

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Disertační práce

**Nové biomarkery diagnostiky a progresu
„triple“ negativních karcinomů prsu**

MUDr. Markéta Kolečková

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.

Studijní obor: Patologická anatomie a soudní lékařství

Olomouc 2019

Zvláštní poděkování:

Zvláštní poděkování patří mému školiteli *prof. MUDr. Zdeňkovi Kolářovi, CSc.*, za jeho inspirativní přístup k oboru patologie, vedení během pregraduálního a postgraduálního studia, i cenné životní a profesní rady, nejen při zpracování výsledků pro účely konferencí, publikací, grantových projektů a disertace.

Poděkování:

Své poděkování bych rovněž chtěla vyjádřit *prim. prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D.* a všem spolupracujícím kolegům z Ústavu klinické a molekulární patologie, Ústavu molekulární a translační medicíny, I. chirurgické kliniky, Onkologické kliniky, Radiologické kliniky a Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty UP a Fakultní nemocnice Olomouc a Středoevropského technologického institutu Masarykovy Univerzity v Brně:

doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

prof. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

Mgr. Mária Janíková, Ph.D.

prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

Mgr. Michala Bezděková, Ph.D.

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Mgr. Gabriela Kořínková, Ph.D.

Mgr. Kateřina Štaffová

Laboratorní asistenti ÚKMP a LMP

Mgr. Lenka Radová, Ph.D.

MUDr. Katherine Vomáčková, Ph.D.

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

MUDr. Nora Zlámalová

Mgr. Radek Trojanec, Ph.D.

MUDr. Ivan Švach, Ph.D.

Mgr. Kateřina Langová, Ph.D.

prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.

MUDr. Lucia Veverková

Ing. Mgr. Ivo Überall, Ph.D.

Mgr. Júlia Bohošová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně v rámci postgraduálního studia v oboru Patologická anatomie a soudní lékařství – P5180 na Lékařské fakultě UP v Olomouci. Není-li uvedeno jinak, jsou veškeré tabulky, grafy a vyobrazení dílem autorky disertační práce. V průběhu zpracování disertační práce jsem nepoužila jinou než citovanou literaturu. Práce byla podpořena granty AZV ČR 16-31997A a LF_2017_021.

Uchazečka: MUDr. Markéta Kolečková

od roku 2013

studentská vědecká a pedagogická síla,

Ústav klinické a molekulární patologie,

Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice Olomouc

od roku 2016

lékařka v oboru Patologie,

Ústav klinické a molekulární patologie,

Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice Olomouc

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.

Ústav klinické a molekulární patologie,

Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice Olomouc

OBSAH

1.	TEORETICKÝ ÚVOD	8
1.1	Základní principy kancerogeneze	8
1.1.1	Genetické změny uplatňující se při vzniku nádorů	8
1.1.1a	Onkogeny	9
1.1.1b	Nádorové supresorové geny	10
1.1.1c	Mechanismy oprav poškozené DNA	13
1.1.1d	Geny regulující apoptózu	16
1.1.2	Epigenetické změny v patogenezi nádorů	17
1.1.2a	Metylace DNA	17
1.1.2b	Posttranslační modifikace histonů	17
1.1.2c	miRNA	18
1.1.3	Fenotypové znaky maligní nádorové transformace	20
1.1.3a	Nezávislost na růstových signálech	20
1.1.3b	Ztráta inhibiční regulace buněk	22
1.1.3c	Angiogeneze	22
1.1.3d	Neomezený replikační potenciál	23
1.1.3e	Porucha iniciace apoptózy	24
1.1.3f	Schopnost invaze a migrace nádorové buňky, vznik metastáz	26
1.2	Vývojová stádia a morfogeneze mléčné žlázy	26
1.3	Epidemiologie a patogeneze vzniku prekursorových lézí a karcinomu mléčné žlázy	29
1.4	Molekulární třídy karcinomů prsu – historie a současnost	32
1.5	„Triple“ negativní karcinomy prsu (TNBC)	33
1.5.1	Definice, epidemiologie a klasifikace TNBC	33
1.5.2	Analýza TNBC podle Lehmannových fenotypů	34
1.5.2a	„Basal - like“ podtypy TNBC	35

1.5.2b	Imunomodulační podtyp TNBC	36
1.5.2c	Podtypy TNBC z mezenchymových a z multipotentních mezenchymových kmenových buněk	36
1.5.2d	Luminální podtyp s pozitivitou androgenového receptoru	37
1.5.3	Prognostické a prediktivní ukazatele u TNBC	37
1.5.3.1	Molekulární prognostické a prediktivní znaky u TNBC	37
1.5.3.1.1	Proteiny regulující apoptózu	38
1.5.3.1.1a	Fas a TRAIL receptory smrti - markery nádor nekrotizujícího faktoru	38
1.5.3.1.1b	Nádorový supresor p53	39
1.5.3.1.1c	Proapoptotický protein Bcl-2	40
1.5.3.1.2	Regulace genové exprese	40
1.5.3.1.2.1	Malé nekódující molekuly miRNA	40
1.5.3.1.2.1a	MikroRNA se supresorovým a anti-metastatickým potenciálem u TNBC	40
1.5.3.1.2.1b	MikroRNA s onkogenním a metastatickým potenciálem u TNBC	42
1.5.3.1.2.1c	Cirkulující formy miRNA a jejich prognostický a prediktivní význam u TNBC	44
1.5.3.1.2.2	lncRNA a circRNA	44
1.5.3.1.2.3	siRNA	45
1.5.3.1.2.3	Androgenový receptor	45
1.5.3.1.3	Proteiny uplatňující se při opravě poškozené DNA	46
1.5.3.1.3a	Poly (ADP-ribóza) polymeráza	46
1.5.3.1.3b	Nádorové supresory <i>BRCA 1</i> a <i>BRCA2</i>	47
1.5.3.1.4	Proteiny ovlivňující migraci a proliferaci buněk	49
1.5.3.1.4a	Receptor pro epidermální růstový faktor – EGFR	49
1.5.3.1.4b	Vaskulární endotelový růstový faktor	50
1.5.3.2	Morfologické prognostické a prediktivní znaky u TNBC	52
1.5.3.2.1	Histologická typizace TNBC	52

1.5.3.2.2	Prognostický a prediktivní význam imunokompetentních buněk v kontextu s morfologií TNBC	53
1.5.3.2.2a	Koncepce imunitního dozoru a význam hodnocení TILs, PD-1 a PD-L1	53
1.5.3.2.2b	CD163 a CD204 pozitivní makrofágy	56
1.5.3.2.2c	Markery nádorových kmenových buněk – CD24, CD44 a ALDH1	57
1.5.3.3	Epitelo-mezenchymová tranzice (EMT) v patogenezi TNBC	57
2.	CÍLE PRÁCE	60
3.	METODIKA PRÁCE	61
3.1.	Analýza morfologie, množství a lokalizace TILs, významu některých imunitních biomarkerů a nádorových kmenových buněk u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC	61
3.2.	Stanovení exprese miRNA v kontextu s nádorovou morfologií u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC	70
3.3.	Ověření věkové závislosti exprese prognostických a prediktivních znaků hodnocených u karcinomů mléčné žlázy	73
4.	VÝSLEDKY	75
4.1a	Histopatologická charakteristika souboru neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC – analýza histologických typů a morfologií nádorů	75
4.1b	Vztah mezi množstvím TILs a nádorovou morfologií u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC, korelace s vybranými klinicko-patologickými parametry	77
4.1c	Expresí imunitních biomarkerů v kontextu s morfologií TNBC, věkem pacientek v době diagnózy, stupněm diferenciací nádoru, rozsahem onemocnění (TNM klasifikace), expresí Bcl-2 a proliferačním indexem Ki-67	81
4.1.1a	Expresí biomarkerů kontrolních bodů imunitního systému - PD-1 a PD-L1	81
4.1.1b	Expresí CD40 a CD95 náležejících do rodiny receptorů pro TNF	84
4.1.1c	Expresí CD163 a CD204 - biomarkerů M2 makrofágů	86

4.1.1d	Exprese ALDH1, CD24 a CD44 - biomarkerů nádorových kmenových buněk	88
4.1.1e	Exprese AR u TNBC	91
4.2	Exprese specifických miRNA a infiltrace TILs u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC	93
4.3.	Věková závislost exprese prognostických a prediktivních znaků rutinně hodnocených u karcinomů mléčné žlázy	100
4.3.1	Věkově specifická závislost histologického typu karcinomu mléčné žlázy a stupně diferenciaci („grade“) nádoru	101
4.3.2	Věkově specifická závislost zastoupení molekulárních tříd u karcinomu mléčné žlázy	102
4.3.3	Věkově specifická závislost exprese hormonálních receptorů u karcinomu mléčné žlázy	104
4.3.4	Věkově specifická závislost exprese proteinu HER2	104
4.3.5	Věkově specifická závislost proliferačního indexu Ki-67 a PCNA	105
4.3.6	Věkově specifická závislost proteinu Bcl-2	105
5.	DISKUZE	106
6.	ZÁVĚR	117
7.	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ AUTORKY DISERTAČNÍ PRÁCE	118
8.	REFERENCE	121
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	145

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Základní principy kancerogeneze

Kancerogeneze je komplexní mnohastupňový proces, zahrnující *genetické* a *fenotypové změny*. Původ většiny nádorů je připisován monoklonální proliferaci jedné progenitorové buňky. Ta vzniká jako výsledek četných mutací, deregulace fyziologicky probíhajících metabolických drah či aktivací epigenetických mechanismů (tzv. deregulační teorie kancerogeneze) a to jak u sporadických (70 %), familiárních (15 – 25 %) tak i hereditárních (5 - 10 %) forem onemocnění (Slabý O. et al., 2015). *Genetické změny* se mohou odehrávat na úrovni nukleotidů (bodové mutace se ztrátou funkce nebo s konstitutivní aktivací cílových proteinů) či karyotypu (genové amplifikace, translokace, delece a inverze). *Epigenetické změny* představují dědičné změny v expresi genů, které nejsou podmíněny modifikacemi v sekvenci nukleotidů. Zahrnují hypermetylaci oblastí cystidinových sekvencí dinukleotidů (CpG) promotorů nádorových supresorových genů a genů regulujících opravy poškozené DNA, acetylaci či deacetylaci histonů, tj. bazických nukleoproteinů podílejících se na výstavbě chromatinu, glykosylaci a v neposlední řadě regulaci formou zvýšení či snížení exprese malých nekódujících molekul zvaných mikroRNA. Mezi získané fenotypové znaky maligního zvratu buněk patří nekontrolované a nadměrné buněčné dělení, schopnost invazivního způsobu růstu a zakládání metastáz. Progrese nádorového onemocnění je posléze dána diverzitou subpopulace nádorové tkáně s doprovodnou kumulací dalších genetických a epigenetických změn a deregulačních mechanismů.

1.1.1 Genetické změny uplatňující se při vzniku nádorů

Klíčovou úlohu při vzniku nádorů hraje porušení funkce regulačních genů, které vede k neletálním změnám genomu – genomové nestabilitě. Zachovaná fyziologická funkce regulačních genů je nezbytná pro normální průběh buněčného cyklu s opravou genomu prostřednictvím reparace chybného párování („mismatch repair“ – MMR, „base excision repair“ – BER) a rekombinační neboli postreplicační reparací (homologní rekombinace - HR). Genomová nestabilita vzniká důsledkem selhání těchto kontrolních mechanismů vůči působení fyzikálních, chemických či biologických mutagenů. Spolu s přítomností imunokompetentních buněk má nestabilita genomu zásadní vliv na vznik a progresi nádorového onemocnění.

Z výše uvedeného vyplývá, že regulační geny jsou zodpovědné za životaschopnost buňky. Mezi tyto regulační geny řadíme protonkogeny, supresorové geny, geny ovlivňující apoptózu a geny zajišťující reparaci poškozené DNA.

1.1.1a Onkogeny

Protonkogeny jsou geny řídící buněčný růst a diferenciaci, jejich proliferaci i programovanou buněčnou smrt. Aberantní aktivací protonkogenů dochází ke vzniku dominantní mutantní alely, tzv. *onkogeny*, který posléze stimuluje nekontrolované buněčné dělení. Abnormální aktivace protonkogenů na onkogeny může být obecně způsobena různými mechanismy. Patří mezi ně bodová mutace, amplifikace genu, translokace do transkripčně aktivního místa či fúze genů na základě chromozomální přestavby.

Genovou amplifikací se rozumí repetitivní zmnožení určitého úseku DNA. Diagnostický, prognostický a prediktivní význam má například u karcinomů mléčné žlázy stanovení **amplifikace genu *c-erbB-2*** a/nebo imunohistochemický průkaz **zvýšené exprese proteinu *HER2***. Tzv. „HER2 – enriched“ molekulární třída karcinomů prsu je charakterizována zvýšenou proliferační aktivitou nádoru s častější tendencí k metastatickému rozsevu a rekurenci onemocnění. Amplifikaci genu pro receptor HER-2/neu/ErbB2 můžeme zaznamenat až u 20 % karcinomů prsu, a to ve všech stádiích onemocnění od prekancerózních lézí až po metastázy. Zdokumentovány jsou však i diskrepantní případy pozitivní imunohistochemicky stanovené membránové exprese receptoru HER-2/neu/ErbB2 s potvrzenou amplifikací jeho genu mezi primárním nádorem a metastázou (Santinelli A. et al., 2008). Receptor HER-2/neu/ErbB2 je transmembránový protein s tyrozinkinázovou aktivitou, kódovaný genem *c-erbB-2* na chromozomu 17. Navázáním jeho ligandů neuregulinu (NRG) či EGF dochází k heterodimerizaci mezi proteiny ostatních členů receptorové rodiny ErbB (ErbB-1, ErbB-3 nebo ErbB-4), autofosforylaci tyrozinových reziduí v oblasti intracelulární domény receptoru, aktivaci signálních drah řízenými geny *MAPK*, *PI3K/AKT1*, *STAT3*, *PLC γ* a *PKC* a následné transkripci DNA. V současné době je stanovení exprese proteinu HER2 a amplifikace jeho genu *c-erbB-2* stěžejní pro indikaci pacientů k cílené léčbě rekombinantní monoklonální protilátkou (trastuzumab), ATP - kompetitivními inhibitory tyrozinkináz (lapatinib) či konjugáty protilátka – cytostatikum (trastuzumab - emtasin) (Nakai K. et al., 2016).

Trastuzumab i lapatinib inhibují tyrozinkinázy EGFR i HER2 a signální dráhu PI3K/AKT1, čímž znemožňují aktivaci genu *MYC* a zvyšují naopak expresi nádor supresorové miRNA-16. V recentních studiích byla u karcinomu prsu rovněž prokázána mutace či amplifikace genu *EGFR* (Bhargava R. et al., 2005; Generali D. et al., 2007) s aktivací signálních drah Ras/Raf/MAP2K1/ERK a Ras/PI3K/PTEN/AKT1/mTOR. V případech TNBC byly změny v genu *EGFR* zaznamenány u 11 % pacientek (Teng Y. H. et al., 2011). U metaplastických karcinomů prsu, řazených typicky mezi „basal - like“ TNBC, byla mutace v genu *EGFR* zjištěna dokonce až u 76 % případů (Reis-Filho J. S. et al., 2005).

Většina karcinomů prsu (75 %) vykazuje expresi hormonálních receptorů. Získaná rezistence k endokrinní léčbě u nich představuje hlavní terapeutický problém. Jedním z mechanismů vzniku této rezistence je mimo jiné aktivace signální dráhy PI3K/PTEN/Akt/mTORC1. Komplex proteinů mTORC1 může prostřednictvím p70S6K fosforylovat a aktivovat ER α a vést tak k transkripci jím regulovaných genů. Užitím kombinace inhibitoru aromatáz (anastrozol, letrozol) a mTOR (everolimus) či inhibitoru tyrozinkinázy EGFR (gefitinib) byla prokázána efektivita léčby u pokročilých karcinomů prsu s rezistencí k endokrinní terapii při současné negativitě exprese proteinu HER2 či amplifikace jeho genu (Tryfonidis K. et al., 2016). V případě rezistence k inhibitorům aromatáz lze ve stejné indikaci využít i kombinace inhibitorů estrogenových receptorů (tamoxifen) a mTOR (everolimus). Nejlepších výsledků v neoadjuvantní terapii hormonálně dependentních karcinomů prsu potom dosahuje kombinace inhibitorů aromatáz (letrozol) s kyselinou zoledronovou (Perrone F. et al., 2019).

Dalšími popsanými aktivovanými onkogeny u karcinomů prsu jsou například *EGF*, *CDK*, *lncRNA* a *mikroRNA*, o nichž bude postupně pojednáno v následujícím textu.

1.1.1b Nádorové supresory

Geny s nádory suprimující funkcí jsou recesivní geny inhibující různými mechanismy rozvoj nádorů. Jelikož se oproti protonkogenům vyskytují v genomu ve dvou kopiích, ke ztrátě jejich funkce je nutné nejprve poškození obou alel. Svou důležitou roli sehrávají i v rámci dědičnosti nádorových onemocnění. U heterozygotních jedinců s již zděděnou jednou mutovanou kopií nádorového supresorového genu proto stačí, aby mutace postihla druhou, tedy nepostiženou kopii genu. Tento jev popisuje tzv. Knudsonova teorie (Knudson A. G., 2002).

Nádorové supresory můžeme rozdělit na strážce genomu („gatekeepers“) a dozorčí geny („caretakers“). Zatímco mutace genů strážců genomu vede k nádorové transformaci uvolněním mechanismů inhibujících buněčnou proliferaci, v případě dozorčích genů k tomu dochází vlivem ztráty integrity genomu, tj. schopnosti poškozené geny opravovat. Gen **RBI** je gen lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 13, který byl poprvé objeven u pacientů s retinoblastomem. Jeho výsledný produkt, protein Rb (pRb), je inhibicí navázaného transkripčního faktoru E2F významně zapojen do regulace buněčného cyklu, kontroly struktury chromatinu, proliferace a diferenciacie nádorových buněk i buněčné smrti (Witkiewicz A. K., Knudsen E. S., 2014). Protein pRb snižuje expresi genů zapojených do S fáze buněčného cyklu (například *MCM7* a *Cdc6*) a přechodu G2 do M fáze buněčného cyklu (například *Cdk1* a *cyklin B1*). Mimo buněčný cyklus, ve fázi G0, se pRb nachází převážně v aktivní, tj. nefosforylované formě a je schopen buněčné dělení potlačovat. Správný průchod jednotlivými fázemi buněčného cyklu je zajištěn vazbou specifických cyklínů na příslušnou cyklín-dependentní kinázu (CDK). Regulační podjednotka cyklínu interaguje s katalytickou podjednotkou CDK za vzniku aktivních dimerů. Aktivovaný komplex cyklínu D1 - CDK4/6 fosforyluje a tím inaktivuje pRb za uvolnění transkripčního faktoru E2F, jeho translokace do jádra a transkripce genů nezbytných pro vstup buňky do S fáze buněčného cyklu a syntézu DNA. Po ukončení aktivity komplexu cyklínu D1 - CDK4/6 dochází nejprve k sestavení komplexu cyklín E - CDK2 a následně jím indukovaného komplexu cyklín A - CDK2, částečně zodpovědného za replikaci DNA a aktivaci fosfatázy CDC25A. Fosfatázy CDC25A a CDC25B dále aktivují komplexy cyklín A - CDK1 a cyklín B - CDK1, který umožňuje přechod z G2 fáze do M fáze a nakonec opět do G1 fáze buněčného cyklu. Aktivita příslušných komplexů cyklín - CDK je inhibována pomocí CDKN1A (p21^{WAF1}; inhibice komplexu cyklín E - CDK2 a cyklín A - CDK2), CDKN1B (p27^{Kip1}; inhibice komplexu cyklín E - CDK2 a cyklín A - CDK2), CDKN2A (p16^{INK4A}; inhibice CDK4 a CDK6), CDKN2B (p15^{INK4B}; inhibice CDK4 a CDK6) a CDKN2C (p18^{INK4C}; inhibice CDK4 a CDK6). Alterace CDK4/6/RB/p16^{INK4A} signální dráhy byla zjištěna u mnoha nádorů (Slabý et al., 2015). V patogenezi těchto nádorů se uplatňuje ztráta exprese genu *RBI* způsobená inaktivací obou alel delecí, bodovou mutací či hypermetylací jeho promotoru, zvýšenou expresí či amplifikací genu pro cyklín D1, sníženou expresí inhibitoru p16^{INK4A} a v neposlední řadě například vyvazováním proteinu pRb onkoproteinem E7 lidského papilomaviru. Současná přítomnost mutace v genech *RBI* a *TP53* indukuje proces EMT (Jiang Z. et al., 2011).

U TNBC s prokázanou inaktivací genu *RBI* dochází k navození zvýšené senzitivity k radioterapii a cytotoxickým látkám doxorubicinu či metotrexátu (Robinson T. J. et al., 2013).

Nádorový supresor a strážce genomu *TP53* produkuje protein **p53**, který má zásadní vliv na regulaci kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné odpovědi na poškození DNA či telomer, na aerobní buněčný metabolismus, apoptózu, inhibici angiogeneze působením trombospondinu a aktivaci onkogenů (Bykov V. J. N. et al., 2018; Yue X. et al., 2017; Essmann F. et al., 2012; Saha T. et al., 2015). Protein p53 je tvořen celkem čtyřmi doménami, mezi něž patří doména aktivující transkripci na N - terminálním konci, DNA vazebná doména, oligomerizační doména a na proteázy sensitivní doména, ovlivňující schopnost vazby proteinu na poškozenou DNA. Funkční protein p53 se nachází ve formě tetrameru, přičemž ztráta funkce jedné podjednotky způsobuje nefunkčnost celého komplexu. Alterace genu *TP53* na chromozomu 17 nebo jeho aktivátoru *CHK2* jsou vůbec nejčastěji zaznamenané genetické defekty, uplatňující se v patogenezi jak hereditárních (LiFraumeniho syndrom), tak i sporadicky vzniklých nádorů. Udává se, že až 90 % mutací v *TP53* je umístěno do DNA vazebné domény. Největší podíl aberací *TP53* byl popsán u karcinomů tlustého střeva, plic a prsu. Za normálních okolností se protein p53 vlivem negativní regulace ubikvitin - ligázou MDM2 vyskytuje v buňkách všech tkání ve velmi nízkých hladinách. Aktivací některého z kontrolních bodů buněčného cyklu dochází k navýšení hladin proteinu p53. Úlohu senzoru poškození DNA zaujímá proteinu p53 nadřazená proteinkináza ATM, aktivovaná na základě dvouřetězcových zlomů a poškození telomer a proteinkináza ATR při selhání replikace a poruchách buněčného metabolismu. Protein p53 představuje hlavní substrát pro fosforylaci komplexů ATM/CHK2 a ATR/CHK1. Po translokaci do jádra působí protein p53 jako transkripční faktor, který umožňuje zástavu buněčného cyklu, indukci senescence či apoptózy (aktivace proapoptotických členů rodiny BCL-2, proapoptotických faktorů nesoucích pouze doménu BH3-APR/PMAIP1/Noxa, faktoru APAF1 lidského homologu genu *C. elegans* CED4, snížení exprese proteinů inhibujících apoptózu) a v závislosti na konkrétním stavu buňky zvýšení exprese genů inhibujících buněčný růst a invazi. Jedním z hlavních transkripčních cílů proteinu p53 je protein p21^{WAF1/CIP1}, který inhibicí komplexu cyklin E- CDK2 a CDK1 zastaví průběh fází G1 a G2 buněčného cyklu a tím vytváří prostor pro opravu poškozené DNA. Inaktivace p53, vedoucí k přežívání nádorových buněk, může být způsobena ztrátou heterozygotnosti, negativně dominantní mutací alely genu *TP53*, tvorbou komplexu s virovými proteiny (SV40, adenoviry, HPV) a amplifikací genu *MDM2* se zvýšením jeho odbourávání v proteazomu (Slabý O. et al., 2015).

Mutované molekuly p53 jsou zpravidla stabilnější než wt - p53 a lze je proto relativně dobře prokazovat pomocí imunohistochemických metod. Ne každá mutace v genu *TP53* však musí vést k inaktivaci jeho supresorové funkce a existují i mutace, které způsobují větší stabilitu molekuly p53 a přitom neovlivňují jeho správnou funkci strážce genomu (Zhou Y. et al., 2019).

1.1.1c Mechanismy oprav poškozené DNA

Efektivní odezva na poškození DNA, znemožňující akumulaci spontánních mutací v průběhu replikace DNA, funguje v mnohobuněčném organismu jako faktor udržující integritu genomu, jež je nutná pro přežití nenádorových buněk. Proto mechanismy zprostředkované proteiny reparace chybného párování (proteiny MMR) patří mezi další důležité strážce genomu. **MMR proteiny** obvykle iniciují apoptózu mutacemi poškozených buněk až po selhání oprav DNA. Poškození DNA nejprve vede k aktivaci senzorů poškození, přenašečů signálu a regulátorů transkripce (protein p53 a jeho cílové proteiny). Teprve až sekundární odezvu na poškození DNA představuje apoptóza, která má za úkol chránit organismus před dělením poškozených buněk. Nově popsáním genem regulujícím opravu poškozené DNA je *MPPED2* (Pellecchia S. et al., 2019). O dalších genech s obdobnou funkcí a translačně neaktivních RNA, uplatňujících se v patogenezi karcinomů prsu - *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* a *lncRNA*, *mikroRNA* je pojednáno v dalším textu.

Geny regulující opravu poškozené DNA jsou nezbytné pro zachování její integrity. DNA může být poškozena z příčin endogenních a exogenních. K endogenním příčinám řadíme poškození DNA při její replikaci (funkční poruchy proteinů replikačního aparátu, poškození DNA na templátovém vlákně) nebo působením produktů intracelulárního metabolismu (reaktivní kyslíkové formy, alkylace a hydrolýza bází). Z exogenních příčin se uplatňují vlivy fyzikální (ultrafialové a ionizující záření), chemické (karcinogeny) a biologické (viry, bakterie). Oprava DNA je důležitá pro správný průběh buněčného cyklu a rozdělení buňky. V organismu může být realizována opravou chybného párování bází („mismatch repair“ - MMR), nukleotidovou a bázovou excizní opravou („nucleotide excision repair“- NER; „base excision repair“- BER) či opravou dvouřetězcových zlomů DNA cestou homologní rekombinace (HR) nebo nehomologním spojením konců (NHEJ).

„Mismatch repair“ (MMR) je reparace DNA po chybném párování nukleotidů. Mutace genů kódujících proteiny zapojené do systému MMR (MSH2, MSH6, MSH3, MLH1 a PMS2) vede ke vzniku mikrosatelitové nestability s kolísáním délky tandemových repeticí nukleotidů (Slabý O. et al., 2015). Vrozené defekty mechanismů MMR jsou dávány do souvislosti například s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem (HNPCC; Lynchův syndrom) asociovaným mimo jiné i s možným vývojem karcinomů žaludku, endometria a ovaria.

Nukleotidová excizní oprava (NER) slouží k reparaci chemicky modifikovaných bází a distorze DNA vlivem fyzikálních (UV záření) či chemických faktorů (polycyklické aromatické sloučeniny), uplatňujících se v procesu kancerogeneze. Tvoří jej celogenomový reparační systém (GGR) a systém reparace v průběhu transkripce (TCR) aktivovaný v okamžiku, kdy se naváže RNA polymeráza II (POLII). Příkladem poruchy v systému GGR je autozomálně recesivní dědičné onemocnění xeroderma pigmentosum (geny *XPA-G*), charakterizované neurologickými abnormalitami s fotosenzitivitou a zvýšeným rizikem vzniku maligních kožních nádorů (Black J. O. et al., 2016; Natale V. et al., 2017). Stupeň závažnosti postižení pak závisí na typu poškozeného genu. Samostatná mutace genů systému TCR je asociována se vznikem Cockaynova syndromu (Neill - Dingwallův syndrom, geny *ERCC6* a *ERCC8*), tj. neurodegenerativního onemocnění rovněž s fotosenzitivitou, oproti xeroderma pigmentosum ovšem bez zvýšeného rizika vzniku malignit.

Excizní reparace bází (BER) je součástí procesu replikace. Cílem BER je rozpoznání a odstranění chybně zařazených a jednořetězcovými zlomy poškozených bází DNA a jejich následné nahrazení správnými analogy pomocí DNA endonukleázy, polymerázy I a ligázy. BER existuje v krátké („short-patch“ BER) a komplexnější dlouhé („long-patch“ BER) variantě. Stěžejními regulátory BER je *poly (ADP - ribóza) polymeráza* (gen **PARP**), zejména geny *PARP 1* (90 %) a *PARP 2* a protein XRCC1, které zprostředkovávají vzájemné proteinové interakce. Rodina proteinů PARP zahrnuje celkem 18 proteinů lišících se svou strukturou i funkcí (Morales J. et al., 2014; Dulaney C. et al., 2017; Gottipati P. et al., 2010). Přenosem ADP - ribóz na nikotinamidadeninukleotid (NAD) a histony H1 dochází k syntéze PARP polymerů, rozvolnění chromatinu, excizi poškozených bází účinkem DNA glykosyláz a opravě DNA v místě poškození pomocí endonukleázy APE1, DNA polymerázy β a DNA ligázy III. U pacientek s diagnózou „triple“ negativního karcinomu prsu (TNBC) se současně potvrzenou mutací genů *BRCA1* nebo *BRCA2* iniciuje PARP inaktivací degradace kaspáz mimo jiné apoptózu a díky navození syntetické letality představuje proto potenciální terapeutický cíl.

V recentních studiích byl rovněž analyzován účinek inhibitorů PARP spolu s inhibitory CDK1, EGFR, deacetylase histonů či androgenových receptorů (AR). Popsán byl i jejich přímý negativní vliv na PI3K/AKT/mTOR a Wnt/ β -catenin signální dráhu, doprovázený změnou exprese cílových proteinů specifických mikroRNA a kinázy ATM. Mutace genu *MUTYH* byla zjištěna u jedné z forem familiární adenomatózní polypózy (FAP), charakterizované výskytem adenomů tlustého střeva s významným rizikem kancerizace (Poulsen M. L. M., Bisgaard M. L., 2008).

Oprava dvouřetězcových zlomů (DSB) v průběhu replikace DNA je zahájena kinázami ATM a ATR a probíhá dvěma mechanismy v závislosti na fázi buněčného cyklu a zvoleném směru štěpení konců DNA. *Nehomogní spojení konců (NHEJ)* při opravě DNA se účastní všech fází buněčného cyklu a představuje hlavní reparační systém u eukaryotních buněk. Při NHEJ dochází k vytvoření komplexu DNA ligázy IV s kofaktorem XRCC4, připojení na vzájemně kompatibilní konce a ligaci.

Homologní rekombinace (HR) je proces probíhající mezi dvěma molekulami DNA s obdobnou nukleotidovou sekvencí v pozdní S fázi a G2/M fázi buněčného cyklu. HR je zahájena rozštěpením jednoho řetězce ve směru 5' - 3' pomocí MRN komplexu složeného z proteinů MRE11 s endonukleázovou aktivitou, Rad50 a NBS1 v konjunkci s proteiny CtIP a BRCA1. Po navázání replikačního proteinu RPA na 3' konec DNA dochází pomocí enzymů exonukleázy 1 a DNA2 helikázy, respektive fosforylace histonu H2AX, k rozštěpení molekuly DNA. Paralelně s tímto dějem dochází vlivem proteinů BRCA1, BRCA2 a PALB2 k navázání DNA - dependentní ATPázy na protein Rad51 s tvorbou nukleoproteinových filament na jednovláknové DNA k detekci homologních sesterských chromatid. Vytěsněné vlákno je přerušeno a páruje se opět s komplementárním vláknem helixu (crossing-over) za vzniku Hollidayova spoje. Prostřednictvím DNA polymerázy dochází k syntéze nové části DNA. Spojení volných konců posléze zajišťuje DNA ligáza. Komplexy kináz ATM a ATR s CHK2 a CHK1 mohou aktivovat nádorový supresor p53 a vést tak k zástavě buněčného cyklu, indukci senescence či apoptózy. Zárodečná mutace v genu *ATM* má za následek neurodegenerativní, autozomálně recesivně dědičné onemocnění zvané ataxia teleangiectasia (AT), charakterizované progresivní mozečkovou ataxií, okulomotorickou apraxií, choreoatetózou, záněty vedlejších nosních dutin a plic, imunodeficiencí, okulokutánní teleangiektázií a radiosenzitivitou se zvýšeným rizikem rozvoje akutní lymfoblastické leukémie a lymfomů.

Incidence karcinomu prsu v mladším věku je u pacientů s mutací genu *ATM* 2krát až 3krát vyšší oproti nepostížené populaci. Aplikace inhibitorů PARP1 u pacientů s mutací v genu *ATM*, stejně jako u případů s prokázanou mutací genu *BRCA1* či *BRCA2*, vede k syntetické letalitě nádorových buněk v důsledku jejich vystupňované apoptózy. Průkaz mutace genu pro kinázu CHK2 a zárodečné mutace genu *TP53* (56 – 74 %) je dáván do souvislosti s již zmíněným autozomálně dominantním dědičným *Li - Fraumeniho syndromem* (LFS), který predisponuje nemocné ke vzniku širokého spektra nádorů. Mezi nádory vznikající v rámci LFS můžeme jmenovat například sarkomy měkkých tkání a kostí, karcinom prsu, karcinom kůry nadledvin či nádory mozku.

Nádory prsu s typickým velmi mladým věkem pacientek v době stanovení diagnózy (méně než 30 let věku) patří mezi vůbec nejčastější neoplazie asociované s LFS (Penkert J. et al., 2018). Histologicky bývají tyto nádory popisovány jako invazivní karcinomy NST s průkazem amplifikace genu *c-erbB-2* a phyllodes nádory. Mezi geny udržujícími integritu genomu pomocí mechanismu HR řadíme rovněž geny *BRCA1* a *BRCA2*. Přítomnost mutované formy genu *BRCA* byla zjištěna u 5 % pacientek s karcinomem prsu, a to převážně u subtypu TNBC (57,1 %). V případě, že dojde ke ztrátě funkce genů *BRCA1* a *BRCA2*, přebírají jejich úlohu pro zachování integrity genomu geny *PARP*.

1.1.1d Geny regulující apoptózu

Apoptóza neboli geneticky naprogramovaná buněčná smrt, je považována za aktivní děj. Jde o mechanismus sloužící k eliminaci nadbytečných či poškozených buněk a udržení stabilního počtu buněk v průběhu prenatalního a postnatalního života. Aktivací cysteinových proteáz (kaspáz) dochází k hydrolýze cytoskeletálních proteinů a další aktivací DNáz k degradaci jaderné DNA a zástavě všech biosyntetických pochodů v buňce. **Geny regulující apoptózu** mají úlohu proapoptotickou i antiapoptotickou. V patogenezi karcinomů prsu se uplatňují geny *APAF1*, *DAPK1* s proapoptotickou funkcí a geny *BCI-2*, *PSMC3IP*, *EPSTII* s protiapoptotickou funkcí (Loginov V. I. et al., 2017).

1.1.2 Epigenetické změny v patogenezi nádorů

Epigenetické změny jsou reverzibilní a hereditárně podmíněné procesy, které zahrnují převážně změny metylace DNA, modifikaci histonů a alteraci exprese miRNA, čímž jsou ovlivněny cílové receptory nebo signální dráhy. Stanovení epigenetických změn probíhajících u karcinomů prsu může sloužit k predikci odpovědi na léčbu. Modulace epigenetických regulátorů představuje nový slibný terapeutický cíl, a to zejména u hormonálně dependentních a k endokrinní léčbě rezistentních nádorů (inhibitory DNA metyltransferáz, acetylace a deacetylace histonů).

1.1.2a Methylace DNA

K nejdůležitějším modifikacím v rámci epigenetických změn patří *methylace DNA*. Podílí se na regulaci exprese genů asociovaných s normálním vývojem a růstem mléčné žlázy. Methylace CpG promotorů regulačních genů je zajišťována pomocí DNA metyltransferáz (gen *DNMT1*, *DNMT3a* a převážně *DNMT3b*), jejichž zvýšená exprese byla u karcinomů prsu v recentních studiích jednoznačně prokázána (Kullmann K. et al., 2013; Sun M. Y. et al., 2012). K dalším regulátorům methylace CpG je řazena i rodina „methyl – CpG - binding domain“ proteinů (MeCP - MBD) zasahující na úrovni transkripce (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4). Do souvislosti se vznikem a progresí karcinomu prsu je dáována rovněž hypermethylace CpG promotorů nádorových supresorových genů (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*, *CCND2a*), genů regulujících opravu poškozené DNA (*BRCA1*, *MLH1*, *MGMT*), genů celulární detoxikace (*GSTP1*), adheze a invaze (*TWIST1*, *CDH1*, *TIMP3*) či hormonálních receptorů (*ER*, *PR*) a genů regulujících apoptózu (*HOXA5*, *TMS1*).

1.1.2b Posttranslační modifikace histonů

Posttranslační modifikace histonů zahrnuje jejich fosforylaci, ubikvitinaci, metylaci a demethylaci, acetylaci a deacetylaci (Pang-Kuo L., Saraswati S., 2008). V současné době probíhají studie zaměřené především na výzkum účinku inhibitorů deacetylace histonů (vorinostat, entinostat a panobinostat) včetně jejich užití v kombinacích s cytotoxickou (paklitaxel), hormonální (tamoxifen) či cílenou anti - HER2 (trastuzumab) a anti - VEGF (bevacizumab) terapií (Abdel-Hafiz H. A. et al., 2015).

Potenciální inhibitory acetylace histonů jsou kyselina anakardiová získaná z ořechů kešu či kurkumin (Zhao Q. et al., 2018; Imran M. et al., 2018). Metylace a demethylace histonů, která je zprostředkována metyltransferázou a demetylázou je omezena na aminokyseliny arginin a převážně lysin. Zatímco metylace H3K4 (SMYD3), H3K36 nebo H3K79 indukuje transkripci, metylace H3K27 proteinem EZH2 vede k její represi a je popisována u agresivních a metastazujících forem karcinomů prsu. Snížení exprese proteinu SMYD3 (novobiocin, tranilcypromin) vede v *in vitro* studiích k inhibici proliferace a migrace buněk. Mechanismem účinku inhibitorů proteinu EZH2 je indukce apoptózy nádorových buněk. Potlačení genové exprese (genový „silencing“, RNA interference) je dáváno do souvislosti s metylací H3K9, H3K20 či H3K27. Demethylace H3K4, p53 a DNMT1 je zprostředkována proteinem LSD1, jehož zvýšená exprese odráží agresivní biologické chování u subtypů karcinomu prsu „HER2 - enriched“ a TNBC. Zvýšená exprese enzymů modifikujících histony (LSD1, EZH2) koreluje s inaktivací regulačních genů. Inhibitory metylace a demethylace (biguanidin a jeho analoga) pak mohou indukovat re - expresi těchto inaktivovaných genů. (Vasilatos S. N. et al., 2013; Lei A. et al., 2019).

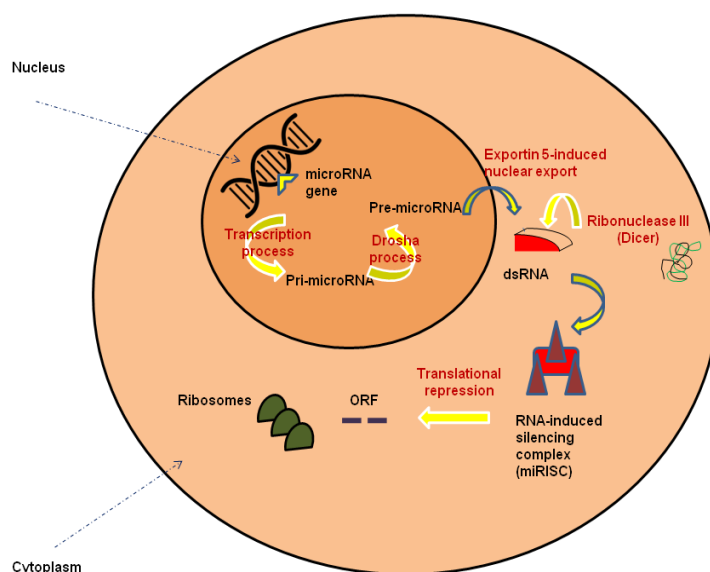
1.1.2c miRNA

Změny exprese mikroRNA (miRNA) jsou zodpovědné za vznik řady onemocnění včetně poruch funkce imunitního systému či nádorové transformace buněk a rezistence k farmakologické i radiační terapii. V posledních letech je jim jako možným prognostickým a prediktivním ukazatelům věnována pozornost v souvislosti s nalezenými změnami koncentrací v séru. MiRNA byly poprvé popsány v roce 1993 týmem profesora Victora Ambrose (Lee R. C. et al., 1993; Sempere L. F. et al., 2019). V průběhu výzkumu prováděného na modelovém organismu hlístice *C. elegans* zjistili, že nedostatečná funkce genu *lin-4*, který má stěžejní úlohu v larválním stádiu vývoje tohoto parazita, vede nejen ke vzniku jeho vývojových abnormalit, ale také překvapivě i ke vzniku malých RNA molekul o délce 22 až 61 nukleotidů. Malé RNA molekuly posléze rozdělili na skupiny *lin-4S* („short“) a *lin-4L* („long“). Další sekvenční analýzou těchto skupin odhalili schopnost interakce *lin-4S* s 3' nepřekládanou oblastí (3' UTR) mRNA genu *lin-14*. Tato interakce vedla následně k inhibici exprese jim kódujícího stejnojmenného proteinu. Jako druhá molekula s obdobnými vlastnosti byla u zmíněného mikroorganismu popsána tzv. *let-7* RNA, jejíž výskyt byl spolu s *lin-4* v roce 2001 potvrzen u několika živočišných druhů včetně člověka.

Dnes již široce používané označení miRNA je výhradně určeno pro malé nekódující, endogenní a stabilní jednořetězcové RNA molekuly s délkou od 18 do 25 nukleotidů. Geny pro miRNA jsou lokalizovány na všech somatických chromozomech a gonozomu X. MiRNA mají tendenci vytvářet klastry či rodiny a jejich sekvence je s výjimkou druhově specifických krátkých RNA fylogeneticky konzervována. Podle vztahu k definovaným transkripčním jednotkám je dělíme na mezigenové miRNA, intronové miRNA, miRtrony a exonové miRNA. MiRNA jsou částečně či úplně komplementární k jedné nebo více mediátorové RNA (mRNA) zodpovědné za přenos genetické informace z DNA do primární struktury proteinu. MiRNA se podílejí na kontrole více než poloviny lidských genů prostřednictvím jejich negativní regulace na posttranskripční úrovni a mají tak klíčovou úlohu v řadě fyziologických biologických procesů (buněčný růst a proliferace, diferenciace tkání, embryogeneze či apoptóza).

Biosyntéza miRNA probíhá v několika krocích (obrázek č. 1). Geny pro miRNA jsou nejprve účinkem RNA polymerázy II transkribovány do primárních transkriptů (pri - miRNA), které jsou následně transformovány působením RNázy III Drosha na prekursorové RNA (pre - miRNA). Exportin-5 přenáší pre - miRNA z jádra do cytoplazmy, kde jsou modifikovány RNázou III Dicer do forem dvouřetězcových RNA. Tyto RNA se posléze vážou na 3'- nepřekládanou oblast mRNA nebo ORF komplex cílových genů a snižují expresi jimi ovlivňovaných proteinů z důvodu degradace mRNA nebo inhibice translace. Některé miRNA jsou ovšem schopny vazby na 5'- nepřekládanou oblast (5' UTR) mRNA nebo ORF komplexu a jejich efekt je zcela opačný.

