

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Použitá literatura a další zdroje, z kterých jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za cenné rady a pomoc při vzniku této práce.

V Hradci Králové, duben 2009

Lenka Celbová

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. SOUHRN | 4 |
| 2. SUMMARY | 6 |
| 3. ÚVOD..... | 8 |
| 4. TEORETICKÁ ČÁST..... | 9 |
| 4.1. ANATOMIE MLÉČNÉ ŽLÁZY..... | 9 |
| 4.2. KARCINOMY MLÉČNÉ ŽLÁZY | 9 |
| 4.2.1. Maligní epitelové nádory – karcinomy prsu | 9 |
| 4.2.1.1. Neinvazivní karcinom..... | 10 |
| 4.2.1.2. Invazivní karcinom | 11 |
| 4.3. NÁDOROVÁ TRANSFORMACE BUNĚKY | 11 |
| 4.3.1. Onkogeny..... | 11 |
| 4.3.2. Tumor supresorové geny | 13 |
| 4.4. NÁDOROVÉ MARKERY | 13 |
| 4.4.1. Všeobecná charakteristika nádorových markerů | 13 |
| 4.4.2. HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor)..... | 14 |
| 4.4.2.1. Charakteristika HER-2/neu..... | 14 |
| 4.4.2.2. Ligandy HER rodiny receptorů..... | 15 |
| 4.4.2.3. Signální dráhy | 17 |
| 4.4.2.3.1. MAPK..... | 17 |
| 4.4.2.3.2. Signální dráhy Akt a PI3K..... | 18 |
| 4.4.2.4. HER-2/neu a maligní zvrát | 20 |
| 4.4.2.5. Vztah mezi ER a HER | 20 |
| 4.4.2.6. Stanovení HER-2/neu | 21 |
| 4.4.2.6.1. Imunohistochemie (IHC) | 21 |
| 4.4.2.6.2. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) | 22 |
| 4.4.2.7. Léčba cílená na HER-2/neu | 23 |
| 5. KLINICKÁ ČÁST | 24 |
| 5.1. ČESKÁ LITERATURA – PŮVODNÍ SDĚLENÍ..... | 24 |
| 5.1.1. Porovnání detekce HER-2/neu metodou IHC a FISH | 24 |
| 5.1.2. Klasifikace karcinomů prsu, triple negative nádory | 26 |
| 5.1.3. Prediktivní hodnota HER-2/neu jako markeru rezistence na tamoxifen | 28 |
| 5.1.4. Sérový HER-2/neu – predikce léčby a korelace s CA15-3 a CEA..... | 28 |
| 5.1.5. Závislost exprese HER-2/neu na věku v pardubické nemocnici | 31 |
| 5.2. ZAHRANIČNÍ ABSTRAKTOVÁ LITERATURA..... | 34 |
| 5.2.1. Korelace stavu HER-2/neu s ER a PR | 34 |
| 5.2.2. Nárůst stavu exprese/amplifikace HER-2/neu zvýšenou malignizací | 35 |
| 5.2.2.1. Vznik exprese/amplifikace HER-2/neu de novo | 35 |
| 5.2.2.2. Rozdíly exprese HER-2/neu, ER, PR mezi podtypy IDC a DCIS..... | 37 |
| 5.2.3. Extracelulární doména HER-2/neu | 39 |
| 5.2.4. Prognostická a prediktivní hodnota tkáňového HER-2/neu | 41 |
| 5.2.5. Nádorové charakteristiky před a po neoadjuvantní léčbě | 42 |
| 5.2.6. Možnosti budoucího klinického rozvoje..... | 44 |
| 5.2.6.1. Zájímavosti z hlediska diagnostiky..... | 44 |
| 5.2.6.1.1. Genomový profil HER-2/neu pozitivních karcinomů, vliv ER | 44 |
| 5.2.6.1.2. Stanovení fosforylace HER-2/neu v tyrozinu 1221/1222..... | 44 |
| 5.2.6.2. Zájímavosti z hlediska léčby..... | 45 |
| 5.2.6.2.1. Propeptid lysyl oxidázy | 45 |
| 5.2.6.2.2. Vakcína E75..... | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 6. DISKUZE | 47 |
| 6.1. AKTIVACE RODINY RECEPTORŮ HER | 47 |
| 6.2. HODNOCENÍ POZNATKŮ Z KLINICKÉ ČÁSTI | 48 |
| 7. ZÁVĚR | 51 |
| 8. SEZNAM ZKRATEK | 52 |
| 9. LITERATURA | 54 |

1. SOUHRN

Autor: Bc. Lenka Celbová

Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Název práce: HER-2/neu a další markery v nádorech prsu

Diplomová práce

Katedra biologických a lékařských věd

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

Cílem této diplomové práce bylo přinést přehled nádorového markeru HER-2/neu z hlediska jeho aktivace, laboratorního stanovení, vztahu k hormonálním receptorům, úloze v tumorigenezi karcinomu prsu a dále jeho prognostického významu a vztahu k léčbě rakoviny prsu.

V klinické části této rešeršní práce byla řešena především prognostická a prediktivní hodnota HER-2/neu. V mnoha pracích byla potvrzena špatná prognóza HER-2/neu pozitivní rakoviny prsu. V této souvislosti byl v literatuře řešen význam stanovení extracelulární domény HER-2/neu v séru. Bylo prokázáno, že toto sledování je vhodné k monitorování onemocnění u pacientek s HER-2/neu pozitivními karcinomy a má i prediktivní význam pro léčbu trastuzumabem.

Další problematikou řešenou v této práci je exprese HER-2/neu de novo. Námi nalezené dvě studie potvrzují názor, že amplifikace HER-2/neu de novo může vzniknout v kterémkoliv stádiu rakoviny prsu.

V souvislosti s nadměrnou expresí HER-2/neu je některými autory popisován pokles exprese estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR). S tímto poznatkem se shoduje námi posuzovaná skupina pacientek Pardubické krajské nemocnice, u kterých se ve většině případů nevyskytovala zároveň HER-2/neu pozitivita s pozitivitou ER a PR.

Výsledky pardubických pacientek jsme také analyzovali vzhledem k věku. Zaznamenali jsme vyšší výskyt HER-2/neu positivity u postmenopauzálních pacientek s neselektovaným karcinomem prsu. Naopak v jedné zahraniční studii autoři uvádějí, že zaznamenali HER-2/neu pozitivitu pouze u premenopauzálních pacientek s invazivním duktálním karcinomem. Nicméně, nenalezli jsme v literatuře další údaje o vztahu mezi HER-2/neu pozitivitou a věkem.

V závěru klinické části zmiňujeme možnost léčby imunogenním peptidem E75 připraveným z HER-2/neu proteinu. Bylo prokázáno, že vakcína E75 může redukovat opětovný vznik metastáz u konvenčně léčených pacientek.

Domníváme se, že některé námi prezentované informace by mohly posloužit k obohacení české literatury z hlediska hodnocení významu HER-2/neu v karcinomu prsu.

2. SUMMARY

Author: Bc. Lenka Celbová

Tutor: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Title of a work: HER-2/neu and other markers in breast tumours

Diploma work

Department of Biological and Medical Sciences

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study programme: Healthcare bioanalytics

The aim of our diploma work is to bring an overview of the tumour marker HER-2/neu especially with focus on its activation, laboratory detection, relation to hormonal receptors, its role in tumorigenesis of breast carcinoma and also on the examination of its prognostic importance and its relation to the breast cancer treatment.

In the clinical part of this review work we target especially the prognostic and predictive value of HER-2/neu. In many studies, a bad prognosis of HER-2/neu positive breast cancer was confirmed. In this connection the importance of determination of extracellular domain HER-2/neu in serum was examined in the literature. It is proved, that observation of this parameter is useful for monitoring of the patients with HER-2/neu positive carcinomas and there is also proved its predictive importance for the trastuzumab treatment.

Another topic investigated in this work is expression of HER-2/neu de novo. Two studies, we found, confirm the opinion, that an amplification of HER-2/neu de novo can emerge in any stage of the breast cancer.

In connection with an elevated expression of HER-2/neu, there has been a significant decrease of the estrogen and progesterone receptors (ER, PR) described by some authors. This finding correlates with the result of our comparison of a group of patients in the Pardubice regional hospital, which confirms that almost no case of the simultaneous HER-2/neu positivity and ER and PR positivity was found.

We analyzed also the results of the Pardubice regional hospital patients considering the age of patients. We found a higher occurrence of HER-2/neu positivity among postclimacterical patients with non-selected breast carcinomas. Contrary to our conclusion, one foreign study declares HER-2/neu positivity only for preclimacterical patients with an invasive ductal carcinoma. Nevertheless, we found no further

indications concerning the relation between HER-2/neu positivity and the age of patients.

At the end of the clinical part of our work we investigate refer about the possibility of treatment with immunogenic peptid E75 made from the HER-2/neu protein. It was proved, that the vaccine E75 can result in reduction of repeated arising of metastases among patients treated with conventional methods.

We consider some information presented in our work as possibly useful for further enrichment of Czech literature with the new knowledge from the point of view of evaluation of importance of HER-2/neu in the breast carcinoma.

3. ÚVOD

Naší snahou v této rešeršní práci bylo přinést pohled na českou a zahraniční literaturu týkající se markeru HER-2/neu ve vztahu ke karcinomu prsu a k jiným nádorovým markerům.

V teoretické části této diplomové práce jsme použili převážně knižní monografickou literaturu, česky i anglicky psanou.

V klinické části, v kapitolách Česká literatura a Zahraniční abstraktová literatura, jsme využili informací z dostupných internetových zdrojů. Pro česky psanou literaturu jsme používali vyhledavač Google a internetovou podobu časopisu Klinická onkologie. Články jsme vybírali omezením data publikace a zadáním klíčových slov do vyhledavače (karcinom prsu, HER-2/neu, nádorový marker).

K vyhledávání abstraktů v zahraniční literatuře jsme použili veřejně dostupnou databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) PubMed a databázi dostupnou pro farmaceutickou fakultu Current Contents Connect. Abstrakty, nalezené zadáním klíčových slov a jejich kombinacemi, jsme dále třídili podle názvu a shlédnutím textu. Vybrané abstrakty nebo jejich části jsme přeložili do češtiny a použili je jako podklad pro tuto kapitolu.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. 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).

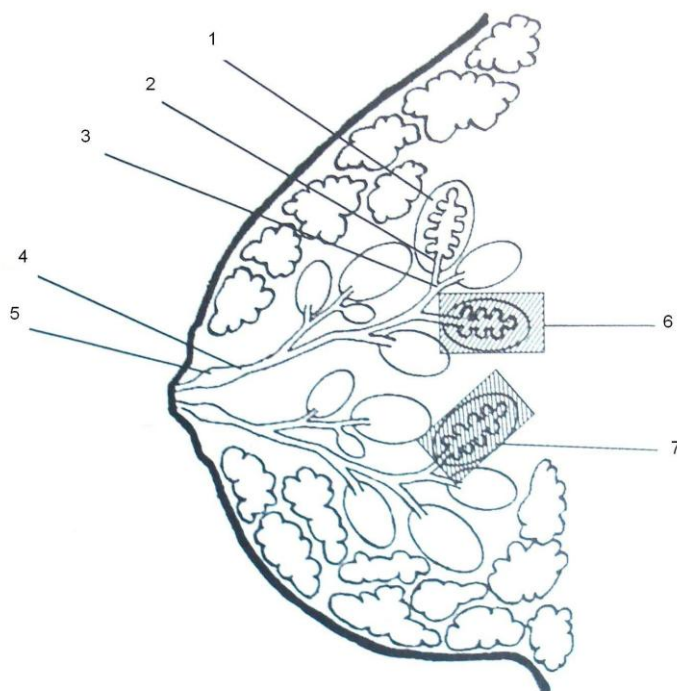
Anatomicky (histologicky) jde o bohatě větvenou tubulární žlázu, jejíž terminální úsek citlivě reaguje na hormonální podněty (estrogeny, gestageny, prolaktin) a v těhotenství se proměňuje v tubulárně acinózní žlázu s morfológickými projevy laktace „acinárního“ epitelu. Nejperifernější úsek vývodového 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. 1). 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).

4.2. KARCINOMY MLÉČNÉ ŽLÁZY

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).

4.2.1. Maligní epitelové nádory – karcinomy prsu

Karcinom prsu dělíme na hlavní dva typy: neinvazivní a invazivní karcinom. Většina karcinomů vychází z TDLU (viz obr. 1 č. 6).



Obr. 1 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)

4.2.1.1. 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).

4.2.1.2. 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).

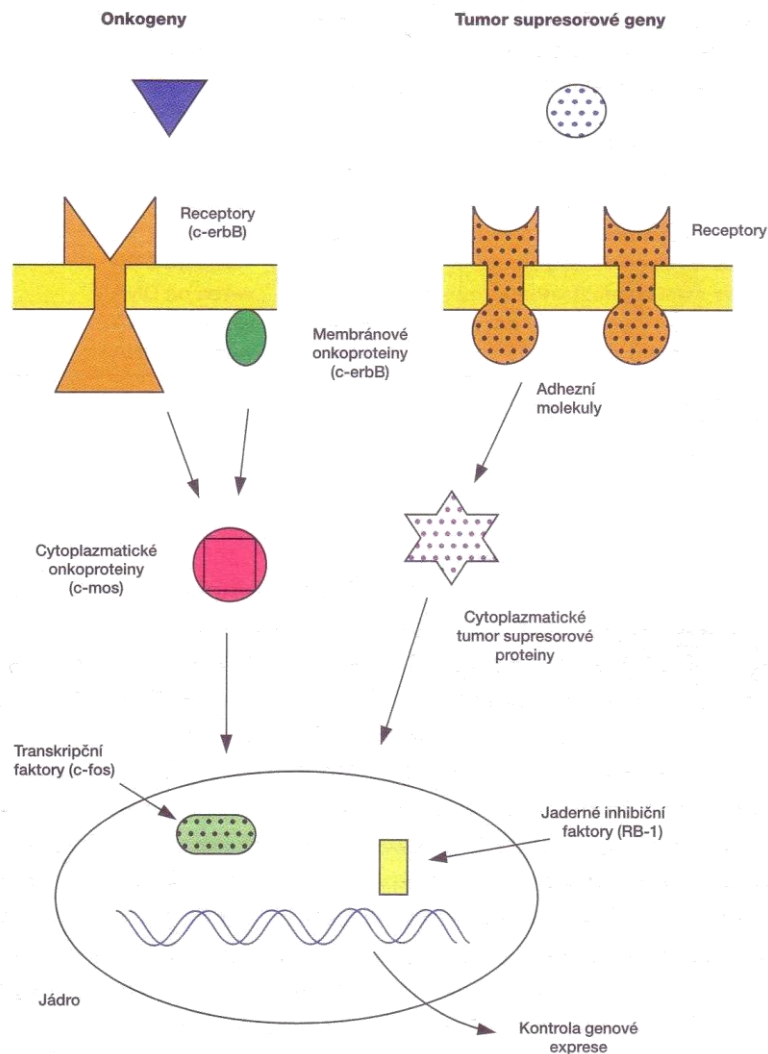
4.3. NÁDOROVÁ TRANSFORMACE BUŇKY

Za nádorovou transformaci buněk označujeme změny, kdy buňky nereagují na regulační mechanismy. Jejich charakteristickými vlastnostmi jsou, kromě často nadměrného množení buněk, poruchy diferenciací, ploidy 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).

4.3.1. Onkogeny

Onkogeny jsou geny, které 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).



Obr. 2 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).

4.3.2. 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. 2

4.4. NÁDOROVÉ MARKERY

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 přípravě 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). Dále sem patří markery vzniklé mutací genů.

