

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni**



Obor: vnitřní nemoci

Prognostické a prediktivní faktory karcinomu prsu

Stanovení exprese mRNA vybraných genů v normální a nádorové prsní tkáni a
zhodnocení možnosti jejich využití u karcinomu prsu

Autoreferát dizertační práce

MUDr. Lucie Šefrhansová
Plzeň, 2012

Vědecká rada
Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

MUDr. Lucie Šefrhansová

Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu

Stanovení exprese mRNA vybraných genů v normální a nádorové prsní tkáni a zhodnocení
možnosti jejich využití u karcinomu prsu

Autoreferát k získání vědecké hodnosti doktora lékařských věd

Plzeň, 30. 3. 2012

Dizertační práce byla vypracována v rámci externí formy postgraduálního doktorandského studia na II. Interní klinice Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Uchazeč: MUDr. Lucie Šefrhansová

Oddělení onkologické a radioterapeutické LFUK a FN v Plzni
Alej Svobody 923/80, 323 00 Plzeň

Školitel: Doc. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D.

Onkologické a radioterapeutické oddělení LF UK a FN v Plzni

Oponenti: Doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Onkologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.

Klinika TRN Fakultní nemocnice v Plzni

MUDr. Miroslava Nekulová, CSc.

Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav

Stanovisko k dizertační práci vypracovalo vedení Onkologického a radioterapeutického oddělení

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajoby doktorských dizertací se koná dne

Místo obhajoby: **Šafránkův pavilon, posluchárna A, Alej Svobody 31, Plzeň**

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Předseda komise pro obhajoby v oboru vnitřní nemoci

1 Popis současného stavu problematiky

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen ve světě i u nás. V roce 2008 bylo v České republice diagnostikováno 67,68 případů karcinomu prsu na 100 000 žen, mortalita byla 15,98 na 100 000 žen.

Prognóza je výpověď o budoucím stavu objektivní reality. V medicíně se určení prognózy používá ke stanovení pravděpodobnosti recidivy onemocnění, generalizace onemocnění, úmrtí či úplného uzdravení nemocného. Klinicky použitelný prognostický faktor by měl splňovat následující podmínky: jednoduché a dostupné stanovení, spolehlivost a prognosticky statistická významnost – nezávislý prognostický faktor, konečná informace musí přinášet prospěch pro nemocného. Z pohledu klinické praxe je uznáváno a přijato rozdělení prognostických faktorů u karcinomu prsu dle konsenzu v St. Gallen z roku 2007 viz tabulka.

Tabulka Prognostické faktory podle konsenzu ze St. Gallen 2007

Prognostický faktor	Nízké riziko	Střední riziko		Vysoké riziko	
N	N0 a všechna následující kritéria	N0 a alespoň jedno z následujících kritérií	N 1 – 3 a všechna následující kritéria	N1 – 3 a všechna následující kritéria	N≥4
pT	pT ≤ 2cm	pT > 2cm	-	-	-
Grade	G1	G2 – 3	-	-	-
ER, PR	ER+ a/nebo PR+	ER- a PR-	ER+ a/nebo PR+	ER- a PR-	-
HER-2	HER-2 -	HER-2+	HER-2 -	HER-2+	-
Věk	≥ 35 let	věk < 35 let	-	-	-
PVI	Bez	Malá	rozsáhlá		

N – postižení mizních uzlin, pT – velikost nádoru, ER – estrogenový receptor, PR- progesteronový receptor, PVI – perivaskulární invaze

Dle konsenzu ze St. Gallen z roku 2009 je výše uvedené rozdělení zahrnuto v doporučení při rozhodování o adjuvantní léčbě karcinomu prsu s prokázanou

pozitivní expresí estrogenového a/nebo progesteronového receptoru a s negativní expresí HER-2 receptoru a dostalo se tak do klinické praxe.

Predikce je odhad budoucí skutečnosti opřený o vědeckou hypotézu nebo teorii. V medicíně prediktivní údaje slouží k odhadu úspěšnosti léčby a zvolení optimálního léčebného postupu. Nalezením vhodných prediktivních faktorů a jejich jednoduchá následná interpretace by byla velkým přínosem v klinické praxi při léčbě karcinomu prsu a vedla by k léčbě šitě tzv. na míru. Nedochozelo by k podávání velice náročné léčby nemocným, které by z ní neprofitovali a naopak. V praxi užívaným a jasně definovaným prediktivním faktorem je exprese hormonálních receptorů a exprese HER-2 receptoru. Velké úsilí k určení dobrého prediktivního faktoru v posledních letech a uplatnění individualizované terapie není úspěšné.

Velikost nádoru je jedním z nejvýznamnějších prognostických faktorů karcinomu prsu. Některými autory je udávána na prvním místě, jiní ji řadí na místo druhé a jako silnější prognostický faktor udávají postižení mízních uzlin. Ukazuje se, že vliv velikosti tumoru na další prognózu bude hrát největší roli do jednoho centimetru. Pro nemocné bez postižení mízních uzlin zůstává velikost nádoru nejvýznamnějším prognostickým faktorem. Tyto mají riziko desetiletého přežití při velikosti tumoru do 1 cm 91% oproti 83% při velikosti 1 až 2 cm.

Diskutovaným tématem jsou nádory o velikosti do jednoho centimetru včetně, bez postižení lymfatických uzlin a pozitivitou HER-2. Tyto jsou agresivnější a mají horší prognózu přežití než nádory stejné velikosti s negativitou HER-2. Proto ČOS doporučuje u pacientek do 0,5 cm, bez postižení uzlin a triplepozitivních pouze hormonální léčbu. Kdežto u pacientek s velikostí nádoru od 0,5 do 1cm, bez postižení uzlin a triplepozitivních doporučuje ČOS zvážit léčbu transtuzumabem.

Metastatické postižení uzlin je nejsilnějším prognostickým faktorem přežití a lokální recidivy u nemocných s karcinomem prsu. Nemocné bez postižení lymfatických uzlin mají pravděpodobnost desetiletého přežití 75%, při jejich postižení je to jen 25 až 30%. S počtem postižených uzlin dochází k postupnému zhoršování prognózy. Nemocné s postiženou jednou uzlinou mají přežití blízké těm bez postižení, při postižení více jak čtyř uzlin je pětileté přežití těchto žen okolo 62%. Riziko lokální recidivy koreluje s počtem postižených uzlin.

Mezi **histologické typy** karcinomu prsu s dobrou prognózou patří tubulární invazivní karcinom, kribriformní invazivní karcinom, adenoidně cystický a mucinózní karcinom. Někdy k nim bývá zařazen tubulolobulární a papilární karcinom. Prognóza medulárního karcinomu je sporná.

Stupeň diferenciacie nádorových buněk určený podle kritérií UICC je nezávislým prognostickým faktorem. Desetileté přežití nemocné s nádorem G1 je 85% oproti 45% u nemocných s nádorem G3. Ve studii Hensona je desetileté přežití nemocné s nádorem G1 90% oproti 53% u nemocných s nádorem G3.

Věk je výrazným prognostickým faktorem. V roce 2003 byl na základě konsenzu ze St. Gallen zařazen věk do 35 let mezi nezávislé rizikové a prognostické faktory karcinomu prsu. V tomto věku se jedná většinou o nádory biologicky agresivní, s vysokou mitotickou aktivitou, vaskulární a lymfatickou invazí, s četnějším zastoupením negativní exprese hormonálních receptorů a špatnou prognózou. Od tohoto roku je věk nezastupitelným kritériem v rozdělení nemocných do rizikových prognostických skupin s následnou volbou adekvátní léčby.

Invaze nádorových buněk v krevních a/nebo lymfatických cévách je popisována patologií u 22,8% karcinomů prsu. Přítomnost **perivaskulární invaze** signifikantně zvyšuje riziko vzniku lokoregionální rekurence, je spojena s nižším celkovým přežitím i kratším intervalem do progresu. Koreluje s velikostí tumoru, diferenciací nádoru, typem, postižením uzlin, rozvojem vzdálených metastáz a špatnou prognózou. Jedná se o nezávislý prognostický faktor, který byl do managementu léčby karcinomu prsu zařazen v roce 2007. Jako příklad lze uvést studii Bettleheima a spol. V této studii byl zjištěn vznik lokální recidivy u nemocných po lokální excizi nádoru a s popsanou vaskulární invazí v 44% oproti 33% recidiv vzniklých u nemocných po lokální excizi nádoru bez vaskulární invaze. Tento rozdíl byl větší u nemocných, kteří podstoupily totální mastektomii (27% vs. 53%) Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl v délce bezpříznakového období i přežití.

V roce 2007 bylo přijato Americkou onkologickou společností doporučení použití **nádorových markerů** u karcinomu prsu. Jednalo se o aktualizaci z roku 2000. Shrnutí tohoto doporučení uvádí tabulka níže. Do konce roku 2011 nebylo toto doporučení revidováno.

