

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Vzájemná souvislost markerů nádoru prsu

Bakalářská práce



Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Hradec Králové 2007

Lenka Celbová

Děkuji školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za všestrannou pomoc při vzniku této práce.

OBSAH

1. SOUHRN.....	4
-----------------------	----------

2. SUMMARY	5
3. ÚVOD	7
4. TEORETICKÁ ČÁST – MONOGRAFICKÁ LITERATURA	9
4.1. NÁDOROVÁ TRANSFORMACE BUŇKY	9
4.1.1. Onkogeny	9
4.1.2. Tumor supresorové geny	9
4.2. ANATOMIE MLÉČNÉ ŽLÁZY	11
4.3. NÁDOROVÁ PATOLOGIE MLÉČNÉ ŽLÁZY (KARCINOM)	12
4.3.1. Maligní epitelové nádory – karcinomy prsu	12
4.3.1.1. Neinvazivní karcinom	13
4.3.1.2. Invazivní karcinom	13
4.4. NÁDOROVÉ MARKERY OBECNĚ	13
4.4.1. Všeobecná charakteristika nádorových markerů	13
4.4.2. Rozdělení nádorových markerů	14
4.4.2.1. Klasické nádorové markery	14
4.4.2.2. Nové nádorové markery	14
4.5. MARKERY NÁDORŮ PRSU STANOVOVANÉ V KLINICKÉ PRAXI	17
5. ZAMĚŘENÍ NĚKTERÝCH ČESKÝCH PŘEDEVŠÍM TEORETICKÝCH PRACOVIŠŤ	19
5.1. PRÁCE NA ŠKOLÍCÍM PRACOVIŠTI	19
5.1.1. Bakalářská práce Šustrové	20
5.1.2. Bakalářská práce Hirmerové	21
5.1.3. Bakalářská práce Mareškové	21
5.2. PRÁCE NA OSTATNÍCH PRACOVIŠTÍCH	22
5.2.1. Dizertační práce Prchalové	22
5.2.2. Mutace genů BRCA1 a BRCA2	23
6. ZAHRANIČNÍ ABSTRAKTOVÁ LITERATURA	26
6.1. MUTACE GENŮ V SOUVISLOSTI S NÁDORY PRSU	26
6.2. VĚTŠINOU NEMUTOVANÉ MARKERY SE VZTAHEM K PŘEŽITÍ	27
6.2.1. Exprese a klinický význam cytosolových hladin hyaluronanu	27
6.2.2. Význam cathepsinů v rakovině prsu	27
6.2.3. Ostatní markery ve vztahu k přežití	29
7. DISKUZE	32
7.1. POROVNÁNÍ VÝČTU NÁDOROVÝCH MARKERŮ	32
7.2. PROGNOTICKÉ MARKERY	33
7.2.1. Prognostické markery v souvislosti s hereditární rakovinou prsu	33
7.2.2. Ostatní prognostické markery	33
7.3. MARKERY MAJÍCÍ VZTAH K LÉČBĚ	35
8. ZÁVĚR	37

9. SEZNAM ZKRATEK	38
10. LITERATURA	39

1. SOUHRN

Cílem této bakalářské práce bylo přinést přehled nádorových markerů prsu, zhodnotit jejich význam, souvislosti, prognostickou hodnotu a vztah k léčbě.

V česky psané literatuře jsme se zaměřili např. na dizertační práce a dále pak především na WWW stránky. Z hlediska věcného pak nejprve na význam mutací genů BRCA1 a BRCA2. Nalezli jsme studii zaměřenou na analýzu inaktivace genů BRCA1/2 u 40 neselektovaných vzorků karcinomu prsu. Ztráta alely BRCA1 byla prokázána u 8 nádorových vzorků (21 %), ztráta alely BRCA2 pak u 13 nádorů (33 %). Ve čtyřech vzorcích (10 %) patrně došlo ke kompletní inaktivaci genu BRCA1. Ve dvou případech byly příčinou somatické mutace, způsobující zkrácení genového produktu. Jedná se o zatím nepopsané somatické mutace genu BRCA1. U dvou nádorů pak byla zjištěna hypermetylace promotorové oblasti genu BRCA1.

Dále jsme vyhledávali abstrakty v souvislosti s markery nádorů prsu v zahraniční literatuře, pro nás dostupnými internetovými databázemi. U takto nalezených markerů byla hlavně řešena jejich prognostická hodnota.

Z námi prezentovaných studií vyplývá, že s kratším celkovým přežitím pacientek je spojena exprese c-erbB-2, vysoká hladina Ki67 (je ale spojena s dobrou odpovědí na chemoterapii), mutace p53 (špatná reakce na chemoterapii), postižení lymfatických uzlin, zvýšená exprese rodiny genů BCL2 a cathepsinů, které stimulují tumorigenicitu a metastazování. Nízká exprese VEGF v jedné studii odhalovala pacientky s nižší nebo dvaceti procentní pravděpodobností návratu choroby během sedmi let.

V jedné práci se autoři zabývají obsahem cytosolové kyseliny hyaluronové, kdy vysoká intratumorální hladina byla spojena s delším přežitím pacientek a pozitivně korelovala s jedním z estrogenem navozených proteinů.

Autoři ve vztahu k léčbě poukazují na důležitost stanovení steroidních receptorů pro volbu endokrinní terapie. Expres ER v nádoru prsu znamenala dobrou klinickou odpověď. Pro expresi c-erbB-2 je indikován trastuzumab, jedna studie se zabývala

novou cestou léčby propeptidem lysyl oxidázy u rakoviny prsu stimulované tímto onkogenem (c-erbB-2).

Domníváme se, že některé námi prezentované informace by mohly posloužit k lepšímu pohledu a hodnocení této problematiky.

2. SUMMARY

The objective of this bachelor thesis (Tumour markers of breast cancer and their mutual connection.) is to show the list of tumour markers of the breast cancer, to evaluate the importance, connections, prognostic values of tumour markers, and connection to therapy.

We concentrated e.g. on the dissertation theses and in the addition predominantly on the WWW pages in case of the Czech literature. From the point of view of concrete problems we concentrated first on the importance of mutation of BRCA1 and BRCA2 genes. We found the study about the analysis of inactivation of BRCA1/2 genes by 40 unselected samples of breast carcinoma. The deprivation of the BRCA1 alele was demonstrated in 8 samples of tumours (21 %), and deprivation of the BRCA2 alele in 13 samples of tumours (33 %). In 4 samples (10 %) the BRCA1 gene was inactivated probably completely. In two cases the cause was in the somatic mutations, which shortened the gene product. It concerns the not yet described mutations of the BRCA1 gene. In two cases the hypermethylation of the BRCA1 gene promoter area was found. In the other way we searched the abstracts in connection with the tumour markers in foreign literature (by accessible internet database). In case of the tumour markers found by this manner their prognostic value was solved.

It is evident from the studies, presented by us, that the c-erbB-2 expression is connected with a shorter overall survival of the patients, also high level of Ki67 (but is connected with good response to chemotherapy), mutation p53 (bad response to chemotherapy), involvement of a lymph nodes, higher level of BCL2 gene family and cathepsins, that stimulate tumorigenicity and formation of metastases. Low VEGF expression in one work revealed the patients with 20 % or smaller probability of relaps (of cancer till 7 years).

In one work the authors deal with the importance of cytosolic hyaluronic acid and they found that the high intra – tumour level was connected with longer survival of patients, and it also correlated positively with one of the estrogen-induced protein.

The authors point out the importance of steroid receptors determination for the choice of endocrine therapy. ER expression in the breast tumour meant the good clinical response. Trastuzumab is indicated for c-erbB-2 expression. One study concerned with the new way for treatment of the breast cancer. The new substance is lysyl oxidase propeptide – for these c-erbB-2 stimulated tumours.

We suppose that some of the information presented by us can be useful for better evaluation of these problems.

3. ÚVOD

Naší snahou v této rešeršní práci je přinést přehled nádorových markerů, jejich rozdělení, vzájemné souvislosti a důležitost jejich stanovení v klinické praxi.

Chtěli bychom poukázat na význam některých markerů jako prognostických faktorů pro přežití pacientek a jejich vztah k léčbě rakoviny prsu, jenž patří mezi přední nádorová onemocnění v České republice.

Prvním cílem je rozšířit počet témat sledovaných rešeršní skupinou studentů na naší fakultě a současně se pokusit obohatit tím česky psané zdroje poznatků o nádorech prsu na makromolekulární a molekulární úrovni.

K vyhledávání informací pro tuto bakalářskou práci jsme používali převážně internetové vyhledavače. Při vyhledávání jsme zadávali klíčová slova a jejich kombinací jsme redukovali nalezené abstrakty. Také jsme vymezili dobu, ze které by měly články pocházet, tedy nejnovější poznatky. Nalezené abstrakty jsme třídili podle názvu a rychlém shlédnutí textu, případně přeložením závěru. Z abstraktů jsme po přečtení a přeložení vybírali části textů, které jsme použili jako podklady pro tuto práci.

Z volně dostupných vyhledavačů jsme používali Google. Tohoto vyhledavače jsme využili v kapitolách Teoretická část a Zaměření některých českých především teoretických pracovišť.

Vyhledavačů dostupných pro farmaceutickou fakultu jsme použili k vyhledávání vědeckých abstrakt. Zaměřili jsme se na databáze Current Contents Connect a Science Direct.

Základními klíčovými slovy bylo spojení (tumor or biologic) markers, která jsme doplňovali dalšími slovy jako např.: receptor, expression, survival. Pro vyhledání konkrétních informací o některém markeru jsme použili jako klíčové slovo přímo název hledaného markeru. Jako poslední klíčové slovo jsme uvedli breast cancer, abychom vše zúžili na rakovinu prsu.

4. TEORETICKÁ ČÁST – MONOGRAFICKÁ LITERATURA

4.1. NÁDOROVÁ TRANSFORMACE BUŇKY

Za nádorovou transformaci buněk označujeme změny, kdy buňky nereagují na regulační mechanismy. Jejich charakteristickými vlastnostmi jsou, kromě často nadměrného množení buněk, poruchy diferenciace, ploidity a změny migračních vlastností, které se projeví invazivním růstem nádoru a metastazováním do jiných tkání v organismu. Nádorové buňky se dělí neomezeně a nekontrolovaně. Podstatou transformace buňky v nádorovou buňku je změna aktivity genů – onkogenů a tumor supresorových genů (Nečas a kol. 2000).