Tkáňové markery (na rozdíl od humorálních) jsou k rutinnímu vyšetřování pacientek vybírány tak, aby zobrazovaly stav receptorů a signálních drah, které jsou zodpovědné za vznik nádoru – neboť přenášejí hormonální mitogenní signál. Na základě těchto výsledků lze pak provádět medikamentózní zásahy do těchto drah.

V případě karcinomu prsu jde především o dráhu navazující na estrogenový receptor (řešeno v jiných diplomových pracích tohoto školicího pracoviště) a na dráhu navazující na receptor HER-2/neu, řešenou v této diplomové práci.

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 | Estrogenové 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. Estrogenové 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-erb-B2) 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 Herceptin ^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)

4.4.2. HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor)

4.4.2.1. Charakteristika HER-2/neu

Receptor pro epidermální růstový faktor – HER-2/neu je významný prognostický a prediktivní marker v karcinomu prsu.

Poprvé byl identifikován v roce 1981 v linii krysího neuroblastomu (Hajdúch a kol. 2003). Jedná se o transmembránový glykoprotein (p185) s tyrozinkinázovou aktivitou o molekulové hmotnosti 185 kDa a je produktem protoonkogenu c-erb-B2, který je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromozomu – 17q11.2-q12. Tento receptor patří do rodiny dnes již dobře poznaných HER (human epidermal receptor), neboli erbB receptorů, která se skládá ze čtyř homologních, vzájemně spolupracujících členů označovaných HER-1, HER-2, HER-3 a HER-4. Za fyziologického stavu jsou receptory HER rodiny důležité pro plynulou obnovu epiteliálních tkání (Cinek a Filip 2007).

Každý receptorový protein HER rodiny zahrnuje přibližně 600 aminokyselinovou extracelulární ligand vázající doménu, 24 aminokyselinovou helikální transmembránovou doménu a >500 aminokyselinovou cytoplazmatickou tyrozinkinázovou doménu s mnohočetnými autofosforylovanými místy a autoinhibiční smyčkou (Schulz 2005).

HER receptory jsou inaktivní monomery, které se stávají aktivními po dimerizaci a to s receptorem toho samého typu (homodimerizace) a nebo jiného typu (heterodimerizace). Heterodimerizace je zvláště významná u HER-2/neu receptoru, u něhož není znám ligand, tento receptor je také jako dimerizační partner preferován. Dimerizace spouští autofosforylaci tyrozinkinázy, která aktivuje kaskádu metabolických pochodů tvořících komplexní signální dráhu (nejčastěji Ras/MAPK a PI3K/Akt) přenášející extracelulární podnět do jádra buňky, signál modifikuje genovou kontrolu a proteinovou transkripci. Důsledkem jsou klíčové buněčné regulační procesy, jako jsou diferenciaci, adheze, růst, migrace a apoptóza (Cinek a Filip 2007).

4.4.2.2. Ligandy HER rodiny receptorů

HER-1 také známý jako EGFR receptor pochopitelně váže epidermální růstový faktor, ale také několik dalších peptidů, které mají stejný konzervativní motiv s třemi cystinovými disulfidickými můstky, který je nazýván EGF motiv (motivy – krátké sekvenční úseky – subsekvence, které mají určitý biologický význam; motivy bílkovin často reprezentují strukturní rysy; DNA motivy poskytují signál pro vazbu bílkovin nebo vznik záhybů).

Skutečně, v mnoha fyziologických procesech strukturně příbuzný $TGF\alpha$, amphiregulin a heparin vázající EGF (HB-EGF), jsou pravděpodobně významnější než samotný EGF. HB-EGF právě tak jako betacellulin (BTC) a epiregulin (EPR) se také vážou na HER-4 a aktivují jej. Neureguliny 1-4 (NRG) jsou specifické pro HER-3 a HER-4, NRG 1 a 2 jsou převážně rozpoznávány HER-3; NRG 3 a 4 jsou rozpoznávány pomocí HER-4. Jak již bylo uvedeno výše, HER-2 má neznámý ligand a opravdu zde nemusí žádný být (Schulz 2005).

Vazba ligandu indukuje změnu konformace, která usnadňuje autoinhibici tyrozinkinázy pseudosubstrátovou smyčkou, aby umožnila cross-fosforylaci s následujícím přitisknutím adaptéru a substrátových proteinů. Signály vychází z HER receptorů hlavně dráhami MAPK, PI3K, STAT (Schulz 2005).

Zatímco HER-2 je zvláštní člen rodiny se vztahem k vazbě ligandu, HER-3 je neobvyklý z pohledu kinázové aktivity. Rozhodující zbytky v jeho aktivním centru nejsou konzervovány a HER-3 nemusí mít kinázovou aktivitu vůbec. Tudíž jeho tyrozinkinázová aktivita je poskytnuta jeho HER-2 dimerizačním partnerem (Schulz 2005).

V normálních epiteliálních buňkách prsu – jak proliferace, tak diferenciace jsou ovlivněny několika EGF – příbuznými peptidy a každý člen HER rodiny je zapojen alespoň v podskupině buněk.

Produkce peptidových růstových faktorů se odehrává ve stromálních a epiteliálních buňkách a je regulována estrogény. Jak jejich produkce, tak buněčné odpovědi na růstové faktory jsou ovlivněny cross-talkem (zkříženou aktivací) s různými dalšími hormony a růstovými faktory. Např. uvolnění HB-EGF vyžaduje proteolytické štěpení metaloproteinázami, které jsou stimulovány endotelinem-1 a bombesinem působícím přes serpentinové receptory spřažené s G-proteinem. Jisté WNT faktory také podporují uvolnění EGF podobných faktorů. Důležitost WNT aktivační cesty v rakovině prsu může tedy být zvažována v tomto ohledu (Schulz 2005).

Sekreční glykoproteiny WNT (název „WNT“ vznikl spojením názvů dvou genů Wg - wingless a INT genů lokalizovaných poblíž integračních míst viru myšího tumoru mléčné žlázy) mají zásadní roli v embryogenezi, v mnoha fyziologických procesech, ale také v tumorigenezi. Cesta WNT zahrnuje proteiny regulující tvorbu WNT signálních molekul, které modulují reakci buňky na extracelulární WNT ligandy (Palička a Živný 2007).

Za normálních okolností se WNT proteiny spojí na buněčném povrchu s receptorem z tzv. Frizzled rodiny a následnými aktivacemi v několika krocích způsobí uvolnění β -kateninu, což je bílkovina, která se váže ke cadherinu. β -katenin vstupuje do buněčného jádra a spouští expresi specifických promotorových genů. Usuzuje se, že WNT proteiny mohou působit jako růstové faktory kmenových buněk (Palička a Živný 2007).

U HER receptoru může být v prsní tkáni obzvláště důležitý cross-talk s cytokinovými receptory. Prolaktinové receptory a receptory pro růstové hormony indukují fosforylaci HER-1 kinázami JAK (Schulz 2005).

Přesné vztahy s mnohočetnými růstovými faktory a receptory vyskytujícími se mezi různými buněčnými typy a subjekty jsou extrémně složité. Navíc se mohou podstatně měnit mezi různými fázemi růstu prsu, a dokonce mezi segmenty ductu. Souhrně to vypadá, že aktivace HER-1, ale ještě více HER-2/HER-3 heterodimeru, poskytuje hlavní stimul pro proliferaci. V případě jednotky HER-2/HER-3 tato stimulace může být uplatněna převážně prostřednictvím dráhy PI3K, protože HER-3 po fosforylaci HER-2 poskytuje několik vazných míst pro PI3K α regulační podjednotku.

Naopak, HER-4 receptor, který je aktivován hereguliny a snad HB-EGF spíše podporuje diferenciaci mamárních epiteliálních buněk (Schulz 2005).

Tab. 2 Receptory HER rodiny

| Gen | Jiný název | Chromozomální lokalizace | Ligand |
|--------------|------------------|--------------------------|---|
| EGFR / erbB1 | HER-1 | 7p12 | EGF, TGF α , amphiregulin, HB-EGF, BTC |
| erbB2 | HER-2/neu / p185 | 17q11.2-q12 | Není znám |
| erbB3 | HER-3 | 12q13 | NRG1, NRG2 |
| erbB4 | HER-4 | 2q33.3-q34 | NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, BTC, HB-EGF |

EGF: epidermální růstový faktor, TGF: transformující růstový faktor, HB-EGF: heparin vázající epidermální růstový faktor, BTC: betacellulin, NRG: neuregulin (Schulz 2005)

4.4.2.3. Signální dráhy

V šest let starém přehledném sdělení popisuje Masopust a kol. (2003) problematiku signálních drah:

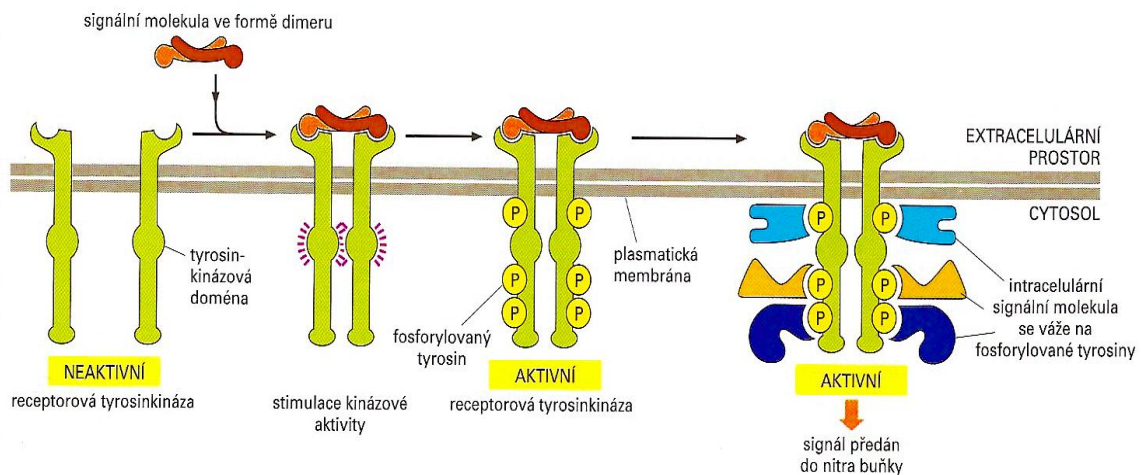
4.4.2.3.1. MAPK

Klasické MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy), také zvané ERK (Extracellular signal – Regulation Kinase), hrají důležitou úlohu v buněčné proliferaci a diferenciaci. Tento proces začíná aktivací receptoru proteinkinázy pro růstový faktor a pro receptory spřažené s G-proteinem; následuje aktivace MAPK proteinů p44/p42 (ERK1/ERK2), které dále aktivují:

- a) proteinkinázu-1 Rsk/MAPKAPK-1 (p90 ribozomální proteinkinázu-1 aktivovanou pomocí S6-kinázy/MAPkinázy) a dále
- b) transkripční faktory ELK-1 a STAT-3 (STAT - signal transducers and activators of transcription), což umožní vstup těchto transkripčních faktorů do buněčného jádra, kde navodí
- c) expresi příslušného genu stimulací promotoru c-fos (= promotoru pro jeden z genů časné – tentokrát již transkripční odpovědi na mitogenní signál). (Masopust a kol. 2003)

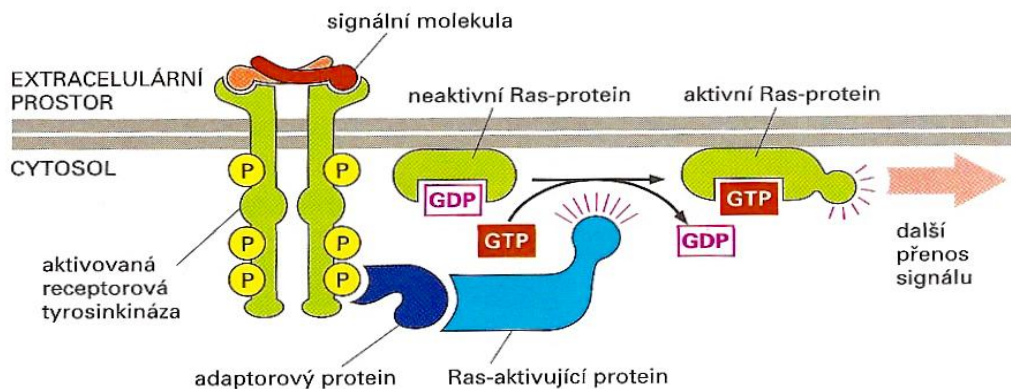
4.4.2.3.2. Signální dráhy Akt a PI3K

Tato proteinkinasaová kaskáda hraje centrální úlohu v regulaci přežívání buněk a v metabolismu. Serin/threonin-proteinkináza Akt/PKB je aktivována různými faktory růstu a přežívání buněk, inzulinem, integriny a receptory spřaženými s G-proteinem. Byly popsány 3 izoformy: Akt1, Akt2, Akt3. Signál je na Akt přenášen aktivací fosfoinositid-3 kinázy (PI3K) (Masopust a kol. 2003).



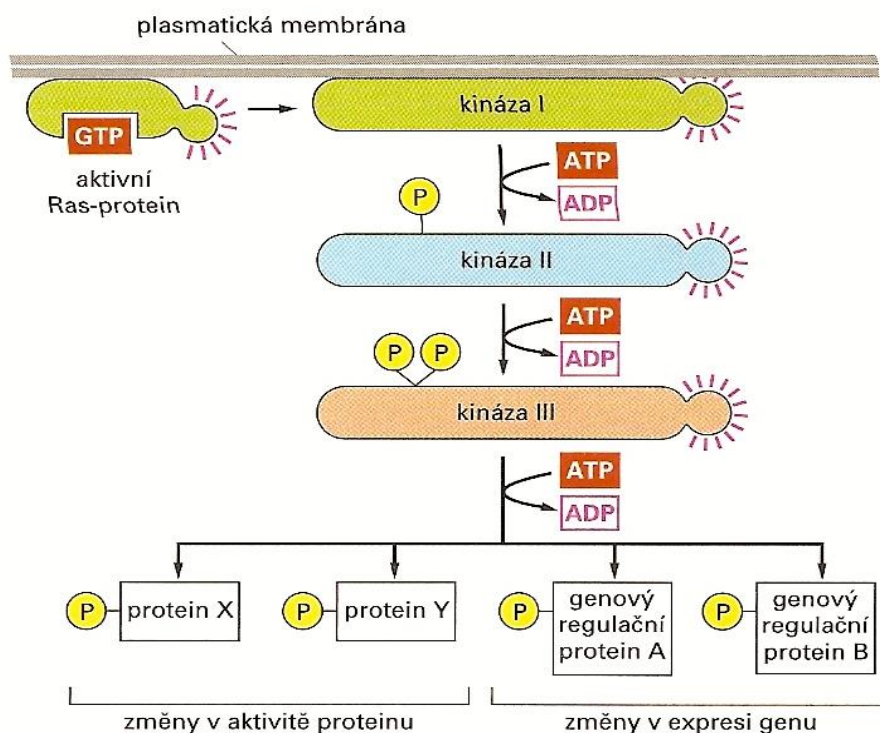
Obr. 3 Schéma přenosu signálu přes receptor s tyrozinkinázovou aktivitou

Aktivace receptorové tyrozinkinázy vede k vytvoření intracelulárního signálního komplexu. Navázání signální molekuly k extracelulární doméně receptorové tyrozinkinázy způsobí asociaci dvou molekul receptoru za vzniku dimeru nebo je signální molekula již dimerem. V dimeru se kinázové domény intracelulárních konců molekul receptoru dostanou do kontaktu, což kinázy aktivuje a umožní jim vzájemně si fosforylovat postranní řetězce několika tyrosinů. Každý fosforylovaný tyrosin slouží jako specifické vazebné místo pro příslušný intracelulární signální protein, který přebírá signál a přenáší ho dále do nitra buňky (Alberts a kol. 2005).



