčbě karcinomů endometria, které byly navozeny tamoxifenovou léčbou, se z hlediska pokusů na buňkách adenokarcinomu endometria a hormonálně dependentních buňkách rakoviny prsu, jeví perspektivní inhibitory FASN (enzym syntetizující poslední krok v biosyntéze mastných kyselin) či RNAi zacílená na gen FASN. Inhibice FASN podporuje apoptózu u karcinomu endometria i prsu. Regulační snížení hladiny ER a také antagonizace transkripční aktivity závislé na estradiolu a tamoxifenu jsou u karcinomu prsu opačné než u karcinomu dělohy [26], [27].

Genoterapie, která by vnesením genů PRB mohla vést k potlačení proliferace a zcitlivění k progestinové léčbě, je v současnosti zkoumána, i když ne ve validních studiích na pacientkách [6], [7], [45], [27].

4.1.2 Česká internetová a časopisová literatura popisující molekulárně-biologické výsledky zahraničních studií o karcinomu endometria

Nejčastějším gynekologickým zhoubným nádorem v České republice je endometriální karcinom, jehož incidence se neustále zvyšuje. Tento růst je zapříčiněn vyšší incidencí nadváhy, neoponovanou exogenní estrogenovou terapií, diabetem mellitem, syndromem polycystických ovárií apod. [41].

Podle [30] se nejčastěji v literatuře setkáváme s dualistickým modelem endometriálního karcinomu. Dědičnému modelu, který často bývá spojen s non-polypoidním kolorektálním karcinomem (HNPCC), je připisováno pak již jen

10 % případů všech karcinomů. O tomto modelu nemáme doposud dostatek informací. Hlavní vliv na vznik karcinomu má inaktivace komplexu MSH2/MSH6. Jedná se o proteiny opravující mikrosatelitovou nestabilitu (MSI). Lynchův syndrom (HNPCC) se podobá do značné míry sporadickému typu 1, jelikož z histologického hlediska je mucinózního či endometroidního typu. Odlišnost nacházíme v tom, že je způsoben mutací zárodečných buněk. Až u 90 % takovýchto pacientek dochází k ztrátě exprese proteinů MLH1 a MSH2 a mutaci PTEN. Jedná se o homolog fosfatázy a tenzinu, který při zvýšené expresi vede k bloádě G1 fáze buněčného cyklu.

Zbýlých 90 % je označováno za sporadické nádory, ty se liší hormonální závislostí na ER a tedy i svým fenotypem a biologickou aktivitou. Přibližně 70 - 80 % sporadických nádorů jsou na ER závislé a označujeme je jako typ 1. Z histologického hlediska se jedná o velmi dobře diferencované endometroidní nádory výjimečně o mucinózní adenokarcinomy. U tohoto typu byl vysledován postupný vývoj z prosté hyperplazie přes komplexní až k atypické hyperplazii, která je ukončena vznikem novotvaru. Tato teorie se dá podložit řadou faktů. V endometriálním karcinomu pozorujeme více genetických alterací, přičemž některé z nich se shodují s těmi, které jsou v atypické hyperplazii. Čím vyšší je dediferenciace nádoru, tím je počet genetických alterací větší. Jen nepatrné množství prostých hyperplazií progreduje přímo do karcinomu.

Typ 2, tedy na ER nezávislý karcinom, je většinou spojen s vyšším věkem pacientek. Hovoříme o non-endometroidním karcinomu, většinou serózního typu nebo z jasných buněk na podkladě atrofizace endometria. Prognóza je podstatně horší než u typu 1, jak tomu je naznačeno u práce Deligdische a kol. Za prekursor serózního karcinomu (označení pro typ 2) je považován intraepiteliální karcinom (EIC), kdy dochází ke ztrátě jedné alely p53. Při ztrátě druhé alely dojde k rozvoji serózního nádoru.

Více prozkoumaným je sporadický typ 1. Nukleární receptory ER a PR přímo aktivují cílové geny tím, že modulují jejich expresi. Vykazují však i nepřímý efekt a to vazbou na transkripční faktory jako například AP-1 (c-fos, c-jun) nebo NF-kB. Na kancerogenezi typu 1 se často podílí nerovnováha mezi expresí podtypů ER α /ER β či chybně transkribované proteiny odvozené od ER α , ER β .

Poměr isoformů PRA, PRB se také podílí na vzniku endometriálního karcinomu. PRA je odpovědný za negativní regulaci estrogenové aktivity skrze inhibici ER α zatímco isoforma B je agonistou estrogenu. ER α a ER β regulují velkou škálu růstových faktorů, které jsou odpovědné za endometriální proliferaci (epidermální růstový faktor - EGF, transformující růstový faktor - TGF α a β , bazální fibroblastový růstový faktor - bFGF, inzulinu podobný růstový faktor I - IGF-I) [30].

Nadměrná exprese **p53**, dle mnohých zahraničních autorů, má souvislost s nepříznivými prognostickými faktory u žen s primárním EC. Zvýšená imunoreaktivita p53 může predikovat rekurenci EC. P53 je jediným potenciálním markerem schopným predikovat vzdálené metastázy. Vyšší exprese je pozorovatelná v serózních a světlobuněčných nádorech, tedy nádorech s horší prognózou. Přičemž G3 tumory se blíží více charakteru seróznímu papilárnímu karcinomu než endometrioidnímu. G3 tumory nejspíš vykazují jinou cestu kancerogeneze.

Bcl-2 je antiapoptotický gen, jehož exprese se fyziologicky zvyšuje během proliferativní fáze menstruačního cyklu, opačně tomu je v sekreční fázi. Tento marker je odpovědný za časnou fázi kancerogeneze. V řadě studií bylo potvrzeno, že exprese bcl-2 se zvyšuje u hyperplazie endometria, opačně tomu je v EC. Ztráta exprese koreluje s horší prognózou, horším klinickým stádiem, hloubkou myometrální invaze a postižením lymfatických uzlin. Exprese bcl-2 je částečně regulována estrogenem a p53. Právě pokročilé nádory jsou spojovány se ztrátou ER a mutací p53, což vysvětluje ztrátu exprese onkogenu. V některých studiích nebyla nalezena souvislost exprese bcl-2 s gradem, hloubkou myometrální invaze a postižením lymfatických uzlin. Významná korelace mezi expresí bcl-2 a ER, PR byla již mnohokrát potvrzena v zahraničních studiích. Jde o možný významný negativní prognostický faktor pro pacientky.

Nadměrná exprese **Ki-67** souvisí s proliferační aktivitou. Většina EC exprimuje nízký proliferační index a má příznivou prognózu, u serózních a světlobuněčných tumorů je tomu opačně. Mnohé práce hovoří o Ki-67 jako nezávislém prognostickém indikátoru přežití, jehož zvýšená exprese Ki-67 koreluje s gradingem, hloubkou myometrální invaze a rizikem rekurence. Jsou však i studie, kde tato fakta nebyla prokázána.

Údaje o amplifikaci a expresi **c-erbB-2** v EC se značně v jednotlivých studiích liší. Podle některých prací zvýšená exprese koreluje s gradingem, hloubkou myometrální invaze a pokročilým stádiem onemocnění. Pravděpodobně zvýšená exprese markeru je pozdní událostí u endometriálního karcinomu, naopak u serózního a karcinomu z jasných buněk se jedná o časnou událost. Zvýšené pozitivní barvení markeru by potenciálně mohlo souviset s predikcí vzdálených metastáz a horší celkovou prognózou. V další rozsáhlé studii byl c-erbB-2 označen za nezávislý prognostický faktor korelující s horším přežitím. Informace jsou často nejednoznačné, a proto je třeba provést další studie. Amplifikace a zvýšená exprese onkogenu HER-2/neu je statisticky významně spojena s pokročilým stupněm onemocnění a nižším stupněm histologické diferenciacie jen u některých nádorů (karcinom prsu). U nádoru endometria tato korelace nebyla doposud jasně prokázána.

Naopak u většiny autorů byla prokázána jasná korelace mezi přítomností a množstvím **ER**, **PR** a stagingem, gradem a přežitím. Naopak absence ER, PR je negativním prognostickým faktorem agresivního růstu a špatné prognózy [28]. Dle některých autorů je významnějším faktorem PR, jehož exprese koreluje s metastatickou propagací do lymfatických uzlin [41].

Produkce matrix metaloproteináz je vyvolána zánětlivým či nádorovým procesem. Byla prokázána zvýšená exprese **MMP-7** korelující s horším klinickým stádiem nemoci a přítomností lymfatických metastáz. Funkce **MMP-26** je odlišná, její exprese specificky kolísá během cyklu. Vysoké hladiny můžeme sledovat uprostřed cyklu a v hyperplastickém endometriu naopak nízké hladiny nakonci cyklu či v EC, z čehož vyplývá korelace s ER. K odlišnému výsledku dospěla jiná studie, která popisuje zvýšenou expresi MMP-26 v nízce diferencovaném EC [28].