4.1.1. Onkogeny

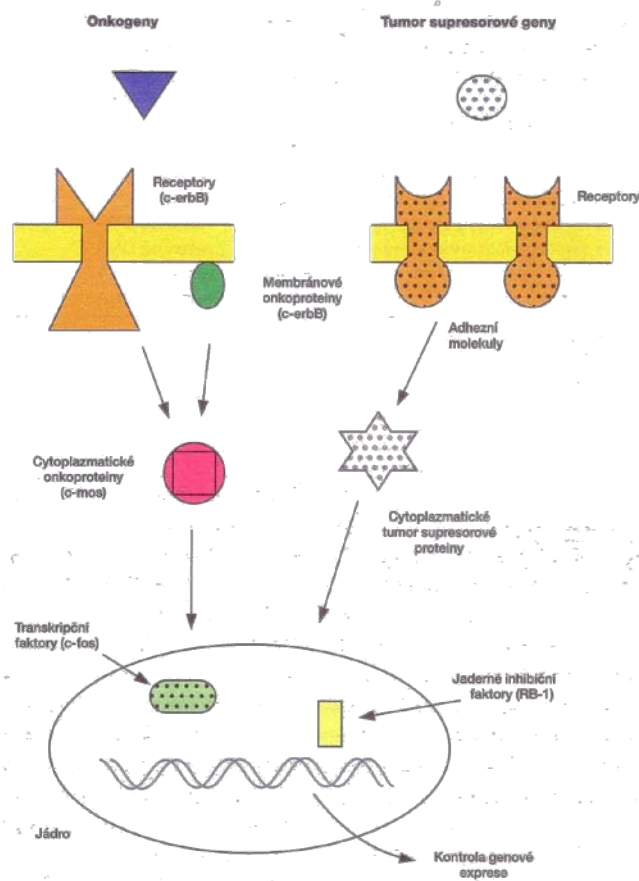
Onkogeny významným způsobem přispívají k nádorové transformaci buňky. Potenciální onkogeny se nazývají protoonkogeny. Jsou to obecně geny, jejichž produkty se v normální buňce podílejí na kontrole dělení a diferenciaci buňky. K aktivaci protoonkogenů na onkogeny dochází buď kvantitativní změnou jejich exprese, nebo kvalitativní změnou struktury (mutace) s následnou změnou funkce genového produktu. Aktivaci protoonkogenu na onkogen způsobují tyto mechanismy: bodová mutace, amplifikace protoonkogenu, inserce virových promotorů a enhancerů a translokace částí chromozomů (Nečas a kol. 2000).

Onkogeny se dělí na: onkogeny kódující růstové faktory a jejich receptory, onkogeny kódující signální transduktory, onkogeny kódující proteinkinázy, onkogeny kódující transkripční faktory a onkogeny kódující proteiny, které blokují apoptózu (Nečas a kol. 2000).

4.1.2. Tumor supresorové geny

Tumor supresorové geny (antionkogeny) jsou geny, které potlačují nádorový růst a zpomalují nekontrolovaný růst buněk, které jsou již nádorově transformované (Nečas a kol. 2000).

Schematické působení onkogenů a tumor supresorových genů znázorňuje obr.1



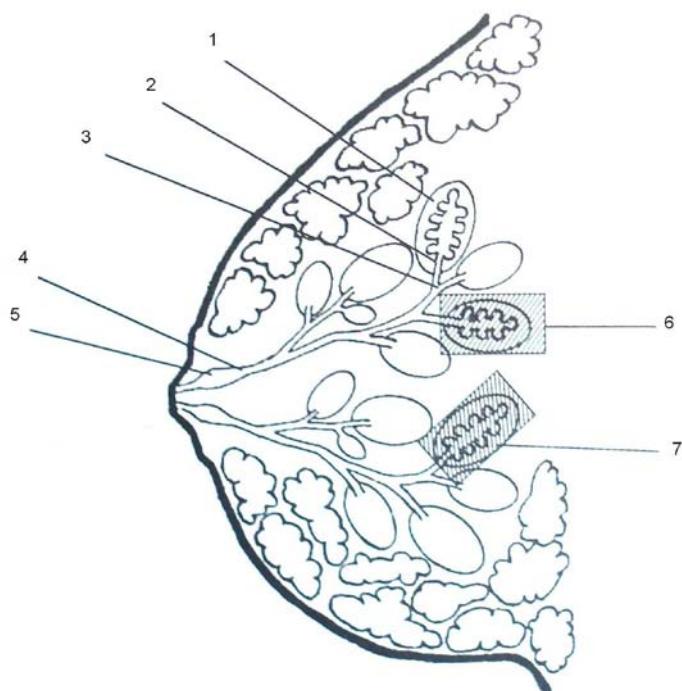
Obr. 1 Schematické působení onkogenů a tumor supresorových genů.

Nádorová transformace buňky může být vyvolána tím, že produkty onkogenů se vážou jako modifikované růstové faktory na specifické receptory, nebo fungují jako změněné receptory pro růstové faktory (c-erb-B), či jako membránové onkoproteiny (signální transduktory, c-ras). Cytoplazmatické onkoproteiny mohou být součástí kaskády mitogenního signálu jako proteinkinázy (c-mos). Jiné onkoproteiny fungují jako transkripční faktory v jádře buňky (c-fos). Produkty tumor supresorových genů mohou působit inhibici buněčné proliferace na úrovni interakce s růstovými faktory či jejich membránovými receptory a na úrovni interakce s adhezními molekulami transmembránového skeletu. Produkty jiných tumor supresorových genů mohou mít funkci cytoplazmatických tumor supresorových proteinů či jaderných inhibitorů transkripce (RB-1) (Nečas a kol. 2000).

4.2. ANATOMIE MLÉČNÉ ŽLÁZY

Embryologicky je mléčná žláza ektodermový derivát kůže. Je to v podstatě modifikovaná apokrinní potní žláza vývojově blízká „aromatickým“ žlázám savců. (Motlík a Živný 2001).

Anatomicky (histologicky) jde o bohatě větvenou tubulární žlázu, jejíž terminální úsek citlivě reaguje na hormonální podněty (estrogeny, gestageny, prolaktin) a v těhotenství se proměňuje v tubulárně acinózní žlázu s morfologickými projevy laktace „acinárního“ epitelu. Nejperifernější úsek vývodového stromu se definuje jako terminální duktulární lobulární jednotka (terminal ductular lobular unit, TDLU). Skládá se z intralobulárního úseku terminálního ductu, z něhož do stran odstupují slepé terminální duktuly (viz obr. 2). TDLU je vybavena charakteristickým epitelem a řídkým vazivovým stromatem. Epitel je dvouvrstevný a jeho vnitřní vrstva kubických buněk je zdrojem většiny nenádorových i nádorových změn lobulu. Zevní vrstvu epitelu hraničící se stromatem tvoří souvislá vrstva myoepitelových buněk. Další úseky vývodového stromu se liší strukturou stěny. Větší extralobulární vývody jsou provázány přibývajícím množstvím elastických vláken, kdežto myoepitelová vrstva se vytrácí (Motlík a Živný 2001).



Obr. 2 Struktura vývodového stromu mléčné žlázy

1-lobulus, 2-ductus terminalis intralobularis, 3-ductus terminalis extralobularis, 4-ductus lactiferus, 5-sinus lactiferus, 6-terminal ductular lobular unit (TDLU), 7-lokalizační predilekce karcinomu in situ i invazivního všech typů (Motlík a Živný 2001)

4.3. NÁDOROVÁ PATOLOGIE MLÉČNÉ ŽLÁZY (KARCINOM)

V patologii mléčné žlázy mají největší význam onkologické léze. Karcinom prsu je jedním z častých lidských nádorů, který u žen zaujímá přední místo co do prevalence i mortality (Motlík a Živný 2001).

4.3.1. Maligní epitelové nádory – karcinomy prsu

Karcinom prsu dělíme na hlavní dva typy: neinvazivní a invazivní karcinom. Většina karcinomů vychází z TDLU (viz obr. 2 č. 7).

4.3.1.1. Neinvazivní karcinom

Neinvazivní karcinom (in situ karcinom) je definován intaktní bazální membránou, maligní buňky proliferují uvnitř dilatovaného duktálního nebo acinárního prostoru a neprostupují přes bazální membránu (Skálová 2006). Rozlišujeme dva základní typy in situ karcinomu, vycházející z duktální jednotky (duktální carcinoma in situ, DCIS) nebo vycházející z lobulární jednotky (lobulární carcinoma in situ, LCIS).

4.3.1.2. Invazivní karcinom

Invazivní karcinom se vyznačuje invazivním růstem a schopností metastázovat do jiných tkání. Dle histologické klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) se do této skupiny řadí: invazivní duktální karcinom (DIC), invazivní lobulární karcinom (LIC), medulární karcinom (MC), mucinózní invazivní karcinom (GIC), invazivní papilární karcinom (PIC), tubulární karcinom (TIC), adenoidně cystický karcinom (ACC), sekreční karcinom (SJC), apokrinní karcinom (AIC) a karcinom s metaplazií (MIC) (Motlík a Živný 2001).

4.4. NÁDOROVÉ MARKERY OBECNĚ

4.4.1. Všeobecná charakteristika nádorových markerů

Jedním z typických projevů maligních nádorů je produkce různých látek. Pro jejich označení se používá stručný a výstižný název nádorový marker. Pod tímto názvem se v užším slova smyslu chápou látky produkované maligními tkáněmi, z kterých pronikají do tělesných tekutin, kde je možné kvantitativně měřit jejich koncentrace (markery humorální). Ale jde i o látky, které do tělesných tekutin nepřecházejí, a jejich přítomnost se v nádorových tkáních dokazuje buď biochemicky – po připravení suspenze z nádoru (= v cytosolu), nebo mikroskopickými technikami – pomocí imunohistochemických metod (markery tkáňové). Pod názvem nádorový marker se v širším slova smyslu chápou také látky, které nejsou produkovány maligními tkáněmi a které se do tělesných tekutin dostávají z tkání zdravých v důsledku nespecifické odpovědi na přítomnost malignity v organismu (Kaušitz 1991).