Obr. 4 Aktivace proteinu Ras aktivovanou receptorovou tyrosinkinázou

Adaptérový protein je připojen ke zvláštnímu fosfotyrosinu. Adaptér váže a aktivuje protein, který funguje jako aktivátor proteinu Ras. To stimuluje Ras k výměně navázaného GDP za GTP. Aktivovaný Ras potom stimuluje další krok signální dráhy (Alberts a kol. 2005).



Obr. 5 Fosforylační kaskáda aktivovaná proteinem Ras

Protein Ras spouští fosforylační kaskádu tří proteinkináz, která zesiluje signál a rozděluje ho do různých směrů. Poslední kináza v kaskádě fosforyluje různé cílové proteiny, mezi něž patří další proteinkinázy a genové regulační proteiny, které regulují genovou expresi. Změny v expresi genů a v aktivitě proteinů vedou ke komplexním změnám v chování buněk (Alberts a kol. 2005).

4.4.2.4. HER-2/neu a maligní zvrát

O úloze HER-2/neu v tumorigenezi Cinek a Filip (2007) uvádí: Zvýšená exprese HER-2/neu poskytuje buňkám růstovou výhodu. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese HER-2/neu, pozorovaná asi u 20–30 % karcinomu prsu a vaječníků, aktivuje PI3-K/Akt cestu „prežití“. Tím upřednostňuje buněčnou proliferaci pomocí inhibice apoptózy. Signál „prežití“ je za normálního stavu spárován s aktivací další, tzv. proliferační dráhy Ras/MAPK. Zvýšená exprese HER-2/neu v nádorech proto zvyšuje a prodlužuje signalizaci prostřednictvím obou těchto drah, PI3-K/Akt i Ras/MAPK. Ve zvýšené přítomnosti signálu HER-2/neu je tedy umožněn posun od apoptózy k proliferaci a prežití, což potvrzuje spojení receptoru HER-2/neu s maligním fenotypem.

Klíčová role členů HER rodiny ve zvyšování metastatického potenciálu spočívá také v jejich schopnosti vyvolat sekreci tkáňových membránových degradačních enzymů metaloproteináz, které vedou k poruše interakcí mezibuněčných a interakcí buňka – matrix. Tyto poruchy společně se změnami integrinové a kadherinové funkce jsou často pozorovány u nádorových buněk s aktivovanou HER signalizací. Usnadňují komunikaci mezi nádorovými buňkami a jejich proklouznutí z kontroly v mikroprostředí (Cinek a Filip 2007).

Rozdíl mezi ER(+) a ER(-) nádory, také (analogický) rozdíl mezi HER-2(+) a HER-2(-) nádory prsu má prognostický význam, protože HER-2(+) nádory zpravidla mají horší průběh. To má také důsledky pro terapii (Schulz 2005).

4.4.2.5. Vztah mezi ER a HER

Jak již bylo uvedeno výše, produkce peptidových růstových faktorů se odehrává ve stromálních a epiteliálních buňkách a je regulována estrogény (Schulz 2005). Estrogeny a estrogenové receptory (ER) jsou klíčové regulátory růstu v normálním prsu společně s dalšími hormony působícími přes jaderné nebo membránové receptory. Kromě toho synergizují s růstovými faktory z rodiny EGF, které aktivují receptorové tyrozinkinázy z HER rodiny (Schulz 2005).

Přibližně 50 % ER(-) a menší díl ER(+) nádorů prsu nadměrně exprimuje HER-2 (Schulz 2005). V klinické běžné praxi jsou většinou kvalitativně rozlišovány 4 skupiny: ER(+)/HER-2(-), ER(+)/HER-2(+), ER(-)/HER-2(+) a ER(-)/HER-2(-) (Schulz 2005).

S rostoucí expresí HER-2 nebo HER-1 se potřeba estrogenu pro růst epiteliálních buněk jeví být snižená nebo eventuálně vymizelá. Zatímco normální buňky vyžadují estrogenu a EGF podobné růstové faktory, ER(+) nádor udržuje tuto potřebu v co nejmenším rozsahu, ER(-)/HER-2(+) nádory prsu potřebují pouze peptidové faktory a eventuálně dokonce i jen málokterý z nich. Činnost estrogenu je samozřejmě částečně, ale ne kompletně zprostředkována přes indukci růstových faktorů a aktivaci HER receptorů. Důležité je, že ER(-) nádory zahrnují velký počet dalších genetických a epigenetických změn (Schulz 2005).

HER-1 je také nadměrně exprimován v některých případech buď místo HER-2 (alternativně), nebo společně s ním a může poskytnout rozhodující růstový stimul u některých ER(-)/HER-2(-) nádorů. HER-3 není obvykle nadměrně exprimován, ale je vždy prezentován v HER-2(+) nádorech. To je pravděpodobně nezbytné pro činnost HER-2 poskytováním rozhodujících vazebných míst pro PI3K α a jiných intracelulárních mediátorů. U normálních koncentrací receptorů by byly HER-2 a HER-3 přítomny jako monomery a jejich dimerizace by byla závislá na vazbě ligandu pomocí HER-3. Nadměrná exprese HER-2 může snižovat koncentraci požadovaného ligandu nebo ho dokonce „zlikvidovat“, tudíž napomáhá konstitutivnímu (pro expresi není nutná indukce) spojení a konstitutivní aktivitě (Schulz 2005).

4.4.2.6. Stanovení HER-2/neu

Stanovení nadměrné exprese HER-2/neu je důležité pro prognózu a léčbu pacientek, u nichž byl diagnostikován invazivní karcinom prsu. Používá se stanovení amplifikace genu c-erb-B2 DNA fluorescenční in situ hybridizací (FISH), exprese receptoru v buněčné membráně imunohistochemickými technikami a analýza extracelulární domény (ECD), která je uvolňována do cirkulace a měřitelná v séru. Stanovení ECD v séru má význam u pacientek, u kterých není možné zopakovat biopsii nebo pro sledování průběhu metastazující nemoci.

4.4.2.6.1. Imunohistochemie (IHC)

IHC stanovení HER-2/neu je založeno na reakci antigen – protilátka. V parafinových tkáňových řezech se prokazuje antigen HER-2/neu exprimovaný na buněčné membráně pomocí specifické protilátky značené enzymem. Po přidání

substrátu se mikroskopicky detekuje barevná reakce. Hodnocení je semikvantitativní, výsledek se udává jako skóre od 0 do 3+ (viz tab. 3).

Tab. 3 Hodnocení IHC detekce HER-2/neu

| skóre | výsledek |
|-------|-----------------------------|
| 0 | HER-2 negativní |
| 1+ | HER-2 negativní |
| 2+ | nejistý, nutno doplnit FISH |
| 3+ | HER-2 pozitivní |

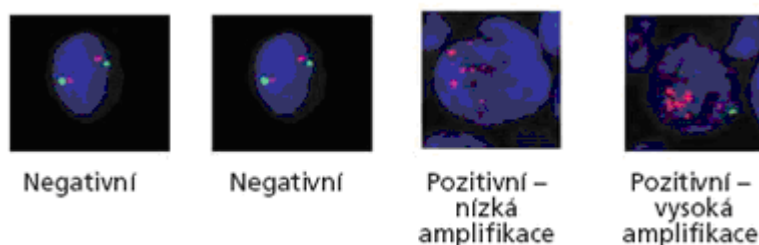
(Tesařová 2008)

4.4.2.6.2. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Metodou fluorescenční in situ hybridizace lze lokalizovat cílové nukleotidové sekvence přímo v buňkách, cytologických preparátech chromozomů nebo řezech tkání (in situ). Metoda FISH je založena na schopnosti jednořetězcové DNA sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované v histologickém řezu tkáně na mikroskopickém podložním sklíčku.

Inkorporace fluorescenčně značených nukleotidů do hybridizačních sond se obvykle provádí metodou nick translace, in vitro transkripce, „random primer“, nebo metodou polymerázové řetězové reakce.

Cílovou DNA a DNA sondy je nutné denaturovat. Denaturace se obvykle provádí ve formamidovém roztoku při teplotě 65-70 °C. Při vlastní hybridizaci, která probíhá při 37 °C, se jednořetězcová DNA sonda váže na komplementární úseky cílové DNA. Po odstranění nespécificky navázané sondy se detekuje signál (Sigma-Aldrich 2008).



Obr. 6 Stanovení HER-2/neu metodou FISH

Zeleně je znázorněna centromera chromozomu 17, červeně gen pro HER-2/neu. Hodnotí se poměr počtu genů a chromozomů, za normálních okolností je na každém chromozomu jeden gen pro HER-2/neu (poměr gen : chromozom = 1), za pozitivní výsledek se považuje poměr gen : chromozom ≥ 2 (Tesařová 2008).

4.4.2.7. Léčba cílená na HER-2/neu

Herceptin (trastuzumab) je rekombinantní humanizovaná IgG1 kappa monoklonální protilátka, která se selektivně váže s vysokou afinitou na extracelulární doménu HER-2/neu. Molekula obsahuje antigen vázající smyčky z vnitřku variabilní oblasti anti-HER-2/neu myší monoklonální protilátky (4D5), spojené se zbytky struktury lidské variabilní oblasti a konstantní domény IgG1 (Cho 2003).

Mechanismus účinku a rezistenci vůči Herceptinu Masopust (2009) vysvětluje: Signální dráha epidermálního růstového faktoru redukuje hladinu p27^{kip1} navozením jeho degradace ubikvitinací; to následně způsobuje uvolnění cyklindependentní kinázy 2 (Cdk2) a tím aktivaci procesu buněčného dělení (při nadměrné expresi genu HER-2/neu v maligně transformovaných buňkách to znamená podporu nádorové proliferace). Aplikace Herceptinu blokuje vazbu na receptor (HER-2/neu), takže signalizace růstového podnětu je přerušena (nedochází k degradaci p27^{kip1}) a jeho vazba na Cdk2 znemožní postup cyklu buněčného dělení a způsobí zástavu v G1-fázi (brání tak nádorové proliferaci). Pozdější rezistence vůči účinku Herceptinu se vysvětluje nadměrnou expresí genu pro ubikvitin-ligázu (Skp2) v adaptovaném subklonu nádorových buněk. Zvýšení Skp2 podpoří ubikvitinaci p27^{kip1} blokovanou Herceptinem a nádorová progresse může pokračovat.

5. KLINICKÁ ČÁST

5.1 ČESKÁ LITERATURA – PŮVODNÍ SDĚLENÍ

5.1.1. Porovnání detekce HER-2/neu metodou IHC a FISH

Autoři z Fakultní nemocnice Brno se zabývali srovnávací analýzou metod imunohistocemických (IHC) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

Cílem jejich studie bylo posouzení validity metod IHC za použití různých primárních protilátek a postupů ve srovnání s FISH. Bylo vyšetřeno 60 standardně zpracovaných vzorků invazivních karcinomů prsu pomocí IHC při použití diagnostického kitu DAKO HercepTestTM a tří monoklonálních protilátek firmy Novocastra (NCL-c-erbB-2-316, NCL-c-erbB-2-356, NCL-CB11) a dále pomocí FISH při použití INFORM HER-2/neu Gene Detection System.

Amplifikace byla detekována u 13,3 % případů a nadměrná exprese (na 3+) u 13,3 % - 28,3 % případů v závislosti na použitém postupu a primární protilátce. Významná shoda byla zaznamenána mezi FISH a IHC při použití monoklonálních protilátek Novocastra NCL-c-erbB-2-316 a NCL-c-erbB-2-356 u postupu, který vynechává tzv. „oživení“ (retrieval) antigenu ve vodní lázni. U 9 pozitivních DAKO HercepTestTM případů (7 případů na 2+ a 2 případy na 3+) nebyla prokázána amplifikace metodou FISH. Tyto výsledky dokládají, že nadměrná exprese HER-2/neu (3+) a stejně tak normální exprese HER-2/neu (0 a 1+) mohou být detekovány oběma metodami, přičemž hraniční pozitivita 2+ musí být pozorně interpretována za použití obou metod a optimalizovaných pracovních postupů (Hermanová a kol. 2001).

Tab. 4 Srovnání protilátek a protokolů z hlediska predikce výsledků FISH

| Protilátka, protokol | Efektivita % | Senzitivita % | Specifita % | PHV+ % | PHV- % |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| DAKO Herceptest | 85 | 100 | 83 | 47 | 100 |
| DAKO bez retrievalu | 93 | 100 | 92 | 67 | 100 |
| Novocastra 316 | 93 | 100 | 92 | 67 | 100 |
| Novocastra 316 bez retrievalu | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Novocastra 356 | 95 | 100 | 94 | 73 | 100 |
| Novocastra 356 bez retrievalu | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Novocastra CB 11 | 92 | 100 | 90 | 62 | 100 |
| Novocastra CB 11 bez retrievalu | 97 | 88 | 98 | 88 | 98 |

efektivita - poměr vynaložených nákladů k dosaženému výsledku

senzitivita - % správně pozitivních výsledků z daného souboru

specifita - % správně negativních výsledků z daného souboru

PHV+ pozitivní prediktivní hodnota - % s jakou pravděpodobností bude mít pacient hledanou chorobu, když bude výsledek testu pozitivní

PHV- negativní prediktivní hodnota - % s jakou pravděpodobností nebude mít pacient hledanou chorobu, když bude výsledek testu negativní

opakované vyšetření bez retrievalu bylo provedeno pro výsledky Herceptestu 1+, 2+, 3+; 0 byla považována za negativní i pro toto vyšetření (Hermanová a kol. 2001).

5.1.2. Klasifikace karcinomů prsu, triple negative nádory

Práce Palácové (2008) se zabývá probíhajícími studiiemi a novinkami v léčbě karcinomu prsu a dále klasifikací karcinomů: Karcinomy prsu byly dříve klasifikovány na základě morfologie a podle imunohistochemického stanovení steroidních receptorů (ER a PR) a HER-2/neu receptoru. Tato klasifikace byla využívána k určení léčebné strategie, prognózy a k určení predikce odpovědi na terapii. V současnosti lze využít také genové exprese. Na základě exprese genů můžeme určit 5 molekulárních subtypů

- lumenální typ A a B (ER pozitivní skupiny),
- skupinu nadměrně exprimující HER-2/neu,
- skupinu nádorů charakterizovanou vysokou expresí genů bazálních epitelů a nízkou expresí genů lumenálních epitelálních buněk – bazální typ,
- posledním subtypem je basal-like skupina nádorů, která je charakterizována pozitivitou cytokeratinů 5/6 a 17 (myoepitelie), absencí receptorů ER, PR a HER-2/neu, také označována jako triple negative (vychází z myoepitelálních buněk ductů).

Označení triple negative a basal-like tumory nejsou zcela totožné. Pro skupinu basal-like nádorů je typická exprese CK 5/6, vysoká proliferace, centrální nekrózy, obvykle nebývá exprimován ER, PR a HER-2/neu. Většina basal-like nádorů jsou triple negative, CK-5 pozitivní, s vysokou proliferací a expresí p53, s jeho častými mutacemi. U těchto nádorů je také popisována vysoká exprese EGFR a ckit. Nejpřesnější je identifikovat triple negative tumory RNA array analýzou, která zatím není standardně dostupná. Jako alternativu lze využít Nielsonův návrh pro triple negative tumory – negativní ER, PR, HER-2/neu a přítomnost CK 5/6 nebo EGFR (Palácová 2008).

