Zdravotně sociální fakulta
Faculty of Health and Social Studies

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Význam amplifikace genu HSD17B1 u karcinomu prsu

Bakalářská práce

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

Vypracoval: Michaela Mašová

Vedoucí práce: RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Význam amplifikace genu HSD17B1 u karcinomu prsu jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 3.5.2017 .....

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala RNDr. Radku Trojancovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady a připomínky, celému kolektivu Cytogenetické laboratoře ÚMTM UP v Olomouci, a to především Soně Mlčochové, za pomoc při práci v laboratoři.

Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během mého studia.

Význam amplifikace genu HSD17B1 u karcinomu prsu

Abstrakt

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním u žen. Přesto, že incidence neustále narůstá, snižuje se mortalita tohoto onemocnění. Nicméně, stále existují případy, u nichž konvenční léčba selhává.

Jedním z terapeuticky důležitých rysů je hormon-dependentní závislost karcinomů prsu a status receptoru růstového faktoru HER-2 (Her-2/neu, c-erbB-2). U karcinomů se zvýšenou expresí estrogenového či progesteronového receptoru (ER, resp. PR) lze léčbu zacílit na jejich blokádu, či v případě HER2 nadměrné exprese funkci zablokovat použitím monoklonální protilátky trastuzumab, popř. lapatinib. Přestože díky agresivitě HER2 pozitivních nádorových buněk patřil tento podtyp onemocnění do skupiny pacientek s nejhorší prognózou, díky cílené (biologické) léčbě patří v současné době tyto pacientky do skupiny nejlépe léčitelných ca. mammy.

Nicméně, u některých hormonálně-dependentních nádorů dochází k selhání léčby. Jedním z důvodů by mohl být produkt genu HSD17B1, který zasahuje do metabolismu těchto hormonů. Gen je navíc lokalizován na chromozomu 17 (podobně jako gen HER2) a tudíž lze předpokládat jeho aberaci.

Vzhledem k tomu, že sonda pro gen HSD17B1 není komerčně dostupná, připravili jsme tuto sondu pomocí transfekovaných *E. coli* bakteriálních klonů a její specifitu jsme ověřili na chromozomálních preparátech a pacientských vzorcích.

V předkládané práci jsme provedli FISH u 50 vzorků pacientek s karcinomem prsu s cílem alespoň předběžně zjistit, v jaké míře je u nich zmnožen gen HSD17B1 a zvážit jeho zařazení do rutinního vyšetřování ca. mammy. Dále jsme se pokusili ověřit, zda počet kopií genu HSD17B1 není závislý na statusu genu HER2, či zda nekoreluje např. s věkem pacientky při diagnóze apod.

Zdá se, že počet kopií genu HSD17B1 je v některých případech u ca. prsu navýšen, i když se jeho navýšení je spíše důsledkem polyzomie chromozomu 17. V další fázi

bude studie rozšířena o další pacienty a dokončen sběr klinických dat a jejich analýza ve vztahu k HSD17B1.

Jedná se o pilotní projekt, jehož cílem je ověřit význam genu HSD17B1 a případně nabídnout připravenou sondu ke komercionalizaci.

Klíčová slova:

Karcinom prsu, prediktivní faktor, prognostický faktor, cílená léčba, biologická léčba, Fluorescenční *in situ* hybridizace, Gen HSD17B1, estrogenový receptor, progesteronový receptor, HER2

Importance of HSD17B1 gene Amplification in breast cancer

Abstract

Breast cancer is the most common female tumour disease. Although, the incidence is constantly growing, mortality of this disease is decreasing. However, there are still occurrences, where the conventional therapy failed.

One of the important therapeutic attribute is hormone dependence of breast cancer and status of growth factor receptor HER2 (Her-2/neu, c-erbB-2). Treatment of the breast cancer with higher expression of estrogene or progesterone receptors (ER or PR) could be targeted-into blockade of these receptors or in the case of HER2 we could blockade it´s function with monoclonal antibody trastuzumab or lapatinib. Because of aggression of HER2 positive tumour cells, this subtype of breast cancer belonged to the group of patients with the worst prognosis. Thanks to targeted (biological) therapy belongs this patients into the group with the best treatable breast cancer today.

However, in some of the hormone-dependent breast cancer cases the treatment fails. One of the reasons could be the product of HSD17B1 gene that is involved in metabolism of these hormones. Moreover, this gene is localized on chromosome 17 (like HER2 gen) and therefore it´s aberration could be suspected.

Because the FISH probe for HSD17B1 gene is not commercially available, we prepared it by using transgenic *E. coli* bacterial clones. The specifity was checked on chromosomal spreads.

In this presented thesis, we investigated 50 patient´s breast cancer samples by using fluorescent *in situ* hybridization to determine the status of HSD17B1 gene. Amplification of the gene could be important in the treatment of breast cancer and in resistance to antihormonal therapy. Next, we tried to check, if the status of HSD17B1 gene could be dependent on status of HER2 gene or if it correlates for example with patient´s age at time of diagnosis etc.

Although, the statistical important correlations were not found, it seems, that HSD17B1 gene is lightly increased in some cases. In the next phase the study will be extended of another patient samples and the clinical dates and analysis in relation to HSD17B1 will be done.

This is a pilot project. The main goal was to prepare HSD17B1 gene probe intended for commercialization and check the probe on the set of patients with breast cancer.

Key words:

Breast cancer, predictive factor, prognostic factor, targeted therapy, biological therapy, fluorescent *in situ* hybridization, HSD17B1 gene, estrogene receptor, progesterone receptor, HER2

Obsah

Úvod **10**

1. Teoretická část **12**

1.1 Nádorová onemocnění **12**

1.1.1 Historie nádorových onemocnění ***12***

1.1.2 Charakteristika nádorů ***12***

1.1.3 Vznik nádorů ***13***

1.1.4 Diagnostika ***16***

1.1.5 Léčba nádorů ***17***

1.2 Karcinom prsu **27**

1.2.1 Rozdělení a léčba karcinomu prsu ***28***

1.2.2 Diagnostika karcinomu prsu ***30***

1.3 Gen HSD17B1 (17q21.2; hydroxysteroid 17 - beta dehydrogenase 1) **31**

2. Cíl práce a hypotézy **36**

3. Metody, použité materiály **37**

3.1 Fluorescenční in situ hybridizace **37**

3.2 DNA sondy **37**

3.3 Materiál a přístroje pro fluorescenční značení sondy **38**

3.3.1 Přístroje a zařízení ***38***

3.3.2 Materiál a reagencie ***38***

3.4 Příprava fluorescenčně značené sondy **39**

3.4.1 Fragmentace plasmidové DNA ***39***

3.4.2 Značení DNA pomocí Bright kitu ***39***

3.4.3 Přečištění vzorku pomocí Platinum bright kitu ***39***

3.4.4 Přesrážení s cot-1-DNA ***40***

3.5 Materiál a přístroje pro FISH **41**

3.5.1 Přístroje a zařízení *41*

3.5.2 Materiál a reagencie *41*

3.5.3 Soubor pacientů *41*

3.6 Deparafinizace a příprava tkáňového řezu pro fluorescenční in situ hybridizaci **41**

3.6.1 Předpříprava FFPE řezů pro FISH *41*

3.7 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) **43**

3.7.1 Denaturace a hybridizace *43*

3.7.2 Odmytí nenavázané sondy *43*

3.8 Vyhodnocení FISH **44**

4. Výsledky **45**

5. Diskuze **52**

6. Závěr **55**

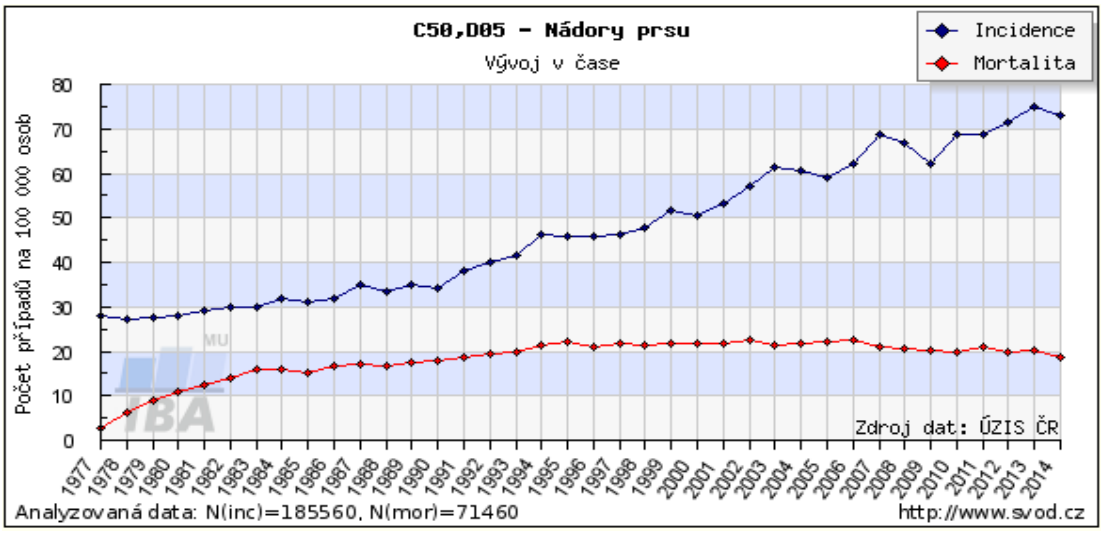
7. Použitá literatura **56**

8. Seznam použitých zkratek **64**

Úvod

Podle údajů Státního zdravotního ústavu (SZÚ) v České republice (ČR) zemře ročně na nádorové onemocnění 27 000 osob a jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí (Státní zdravotní ústav).