4.1.3 Česká internetová a časopisová literatura o klinických a laboratorních výsledcích českých autorů

Cílem práce Pilky a kol. (2008) bylo stanovit imunohistochemickou metodou expresi molekulárně biologických markerů a jejich korelaci s klinicko-patologickými faktory endometriálního karcinomu, které by vedly k odpovídající léčbě jednotlivých pacientek.

Mezi již běžně používané prognostické faktory patří: věk, parita, stádium onemocnění, histologický typ, histologický stupeň malignity (grade), hloubka myometrální invaze, DNA ploidita, vaskulární invaze a postižení lymfatických uzlin. Standardně se určuje hladina ER a PR, která koreluje inverzně se stupněm diferenciací nádoru a klinickým stádiem onemocnění dle názoru Pilky, ale i řady výsledků zahraničních studií. Expres ER, PR v české studii však nedosáhla statistické významnosti v závislosti na klinicko-patologických parametrech [41]. V práci Markové byl patrný trend inverzní korelace PR s klinickým stádiem III – IV a horší diferenciací nádoru [28].

Pilkova studie sledovala tkáňové řezy 103 pacientek o průměrném věku 67 let, u nichž byl diagnostikován primární endometriální karcinom, který před operací nebyl léčen. Kromě již zmíněných steroidních receptorů byly detegovány další biologické markery: p-53, bcl-2, HER-2/neu, Ki-67. Byla stanovena vzájemná závislost mezi imunohistochemickým barvením zhodnoceným pomocí histoskóre, věkem, histologickým stupněm malignizace, hloubkou invaze, klinickým stádiem a metastatickou progresí [41].

Cílem studie Markové a kol. bylo imunohistochemicky stanovit expresi molekulárně biologických markerů - p53, bcl-2, c-erbB-2, Ki-67, ER, PR, MMP-7 (matrix metaloproteinázy-7) a MMP-26 (matrix metaloproteinázy-26); zhodnocení vztahu mezi pozitivitou steroidních receptorů a ostatními markery a korelace všech biomarkerů s klinicko-patologickými charakteristikami endometriálního karcinomu. Studie se účastnilo 154 pacientek s primárně neléčeným karcinomem endometria v období od září 2001 do března 2009 [28].

Pozitivita jednotlivých markerů byla následovná: p53 - 49 pacientek (48 %), bcl-2 - 81 (79 %), HER-2/neu - 18 (17 %), Ki -67 - 99 (96 %), ER - 73 (70 %),

PR - 87 (84 %). Studie neprokázala závislost mezi imunohistochemickými parametry a věkem žen [41]. Jediný marker, který koreloval s věkem pacientek, byla MMP-7, kdy ve skupině pacientek s věkem pod 65 let byla signifikantně vyšší pozitivita tohoto markeru [28].

Zvýšená exprese p-53 a Ki-67 korelovala se špatnou diferenciací, hloubkovou invazí do myometria, pokročilým klinickým stádiem a metastatickou propagací [41]. Statisticky významná závislost ve smyslu vyšší positivity p-53, Ki-67 byla v druhé práci popsána ve zúžené skupině pacientek G3. Dále byl pozorován trend zvýšené exprese c-erbB-2 a Ki-67 při myoinvazi nad 50 % tloušťky myometria [28].

V Pilkově studii nebyla nalezena souvislost mezi Bcl-2 a uvedenými klinickými parametry [41]. Procento bcl-2 pozitivních endometriálních tumorů bylo signifikantně vyšší ve skupině pacientek ER + i PR + [28]. V práci Pilky a kol. byla prokázána zvýšená exprese HER-2/neu u nádorů s hlubší myometrální invazí [41]. Překvapivým výsledkem byla statisticky významná korelace mezi ER a c-erbB-2, kdy ve skupině ER + byla signifikantně vyšší pozitivita tohoto markeru [28].

4.2 Zahraniční literatura

4.2.1 Zahraniční přehledné sdělení – klinicko-patologické faktory ve vztahu k morfolologii ECs a prognóze

Morfologie ECs spolu s dalšími klinicko-patologickými faktory vytváří dvě skupiny CEs, které byly na základě dualistického modelu popsány v kapitole 3.1.2. Míčkovou a kol., 2006, proto zde uvádíme jen informace, které jsou doplněním této kapitoly a tuto problematiku shrnujeme přehlednou *tabulkou 6*.

Tbl. 6: Zastoupení klinicko-patologických charakteristik a genetických abnormalit u typu 1 a typu 2 EC [10]

Klinicko-patologické charakteristiky	Typ 1 (EECs) Endometrioidní endometriální karcinomy	Typ 2 (NEECs) Non-endometrioidní endometriální karcinom
Neoponovanování estrogenům	ANO	NE
Stav endometria	Hyperplazie	Atrofie
Morfologie nádoru	Endometrioidní	Serózní, z jasných buněk
Mikrosatelitová nestabilita	20 – 40 %	0 – 5%
Mutace p53	10 – 20 %	90 %
Mutace β -kateninu	31 – 47 %	0 – 3 %
Mutace K-ras	15 – 30 %	0 – 5 %
PTEN inaktivace	35 – 50 %	10 %
Mutace Her-2/neu	Nedostatek informací	18 – 80%

Fakta jak epidemiologická tak molekulární podporují představu, že endometriální hyperplazie je předstupněm endometrioidního adenokarcinomu. Naproti tomu NEECs (neendometrioidní) jsou často spojovány s intraepiteliálním karcinomem.

Molekulární genetika EECs (endometrioidních karcinomů)

1. DNA - mismatch repair geny (reparační geny typu mismatch) a mikrosatelitová nestabilita

Postupná akumulace alterací mikrosatelitových oblastí chromozomu (MSI = mikrosatelitová nestabilita) u kritických regulačních genů může vést k procesu kancerogeneze.

2. Onkogeny

2. 1. K-ras

K-ras gen kóduje signální proteiny s GTP – ázovou aktivitou. Fungují jako molekulární spínače během signalizace a mají vztah k růstu a diferenciaci buňky. Mutace v K-ras byly také častěji nalezeny v MSI - pozitivních tumorech, což naznačuje, že obě mutace se mohou vyskytovat současně před klonální expanzí. Tyto mutace jsou taktéž detekovány u endometriální hyperplazie v podobném

procentuálním zastoupení jako v EC. Tento fakt vede k názoru, že ras gen může představovat časný jev v procesu kancerogeneze – a to právě v podmnožině EECs. Studie ukázaly, že četnost K-ras mutací progresivně vzrůstala směrem od prosté hyperplázie přes komplexní hyperplazii ke karcinomu endometria, a přítomnost těchto mutací v premaligních biotických vzorcích jsou považovány za markery budoucího rozvoje malignity. K-ras mutace jsou spojeny s nepříznivou prognózou a jsou nezávislým prognostickým faktorem nezávislým na věku a stádiu onemocnění.

2. 2. Her-2/neu

Her-2/neu (= erbB-2) gen kóduje 185 kDa tyrosin - kinázový transmembránový receptor, který je podobný receptorům epidermálních růstových faktorů (EGFR). Her-2/neu fungují jako preferenční partneři heterodimerizace s receptory rodiny EGF, proto mají důležitou roli v koordinaci komplexu signální dráhy ErbB, která je zodpovědná za regulaci buněčného růstu a diferenciaci. Nadměrná exprese Her-2/neu adenokarcinomů byla spojována v některých studiích s prognózou kratší doby celkového přežití.

2. 3. Další onkogeny

C-myc amplifikace a nadměrná exprese je přítomna u přibližně 3 – 19 % EC, a navzdory rozporuplným informacím souvisejícím s vazbou c-myc k diferenciaci tumoru, myometriální invazi a metastazování do lymfatických uzlin - nedávné zprávy ukázaly, že imunohistochemické barvení jaderných a cytoplazmatických c-myc je nezávislým prognostickým faktorem v EC.

ETV5/ERM (protein příbuzný Ets) je transkripční faktor. Je předpokládáno, že ETV5 má důležitou roli v časných stádiích tumorogeneze a mohl by mít souvislost s počáteční aktivací myometriální infiltrace. Kromě toho, imunohistochemická metoda tissue array prokázala, že tato nadměrná aktivační regulace korelovala s procesem kancerogeneze od zdravého endometria přes prostou a komplexní hyperplazii až ke CE.

3. Tumor supresorové geny

3. 1. PTEN/MMAC1

Gen PTEN (fosfatázový a tensinový homolog deletovaný na chromozomu 10q23) kóduje protein, který funguje jako lipidová fosfatáza, která pomáhá modulovat buněčné transdukční signalizační dráhy tím, že působí na fosfolipid

fosfatidylinositol - (3, 4, 5) - trifosfát (PIP3), což je druhý posel tvořený po navázání růstových faktorů na receptory na povrchu buněčné membrány. Snížená aktivita nebo ztráta funkce způsobená mutacemi a konstitutivní aktivace vede ke konstitutivnímu (= i bez aktivace neustále probíhajícímu) spuštění mnohých signálních drah, zahrnující např. dráhu PI3K/Akt, která ovlivňuje buněčnou proliferaci, apoptózu a migraci. Ukázalo se, že PTEN kontroluje hladinu proteinu p53 a jeho transkripční aktivitu. U více než 80 % případů EECs byla odhalena ztráta exprese především na podkladě mutací a současně byla vysledována vyšší četnost MSI.