Tabulka Doporučení ASCO 2007

Marker	Doporučení ASCO 2007
DOPORUČENO	
Estrogenové a progesteronové receptory	Estrogenové a progesteronové receptory by měly být stanoveny u každého primárního invazivního karcinomu prsu. Dále je možné stanovení z metastatických lézí, pokud by výsledek ovlivnil plánovanou léčbu.
	Estrogenové i progesteronové receptory by měly být stanoveny u pre i postmenopauzálních žen, aby bylo možné identifikovat pacientky, které budou nejlépe profitovat z endokrinní terapie.
	U pacientek s DCIS není doporučeno běžné stanovení estrogenových a progesteronových receptorů pro nedostatek dat.
HER-2	HER-2 exprese a/nebo amplifikace by měla být stanovena u každého primárního invazivního karcinomu prsu, buď v době stanovení diagnózy nebo v době rekurence jako vodičko

	volby léčby transtuzumabem.
Senzitivita k anti HER-2 léčbě	Vysoké hladiny HER-2 exprese či amplifikace by měly být použity k identifikaci nemocných, pro které je užití transtuzumabu výhodou.
Přínos HER-2 jako prediktora léčebné odpovědi	Je navrženo použít antracykliny v léčbě HER-2 pozitivního karcinomu prsu – HER2 3+, FISH>2,0 za předpokladu, že nejsou přítomny její kontraindikace.
uPA a PAI	uPA/PAI-1 měřené pomocí enzymatické imunoabsorpční analýzy (ELISA) ze vzorku 300 mg zmrazené tkáně karcinomu prsu lze použít ke stanovení prognózy u pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem prsu s negativním postižením uzlin.
	Nízké hladiny obou markerů jsou spojovány s nízkým rizikem návratnosti nemoci, zvláště u hormonálně pozitivních pacientek, které jsou léčeny hormonální terapií a přidání chemoterapie pro ně znamená minimální benefit. U pacientek s vysokými hladinami obou markerů znamená přidání CMF adjuvantní chemoterapie značný benefit oproti observaci.
Multiparametrová analýza genové exprese karcinomu prsu	U nově diagnostikovaných pacientek s estrogenpozitivním karcinomem prsu, bez postižení mízních uzlin může být použita Oncotype DX analýza k predikci rizika návratnosti nemoci při léčbě tamoxifenem.
	Užití ostatních analýz jako MammaPrint, Rotterdam Signature, Breast Cancer Gene Expression Ratio jsou předmětem výzkumu.
CA 15-3 a CA 27.9	Tyto markery jsou doporučeny k monitoraci pacientů s metastatickým onemocněním v průběhu terapie. Mají být použita ve spojení s běžnými diagnostickými metodami. Jejich samotné užití jako markeru odpovědi na léčbu se nedoporučuje. Zvýšení CA 15-3 a CA 27.29 může být použito jako indikátor selhání terapie u špatně měřitelného onemocnění. Je třeba být obezřetný při interpretaci zvyšujících se hladin těchto markerů v prvních 4-6 týdnech léčby.
CEA	Doporučeno k monitoraci pacientů s metastatickým onemocněním v průběhu terapie. Má být použito ve spojení s běžnými diagnostickými metodami. Samotné užití CEA jako markeru odpovědi na léčbu se nedoporučuje. Zvýšení CEA může být použito jako indikátor selhání terapie u špatně měřitelného onemocnění. Je třeba být obezřetný při interpretaci zvyšujících se hladin CEA v prvních 4-6 týdnech léčby, protože může dojít k falešnému časnému nárůstu

	hladin.
NEDOPORUČENO	
HER-2	Použití HER-2 k definici prognózy u časného karcinomu prsu není doporučeno
	Komise nedoporučuje použít HER-2 jako ukazatel pro adjuvantní léčbu taxany.
CEA, CA 15-3 a CA 27.29	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné doporučit tyto markery k určení diagnózy, screeningu nebo monitorování návratnosti nemoci.
Markery proliferace	Stávající data nestačí k doporučení měření Ki-67, cyclinu D, cyclinu E, p27, p21, thymidinkinázy, topoisomerázy II a dalších markerů proliferace
Cathepsin D	Stávající data nestačí k doporučení měření cathepsinu D při léčbě karcinomu prsu
Cyclin E	Stávající data nestačí k doporučení měření celého cyclinu E nebo jeho fragmentů při léčbě karcinomu prsu
Proteomická analýza	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné doporučit použití protetické analýzy při léčbě pacientek s karcinomem prsu.
P53	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné doporučit použití p53 jako markeru při léčbě pacientek s karcinomem prsu.
Mikrometastázy v kostní dřeni jako marker karcinomu prsu	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné použít hodnocení mikrometastáz v kostní dřeni jako markeru při léčbě pacientek s karcinomem prsu.
Cirkulující nádorové buňky (CTC) jako marker karcinomu prsu	Testování CTC by nemělo být použito při diagnóze karcinomu prsu nebo k ovlivnění léčebných rozhodnutí.

Estrogenové receptory (ER) a progesteronové receptory (PR)

Estrogenové i progesteronové receptory je možné stanovovat imunohistochemicky, pomocí ELISA či ligand saturační analýzou. Rozlišení alfa či beta varianty není při hodnocení zatím nijak zohledňováno. Podle doporučení ASCO i ČOS mají být hormonální receptory vyšetřeny u každého primárního nádoru karcinomu prsu a mohou být vyšetřeny i z metastatických lézí, pokud výsledek ovlivní následnou terapii.

Stav hormonálních receptorů v nádorové tkáni prsu je nejvýznamnějším prognostickým i prediktivním faktorem. 75% karcinomů prsu je estrogen pozitivních a z těchto nádorů je 65% současně progesteron pozitivních. Pozitivita

progesteronových receptorů při negativitě estrogenových se vyskytuje v 5%. Stav estrogenových receptorů určuje bezpříznakové období i čas do progresu. Nemocní s karcinomem estrogen pozitivním a/nebo progesteron pozitivním karcinomem prsu mají nižší riziko úmrtí oproti nemocným estrogen a/nebo progesteron negativním. Estrogen a progesteron negativní nádory jsou klinicky agresivnější, jedná se o nádory málo diferencované, s vysokou mitotickou aktivitou, častější návratností a kratším přežitím. Hormonálně negativní nádory se vyskytují častěji u premenopauzálních žen.

Nejdůležitější úloha stanovení positivity receptorů v klinické praxi je jejich prediktivní hodnota ve vztahu k endokrinní léčbě. Šedesát procent estrogen pozitivních nemocných odpoví na hormonální léčbu. Při pozitivitě estrogenových i progesteronových receptorů se tato odpověď zvýší na 70-75%.

HER-2 receptor

Stanovení exprese HER-2 receptoru se stalo již součástí vyšetřovacího protokolu u karcinomu prsu, stejně tak podání jeho inhibitoru transtuzumabu ve všech liniích léčby karcinomu prsu. Z dalších biologických léčiv působících prostřednictvím nejen HER-2 receptoru jsou lapatinib, neratinib a konjugát transtuzumab entamsine.

HER-2 receptor patří do rodiny tyrosinkinázových receptorů pro epidermální růstové faktory. Po navázání ligandu na extracelulární část receptoru dochází k dimerizaci receptorů a tvorbě heterodimerů či homodimerů, následné fosforylaci obou jednotek a iniciaci signální kaskády, jejímž výsledkem je stimulace proliferčních a antiapoptotických dějů. Spouštěcím mechanismem může být i receptorová dimerizace bez navázání ligandu. Receptor HER-2 má klíčovou úlohu pro signální přenos v buňkách karcinomu prsu. Zvýšeně je exprimován u 20 – 30% invazivních karcinomů prsu. Výsledky studie MAGISTER, která probíhá v České republice, ukazují, že zvýšená exprese HER-2 je u 12,5% nádorů prsu. Stanovení exprese HER-2 dle doporučení ČLS JEP musí být provedeno u všech nemocných s nově diagnostikovaným karcinomem prsu imunohistochemicky v referenční laboratoři. Jako pozitivní se hodnotí imunochemické hodnocení 3+ a u fluorescenční in situ hybridizace je to více než šest HER-2 genových kopií na jádro, nebo poměr FISH větší než 2,0. Za negativní jsou považovány vzorky IHC 0 a 1+, či FISH méně jak čtyři genové kopie na jádro nebo FISH poměr menší než 2,0. Stav HER-2 u nemocných s karcinomem prsu je zkoumán z několika pohledů prognózy a predikce. Z dostupných poznatků bylo však použito zvýšené exprese/amplifikace HER-2 doporučeno ASCO zatím jen pro predikci účinku transtuzumabu. Komise připouští též možnost použití stanovení HER-2 při léčbě lapatinibem v budoucnosti.

uPA, PAI

uPA je serinová proteáza o velikosti 45 kD, která přeměňuje plasminogen na aktivní plasmin a tím rozpouští komponenty extracelulární matrix jako je laminin, fibronectin a fibrin. Plasmin degraduje extracelulární matrix také nepřímým prostřednictvím metaloproteináz (MMP-3, -9, -12 a -13) uPA je inhibován prostřednictvím PAI-1 (inhibitor plasminogen aktivátoru 1), PAI-2 a maspinu. PAI-1

je považován za hlavního inhibitora uPA. Kromě tvorby komplexů s uPA má PAI-1 schopnost prostřednictvím vazby na vibronectin ovlivňovat buněčnou adhezi a migraci buněk.

Oba dva proteiny se podílejí na nádorové invazivitě a metastazování. UPA je schopný stimulovat angiogenezi, migraci buněk a jejich adhezi, inhibuje apoptózu. PAI-1 moduluje buněčnou adhezi, stimuluje buněčnou proliferaci a angiogenezi.

Ke stanovení míry exprese těchto proteinů v tkáni je doporučeno stanovení pomocí ELISA z 300mg čerstvé nebo zmražené tkáně. Tato metoda je dostatečně robustní a umožnila provedení studií velkých studií, jejichž výsledky vedly až k doporučení těchto dvou markerů ASCO ke stanovení prognózy u nemocných s karcinomem prsu bez postižení lymfatických uzlin. Nízké hladiny těchto markerů u výše definovaných nemocných jsou spojeny s velice nízkým rizikem návratnosti nemoci a chemoterapie jim nepřináší větší benefit, na druhou stranu, nemocné s vysokými hladinami obou těchto markerů mají benefit z chemoterapie CMF oproti nemocným bez ní.

První randomizovaná prospektivní studie, která rozdělila nemocné s karcinomem prsu bez postižení mízních uzlin na základě hladin uPA/PAI-1 byla publikována v roce 2001. Nemocné, jejichž nádor vykazoval nízké hladiny uPA/PAI, nebyly léčeny chemoterapií. Nemocné, jejichž nádor vykazoval vysoké hladiny markerů, byly dále náhodně rozděleny do dvou ramen s a bez adjuvantní chemoterapie. Skupina s nízkými hladinami uPA/PAI-1 měla tříleté riziko návratnosti nemoci 6,7%, skupina s vysokými hladinami uPA/PAI-1 bez chemoterapie měla toto riziko dvojnásobné. V poslední skupině bylo toto riziko téměř poloviční oproti skupině bez chemoterapie.