Jedním z nejčastějších karcinomů diagnostikovaných v ČR je karcinom prsu. Ačkoliv je karcinom prsu považován převážně za nádorové onemocnění ženské populace, mohou tímto onemocněním vzácně trpět i muži. Incidence karcinomu prsu ve světě neustále stoupá. Nejvíce případů bylo v roce 2012 zaznamenáno v Belgii, Dánsku a Moldavsku. ČR se v celosvětovém měřítku nacházela ve stejném roce na 18. místě (EUCAN, 2012). Díky záchytu onemocnění v počátečním stádiu a novým možnostem léčby mortalita žen trpících nádorem prsu stagnuje nebo mírně klesá (obr.1). K tomu také v roce 2002 napomohlo zavedení screeningového vyšetřování karcinomu prsu u žen nad 45 let (Novotvary, 2016).



Obr. 1: Vývoj incidence a mortality u nádoru prsu v letech 1977 až 2014. Dostupné z: DUŠEK, L., MUŽÍK, J., KUBÁSEK, M., KOPTÍKOVÁ, J., ŽALOUDÍK, J., VYZULA, R., Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. 2005. [online]. Masarykova univerzita, [cit. 2017-4-05]. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802–8861. Dostupný z WWW: http://www.svod.cz.

Riziko vzniku karcinomu prsu stoupá spolu s narůstajícím věkem. U žen do 20 let věku se téměř nevyskytuje, u žen do 30 let je zaznamenána nízká incidence a nejvíce nových případů tohoto onemocnění je diagnostikováno u žen v kategorii od 50 let věku (Adam et al., 2010).

Dnes, díky novým poznatkům v medicíně a zavedením screeningových programů, je umožněno zachycení nádorových onemocnění již v raných stádiích a prognóza takových pacientů je o to příznivější. Problémem však zůstává, ne zcela dostačující, účast žen na těchto programech.

1. Teoretická část

1.1 Nádorová onemocnění

1.1.1 Historie nádorových onemocnění

Svůj název získalo toto onemocnění odvozením z řeckého slova karkinos, což znamená rak, nebo onkos, v překladu krab. Ze slova onkos pak vznikl název pro vědu zabývající se nádory – onkologie. Vznik a proces rozvoje onkologických onemocnění je nazýván karcinogeneze, kancerogeneze, onkogeneze nebo tumorigeneze (Hofmanová, 2013).

První zmínky o nádorovém onemocnění se u různých autorů liší, avšak rakovina se v lidské populaci vyskytovala již od pradávna. Podle Altanera první zmínky pocházejí už ze starověkého Egypta. Brzy na počátku 20. století byla popsána spojitost mezi vlivem RTG záření a vznikem rakoviny a také rodinný výskyt nádorů. Velkým krokem kupředu byl objev lidského genomu na konci 20. století, který velkou měrou přispěl k poznání mechanismů vzniku nádorů na genetické úrovni. V současné době jsou onemocnění zkoumána na molekulárně genetické či proteomické úrovni, což umožňuje více pochopit jednotlivé procesy vzniku a vývoje nádorové buňky a zároveň nalézt vhodné cíle (markery), které by umožnily selektivní eliminaci těchto buněk. (Altaner,2008).

1.1.2 Charakteristika nádorů

Vznik nádorového onemocnění je složitý a doposud ne zcela objasněný proces. Nádorem můžeme označit nekontrolovatelné nadměrné a abnormální bujení buněk (Duda, 2011).

Důležitým charakteristickým znakem nádoru je jeho biologická povaha (způsob růstu a jeho chování v organismu). Podle ní rozlišujeme nádory na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné) nádory. Benigní nádory většinou rostou pomaleji, na okolní tkáň působí pouze tlakem a jsou ohraničené. Růst benigního nádoru není neomezený a po určité době se zastaví. Většinou se dají snadno odstranit a obvykle u nich nevzniká recidiva onemocnění. Buňky nezhoubného nádoru neinfiltrují ostatní tkáně a nevytváří

tak sekundární nádory, tzv. metastáze. Někdy se však může stát, že se benigní nádor zvrhne na maligní. Maligní nádory rostou rychleji, mají destruktivní a invazivní charakter, prorůstají do lymfatických a krevních cév. Maligní buňky mají schopnost infiltrovat okolní tkáně a tvořit metastáze. Oproti okolní tkáni nejsou většinou ohraničené (Duda, 2011).

Histogenetický původ *(typing*) je dalším důležitým znakem nádoru. Rozlišujeme tak nádory podle toho, ze které tkáně pocházejí. A to nádory mezenchymové, epitelové, smíšené a další. Nádory pocházející z epitelových buněk se nazývají karcinomy. Nádory neepitelového původu jsou sarkomy, např. ze svalů, vaziva, kostí a podobně. Někdy se můžeme setkat s případy, kdy jsou nádorové buňky natolik nediferencované, nezralé, že nelze určit, z které tkáně primárně pocházejí (Duda, 2011).

Stanovení stupně malignity (*grading*) je důležité pro stanovení postupu léčby a určení prognózy onemocnění. Stupeň malignity stoupá s atypií a stupněm nezralosti nádorových buněk oproti tkáni, z které pocházejí. (Coufal et al., 2011; Duda., 2011).

Ke stanovení rozsahu onemocnění (*staging*) se využívá nejčastěji klasifikace TNM. T slouží k určení rozsahu primárního nádoru. N popisuje zasažení lymfatických uzlin a M vzdálené metastázy. Rozsah onemocnění je určován přiřazením čísla za jednotlivá písmena. Čím je vyšší číslo, tím je vyšší i rozsah nádoru v dané kategorii (Vorlíček et al., 2012).

1.1.3 Vznik nádorů

Růst a vznik nádoru je vícestupňový proces. Počáteční změna buňky na nádorovou se nazývá stádium iniciace. Stádiem promoce označujeme zahájení dělení buňky. Třetím stádiem růstu nádoru je stádium progrese (Vorlíček et al., 2012). Obecně platí, že riziko vzniku karcinomu koreluje s narůstajícím věkem vlivem nahromadění genetických změn v buňce. Nádorové onemocnění vzniká z jakékoliv dělení schopné buňky tkáně (Altaner,2008).

Buněčné dělení a růst buněk je řízen přesně regulovanými mechanismy. Kontrolní mechanismy zabraňují poškozené buňce vstoupit do další fáze buněčného dělení a iniciují opravy či směřují buňku k programované smrti, apoptóze. Pokud dojde k poškození kontrolních mechanismů, poškozená buňka přechází do další fáze buněčného cyklu a může se tak stát buňkou nádorovou (Snustad et al., 2009).

Životnost buněk je dána zkracováním telomery. Telomery tvoří opakující se nukleotidové sekvence, které se nacházejí na konci chromozomů. Tato sekvence nukleotidů může být udržována pomocí enzymu telomerázy (např. u epiteliálních buněk apod.). Při každém buněčném dělení dochází ke ztrátě malého množství DNA z konců chromozomů. Úlohou telomerázy je nahradit ztracené množství DNA a vzhledem k tomu, že u většiny somatických buněk není tento enzym aktivní, dochází k jejich zkracování. Ve chvíli, kdy je telomera příliš krátká dochází k delecím pro buňku životně důležitých genů a buňka zaniká pomocí apoptózy (programovaná buněčná smrt). U nádorových buněk zůstává délka telomery zachována vlivem aktivní telomerázy a buňky se tak stávají „nesmrtelnými“ (Altaner, 2008).

Jak bylo uvedeno výše, v případě poškození je buňka směřována k apoptóze. Mechanismus apoptózy můžeme rozdělit na receptorový a mitochondriální. Receptorová apoptóza je spuštěna shlukováním receptorů programové buněčné smrti, tzv. *death* receptorů. (FAS, TNF, TRAIL a jiné) a vazbou *death* ligandů. Dochází ke vzniku DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) a aktivaci kaspáz. Mitochondriální apoptóza je umožněna vyplavením apoptotických molekul (AIF-*Apoptosis Including Factor,* endonukleáza G, cytochrom c) z buněčných organel, mitochondrií (Klener et al., 2010). Kaspázy spolu s dalšími enzymy (proteázy, endonukleázy a další) štěpí různé proteiny obsažené v cytoskeletu a vnitřní jaderné membráně buňky. Buňka se zmenšuje a postupně se rozpadá na apoptotická tělíska, která jsou následně pohlcena pomocí fagocytů (Snustad et al., 2009). Při vzniku nádorového onemocnění často dochází k defektu v apoptotická dráze. Defekt může nastat např. v tumor supresorovém genu TP53. Produkt tohoto genu, protein p53, kontroluje integritu DNA v G1/S fázi buněčného cyklu. Jeho dysfunkce

může vést k pokračování buněčného cyklu i s poškozenou DNA a tím k přežívání a kumulaci poškozených buněk v organismu. U poškozených buněk pak může dojít k dalším mutacím a následně maligní transformaci (Klener et al., 2010).