Retrospektivně bylo prokázáno, že u triple negative tumorů je častější výskyt mozkových metastáz, vysoký výskyt lokálních recidiv, větší výskyt viscerálních než kostních metastáz. Existují také některé vlastnosti, které jsou společné pro triple negative tumory a pro nádory s prokázanou mutací v genu BRCA1. Jedná se o ER negativitu, vysoký grade, vysoký Ki-67, CK 5/6 a expresi EGFR. Společná pro obě skupiny nádorů je také častá mutace p53 (Palácová 2008).

Přehled léčby triple negative tumorů uvádíme v následující tabulce.

Tab. 5 Potencionální cílená léčba triple negative tumorů

| Léčba | Cíl | Princip účinku | Probíhající studie |
|---|---|--|---|
| Chemoterapie působící zlomy v DNA (platinové deriváty) | DNA | Početné DNA aberace způsobí defektní DNA reparaci In vitro doklad o selektivní chemosenzitivitě (u nosiček BRCA1) Není klinický doklad | Plánovaná studie srovnávající platinové deriváty a taxany u BRCA1 triple-negative a sporadických triple-negative nádorů |
| PARP1 inhibice | PARP1 | Doklad o deficitu BRCA1 In vitro data, která prokazují efektivitu u BRCA1 nosiček | Studie fáze I |
| Látky olivňující EGFR – monoklonální protilátky (cetuximab) nebo malé molekuly inhibující tyrozinkinázu (gefitinib) | EGFR | Overexprese EGFR. Doposud nejsou data o efektivitě | Studie fáze II |
| Multikinázové inhibitory (lapatinib, pertuzumab) | EGFR/erbB2 | Overexprese EGFR. Doposud nejsou data o efektivitě. | Studie fáze II |
| Inhibitor ckit tyrozin kinázy | ckit | Overexprese ckit. Doposud nejsou data o efektivitě | Studie fáze II |
| Second-messenger inhibice | Second messengers (Ras farnesylace, Raf, MEK, mTOR, Src, HSP90) | Vysoká proliferace. Doposud nejsou data o efektivitě. | Studie fáze I a II |

BRCA1 – breast cancer gene 1

PARP1 – poly ADP ribozil polymeráza 1

EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor 1

ckit – povrchový tyrozin-kinázový receptor

erbB2 – receptor pro epidermální růstový faktor 2 (HER-2/neu)

mTOR – mammalian target of rapamycin

HSP 90 – heat shock protein 90

Ras, Raf, MAPK, MEK kinázová dráha k přenosu signálů do jádra (Palácová 2008)

5.1.3. Prediktivní hodnota HER-2/neu jako markeru rezistence na tamoxifen

V retrospektivní studii Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) v Brně byla řešena otázka prediktivních markerů rezistence na tamoxifen.

Petráková a kol. (2008) publikovali: Z pacientek klinického stadia I-III operovaných pro karcinom prsu na MOÚ v letech 1998-2000 byly vyhledány případy léčené v adjuvanci tamoxifenem po dobu pěti let, případně do relapsu onemocnění.

U těchto 179 případů byla provedena z archivního parafinového materiálu imunohistochemická stanovení estrogenového receptoru alfa (ER), progesteronového receptoru (PR) a Ki-67. Dále byla vyšetřena pomocí FISH amplifikace HER-2/neu a genu pro cyklin D1.

Z klasických prognostických parametrů jsou v jednorozměrné regresní analýze bezpříznakového přežití významnými rizikovými faktory přítomnost více než tři uzlinových metastáz a grade 3. Z biologických parametrů zvyšují riziko relapsu zejména amplifikace cyklinu D1, amplifikace HER-2/neu a negativita PR.

Ve vícerozměrném regresním modelu však vymizel význam negativity PR a vedle klinického stadia III proti I-II se uplatnila jen amplifikace cyklinu D1 a amplifikace HER-2/neu.

Pokud byly pacientky s adjuvantní chemoterapií posuzovány odděleně (n = 77), žádný z klinickopatologických ani biologických rizikových parametrů nedosáhl statistické významnosti ani v jednorozměrné analýze. Ve vícerozměrné analýze pacientek bez adjuvantní chemoterapie (n = 102) se vedle klinického stadia III proti I a II uplatnila významně pouze amplifikace HER-2/neu.

Výsledky potvrzují prioritu klinického stadia jako prediktoru selhání adjuvantní léčby u pacientek s ER pozitivními nádory. Jako významné biologické parametry se jeví amplifikace HER-2/neu a amplifikace cyklinu D1. Jejich prediktivní hodnota však klesá, pokud je pacientkám podána adjuvantní chemoterapie. Nelze tedy vyloučit, že cyklin D1 je spíše prognostickým, než prediktivním faktorem selhání adjuvantní léčby tamoxifenem (Petráková a kol. 2008).

5.1.4. Sérový HER-2/neu – predikce léčby a korelace s CA15-3 a CEA

Sérový marker HER-2/neu (S_{HER-2/neu}) je vhodné sledovat u pacientek s metastazující rakovinou prsu. Mnoho studií prokázalo, že vyšší hladiny extracelulární

domény HER-2/neu v séru mohou být detekovatelné i u nádorů, jenž byly prvotně stanoveny jako HER-2/neu negativní, vysvětluje se to tím, že tato produkce je sekundární a jejím zdrojem jsou metastázy (Šimíčková a kol. 2005).

Tito autoři z Masarykova onkologického ústavu v Brně se zabývali stanovením sérového HER-2/neu jako prediktivního markeru odpovědi na léčbu Herceptinem a jeho korelací se sérovými nádorovými markery CA15-3 a CEA.

Šimíčková a kol. (2005): V souboru 28 pacientek s metastazující rakovinou prsu byla hodnocena odpověď na léčbu Herceptinem se známou hladinou sérového HER-2/neu, která byla stanovena před i po prvních 3 měsících terapie:

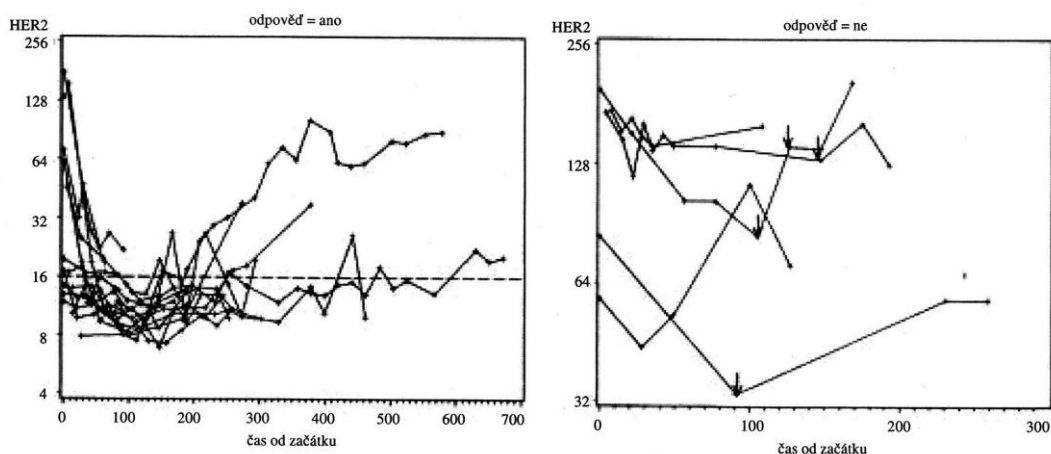
U 14 pacientek (50 %) došlo k výrazné odpovědi (kompletní léčebná odpověď/CR nebo částečná/PaR), u 4 pacientek přetrvává odpověď PaR nebo CR více než 11 měsíců (rozsah 11-39 měsíců). U 9 pacientek bylo optimálně dosaženo SD (stabilní onemocnění), u 4 je SD dosud delší než 6 měsíců (rozsah 7-14 měsíců). K progresi došlo u 5 pacientek (17,8 %).

Koncentrace sérového HER-2/neu před terapií byla zvýšena celkem u 57,1 % (16/28) pacientek. Při restagingu (většinou po třech měsících terapie) byla u pacientek, u nichž bylo dosaženo CR či PaR jako nejlepší dosažené odpovědi, koncentrace sérového HER-2/neu v normě (pod 15 µg/l) u 13 ze 14 pacientek. U skupiny pacientek s progresí se však koncentrace S_{HER-2/neu} ve všech 5 případech stále pohybovala nad cut-off hladinou. Tento rozdíl byl statisticky významný.

Statistické významnosti se přibližovaly rovněž rozdíly v předterapeutické hodnotě sérového HER-2/neu u těchto dvou skupin pacientek, i když i u pacientek s dosaženou remisí byly nalezeny výrazně zvýšené koncentrace před začátkem terapie Herceptinem (obr. 7); hodnoty pacientek v progresi byly výrazně vyšší než cut-off vždy. Poměr poklesu hladin S_{HER-2/neu} nebyl v jejich souboru signifikantní.

Výpovědní hodnota CEA po třech měsících sice vykazuje signifikantní rozdíl středních hodnot, při progresi je však medián vyšší. Pro CA15-3 nebyly nalezeny ve dvou skupinách hodnocených podle odpovědi na terapii Herceptinem signifikantní rozdíly.

Z uvedených výsledků vyplývá, že HER-2/neu, narozdíl od CA15-3 a CEA, má prediktivní hodnotu pro terapii Herceptinem. V případě pacientek, u kterých po třech měsících léčby neklesnou koncentrace S_{HER-2/neu} pod diskriminační hodnoty, nedojde k odpovědi na léčbu (Šimíčková a kol. 2005).



Obr. 7 Koncentrace S_HER-2/neu v souboru vyšetřovaných pacientek

Koncentrace S_HER-2/neu v $\mu\text{g/l}$ v souboru vyšetřovaných pacientek, které dosáhly jako optimální kompletní léčebné odpovědi nebo částečné léčebné odpovědi – odpověď = ano, a nebo k odpovědi na léčbu nedošlo – odpověď = ne. Čas od začátku léčby je uveden ve dnech, pokud k odpovědi nedošlo je konec léčby označen šipkou (Šimíčková a kol. 2005).

V případě dalších autorů (Svoboda a kol. 2008) navazuje na předchozí studie retrospektivní analýza vlastního souboru pacientek Masarykova onkologického ústavu v Brně, s cílem identifikovat prognostické faktory použitelné v běžné klinické praxi.

Svoboda a kol. (2008): Do souboru bylo zařazeno 112 pacientek, které od dubna 2000 do ledna 2007 zahájily v MOÚ paliativní protinádorovou terapii s trastuzumabem pro metastatický karcinom prsu. Byly sledovány základní charakteristiky primárních tumorů (histologický typ, exprese estrogenového, progesteronového a HER-2/neu receptoru, amplifikace HER-2/neu genu), stav pacientek, rozsah onemocnění, vývoj koncentrace sérových nádorových markerů [karcinoembryonální antigen (CEA), CA 15-3, sérová koncentrace extracelulární části HER-2/neu receptoru (S_HER-2/neu)] a parametry účinnosti léčby a přežití (léčebná odpověď RR, čas do progresu onemocnění TTP, celkové přežití OS).

U 95 % pacientek byl trastuzumab podáván v kombinaci s cytostatiky (nejčastěji taxany – 83 %), 1. a 2. linie léčby představovaly 88,4 % aplikací. Medián TTP byl 284 dnů (9,3 měsíce), medián OS byl 612 dnů (20,1 měsíce), RR 54,5 %. Nejvíce odpovědi na léčbu bylo v první linii léčby a u nádorů s poměrem signálů sond HER-2/Ch17 $\geq 2,2$ (tedy s amplifikací HER-2/neu).

Léčba trastuzumabem byla předčasně ukončena u 11 pacientek (9,8 % případů), u 7 pacientek (6,2 %) z důvodů kardiotoxicity. Metastatické postižení CNS nastalo u 31 pacientek (27,7 %).

Sérový nádorový marker S_{HER-2/neu} byl nejčastějším pozitivním markerem v době před zahájením léčby (72,5 %) i při progresi onemocnění (55,9 %). Coxova regresní analýza prokázala nejsilnější prognostický význam ve vztahu k TTP u markeru S_{HER-2/neu}, a to jak k jeho hladině před zahájením léčby, tak i v době mezi 90 a 130 dnem léčby trastuzumabem. Nejlepším prediktorem OS byl stav CEA před zahájením léčby a stav S_{HER-2/neu} v době mezi 90 a 130 dnem léčby. Citovaní autoři potvrdili, že jediným prediktivním markerem odpovědi na léčbu trastuzumabem, který je zároveň absolutním indikačním kritériem, je průkaz HER-2/neu positivity tumoru. Stanovení sérové koncentrace S_{HER-2/neu} před zahájením léčby a monitorace dynamiky tohoto markeru v průběhu léčby trastuzumabem je nejvýznamnějším prognostickým ukazatelem vývoje onemocnění (TTP i OS) a může tak přispět k časnému odhalení progresu a k individualizaci časového plánu kontrolních vyšetření (Svoboda a kol. 2008).

5.1.5. Závislost exprese HER-2/neu na věku v pardubické nemocnici

Na Katedru biologických a lékařských věd jsme získali výsledky souboru pacientek z Pardubické krajské nemocnice, které byly imunohistochemicky vyšetřeny na přítomnost HER-2/neu v parafínových tkáňových řezech karcinomů prsu během roku 2007. Tyto výsledky jsme se pokusili zanalyzovat vzhledem k věku pacientek.

V souboru bylo celkem 109 pacientek různých věkových kategorií, z čehož 76 (69,72 %) mělo skóre 0, 15 pacientek (13,76 %) bylo pozitivní na 1+, 7 pacientek (6,42 %) na 2+ a 11 pacientek (10,09 %) na 3+.

Pacientky jsme rozdělili podle věku do čtyř kategorií: do 45 let (n = 12), do 55 let (n = 30), do 65 let (n = 36) a nad 65 let (n = 31). Výsledky IHC stanovení HER-2/neu v jednotlivých věkových kategoriích shrnuje tabulka 6.