3. 2. β -katenin

β -katenin je multifunkční protein, který má podstatnou roli v E-kadheriny zprostředkované organizaci a ukotvení cytoskeletu a chová se jako transkripční spouštěč v transdukční signální dráze zvané Wnt.

3. 3. P53

Gen p53, který je lokalizován na chromozomu 17, kóduje jaderný protein, jenž hraje významnou roli v prevenci množení buněk s poškozenou DNA. Mutace genu p53 jsou častým a charakteristickým nálezem u 2. typu serózních karcinomů. Ukázalo se, že ztráta funkce p53, se vyskytuje relativně časně ve vývoji karcinomu, a nadměrná exprese je přítomna u 75 % endometriálních intraepiteliálních karcinomů (EICs).

4. Geny steroidních receptorů

Estrogenové receptory ER α , ER β a progesteronové receptory PR A , PR B patří do nadrodiny jaderných receptorů pro steroidní/tyroidální hormony. Jedná se o ligandem aktivované transkripční faktory, které jsou zapojeny v hormonálně zprostředkované signalizaci, v hormonální inhibici genové exprese, buněčné proliferaci a diferenciaci v různých cílových tkáních. Jsou přenášeny z plazmatické membrány do jádra a jejich funkce je zprostředkována pomocí aktivace MAP kinázou. Váží se jako homo - či heterodimery s ESR2 k estrogen - responzibilním elementům, nebo interagují s jinými transkripčními faktory jako jsou AP-1 nebo NF- κ B.

Nepoměr v expresi ER α a ER β může znamenat rozhodující krok v estrogenově závislé kancerogenezi. Bylo prokázáno, že exprese mRNA a proteinu

ER α je nižší ve stádiu, kdy jsou buňky zdravé či v histologickém stupni 1 oproti klinickému vyzrání nádorové léze stupně 3, naopak ER β se nemění. U ER α i u ER β byly popsány variantní proteiny, které chybně vznikají během transkripčního sestřihu. Např. sestřihová varianta ER α exon 5 (Δ 5 ER α) (ve které tento exon pravděpodobně chybí) nebyla objevena ve zdravém endometriu, ale ve významně zvýšeném množství je přítomna v endometriálním karcinomu v porovnání s endometriální hyperplazií. Potvrdilo se, že při nepřítomnosti hormonů, Δ 5 ER α je schopna konstitutivně aktivovat (= bez nějaké přídatné aktivace) transkripci genů na ER - závislých. To může podpořit růst nádorových buněk a potenciálně vést k nekontrolovatelné proliferaci.

PR je exprimován ve dvou isoformách. Hlavní rolí PRA je negativní regulace estrogenové aktivity zamezením aktivace ER α . Naopak, PRB isoforma funguje v endometriu jako agonista estrogenů. Ztráta exprese PR isoformy je spojena se špatnou prognózou. Změna ve vzájemném poměru exprese PR isoform byla pozorována u případů atypické komplexní hyperplazie. Časné změny v poměru PRA/PRB mohou tedy předcházet a/nebo mohou být zahrnuty ve vývoji EC. Význam rovnováhy poměru PRA/PRB může být kromě toho zvýrazněn souběžně popsanými funkčními polymorfismy v promotoru PR. Polymorfismus má za následek zvýšenou transkripci PRB a změnu poměru PRA/PRB a je spojován se zvýšeným rizikem vzniku EC.

Riziko endometriálního karcinomu je nižší při expozici progesteronům tím, že přeruší dlouhodobou estrogení stimulaci endometria. Endometriální hyperplazie, která je způsobena neoponovanou estrogení stimulací, může být léčena progestiny. Progestinová terapie může být použita jako ochrana proti stimulaci estrogenové léčby. Jde např. o hormonální substituční terapii, kde se užívá kombinace estrogenů a progesteronů, která snižuje riziko vzniku CE v porovnání se samotnými estrogeny. Progestiny jsou nejběžnějším typem hormonální terapie v léčbě endometriální hyperplazie a endometriálního karcinomu [10].

4.2.2 Zahraniční původní práce

4.2.2.1 Výskyt exprese ER a PR

Pozitivita karcinomu endometria na ER byla prokázána u 50 případů (76,9 %) a negativita u 15 (23,1 %). 47 případů (72,3 %) vykazovalo PR pozitivitu a v 18 případech (27,7 %) tomu bylo naopak. Oba typy receptorů ER a PR spolu navzájem (u jednotlivých pacientek) statisticky signifikantně korelovaly $P < 0,01$. V případě ER, PR byly výsledky zaznamenávány v rozmezích $< 10\%$, 11 - 25 %, 26 - 50 %, 51 - 75 % a $> 75\%$. U případů pozitivního zbarvení - více než 10 % jader, autoři hovoří o pozitivním nálezu ER a PR. Minimálně bylo vyšetřeno 1000 nádorových buněk v každém histologickém preparátu [47].

40 % případů bylo ER pozitivních, PR pozitivních bylo 45 %. Subcelulární lokalizace PR A byla pouze jaderná a to u 16 % nádorů. PR B bylo distribuováno jak v jádře (22 %), tak v cytoplazmě (36 %) [52].

V jiné práci, za účelem prošetření exprese alternativního na estrogen reagujícího proteinu (GPR30), estrogenových receptorů, progesteronových receptorů, receptorů epidermálního růstového faktoru a Ki-67 u 47 s karcinomem endometria byla použita imunohistochemie. GPR30 pozitivně koreloval s receptorem pro epidermální růstový faktor, ale negativně s expresí progesteronových receptorů. Nadměrná exprese GPR30 se vyskytovala častěji u nádorů s hlubokou myometriální invazí, u histologických podtypů s biologickou agresivitou s přítomností vysokého stupně diferencovanosti, a u pokročilého stádia. U pacientek s nadměrnou expresí GPR30 bylo přežití významně horší v porovnání s ostatními [46].

4.2.2.2 Vliv histologického stupně nádoru na expresi ER, PR

Hladiny ER, PR a PRA ze zmražených nádorových tkání a hladiny cytoplazmatických PRB z klasicky fixovaných nádorových tkání výrazně klesaly s vyšším histologickým stupněm malignity [52]. Intenzita barvení u imunohistochemického průkazu exprese ER/PR se zmenšovala se stupněm dediferenciace, která byla typická pro starší pacientky [8]. Koncentrace estrogenových receptorů (ER) a progestinových receptorů (PR) stanovených biochemicky v krvi, byly v nepřímé závislosti s histologickým podtypem [18].

Nadměrná exprese imunohistochemicky stanoveného GPR30 se vyskytovala častěji u nádorů s nízkou expresí ER, PR a vysokým stupněm diferencovanosti [46]. Nízká hladina ER a PR je spojena s vysokým histologickým stupněm nádoru [21]. Exprese Bcl-2 byla v přímém vztahu s mladším věkem, lepší diferenciací nádoru a expresí PR [20].

4.2.2.3 Vliv věku na expresi ER a PR

V práci Deligdische byly hodnoceny histologické preparáty a tak zvané „hlubší řezy“ (neboli z téhož parafinového bločku později nakrájené) - barvené imunohistologicky k průkazu ER/PR u 54 žen s endometriálním karcinomem ve věku 75 - 95 let. Intenzita barvení ER/PR se zmenšovala se stupněm dediferenciace. Starší pacientky mají méně diferencované endometriální karcinomy vypadající histologicky jako neendometriální („odcizení“) [8].

Bylo analyzováno přežití 213 postmenopauzálních pacientek s primárním karcinomem endometria. Hladiny ER a PR byly ve vzájemné pozitivní korelaci, ale ani ER, ani PR nekorelovaly s věkem. U 187 pacientek ve stádiu I a II, potom pozitivita ER (kterou je rozuměno větší nebo rovna 20 fmol/mg cytosolového proteinu (cp)) byla signifikantně spojena s histologickým stupněm malignity (grade) a pozitivita PR (větší nebo rovna 7 fmol/mg cp) byla signifikantně spojena s histologickým podtypem [18].

4.2.2.4 Vliv ER a PR na přežití

Univariantní analýza ukázala, že doba přežití u pacientek s časným karcinomem endometria je statisticky signifikantně závislá na stavu ER, PR a histologickém stupni (diferenciaci nádoru). Multivariantní analýza hladin ER, PR, věku a histologického podtypu ukázala, že pozitivita ER byla významným prognostickým faktorem pro přežití, i když hranice positivity PR byla definována jako větší nebo rovna 50 fmol/mg cp. Jestliže byla rozdělena koncentrace ER na 0 - 19, 20 - 100, a větší než 100 fmol/mg cp, bylo by přežití statisticky významně odlišné u skupiny s nejnižší koncentrací v porovnání s dalšími dvěma skupinami. Pokud byla rozdělena koncentrace PR na 0 - 6, 7 - 50, a větší než 50 fmol/mg cp, přežití bylo statisticky významně rozdílné mezi prvními dvěma skupinami

a skupinou s nejvyšším rozmezím. Přežití u těchto pacientek s karcinomem endometria bylo lépe predikováno dle ER positivity než dle histologického podtypu [18].