Obecně existují dva typy genů, jejichž mutace může přispívat ke vzniku nádorů. Prvním typem takových genů jsou protoonkogeny. Funkcí protoonkogenů je kontrolovat a podporovat růst a buněčné dělení. Druhým typem genů, jejichž mutace vede ke vzniku nádorů, jsou tumor supresorové geny. Jejich funkcí v organismu je inhibovat růst a dělení buněk, opravovat DNA, regulovat apoptózu a diferenciaci buněk. V případě kumulace nefyziologických změn těchto genů se buňka může vymknout kontrole a nadměrně proliferovat. Maligní buňky mají většinou schopnost prostupovat do okolních tkání a tvořit metastáze. Tyto léze mohou utlačovat orgány či narušovat jejich funkci, v čehož důsledku dojde k selhání orgánu a následnému kolapsu celého organismu (Altaner, 2008; Snustad et al., 2009; Hofmanová, 2013).

Vznik nádorů je podmiňován genetickými faktory v interakci s vlivy vnějšího prostředí. Dědičná nádorová onemocnění tvoří jen asi 5-10 % všech nádorů, u zbytku onemocnění se jedná o tzv. sporadické typy onemocnění, u kterých jsou genetické změny nacházeny výhradně v nádorových buňkách. Většina dědičných nádorových onemocnění má autozomálně recesivní povahu. To znamená, že pokud zdědíme pouze jednu dysfunkční alelu určitého genu od jednoho z rodičů, může dojít ke vzniku predispozice k tvorbě nádoru, avšak druhá alela tohoto genu funguje bez poruchy a k rozvoji onemocnění většinou nedochází. Nicméně, dle Knudsonovy teorie dvou zásahů, velmi často dochází ke ztrátě heterozygozity (LOH), kdy postižená buňka inaktivuje i druhou funkční alelu (bodovou mutací, delecí apod.), čímž může dojít ke spuštění onkogenního procesu. Nejčastějšími dědičnými karcinomy jsou retinoblastom (RB1 gen), karcinom prsu a ovarií (BRCA1 a BRCA2 geny), Li Fraumeniho syndrom (TP53 gen), či karcinomy kolorekta (FAP, popř. DCC gen) či syndromy chromozomální instability (Altaner, 2008; Hofmanová, 2013; Foretová et al., 2014).

Na udržení integrity organismu se podílí rovněž imunitní systém. Imunitní systém má důležitou úlohu v prevenci nádorů a také v regulaci jeho růstu. Nádorové buňky se

svými vlastnostmi méně nebo více liší od normálních buněk. Proto by měly být rozeznány a eliminovány imunitním systémem. Tyto rozdílné vlastnosti jsou však příliš malé a jsou tak imunitním systémem ignorovány, nebo nádorové buňky používají mechanismy, které jim umožní utlumit reakci imunitního systému či jejich počet je již příliš vysoký (Hořejší et al., 2005; Vokurka et al., 2012).

1.1.4 Diagnostika

U nádorových onemocnění je nejdůležitější včasný záchyt onemocnění. Jejich diagnostika je však velmi složitá a ke konečné diagnóze vede dlouhá cesta zahrnující celou řadu vyšetření. Bohužel, většina nádorů probíhá v počátečních fázích bezpříznakově a onemocnění je diagnostikováno až při prvních klinických příznacích, kdy je nemoc již často rozvinutá, zasahuje do dalších orgánů a její eliminace je obtížná.

Nezbytnou součástí diagnostiky tumorů jsou zobrazovací metody (např. magnetická rezonance, rentgenové vyšetření, ultrasonografie nebo počítačová tomografie), které nám umožňují detekci nádoru (Krška et al., 2014).

Další možností jsou endoskopická vyšetření jako gastroskopie, kolonoskopie a další. Při endoskopických vyšetřeních se často odebírá bioptický vzorek, který je následně histologicky vyšetřen a pomůže nám určit typ a biologickou povahu nádoru. Cytologický preparát získáváme nátěrem buněk odebraných stěrem ze sliznic, tenkojehlovou punkční technikou nebo z tekutin výpotků (Krška et al., 2014).

Při diagnostice nádorových onemocnění je kromě klasických laboratorních testů nutné rovněž stanovení vybraných nádorových markerů. Lze je stanovovat v moči, krvi nebo tkáni a jsou projevem odpovědi nádoru na léčbu, nebo příznakem zhoršení nemoci. Některé nádorové markery však mohou být přítomny i u nenádorových onemocnění. Nejčastěji stanovované tumor markery jsou například karcinoembryonální protein (CEA) vyskytující se u většiny nádorů, alfa-fetoprotein (AFP) a onkofetální nádorový marker (CA) (Hofmanová, 2013; Krška et al., 2014).

Pro zpřesnění diagnózy a odhad chování nádoru se rovněž provádí molekulárně genetická vyšetření. Smyslem je prognóza onemocnění či predikce odpovědi nádoru na léčbu, v případě výzkumu pak nalezení a identifikace nových léčebných cílů. Mezi takové metody patří elektroforetické metody, polymerázová řetězová reakce (PCR), imunohistochemie (IHC), sekvenování, analýza proteomu nebo např. fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

1.1.5 Léčba nádorů

Léčba nádoru ve většině případů vyžaduje komplexní terapii, tzn. kombinaci více léčebných postupů. Nádorová onemocnění bývají často heterogenní, a tedy ne všechny přítomné klony reagují na stejné terapeutikum. Smyslem komplexní terapie je zvolit kombinaci léčiv tak, aby zasáhla všechny přítomné nádorové klony. Terapii nádorů můžeme rozdělit podle cíle, kterého má být dosaženo. V případě, že nádor není možné chirurgicky odstranit, bývá zvolen neoadjuvantní režim, jehož smyslem je redukovat nádor tak, aby odpovídal chirurgickým možnostem. Kurativní (adjuvantní) léčba má za cíl úplné vyléčení pacienta. Paliativní léčba se indikuje pacientům v pokročilém stádiu nemoci, kdy vyléčení není možné, s cílem co největší redukce nádorových buněk či alespoň k zastavení růstu nádoru. Smyslem je zlepšit pacientovi kvalitu života a prodloužit jej. Podpůrná (symptomatická) léčba pouze zmírňuje nežádoucí účinky vlastní protinádorové terapie a důsledky přítomnosti nádoru (Petráková et al., 2014).

1.1.5.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba je základním léčebným postupem u většiny nádorů. Pokud to lokální umístění dovoluje, přistupuje se k chirurgickému odstranění nádoru. Ve většině případů je nutné provést resekci spádových uzlin, které by mohly být infiltrovány nádorovými buňkami. Jejich pozitivní počet zároveň nepřímo poukazuje na rozsah onemocnění. Negativita uzlin či jejich resekce nedává jistotu odstranění všech nádorových buněk, které by mohly zapříčinit recidivu onemocnění, nebo způsobit vznik metastází. Proto, zejména u neohraničených nádorů, se většinou přistupuje také k radioterapii a chemoterapii. Tato léčba se často preventivně podává i v případě karcinomů *in situ*,

tj. u nádorů, které jsou ve tkáni ohraničené a nepředpokládá se jejich invaze (Altaner, 2008; Petráková et al., 2014).

1.1.5.2 Radioterapie

Radioterapii podstupuje 50-70 % onkologických pacientů. Radioterapie využívá ionizující záření. Cílem kurativní radioterapie je zničení nádorových buněk aplikací maximální dávky záření s přijatelnou mírou nežádoucích účinků (Tomášek et al., 2015).

Radioterapii lze rozdělit na zevní radioterapii a brachyradioterapii. U externí radioterapie se zdroj záření nachází mimo tělo pacienta. U brachyradioterapie se zdroj záření zavádí přímo do orgánu nebo tkáně postižené nádorem (Hynková et al.,2011).

1.1.5.2.1 Zevní radioterapie

Radioterapie s modulovanou intenzitou (IMRT) je 3 D-konformní radioterapie (trojrozměrná). Svazek záření je přizpůsoben cílovému objemu a je upravena intenzita svazku záření. Tato metoda umožňuje ozařovat složitěji strukturované nádory a zároveň IMRT více šetří zdravou tkáň (Hynková et al., 2011).

Stereotaktická radioterapie se pomocí trojrozměrného koordinačního systému a zobrazovací metody přesně určí prostorovou lokalizaci cílového objemu. Stereotaktická radiochirurgie je vysoká dávka záření aplikována přímo do nádorového ložiska (Hynková et al., 2011).

V průběhu léčby dochází k fyziologickému pohybu nádoru. Tyto změny cílového objemu v aktuálním čase zohledňuje 4 D-konformní radioterapie. Adaptivní radioterapie (ART) dovoluje vyhodnotit a upravit změnu polohy, velikosti a tvaru cílového objemu. Charakteristikou ART je možnost změny ozařovacího plánu a dávky v průběhu léčby. Cílem této radioterapie je aplikace správné dávky do správného objemu (Hynková et al., 2011).

Další specifickou metodou radioterapie je velkoobjemová technika radioterapie. U této metody dochází k ozařování velkých objemů. Příkladem je celotělové ozařování před transplantací kostní dřeně (Hynková et al., 2011).

V oblasti radioterapie lze za jednu z nejšetrnějších léčebných metod považovat protonovou terapii, při které, oproti běžnému ozařování, dochází k lepšímu zacílení předávané energie na cílovou strukturu a minimalizuje se poškození zdravých tkání. Vstupní dávka záření je nízká a výstupní je nulová, což nám také snižuje nebo přímo eliminuje nástup nežádoucích účinků (Proton therapy center, 2016).