Multiparametrová analýza genové exprese karcinomu prsu

U karcinomu prsu jsou zatím nejlépe ověřeny dva testy, a to OncotypeDX a Mammaprint.

OncotypeDX je RT-PCR analýza, která měří expresi 21 genů (16 s nádorem asociovaných a pět kontrolních). Exprese vybraných genů je definována matematickým algoritmem, který stanoví Recurrence Score (RS) a na jeho základě jsou vybráni pacienti s nízkým (RS < 18), středním a vysokým rizikem (RS > 31) návratnosti nemoci.

Tato analýza byla vyvinuta pro nemocné s estrogen-pozitivním, časným karcinomem prsu, aby umožnila vybrat nemocné, které by profitovaly z přidání chemoterapie k hormonální léčbě. Retrospektivní analýza vzorků nádorů prsu pacientů ze studie NSABP B-20 potvrdila, že nemocní s vysokým RS mají větší benefit z přidání chemoterapie CMF oproti nemocným se středním a nízkým rizikem. Dále bylo toto tvrzení ověřeno na vzorcích nemocných ze studie NSABP B-14, kde nemocní s nízkým RS měli riziko vzniku distálních metastáz 6,8% oproti nemocným s vysokým RS, kde toto riziko bylo 30,5%. Studie udává test jako nezávislý prognostický faktor návratnosti onemocnění a přežití. Studie Kaiser Permanente potvrdila, že OncotypeDX pomáhá predikovat pravděpodobnost

desetiletého přežití u žen s karcinomem prsu. V poslední velké studii SWOG 8814 provedené na vzorcích nádorové tkáně u postmenopauzálních nemocných s hormonálně pozitivním karcinomem prsu a postižením lymfatických uzlin bylo potvrzena prognostická hodnota testu i u těchto nemocných. Pravděpodobnost desetiletého období bez nemoci bylo 60% u nemocných s nízkým RS, 49% se středním RS a 43% u nemocných s vysokým RS v rameni nemocných léčených pouze tamoxifenem. Všechna tato data čekají na další ověření ve studii OncotypeDX TAILORx TRIAL. Výsledky této studie budou uveřejněny v roce 2014.

MammaPrint měří expresi 70 genů podílejících se na regulaci proliferace, metastazování, angiogenezi. Tento test byl navržen pomocí validačních studií tak, aby dokázal odlišit nemocné s vysokým rizikem vzniku metastáz v prvních pěti letech od diagnózy. Výsledkem testu je rozdělení nemocných do dvou skupin – s vysokým a nízkým rizikem vzniku metastáz. Nemocné s výsledkem vysokého rizika mají 29% šanci, že dojde k návratu nemoci do deseti let bez adjuvantní léčby. Nemocné s výsledkem nízkého rizika mají 10% šanci návratnosti nemoci do deseti let. Velké multicentrické studie k ověření prognostické hodnoty testu, prediktivní hodnoty ve vztahu k chemoterapeutickým režimům, hormonální léčbě právě probíhají (MINDACT). Dále jsou zkoumány možnosti predikce odpovědi na neoadjuvantní terapii ve spojení s dalšími testy (MINT, NBRST).

CTC Cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumor Cells)

Bylo publikováno více jak čtyři stovky studií, které se zabývali možností využití detekce cirkulujících nádorových buněk v managementu léčby karcinomu prsu. Hlavním cílem těchto studií je zjištění prognostické hodnoty CTC u nemocných s lokalizovaným a metastatickým onemocněním, dále možnost využití detekce CTC při terapeutickém rozhodování a při monitoringu účinnosti léčby. Na základě těchto studií byla zahájena prospektivní studie (SWOG protokol SO500), ve které nemocné s metastatickým karcinomem prsu a se zvýšenými CTC po prvním cyklu chemoterapie budou buď pokračovat ve stávající chemoterapii do klinických známek progresu nebo budou převedeny na jinou chemoterapii opět do klinických známek progresu. Použití výsledků detekce cirkulujících nádorových buněk v praxi se nejspíše nestane standardem, ale na tento závěr je třeba si počkat do provedení prospektivních studií s jednotným laboratorním a dostatečně validním stanovením.

Markery proliferační aktivity

Mezi markery proliferační aktivity patří mitotický index, Ki67 index, stanovení cyklinu D, E, p21, p27, thymidinkinázy, topoisomerázy II α . Použití těchto markerů k určení prognózy nemocných s karcinomem prsu nebylo zatím ASCO doporučeno.

Po rozdělení nádorů podle na základě genového expresního modelu došlo k publikování studií zabývajících se vztahem klasických prognostických markerů a molekulárně biologického typu nádoru. Na jejich základě bylo rozhodnuto a doporučeno ČOS, že pomocí markerů jako je exprese ER, PR, HER-2 a hodnota mitotického indexu, popř. indexu Ki67, je možné rozlišit tyto subtypy a to následovně (39).

Luminální typ A Ki67	- ER+ a/nebo PR+, HER-2-, G menší než 3, nízký index
Luminální typ B Ki67	- ER+ a /nebo PR+, HER-2-, G větší než 1, vysoký index
Luminální typ B (HER-2+)	- ER+ a /nebo PR+, HER-2+
Her-2 pozitivní (neluminální)	- ER,PR negativní, Her-2+
Triple negativní	- ER,PR, HER-2 negativní

Ve studii Chaenga a spol., kde byla zkoumána možnost použití Ki67 indexu k rozlišení luminálního typu B karcinomu prsu, jako nejlepší cut off hodnotu našli hodnotu Ki67 indexu 13,25% (72% senzitivita, 77% specifická) (92).

Katepsin D

Role u karcinomu prsu je zkoumána již od roku 1978, ale výsledky studií nejsou zatím přesvědčivé a katepsin D zatím nebyl uznán jako prognostický či prediktivní marker u karcinomu prsu. Jeho vyšší exprese v nádorech prsu bude nejspíše souviset s nově popsanou úlohou v tukové tkáni prsu. Vezmeme-li v úvahu, že nádory prsu vznikají nejvíce ze žlázové části prsu, budou výsledky ve vztahu k prognóze u karcinomu prsu spíše falešně pozitivní a bude třeba se zaměřit na výzkum biologické funkce této proteázy.

Mikrometastázy kostní dřevě

Prognostická hodnota přítomnosti mikrometastáz karcinomu prsu v kostní dřevě jako markeru horšího přežití a vyššího rizika návratnosti nemoci je diskutabilní pro malé soubory nemocných a statistické hodnocení jednotlivých studií. Studie zabývající se tímto tématem mají vysoké procento falešně pozitivních výsledků. U 1 - 2% populace jsou detekovány epiteliální buňky v kostní dřevě. Pouze u 30 – 50% nemocných s mikrometastázami karcinomu prsu v kostní dřevě se vyvine klinicky jasný karcinom prsu v průběhu pěti až deseti let. Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné použít hodnocení mikrometastáz v kostní dřevě jako markeru při léčbě pacientek s karcinomem prsu.

P53 (Protein 53), TP 53

Protein 53 je kódován genem TP53, lokalizovaným na krátkém raménku 17. chromozomu (17p13.1). Celková délka genu je 20 000 bp. Jeho produktem je protein složený z 393 aminokyselin. V dnešní době je známo již 30 500 mutací tohoto genu, které jsou popisovány ve vztahu s nádorovým bujením. Porucha regulační funkce p53 byla popsána u mnoha nádorů. Jedná se o jednu z nejvýznamnějších molekul regulace buněčného cyklu. Důležitou roli v karcinogenezi hrají mutace v genu TP53. 80 až 90% těchto mutací bylo nalezeno v DNA vazebné doméně. Mutace v této oblasti zabraňují vazbě p53 na DNA a znemožňují následnou regulaci transkripce cílových genů. Mutace p53 byly popsány téměř u všech typů nádorů. Mutaci TP53 vykazuje 20 – 35% nádorů karcinomu prsu. Buňky s mutovaným TP53 vykazují změny fenotypu jako je zvýšený nádorový

potenciál, růst, aktivace proangiogenních faktorů, větší odolnost vůči radioterapii a chemoterapii. Vrozená mutace je ze 70% zodpovědná za rozvoj autozomálně dominantního Li - Fraumeniho syndromu. BRCA nádory jsou spojovány s větším výskytem mutací TP53 oproti sporadickému výskytu. U nádorů BRCA-1 se dále uvažuje o interakci mezi p53 a BRCA-1 genem.

Rozdělíme-li nádory prsu na základě genového expresního modelu, vyskytují se mutace TP53 častěji u bazaloidního (82%) a HER-2 typu (71%) oproti lumenálnímu (31%). V metaanalýze zahrnující 3 500 nemocných s karcinomem prsu je potvrzeno horší přežití a kratší období bez známek nemoci nemocných s mutacemi TP53. Riziko úmrtí je dvakrát větší u nemocných s jakkoliv pokrčilým karcinomem prsu, u nemocných s postižením uzlin toto riziko vzrostlo na 2,6. Nemocné bez postižení mízních uzlin a s prokázanou mutací TP53 mají riziko úmrtí 1,7 krát větší. Vztah přítomnosti mutovaného TP53 v nádorové tkáni a odpovědi na léčbu je předmětem studií od jeho objevení. Výsledky studií ukazují, že nemocné s TP53 mutovaným karcinomem prsu jsou rezistentnější k léčbě fluorouracilem, docetaxelem, mitomycinem C, epirubicinem, cyklofosfamidem a časněji relabují. Tyto studie jsou však na malých vzorcích nemocných, s nekonzistentním složením nemocných a v různých režimech podání (neoadjuvantní, adjuvantní). Pro ověření těchto skutečností by bylo třeba velkých multicentrických randomizovaných studií, s jasně definovanými vstupními podmínkami.