GPR30 představuje alternativní - na estrogény reagující receptor, který je nadměrně exprimován u nádorů, kde estrogenové a progesteronové receptory jsou regulovány směrem dolů a u pacientek s vysoce rizikovým karcinomem endometria s nižší mírou přežití [46].

Další studií, která řeší problematiku vzájemného vztahu buněčných markerů s dobou přežití a rekurencí nádorů endometria, je založena na imunohistochemické metodě parafinových bločků získaných od 65 případů žen s endometriálním karcinomem o průměrném věku 54, 94 let (24 – 80 let). Výsledky této studie potvrdily, že ER a PR jsou nezávislé prognostické faktory přežití a rekurence (rozvoje metastáz) karcinomu endometria. Z positivity ER nebo PR či kombinaci ER+, PR+ vyplynulo výrazně delší přežití bez známek nemoci než při negativním stavu hormonálních receptorů.

Tato práce odkazuje na Chamberse a kol. z roku 1988, kteří v multivariantsní analýze sledovali hladiny ER a PR za použití různých rozhraní (% ER+ nebo PR+ buněk) v porovnání s histologickým stupněm malignity nádoru (klasifikace FIGO). Z jejich studie vyplývá, že stav ER a PR jsou nejvýznamnějšími predikčními faktory přežití, které závisí na výběru rozhraní pro receptorovou pozitivitu (% receptorově pozitivních buněk).

Podobný závěr byl nalezen i v této studii Suthipintewonga a kol. (2008). Hladiny PR, ER jsou významnými předpovědními faktory a totéž lze říci o FIGO klasifikaci histologického stupně malignity (grade) a o FIGO klasifikaci klinického stadia (stage) nádoru (např. přítomnost metastáz) [47].

Proliferační index (% rozmnožujících se buněk) stanovený pomocí exprese Ki-67 je také nezávislým predikčním ukazatelem stejně jako v případě ER a PR. Studie prokázala, že případy v nízkém klinickém stádiu (tedy bez metastáz), s nízkým (histologickým) stupněm malignity, bez rekurence nádoru a s ER, PR pozitivitou a $Ki-67 \leq 35\%$ mají vyšší šanci na přežití než případy s opačnými výsledky ($p < 0,05$).

Nebyl však prokázán statisticky významný vztah mezi p53 a dobou přežití. P53 totiž pravděpodobně není nezávislý prognostický faktor. Musí být tedy spojován s jiným významným nezávislým faktorem jako např. s klinickým stadiem (stage), histologickým stupněm malignity (grade) či histologickým typem.

Zvýšená exprese c-erbB-2 byla nalezena pouze v případě karcinomu z jasných buněk. Pouze amplifikace tohoto genu měla předpovědní hodnotu (pro délku přežití) – stejně tak jako klinické stádium, histologický typ a histologický stupeň malignity, nikoliv nadměrná exprese – neboli tvorba proteinu tvořeného tímto genem [47].

Cílem další studie bylo vyšetřit expresi c-erbB-2 v EC a zjistit závislost na ER, PR a stanovit korelaci s prognostickými parametry. Do studie vstoupilo 72 pacientek s EC, z nichž 22 bylo premenopauzálních a 50 postmenopauzálních o průměrném věku 58, 3 let.

Pozitivní barvení c-erbB2 bylo prokázáno v 18, 1 % případů. Signifikantně byla prokázána pouze c-erbB2 korelace s PR ($p < 0, 05$) nikoliv však s ER. Byl zaznamenán trend zvýšené hladiny markeru ve skupině pacientek s gradem 2 než G1. U pacientek s G3 nelze hodnotit z důvodu nízké kohorty. Ve studii nebyl statisticky prokázán významný vztah mezi c-erbB2 a menstruačním stavem, myometrální invazí, postižením lymfatických uzlin, stagingem a přežitím [13].

U hormonálně non-dependentního karcinomu endometria byla popsána hypotéza možné budoucí targeting (cílené) terapie proti receptoru EphA2. EphA2 je tyrosin kinásový receptor z ephrinové rodiny, který je významný v procesu onkogeneze a angiogeneze. Nadměrná exprese EphA2 byla spojena s pokročilým stádiem onemocnění, s biologicky agresivním histologickým podtypem s přítomností špatné diferenciací, hlubší myometriální invazí, nízkou expresí ER, nízkou expresí PR, vysokou expresí Ki-67. Nízká hladina ER a PR je spojena s vysokým histologickým stupněm nádoru, pozitivitou lymfatických uzlin, vysokou expresí Ki-67 a vysokou expresí EphA2. U všech pacientek při imunohistochemické univariální analýze byla odhalena souvislost mezi vysokým EphA2 a krátkou specifickou délkou přežití (DSS). Nadměrná exprese EphA2 je spojena s agresivními charakteristickými rysy fenotypu karcinomu endometria a je inverzní k expresi ER, PR (nepřímá úměrnost) [21]. Z předchozích dvou vět můžeme odvodit, že nejen

nadměrná exprese EphA2, ale i nízké hodnoty ER a PR jsou spojeny s krátkým přežitím.

Imunohistochemická exprese bcl-2, p53, PR a ER u případů s karcinomy endometria byla testována a korelována pomocí metody tissue microarray (TMA). Bylo zhodnoceno sedmdesát sedm pacientek s karcinomem endometria. Průměrný věk pacientek byl 62, 5 roků (rozmezí 35 - 80), medián doby sledování byl 60 měsíců (rozmezí 9 - 120). Sedmdesát devět procent pacientek bylo dle metody FIGO ve stádiu I. PR a ER byly pozitivní u 63, 6 %, respektive u 30 % případů. Analýza nadměrné exprese p53 a exprese bcl-2 ve vztahu ke koncentraci ER a PR ukázala přímou korelaci mezi expresí bcl-2 a pozitivitou PR. V multivariační analýze (analýza o více proměnných) – pouze klinické stádium určené dle metody FIGO bylo jediným klinicko-patologickým parametrem, který nezávisle koreloval s DFS (disease – free survival - tedy období bez vzniku nových metastáz). Z toho usuzujeme, že bychom museli mít k dispozici plné znění jejich práce (nejen abstrakt), abychom mohli rozhodnout, zda stav ER a PR neměl v případě jejich práce žádný vliv na přežití, nebo jen, že vliv ER a PR na přežití byl např. závislý na dalších faktorech [20].

4.2.2.5 Vliv přesně specifikované léčby na přežití v závislosti na expresi ER a PR

Cílem další studie bylo objasnit vztah mezi expresí steroidních receptorů v metastazujícím endometriálním karcinomu a klinickou odpovědí na každodenní podávání citrátu tamoxifenu a podávání octanu medroxyprogesteronu (MPA) jednou týdně. Do klinické studie byly zařazeny pacientky s rekurentním nádorem endometria či pokročilým stupněm tumoru. Biopsií byly získány vzorky nádorů pacientek, které doposud nebyly léčeny, a byly podrobeny imunohistochemické analýze.

ER HSCORE (semikvantitativní vyšetření nejen počtu pozitivních buněk, ale i intenzity jejich positivity) bylo analyzováno z hlediska jejich odpovědi na léčbu i z hlediska doby přežití. Nebyl však prokázán vzájemný vztah mezi klinickou odpovědí a hladinou PR, nejspíš i z důvodu malého počtu probandů. Zjištěná hladina (naopak) ER α v endometriálním karcinomu před hormonální terapií významně

statisticky souvisí s klinickou odpovědí na každodenní podávání tamoxifenu a intermitentní podání MPA.

PR A isoforma kóduje 90 kDa protein a PR B 120 kDa protein. Obě isoformy jsou exprimovány díky promotorům, které jsou umístěny na témže genu a mohou tvořit homodimery (A/A, B/B) či heterodimery (A/B). Isoformy jsou identické až na delší N - konec PRB sestávající ze 164 aminokyselin. V porovnání s PRA, PRB je silnější transkripční aktivátor mnohých genů. PRA vede navíc k represi PRB. Z těchto výsledků vyplývá, že změna v poměru isoform PR je významná stejně jako určení totální hladiny PR ve vývoji nádoru endometria.

Progestiny nejsou dostatečně účinné v léčbě primárního endometriálního karcinomu, přestože jsou velmi úspěšně využity k léčbě endometriální hyperplazie. Tradičně jsou indikovány v léčbě rekurentního či metastazujícího endometriálního adenokarcinomu, ačkoliv celková odpověď pacientek se nachází v rozmezí od 8 % do 55 %. Exogenním přívodem progestinů dochází k ligandově - závislému poklesu PR v nádorovém i ve zdravém epitelu endometria.