Tab. 6 Výsledky IHC stanovení HER-2/neu pacientek z Pardubické nemocnice

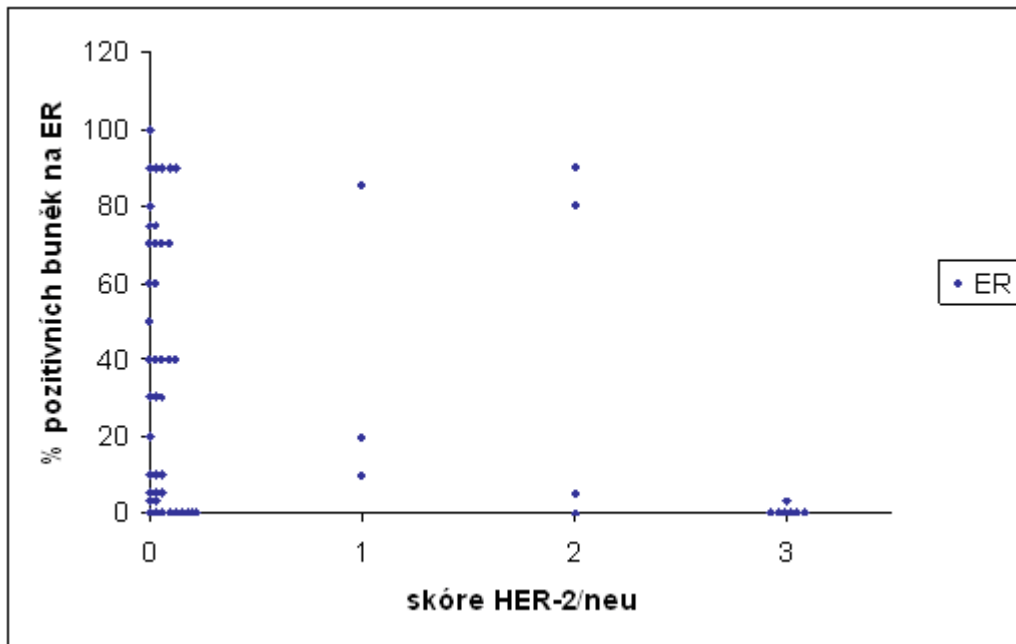
| skóre | Sk. do 45 let (n = 12) | Sk. do 55 let (n = 30) | Sk. do 65 let (n = 36) | Sk. nad 65 let (n = 31) |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0 | 9 (75 %) | 19 (63,33 %) | 24 (66,66 %) | 24 (77,42 %) |
| 1+ | 3 (25 %) | 7 (23,33 %) | 4 (11,11 %) | 1 (3,23 %) |
| 2+ | 0 | 1 (3,33 %) | 4 (11,11 %) | 2 (6,45 %) |
| 3+ | 0 | 3 (10 %) | 4 (11,11 %) | 4 (12,90 %) |

Ve všech kategoriích převažuje HER-2/neu negativita (0, 1+), skóre 2+ jsme detailněji neanalyzovali, protože jsme neměli k dispozici výsledky amplifikace HER-2/neu pomocí FISH. HER-2/neu pozitivita (skóre 3+) byla zaznamenána ve třech skupinách (do 55, do 65 a nad 65 let), pozorovali jsme vzestupnou tendenci nadměrné exprese HER-2/neu u starších pacientek.

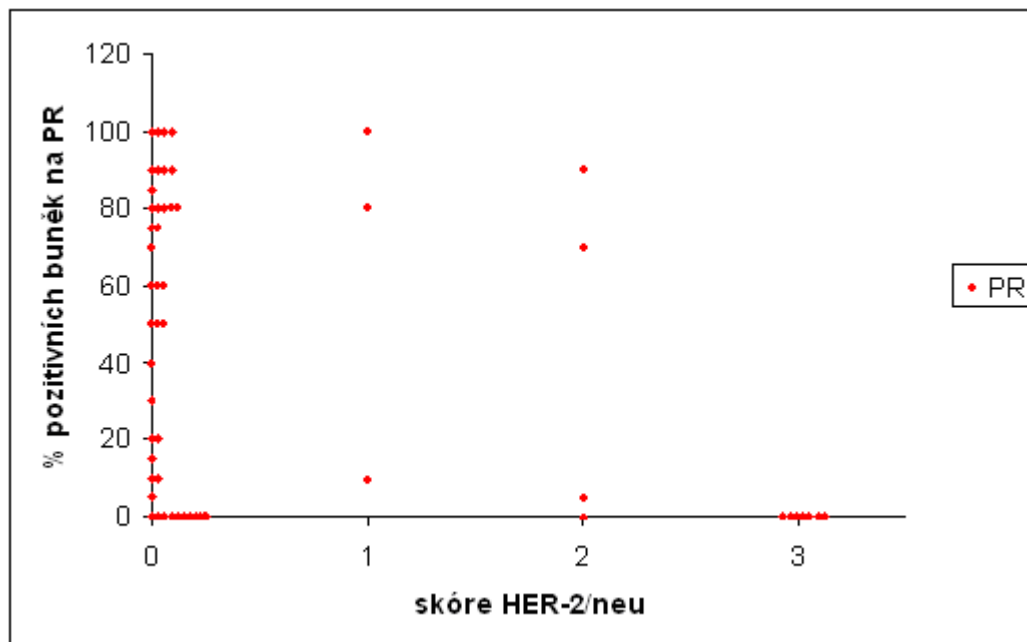
Následně jsme ve skupině (n = 56) starších pacientek (nad 55 let) porovnávali expresi HER-2/neu a expresi hormonálních receptorů (HR).

Ze 7 pozitivních případů (12,5 %) na HER-2/neu (3+) byla pouze v jednom zaznamenána slabá pozitivita ER (2 % pozitivních buněk). Čtyři pacientky (7,14%) měly hraniční pozitivitu HER-2/neu (2+), z kterých dvě pacientky byly ER(+)/PR(+), jedna ER(slabě +)/PR(-) a jedna ER(-)/PR(slabě +). Celkem 39 pacientek (69,65 %) vykazovalo pozitivitu HR a negativitu HER-2/neu [5,36 % PR(+); 8,93 % ER(+); 55,36 % ER(+)/PR(+)]. Zbývajících 6 pacientek (10,71 %) bylo triple negative. Přehled výsledků uvádíme v následujících grafech.

Graf 1 Přehled exprese ER a HER-2/neu



Graf 2 Přehled exprese PR a HER-2/neu



5.2. ZAHRANIČNÍ ABSTRAKTOVÁ LITERATURA

5.2.1. Korelace stavu HER-2/neu s ER a PR

Ve studii z roku 2005 Lal a kol. zkoumali inverzní vztahy (nepřímou závislost) mezi HER-2/neu receptory a estrogenovými (ER) a progesteronovými (PR) receptory a korelovali stav HER-2/neu s histologickými rysy u 3655 neselektovaných invazivních karcinomů prsu. Pro ER, PR a HER-2/neu byla použita imunohistochemická analýza, vyšetření HER-2/neu bylo navíc doplněno o FISH.

Expresí ER a PR byla signifikantně snížena v HER-2/neu(+) nádorech ve srovnání s HER-2/neu(-) nádory (ER, 49.1 % vs 78.17 %; PR, 24.3 % vs 53.13 %). Dokonce mezi HER-2/neu(+) nádory byl poměr ER nebo PR exprese v nádorech vykazujících vysoce maligní histologický stupeň signifikantně snížen ve srovnání se středním stupněm nádorů.

Vyšetření HER-2/neu bylo pozitivní u 10,87 % duktálních karcinomů grade 2 a 27,84 % grade 3 a negativní byly všechny duktální karcinomy grade 1. Nadměrná exprese nebo amplifikace HER-2/neu byla v zásadě omezena na grade 2 a 3 duktálních karcinomů a inverzně korelovala s expresí ER nebo PR. Ačkoliv exprese ER nebo PR je v HER-2/neu(+) nádorech snížena, jejich značná část stále exprimuje ER nebo PR (Lal a kol. 2005).

Konecny a kol. (2003) studovali kvantitativní spojení mezi HER-2/neu a steroidními hormonálními receptory v primární rakovině prsu pozitivní na hormonální receptory (HR). HER-2/neu pozitivní nádory jsou často rezistentní k hormonální terapii. Navzdory všeobecnému inverznímu spojení mezi amplifikací nebo nadměrnou expresí HER-2/neu a ER nebo expresí PR, je část pacientek jak HER-2/neu tak HR pozitivní.

K lepšímu pochopení vztahů mezi pozitivitou HER-2/neu a expresí HR Konecny a kol. (2003) analyzovali HER-2/neu, ER a PR jednak jako posloupnost proměnných v buněčných liniích rakoviny prsu, a jednak ve dvou statistických skupinách pacientek s primární rakovinou prsu. Pro studii klinické populace byly hladiny HER-2/neu proteinu stanovovány pomocí ELISA (skupina A, n = 665) a počet genových kopií HER-2/neu byl stanovován pomocí DNA fluorescenční in situ hybridizace (skupina B, n = 894). Expresí ER a PR byla analyzována pomocí EIA (skupina A) nebo radioligandovou metodou (skupina B).

HR-pozitivní buněčné linie (rakoviny prsu), modifikované pomocí genového inženýrství – transfekcí genem HER-2/neu, exprimovaly statisticky významně nižší hladiny ER a PR než původní linie.

V klinických skupinách hladiny nadměrné exprese a genové amplifikace HER-2/neu inverzně korelovaly s hladinami ER a PR. U pacientek s HR-pozitivními nádory měly HER-2/neu pozitivní nádory statisticky významně nižší hladiny ER a PR než pacientky HER-2/neu negativní (Skupina A: pro ER, medián = 25 fmol/mg versus medián = 38.5 fmol/mg; pro PR, medián = 35 fmol/mg versus medián = 88.5 fmol/mg. Skupina B: pro ER, medián = 44 fmol/mg versus medián = 92 fmol/mg; pro PR, medián = 36 fmol/mg versus medián = 84 fmol/mg). Pacientky s vyššími hladinami nadměrné exprese HER-2/neu nebo amplifikace měly statisticky významně nižší hladiny ER a PR než pacientky s nižšími hladinami nadměrné exprese nebo amplifikace HER-2/neu.

Protože absolutní hladiny HR jsou silně spojené s reakcí na hormonální terapii u primární a pokročilé rakoviny prsu, snížení exprese ER a PR může být jedním mechanismem k objasnění relativní rezistence HER-2/neu(+)/HR(+) nádorů k hormonální terapii (Konecny a kol. 2003).

5.2.2. Nárůst stavu exprese/amplifikace HER-2/neu zvýšenou malignizací

5.2.2.1. Vznik exprese/amplifikace HER-2/neu de novo

V mnoha předchozích studiích byly primární nádory srovnávány s metastázami v regionálních mízních uzlinách, které byly přítomny ve stejném čase jako primární nádor (nikoliv pooperačně vzniklé metastázy), a proto se předpokládalo, že stav HER-2/neu zůstává stejný (Regitnig a kol. 2004).

Regitnig a kol. (2004) analyzovali stav HER-2/neu imunohistochemicky a pomocí FISH u 31 karcinomů prsu a v témže čase se vyskytujících metastáz do mízních uzlin a vzdálených metastáz: Ve 14 případech bylo následně vyšetřeno sérum na HER-2/neu – Bayer Immuno 1 HER-2/neu analýzou. Imunohistochemické srovnání HER-2/neu primárních nádorů a vzdálených metastáz bylo hodnoceno případ od případu.

Byla zjištěna zvýšená exprese HER-2/neu u vzdálených metastáz v porovnání s primárními nádory – a to v 15 případech (48,4 %). Tři (9,7 %) z nich vykazovaly zvýšení skóre z 0 na 3+. Naopak metastázy v mízní uzlině vykazovaly stejnou expresi HER-2/neu jako primární nádory, což bylo potvrzeno pomocí FISH. Dva případy, které vykazovaly skóre HER-2/neu 3+ a amplifikaci HER-2/neu v primárních nádorech odhalily v prvním měření hladiny sérového HER-2 nad 50 ng/ml. Pět ze čtrnácti případů (36 %) ukázalo zvýšení sérového HER-2 nad 50 ng/ml, což směřuje ke smrti pacientek.

Tato studie přináší důkaz, že existuje podskupina karcinomů prsu, kde se HER-2/neu nadměrná exprese a amplifikace vyskytuje de novo v distálních metastázách v pozdním stádiu nemoci (Regitnig a kol. 2004).

Ve studii o dva roky starší byla detekována amplifikace genu HER-2/neu pomocí FISH v karcinomech prsu nadměrně exprimujících HER-2/neu a neexprimujících HER-2/neu a v jejich synchronních benigních, premaligních a metastatických lézích a přináší důkaz o tom, že amplifikace HER-2/neu se může vyvinout de novo v kterémkoliv stádiu nemoci, ale jeví se být zapojena hlavně do iniciace vzniku rakoviny prsu (Xu a kol. 2002).

Xu a kol. (2002) posuzovali 26 pacientek s nadměrnou expresí HER-2/neu v invazivních duktálních karcinomech (IDC) a se společně se vyskytujícími lézemi duktální hyperplázie (DH) nebo lézemi atypické duktální hyperplázie (ADH) nebo se společně se vyskytujícím duktálním karcinomem in situ (DCIS) v okolí invazivního tumoru stejně tak jako s metastazujícím karcinomem v axilárních mízních uzlinách.

V primárních karcinomech se vyskytoval těsný vztah mezi nadměrnou expresí (detekce IHC) a amplifikací pomocí FISH (85 % shoda). U těchto pacientek byla demonstrována amplifikace HER-2/neu u 7 ze 13 případů s ADH a u 21 z 22 případů s DCIS. Amplifikace se nevyskytovala u DH nebo v normálním duktálním epitelu. U všech 12 pacientek s pozitivními současně se vyskytujícími metastázami v axilárních mízních uzlinách byla významně shodná amplifikace HER-2/neu v primárním a metastazujícím karcinomu. Amplifikace byla shodná v multifokálních metastázách navzdory morfologické heterogenitě u některých pacientek. Amplifikační poměry se zvyšovaly od ADH k DCIS a k invazivnímu karcinomu, ale nebyl zde rozdíl v amplifikačních poměrech mezi primárními karcinomy a současně s primárním nádorem se vyskytujícími axilárními metastázami.

Také zde byla zhodnocena amplifikace HER-2/neu u 21 pacientek bez nadměrné exprese HER-2/neu v primárních karcinomech. Tři vykazovaly amplifikaci jak v primárních, tak v metastatických lézích s nízkým amplifikačním poměrem (asi 2). Jedna pacientka měla amplifikaci v primárním tumoru, ale neměla ji v axilárních metastázách. Dvě pacientky vykazovaly nepatrnou amplifikaci v metastazujícím karcinomu (poměry 1,6 a 2), ale ne v primárních karcinomech (Xu a kol 2002).

5.2.2.2. Rozdíly exprese HER-2/neu, ER, PR mezi podtypy IDC a DCIS

Prostý duktální karcinom in situ (DCIS) prsu může být rozdělen do tří subtypů (luminální, bazálně/kmenový a nerozlišený „nulový“) založených na expresi pěti cytokeratinových markerů (CK): CK5/6, CK14, CK17 (kmenový/bazální), a CK8, CK18 (luminální). Rozdělení CK subtypů je spojeno s jaderným stupněm a rozdílnou expresí ER-alfa, PR, HER-2/neu a EGFR (Steinman a kol. 2007).

Všechny tři původní (mateřské) buněčné subtypy – luminální, bazální a nerozlišený (luminal, basal/stem, null) mohou exprimovat ER-alfa a PR a jejich exprese je vyšší u nízkého stupně DCIS než u vysokého stupně DCIS. Exprese HER-2/neu je spojena s luminálním typem pouze u nízkého stupně DCIS, ale může se nacházet u všech tří subtypů vysokého stupně DCIS, exprese EGFR je nízká a je přítomna pouze v luminálních buňkách jak vysokého, tak nízkého stupně DCIS. Charakteristiky exprese ER-alfa, PR, HER-2/neu a EGFR jsou značně rozdílné v rozdílných podtypech mateřských nádorových buněk u DCIS (Tang a kol. 2006).

Autoři, kteří došli k závěrům v předchozím odstavci, se dále podíleli na další studii, ve které zkoumali typy exprese CK markerů, ER-alfa, PR, HER-2/neu a EGFR imunohistochemickou analýzou 99 případů prostého DCIS a 96 případů DCIS s ko-existujícím invazivním duktálním karcinomem (DCIS/IDC).

Steinman a kol. (2007) uvádí, že mezi pokročilým stupněm DCIS a DCIS/IDC jako hypotetického mezistupně jsou rozdílné typy exprese pro ER-alfa, PR a EGFR odpovídající CK subtypům. Z toho lze usuzovat, že přinejmenším některý prostý DCIS je molekulárně odlišný od DCIS/IDC. Ve většině případů je mezi DCIS a ko-existujícím IDC vysoký stupeň ko-exprese markerů, naznačující, že DCIS je často prekurzorová léze pro ko-existující IDC.