Obrázek č. 1: Biosyntéza miRNA



1.1.3 Fenotypové znaky maligní nádorové transformace

Růst nádoru je umožněn získáním několika vlastností, které v roce 2000 poprvé popsali a posléze v roce 2011 doplnili autoři Hanahan a Weinberg (Hanahan D., Weinberg R. A., 2000; 2011):

1. genomová nestabilita (kap. 1.1)
2. nezávislost na růstových signálech buňky
3. ztráta zpětně vazebné a kontaktní inhibice buněk
4. indukce procesu angiogeneze
5. neomezený replikační potenciál
6. poškození mechanismu apoptózy
7. únik z imunitního dozoru (kap. 1.5.3.2.2a)
8. invaze do okolní tkáně i do krevních a/nebo lymfatických cév a metastazování

1.1.3a Nezávislost na růstových signálech

Nezávislost na růstových signálech je dána aktivací receptorů pro růstové faktory vlivem mutací, jejich amplifikací a/nebo nadměrnou expresí či zvýšenou autokrinní produkcí růstových faktorů. Tato aktivace vede k trvalému přenosu mitogenních signálů do jádra buňky s následnou transkripcí DNA a stimulací buněčného cyklu.

Centrální úlohu v regulaci buněčné proliferace má rodina transkripčních faktorů MYC, zastoupená především c-Myc, N-Myc a L-Myc. Aktivace **protonkogenu MYC** na onkogen byla prokázána u řady nádorových onemocnění včetně karcinomu prsu. Gen *MYC* se podílí na regulaci exprese proteinové i nekódující RNA a tím nařízení ústředních drah buněčného metabolismu (glutaminolýza, glykolýza), apoptózy, proliferace, diferenciaci i na ovlivnění mechanismů lékové rezistence. Zvýšená exprese MYC byla prokázána u 30 až 50 % „high grade“ karcinomů prsu (Blancato J. et al., 2004). U hormonálně dependentních karcinomů prsu je aktivace onkogenu *MYC* zprostředkována geny indukovanými estrogeny (například *HSPC11*) a transkripčním faktorem AP-1 a jeho aktivace odpovídá až za 50 % případů rezistence k endokrinní terapii (Fallah Y. et al., 2017). Z molekulárních tříd karcinomů prsu je však gen *MYC* nejmarkantněji exprimován u nádorů s „triple“ negativním imunofenotypem.

Protonkogeny Ras patří do rodiny genů kódujících malé monomerické G-proteiny schopné vázat GTP (N-Ras, H-Ras a K-Ras). Za fyziologických poměrů oscilují proteiny Ras mezi stavem přenosu signálu do jádra (katalýza výměny nukleotidu pomocí proteinu SOS) a stavem inaktivním (hydrolyza GTP na GDP). Aktivace proteinu Ras je stejně jako u proteinu MYC klíčová pro regulaci buněčného dělení stimulací kinázy PI3K či RAF serin/threonin kináz, které jsou součástí MAP kinázové mitogenní kaskády regulující transkripční faktor AP-1. Transkripční faktor AP-1 se podílí na řízení buněčného cyklu mimo jiné aktivací genů pro cyklin D1 (*CCND1*), který spolu s CDK4/6 zajišťuje vstup do fáze G1 buněčného cyklu a její průběh.

Cyklin - dependentní kinázy (CDK) a jejich regulační podjednotky **cykliny** zajišťují průchod jednotlivými fázemi buněčného cyklu (cyklin-D/CDK4/6 – průchod G1 fází, cyklin-E/CDK2 – přechod G1 fáze do S fáze, komplex cyklin-A/CDK2 – průchod S fází, komplexy cyklin-A/CDK2 a cyklin B/CDK1 – průchod G2 fází a přechod do M fáze) nebo transkripci (CDK 7-13, CDK 19 a CDK 20) (Slabý O. et al., 2015). Po navázání cyklinu na specifickou CDK dochází po fosforylaci cílových proteinů na aminokyselinách serin a threonin, vedoucí k odkrytí jejich aktivního místa, ke konformační změně její katalytické podjednotky. Kontrola buněčného cyklu zprostředkovaná CDK je tedy víceúrovňová a probíhá prostřednictvím vazby s cykliny či inhibitory CDK (rodina p16^{ink4a} a p21^{Cip/Kip}). Na regulaci mitózy se podílejí serin/threoninové kinázy Aurora typů A až C. Zvýšená exprese cyklinu E či jeho defektní odbourávání, zvýšená exprese cyklinu D1 způsobená amplifikací jeho genu či zvýšení exprese kináz Aurora patří mezi příčinychybnéregulace na úrovni buněčného cyklu (Slabý O. et al., 2015). Zvýšená exprese a/nebo amplifikace genu *c-erbB-2*, snížená nebo chybějící exprese hormonálních receptorů a porušená regulace signální dráhy CDK4/6–INK4–pRb patří u karcinomů mléčné žlázy k potenciálním mechanismům vzniku rezistence na endokrinní terapii (Osborne C. K., 2011). Cílené ovlivnění **genů autofagie LC3 a Beclin-1** vede u TNBC, konkrétně inhibicí cyklinu D1 a genů signální dráhy uPAR/Integrin β1/Src, k útlumu buněčné proliferace, migrace a schopnosti buněčné invaze (Hamurcu Z. et al., 2018). Jako další poškozené receptory, uplatňující se v patogenezi karcinomu mléčné žlázy, a v budoucnu nové potenciální terapeutické cíle můžeme zmínit například FGFR, IGF-1R a IGF-2R (Chen L., 2018; Ekyalongo R. C., Yee D., 2017).

1.1.3b Ztráta zpětně vazebné a kontaktní inhibice buněk

Pro normální průběh buněčného cyklu, buněčnou proliferaci a diferenciaci je nezbytná striktní kontrola zachování rovnováhy stimulačních a inhibičních signálů. Schopnost buňky vyvarovat se abnormálnímu dělení závisí na funkci zpětně vazebných regulačních mechanismů, které jsou zajišťovány apoptózou a zkracováním telomer. Poruše těchto dějů jsou věnovány kapitoly 1.1.3d a 1.1.3e. Kontaktní inhibice buněčné proliferace je typická pro normální buňky, pokud jejich denzita ve tkáni dosáhne určité hodnoty. Tuto schopnost nádorové buňky ztrácí a jsou schopné se dělit i při dosažení denzního limitu (Hanahan D., Weinberg R., 2000).

1.1.3c Angiogeneze

Angiogeneze je komplexní proces, při kterém dochází k novotvorbě kapilár z již existujících cév pučením („sprouting angigenesis“) nebo vchlipováním („intussusceptive angiogenesis“) (Adair T. H., Montani J. P., 2010). S angiogenezí se setkáváme jak za fyziologických (embryonální vývoj vaskulárního systému, reparace endometria v průběhu menstruačního cyklu) tak patologických okolností (hojení ran, zlomenin a nekrotizace, chronické zánětlivé procesy, růst nádoru). Základním stimulem pro *novotvorbu cév pučením* jsou stavy spojené se sníženou perfúzí a hypoxií tkání vedoucí k aktivaci hypoxií indukovaných faktorů HIF-1a a HIF-2a. Angiogeneze pučením probíhá v několika etapách. Prvním krokem je degradace bazální membrány kapilár a extracelulární matrix (ECM) působením matrixových metalo - proteáz (MMP) aktivovaných tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF- α) s uvolněním dalších proangiogenních (vaskulární endotelový růstový faktor – VEGF, transformující růstový faktor α – TGF- α , růstový faktor fibroblastů – FGF a hepatocytů – HGF, destičkový růstový faktor – PDGF, destičkový endotelový růstový faktor - PD-EGF, integriny, interleukiny - IL-1, IL-6, IL-8 a angiopoetiny) a zároveň inhibičních faktorů nutných k její zpětně vazebné regulaci (například trombospondin, angiostatin, endostatin, tumstatin, tkáňové inhibitory metaloproteáz). Vlivem VEGF-A dochází k vytvoření fibrinové sítě a stimulaci produkce proteinu Delta-like-4, ligandu receptoru Notch. Aktivace intercelulární Delta-Notch signální dráhy je nezbytná pro migraci a proliferaci endotelií s tvorbou útvarů podobným pupenům. Morfogeneze cév je posléze dokončena tubulizací pupenů s vytvořením cévního lumen (E-kadherin) a stabilizací cévní stěny proliferací fibroblastů se syntézou kolagenu (EGF) a adhezí pericytů. V průběhu *angiogeneze intususcepce* dochází k vchlípení protilehlých stěn kapiláry do lumen cévy a rozdělením do dvou nových.

Tento způsob novotvorby cév je oproti angiogenezi pučením daleko rychlejší a efektivnější, neboť vyžaduje pouze reorganizaci existujících endotelií. Uplaňuje se především v průběhu embryonálního vývoje. *Nádorová angiogeneze (neovaskularizace)* je umožněna stimulací novotvorby cév z kapilárního řečiště v okolí nádoru a přísunem endotelií z cirkulujících endotelových progenitorových buněk kostní dřeně. Angiogenní faktory mohou být produkovány doprovodnou zánětlivou populací či buňkami stromatu. Neovaskularizace zajišťuje přísun živin a růstových faktorů nezbytných pro vyvíjející se nádor a umožňuje jeho invazi do krevních či lymfatických cév a metastazování.

1.1.3d Neomezený replikační potenciál

Neomezený replikační potenciál nádorových buněk souvisí s poruchou funkce telomer, tj. nukleoproteinových komplexů na koncích chromozomů obsahujících opakující se sekvence DNA bohaté na guanin (TTAGGG). Vytvořením protektivní čepičky kolem genomové DNA zabraňují telomery ztrátám a aberantním fúzím chromozomů v průběhu mitotického dělení buňky. Délka telomer je udržována a kontrolována pomocí reverzní transkriptázy (telomerázy) a bílkovinného komplexu telomer zvaného shelterin. Fyziologický projev buněčného stárnutí neboli senescence je vysvětlován nízkou či chybějící aktivitou reverzní transkriptázy v somatických buňkách vedoucí k progresivnímu zkracování telomer na koncích chromozomů, aktivaci proteinů p53 a pRb a ztrátě schopnosti buněčného dělení, tj. replikativní senescence. Mutacemi v genech *TP53* a *RB* dochází k opakovanému spojování chromozomálních konců za vzniku dicentrických chromozomů, dvouřetězcových zlomů DNA a genomické nestability (Satoru K. et al., 2003). V takovémto případě část buněk podlehne tzv. mitotické katastrofě a následné buněčné smrti. Nádorové buňky, stejně jako buňky zárodečné či imortalizované, jsou však schopny telomerázu reaktivovat, zabránit tak zkracování telomer a oběma procesům uniknout. Telomeráza, poprvé objevena v cíliích prvoka *Tetrahymena*, je tvořena RNA (hTERC) a katalytickou (hTERT) podjednotkou. RNA podjednotka slouží jako templát pro syntézu DNA telomery katalyzovanou reverzní transkriptázou. Zvýšená aktivita telomeráz byla zjištěna u 85 % všech nádorů (Phatak P., Burger A. M., 2007). Transkripční aktivace genu *hTERT* spolu s onkogeny *T-Ras* a *H-Ras* umožňuje přímou nádorovou konverzi původně normálních epitelových buněk a fibroblastů.

Podjednotka hTERT telomerázy je aktuálně zkoumána především v souvislosti s imunoterapií pokročilých karcinomů pankreatobiliární oblasti (prostřednictvím látek GV1001, Vx-001), nemalobuněčných karcinomů plic (GV1001, Vx-001) a maligního melanomu (GV1001, Vx-001, TAPCells, INVAC-1), karcinomů prostaty (GX301, UV1, GRNVAC1), ledvin (GX301) i prsu (Vx-001) (Mizukoshi E., Kaneko S., 2019).

V minulosti provedené výzkumy inhibice růstu nádoru indukci apoptózy prokázaly význam nejen cíleného ovlivnění hTERT podjednotky telomerázy, ale také proteinového komplexu shelterinu telomers TRF2 nebo POT1 či přítomnosti mutantní templátové RNA telomerázy (Mukherjee A. K. et al., 2018; Frescas D., de Lange T., 2014). Některé immortalizované a nádorové buňky mají dokonce schopnost zachovat délku telomer přes absenci aktivity telomerázy alternativním prodlužováním telomer (ALT) cestou homologní rekombinace (Dunham M. A. et al., 2000). Homeostáza systému telomery - telomeráza je kromě faktorů genetických ovlivňována i působením řady látek, které aktivitu telomerázy buď snižují (cisplatina, doxorubicin, antiestrogeny, androgeny, inhibitory reverzní transkriptázy) nebo zvyšují (chemické karcinogeny, gamma záření, estrogeny).

1.1.3e Porucha iniciace apoptózy

Porucha iniciace apoptózy vede k nárůstu počtu nádorových buněk. Tato porucha může být způsobena jak aberantní aktivací exogenní cesty zodpovědné za eliminaci regulačního vlivu imunokompetentních buněk, tak endogenní cesty umožňující přežívání a dělení nádorových buněk navzdory poškození DNA. *Vnější apoptotická dráha (membránová, receptorová)* je iniciována interakcí ligandu – faktoru smrti (TNF- α , TRAIL, FasL/CD95L) s transmembránovým receptorem – receptorem smrti (TNFR1, DR4 a/nebo DR5, CD95R). Tato vazba způsobí konformační změnu (oligomerizaci) receptoru, odkrytí tzv. domén smrti a navázání intracelulárních adaptorových proteinů (TRADD, FADD), přitahující pomocí efektorových domén smrti iniciační kaspázu 8. Tímto mechanismem vytvořený smrt buněk indukující signalizační komplex (DISC) vede k aktivaci kaskády efektorových kaspáz (Slabý O. et al., 2015). Aktivované efektorové kaspázy se posléze z tohoto komplexu uvolňují a aktivují signální dráhy, které vedou k hydrolýze proteinů a rozrušení jaderného a plazmatického cytoskeletu (exprese annexinu V a trombospondinu apoptotickými tělísky) a intranukleozomální degradaci DNA.

Poškození vnější apoptotické dráhy je u nádorů způsobeno somatickými mutacemi v genech pro receptory smrti. Zvýšená exprese receptoru Fas byla zaznamenána u 16 – 20 % hormonálně dependentních, 29 % „HER2-enriched“ a 49 % TNBC (Blok E. J. et al., 2017). Aberantní aktivace genu pro Fas u „luminal“ A či „luminal“ B molekulárního podtypu karcinomu prsu vysoce signifikantně koreluje s přežitím nemocných bez recidivy onemocnění a středně signifikantně s celkovým přežitím. Současné hodnocení receptoru Fas a intenzity CD8+ TILs se u TNBC jeví jako důležitý prognostický ukazatel. Pozitivní průkaz exprese proteinů formujících intermediární filamenta – cytokeratinu 8 a 18 vede u karcinomu prsu k inhibici apoptózy iniciované ligandem TRAIL a může posloužit jako případný prediktor rezistence nádoru k cílené terapii zaměřené na DR5 („death receptor“ 5) (Bozza W. P. et al. 2018). Heterogenní cytoplazmatická či jaderná distribuce receptoru TRAIL, přítomná až u 25 % karcinomů prsu, je asociována s horší prognózou onemocnění (Heilmann T. et al., 2019). Zvýšená exprese a aktivace receptorem TRAIL je navíc považována za jeden z možných mechanismů vzniku rezistence k monoklonární protilátce transtuzumabu užívané v terapii HER2 pozitivních karcinomů prsu (Díaz - Rodríguez E. et al., 2019). *Vnitřní apoptotická dráha (mitochondriální)* je naproti tomu stimulována poškozením DNA či poruchami metabolismu buňky a je regulována rodinou proteinů Bcl-2. Protein **Bcl-2** má stěžejní úlohu pro udržení integrity mitochondrií tím, že ovlivňuje propustnost její vnější membrány. Bcl-2 je široce exprimován v průběhu embryonálního vývoje, v dospělosti však jeho exprese zůstává zachována pouze v kmenových a replikujících se buňkách řady tkání. Řízení apoptózy se odvíjí od interakce genu *Bcl-2* s dalšími členy početné rodiny. Podle své funkce můžeme rodinu proteinů Bcl-2 rozdělit na proapoptoticky působící (Bax, Bak, Bok, Bcl-G, Bcl-rambo, Bfk, Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Noxa, Puma, Hrk, Beclin1, MULE), a protiapoptoticky působící (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl2l10, Bfl-1 či Bcl2l12). Proapoptotické proteiny Bax, Bak, proteiny Bid, Puma obsahující pouze doménu BH3, strukturní protein heptamerického komplexu apoptozomu, jehož vznik je ovlivněn translokací cytochromu C z intermembránového prostoru mitochondrie do cytoplazmy. Změna hladin proteinu Bcl-2 vede k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP) a aktivaci vnitřní mitochondriální dráhy.

1.1.3f Schopnost invaze a migrace nádorové buňky, vznik metastáz

Schopnost invaze a migrace nádorové buňky je stimulována snížením či vymizením proteinů intercelulárních spojů (E-kadherin, β -catenin, aktinový cytoskelet, integriny), k nimž dochází mutací jejich genů, hypermetylací promotoru, potlačením transkripce či proteolytickou degradací (matrixové metalo - proteázy, katepsin-B, katepsin-D, urokináza, kalikreiny). Proces vzniku metastáz vlivem buněk nádorového mikroprostředí vysvětluje teorie tzv. epitelo - mezenchymové tranzice (EMT), která je podrobněji popsána v kap. 1.5.3.3.

1.2 Vývojová stádia a morfogeneze mléčné žlázy

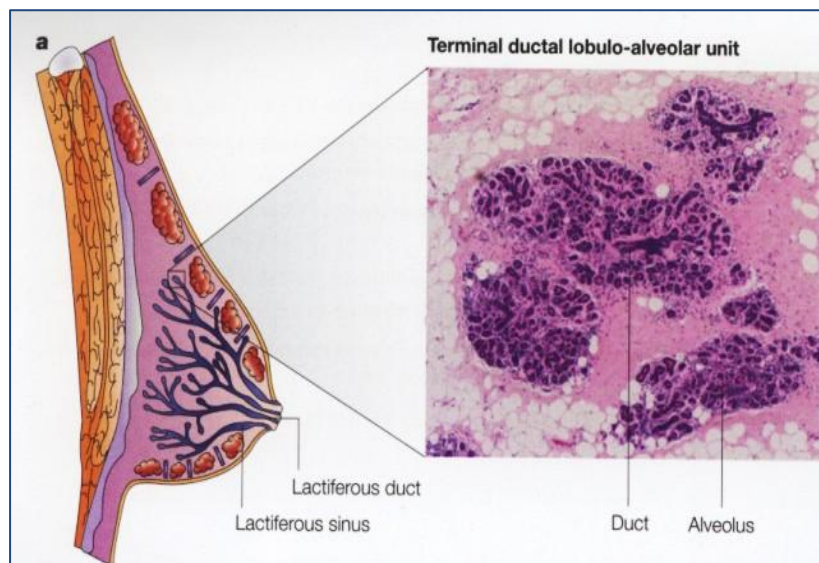
Prs je složitý orgán tvořený mléčnou žlázou spolu s tukovou a vazivovou tkání krytou kůží. Vývoj mléčné žlázy začíná záhy po gestaci a můžeme jej rozdělit do deseti intrauterinních fází (Sternlicht M. D., 2006). U obou pohlaví se mléčná žláza zakládá z mléčné lišty, která se formuje z ektodermy („ridge stage“) ve 4. až 5. týdnu embryonálního vývoje a je tvořena pruhem epitelu sahajícím od axily po tříslu. Za fyziologických okolností však mléčná lišta již v průběhu 6. až 7. týdne gravidity mizí a perzistuje jen ve formě dvou hrudních epitelových pupenů, které se dále mezi 10. a 20. týdnem gestace vychlipují do primárních a sekundárních váček. Vzniklé váčky se posléze do 32. týdne gravidity luminizují a až do ukončení fetálního období vytvářejí mléčné vývody vyrůstající do podkoží. Zatímco nejčasnější stadia embryogeneze probíhají nezávisle na steroidních hormonech, po 15. týdnu gravidity je struktura prsu významně ovlivněna řadou hormonů zahrnujícími růstové hormony, estrogeny, progesterony, androgeny i lidský choriový gonadotropin. U mužů se vývody mléčné žlázy vlivem působení androgenů terminálně zakončují. Naproti tomu u žen do 35 let věku dochází vlivem cyklické sekrece ovariálních hormonů, zejména estrogenu a progesteronu, k pozvolnému zmnožení stromatu, vývodů a vytvoření lalůček v průběhu prvního až druhého roku po menarche (Russo J., Russo I. H., 2004). Lalůček typu I je reprezentován terminální duktus - lobulární jednotkou (TDLU) (obrázek č. 2 a 3). Vystupňované pučení nových duktulů vede k přeměně v lalůček typu II, obsahující 47 duktulů a lalůček typu III s 80 duktuly. Kompozice lobulů je ovlivněna řadou exogenních a endogenních faktorů, mezi něž patří věk, počet a pravidelnost menstruačních cyklů, endokrinní dysbalance, užívání exogenně podávaných hormonálních přípravků a těhotenství. V období od puberty k menopauze prodělává tkáň mléčné žlázy řadu změn, při nichž průběžně mění svou velikost, tvar i funkci. Procentuální zastoupení TDLU se u nullipar v průběhu života téměř nemění, kdežto počet lobulů typu II významně klesá po 23 letech věku a lobuly typu III jsou prakticky nepřítomné.

Zcela opačná je situace u žen, které v časném fertlím věku alespoň jednou rodily. V takovýchto případech převažují až do 40 let věku lobuly typu III, kdy začínají involovat a posléze převažují lobuly typu I, od nichž se mimo jiné odlišují i svým expresním genetickým profilem. Proporcionální zastoupení žlázoého parenchymu tkáně prsu se mění z původních 10 % objemu mammy v pubertálním období na 30 % u adolescentů a mladých nullipar, přičemž jednotlivé typy lobulů jsou zastoupeny následovně: lobuly typu I 0 - 10 %, lobuly typu II 10 – 18 % a lobuly typu III 1 – 3 %.

Imunohistochemickým stanovením exprese markerů endotelu ve strukturách lalůčků můžeme rovněž stanovit tzv. angiogenní index, který je signifikantně nejvyšší u lobulů typu I a koreluje pozitivně s proliferační aktivitou a negativně s lobulární diferenciací. Diferenciace lalůčků je determinována expresí nádorového supresorového genu *MDGI* na chromozomu 1, patřícího do rodiny proteinů FABP. Jeho exprese je zeslabena u nízce diferenciovaných forem a rovněž u časných i pozdních stádií karcinomu prsu. Recentní studie prokázaly vliv těhotenství na zvýšenou expresi genu *MDGI*, a tím řádnou diferenciaci lalůčků nezbytnou pro prevenci karcinogeneze. Dalším faktorem podporujícím možný protektivní vliv těhotenství je působení hCG, který vazbou na svůj receptor LH/hCG stimuluje jak tvorbu žlutého tělíska, tak vyzrávání lalůčků mléčné žlázy a expresi proapoptotických genů. Vzájemná interakce stromální a epitelové komponenty mléčné žlázy představuje dynamický proces, k němuž významně přispívají hypofyzární růstové hormony a různé transkripční faktory. Mezi klíčové endokrinní a parakrinní stimulatory morfogeneze mléčné žlázy patří kromě zmíněných růstových hormonů a jejich receptorů i ovariální estrogény a ER- α , IGF-I a IGF1R stimuluující buněčnou proliferaci, protein ADAM17, TIMP3, proteiny proAREG a AREG, EGFR, FGF a FGFR2b, MMP14 aktivující MMP2 a degradaci kolagenu. Nelaktující mléčná žláza se ve své finální podobě skládá z 15-20 tuboalveolárních žláz, které utvářejí samostatné laloky. Jednotlivé laloky jsou od sebe odděleny kolagenním vazivem a tukovou tkání. Hlavní vývod každého laloku (ductus lactiferus) se terminálně nálevkovitě rozšiřuje (sinus lactiferus) a vyústuje na bradavce (porus lactiferus). V histologickém obraze je lobární vývod vystlán vnitřní vrstvou kubických až cylindrických buněk a zevní vrstvou myoepitelových buněk, v oblasti sinus lactiferus potom vícevrstevným dlaždicovým epitelem. Větve hlavního vývodu, resp. interlobulární vývody jsou tvořeny jednou vrstvou kubických buněk, bazální laminou a diskontinuální porporci myoepitelových buněk. Terminální kanálky interlobulárních vývodů propojují sekreční oddíly (acini) jednotlivých lalůčků.

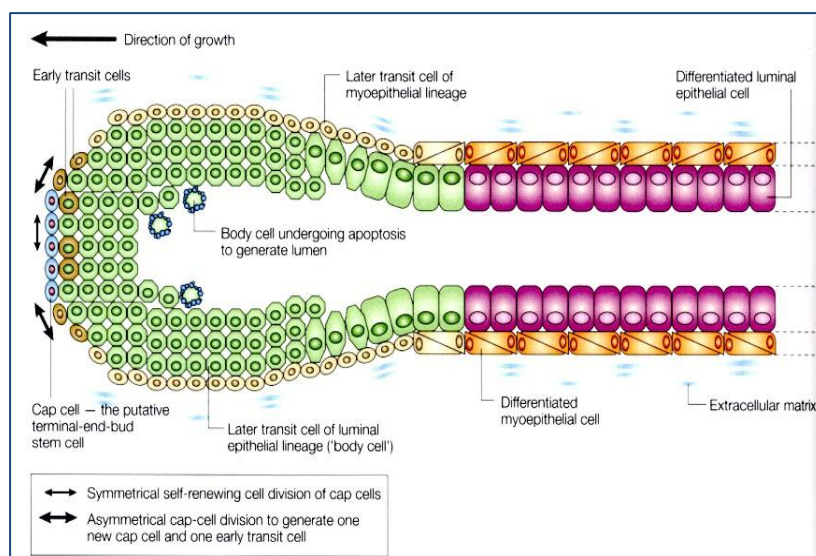
Pojivová tkáň lalůček sestává jednak z fibroblastů a fibrocytů produkujících kolegení vazivo a jednak z myxoidních buněk produkujících hlenovité substance. Dále jsou v ní přítomny histiocyty a nečetné lymfocyty. Interlobulární stroma je naopak tvořeno málo buněčnou vazivově tukovou tkání.

Obrázek č. 2: Schematický řez prsem s lokalizací terminální duktulo-lobulární jednotky (TDLU)



Zdroj: Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(11): 832-844.

Obrázek č. 3: Distribuce jednotlivých buněčných typů v TDLU mléčné žlázy



Zdroj: Smalley M, Ashworth A. *Stem cells and breast cancer: A field in transit.* *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(11): 832-844.

1.3 Epidemiologie a patogeneze vzniku prekursorových lézí a karcinomu mléčné žlázy

Výskyt neoplastických lézí mléčné žlázy koresponduje se třemi typy lalůček, které můžeme v průběhu vývoje tkáně mléčné žlázy rozlišit. První typ lalůček odpovídá funkční, tzv. terminální duktolobulární jednotce (TDLU). TDLU může být vlivem působení různých endogenních i exogenních faktorů zdrojem vzniku intraduktálních proliferujících lézí zahrnujících plochou epitelovou atypii, atypickou duktální hyperplazii, kolumnární léze a proliferujících intraduktálních papilárních lézí s tendencí vývoje in situ (DCIS) až invazivních karcinomů. Atypická lobulární hyperplazie (ALH) je asociována s tří- až pětinasobně zvýšeným rizikem vývoje karcinomu mléčné žlázy oproti nepostížené populaci žen (Page D. L. et al., 2003). Progresi lobulárního karcinomu in situ (LCIS) v invazivní lobulární karcinom zaznamenáváme pak u téměř poloviny případů (Wen H. Y., Brogi E., 2018).

Duktální karcinom in situ (DCIS) je považován za morfologicky i geneticky heterogenní prekursorovou lézi karcinomu mléčné žlázy a představuje přibližně 20 % všech diagnostikovaných nádorů prsu (Yeong J. et al., 2016).

Z dostupných údajů je odhadováno, že přibližně polovina všech karcinomů prsu vzniká právě na podkladě DCIS (Sanders M. E., 2005). V případě synchronního výskytu DCIS a invazivního karcinomu je počet alterovaných kopií DNA a spektrum aberantní exprese genů bližší invazivnímu karcinomu bez in situ komponenty v porovnání se samostatným výskytem DCIS (Kim S. Y., 2015; Hernandez L., 2012). Předmětem vědeckého výzkumu je určení faktorů progresu DCIS v invazivní karcinom (Lee S. et al., 2012; Gorringer K. L., Fox S. B., 2017). Podstatný význam přechodu in situ složky v invazivní nádor se přičítá působení faktorů nádorového stromatu, tj. extracelulární matrix (glykoproteiny, proteiny, proteoglykany, polysacharidy), myoepitelové vrstvě buněk, buňkám imunitního systému a s nádorovou desmoplazií asociovaným fibroblastům. V souladu s radiologickými nálezy je vysoká denzita vaziva v mléčné žláze považována za jeden z nejsilnějších rizikových faktorů vývoje karcinomu. Tento stav je obvykle provázen zvýšenou expresí genů specifických pro EMT. V recentních studiích byly rovněž zjištěny staticky významné rozdíly v alteraci genů asociovaných s epitelovou či stromální komponentou mezi DCIS a invazivním karcinomem. Hypermetylace DNA nádorových supresorových genů je považována za determinující epigenetickou změnu v patogenezi DCIS. Další významné epigenetické příčiny vývoje DCIS souvisí se změněnou expresí různých miRNA. Oproti normální tkáni mléčné žlázy byla v DCIS například zjištěna snížená exprese miRNA-132 indukující buněčnou proliferaci a let-7 regulující aktivitu ER- α . Naopak zvýšeně exprimována bývá miRNA-182 a miRNA-183 vedoucí k amplifikaci genu *CDH1* pro E-kadherin, miRNA-21 ovlivňující proteiny MSH2 a SMAD7 zapojených do signální dráhy řízené TGF- β včetně proteinu RB1CC1 negativně regulovaného miRNA-10b-5p. Zvýšená exprese miRNA-423 a miRNA-375 byla navíc specifická pro případy progredujícího DCIS v TNBC. Snížení až vymizení exprese genu *CDH1* na chromozomu 16 a zvýšení exprese MMP2 jsou jednoznačně zodpovědné za progresi DCIS v invazivní karcinom a reflektují potenciálně agresivní biologické chování nádoru (Cleton-Jansen A. M., 2001; Carraro D. M. et al., 2014).

Terapeutický přístup k DCIS je velmi individuální a je stanoven na základě vyhodnocení Van Nuys prognostického indexu (skóre 4 - 12), který zohledňuje velikost léze, věk pacientek v době diagnózy, jaderný „grade“, přítomnost či absenci „komedo“ nekrózy a vzdálenost léze od resekcčních linií (Silverstein M. J., Lagios M. D., 2015). Téměř 57 % pacientek s diagnózou DCIS podstoupí rozšířenou lokální excizi léze a následnou radioterapii. Riziko rekurence onemocnění po provedeném chirurgickém zákroku je 30 %, po doplněné radioterapii se snižuje na 15 %.

Rutině prováděné stanovení exprese hormonálních receptorů (ER, PR) umožňuje pacientkám případně dále profitovat z antihormonální terapie (tamoxifen).

Lobulární karcinom in situ (LCIS) byl poprvé popsán v roce 1941 jako vzácná varianta karcinomu mléčné žlázy (Foote F. W., Stewart F. W., 1941). LCIS je diagnostikován převážně u postmenopauzálních žen okolo 50 let věku. Popisovanou genetickou změnou v patogenezi LCIS je vznik somatické mutace v genu *CDH1*, *PIK3CA* či *CBFB* (Sakr R. A. et al., 2016). Riziko jeho přechodu v invazivní lobulární karcinom (ILC) se zvyšuje až desetinásobně (Maxwell A. J. et al., 2016). Multicentrický výskyt LCIS je možno zaznamenat u 60-80 % pacientek, postižení obou prsů u 20 - 60 % (Wen H. Y., Brogi E., 2018). Lobulární neoplazie (ALH, LCIS a ILC) jsou charakterické svou aberantní či vymizelou expresí E-kadherinu a naopak zvýšenou cytoplazmatickou expresí cateninu p120. Přestože je LCIS považován za prekursorovou lézi karcinomu mléčné žlázy, doporučuje se v současnosti konzervativní terapie s podáním tomoxifenu či inhibitorů aromatáz.

Zhoubné novotvary (ZN) prsu představují v České republice nejčastější onkologické onemocnění u žen s vrcholem výskytu okolo 65 let věku. Podle nejnovějších dostupných dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS ČR, www.uzis.cz) zauímají ZN prsu 18% všech hlášených nádorů. Incidence ZN prsu v roce 2016 činila 134,4 případů na 100 000 žen a je v dlouhodobém časovém horizontu stále na vzestupu. Přestože mortalita vykazuje mírně klesající tendenci, patří ZN prsu po ZN trachey, bronchů a plic k nejčastějším onkologickým příčinám úmrtí. Úspěch léčby je z velké části přisuzován efektivnímu screeningovému programu karcinomu prsu pro ženy od 45 let věku, probíhajícímu ve dvouletých intervalech a s tím souvisejícímu časnému záchytu lézí. V roce 2016 se screeningu zúčastnilo 62,9 % cílené populace žen. V souvislosti s tímto programem také v posledních letech vzrostl i záchyt in situ karcinomů mléčné žlázy, jež je oproti roku 2011 zvýšen o 41,1 %. Relativní pětileté přežití léčených pacientů u nádorů I. klinického stádia dosahuje téměř 100 %, u II. klinického stádia dosahuje téměř 90 %.

1.4 Molekulární třídy karcinomů prsu – historie a současnost

Na základě typického expresního profilu bylo postupně navrženo několik způsobů třídění karcinomů prsu. Toto rozdělení přispělo nejen k pochopení patogeneze onemocnění, ale zejména ke stanovení nových potenciálních terapeutických cílů a nových efektivnějších léčebných postupů. Vůbec poprvé byly karcinomy prsu rozděleny na základě genetického profilování do čtyř molekulárních podtypů kolektivem autorů Perou C. M. et al. (2000). Ti ve své práci navrhli členění na skupinu lumbálních karcinomů s expresí CK 8/18, ER a genů podílejících se na aktivaci ER, skupinu karcinomů s nadměrnou expresí transmembránového proteinu HER2, variantu „normal breast-like“ asociovanou s vysokou expresí genů pro bazální epitelové a protukové buňky při nízké expresi genů pro luminální buněčnou výstelku a podtyp „basal-like“ s nízkou expresí HR i proteinu HER2 při zvýšené expresi CK bazálních buněk a genů souvisejících s proliferační aktivitou. Teprve následně provedená analýza luminálního podtypu karcinomů prsu dala o rok později vznik podtypům „luminal A“ a „luminal B“. Došlo tak vytvoření celosvětově uznávaného schématu zahrnujícího 5 molekulárních tříd „luminal A“, „luminal B“, „HER2 - enriched“, TNBC a „claudin - low“ (Sorlie T. et al., 2001; Prat A. et al., 2015). Nejasně definovány zůstávaly stále nádory s nadměrnou expresí genu *c-erbB-2* na chromozomu 17, a to vzhledem k jeho možné expresi i u „luminal“ B podtypu (Li Z. H. et al., 2016; Ades F. et al., 2014). V roce 2010 byl navíc popsán další, tzv. „claudin - low“ podtyp karcinomů prsu s nízkou expresí proteinů těsných buněčných spojů - claudin 3, 4 a 7, kalcium dependentního mezibuněčného adhezivního glykoproteinu E-kadherinu a s vyšší tendencí k přechodu do procesu EMT (Prat A. et al., 2010). Imunohistochemicky se „claudin - low“ karcinomy prsu vyznačují CD44+ a CD24- expresním profilem na povrchu buněčných membrán, potvrzující jejich vztah k nádorovým kmenovým buňkám (CSCs). V 61 až 71 % případech spadají „claudin - low“ karcinomy prsu do molekulární třídy TNBC s častějším výskytem medulárního morfotypu či metaplastického typu diferenciaci. Recentní studie rovněž dokazuje význam této skupiny karcinomů prsu pro predikci kompletní patologické odpovědi (pCR) po aplikované chemoterapii (Sabatier R. et al., 2014).

1.5 „Triple“ negativní karcinomy prsu

1.5.1 Definice, epidemiologie a klasifikace TNBC

TNBC jsou považovány za morfologicky a geneticky heterogenní skupinu karcinomů prsu, charakterizovanou nízkou či nulovou expresí steroidních receptorů (estrogenový a progesteronový receptor) a receptoru HER2/neu/ERBB2, nebo absencí amplifikace jeho genu, se specifickým biologickým chováním a odpovědí na léčbu (Lebert J. M. et al., 2018). TNBC reprezentují 15 až 20 % všech karcinomů prsu a jsou asociovány s nižším stupněm diference, respektive vyšším „grade“, častějším postižením regionálních lymfatických uzlin vznikem orgánových metastáz, bez odpovídajícího terapeutického zásahu s relapsem onemocnění v období kratším pěti let, kratší dobou celkového přežití pacientů i přežití specifického pro karcinomy prsu (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Morris G. J. et al., 2007). Medián přežití pacientek s generalizovaným onemocněním je udáván okolo 13 měsíců (Kassam F. et al., 2009). Výskyt TNBC je častější u žen před menopauzou, u žen s časnou menarché, vyšším „body mass indexem“ (BMI) v premenopauzálním období, u žen patřících k afroamerické a hispánské etnické skupině či u žen s prokázanou zárodečnou mutací *BRCA1/2* genu nebo somatickou mutací *TP53* genu. Za další významný rizikový faktor vzniku karcinomu prsu je specificky u nosiček *BRCA1/2* mutantního genu považována dignostická i terapeutická expozice ionizujícímu záření (Drooger J. C. et al., 2015).

V minulosti bylo podle expresního profilu navrženo několik způsobů klasifikace TNBC. Jedno z nejjednodušších schémat dělí TNBC pouze na skupiny „basal - like“ a „normal breast - like“ podle zvýšené exprese cytokeratinu 5/6 (CK 5/6) a receptoru pro EGFR ve skupině „basal - like“ (Zeng Z. et al., 2017). Tato skupina bývá v porovnání s „normal breast - like“ TNBC charakterizována vyšší mitotickou aktivitou, nižším stupněm diference (vyšším „grade“) a tím i horší prognózou související s časným metastazováním do plic a centrálního nervového systému. Podrobnější je rozdělení TNBC na „basal - like“ variantu s expresí CK 5/6 a EGFR, variantu exprimující ARa „claudin - low“ variantu (Ma C. X. et al., 2010). V současné době je však nejznámější dělení TNBC podle Lehmannových fenotypů, které bylo navrženo v roce 2011 (Lehmann B. D. et al., 2011).

O pár let později, v roce 2015, kolektiv autorů Burstein M. D. et al. (2015) analyzoval u 198 TNBC profil RNA i DNA a popsal kromě lumenálního podtypu s expresí AR (LAR) a mezenchymového podtypu (MES) i podtyp aktivovaný „basal - like“ (BLIA) a imunitním systémem suprimovaný (BLIS) s nejkratším přežitím bez známek onemocnění (DFS) a nádorově specifickým přežitím (DSS). Prognosticky nejpříznivější se naopak jevil podtyp BLIA. V rámci popsaných podtypů autoři identifikovali i terapeuticky ovlivnitelné proteiny: AR a protein MUC1 u podtypu LAR, receptory růstových faktorů (receptor PDGF-A, c-Kit) u podtypu MES, imunosupresivní molekulu VTCN1 u BLIS a molekulu transdukce signálu Stat či cytokiny u podtypu BLIA, který je charakterizován nadměrnou infiltrací imunokompetentními buňkami a zvýšenou expresí genů regulujících B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky. Téhož roku publikovali své výsledky čipové analýzy exprese genů u 107 TNBC i autoři Jézéquel P. et al. (2015). V této studii byly TNBC rozděleny do molekulárního podtypu LAR (22 %), „basal - like“ s nízkou imunitní odpovědí a vysokou proporcí buněk podobných M2 makrofágům (45 %) a „basal - enriched“ s výraznou imunitní reakcí, avšak nízkým zastoupením buněk podobných M2 makrofágům (33 %). V roce 2016 byl pak včleněn podtyp obohacený o mezenchymové znaky či imunokompetentní buňky spolu s podtypem LAR a „basal-like“ (Ahn S. G. et al., 2016). Nejčastější „basal - like“ TNBC se rovněž staly předmětem zájmu programu „The Cancer Genome Atlas“, využívající metod sekvenování genomu a bioinformačních technologií k vytvoření seznamu genetických mutací zapojených do patogeneze nádorů. U TNBC byla tímto způsobem potvrzena přítomnost četných mutací v genu *TP53*, zvýšená proliferační aktivita, aktivace signální dráhy řízené PI3K, ztráta funkce nádorových supresorových genů *RBI* a *BRCA1* a v neposlední řadě genetická souvislost se serózními ovariálními karcinomy, reprezentována mutacemi genů *TP53*, *ATM*, *BRCA1* a *BRCA2*, expresí genů *AKT3* a *MYC*, amplifikací genu pro *cyklin E1a* a inaktivací genu *RBI*. Změny v počtu kopií genů *KRAS*, *BRAF* a *EGFR* otevírají možnost dalších terapeutických úvah (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

1.5.2 Analýza TNBC podle Lehmannových fenotypů

Přestože jsou TNBC obecně považovány za chemosenzitivní nádory, setkáváme se u nich s odlišnou odpovědí na léčbu či dokonce s primární a sekundární rezistencí (Svoboda M. et al., 2012). Jedním z možných způsobů vysvětlení tohoto jevu je značná genetická heterogenita uvnitř TNBC. Cílem vědeckého výzkumu je tudíž snaha o nalezení nových prediktorů léčebné odpovědi a potenciálních terapeutických cílů.

Rozsáhlé genetické profilování souboru pacientů s TNBC provedené v roce 2011 Lehmannem a jeho spolupracovníky genetickou heterogenitu potvrdilo (Lehmann B. D. et al., 2011). Ve zmíněné studii byly TNBC rozčleněny na luminalní podtyp s expresí androgenových receptorů, podtyp „basal - like“ 1 a 2 (BL1, BL2), podtyp mezenchymový (M), z multipotentních mezenchymových kmenových buněk (MSL) a imunomodulační (IM). Nejvíce TNBC spadá do „basal – like“ molekulárního podtypu, jehož buňky tím, že exprimují CK 5/6, napodobují bazální epitelové buňky vývodů a vzájemně se liší zvýšenou expresí Ki-67 u BL1 (17 %) a p63 a CD10 u BL2 (7 %). Tzv. Lehmannovy fenotypy se staly východiskem pro chápání molekulární podstaty TNBC a rovněž podnětem pro další nezbytné analýzy.