Protein 53 má velice významnou úlohu ve vývoji buňky a její odpovědi na stres. Protein 53 je pomyslnou křížovatkou sítě signálních drah důležitých pro regulaci buněčného růstu a apoptózy. Aktivuje se působením stresových faktorů jako je ionizační záření, hypoxie, chemoterapeutika a další. Jedná se o jaderný transkripční faktor kontrolující přechod G1/S a G2/M fází buněčného cyklu. Podílí se na opravě DNA, indukci stárnutí, apoptóze, autofagocytóze a hraje roli v angiogenezi. Nádory prsu s vysokým množstvím proteinu 53 jsou častěji estrogen a progesteron negativní, dediferencované, aneuploidní a jsou spojovány s horším přežitím. Vysoké hladiny p53 jsou též popisovány u HER-2 pozitivních nádorů. Aberantní funkce p53 je spojována s výskytem nádorového onemocnění. K tomuto dochází poruchou v jakékoliv části fyziologické kaskády p53. Budeme-li znát přesně chybný stav dráhy p53, díky kterému dochází k nádorovému růstu, budeme moci vhodně zacílit účinnou terapii. První terapeutické možnosti jsou již vyvíjeny.

Matrixmetaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory

Matrixové metaloproteinázy, označované též matrixiny, jsou zinek i vápník dependentní endopeptidázy, jejichž hlavní úlohou je štěpení extracelulární hmoty. S dokončením sekvence genomu bylo stanoveno 24 různých genů, kódujících všechny metaloproteinázy v lidském těle. Matrixiny se fyziologicky podílejí na embryonální modelaci, přestavbě a obnově tkání, angiogenezi a hojení ran. Uplatňují se i v mnoha patologických procesech jako jsou zánětlivá a nádorová onemocnění. Ve zdravé tkáni je nízká produkce metaloproteináz, při patologických procesech se jejich exprese prudce zvyšuje. Většina metaloproteináz je v buňce syntetizována (kromě membránových MT-MMP) v podobě proenzymu. Tato

neaktivní forma je dále secernována z buňky do extracelulární matrix a zde v případě potřeby aktivována. Původní představu, že hlavní funkcí metaloproteináz je degradace komponent extracelulární matrix a bazální membrány je nutno rozšířit. Po objevu nových substrátů matrixmetaloproteináz (receptory růstových faktorů, angiogenní faktory, cytokiny, apoptotické ligandy), které nejsou součástí bazální membrány a extracelulární matrix, je jasné, že funkce MMPs je velice komplexní. V procesu karcinogeneze se matrixiny uplatňují ve všech jejích stádiích. Metaloproteinázy se podílejí na modulaci nádorového růstu aktivací růstových faktorů, ovlivněním apoptózy, zasahují do gradientu chemokínů při imunitní odpovědi hostitele, či uvolňují angiogenní faktory. Folgueras ve své práci upozorňuje na duální funkci metaloproteináz v průběhu karcinogeneze. Aktivita metaloproteináz v tkáni je regulována na úrovni transkripce, aktivace zymogenů a endogenní inhibice. Genovou expresi metaloproteináz pozitivně ovlivňuje řada růstových faktorů jako VEGF, TNF- α , IL-1. Naproti tomu například steroidní hormony, retinoly, TGF- β tuto expresi potlačují. Neaktivní forma metaloproteinázy je udržována v latentním stavu pomocí N-terminálního propeptidu, který obsahuje cystein, jehož postranní řetězce tvoří vazbu se zinkem enzymu. Tato vazba tak brání navázání a štěpení substrátu. K aktivaci enzymu dochází odštěpením propeptidu in vivo působením proteáz (jiná metaloproteináza, elastáza, chymáza) proteolytických kaskád v extracelulární matrix. Intracelulárně byla popsána aktivace metaloproteináz 11, 21, 28, 23 prostřednictvím furinu či furinu podobných konvertáz. Endogenní inhibice metaloproteináz je zprostředkována nespecificky prostřednictvím například α 2-makroglobulinu či trombospondinu-2. Nejlépe zatím popsanými endogenními inhibitory metaloproteináz jsou tkáňové inhibitory metaloproteináz 1, 2, 3 a 4. TIMPs tvoří s metaloproteinázami nekovalentní binární komplexy a blokují vazebná místa pro substráty. Tyto inhibitory jsou schopny inhibovat všechny známé metaloproteinázy. TIMP-1,-2,-4 jsou volně secernovány do intersticia, zatímco TIMP-3 je pevně zakotven v extracelulární matrix. Nadprodukce TIMPs brzdí růst tumorových buněk. Pokles jejich koncentrace vede ke zvýšení kolagenolytické aktivity a zlepšení migrace nádorových buněk. Některé studie ale prokazují zvýšenou expresi TIMP u pokročilých tumorů i jejich stimulační efekt na růst nádoru.

MMP-7 Matrilysin, PUMP-1 Putative Metaloproteinase 1

Gen PUMP-1 je lokalizován na dlouhém raménku 11. chromozomu, skládá se z 1 144bp a jeho produktem je protein o velikosti 267 aminokyselin a molekulové hmotnosti 20 kDa. Svoji strukturou se liší od ostatních MMPs absencí hemopexinové domény a společně s MMP-26 tvoří samostatnou podskupinu metaloproteináz.

Zymogenní forma enzymu je aktivována prostřednictvím trypsinu, plazminu, leukocytární elastázy. Matrilysin má širokou substrátovou aktivitu, katalyzuje kolagen IV, laminin, fibronectin, proteoglykan, elastin. Jeho substráty jiné než komponenty extracelulární matrix a bazální membrány jsou transferin, plasminogen, entactin, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-8, proMMP-9, pro α -1

proteínáza inhibitor, decorin, endostatin, Fas ligand, α -2 makroglobulin, proTNF- α , syndecan, E-cadherin, pro- α -defensin, β 4-integrin, TFPI-1, všechny podtřídy IgG, Insulin Growth like Factor Binding protein 5 (IGFBP1-5), heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF). Výčet zdaleka není konečný a každým dnem přibývají studie zabývající se tímto enzymem.

Jak je ale zřejmé, jedná se o molekulu, která se účastní celé řady fyziologických i patologických procesů v těle. MMP-7 se účastní nejen degradace extracelulární matrix a bazální membrány, ale účastní se procesů jako je zánět, přestavba a novotvorba tkání. Konstitutivně je produkována žlázovými epiteliálními buňkami v mléčné žláze, štítné žláze, slinivce břišní, v játrech, prostatě a peribronchiálních žlázkách. V procesu karcinogeneze se účastní všech jejích stadií a to degradace extracelulární matrix, bazální membrány, angiogeneze, proliferace i invaze buněk. MMP-7 je secernována nejen stromálními buňkami, ale hlavně samotnými nádorovými buňkami. Její zvýšená exprese byla popsána u mnoha typů nádorů jako jsou nádory plic, kůže, prsu, prostaty, tlustého střeva, slinivky břišní a nádory hlavy a krku. Zvýšená exprese MMP-7 koreluje se špatným agresivním fenotypem buněk nádoru a horší prognózou.

TIMP-1 Tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1)

TIMP-1 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 28,5 kDa, který tvoří stechiometrické komplexy v poměru 1:1 s metaloproteinázami.

Funkce TIMP-1 je komplexnější než jen inhibice metaloproteináz. TIMP-1 se podílí na stimulaci proliferace buněk, inhibici apoptózy a angiogenezi. Všechny tyto funkce jsou ale kontroverzní a dosud není jasný přesný mechanismus účinku TIMP-1 kromě inhibice metaloproteináz, ani ucelená a sjednocená fyziologická funkce tohoto inhibitoru. Vysoké hladiny exprese TIMP-1 byly popsány u nádorů mozku, prsu a plic. Bylo prokázáno, že exprese TIMP-1 je signifikantně vyšší v nádorové tkáni prsu oproti nenádorové tkáni prsu. TIMP-1 je produkována stromálními buňkami spíše než nádorovými buňkami samotnými. Zvýšená exprese TIMP-1 mRNA je spojena s horší prognózou nemocných s karcinomem prsu.

2 Cíl práce

Základním cílem této práce je popsání problematiky prognózy a predikce u karcinomu prsu a zhodnocení možnosti použití jednotlivých ukazatelů v klinické praxi. Dále byla v rámci této práce provedena prospektivní studie, jejímiž hlavními cíli bylo kvantitativní stanovení exprese mRNA u vybraných genů – pro protein 53 (p53), matrixmetaloproteinázu 7 (MMP-7), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 – tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) pomocí kvantitativní polymerázové reakce - Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ze vzorků ductálního invazivního karcinomu a ze vzorků zdravé tkáně prsu. Dalším z cílů bylo zhodnocení exprese mRNA těchto genů ve vztahu ke klinicko-patologické charakteristice souboru, prospektivní sledování těchto nemocných a zhodnocení možnosti využití výsledků ve vztahu k prognóze nemocných s karcinomem prsu. Posledním z cílů bylo provedení analýzy přežití.

Proč MMP-7?

Z dostupných poznatků jsme chtěli na vzorcích zdravé a nádorové prsní tkáně in vivo ověřit expresi mRNA matrilysinu pomocí RT-PCR a podle slibných výsledků u kolorektálního karcinomu toto promítnout do výzkumu karcinomu prsu. Předpokládali jsme, že exprese matrilysinu ve zdravé tkáni prsu bude minimální a s invazivitou či stadiem nádoru se její exprese bude zvětšovat. Chtěli jsme ověřit, zda výši exprese mRNA možno použít jako prognostický faktor a zda jeho výše bude korelovat se základní charakteristikou souboru: TNM klasifikace, MIB aktivita, exprese hormonálních receptorů. Dalším z bodů výzkumu byl vztah mezi mírou exprese mRNA matrilysinu v nádorové prsní tkáni a délkou bezpříznakového období (Disease Free Interval – DFI) a vztah mezi mírou exprese mRNA matrilysinu v nádorové prsní tkáni a celkovým přežitím (Overall Survival – OS).

Proč TIMP-1?