Poměr nesouhlasné exprese těchto markerů je nízký a je častěji spojen s pokročilým stupněm karcinomu, z čehož lze usuzovat, že zde může být přítomna jiná signální dráha. Existují významné rozdíly v expresi těchto molekulárních markerů mezi pokročilým stupněm karcinomu a počátečním stupněm karcinomu. Tím je podporováno stanovisko, že vysoký (histologický) stupeň a nízký stupeň karcinomů prsu jsou odlišné jednotky (Steinman a kol. 2007).

Ve studii Husseina a kol. (2008) byla testována hypotéza, že progresse duktálního karcinomu in situ k invazivnímu duktálnímu karcinomu je spojena se změnou exprese ER, PR a HER-2/neu.

Byly vyšetřeny vzorky ze sta mastektomií, všechny vzorky obsahovaly buď duktální karcinom in situ (DCIS), nebo invazivní duktální karcinomy (IDC) nebo nspecifikované karcinomy. Stav ER, PR a HER-2/neu byl zkoumán pomocí imunohistochemie. Expres ER a PR byla zaznamenána jako skóre – průměrná hodnota pozitivně obarvených buněk (0, 1+, 2+, 3+).

Autoři našli rozdíly mezi DCIS a IDC se statisticky významným snížením průměrných hodnot pozitivně barvených buněk na ER a PR v pokročilém histologickém stupni malignizace (grade 3) IDC. Invazivní karcinomy s metastázami v lymfatických uzlinách nebo lymfovaskulární invazi nebo obojím měly nižší průměrné hodnoty positivity barvených buněk na ER a PR ve srovnání s těmi, které byly bez těchto rysů (metastázy + lymfovaskulární invaze).

U IDC (grade 3), hodnoty exprese HER-2/neu byly statisticky významně vyšší ve srovnání s DCIS. Navíc, hodnoty exprese HER-2/neu byly statisticky významně vyšší u IDC s metastázami lymfatických uzlin nebo lymfovaskulární invazi než u těch IDC, které neměly tyto rysy.

Statisticky významně vysoký průměr positivity barvených buněk na ER a PR byl pozorován u žen po menopauze ve srovnání s ženami před menopauzou. Naopak, vysoká exprese HER-2/neu byla pozorována pouze u žen před menopauzou. Významná pozitivní korelace byla pozorována mezi expresí ER a PR. Nízký stupeň nepřímé závislosti byl nalezen mezi ER(+)/PR(+) nádory a expresí HER-2/neu.

Tyto objevy zdůvodňují názor, že progresse rakoviny prsu je často spojena se změnami exprese ER, PR a HER-2/neu (Hussein a kol. 2008).

Lebeau a kol. (2003) se, kromě EGFR a HER-2/neu, zabývali cyklinem D1 a proteiny p21 a p53 v korelaci s buněčnou proliferací a stavem hormonálních receptorů u DCIS.

Zvýšená proliferační aktivita byla pozorována u 46 % DCIS. To korelovalo s expresí EGFR a HER-2/neu, ale ne s nadměrnou expresí cyklinu D1 a p21 a také ne s akumulací p53. HER-2/neu pozitivita byla spojena s nadměrnou expresí p21. Autoři našli korelaci mezi nadměrnou expresí p21 a cyklinu D1 omezenou na případy s pozitivitou HER-2/neu. HER-2/neu negativní tumory se zvýšenou proliferační aktivitou byly pozitivní na ER a cyklin D1. Protein p21 se zdá být potenciálním mediátorem v HER-2/neu signalizaci. Je možné, že cyklin D1 může být nepřímo indukován HER-2/neu signalizací přes p21. Kromě toho, ER zprostředkovaná regulace směrem k nadměrné tvorbě cyklinu D1 se zdá být možný mechanismus udržující buněčnou proliferaci u DCIS v případě EGFR a HER-2/neu negativity (Lebeau a kol. 2003).

5.2.3. Extracelulární doména HER-2/neu

Extracelulární doména (ECD) HER-2/neu receptoru je vhodná jako marker HER-2/neu pozitivní rakoviny prsu. V následující studii Garoufaliho a kol. (2008) byly hladiny ECD HER-2/neu srovnávány se standardními klinickými a patologickými prognostickými faktory. U 248 pacientek (116 s časnou nebo lokalizovanou rakovinou prsu, 116 s pokročilou nebo metastazující rakovinou prsu a 16 s benigní mastopatií) byly měřeny hladiny ECD HER-2/neu v séru. U 116 pacientek s pokročilým stádiem nemoci byl také stav HER-2/neu zjišťován pomocí imunohistochemie (IHC). Průměrné hodnoty ECD HER-2/neu v séru byly 19,62 ng/ml.

Průměrné hodnoty u benigní mastopatie byly 9,04 ng/ml, u časného stádia nemoci byly hodnoty 9,40 ng/ml a u pokročilého stádia nemoci 34,50 ng/ml. Bylo pozorováno, že není rozdíl mezi benigní mastopatií a časným stádiem rakoviny prsu, zatímco byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi časným a pokročilým stádiem rakoviny prsu.

Kromě toho u pacientek s pokročilým stádiem nemoci byla zaznamenána signifikantní přímá závislost mezi ECD HER-2/neu a HER-2/neu zjišťovaného pomocí IHC, stupněm nemoci a úrovní II postižení axilárních uzlin právě tak jako

významná nepřímá závislost s estrogenovými receptory a progesteronovými receptory (Garoufali a kol. 2008).

Na hodnocení sérové extracelulární domény ECD HER-2/neu u pacientek s časným stádiem rakoviny prsu a korelaci s klinickopatologickými parametry a přežitím se zaměřili autoři v další studii.

Ludovini a kol. (2008) uvádí: Tato prospektivní studie zahrnovala pacientky se stádiem I-III rakoviny prsu. Od 5/2000 do 7/2005 bylo do této studie postupně zahrnuto 256 pacientek s rakovinou prsu stádia I-III. Vysoké hladiny ECD HER-2/neu v séru ($>$ nebo $=$ 15 ng/ml) byly zjištěny u 23 pacientek (9.0 %) a stav HER-2/neu positivity nádorové tkáně byl pozorován u 42 pacientek (16.4 %) se shodou z 87.1 %.

Vysoké hladiny ECD HER-2/neu byly statisticky významně spojeny s vysokým histologickým stupněm, stádiem III, postižením lymfatických uzlin a negativitou jak ER, tak PR. Ve vícerozměrné analýze byly vysoké hladiny ECD HER-2/neu v séru významným nezávislým prognostickým faktorem horšího přežití bez opětovného výskytu nemoci. Statisticky významné spojení bylo pozorováno mezi vysokými hladinami sérové ECD HER-2/neu a horším přežitím bez opětovného výskytu nemoci u pacientek s časným stádiem rakoviny prsu (Ludovini a kol. 2008).

Cílem studie Fehma a kol. (2007) bylo určit stav HER-2/neu v séru a korespondujících cirkulujících nádorových buněk u pacientek s metastazující rakovinou prsu, jejichž primární nádor byl HER-2/neu negativní nebo stav HER-2/neu byl neznámý. Stanovení HER-2/neu v séru nebo hodnocení stavu HER-2/neu v cirkulujících nádorových buňkách může být klinicky důležité, protože metastazující tkáň může být pro analýzu získána obtížně z důvodu její nepřístupné lokalizace.

Shoda mezi stavem HER-2/neu zjištěným v cirkulujících nádorových buňkách a nebo zjištěným v séru byla 71 %. Ačkoliv byl studován pouze malý počet pacientek, pozorování je klinicky významné, protože v době studie tyto pacientky neměly přístup k léčbě cílené na HER-2/neu (přestože je u nich nebezpečí, že se genetická povaha nádoru v pooperační době mohla změnit neznámým směrem, pro jehož diagnózu dříve neexistovaly metody) (Fehm a kol. 2007).

5.2.4. Prognostická a prediktivní hodnota tkáňového HER-2/neu

Ve studii Changa a kol. (1999) byly analyzovány ER, PR, 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 HER-2/neu 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 HER-2/neu se zabýval Sjogren a kol. (1998): Nadměrná exprese proteinu HER-2/neu byla zjištěna u 19 % nádorů a byla spojena s kratším přežitím při pětiletém sledovacím období (rozuměno s menším % přeživších) ve srovnání s HER-2/neu negativními případy. V porovnání vztaženém k celkovému počtu pacientek přežilo 58 % u HER-2/neu(+) respektive 77 % u HER-2/neu(-) a v případě 96 pacientek s pozitivním postižením uzlin přežilo 31 % u HER-2/neu(+) respektive 61 % u HER-2/neu(-). Ale při posuzování pacientek s negativním postižením uzlin nebylo zjištěno kratší přežití u těch, které měly zároveň nadměrnou expresi HER-2/neu. U 47 pacientek pozitivních na postižení uzlin léčených adjuvantně tamoxifenem a radioterapií bylo pětileté celkové přežití 13 % pro HER-2/neu pozitivní a 75 % pro HER-2/neu negativní pacientky.

Prognostická hodnota HER-2/neu 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 HER-2/neu 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 (Sjogren a kol. 1998).

Ačkoli pacientky s rakovinou prsu s nízkým stupněm nádoru a negativními uzlinami patří do velmi dobré prognostické skupiny, tak výsledek stanovení HER-2/neu pozitivity významně ovlivňuje přežití v této skupině. Výsledky retrospektivní analýzy

zajišťují podporu pro užití trastuzumabu v adjuvantní terapii i u těchto pacientek, které jsou typicky klasifikovány jako mající velmi dobrou prognózu (Tovey a kol. 2009).

5.2.5. Nádorové charakteristiky před a po neoadjuvantní léčbě

Užití neoadjuvantní chemoterapie přednostně před chirurgickou resekcí u rakoviny prsu se již neomezuje na pacientky s lokálně pokročilou nemocí. Tím, jak se předoperační léčba stává obvyklejší, vzniká otázka, zda taková terapie mění důležité nádorové charakteristiky (Adams a kol. 2008).

Cílem studie Adamse a kol. (2008) bylo porovnat histologický stupeň, hormonální receptorový stav a expresi HER-2/neu před a po terapii pacientek přijatých na předoperační neoadjuvantní chemoterapii (z klíčových slov se domníváme, že šlo o taxanovou léčbu). Byl identifikován stav 40 pacientek po neoadjuvantní léčbě, u kterých byl k dispozici archivovaný patologický materiál před a po terapii. Histologické preparáty byly posouzeny retrospektivně, nádorový histologický stupeň, hormonální receptorový stav a exprese HER-2/neu byly porovnány mezi vzorky před a po terapii.

Nebyly zjištěny žádné statisticky významné histologické rozdíly mezi vzorky před a po uvedené neoadjuvantní léčbě pro dva ze tří parametrů, které dohromady tvoří modifikovaný Bloom-Richardsonův stupeň zahrnující stupeň tvorby tubulů a jaderný pleomorfismus. Bylo pozorováno snížení skóre pro mitotickou aktivitu mezi vzorky před a po terapii, což bylo statisticky významné. Nicméně, nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v celkovém modifikovaném Bloom-Richardsonově stupni.

U 26 pacientek (65 %) byla k dispozici informace, co se týče stavu hormonálních receptorů a HER-2/neu. V případě stavu hormonálních receptorů nebyl žádný významný rozdíl mezi vzorky před a po terapii. Nicméně, bylo zde více pacientek s nadměrnou expresí HER-2/neu po přijetí neoadjuvantní terapie. Neoadjuvantní terapie vedla k významnému snížení počtu mitóz a ke zvýšení podílu pacientek s nadměrnou expresí HER-2/neu. Nebyly zaznamenány žádné významné změny pro stupeň tvorby tubulů, jaderný pleomorfismus, celkový Bloom-Richardsonův stupeň a stav hormonálních receptorů. Nicméně omezením pro tyto výsledky může být malý objem vzorku (Adams a kol. 2008).

Karcinomy prsu ER negativní spíše dosáhnou patologické kompletní odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii ve srovnání s ER pozitivními nádory. ER pozitivní

nádory vykazují nízkou proliferaci a ER negativní karcinomy vysokou proliferaci (Jones a kol. 2009).

Jones a kol. (2009) analyzovali do jaké míry koreluje lepší odpověď ER negativních karcinomů s proliferačním stupněm. Retrospektivní analýza prospektivně udržované databáze identifikovala 175 pacientek léčených neoadjuvantní chemoterapií, u nichž byla k dispozici tkáň pro analýzu Ki-67.

Při jednorozměrné analýze byly statisticky významně spojeny předběžná terapie, Ki-67, ER status, HER-2/neu status a grade s patologickou kompletní odpovědí. Ve vícerozměrném modelu byl pouze HER-2/neu významný ukazatel patologické kompletní odpovědi.

Bylo ukázáno, že není významný vztah mezi předběžnou terapií, Ki-67 a přežitím bez nemoci a celkovým přežitím. Ki-67 není nezávislý ukazatel klinické kompletní odpovědi nebo patologické kompletní odpovědi. Aspekty stavu ER kromě jeho inverzního vztahu s proliferací mohou přispět k jeho prediktivní hodnotě pro patologickou kompletní odpověď (Jones a kol. 2009).

Užitím vícerozměrných analýz byl zkoumán Desmedtem a kol. (2009) vztah mezi kvantitativními měřeními exprese HER-2/neu nebo poměru HER-2/neu ku dimerizovanému HER-2/neu a objektivní odpovědi. Jako kritéria zhodnocení odpovědi byla zvolena doba do progresu a přežití po léčbě trastuzumabem ve skupině pacientek s metastazující rakovinou prsu, které byly primárně vybrány pro léčbu pomocí FISH.

Vysoké hladiny exprese HER-2/neu nebo poměru HER-2/neu ku dimerizovanému HER-2/neu korelovaly s dlouhým přežitím po léčbě trastuzumabem v populaci pacientek, které byly buď FISH pozitivní (90 %), nebo IHC s výsledkem na 3+ (10 %).

Ale v případě, že nebyl podáván trastuzumab samotný – nýbrž v kombinaci s cytostatiky – potom naopak u pacientek s vysokými hladinami exprese HER-2/neu nebo s vyššími hladinami dimérů HER-2:HER-2 se zdálo, že získaly již jen malý prospěch z přidání chemoterapie k trastuzumabu, zatímco ty s nízkými hladinami (HER-2/neu nebo dimérů HER-2:HER-2) prospívaly statisticky významně (díky chemoterapii přidané k trastuzumabu).

Tato data naznačují, že další kvantitativní nebo funkční měření stavu HER-2/neu může umožnit rozvoj (individuálně pro každou podskupinu pacientek) přizpůsobených léčebných strategií pro pacientky s metastazující rakovinou prsu (Desmedt a kol. 2009).

5.2.6. Možnosti budoucího klinického rozvoje

5.2.6.1. Zájímavosti z hlediska diagnostiky

5.2.6.1.1. Genomový profil HER-2/neu pozitivních karcinomů, vliv ER

Profilovací studie exprese naznačovaly, že karcinomy prsu s amplifikací HER-2/neu tvoří heterogenní skupinu, která může být podrozdělena podle stavu ER. Jedná se jednak o ER pozitivní karcinomy prsu s amplifikací HER-2/neu, které patří do luminální B skupiny, a jednak o ER negativní karcinomy s amplifikací HER-2/neu, které tvoří odlišnou molekulární podskupinu, známou jako erbB2 nebo HER-2/neu podskupina. ER negativní karcinomy prsu se značně liší od ER pozitivních v charakteru, typu a složitosti genetických aberací (Marchiò a kol. 2008).