Výsledky imunochemického barvení všech receptorů bylo za použití semikvantitativního HSCORE, vypočtené na základě odhadu procent pozitivně zbarvených epiteliálních buněk v pěti různých kategoriích intenzity (0, 1+, 2+, 3+, 4+). HSCORE tedy představuje sumu procent vynásobených hodnotou intenzity zbarvení. Kromě jaderného barvení, je třeba počítat i s cytoplazmatickým barvením buněk, jelikož progesteronové receptory (zejména PRB) jsou zde lokalizovány za absence ligandu [52].

Částečná odpověď v jiné studii, podle níž se řídili tito autoři, která zkoumá klinickou odpověď na kombinovanou léčbu a celkovou dobu přežití, je definována jako 50 % či větší redukce nádorového bujení v největším průřezu každé měřitelné léze při dvou samostatných vyšetřeních přinejmenším s odstupem dvou týdnů. Kompletní odpověď tedy znamená, že je dostatek důkazů pro vyléčení nemoci nejdéle za období jednoho měsíce.

Klinická studie, která sledovala klinickou odpověď na léčbu s terapeutickou kombinací tamoxifenu a octanu medroxyprogesteronu (MPA) v souvislosti s receptory, přinesla tyto výsledky: 10 % kompletní odpověď, 22 % (13/58) částečná odpověď z celkového počtu 33 % (19/58). Pro ER pozitivní nádory byla klinická

odpověď 47 % v porovnání s 26 % ER negativními tumory. Nepodařilo se najít vztah mezi ER, PR hladinami a rekurencí u 62 vysoce rizikových nádorů endometria. Nejednotný přístup v terapii vedl k limitaci využití vztahu mezi hodnotami receptorů a klinickými výsledky.

Z této studie vyplývá, že ER je nejlepším a jediným prediktorem, který je významně spojen s klinickou odpovědí a dobou přežití po terapeutické kombinaci tamoxifenu a octanu medroxyprogesteronu (MPA). Také exprese ER dobře koreluje s expresí PRA, nikoliv s PRB. Nicméně 26 % nádorů ER – a 32 % bez PRA či PRB, které byly určeny k biopsii, odpovídalo na terapii. Byla prokázána důležitost stanovení positivity či negativity exprese steroidních receptorů [44].

Jiní autoři uvádí, že určení fenotypu nádoru vede k výběru vhodné farmakoterapie. Existují čtyři fenotypy endometriálního karcinomu (stejně jakou nádoru prsu): PR+ ER+, PR- ER+, ER- PR+, ER- PR-.

Absence PR v endometriálním karcinomu, stejně tak v karcinomu prsu, předurčuje špatnou prognózu. V opačném případě (míněno - v případě positivity PR) je PR B lepším markerem než PR A, jelikož dle G1 - 3 klasifikace bylo pozorováno, že v G1 má většina pacientek pozitivní oba dva typy progesteronových receptorů (jak PRA, tak PRB), ale PRA není pro prognózu signifikantní.

Začleněním genů PR do linie nádorových endometriálních (prsích) buněk prostřednictvím adenovirů jako vektorů by (podle těchto autorů) došlo k senzitivizaci karcinomu ke gestagenní terapii a k prodloužení života pacientek. Včleněním PRB genu do endometria a následnou léčbou progesteronem došlo k inhibici exprese D1 cyklinu, metaloproteináz a tím k zamezení růstu nádorových buněk. Byl nalezen způsob, jak zcitlivit nádorovou endometriální tkáň, která nejeví PR pozitivitu, ke gestagenní terapii. Podáním azadeoxycytidinu a trichostatinu se zvýšila exprese PR. Účinek zůstal zachován 48 hodin po vysazení léčiv.

Studie popisující molekulární funkci PRB a dalších faktorů, které jej ovlivňují, ukazují, že je zde silná závislost, PRB na rodině epidermálního růstového faktoru (EGF). EGF způsobuje zvýšenou citlivost na PRB na progesteronu. Mnohé zahraniční studie popsaly závislost na molekulární úrovni na rodině růstových faktorů (EGF) a zvýšenou senzitivitu progesteronu k PRB.

Progesteron má ochrannou funkci v tkáních hormonálně závislých a tím zabraňuje neoplastické transformaci. V glandulárním epitelu endometria vykazuje progesteron primárně antagonistický efekt k estrogenem řízené buněčné proliferaci. V prsu je tomu jinak, progesteron má jak proliferativní, tak i antiproliferativní efekt. Vliv progesteronu na inhibici kancerogeneze EC spočívá, dle jedné z hypotéz, v inhibici genové exprese proteinů, které zodpovídají za zánětlivý proces (TNF alpha, IL-1 β , MCP-1/MCAF-1) a ve spuštění genové exprese proteinů potlačující zánětlivou odpověď (TRA P1, SMAD 4).

V kontrastu k této hypotéze, je účinek progesteronu proti stimulaci buněčné proliferace a proti inhibici buněčné diferenciaci způsobený estrogeny a Id-1 (což naznačuje estrogenům podobný efekt) [52].

4.2.2.6 Vliv léčby na expresi ER a PR

Po nasazení gestagenní terapie u pacientek s EC bylo pozorováno snižování PR a ER. U všech pacientek, které byly léčeny levonorgestrem a u 50 % pacientek, které byly léčeny medroxyprogesteronem, nebyly pozorovány žádné symptomy endometriální hyperplazie. Nicméně, u pacientek užívajících medroxyprogesteron bylo zaznamenáno významnější snížení exprese receptorů. Ukázalo se, že počet buněk pozitivních na PR v žlázovém epitelu je vyšší po podání samotných estrogenů (průměrně 12 %) a tamoxifenu (11 %) než po podání kombinace estrogenů a gestagenů (5 %) či gestagenů samotných (4 %). U žen, kterým nebyla podána hormonální substituční terapie – počet buněk pozitivních na PR byl 6 %. Dále byl zjištěn rozdíl v expresi PRB. Ve skupině žen léčených estrogeny či tamoxifenem byla hladina PRA nezměněna a poměr PR/PRB byl přibližně 2, 7, zatímco ve skupině léčených estrogeny a gestageny poměr klesl na hodnotu 0, 2 [52]. V práci nebylo uvedeno, zda autoři léčili endometriální hyperplazii, nebo naopak karcinom.

5 Diskuse

Klinicko-patologické faktory ve vztahu k morfolologii ECs a prognóze

Jak bylo popsáno [10], [30] ECs vykazují buď ER+ či ER- a obecně platí fakt, že nádory pozitivního typu mají lepší prognózu. Na základě literatury lze uvažovat, že i přes možnou predikci ER+ pomocí dalších klinicko-patologických faktorů se můžeme dopustit chyby. Kliničtí odborníci často na základě svých zkušeností s věkem a dalšími údaji předvídají EC fenotyp. V České republice se hladiny ER, PR také rutinně nevyšetřují. ER+ nádor nemusí vždy současně vykazovat i vlastnosti PR+ [52], která je podstatná pro hormonální léčbu progestiny [27], [10]. Proto by se stanovení exprese ER, PR mohlo stát automatickou vyšetřovací metodou u CE [41], respektive rádi bychom upozornili i na názor, který dokládá [27], [10], že by bylo vhodné stanovovat i poměry jednotlivých isoform PRA/PRB a ER α /ER β a to především ER α a PRB. Přičemž nejvýznamnější ohledně zvolení terapie progestiny je PRB [27], [52]. Určení hranice pozitivivity je však velmi citlivou záležitostí, kterou můžeme do výsledků zanést chybu [18]. Ve studii [10] je změna isoform považována za předstupeň EC, v nádorech se již setkáváme se ztrátou jedné z isoform steroidních receptorů a tím se špatnou prognózou. Tedy i nádory původně dobře diferencované mohou přejít v typ NEEC, což je třeba včas diagnostikovat a léčit. U EECs je podstatou vzniku nádoru přechod z hyperplazie endometria vlivem neoponovaného působení estrogenu. V literatuře jsme vyhledali dva možné markery, které by mohly být vhodnými ukazateli přechodu z hyperplazie endometria do CE: ETV5, K-ras [10], jejichž exprese je úměrná procesu kancerogeneze.

Vliv histologického stupně nádoru na expresi ER, PR

Mnohé studie [52], [8], [46], [21] se shodují na tom, že hladina ER, PR inverzně koreluje s diferencovaností nádorů, ale také se stádiem onemocnění. Právě zde máme pocit, že mnoho autorů přikládá i důležitost stanovení hladin dalších markerů, nejspíš z důvodu bližšího rozpoznání mechanismů, které vedou k ozřejmění procesu kancerogeneze. Se špatnou diferencovaností (ale také s horším stádiem) tedy souvisí zvýšená exprese p53 a, Ki-67, ale také ztráta exprese bcl-2 (ta souvisí se ztrátou vlivu estrogenu prostřednictvím ER) [28], [10]. Myslíme si, že v nádorech, které jsou chudé na expresi ER, PR můžeme využít ke stanovení závažnosti

karcinomu markery, které jsou v přímé korelaci s diferenciací a v inverzním charakteru ke steroidním receptorům, jedná se například o GPR30 [46], EphA2 [21]. Tím by se dal potvrdit závěr u pacientky s poněkud nerozhodným výsledkem ER a PR, neboť jde o závislý marker. Někdy jsou důležitějšími tzv. „nezávislé“ markery, které mohou odhalit jinou příčinu zhoubnosti než reakci na estrogeny.