V naší studii bylo snahou ověřit míru exprese TIMP-1 mRNA v normální a nádorové tkáni prsu. Dále prostřednictvím prospektivní studie korelovat výši exprese TIMP-1 mRNA s užívanými prognostickými faktory jako je velikost nádoru, postižení uzlin, přítomnost vzdálených metastáz, mitotická aktivita a exprese hormonálních receptorů. Stejně tak ověřit, zda zvýšená exprese TIMP-1 mRNA v nádorové tkáni prsu je nezávislým prognostickým faktorem přežití či bezpříznakového období. Dále bylo naším cílem stanovení této exprese metodou RT PCR, která nebyla při hodnocení exprese TIMP-1 v nádorové tkáni prsu dosud použita.

Proč p53?

Podle dostupných poznatků jsme chtěli ověřit prognostickou hodnotu exprese p53 u nemocných s karcinomem prsu. Dále jsme chtěli zjistit, zda míra exprese koreluje s klasickými klinicko-patologickými parametry pro rozporupnost studií zabývajících se tímto tématem. Předpokládali jsme, že zvýšená exprese p53 v nádorové tkáni prsu by mohla být dobrým ukazatelem odlišení rizikových nemocných v časném stadiu karcinomu prsu, kde je třeba zvažovat podání adjuvantní onkologické léčby

podle všech dostupných údajů o nemocném i podle biologické charakteristiky samotného nádoru. Dalším cílem této studie byl vztah míry exprese mRNA p53 a přežití, popřípadě délkou bezpříznakového období. Exprese p53 byla stanovována převážně imunohistochemicky. Dále díky spolupráci s Oddělením plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni se nám naskytla možnost zjistit, jaká je míra exprese mRNA p53 ve zdravé tkáni.

3 Metody zpracování

Metodika zpracování vzorků

Celkem 74 vzorků karcinomu prsu bylo odebráno v průběhu primárního resekčního výkonu ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice v Plzni v letech 1998 – 2000. Vzorky byly patologem histologicky verifikovány a zmrazeny na -70°C . Takto byly uchovány k dalšímu zpracování v naší laboratoři. Dále byly odebrány vzorky ke standardnímu patologickému vyšetření a ke stanovení rozsahu nádoru dle pTNM, k určení stupně diferenciaci nádoru, k vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů a ke stanovení mitotického indexu.

Kontrolní vzorky byly odebrány ve spolupráci s Oddělením plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni v průběhu estetických zákroků ze zdravé prsní tkáně. Po zmrazení na -70°C byly uchovány k dalšímu zpracování v naší laboratoři. Údaje o klientkách nebyly dále z etických důvodů zpracovávány.

Stanovení exprese jednotlivých genů pomocí RT-PCR ze vzorků prsní tkáně

Nejprve jsme provedli izolaci RNA z tkáňových vzorků karcinomu prsu a to následovně. Ze 100 mg vzorku tkáně karcinomu prsu jsme izolovali celkovou RNA. Homogenizaci jsme provedli ve zkumavkách se speciálními kuličkami přístrojem Fastprep (Thermosavant, USA) a kitem FastRNA Pro Green Kit (Q BIOgene, USA). 3 μg izolované celkové RNA jsme použili do reverzní transkripce. Reverzní transkripci jsme provedli pomocí enzymu Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA). Jako primer pro reverzní transkripci jsme použili oligo d(T)₂₁. Primery pro GAPDH, MMP-7, TIMP-1 a GAPDH jsme navrhli tak, aby překračovaly minimálně jeden intron. Fragmenty získané PCR jsme vložili do vektoru pGEM (Promega Corporation, USA), klonovali a sekvenovali. Klonované fragmenty GAPDH, MMP-7, TIMP-1 a p53 jsme použili jako standardy o známém počtu molekul. 1 μl cDNA každého vzorku jsme použili pro RT-PCR na přístroji Rotorgene (Corbet Research, Australia). Pro stanovení amplifikace DNA jsme použili barvu SYBR Green I. Specificitu reakce jsme ověřili pomocí teplotní křivky tání a elektroforézy. Stanovení jsme provedli jako absolutní (počet molekul cDNA) a jako standardy jsme použili klonované fragmenty cDNA. Výsledky jsou uváděny jako absolutní hodnoty - kvantifikace byla provedena absolutně, za použití klonovaných fragmentů o známé koncentraci jako standard (počet kopií molekul/ 3 μg RNA) a normalizované hodnoty - jako poměr sledovaného genu a GAPDH (TIMP-1/GAPDH).

Metodika sledování nemocných

74 nemocných, od kterých byl odebrán vzorek nádorové tkáně v průběhu primárního resekčního výkonu pro nádorové onemocnění prsu, bylo následně léčeno podle doporučení České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (ČLS JEP) a následně dispenzarizováno či pouze dispenzarizováno na Onkologickém oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. Určení primárního klinicko-patologického obrazu bylo provedeno dle UICC. V průběhu léčby a dispenzarizace byl zdravotní

stav pro potřeby studie hodnocen podle RECIST kritérií. Nemocné byly sledovány do své smrti či do data poslední kontroly (1. 3. 2009).

Statistická analýza

Expresí jednotlivých genů ve zdravé a nádorové tkáni byla popsána pomocí deskriptivních statistických parametrů jako jsou minimum, maximum, medián, průměr. Klinicko-patologická charakteristika byla shrnuta pomocí tabulek četnosti. Rozdíl mezi expresí genů v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni a rozdíl genové exprese genů podle rozvoje progresu do pěti let od primární operace byla hodnocena pomocí neparametrického Mann-Whitneova testu. Neparametrický Mann-Whitneův test a Kruskal-Wallis test (ANOVA) byly použity k hodnocení vztahu mezi genovou expresí a klinicko-patologickými parametry. Analýza přežití byla hodnocena pomocí Kaplan-Meierovy analýzy. Rozdíl v přežití byl stanoven pomocí log-rank testu. Grafické zpracování bylo provedeno pomocí programu STATISTICA pro Windows 8.0.

4 Výsledky

Klinicko-patologická charakteristika souboru

Soubor tvořilo 74 pacientek po operaci pro invazivní karcinom prsu. V době operace byl jejich věk 31 – 85 let, medián (MED) 65 let. V době poslední kontroly k 1. 3. 2009 dvacet nemocných zemřelo a u pěti se zdravotní stav nepodařilo zjistit. U 51,4% nemocných bylo dosaženo kompletní remise, 8,1% dosáhlo parciální remise a 37,8% bylo v progresi. Medián přežití byl 4 roky. U všech se jednalo o duktální invazivní karcinom NOS.

MMP-7

Potvrdili jsme, že exprese mRNA MMP-7 je statisticky významně vyšší v nádorové tkáni karcinomu prsu (duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni ($p < 0,001$). Tato exprese se ve zdravé tkáni blíží nule.

Expresce mRNA MMP-7 je vyšší u vzorků odebraných nemocným s postižením mizních (N+) i bez postižení mizních uzlin (N0) oproti vzorkům ze zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$). Expresce mRNA MMP-7 vzorků odebraných nemocným s postižením mizních uzlin oproti vzorkům nemocných bez postižení mizních uzlin bylo nesignifikantní ($p = 0, 2$ resp. $0, 43$).

Expresce mRNA MMP-7 byla statisticky významně vyšší u pacientek s negativními estrogenovými receptory ($p = 0,017$, resp. $p = 0,012$)

Expresce mRNA MMP-7 nebyla signifikantně vyšší u nemocných s progresí onemocnění do pěti let od operace.

Bezpříznakové období bylo statisticky významně delší u nemocných, jejichž vzorek vykazoval expresi mRNA MMP-7 pod medián ($p = 0,05$).

TIMP-1

Potvrdili jsme statisticky významně vyšší expresi mRNA TIMP-1 v nádorové tkáni prsu (duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni. ($p < 0,001$). Potvrdili jsme, že exprese mRNA TIMP-1 ve zdravé prsní tkáni se blíží nule.

Prokázali jsme, že exprese mRNA TIMP-1 je signifikantně vyšší ve vzorcích duktálního invazivního karcinomu u nemocných bez postižení mizních uzlin (N0) oproti vzorkům zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$).

Rozdíl exprese mRNA TIMP-1 stanovené ze vzorků nádorové tkáně nemocných s pozitivními lymfatickými uzlinami (N+) oproti vzorkům nádorové tkáně nemocných bez postižení mizních uzlin (N-) není statisticky významný ($p = 0,7$ resp. $0,4$).

Nepodařilo se nám prokázat prognostický význam tohoto markeru.

P53

Zjistili jsme, že exprese mRNA p53 je statisticky významně vyšší v nádorové prsní tkáni (duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni ($p < 0,001$). Tato exprese byla ve zdravé tkáni nulová.

Zjistili jsme, že exprese mRNA p53 stanovená ze vzorků nádorové tkáně nemocných bez postižení mizních uzlin (N0) je statisticky významně vyšší oproti naměřené expresi mRNA p53 ze vzorků zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$).

Expresie mRNA p53 stanovená ze vzorků nádorů prsu nemocných bez postižení uzlin (N0) nebyla statisticky významně rozdílná oproti expresi mRNA p53 stanovené ze vzorků nemocných s postižením mizních uzlin (N+). Z rozložení souboru je ale možné usuzovat, že při vyšším počtu nemocných v souboru by mohl být tento rozdíl statisticky významný.

Míra exprese mRNA p53 stanovená ze vzorků nádorové tkáně prsu nekorelovala s klinicko-patologickými parametry souboru jako je velikost nádoru, postižení mizních uzlin, mitotická aktivita, stav hormonálních receptorů.

Zjistili jsme, že čím nižší je diferenciace nádorové tkáně, tím nižší je exprese p53 a tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,042$ resp. $0,041$). Statisticky významný výsledek byl zjištěn i při srovnávání nemocných s nádorem G1 proti G2. medián exprese mRNA p53 byl statisticky významně vyšší u nemocných s nádorem G1 oproti nemocným s nádorem G2 ($p = 0,032$). Tento výsledek je ovlivněn nedostatečným počtem nemocných ve skupině (3 vs. 36) a nemůže být považován za spolehlivý.