1.5.2a „Basal - like“ podtypy TNBC

BL-1 a BL-2 se vyznačují expresí genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a proliferace (*AURKA*, *AURKB*, *CENPA*, *CENPF*, *BUB1*, *TTK*, *CCNA2*, *PRC1*, *MYC*, *NRAS*, *PLK1* a *BIRC5*), genů signalizace DNA poškození (*CHEK1*, *FANCA*, *FANCG*, *RAD54BP*, *RAD51*, *NBN*, *EXO1*, *MSH2*, *MCM10*, *RAD21* a *MDC1*) a ztrátou kontrolních bodů buněčného cyklu. BL-1 a BL-2 se vzájemně liší zvýšenou expresí Ki-67 (*MKI67*) u BL-1 a p63 (*TP63*) a CD10 (*MME*) u BL-2, které potvrzují jeho původ v bazálních, resp. myoepitelových buňkách. V porovnání s ostatními skupinami TNBC je však procentuální vyjádření proliferativní aktivity pomocí jaderné exprese Ki-67 u obou podtypů signifikantně vyšší (BL-1 a 2 = 70 % vs. ostatní podtypy TNBC = 42 %; $p < 0,05$), z čehož vyplývá vyšší pravděpodobnost efektivnější terapeutické a případné kompletní patologické odpovědi na podání inhibitorů mitotické aktivity (paklitaxel, docetaxel) v rámci systémové léčby. BL-2 je pak dále navíc charakterizován přítomností genů signálních drah pro růstové faktory (EGF, NGF, HGFR, Wnt/ β -catenin a IGF1R), glykolýzu a glukoneogenezi.

1.5.2b Imunomodulační podtyp TNBC

V patogenezi imunomodulačního podtypu (IM) TNBC se významně uplatňují geny ovlivňující imunitní procesy. Ty zahrnují signální dráhy imunokompetentních buněk (pomocné CD4⁺ T-lymfocyty, NK buňky, B-lymfocyty, dendritické buňky) související s produkcí cytokinů (interleukinu 12 a 7), s rozpoznáním a prezentací antigenu a také signální dráhy vedoucí k transdukci signálu z cytokinových receptorů do jádra a následně aktivaci transkripčních faktorů důležitých pro zajištění exprese genů imunitní a zánětlivé odpovědi či buněčné proliferace, migrace, diferenciaci a apoptózy (NFκB, TNF a JAK/STAT signální dráha). Tento podtyp je asociován převážně s medulárním karcinomem mléčné žlázy, tedy poměrně vzácnou entitou TNBC s příznivou prognózou.

1.5.2c Podtypy TNBC z mezenchymových a z multipotentních mezenchymových kmenových buněk

Mezenchymový podtyp (M) je spjat s expresí genů a regulací signálních drah spojených s migrací či diferenciací buněk (Wnt, ALK, TGF-β) a interakcí buněčných receptorů s ECM (extracelulární matrix). Podtyp z multipotentních mezenchymových kmenových buněk (MSL) je rovněž dáván do souvislosti s migrací buněk (Rho) a buněčnou diferenciací (ALK, TGF-β a Wnt/β-catenin). Kromě toho je však MSL podtyp asociován i s EMT, signální dráhou ERK1/2, inositol fosfátovým metabolismem, ABC transportním proteinem, adipocytokiny, expresí EGFR a PDGF a nízkou expresí claudinů 3, 4 a 7, vymezející popsaný „claudin – low“ molekulární podtyp TNBC. Další rozdíl mezi M a MSL podtypem spočívá v nízké expresi proliferačních genů a genů charakteristických pronádorové kmenové buňky (*ABCA8*, *PROCR*, *ENG*, *ALDH1*, *PER1*, *ABCBI*, *TERF2IP*, *BCL2*, *BMP2*, *THY1* a početné geny *HOX*) nebo pro mezenchymové kmenové buňky (*BMP2*, *ENG*, *ITGAV*, *KDR*, *NGFR*, *NT5E*, *PDGFRB*, *THY1* a *VCAMI*). Histologickým korelátem M a MSL podtypu TNBC je metaplastický karcinom s agresivním biologickým chováním.

1.5.2d Luminální podtyp s pozitivitou androgenového receptoru

Luminální podtyp s pozitivitou androgenového receptoru (LAR), doprovázený častým výskytem apokrinního typu diferenciace, je nejlépe diferencovaným subtypem TNBC. LAR odpovídá luminálním epitelovým buňkám ductů mléčné žlázy s výrazně zvýšenou expresí genů, jakými jsou například *FOXA1*, *KRT18* a *XBPI*. Přestože je tato skupina ER negativní, podílí se na regulaci hormonálních signálních drah zahrnujících syntézu steroidů včetně androgenů i estrogenů a na regulaci metabolismu porfyrinů.

1.5.3 Prognostické a prediktivní ukazatele u TNBC

Chemoterapie je v současné době považována za jedinou systémovou léčebnou modalitu. Novým trendem výzkumu je tedy získání a do klinické praxe uvedení nových terapeutických přístupů založených na cíleném ovlivnění v patogenezi se uplatňujících molekul jakými jsou například AR, EGFR, PARP, protein p53 a Bcl-2, různé miRNA, lncRNA a siRNA, molekuly angiogeneze či signálních drah Notch, Hedgehog, Wnt/ β -catenin a PI3k/Akt/mTOR. Základním kritériem diagnostiky však zůstává precizní určení morfologie a histologického typu nádoru patologem, v poslední době i v kontextu s nabývajícím prognostickým významem intenzity lymfo/plazmocytárního zánětlivého infiltrátu (TILs).

1.5.3.1 Molekulární prognostické a prediktivní znaky u TNBC

Jednotlivé molekulární prediktivní znaky můžeme podle jejich funkce rozdělit na proteiny uplatňující se v regulaci apoptózy, genové exprese, opravy poškozené DNA či migrace a proliferace buněk (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Rozdělení molekulárních prognostických a prediktivních znaků u TNBC

Regulátory apoptózy	Fas, TRAIL, p53, Bcl-2
Regulátory genové exprese	mikroRNA, lncRNA, siRNA
Regulátory opravy poškozené DNA	BRCA1, BRCA2, PARP
Regulátory migrace a proliferace buněk	EGFR, VEGF

1.5.3.1.1 Proteiny regulující apoptózu

1.5.3.1.1a Receptory buněčné smrti Fas a TRAIL - markery rodiny TNF

Receptor Fas (CD95R) je transmembránový protein, patřící do poměrně početné rodiny cytokinových receptorů zvaných tumor nekrotizující faktory (TNF; „tumor necrosis factor“). V rámci imunitního systému se účastní regulace buněčné multiplikace, diferenciace a programované buněčné smrti. U člověka je protein CD95 kódován genem lokalizovaným na dlouhém raménku chromozomu 10 (10q24.1). CD95R receptor smrti je tvořen třemi doménami - extracelulární, transmembránovou a intracelulární (cytosolickou). Navázáním solubilního membránového ligandu cytotoxických T-lymfocytů CD95 (CD95L, FasL) dochází k tvorbě komplexu DISC a spuštění vnější apoptotické dráhy. Zvýšená exprese CD95R byla zjištěna až u 49% TNBC (Blok E. J. et al., 2017). Štěpením extracelulární domény receptoru, zprostředkované účinkem MMP, vzniká solubilní ligand cl-CD95L, který je zodpovědný za aktivaci imunitní odpovědi, EGFR a onkogenní c-yes/Ca²⁺/PI3K signální dráhy, a to selektivní interakcí s katalytickou podjednotkou β za vzniku komplexu indukujícího buněčnou proliferaci (MISC) (Tauzin S. et al., 2011). Zvýšené sérové hladiny CD95L u pacientek s TNBC korespondují s expresí CD95L v nádorových buňkách i CD31 pozitivních endoteliích krevních cév. Ektopická exprese CD95L nádorovými krevními cévami a detekce sérových hladin cl-CD95L predikuje u těchto pacientek metastatický potenciál nádoru (Malleter M. et al., 2013). Snížená exprese receptoru Fas (CD95R) je tedy ukazatelem horší prognózy onemocnění. Na významu nabývá jeho korelace s intenzitou CD8⁺ TILs (Blok E. J. et al., 2017).

Ligand **receptoru TRAIL** aktivuje vnější apoptotickou dráhu u mezenchymového podtypu TNBC (Rahman M. et al. 2009). Průkaz exprese vimentinu a tyrosin kinázového receptoru AXL zde může výrazně napomoci k predikci odpovědi na terapii příslušnými agonisty (Dine J. L. et al., 2016). Agonisté receptoru TRAIL („TNF - related apoptosis - inducing ligand“) tedy představují potenciální protinádorové molekuly díky jejich schopnosti indukce apoptózy prostřednictvím aktivace receptorů smrti DR4 a/nebo DR5 a to při současné minimální toxicitě k normálním buňkám. Pozitivní terapeutický efekt zvláště u generalizovaných TNBC má nově popsaná molekula MEDI3039 cílící na DR5 (Greer Y. E. et al., 2019).

1.5.3.1.1b Nádorový supresor p53

Mutace v genu *TP53* byla zjištěna u 60 až 88 % TNBC. Nemutovaný a plně funkční *TP53* produkuje tzv. „wild - type“ protein p53 (wt - p53), který spouští signální kaskádu, zahrnující přímé ovlivnění proteinu p21 či nepřímou aktivaci PTEN, CDK1, CDK2, PARP1 a BRCA1, které se uplatňují při zástavě buněčného cyklu a umožňují opravu poškozené DNA. Postranlační modifikace wt - p53 je zajištěna enzymy Pin1, epigenetické změny probíhají na úrovni acetylace histonů. Strukturální a funkční podobu s wt - p53 vykazují i proteiny p63 a p73, které jsou schopné transaktivovat jeho cílové molekuly. Je prokázáno, že izoforma proteinu p73 může být u TNBC inhibována nejen mutantní formou p53, ale i izoformou p73 či p63, což je důležité pro přežití buněk (Bisso A. et al., 2011; Leong C. O. et al., 2007; Troester M. A., 2006). Exprese genů asociovaných s mutovaným p53 je považována za prediktor celkového přežití (OS) i prediktor délky bezpříznakového období (DFS). Ovlivnění genů zapojených do regulace proteinu p53 a jeho izoform (Cyklin G2, Sharp-1, PI3K/AKT/mTOR, Chk1, CDK, Hsp90, Mdm2, histonová deacetyláza) může být jednou z cest vedoucích k nové léčebné strategii TNBC (Turner N. et al., 2013).

1.5.3.1.1c Proapoptotický protein Bcl-2

Proapoptotický protein Bcl-2 je u nemocných s TNBC považován za nezávislý nepříznivý prognostický ukazatel přežití (Ozretic P. et al., 2018) a zároveň prediktor odpovědi na léčbu. Exprese proteinu Bcl-2 negativně koreluje se stupněm diferenciaci nádoru („grade“) a naopak pozitivně s velikostí nádoru a zakládáním metastáz do regionálních lymfatických uzlin. Užití inhibitorů Bcl-2 působí protektivně vůči vzniku rezistence jak k chemoterapii, tak k imunoterapii (García - Aranda M. et al., 2018; Inao T. et al., 2018). Kromě vlivu na uvedené lékové rezistence byla rovněž popsána proteinem Bcl-2 indukovaná rezistence k radioterapii, související s aktivací genu *STAT3* a redukcí reaktivních kyslíkových forem (Lu L. et al., 2018).

1.5.3.1.2 Regulace genové exprese

1.5.3.1.2.1 Malé nekódující molekuly miRNA

Tyto malé nekódující molekuly jsou schopny různým způsobem regulovat proces kancerogeneze, angiogeneze, buněčné proliferace a migrace, mechanismus EMT i zánětlivou odpověď. Z funkčního hlediska se dají miRNA rozdělit na molekuly se supresorovým, onkogenním a metastatickým potenciálem. V klinické praxi mohou v budoucnu sloužit jako ukazatelé prognózy onemocnění, predikce odpovědi na léčbu či třeba vysvětlovat mechanismy vzniklé lékové rezistence. Některé cirkulující formy miRNA rovněž nabývají významu diagnostických a screeningových markerů.

1.5.3.1.2.1a MiRNA se supresorovým a anti - metastatickým potenciálem u TNBC

Supresorový či anti-metastatický efekt miRNA se může projevat jako:

1. Inhibice buněčné proliferace a migrace
2. Omezení procesu EMT
3. Zvýšení exprese genů opravy poškozené DNA
4. Indukce programované buněčné smrti
5. Interakce s cílovými proteiny a lncRNA

MiRNA-1 je známá pro svůj recipročně inhibiční vztah s lncRNA MALAT1 (Jin C. et al., 2016), vedoucí k zástavě buněčné proliferace, migrace a indukci apoptózy. V literatuře je podrobně analyzována početná rodina **miRNA-200** a **let-7** (Boyerinas B. et al., 2010). Proapoptotickým účinkem se díky přímému řízení receptoru EPHA2 vyznačuje **miRNA-200a**. Další členové této rodiny se například zapojují do negativní regulace EMT (**miRNA-200b-3p** a **miRNA-200b-5p**) a omezují buněčnou migraci, proliferaci a metastatický potenciál inhibicí proteinkinázy Ca (**miRNA-200b**) (Tsouko E. et al., 2015; Humphries B. et al., 2014; Rhodes L. V. et al., 2015). **MiRNA-26** a **miRNA-31** omezují metastatický potenciál TNBC regulací cílových mRNA a proteinů (miRNA-26a – MTDH; miRNA-31 - WAVE3) či interakcí s lncRNA (miRNA-31 – lncRNALOC554202) (Liu P. et al., 2015; Valastyan S. et al., 2010; Sossey-Alaoui K. et al., 2007; Augoff K. et al., 2012).

Nádorově supresorová **miRNA-34b** je transkripčním cílem proteinu p53 a přímým regulátorem proteinu Notch2, který hraje významnou úlohu v buněčné diferenciaci a je u karcinomu prsu sníženež exprimován (Yamakuchi M. et al., 2009; He L. et al., 2007). **MiRNA-34a** **miRNA-148** jsou rovněž zmiňovány jako ukazatelé nepříznivé prognózy onemocnění (Xu X. et al., 2016). Mutace p53 vede nejen ke snížení jejich hladin, ale i supresi proteinu Snail1 a aktivaci procesu EMT (Kim N. H. et al., 2011). V predikci odpovědi na léčbu může sloužit **miRNA-101**, **miRNA-125b** a **miRNA-1296**. Zatímco miRNA-101 a miRNA-1296 zvyšují senzitivitu k paklitaxelu a cisplatině, miRNA-125b ovlivňuje EMT a mechanismus rezistence k protinádorové terapii (Liu X. et al., 2015; Hong L. et al., 2016; Phan B. et al., 2016). V souvislosti s regulací molekul zapojených do EMT (RASAL2, Wnt3, β -catenin, E-kadherin - ZeB1 a Slp1, Twist, Prrx1) je popisována i exprese **miRNA-136**, **miRNA-141**, **miRNA-195**, **miRNA-205**, **miRNA-300** či **miRNA-655** (Yan M. et al., 2016; Wu H. et al., 2009; Lv Z. D. et al., 2016).

Mechanismem účinku **miRNA-145**, která se kromě karcinomu prsu uplatňuje i v patogenezi karcinomu tlustého střeva či myelodysplastického syndromu, je regulace protonkogenu *ROCK1* a buněčných inhibitorů apoptózy (cIAP1). Aktivace opravy poškozené DNA genem *BRCA1* je zprostředkována **miRNA-185** (Tang H. et al., 2014). Mezi další mikroRNA inhibující buněčnou proliferaci a migraci ovlivněním specifických proteinů signálních drah patří **miRNA-203** (BIRC5, LASP1), **miRNA-211** (CDC25B, CCNB1, FOXM1), **miRNA-340** (SOX17), **miR-378** (Runx1), **miRNA-448** (lncRNA MALAT1, KDM5B), **miRNA-544** (Bcl6, STAT3) a **miRNA-206** (PFKFB3, connexin43).

1.5.3.1.2.1b *MiRNA s onkogenním a metastatickým potenciálem u TNBC*

MiRNA-10b je malá nekódující RNA molekula s onkogenním a metastatickým potenciálem v důsledku zvýšení syntézy transkripčního faktoru *HoXD10* a následné aktivace genu *RhoC*, jehož nadměrná exprese je u karcinomu prsu ukazatelem horší prognózy onemocnění. GTPáza Rho patří do obsáhlé rodiny proteinů Ras a je nezbytná pro regulaci cytoskeletálních funkcí buňky, tedy buněčné migrace, adheze a polarizace. Aktivace genu *RhoC* vede k indukci schopnosti invaze a proliferace (Lang S. et al., 2017). Společně s **miRNA-26a**, **miRNA-146a** a **miRNA-153** se miRNA-10b podílí na negativní regulaci exprese genu *BRCA1* (Fkih M'hamed I. et al., 2015). Kromě metastazujícího TNBC byla miRNA-10b zjištěna u agresivních a prognosticky velmi nepříznivých nádorů, jakými jsou multiformní glioblastom, anaplastický astrocytom či karcinom pankreatu.

Cílovou molekulou pro **miRNA-15a** je cyklin E1 kódovaný genem *CCNE1*, který se za normálních okolností uplatňuje v regulaci přechodu G1 fáze do S fáze buněčného cyklu a ovlivňuje tak buněčnou proliferaci. Podle výsledků multivariační analýzy autorů Shinden Y. et al. (2015) by mohla nízká exprese miR-15a u TNBC posloužit jako nezávislý prognostický faktor. Za další slibný prognostický faktor s funkcí obdobnou cyklinu E1 je u TNBC považován jaderný fosfoprotein ANP32E, jehož transkripčním cílem je protein E2F1 a je asociovaný s kratším celkovým přežitím pacientů a vyšším rizikem rekurence onemocnění (Xiong Z. et al., 2018).

MiRNA-21, kódovaná genem *MIR21* na chromozomu 17 je jednou z nejčastějších zvýšeně exprimovaných mikroRNA u solidních nádorů. Svou antiapoptotickou aktivitou, ovlivněním EMT, nádorového supresoru tropomyosinu 1 a genu *pDCD4* je zodpovědná za buněčný růst, angiogenezi, schopnost proliferace a invaze (Dong G. et al., 2014; Chen J. et al., 2014). Zvýšená exprese miRNA-21 koreluje u TNBC s pokročilým rozsahem nádoru, horší prognózou onemocnění a kratším přežitím pacientek a může tedy sloužit jako prognostický prediktivní faktor, a to především ve vztahu k nádorovému stromatu (MacKenzie T. A. et al., 2014; Yan L. X. et al., 2008).

MiRNA-29 reguluje N-myc, adhezivní molekuly a metylaci DNA, čímž ovlivňuje proces EMT (Jiang H. et al., 2014; Rostas 3rd J. W. et al., 2014). Jejím cílovým proteinem je, společně s **miRNA-30** a **miRNA-200**, jedna ze sestřihových variant proteinu ADAM12, která má u karcinomu prsu význam v predikci odpovědi na chemoterapii (Duhachek - Muggy S. et al., 2015).

Vysoké sérové hladiny **miRNA-122** jsou u pacientek s karcinomem prsu asociovány s vyšším metastatickým potenciálem nádoru, což je vysvětlováno zablokováním příjmu glukózy a snížením aktivity pyruvátkinázy (Fong M. Y. et al., 2015).

MiRNA-135b je schopna indukovat buněčnou migraci, proliferaci a invazi ovlivněním enzymu LATS2, zakorpaného do oblasti centrozomu v průběhu interfáze a časně i pozdní metafáze buněčného cyklu. Molekuly signální dráhy LATS2 by proto mohly být v budoucnu u TNBC potenciálním terapeutickým cílem (Hua K. et al., 2016).

Za fyziologických okolností je **miRNA-146** spolu s **miRNA-155** považována za mediátor zánětu a vrozené imunitní odpovědi. **MiRNA-146a**, **miR-146b-5p**, **miRNA-498** či **miRNA-638** vedou k inaktivaci genu *BRCA1* u „basal - like“ TNBC, jejímž důsledkem je porucha opravy poškození DNA cestou HR (Garcia A. I. et al., 2011; Matamala N. et al., 2016; Zavala V. et al., 2016). Zvýšená exprese miRNA-146a koreluje s postižením regionálních lymfatických uzlin a kratším celkovým přežitím pacientek (Kumaraswamy E. et al., 2015). Aktivace **miRNA-155** spouští onkogenní signální dráhu vedoucí k inhibici apoptózy a je jedním z markerů rezistence k chemoterapii. Negativní korelace miRNA-155 s von Hippel-Lindau nádorovým supresorovým genem (*VHL*) je asociována s pokročilým rozsahem onemocnění, vyšším výskytem metastáz do regionálních lymfatických uzlin a tím i horší prognózou onemocnění (Kong W. et al., 2014). Regulací TGF- β indukuje miRNA-155 proces EMT a schopnost buněčné invaze a metastazování. TGF- β se naopak spolu s aktivinem podílí na expresi **miRNA-18**, jež je selektivně prokazatelná u generalizovaného TNBC (Taylor M. A. et al., 2013).

Slibnou terapeutickou modalitou se zdá inhibice exprese **miRNA-182**, **miRNA-221** a **miRNA-222** či jejich cílových proteinů (miRNA-182 - PFN1; miRNA-221/222 – uPAR, RHOC, p27^{Kip1}) (Liu H. et al., 2013; Falkenberg N. et al., 2015; Miller T. E. et al., 2008). Nezávislými prognostickými ukazateli přežití pacientek s TNBC se pak jeví miRNA-210 a miRNA-301 (Camps C. et al., 2008; Yu H. et al., 2014).

1.5.3.1.2.1c Cirkulující formy miRNA a jejich prognostický a prediktivní význam u TNBC

MiRNA jsou stabilně přítomny v lidském séru vlivem protektivního účinku endogenně uvolňované RNázy, která umožňuje jejich uniformní amplifikaci a kvantifikaci. Detekce cirkulujících forem miRNA představuje pro pacienta minimálně invazivní postup, jímž lze získat cenné screeningové, diagnostické, prognostické či prediktivní informace o probíhajícím nádorovém onemocnění. Cirkulující miRNA mohou vypovídat o (Slabý O., Svoboda M. et al., 2012):

- indikaci k cílené terapii
 - například miR-30a, miR-373, miR-199a-5p a miR-495
- pravděpodobnosti recidivy onemocnění
 - například miRNA-107, miRNA-652, miRNA-21-5p, miRNA-375, miRNA-205-5p, miRNA-194-5p, miRNA-382-5p, miRNA-376c-3p a miRNA-411-5p
- pravděpodobnosti generalizace nádoru
 - například miRNA-141, miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-203, miRNA-210, miRNA-375 a miRNA-801
- citlivosti k systémové léčebné modalitě
 - například miRNA-195

1.5.3.1.2.2 lncRNA a circRNA

Dlouhé nekódující RNA jsou molekuly o délce 200 a více nukleotidů, které nevedou ke vzniku proteinů. Jsou však schopny ovlivňovat expresi genů, aktivovat transkripci, onkogenní (lncRNA MALAT1) a supresorové signální dráhy (lncRNA RMST, MIR503HG) či EMT, čímž u řady nádorů nabývají na významu jako další potenciální terapeutické cíle či diagnostické a prognostické markery (Zuo Y. et al., 2017; Wang L. et al., 2018; Fu J. et al., 2019; Zou Y. et al., 2018). Na epigenetické úrovni jsou zodpovědné za metylaci DNA, postup translace, konjugaci s mRNA a miRNA.

Mezi nově popsané lncRNA u TNBC patří například DANCR („lncRNA - differentiation antagonizing non-protein coding RNA“), jejíž zvýšená produkce iniciuje fosforylaci RXRA („retinoid X receptor alpha“) proteinem GSK3 β („glycogen synthase kinase-3“, izoforma beta) a stimuluje onkogenní signální dráhu PI3K/AKT (Tang J. et al., 2018). LncRNA indukují epigenetické změny zvýšením exprese miRNA-34a, miRNA-15a, miRNA-16 a let-7a (lncRNA sONE) nebo snížením exprese miRNA-218 (lncRNA CCAT1) a regulují tak biologické chování nádoru (Youness R. A. et al., 2019; Han C. et al., 2019). Některé lncRNA mohou rovněž indukovat terapeutickou odpověď na podání systémové léčby (lncRNA GAS5) (Li J. et al., 2019). V recentní studii kolektivu autorů Adhikary J. et al. (2019) je rovněž poukázáno na obdobný význam nové třídy lncRNA, tzv. cirkulárních RNA (circRNA), kódovaných genem *circPVT1* na chromozomu 8.

1.5.3.1.2.3 siRNA

SiRNA jsou malé nestabilní interferující RNA molekuly, které jsou organismem poměrně rychle eliminovány. Díky své schopnosti negativně regulovat expresi protonkogenu Bcl-2 a p-glykoproteinu jsou u TNBC považovány za jeden z možných mechanismů vzniku rezistence k chemoterapii. Podle recentní literatury je možná jejich konjugace s nanočásticemi oxidu křemičitého a v kombinaci s aplikovanou chemoterapií mohou představovat novou léčebnou strategii budoucnosti (Darvishi B. et al., 2017). Potenciálním terapeutickým cílem u TNBC se zvýšenou expresí EGFR může být unimolekulární pH/redox duální nanočástice (Chen G. et al., 2017).

1.5.3.1.2.3 Androgenový receptor

Androgenové receptory (AR) patří spolu s ER, PR, receptorem pro glukokortikoidy a mineralokortikoidy mezi jaderné steroidní hormonální receptory. Gen pro AR je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu X. Androgeny (testosteron, resp. dihydrotestosteron), které se na ně váží, jsou za fyziologických okolností důležitými regulátory vývoje nejrůznějších tkání a orgánů. AR tvoří tři hlavní funkční domény - transkripční N-terminální doména, DNA-vázebná doména a C-terminální doména. Funkce AR jako transkripčního faktoru moduluje aktivitu steroidy regulovaných genů nebo mění postranskripční děje vyúsťující ve změny hladiny specifických mRNA a proteinů.

Indukcí exprese jaderných protoonkogenů jsou AR schopny podporovat růst některých nádorů. AR je exprimována 5 – 30 % lumenálních epitelových buněk normální mléčné žlázy, popřípadě buněk, které jeví známky apokrinní metaplazie. Zvýšená exprese AR pak byla popsána u 60 % až 80 % karcinomů prsu. Svou interakcí se signálními dráhami PI3K/Akt/mTOR, MAPK, ER či receptorem pro protein HER2 hraje AR významnou roli v patogenezi tohoto onemocnění (Christopoulos P. F. et al., 2017; Rampurwala M. et al., 2016; Lehmann B. D. et al., 2014). U TNBC byla v závislosti na velikosti souboru a stanoveném prahu zaznamenána zvýšená exprese AR u 6,6 až 75 % případů. Exprese AR má být asociována s nižším „grade“, nižší proliferací i menším rozsahem onemocnění. Absence AR je tedy považována za faktor spojený s vyšším rizikem recidivy onemocnění a výskytem lokálních i vzdálených metastáz nádoru (Rampurwala M. et al., 2016; Bhattarai S. et al., 2019).

1.5.3.1.3 Proteiny uplatňující se při opravě poškozené DNA

1.5.3.1.3a Poly (ADP-ribóza) polymeráza

Poly (ADP-ribóza) polymeráza (PARP) zahrnuje rodinu 18 enzymů, zapojených do různých mechanismů odpovědi na poškození buňky. Nejpočetněji zastoupené PARP-1, popsaná v roce 1963, méně PARP-2 (10-15% aktivity PARP), mají důležitou roli v reparaci poškozené DNA cestou BER („base excision repair“). Schopností PARP je přenášet podjednotky (ADP) – ribózy z NAD⁺ na akceptorový protein za vzniku dlouhých, větvených a negativně nabitých polymerů poly - ADP ribózy. Nejpočetněji zastoupená PARP-1, popsaná v roce 1963 a PARP-2 patří mezi klíčové regulátory BER. PARP-1 je vysoce vývojově konzervovaný enzym tvořený NH₂-terminální doménou, vázající úsek poškozené DNA, se třemi „Zinc fingers“, automodifikační doménou a C-terminální katalytickou doménou (Slabý O. et al., 2015). Konformační změna vzniklá po navázání PARP na místo poškozené DNA umožňuje katalýzu přenosu ADP-ribózy z NAD navlastní molekulu a histony H1, čímž rozvolňuje strukturu chromatinu a atrahuje další proteiny opravy poškozené DNA (například DNA ligáza 3, DNA polymeráza β a protein XRCC1). Degradace nepotřebných PARP probíhá působením poly (ADP-ribóza) glykohydrolázy.

Ztráta aktivity PARP-1 výrazně zvyšuje senzitivitu buněk k exogennímu i endogennímu poškození. Defektní aktivita PARP-1 byla popsána zejména u nádorů asociovaných s deficiencí genu *BRCA1* a/nebo *BRCA2* (karcinom prsu a ovaria). U TNBC vede farmakologická inhibice PARP k indukci buněčné smrti pomocí tzv. syntetické letality a může v kombinaci s jinými léčivy přispět k zesílení účinku podané terapie. Tento jev se ukazuje být přínosný pro klinickou praxi v kombinaci inhibitorů PARP (iniparib, olaparib, niraparib, veliparib, talazoparib, rucaparib) s chemoterapií a/nebo inhibitory molekul signální dráhy PI3K/AKT/mTOR, inhibitory deacetylase histonů, inhibitory CDK1, EGFR, AR, ATM či MYC (Geenen J. J. J. et al., 2018; Carey J. P. W. et al., 2018; Comen E. A. et al., 2010). Mezi popsané mechanismy vzniku rezistence k inhibitorům PARP jsou řazeny například sekundární mutace v genu *BRCA1* a *BRCA2*, zvýšená regulace genů kódující P-glykoproteinové pumpy nebo ztráta proteinu 53BP1 („p53 - binding protein 1“).

1.5.3.1.3b Nádorové supresory *BRCA 1* a *BRCA2*

Geny *BRCA1* a *BRCA2* jsou nádorové supresorové geny účastníci se regulace fází S a G2 buněčného cyklu. Jako transkripční faktory se podílejí na mechanismu opravy jednořetězcových zlomů DNA a zabraňují tak jejich konverzi v méně stabilní dvouřetězcové zlomy. Gen *BRCA1* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 17, kde se rozprostírá na 24 exonech a je rozložen přes 100 Kb DNA. Gen *BRCA2* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 13, zaujímá 27 exonů a přes 70 Kb DNA. Oba genové produkty, proteiny pBRCA1 a pBRCA2 jsou umístěny v buněčném jádru a spolupůsobí přímo či nepřímo s proteiny p53 a RAD51. V momentě dvouřetězcového zlomu DNA spouští proteinkináza ATM fosforylační kaskádu vedoucí k fosforylaci pBRCA1 a jeho následné interakci s proteinem RAD51, který je transportován do místa poškození pomocí pBRCA2 a zprostředkovává její opravu cestou homologní rekombinace (HR). Heterozygotní zárodečná mutace v genu *ATM* vede ke středně významnému riziku vývoje karcinomu prsu (Hamdi Y. et al., 2017).

Familiární výskyt karcinomu prsu, tzn. přítomnost prokazatelného onemocnění u minimálně jednohopříbuzného, vykazuje 20 až 30 % žen. Mutace v genu *BRCA1* je přítom zjištěna u 40 % případů, z toho až u poloviny nemocných s TNBC (Bouchalova K. et al., 2016; Bayraktar S. et al., 2011). Dědičné autozomálně dominantní genové mutace *BRCA1/2* se však vyskytují pouze u 5 až 10 % nemocných žen. Vedou často ke vzniku karcinomů prsu již v mladém věku, tj. před dosažením 30. roku života. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu se pohybuje u nosičů mutace v obou genech *BRCA1* i *BRCA2* od 40 do 80 %. Prognóza onemocnění se však od sporadických karcinomů neliší (Comen E. A. et al., 2010). Mutace v genech *BRCA1/2* je rovněž asociována i s vyšší incidencí ostatních malignit, a to zejména karcinomů ovarii (60 % riziko vniku pro *BRCA1* a 10 – 20 % pro *BRCA2*). Somatická mutace genů *BRCA1/2* je u nehereditárních forem karcinomů prsu a ovaria poměrně vzácná a bývá, zejména v případě genu *BRCA1*, zaznamenána zejména u níže diferencovaných nádorů. Snížená exprese pBRCA1 rezultuje jak z hypermetylace promotoru svého genu, tak například ze snížené exprese regulačních proteinů (Rice J. C. et al., 2010; Turner N. C. et al., 2006).

V literatuře se můžeme setkat s označením „**BRCAness**“ (Lord C. J. et al., 2016; Sharma P. et al., 2016). Tento pojem shrnuje molekulární a morfologické znaky sporadických i familiárních karcinomů prsu s prokázanou mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Kromě zmíněného „triple“ negativního fenotypu zahrnuje i mutace v genu *TP53*, amplifikaci genu a/nebo zvýšenou expresi proteinu EGFR, výskyt histologických „medulárních“ znaků nádoru, tj. přítomnost ohraničeného tumoru s expanzivním způsobem růstu, synciciální morfologií, různě intenzivním TILs a nízkým stupeň diference nádoru („grade“). Podobné charakteristiky byly zjištěny i v případě popsaných somatických mutací jiných genů zahrnutých do mechanismů reparace poškozené DNA cestou HR (*ATM, ATR, BAP1, CDK12, CHEK2, FANCA/C/D2/E/F, PALB2, NBS1, WRN, RAD51B/C/D, MRE11A, BLM, CHEK1*). Přítomnost mutovaných forem těchto genů by teoreticky mohla umožnit použití obdobných léčebných modalit jako u případů s mutací v genech *BRCA1* či *BRCA2*.

1.5.3.1.4. Proteiny ovlivňující migraci a proliferaci buněk

1.5.3.1.4a Receptor pro epidermální růstový faktor- EGFR

EGFR byl poprvé popsán v 50. letech 20. století americkým biochemikem Stanley Cohenem u kuřat infikovaných virem ptačí leukózy (ALV). EGFR je glykoprotein tvořený extracelulární doménou pro vazbu ligandu (EGF a TNF- α), transmembránovou doménou a cytoplazmatickou doménou s tyrozinkinázovou aktivitou. Aktivace receptoru EGFR/ErbB1 probíhá obdobným mechanismem jako u receptoru HER-2/neu/ErbB2. EGFR/ErbB1 se významně podílí na regulaci buněčného cyklu, buněčné migrace, proliferace a diferenciace a buněčného přežívání prostřednictvím aktivace jemu podřízených signálních drah Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR či Src/STAT3 (Nakai K. et al., 2016). Schopnost jeho translokace do jádra, regulace transkripce, replikace a opravy poškozené DNA byla velmi dobře zdokumentována. Pro aberantní zvýšenou expresi receptoru EGFR/ErbB1 v nádorových buňkách se kromě amplifikace či mutace jeho genu na chromozomu 17 ukazuje být nezbytný proces degradace molekul endocytózou. Imunohistochemický průkaz zvýšené exprese EGFR a claudinu 3 může nasvědčovat pro přítomnost mutace v genu *BRCA1* (Danzinger S. et al., 2018). Zvýšená exprese EGFR (membránová pozitivita 2+ a 3+ u více než 10 % nádorových buněk) byla prokázána u 13 – 76 % TNBC v závislosti na použité primární protilátce (Choi J. et al., 2012; Martin V. et al., 2012). Amplifikace genu *EGFR* byla však potvrzena pouze u 2 – 24 % případů, z čehož vyplývá, že amplifikace genu je zodpovědná za nadměrnou expresi proteinu pouze zčásti a její stanovení je nezbytné pro predikci odpovědi na anti - EGFR cílenou terapii (Grob T. J. et al., 2012; Martin V. et al., 2012). Zvýšený počet kopií genu v důsledku polysomie byl pak zjištěn u 8 – 27 % TNBC. Procentuální zastoupení aktivačních mutací se u TNBC v jednotlivých studiích liší od 2 do 11 % pro mutaci L858R (Teng Y. H. et al., 2011) a 12 % pro mutaci T790M (Bemanian V. et al., 2015). Doposud probíhá několik klinických studií zaměřených na užití inhibitorů EGFR v monoterapii či v kombinaci s chemoterapií, a to zejména u pokročilých a generalizovaných TNBC, méně u časných a operabilních forem TNBC. Nejvyšší kompletní patologickou odpověď zaznamenala kombinace 5 - fluoruracilu, epidoxorubicinu, cyklofosfamidu, docetaxelu spolu s panitimumabem (47 %) a docetaxelu s cetuximabem (24 %), podávané v neoadjuvanci u operabilních TNBC (Nabholtz J. M. et al., 2014; Nabholtz J. M. et al., 2016).

Nejvyšší četnost odpovědi (ORR; „overall response rate“) byla zaznamenána u pacientek léčených kombinací cisplatinu a cetuximabu (Baselga J. et al., 2013). V obou těchto studiích byla navíc zjištěna korelace terapeutické odpovědi s intenzitou infiltrace CD8+ lymfocyty. V mnoha publikacích se však setkáváme s popsanou rezistencí k inhibitorům EGFR. Možnými mechanismy vzniku tohoto jevu jsou metylace extracelulární domény receptoru EGFR/ErB1 proteinem PRMT1 či zvýšená exprese proteinu Notch3 (Diluvio G. et al., 2018). Inaktivace Notch3 vede defosforylaci tyrozinového zbytku Y1173, internalizaci receptoru EGFR/ErB1, zástavě jeho intracelulární transdukce a zvýšení senzitivity ke gefitinibu. Senzitivita ke gefitinibu může být rovněž pozitivně ovlivněna u generalizovaného TNBC interakcí EGFR/ErB1 se subcelulárně lokalizovaným faktorem NHERF1 (Bellizzi A. et al., 2015). Slibný terapeutický potenciál má i kombinovaná terapie s inhibitory PARP či inhibitory kontrolních bodů imunitního systému. Autory Shaghghi Z. a Hosseinimehr S. J. (2017) byla mimo jiné prokázána korelace mezi zvýšenou expresí EGFR v nádoru a sníženou citlivostí k ionizujícímu záření, která může být aplikací inhibitorů EGFR pozitivně ovlivněna.

1.5.3.1.4b Vaskulární endotelový růstový faktor

Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) zahrnuje šestičlennou rodinu růstových faktorů (VEGF-A-E, PlGF). Jde o glykoproteiny, poprvé popsané v roce 1989 v bovinních buňkách hypofýzy (Ferrara N. et al., 1989). Za fyziologických okolností je VEGF uvolňován fibroblasty a spolu s angiopoetinem 2 či receptorem Tie2 je považován za stimulator angiogeneze, respektive proliferace endotelových buněk (Leung D. W. et al., 1989). Ta může být vyvolána příčinami genetickými (mutace v nádorových supresorových genech *TP53* či *VHL*, aktivace onkogenů) i metabolickými (hypoxie, účinek pohlavních hormonů, růstových faktorů i cytokinů).

VEGF se váže na své transmembránové receptory s tyrozinkinázovou aktivitou označované jako VEGFR-1 a VEGFR-2, čímž stimuluje aktivaci matrixových metalo - proteáz, buněčnou migraci a proliferaci endotelu s tvorbou cévních lumen a fenestrací. Interakce ligand-receptor působí chemotakticky na progenitorové endotelové buňky, neutrofile a makrofágy (Robinson C. J. et al., 2001). Za patologických podmínek je VEGF produkován nádorovými buňkami, které si tak vytváří cévní zásobení a zvyšuje permeabilitu cév uvnitř nádoru.

U TNBC je zvýšená exprese VEGF dávána do souvislosti s prokázanou mutací genů *BRCA1/2*, pokročilým stadiem nemoci a rezistencí k terapii. Interakce proteinu neuropilinu 2 kódovaného genem *NRP2* s receptorem VEGF je u TNBC asociována s agresivním biologickým chováním (Elaimy A. L. et al., 2019). Autokrinní stimulace VEGF neuropilinem 2, aktivovaná GTPázou Rac1, je nezbytná pro proliferaci a přežívání nádorových kmenových buněk. Enzym Rac1 je v nádorových kmenových buňkách nepřetržitě aktivován díky vazbě komplexu proteinu TAZ a transkripčního faktoru TEAD na promotorovou oblast genu kódujícího protein Rac GAP β -chimaerin (Elaimy A. L. et al., 2018). V minulosti byla u řady nádorů zkoumána účinnost neoadjuvatní terapie založené na přenosu genu pro VEGF-Trap, vzniklého fúzí imunoglobulinové domény receptoru VEGF1s Fc oblastí IgG1, zprostředkovaném adenovirem typu 2 (AAV2-VEGF-Trap). U TNBC byl na zvířecích modelech zjištěn synergický anti - angiogenní efekt intravenózně podaného AAV2-VEGF-Trap a paklitaxelu. Obdobný efekt má i koenzym Q0, který ovlivněním signální dráhy PI3K/AKT/NFKB/MMP-9 a negativní regulací MMP-2/-9, uPA („urokinase-type plasminogen activator“), uPAR („uPA receptor“) a VEGF vede k indukci apoptózy a inhibici EMT (Yang H. L. et al., 2019). V patogenezi TNBC relativně nově popsaná signální dráha Hedgehog byla prvně zmíněna v roce 1998, a to v souvislosti s vyvíjejícím se embryem, kde se podílí převážně na udržení vaskulární integrity hematoencefalické bariéry. Ovlivnění této signální dráhy se jeví jako další perspektivní nástroj umožňující inhibici angiogeneze (Di Mauro C. et al., 2017; Chapouly C. et al., 2019; Pepicelli C. V., 1998; Rowitch D. H. et al., 1999). V současné době probíhají klinické studie účinku bevacizumabu v kombinaci s chemoterapií (Nab-paklitaxel, paklitaxel, doxorubicin, cyklofosfamid, karboplatina) a/nebo inhibitory mTOR (temsirolimus, everolimus) či tyrozinkinázy EGFR (erlotinib) u pokročilých a metastazujících TNBC (Symonds L. et al., 2019; Basho R. K. et al., 2018; Tampaki E. C. et al., 2018; Saloustros E. et al., 2018), přičemž kompletní patologická odpověď se zvyšuje u nemocných s prokázanou mutací genu *BRCA1/2* (Fasching P. A. et al., 2018).

1.5.3.2 Morfologické prognostické a prediktivní znaky u TNBC

1.5.3.2.1 Histologická typizace TNBC

Nejčastějšími histologickými typy TNBC jsou „high grade“ invazivní karcinomy NST, invazivní karcinomy NST s medulárními rysy, metaplastické karcinomy a sekreční karcinomy. Vůbec nejčastěji diagnostikovanými jsou invazivní karcinomy NST nízkého stupně diferenciaci („high grade“), která se stanovuje dle doporučení WHO podle Elston a Ellisové (1991) (procentuální rozsah přítomnosti tubulárních formací, stupeň jaderné pleomorfie a počet mitóz v plošně přesně vymezeném prostoru). Invazivní karcinomy NST s medulárními rysy jsou podle vydání WHO klasifikace z roku 2012 (Lakhani S. R. et al., 2012) pro své zřetelné ohraničení, expanzivní způsob růstu s tvorbou synciciálních formací ve více než 75 % plochy nádoru a doprovodnou intenzivní infiltrací TILs řazeny do společné skupiny s klasickým a atypickým medulárním karcinomem (tzv. karcinomy s medulárními rysy). Přestože jsou karcinomy s medulárními rysy spojovány s nízkým stupněm diferenciaci, mutací v genu *BRCA1* a *TP53*, je jejich prognóza i díky moderní agresivní terapii poměrně dobrá. Speciálně přežití s klasickým medulárním karcinomem dosahuje více jak 10 let od stanovení diagnózy téměř 95% pacientek. Délka přežití také pozitivně koreluje s intenzitou infiltrace TILs (Rodríguez - Pinilla S. M., 2007; García - Teijido P. et al., 2016; Salgado R. et al., 2015; Polónia A. et al., 2017). Mezi další histologické typy nádorů vyskytující se v „triple“ negativních karcinomech prsu patří metaplastické a sekreční karcinomy. Metaplastické karcinomy prsu reprezentují pouze 0,2 až 5 % invazivních karcinomů prsu a zahrnují heterogenní skupinu nádorů s dlaždicobuněčnou, vřetenobuněčnou či mezenchymovou, tj. převážně chondroidní či osseózní diferenciací (Lakhani S. R. et al., 2012; McKinnon E. et al., 2015). Díky imunohistochemickému expresnímu profilu (pozitivita CK5/6, CK14, EGFR a p63) je lze řadit k „basal - like“ podtypu, karcinomy s vřetenobuněčnou diferenciací pak do „claudin - low“ podtypu asociovaného s epitel - mezenchymovou tranzicí (EMT). V případě metaplastických karcinomů je prognóza pacientek úzce spjata s morfologií uvnitř nádoru. Nádory s adenoskvamózní diferenciací a „fibromatosis - like“ morfologií bývají podle některých pramenů označovány jako „low - grade“ nádory (Carter M. R. et al., 2006). Postižení axilárních lymfatických uzlin bývá přítomno u 8 až 40 % pacientek s TNBC (Günhan - Bilgen I. et al., 2002). Sekreční karcinom prsu byl poprvé popsán v roce 1966 jako „juvenilní karcinom prsu“ (McDivitt R. W. et al., 1966).