1.1.5.2.2 Brachyterapie

Podle umístění radionuklidového zářiče dělíme brachyterapii do několika skupin. U intrakavitární brachyterapie je zářič umístěn do břišní dutiny, z které nádor vychází. U intraluminární brachyterapie jsou zdroj a vodič záření zavedeny do lumen trubicového orgánu. Intersticiální brachyterapie je charakteristická zavedením zářiče přímo do nádorového ložiska. Zavedení zářiče je prováděno při operačním zákroku, pooperačně nebo bez operačního výkonu. U povrchové brachyterapie jsou na povrch postižené kůže nebo sliznic umístěny speciální aplikátory formou muláží (Hynková et al., 2011).

1.1.5.3 Chemoterapie

Chemoterapie využívá protinádorových účinků některých chemických látek (Heroková et al., © 2017). Cytostatická léčiva působí na buňky cytotoxicky a inhibují jejich proliferaci, nebo navozují apoptózu buněk. Jejich účinek se nejvíce projevuje ve tkáních s velkou proliferační aktivitou. Tento fakt s sebou přináší také spoustu nežádoucích účinků. Ačkoliv se některá chemoterapeutika špatně zařazují, obecně je můžeme rozdělit na konvenční a epigenetická. Konvenční chemoterapeutika zasahují do DNA buněk. Narušují replikaci a transkripci což vede k poškození DNA a proteinů. Účinek epigenetických chemoterapeutik způsobují změny struktury chromatinu uloženého v jádře buňky. Chromatin je komplex DNA s některými proteiny (Klener et al., 2010; Petráková et al., 2014).

1.1.5.3.1 Konvenční chemoterapeutika

V nádorových buňkách dochází k nadměrnému dělení buněk, které probíhá v několika fázích. Konvenční terapeutika zasahují do mechanismů replikace DNA, syntézy nukleových kyselin a proteosyntézy zablokováním nebo likvidací určitého substrátu, enzymu nebo receptoru či jiným narušením mechanismu. Některá konvenční cytostatika alkylují DNA nebo navozují u nádorových buněk apoptózu. Tím dochází k zástavě buněčného cyklu nebo poruše syntézy nukleových kyselin a proteosyntézy. Mezi konvenční chemoterapeutika patří např. antimetabolity. Antimetabolit se chová z pohledu buňky jako běžný substrát, nicméně oproti běžnému metabolitu je upraven přídatnou skupinou či stericky. Pokud jej buňka využije ve svém metabolismu, zablokují tyto přídatné vlastnosti celý proces a ten se zastaví. Existují různé skupiny antimetabolitů např. antifolika (analogy kyseliny listové), purinová analoga či pyrimidinové antimetabolity (Klener et al., 2010).

Cytostatika s genotoxickým účinkem jsou např. alkylační cytostatika nebo platinové deriváty (cisplatina) a interkalační látky. Tyto látky působí toxicky na genom a narušují tak DNA. Účinkem těchto látek dochází k narušení procesů uvnitř buňky jako je reparace DNA, přenos signálů, buněčné dělení či apoptóza. Mezi takové léčebné přípravky patří např. bleomycin, voreloxin nebo amonafid a další (Klener et al., 2010; Hofmanová, 2013; Tomášek et al., 2015).

Antimitotika působí jako inhibitory mitózy. Tyto látky zabraňují dělení buňky, a to převážně poškozením cytoskeletárních struktur nebo zablokováním enzymů, které jsou nutné pro správný průběh mitózy. Jako antimitotika se používají rostlinné alkaloidy, inhibitory aurora kináz a deriváty epotilonu. Deriváty epotilonu získáváme izolací z půdní bakterie *Sorangium cellulosum*. Například ixabepilon byl jako první schválen k léčbě metastatického karcinomu prsu. (Klener et al., 2010; Tomášek et al., 2015).

1.1.5.3.2 Epigenetická chemoterapeutika

Mezi epigenetická cytostatika patří např. inhibitory DNA metyl-transferáz. Metylace je jedním z mechanismů kontroly genové exprese. Hypermethylace tumor supresorových genů má za následek utlumení jejich transkripce. Utlumením transkripce vybraných genů může docházet ke znemožnění oprav genetických chyb, k deregulaci průchodu buněčným cyklem, poruchám metabolismu či vzniku prekancerózní transformace.

Dalším kontrolním mechanismem je acetylace histonů. Ta vede k rozvolnění heterochromatinu na euchromatin. Deacetylací histonů dochází ke kondenzaci chromatinu do tzv. heterochromatinu. V této podobě není průchod transkripčních faktorů umožněn. V nádorových buňkách převažuje mechanismus deacetylace. Inhibitory histon deacetyláz mají široké spektrum účinku. Mezi ně patří hlavně navození apoptózy a diferenciace, zástava buněčného cyklu a další (Klener et al.,2010).

1.1.5.4 Biologická (cílená) léčba

Principem účinku biologické léčby je cílené zaměření proti definovaným markerům nádorových buněk. Výhodou cílené léčby je její účinnost pouze v místě nádoru s minimálním poškozením okolních buněk a většinou s malým spektrem celkových nežádoucích účinků (ČSO ČSL JEP, © 2017).

1.1.5.4.1 Hormonální léčba

Závislost vzniku nádorového onemocnění na produkci hormonů byla objevena již v 19.století. Nejvýznamnější byl však objev estrogenového receptoru jako prediktivního markeru odpovědi na hormonální léčbu. Pomocí různých způsobů inhibice nebo zablokování funkce orgánu produkujících hormony snížíme jejich produkci (Abrahámová, 2008).

Takovou léčebnou metodou je např. hormonální ablace, což je odstranění orgánu produkujícího hormony nebo eliminace jeho funkce (chirurgická nebo radiační ovarektomie, zablokování produkce hormonu pomocí léčiv apod.) (Abrahámová, 2008).

Kompetitivní inhibice slouží k zablokování přenosu signálu na receptor (Abrahámová, 2008). Například antiandrogeny blokují vazbu testosteronu a dihydrotestosteronu na buněčné receptory. Steroidní antiandrogeny, odvozené od gestagenů, byly postupně nahrazeny účinnějšími nesteroidními antiandrogeny (Klener et al., 2010). Antiestrogeny obsazují estrogenové a progesteronové receptory. Tím zabrání navázání estrogenů. Komplex antiestrogenu s estrogenovým receptorem pak nemá stimulační účinky na růst a proliferaci buněk. Nejčastěji užívaným lékem je tamoxifen.

Tamoxifen však není čistě antiestrogenním léčivem, neboť jeho účinek je duální. V některých orgánech má tamoxifen estrogenní a v jiných antiestrogenní účinek. Tamoxifen zabraňuje dělení hormonálně dependentních buněk, indukuje apoptózu a snižuje riziko osteoporózy. Tento lék je účinný jak u žen před menopauzou, tak u postmenopauzálních žen. Nejvyšší účinek má u nádorů s pozitivitou estrogenových i progesteronových receptorů. Užívání tamoxifenu navozuje u pacientek stav podobný menopauze. Tamoxifen s sebou přináší v menší míře i nežádoucí účinky, ve většině případů je však snášen dobře. Mohou to být gastrointestinální obtíže, suché sliznice, otoky a zadržování tekutin. Vzácně se mohou vyskytnout deprese, trombocytopenie, úbytek váhy a další. Dalším léčivem používaným k léčbě metastatického karcinomu prsu je např. fulvestrant (Petráková et al., 2011).

Možností hormonální léčby je i inhibice enzymů řídících syntézu hormonů (Abrahámová, 2008). Glukokortikoidy zasahují do krvetvorby, kardiovaskulárního a muskuloskeletálního systému, imunitního systému, centrální nervové soustavy a jiné. Glukokortikoidy také působí protizánětlivě. Účinkem glukokortikoidů dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin a indukci programované buněčné smrti (Klener et al., 2010). U postmenopauzálních žen je zdrojem estrogenu přeměna testosteronu na estradiol a androstendiolu na estron. K této proměně slouží aromatáza. Aromatáza je enzym, který se nachází v periferních tkáních. Inhibicí aromatáz této přeměně zabráníme a dojde tak ke snížení hladiny estrogenu v nádorových buňkách. Takovými léky jsou například exemestan, anastrozol a letrozol (Klener et al., 2010; Petráková et al., 2011).

Hormonální terapie využívá také tzv. aditivní blokády, čímž docílíme vyřazení vazby na receptor (Abrahámová, 2008). K aditivní blokádě se používají gestageny, které se váží na progesteronové receptory. Tím sníží syntézu androgenních a estrogenních receptorů v periferních tkáních. To způsobí pokles koncentrace estrogenu v nádorové tkáni. V klinické praxi se používají látky megestrolacetát a medroxyprogesteronacetát (Petráková et al, 2011).

1.1.5.4.2 Monoklonální protilátky (MoAb)

V současnosti se v při léčbě nádorových onemocnění uplatňují i monoklonální protilátky. Ty jsou namířeny proti antigenům (Ag) na povrchu nádorových buněk. Jejich účinek je ovlivněn homogenitou Ag a mírou jeho exprese. Nejčastějšími cílovými Ag jsou membránové proteiny, adhezivní molekuly, receptory, růstové faktory a další. MoAb vznikly fúzí jednoho klonu B-lymfocytů, produkujících specifickou protilátku, s nesmrtelnými nádorovými buňkami. Touto fúzí vzniká hybridom. MoAb se získávají stimulací myšího imunitního systému specifickými Ag. Myší protilátky ale lidský organismus rozezná jako cizí a vyvolají v lidském organismu imunitní reakci proti těmto protilátkám. Humanizované protilátky naproti tomu obsahují malou část myšího imunoglobulinu, která se váže na Ag na povrchu nádorových buněk a zbytek molekuly je lidské (Halámková et al., 2011).