Expresie mRNA p53 stanovená ze vzorků nádoru nemocných, kteří zprogredovali do pěti let od primárního výkonu nebyla statisticky významně vyšší.

Délka bezpříznakového období nebyla statisticky významně vyšší u nemocných, u kterých byla stanovená exprese mRNA p53 vyšší než medián souboru. Statisticky významnou délku bezpříznakového období se nám nepodařilo zjistit ani u nemocných, které měly expresi mRNA p53 vyšší než naměřená maximální hodnota exprese mRNA p53 ve zdravé prsní tkáni.

5 Závěr

Potvrdili jsme statisticky významně vyšší expresi mRNA MMP-7 v nádorové tkáni prsu. Pacientky s vyšší expresí MMP-7 mRNA mají kratší bezpříznakové období a pětileté přežití. Statisticky významně vyšší exprese mRNA MMP-7 byla v nádorové tkáni neexprimující estrogenové receptory, tzn. u nádorů s prognosticky nepříznivým fenotypem.

Expese mRNA matrilysinu je nepříznivým prognostickým faktorem nemocných s časným karcinomem prsu.

Potvrdili jsme statisticky významně vyšší expresi TIMP-1 v nádorové tkáni resp. u ductálního invazivního karcinomu prsu a to již v časných stádiích nemoci. Expese mRNA TIMP-1 nekorelovala signifikantně s ostatními prognostickými parametry jako je velikost nádoru, postižení mízních uzlin, hormonální status, stupeň diferenciacie nádoru. Expese mRNA TIMP-1 nebyla statisticky významně vyšší u nemocných, kteří zprogredovali v pěti letech od primární operace oproti skupině v remisi. Celkové přežití nemohlo být stanovené.

Z dostupných dat nebylo možné potvrdit ani vyvrátit roli exprese mRNA TIMP-1 jako nezávislého prognostického faktoru u nemocných s karcinomem prsu.

Myslíme si, že TIMP-1 nebude ideálním prognostickým faktorem karcinomu prsu.

Zjistili jsme, že expese mRNA p53 se ve zdravé prsní tkáni blíží nule. Potvrdili jsme statisticky významný rozdíl exprese p53 mRNA v nádorové tkáni prsu, resp. u ductálního invazivního karcinomu oproti zdravé prsní tkáni. Expese p53 mRNA stanovená ze vzorků nemocných bez postižení mízních uzlin byla statisticky významně vyšší oproti expresi mRNA p53 stanovená ze vzorků zdravé prsní tkáně.

Rozporuplný je výsledek, kdy míra exprese mRNA p53 je tím vyšší, čím je nižší stupeň diferenciacie nádoru. Tento výsledek popírá poznatky ostatních studií.

Prognostickou hodnotu exprese mRNA p53 stanovené ze vzorků nádoru prsu v době primární operace se nám nepodařilo prokázat.

Z těchto výsledků usuzujeme, že ke zvýšené expresi mRNA p53 dochází v časně karcinogenezi, kdy není ještě porušena regulační schopnost buňky. Předpokládáme, že v s přibývajícím dediferenciací buněk nádoru dochází k útlumu fyziologické funkce p53 a k moci se dostávají signální dráhy pozměněné v průběhu vzniku nádoru.

Znalost exprese p53 nádorem by mohla být užitečná při rozhodování o léčbě u nemocných v časných stádiích nemoci. Vysoká expese p53 v časných stádiích je špatným prognostickým faktorem a tyto nemocné, by měly být léčeny jako vysoce rizikové.

Seznam prací vztahujících se k tématu

Šefrhansová, L., Benišová, M., Fínek, J., Holubec, L. jr., Topolčan, O. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu v klinické praxi, *Plzeňský lékařský sborník*, 2012

Fínek, J., Holubec, L. jr., Topolčan, O., **Elgrová, L.**, Skalová, A. and Pecen, L. The importance of Prognostic Factors in Premenopausal Women with Breast Cancer. *Anticancer Research*. 2007, 27:1893-1896

Pesta, M., Holubec, L. jr., Topolčan, O., Cerna, M., Rupert, K., Holubec, L. sen., Treska, V., Kormunda, S., **Elgrová, L.**, Fínek, J. and Cerny, R. Quantitative Estimation of Matrix Metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in Colorectal Carcinoma Tissue Samples. *Anticancer Research*. 2005, 25:3387-3392

Fínek, J., Holubec, L., **Elgrová, L.** Hormonální léčba časného karcinomu prsu *Farmakoterapie v gynekologii*. 2005, 19:216-220

Seznam použité literatury

1. **Dušek, Ladislav, et al.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. www.svod.cz. [Online] 2005. 1802 - 8861.
2. **Citterbart, Karel.** *Gynekologie*. Praha : Galén, 2001. stránky 9-10.
3. **Rosai, Juan.** *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 9.vydání. USA : Elsevier, 2004.
4. **Cotran, Ramzi S. et al.** *Robbins Pathology Basis of Disease*. 6. vydání. USA : Elsevier, 1998.
5. **Junqueira, Carlos L. et al.** *Základy histologie*. Praha : H and H, 1995.
6. www.svod.cz. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*. [Online] <http://www.svod.cz>. ISSN 1802-8861.
7. **Titus - Ernstoff, L. et al.** Menstual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 7, 1998, stránky 783-789.
8. **Donegan, William L. and Spratt, John S.** *Cancer of the Breast*. 5.vydání. USA : Elsevier Science, 2002. stránka 1072.
9. **MacMahon, B., et al.** Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin WHO*. 43, 1970, stránky 209-221.
10. **Strnad, P.** *Nemoci prsu pro gynekology*. Praha : Grada Publishing, 2001. stránky 23-237.
11. **Tesařová, Petra.** Novinky ze symposia v San Antoniu věnovaného karcinomu prsu. *Remedia*. 2009, stránky 76-80.
12. **Triano, E. A. et al.** Class I Alcohol Dehydrogenase Is Highly Expressed in Normal Human Mammary Epithelium but not in Invasive Breast Cancer: Implications for Breast Carcinogenesis. *Cancer Research*. 2003, 63, stránky 3092-3100.

13. **Longnecker, M. P.** *Risk of Breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption.* 87, 1995, stránky 923-929.
14. **Trentham - Dietz, A. et al.** Body size and risk of breast cancer. *American A of Epidemiology.* 1997, Vol. 145, stránky 1011-1019.
15. **Newman, B. et al.** Genetic heterogeneity and penetrance of the BRCA 1 and BRCA 2 genes in breast cancer families. 1988, Vol. 85, stránky 3044-3048.
16. **Claus, E. B. et al.** Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high risk families. *Cancer.* 1994, 73, stránky 643-651.
17. **Ford, D. et al.** Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of human genetics.* 1998, 62, stránky 676-689.
18. **Modungo, F.** Ovarian cancer and high risk women implications for prevention, screening and early detection. *Gynecologic Oncology.* 2003, 91, stránky 15-31.
19. **Szabo, C. L. a King, M. C.** Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *American Journal of Human Genetic.* 1997, 60, stránky 1013-1020.
20. **Foretová, L. et al.** BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Human Mutation.* 2004, strana 23.
21. **Bartoňková, H. a Foretová, L.** Doporučené zásady péče o nemocné nádory prsu a vaječnicků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 a BRCA2. *Klinická onkologie.* 2003, 16, stránky 29-34.
22. **Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2.LF a FN Motol.** [Online] [Citace: 22. 2 2012.] <http://ublg.lfp.cuni.cz>.
23. **OMIM. Pubmed.** [Online] říjen 2009. <http://omim.org/entry/158350>.
24. **Hong, F. D. et al.** Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc.Nat.Academy of science.* 1989, 86, stránky 5502-5506.
25. **Swift, M. et al.** Breast and other cancers in families with ataxia-teleangiectasia. *National English Journal of Medicine.* 1987, 316, stránky 1289-1294.
26. **Janin, M. et al.** Breast cancer risk in ataxia teleangiectasia heterozygotes: haplotype study in French AT families. *British Journal of Cancer.* 1999, 80, stránky 1042-1045.
27. **Gail, M. H. et al.** Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of National Cancer Institute.* 1989, 81(24), stránky 1879 - 86.
28. **Strnad, Petr.** [Online] <http://www.senologie.cz/odborne>.
29. **Sobin, L. H. a Wittekind, Ch.** *TNM klasifikace zhoubných novotvarů.* 6. vydání. Praha : Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2004. stránky 111-121.
30. **Tavassoli, Fattaneh, A. a Devilee, P.** *World Health Organization Classification od Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* Lyon : IARC Press, 2003.

31. Nádory prsu. [Online] Biopstická laboratoř s.r.o, 10 2009. <http://www.mamma.cz>.
32. **Berx, G. et al.** E-cadherin is inactivated in a majority of human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996, 13(9), stránky 1919-1925.
33. **Kanai, Y.** Point station of E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn Journal Cancer Research*. 1994, 85(10), stránky 1035-39.
34. **McDivitt, R. et al.** Tubular carcinoma of the breast. Clinical and pathological observations concerning 135 cases. *American Journal of Surgical Pathology*. 1982, 6, str. 401.
35. **Bloom, H.J. a Richardson, W.W.** Histologic grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*. 1957, 11, stránky 359-377.
36. **Elston, C.W. a Ellis, I.O.** Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow up. *Histopathology*. 1991, 19, stránky 403 - 410.
37. **Perou, C.M.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000, 406, stránky 747-752.
38. **Ryška, A.** Vybrané novinky v diagnostice a klasifikaci invazivního karcinomu prsu. *mojemedicina.cz*. [Online] 22. 3 2010. [Citace: 1. březen 2012.] <http://mojemedicina.cz/zhoubne-nadory-prsu>.
39. **Vyzula, R..** Zásady cytostatické léčby maligních onemocnění. 2012, strana 13.
40. Medical Tribune, 3. březen 2009, strana A5. 9.
41. **Schneiderová, M. et al.** Magnetická rezonance prsu - první zkušenosti. *Klinická onkologie*. 2006, 19(3), stránky 194-197.
42. **Leach, M. O.** Screening in women at genetic risk of breast cancer: Results of the UK multicentre study of magnetic resonance imaging (MRI) and X-ray mammography (XRM). *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2005, 23, Part I of II (June 1 číslo abstraktu 520)
43. **Třeška, V.** *Propedeutika vybraných klinických oborů*. Praha : Grada Publishing, 2003.
44. **Chrenko, V. a Fait, V.** Taktika chirurgického řešení časného karcinomu prsu. 2006, stránky 18-27.
45. **Vyzula, Rostislav.** *Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění*. Brno : Masarykův onkologický ústav, 2011.
46. **Šlampa, Pavel a kol.** *Radiační onkologie v praxi*. Brno : Masarykův onkologický ústav, Oddělení radiační onkologie, 2004.
47. **Kubecová, M.** Radioterapie karcinomu prsu. *www.onkologiecs.cz*. 2009, 3(1), stránky 28-31.
48. **Overgard, M., Hansen, P. S. a Overgard, J.** Postoperative radiotherapy in high risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. *National England Journal of Medicine*. 1997, 337, stránky 949-955.