4.4.2. Rozdělení nádorových markerů

Co se týká rozdělení nádorových markerů – nenalezli jsme v literatuře jednotnost. Rozhodli jsme se použít rozdělení podle Zimy a kol. (2007), jenž dělí nádorové markery na klasické, které se běžně stanovují na českých klinických pracovištích, a slouží zejména k monitorování terapie. Druhou skupinou jsou potenciální nové nádorové markery spojené s buněčnou proliferací, diferenciací a metastazováním, které jsou předmětem výzkumu českých i zahraničních pracovišť (Zima a kol. 2007).

4.4.2.1. Klasické nádorové markery

Klasické nádorové markery můžeme rozdělit do tří skupin:

Onkofetální antigeny: tyto proteiny jsou exprimovány pouze během vývoje lidského zárodku, brzy po porodu jejich exprese mizí a znovu se objevuje nejčastěji ve spojitosti s nádorovými onemocněními. Patří sem např. alfa-1-fetoprotein, karcinoembryonální antigen, lidský choriový gonadotropin (Zima a kol. 2007).

Tkáňově specifické antigeny: jsou to molekuly, jejichž exprese je omezena pouze na určitou tkáň nebo orgán (např. prostatický specifický antigen, tkáňový polypeptidový specifický antigen, většina CA antigenů). Teprve při nádorovém procesu (méně často při zánětu či traumatizaci) postihujícím tuto specifickou tkáň dochází k jejich uvolnění (Zima a kol. 2007).

Nespecifické antigeny, enzymy a hormony produkováné nádory: jde o molekuly, které se vyskytují v řadě tkání organismu a jejichž hladinu je možné detekovat i za fyziologických podmínek. Za patologických podmínek (při přítomnosti nádoru) se jejich hladina zvyšuje (Zima a kol. 2007).

Nádorové markery jsou látky různé chemické struktury a různé biologické povahy. Patří sem: enzymy, hormony, hormonální receptory (estrogenové a progesteronové receptory), cytokeratiny (glykoproteiny, glykolipidy, sacharidy) a další (Malík 2004).

4.4.2.2. Nové nádorové markery

Potenciální nové nádorové markery jsou látky (proteiny a onkoproteiny – produkty mutovaných genů), které mají význam v dějích důležitých pro přežití buněk, jejich dělení, diferenciaci a metastazování, podílí se na regulaci buněčného cyklu, apoptóze, signální transdukci, adhezi a angiogenezi (Zima a kol. 2007).

Přehled některých nových nádorových markerů podle Zimy a kol. (2007):

Markery spojené se signální transdukcí:

- c-erbB-2 (HER-2/neu) – protoonkogen
- C-myc onkoproteiny
- EGRF – epidermální růstový faktor, jedná se o transmembránový protein s tyrozinkinázovou aktivitou. Zvýšená exprese EGRF je typická pro řadu malignit (prs, mozek, plíce atd.)
- IGF-I a IGF-IR (IGFBP-3) – inzulínu podobný růstový faktor, jeho receptor a vazebný protein
- Interleukiny a jejich receptory (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) – významná role v procesu zánětu a proliferace imunokompetentních buněk
- Ras protein (Ras P21 či p21^{ras}) – klíčový regulátor buněčného cyklu
- TGF- β 1 (transformující růstový faktor) – účastní se v kontrole proliferace a diferenciaci
- TNF- α (tumor necrosis faktor alfa) – patří k nejdůležitějším prozánětlivým cytokinům, hraje roli v rezistenci proti nádorům

Markery spojené s regulací buněčného cyklu:

- Cykliny
- Inhibitory cyklin dependentních kináz

Markery spojené s apoptózou:

- BCL2 protein – přispívá k tumorigenezi blokováním apoptózy
- sFas – patří do rodiny TNF, existuje ve dvou formách, jako transmembránový a solubilní (sFas). sFas je zvýšen u řady nádorů, suprimuje apoptózu, a tak přispívá ke karcinogenezi a rezistenci k chemoterapii.
- sFasL (sFas ligand)
- Protein p53 – produkt mutovaného genu p53 a protilátky proti proteinu p53, protein p53 suprimuje růst buněk a hraje významnou roli v zachování stability genomu.

Markery spojené s angiogenezí:

- Angiostatin – inhibitor angiogeneze, jeví velkou homologii s plazminogenem
- Angiogenin – inhibitor angiogeneze
- bFGF – bazický fibroblastový růstový faktor – induktor angiogeneze
- CD105 (endoglin) – receptor pro TGF- β 1 a - β 3 – nezbytný pro angiogenezi
- Endostatin – působí antiangiogeneticky
- Trombospondin – inhibitor angiogeneze

- VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) – velmi účinný angiogenetický faktor

Markery spojené s adhezí:

Buněčné adhezivní molekuly jsou potřeba pro progresi nádoru a metastazování, existují jako solubilní a membránově vázané.

- E-cadherin
- CD 44
- E-selektin
- ICAM-1 (intercelulární adhezivní molekula)
- VCAM-1 (vaskulární buněčná adhezivní molekula)

Markery spojené se specifickými vlastnostmi nádorových buněk:

- Vztah k zánětu – CRP
- Souvislost s nekrózou nádorových buněk – mimobuněčná volně cirkulující

DNA

- Matrix metalloproteinázy (MMPs) – endopeptidázy závislé na zinku, souvisejí s nádorovou invazí a metastazováním

- Cyklooxygenáza 2 (COX-2) – enzym konvertující kyselinu arachidonovou na prostaglandiny a další eikosanoidy, které stimují angiogenezi a potencují tumorigenezi. Proto nesteroidní protizánětlivé léky a COX-2 inhibitory mohou hrát důležitou roli v nádorové prevenci (např. kolorektální karcinom).

Význam potenciálních nových nádorových markerů se u různých typů onemocnění může lišit. Nález zvýšeného markeru u jednoho typu nádoru může znamenat špatnou prognózu, u jiného však může být spojen s dobrou prognózou (Zima a kol. 2007).

4.5. MARKERY NÁDORŮ PRSU STANOVOVANÉ V KLINICKÉ PRAXI

Tabulka 1 uvádí přehled vhodných kombinací markerů nádoru prsu pro použití v klinické praxi, který vychází z doporučení mezinárodních společností zabývajících se nádorovými markery.

Tab. 1 Přehled markerů nádoru prsu dle doporučení mezinárodních společností

NACB	Estrogenní a progesteronové receptory vždy, CA 15-3 a CA 27. 29 pro monitoraci pokročilého onemocnění
ASCO	Rutinní použití CA 15-3 a CA 27. 29 samostatně není doporučeno. Zvyšování CA 15-3 nebo CA 27. 29 může být použito pro odhad selhání terapie. Rutinní použití CEA není doporučeno. Estrogenní a progesteronové receptory by měly být stanoveny u primárních lézí. Steroidní receptory by měly být použity pro výběr pacientů pro endokrinní terapii. Zvýšená exprese nebo amplifikace HER-2/neu (c-erbB2) by mohla být použita pro výběr pacientů pro terapii Herceptinem ^R (trastuzumab)
ACS	Není
EGTM	Steroidní receptory ve tkáni pro predikci odpovědi na hormonální terapii. CEA a jeden z rodiny MUC-1-genům příbuzných proteinů v séru pro prognózu, sledování a monitorování terapie. HER-2/neu ve tkáni pro predikci odpovědi na Herceptinem ^R (trastuzumab) u pacientů s pokročilým onemocněním

EGTM - European Group on Tumor Markers, NACB – National Academy of Clinical Biochemistry, ASCO – American Society for Clinical Oncology, ACS – American Cancer Society (Zima a kol. 2007, přesné odkazy na tyto zdroje Zima neuvádí).

Charakteristika markerů nádorů prsu podle Zimy a kol. (2007):

Markery humorální:

CA 15-3 (CA – carbohydrate antigen)

CA 15-3 je glykoprotein, patřící do rodiny mucinů. Slouží k monitorování pacientek s metastazujícím nádorem prsu.

MCA (mucin-like cancer associated antigen)

Antigen, charakterizovaný pomocí monoklonálních protilátek, marker dobře prokazuje metastázy, progresi i regresi nádoru. Často však bývá zvýšený i u jiných typů nádorů.

CEA (karcinoembryonální antigen)

CEA patří k nejdéle známým nádorovým markerům. CEA se nachází jak v embryonální tkáni tak u dospělých v epiteliální tkáni. Nevýhodou CEA je časté zvýšení u nemaligních onemocnění.

Markery tkáňové:

SR (steroidní receptory)

Tkáňové nádorové markery je možné stanovovat imunochemicky v extraktech nádorové tkáně nebo imunohistochemicky na tkáňových řezech. Pomáhají určit reakci nádoru na hormonální terapii a odhadnout jeho prognózu. Stanovují se estrogenové (ER) a progesteronové (PR) receptory.

c-erbB-2 (HER-2/neu)

c-erbB-2 je protoonkogen na chromozomu 17 (17q11-q12), kódující transmembránový glykoprotein p185 s tyrozinkinázovou aktivitou, má strukturální i funkční homologii s epidermálním růstovým faktorem. Extracelulární doména proteinu (97-115 kDa) je uvolňována do cirkulace a je měřitelná v séru nebo v plazmě. Zvýšená exprese může být nalezena např. u některých pacientek s metastazujícím karcinomem prsu (30-40 % karcinomů prsu je HER-2 pozitivních, ve vyšším zastoupení duktální karcinom) a bývá spojena se zvýšenou proliferační schopností buněk, rychlejším metastazováním, pozitivní mitotickou aktivitou a negativitou estrogenových a progesteronových receptorů. Pacientky s nadměrnou expresí HER-2/neu onkogenu nebo jeho proteinového produktu mají horší odpověď na hormonální léčbu a chemoterapii a špatnou prognózu. Jsou indikovány k léčbě humanizovanými monoklonálními protilátkami proti ektodoméně c-erbB-2 onkoproteinu (Herceptin^R - trastuzumab) (Zima a kol. 2007).

5. ZAMĚŘENÍ NĚKTERÝCH ČESKÝCH PŘEDEVŠÍM TEORETICKÝCH PRACOVIŠŤ

5.1. PRÁCE NA ŠKOLÍCÍM PRACOVIŠTI

Na školícím pracovišti farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy se MUDr. Hochmann, CSc. dlouhodobě zabývá vztahem estrogenových a progesteronových receptorů navzájem a ve vztahu k okolním faktorům. Na toto téma bylo napsáno několik diplomových a bakalářských prací. Některé práce jsou zaměřeny na nádory dělohy, ale i tyto poznatky mohou podpořit řešení problematiky nádorů prsu.