Jedná se o velmi vzácné (0,02 %), prognosticky příznivé, v histologickém obraze zpravidla dobře diferencované a ohraničené nádory se solidní, mikrocystickou či tubulární úpravou a intracelulární i extracelulární produkcí sekrečního materiálu (Lakhani S. R. et al., 2012; Li L. et al. 2019; Nielsen T. O., 2015). Topograficky jsou lokalizované do blízkosti areoly. Genetická analýza souboru sekrečních karcinomů odhalila přítomnost balancované translokace t(12;15) s fúzí genů ETV6-NTRK3 (Tognon C. et al., 2002). Výskyt sekrečního karcinomu u pacientek mladších 30 let věku byl zjištěn u 10,2 % případů (Li L. et al., 2019). Přestože je u nich riziko lokálních i vzdálených metastáz či recidivy tumoru v porovnání s ostatními invazivními karcinomy nízké, doporučuje se v terapii vzhledem k jejich frekventnímu „triple“ negativnímu fenotypu časný chirurgický výkon doplněný o adekvátní adjuvantní systémovou léčebnou modalitu.

1.5.3.2.2 Prognostický a prediktivní význam imunokompetentních buněk v kontextu s morfologií TNBC

1.5.3.2.2a Koncepce imunitního dozoru a význam hodnocení množství TILs a exprese PD-1 a PD-L1 buňkami nádoru či lymfocyty

Úloha imunitního systému v progresi nádorů je studována řadu let. Teorii imunitního dozoru poprvé formuloval v druhé polovině 20. století Enrich a jen o něco později i Burnet a Lewis (Burnet F. M., 1959; Prendergast G. C., Jaffee E. M., 2007). Objevy v nedávné době ukázaly, že selhání nebo přeprogramování imunitní odezvy při vzniku a rozvoji nádorů hraje v těchto procesech zásadní roli. V literatuře udávaný termín „cancer immunoediting“ popisuje dynamický vztah mezi nádorem a imunitním systémem hostitele s důrazem na význam nádorového mikroprostředí a na mechanismy umožňující nádorům unikat z imunitního dozoru. Zabývá se dvojitou úlohou imunitního systému, který je na jedné straně schopen růst nádoru podpořit, na druhé však může vést k jeho regresi (Aragon - Sanabria V. et al., 2018).

Imunitní dozor probíhá ve třech fázích- fáze eliminační, fáze rovnováhy mezi hostitelem a nádorem a fáze úniková spojená s únikem nádorových buněk z dozoru imunokompetentních buněk. Přestože jsou nádorové elementy nejprve imunitním systémem inhibovány a eliminovány (fáze eliminační), mohou některé z nich přežívat (fáze rovnováhy) a později také prostřednictvím produkce molekul potlačujících cytotoxicitu imunokompetentních buněk nebo maskujících svůj neoplastický fenotyp uniknout z jejich dozoru (fáze úniková).

Utlumení imunitního systému (navození tzv. imunitní tolerance) má za normálních podmínek zásadní význam pro ochranu zdravé tkáně před poškozením vlastními imunokompetentními buňkami. Pokud k utlumení této reakce nedojde, mohou vzniknout autoimunitní onemocnění. Nádorové buňky však dokážou různými mechanismy navodit tuto imunitní toleranci i vůči svým antigenům. Buňky imunitního systému (neutrofil, monocyty, makrofágy a jiné antigen prezentující buňky) jsou nezbytné k identifikaci nádorových antigenů a indukci protilátkové i buněčné imunity zprostředkované B- a T-lymfocyty. Jedním z důsledků je vznik paměťových buněk přítomných v lymfatických uzlinách. Intenzita této protinádorové imunitní odpovědi koreluje s delším celkovým přežitím (OS) pacientů, delším obdobím bez vytvoření metastáz (MFS) či bez relapsu onemocnění nebo tzv. bezpříznakovým obdobím (RFS, DFI) (García - Tejjido P. et al., 2016). Množství tumor infiltrujících lymfocytů (TILs) v nádoru je s ohledem na věk pacientek v době diagnózy, velikost a histologický typ nádoru, stupeň diferenciaci „grade“, expresi hormonálních receptorů, postižení lymfatických uzlin a aplikovanou terapeutickou modalitu považováno za nezávislý prediktivní ukazatel odpovědi na neoadjuvantní i adjuvantní terapii. Nádorová infiltrace TILs bývá asociována až s čtyřikrát silnější úplnou patologickou odpovědí. Podle lokalizace kulatobuněčné infiltrace v nádorech prsu můžeme TILs rozdělit na intratumorální, tj. infiltrát v těsném kontaktu s vlastními nádorovými buňkami, dále stromální a v okolí invazivních částí nádoru s případnou přítomností terciárních lymfoidních struktur v bezprostředně na nádor navazující tukové tkáni mléčné žlázy (Salgado R. et al., 2015). Rovněž bylo navrženo zavedení nové jednotky zvané „lymphocyte-predominant breast cancer“ (LPBC), která je charakterizovaná zánětlivou infiltrací v rozsahu více jak 60 % plochy nádoru. Ukazuje se, že vysoký výskyt TILs v nádorovém stromatu a v okolí invazivních částí nádoru je asociován s dobrou prognózou onemocnění. Existují práce, které se zabývají hodnocením TILs v karcinomech prsu ve vztahu k terapeutické odezvě i praktickým aspektům jejich objektivního vyhodnocení (Denkert C. et al., 2016; Salgado R. et al., 2015; Polónia A. et al., 2017). Výsledkem je návrh standardizace těchto postupů. V rutinní praxi patologa je však velmi obtížné kvantifikovat počet buněk v přímém kontaktu s nádorovými buňkami odděleně od počtu buněk infiltrujících stroma nádoru a zvláště určení histologického typu nádoru a množství TILs, pokud máme pro hodnocení k dispozici pouze punkční proužky nádorem postižené mléčné žlázy. Dalším úskalím objektivního hodnocení TILs jsou vzorky nádoru získané od pacientek, které podstoupily neoadjuvantní chemoterapii. U pacientek bez neoadjuvantní léčby byl v minulosti prokázán statisticky významně vyšší podíl CD3+, CD8+ a FOXP3 („forkhead box P 3 protein“) pozitivních T-lymfocytů v porovnání s pacientkami po podání chemoterapie (Mao Y. et al., 2014).

Podle práce Miyashita se spolupracovníky (2015) by při hodnocení nádorových reziduí po neoadjuvanci mohl vysoký poměr CD8/FOXP3 T-lymfocytů sloužit jako ukazatel delší doby přežití.

Mezi mechanismy, pomocí kterých nádorové buňky unikají z imunitního dozoru, patří produkce molekul, kterými je imunitní odezva tlumena. Tyto mechanismy představují proteiny kontrolních bodů imunitního systému, jakými jsou například protein pro programovanou buněčnou smrt 1 - **PD-1**, kódovaný genem *PDCD1* na chromozomu 2 a jeho ligand - **PD-L1**, který je zvýšeně exprimován u 30 až 50 % karcinomů prsu (Wimberly H. et al., 2015). PD-1 je monomerní protein o délce 288 aminokyselin, který se řadí do rodiny molekul CD28/CTLA-4/ICOS. Skládá se z N-koncové IgV domény, „linkeru“ o délce asi 20 aminokyselin, transmembránové domény a C-koncové intracelulární domény s dvěma tyrozinovými motivy – ITIM („immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“) a ITSM („immunoreceptor tyrosine-based switch motif“). Receptorový protein PD-1 má dva ligandy s koinhibiční funkcí, proteiny PD-L1 (CD274) a PD-L2 (CD273). Zatímco PD-L1 je exprimován na T- i B-lymfocytech, dendritických buňkách, makrofázích, mesenchymových kmenových buňkách a žírných buňkách, exprese PD-L2 se omezuje zejména na antigen prezentující buňky a žírné buňky. Signální dráha PD1/PD-L1 za normálních okolností inhibuje PI3K/Akt a MAP-kinázovou dráhu (Ras/MEK/Er), vedoucí k indukci apoptózy a zástavě buněčného cyklu a omezuje efektorovou funkci CD8+ T-lymfocytů ve prospěch regulačních CD4+ T-lymfocytů. Zvýšená exprese PD-1/PD-L1 nádorovými či imunokompetentními buňkami v nádorovém mikroprostředí by mohla být využita k cílené léčbě pomocí inhibitorů těchto signálních drah. Je známo, že zvýšená exprese PD-L1 nádorovými buňkami je asociována s horší prognózou onemocnění, kdežto její exprese TILs naopak přežití pacientů prodlužuje (Huang W. et al., 2019). U TNBC byla zvýšená exprese PD-L1 pozorována u 20 % případů (Mittendorf E. A. et al., 2014). Ve stejné studii byla rovněž prokázána souvislost zvýšené exprese PD-L1 nádorovými buňkami s inaktivací genu *PTEN* a její negativní ovlivnění inhibicí PI3K/Akt signální dráhy. Klinické studie zaměřené na účinnost monoklonálních protilátek blokujících kontrolní body imunitního systému PD-1 a PD-L1 prokázaly v případě metastazujícího TNBC obdobné výsledky jako například u maligního melanomu či nemalobuněčného karcinomu plic (García - Teijido P. et al., 2016). Exprese PD-L1 může být zaznamenána jak na membráně nádorových buněk, tak i v jejich cytoplazmě či v buněčných elementech nádorového stromatu včetně fibroblastů.

Je třeba však vzít v úvahu, že exprese PD-L1 uvnitř nádoru i v metastázách do lymfatických uzlin je velmi heterogenní a jedná se o dynamický ukazatel měnící se v čase (Li M. et al., 2018). Pečlivé vypracování postupu hodnocení TILs u karcinomu prsu a stanovení přesných indikačních kritérií je pro jeho zavedení do klinické praxe naprosto nezbytné.

1.5.3.2.2b CD163 a CD204 pozitivní makrofágy

Makrofágy jsou reprezentanty nespecifické imunitní odpovědi. Jejich hlavní funkce spočívá ve schopnosti fagocytózy, prezentace antigenu, produkce cytokinů a modulátorů zánětlivé odpovědi. Pod vlivem prozánětlivého cytokinu IFN- γ vznikají tzv. prozánětlivé makrofágy (typ M1). M1 makrofágy převážně likvidují zbytky nekrotických buněk, produkují IL-12 a tím stimulují T-lymfocyty a NK buňky. Působením IL-4 a IL-13 (pomocné T-lymfocyty) vznikají naopak protizánětlivé makrofágy typu M2, které produkcí IL-10 a TGF- β podporují hojení a regeneraci tkání poškozených poraněním či mikrobiální infekcí.

Makrofágy typu M2 obvykle infiltrují nádory. V literatuře se setkáváme s jejich označením jako makrofágy asociované s nádory (TAM; „tumor-associated macrophages“). Aktivované TAM jsou známé produkcí pronádorových molekul a ligandů EGFR, jakými jsou EGF, onkostatin M a heparin vázající růstový faktor podobný EGF, a rovněž i schopností ovlivňovat signální dráhu PD-1/PD-L1 (Santoni M. et al., 2018). Přítomnost makrofágů typu M2 v nádorové tkáni je spojena s expresí antigenů CD163 a CD204. Míra infiltrace karcinomu prsu makrofágy je závislá na hormonálním profilu nádoru. Recentní studie prokázala, že u hormonálně dependentních nádorů je výrazná infiltrace CD68, CD163, CD204 a MMP-9 pozitivními makrofágy asociována s horšími klinickými výsledky, respektive kratším obdobím bez relapsu onemocnění (RFS) i kratším přežitím specifickým pro karcinom prsu (Pelekanou V. et al., 2018). U žen s diagnózou TNBC se však zvýšená infiltrace TAM jeví jako příznivý prognostický ukazatel, který koreluje s delším celkovým přežitím pacientek (OS). Na významu nabývá rovněž stanovení počtu cirkulujících TAM. Kolektiv autorů Zhang B. et al. (2017) prokázal pomocí průtokové cytometrie významnou asociaci zvýšeného počtu cirkulujících CD163 a CD204 monocytů se stadiem karcinomu prsu, stupněm diferenciacie nádoru a expresí ER. Není tedy vyloučeno, že by právě cirkulující monocyty podobné makrofágům typu 2 mohly u karcinomů prsu reflektovat progresi nádoru.

1.5.3.2c Markery nádorových kmenových buněk – CD24, CD44 a ALDH1

CD24 je malá signální glykoproteinová adhezivní molekula na povrchu B-lymfocytů, diferencujících se neuroblastů, monocytů a neutrofilů, kódovaná genem *CD24* na chromozomu 6. Adhezivní molekula **CD44**, kódovaná genem *CD44* na chromozomu 11, je exprimována u řady buněčných typů a je zodpovědná za regulaci aktivity lymfocytů, hematopoézy i vzniku nádorových metastáz. CD44+/CD24- fenotyp je u karcinomu prsu považován za znak nádorových kmenových buněk. Nádor s tímto imunofenotypem je řazen pod tzv. „claudin - low“ molekulární podtyp karcinomů prsu, jemuž byly věnovány pasáže v kapitolách 1.4 i 1.5. Molekulární třída karcinomů prsu „claudin - low“ vešla do podvědomí v roce 2007, kdy byla popsána na základě genové analýzy 13 vzorků karcinomů prsu (Herschkowitz J. I. et al., 2007). U většiny těchto nádorů se imunohistochemicky neprokáže exprese ER a PR ani proteinu HER2 či amplifikace jeho genu a jsou tedy léčeny jako TNBC. CD44+/CD24-/low fenotyp je asociován se schopností intenzivnější buněčné migrace, proliferace, invaze, zvýšené frekvence vzdálených metastáz a rezistence k chemoterapii a je považován za prognostický nepříznivý ukazatel. Stanovení exprese CD44 a CD24 s určením mezenchymového („claudin - low“) či epitelového fenotypu (CD44+/CD24+) u TNBC může napomoci prognostické stratifikaci pacientů s TNBC a predikovat odpověď na léčbu různými cytotoxickými látkami (Deng X. et al., 2017). Zvýšená exprese **ALDH1** byla zaznamenána u téměř 56 % TNBC a korelovala pozitivně s velikostí nádoru, stadiem onemocnění („stage“), kratším obdobím bez relapsu onemocnění (RFS) a rovněž i s celkovým přežitím pacientů (OS). TNBC s prokázanou expresí ALDH1 mají tendenci k agresivnějšímu biologickému chování a jsou rezistentní na chemoterapii (Kida K. et al., 2016). V souvislosti s RFS a OS je exprese ALDH1 považována za nezávislý prognostický faktor (Ma F. et al., 2017).

1.5.3.3 Epitelo-mezenchymová tranzice (EMT) v patogenezi TNBC

Epitelo-mezenchymová tranzice (EMT) je dynamický proces, při kterém dochází ke změně epitelového fenotypu na fenotyp mezenchymový. EMT hraje významnou roli při morfogenezi a vývoji orgánů (typ I), regeneraci a reparaci tkání (typ II) a metastatickém šíření primárních epitelových nádorů (typ III). Aberantní aktivace EMT je esenciální pro metastatický rozsev karcinomu prsu.

V případě EMT dochází u nádorových buněk ke ztrátě typických vlastností epitelového fenotypu, kterými jsou vytvoření těsných mezibuněčných spojů, s tím spojená buněčná kohezivita, zachovaná polarita s relativně uniformním uspořádáním buněk a zároveň nabytí následujících charakteristik buněk mezenchymu (Weng Y. S. et al., 2019; Watanabe K. et al., 2019; Chi Y. et al., 2019; Liu X. et al., 2019; Wang N. et al., 2017; Afshar E. et al., 2019; Piasecka D. et al., 2018; Wang Q. et al., 2017; Jang M. H. et al., 2017; Johansson J. et al., 2013; Su C. M. et al., 2015; Lee J. M. et al., 2006; Kalluri R. et al., 2009; Kalluri R., 2009; Díaz - López A. et al. 2014; Xia H. et al., 2012; Zhao X. et al., 2013; Zeisberg M. et al., 2009):

1. Vřetenobuněčná transformace
2. Schopnost buněčné migrace, invaze, extravazace a metastazování
3. Prostorová reorganizace, vymizení exprese cytokeratinu a ztráta polaritativy buněk
4. Rezistence k apoptóze
5. Změny buněčného metabolismu
 - zesílení glykolýzy, pentózové fosfátové dráhy a metabolismu glutaminu
 - biosyntéza aminokyselin, nukleotidů a lipidů
6. Regulace transkripčních faktorů a onkogenních signálních drah
 - aktivace například TGF- β , ZEB1, Pygo2/Wnt, STAT3, EGF, EpCAM, p-Akt S473, MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6, KRT19, AKT2, CD24, TIMP1
 - inhibice např. MMP2, ALDH1, MMP9, TWIST, NOTCH1, AKT1
7. Alterace membránových, cytoplazmatických a jaderných proteinů
 - indukce exprese například N-kadherinu, vimentinu, desminu, α -SMA, FSP1, CDH11, β -catenin, osteonektinu, fibronektinu, MMP-2, MMP-3, MMP-9, Sox10, Gooseoid, Twist, Snail1, Snail2, Smad-2/3, NF- κ B
 - inhibice exprese například E-kadherinu, desmoplakinu, cytokeratinů, okludinu
 - zvýšení aktivity Rho, ILK, GSK-3 β
8. Změny v expresi mikroRNA
 - indukce například miRNA-214, miRNA-34a, miRNA-130a-3p, miRNA-192-5p, miRNA-214-3p, miRNA-101-3p, miRNA-30d-5p, miRNA-10a-5p, miRNA-99a-5p, miRNA-200c-3p, miRNA-143-3p, miRNA-9, miRNA-30b-5p, miRNA let-7f-5p, miRNA-10b, miRNA-21, miRNA-29, miRNA-221 a miRNA-222, miRNA-373

- inhibice například miRNA-335, miRNA-155, miRNA-516a-3p, miRNA-520c, miRNA-7-5p, miRNA-149-3p, miRNA-215, miRNA-150-5p, miRNA-205-5p, miRNA-206, miRNA-10b-5p, miRNA-20b-5p, miRNA-145-5p, miRNA-26b-5p, miRNA-223-3p, miRNA-17-5p, miRNA-186-5p, miRNA-146a-5p, let-7c, miR-200c
9. Plasticita nádorových buněk – schopnost mezenchymo - epitelové tranzice (MET) a vytvoření metastáz

2. CÍLE VÝZKUMU

Přestože se neustále hledají nové biomarkery, které by umožnily lépe odhadnout biologické chování TNBC, základním kritériem pro indikaci jejich léčby stále zůstává určení histologického typu, stupně diferenciaci a stadia nemoci patologem. Vzhledem k časté morfoloické heterogenitě uvnitř každého TNBC a významné úloze imunokompetentních buněk při jeho rozvoji nabývá na významu rovněž i stanovení zastoupení různých morfoloí a exprese PD-1, jeho ligandu PD-L1, proteinu Bcl-2 a množství TILs. Kromě zmíněné morfoloické heterogenity se v TNBC prokázala i výrazná genetická heterogenita asociovaná mimo jiné s expresí malých nekódujících molekul miRNA, které se tak mohou stát významným diagnostickým, prognostickým nebo prediktivním znakem.

V rámci našeho výzkumu jsme si položili několik otázek:

1. Jak souvisí množství a distribuce TILs s heterogenitou nádorové morfoloie, expresí antiapoptotického proteinu Bcl-2, proliferačním indexem Ki-67 a věkem pacientek v době stanovení diagnózy u skupiny neoadjuvatní terapií neovlivněných TNBC?
2. Je možné modifikovat navržené postupy pro hodnocení TILs tak, aby efektivněji sloužily pro rutinní praxi patologa?
3. Jaká je distribuce dalších imunokompetentních a nádorových kmenových buněk u TNBC?
4. Reflektuje exprese specifických miRNA nádorovou heterogenitu uvnitř neoadjuvatní terapií neovlivněných TNBC?
5. Jaká je specifická věková závislost exprese prognostických a prediktivních znaků rutinně hodnocených u karcinomů mléčné žlázy na našem pracovišti?

3. METODIKA PRÁCE

3.1. Analýza morfologie, množství a lokalizace TILs, významu některých imunitních biomarkerů a nádorových kmenových buněk u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC

Klinicko-patologická charakteristika souboru pacientek

Z celkového počtu 3544 karcinomů prsu diagnostikovaných na Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc mezi lety 2007 až 2017 jsme získali celkem 413 TNBC hodnocených na základě výsledků standardního imunohistochemického a „in situ“ vyšetření, což bylo 11,7 % jejich celkového počtu. Z tohoto souboru jsme s ohledem na možnost posouzení celé morfologie nádoru následně vyřadili ty nádory, u kterých byly k dispozici jen punkční vzorky a nádory, jejichž morfologie by mohla být pozměněná neoadjuvantní chemoterapií. U všech případů invazivních karcinomů prsu hodnocených jako TNBC jsme znovu revidovali histologický typ nádoru a provedli podrobný rozbor nádorové morfologie včetně přítomnosti a stupně intenzity TILs. Zaznamenávali jsme výskyt centrální nekrózy/fibrózy, ložisek se světlobuněčnou, respektive apokrinní transformací nádorových buněk s charakteristickou objemnější eosinofilní nebo světlou granulární cytoplasmou nádorových buněk, potvrzenou následně průkazem markeru GCDFP-15, ložisek a vřetenobuněčnou transformací nádorových buněk a výskyt metaplastických změn (skvamózní, chondrogenní). Dále jsme evidovali velikost nádoru v mm, věk pacientek v době stanovení diagnózy, stupeň diferenciací nádoru („grade“) a stadium onemocnění (dle nejnovější TNM klasifikace). Soubor pacientek jsme rozdělili podle věku v době stanovení diagnózy na skupinu pacientek s velkou pravděpodobností premenopauzálních (< 50 let věku) a postmenopauzálních (≥ 50 let). Na základě revidovaného histologického typu nádoru jsme z analyzovaného souboru vyřadili evidentní adenoidně cystické karcinomy, u kterých je negativita hormonálních receptorů a proteinu HER2/neu/ERBB2 či absence amplifikace jeho genu popisována a dále mezi TNBC se ojediněle vyskytující kribriformní, tubulární či mucinózní karcinomy s dobrou prognózou.

Za období jedenácti let jsme tedy po aplikaci výše uvedených kritérií získali celkem 58 případů TNBC léčených primárně chirurgickým přístupem bez neoadjuvance (kvadrantektomie, totální/subkutánní/kůže šetřící mastektomie) s velikostí ložisek nádorů do 20 mm (pT1a-c).

Stupeň a lokalizace infiltrace TILs v nádorovém parenchymu/stromatu a v okolí invazivních částí nádorů byl porovnán s nádorovou morfologií TNBC, menopauzálním stavem pacientek, věkem pacientek v době diagnózy, stupněm diferenciaci („grade“), velikostí nádorů, proliferační aktivitou měřenou pomocí Ki-67 a expresí Bcl-2.

Modifikace standardizovaných postupů hodnocení TILs

Oproti doporučeným postupům (Denkert C. et al., 2016; Salgado R. et al., 2014) jsme hodnocení stupně infiltrace TILs v nádorovém parenchymu/stromatu a okolí invazivních partií nádoru modifikovali s ohledem na skutečnost, že jsme měli k dispozici celá ložiska nádorů a nejen punkční vzorky. Rozšířili jsme kvantitativní škálu hodnocení na stupně 1 až 4, kde jsme zohlednili rozsah zánětlivě infiltrované plochy uvnitř hranic nádoru a po obvodu ložiska (1 – TILs v méně než 10 % plochy uvnitř hranic nádoru a podél obvodu ložiska; 2 – TILs v 10 – 29 % plochy uvnitř hranic nádoru a podél obvodu ložiska; 3 – TILs v 30 – 60 % plochy uvnitř hranic nádoru a podél obvodu ložiska; 4 – TILs ve více než 60 % plochy uvnitř hranic nádoru a podél obvodu ložiska nádoru). Rovněž jsme se rozhodli hodnotit TILs v nádorovém parenchymu a stromatu společně, neboť v běžném histologickém preparátu obě lokalizace ve většině případů nelze spolehlivě odlišit.

Imunohistochemická vyšetření a fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Expres hormonálních receptorů (ER, PR, AR), proteinu HER2, ukazatele proliferační aktivity Ki-67, protiapoptického antigenu Bcl-2, antigenů T-lymfocytů CD4, CD8, CD95, PD-1 a PD-L1, ukazatelů TAM - CD204 a CD163 a markerů nádorových kmenových buněk - CD24, CD40, CD44 a ALDH1 byla stanovena imunohistochemicky. K analýze byly vybrány pouze vzorky s negativitou ER, PR (úplná negativita, v ojedinělých případech s pozitivitou u méně než 1 % nádorových buněk) a proteinu HER2 (0, 1+), potvrzenou v případě hraničních výsledků fluorescenční in situ hybridizací (FISH).

Imunohistochemická (IHC) vyšetření byla provedena na formalínem fixovaných a do parafínu zalitých tkáních (FFPE) mléčné žlázy. Řezy o síle 5 μm byly deparafinizovány, antigenicita byla obnovena zahřátím na teplotu 120 $^{\circ}\text{C}$ v mikrovlnné troubě po dobu 5 minut v citrátovém pufru (pH 6,0). Aktivita endogenní peroxidázy byla zrušena inkubací v blokačním roztoku po dobu 10 minut. Protilátky byly ředěny a inkubovány s tkáněmi a vizualizovány podle protokolu výrobce s použitím sekundárního systému pro manuální zpracování či přípravou v automatu postupy uvedenými v tabulce č. 2 a tabulce č. 3. Tkáňové řezy byly obarveny hematoxylinem, dehydratovány a montovány. Způsobu hodnocení hormonálních receptorů, proteinu HER2, Bcl-2, Ki-67 a imunitních biomarkerů jsou věnovány samostatné odstavce.

Počet kopií genu *c-erbB-2* a centromery chromosomu 17 byl určován metodou FISH na Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc akreditovanou metodou s použitím lokusově specifické sondy LSI HER2 (Spectrum Orange™) a alfa-satelitní (centromerické) sondy CEP17 (Spectrum Green™; IntellMed, Ltd., Olomouc, ČR). Za pozitivní výsledek byl podle doporučení ASCO/CAP z roku 2007 považován průměrný počet kopií genu *c-erbB-2* $> 6,0$ a/nebo poměr HER2/chromozom 17 $> 2,20$. Karcinomy prsu s poměrem 4,0-6,0 a/nebo poměrem 1,8 - 2,2 byly hodnoceny jako hraničně pozitivní (nesplňují-li některou předchozí podmínku). Od roku 2013 byly za pozitivní považovány pacientky s průměrným počtem kopií genu *c-erbB-2* $> 6,0$ a/nebo poměrem HER2/chromozom 17 $> 2,00$. Jako hraniční pak byly stanoveny případy s poměrem $< 2,00$ a průměrem 4,0 - 6,0. Při hodnocení bylo odečteno nejméně sto nepřekrývajících se jader.

Hodnocení hormonálních receptorů - ER, PR a AR

Expresi hormonálních receptorů jsme u našeho souboru TNBC hodnotili jako procentuální zastoupení počtu pozitivních jader na ploše nádoru. Na našem pracovišti hodnotíme i tzv. H - skóre, které vyjadřuje procento pozitivních jader násobené subjektivním hodnocením intenzity barvení (1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná). Výsledkem je kvantitativní škála s hodnotami 0 až 300.

Hodnocení exprese receptoru HER2/neu/ErbB2

Imunohistochemická exprese receptoru HER2/neu/ErbB2 byla stanovena v souladu s platnými modifikovanými doporučeními American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) z roku 2013 (Wolff A. C. et al., 2013; Varga Z. et al., 2015). Skóre 0 nebo 1+ (negativní), 2+ (slabě pozitivní) a 3+ (silně pozitivní) u invazivních nádorových buněk jsme vyhodnotili na základě níže popsaných kritérií:

Skóre 0: absence membránové positivity u invazivních nádorových buněk

Skóre 1+: slabá nebo inkompletní membránová pozitivita u méně než 10 % invazivních nádorových buněk

Skóre 2+: slabá kompletní membránová pozitivita u více než 10 % invazivních nádorových buněk

Skóre 3+: silná homogenní kompletní membránová pozitivita u více než 10 % invazivních nádorových buněk

Hodnocení proliferačního indexu Ki-67

Hodnota proliferačního indexu Ki-67 byla stanovena na základě procentuálního zastoupení pozitivních jader ve vzorku a posléze s ohledem na specifika „triple“ negativního molekulárního podtypu rozdělena na případy s nižší (silná jaderná pozitivita do 30 % nádorových buněk), střední (silná jaderná pozitivita u 31 až 70 % nádorových buněk) a vysokou jadernou expresí (silná jaderná pozitivita u více než 70 % nádorových buněk).

Hodnocení exprese antiapoptického proteinu Bcl-2

Expresi proteinu Bcl-2 jsme hodnotili ve čtyřech stupních na základě procentuálního zastoupení zjištěné slabé až silné cytoplazmatické positivity nádorových buněk na plochu nádoru. Soubor TNBC jsme posléze rozdělili na nádory s kompletní negativitou exprese Bcl-2, nádory s expresí Bcl-2 v 1 až 5 % nádorových buněk (nízká exprese), nádory s expresí Bcl-2 v 6 až 60 % nádorových buněk (střední exprese) a ve více než v 60 % nádorových buněk (vysoká exprese).

Hodnocení exprese - PD-1 a PD-L1

Membránová či cytoplazmatická pozitivita PD-1 a PD-L1 v nádorových buňkách a buňkách imunitního systému (TILs) byla vymezena kvantitativní škálou označenou čísly 0 až 4 (0 – absence exprese nádorovými buňkami či buňkami imunitního systému; 1 – exprese v 1 % nádorových buněk či buňkách imunitního systému; 2 - exprese v 1 až 10 % nádorových buněk či buňkách imunitního systému; 3 – exprese v 11 až 50 % nádorových buněk či buňkách imunitního systému; 4 – exprese v 51 % a více nádorových buněk či buňkách imunitního systému).

Hodnocení CD4+/CD8+ T-lymfocytů, CD163+ a CD204+ M2 makrofágů a markerů nádorových kmenových buněk – ALDH1, CD24, CD44

Četnost CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, CD163+ a CD204+ makrofágů v nádorovém parenchymu/stromatu a v okolí invazivní části nádoru jsme stanovili průměrným počtem přítomných pozitivních buněk na 10 HPF při největším zvětšení. Množství CD24+, CD44+ a ALDH1+ nádorových kmenových buněk bylo určeno na základě jejich procentuálního zastoupení v rámci plochy celého zastiženého nádoru. Případy s pozitivitou ALDH1 jsme rozdělili do skupiny s kompletní negativitou (skóre 0), s nízkou pozitivitou (méně než 10 % pozitivních buněk, skóre 1), se střední pozitivitou (11 až 50 % pozitivních buněk, skóre 2) a vysokou pozitivitou (více než 50 % pozitivních buněk, skóre 3). Případy s pozitivitou CD24 nádorových buněk jsme hodnotili na semikvantitativní stupnici od 0 do 3 (0 = 0 - 10 % pozitivních nádorových buněk; 1 = 11 - 25 % pozitivních nádorových buněk; 2 = 26 - 50 % pozitivních nádorových buněk; 3 = více než 50 % pozitivních nádorových buněk), přičemž skóre 0 nebo 1 bylo považováno za negativní či nízkou expresi a skóre 3 jako výrazně zvýšenou expresi. Případy s pozitivitou CD44 nádorových buněk jsme dále rozdělili do 5 stupňů označených 0 až 4 (0 = méně než 2 % pozitivních nádorových buněk; 1 = 3 až 10 % pozitivních nádorových buněk; 2 = 11 až 30% pozitivních nádorových buněk; 3 = 31 až 50 % pozitivních nádorových buněk; 4 = více než 50 % pozitivních nádorových buněk). V případě markeru CD44 jsme za negativní či nízkou expresi považovali skóre 0 a 1 a za signifikantně zvýšenou expresi skóre 4.

Hodnocení exprese receptorů rodiny tumor nekrotizujícího faktoru – CD40 a CD95

Membránová či cytoplazmatická exprese CD40 v nádorových buňkách a plasmocytech byla kvantifikována od 0 do 3 (0 = pozitivita do 1 % nádorových buněk či plasmocytů; 1 = pozitivita u 2 až 30 % nádorových buněk či plasmocytů; 2 = pozitivita u 31 až 60 % nádorových buněk či plasmocytů; 3 = pozitivita u více než 60 % nádorových buněk či plasmocytů). Membránová pozitivita antigenu CD95 v nádorových buňkách byla hodnocena na kvantitativní škále 0 až 2 (0 = absence exprese; 1 = heterogenní exprese v 1 až 50 % pozitivních nádorových buněk; 2 = homogenní exprese ve více než 50 % pozitivních nádorových buněk).

Tabulka č. 2: Primární protilátky použité pro IHC vyšetření, výrobce a ředění

Biomarker	Typ protilátky	Výrobce	Koncentrace
ER	monoklonální myši, 1D5	Dako; Agilent Technologies, Inc.	1:20
PR	monoklonální myši, PgR 636	Dako; Agilent Technologies, Inc.	1:100
HER2	polyklonální králičí, HercepTest™	Dako; Agilent Technologies, Inc.	RTU
AR	IVD monoklonální myši, AR441	Dako; Agilent Technologies, Inc.	1:25
Bcl-2	monoklonální myši, 10C4	BioGenex Laboratories, Inc.	1:10
Ki-67	monoklonální myši, MIB-1	Dako; Agilent Technologies, Inc.	1:200
CD4	IVD monoklonální myši, 4B12	Dako; Agilent Technologies, Inc.	RTU
CD8	IVD monoklonální myši, SP16	Zeta Corporation	1:50
CD163	RUO monoklonální myši, 10D6	Abcam	1:1
CD204	RUO polyklonální králičí	Sigma – Aldrich	1:100
ALDH1	RUO monoklonální králičí, EP1933Y	Abcam	1:250
CD24	RUO monoklonální myši, 10D6	Abcam	1:100
CD44	IVD monoklonální králičí, EP44	Epitomics	1:100
PD-1	IVD monoklonální myši, NAT105	Cell Marque	1:25
PD-L1	IVD monoklonální myši, 22C3	Dako; Agilent Technologies, Inc.	1:40
CD40	RUO monoklonální myši, C-20	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:100
CD95	RUO monoklonální králičí, GM30	Novocastra™	1:50
GCDFP-15	IVD monoklonální myši, 23A3	Leica Biosystems	1:40
PCNA	IVD monoklonální myši, PC10	Abcam	1:1500

Tabulka č. 3: Sekundární vizualizační systémy pro manuální nebo automatické zpracování

Biomarker	Sekundární systém pro manuální zpracování/příprava v automatu	
ER	Dako EnVision + Dual Link System HRP; Agilent Technologies, Inc.	3,3'-diaminobenzidin Liquid DAB +
PR	Dako EnVision + Dual Link System HRP; Agilent Technologies, Inc.	3,3'-diaminobenzidin Liquid DAB +
HER2	Dako EnVision + Dual Link System HRP; Agilent Technologies, Inc.	3,3'-diaminobenzidin Liquid DAB +
AR	EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH; Agilent Technologies, Inc.	Flex pH9 s amplifikací signálu
Bcl-2	Dako EnVision + Dual Link System HRP; Agilent Technologies, Inc.	3,3'-diaminobenzidin Liquid DAB +
Ki-67	Dako EnVision + Dual Link System HRP; Agilent Technologies, Inc.	3,3'-diaminobenzidin Liquid DAB +
CD4	EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH; Agilent Technologies, Inc.	Flex pH9 s amplifikací signálu
CD8	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6
CD163	EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH; Agilent Technologies, Inc.	Flex pH9
CD204	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6
ALDH1	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6
CD24	automat Ventana UV-DAB kit; F. Hoffmann-La Roche Ltd	HIER CC1 pH9
CD44	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6
PD-1	EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH; Agilent Technologies, Inc.	Flex pH9 s amplifikací signálu
PD-L1	automat Ventana OV-DAB kit; Biocompare	HIER CC1 pH9
CD40	EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH; Agilent Technologies, Inc.	Flex pH9 s amplifikací signálu
CD95	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6
GCDFP-15	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6
PCNA	Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB; Bio SB	MW citrátový pufr pH6

Vysvětlivky ke zkratkám uvedených v tabulkách č. 2 a 3:

IVD = *in vitro* diagnostika; *RUO* = pouze pro vědecké účely; *RTU* – připraveno k použití;
HRP – křenová peroxidáza; *DAB* – tetrachlorid diaminobenzidin

Statistická analýza získaných výsledků

Korelace morfologických typů TNBC s množstvím TILs v nádorovém parenchymu/stromatu a v okolí invazivních částí, expresí Bcl-2, Ki-67, markerů imunokompetentních buněk (CD4, CD8, CD95, PD-L1, PD-1, CD204, CD163) a nádorových kmenových buněk (CD24, CD40, CD44, ALDH1), věkem pacientek v době diagnózy, „grade“ a přítomností regionálních či vzdálených metastáz byla zpracována statistickým programem systémem IBM SPSS version 23.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA). Korelace mezi dvěma ordinálními veličinami a mezi kvalitativními a ordinálními veličinami byla ověřena výpočtem Spearmanova korelačního koeficientu (r). Za nízkou míru korelace byly považovány hodnoty korelačního koeficientu mezi 0,1 až 0,3, za střední potom hodnoty korelačního koeficientu méně než 0,5 a vysokou míru korelace hodnoty korelačního koeficientu více než 0,5. Rozdíly mezi dvěma skupinami v ordinálních veličinách, které měly alespoň 4 stupně, byly ověřeny Mann - Whitneyovým U-testem. Rozdíly mezi dvěma skupinami v kvalitativních nominálních veličinách byly ověřeny Fisherovým přesným testem. Test normality (Shapirův – Wilkův test normality) odhalil abnormální distribuci kvantitativních dat. Stanoven byl medián, minimální a maximální hodnota, průměr a směrodatná odchylka. Kvalitativní data byla interpretována pomocí absolutních a relativních četností. Za statisticky významné výsledky jsme považovali hodnoty signifikance (p -value) menší než 0,05. Statistická analýza všech hodnocených parametrů byla vypracována paní *Mgr. Kateřinou Langovou, Ph.D.* z Ústavu lékařské biofyziky LF UP v Olomouci.

3.2. Stanovení exprese miRNA v kontextu s nádorovou morfologií u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC

Soubor pacientek

Pro analýzu exprese 2578 lidských zralých miRNA v jednotlivých morfologiích uvnitř každého nádoru a okolní nenádorové tkáni mléčné žlázy jsme náhodně vybrali 25 TNBC, diagnostikovaných na Ústavu klinické a molekulární mezi lety 2010 a 2017 od pacientek, které (s ohledem na možnost vyšetřit celý nádor se zachovanou nádorovou morfologií, která není poškozena chemoterapií) nepodstoupily neoadjuvantní chemoterapii a byly léčeny primárně chirurgickým přístupem. U všech případů jsme ve shodě s metodickým postupem uvedeným v kapitole 3.1 revidovali histologický typ nádoru a zároveň identifikovali různé nádorové morfologie uvnitř každého nádoru. Izolace celkové RNA včetně krátkých molekul miRNA pro účely mikročipové a statistické analýzy byla provedena ze vzorků získaných mikrodisekcí z různých částí tumoru s rozdílnou morfologií. Kontrolní vzorky byly také získány z epitelové komponenty lalůček, respektive ductů okolní nenádorové tkáně mléčné žlázy. Takto izolovaná RNA byla analyzována pomocí mikročipové technologie a vyselektované kandidátní miRNA, které nejlépe diskriminovaly jednotlivé morfologie uvnitř nádoru, byly vizualizovány metodou in situ hybridizace (ISH). Pro nestandardní výsledky vizualizace, které byly ovlivněny rozdílným chováním každé tkáně, jsme provedli validaci výsledků mikročipové analýzy pomocí qRT - PCR na rozšířeném souboru 70 TNBC. Tento soubor byl vybrán na základě identických kritérií, které jsou uvedeny v kapitole 3.1.

Mikrodisekce nádorových buněk

Mikrodisekce nádorových a nenádorových morfologií v rámci kompletně zachovaných vzorků TNBC byla provedena na sérii 6 histologických řezů o síle 10 μm . Vzorky určené k mikrodisekci bezprostředně po jejich přípravě byly zhotoveny za „RNase - free“ podmínek, namontovány na plusová podložní skla, sušeny při teplotě 56°C po dobu 24 hodin v mikrovlnné troubě, deparafinizovány a barveny kresolovou violetí podle protokolu výrobce.

Pro kontrolu přítomnosti různých nádorových morfologií s ohledem na případné vykrájení materiálu a především přesnost odběru jsme před mikrodisekcí zhotovili jeden 5 µm silný řez barvený standardně hematoxylinem a eosinem na začátku série a jeden takový řez na jejím konci. K vlastní mikrodisekci jsme použili laserový mikrodisektor PALM MicroBeam, PALM RoboSoftware version 4.6 (katalogové číslo 415109-2620-102) od firmy Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Německo), za použití sběrných zkumavek AdhesiveCap 500 opaque (katalogové číslo 415190-9201-000; Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Německo).

Izolace celkové RNA a stanovení miRNA pomocí mikročipové technologie

Izolace celkové RNA včetně krátkých molekul RNA ze vzorků po mikrodisekci byla provedena ve spolupráci s Ústavem molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc pomocí AllPrep DNA/RNA FFPE kitu podle protokolu uvedeného firmou Qiagen (Hilden, Německo) s modifikací doby inkubace s proteinázou K při 56°C (prodloužení z 15 na 60 minut). Koncentrace a čistota získané RNA byla ověřena Nanodropem ND 1000 (ThermoScientific; Wilmington, DE, USA). Kvalita RNA pak byla měřena pomocí Agilent Small RNA kitu a přístroje Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc.; Waldbronn, Německo).