První schválenou monoklonální protilátkou k léčbě solidních nádorů byl trastuzumab. Trastuzumab (Herceptin) se řadí mezi inhibitory receptorů pro růstové faktory. Je to humanizovaná MoAb třídy IgG. Účinek trastuzumabu je namířen proti receptoru HER2/neu. Zablokováním HER2 receptoru trastuzumabem dochází k zastavení přenosu signálu v signální kaskádě a tím i proliferace buněk. Trastuzumab má také antiangiogenní účinky. Je indikován pacientkám s karcinomem prsu po prokázání exprese anebo vysoké amplifikace HER2/neu Mezi závažné nežádoucí účinky trastuzumabu patří hlavně kardiotoxicita, dále jsou to průjmy, nevolnosti, zvracení a další (Halámková et al., 2011; Hajdůch et al., 2012; Vyzula et al., 2017).

1.1.5.4.3 Antiangiogenní léčba

Přímo cílená antiangiogenní léčba je zaměřena na tvorbu cév, které nádor vyživují a jejichž tvorba se zvyšuje s růstem nádoru. Jakmile nádor dosáhne určité velikosti, je nutné zajistit přísun kyslík. Z tohoto důvodu nádor začne produkovat vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Ten působí na endoteliální buňky v cévách a začnou se tvořit nové vyživující cévy. Při použití antiangiogenní léčby zamezíme tvorbě nových kapilár a zpomalíme, nebo úplně zastavíme nádorový růst. Mezi angiogenní léčiva patří např. bevacizumab či sorafenib. Tato léčba však tlumí angiogenezi v celém organismu, a tak se i v místě potřeby tvoří nové cévy pomaleji. Antiangiogenní účinek má také např. monoklonální protilátka bevacizumab. Tento lék zabraňuje interakci VEGF s tyrosinkinázovými receptory VEGFR1/2. Používá se při léčbě metastatického karcinomu prsu, rekta, tlustého střeva a plic (Halámková et al., 2011; ČOS ČLS JEP, © 2017).

1.1.5.4.4 Diferenciační léčba

Diferenciace je v buňkách řízena pomocí transkripčních faktorů např. RARA, AMPL1, PU1 či GATA1. Ty reagují na signály z okolí buňky a mění expresi cílových genů a vyzrávání buňky. U nádorových buněk dochází k poškození těchto genů a buňky tak zůstávají nediferencované, díky čemuž neztrácí schopnost proliferace. Podstatou diferenciační léčby je pomocí farmak přinutit nádorové buňky k diferenciaci (vyzrávání buňky), čímž se snižuje jejich schopnost dalšího dělení a sebeobnovy. Mezi taková léčiva patří např. bexaroten a tretinoin. Přesné účinky bexarotenu nejsou doposud známy. Tretinoin degraduje proteiny vzniklé z poškozených genů. Dochází k obnovení transkripční aktivity retinoidních receptorů v buňce, indukci diferenciace a inhibici proliferace nádorových buněk. (Klener et al., 2010; ČOS ČLS JEP, © 2017).

1.1.5.4.5 Inhibitory proteazomu

Biologická léčba využívá také inhibitoru proteazomu. Proteazom je buněčná organela sloužící k odbourání signálních molekul, které již signál předaly a mají být zničeny (ČOS ČLS JEP, © 2017). Proteazom reaguje pouze s proteiny, které obsahují specifickou sekvenci aminokyselin nebo byly označeny polyubikvitinovým řetězcem.

Inhibitory proteazomu brání odbourávání některých proteinů, které by za normálních okolností byly po předání určitého signálu zničeny. K inhibici funkce proteazomu stačí zablokovat pouze jednu ze tří proteolytických podjednotek a to β5. V buňce tak nastane signální chaos a zaniká. Takovým lékem byl jako první bortezomid. Ten však s sebou přinášel spoustu nežádoucích účinků, a tak se později vyvinuly další farmaka s vyšší účinností a menším negativním dopadem na náš organismus. A to Carfilzomid a Marizomid (Ševčíková et al., 2012).

1.1.5.4.6 Inhibitory tyrosinkinázy

Inhibitory tyrosinkinázy zabraňují přenosu signálů do buňky. Buňka ze svého okolí přijímá signály pomocí receptorů na svém povrchu. V případě, že receptor přijme z okolí buňky signál, dochází k aktivaci enzymu tyrosinkinázy na vnitrobuněčné straně receptoru a signál je předán dále do buňky. Buňka, která nedostává signály, přestává růst nebo zaniká. Takovými léčivy jsou erlotinib, lapatinib a verumafenib (Halámková et al., 2011).

Lapatinib (Tyverb) je indikován u pacientek s pokročilým nebo metastatickým karcinomem prsu, u kterého selhala léčba pomocí trastuzumabu. Lapatinib je inhibitorem ATPázy tyrosinkináz EGFR a HER2. Tím zabraňuje vlastní aktivaci receptorů. U léčby lapatinibem se vyskytují nežádoucí účinky jako nauzea, průjem, kožní vyrážky, hepatotoxické účinky a další (Halámková et al., 2011).

1.1.5.4.7 Imunoterapie

Jednou z hlavních rolí imunitního systému je eliminace transformovaných buněk předním, než vytvoří nádorovou masu. Imunoterapie má za cíl zaktivizovat složky imunitního systému k boji proti nádorovým buňkám. Oproti radioterapii a chemoterapii má imunoterapie tu výhodu, že ničí nádorové buňky vysoce selektivně, ve většině případu nezávisle na fázi buněčného cyklu (Klener et al., 2010).

Pomocí různých látek můžeme stimulovat nespecifickou stimulací imunitního systému. Význam imunitní reakce je dokladován i četnými pokusy o její zvýšení. Např. aplikace bakteriální suspenze měla v místě nádoru vyvolat zánětlivou odpověď a následně vést

k eliminaci nádorových buněk. Protože však žádná z všeobecně uznávaných prací nepotvrdila léčebné účinky, od většiny těchto postupů se odstoupilo (Klener et al., 2010).

Pasivní (adoptivní) imunoterapie využívá stimulace buněk LAK (*Lymphokine Activated Killers*) a TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*). LAK získáváme odběrem T-lymfocytů a NK buněk (*natural killers*) z těla pacienta. Ty jsou *in vitro* stimulovány pomocí cytokinů a takto stimulované buňky vráceny zpět do krevního oběhu pacienta. Ve většině případů bylo popsáno alespoň zpomalení růstu nádoru. TIL jsou lymfocyty odebrané přímo z nádoru, ale jejich účinek je utlumený nádorem, který neposkytuje dostatečné kostimulační signály. Opět se tyto buňky stimulují in vitro pomocí cytokinů a vrátí se do těla pacienta (Klener et al.,2010).

Velmi nadějná se zdá být imunoterapie pomocí dendritických buněk. Dendritické buňky jsou profesionální antigen prezentující buňky (APC), které na svém povrchu předkládají specifický antigen T-lymfocytům. In vitro lze z monocytů vypěstovat velké množství dendritických buněk, které následně kultivujeme s nádorovými Ag. Následně se takové dendritické buňky vpraví pacientovi do těla a stimulují T-lymfocyty k protinádorové odpovědi (Klener et al., 2010).

Nádorové vakcíny patří mezi metody aktivní imunoterapie. Cílem nádorových vakcín je aktivovat cytotoxické T-lymfocyty, zvýšení exprese nádorových Ag a kostimulačních molekul. Z bakteriálních plasmidů jsou tvořeny DNA vakcíny. Do plasmidu je zaveden gen pro nádorový Ag nebo gen jehož produkty mají imunomodulační či kostimulační účinky. Vakcíny na bázi nádorových buněk jsou tvořeny nemodifikovanými usmrcenými nádorovými buňkami, které jsou vystaveny interferonu γ. Ten zvyšuje expresi MHC molekul. V klinických testech se u karcinomu prsu osvědčily vakcíny na bázi dendritických buněk, a to vakcína lapuleucel-T (Neuvenge). Tato vakcína obsahuje fúzní protein obsahující sekvence ERBB2/HER2/neu (Klener et al., 2010).

V imunoterapii se využívá také účinku cytokinů. Cytokiny jsou látky polypeptidové povahy a zahrnují interferony, interleukiny, růstové faktory, *death* ligandy a další. Jejich

účinky jsou pleiotropní a často se cytokiny ovlivňují navzájem a vytváří tak komplikovanou síť signálů. Interferony (INF) mají především antivirové, imunomodulační a antiproliferační účinky. Interleukiny (IL) mají pleiotropní účinky. Např. IL-2 stimuluje proliferaci T-lymfocytů a indukuje sekreci dalších cytokinů. IL-6 stimuluje růst a diferenciaci lymfocytů a IL-12 stimuluje aktivaci NK buněk, diferenciaci T-lymfocytů a podporuje produkci INFγ. Růstové faktory mají význam především pro obnovu krvetvorby po onkologické léčbě. SCF (*stem cell factor)* podporuje proliferaci pluripotentních krvetvorných buněk., GM-CSF je faktor stimulující diferenciaci granulocytů a makrofágů a např. erytropoetin je růstový faktor pro tvorbu erytrocytů (Klener et al., 2010).

1.2 Karcinom prsu

Karcinom prsu je maligní onemocnění vznikající z epiteliálních buněk mléčné žlázy. Existují různé typy nádorů prsu, které se liší svými vlastnostmi a aktivitou (Adam et al., 2004; Petráková et al., 2010).