MUDr. Hochmann, CSc. (2007) jednak podává návod na vyhodnocování receptorového poměru ER/PR (2007/a), a jednak šíře upozorňuje na zpřesnění diagnostiky analýzou matematických vztahů mezi estrogenovými a progesteronovými receptory v nádorech prsu s ohledem na komplikující faktory.

Cytosolové, ale i imunohistochemické stanovení estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) v nádorech prsu je zatíženo poměrně velkými nepřesnostmi v blízkosti rozhraní pozitivivity a negativity.

Klinik většinou neví, jak velká je chyba. Může však přesnost práce laboratoří posoudit pomocí statistické analýzy všech výsledků všech svých pacientek. Pokud lze v dotyčném statistickém souboru prokázat všechny publikované celoskupinové závislosti – s minimálními odchylkami, lze považovat i výsledky jedné posuzované pacientky za spolehlivé.

Např. jde o závislost ER na věku, PR na ER nebo ER/PR na PR. Nebo je možno analyzovat pravidelnost tvaru logaritmicko-normálního rozložení ER nebo PR.

Navíc, některé kombinace laboratorních výsledků (jako např. poměr ER/PR) by mohly zároveň sloužit jako diagnostické, terapeutické nebo prognostické ukazatele.

Dalšími skutečnostmi, u nichž lze prověřovat, zda laboratoř pracuje dost precizně, aby je byla schopna odhalit, je např. vliv stádia menstruačního cyklu na ER a PR, na koncentrace těchto receptorů. Pro rozhodování o terapii je důležitá hlavně možnost přeměnit naměřené hodnoty – na „korigované“ hodnoty ER a PR – vypočítané s ohledem na tyto skutečnosti.

5.1.1. Bakalářská práce Šustrové

Studentka Šustrová se ve své bakalářské práci zabývala vztahem estrogenových a progesteronových receptorů v nádoru prsu s ohledem na okolní faktory, jako např. menstruační cyklus, věk, obezitu nebo předešlou hormonální léčbu.

V přehledu nově získaných poznatků Šustrová (2006) uvádí: Aktivace estrogenového receptoru (ER) estradiolem vede ke kaskádě dějů, které mohou mít vliv na funkci či samotnou expresi druhého typu receptorů, progesteronového receptoru (PR).

U lidí je tvorba PR v nádorech prsu indukována nejen ovariálními estrogény, ale také intra-tumorovým estradiolem pomocí ER. Progesteronový receptor může sloužit u takovýchto pacientek jako lepší faktor pro prognózu primárního karcinomu prsu než intra-tumorová hladina estradiolu nebo ER (Miyoshi a kol. 2004).

Šustrová dále poukazuje na důležitost brát v úvahu přítomnost receptorů v několika izoformách. Ve své práci cituje studie několika autorů: Estradiol indukoval expresi PR ve všech studovaných buněčných liniích, poměr exprese PRA/PRB, indukovaný estradiolem, závisel na buněčných liniích. Promotory PRA a PRB jsou odlišně regulované estradiolem v odlišných buňkách nádoru prsu. Inzulín, IGF-1 nebo cAMP, o kterých bylo dříve publikováno, že indukují expresi PR, však v citované studii expresi PR nijak nemění (Vienonen a kol. 2002).

Také jednotlivé izoformy mají schopnost se ovlivňovat navzájem: PRA projevuje dominantní inhibiční efekt na aktivitu PRB a na další jaderné receptory.

PRA a PRB jsou exprimovány v cílových tkáních ve srovnatelných hladinách, nicméně mohou být identifikovány buňky, produkující přednostně pouze jednu z izoform. V některých tumorech probíhá exprese vysokých hladin PRA a to může být spjata se špatnou prognózou. Nadměrná exprese PRA je spojena se změnou adhezivních vlastností v buňkách nádoru prsu a ovlivňuje endogenní progestinové cíle, které závisely na buněčném poměru PRA:PRB (McGowan a kol. 1999).

S expresí PR byly úzce spjaty ER α a ER β . To nasvědčuje tomu, že ER α je hlavní regulátor tohoto estrogenem indukovaného genu progesteronového receptoru v nádorech prsu. Zatímco exprese ER α pozitivně korelovala s nízkým (histologickým) stupněm nádoru, diploidií, a s nízkým % buněk v S-fázi, tedy se všemi biologickými parametry dobrého prognostického profilu, měly ER β tendenci hloupost pouze k aneuploidii a souvislost se stupněm nádoru nebo S-fází nebyla pozorována (Šustrová 2006).

Citovaní autoři zjistili: Expres ER β může způsobit falešně pozitivní interpretace pro ER α . Tento závěr naznačuje, že v klinických nádorech prsu exprese ER β zastupující pro ER α a že ER β může být použitelným biomarkerem (Fugua a kol. 2003).

Předmětem další práce Šustrové byl vliv okolních faktorů na přesnost stanovení ER a PR – především z hlediska nebezpečí vzniku falešné negativy vyšetření těchto receptorů.

5.1.2. Bakalářská práce Hirmerové

Stejnými principy jako Šustrová se ve své bakalářské práci zabývala Hirmerová. Problematiku však zaměřila na rakovinu dělohy.

Ve své práci uvádí: Existuje nebezpečí vzniku falešné negativy nebo falešné pozitivy těchto receptorů a tím nebezpečí chybné léčby. Proto je nutno zabezpečit, aby před operací byly některé arteficiální vlivy eliminovány (např. přerušením hormonální léčby klimakterických obtíží). U některých jiných vlivů by bylo vhodné vypracovat matematický způsob korekce (např. vliv vyšetření v nevhodné fázi ovariálního cyklu).

Faktory, zvyšující koncentraci ER v děloze (především v endometriu a jeho nádorech) jsou především proliferací fáze menstruačního cyklu, z chemických látek jsou to tamoxifen, estradiol, estrogenový trifenyletylen ICI 47 699, ICI 318, danazol a triptorelin.

Naopak snížení ER bylo nalezeno při vlivu sekreční fáze menstruačního cyklu, dále vlivem diferenciací, kdy se množství snižovalo v závislosti na stupni nádoru. Také vliv polohy zde má význam, ER se snižují směrem z fundu ke krčku dělohy.

V případech PR lze říci, že jejich koncentrace v děloze (především v endometriu a jeho nádorech) byla vyšší v proliferací fázi menstruačního cyklu. Snížené hladiny PR byly v sekreční fázi menstruačního cyklu a u vlivu diferenciací platí stejný princip jako u ER. PR se také snižují směrem z fundu ke krčku (Hirmerová 2006).

5.1.3. Bakalářská práce Mareškové

Předmětem bakalářské práce Mareškové byly estrogenové a progesteronové receptory v nádorech dělohy ve vztahu k terapii.

Tamoxifenová terapie endometriálního karcinomu může indukovat syntézu PR dokonce i v nádorech s nízkou výchozí hladinou PR, dělajíce takové nádory potenciálně citlivé k další hormonální terapii progesteronem (Nola a kol. 1999). Na základě tohoto

zjištění se jeví vhodná kombinace léčby tamoxifenem a progestinem. Tuto jejich úvahu však považujeme za teoretickou. Dále ve své práci Marešková poukazuje na vhodnost vyšetřování PRB místo samotného PR: Smid-Koopman a kol. (2003) in vitro odhalují, že PRA inhibuje funkci PRB, jako důležitá determinanta progesteronového účinku je buněčný poměr PRA : PRB. Exprese pouze jedné PR izoformy byla častá v endometriálních nádorech, což ukazuje, že snížení PR, pozorované v těchto karcinomech, vzniká ze ztráty jedné PR izoformy. Progesteron účinkoval prostřednictvím receptorů B a inhiboval invazivnost rakovinných buněk (Dai a kol. 2002).

5.2. PRÁCE NA OSTATNÍCH PRACOVÍŠTÍCH

5.2.1. Dizertační práce Prchalové

Prchalová se ve své práci, která byla vypracována v laboratoři buněčné biologie ÚMG AV ČR, zabývala založením a podrobnou charakterizací permanentní klonální buněčné linie, EM-G3, odvozené ze vzorku primárního lidského karcinomu prsu.

Prchalová (2006) EM-G3 charakterizuje: Linií tvoří kuboidální buňky, příležitostně se vyskytují i více diferencované buňky s dlouhými výběžky, které se zřejmě podílí na mezibuněčné komunikaci. EM-G3 buňky, s generační dobou 34h, jsou závislé na epidermálním růstovém faktoru. Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace prokázala stabilní genom s několika genetickými změnami. Nebyly detekovány amplifikace ani delece žádného z genů, které se často pojí s diagnózou karcinomu prsu (HER2/neu, cyklin D, c-myc, p53 a retinoblastomový gen).

Imunocytochemická analýza EM-G3 buněk in vitro odhalila pozitivitu na cytokeratiny (K) K5, K14, K18 (cytokeratiny K7, K8, K18 jsou markery luminálních buněk; K5 a K14 jsou markery bazálních/myoepiteliálních buněk; K19 je marker plně diferencovaných luminálních buněk), protein p63 (jaderný protein, vyskytující se v progenitorových a myoepiteliálních buňkách), epiteliální membránový antigen (EMA) a jiné proteiny charakterizující mamární epiteliální bipotentní progenitory. Detekce integrinů $\alpha 6$, $\beta 1$ a proteinu CD44 (povrchový marker, vyskytující se u progenitorových a bazálních buněk mléčné žlázy) pomocí cDNA arraye také poukazuje na bazální/kmenové buňky. Oproti tomu většina buněk původního karcinomu prsu

vykazovala luminální charakter (K18+, K19+, K5-, K14- a p63-). Nicméně buňky s imunocytochemickým profilem podobným kultivovaným EMG3 buňkám byly též nalezeny v malých ostrůvcích na parafinových řezech nádoru pacientky. EM-G3 buňky tvořily limitované tumory v nu/nu myších. Buňky v myších tumorech byly organizovány v primitivních duktálních strukturách, obsahující 1-3 velké centrální buňky (EMA+, marker luminálních buněk), obklopené menšími periferními buňkami (p63+, marker myoepiteliálních buněk). Velké centrální buňky se postupně rozpadaly až vznikl pseudolumen. Je zřejmé, že EM-G3 buňky jsou schopné částečné diferenciaci in vitro i in vivo.

Výsledky ukazují, že EM-G3 buňky byly odvozeny z premaligní populace společných progenitorů luminálních a myoepiteliálních buněk, které byly immortalizované v raném stadiu tumorigeneze (Prchalová 2006).