„Microarray“ neboli čipová technologie je založená na hybridizaci nukleových kyselin podle Watsonova - Crickova párování bází mezi cílovými molekulami a specifickými sondami. Pro analýzu našeho souboru neoadjuvatní terapií neovlivněných TNBC jsme ve spolupráci s Ústavem molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc použili Affymetrix miRNA 4.0 Arrays a FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) v souladu s protokolem výrobce, využívající 130 ng celkového množství RNA. Výsledné soubory dat („CEL files“) byly ve spolupráci se Středoevropským technologickým institutem MU v Brně analyzovány statistickým programem R Core Team, Version 3.5.0 (2018-04-23).

Verifikace kandidátních miRNA pomocí in situ hybridizace (ISH) a kvantitativní „real-time“ PCR (qRT - PCR)

Pro ověření lokalizace i kandidátních miRNA byly tkáňové řezy v naší laboratoři podrobeny ISH pomocí miRCURY™ LNA™ microRNA ISH Detection Probes & Kit (Exiqon/Qiagen; Hilden, Německo) se specifickými „double DIG - labeled LNA“ sondami. Protokol výrobce byl mírně modifikován. Po optimalizaci metody se doba trvání ISH prodloužila z původně doporučených 5 minut při teplotě 60°C na dobu 15 hodin při teplotě 37°C. Promytí řezů v SSC roztoku bylo uskutečněno při teplotě 50°C (anti - DIG reagent; ředění 1:200). Inkubace vzorků AP substrátem probíhala 2 hodiny při teplotě 37°C. Zbylé kroky postupu se již shodovaly s protokolem výrobce.

Vybrané miRNA byly dále testovány a kvantifikovány systémem miRCURY LNA miRNA PCR (Qiagen; Hilden, Německo) podle protokolu výrobce na rozšířeném souboru celkem 70 neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC. cDNA byla syntetizována z celkového množství izolované RNA za užití miRCURY LNA RT kitu (Qiagen; Hilden, Německo) v souladu s protokolem výrobce. Každou kandidátní miRNA jsme kvantifikovali pomocí miRCURY LNA SYBR Green PCR kitu a miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen; Hilden, Německo) v systému LightCycler 480 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.; Basilej, Švýcarsko). Jako endogenní kontrola qRT-PCR byla užita „Spike-in“ RNA. Referenčním genem pro určení relativní kvantity jednotlivých miRNA, počítanou metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$, byl U6.

3.3. Ověření věkové závislosti exprese prognostických a prediktivních znaků hodnocených u karcinomů mléčné žlázy

Soubor pacientek a sledované parametry:

Ověření věkové závislosti exprese v rutinní diagnostice standardně užívaných prognostických a prediktivních znaků karcinomů mléčné žlázy (ER, PR, HER2/neu/ErbB2, Bcl-2, Ki-67) bylo provedeno na souboru 662 případů karcinomů mléčné žlázy, vyšetřených na Ústavu klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc mezi lednem 2010 a dubnem 2014. Soubor pacientek byl rozdělen podle věku v době stanovení diagnózy do 8 skupin (3. až 10. decenium věku). Všechna zmíněná imunohistochemická vyšetření byla provedena na tkáňových řezech o síle 5 μm , a to obdobným způsobem, který byl popsán v kapitole 3.1. Byl revidován histologický typ nádoru a stupeň diferenciaci („grade“) nádoru podle doporučení WHO z roku 2012 (Lakhani S. R. et al., 2012). Dle výsledků imunohistochemického vyšetření výše uvedených znaků byly nádory zařazeny do jednotlivých molekulárních tříd podle exprese hormonálních receptorů, proteinu HER2 a případně hodnoty Ki-67. H skóre bylo vypočteno násobením procentuálního zastoupení exprese daného markeru v buňkách invazivní složky nádoru se stupněm intenzity barvení od 1 do 3. FISH pro stanovení amplifikace genu *c-erbB-2* byla provedena rovněž v souladu s platnými doporučeními ASCO/CAP (Wolff A. C. et al., 2013).

Statistická analýza sledovaných parametrů:

Korelace specifické věkové závislosti výše zmíněných prognostických a prediktivních znaků karcinomů mléčné žlázy byla zpracována statistickým systémem IBM SPSS version 22.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) na Ústavu lékařské biofyziky, LF UP a FN Olomouc. Pro statistické účely jsme z důvodu srovnatelnosti velikosti jednotlivých skupin sloučili skupiny pacientek ve 3. až 4. a 9. až 10. deceniu života. Korelační analýza pro expresi ER, PR, Ki-67, Bcl-2, proteinu a amplifikaci genu *c-erbB-2* (FISH) s věkem pacientek v době diagnózy a dále stupněm diferenciaci („grade“) nádoru byla provedena pomocí Spearman's rank korelačního koeficientu.

Vztah mezi expresí ER, PR, PCNA, Bcl-2, Ki-67, „grade“, expresí proteinu HER2, amplifikací jeho genu a molekulární třídou karcinomu prsu či histologickým typem nádoru byl hodnocen Kruskal-Wallisovým testem. Rozdíly mezi skupinami byly ověřeny Mann-Whitney U-testem s Bonferroniho korekcí. K hodnocení korelace mezi expresí proteinu HER2, molekulární třídou karcinomu prsu a histologickým typem nádoru byl použit Fisherův exaktní test. Za statisticky významné výsledky jsme považovali hodnoty signifikance (p-value) menší než 0,05.

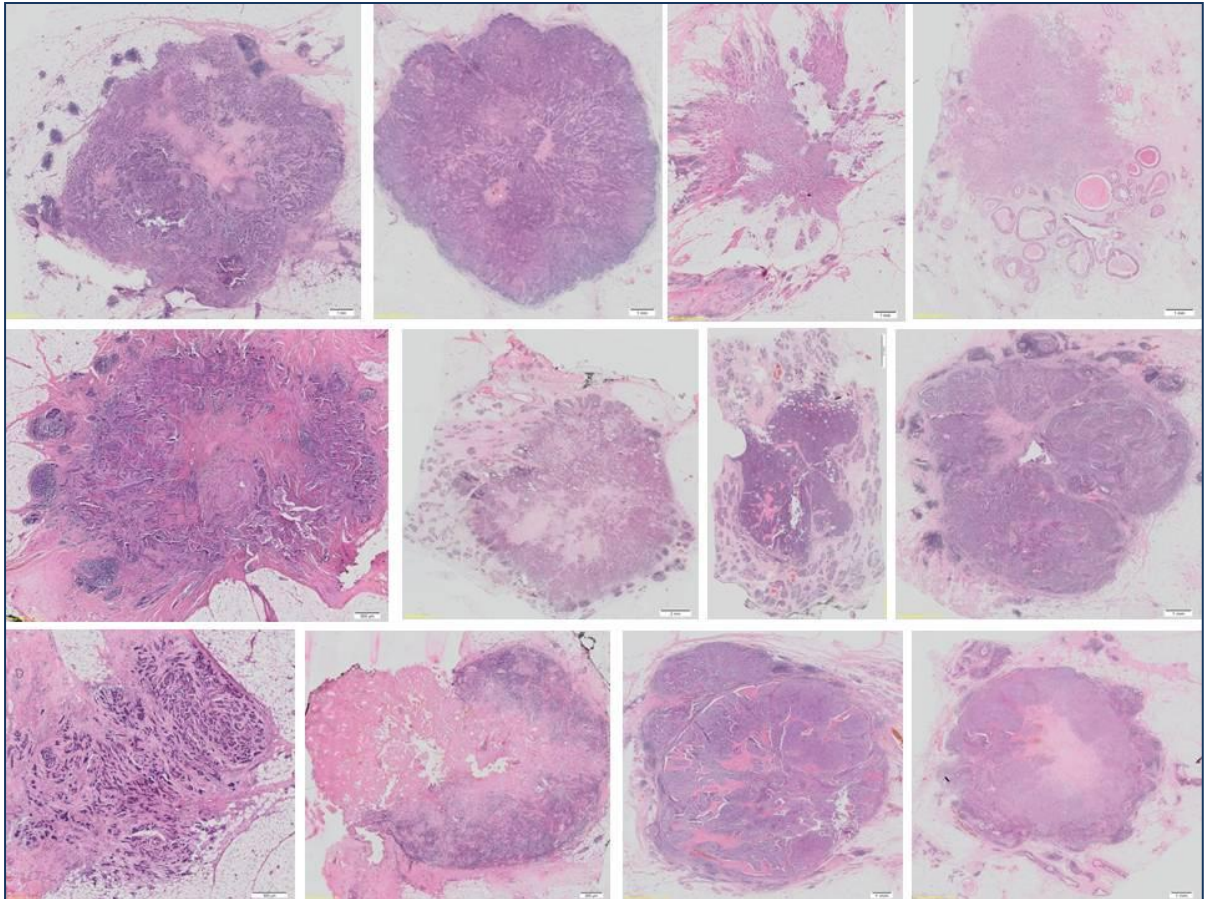
4. VÝSLEDKY

4.1a Histopatologická charakteristika souboru neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC – analýza histologických typů a morfologií nádorů

Náš původní nerozšířený soubor 58 neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC, ze 413 na Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc diagnostikovaných TNBC mezi lety 2007 až 2017, sestával převážně z invazivních karcinomů NST s medulárními rysy (48/58; 82,8 %). Z dalších histologických typů se vyskytoval metaplastický karcinom (5/58; 8,6 %), medulární karcinom (3/58; 5,2 %) a v jednom případě také atypický medulární karcinom (1/58; 1,7 %) či malobuněčný karcinom (1/58; 1,7 %). Ze souboru jsme již v této fázi vyřadili zmíněné adenoidně cystické karcinomy, u nichž je „triple“ negativní imunofenotyp obvyklý a také ojedinělé případy tubulárního, kribriformního či mucinózního karcinomu, které jsou prognosticky příznivé. Průměrný věk patientek v tomto souboru byl v době diagnózy 55,8 let (rozmezí 28 až 82 let, medián 55 let), 20 patientek bylo mladších 50 let (pravděpodobně premenopauzální status) a 38 patientek mělo 50 nebo více let (s velkou pravděpodobností postmenopauzální status). Metastatické postižení regionálních axilárních lymfatických uzlin bylo prokázáno u 11 případů (11/58; 18,6%), multifokální výskyt nádoru jsme zjistili u 7 případů (7/58; 11,9%).

Soubor TNBC sestával z poměrně dobře ohraničených nádorů s expanzivním způsobem růstu, přítomností centrální nekrózy či fibrózy a velikostí od 5 do 20 mm (pT1a – pT1c), o průměrné velikosti 13,4 mm (medián 15 mm). Kromě synciciální morfologie typické pro nádory s tzv. medulárními rysy, jsme zaznamenali častou tendenci k světlobuněčné, respektive apokrinní diferenciaci s objemnější eosinofilní nebo světlou granulární cytoplasmou nádorových buněk, potvrzenou imunohistochemickým průkazem GCDFP-15 a/nebo k vřetenobuněčné transformaci, jejichž četnosti spolu s četnostmi ostatních typů morfologie byly popsány v kapitole 4.2. U některých případů byla zjištěna mimo jiné tvorba kribriformních formací nebo přítomnost obrovských až monstrózních nádorových buněk. Jiný typ diferenciacie (metaplazie), a to skvamózní či chondrogenní jsme pozorovali sporadicky. Neinvazivní „in situ“ karcinom (DCIS) se vyskytoval u více než jedné třetiny případů. U všech nádorů jsme pozorovali různě intenzivní infiltraci lymfocytů (TILs) v nádorovém parenchymu/stromatu a v okolí invazivních částí nádorů, jejíž intenzitu jsme hodnotili podle modifikované kvantitativní škály popsané v kapitole 3.1. Příklady TNBC našeho souboru poskytují obrázky č. 4 až 7.

Obrázek č. 4: Příklady TNBC našeho souboru. Většina nádorů byla poměrně dobře ohraničená oproti okolí, převážně s centrální nekrózou či fibrózou a s různě intenzivní celulizací představovanou TILs. Velikost nádorů se pohybovala mezi 5 až 20 mm (pT1c).



4.1b Vztah mezi množstvím TILs a nádorovou morfológií u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC, korelace s vybranými klinicko - patologickými parametry

U mladších, pravděpodobně premenopauzálních pacientek (skupina pacientek mladších 50 let) jsme zaznamenali signifikantně vyšší množství TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů ve srovnání s pacientkami s velkou pravděpodobností postmenopauzálních (starších 50 let) ($p = 0,003$). Mladší věk pacientek v době diagnózy (< 50 let) byl rovněž asociován s nižším stupněm diferenciaci (vyšším „grade“) ($p = 0,002$) a vyšší proliferativní aktivitou ($p = 0,015$). V této skupině jsme zaznamenali statisticky významně nižší počet případů s metastatickým postižením regionálních lymfatických uzlin v porovnání se skupinou žen postmenopauzálních ($p = 0,001$).

V souboru převažovaly nádory se středním až nízkým stupněm diferenciaci. „Grade“ 2 byl diagnostikován u 17 případů (28,8 %), „grade“ 3 u 41 případů (69,5 %). Dobře diferencované nádory (grade 1) se vyskytovaly po vyloučení několika málo případů s morfológií invazivního tubulárního, invazivního kribriformního a mucinózního karcinomu jen u 1,7 % případů. Dále jsme prokázali v tomto souboru signifikantní pozitivní korelaci mezi stupněm diferenciaci nádoru a stupněm infiltrace TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů ($p = 0,002$). Průměrná velikost nádorů v našem souboru byla 13,4 mm v rozmezí 5 až 20 mm. Tato malá velikost umožňovala primární chirurgickou intervenci bez předchozí neoadjuvantní chemoterapie. Velikost nádorů vykazovala tendenci k přímé korelaci s množstvím TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů ($p = 0,065$).

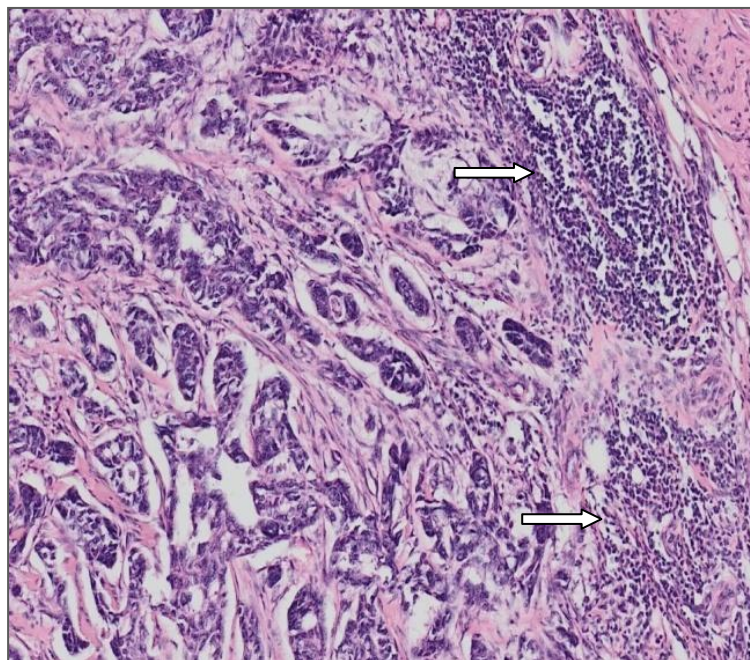
Při hodnocení exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 způsobem uvedeným v kapitole 3.1 jsme jeho kompletní negativitu zjistili u 57,4 % případů, nízkou expresi u 3,3 % případů, středně zvýšenou expresi u 16,4 % případů a vysokou expresi u 22,9 % pacientek. Vysoká exprese Bcl-2 negativně korelovala s množstvím TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů ($p = 0,035$).

Nižší proliferativní index vyjádřený expresí Ki-67 byl zjištěn u 32,8 %, střední proliferativní index u 18,0 % a vysoký proliferativní index u 49,2 % pacientek. V našem souboru jsme prokázali pozitivní, statisticky významnou korelaci proliferativního indexu s množstvím TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů ($p = 0,015$).

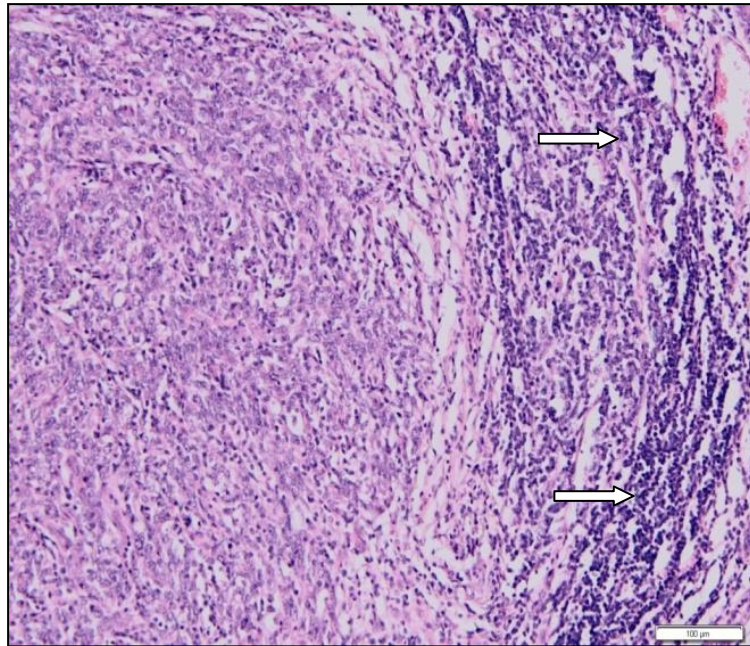
TNBC se současně přítomnou ložiskovou vřetenobuněčnou a světlobuněčnou, respektive apokrinní transformací nádorových buněk byly spojeny se statisticky významně intenzivnější infiltrací TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů ($p = 0,005$). Další statisticky významné rozdíly mezi množstvím TILs a vřetenobuněčnou či apokrinní transformací nádorových buněk prokázány nebyly ($p = 0,413$). Případy hodnocené jako metaplastické karcinomy se vyznačovaly nízkou intenzitou infiltrace TILs v nádorovém parenchymu/stromatu a středně vysokou intenzitou infiltrace v okolí invazivních částí nádoru.

Obrázek č. 5A a 5B: Příklad denzního infiltrátu TILs v okolí invazivních částí TNBC

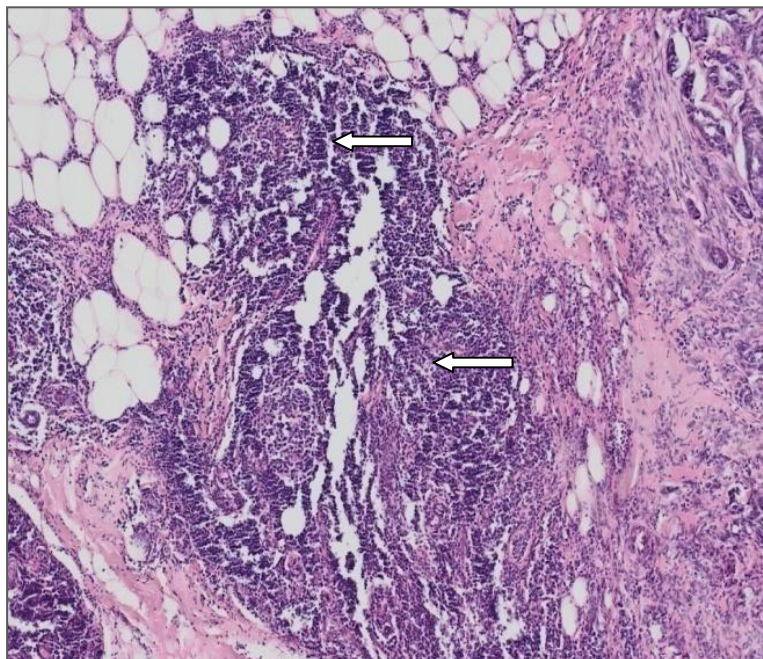
Obrázek č. 5A:



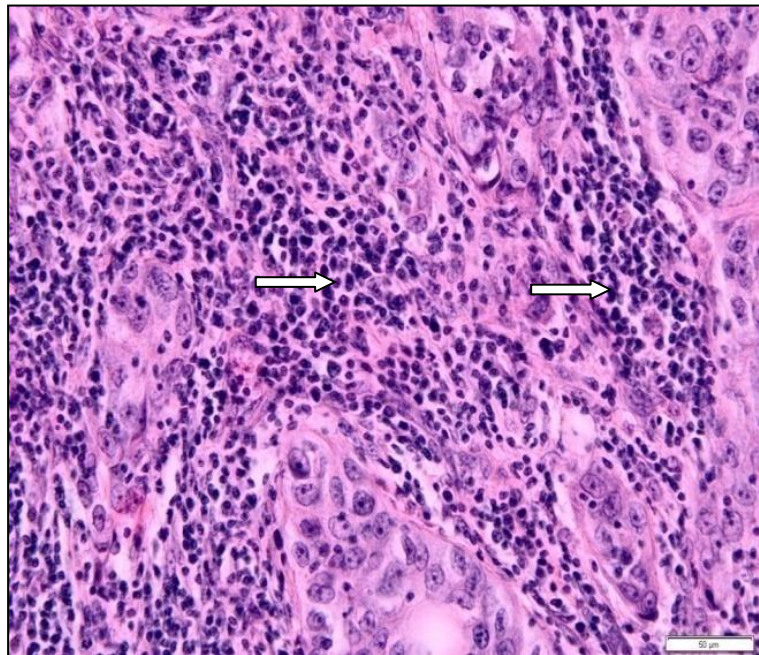
Obrázek č. 5B:



Obrázek č. 6: TILs formující lymfatické pseudofolikuly



Obrázek č. 7: Příklad denzního infiltrátu TILs v nádorovém parenchymu/stromatu



4.1c Exprese imunitních biomarkerů v kontextu s morfológií TNBC, věkem pacientek v době diagnózy, stupněm diferenciací nádoru, rozsahem onemocnění (TNM klasifikace), expresí Bcl-2 a proliferačním indexem Ki-67

4.1.1a Exprese biomarkerů kontrolních bodů imunitního systému - PD-1 a PD-L1

Zjištěné relativní četnosti membránové či cytoplazmatické pozitivité exprese PD-1 a jeho ligandu PD-L1 v nádorových buňkách a buňkách imunitního systému našeho souboru jsou shrnuty v tabulkách č. 4A-B a 5A-B. Kvantitativní škála je označena čísly 0 až 4 (0 – absence exprese nádorovými buňkami či buňkami imunitního systému; 1 – exprese v méně než 1 % nádorových buněk či méně než 1 % buněk imunitního systému; 2 - exprese v 1 až 10 % nádorových buněk či 1 až 10 % buněk imunitního systému; 3 – exprese v 11 až 50 % nádorových buněk či 11 až 50 % buněk imunitního systému u; 4 – exprese v 51 a více % nádorových buněk či 51 a více % buněk imunitního systému).

Tabulky č. 4A a 4B: Relativní četnosti exprese PD-1 v buňkách TNBC a v TILs

Exprese PD-1 v nádorových buňkách	
0	41,4 %
1	24,1 %
2	12,1 %
3	12,1 %
4	10,3 %

Exprese PD-1 v TILs	
0	34,5 %
1	31,0 %
2	5,2 %
3	19,0 %
4	10,3 %

*Tabulky č. 5A a 5B: Relativní četnosti exprese PD-L1 v nádorových buňkách
a v TILs*

Exprese PD-L1 v nádorových buňkách	
0	36,2 %
1	5,2 %
2	15,5 %
3	17,2 %
4	25,9 %

Exprese PD-L1 v TILs	
0	31,0 %
1	13,8 %
2	29,3 %
3	20,7 %
4	5,2 %

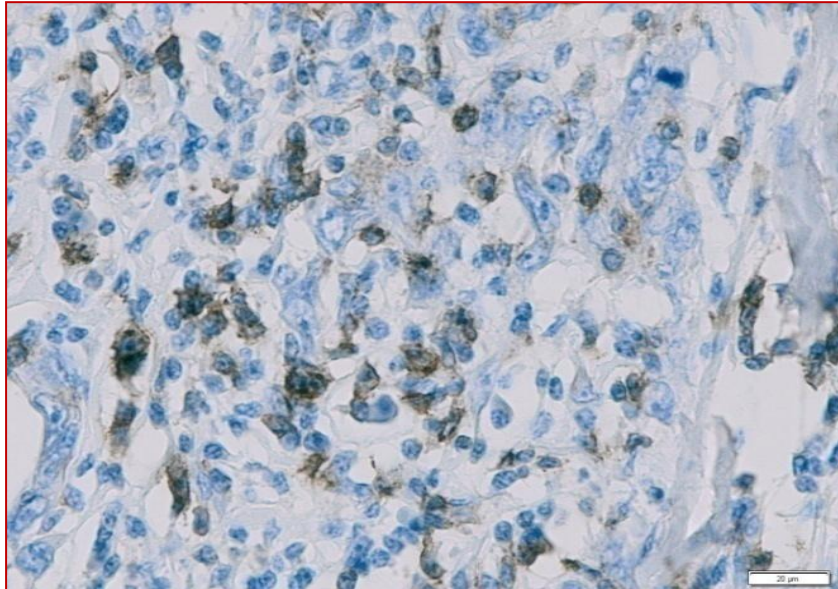
U našeho souboru TNBC jsme prokázali signifikantní pozitivní korelaci exprese PD-1 v nádoru i v TILs k velikosti nádoru ($r = 0,363$; resp. $0,469$), k expresi markeru proliferační aktivity Ki-67 ($r = 0,358$; resp. $0,505$) a nižšímu stupni diferenciaci nádorů (vyššímu „grade“) ($r = 0,352$; resp. $0,354$). Ve skupině postmenopauzálních pacientek bez generalizace onemocnění byla exprese PD-1 v nádoru rovněž přímo úměrně asociována s expresí CD40 v nádoru ($r = 0,670$; resp. $0,501$) i množstvím CD20+ B-lymfocytů ($r = 0,487$; resp. $0,571$), CD4+ T-lymfocytů ($r = 0,373$; resp. $0,645$; $0,334$; $0,549$) a CD8+ T-lymfocytů ($r = 0,465$; resp. $0,567$; $0,470$; $0,529$) uvnitř tumoru i v okolí invazivních částí nádorů, stejně jako s množstvím nádorových buněk exprimujících ALDH-1 ($r = 0,289$) a s vyšším zastoupením populace CD163 pozitivních, nádor infiltrujících M2 makrofágů ($r = 0,669$; resp. $0,567$). Trend ke korelaci, avšak bez zřetelné statistické významnosti, byl pozorován mezi expresí PD-1 v nádoru ($r = 0,060$) a cytoplazmatickou expresí Bcl-2 v nádorových buňkách ($r = -0,009$).

Exprese PD-L1 v nádorových buňkách korelovala u pacientek bez generalizace onemocnění s vyšší expresí ALDH-1, považovaného za jeden ze znaků nádorových kmenových buněk ($r = 0,321$) a CD44 ($r = 0,307$), vyšším obsahem CD4 pozitivních T-lymfocytů v nádorovém parenchymu/stromatu ($r = 0,596$) i CD163 pozitivních M2 makrofágů ($r = 0,311$). Ve skupině pacientek s metastatickým postižením regionálních lymfatických uzlin korelovala zvýšená exprese PD-L1 v lymfocytech s vyšší proliferační aktivitou stanovenou pomocí Ki-67 indexu ($r = 0,697$).

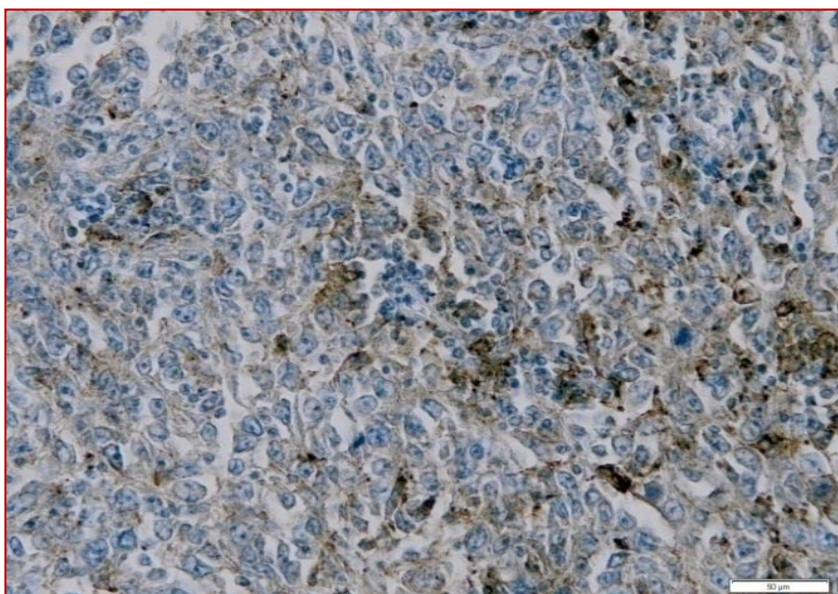
Příklady typické exprese PD-1 a PDL-1 poskytují obrázky č. 8A - B.

Obrázky č. 8A a 8B: Příklady exprese PD-1 v lymfocytech (8A) a PD-L1 v nádorových buňkách (8B)

Obrázek 8A:



Obrázek 8B:



4.1.1b Exprese CD40 a CD95 náležejících do rodiny receptorů pro TNF

V našem souboru jsme identifikovali 46,6 % nádorů s kompletní negativitou CD40 či velmi nízkou pozitivitou v nádorových buňkách (do 1 % nádorových buněk, skóre 0; 27/58), 44,8 % s nižší pozitivitou (2 – 30 % nádorových buněk, skóre 1; 26/58), absenci středně vysoké positivity (31 – 60 % nádorových buněk, skóre 2; 0/58) a 8,6 % nádorů s vysokou pozitivitou (více než 60 % nádorových buněk, skóre 3; 5/58). V případě exprese znaku CD40 v B – lymfocytech jsme zjistili, že 15,5 % případů bylo s kompletní negativitou nebo velmi nízkou pozitivitou (do 1 % B-lymfocytů, skóre 0; 9/58), 19 % s nižší pozitivitou (2 – 30 % B-lymfocytů, skóre 1; 11/58), 41,4 % se středně vysokou pozitivitou (31 – 60 % B-lymfocytů, skóre 2; 24/58) a 24,1 % s vysokou pozitivitou (více než 60 % B-lymfocytů, skóre 3; 14/58).

Analýzou znaku CD95 jsme prokázali 17,3 % nádorů s kompletní negativitou (skóre 0; 10/58), 37,9 % s nižší pozitivitou (1 až 50 % nádorových buněk, skóre 1; 22/58), 44,8 % s vysokou pozitivitou (více než 50 % nádorových buněk, skóre 2; 26/58).

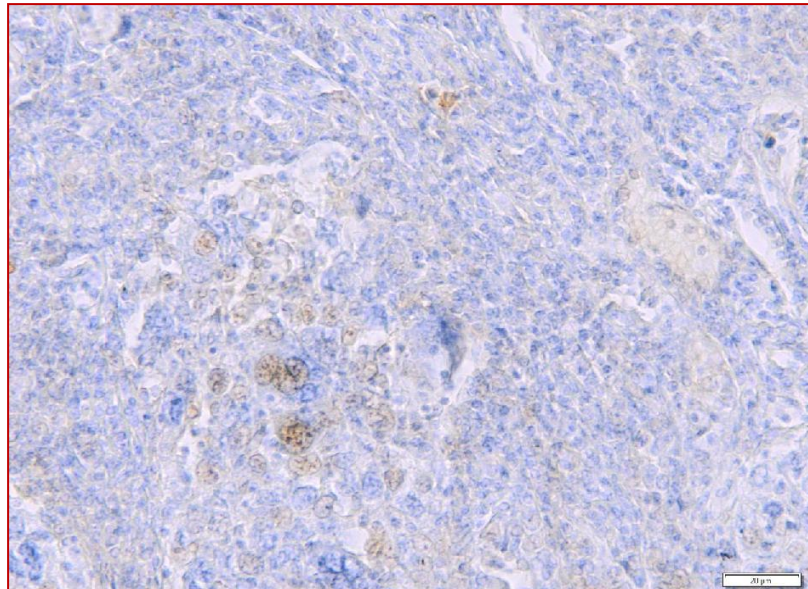
Kromě pozitivní korelace množství CD40 pozitivních nádorových buněk s množstvím nádorových buněk exprimujících PD-1 se nám podařilo prokázat pozitivní vztah mezi množstvím CD40 pozitivních B-lymfocytů ($r = 0,384$; resp. $0,429$) i CD40 pozitivních nádorových buněk ($r = 0,422$; resp. $0,412$) a množstvím TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů, a to u případů, u kterých se vyskytovala vřetenobuněčná transformace nádorových buněk.

V případě receptoru CD95, transmembránového proteinu cytotoxických T-lymfocytů, jsme u premenopauzálních pacientek prokázali přímou korelaci jeho exprese v nádorových buňkách se zvýšeným množstvím CD8 pozitivních T-lymfocytů v okolí invazivních částí nádorů ($r = 0,605$) a dále se zvýšeným množstvím CD163 pozitivních M2 makrofágů ($r = 0,546$). Tyto nálezy nekorelovaly s výskytem vřetenobuněčné transformace v TNBC. U postmenopauzálních žen jsme však zaznamenali pozitivní korelaci exprese CD95 v nádorových buňkách s expresí markerů nádorových kmenových buněk ALDH1 a CD44 ($r = 0,701$; resp. $0,374$).

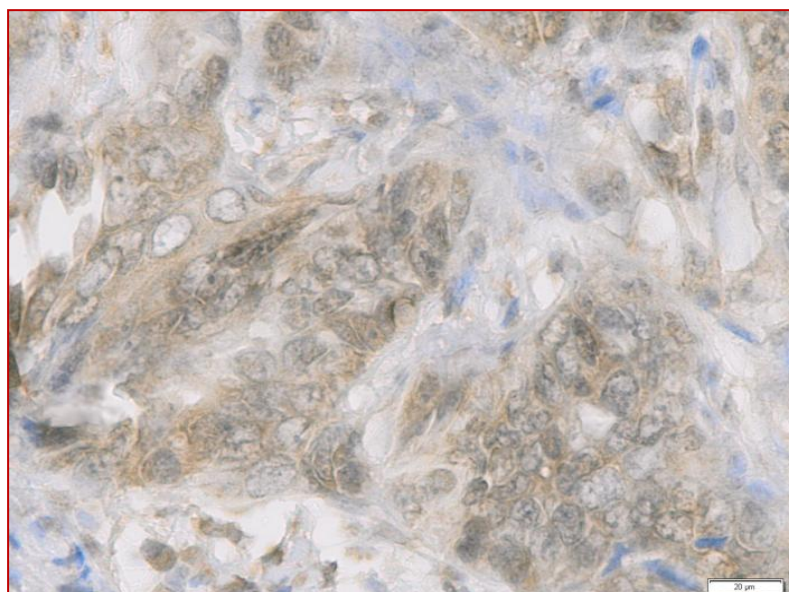
Příklady exprese CD40 a CD95 v nádorových buňkách poskytují obrázky č. 9A - B.

Obrázky č. 9A a 9B: Příklady převážně jaderné exprese CD40 (9A) a cytoplasmatické exprese CD95 v nádorových buňkách TNBC (9B)

Obrázek 9A:



Obrázek 9B:



4.1.1c Exprese CD163 a CD204 - biomarkerů M2 makrofágů

Množství CD163+ a CD204+ M2 makrofágů v TNBC pacientek ve věku < 50 let a ≥ 50 let shrnuje tabulka č. 6.

Tabulka č. 6:

Věk v době diagnózy											
	< 50 let (n = 20)					≥ 50 let (n = 38)					p - value
	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	
CD163	35,5	1	153	47	43,29	10	1	103	19,42	28,61	0,004
CD204	11,5	1	98	18,94	26,53	3,4	0,5	30	6,84	8,51	0,008

Min = minimální hodnota; Max = maximální hodnota; Mean = průměrná hodnota; SD = směrodatná odchylka

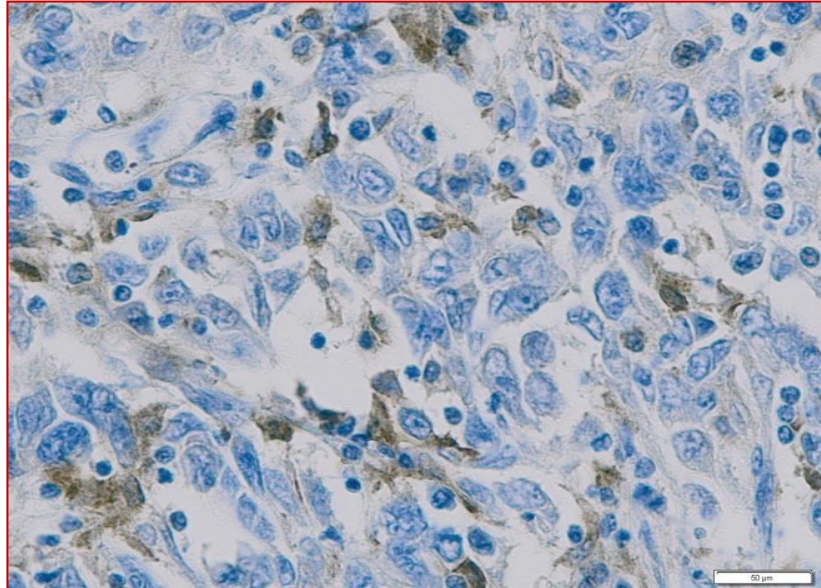
Hodnoty byly odvozeny z průměrného počtu pozitivních buněk z 10 zorných polí při největším zvětšení.

Množství CD163 pozitivních M2 makrofágů v nádoru korelovalo přímo úměrně s vyšší infiltrací TILs i CD4 a CD8 pozitivních T-lymfocytů ($r = 0,430$, $r = 0,570$; resp. $r = 0,291$, $r = 0,631$) v nádorovém parenchymu/stromatu ($r = 0,422$) i v okolí invazivních částí ($r = 0,423$). U pacientek bez přítomnosti metastáz do regionálních lymfatických uzlin jsme prokázali pozitivní korelaci množství CD163 pozitivních M2 makrofágů s množstvím TILs, stejně jako s expresí PD-1 ($r = 0,669$) a PD-L1 ($r = 0,311$) v nádoru a množstvím buněk v nádoru exprimujících ALDH1 ($r = 0,389$) a CD44 ($r = 0,570$). U TNBC s absencí ložisek vřetenobuněčné transformace pozitivně korelovalo množství CD163 pozitivních M2 makrofágů s expresí CD40 v nádoru ($r = 0,549$) i v B-lymfocytech ($r = 0,511$) a s expresí CD95 v nádorových buňkách ($r = 0,631$). Zvýšená infiltrace CD204 pozitivními makrofágy pozitivně korelovala jen s množstvím CD40 pozitivních nádorových buněk ($r = 0,537$), expresí PD-1 v nádoru ($r = 0,472$) a infiltrací CD4 a CD8 pozitivními T-lymfocyty v nádorovém parenchymu/stromatu ($r = 0,565$; resp. $0,428$).

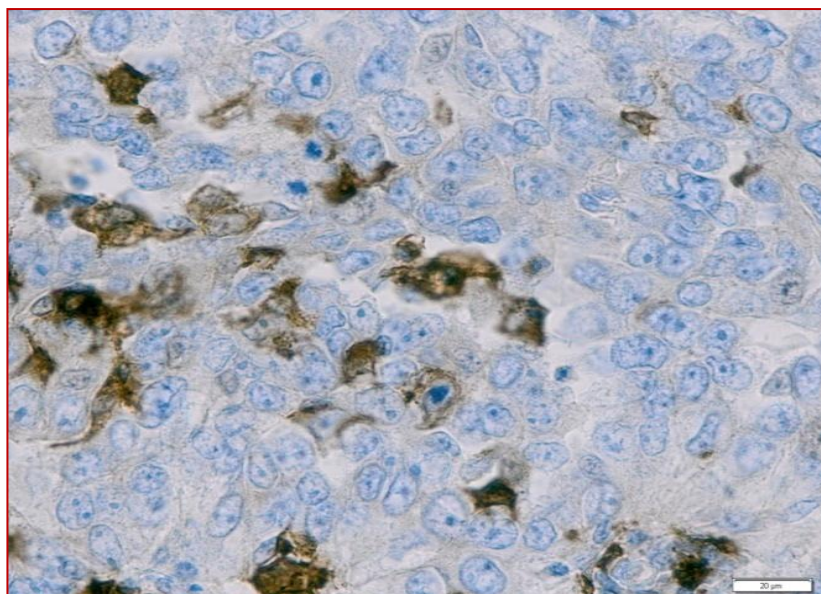
Příklady exprese CD163 a CD204 jsou prezentovány na obrázcích č. 10A - B.

Obrázky č. 10A a 10B: Příklady exprese CD163 pozitivních (10A) a CD204 pozitivních makrofágů (10B)

Obrázek 10A:



Obrázek 10B:



4.1.1d Exprese ALDH1, CD24 a CD44 - biomarkerů nádorových kmenových buněk

V našem souboru jsme zjistili 31 % případů s kompletní negativitou ALDH1 (skóre 0; 18/58), 37,9 % případů s nízkou pozitivitou do 10 % nádorových buněk (skóre 1; 22/58), 12,1 % se střední pozitivitou mezi 11 a 50 % nádorových buněk (skóre 2; 7/58) a 19 % s vysokou pozitivitou více než 50 % nádorových buněk (skóre 3; 11/58). Prokázali jsme statisticky významnou korelaci mezi množstvím ALDH1 pozitivních buněk a větší velikostí nádorů ($r = 0,335$), množstvím AR pozitivních nádorových buněk ($r = 0,327$) a CD40 pozitivních imunokompetentních buněk ($r = 0,309$). V nádorech se rovněž prokázala pozitivní korelace s množstvím CD8 ($r = 0,336$) a CD95 pozitivních T-lymfocytů ($r = 0,372$) a CD163 pozitivních M2 makrofágů ($r = 0,389$).

Dále jsme identifikovali 48,3 % nádorů s velmi nízkou expresí až negativitou CD44 (méně než 10 % nádorových buněk, skóre 1 a 0; 28/58), 27,6 % s nižší pozitivitou (11 až 30 % nádorových buněk, skóre 2; 16/58), 13,8 % se středně vysokou pozitivitou (31 až 50 % nádorových buněk, skóre 3; 8/58) a 10,3 % nádorů s vysokou pozitivitou CD44 (více než 50 % nádorových buněk, skóre 4; 6/58). U postmenopauzálních pacientek jsme zjistili signifikantní pozitivní vztah mezi expresí CD44 a expresí receptorů pro tumor nekrotizující faktory CD40 ($r = 0,400$) i CD95 v nádorových buňkách ($r = 0,324$) nebo mezi expresí CD44 v nádorových buňkách a množstvím CD163 ($r = 0,426$) i CD204 ($r = 0,690$) pozitivních M2 makrofágů.