Vliv věku na expresi ER, PR

Nelze přesně říci, kde je věková hranice, která by pacientky řadila do skupiny s nádory, kde nejsou exprimovány steroidní receptory. V práci [8] bylo potvrzeno, že intenzita barvení ER, PR se zmenšuje se stupněm dediferenciace. Jednalo se však o ženy staršího postmenopauzálního věku. Naopak v práci [18] tato závislost vysledována nebyla, jelikož v kohortě pacientek bylo i zásadní procento žen, které byly mladšího postmenopauzálního věku, u nichž nedochází k razantní změně v expresi steroidních receptorů. Zde by se významně mohl uplatňovat vliv HRT, který však může ovlivnit výsledky stanovení hladin ER, PR, stejně jako fáze menstruačního cyklu u žen reprodukčního věku [27], [15]. Ve studii [28] byla vysledována závislost mezi věkem pod 65 let a zvýšenou expresí MMP-7 (mohlo se však jednat o pouhou náhodu), proto výsledku nepřikládáme doposud význam. Exprese bcl-2 byla v přímém vztahu s mladším věkem ve studii [20], což nás utvrzuje v názoru, že ztráta exprese je způsobena ztrátou exprese ER. V ostatních studiích nebyl objeven jiný marker, který by koreloval s věkem pacientek.

Vliv ER, PR na přežití

Dle práce [18] jsou nejvýznamnějším predikčním faktorem ER a PR, což potvrzuje například [47], která vysledovala mimo jiné i význam stage a gradu dle FIGO klasifikace. Máme i příklady studií, kde pro prognózu stačí znát diferencovanost nádoru [8], [20]. V některých studiích je PR označován za lepší predikční faktor [28], [41]. Naopak u [44] a [18] jsme našli názor opačný, tedy - že jediným kvalitním predikčním faktorem je ER+. Z jiných prací však vyplývá, že podstatu je třeba hledat právě v již výše zmíněném poměru jejich isoform, které korelují s gradem či stádiem nemoci. Markery typu Ki-67 [47], [28], p53 [41], [28] a jejich nadměrná exprese by mohly být použity jako alternativa prognózy horšího přežití. Her2/neu amplifikace podle práce [47] je také predikčním negativním faktorem nikoliv však jeho exprese. Tento fakt popírá [10], kde i exprese vede

k horší predikci. Nejvýznamnějším markerem, který je okamžitým indikátorem k agresivní terapii je nadměrná exprese EphA2 [21].

Vliv léčby na expresi ER, PR

Progestinová léčba je zatím jedinou možnou hormonální terapií v léčbě CE. Po podávání této terapie dochází ke snížení exprese PR, ER. Významný je ten fakt, že podáváním kombinace progesteronů a estrogenů dochází ke zvýšení exprese PRB, což je isoforma, která léčebně odpovídá na podání progestinů [52]. Právě kombinovaná HAK je prevencí vzniku EC [27]. Na terapii progestiny nejlépe reaguje hyperplazie endometria, poté rekurentní ECs s dobrou diferenciací a PR+, nedostatečná účinnost je nalézána u primárního EC [52], [27].

6 Závěr

V českých studiích je vyšetření ER, PR často spojováno s vyšetřením jiných markerů, kterým je mnohdy věnována větší pozornost než samotnému stanovení hladin steroidních receptorů. Totéž lze vysledovat i v zahraniční literatuře, ale ta je bohatší – a proto z ní lze vytěžit takové informace o ER a PR v endometriálních karcinomech, kterými lze českou literaturu obohatit.

Dle dualistického modelu ECs, bychom se mohli domnívat, že není třeba vyšetřovat hladiny ER, PR u všech pacientek. Domníváme se však, že vyšetření ER a PR by mohla být užitečná – a to především u sporných případů, jelikož nelze vždy s přesností zařadit daný CE do jedné ze dvou skupin na podkladě věku či histologie. Význam by mělo mít i stanovení poměru isoform steroidních receptorů. Výsledky PR respektive PRB jsou například významným faktorem pro nasazení progestinové terapie. Ztráta jedné z isoform může vést k dediferenciaci nádoru a horší prognóze.

U sporných případů, kde jsou hladiny ER a PR nízké, se zdá být vhodné vyšetření závislých markerů (např. GPR30, EphA2), které jsou v inverzní závislosti ke steroidním receptorům.

V případě nádorů, kde nejsou exprimovány steroidní receptory (NEECs), podle literatury se zdají být prognosticky významné nezávislé markery (např. Ki-67, K-ras, p53).

7 Seznam použitých zkratek

(-)	Negativní
(+)	Pozitivní
AF1, AF2	Oblasti na efektorovém místě ER aktivující transkripci
ALT	Alternativní prodlužování telomer nádorových buněk
AP-1	Transkripční aktivační faktor - 1 z rodiny c-fos, c-jun
Apaf-1	Apoptotická proteáza aktivující faktor - 1
APC	Adematous polyposis coli (tumor supresorový gen)
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated, gen pro proteinkinázu aktivující apoptotickou dráhu p53
ATR	Ataxia Telangiectasia and rad3 related, gen pro proteinkinázu aktivující apoptotickou dráhu p53
Bax, Bad, Bak	Proapoptotické proteiny z rodiny Bcl-2
bcl-2	B-CLL and lymphoma 2, antiapoptotický protein regulující propustnost vnější mitochondriální membrány
Bcl-XL, Bcl-2	Antiapoptotické proteiny z rodiny Bcl-2
bcr	Gen z chromozomu 22, jehož fúzí s c-abl vzniká Philadelphský chromozom
bFGF	Bazální fibroblastový růstový faktor
c-abl	Gen z chromozomu 9, jehož fúzí s bcr vzniká Philadelphský chromozom
cAMP	Cyklický adenosin monofosfát
Cdc2	Cyklin dependentní kináza 2
Cdk	Cyklin dependentní kináza
c-erbB-2/(HER2/neu)	Human epidermal growth factor receptor 2, jehož produktem je transmembránový receptor s tyrosin kinázovou aktivitou pro bílkoviny z rodiny ErbB
c-fos, c-mos	Buněčné protoonkogeny pro transkripční faktory
c-myc, c-ras	Buněčné protoonkogeny pro transkripční faktory
CSFR	Receptor pro kolonie stimulující faktor
D1 cyklin	Cyklin z rodiny D cyklinů stimulující přechod z G1

	fáze do S - fáze cyklu buňky
DFS	Období bez vzniku nových metastáz (Disease – Free Survival)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSS	Specifická doba přežití (Disease - Specific Survival)
E-kadherin	Epiteliální kadherin – transmembránové proteiny tvořící mezibuněčné spoje
E2F	Skupina genů kódující rodinu eukaryotních transkripčních faktorů
EC (s)	Endometriální karcinom (y)
EEC (s)	Endometrioidní endometriální karcinom (y)
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EphA2	Tyrosin kinázový receptor z ephrinové rodiny, při jehož aktivaci dochází k stimulaci MAP/ERK mitogenní dráhy
ER	Estrogenový receptor
ER β 2/bcx	Sestříhová varianta ER β isoformy bcx
ER α / β	Isoforma α / β estrogenového receptoru
ErbB	Rodina genů pro tyrosin - kinázové receptory (Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog)
ERE	Estrogen responsive elements
ERK	Extracelulární signál regulující kinázy
ESR 2	Estrogenový receptor β (ER β)
EST	Estrogen sulfotransferáza
ETS	Erythroblast Transformation Specific rodina transkripčních faktorů
ETV5/ERM	ETS - transkripční faktory spoštějící myometrální infiltraci v EC
Fas (CD95)	Gen pro transmembránový receptor ze skupiny TNF FasL ligand pro receptor Fas
FASN	Enzym katalyzující koncové stupně de novo dlouhých řetězců mastných kyselin
FIGO	Obligatořní vyšetřeni sloužící k určení klinického stádia

dle Federation of International Gynaecologists
and Obstetricians

Fz	„Frizzled“ receptor (receptor smrti)
G0	Klidová fáze buňky
G1	Gap1 (přípravná) fáze buněčného cyklu
G2	Gap2 (přípravná) fáze buněčného cyklu
GRP 30	Alternativní na estrogen reagující receptor
GTP	Guanosin trifosfát
H score	Semikvantitativní vyšetření – kombinované skóre počtu pozitivy jader a jejich density (Reinerovo score)
HAK	Hormonální antikoncepce
HNPCC	Hereditary non - polyposis colorectal cancer
HRT	Hormonální substituční terapie
Chk1, Chk2	Geny či Check Point proteinkinázy aktivující apoptotickou dráhu p53
Id-1	Transkripční faktor DNA - binding protein - 1
IGF	Inzulínu podobný růstový faktor
IGFR	Receptor pro inzulínu podobný růstový faktor
IL-1 β	Interleukin-1 β - prozánětlivý cytokin a kostimulant růstových faktorů
Ki-67	Buněčný marker proliferace
M	Mitotická fáze buněčného cyklu
Mad - Max	Komplex transkripčních faktorů indukující správnou diferenciaci buňky
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinázy signální dráhy Ras - Raf - MAPK
MCL-5	Buněčná linie lymfoidní neoplazie plášťové zóny germinativních center uzliny
MCP-1(MCAF-1)	Human macrophage chemoattractant protein neboli (Monocyte chemotactic activating factor)
mdm2	Mouse double minute, inhibitor tumor supresorového genu p53
MLH1	Protein opravující mikrosatelitovou DNA