5.2.2. Mutace genů BRCA1 a BRCA2

Ve spojitosti s markery nádorů prsu jsme našli, že se česká výzkumná a klinická pracoviště zabývají detekcí mutací v genech BRCA1 (breast cancer gene 1) a BRCA2 (breast cancer gene 2) a následnou péčí o rodiny s hereditárním výskytem karcinomu prsu a vaječníků. Vzájemně spolupracují: Ústav biochemie a experimentální onkologie, Onkologická klinika 1. LF UK a VFN, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN, Komplexní onkologické centrum, Masarykův onkologický ústav v Brně a FN Motol (Praha).

Karcinom prsu se vyskytuje v hereditární (5–10 % případů) a sporadické formě. Příčinou většiny hereditárních karcinomů jsou zárodečné mutace genů BRCA1 a BRCA2. Kromě inaktivujících mutací, závisí vývoj nádoru i na ztrátě druhé, intaktní alely. U karcinomů prsu, které vznikají v nepřítomnosti dědičné mutace, není úloha genů BRCA1/2 dostatečně známa (Janatová a kol. 2005).

Prchalová (2006) podle Denga (2006) řadí BRCA1 a BRCA2 společně s geny Rad51, BRAF, NBS1 do skupiny reparačních genů, jejichž produkty (proteiny) se uplatňují při opravě poškozené DNA, která vzniká při replikaci nebo působením kancerogenních vlivů.

Přibližně 1 % hereditárních karcinomů prsu způsobuje mutace v dalších vysoce penetrantních genech (např. p53, PTEN), které jsou zodpovědné za hereditární syndromy, zahrnující i další malignity (Kleibl a kol. 2006).

Karcinomy prsu u pacientek s BRCA1 zárodečnými mutacemi jsou častěji negativní na estrogenové receptory, progesteronové receptory a c-erbB-2 a mnohem častěji jsou pozitivní na protein p53. Naopak, BRCA2 nádory, nevykazují významný rozdíl v expresi některých těchto proteinů. BRCA1 má zřetelný morfologický a imunohistochemický fenotyp. Kombinace morfologických a imunohistochemických dat může být užitečná v predikci rizika u mladých pacientek majících zárodečné mutace BRCA1. Podle pět let starého údaje – BRCA2 fenotyp není dosud dobře definovaný (Lakhani a kol. 2002).

Pacientky s oboustrannou rakovinou prsu mající mutace BRCA jsou významně mladší než ty, které je nemají. Mají také významně vyšší rodinnou zátěž rakovinou prsu a zvýšené riziko rozvoje rakoviny vaječníků (Rogozinska-Szczepka a kol. 2004).

Janatová a kol. (2005) z Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK, Praha se ve své studii zaměřily na analýzu inaktivace genů BRCA1/2 u 40 neselektovaných vzorků karcinomu prsu. Ztráta alely BRCA1 byla prokázána u 8 nádorových vzorků (21 %), ztráta alely BRCA2 pak u 13 nádorů (33 %). Ve čtyřech vzorcích (10 %) patrně došlo ke kompletní inaktivaci genu BRCA1. Ve dvou případech byly příčinou somatické mutace, způsobující zkrácení genového produktu. Jedná se o zatím nepopsané somatické mutace genu BRCA1. U dvou nádorů pak byla zjištěna hypermetylace promotorové oblasti genu BRCA1.

Výsledky Janatové a kol. (2005) potvrdily úlohu genu BRCA1 v tumorigenezi sporadického karcinomu prsu a naznačily způsoby genové inaktivace. Časté výpadky BRCA1 alely mohou být doprovázeny somatickými mutacemi druhé alely nebo její inaktivací v důsledku metylace promotorové oblasti.

Kleibl a kol. z Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK ve spolupráci s Onkologickou klinikou 1. LF UK v Praze a VFN studovali u pacientek s hereditárním nebo sporadickým karcinomem prsu význam mutací v genech s nízkou penetrancí se zvláštním zřetelem ke genům angažovaným v reparaci DNA. Studován byl gen ATM (ataxia telangiectasia mutated) a výskyt známých patogenních alterací genu CHEK2 (checkpoint kinase 2) a NBS1 (nibrin).

Mutační analýza genu ATM v souboru 161 rizikových pacientek s karcinomem prsu odhalila přítomnost tří zřejmě patogenních mutací (1,9 %), vedoucích ke zkrácení proteinu. Naopak analýza ve skupině 183 kontrolních vzorků neprokázala výskyt žádné patogenní varianty. Ve dvou případech pacientek s mutací se jednalo o osoby s

bilaterálním výskytem karcinomu prsu, u další pacientky byl diagnostikován duktální karcinom prsu ve 37 letech.

Analýza mutace 1100delC genu CHEK2 prokázala její výskyt u 1/358 (0,28 %) vysoce rizikových osob s karcinomě prsu. Jednalo se o muže s karcinomě prsu a pozitivní rodinnou anamnézou (karcinomy GIT). Analýza 688 vzorků pacientek se sporadickým karcinomě prsu pak identifikovala mutaci 1100delC ve třech případech (0,44 %). U dvou pacientek se v rodině vyskytovali přímí příbuzní s nádorovým onemocněním (karcinom cervixu nebo plic). Karcinomy u všech identifikovaných nosičů mutací byly pozitivní na přítomnost estrogenových i progesteronových receptorů. Populační četnost mutace c.1100delC genu CHEK2 (0,27 %) byla stanovena na kontrolním vzorku 730 osob (2/730).

Mutační analýza genu NBS1 byla zaměřená na výskyt mutace c.675del5. Oproti očekávání v 472 vzorcích pacientek se sporadickým karcinomě prsu nebyla mutace nalezena.

Kleibl a kol. (2006) se na základě výsledků domnívají: Frekvence a charakter alterací genů s nízkou penetrancí má vysoce regionální závislost a pro jejich identifikaci a praktické uplatnění se často nelze vyhnout analýzám celých skupin genů v rozsáhlých souborech.

6. ZAHRANIČNÍ ABSTRAKTOVÁ LITERATURA

6.1. MUTACE GENŮ V SOUVISLOSTI S NÁDORY PRSU

Tutt a Ross (2000) se zabývali studiem mutací proteinu p53, který způsobuje záruku integrity genetického kódu. Jestliže je DNA poškozena a buňka proliferuje bez reparace, mutace jsou přeneseny na dceřiné buňky. Prudký nástup mnohočetných mutací může brzy vést k začátku agresivní rakoviny. Za normálních okolností tomu protein p53 zabraňuje zastavením buněčného cyklu, aby povolil opravu poškozené DNA nebo podpořil apoptózu.

Mutace v genu p53 přeruší toto normální hospodaření DNA a buňky mohou pokračovat v proliferaci navzdory přítomnosti poškozené DNA. Podobně, jestliže je protein p53 nefunkční, schopnost buněk rozpoznat a odpovídat na poškození navozené chemoterapií a radioterapií může být redukována, potenciálně dovoluje nádorovým buňkám přežít léčbu rakoviny.

Buněčný membránový receptor p185 je také zapojen do kontroly buněčné proliferace. Je kódován přes gen c-erbB-2. Když je tento receptor aktivován, buněčná proliferace je stimulována. V mnoha případech rakoviny prsu je c-erbB-2 nadměrně exprimován a vede ke zvýšení buněčné proliferace.

V souvislosti s rodinou genů BCL2 jsme našli, že jsou odlišně exprimovány v různých malignitách, a proto je můžeme považovat za prognostické markery v rakovině prsu.

Byl naklonován nový člen rodiny genů BCL2, BCL2L12 a bylo zjištěno, že je exprimován v prsní žláze. Zvýšená exprese genu BCL2 byla nalezena u pacientek patřících do věkové skupiny mladší než čtyřicet pět nebo starší než padesát pět let právě tak jako u ER pozitivních pacientek a v BCL2L12 pozitivních nádorech. BCL2 nebo BCL2L12 pozitivní pacientky byly nalezeny téměř čtyřikrát méně, pravděpodobně došlo k recidivě, nebo zemřely ve srovnání s BCL2 nebo BCL2L12 negativními pacientkami (Thomadaki a kol. 2007).

Významnou úlohu v hereditární rakovině prsu tvoří geny BRCA1 a BRCA2. O mutacích těchto genů bylo pojednáno v kapitole Práce na ostatních pracovištích.

6.2. VĚTŠINOU NEMUTOVANÉ MARKERY SE VZTAHEM K PŘEŽITÍ

6.2.1. Exprese a klinický význam cytosolových hladin hyaluronanu

O kyselině hyalurové (glykosaminoglykan s vysokou molekulovou hmotností [HA]) bylo uvažováno, že je zahrnuta do růstu a progresu nádorů v několika experimentálních studiích.

Cílem práce Corteho a kol. (2006) bylo zhodnotit obsah cytosolové HA v rakovině prsu, její možný vztah s klinickopatologickými nádorovými parametry a stavem steroidního receptoru, právě tak jako její potenciální prognostický význam.

Statistická analýza ukázala, že hladiny HA byly významně vyšší u mladších pacientek, právě tak jako u pacientek před menopauzou než po menopauze. Hladiny HA byly také významně vyšší u duktálního nebo lobulárního histologického typu než v jiných histologických typech. HA rovněž korelovala významně a pozitivně s nádorovými hladinami PR u všech pacientek ve skupině.

V podskupině pacientek s duktálním invazivním typem byly hladiny HA významně vyšší v dobře diferencovaných nádorech a v diploidních nádorech. Navíc v této posledně zmiňované skupině pacientek hladiny HA v nádorech korelovaly také pozitivně a významně s jedním z estrogenem navozených proteinů: PR, pS2 a tPA.

Vysoké intratumorální hladiny HA byly významně spojeny s delším průběhem od vyoperování nádoru, dokud se znovu neobjevily příznaky rakoviny v podskupině pacientek s duktálním histologickým typem nádorů právě tak jako u těch pacientek bez jakéhokoliv typu systémové adjuvantní léčby.

Výsledky naznačují, že vysoké intratumorální hladiny HA mohou být spojeny s příznivým vývojem nádorů v určitých podskupinách pacientek s rakovinou prsu.