Geneticky podmíněné karcinomy prsu, tzv. hereditární karcinomy, jsou nejčastěji způsobeny mutacemi v tumor supresorových genech BRCA1, nebo BRCA2 a představují přibližně 10-15 % všech ca. prsu a jsou často doprovázeny ca. ovárií. Geny BRCA1 a 2 se zúčastňují opravy DNA poškozené zářením, volnými radikály, oxidativním stresem apod., či homologní rekombinace, regulaci transkripce a buněčného cyklu. V případě jejich mutací hrozí vysoké riziko vzniku karcinomu prsu, které se pohybuje okolo 85 %, následované karcinomem ovárií. Dědičný karcinom prsu postihuje nejčastěji ženy do 35 let věku a obyčejně se jedná o tzv. „triple negativní" pacientky, tj. s negativními ER, PR i HER2 receptory. Z tohoto důvodu zůstávají u této skupiny pacientek léčebné možnosti omezené, především na chirurgické preventivní zákroky (Altaner, 2008; Petráková et al., 2010; Foretová et al., 2011.; Foretová et al., 2014).

Převážná část ca. prsu však patří do skupiny tzv. sporadických nádorů, tj. nádorů, v jejichž případě se nachází aberace výhradně v nádorové tkáni.

1.2.1 Rozdělení a léčba karcinomu prsu

Karcinomy prsu dělíme na karcinomy *in situ* a invazivní karcinomy. U duktálního carcinomu *in situ* (DCIS) a lobulárního carcinomu *in situ* (LCIS) se běžně nepoužívá k léčbě chemoterapie a jen ve výjimečných případech se přistupuje k indikaci hormonální terapie tamoxifenem (Vyzula et al., 2017).

Karcinomy prsu dále dělíme podle exprimace estrogenových receptorů (ER) a progesteronových receptorů (PR). Tyto hormonální receptory jsou fyziologicky přítomny ve zdravé tkáni. U karcinomu prsu může docházet k nadměrné expresi receptorů, čímž se nádor stává závislým na regulaci estrogenem a progesteronem. (Ryška, 2014).

Kromě statusu ER a PR hodnotíme u každého nově diagnostikovaného karcinomu prsu expresi HER2. Karcinomy prsu, u nichž je prokázána amplifikace onkoproteinu HER2/neu tvoří 15-25 % ze všech nádorů prsu. Onkogen HER2 je lokalizován na chromozomu 17. Tento gen kóduje transmembránový receptor patřící mezi receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR). Ve fyziologické buňce vytváří Her-2 heretodimer s jiným členem HER rodiny. HER1 (EGFR), HER3 či HER4. Po navázání růstového faktoru se tento heterodimer aktivuje. Při zvýšené expresi HER2 však dochází ke vzniku homodimerů a takovýto receptor je aktivní i bez růstového faktoru. Z tohoto důvodu, jeho aktivace vede ke zvýšené proliferaci, nádor velmi rychle roste a metastazuje. Tato skupina pacientek proto patřila mezi pacientky s nejhorší prognózou. Aplikací biologické léčby (trastuzumab, lapatinib) je dosahováno blokace tohoto receptoru a pacientky s amplifikací Her-2 se tak zařadily mezi nejlépe léčitelnou skupinu ca. mammy. Ke stanovení se v praxi nejvíce používá imunohistochemie a fluorescenční *in situ* hybridizace. Imunohistochemie slouží jako screening HER2 a hraniční případy jsou ověřovány pomocí FISH (Winer et al., 2011; Drábek et al., 2012; Pala et al., 2015).

Luminální karcinomy A se vyznačují pozitivní expresí ER/PR a nenacházíme u nich zvýšenou expresi onkogenu HER2. Takové nádory mají nižší grade, a tak i příznivější

prognózu. Nádorové buňky vykazují nižší proliferační aktivitu. U postmenopauzálních pacientek se tyto nádory léčí pomocí hormonální terapie tamoxifenem nebo inhibitory aromatáz. Pouze v případě rychlé progrese onemocnění nebo rizika viscerální krize přecházíme k léčbě pomocí chemoterapie (Heroková et al., 2017; Vyzula et al., 2017).

Luminální karcinomy B mají zpravidla vyšší grade a horší průběh. Tyto karcinomy vykazují expresi estrogenových a progesteronových receptorů a amplifikaci HER2. Amplifikace tohoto genu má za následek zvýšenou proliferaci a agresivitu nádoru (Heroková et al., © 2017). Luminální karcinom B dobře odpovídá na chemoterapii, která však není indikována ve všech případech nádorů tohoto typu. Většina nádorů s pozitivními ER/PR a HER2 se léčí kombinací trastuzumabu a hormonální terapie nebo trastuzumabu s chemoterapií. V případě kontraindikací k léčbě anti-HER2 a přítomnosti dalších onemocnění, je možné pacientku léčit pouze hormonální terapií (Vyzula et al., 2017).

Karcinomy, které vykazují overexpresi (zvýšenou expresi) nebo amplifikací onkogenu HER2, bez zvýšené exprese hormonálních receptorů, mají méně příznivý klinický průběh (Heroková et al., © 2017). Takové nádory léčíme pomocí trastuzumabu po dobu 12 měsíců či do progrese. U pacientek s negativním nebo nízkým ER je vhodná indikace neoadjuvantní terapie. V pozdějším stádiu onemocnění se doporučuje indikace chemoterapie. V první linii léčby Her2 pozitivních nádorů by měla být pacientkám podávána kombinace trastuzumab, pertuzumab a taxan. V případě selhání této léčby je možné pacientku léčit pomocí trastuzumab emtansinu (t-DM1) (Vyzula et al., 2017).

U luminálních karcinomů a HER2 pozitivních karcinomů se používá adjuvantní hormonální léčba pomocí tamoxifenu po dobu 5 let. U pacientek do 35 let je možné přidat k chemoterapii adjuvantní ovariální supresi. Nejčastěji používanými chemoterapeutiky jsou antracykliny a taxany. U postmenopauzálních pacientek je možná také kombinace tamoxifenu a inhibitoru aromatáz (Vyzula et al., 2017).

Bazální nebo také triple negativní karcinom (TNBC) je nádor bez pozitivních hormonálních receptorů i bez amplifikace onkogenu HER2. 10-20 % všech

diagnostikovaných karcinomů prsu jsou právě TNBC. Ačkoli jejich výskyt není častý, velké zastoupení mají v případě metastatických karcinomů a úmrtí na karcinom prsu. Jedná se o bazální nádory, které jsou vysoce agresivní, doprovázené špatnou prognózou. Vykazují amplifikaci genu EGFR a často vznikají u žen mladšího věku, u nichž byla prokázána mutace v genu BRCA1/2. (Petráková et al.,2010, Heroková et al., © 2017). U tohoto typu nádorů je možné podání chemoterapie na bázi platiny (Vyzula et al., 2017).

1.2.2 Diagnostika karcinomu prsu

1.2.2.1 Samovyšetření

Samovyšetření prsou by si měla provádět každá žena, a to jednou měsíčně. Vyšetření si provádí žena nejprve vleže a poté ve stoje. Pokud zaznamená nějaký z příznaků, měla by ihned navštívit svého lékaře. Takovými příznaky jsou změna velikosti a tvaru prsu, vtažení kůže nebo bradavky, edém a erytrém kůže, bolest prsu, výtok z bradavky, bulka v prsu nebo v podpaží. Většina lézí se i přes samovyšetřování zjistí spíše preventivními vyšetřeními pomocí zobrazovacích metod (Petráková et al., 2010; Petráková et al., 2014).

1.2.2.2 Vyšetření pomocí zobrazovacích metod

Zobrazovací metody patří mezi neinvazivní vyšetření. Jednou z takových metod je mamografie. Mamografie využívá rentgenové měkké záření. Cílem tohoto vyšetření je vyhledávat minimální nebo nehmatné změny v prsu u žen, které zatím nemají žádné příznaky. V obraze se hodnotí stín žlázy, přímé a nepřímé známky patologického ložiska v prsu a uzliny v zadní části podpaží (Petráková et al., 2010).

Další zobrazovací metodou je ultrazvukové vyšetření (ultrasonografie). Toto vyšetření se používá pro vyšetření mladých žen, u kterých je žláza pro mamografii příliš nepřehledná. Dále se používá jako doplňující vyšetření k mamografii nebo k hodnocení pooperačních změn a vyhledání recidiv (Petráková et al., 2010).

Dalším vyšetřením je magnetická rezonance. Tato metoda je ze všech uvedených nejvíce sensitivní pro zobrazení invazivního karcinomu prsu. Nevýhodou je naopak její nízká specifita. Tato metoda nepatří mezi běžná vyšetření. Provádí se pouze u žen s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu, pro stanovení přesného rozsahu nádoru před operací, pro monitoring efektu podpůrné chemoterapie a při nálezu metastáz v axilárních uzlinách při neznámé primární lokalizaci nádoru (Petráková et al., 2010).

Jako doplňující metody se v diagnostice karcinomu prsu používají v menší míře i další zobrazovací metody jako např. pozitronová emisní tomografie k vyhledávání přídatných ložisek a postižených uzlin. Dále se někdy využívá výpočetní tomografie ke zjištění, zda se patologický proces nerozšiřuje do hrudní dutiny (Petráková et al., 2010).