	Human Mut Homolog 1 - reparační „mismatch“ gen
MMP-26	Matrix metaloproteináza z rodiny enzymů zinek-dependentních endopeptidáz degradující extracelulární matrix-matrilisyn-2
MMP-7	Matrix metaloproteináza z rodiny enzymů zinek-dependentních endopeptidáz degradující extracelulární matrix-matrilysin-1
MPA	Medroxyprogesteron acetát
mRNA	Messenger (informační) RNA sloužící k translaci genetického kódu do bílkoviny
MSH2, MSH6	Proteiny opravující mikrosatelitovou DNA
MSI	Mikrosatelitová nestabilita
NEEC(s)	Neendometrioidní endometriální karcinom (y)
NF-κB	Nukleární transkripční faktor κ B
NGFR	Receptor pro nervový růstový faktor
N-myc	Gen pro jaderné transkripční faktory
p15, p16	Proteinové inhibitory cyklus dependentních kináz
p21, p27	Proteinové inhibitory komplexů cyklin – cyklus dependentní kinázy
p-53	Tumor supresorový gen, protein p53 regulující expresi většiny genů, „ochránce genomu“
PDF	Destičkový růstový faktor
PDGFR	Receptor pro destičkový růstový faktor
PIP3	Phospholipid phosphatidylinositol - 3,4,5 - triphosphate protein kinase
PR	Progesteronový receptor
PRA, PRB	Isoforma A/B progesteronového receptoru
PTEN/MMAC1	Phosphatase tensin homologue/mutated in multiple advanced (tumor supresorový gen)
Raf	Gen pro cytoplazmatické přenašeče
Ras	Rous adenosarcoma, gen či protein účastníci se přenosu mitogenního signálu

RB	Tumor supresorový retinoblastomový gen či bílkovina
REA	Represorová estrogenová aktivita
RNAi	Interferenční (tlumící transkripci určitého genu) RNA
S	Syntetická fáze buněčného cyklu
SERM	Selektivní modulátor estrogenového receptoru
SMAD	Transkripční proteiny (produkty tumor supresorových genů) antimitogenní signalizační dráhy TGF- β
SMAD 4	Transkripční protein 4 z rodiny SMAD
SS	Steroidní sulfatáza
TGF α , β	Transformující růstový faktor α , β
TMA	Tissue microarray metoda
TNF α	Tumor nekrotizující faktor α
TRA P1	TNF receptor – associated protein 1 (mitochondriální heat shock protein)
v-src	Onkogen vnesený virem Rousova sarkomu
WNT1	Extracelulární transkripční faktor vázající se na receptor smrti
β -katenin	Transkripční faktor signalizační dráhy WNT
Δ 5 ER α	Sestříhová variant ER α deletovaná na exonu 5

8 Seznam literatury

1. Adam Z., a kol.: Obecná onkologie a podpůrná léčba. Grada Publishing a. s., 2003, str. 61 - 68
2. Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J.: Obecná onkologie a podpůrná léčba. Praha, Grada Publishing, 2003: 355 - 360 (citováno dle Mareškové, 2008)
3. Arnett - Mansfield R. L., Defazio A., Wain G. V., Jaworski R. C., Byth K., Mote P. A., Clarke C. L.: Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium, Cancer Research, Volume 61, Issue 11, 1 June 2001, Pages 4576 - 4582 (citováno dle Mareškové, 2008)
4. Citterbart K.: Gynekologie. Praha, Galén, 2001, 167 - 170 (citováno dle Mareškové, 2008)
5. Cohen I., Betty Y., Altaras M. M., Shapira J., Tepper R., Cardoba M., Yigael D., Figer A., Fishman A., Berenhein J.: Estrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal tamoxifen - exposed endometrial pathologie. Gynecol oncologie 1997: vol. 67, issue 1, pages 8 - 15 (citováno dle Mareškové, 2008)
6. Dai D., Kumar N. S., Wolf D. M., Leslie K. K.: Molecular tools to reestablish progestin control of endometrial cancer cell proliferation. American journal of obstetrics and gynecology 2001, volume 184, issue 5, pages 790 - 797 (citováno dle Mareškové, 2008)
7. Dai D., Wolf D. M., Litman E. S., White M. J., Leslie K. K.: Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: Down - regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. Cancer research 2002, 62 (3): 881 - 886 (citováno dle Mareškové, 2008)
8. Deligdisch L., Kase N. G., Bleiweiss I. J.: Endometrial Cancer in Elderly Women: A Histologic and Steroid Receptor Study, Gerontology, Volume 46, 2000, Pages 17 – 21, <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=22128>; 20/05/10
9. Doležel M.: Osobní sdělení, Nemocnice Pardubice 2008
10. Doll A., Abal M., Rigau M., Monge M., Gonzalez M., Demajo S., Col'as E., Llaurad'M., Alazzouzi H., Planagum'a J., Lohmann M. A., Garcia J., Castellvi S., Ramon y Cajal J., Gil - Moreno A., Xercavins J., Alameda F., Revent'os J.: Novel molecular profiles of endometrial cancer - new light through old windows. Journal

of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2008, 108, 221 – 229,
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6T8X-4PNM46M-1-5&_cdi=5098&_user=1490772&_pii=S0960076007002543&_origin=search&_coverDate=02%2F29%2F2008&_sk=998919996&_view=c&_wchp=dGLzVtzzSkWA&_md5=10d2bd10337249de655bfb7a5fa5f412&_ie=/sdarticle.pdf; 24/02/11

11. Feranec R., Otevřel P., Frgala T., Dörr A.: Mapování lymfatik a biopsie sentinelové uzliny u pacientek s karcinomem endometria. Klinická onkologie 2/2007, 20, http://www.linkos.cz/odbornici/vzdelavani/2_07/01.pdf; 06/02/11

12. Fínek J.: Chemoterapie a radioterapie tří nejčastějších gynekologických malignit. Lékařské listy 18/2002 (citováno dle Mareškové, 2008)

13. Gul A. E., Keser S. H., Barisik N. O., Kandemir N. O., Cakir C., Sensu S., Karadayi N.: The relationship of c-erbB2 expression with estrogen receptor and progesterone receptor and prognostic parameters in endometrial carcinomas. Diagnostic Pathology 2010, 5 (13): 1 – 7,
<http://www.diagnosticpathology.org/content/pdf/1746-1596-5-13.pdf>; 06/03/11

14. Herynk M. H., Fuqua S. A. W.: Estrogen Receptor Mutations in Human Disease. Endocr. Rev. 25 (6), 2004, s. 869 – 898,
<http://edrv.endojournals.org/cgi/content/full/25/6/869>; 25/07/08 (citováno dle Kružikové – Novákové, 2008)

15. Hirmerová E.: Estrogenové a progesteronové receptory v nádorech dělohy ve vztahu k jiným ukazatelům. Bakalářská práce (školitel Hochmann J.), Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v HK, UK v Praze, 2006

16. Hirsimaki P., Aaltonen A., Mantyla E.: Toxicity of antiestrogens. Brest journal, 2002 Mar - Apr, 8(2): 92 - 6 (citováno dle Mareškové, 2008)

17. Chakravarty D., Srinivasan R., Ghosh S., Gopalan S., Rajwanshi A., Majumdar S.: Estrogen receptor $\beta 1$ and the $\beta 2/\beta cx$ isoforms in nonneoplastic endometrium and in endometrioid carcinoma. International journal of gynecological cancer 2007, Jul - Aug; 17(4): 905 - 13 (citováno dle Mareškové, 2008)

18. Chambers J. T., MacLusky N., Eisenfield A., Kohorn E. I., Lawrence R., Schwartz P. E.: Estrogen and progesterin receptor levels as prognosticators for survival in endometrial cancer, Gynecol Oncol., Volume 31 (1), September 1988, Pages 65 - 81

19. Chovanec J.: Maligní nádory endometria. Lékařské listy 17/2003a (citováno dle Mareškové, 2008)

20. Kalogiannidis I., Bobos M., Papanikolaou A., Makedos A., Amplianitis I., Vergote I., Nenopoulou E., Makedos G.: Immunohistochemical bcl-2 expression, p53 overexpression, PR and ER status in endometrial carcinoma and survival outcomes, Eur J Gynaecol Oncol., Volume 29 (1), 2008, Pages 19 – 25, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18386458>; 20/05/10