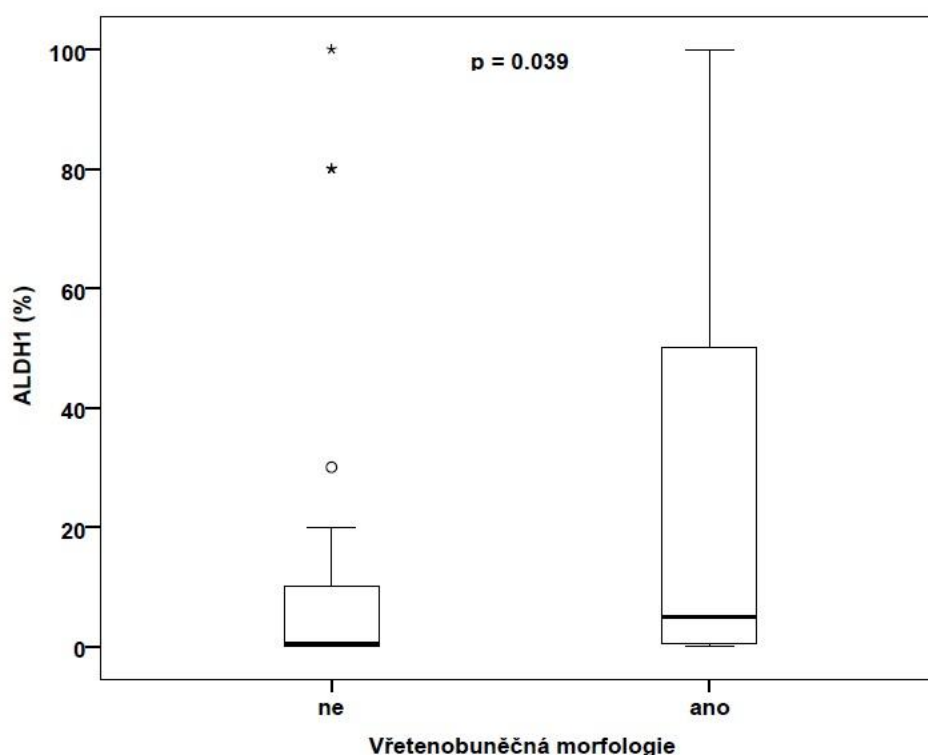
V případě exprese znaku CD24 jsme zjistili, že 58,6 % nádorů bylo s nízkou pozitivitou až negativitou (méně nebo rovno 25 % nádorových buněk, skóre 1 a 0; 9/58), 25,9 % se středně vysokou pozitivitou (26 – 50 % nádorových buněk, skóre 2; 15/58) a 15,5 % CD24- případů s vysokou pozitivitou CD24 (více než 50 % nádorových buněk, skóre 3; 34/58). Prokázali jsme statisticky významnou korelaci mezi množstvím CD24 pozitivních buněk a množstvím PD-L1 pozitivních lymfocytů v nádoru ($r = 0,275$).

Epitelový fenotyp, charakterizovaný vysokou expresí CD44 (skóre 4) i CD24 (skóre 3), byl zjištěn u 4 případů (4/58; 6,9 %). Mezenchymový fenotyp s charakteristickou vysokou expresí CD44 (skóre 4) a negativitou (skóre 0 - 1) CD24 („claudin - low“ fenotyp) jsme v našem souboru nezaznamenali.

Signifikantní pozitivní vztah mezi množstvím CD44 pozitivních nádorových buněk a množstvím ALDH1 pozitivních buněk ($r = 0,433$) byl zjištěn u nádorů s vřetenobuněčnou morfologií ($r = 0,444$) a u pacientek s metastázami do regionálních lymfatických uzlin ($r = 0,655$). Množství CD24 pozitivních buněk signifikantně nekorelovalo s množstvím buněk exprimujících ALDH1 nebo CD44.

Srovnání exprese ALDH1 v nádorových buňkách s a bez přítomnosti vřetenobuněčné morfologie je vyobrazeno na grafu č. 1. Příklady imunohistochemické vizualizace antigenů CD44 a ALDH1 jsou prezentovány na obrázcích č. 11A - B.

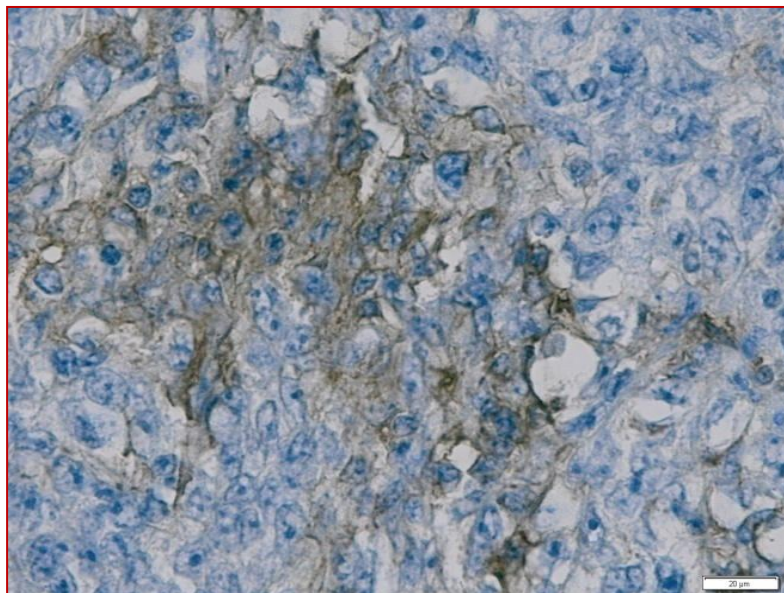
Graf č. 1: Grafické znázornění množství ALDH1 pozitivních buněk u případů TNBC s přítomností ložisek vřetenobuněčné složky a bez ní



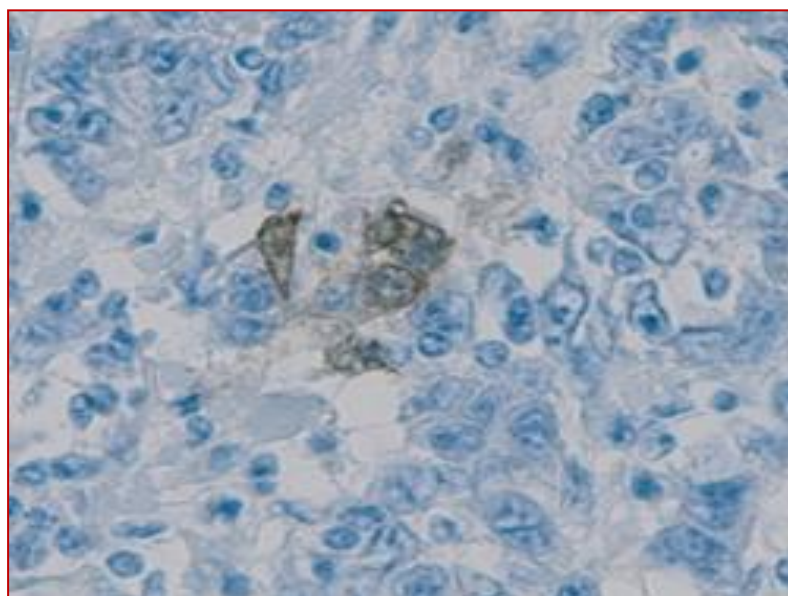
Rozložení naměřených hodnot bylo znázorněno „box“ grafy. Vodorovná čára v „box“ grafu znázorňuje hodnotu mediánu, dolní hrana „box“ grafu hodnotu 1. kvartilu (25. percentilu), horní hrana hodnotu 3. kvartilu (75. percentilu). Svorky ukazují maximální a minimální naměřené hodnoty, pokud byly v souboru nalezeny odlehle a extrémní hodnoty jsou zakresleny kroužky a hvězdičkami.

Obrázky č. 11A a 11B: Příklady exprese CD44 (11A) a ALDH1 (11B) v nádorových buňkách

Obrázek 11A:



Obrázek 11B:



4.1.1e Exprese AR u TNBC

Množství AR pozitivních nádorových buněk v TNBC pacientek ve věku < 50 let a ≥ 50 let shrnuje tabulka č. 7. Signifikantní rozdíly mezi zmíněnými věkovými skupinami nebyly zjištěny.

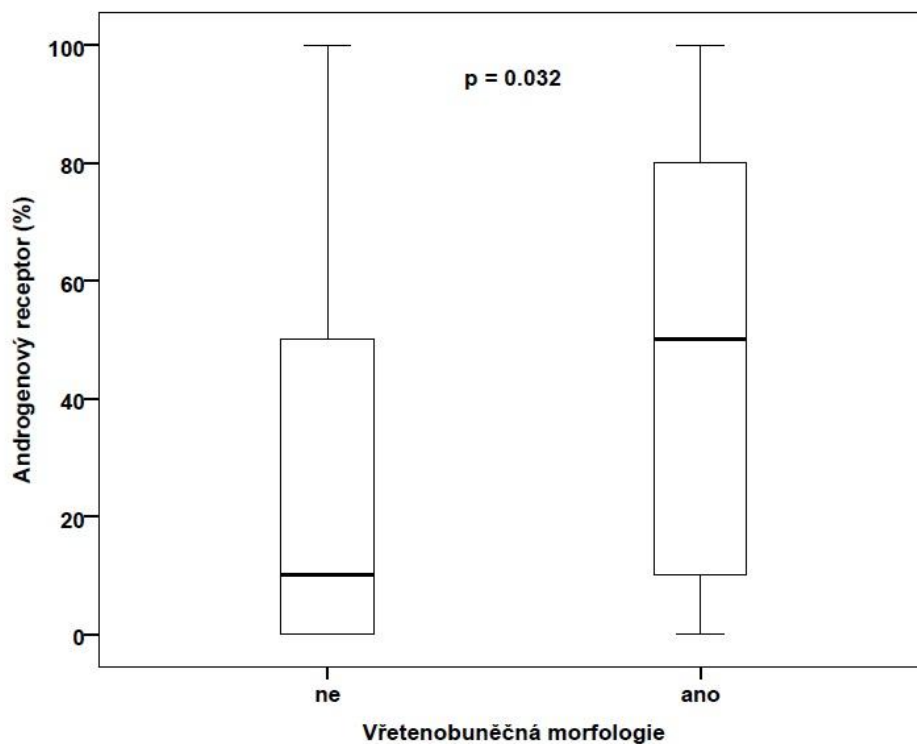
Tabulka č. 7:

Věk v době diagnózy											
	< 50 let (n = 20)					≥ 50 let (n = 38)					p - value
	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	
AR (%)	17,5	0	100	30,4	33,94	45	0	100	41,53	36,5	0,291

Min = minimální hodnota; Max = maximální hodnota; Mean = průměrná hodnota; SD = směrodatná odchylka

V našem souboru jsme prokázali expresi AR u 81 % nádorů (47/58). Ve skupině premenopauzálních pacientek bylo u našeho souboru neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC vyšší množství AR pozitivních buněk signifikantně asociováno s větší velikostí nádoru ($r = 0,456$), intenzivnější intratumorální infiltrací TILs ($r = 0,738$) a dále s nižším proliferačním indexem Ki-67 ($r = -0,665$). U nádorů s expresí AR a přítomností ložisek vřetenobuněčné morfologie byl zaznamenán nižší počet CD163 pozitivních M2 makrofágů ($r = -0,543$). Dále jsme prokázali pozitivní vztah mezi výskytem ložisek s vřetenobuněčnou morfologií v nádoru a množstvím AR pozitivních buněk ($p = 0,032$, viz Graf č. 2).

Graf č. 2: Grafické znázornění množství AR pozitivních buněk u případů TNBC s přítomností ložisek vřetenobuněčné složky a bez ní



Vodorovná čára v „box“ grafu znázorňuje hodnotu mediánu, dolní hrana „box“ grafu hodnotu 1. kvartilu (25. percentilu), horní hrana hodnotu 3. kvartilu (75. percentilu). Svorky ukazují maximální a minimální naměřené hodnoty, pokud byly v souboru nalezeny odlehle a extrémní hodnoty jsou zakresleny kroužky a hvězdičkami.

4.2 Exprese specifických miRNA u neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC

Pro analýzu miRNA jsme rozšířili soubor na 70 případů (viz metodická část). Většina nádorů tohoto souboru neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC byla reprezentována invazivními karcinomy NST s medulárními rysy (58/70; 82,9 %). Jednalo se o poměrně dobře ohraničené nádory s přítomností centrální nekrózy či fibrózy a velikostí do 2 cm (pT1c). V rámci detailně analyzované morfologie těchto nádorů jsme kromě synciciálních formací, popisovaných u klasických medulárních nádorů, zaznamenali tendenci k světlobuněčné, respektive apokrinní transformaci (34/70; 48,6 %), potvrzenou následně imunohistochemickým průkazem GCDFP-15 a/nebo k vřetenobuněčné transformaci (32/70; 45,7 %). U 27,1 % (19/70) případů byla vřetenobuněčná a světlobuněčná transformace nádorových buněk přítomna současně. U ojedinělých případů byla zjištěna mimo jiné tvorba naznačených kribriformních (3/70; 4,3 %) či tubulárních formací (9/70; 12,9 %) nebo přítomnost obrovských buněk až monstrozit (6/70; 8,6 %).

U 25 případů TNBC s medulárními rysy jsme provedli mikrodisekci tkání z různých výše popsaných morfologií a po extrakci RNA analyzovali pomocí mikročipů 2578 lidských zralých miRNAs. Následně jsme vybrali několik kandidátních miRNAs, u nichž rozdíl v expresi nejvíce odrážely specifiku jednotlivých morfologií. Lokalizace exprese specifických miRNA byla ověřena pomocí ISH, jejich kvantifikace byla provedena metodou qRT - PCR.

Výsledky jsou shrnuty formou tabulek č. 8A a 8B. Příklady lokalizace exprese některých miRNA (miRNA-182-5p, miRNA-155-5p, miRNA-185-5p) pomocí metody ISH jsou vyobrazeny na obrázcích č. 13A - 13C. Příklady grafického znázornění křivek tání a teploty tání všech analyzovaných miRNA v qRT - PCR znázorňují obrázky č. 12A a 12B.

Tabulka č. 8A a 8B: Kandidátní lidské miRNA vybrané na základě srovnání jejich exprese v jednotlivých morfologiích s expresí v nenádorových lalůčcích

Tabulka č. 8A:

hsa-miRNA	Analyzovaná nádorová morfologie/nenádorová tkáň mléčné žlázy							
	1	2	3	4	5	6	7	8
hsa-miRNA-93-5p	2,778464	0,625385	2,042346	1,16495	2,954544	0,416898	3,004543	3,507767
hsa-miRNA-106b-5p	2,312141	0,280578	1,899129	0,645866	2,399364	-0,21342	2,693886	3,316004
hsa-miRNA-143-3p	-3,11524	-4,13503	-2,05416	-1,48588	-3,70984	-4,69437	-5,14633	-2,36005
hsa-miRNA-145-5p	-3,3784	-3,83976	-1,9239	-1,48862	-3,89388	-3,14193	-3,24104	-3,096
hsa-miRNA-155-5p	1,789823	0,5133275	3,322195	-0,097194	1,932161	4,423448	6,290150	4,15905
hsa-miRNA-182-5p	3,33495	1,538899	1,547441	1,813662	2,606678	-0,96368	-0,22961	4,313127
hsa-miRNA-185-5p	2,104656	0,667754	2,497742	-0,41043	1,479555	0,339569	2,470375	3,293169
hsa-miRNA-200c-3p	1,068412	0,714128	-1,79161577	0,73008	0,857119	-5,91259	-6,25195	1,24048
hsa-miRNA-205-5p	-3,86818	-3,79472	-4,30683	-0,67873	-2,68913	-6,09053	-6,19261	-2,39757
hsa-miRNA-361-5p	0,27974	0,191571	0,176113	0,038131	0,033238	-0,26742	-0,38186	-0,17218
hsa-miRNA-4417	2,84449	-0,44790394	0,2327839	0,498020	1,47838	0,040584	-0,4865019	0,935756

1 – světlóuněčná složka/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

2 – DCIS/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

3 – vřetenóuněčná složka/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

4 – kribriřormní struktury/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

5 – tubulární struktury/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

6 – oblast denzního infiltrátu TILs/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

7 – medulární struktury nádoru/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

8 – nádorové monstrozity/normální lalůček tkáň mléčné žlázy

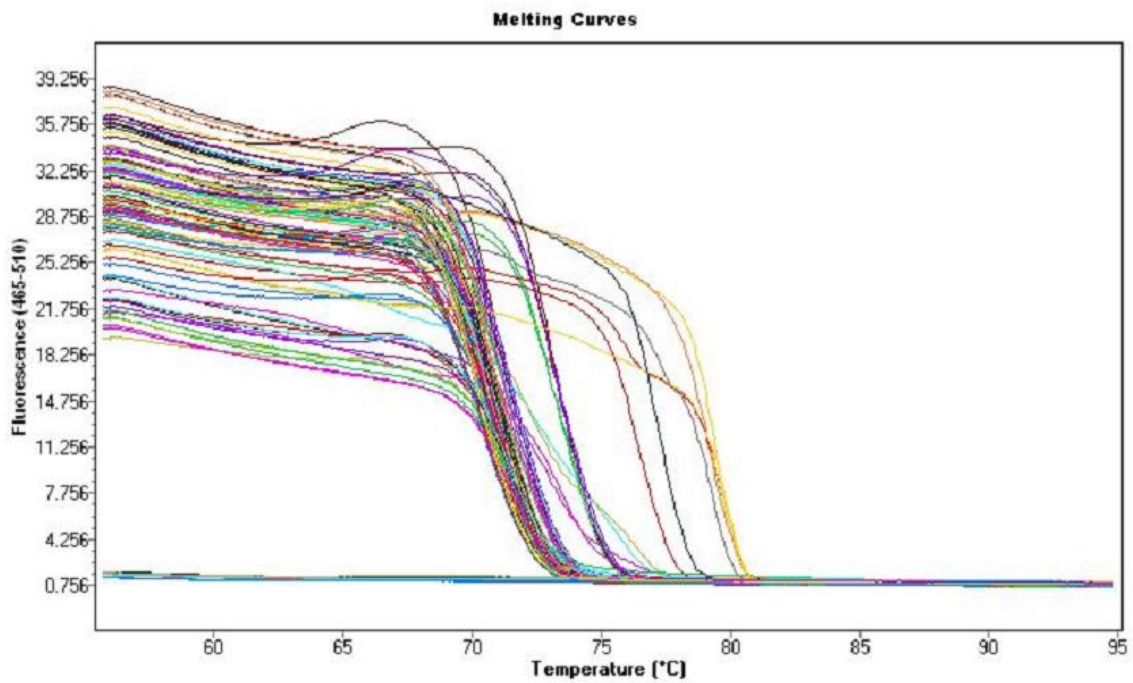
Tabulka č. 8B:

hsa-miRNA	AveExpr	F	p-value	adj p-value
hsa-miRNA-93-5p	5,428349	1,659982	0,072669	0,40094
hsa-miRNA-106b-5p	4,13362	1,855335	0,037978	0,29579
hsa-miRNA-143-3p	4,029096	4,988822	0,000012	0,00063
hsa-miRNA-145-5p	5,291003	3,349342	0,000219	0,01992
hsa-miRNA-155-5p	2,777901	3,147294	0,000434	0,02660
hsa-miRNA-182-5p	3,481485	2,438843	0,005054	0,10022
hsa-miRNA-185-5p	3,257825	2,388556	0,006024	0,11361
hsa-miRNA-200c-3p	8,366048	6,147726	0,000047	0,00007
hsa-miRNA-205-5p	4,697128	3,478942	0,000142	0,01462
hsa-miRNA-361-5p	1,39765	1,416672	0,156320	0,57406
hsa-miRNA-4417	2,83558	4,078781	0,000019	0,00382

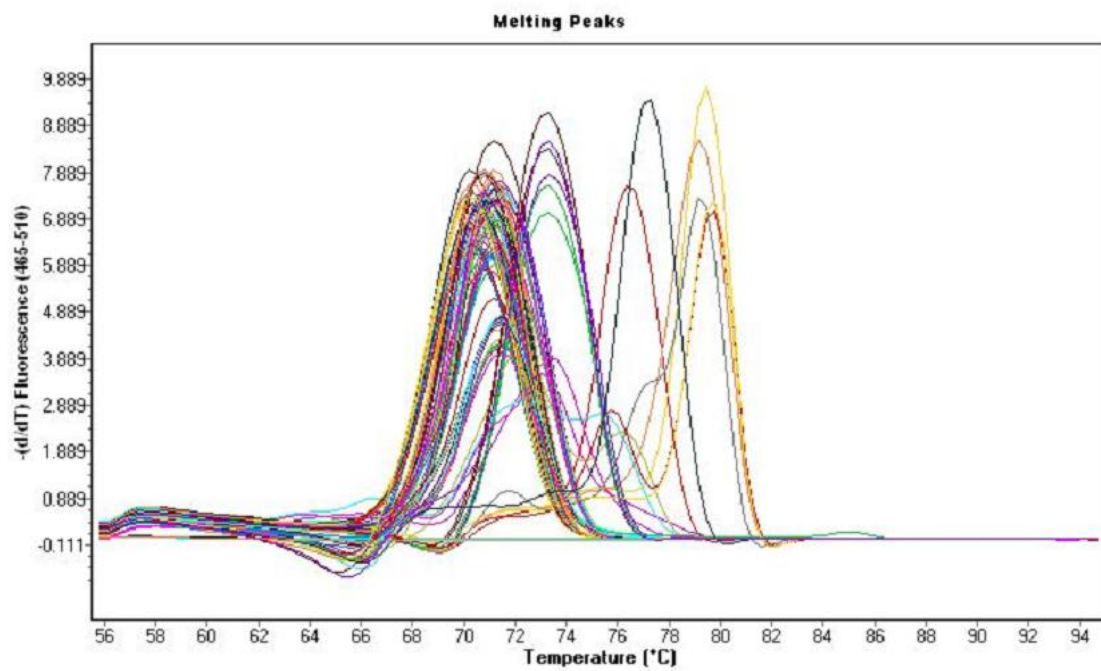
AveExpr – průměrná exprese; F – F test; adj p – value –, „adjusted p-value“

Obrázek č. 12A a 12B: Křivky tání (12A) a teploty tání (12B) všech analyzovaných miRNA v qRT - PCR

Obrázek 12A:

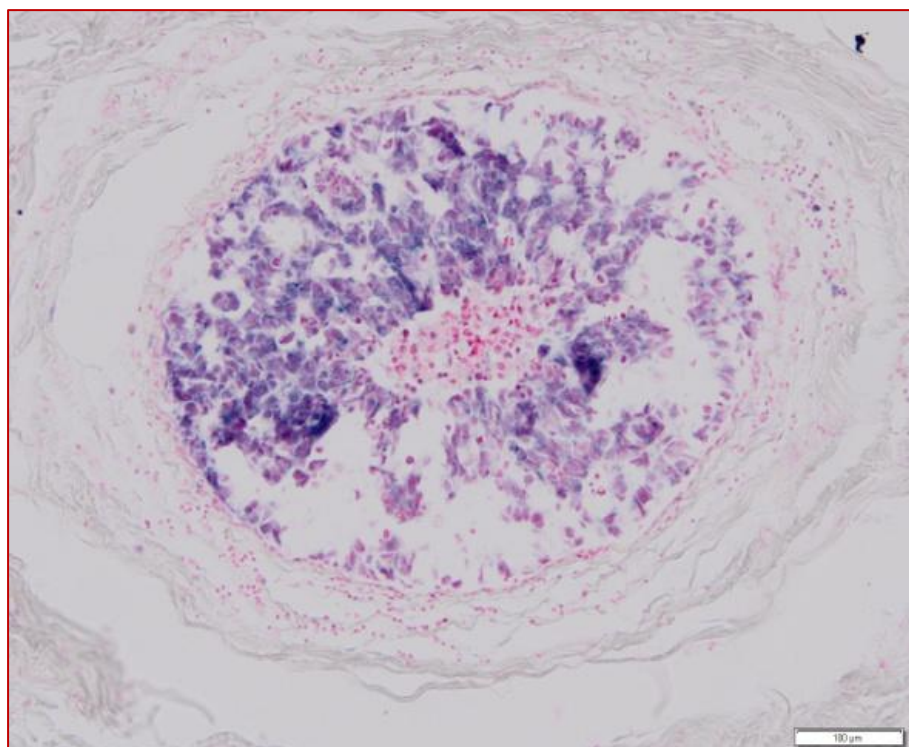


Obrázek 12B:

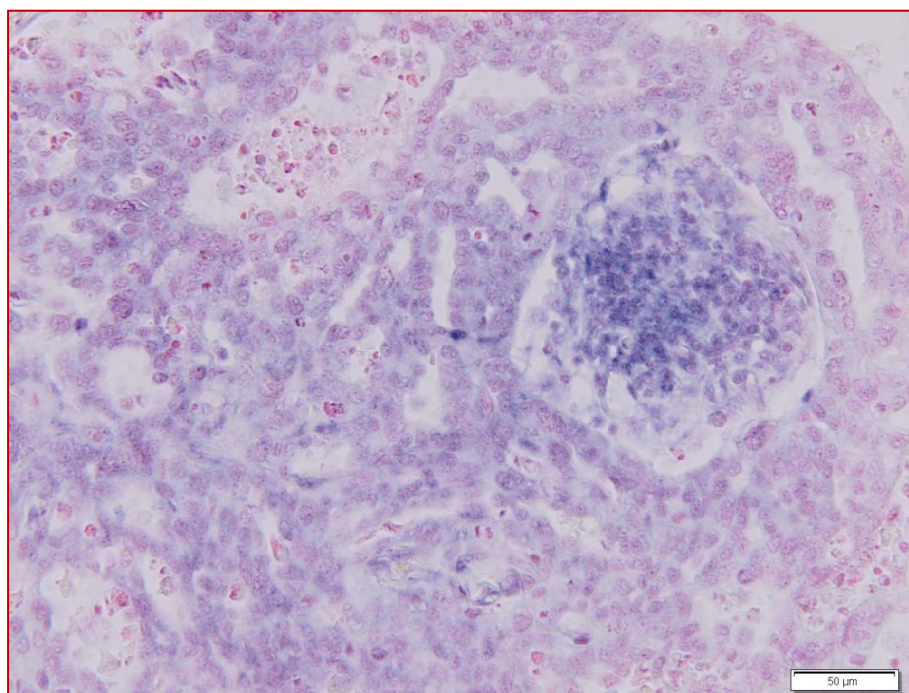


Obrázek č. 13A-13C: Příklady prokázané lokalizace exprese miRNA pomocí ISH

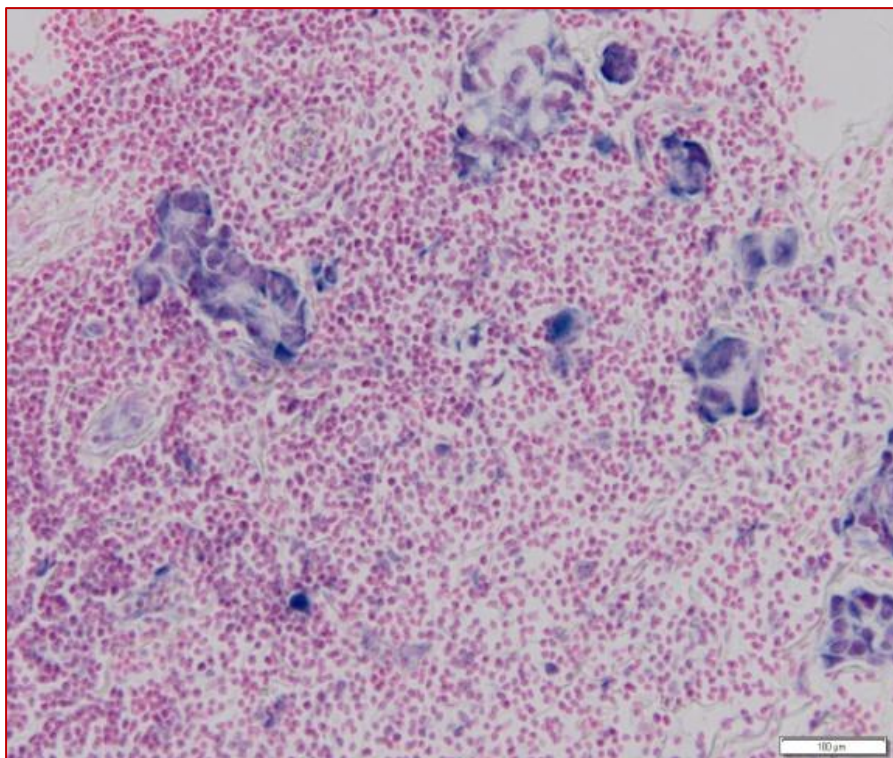
Obrázek č. 13A: Exprese miRNA-182-5p v nádorových buňkách karcinomu in situ (DCIS)



Obrázek č. 13B: Slabá exprese miRNA-155-5p v nádorových buňkách, silná exprese v *TILs*



Obrázek č. 13C: Silná exprese miRNA-185-5p v buňkách TNBC do lymfatické uzliny



miRNA-93-5p

U našeho souboru patientek s TNBC jsme zaznamenali zvýšení exprese miRNA-93-5p ve všech morfologiích invazivního karcinomu oproti strukturám duktálního karcinomu in situ (DCIS), kde se exprese jen nesignifikantně lišila od exprese v normálních lalůčkách. Minimální zvýšení exprese oproti normálním lalůčkům bylo také pozorováno v místech s denzním lymfocytárním infiltrátem.

miRNA-106-5p

V našem souboru byla miRNA-106-5p zvýšeně exprimována ve všech typech sledovaných morfologiích invazivního karcinomu a spolehlivě je odlišovala od DCIS i ložisek TILs, kde se exprese blížila normálnímu stavu.

miRNA-143-3p

U miRNA – 143-3p se prokázalo snížení exprese ve všech nádorových morfologiích a ložiscích TILs oproti nenádorovému epitelu lalůček z okolí nádoru, s výraznějším poklesem zejména u nádorů s medulární morfologií.

miRNA-145-5p

Rovněž exprese miRNA-145-5p odlišovala všechny nádorové morfologie i TILs, kde byla její exprese snížena, od normální, respektive nenádorové tkáně epitelu lalůček a ductů mléčné žlázy v okolí nádoru.

miRNA-155-5p

Zvýšená exprese miRNA-155-5p byla asociována s agresivnějšími nádorovými morfologiemi, zahrnujícími vřetenobuněčnou transformaci nádorových buněk, „high grade medulární morfologie“ a oblasti s výskytem buněčných monstrozit. Poněkud překvapivě byla zvýšená i v ložiscích denzního infiltrátu TILs.

miRNA-182-5p

Podářilo se prokázat rozdíly v expresi miRNA-182-5p mezi všemi nádorovými morfologiemi včetně in situ komponenty karcinomu (DCIS) s výjimkou medulární (zvýšená exprese) a ložisky TILs respektive medulární morfologií (nesignifikantně snížená exprese).

miRNA-185-5p

U našeho souboru neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC jsme prokázali vyšší expresi miRNA-185-5p v nádorových morfologiích s přítomnou světlobuněčnou, vřetenobuněčnou, medulární i monstrózní buňky obsahující složkou oproti diferencovanějším partiím s kribriformní a tubulární složkou, stejně jako oproti DCIS a oblastem s denzním lymfocytárním infiltrátem.

miRNA-200c-3p

Expresa miRNA-200c-3p byla u našeho souboru pacientek s TNBC výrazně snížena v TILs, na rozdíl od ostatních nádorových i nenádorových morfologií s výjimkou medulárních struktur.

miRNA-205-5p

Expresa miRNA-205-5p v našem souboru pacientek s TNBC diskriminovala agresivní nádorové morfologie s vřetenobuněčnou transformací nádorových buněk (silně snížená exprese) od méně agresivních nádorových morfologií zahrnujících kribriformní a tubulární formace, kde pokles exprese byl signifikantně méně výrazný. Zaznamenaný mírnější pokles v oblastech nádoru s výskytem monstrózních buněk nebyl signifikantní.

miRNA-361-5p

V našem souboru pacientek s TNBC odlišovala exprese miRNA-361-5p méně agresivní nádorové morfologie (kribriformní a tubulární formace), u nichž se exprese prakticky nelišila od normálních lalůček, od ostatních morfologií včetně ložisek TILs, které jevíly nepřilíš výrazné odchylky jak směrem nohoru, tak i dolů.

miRNA-4417

Expresa miRNA-4417 významně odlišovala ložiska světlobuněčné transformace nádorových buněk (zvýšená exprese) od TILs i DCIS (snížená exprese), ale svou hodnotou se lišila i od ostatních nádorových morfologií, kde podstatné změny oproti normálním lalůčkům nebyly pozorovány.

4.3 Věková závislost exprese prognostických a prediktivních znaků rutinně hodnocených u karcinomů mléčné žlázy

Věková a histologická charakteristika analyzovaného souboru pacientek s karcinomy mléčné žlázy je uvedena v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Věkově specifická distribuce histologických typů karcinomů mléčné žlázy v našem souboru pacientek

Věkové rozmezí pacientek v době stanovení diagnózy (decenium života)	Počet pacientek	Průměrný věk	Distribuce histologických typů					
			1	2	3	4	5	6
20-29 let (3. decenium života)	4	29	4	0	0	0	0	0
30-39 let (4. decenium života)	30	36	25	4	1	0	0	0
40-49 let (5. decenium života)	79	46	66	8	4	0	0	1
50-59 let (6. decenium života)	158	56	130	16	8	0	1	3
60-69 let (7. decenium života)	203	65	163	25	10	2	0	3
70-79 let (8. decenium života)	111	75	88	7	11	1	1	3
80-89 let (9. decenium života)	41	84	36	1	3	0	0	1
90-99 let (10. decenium života)	6	93	6	0	0	0	0	0
<i>Celkový počet</i>	<i>632</i>	<i>61</i>	<i>518</i>	<i>61</i>	<i>37</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>11</i>

* *Vysvětlivky k histologickým typům karcinomů mléčné žlázy:*

1 – invazivní karcinom NST; 2 – DCIS; 3 – invazivní lobulární karcinom; 4 – prognosticky horší karcinomy mléčné žlázy (metaplastický a mikropapilární karcinom); 5 – medulární karcinom; 6 – prognosticky příznivější karcinomy mléčné žlázy (tubulární karcinom, mucinózní karcinom, kribriformní karcinom, papilární karcinom)

4.3.1 Věkově specifická závislost histologického typu karcinomu mléčné žlázy a stupně diferenciaci („grade“) nádoru

U našeho souboru 632 pacientek byly karcinomy prsu nejčastěji zastoupeny invazivním karcinomem NST (82,0 %) a následně DCIS (9,7 %), invazivním lobulárním karcinomem (5,8 %), v menším počtu případů skupinou karcinomů mléčné žlázy s horší prognózou (0,5 %) – metaplastické a mikropapilární karcinomy, skupinou medulárních karcinomů (0,3 %) a skupinou karcinomů mléčné žlázy s lepší prognózou (1,7 %) – tubulární karcinomy, kribriformní karcinomy, papilární karcinomy, mucinózní karcinomy. Nejvyšší incidence invazivního karcinomu NST a DCIS byla zaznamenána mezi 60 až 69 lety věku pacientek s průměrným výskytem okolo 65 let věku (31,5 % a 41,0 %). Tyto dvě jednotky byly rovněž i nejpočetněji zastoupené u žen mladších 50 let věku, tj. premenopausálních pacientek a vykazovaly nejvyšší frekvenci průkazu pozitivní membránové exprese proteinu HER2. Výskyt invazivního lobulárního karcinomu se pak markantněji zvyšoval u žen mezi 50 a 70 lety věku.

U popsaného souboru jsme prokázali statisticky významnou pozitivní korelaci mezi „grade“ nádoru, expresí proteinu HER2 ($p = 0,0002$) a proliferační aktivitou měřenou expresí Ki-67 ($p < 0,0001$). Stupeň diferenciaci nádoru signifikantně negativně koreloval s expresí hormonálních receptorů ($p < 0,0001$), která naopak pozitivně korelovala s věkem pacientek v době stanovení diagnózy ($p < 0,0001$).

4.3.2 Věkově specifická závislost zastoupení molekulárních tříd karcinomu mléčné žlázy

Distribuce jednotlivých molekulárních tříd karcinomu mléčné žlázy, definovaných v souladu s kritériemi „St. Gallen International Expert Consensus“ (Goldhirsch A. et al., 2011) byla následující:

- „*luminal*“ A 35%
 - ER+ a/nebo PR+, HER2/neu- či absence amplifikace jeho genu, Ki-67 < 14 %
- „*luminal*“ B – HER2 pozitivní 25 %
 - ER+ a/nebo PR+, HER2/neu+ či přítomnost amplifikace jeho genu, jakákoliv hodnota Ki-67
- „*luminal*“ C = „*luminal*“ B – HER2 negativní 1 %
 - ER+ a/nebo PR+, HER2- či absence amplifikace jeho genu, vysoká hodnota Ki-67
- „*HER2 - enriched*“ 14 %
 - ER- a PR-, HER2+ či přítomnost amplifikace jeho genu
- TNBC 25 %
 - ER- a PR-, HER2- či absence amplifikace jeho genu

Distribuci molekulárních tříd karcinomu mléčné žlázy u našeho souboru v závislosti na jednotlivých decéniích věku pacientek v době stanovení diagnózy shrnuje tabulka č. 10.

Tabulka č. 10: Věkově specifická distribuce molekulárních tříd karcinomů mléčné žlázy ve sledovaném souboru pacientek

Decenium věku	„Luminal“ A (%)	„Luminal“ B (%)	„Luminal“ C (%)	„HER2-enriched“ (%)	TNBC (%)
3. decenium	0,00	0,00	0,00	33,00	67,00
4. decenium	12,50	25,00	4,20	25,00	33,30
5. decenium	31,00	17,30	0,00	15,50	36,20
6. decenium	30,00	28,60	2,00	12,30	22,10
7. decenium	40,80	26,00	0,00	13,60	19,60
8. decenium	45,90	16,50	0,00	10,60	27,00
9. decenium	46,40	32,20	0,00	7,10	14,30
10. decenium	33,30	16,70	0,00	0,00	50,00

Nejvyšší výskyt prognosticky méně příznivých molekulárních tříd karcinomů mléčné žlázy – TNBC a „HER2 - enriched“ byl asociován s mladším věkem pacientek v době diagnózy, a to konkrétně s 3. deceniem a 4. deceniem věku u „HER2 - enriched“ molekulární třídy a 3. až 5. deceniem věku v případě TNBC, kde byla zároveň zjištěna i signifikantně vyšší proliferační aktivita nádorů. Nejvíce zastoupen byl v našem souboru pacientek „luminal“ A molekulární podtyp, jehož incidence významně vzrůstala od 5. decenia věku. Statisticky se podařilo prokázat signifikantní pozitivní korelaci molekulárních tříd karcinomů mléčné žlázy s expresí hormonálních receptorů ($p < 0,0001$), proliferační aktivitou ($p < 0,0001$), „grade“ nádoru ($p < 0,0001$), histologickým typem nádoru ($p < 0,0001$), expresí proteinu HER2 nebo amplifikací jeho genu a expresí proteinu Bcl-2. Karcinomy prsu řazené pod molekulární podtyp „luminal“ A byly často reprezentovány prognosticky příznivějšími histologickými typy nádorů, kterými jsou tubulární, kribriformní, mucinózní a papilární karcinomy. „Luminal“ B – HER2 pozitivní molekulární třída karcinomů mléčné žlázy byla charakterizována signifikantně nižším stupněm diferenciaci než podtyp „luminal“ A ($p = 0,001$) a naopak vyšším stupněm diferenciaci než v případech molekulární třídy „HER2 - enriched“ ($p < 0,0001$).

Distribuce jednotlivých molekulárních tříd u nejpočetněji zastoupeného invazivního karcinomu NST se významně lišilo („luminal“ A - 35,8 %; „luminal“ B - 24,7 %; „HER2 - enriched“ - 10,9 %; TNBC - 27,9 %). U invazivního lobulárního karcinomu byl nejčastějším výskyt molekulární třídy „luminal“ A u 53,3 % případů, která byla následována podtypy karcinomů „luminal“ B (33,3 %) a „HER2-enriched“ (13,3 %).

4.3.3 Věkově specifická závislost exprese hormonálních receptorů u karcinomu mléčné žlázy

V naší studii jsme prokázali statisticky významnou pozitivní korelaci mezi věkem pacientek v době stanovení diagnózy a expresí ER ($p < 0,0001$). Zvýšená exprese hormonálních receptorů byla asociována s přítomností lépe diferencovaných forem nádorů ($p = 0,004$), absencí amplifikace genu pro protein HER2 ($p < 0,0001$) a nižší proliferativní aktivitou ($p < 0,0001$). Signifikantní vztah mezi věkem pacientek v době stanovení diagnózy a expresí PR zjištěna nebyla. Exprese PR však pozitivně korelovala s expresí proteinu HER2 ($p = 0,001$) a Bcl-2 ($p < 0,0001$). Nejvyšší hodnoty exprese ER a Bcl-2 byly zaznamenány v 8. deceniu věku, zatímco nejvyšší hodnoty exprese PR ve 4. deceniu věku.

4.3.4 Věkově specifická závislost exprese proteinu HER2

Membránová exprese proteinu HER2 statisticky signifikantně pozitivně korelovala kromě amplifikace jeho genu ($p < 0,0001$) s expresí PR a „grade“ nádoru ($p = 0,0002$) a naopak negativně s expresí Bcl-2 ($p = 0,003$) a ER ($p = 0,001$). Statisticky významná závislost exprese proteinu HER2 s věkem pacientek zjištěna nebyla, přestože incidence „HER2 - enriched“ molekulární třídy karcinomu prsu byla v porovnání s ostatními věkovými skupinami výrazně vyšší ve 3. a 4. deceniu věku.

4.3.5 Věkově specifická závislost proliferačního indexu Ki-67 a PCNA

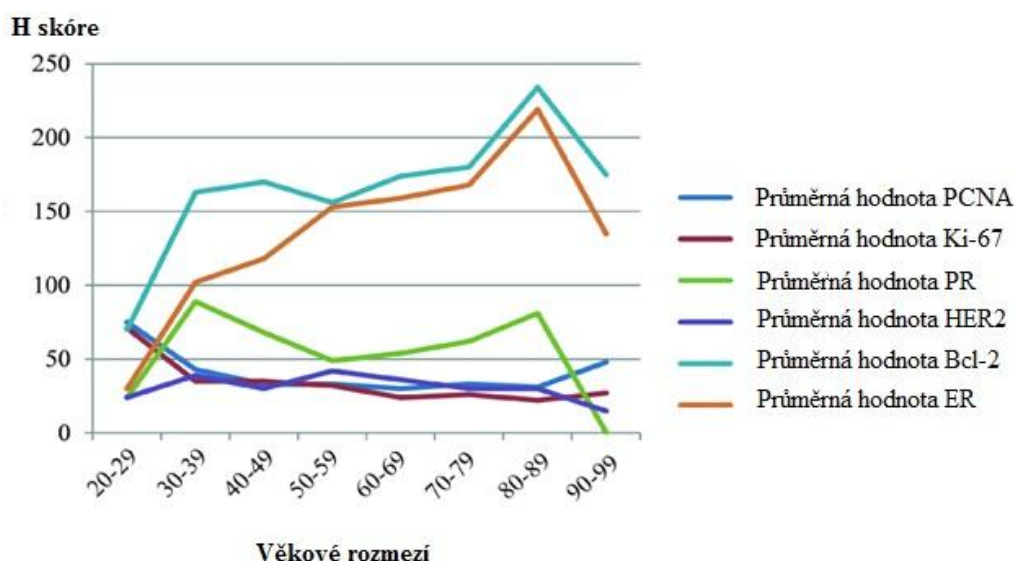
Silná jaderná exprese Ki-67 vykazovala u našeho souboru pozitivní vztah k věku pacientek v době stanovení diagnózy ($p < 0,0001$), nižšímu stupni diferenciaci ($p < 0,0001$), expresi proteinu HER2 ($p = 0,032$), amplifikaci jeho genu ($p = 0,007$), dalšímu ukazateli proliferační aktivity PCNA ($p < 0,0001$), histologickému typu nádorů ($p < 0,0001$) a k molekulárním třídám karcinomu prsu ($p < 0,0001$). Negativní korelace byla v případě Ki-67 potvrzena v souvislosti s expresí Bcl-2 ($p < 0,0001$).