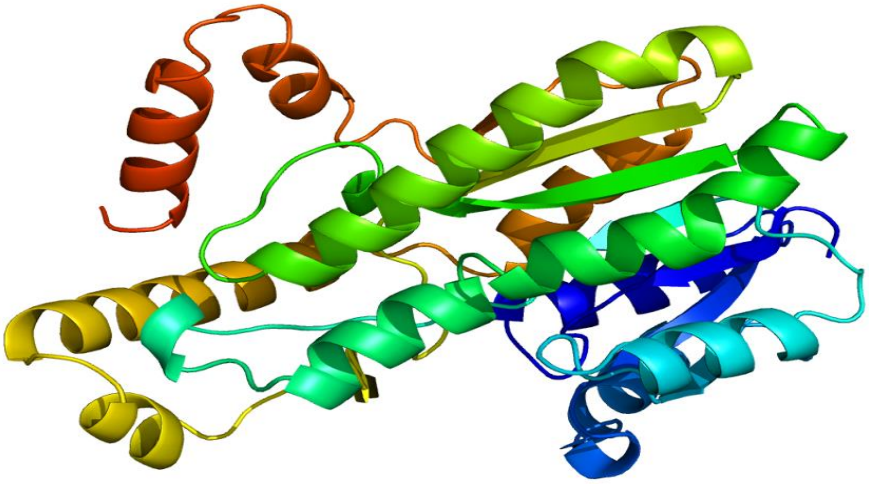
1.2.2.3 Invazivní metody

V případě pozitivního nálezu (zobrazovací metody) je nutné provést histologické vyšetření. Mezi invazivní metody, používající se při stanovení diagnózy karcinomu prsu, patří aspirace tenkou jehlou (FNA). Při tomto zákroku je do injekční stříkačky podtlakem odebráno několik málo buněk a jejich shluků, které se poté cytologicky vyšetří. Význam této metody však již poklesl a je používána zejména pro aspiraci tekutinových útvarů v prsu. Více využívaná je tzv. core – cut biopsie neboli tkáňová punkční biopsie. Při této biopsii se odebere pacientce pod ultrazvukovou kontrolou pomocí speciální jehly válec tkáně se zachovanou strukturou. Takto odebraný vzorek je následně odeslán na komplexní histologické vyšetření. V poslední době klesá využívání otevřené chirurgické biopsie. Tento postup se volí pouze v případě, že ostatní metody selhaly (Petráková et al., 2010; Coufal et al., 2011).

1.3 *Gen HSD17B1 (17q21.2; hydroxysteroid 17 - beta dehydrogenase 1)*

17β – hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1 – produkt genu HSD17B1 (E2DH, HSD17, EDHB17, EDH17B2, SDR28C1, 17 - beta-HSD, 20-alpha-HSD) byla objevena již na konci 40. let 20. století (He et al., 2016). Patří do rodiny 17β – hydroxysteroid dehydrogenáz. Gen HSD17B1 je lokalizován na q rameni chromozomu 17, v blízkosti genu BRCA1. V tomto místě dochází často k různým genetickým aberacím. HSD17B1

má N-koncovou doménu dehydrogenázy s krátkým řetězcem s vazebným místem pro kofaktor a úzkou, hydrofobní C-terminální doménu s vazebným místem pro steroidní substrát (obr.2) (Gunnarsson et al., 2003; Pubmed, 2017).

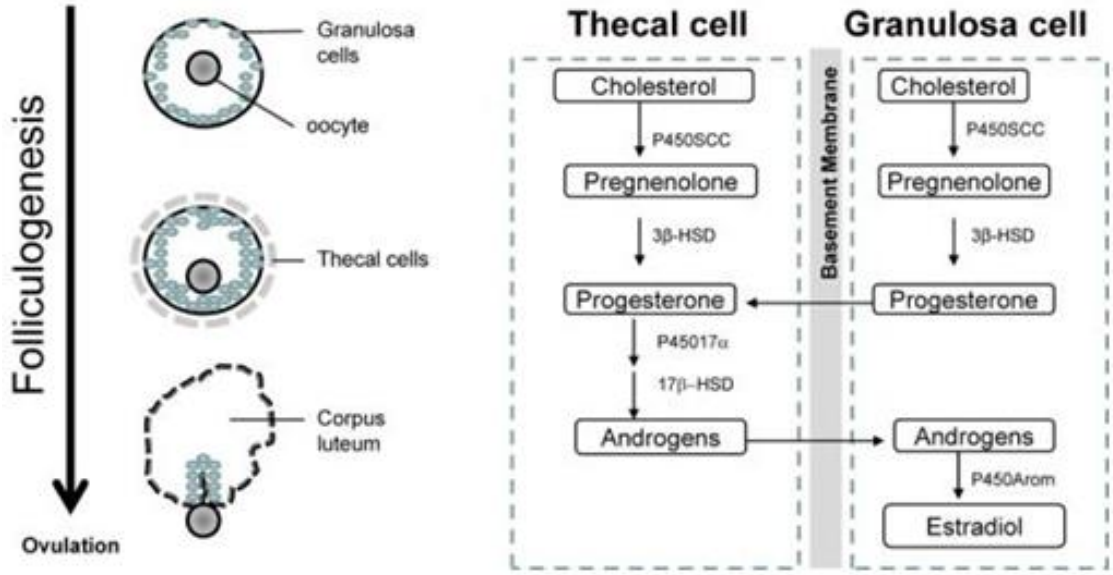


Obr.2: Struktura genu HSD17B1. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/HSD17B1

17β-HSD1 má dvojí funkci. Za prvé, inaktivuje androgen dihydrotestosteron (DHT). Za druhé, katalyzuje poslední krok aktivace 17β-estradiolu (E2), estrogenního enzymu, který stimuluje proliferaci nádorových buněk karcinomu prsu. Syntéza estrogenu u premenopauzálních žen probíhá především ve vaječnících a placentě. V menší míře je produkován i v játrech, srdci, mozku a tukové tkáni. Takové tkáně jsou důležité pro produkci estrogenů hlavně u postmenopausálních žen. Fyziologicky jsou u žen produkovány tři hlavní typy estrogenů a to estron (E1), estradiol (E2) a estriol (E3) (Cui et al., 2013).

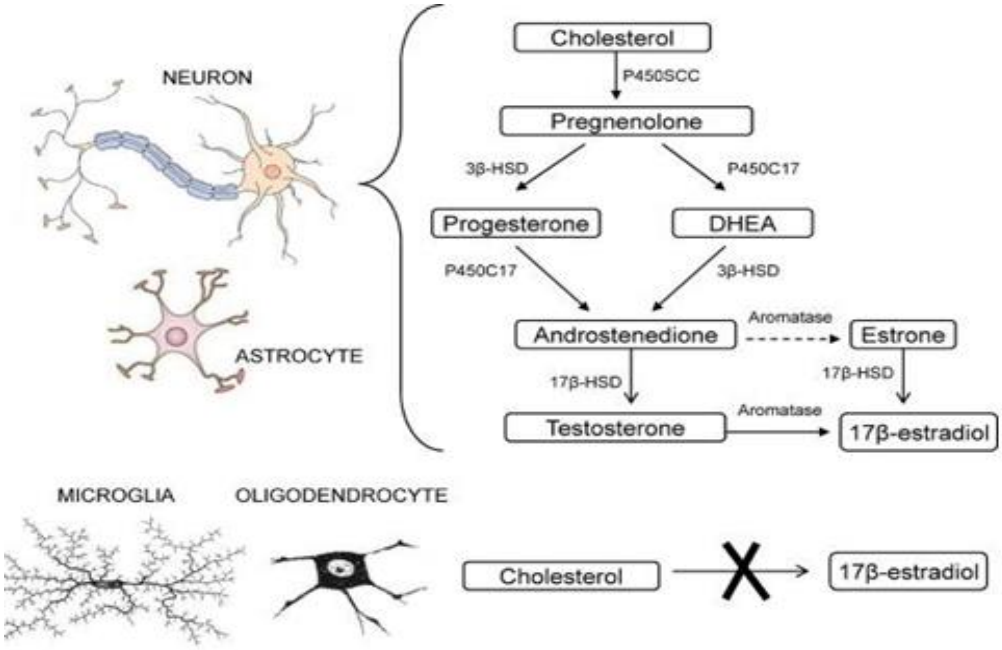
Syntéza estradiolu může probíhat přes aromatázu nebo sulfatázu. V buňkách karcinomu prsu podmiňuje tuto biosyntézu 17β-hydroxysteroid dehydrogenáza 1 reakcí s nikotinamidadenindinukleotidfosfátem (NADP) jako kofaktoru. Biosyntézu estrogenu reguluje luteinizační hormon (LH). Všechny jsou syntetizovány oxidativním rozštěpením a hydroxylacemi řetězce cholesterolu. Následně dochází k dehydrataci a získáváme produkt prognenolon. Dále probíhá změna na progesteron, v thekálních buňkách probíhá konverze na androgen. Ten je transportován do buněk granulózy,

kde dochází k poslednímu kroku konverze na estradiol (obr.3). Aktivní estradiol se potom váže na estrogenové receptory v buňkách. (Cui et al., 2013).



Obr.3: Syntéza estradiolu v ováriích. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595330/

V mozku při syntéze estradiolu vzniká z prognenolonu progesteron nebo dehydroepiandrosteron (DHEA). Účinkem enzymů 3β-HSD a P450C17 dochází ke konverzi na androstendion, dále se mění estron nebo testosteron. Nakonec pomocí enzymu 17β-HSD1 dochází ke konverzi z estronu na 17β-estradiol nebo pomocí aromatázy z testosteronu na 17β-estradiol (obr.4). Exprese genu pro aromatázu je řízena folikuly stimulujícím hormonem (FSH) (Aka et al., 2012; Koolman et al, 2012).