21. Kamat A. A., Coffey D., Merritt W. M., Nugent E., Urbauer D., Lin Y. G., Edwards C., Broaddus R., Coleman R. L., Sood A. K.: EphA2 overexpression is associated with lack of hormone receptor expression and poor outcome in endometrial cancer. American Cancer Society Jun 2009, 115 (12): 2684 – 2692, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396818>; 05/06/10

22. Kauppila A.: Oestrogen and progesterin receptors as prognostic indicators in endometrial cancer. Acta oncologica 1989; 28(4): 561 - 6 (citováno dle Mareškové, 2008)

23. Kružiková Nováková L.: Dědičné a získané změny estrogenových a progesteronových receptorů ve vztahu k nádorům prsu. Bakalářská práce (školitel Hochmann J.), Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v HK, UK v Praze, 2008

24. Kumar N. S., Richer J., Owen G., Litman E., Horwitz K. B., Leslie K. K.: Selective down - regulation of progesteron receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: Implications for unopposed estrogen action 1998, vol 58, issue 9, pages 1860 - 1865 (citováno dle Mareškové, 2008)

25. Lincová D. a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, 2007, str. 425 – 432 (citováno dle Mareškové, 2008)

26. Lupu R., Menendez J. A.: Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators. Endocrinology 2006, 147(9): 4056 - 66 (citováno dle Mareškové, 2008)

27. Marešková B.: Vztah výsledků vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech dělohy k léčbě s ohledem na vliv okolních faktorů. Diplomová práce (školitel Hochmann J.), Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v HK, UK v Praze, 2008

28. Marková I., Lubušský M., Procházka M., Kudela M., Dušková M., Zapletalová J., Pilka R.: Vybrané imunohistochemické prognostické faktory karcinomu endometria. Praktická gynekologie 2010, 14 (1): 14 – 21, <http://www.lubusky.com/clanky/49.pdf>; 06/03/11

29. Martin J. D., Hähnel R., McCartney A. J., Klerk N.: The influence of estrogen and progesterone receptors on survival in patients with carcinoma of the uterine cervix. Gynecologic Oncology 1986, vol. 23, issue 3, pages 329 - 335 (citováno dle Mareškové, 2008)

30. Míčková I., Pilka R., Lubušský M., Kudela M.: Molekulární prognostické faktory apatogeneze endometriálního karcinomu, Čes. Gynek., 71, č. 4, 2006, str. 355 – 360, <http://www.lubusky.com/clanky/29.pdf>; 25/06/10

31. Mitwally M. F., Casper R. F.: Inhibitory aromatázy a prevence karcinomu prsu. Gynekologie po promoci, březen - duben 2004, str. 7 - 12 (citováno dle Mareškové, 2008)

32. Munstedt K., Grant P., Woenckhaus J., Roth G., Tinneberg H. R.: Cancer of the endometrium: current aspects of diagnostics and treatment. World journal of surgical oncology 2004; 2 (24); 10. 1186/1477 - 7819 - 2 - 4 (citováno dle Mareškové, 2008)

33. Nečas O., a kol.: Obecná biologie pro lékařské fakulty. Nakladatelství H&H Vyšehradská s. r. o., 2000, str. 138, 264 - 266, 290 - 295

34. Novák J., Beška F.: TNM klasifikace zhoubných novotvarů. ÚZIS ČR, Praha 2004, http://www.uzis.cz/system/files/tnm6_cz.pdf; 06/02/11

35. O'regan R. M., Cisneros A., England G. M., Macgregor J. I., Muenzner H. D., Assikis V. J., Bilimoria M. M., Piette M., Dragan Y. P., Pitot H. C., Chatterton R., Jordan V. C.: Effects of the antiestrogens tamoxifen, toremifene, and ICI 182, 780 on endometrial cancer growth. Journal of the national cancer institute 1998, vol. 90, issue 20, pages 1552 - 1558 (citováno dle Mareškové, 2008)

36. Petera J. a kol.: Obecná onkologie. Praha, nakladatelství Karolinum, 2005, str. 12 – 25

37. Petřlová B., Hejda V., Ulčová - Gallová Z., Mukenšnábl P., Rokyta Z.: Porovnání ukazatelů steroidního metabolismu v endometriu žen s endometriózou,

s hyperplazií a bez těchto patologických změn. Česká gynekologie 69, 2004, č. 3, s. 218 - 224 (citováno dle Hirmerové, 2006)

38. Petruželka L., Konopásek B., a kol.: Klinická onkologie. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2003, str. 10 – 26, 42, 43

39. Petruželka L., Konopásek B., Tesařová P.: Hormonální léčba – nové perspektivy a nové možnosti léčby postmenopauzálních žen s hormonálně dependentním karcinomem prsu. Lékařské listy 9/2007, str. 23 - 25 (citováno dle Mareškové, 2008)

40. Petruželka L.: Antiestrogeny v terapii ca mammy. Lékařské listy č. 36/2001 (citováno dle Mareškové, 2008)

41. Pilka R., Míčková I., Lubušský M., Dušková M., Říčančková M., Kudela M.: Expres p53, Ki-67, bcl-2, c-erb-2, estrogenového a progesteronového receptoru v endometriálním karcinomu, Čes. Gynek., 73, č. 4, 2008, str. 222 – 227, <http://www.lubusky.com/clanky/45.pdf>; 25/06/10

42. Prokopová R.: Markery nádorů prsu (estrogenové a progesteronové receptory). Diplomová práce (školitel Hochmann J.), Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2001 (citováno dle Mareškové, 2008)

43. Satyaswaroop P. G., Zaino R. J., Mortel R.: Estrogen - like effects of tamoxifen on human endometrial carcinoma transplanted into nude mice. Cancer Research 1984, 44(9): 4006 - 4010 (citováno dle Mareškové, 2008)

44. Singh M., Zaino R. J., Filiaci V. J., Leslie K. K.: Relationship of estrogen and progesterone receptors to clinical outcome in metastatic endometrial carcinoma. Gynecologic Oncology 2007, 106 (2): 325 – 333, http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WG6_4NTHMXD_29&_cdi=6814&_user=1490772&_pii=S0090825807002272&_origin=search&_coverDate=08%2F31%2F2007&_sk=998939997&_view=c&_wchp=dGLzVtzzSkzk&_md5=a980fc287337a9d9f1d27785a29584a9&_ie=/sdarticle.pdf; 05/06/10

45. Smid - Koopman E., Blok L. J., Kühne L. C. M., Burger C. W., Helmerhorst T. J. M., Brinkmann A. O., Huikeshoven F. J.: Distinct functional differences of human progesterone receptors A and B on gene expression and growth regulation in two endometrial carcinoma cell lines. Journal of the Society for

Gynecologic Investigation 2003, vol. 10, issue 1, pages 49 - 57 (citováno dle Mareškové, 2008)

46. Smith H., Leslie K., Singh M., Qualls C., Revankar C., Joste N., Prossnit E.: GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma, American Journal of Obstetrics and Gynecology, Volume 196, Issue 4, April 2007, Pages 386. e1 - 386. e11, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17403429>; 20/05/10

47. Suthipintawong Ch., Wejaranayang Ch., Vipupinyo Ch.: Prognostic Significance of ER, PR, Ki67, c-erbB-2, and p53 in Endometrial Carcinoma. Journal of the Medical Association of Thailand 2008, 91 (12): 1779 – 1785, http://www.mat.or.th/journal/files/Vol91_No.12_1779_6731.pdf; 05/06/10

48. Špaček J., Štipl S., Halada P.: Jaké jsou zásady racionálního přístupu u pacientek s karcinomem děložního hrdla?. Postgraduální medicína, ZDN archiv 02/2011 [http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni - medicina/jake - jsou - zasady - racionalniho - pristupu - u - pacientek - s - karcinomem - delozniho - hrdla - 457920](http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni_-_medicina/jake_-_jsou_-_zasady_-_racionalniho_-_pristupu_-_u_-_pacientek_-_s_-_karcinomem_-_delozniho_-_hrdla_-_457920); 15/02/2011

49. University of Queensland, 2011: <http://www.di.uq.edu.au/proj4abackground>; 13/02/11

50. Utsunomiya H., Ito K., Suzuki T., Kitamura T., Kaneko C., Nakata T., Niikura H., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H.: Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma. Clinical cancer research 2004, 10 (17): 5850 - 5856 (citováno dle Mareškové, 2008)

51. Valík D., Vyzula R., Janáková E., Nenutil R.: Predikátory účinnosti hormonální léčby karcinomu prsu: co dnes víme o struktuře a funkci estrogenového receptoru. Lékařské listy č. 46/2001 (citováno dle Mareškové, 2008)

52. Wolański Ł., Stanisławek A.: The role of progesterone receptors in breast and endometrial cancer. Annales Universitatis Mariae Curie - Skłodowska Lublin, Polonia 2008, 21 (2), 299 – 307, <http://versita.metapress.com/content/n05km4807j117140/fulltext.pdf>; 05/06/10

53. Žaloudík J.: Křížovatky v léčbě karcinomu prsu. Klinická onkologie 1997, 10/1: 29 - 30 (citováno dle Mareškové, 2008)