4.3.6 Věkově specifická závislost proteinu Bcl-2

Cytoplazmatická exprese proteinu Bcl-2 statisticky signifikantně pozitivně korelovala kromě výše zmíněné exprese hormonálních receptorů i s jednotlivými molekulárními třídami karcinomu mléčné žlázy. Vysoké hodnoty H skóre pro expresi Bcl-2 byly v porovnání se skupinami pacientek s „HER2 - enriched“ karcinomy prsu a TNBC, zjištěny u „luminal“ A i „luminal“ B molekulárního podtypu.

Věkově specifickou závislost exprese hormonálních receptorů, exprese proteinu Bcl-2, proliferačního indexu Ki-67 a PCNA a proteinu HER2 shrnuje u našeho souboru následující graf č. 3.

Graf č. 3: Věkově specifická závislost exprese prognostických a prediktivních znaků u karcinomů mléčné žlázy



5. DISKUZE

V předložené disertační práci se zabýváme z pohledu morfologického a genetického poměrně vzácnou skupinou neoadjuvantní chemoterapií neovlivněných časných TNBC.

V našem souboru neoadjuvantní terapií neovlivněných TNBC se vyskytovaly nádory s velikostí od 5 mm do 20 mm (pT1a - pT1c). Většina nádorů patřila k histotypu invazivního karcinomu NST s medulárními rysy, jež jsou zpravidla asociovány s „triple“ negativním imunofenotypem. Zmíněné karcinomy jsou v současnosti považovány za prognosticky málo příznivé entity. Metaplastické karcinomy tvořily u našeho souboru pacientek nepočetnou skupinu. Oproti dříve publikovaným studiím (Livasy C. A. et al., 2006; Thike A. A. et al., 2010; Weisman P. S. et al., 2016) se v našem souboru pacientek s TNBC poměrně častěji vyskytoval klasický medulární karcinom, u něhož je negativita hormonálních receptorů a HER2 častá. Je však možné polemizovat s přístupem, podle kterého by tento typ karcinomu měl být vyřazen ze skupiny karcinomů považovaných za prognosticky příznivé. V souboru se překvapivě vyskytly i tři případy s evidentní morfologií kribriformního, tubulárního a mucinózního karcinomu, které byly sice opakovaně ER i PR negativní, avšak pro všobecně akceptovanou pozitivní prognózu těchto typů karcinomů jsme se nakonec rozhodli je ze souboru vyloučit. Naskytuje se tedy otázka, zda neměly být z této skupiny skutečně vyřazeny již na základě morfologické typizace, i když neexprimovaly hormonální receptory ani protein HER2, nebo zda měly být podrobeny další IHC specifikaci. Přestože se k druhé možnosti přikláníme, vyloučit jsme se je rozhodli s ohledem na možné ovlivnění výsledků analýz. Důvody, proč tyto nádory neexprimovaly hlavní znaky pro zařazení do molekulárního podtypu, se mohly vyskytovat na úrovni fixačního artefaktu. Na druhé straně bychom mohli spekulovat i o specifické regulaci exprese receptorů pro steroidní hormony, vlivu věku, fáze menstruačního cyklu, správnosti prahu negativity estrogenových receptorů < 1% apod. Metodickou nebo fixační chybu však musíme vyloučit, protože jsme imunohistochemická vyšetření opakovali se stejným výsledkem, přestože imunopozitivita jiných markerů (androgenových receptorů, Ki-67 apod.) zůstala zachována. Stejně tak jsme se rozhodli ze souboru nakonec vyřadit i prognosticky příznivé adenoidně cystické karcinomy, u nichž se však může „triple“ negativní imunofenotyp vyskytovat. Histotypizací TNBC se zabývala řada prací (viz výše). Určité kvantitativní rozdíly ve spektru TNBC našeho souboru vysvětlujeme tím, že jsme měli k dispozici vzorky úplných nádorů, které byly menších rozměrů, a proto pravděpodobně odrážely časná stadia jejich vývoje.

Oproti literárním datům jsme poměrně často zaznamenali a popsali uvnitř nádorů, kromě základního histologického typu, výskyt ložisek specifických buněčných morfologií, jako vřetenobuněčné, světlobuněčné, obrovskobuněčné. Považujeme je za projevy počínající epitelu - mezenchymové tranzice (EMT) a metaplazie.

Je známo, že vyšší intenzita TILs je asociována s až 4x silnější kompletní patologickou odpovědí (pCR) a je považována za ukazatel imunitní odpovědi, popsané v rámci koncepce nádorového imunitního dozoru (Burnet F. M., 1959). V poslední době se setkáváme se snahou o zavedení standardizovaných postupů hodnocení množství TILs v nádorech. Práce kolektivu autorů Salgado R. et al., z roku 2015, prezentuje doporučené postupy hodnocení TILs v nádorovém parenchymu, tj. v těsném kontaktu s nádorovými buňkami, v nádorovém stromatu a v okolí invazivních částí nádoru s tvorbou či absencí terciárních lymfoidních struktur. Prostudováním publikovaných doporučených postupů hodnocení TILs u karcinomů prsu jsme však došli k názoru, že autoři nedostatečně zohledňují rutinní praxi patologa, způsob získání vzorku tkáně a ve většině případů karcinomů prsu také nemožnost přesného odlišení TILs nádorového parenchymu od TILs přítomných v nádorovém stromatu, přičemž je význam připisován zejména lymfocytární infiltraci v nádorovém stromatu či v okolí invazivních partií nádoru a nikoliv jiným imunokompetentním buňkám. Otázkou je vůbec smysl hodnocení TILs z punkčních vzorků tkáně, u nichž nemůžeme vzhledem k heterogenitě infiltrace zaručit objektivní posouzení kvantity i kvality TILs ani posoudit úplnou morfologii nádorů. Z těchto důvodů jsme z našeho souboru vyřadili nádory diagnostikované primárně z punkčních vzorků a ponechali v souboru pouze ty nádory, u nichž jsme měli k dispozici kompletní resekáty získané po provedené mastektomii či kvadrantektomii. Takto sestavený soubor TNBC nám poskytoval jedinečnou příležitost detailní a validní analýzy nádorové morfologie včetně hodnocení intenzity a lokalizace TILs, exprese dalších biomarkerů i získání dostatečného množství tkáně pro účely mikrodisekce a stanovení exprese specifických miRNA. Protože je v rutinní praxi velmi těžké kvantifikovat počet TILs v přímém kontaktu s nádorovými buňkami odděleně od počtu TILs v nádorovém stromatu, doporučený postup jsme modifikovali tak, že nerozlišujeme tyto dvě skupiny a kvantitativně na námi vymezené čtyřstupňové škále hodnotíme počet TILs nacházejících se uvnitř hranic nádoru, zatímco infiltrace TILs podél invazivních částí nádorů leží mimo hranice nádoru. Náš mírně modifikovaný a zjednodušující postup je v parciálním souladu s návrhy uvedenými ve standardizovaných postupech, a navíc je rozšířen o hodnocení TILs v okolí nádoru podle doporučení uvedeného v práci Polónia A. a spolupracovníků (2017).

Signifikantně vyšší intenzitu infiltrace TILs uvnitř nádoru i v okolí invazivních částí nádorů a nižší stupeň diferenciaci a vyšší proliferativní aktivitu jsme prokázali u premenopauzálních žen. Přes vysoké hodnoty indexu Ki-67, nízkou až kompletně negativní expresi proteinu Bcl-2 a větší velikost nádorů jsme v této skupině zaznamenali méně případů s metastatickým postižením lymfatických uzlin. Tento jev dáváme spolu s nekrózou a fibrózou do souvislosti s vystupňovanou imunitní reakcí. Naše výsledky ukazují, že exprese proteinu Bcl-2 je v souladu s dřívějšími studiemi nezávislým prognostickým faktorem případné hormonální odpovědi nádorů (Bouchalova K. et al., 2015). Velikost nádorů v mm změřená v průběhu makroskopického popisu a zpracování vzorků a verifikována na mikroskopické úrovni, vykazovala pouze nesignifikantní tendenci ke korelaci s nárůstem množství TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů. Recentní studie zabývající se vztahem TILs k efektivitě neoadjuvantní chemoterapie potvrzují, že vyšší intenzita s nádorem asociované zánětlivé infiltrace může znamenat vyšší pravděpodobnost pCR, která je považována za nejsignifikantnější ukazatel celkového přežití (OS) a období bez progresu nádorového onemocnění (PFS) (Kurozumi S. et al., 2019; Pelekanou V. et al., 2017).

Přestože byly nádory v našem souboru charakterizovány převážně vysokou jadernou expresí Ki-67, u jedné třetiny případů jsme naopak zaznamenali proliferativní aktivitu neobvykle nízkou. Tuto skutečnost si vysvětluje tím, že náš soubor neodráží situaci u typických TNBC, ale u prognosticky příznivějších případů vyselektovaných výběrem k určité terapii. Do mezilaboratorní variability všeobecně spadá typ použité protilátky či rozdíly v jejich koncentracích. Metodickou chybu můžeme u našeho souboru TNBC vyloučit. Výsledky proliferativní aktivity se rovněž liší v různých studiích zabývajících se touto problematikou (Focke C. M. et al., 2017; Zenzola V. et al., 2018; Ilie S. M. et al., 2018). Zatímco výstupem konference v St. Gallenu je postupná redukce prognosticky významné vysoké hodnoty proliferativního indexu z původních 30 % na 20 %, v jiných studiích se setkáváme například s hodnotami více než 25 % či dokonce 34 % (Penulaut – Llorca F., Radošević-Robin N., 2017). Nejasnosti týkající se standardizace hodnocení vysokého proliferativního indexu Ki-67 mají za následek neporovnatelnost výsledků z různých laboratoří.

U našeho souboru TNBC jsme také analyzovali zastoupení imunokompetentních buněk a buněk s charakteristikou nádorových kmenových buněk. Hodnotili jsme v něm expresi biomarkerů kontrolních bodů imunitního systému - PD-1 a PD-L1, receptorů pro tumor nekrotizující faktor - CD40 a CD95, ukazatelů kmenových nádorových buněk – ALDH1, CD24 a CD44 a ukazatelů M2 makrofágů – CD163 a CD204, které by nám v kontextu s běžně hodnocenými a dostupnými klinicko-patologickými parametry mohly případně napomoci ke stratifikaci pacientek do prognostických skupin a poskytnout informaci o možné cílené terapii.

Expres PD-L1 byla v nádorových buňkách kompletně negativní u více než třetiny případů, vysoce pozitivní u čtvrtiny případů. Expres PD-L1 v TILs byla homogennější a celkově nižší než v nádorových buňkách. U našeho souboru TNBC jsme prokázali signifikantní pozitivní vztah exprese PD-1 v nádorových i imunokompetentních buňkách k velikosti nádoru, nízkému stupni diferenciaci nádorů a spolu s PD-L1 také vztah k vysoké proliferační aktivitě (Ki-67), ale i k vyššímu zastoupení populace s nádorem asociovaným M2 makrofágů (TAM), jejichž infiltrace se u TNBC oproti hormonálně dependentním nádorům jeví být jako prognosticky příznivější (Peľekanou V. et al., 2018). Množství CD163 a CD204 pozitivních M2 makrofágů v nádoru u našeho souboru přímo úměrně korelovalo s vyšší infiltrací CD4 a CD8 pozitivními T-lymfocyty a dále s expresí CD40 v nádoru i v B-lymfocytech a rovněž s expresí CD95 v nádorových buňkách. Je známo, že M2 makrofágy představují více než 50 % nádorového zánětlivého infiltrátu (Tsai C. S. et al., 2007). Jejich schopnost konverze na M1 prozánětlivé makrofágy odkrývá možnost potenciální cílené terapie s užitím monoklonálních protilátek proti CD40 (Genard G. et al., 2017), která se na této přeměně podílí a je rovněž v našem souboru zvýšeně exprimována.

Významné se v našem souboru TNBC ukázalo být hodnocení exprese CD40 v B-lymfocytech i v nádorových buňkách a CD95 v nádorových buňkách. CD40 bývá zvýšeně exprimován jak v různých epitelových nádorech včetně karcinomů prsu či lymfomech, tak i v nenádorových imunokompetentních buňkách či fibroblastech (Alexandroff A. B. et al., 2000; Brouty-Boyé D. et al., 2000; Slobodova Z. et al., 2011; Kim H. et al., 2015). Expresi CD40 jsme u našeho souboru TNBC detekovali v cytoplazmě i v jádře. Prokázali jsme nejen statisticky významnou pozitivní korelaci mezi množstvím CD40 pozitivních nádorových buněk a množstvím nádorových buněk exprimujících PD-1, ale také mezi množstvím CD40 pozitivních B-lymfocytů a nádorových buněk a množstvím TILs v nádorovém parenchymu/stromatu i v okolí invazivních částí nádorů, a to v souvislosti s přítomnou vřetenobuněčnou transformací nádorových buněk, tedy agresivnější nádorovou morfologií.

Při analýze Bcl-2 jsme se setkali s jeho kompletní negativitou u více než poloviny případů, kterou si vysvětlujeme porušenou a nefunkční steroidní signalizací. Studie zaměřené na vztah vysoké cytoplazmatické exprese Bcl-2 a exprese CD40 v nádorových buňkách prokázaly jejich příznivý prognostický efekt u hormonálně dependentních nádorů a naopak u TNBC či „HER2 - enriched molekulární třídy karcinomů prsu (Pinzon - Charry A. et al., 2006; Slobodova Z. et al., 2011). U našeho souboru TNBC jsme prokázali pouze nesignifikantní tendenci k negativní korelaci mezi expresí CD40 v nádorových buňkách i B-lymfocytech stejně jako v případě transmembránové nádorové exprese CD95. Exprese CD95 u našeho souboru pacientek pozitivně korelovala s množstvím CD8+ T-lymfocytů a CD163+ M2 makrofágů. Navíc, oproti expresi CD40, nálezy týkající se exprese CD95 nekorelovaly s výskytem vřetenobuněčné morfologie nádoru.

Jak již bylo uvedeno v úvodní části disertace, existují práce dokazující, že zvýšená exprese ALDH1 v TNBC pozitivně koreluje s velikostí nádorů, stadiem onemocnění, kratším obdobím bez relapsu, celkovým přežitím i rezistencí na chemoterapii (Kida K. et al., 2016; Ma F. et al. 2017). Jde tedy o biomarker, který predikuje agresivní biologické chování nádoru. Naše výsledky doplňují tyto předchozí studie, protože jsme prokázali korelaci exprese ALDH1 s větší velikostí nádorů a rovněž s větším zastoupením CD163 pozitivních „pronádorových“ M2 makrofágů v infiltrátu. Na druhé straně jsme prokázali pozitivní korelaci s množstvím CD8+, CD40+ a CD95+ lymfocytů, tedy buněk, které hrají významnou, ale zatím ne zcela objasněnou úlohu v protinádorové imunitní odezvě. Tento paradox zatím nedokážeme vysvětlit, avšak tyto nálezy ukazují, že ALDH1 se může rovněž účastnit procesů zánětlivé a imunitní reakce.

Buňky s pozitivitou CD44 a negativitou CD24 jsou považovány za nádorové kmenové buňky (Herschkowitz J. I. et al. 2007). Protože jsme neprováděli dvojité barvení, nemůžeme se jednoznačně vyslovit k množství buněk s tímto imunofenotypem v nádorech našeho souboru. Můžeme však konstatovat, že mezenchymový fenotyp TNBC (tzv. „claudin - low“ fenotyp), to znamená případy s vysokým množstvím CD44 pozitivních buněk a současně s negativitou nebo velmi malým množstvím CD24 negativních buněk se v našem souboru nevyskytovaly. Přesto bylo jednoznačně prokázáno, že exprese CD44 pozitivně koreluje se znaky nižší diferenciací a horší prognózy, jako jsou výskyt ložisek s vřetenobuněčnou morfologií v nádoru či výskyt metastáz do lymfatických uzlin. Zjištěnou pozitivní korelaci množství CD44 pozitivních buněk s množstvím ALDH1 pozitivních buněk v TNBC našeho souboru lze označit za očekávanou a svědčící pro souvislost exprese CD44 s vyšší agresivitou nádorů.

Expresí CD24 v našem souboru nekorelovala ani s expresí ALDH1 ani CD44. Jediná statisticky signifikantní pozitivní korelace byla zaznamenána mezi množstvím CD24 pozitivních nádorových buněk a množstvím PD-L1 pozitivních lymfocytů. Vyšší exprese CD24 v nádoru tedy může souviset s aktivací protinádorové imunitní odpovědi. Množí se data o tom, že tumory mohou uniknout z imunitního dozoru zajišťovaného mechanismem fagocytózy zprostředkované makrofágy tím, že produkují antifagocytární signály. Nová studie Barkala A. A. a spolupracovníků (2019) ukazuje, že jeden z těchto signálů – molekula CD24 řídí nový kontrolní bod vrozené imunity tím, že interaguje s inhibičním receptorem Siglec-10 („sialic acid-binding Ig-like lectin 10”) na povrchu TAMs („tumor-associated macrophages”). Z údajů v databázích TARGET a TCGA shromažďujících data o sekvenování RNA autoři zjistili, že exprese CD24 je zvýšená oproti normální tkáni téměř ve všech typech tumorů. Tato exprese byla mnohem vyšší, než u jiných regulátorů kontrolních bodů vrozené imunity, jako je například CD47. Největší zvýšení exprese CD24 bylo v TNBC a ovariálních karcinomech. Pacientky s nízkou expresí CD24 u těchto diagnóz měly delší celkové přežití a delší interval bez relapsu. To vše dokumentuje, že CD 24 je signální molekulou, která může účinně modulovat protinádorovou vrozenou imunitní odpověď a blokáda CD24 se jeví jako slibný způsob imunoterapie nádorů.

Androgenový receptor je transkripční faktor, který může regulovat proliferaci a růst nádorů (Christopoulos P. F. et al. 2017). U TNBC však má mít prognosticky příznivou charakteristiku, protože negativně koreluje s lepší diferenciací, nižší proliferací a menším rozsahem onemocnění (Bhattarai S. et al. 2019). V našem souboru jsme prokázali expresi AR u 81 % nádorů. Množství AR pozitivních buněk v souladu s publikovanými údaji negativně korelovalo s nižším proliferacním Ki67 indexem ($r = -0,665$), pozitivní korelace pak byla zjištěna i mezi expresí AR a intenzitou intratumorální infiltrace TILs ($r = 0,738$). Zatímco u souboru jako celku nebo u skupiny pacientek postmenopauzálních jsme neprokázali žádný vztah exprese AR a velikosti tumoru, u premenopauzálních pacientek byla shledána pozitivní korelace k velikosti tumoru ($r = 0,456$). Tento nálezný nekorresponduje s literárními údaji, avšak nelze vyloučit, že se jedná o rozdíly související s relativně malými soubory vyšetřovaných případů. Za zajímavý signifikantní poznatek považujeme prokázaný pozitivní vztah mezi výskytem ložisek s vřetenobuněčnou morfológií v nádoru a množstvím AR pozitivních buněk nebo negativní vztah mezi expresí AR v nádorech s výskytem ložisek vřetenobuněčné morfológie a množstvím CD163 pozitivních M2 makrofágů. První signifikantní výsledek nedokážeme uspokojivě vysvětlit, druhý pravděpodobně může souviset s příznivou prognostickou charakteristikou AR.

U našeho souboru pacientek s diagnostikovanými a současně neoadjuvatní terapií neovlivněnými TNBC jsme analyzovali 2578 lidských zralých miRNA s cílem zjistit, zda se významně liší jejich exprese v různých částech téhož tumoru se specifickou morfologií. Na základě mikročipové analýzy, srovnáním nádorové a nenádorové morfologie a literatury, jsme vybrali několik kandidátních miRNA - miRNA-93-5p, miRNA-106-5p, miRNA - 143-3p, miRNA-145-5p, miRNA-155-5p, miRNA-182-5p, miRNA-185-5p, miRNA-200c-3p, miRNA-205-5p, miRNA-361-5p a miRNA-4417, diskriminujících určité morfologie. Expresi specifických miRNA vázaná na ložiska určité morfologie (syncyziální buněčné formace, světlobuněčná transformace, vřetenobuněčná transformace, kribriformní komponenta, tubulární komponenta, ložiska in situ karcinomu v okolí, normální lalůčky v okolí, ložiska denzního lymfocytárního infiltrátu) byla verifikována pomocí ISH a ověřena užitím qRT - PCR. Vyhodnocení významu zvýšené či snížené exprese miRNA nám umožnilo odlišit nenádorové morfologie od invazivní či in situ komponenty nádorů i od ložisek TILs a rovněž agresivní nádorové morfologie od méně agresivních.

V souladu s cílem naší práce se nám tedy podařilo prokázat heterogenní expresi miRNA vázanou na určité buněčné typy a morfologicky definovatelná buněčná seskupení uvnitř TNBC, popřípadě jejich metastáz do lymfatických uzlin.

MiRNA-93-5p je v literatuře v souvislosti s TNBC považována za molekulu s onkogenním potenciálem, která ovlivněním signální dráhy PI3K/AKT1 a potlačením exprese genu PTEN hraje významnou roli v buněčné proliferaci a diferenciaci normálních i nádorových kmenových buněk mléčné žlázy, procesu EMT, invazi nádorových buněk a zakládání metastáz, angiogenezi a rezistenci k chemoterapii (Kawano M. et al., 2015). V naší studii se prokázalo, že tato miRNA je zvýšeně exprimována zejména v morfologiích vyskytujících se v TNBC a dovoluje tyto morfologie odlišit od struktur DCIS i normálních lalůček. Tento nálezní potvrzuje předpokádaný onkogenní potenciál uvedené miRNA. Onkogenní vlastnosti má mít i miRNA-106-5p, která rovněž ovlivňuje buněčnou proliferaci, migraci, invazivitu i metastazování, a to u všech molekulárních podtypů karcinomů mléčné žlázy (Li M. et al., 2018). Naše výsledky ukázaly, v souladu s literárními údaji, že tato miRNA se chová jako onkogen. MiRNA - 143-3p se považuje za molekulu s nádorově supresorickou funkcí a její snížená exprese má být zodpovědná za aktivaci cílového proteinu CIAPIN1 a vznik rezistence na kombinovanou systémovou terapii (Deng Y. W. et al., 2018).

V naší studii se potvrdilo, že její exprese je v nádorových morfologiích snížena oproti normálním lalůčkům, a proto se patrně uplatňuje jako nádorový supresor. Zvláště významný pokles jsme pozorovali v buněčných formacích s medulární morfologií, které jsou právě pro TNBC typické. Za významné zjištění považujeme fakt, že její exprese je rovněž snížena v ložiscích TILs, což by na jedné straně dovoľovalo diskriminovat nádor infiltrující lymfocyty od buněk nádoru, na druhé straně by potenciálně bylo možné tento fakt využít pro kvantifikaci TILs ve vzorcích nádorů. MiRNA-145-5p rovněž s nádorovým supresorovým potenciálem inhibuje buněčnou proliferaci a migraci, angiogenezi i proces EMT a to negativní regulací TGF- β 1 (Ding Y. et al., 2017). Rovněž expresní profil této miRNA potvrdil její předpokládanou supresorickou funkci. MiRNA-155 je u karcinomu prsu považována za onkogenní miRNA, zodpovědnou za indukci buněčné proliferace v důsledku aktivace genu *STAT3*. Studie Harquail J. et al. (2018) prokázala vliv exprese miRNA-155 na aktivitu mediátoru zánětlivé odpovědi NF- κ Ba a proces EMT či MET. U hormonálně dependentních karcinomů prsu se zvýšená exprese miRNA-155 podílí na farmakologické rezistenci k tamoxifenu prostřednictvím represe proteinu SOCS6 (Shen R. et al., 2015). Za přímý regulátor miRNA-155 je považována nádorově supresorová lncRNA XIST, jejíž snížená exprese vede prostřednictvím signální dráhy miRNA-155/CDX1 k buněčnému růstu, buněčné migraci a invazi nádorových buněk (Zheng R. et al., 2018). Naše výsledky poukazují na asociaci její exprese s agresivnějšími morfologickými změnami uvnitř TNBC a staví ji tak do pozice významného potenciálního prediktoru biologického chování TNBC. Její zvýšená exprese v ložiscích TILs pravděpodobně souvisí s její dříve prokázanou funkcí v indukci zánětlivé odpovědi. MiRNA-182 patří mezi molekuly s onkogenním potenciálem, které stimulují buněčnou proliferaci, migraci a invazi buněk karcinomů mléčné žlázy a zároveň inhibují apoptózu. Ovlivněním TGF- β a BRCA1 se má podílet na diferenciaci tkání mléčné žlázy. Zvýšená exprese miRNA-182 inhibuje opravu poškozené DNA zprostředkovanou genem *BRCA1* a snižuje expresi transkripčního faktoru FOXF2, podílejícího se na vývoji a remodelaci kostní tkáně (Yu J. et al., 2017). Studie autorů Liu H. et al. (2013) potvrdila u TNBC negativní vliv miRNA-182 na expresi genu *PFNI* nezbytného pro formování cytoskeletu, elongaci a polymerizaci aktinu a také pro myelinizaci periferních nervových vláken. V TNBC signifikantně koreluje s výskytem regionálních i vzdálených metastáz, invazí do krevních cév a kratším obdobím bez relapsu onemocnění (DFS). Naše výsledky jednoznačně nepotvrzují, ale ani nevyvrací onkogenní vlastnosti této miRNA. Na jedné straně jsme neshledali signifikantní rozdíly v expresi mezi invazivními TNBC a konkomitantními strukturami DCIS.

Na druhé straně snížená exprese v medulární složce TNBC může znamenat větší pravděpodobnost lepší prognózy nádorů s touto morfologií nebo svědčit pro fakt, že tato morfologie je zpravidla provázána větším zastoupením infiltrujících lymfocytů (podobný expresní profil mezi medulární morfologií a ložisky TILs). Hlavní funkcí nádorově supresorové miRNA-185-5p je u karcinomu prsu inhibice procesu EMT ovlivněním S100A8/A9 a signální dráhy jaderného faktoru- κ B/Snail (Chonggao Y. et al.). Její exprese negativně koreluje s mRNA receptoru RAGE a onkogenu Six1, řídících buněčný růst a progresi u řady nádorů. Mezi další její vlastnosti patří schopnost indukovat řízenou programovanou buněčnou smrt (Imam J. S. et al., 2010). V naší studii se nepotvrdilo, že tato miRNA má u TNBC efekt nádorového supresoru, protože její exprese byla vyšší v agresivnějších morfologických strukturách oproti normálním lalůčkům, DCIS i lépe diferencovaným nádorovým partiím. Může to znamenat, že procesy EMT v TNBC jsou řízeny jinými mechanismy. Vzhledem k tomu, že tato miRNA nejlépe ze všech kandidátních miRNA nejlépe diskriminovala agresivní nádorové morfologie od méně agresivních a normálních, je možné, podobně jako v případě miRNA 155, uvažovat o jejím použití pro predikci biologického chování TNBC. MiRNA-200c-3p se podílí na regulaci genů asociovaných se zánětem a normálním buněčným cyklem. U TNBC má být její exprese redukována vlivem mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Redukce její exprese umožňuje u TNBC předpovídat metastazování do regionálních lymfatických uzlin. MiRNA-200c-3p má také participovat na indukci EMT, a to tím, že navozuje aberantní metylaci DNA (Vrba L. et al., 2010). V námi analyzovaném souboru TNBC byla její exprese výrazně snížena v ložiscích TILs oproti všem ostatním sledovaným morfologiím s výjimkou medulárních struktur. Tento expresní profil silně podporuje publikované úvahy o její úloze při regulaci zánětu. Nádorově supresorová miRNA-205-5p se účastní regulace procesu EMT (Stankevics L. et al., 2017). Její negativně regulační úloha je u molekulární třídy karcinomů mléčné žlázy „HER2 - enriched“ dávána do souvislosti s horší prognózou onemocnění a rezistencí k chemoterapii. Zvýšená exprese miRNA-205-5p se potom projevuje indukcí radiosenzitivity nádorů. Podle našich výsledků je její exprese v agresivnějších nádorových morfologiích výrazně snížena oproti méně agresivním a lépe diferencovaným strukturám. Tento nálezní podpora dříve publikované údaje, které ji charakterizují jako nádorový supresor. Také miRNA-361-5p má u karcinomu prsu nádorově supresorický potenciál a její zvýšená exprese je považována za příznivý prognostický ukazatel (Cao Z. G. et al., 2016). V naší studii se potvrdilo, že její exprese je prakticky stejná v normálních lalůčkách a v lépe diferencovaných morfologiích jako jsou kribriformní a tubulární buněčné formace.

Rozdíly v expresi u jiných nádorových morfologií nebyly příliš výrazné. Proto nemůžeme jednoznačně spekulovat o jejím prognostickém nebo prediktivním charakteru. Snížená exprese miRNA-4417 je u TNBC obecně považována za ukazatel horší prognózy onemocnění, má tedy nádorově supresorický charakter (Wong C. K. et al., 2019). Její lokalizace na chromozomu 1p36 predisponuje u řady nádorů ke ztrátě heterozygosity. Spolu s miRNA-423-3p je miRNA-4417 schopna odlišit hereditární od sporadické formy karcinomů prsu (Estal R. M. et al., 2013). V našem souboru TNBC se tato miRNA jevila jako nejlepší ukazatel světlobuněčné, respektive apokrinní transformace. O případné nádorově supresorické funkci může vypovídat mírné zvýšení její exprese v tubulárních morfologiích, avšak nesignifikantní snížení exprese ve strukturách DCIS by mohlo svědčit o opaku. Pro lepší vyhodnocení úlohy této miRNA bude třeba provést analýzy většího počtu případů TNBC.

Naše výsledky týkající se miRNA poukázaly na jejich možný význam v morfogenezi a diferenciaci nádorů mléčné žlázy. Naše poznatky mohou pomoci na základě případných stanovení hladin výše diskutovaných miRNA v tělních tekutinách pacientek s TNBC odhadnout podíl agresivních a méně agresivních buněčných složek v nádoru a toto zjištění může mít terapeutický dopad. Určení exprese některých miRNA může pomoci kvantifikovat TILs v nádorech a vypovídat tak o protinádorové imunitní reakci. Dané výsledky rovněž doplňují poznatky o úloze miRNA v procesu EMT.

Cílem poslední zmíněné části našeho výzkumu bylo hodnocení věkové závislosti rutinně vyšetřovaných prognostických a prediktivních znaků na souboru karcinomů mléčné žlázy. Získané výsledky potvrzují fakt, že mladší věk pacientek v době diagnózy, konkrétně u žen mezi 20 a 39 lety věku, koreluje s výskytem nádorů s agresivnějším biologickým chováním a nižším stupněm diferenciaci („HER2 - enriched“ a TNBC) oproti starším ženám, u kterých převažoval výskyt nádorů molekulárních tříd „luminal“ A, „luminal“ B. Proliferační index Ki-67 měl tendenci k poklesu se stoupajícím věkem pacientek v době diagnózy, což odpovídá výskytu prognosticky příznivějších skupin nádorů ve vyšším věku. Benz C. C. (2008) ve své studii porovnával biologické chování karcinomů prsu u pacientek v mladším a starším věku a jednoznačně prokázal příznivější prognózu onemocnění u starších pacientek. Jiná studie prokázala negativní korelaci mezi mladším věkem žen v době stanovení diagnózy a expresí ER, naopak pozitivní korelaci k expresi proteinu HER2, nižšímu stupni diferenciaci nádoru a vyšší tendencí k iniciaci zakládání metastáz do regionálních lymfatických uzlin (Anders C. K. et al., 2008).

Závěry těchto studií jsou v souladu s našimi výsledky stejně jako zjištění publikovaná kolektivy autorů de Kruijf E. M. et al. (2014) a Park Y. H. et al. (2015), které rovněž jako naše studie prokázaly vyšší výskyt karcinomů prsu molekulární třídy „luminal“ A u pacientek ve vyšším věku v porovnání s pacientkami s nádory molekulárních tříd „HER2 - enriched“ nádory a TNBC. Jenkins E. O. et al. (2014) také potvrdili souvislost mezi věkem pacientek v době stanovení diagnózy a frekvencí výskytu specifických molekulárních tříd karcinomu prsu, délkou období bez relapsu onemocnění (DFS), přežitím specifickým pro karcinomy prsu (BCSS) i celkovým přežitím (OS) pacientek. Distribuce jednotlivých molekulárních tříd karcinomů prsu byla v našem souboru obdobná.

Molekulární třída TNBC se však vyskytovala v naší studii poněkud častěji, než uvádí jiné prameny (Gierach G.L. et al., 2010). Příčinou může být fakt, že v naší FN se soustřeďují diagnosticky i terapeuticky komplikovanější případy, mezi něž TNBC nesporně patří. Ve studii zabývající se souborem afro-amerických žen (Ihemelandu C. U. et al., 2007) se vyskytovala nejčastěji molekulární třída karcinomů prsu „luminal“ A (55,4 %), zatímco například TNBC (21,2 %) se objevovaly nejčastěji u pacientek mladších 35 let a dále mezi 51 a 65 lety věku. Tyto rozdíly mohou být vysvětleny etnickou příslušností pacientek sledovaných v této studii. Proliferační index vyjádřený expresí Ki-67 a PCNA byl očekávaně signifikantně vyšší u pacientek s „HER2 - enriched“ molekulární třídou a TNBC, než u pacientek s nádory molekulárních tříd „luminal“ A a B.

V poslední době se hojně diskutuje o prognostické i prediktivním významu stanovení cytoplazmatické exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2. Protein Bcl-2 byl však identifikován jako prognosticky příznivý marker napříč definovanými molekulárními třídami (Seong M. K. et al., 2015). Vysvětlením tohoto paradoxního jevu může být skutečnost, že exprese proteinu Bcl-2 je regulována funkčním ER a souvisí s regulací mitochondriální replikace DNA (Perillo B. et al., 2000; Certo M. et al., 2015). U postmenopauzálních žen, které nepodstoupily adjuvantní terapii, se jeví exprese Bcl-2 jako nezávislý faktor horší prognózy onemocnění. Tato skutečnost může souviset se ztrátou funkčnosti ER u těchto pacientek. Naše studie prokázala signifikantní pozitivní korelaci exprese Bcl-2 s molekulárními třídami karcinomů prsu „luminal“ A i „luminal“ B, tedy nádory exprimujícími ER oproti molekulárním třídám „HER2 - enriched“ a TNBC. Tato korelace potvrzuje funkční vztah mezi ER a Bcl-2 a svědčí pro zachovanou a funkční steroidní signalizaci reflektující u těchto molekulárních tříd vysokou pravděpodobnost odpovídavosti Bcl2 pozitivních nádorů na hormonální terapii.

V jiných studiích prokázaný pozitivní prognostický význam exprese proteinu Bcl2 i u molekulárních tříd s nízkou nebo žádnou expresí ER může souviset s jeho vlivem na replikaci mitochondriální DNA.

6. ZÁVĚR

Naše výsledky dokazují význam přesné histologické typizace a popisu morfologické heterogenity uvnitř každého z nádorů. Tyto údaje mohou následně klinikům podat validní informaci o možném dalším vývoji léze a naplánovat specifický terapeutický přístup. Neoadjuvantní terapií neovlivněné TNBC mají své specifické histopatologické znaky, které samy o sobě vypovídají o prognóze pacientek a mohou posloužit k jejich stratifikaci do dalších prognostických skupin. Snížená či zvýšené exprese specifických lidských miRNA reflektuje u této vysoce selektované skupiny TNBC morfologickou heterogenitu uvnitř nádoru a koresponduje jak s nádorovou či nenádorovou morfologií a množstvím TILs i výskytem metastáz do regionálních lymfatických uzlin. Musíme však mít na paměti, že topické rozdíly v expresi miRNA mohou být projevem proliferační a metabolické aktivity morfologicky odlišných typů nádorových buněk, či souviset s regresivními změnami probíhajícími v nádoru, a ne projevem přímého zapojení miRNA do procesů morfologické diverzity.

7. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ AUTORKY DISERTAČNÍ PRÁCE

Původní a přehledové publikace v recenzovaných časopisech a časopisech s IF související s tématem disertační práce:

1. **Kolečková M**, Kořínková G, Koudeláková V, Potočková J, Šopíková B, Hajdúch M, Kolář Z. RNAscope® method for analysis of HER2 expression in the samples of breast cancer without amplification. *Onkologie* (2015), 9(5): 245-247.
2. **Koleckova M**, Kolar Z, Ehrmann J, Korinková G, Trojanec R. Age - associated prognostic and predictive biomarkers in patients with breast cancer. *Oncology Letters* (2017) 13: 4201-4207.
3. **Koleckova M**, Janikova M, Kolar Z. MicroRNAs in triple - negative breast cancer. *Neoplasma* (2018); 65(1):1-13.
4. **Kolečková M**, Kolář Z, Ehrmann J, Kořínková G, Zlámalová N, Melichar B, Trojanec R. Lymfo/plasmocytární infiltrace chemoterapií neovlivněných „triple“ negativních karcinomů prsu. *Klin Onkol* (2019); 32(5): 380– 387.

Publikovaná abstrakta související s tématem disertační práce

1. **Kolečková M**, Kořínková G. Analýza neobvyklých expresních profilů u karcinomu prsu. XLVII. konference studentských vědeckých prací LF UP v Olomouci (2014): 114.
2. **Kolečková M**, Kolář Z, Langová K. Age-specific characteristics of expression profiles in breast cancer. Sborník abstraktů. The Biomania Student Scientific Meeting (2015), Týden lékařské genetiky v Brně: 67.
3. **Kolečková M**, Kolář Z. Prognostické a prediktivní znaky u karcinomů mléčné žlázy. XLVIII. konference studentských vědeckých prací LF UP v Olomouci (2015): 116.
4. **Koleckova M**, Kolar Z, Ehrmann J, Korinkova G, Trojanec R, Uberall Ivo. Morphotypes of the triple-negative breast cancer. *Virchows Arch* (2017) 471(Suppl 1): S1–S352.
5. **Koleckova M***, Kolar Z, Ehrmann J, Korinkova G, Trojanec R, Uberall I. Tumour-infiltrating lymphocytes in triple - negative breast cancer correlate with morphology, Bcl2 expression, proliferative activity and menopausal status. *Virchows Arch* (2018) 473 (Suppl 1): S1–S340.

6. **Kolečková M**, Ehrmann J, Kořínková G, Zlámalová N, Melichar B, Kolář Z. Imunitní biomarkery u „triple“ negativních karcinomů prsu. Dni molekulové patologie; Martin, Slovensko (2019): 54.
7. **Kolečková M***, Kolar Z, Ehrmann J, Svoboda M, Slaby O, Bouchal J, Bouchalova K, Janikova M, Srovnal J, Radova L. Investigation of microRNA expression profiles related to morphological heterogeneity in triple - negative breast cancer. Virchows Arch (2019) 475 (Suppl 1): S1-S436.

** Prezentováno formou přednášky na 30th European Congress of Pathology (2018) v Bilbao, Španělsko a 31st European Congress of Pathology (2019) v Nice, Francie.*

Ostatní původní a přehledové publikace v recenzovaných časopisech:

1. **Kolečková M**, Tichý T. Polékové poškození ledvin. Klin Farmakol Farm (2018); 32(1): 14–19.
2. **Kolečková M**, Tichý T, Melichar B, Veverková L, Hes O, Kolek V, Kolář Z. Metastazující světlobuněčný renální karcinom bez zjevného primárního ložiska v ledvině imitující pokročilé stadium plicní malignity. Článek ve sborníku. Klin Onkol (2019); 32 (Suppl 1): S138-S140.

Vedení studentských vědeckých prací souvisejících s tématem disertační práce, prezentovaných v rámci Konference studentských vědeckých prací LF UP v Olomouci:

1. Adar G, **Kolečková M**, Chmelová J. Radiological correlations of TNBC histomorphology – vítězná práce akademického roku 2017/2018 v rámci studijního programu General Medicine, 51. konference studentských vědeckých prací LF UP Olomouc.
2. Bitton N, **Kolečková M**. Significance of epithelial-mesenchymal transition markers in breast cancer – studijní program General Medicine, akademický rok 2019/2020.

Prezentace formou přednášek na tuzemských celooborových seminářích souvisejících s tématem disertační práce:

2018: Morfologické a molekulární prediktivní znaky u „triple“ negativních karcinomů prsu.
Dny molekulární patologie, Olomouc.

Publikace do recenzovaných časopisů a časopisů s IF související s tématem disertační práce:

1. Studentová H, Melichar B, Kalabova H, Vitaskova D, Andrasikova A, Vlachova Z, Zezulova M, **Koleckova M**, Kolar Z, Klos D, Zlamalova N, Juranova J, Martinkova P. Pretreatment peripheral blood cell count and efficacy of neoadjuvant therapy in breast cancer patients: a retrospective single-center analysis (2019).
2. Cizkova K, **Koleckova M**, Tauber Z. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) - cytochrome P450 epoxygenases - soluble epoxide hydrolase axis in ER+PR+HER2- breast cancer (2019).
3. Veverková L, Šišola I, Janková J, **Kolečková M**, Zlámalová N. Objemný exulcerovaný adenomyoepiteliom prsu – kazuistika (2019).
4. Veverkova L, Melichar B, Zlamalova N, Vomackova K, **Koleckova M**, Rohit PT. Association between negative preoperative axillary node staging and surgical sentinel node biopsy in women with newly diagnosed breast cancer: A retrospective analysis (2019).

Ostatní publikace do recenzovaných časopisů a časopisů s IF:

1. Khalikova M, Lisa M, Cifkova E, Vrana D, Matzenaur M, Melichar B, **Koleckova M**, Student V, Kuchar L, Holcapek M*. Differentiation of renal cell carcinoma patients and healthy controls based on lipidomic analysis of tissues and plasma by ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (2019).
2. Hambálek J, Maděrka M, **Kolečková M**, Pilka R. Nízkoobjemové metastatické postižení lymfatických uzlin u karcinomu endometria (2019).