6.2.2. Význam cathepsinů v rakovině prsu

Lysosomální aspartátová proteáza cathepsin D (CD) je nadměrně exprimována a zvýšeně secernována epiteliálními rakovinnými buňkami prsu. Tato proteáza je nezávislý marker špatné prognózy rakoviny prsu, koreluje s incidencí klinických metastáz. Nadměrná exprese CD stimuluje tumorigenicitu a metastazování. Toto hraje základní roli ve vícenásobných stupních nádorové progresi, ve stimulaci proliferace nádorové buňky, produkci fibroblastu a angiogeneze, právě tak jako v inhibici apoptózy

nádorových buněk. U mutovaného CD zbaveného katalytické aktivity byla ještě prokázána mitogenní aktivita pro rakovinu u endoteliálních buněk a fibroblastů a ovlivnění extracelulární aktivity CD zahrnující spouštění buď přímo, nebo nepřímo dosud neidentifikovaného povrchového buněčného receptoru. CD je také klíčový mediátor indukované apoptózy a jeho proteolytická aktivita je obecně zapojena v této funkci. Během apoptózy je lysosomální CD přemístěn do cytosolu. Protože CD je jedním z lysosomálních enzymů s proteolytickou aktivitou, které vyžadují kyselější pH je příbuzný k cysteinovým lysosomálním enzymům, jako je cathepsin B a cathepsin L. Otázkou je, zda by mohl cytosolický CD být schopen štěpit substráty zahrnuté do apoptotické kaskády (Liaudet-Coopman 2006).

Hladiny cysteinových proteáz cathepsinu B a cathepsinu L v souvislosti s klasickými prognostickými faktory pozitivně korelují s hodnotou pozitivních lymfatických uzlin a negativně s hladinou steroidních hormonálních receptorů. Významný vztah mezi hladinami cathepsinu B a cathepsinu L s věkem a menopauzou pacientek nebo s velikostí primárního nádoru nebyl nalezen. Hladiny cathepsinu B a cathepsinu L pozitivně souvisejí spolu navzájem a s počtem recidiv a úmrtí, proto jsou cathepsin B a L měřené v rutinně upraveném cytosolu silnými parametry k predikci recidiv a délky přežití po léčbě primárního karcinomu prsu (Foekens a kol. 1998).

Předmětem studie Rodrigueze a kol. (2005) bylo měření cytosolových hladin cathepsinu D.

Studie zahrnovala 1033 žen s histologicky prokázanou invazivní rakovinou prsu. Cathepsin D byl měřen ve vzorcích cytosolu imunoradiometricky ke stanovení celkového množství CD (52 kDa, 48 kDa a 34 kDa). Vyhodnocení přežití z hlediska nádorové příčiny smrti bylo provedeno ve skupině 1003 pacientek bez prokázání metastáz v době počáteční diagnózy.

Hladiny CD naznačily široký rozsah mezi studovanými nádory. Statistická analýza ukázala, že střední hladiny CD byly značně vyšší ve velkých nádorech než v menších, právě tak jako u postižení uzlin než v negativním postižení uzlin. Hladiny CD byly také vyšší v duktálních nádorech než v jiných histologických typech, právě tak jako v mírně nebo špatně diferencovaných nádorech. Podobně, střední hodnota proteázy byla významně vyšší v ER nebo PR – pozitivních nádorech než v nádorech negativních na hormonální receptory, právě tak jako v aneuploidních nádorech než v diploidních. Zvýšení hladiny CD bylo znatelně spojeno s kratším přežitím v celé skupině pacientek s rakovinou prsu, právě tak jako v podskupině pacientek s postižením uzlin.

Tato studie naznačuje, že zvýšené intra-tumorální hladiny CD mohou identifikovat podskupinu rakoviny prsu s postižením uzlin, které ukazují vysokou pravděpodobnost dřívější smrti.

Vyas a kol. (2006) se zabývali regulací CD resveratrolem. Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilben) je látka, která se nachází ve slupkách a jadéřkách modré révy vinné, arašidech a např. slupkách a jadéřkách černého rybízu. Resveratrol má antioxidační a antibakteriální účinky, ovlivňuje metabolismus lipidů a inhibuje srážení krevních destiček. Předpokládá se, že díky své schopnosti inhibovat androgenní receptory, má pozitivní vliv na prevenci rakoviny prostaty. Některé výzkumy naznačují, že dokáže zesílit účinek některých antiretrovirových léčiv (wikipedia 2007).

Inzulínu podobný růstový faktor II (IGF II) podporuje sekreci CD v ER (+) buňkách rakoviny prsu. Resveratrol (RSV) stimuluje IGF II. v ER (+) rakovinných buňkách prsu. RSV (10^{-6} M) zvyšuje CD a IGF II sekreci v ER (+) ale ne v ER (-) buňkách. RSV léčba (10^{-4} M) inhibovala CD v ER (+), ale ne v ER (-) buňkách. Transfekce ER (-) buněk proIGF II zvýšila CD sekreci. RSV (10^{-6} M) reguluje CD sekreci přes IGF II zatímco RSV (10^{-4} M) inhibuje CD v ER (+), ale ne v ER (-) buňkách. Regulace CD resveratrolem představuje nový mechanismus, kterým resveratrol může chránit před rakovinou prsu (Vyas a kol. 2006).

6.2.3. Ostatní markery ve vztahu k přežití

Řada autorů se ve svých studiích zabývá analýzou nádorových markerů jako predikčních faktorů pro přežití.

Takto byly ve studii Changa a kol. (1999) analyzovány ER, PR, c-erbB-2 (HER-2/neu), p53, BCL2, Ki67, S fáze, velikost nádoru, postižení uzlin a ploidita. Výsledky ukázaly, že nedostatek ER, PR a nemožnost dosáhnout dobré klinické odpovědi byly spojeny s významně zvětšeným rizikem recidivy. Totéž bylo spojeno se zvětšeným rizikem smrti. Na dobrou klinickou odpověď ukazovaly exprese ER, nepřítomnost c-erbB-2 a snížení Ki67. Z toho vyplývá, že molekulární markery mohou být užívány pro předpověď dosažení dobré klinické odpovědi, která se zdá být platným náhradním markerem pro přežití.

Konkrétně prognostickou a predikční hodnotou exprese c-erbB-2 se zabýval Sjogren a kol. (1998): Nadměrná exprese proteinu c-erbB-2 byla zjištěna u 19 % nádorů a byla spojena s kratším celkovým přežitím ve srovnání s c-erbB-2 negativními případy

v celkovém počtu pacientek (58 % respektive 77 %) a s 96 pacientkami s pozitivním postižením uzlin (31 % respektive 61 %), ale ne ve srovnání s pacientkami s negativním postižením uzlin. U 47 pacientek pozitivních na postižení uzlin léčených adjuvantně tamoxifenem a radioterapií bylo pětileté celkové přežití 13 % pro c-erbB-2 pozitivní a 75 % pro c-erbB-2 negativní pacientky. Četnost výskytu nadměrné exprese c-erbB-2 klesá s věkem.

Prognostická hodnota c-erbB-2 z hlediska celkového přežití byla nezávislá na věku, postižení uzlin, velikosti nádoru, na histopatologickém gradingu, stavu hormonálních receptorů, S fázi, stavu p53 a adjuvantní léčbě.

Nadměrná exprese proteinu c-erbB-2 může mít predikční hodnotu se vztahem k adjuvantní léčbě u pacientek s pozitivním postižením uzlin, pro které je adjuvantní tamoxifen a radioterapie nedostatečná. Kombinace tradičních a novějších nádorových markerů může rozpoznat pacientky s horší prognózou mezi pacientkami s celkově dobrou prognózou.

Novou cestou léčby rakoviny prsu řízených c-erbB-2 představuje propeptid lysyl oxidázy (LOX-PP), jenž inhibuje signalizační kaskádu, indukovanou c-erbB-2, která podporuje invazivnější fenotyp. Bylo zjištěno, že exprese genu lysyl oxidázy (LOX) inhibuje transformační aktivitu ras onkogenu v NIH 3T3 fibroblastech, a proto byl pojmenován ras recision gen (rrg). Min a kol. (2007) jako první ukazuje, že LOX-PP inhibuje transformaci buněk rakoviny prsu řízených c-erbB-2, což je protisměrný aktivátor Ras.

Znakem špatné prognózy rakoviny prsu je rovněž vysoká hladina Ki67. Tento proliferací marker je široce zkoumán imunohistochemickým vyšetřováním jaderného antigenu Ki67. Exprese Ki67 souvisí s dalšími měřeními proliferace, včetně S fáze a zabudování bromdeoxyuridinu. Vysoký marker Ki67 je spojen s dobrou šancí klinické odpovědi na chemoterapii. Nezávislá statistická signifikance je malá, a proto není výhodná pro měření v nejrutinnějších klinických podmínkách. Avšak jeho aplikace jako farmakodynamický intermediální marker efektivity léčby slibuje rychlé hodnocení nového léku (Urruticoechea a kol. 2005).

Studie Eppenbergera a kol. (1998) se zabývá porovnáním prognostického dopadu nádorových faktorů angiogeneze (cévní endoteliální růstový faktor [VEGF], angiogenin a základní fibroblastový růstový faktor [bFGF]), nádorové faktory proteolýzy (urokinázový typ plazminogenu aktivátoru [uPA] a inhibitor-1

plazminogenového aktivátoru [PAI-1]) a konvenční nádorové markery (staging, grading a steroidní receptory) v časně rakovině prsu.

Hladiny VEGF pozitivně korelovaly s návratem rakovinového onemocnění po správně provedeném vyoperování nádoru. Hladiny angiogeninu pozitivně korelovaly s chorobnou recidivou pro celou skupinu, ale ne uvnitř podskupiny na postižení uzlin negativní rakoviny prsu. Žádné významné korelace nebyly nalezeny mezi nádorovými hladinami bFGF a přežitím pacientek. V multivariační regresní analýze byly jedinými nezávislými předpovědními faktory „bezrecidivové doby přežití“ VEGF, uPA a stav lymfatických uzlin. Ve validační sadě byly hodnoty distribuce VEGF a uPA podobné těm v primární studii, - a to nízká exprese jak VEGF tak uPA odhalovala pacientky s nižší nebo dvaceti procentní pravděpodobností návratu choroby během sedmi let.

Oddělené primární a validační klinické studie se shodují, že nádorová hladina VEGF je nejdůležitější prognostický parametr mezi několika markery nádorové angiogeneze a proteolýzy.