Tito autoři porovnali genomové profily ER pozitivních a ER negativních karcinomů s amplifikací HER-2/neu užitím aCGH (array komparativní genomová hybridizace). Validace rozdílně amplifikovaných oblastí byla provedena v nezávislých sériích 70 karcinomů prsu amplifikujících HER-2/neu. Ačkoli karcinomy amplifikující HER-2/neu měly nápadně komplexní charakteristiky (seskupení) molekulových genetických aberací, ER pozitivní a ER negativní karcinomy prsu amplifikující HER-2/neu sdílely molekulové genetické rysy definované pomocí aCGH.

Exaktní analýza pomocí Fisherova „genome-wide“ testu (Genome-wide Fisher's exact test analýza) odhalila, že méně než 1,5 % genomu bylo významně odlišně získáno nebo ztraceno u ER pozitivních proti ER negativním karcinomům s amplifikací HER-2/neu. Nicméně dvě oblasti amplifikace byly statisticky významně spojeny s ER pozitivními karcinomy, jedna z nich lokalizována do chromozomální oblasti 17q21.2 a zahrnovala GJC1, IGFBP4, TNS4 a TOP2A. Kromě toho CISH (chromogenní in situ hybridizace) analýza z nezávislých validačních sérií potvrdila spojení mezi stavem ER a amplifikací TOP2A. Ačkoli stav ER neudává celkový genetický profil karcinomů prsu amplifikujících HER-2/neu, pro podskupiny HER-2/neu karcinomů prsu mohou být specifické genové aberace charakteristické (Marchiò a kol. 2008).

5.2.6.1.2. Stanovení fosforylace HER-2/neu v tyrozinu 1221/1222

Stanovení fosforylace HER-2/neu v tyrozinu 1221/1222 zlepšuje předpověď nepříznivého přežití pro pacientky s rakovinou prsu s nádory pozitivními na hormonální receptory (Frogne a kol. 2009). V této studii Frogne a kol. (2009) zkoumali význam

aktivní HER signalizace v biopsii nádoru prsu a párových metastázách hodnocením exprese fosforylace HER1, HER2, HER3, Erk, Akt a celkové hladiny HER4 a HER2.

IHC analýza byla provedena u 268 primárních nádorů prsu a u 30 párových metastatických lézí žen po menopauze s nádory prsu pozitivními na hormonální receptory, které užívaly tamoxifen v adjuvantní terapii. Úrovně exprese sledovaného proteinu byly analyzovány na koexpresi, korelaci s klinickopatologickými parametry a pro prognostickou hodnotu ve vztahu k přežití bez návratu nemoci a celkovému přežití. Na závěr byl zhodnocen rozdíl mezi hladinami proteinu v primárním nádoru versus v metastázách.

V primárních nádorech 8 %, 18 %, 14 % a 15 % z vyšetřovaných případů bylo určeno jako pozitivní na expresi celkového HER2, pHER1 (fosforylovaný HER1), pHER2 a pHER3 (ve stejném pořadí). HER4 byl exprimován s vysokou intenzitou u 68 % případů a s mírnou intenzitou u 29 % případů. Aktivované formy Akt a Erk byly zcela uniformně exprimovány v kategoriích negativní, mírná nebo výrazná.

V jednorozměrné analýze exprese celkového HER2, pHER1, pHER2 a pHER3 byla významně spojena s nepříznivou dobou přežití bez návratu nemoci. Výrazná exprese HER4 byla spojena s prodlouženým přežitím bez opětovného výskytu nemoci právě tak jako s celkovým přežitím. Exprese pAkt a pErk nekorelovala s přežitím.

Ve vícerozměrné analýze byla exprese pHER2 zjevně nezávislý marker pro nepříznivé přežití bez opětovného výskytu nemoci a celkové přežití, kdy se testovala velikost nádoru, stupeň, stav uzlin a HER2. Na závěr byla srovnávána exprese HER receptoru v metastazujících versus v primárních nádorech, která ukázala významné zvýšení exprese pHER1 a pHER3 v metastázách.

V karcinomech prsu pozitivních na hormonální receptory určení fosforylovaného HER2 přináší další prognostickou informaci o nepříznivé prognóze ve srovnání s aktuálním klinickým standardem pro měření HER-2/neu (Frogne a kol. 2009).

5.2.6.2. Zajímavosti z hlediska léčby

5.2.6.2.1. Propeptid lysyl oxidázy

Novou cestou léčby rakoviny prsu řízené HER-2/neu představuje propeptid lysyl oxidázy, jenž inhibuje signální kaskádu, indukovanou HER-2/neu, která podporuje

invazivnější fenotyp. Bylo zjištěno, že exprese genu lysyl oxidázy 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 propeptid lysyl oxidázy inhibuje transformaci buněk rakoviny prsu řízených HER-2/neu, což je protisměrný aktivátor Ras.

5.2.6.2.2. Vakcína E75

E75 je imunogenní peptid z HER-2/neu proteinu, který je nadměrně exprimován u mnoha pacientek s rakovinou prsu. Autoři Peoples a kol. (2008) spojili dva – navzájem se překrývající – řízené klinické experimenty léčby pomocí E75 vakcíny k prevenci rekurence u pacientek s rakovinou prsu s pozitivními uzlinami a s negativními uzlinami.

Peptid E75 a granulocyty a makrofágy stimulující faktor byl podán intradermálně již dříve léčeným pacientkám, které byly v dotyčném období bez nemoci – jednak těm – s pozitivními uzlinami – a to v klinické studii na zvyšování dávek; a kromě toho – byl podán pacientkám s negativními uzlinami – a to v dávkově optimační studii. Byla monitorována lokální a systémová toxicita. Imunologické odpovědi byly stanoveny pomocí vyšetřovacích metod in vitro a pomocí in vivo hypersenzitivní reakce opožděného typu. U každé pacientky byl dokumentován opětovný výskyt choroby (vznik metastáz).

186 pacientek bylo rozděleno do dvou studií (počet pacientek s pozitivními uzlinami = 95; pacientky s negativními uzlinami = 91). Pacientky, u nichž se vyskytovaly antigeny HLA-A2 a HLA-3 byly vakcinovány (n = 101) zatímco všechny ostatní (n = 85) byly sledovány jako kontrola.

Toxicita byla minimální a byla pozorovatelná na dávce závislá imunitní odpověď vůči vakcíně. Plánovaná primární analýza odhalila opětovný výskyt choroby u 5,6 % vakcínou léčených pacientek ve srovnání s 14,2 % u kontroly (P = 0,04) ve sledovaných 20 měsících. S tím, jak během času slábla na vakcínu specifická imunita, rozdíl v opětovném výskytu metastáz ztratil statistickou signifikanci – a to za 26 měsíců (8,3 % vs. 14,8 %); nicméně signifikantní rozdíl v modelu opětovného výskytu perzistoval. Vakcína E75 může redukovat opětovný výskyt metastáz u konvenčně léčených, vysoce rizikových pacientek – které jsou (po operaci) „bez nemoci“ (Peoples a kol. 2008).

6. DISKUZE

6.1. AKTIVACE RODINY RECEPTORŮ HER

Z hlediska časové návaznosti dějů je nutno nejprve vyzdvihnout poznatek, že produkce ligandů (peptidových růstových faktorů) pro HER receptory se odehrává ve stromatu a je regulována estrogény (Schulz 2005).

Selektivní modulátory estrogenových receptorů většinou nemají terapeutický efekt na ER(-) nádory. Uvažujeme, že úspěch takovéto léčby u výjimečných ER(-) případů by mohl být způsoben vlivem těchto farmak na ER v intersticiu (jehož pozitivita nemusí být detekovatelná). Intersticiem by mohlo vlivem těchto látek přestat tvořit ligandy pro HER systém.

Úlohu aktivace receptoru HER-2/neu jsme se snažili pochopit z hlediska možné nadprodukce jeho ligandů. Proto byl v teoretické části řešen význam epidermálního růstového faktoru jako ligandu HER rodiny receptorů. Nezvyklým dojmem působí, že dosud nebyl nalezen ligand pro HER-2/neu a že tento receptor ani ligand mít nemusí. Buňka využívá toho, že ligandem je aktivován např. HER-3, který nemá kinázovou aktivitu pro další přenos signálu. Ta je však získána tím, že HER-3 se dimerizuje s HER-2/neu, který tuto aktivitu zprostředkuje (Schulz 2005). Možnost terapeutického zásahu do této signální dráhy je proto komplikovaná. Místo zásahu na úrovni ligandů se proto rozvinula léčba protilátkou proti HER-2/neu (trastuzumab).

V mnoha fyziologických procesech jsou podle Schulze (2005) látky jako strukturně příbuzný TGF α , amphiregulin a heparin vázající EGF (HB-EGF) pravděpodobně významnější než samotný EGF. HB-EGF právě tak jako betacellulin (BTC) a epiregulin (EPR) se také vážou na HER-4 a aktivují jej. Neureguliny (NRG) 1 a 2 jsou převážně rozpoznávány HER-3; NRG 3 a 4 jsou rozpoznávány pomocí HER-4.

Návázání ligandu způsobí dimerizaci HER receptorů a to buď homodimerizaci (2 stejné receptory), nebo heterodimerizaci (2 různé receptory). Stejně jako Schulz se o tom, že HER-2/neu má neznámý ligand, zmiňují ve své práci Cinek a Filip (2007), dále také uvádějí, že intracelulární signály dimerů obsahujících HER-2/neu jsou silnější než signály ostatních dimerů. Ovšem vznik homodimeru HER-2/neu nebyl vyjasněn v žádné z námi nalezených prací.

Jak již bylo řečeno – produkce peptidových růstových faktorů se odehrává ve stromálních a epiteliálních buňkách a je regulována estrogény. Jak jejich produkce, tak

buněčné odpovědi na růstové faktory jsou ovlivněny cross-talkem (zkříženou reakcí) s různými dalšími hormony a růstovými faktory. Přesné vztahy s mnohočetnými růstovými faktory a receptory vyskytujícími se mezi různými buněčnými typy a subjekty jsou extrémě složité. Navíc se mohou podstatně měnit mezi různými fázemi růstu prsu, a dokonce mezi segmenty ductu, tímto způsobem se také mohou měnit jednotlivé nádory (Schulz 2005).

6.2. HODNOCENÍ POZNATKŮ Z KLINICKÉ ČÁSTI

Česká literatura je poměrně bohatá na problematiku týkající se karcinomu prsu. V souvislosti s markerem HER-2/neu se zaměřuje na jeho stanovení a prognostickou a prediktivní hodnotu. Dále se zajímá o novinky v léčbě karcinomu prsu, kdy autoři často čerpají ze zahraničních zdrojů. Z hlediska klinického další poznatky přinášejí přímo česká pracoviště, která provádějí výzkum za podpory grantů (např. práce Hermanové a kol. 2001, Petrákové a kol. 2008, Svobody a kol. 2008, Šimíčkové a kol. 2005).

Jak v české, tak v zahraniční literatuře byl řešen význam stanovení sérového HER-2/neu. V obou případech byla potvrzena jeho prediktivní a prognostická hodnota. V české studii Šimíčkové a kol. (2005) byla navíc řešena korelace sérového HER-2/neu s dalšími humorálními markery CA15-3 a CEA. Nicméně stanovení extracelulární domény se podle ČSKB ČLS JEP zatím nedostalo mezi doporučené metody v klinické praxi.

Zahraniční literatura věnující se rakovině prsu je velmi obsáhlá, proto jsme omezili abstrakty pouze na ty novější, které souvisí s HER-2/neu receptorem. Lze vyzdvihnout, že jsme se často setkávali s důkazy o tom, že při karcinogenezi stoupá exprese HER-2/neu a zároveň naopak klesá exprese ER. Toto se týká i nádorů, které byly původně ER pozitivní.

Studie Regitniga a kol. (2004) přinesla důkaz o nadměrné expresi a amplifikaci HER-2/neu de novo v distálních metastázách v pozdním stádiu nemoci. V této souvislosti jsme našli studii o dva roky starší, ve které Xu a kol. (2002) na podkladě výsledků uvádí, že amplifikace HER-2/neu se může vyvinout v kterémkoliv stádiu

nemoci. Poznatky obou studií vyvracejí dřívější názor, že stav HER-2/neu zůstává během nemoci neměnný.

Šimíčková a kol (2005) potvrdila tuto hypotézu o přeměně původně HER-2/neu negativních primárních nádorů na HER-2/neu pozitivní metastázy nálezem sérového HER-2/neu u HER-2/neu negativních pacientek.

Lal a kol. (2005) se zabývali korelací stavu HER-2/neu s hormonálními receptory ER a PR u neselektovaných invazivních karcinomů prsu. Autoři udávají, že exprese ER a PR je významně nižší v HER-2/neu pozitivních nádorech. Vlivem malignizace se snižuje přítomnost HR. Ke stejnému závěru došli Konecny a kol. (2003) u pacientek s primární rakovinou prsu – pacientky HER-2/neu pozitivní měly významně nižší hladiny ER a PR než pacientky HER-2/neu negativní. S těmito výsledky se shoduje i námi posuzovaná skupina pardubických pacientek s nespecifikovanými karcinomy prsu – HER-2/neu pozitivní pacientky byly na hormonální receptory negativní (až na jeden případ nízké positivity na ER). Tyto závěry jsou významné zejména pro léčbu, protože absolutní hladiny hormonálních receptorů jsou spojeny s reakcí na hormonální terapii.

V souvislosti se změnami exprese v časnějších stádiích malignizace (u duktálního karcinomu in situ a invazivního duktálního karcinomu) byl v zahraniční literatuře řešen HER-2/neu spolu s ER a PR. Námi nalezené studie Steinmana a kol. (2007) a Husseina a kol. (2008) se shodují ve změně exprese ER a PR v progresi karcinomu prsu.

Studie Husseina a kol. (2008) řeší navíc věkovou změnu v expresi HER-2/neu. IDC měly proti DCIS statisticky významně nižší hladiny ER a PR a vyšší stav HER-2/neu, což svědčí pro jejich horší prognózu. Pacientky po menopauze měly vyšší pozitivitu ER a PR než premenopauzální pacientky. Nadměrná exprese HER-2/neu byla nalezena pouze u pacientek před menopauzou.

V rozporu s touto studií jsou naše výsledky pardubických pacientek, u kterých jsme zaznamenali nárůst positivity HER-2/neu u starších pacientek nad padesát pět let (po menopauze). Ovšem omezením pro naši interpretaci výsledků bylo, že jsme nevěděli, o které typy karcinomů se jedná. Nicméně v námi nalezených pracích jsme nenašli další souvislosti mezi nadměrnou expresí HER-2/neu a věkem pacientek.

Hermanová a kol. (2001) srovnávali v souboru 60 pacientek s invazivním karcinomem prsu pozitivitu HER-2/neu metodou FISH a IHC. Amplifikace byla potvrzena v 13,3 % případů, nadměrná exprese se lišila v závislosti na použité metodice v rozmezí 13,3 – 28,3 %. V pardubickém souboru 56 pacientek nad 55 let s nespecifikovanými karcinomy byla nadměrná exprese potvrzena v 12,5 % případů, nicméně je zde možnost nárůstu positivity o 7,14 % případů pacientek, které měly hraniční pozitivitu na 2+, tudíž procento skutečně pozitivních pacientek na HER-2/neu je třeba ověřit (jak mimo jiné doporučuje i Hermanová a kol.) pomocí FISH.

Vliv neoadjuvantní terapie na nádorové charakteristiky byl zkoumán Adamsem a kol. (2008). Z klíčových slov abstraktu se domníváme, že šlo o taxanovou terapii docetaxelem. Z rozdílů mezi vzorky před a po terapii bylo významné snížení počtu mitóz. U pacientek, u kterých byl znám stav HER-2/neu a hormonálních receptorů, byla po přijetí neoadjuvantní terapie zvýšena exprese HER-2/neu, zatímco stav HR se významně nezměnil. Autoři ale uvádějí, že omezením pro tyto výsledky mohl být malý objem vzorku.