49. **Van de Steene, J. a Soete, G.** Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival:the missing link. *Radiother Oncology*. 2000, 55, strana 263.
50. **Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J. et al.** Twenty year follow up a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer.Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *National England Journal of Medicine*. 2002, 347, strana 1233.
51. **Carey, L. A. et al.** American Joint Comittee on Cancer tumor node metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *Journal of National Cancer Institute*. 2005, 97, stránky 1137-1142.
52. Avastin (bevacizumab). *moje medicína.cz*. [Online] [Citace: 1. březen 2012.] <http://www.mojemedicina.cz/leciva/avastin-bevacizumab/>.
53. **Zubrod, C. G. et al.** Appraisal of methods for study of chemotherapy of cancer in man:comparative therapeutic trial of nitrogen mustard and thiophosphoamide. *J Chronic Dis*. 1960, 11, stránky 7-23.
54. *WHO handbook for reporting results of cancer treatment*. Geneva (Switzerland) : World Health Organization Offset Publication, 1979. 48.
55. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000, 92 (3), stránky 205-216.
56. **Eisenhauer, E. A., et al.** New response evaluation criteria in solid tumours:Revised RECIST guideline. *European Journal of Cancer*. 2009, 45, stránky 228 - 247.
57. Wikipedie. [Online] [Citace: 3. březen 2009.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Prognóza>.
58. **Fitzgibons, R. E.** Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Patol Lab Med*. 2000, 124, stránky 966 - 978.
59. **Goldhirsch, A. et al.** Meeting Highlights: International Expert Consensus on The Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Annals of Oncology*. 2005, 16, stránky 1569-1583.
60. **Goldhirsch, A. et al.** Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology*. 2009, 20(8), stránky 1319-1329.
61. Wikipedie. [Online] [Citace: 1. březen 2009.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/predikce>.
62. **Joensuu, H. et al.** DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer*. 1990, 66, stránky 331-340.
63. **Strnad, A.** Senologie. [Online] [Citace: 10. říjen 2009.] <http://www.senologie.cz/cinnost/atestace-01.html>.
64. **Walker, Rosemary.** *Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer*. 1. vydání. London : Informa Healthcare, 2008.

65. **Henson, D. E., Ries, I. a Freedman, L. S.** Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. *Cancer*. 1991, 6, stránky 2142 - 2149.
66. **Goldhirsch, A. et al.** Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, Sv. 21, 17, stránky 3357-3365.
67. **Pinder, S., Ellis, I., Galea, M., O'Rourke, S., Blamey, R. and Elston, C.** Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow up. *Histopathology*. 1994, 24, stránky 41-47.
68. **Bettelheim, R. et al.** Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1984, 50, stránky 771-778.
69. **Mennel, R. et al.** American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, 25, stránky 5287-5312.
70. **Tesařová, P.** Inhibitory aromatázy a jejich místo v adjuvantní léčbě karcinomu prsu. *Remedia*. 2008, 18(3), stránky 212-222.
71. **Bozkurt K.K., Kapucuoglu N.** Investigation of immunohistochemical ER α , ER β and ER β cx expressions in normal and neoplastic breast tissues. *Pathol Res Pract*. 13. February 2012, epub ahead of print.
72. **Trojan, Stanislav a Langmeier, Miloš.** *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Praha : Grada, 2003. str. 772.
73. **Fisher, B. a Redmond, C.** Relative Word of estrogen or progesterone receptor pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from NSABP protocol B-06. *Journal of Clinical Oncology*. 1988, 6, stránky 1076-1087.
74. **Donegan, W. L.** Prognostic factors Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer supplement*. 1992, 70, strana 6.
75. **Petruželka, L.** Biologická léčba karcinomu prsu. *Onkologie*. 2009, 3(1), stránky 19-26.
76. **Slamon, D. J. et al.** Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*. 1987, 235, stránky 177-182.
77. **Ellis I. et al.** Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1 and/or ErbB-2 positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer. Evidence from a phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2001, 19, stránky 3808-3816.
78. **Vogel, C. L., Cobleigh, M. A. a Tripathy, D. et al.** Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2002, 20, stránky 719-726.
79. **Baselga, J., Tripathy, D. a Mendelson, J. et al.** Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1996, 14, stránky 737-744.

80. **Andreasen, P. A. a Kjøller, L.** The urokinase –type plasminogen activator systém in cancer metastasis: a rewiev. *Internal Journal of Cancer*. 1997, 72, stránky 1-22.
81. **Bilran, H. a Sheng, S. et al.** Pleiotropic inhibition of pericellular urokinase type plasminogen activator system by endogenous tumor supressive maspi. *Cancer Research*. 2001, 15, stránky 8676-8682.
82. **Loskutoff, D. J. a Curriden, S. A.** Regulation of cell adhesion by PAI. *APMIS*. 1999, 107, stránky 54-61.
83. **Duffy, I. et al.** Urokinase PLasminogen ACTivator and Its Inhibitor. PAI-1, as prognostic Markers in Breast Cancer: From Pilot to Level 1 Evidence studies. *Clinical Chemistry*. 2002, 48 (8), stránky 1194-1197.
84. **Zíma, Josef, Vorlíček, Jiří a Topolčan, Ondřej.** Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP) a České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně k využití nádorových markerů v klinické p. *CSKB Tumorové markery*. [Online] 9.. září 2008. [Citace: 15.. leden 2009.] <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--tumorove-markery>.
85. **Ebeling, F. G.** Breast Cancer:CEA, CA 15-3 and prognosis. *British Journal of Cancer*. 2002, 86(8), stránky 1217-1222.
86. **Molina, R., Barak, V. a van Dalen, A.** Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers Recommendations. *Tumor Biology*. 26, stránky 281 - 293.
87. **Weigelt, B., Bosma, A. J. a Hart, A. A.** Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patiens. *British Journal of Cancer*. 2003, 88, stránky 1091-1094.
88. **Cristofanilli, M.** Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, 23, stránky 1420-1430.
89. **Cristofanilli, M., Budd, G. T. a Ellis, M. J.** Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004, 351, stránky 781-791.
90. **Hayes, D. F.et al.** Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patiens predict progression –free and overall survival. *Clinical Cancer Research*. 2006, 12, stránky 4218-4224.
91. **Cheang, M. C. U., et al.** Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *Journal of National Cancer Institut*. 2009, 101, stránky 736-750.
92. **Masson, O.** Cathepsin–D, a key role protease in breast cancer, is upregulated in obese mouse and human adipose tissue, and controlc adiposogenesis. *www.plosone.org*. 2001, 6(2), str. e16452.
93. TP53. [Online] [Citace: 5.. listopad 2011.] <http://p53.free.fr>.
94. **Matlashewski, G. et al.** Alternative splicing of human p53 transcripts. *OncogeneRes. Oncogene Research*. 1987, 1, stránky 77-85.

95. **Børresen-Dale, A.L.** TP53 and breast cancer. *Human mutations*. 2003, 21(3), stránky 292-300.
96. **Hohenstein, P. a Giles, R. H.** BRCA1: a scaffold for p53response? *Trends in Genetics*. 2003, 19, stránky 489-494.
97. **Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R., et al.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(19), stránky 10869-74.
98. **Vogelstein, B. et al.** Surfing p53 network. *Nature*. 2000, 408, stránky 307-310.
99. **Carr, A. M.** Cell Cycle: Piecing together the p53 puzzle. *Science*. 2000, 287, stránky 1765-1766.
100. **El-Deiry, W. S. et al.** Regulation of p53 downstream genes. *Seminars Cancer Biology* . 1997, 8, stránky 345-357.
101. **Fekí, A. a Irminger-Finger, I.** Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 2004, 52, stránky 103-116.
102. **Yamashita H., Nishio M., Toyama T.** Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2004, 6, stránky R24-R30.
103. **Gross, J. a Lapiere, C. M.** Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962, 48, stránky 1014-1022.
104. **Polette, M- a Birembaut, P.** Matrix metalloproteinases in breast cancer. *Breast Cancer Journal*. 1996, 2(3), stránky 209-220.
105. **Anderson, I. C. et al.** Inhibition of the metastatic spread and growth of the Lewis lung carcinoma in a murine model by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor combined with cytostatic agents. *Cancer Research*. 1996, 56, stránky 715-718.
106. **Nomura, H. et al.** Expression of membrane – type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Research*. 1995, 55, stránky 3263-3266.
107. **Soini, Y., Paakko, P. a Autio - Harmainen, H.** Genes of laminin B1 chain, alfa1 (IV) chain of type-IV collagen, and 72-Kd type type-IV collagenase are mainly expressed by the stromal cells of lung carcinomas. *American Journal of Pathology*. 1993, 142, stránky 1622 - 1630.
108. **Caudroy T., Polette M., Tournier J. M., Burlet H., Toole B., Zucker S., Birembaut P.** Expression of the Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) and the Matrix Metalloproteinase-2 in Bronchopulmonary and Breast Lesions. *J Histochem Cytochem*. 1999, 47, stránky 1575-1580.
109. **Hoekstra, R., Eskens, F. A. L. a Verweil, J.** Matrix metalloproteinase inhibitors: Current developments and future perspective. *Oncologist*. 2001, 6, stránky 415-427.
110. **Chang, C. a Werb, Z.** The many faces of metaloproteinases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends of Cell Biology*. 2001, 11, stránky 37-43.