7. DISKUZE

7.1. POROVNÁNÍ VÝČTU NÁDOROVÝCH MARKERŮ

V naší práci jsme se rozhodli použít dělení nádorových markerů podle Zimy a kol. (2007), kteří jako jediní z námi vyhledaných autorů přinášejí kromě klasických (konvenčních) markerů i přehled potenciálních nových markerů (vysvětlení pojmů viz kapitola Nádorové markery obecně). V dělení klasických markerů se většina autorů shoduje. Jedná se především o humorální markery, běžně stanovované na odděleních klinické biochemie a nukleární medicíny, a proto se často dělení omezuje pouze na tyto markery, které jsou v literatuře dobře popsány. Z tohoto důvodu jsme nepoužili Kaušitzovo dělení, které se také spíše zaměřuje na klasické markery a navíc je jeho publikace o patnáct let starší než Zimovo dělení.

Zima a kol. (2007) dále předkládá přehled prioritních markerů karcinomu prsu podle amerických nebo mezinárodních evropských odborných společností, zabývajících se nádorovými markery (viz tab. 1).

Nicméně, Zimův přehled bychom mohli pro potřeby české literatury doplnit, neboť jsme dokázali v zahraniční abstraktové literatuře nalézt řadu látek, které by mohly být označovány jako markery. Žádný z českých autorů je nezmiňuje a daly by se zařadit do některé podskupiny. Tyto markery jsou předmětem výzkumu a většinou nejsou zatím vhodné pro rutinní stanovení.

Dále nad rámec Zimova přehledu, Prchalová ve své práci popisuje jako markery cytokeratiny (K5, K14, K18, K 19) a protein p63. Zmínění autoři je neuvádějí zřejmě proto, že se jedná o markery určené k charakterizaci původu nádorových buněk a jsou předmětem výzkumu. A dále pravděpodobně proto, že cytokeratiny snad ještě nebyly u karcinomu prsu prozkoumány z hlediska jejich vlivu na přežití.

Také další čeští autoři popisují (především genové) markery, které přesahují Zimův přehled. U nich je nutno zdůraznit, že šlo o klinické studie a o vyšetření nádorů – často několika stovek žen.

7.2. PROGNOTICKÉ MARKERY

7.2.1. Prognostické markery v souvislosti s hereditární rakovinou prsu

Řada výzkumných a klinických pracovišť se zabývá prognostickým dopadem mutací genů BRCA1 a BRCA2 ve spojitosti s hereditárním karcinomem prsu.

Prchalová (2006) ve své práci cituje Denga (2006), který označuje geny BRCA1 a BRCA2 jako geny reparační.

Janatová a kol. (2005) se ve své studii zaměřily na analýzu inaktivace genů BRCA1/2 u 40 neselektovaných vzorků karcinomu prsu. Ve dvou případech byly příčinou somatické mutace, způsobující zkrácení genového produktu. Jedná se o zatím nepopsané somatické mutace genu BRCA1.

Tato studie napomáhá odhalení funkce genů BRCA1/2, které ještě nejsou zcela prozkoumány.

Kleibl a kol. studovali u pacientek s hereditárním nebo sporadickým karcinomem prsu význam mutací v genech s nízkou penetrancí se zvláštním zřetelem ke genům angažovaným v reparaci DNA. Studován byl gen ATM (ataxia telangiectasia mutated) a výskyt známých patogenních alterací genu CHEK2 (checkpoint homolog) a NBS1 (nibrin). Mutace ATM se vyskytly u 1,9 % a mutace 1100delC genu CHEK2 u 0,28 % vysoce rizikových osob s karcinomem prsu. U osob se sporadickým karcinomem prsu byla mutace 1100delC prokázána u 0,44 % případů. Mutace NBS1 nebyla nalezena.

Studium těchto markerů (genů) proniká do klinické praxe tím, že takto byly vyšetřeny poměrně velké počty pacientek a lze jimi sledovat vliv na přežití.

7.2.2. Ostatní prognostické markery

V zahraniční literatuře, v abstraktech, které jsme vyhledali, se autoři většinou zabývají prognostickou hodnotou nádorových markerů.

Analýza markerů ER, PR, c-erbB-2, p53, BCL2, Ki 67 jako predikčních faktorů pro přežití ve studii Changa a kol. (1999) ukázala, že se zvýšeným rizikem recidivy je spojen nedostatek ER a PR. Zvětšené riziko úmrtí bylo u postižení lymfatických uzlin a úplného chybění exprese ER. Pro dobrou klinickou odpověď ukazovaly exprese ER, nepřítomnost c-erbB-2 a nízká hladina Ki67. Tyto výsledky se shodují s ostatními autory.

Sjogren a kol. (1998) ve spojitosti s expresí c-erbB-2 uvádí: Nadměrná exprese proteinu c-erbB-2 byla spojena s kratším celkovým přežitím ve srovnání s c-erbB-2 negativními případy.

S výše uvedenou studií se shoduje i stav markeru Ki67, jehož vysokou hladinu Urruticoechea a kol. (2005) označuje za špatnou prognózu rakoviny prsu. Tento proliferační marker Zima a kol. (2007) ve svém rozdělení neuvádí. Domníváme se, že je to proto, že se jedná o marker, který není vhodný pro měření v rutinních klinických podmínkách.

Právě tak není v Zimově a kol. (2007) rozdělení zmíněna kyselina hyaluronová. Námí nalezený abstrakt (Corte a kol. 2006) řeší obsah cytosolové HA v rakovině prsu, její možný vztah s klinickopatologickými nádorovými parametry a stavem steroidního receptoru, právě tak jako její potenciální příznivý prognostický význam.

HA korelovala pozitivně s nádorovými hladinami PR u všech pacientek ve skupině. Vysoké intratumorální hladiny HA byly také významně spojeny s delším průběhem bezrecidivové doby přežití pacientek (Corte a kol. 2006).

Studie Eppenbergera a kol. (1998) se zabývá porovnáním prognostického dopadu nádorových faktorů angiogeneze (VEGF, angiogenin, bFGF) a proteolýzy (uPA, PAI-1). Ve výsledcích se shoduje se Zimou a kol. (2007), že nejdůležitější prognostický parametr mezi jmenovanými markery je VEGF. Nízká exprese VEGF ve studii odhalovala pacientky s nižší nebo dvaceti procentní pravděpodobností návratu choroby během sedmi let.

Za prognostické markery můžeme rovněž považovat rodinu genů BCL2. Ačkoliv ve studii Changa a kol. (1999) nebyl význam BCL2 uveden, jejich prognostickou hodnotu potvrzují výsledky Thomadakiho a kol. (2007): Geny BCL2 jsou odlišně exprimovány v různých malignitách. Zvýšená exprese genu BCL2 byla nalezena u pacientek s rakovinou prsu, patřících do věkové skupiny mladší než čtyřicet pět nebo starší než padesát pět let, právě tak jako u ER pozitivních pacientek a v BCL2L12 (nový člen rodiny genů BCL2) pozitivních nádorech. BCL2 nebo BCL2L12 pozitivní pacientky byly nalezeny téměř čtyřikrát méně, pravděpodobně u nich došlo k recidivě, nebo zemřely ve srovnání s BCL2 nebo BCL2L12 negativními pacientkami.

Mezi další prognostické markery patří cathepsiny. Zima a kol. (2007) tyto markery nejmenuje, zřejmě je shrnuje pod širokou skupinu enzymů. Cathepsiny jsou odlišně exprimovány v různých malignitách.

Lysosomální proteáza cathepsin D (CD) je nezávislý marker špatné prognózy rakoviny prsu, koreluje s incidencí klinických metastáz. Nadměrná exprese CD stimuluje tumorigenicitu a metastazování (Liaudet-Coopman 2006).

Rodriguez a kol. (2005) se s tímto tvrzením shodují: Zvýšení hladiny CD bylo znatelně spojeno s kratším přežitím v celé skupině pacientek s rakovinou prsu, právě tak jako v podskupině pacientek s postižením uzlin.

Vyšetření intratumorálního CD (Kaušitz) bylo rovněž prováděno na klinice v Bratislavě.

Ve studii Foekense a kol. (1998) byly hodnoceny hladiny cysteinových proteáz cathepsinu B a cathepsinu L, které jsou příbuzné cathepsinu D. V souvislosti s klasickými prognostickými faktory pozitivně korelují s hodnotou pozitivních lymfatických uzlin a negativně s hladinou steroidních hormonálních receptorů.

Hladiny cathepsinu B a cathepsinu L pozitivně souvisejí spolu navzájem a s počtem recidiv a úmrtí, proto jsou cathepsin B a L měřené v rutinně upraveném cytosolu silnými parametry k predikci recidiv a délky přežití po léčbě primárního karcinomu prsu.

Z uvedeného vyplývá, že cathepsiny obecně jsou markery špatné prognózy rakoviny prsu.

7.3. MARKERY MAJÍCÍ VZTAH K LÉČBĚ

Pro monitorování stavu onemocnění (zda byla léčba úspěšná) se běžně používají humorální markery. Na významu stanovení CA 15-3 pro nádor prsu se shodují Kaušitz (1999), Malík (2004) i Zima a kol. (2007). Otázku, jaký druh léčby bude úspěšný, řeší především některé markery tkáňové.

Nezastupitelnou úlohu markerů v nádorech prsu má exprese steroidních receptorů. Steroidní receptory (estrogenové a progesteronové receptory) by měly být stanoveny u primárních lézí a měly by být použity pro výběr pacientů pro endokrinní terapii. Stanovují se imunohistochemicky na tkáňových řezech a pomáhají určit reakci nádoru na hormonální terapii a odhadnout jeho prognózu.

Nadměrná exprese proteinu c-erbB-2 může mít predikční hodnotu se vztahem k adjuvantní léčbě u pacientek s pozitivním postižením uzlin, pro které je adjuvantní

tamoxifen a radioterapie nedostatečná. U čtyřiceti sedmi pacientek, pozitivních na postižení uzlin, léčených adjuvantním tamoxifenem a radioterapií, bylo pětileté celkové přežití 13 % pro c-erbB-2 pozitivní a 75 % pro c-erbB-2 negativní pacientky (Sjogren a kol. 1998). Pacientky s nadměrnou expresí c-erbB-2 a špatnou prognózou jsou indikovány k léčbě humanizovanými monoklonálními protilátkami (trastuzumab) proti ektodoměně c-erbB-2 onkoproteinu (Zima a kol. 2007).