8. REFERENCE

1. Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics*. 2015; 7(5): 847–862.
2. Abedi N, Mohammadi-Yeganeh S, Koochaki A et al. MiR-141 as potential suppressor of β -catenin in breast cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 9895-9901.
3. Adair TH, Montani JP. *Angiogenesis*. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. ISBN: 978-16-1504-330-9.
4. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2014; 32(25): 2794-2803.
5. Adhikary J, Chakraborty S, Dalal S et al. Circular PVT1: an oncogenic non-coding RNA with emerging clinical importance. *J Clin Pathol* 2019; 72: 513-519.
6. Afshar E, Hashemi-Arabi M, Salami S et al. Screening of acetaminophen-induced alterations in epithelial-to-mesenchymal transition-related expression of microRNAs in a model of stem-like triple-negative breast cancer cells: The possible functional impacts. *Gene*. 2019; 702: 46-55.
7. Ahn SG, Kim SJ, Kim C et al. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2016; 19(3): 223-230.
8. Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T et al. Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol Immunol* 2000; 37: 515-526.
9. Anders CK, Broadwater G, Acharya CR et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol* 2008; 26(20): 3324-3330.
10. Aragon-Sanabria V, Kim GB, Dong C et al. From Cancer Immunoediting to New Strategies in Cancer Immunotherapy: The Roles of Immune Cells and Mechanisms in Oncology. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1092: 113-138.
11. Augoff K, McCue B, Plow EF et al. MiR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer* 2012; 11: 5.
12. Barkala AA, Brewer RE, Markovic M et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*. 2019; 572(7769): 392-396.
13. Baselga J, Gómez P, Greil R et al. Randomized Phase II Study of the Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab With Cisplatin Versus

- Cisplatin Alone in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2013; 31(20): 2586–2592.
14. Basho RK, Yam C, Gilcrease M et al. Comparative Effectiveness of an mTOR-Based Systemic Therapy Regimen in Advanced, Metaplastic and Nonmetaplastic Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2018; 23(11): 1300-1309.
 15. Bayraktar S, Gutierrez-Barrera AM, Liu D et al. Outcome of triple-negative breast cancer in patients with or without deleterious BRCA mutations. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 130(1): 145-153.
 16. Bellizzi A, Greco MR, Rubino R et al. The scaffolding protein NHERF1 sensitizes EGFR-dependent tumor growth, motility and invadopodia function to gefitinib treatment in breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2015; 46(3): 1214-1224.
 17. Bemanian V, Sauer T, Touma J et al. The epidermal growth factor receptor (EGFR/HER-1) gatekeeper mutation T790M is present in European patients with early breast cancer. *PLoS One*. 2015; 10: e0134398.
 18. Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66(1): 65-74.
 19. Bhattarai S, Klimov S, Mittal K et al. Prognostic Role of Androgen Receptor in Triple Negative Breast Cancer: A Multi-Institutional Study. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(7): E995.
 20. Bisso A, Collavin L, Del Sal G. p73 as a pharmaceutical target for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2011; 17(6): 578-590.
 21. Black JO. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol*. 2016; 10(2): 139-144.
 22. Blancato J, Singh B, Liu A et al. Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer*. 2004; 90(8): 1612-1619.
 23. Blok EJ, van den Bulk J, Dekker-Ensink NG et al. Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(9): 15610-15620.
 24. Bouchalová K, Hajdúch M, Bouchal J et al. *Prediktivní a prognostická onkologie*. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2016. ISBN: 978-80-244-3188-8.
 25. Bouchalova K, Svoboda M, Kharraishvili G et al. BCL2 is an independent predictor of outcome in basal-like triple-negative breast cancers treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biol*. 2015; 36(6): 4243-4252.
 26. Boyerinas B, Park SM, Hau A et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: F19-36

27. Bozza WP, Zhang Y, Zhang B. Cytokeratin 8/18 protects breast cancer cell lines from TRAIL-induced apoptosis. *Oncotarget*. 2018; 9(33): 23264-23273.
28. Brouty-Boyé D, Pottin-Clémenceau C, Doucet C et al. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 2000; 30: 914-919
29. Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge Univ. Press, London 1959.
30. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(7): 1688-1698.
31. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J et al. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(2): 89-102.
32. Camps C, Buffa FM, Colella S et al. Hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1340-1348.
33. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; 490(7418): 61-70.
34. Cao ZG, Huang YN, Yao L, et al. Positive expression of miR-361-5p indicates better prognosis for breast cancer patients. *J Thorac Dis*. 2016; 8(7): 1772–1779.
35. Carey JPW, Karakas C, Bui T et al. Synthetic Lethality of PARP Inhibitors in Combination with MYC Blockade Is Independent of BRCA Status in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res*. 2018; 78(3): 742-757.
36. Carraro DM, Elias EV, Andrade VP. Ductal carcinoma in situ of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. *Biosci Rep*. 2014; 34(1): e00090.
37. Carter MR, Hornick JL, Lester S et al. Spindle cell (sarcomatoid) carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 29 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30(3): 300–309.
38. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to anti-apoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2015; 9: 351-365.
39. Cleton-Jansen AM. E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer?. *Breast Cancer Res*. 2002; 4(1): 5–8.
40. Comen EA, Robson M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer. *Cancer J*. 2010; 16(1): 48-52.

41. Chapouly C, Guimbal S, Hollier PL et al. Role of Hedgehog Signaling in Vasculature Development, Differentiation, and Maintenance. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(12): E3076.
42. Chen G, Wang Y, Xie R et al. Tumor-targeted pH/redox dual-sensitive unimolecular nanoparticles for efficient siRNA delivery. *J Control Release.* 2017; 259: 105-114.
43. Chen J, Wang X. MicroRNA-21 in breast cancer: diagnostic and prognostic potential. *Clin Transl Oncol* 2014; 16: 225-233.
44. Chen L, Qi H, Zhang L et al. Effects of FGFR gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-docetaxel-based chemotherapy in breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1038.
45. Chi Y, Wang F, Zhang T et al. miR-516a-3p inhibits breast cancer cell growth and EMT by blocking the Pygo2/Wntsignalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2019 Jul 5. doi: 10.1111/jcmm.14515.
46. Choi J, Jung WH, Koo JS. Clinicopathologic features of molecular subtypes of triple negative breast cancer based on immunohistochemical markers. *Histol Histopathol.* 2012; 27: 1481–1493.
47. Chonggao Y, Guoxin Z, Ruimei S et al. miR-185-5p inhibits F-actin polymerization and reverses epithelial mesenchymal transition of human breast cancer cells by modulating RAGE. *Mol Med Rep.* 2018; 18(3): 2621–2630.
48. ChristopoulosPF, Vlachogiannis NI, Vogkou CT et al. The Role of the Androgen Receptor Signaling in Breast Malignancies. *Anticancer Res.* 2017; 37(12): 6533-6540.
49. Danzinger S, Tan YY, Rudas M et al. Differential Claudin 3 and EGFR Expression Predicts BRCA1 Mutation in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Invest.* 2018; 36(7): 378-388.
50. Darvishi B, Farahmand L, Majidzadeh-A K. Stimuli-Responsive Mesoporous Silica NPs as Non-viral Dual siRNA/Chemotherapy Carriers for Triple Negative Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017; 7: 164-180.
51. de Kruijf EM, Bastiaannet E, Rubertá F et al. Comparison of frequencies and prognostic effect of molecular subtypes between young and elderly breast cancer patients. *MolOncol* 2014; 8(5):1014-1025.
52. Deng X, Apple S, Zhao H et al. CD24 Expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(24): 38294-38308.

53. Deng YW, Hao WJ, Li YW et al. Hsa-miRNA-143-3p Reverses Multidrug Resistance of Triple-Negative Breast Cancer by Inhibiting the Expression of Its Target Protein Cytokine-Induced Apoptosis Inhibitor 1 In Vivo. *J Breast Cancer*. 2018; 21(3): 251–258.
54. Denkert C, Wienert S, Poterie A et al. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immunology biomarker working group. *Mod Pathol*. 2016; 29(10): 1155-1164.
55. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:4429-4434.
56. Di Mauro C, Rosa R, D'Amato V et al. Hedgehog signalling pathway orchestrates angiogenesis in triple-negative breast cancers. *Br J Cancer*. 2017; 116(11): 1425-1435.
57. Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*. 2014; 6: 205-216.
58. Díaz-Rodríguez E, Pérez-Peña J, Ríos-Luci C et al. TRAIL receptor activation overcomes resistance to trastuzumab in HER2 positive breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2019; 453: 34-44.
59. Diluvio G, Del Gaudio F, Giuli MV et al. NOTCH3 inactivation increases triple negative breast cancer sensitivity to gefitinib by promoting EGFR tyrosine dephosphorylation and its intracellular arrest. *Oncogenesis*. 2018; 7(5): 42.
60. Dine JL, O'Sullivan CC, Voeller D et al. The TRAIL receptor agonist drozitumab targets basal B triple-negative breast cancer cells that express vimentin and Axl. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 155(2): 235-251.
61. Ding Y, Zhang C, Zhang J et al. miR-145 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by directly or indirectly regulating TGF- β 1 expression. *Int J Oncol*. 2017; 50(5): 1701-1710.
62. Dong G, Liang X, Wang D et al. High expression of miR-21 in triple-negative breast cancers was correlated with a poor prognosis and promoted tumor cell in vitro proliferation. *Med Oncol* 2014; 31: 57.
63. Drooger JC, Hooning MJ, Seynaeve CM et al. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev*. 2015; 41(2): 187-196.

64. Duhachek-Muggy S, Zolkiewska A. ADAM12-L is a direct target of the miR-29 and miR-200 families in breast cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 93.
65. Dulaney C, Marcrom S, Stanley J et al. Poly(ADP-ribose) polymerase activity and inhibition in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 63: 144-153.
66. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL et al. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 2000; 26(4): 447-450.
67. Ekyalongo RC, Yee D. Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target. *NPJ Precis Oncol.* 2017; 1:14.
68. Elaimy AL, Amante JJ, Zhu LJ et al. The VEGF receptor neuropilin 2 promotes homologous recombination by stimulating YAP/TAZ-mediated Rad51 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116(28): 14174-14180.
69. Elaimy AL, Guru S, Chang C et al. VEGF-neuropilin-2 signaling promotes stem-like traits in breast cancer cells by TAZ-mediated repression of the Rac GAP β 2-chimaerin. *Sci Signal.* 2018; 11(528): eaao6897.
70. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19: 403-410.
71. Essmann F, Schulze-Osthoff K. Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(2): 328-344.
72. Estal RM, Suela AP, Jiménez IJ et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 142(1): 19-30.
73. Falkenberg N, Anastasov N, Schaub A et al. Secreted uPAR isoform 2 (uPAR7b) is a novel direct target of miR-221. *Oncotarget* 2015; 6: 8103-8114.
74. Fallah Y, Brundage J, Allegakoen P et al. MYC-Driven Pathways in Breast Cancer Subtypes. *Biomolecules.* 2017; 7(3): E53.
75. Fasching PA, Loibl S, Hu C et al. BRCA1/2 Mutations and Bevacizumab in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer: Response and Prognosis Results in Patients With Triple-Negative Breast Cancer From the GeparQuinto Study. *J Clin Oncol.* 2018; 36(22): 2281-2287.
76. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 161(2): 851-858.

77. Fkih M'hamed I, Privat M, Ponelle F et al. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr)* 2015; 38: 433-442.
78. Focke CM, Bürger H, van Diest PJ et al. Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2017; 84: 219-227.
79. Fong MY, Zhou W, Liu L et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2015; 17: 183-194.
80. Foote FW, Stewart FW. Lobular carcinoma in situ: A rare form of mammary cancer. *Am J Pathol*. 1941; 17(4): 491-496.
81. Frescas D, de Lange T. TRF2-tethered TIN2 can mediate telomere protection by TPP1/POT1. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(7): 1349-1362.
82. Fu J, Dong G, Shi H et al. LncRNA MIR503HG inhibits cell migration and invasion via miR-103/OLFM4 axis in triple negative breast cancer. *Cell Mol Med*. 2019; 23(7): 4738-4745.
83. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Molecular Medicine* 2011; 3: 279-290.
84. García-Aranda M, Pérez-Ruiz E, Redondo M. Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(12): E3950.
85. García-Tejido P, Luque Cabal M, Peláez Ferandéz I et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: The future of immune targeting. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2016; 10: 31-39.
86. Geenen JJJ, Linn SC, Beijnen JH et al. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet*. 2018; 57(4): 427-437.
87. Genard G, Lucas S, Michiels C. Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies. *Front Immunol*. 2017; 8: 828.
88. Gierach GL, Burke A, Anderson WF. Epidemiology of triple negative breast cancers. *Breast Dis*. 2010; 32(1-2): 5-24.
89. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011; 22(8): 1736-1747.

90. Gorringer KL, Fox SB. Ductal Carcinoma In Situ Biology, Biomarkers, and Diagnosis. *Front Oncol.* 2017; 7: 248.
91. Gottipati P, Vischioni B, Schultz N et al. Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Res.* 2010; 70(13): 5389-5398.
92. Greer YE, Gilbert SF, Gril B et al. MEDI3039, a novel highly potent tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 2 agonist, causes regression of orthotopic tumors and inhibits outgrowth of metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2019; 21(1): 27.
93. Grob TJ, Heilenkotter U, Geist S et al. Rare oncogenic mutations of predictive markers for targeted therapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134: 561–567.
94. Günhan-Bilgen I, Memiş A, Üstün EE et al. Metaplastic carcinoma of the breast: clinical, mammographic, and sonographic findings with histopathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol.* 2002; 178: 1421–1425.
95. Hamdi Y, Soucy P, Kuchenbaecker KB et al. Association of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with genetic variants showing differential allelic expression: identification of a modifier of breast cancer risk at locus 11q22.3. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 161(1): 117–134.
96. Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S et al. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018; 144(3): 415-430.
97. Han C, Li X, Fan Q et al. CCAT1 promotes triple-negative breast cancer progression by suppressing miR-218/ZFX signaling. *Aging (Albany NY).* 2019; 11. doi: 10.18632/aging.102080.
98. Hanahan D, Weinberg EA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
99. Hanahan D, Weinberg EA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-674.
100. Harquail J, LeBlanc N, Landry C et al. Pax-5 Inhibits NF- κ B Activity in Breast Cancer Cells Through IKK ϵ and miRNA-155 Effectors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2018; 23(3): 177-187.
101. He L, He X, Lim LP et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447: 1130-1134.

102. Heilmann T, Vondung F, Borzikowsky C et al. Heterogeneous intracellular TRAIL-receptor distribution predicts poor outcome in breast cancer patients. *J Mol Med (Berl)*. 2019; 97(8): 1155-1167.
103. Hernandez L, Wilkerson PM, Lambros MB et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *Pathol*. 2012; 227(1): 42-52.
104. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007, 8: R76-10.
105. Hong L, Pan F, Jiang H et al. MiR-125b inhibited epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by targeting MAP2K7. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 2639-2648.
106. Hu Y, Tang H. MicroRNAs regulate the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cancer progression. *Microna*. 2014; 3(2): 108-117.
107. Hua K, Jin J, Zhao J et al. MiR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2. *Int J Oncol* 2016; 48: 1997-2006.
108. Huang W, Ran R, Shao B et al. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2019 Jul 29. doi: 10.1007/s10549-019-05371-0.
109. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist*. 2011; 16 (Suppl 1): 1-11.
110. Humphries B, Wang Z, Oom AL et al. MicroRNA-200b targets protein kinase C α and suppresses triple-negative breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* 2014; 35: 2254-2263.
111. Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F et al. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(3): 876-881.
112. Ithemelandu CU, Leffall LD Jr, Dewitty RL et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res* 2007; 143(1): 109-118.
113. Ilie SM, Bacinschi XE, Botnariuc I. Potential clinically useful prognostic biomarkers in triple-negative breast cancer: preliminary results of a retrospective analysis. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2018; 10: 177-194.

114. Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS et al. MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*. 2010; 29(35): 4971-4979.
115. Imran M, Ullah A, Saeed F et al. Cucurmin, anticancer, & antitumor perspectives: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018; 58(8): 1271-1293.
116. Inao T, Iida Y, Moritani T et al. Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin. *Oncotarget*. 2018; 9(39): 25545-25556.
117. Jang MH, Kim HJ, Gwak JM et al. Prognostic value of microRNA-9 and microRNA-155 expression in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2017; 68: 69-78.
118. Jenkins EO, Deal AM, Anders CK, et al. Age-specific changes in intrinsic breast cancer subtypes: a focus on older women. *Oncologist*. 2014; 19(10):1076-1083.
119. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res*. 2015; 17: 43.
120. Jiang H, Zhang G, Wu JH et al. Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncol Rep* 2014; 31: 1509-1516.
121. Jiang Z, Jones R, Liu JC et al. RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle*. 2011; 10(10): 1563-1570.
122. Jin C, Yan B, Lu Q et al. Reciprocal regulation of Hsa-miR-1 and long noncoding RNA MALAT1 promotes triple-negative breast cancer development. *Tumour Biol*. 2016; 37(6): 7383-7394.
123. Jing Song H, Hong G, Yang J et al. siRNA-mediated suppression of collagen type iv alpha 2 (COL4A2) mRNA inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget*. 2017; 8(2): 2585-2593.
124. Johansson J, Berg T, Kurzejamska E et al. MiR-155-mediated loss of C/EBP β shifts the TGF- β response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene*. 2013; 32(50): 5614-5624.
125. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119(6): 1420-1428.
126. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009; 119(6): 1417-1429.
127. Kassam F, Enright K, Dent R et al. Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clin Breast Cancer*. 2009; 9(1): 29-33.

128. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I et al. microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015; 34(1): 76.
129. Kida K, Ishikawa T, Yamada A et al. Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 156(2): 261-269.
130. Kim H, Kim Y, Bae S et al. Direct Interaction of CD40 on Tumor Cells with CD40L on T Cells Increases the Proliferation of Tumor Cells by Enhancing TGF- β Production and Th17 Differentiation. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0125742.
131. Kim NH, Kim HS, Li XY et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2011; 195(3): 417-433.
132. Kim SY, Jung SH, Kim MS et al. Genomic differences between pure ductal carcinoma in situ and synchronous ductal carcinoma in situ with invasive breast cancer. *Oncotarget.* 2015; 6(10): 7597-7607.
133. Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002; 111(1): 96-102.
134. Kondov B, Milenkovic Z, Kondov G. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018; 6(6): 961–967.
135. Kong W, He L, Richards EJ et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2014; 33: 679–689
136. Kullmann K, Deryal M, Ong MF et al. DNMT1 genetic polymorphisms affect breast cancer risk in the central European Caucasian population. *Clin Epigenetics.* 2013; 5(1): 7.
137. Kumaraswamy E, Wendt KL, Augustine LA et al. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene* 2015; 34: 4333-4346.
138. Kurozumi S, Inoue K, Matsumoto H et al. Prognostic utility of tumor-infiltrating lymphocytes in residual tumor after neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab for HER2-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 1583.
139. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ et al. WHO Classification of Tumours of the Breast. WHO Classification of Tumours (4th ed). Lyon, IARC Press, 2012. ISBN: 978-92-832-2433-4.

140. Lang S, Busch H, Boerries M et al. Specific role of RhoC in tumor invasion and metastasis. *Oncotarget*. 2017; 8(50): 87364–87378.
141. Lebert JM, Lester R, Powell E et al. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol*. 2018; 25(1): S142-S150.
142. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006; 172(7): 973-981.
143. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5): 843-854.
144. Lee S, Stewart S, Nagtegaal I et al. Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2012; 72(17): 4574-4586.
145. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest*. 2011; 121: 2750–2767.
146. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2014; 16(4): 406.
147. Lei A, Chen L, Zhang M et al. EZH2 Regulates Protein Stability via Recruiting USP7 to Mediate Neuronal Gene Expression in Cancer Cells. *Front Genet*. 2019;10:422.
148. Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP et al. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J Clin Invest*. 2007; 117(5): 1370-1380.
149. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989; 246(4935): 1306-1309.
150. Li J, Li L, Yuan H et al. Up-regulated lncRNA GAS5 promotes chemosensitivity and apoptosis of triple-negative breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2019; 18(16): 1965-1975.
151. Li L, Wu N, Li F et al. Clinicopathologic and molecular characteristics of 44 patients with pure secretory breast carcinoma. *Cancer Biol Med*. 2019; 16(1): 139-146.
152. Li M, Li A, Zhou S et al. Heterogeneity of PD-L1 expression in primary tumors and paired lymph node metastases of triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2018; 18(1): 4.
153. Li M, Zhou Y, Xia T, et al. Circulating microRNAs from the miR-106a-363 cluster on chromosome X as novel diagnostic biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018; 170(2): 257–270.

154. Li N, Miao Y, Shan Y et al. MiR-106b and miR-93 regulate cell progression by suppression of PTEN via PI3K/Akt pathway in breast cancer. *Cell Death Dis.* 2017; 8(5): e2796.
155. Li ZH, Hu PH, Tu JH et al. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget.* 2016; 7(40): 65024-65033.
156. Liu H, Wang Y, Li X et al. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1. *Tumour Biol* 2013; 34: 1713-1722.
157. Liu P, Tang H, Chen B et al. MiR-26a suppresses tumour proliferation and metastasis by targeting metadherin in triple negative breast cancer. *Cancer Lett* 2015; 357: 384-392.
158. Liu X, Li J, Cadilha BL et al. Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv.* 2019; 5(6): eaav4275.
159. Liu X, Tang H, Chen J et al. MicroRNA-101 inhibits cell progression and increases paclitaxel sensitivity by suppressing MCL-1 expression in human triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 20070-20083.
160. Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006; 19(2): 264-271.
161. Loginov VI, Pronina IV, Burdennyi AM et al. Role of Methylation in the Regulation of Apoptosis Genes APAF1, DAPK1, and BCL2 in Breast Cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 162(6): 797-800.
162. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16(2): 110-120.
163. Lu L, Dong J, Wang L et al. Activation of STAT3 and Bcl-2 and reduction of reactive oxygen species (ROS) promote radioresistance in breast cancer and overcome of radioresistance with niclosamide. *Oncogene.* 2018; 37(39): 5292-5304.
164. Lv ZD, Kong B, Liu XP et al. MiR-655 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Prrx1 in triple-negative breast cancer. *J Cell Mol Med* 2016; 20: 864-873.
165. Ma CX, Luo J, Ellis MJ. Molecular profiling of triple-negative breast cancer. *Breast Dis.* 2010; 31: 1–2.
166. Ma F, Li H, Li Y et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(14): e6561.

167. MacKenzie TA, Schwartz GN, Calderone HM et al. Stromal expression of miR-21 identifies high-risk group in triple-negative breast cancer. *Am J Pathol* 2014; 184: 3217-3225.
168. Madhavan D, Zucknick M, Wallwiener M et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 5972-5982.
169. Malleter M, Tauzin S, Bessedé A et al. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2013; 73(22): 6711-6721.
170. Mao Y, Qu Q, Zhang Y et al. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(12): e115103.
171. Martin V, Botta F, Zanellato E et al. Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features. *Histol Histopathol.* 2012; 27:785–792.
172. Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R et al. MicroRNA deregulation in triple-negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression. *Oncotarget* 2016; 7: 20068-20079.
173. Maxwell AJ, Clements K, Dodwell DJ et al. The radiological features, diagnosis and management of screen-detected lobular neoplasia of the breast: Findings from the Sloane Project. *Breast.* 2016; 27:109-115.
174. McDivitt RW, Stewart FW. Breast carcinoma in children. *JAMA.* 1966;195: 388–390.
175. McKinnon E, Xiao P. Metaplastic carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 2015; 139(6): 819-822.
176. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 2008; 283: 29897-29903.
177. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(4): 361-370.
178. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res.* 2015; 17: 124.
179. Mizukoshi E, Kaneko S. Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(8): 1823.

180. Morales J, Li L, Fattah FJ et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014; 24(1): 15-28.
181. Morris GJ, Naidu S, Topham AK et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer.* 2007; 110(4): 876-884.
182. Mukherjee AK, Sharma S, Sengupta S et al. Telomere length-dependent transcription and epigenetic modifications in promoters remote from telomere ends. *PLoS Genet.* 2018; 14(11): e1007782.
183. Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol.* 2014; 25: 1570–1577.
184. Nabholz JM, Chalabi N, Radosevic-Robin N et al. Multicentric neoadjuvant pilot Phase II study of cetuximab combined with docetaxel in operable triple negative breast cancer. *Int J Cancer.* 2016; 138: 2274–2280.
185. Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2016; 6(8): 1609-1623.
186. Natale V, Raquer H. Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex. *Orphanet J Rare Dis.* 2017; 12(1): 65.
187. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(16): 5367-5374.
188. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med.* 2011; 62: 233-247.
189. Ozretic P, Alvir I, Sarcevic B et al. Apoptosis regulator Bcl-2 is an independent prognostic marker for worse overall survival in triple-negative breast cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2018; 33(1): 109-115.
190. Page DL, Schuyler PA, Dupont WD et al. Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2003; 361(9352): 125-129.
191. Pang-Kuo L, Saraswati S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(12): 1879–1902.

192. Park YH, Lee SJ, Jung HA et al. Prevalence and clinical outcomes of young breast cancer (YBC) patients according to intrinsic breast cancer subtypes: Single institutional experience in Korea. *Breast* 2015; 24(3): 213-217.
193. Pelekanou V, Carvajal-Hausdorf DE, Altan M et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. *Breast Cancer Res.* 2017; 19(1): 91.
194. Pelekanou V, Villarroel-Espindola F, Schalper KA et al. CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers. *Breast Cancer Res.* 2018; 20(1): 154.
195. Pellecchia S, Sepe R, Federico A et al. The Metallophosphoesterase-Domain-Containing Protein 2 (MPPED2) Gene Acts as Tumor Suppressor in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019; 11(6): 797.
196. Penault-Llorca F, Radošević-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology.* 2017; 49(2): 166-171.
197. Penkert J, Schmidt G, Hofmann W et al. Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity. *Breast Cancer Res.* 2018; 20: 87.
198. Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol.* 1998; 8(19): 1083-1086.
199. Perillo B, Sasso A, Abbondanza C et al. 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MMCF-7 cells, including bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2890-2901.
200. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406(6797): 747-752.
201. Perrone F, De Laurentiis M, De Placido S et al. Adjuvant zoledronic acid and letrozole plus ovarian function suppression in premenopausal breast cancer: HOBOE phase 3 randomised trial. *Eur J Cancer.* 2019; 118: 178-186.
202. Phan B, Majid S, Ursu S et al. Tumor suppressor role of microRNA-1296 in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 19519-19530.
203. Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 2007; 152(7): 1003–1011.
204. Piasecka D, Braun M, Kordek R et al. MicroRNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression. *J Cancer Res ClinOncol.* 2018; 144(8): 1401-1411.

205. Pinzon-Charry A, Maxwell T, Mcguckin MA et al. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *BreastCancer Res* 2006; 8: R5
206. Polónia A, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF et al. Prognostic value of stromal tumour infiltrating lymphocytes and programmed cell death-ligand 1 expression in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2017; 70 (10): 860-867.
207. Poulsen MLM, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics*. 2008; 9(6): 420–435.
208. Prat A, Parker JS, Karginova O et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(5): R68.
209. Prat A, Pineda E, Adamo B et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015; 24 (2): S26-35.
210. Prendergast GC, Jaffee EM. Cancer immunologists and cancer biologists: why we didn't talk then but need to now. *Cancer Res*. 2007; 67(8): 3500-3504.
211. Rahman M, Davis SR, Pumphrey JG et al. TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 113(2): 217-230.
212. Rampurwala M, Wisinski KB, O'Regan R. Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2016; 14(3): 186-193.
213. Rhodes LV, Martin EC, Segar HC, Miller DF, Buechlein A et al. Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 16638-16652.
214. Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P et al. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*. 2000; 21:1761–1765.
215. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*. 2001; 114(5): 853-865.
216. Robinson TJ, Liu JC, Vizeacoumar F et al. RB1 status in triple negative breast cancer cells dictates response to radiation treatment and selective therapeutic drugs. *PLoS One*. 2013; 8(11): e78641.
217. Rodríguez-Pinilla SM, Rodríguez-Gil Y, Moreno-Bueno G et al. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(4): 501-508.

218. Rostas 3rd JW, Pruitt HC, Metge BJ et al. MicroRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 200
219. Rowitch DH, S-Jacques B, Lee SM et al. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci.* 1999; 19(20): 8954-8965.
220. Russo J, Russo IH. *Molecular basis of breast cancer. Prevention and Treatment.* Springer, 2004. ISBN 3-540-00391-6.
221. Sabatier R, Finetti P, Guille A et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer.* 2014; 13: 228.
222. Saha T, Kar RK, Sa G. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015; 117(2-3): 250-263.
223. Sakr RA, Schizas M, Carniello JV et al. Targeted capture massively parallel sequencing analysis of LCIS and invasive lobular cancer: Repertoire of somatic genetic alterations and clonal relationships. *Mol Oncol.* 2016; 10(2): 360-370.
224. Salgado R, Denkert C, Demaria S et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015; 26 (2): 259-271.
225. Saloustros E, Nikolaou M, Kalbakis K et al. Weekly Paclitaxel and Carboplatin Plus Bevacizumab as First-Line Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. A Multicenter Phase II Trial by the Hellenic Oncology Research Group. *Clin Breast Cancer.* 2018; 18(1): 88-94.
226. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D et al. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int. J. Cancer,* 2008; 122: 999–1004.
227. Santoni M, Romagnoli E, Saladino T et al. Triple-negative breast cancer: Key role of Tumor-Associated Macrophages in regulating the activity of anti-PD-1/PD-L1 agents. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018; 1869(1): 78-84.
228. Satoru K, Kenkichi M, Yoshiko M et al. Significance of Immunological Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase : Re-Evaluation of Expression and Localization of Human Telomerase Reverse Transcriptase. *Am J Pathol.* 2003; 163(3): 859–867.
229. Sempere LF. Celebrating 25 Years of MicroRNA Research: From Discovery to Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(8): E1987.

230. Seong MK, Lee JY, Byeon J et al. Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Treat* 2015; 150: 141-148.
231. Shaghghi Z, Hosseinimehr SJ. Synergistic Effect of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Ionization Radiation in Cancer Treatment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2017; 12(4): 323-339.
232. Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist.* 2016; 21(9): 1050-1062.
233. Shen R, Wang Y, Wang CX et al. MiRNA-155 mediates TAM resistance by modulating SOCS6-STAT3 signalling pathway in breast cancer. *Am J Transl Res.* 2015; 7(10): 2115-2126.
234. Shinden Y, Akiyoshi S, Ueo H et al. Diminished expression of MiR-15a is an independent prognostic marker for breast cancer cases. *Anticancer Res* 2015; 35: 123-127.
235. Silverstein MJ, Lagios MD. Treatment selection for patients with ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast using the University of Southern California/Van Nuys (USC/VNPI) prognostic index. *Breast J.* 2015; 21(2): 127-132.
236. Slabý O et al. *Molekulární medicína.* Praha, Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
237. Slabý O, Svoboda M et al. *MikroRNA v onkologii.* Praha, Galén, 2015. ISBN 978-80-7262-587-1.
238. Slobodova Z, Ehrmann J, Krejci V et al. Analysis of CD40 expression in breast cancer and its relation to clinicopathological characteristics. *Neoplasma.* 2011; 58(3): 189-197.
239. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(11): 832-844.
240. Sorlie T, Perou CM, 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): 10869-10874.
241. Sossey-Alaoui K, Safina A, Li X et al. Down-Regulation of WAVE3, a Metastasis Promoter Gene, Inhibits Invasion and Metastasis of Breast Cancer Cells. *Am J Pathol* 2007; 170: 2112-2121.
242. Společnost lékařské genetiky a genomiky České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, z. s., www.slg.cz/doporuceni.

243. Stankevicins L, Barat A, Dessen P et al. The microRNA-205-5p is correlated to metastatic potential of 21T series: A breast cancer progression model. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173756.
244. Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*. 2006; 8(1): 201.
245. Su CM, Lee WH, Wu AT et al. Pterostilbene inhibits triple-negative breast cancer metastasis via inducing microRNA-205 expression and negatively modulates epithelial-to-mesenchymal transition. *J NutrBiochem*. 2015; 26(6): 675-685.
246. Sun MY, Yang XX, Xu WW et al. Association of DNMT1 and DNMT3B polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. *Genet Mol Res*. 2012; 11(4): 4330-4341.
247. Svoboda M, Navrátil J, Fabián P. Triple negativní karcinom prsu: analýza souboru pacientek diagnostikovaných a/nebo léčených v Masarykově onkologickém ústavu v letech 2004 až 2009. *Klinická onkologie* 2012; 25(3): 188 – 198.
248. Symonds L, Linden H, Gadi V et al. Combined Targeted Therapies for First-line Treatment of Metastatic Triple Negative Breast Cancer-A Phase II Trial of Weekly Nab-Paclitaxel and Bevacizumab Followed by Maintenance Targeted Therapy With Bevacizumab and Erlotinib. *Clin Breast Cancer*. 2019; 19(2): e283-e296.
249. Tampaki EC, Tampakis A, Alifieris CE et al. Efficacy and Safety of Neoadjuvant Treatment with Bevacizumab, Liposomal Doxorubicin, Cyclophosphamide and Paclitaxel Combination in Locally/Regionally Advanced, HER2-Negative, Grade III at Premenopausal Status Breast Cancer: A Phase II Study. *Clin Drug Investig*. 2018; 38(7): 639-648
250. Tang H, Liu P, Yang L et al. MiR-185 suppresses tumor proliferation by directly targeting E2F6 and DNMT1 and indirectly upregulating BRCA1 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 3185-3197
251. Tang J, Zhong G, Zhang H et al. LncRNA DANCR upregulates PI3K/AKT signaling through activating serine phosphorylation of RXRA. *Cell Death Dis*. 2018; 9(12): 1167.
252. Tauzin S, Chaigne-Delalande B, Selva E et al. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol*. 2011; 9(6): e1001090.
253. Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL et al. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest* 2013; 123: 150-163.

254. Teng YH, Tan WJ, Thike AA et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res.* 2011; 13: R35.
255. Thike AA, Iqbal J, Cheok PY et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(7): 956-964.
256. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell.* 2002; 2(5): 367-376.
257. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6: 276.
258. Tryfonidis K, Zardavas D, Katzenellenbogen BS et al. Endocrine treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond. *Cancer Treat Rev.* 2016; 50: 68-81.
259. Tsai CS, Chen FH, Wang CC et al. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68(2): 499-507.
260. Tsouko E, Wang J, Frigo DE et al. MiR-200a inhibits migration of triple-negative breast cancer cells through direct repression of the EPHA2 oncogene. *Carcinogenesis* 2015; 36: 1051-1060.
261. Turner N, Moretti E, Siclari O et al. Targeting triple negative breast cancer: is p53 the answer? *Cancer Treat Rev.* 2013; 39(5): 541-550.
262. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene.* 2006; 26: 2126–2132.
263. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, www.uzis.cz.
264. Valastyan S, Weinberg RA MiR-31: A crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 2010; 9: 2124-2129.
265. Varga Z, Noske A. Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140652.
266. Vasilatos SN, Katz TA, Oesterreich S et al. Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2013; 34(6): 1196-1207.
267. Vrba L, Jensen TJ, Garbe JC et al. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS One* 2010; 5: e8697.

268. Wang L, Liu D, Wu X et al. Long non-coding RNA (LncRNA) RMST in triple-negative breast cancer (TNBC): Expression analysis and biological roles research. *J Cell Physiol.* 2018; 233(10): 6603-6612.
269. Wang N, Wei L, Huang Y et al. miR520c blocks EMT progression of human breast cancer cells by repressing STAT3. *Oncol Rep.* 2017; 37(3): 1537-1544.
270. Wang Q, Cheng Y, Wang Y et al. Tamoxifen reverses epithelial-mesenchymal transition by demethylating miR-200c in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2017; 17(1): 492.
271. Watanabe K, Panchy N, Noguchi S et al. Combinatorial perturbation analysis reveals divergent regulations of mesenchymal genes during epithelial-to-mesenchymal transition. *NPJ SystBiol Appl.* 2019; 5:21.
272. Weisman PS, Ng CK, Brogi E et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Mod Pathol.* 2016; 29(5): 476-488.
273. Wen HY, Brogi E. Lobular Carcinoma In Situ. *Surg Pathol Clin.* 2018;11(1):123–145.
274. Weng YS, Tseng HY, Chen YA et al. MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancerstemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer. *MolCancer.* 2019; 18(1): 42.
275. Wimberly H, Brown JR, Schalper K et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3(4): 326-332.
276. Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Research* 2014; 16: 207.
277. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2013; 31(31): 3997–4013.
278. Wong CK, Gromisch C, Ozturk S et al. MicroRNA-4417 is a tumor suppressor and prognostic biomarker for triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8): 1113-1120.
279. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res* 2009; 19: 439-448.

280. Xia H, Hui KM. MicroRNAs involved in regulating epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells as molecular targets for cancer therapeutics. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19(11): 723-730.
281. Xiong Z, Ye L, Zhenyu H et al. ANP32E induces tumorigenesis of triple-negative breast cancer cells by upregulating E2F1. *Mol Oncol.* 2018; 12(6): 896-912.
282. Xu X, Zhang Y, Jasper J et al. MiR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 20381-20394.
283. Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle* 2009; 8: 712-715.
284. Yan LX, Huang XF, Shao Q et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008; 14: 2348-2360.
285. Yan M, Li X, Tong D et al. MiR-136 suppresses tumor invasion and metastasis by targeting RASAL2 in triple-negative breast cancer. *Oncol Rep* 2016; 36: 65-71.
286. Yang HL, Thiyagarajan V, Shen PC et al. Anti-EMT properties of CoQ0 attributed to PI3K/AKT/NFkB/MMP-9 signaling pathway through ROS-mediated apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38(1): 186.
287. Yeong J, Thike AA, Tan PH et al. Identifying progression predictors of breast ductal carcinoma in situ. *J Clin Pathol.* 2017; 70(2): 102-108.
288. Youness RA, Hafez HM, Khallaf E et al. The long noncoding RNA sONE represses triple-negative breast cancer aggressiveness through inducing the expression of miR-34a, miR-15a, miR-16, and let-7a. *J Cell Physiol.* 2019; 234(11): 20286-20297.
289. Yu H, Li H, Qian H et al. Upregulation of miR-301a correlates with poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* 2014; 31: 283.
290. Yu J, Shen W, Gao B et al. MicroRNA-182 targets FOXF2 to promote the development of triple-negative breast cancer. *Neoplasma.* 2017; 64(2): 209-215.
291. Yue X, Zhao Y, Xu Y et al. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol.* 2017; 429(11): 1595-1606.
292. Zavala V, Pérez-Moreno E, Tapia T et al. MiR-146a and miR-638 in BRCA1-deficient triple negative breast cancer tumors, as potential biomarkers for improved overall survival. *Cancer Biomark* 2016; 16: 99-107.
293. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009; 119(6): 1429-1437.

294. Zeng Z, Hou CH, Hu QH et al. Mammography and ultrasound effective features in differentiating basal-like and normal-like subtypes of triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(45): 79670–79679.
295. Zenzola V, Cabezas-Quintario MA, Arguelles M et al. Prognostic value of Ki-67 according to age in patients with triple-negative breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2018; 20(11): 1448-1454.
296. Zhang B, Cao M, He Y et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol*. 2017; 39(6): 1010428317711571.
297. Zhang X, Cheng Q, Yin H et al. Regulation of autophagy and EMT by the interplay between p53 and RAS during cancer progression (Review). *Int J Oncol*. 2017; 51(1): 18-24.
298. Zhao Q, Zhang X, Cai H et al. Anticancer effects of plant derived Anacardic acid on human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Am J Transl Res*. 2018; 10(8): 2424-2434.
299. Zhao X, Lu Y, Nie Y et al. MicroRNAs as critical regulators involved in regulating epithelial- mesenchymal transition. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013; 13(9): 935-944.
300. Zheng R, Lin S, Guan L et al. Long non-coding RNA XIST inhibited breast cancer cell growth, migration, and invasion via miR-155/CDX1 axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 498(4): 1002-1008
301. Zhou Y, Niu W, Luo Y et al. p53/Lactate dehydrogenase A axis negatively regulates aerobic glycolysis and tumor progression in breast cancer expressing wild-type p53. *Cancer Sci*. 2019; 110(3): 939–949.
302. Zou Y, Zhong Y, Wu J et al. Long non-coding PANDAR as a novel biomarker in human cancer: A systematic review. *Cell Prolif*. 2018; 51(1).
303. Zuo Y, Li Y, Zhou Z et al. Long non-coding RNA MALAT1 promotes proliferation and invasion via targeting miR-129-5p in triple-negative breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2017; 95: 922-928.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADAM - a disintegrin and metalloprotease

AKT1 - protein kinase B

AP-1 - activator protein 1

APAF1 - apoptotic protease activating factor 1

APE1 - apurinic/aprimidinic endonuclease

AR – androgene receptor

ARCN1 - Archain 1

AREG – amphiregulin

ATM - ATM serine/threonine kinase

ATP - adenosine tri-phosphate

ATR - Rad3 related protein kinase

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

BER – base excision repair

CBFB - core-binding factor subunit beta

CDC25A - M-phase inducer phosphatase 1

CDH1 - cadherin-1

CDK - cyclin-dependent kinase

CDKN - cyclin-dependent kinase inhibitor

CIAPIN1 - cytokine-induced apoptosis inhibitor 1

CSCs – cancer stem cells

DAPK1 - death-associated protein kinase 1

DCIS – ductal in situ carcinoma

DNA - deoxyribonucleic acid

DNMT - DNA methyltransferase

DSB - double strand break

EGF – epidermal growth factor

EGFR – epidermal growth factor receptor
EPSTI1 - epithelial stromal interaction 1
ER – estrogen receptor
ErbB – epidermal growth factor receptor family
ERK - extracellular signal – regulated kinases
FABP - fatty-acid-binding proteins
FAP - familial adenomatous polyposis
FGF - fibroblast growth factor
FGFR - fibroblast growth factor receptor
GCDFP-15 - gross cystic disease fluid protein 15
GDP - guanosine diphosphate
GGR - global genome repair
GSTP1- glutathione S-transferase P
GTP - guanosine-5'-triphosphate
hCG - human chorionic gonadotropin
HER2 – human epidermal growth factor receptor 2
HGFR - hepatocyte growth factor receptor
HIF - hypoxia-inducible factor
HOXA5 - homeobox protein Hox-A5
HR - homologous recombination
hTERC - human telomerase RNA gene
hTERT - human telomerase reverse transcriptase
CHK2 - checkpoint kinase 2
LH - luteinizing hormone
lncRNA – long-noncoding RNA
MAP2K1 - mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAPK - mitogen-activated protein kinase

MBD - methyl-CpG binding domain

MDGI - mammary-derived growth inhibitor

MDM2 - Mouse double minute 2 homolog

MECP2 - methyl-CpG-binding protein 2

MGMT - O6-methylguanine DNA methyltransferase

miRISC – RNA- induced silencing komplex

miRNA – microRNA

MMR – mismatch repair

MPPED2 - metallophosphoesterase domain containing 2

mRNA – messenger RNA

mTOR - mammalian target of rapamycin

mTORC1 - mammalian target of rapamycin complex 1

MUTYH - mutY DNA glycosylase

NAD - nicotinamide adenine dinucleotide

NER - nucleotide excision repair

NGF - nerve growth factor

NHEJ - non-homologous end joining

NRG – neuregulin

PARP - poly (ADP-ribose) polymerase

pCR – complete pathological response

PD-L1- programmed death-ligand 1

PI3K - phosphoinositide 3-kinase

PKC - protein kinase C

PLC γ - phosphoinositide phospholipase C

POT1 - protection of telomeres protein 1

PR – progesterone receptor

PRMT1 - protein arginine N-methyltransferase 1

PSMC3IP - homologous-pairing protein 2 homolog
PTEN - phosphatase and tensin homolog
RASSF1A - Ras association domain family 1 isoform A
Rb1 - retinoblastoma protein
RB1CC1 - RB1-inducible coiled-coil protein 1
RNA - ribonucleic acid
SMYD3 - SET and MYND domain-containing protein 3
STAT3 - signal transducer and activator of transcription 3
TCR - transcription-coupled repair
TGF – transforming growth factor
TIMP3 - metalloproteinase inhibitor 3
TNBC – triple-negative breast cancer
TNF – tumor necrosis factor
TRF2 - telomeric repeat-binding factor 2
TWIST1 - Twist family BHLH transcription factor 1
XRCC1 - X-ray repair cross-complementing protein 1