111. **Egeblad, M. a Werb, Z.** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev. Cancer.* 2002, stránky 161-174.
112. **Hojilla, C. V., Mohammed, F. F. a Khokha, R.** Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *British Journal of Cancer.* 2003, 89, stránky 1817-1822.
113. **Curry, T. E. a Osteen, K. G.** The matrix metalloproteinase system: changes, regulation,. *Endocrinology Review.* 2003, 24, stránky 428-465.
114. **Hulboy, D. L., Rudolph, L. A. a Matrisian, L. M.** Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reprod.* 1997, 3, stránky 27-45.
115. **Brooks, P. C., Clark, R. A. a Cheresch, D. A.** Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science.* 1994, 264, stránky 561-571.
116. **Kim, Y., Jang, J.W., Lee, O.H., Yeon, J., Choi, E.Y., Kim, K.W., Lee, S.T., Kwon Y.G.:** Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Research.* 2000, 60, stránky 5410-5413.
117. **Folgueras, A.R., Alberto, M.P., Sánchez, L.M., López-Otín, C.** Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. Journal Dev. Biol.* 2004, 48, stránky 411-424.
118. **Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M.-C., Millon-Collard, R., Abecassis, J., Breathnach, R.** The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem Journal.* 1988, 253, stránky 187-192.
119. **Gaire, M. et al.** Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. 1994.
120. **Gasson, J. C., Golde, D. W., Kaufman, S. E., Westbrook, C. A. et al.** Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature.* 1985, 315, stránky 768-771.
121. **Huebner, K., Isobe, M., Gasson, J. C., Golde, D. W., Croce, C. M.** . Localization of the gene encoding human erythroid-potentiating activity to chromosome region Xp11.1-Xp11.4. . *Am J of Human Genetic.* 1986, 38, stránky 819-826.
122. **Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R. C., Anderson, D. C. et al.** Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc.Nat.Acad. Science.* 1986, 83, stránky 2407-2411.
123. **Wurtz, S. Q., et al.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005, 12(2), stránky 215-227.
124. **Yoshiji, H., et al.** Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Research.* 1996, 56(9), stránky 2013-2016.
125. **Clavel, C., et al.** 1 Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bulletin of Cancer.* 1992, 79(3), stránky 261-270.

126. **Wilson, Carole L. a Matrisian, Lynn M.** *Matrilysin: An Epithelial Matrix Metalloproteinase with potentially Novel Functions.* 2, Elsevier Science Ltd., 1996, Int. J. Biochem Cell Biol., 28, stránky 123-136.
127. **Barnett, J. et al.** Production, purification, and characterization of human matrilysin (PUMP) from recombinant Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif.* 1994, 5, stránky 27-36.
128. **Baragi, V.M. et al.** : Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally comprom. 1994, 269, stránky 12692-12697.
129. **Wilson, C. et al.** *The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse.* 1. July 1995, Molecular Biology of the Cell, Sv. 6, stránky 851-869.
130. **Adachi, Y., Yamamoto, H. a Itoh, F.** Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut.* 1999, 45, stránky 252-258.
131. **Masaki, T., et al.** Matrilysin (MMP-7) is a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *British Journal of Cancer.* 2001, 84(10), stránky 1317-1321
132. **Yoshiji, H., Harris, S. R. a Raso, E.** Mammary carcinoma cellsover-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer.* 1998, 75, stránky 81-87.
133. **Brummer, O., Athar, S., Riethdorf, L., Löning, T. and Herbst, H.** Matrix-metalloproteinases 1,2 and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridisation study. *Virchows Archiv.* 1999, 435, stránky 566-573.
134. **Ree, A.H., Flørenes, V.A., et al.** High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-1) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clinical Cancer Research.* 3, stránky 1623-1628.
135. **McCarthy, K., et al.** High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. 1999, 84, stránky 44-48.
136. **Linjawi, A., Kontogiannea M., Halwani F., Edwardes M., Meterissian S.** Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *Journal of American Surg.* 2004, 198(1), stránky 83-90.
137. **Friedrichs, K., Gluba, S., Eidtmann, H., Jonat, W.** Overexpression of p53 and prognosis in breast cance. *Cancer.* 1993, 72(12), stránky 3641-3647.
138. **Craig, D. A., et al.** Association of p53 Protein Expression With Tumor Cell Proliferation Rate and Clinical Outcome in Node Negative Breast Cancer. *J National Cancer Institute.* 1993, 85(3), stránky 200-206.
139. **Nakopoulou, L., Giannopoulou, I. et al.** Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *Journal of Pathology.* 2002, 197(3), stránky 307-313.

140. **Norberg, T., et al.** Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *International Journal of Cancer*. 1998, 79, stránky 376 - 383.
141. **Chrobák, L., a kolektiv** *Propedeutika vnitřního lékařství*. Praha : Grada Publishing, 1997.
142. **Fattaneh, A., Tavassoli, Devilee P.** *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. s.l. : World Health Organization, 2003.
143. **Tryggvadottir, Laufey, et al.** A Cohort Study of Breastfeeding and Breast Cancer. *American Journal of Epidemiology*. 2001.
144. **Butler, J.A., et al.** Estrogen receptor protein of breast cancer as a predictor of recurrence. *Cancer*. 1985, str. 55:1178.
145. **Ford, D., et al.** Inheritance of human breast cancer:evidence for autosomal dominant transmission in high risk families.
147. **Longnecker, M. P.** Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *Journal of National Cancer Institution*. 1995, 87, stránky 923-929.
148. **Gail, M.H., et al.** Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of National Cancer Institut*. 81(24), 1989, stránky 1879-86.
149. **Berx, G. et al.** E-cadherin is inactivated in a majority of human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996, 13(9), stránky 1919-1925.
150. **Whelan, T.J., Julian, J. and Wright, J.** Does locoregional radiation therapy improve survival in breast cancer? A metaanalysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2000, 18, stránka 1220.
151. **Fan, S., Wang, J.-A., Yuan, R., Ma, Y., et al.** BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling transfected cells. *Science*. 1999, 284, stránky 1354-1356.
152. **Harris, L. a Fritsche, H.** ASCO 2007 Update of recommendation for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, Sv. 25, 33, stránky 5287-5312.
153. **Petruželka, L.** Cílená molekulární léčba karcinomu prsu. *Referátový výběr z onkologie*. speciál, 2006, 1/06, stránky 33 - 37.
154. **Hilkens, J., Kroezen, J. M. a Bonfrer, G.** MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Research*. 1986, 46, stránky 2582-2587.
155. **Polette, M., Gilbert N., Stas I. et al.** Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridisation study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch*. 1994, 426, stránky 641-645.
156. **Freije, J .M., Balbin, M., Pendas, A.M., et al.** Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Biol*. 2003, 532, stránky 91-107.
157. **Mitsiades, N., Yu, W.H., Poulaki, V., Tsokos, M., Stamenkovic I.:** Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligands protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Research*. 2001, 61, stránky 577-581.

158. Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985, 318, stránky 66-69.

6 Resumé

Background: The aim of this work was to describe and to evaluate possibilities of prognosis and prediction in breast cancer. Within the framework of this we carry out a prospective clinical study. The aim of this prospective study was to detect mRNA MMP-7, p53 and TIMP-1 expression in normal and tumor breast tissue samples and to determine the clinical, pathological and prognostic significance of our results.

Prognosis and prediction: The tumor size, lymph node status, presence of distant metastasis, differentiation of the tumor, perivascular invasion, mitotic activity, expression of ER, PR and HER2 receptors are the basic prognostic factors in breast cancer. Age under/above 35 years was included among independent prognostic breast cancer factors in 2005. It is approved to use uPA/PAI to assess prognosis in node negative breast cancer patients. The hormone receptor status and HER-2 receptor status are the only two predictive markers associated with the target therapy. OncotypeDX analysis could be used to predict the disease recurrence interval of patients with estrogen positive and node negative breast cancer.

Patients and methods: 74 samples of breast cancer tissue were taken away from inpatients undergoing primary surgeries for breast cancer. 24 samples of normal breast tissue were taken away from inpatients undergoing plastic surgeries. Samples were verified and deep frozen till the mRNA expression was assessed by RT-PCR. Histopatological examinations include the assessment of final tumor histotype, grade of differentiation, hormonal receptor status, mitotic index. Patients were after surgery treated according to the Czech Society of Oncology Recommendations and examined till death or till the first end of the study. Routine statistical methods were used for the statistical analysis.

Results: The expression of p53, MMP-7 and TIMP-1 mRNA was statistically significantly higher in tumor tissue samples ($p < 0.001$) compared with normal breast tissue samples. The expression of all three markers was significantly higher in samples from patients with node negative (N0) and also with node positive (N+) breast cancer compared with normal breast tissue samples ($p < 0.001$). The expression of MMP-7 mRNA was significantly higher in estrogen negative samples ($p = 0.017$). Patients with high mRNA expression of MMP-7 (above median) had shorter disease free interval ($p = 0.017$). The expression of p53 mRNA significantly correlated with tumor grade. The lower the rate of cell differentiation is the lower the median of gene expression is. Patients with grade 1 have higher median expression of p53 than patients with grade 2 ($p = 0,032$). The expression of TIMP-1 did not correlate with any clinical and pathological features and the disease free interval. Gene expression values according to occurrence of progression in patient in 5 years after operation were not statistically significant.

Conclusion: Higher expression of MMP-7 mRNA in breast tumor tissue sample is associated with shorter disease free interval. We confirmed that the expression of MMP-7 is higher in estrogen negative breast cancer samples compared. The expression of MMP-7 mRNA is negative prognostic factor in early breast cancer. We didn't document the prognostic role of expression of TIMP-1 and p53 mRNA in breast cancer.