Novou cestou léčby rakoviny prsu řízených c-erbB-2 představuje propeptid lysyl oxidázy, jež inhibuje signalizační kaskádu, indukovanou c-erbB-2 (Min a kol. 2007). Tuto práci jsme našli mimo rámec česky psané literatury.

Urruticoechea a kol. (2005) ve své studii uvádějí: Vysoký marker Ki67 je znakem špatné prognózy, ale je spojen s dobrou šancí klinické odpovědi na chemoterapii.

Naopak špatnou reakci na chemoterapii a radioterapii vykazují nádorové buňky s mutací v genu p53, protože nefunkční protein p53 redukuje schopnost buněk rozpoznat a odpovídat na poškození navozené touto léčbou a potenciálně dovoluje nádorovým buňkám přežít (Tutt a Ross 2000).

8. ZÁVĚR

V české dostupné literatuře jsme vyhledali a utřídili práce o nádorových markerech. Pokusili jsme se např. vytvořit skupinu markerů se vztahem k léčbě. Dále jsme se pokusili načerpat z internetových databází další zajímavé zahraniční prameny ohledně markerů nádorů prsu.

Z výsledků námi prezentovaných studií je patrné, že stanovení markerů v nádorech prsu, právě tak jako v jiných nádorech, má nezastupitelnou úlohu pro odhad průběhu onemocnění i pro charakter zvolené léčby. Upozornili jsme na význam stanovení některých markerů, o kterých jsme v české literatuře nenašli zmínku, např. kyseliny hyaluronové ve spojitosti s příznivou prognózou a cathepsinů ve spojitosti s prognózou špatnou. Rovněž jsme se zaměřili na genové markery a to jak v české, tak v zahraniční literatuře.

9. SEZNAM ZKRATEK

bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor
BRCA1	breast cancer gene 1
BRCA2	breast cancer gene 2
CA	carbohydrate antigen
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CEA	karcinoembryonální antigen
CD	cathepsin D
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	estrogenový receptor
(+)	pozitivní
(-)	negativní
HA	hyaluronová kyselina
IGF	inzulínu podobný růstový faktor
K	cytokeratin
LOX	lysyl oxidáza
LOX-PP	propeptid lysyl oxidázy
PAI-1	inhibitor 1 aktivátoru plazminogenu
PR	progesteronový receptor
RSV	resveratrol
SR	steroidní receptory
TDLU	terminální duktulární lobulární jednotka
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
uPA	urokináza
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor

10. LITERATURA

BEAULIEU L.M., CHURCH F.C.: Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Experimental cell research*, 313(4): 677-87, 2007

CORTE M.D., GONZALEZ L.O., LAMELAS M.L., ALVAREZ A., JUNQUERA S., ALLENDE M.T., GARCIA-MUNIZ J.L., ARGUELLES J., VIZOSO F.J.: Expression and clinical signification of cytosolic hyaluronan levels in invasive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 97 (3): 329-337(9), 2006

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*, 62 (3): 881-886, 2002

DENG C.X.: BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*, 34: 1416-1426, 2006

EPPENBERGER U., KUENG W., SCHLAEPPI J.M., ROESEL J.L., BENZ C., MUELLER H., MATTER A., ZUBER M., LUESCHER K., LITSCHGI M., SCHMITT M, FOEKENS J.A. AND EPPENBERGER- CASTORI S.: Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 16: 3129-3136, 1998

FOEKENS J.A., KOS J., PETERS H.A., KRASOVEC M., LOOK M.P., CIMERMAN N., MEIJER-VAN GELDER M.E., HENZEN-LOGMANS S.C., VAN PUTTEN W.L., KLIJN J.G.: Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 16: 1013-1021, 1998

FUGUA S.A.W., SCHIFF R., PARRA I., MOORE J.T., MOHSIN S.K., OSBORNE C.K., CLARK G.M., ALLRED D.C.: Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: Correlation with clinical tumor parameters. *Cancer research*, 63 (10): 2434-2439, 2003

GONZALEZ-ANGULO A.M., SAHIN A., KRISHNAMURTHY S., YANG Y., KAU S.W., HORTOBAGYI G.N., CRISTOFANILLI M.: Biologic markers in axillary node-negative breast cancer: Differential expression in invasive ductal carcinoma versus invasive lobular carcinoma. *Clinical Breast Cancer*, 7 (5): 396-400, 2006

HIRMEROVÁ E.: Estrogenové a progesteronové receptory v nádorech dělohy ve vztahu k jiným ukazatelům. Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2006

HOCHMANN J.: Zpřesnění diagnostiky analýzou matematických vztahů mezi estrogenovým a progesteronovým receptorem. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, Konference: Sekcama, Bratislava, 18.-20.4. 2007, (2007/a)

HOCHMANN J.: Ratio of concentrations of estrogen receptors to progesterone receptors (ER/PR) in the cytosol of breast cancers (stratification by forming of groups differing in PR). Neoplasma – accepted for publication – 2007, (2007/b)

CHANG J., POWLES T.J., ALLRED D.C., ASHLEY S.E., CLARK G.M., MAKRIS A., ASSERSON L., GREGORY R.K., OSBORNE C.K., DOWSETT M.: Biologic Markers as Predictors of Clinical Outcome From Systemic Therapy for Primary Operable Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology, 10: 3058-3063, 1999

JANATOVÁ M., PROKOPCOVÁ J., POHLREICH P.: Studium úlohy genů BRCA1 a BRCA2 u sporadického karcinomu prsu, Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK, Praha, Konference: 1. ročník Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 2005, http://www.linkos.cz/kongresy/abstrakta_vypis.php?ID=840 (12.4. 2007)

KAUŠITZ J.: Rádioimunoanalýza v onkologii. VEDA vydavatel'stvo Slovenskej akademie vied Bratislava, p.28, 1991

KLEIBL Z.¹, PROKOPCOVÁ J.¹, HAVRÁNEK O.¹, STŘÍBRNÁ J.¹, NOVOTNÝ J.^{2,3}, POHLREICH P.¹: Alterace v genech s nízkou penetrancí u pacientek s karcinomem prsu. ¹Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK v Praze, ²Onkologická klinika 1. LF UK v Praze a VFN, ³Nemocnice Příbram, Konference: 2. ročník Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 2006, http://www.linkos.cz/kongresy/abstrakta_vypis.php?ID=1587 (12.4. 2007)

LAKHANI S.R., VAN DE VIJVER M.J., JACQUEMIER J., ANDERSON T.J., OSIN P.P., MCGUFFOG L., EASTON D.F.: The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and p53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. Journal of Clinical Oncology, 9: 2310-2318, 2002

MALÍK R.: Nádorové markery. Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK a VFN Praha, <http://www.breastcancer.cz/main.php?section=prevence&page=clanek94> (19.8.2004)

MAREŠKOVÁ B.: Estrogenové a progesteronové receptory v nádorech dělohy ve vztahu k terapii. Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2006

MCGOWAN E.M., CLARKE C.L.: Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. Molecular endocrinology, 13 (10): 1657-1671, 1999

MIN C.Y., KIRSCH K.H., ZHAO Y.S., JEAY S., PALAMAKUNTBURA A.H., TRACKMAN P.C., SONENSHEIN G.E.: The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Research*, 67 (3): 1105-1112, 2007

MIYOSHI Y., AKAZAWA K., KAMIGAKI S., UEDA S., YANAGISAWA T., INOUE T., YAMAMURA J., TAGUCHI T., TAMAKI Y., NOGUCHI S.: Prognostic significance of intra-tumoral estradiol level in breast cancer patients. *Cancer letters*, 216 (1): 115-121, 2004

MOTLÍK K., ŽIVNÝ J.: *Patologie v ženském lékařství*. Grada Publishing Praha, p.393, 394, 418, 2001

NEČAS O. A KOLEKTIV: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. H & H Jinočany, p. 290-295, 2000

NOLA M., JUKIC S., ILIC-FORKO J., BABIC D., UZAREVIC B., PETROVECKI M., SUCHANEK E., SKRABLIN S., DOTLIC S., MARUSIC M.: Effects of tamoxifen on steroid hormone receptors and hormone concentration and the results of DNA analysis by flow cytometry in endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*, 72 (3): 331-336, 1999

OSIPO C., MEEKE K., CHENG D., WEICHEL A., BERTUCCI A., LIU H., JORDAN V.C.: Role for HER2/neu and HER3 in fulvestrant-resistant breast cancer. *International journal of oncology*, 30(2): 509-20, 2007

PRCHALOVÁ M.: Charakterizace nové linie progenitorových buněk, EM-G3, lidského mamárního karcinomu. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2006

ROGOZINSKA-SZCZEPKA J., UTRACKA-HUTKA B., GRZYBOWSKA E., MAK A B., NOWICKA E., SMOK-RAGANKIEWICZ A., ZIENTEK H., STEFFEN J., WOJCIECHOWSKA-LACKA A.: BRCA1 and BRCA2 mutations as prognostic factors in bilateral breast cancer patients. *Annals Of Oncology*, 15 (9): 1373-1376, 2004

SKÁLOVÁ A.: Molekulární a biologické markery premaligních lézí prsu. Klasifikace in situ karcinomu prsu a prognostický význam gradingu in situ karcinomu. Patologicko-anatomický ústav LF UK v Plzni a Biopstická laboratoř s.r.o. v Plzni, <http://www.fnplzen.cz/data/prac/Bory/spau/vyuka/doc/handouty/handout-2006-vol-vs-Skalova.doc> (12.4. 2006)

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*, 10 (1): 49-57, 2003

ŠUSTROVÁ B.: Estrogenové a progesteronové receptory v nádoru prsu ve vztahu k jiným ukazatelům. Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2006

THOMADAKI H., TALIERI M., SCORILAS A.: Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer. *Cancer Letters*, 247 (1): 48-55, 2007

TUTT A., ROSS G.: Commentary: much still to learn about relations between tumour biology, prognosis, and treatment outcome in early breast cancer. *British medical journal*, 320(7233): 474-8, 2000

URRUTICOECHEA A., SMITH I.E., DOWSETT M.: Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (28): 7212-7220, 2005

VIENONEN A., SYVALA H., MIETTINEN S., TUOHIMAA P., YLIKOMI T.: Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 80 (3): 307-313, 2002

WIKIPEDIA: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Resveratrol> (25.2.2007)

ZIMA T., KALOUSOVÁ M., MALBOHAN I.M.: Laboratorní vyšetření u nádorových onemocnění. Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK a VFN Praha, https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/6932_1431.html (4.3.2007)