V zahraniční literatuře jsme dále narazili na nové možnosti léčby HER-2/neu pozitivních nádorů (např. vakcína E75), které jsou ale ještě předmětem dalšího zkoumání.

7. ZÁVĚR

V české a zahraniční dostupné literatuře jsme vyhledali a utřídili práce týkající se markeru HER-2/neu obecně a ve vztahu ke karcinomu prsu. Dále jsme se pokusili načerpat z internetových databází další zajímavé prameny v souvislosti s HER-2/neu.

Z výsledků námi prezentovaných studií je patrné, že stanovení HER-2/neu 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 extracelulární domény HER-2/neu v séru pro monitorování pacientek s metastazující rakovinou prsu a dále na možnost změny exprese HER-2/neu v průběhu onemocnění. Výsledky některých studií jsme porovnali s námi zpracovanými výsledky pacientek z Pardubické krajské nemocnice.

8. SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-----------|---|
| aCGH | array komparativní genomová hybridizace |
| ADH | atypická duktální hyperplázie |
| BRCA | breast cancer gene 1 |
| BTC | betacellulin |
| CA | carbohydrate antigen |
| CEA | karcinoembryonální antigen |
| CISH | chromogenní in situ hybridizace |
| CK | cytokeratin |
| ckit | transmembránový receptor s tyrozinkinázovou aktivitou |
| CR | kompletní odpověď (complete response) |
| ČSKB | Česká společnost klinické biochemie |
| ČLS JEP | Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně |
| DCIS | duktální karcinom in situ |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| ECD | extracelulární doména |
| EGF | epidermální růstový faktor |
| EGFR | receptor pro epidermální růstový faktor (erbB1, HER-1) |
| EIA | enzymoimunoanalýza |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EPR | epiregulin |
| ER | estrogenový receptor |
| erbB1 | receptor pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR, HER-1) |
| erbB2 | receptor pro epidermální růstový faktor 2 (HER-2/neu) |
| erbB3 | receptor pro epidermální růstový faktor 3 (HER-3) |
| erbB4 | receptor pro epidermální růstový faktor 4 (HER-4) |
| FISH | fluorescenční in situ hybridizace |
| HB-EGF | heparin vázající epidermální růstový faktor |
| HER-1 | receptor pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR, erbB1) |
| HER-2/neu | receptor pro epidermální růstový faktor 2 (erbB2) |
| HER-3 | receptor pro epidermální růstový faktor 3 (erbB3) |
| HER-4 | receptor pro epidermální růstový faktor 4 (erbB4) |
| HR | hormonální receptory |

| | |
|---------|---|
| IDC | invazivní ductální karcinom |
| IHC | imunohistochemie |
| JAK | Janus kinasa |
| Ki-67 | proliferační marker |
| MAPK | mitogenem aktivované proteinkinázy |
| MOÚ | Masarykův onkologický ústav |
| NRG | neuregulin |
| OS | celkové přežití (overall survival) |
| PaR | částečná odpověď (partial response) |
| PI3K | fosfoinositid-3 kinázy |
| PR | progesteronový receptor |
| RR | léčebná odpověď (response rate) |
| RT-PCR | reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce |
| SD | stabilní onemocnění (stable disease) |
| S_HER-2 | sérový HER-2/neu |
| Skp2 | gen pro ubikvitin ligázu |
| STAT | signální transducery a aktivátory transkripce |
| TDLU | terminální ductulární lobulární jednotka |
| TGF | transformující růstový faktor |
| TTP | čas do progrese onemocnění (time to progression) |
| WNT | spojení názvů dvou genů: Wg (wingless) a INT geny |
| (+) | pozitivní |
| (-) | negativní |

9. LITERATURA

ADAMS A.L., ELTOUM I., KRONTIRAS H., WANG W., CHHIENG D.C.: The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and Her2/neu status in breast carcinoma. *Breast Journal*, 14(2): p. 141-146, 2008

ALBERTS B. a spol.: *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing Ústí nad Labem, p. 505-507, 2005

BROWN P.H., SUBBARAMAIAH K., SALMON A.P., BAKER R., NEWMAN R.A., YANG P., ZHOU X.K., BISSONNETTE R.P., DANNENBERG A.J., HOWE L.R.: Combination chemoprevention of HER-2/neu-induced breast cancer using a cyclooxygenase-2 inhibitor and a retinoid X receptor-selective retinoid. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2008 Aug, 1(3): p. 208-214, 2008

CINEK P., FILIP S.: Membránový receptor HER-2/neu – struktura a funkce, prognostický a prediktivní význam pro pacientky s invazivním karcinomem prsu. *Vojenské zdravotnické listy ročník LXXVI č. 6*, p.211-215, 2007

DESMEDT C., SPERINDE J., PIETTE F., HUANG W., JIN X., TAN Y., DURBECQ V., LARSIMONT D., GIULIANI R., CHAPPEY C., BUYSE M., WINSLOW J., PICCART M., SOTIRIOU C., PETROPOULOS C., BATES M.: Quantitation of HER2 expression or HER2:HER2 dimers and differential survival in a cohort of metastatic breast cancer patients carefully selected for trastuzumab treatment primarily by FISH. *Diagn Mol Pathol*. 2009 Mar, 18(1): p. 22-29, 2009

FEHM T., BECKER S., DUERR-STOERZER S., SOTLAR K., MUELLER V., WALLWIENER D., LANE N., SOLOMAYER E., UHR J.: Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. *Breast Cancer Research*, 9(5): p. R74, 2007

FROGNE T., LAENKHOLM A.V., LYG M.B., HENRIKSEN K.L., LYKKESFELDT A.E.: Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor positive tumors. *Breast Cancer Res*. 2009 Feb, 11(1): R11, 2009

GAROUFALI A., KYRIAKOU F., KOUNTOURAKIS P., YIOTI I., MALLIOU S., NIKAKI A., KARDARA E., FRANGOS I., KOUMNA S., BAZIOTIS N., SCORILAS A., ARDAVANIS A.: Extracellular domain of HER2: a useful marker for the initial work-up and follow-up of HER2-positive breast cancer. *J Buon*. 2008 Jul-Sep, 13(3): p. 409-413, 2008

HAJDÚCH M., TROJANEC R., NOSKOVÁ V., DŽUBÁK P., KOLÁŘ Z., ŠPAČKOVÁ K., ŠKARDA J., DUŠEK L., BOUCHAL J., VYDRA D., CWIERTKA K., ŽALOUDÍK J., MIHÁL V.: Racionální individualizace protinádorové léčby – molekulární, buněčné a klinické aspekty. *Edukační sborník 2003*, p.136-147, 2003

HERMANOVÁ M., NENUTIL R., KROUPOVÁ I., BRÁZDIL J., LUKÁŠOVÁ E., KOZUBEK S.: Amplifikace a overexprese HER-2/neu v invazivních karcinomech prsu: Srovnávací analýza metod imunohistochemických a fluorescenční in situ hybridizace. *Klinická onkologie* 14 5/2001, p. 157-162, 2001

HUBÁČKOVÁ M., VACLAVÍKOVÁ R., KUBALA E., KODET R., MRHALOVÁ M., NOVOTNÝ J., VRÁNA D., GUT I., SOUČEK P.: Úloha exprese genů chinonoxireduktázy 1 a 2 v rozvoji karcinomu prsu. *Klinická onkologie* 20 5/2007, p. 335-339, 2007

HUSSEIN M.R., ABD-ELWAHED S.R., ABDULWAHED A.R.: Alterations of estrogen receptors, progesterone receptors and c-erbB2 oncogene protein expression in ductal carcinomas of the breast. *Cell Biol Int.* 2008 Jun, 32(6): p. 698-707, 2008

CHANG J., POWLES T.J., ALLRED D.C., ASHLEY S.E., CLARK G.M., MAKRIS A., ASSERSOHN 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

CHO H.S. et al.: The Herceptin molecule. *Nature* 2003, 421: p. 756-760, 2003

JANKŮ F., SROVNAL J., KOŘÍNKOVÁ G., PETRUŽELKA L., MATOUŠ B., HAJDÚCH M.: Detekce minimální residuální choroby v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu technikou kvantitativní RT-PCR v reálném čase pro karcinoembryonální antigen. *Klinická onkologie* 19 1/2006, p. 15-18, 2006

JONES R.L., SALTER J., A'HERN R., NERURKAR A., PARTON M., REIS-FILHO J.S., SMITH I.E., DOWSETT M.: Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Feb 27, 2009

KAUŠITZ J.: Rádioimunoanalýza v onkologii. VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied Bratislava, p.28, 1991

KONECNY G., PAULETTI G., PEGRAM M., UNTCH M., DANDEKAR S., AGUILAR Z., WILSON C., RONG H.M., BAUERFEIND I., FELBER M., WANG H.J., BERYT M., SESHADRI R., HEPP H., SLAMON D.J.: Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jan, 95(2): p. 142-153, 2003

LAL P., TAN L.K., CHEN B.: Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2005 Apr, 123(4): p. 541-546, 2005

LEBEAU A., UNHOLZER A., AMANN G., KRONAWITTER M., BAUERFEIND I., SENDELHOFERT A., IFF A., LÖHRS U.: EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 May, 79(2): p. 187-198, 2003

LUDOVINI V., GORI S., COLOZZA M., PISTOLA L., RULLI E., FLORIANI I., PACIFICO E., TOFANETTI F.R., SIDONI A., BASURTO C., RULLI A., CRINÒ L.: Evaluation of serum HER2 extracellular domain (ECD-HER2) in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Ann Oncol.* 2008 May, 19(5): p. 883-890, 2008

MARCHIÒ C., NATRAJAN R., SHIU K.K., LAMBROS M.B., RODRIGUEZ-PINILLA S.M., TAN D.S., LORD C.J., HUNGERMANN D., FENWICK K., TAMBER N., MACKAY A., PALACIOS J., SAPINO A., BUERGER H., ASHWORTH A., REIS-FILHO J.S.: The genomic profile of HER2-amplified breast cancers: the influence of ER status. *J Pathol.* 2008 Dec, 216(4): p. 399-407, 2008

MASOPUST J.: Nádorové markery včera, dnes a zítra (2. část)
<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0304/markery.pdf> 6.2.2009

MASOPUST J., BARTŮŇKOVÁ J., GOETZ P., CHROMÝ V., JABOR A., JIRÁSEK J.E., MAREŠ J., PALIČKA V., PELOUCH V., PRŮŠA R., ŠTERN P., ZIMA T.: Patobiochemie buňky. 2. lékařská fakulta UK, Praha 2003,
https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1469.html 27.1.2009

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): p. 1105-1112, 2007

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

PALÁCOVÁ M.: Novinky v léčbě karcinomu prsu. *Onkologie* 2008, 2(1): p. 49-52, 2008

PALIČKA V., ŽIVNÝ P.: Glukokortikoidy indukovaná osteoporóza. *Remedia* 5/2007
<http://www.remedia.cz/clanek.php?unit = 29022&parent = 100001&action> 26.1.2009

PEOPLES G.E., HOLMES J.P., HUEMAN M.T., MITTENDORF E.A., AMIN A., KHOO S., DEHQANZADA Z.A., GURNEY J.M., WOLL M.M., RYAN G.B., STORRER C.E., CRAIG D., LOANNIDES C.G., PONNIAH S.: Combined clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine for the prevention of recurrence in high-risk breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 14(3): p. 797-803, 2008

PETRÁKOVÁ K., NENUTIL R., GRELL P., FABIAN P., ZICHOVÁ I., SVOBODA M., PALÁCOVÁ M., VYZULA R.: Faktory predikující selhání adjuvantní hormonoterapie u karcinomu prsu, studované na souboru pacientek léčených tamoxifenem. *Klinická onkologie* 5/2008 21, p. 303-308, 2008

PETRUŽELKA L.: Současné možnosti a nové perspektivy systémové léčby karcinomu prsu. *Klinická farmakologie a farmacie* 2007, 21(3-4): p. 103-113, 2007

REGITNIG P., SCHIPPINGER W., LINDBAUER M., SAMONIGG H., LAX S.F.: Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol.* 2004 Aug, 203(4): p. 918-926, 2004

SCHULZ W.A.: *Molecular Biology of human cancers.* Springer Netherlands, p.373-378, 2005

SIGMA-ALDRICH: Fluorescenční in situ hybridizace.

<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic/informace-o-produktech/biochemie-a-life-science/imunoprotokoly/fluorescencni-in-situ-hybridizace.html> 16.12.2008

SJOGREN S., INGANAS M., LINDGREN A., HOLMBERG L., BERGH J.: Prognostic and predictive value of HER-2/neu overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 1998 Feb, 16(2): p. 462-469, 1998

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

STEINMAN S., WANG J., BOURNE P., YANG Q., TANG P.: Expression of cytokeratine markers, ER-alpha, PR, HER-2/neu, and EGFR in pure ductal carcinoma in situ (DCIS) and DCIS with co-existing invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast. *Ann Clin Lab Sci.* 2007 Spring, 37(2): p. 127-134, 2007

SVOBODA M., GRELL P., ŠIMÍČKOVÁ M., FABIAN P., PETRÁKOVÁ K., PALÁCOVÁ M., MACKOVÁ D., TROJANEC R., HAJDÚCH M., PAVLÍK T., NENUTIL

R., VYZULA R.: Výsledky retrospektivní analýzy cílené léčby metastatického karcinomu prsu trastuzumabem v MOÚ. Identifikace prediktivních faktorů. *Klinická onkologie* 6/2008 21, p. 348-358, 2008

ŠIMÍČKOVÁ M., PETRÁKOVÁ K., PECEN L., NEKULOVÁ M., FRGALA T., NENUTIL R.: Prediktivní význam sérového HER-2/neu u nemocných s karcinomem prsu léčených Herceptinem. *Klinická onkologie* 18 1/2005, p. 23-26, 2005

TANG P., WANG X., SCHIFFHAUER L., WANG J., BOURNE P., YANG Q., QUINN A., HAJDU S.: Expression patterns of ER-alpha, PR, HER-2/neu, and EGFR in different cell origin subtypes of high grade and non-high grade ductal carcinoma in situ. *Ann Clin Lab Sci.* 2006 Spring, 36(2): p. 137-143, 2006

TESAŘOVÁ P.: Farmakoterapie – trastuzumab.

www.farmakoterapie.cz/cz/ClanekTisk/872, 17.11.2008

TOVEY S.M., BROWN S., DOUGHTY J.C., MALLON E.A., COOKE T.G., EDWARDS J.: Poor survival outcomes in HER2-positive breast cancer patients with low-grade, node-negative tumours. *Br J Cancer.* 2009 Feb 17, 2009

TWYMAN R.: Herceptin (also known by its generic name trastuzumab) is a recombinant antibody used to treat advanced breast cancer. 4.2.2004
http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020938.html 9.2.2009

VON MINCKWITZ G., SINN H.P., RAAB G., LOIBL S., BLOHMER J.U., EIDTMANN H., HILFRICH J., MERKLE E., JACKISCH C., COSTA S.D., CAPUTO A., KAUFMANN M.; GERMAN BREAST GROUP.: Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2008 Apr, 10(2): R30, 2008

XU R., PERLE M.A., INGHIRAMI G., CHAN W., DELGADO Y., FEINER H.: Amplification of HER-2/neu gene in HER-2/neu overexpressing and nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant, and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol.* 2002 Feb, 15(2): p. 116-124, 2002

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)