Obr.4: Syntéza estradiolu v mozku. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC

Bylo také prokázáno na buněčné linii CMF-7, že nadměrná exprese HSD17B1 vede ke zvýšení exprese i ostatních genů řídících syntézu, aktivaci a inaktivaci E2. V této studii bylo také prokázáno, že gen HSD17B1 silně ovlivňuje expresi metastáz inhibujícího faktoru nm23-H1. Všechny tyto skutečnosti jsou důležité v poznávání mechanismů vzniku estrogen – dependentních karcinomů (Aka et al., 2012).

V posledních letech se objevují studie, zabývající se právě inhibicí 17β-HSD1, jako možným způsobem léčby karcinomu prsu. Inhibicí 17β-HSD1 by se snížila hladina aktivního estradiolu a také by se snížila inaktivace DHT, který má na rozdíl od estradiolu antiproliferativní účinek. Podle některých studií inhibice HSD17B1 vedla, u jiných živočišných druhů než u člověka, ke smrštění nádoru. (Gunnarsson et al., 2003; Aka et al., 2009).

Několik studií již prokázalo schopnost některých chemických látek, potlačit HSD17B1. Jako nejúčinnější sloučenina se jeví 3-[5-(4-hydroxyfenyl)-1,3-oxazol-2-yl] fenol (Bey

et al., 2008). Další nadějné inhibitory patří do skupiny bicyklických substituovaných hydroxyfenylmetanonů (Oster et al., 2011).

Allesandro Sparado a další vědci se pokoušeli ve svém výzkumu objevit další inhibitory 17β-HSD1 odlišné od výše uvedených inhibitorů, svojí nesteroidní strukturou. Pomocí simulačních počítačových metod se pokoušeli různými chemickými sloučeninami zasáhnout do struktury 17β-HSD1. Objevili tak novou skupinu inhibitorů 17β-HSD1 a to hydroxybenzothiazoly. Jako nejúčinnější z nich se v praxi ukázal [5-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl](3-hydroxyfenyl)metanon (Sparado et al., 2012).

Z těchto důvodů se HSD17B1 jeví jako vhodný potencionální prognosticky-prediktivní marker léčby karcinomu prsu.

2. Cíl práce a hypotézy

V bakalářské práci jsme se zaměřili přípravu a ověření fluorescenčně přímo značené sondy HSD17B1, jejíž využití by mohlo ovlivnit léčbu pacientů s karcinomem prsu. Tato sonda prozatím není komerčně dostupná. Její přípravu jsme zavedli izolací plasmidové DNA z *E.coli* a následným fluorescenčním značením. Vazebnou oblast sondy jsme následně verifikovali na chromozomálních preparátech a kvalitu hybridizace na souboru pacientek s ca. prsu.

U 50 pacientských vzorků jsme za použití připravené sondy vyšetřili metodou fluorescenční *in situ* hybridizace status genu HSD17B1, společně s počtem centromer chromozomu 17. U těchto pacientek byl současně vyšetřen status genu HER2, ležícího na stejném rameni chromozomu 17 (17q12).

Soubor vybraných pacientů náleží do pilotní studie, jejímž úkolem je stanovit status genu HSD17B1 a jeho význam pro prognózu či predikci léčby, V navazující práce bude soubor rozšířen o další pacienty a dále zkoumán předpokládaný vztah mezi amplifikací tohoto genu a a biologickými vlastnostmi jednotlivých pacientů (doba přežití bez příznaku nemoci (DFS), odpovídavost na léčbu apod.).

Dle doporučení ASCO/CAP je hranicí (cut off) pro určení amplifikace pro gen HER2 průměrný počet kopií genu na jádro vyšší než 6 nebo poměr HER2/CEP17 vyšší než 2,2, za hraniční je považován průměr 4-6 kopií/jádro, resp. poměr HER2/CEP17 = 1,8-2,2. U některých genů je však za aberaci pokládán i stav s mnohem nižším cut off, např. u EGFR (Varella-Garcia et al., 2009).

Tato práce by mohla tedy rovněž napomoct k určení správného cut offu pro gen HSD17B1, který zatím v žádné publikaci uveden nebyl (ASCO/CAP, 2015).

3. Metody, použité materiály

3.1 Fluorescenční in situ *hybridizace*

FISH patří mezi cytogenetické metody užívané k detekci cytogenetických změn jako jsou translokace, delece, amplifikace či polyzomie. Je založena na komplementárním párování bází vyšetřované DNA a fluorescenčně značené sondy (Trojanec, 2012).

FISH metoda je vysoce citlivá a specifická a je rutinně užívána k detekci cytogenetických změn v prenatální diagnostice, k určení různých vývojových vad a syndromů nebo v onkogenetice k určení cytogenetických změn nádorů, které mohou mít význam pro predikci či prognózu nemoci (Trojanec, 2012).

V onkologii můžeme rovněž FISH využít k detekci cizorodé DNA v buňkách např. pro průkaz sekvencí lidského papilomaviru v buňkách děložního čípku (Fabian et al.,2014).

Alternativou k fluorescenční *in situ* hybridizaci je chromogenní *in situ* hybridizace (CISH), která k detekci používá místo fluoroforu peroxidázu nebo alkalickou fosfatázu. Druhou alternativou je SISH, která využívá k detekci stříbro (Trojanec, 2012). Na podobném principu jako FISH je založena metoda komparativní genomové hybridizace (CGH), která slouží ke zjištění nebalancovaných odchylek mezi genomickými materiály různých genomů (Otová et al., 2012).

3.2 DNA sondy

DNA sonda je přesně definovaný úsek DNA, který je komplementární ke specifickému úseku DNA ve vzorku. Známe tři druhy DNA sond. LSI neboli lokusově specifické sondy (Locus Specific Identifier), které se naváží na vybraný lokus (gen, část chromozomu). Tyto sondy se používají hlavně ke stanovení počtu kopií genů nebo jednotlivých oblastí chromozomů.

Dalším typem sond jsou alfa satelitní sondy. Pomocí těchto sond je možné stanovit počet kopií daného chromozomu (resp. centromer) v jádře buňky, nebo v případě telomerických sond provádět vyšetření počtu telomerických sekvencí.

Třetím typem jsou WCP (Whole Chromosome Painting) neboli celochromozomové nebo také malovací sondy, které hybridizují na celý chromozom nebo jeho rameno. Používají se k detekci strukturální přestavby chromozomů (Fabian et al., 2012).

DNA sondy můžeme značit radioaktivně nebo neradioaktivně, a to enzymaticky nebo chemicky. Radioaktivní značení je starší metoda, která se dnes již nepoužívá. Pro fluorescenční *in situ* hybridizaci můžeme sondy připravovat v laboratoři např. metodou nick – translace, random priming či vhodně designované polymerázové řetězcové reakce (PCR). V dnešní době však existuje spousta firem, které nabízejí již připravené sondy značené fluoresceinem, kumarinem, rhodaminem či jiným vhodným fluorescenčním barvivem.

Sonda i DNA ve vzorku musí být před vlastní hybridizací denaturována s cílem uvolnit dvoušroubovici DNA, aby se na sebe mohly cílové úseky DNA a sondy navázat a zároveň musí být zablokovány repetitivní sekvence (s použitím COT1 DNA apod.). U fluorescenčně značených sond se používá sledování ve fluorescenčním mikroskopu (Michalová, 2004; Koudeláková, 2012).

3.3 *Materiál a přístroje pro fluorescenční značení sondy*

3.3.1 Přístroje a zařízení

Vodní lázeň, centrifuga, pipety, zkumavky, vortex, flowbox, lednice a mrazák, sonikátor, vakuová odparka,

3.3.2 Materiál a reagencie

E. coli (RP11-365D24 a RP11-400F19) transfekovaná plasmidem s inzertem pro gen HSD17B1 a centromerickou oblast chromozomu 17, led, Platinum Bright kit Kreatech (SpectrumOrange ULS dye, 10x koncentrovaný značící pufr, přečišťovací kolony), Cot-1 DNA, 3M octan sodný, 96 % ethanol, hybridizační pufr

3.4 Příprava fluorescenčně značené sondy

3.4.1 Fragmentace plasmidové DNA

1, Do 0,5 ml zkumavek jsme připravili 1,1 µg plasmidové DNA ve 100 µl vody.

2, Naředěnou DNA krátce jsme krátce centrifugovali, nechali 15 minut vychladit na ledu.

3, Zkumavky s naředěnou DNA jsme vložili do sonikátoru, který slouží k rozrušení DNA pomocí ultrazvukových vln.

4, Po ukončení sonikace jsme přenesli zkumavky na vakuovou odparku a nechali roztoky evaporovat na objem 16 µl.

3.4.2 Značení DNA pomocí Bright kitu

1, Fluorofory jsme před použitím krátce zvortexovali.

2, K 1 µg fragmentované DNA v 16 µl vody jsme přidali 2 µl SpectrumOrange ULS dye a 2 µl 10xlabeling solution. Promíchali jsme pipetováním.

3, Inkubovali jsme ve vodní lázni při 85 °C, po dobu 30 minut.

4, Nechali jsme vzorky na ledu po dobu přípravy přečišťovacích kolon. Vzorky, jsme vzhledem k přítomnosti fluorescenčních barviv, chránili před přímým světlem.

3.4.3 Přečištění vzorku pomocí Platinum bright kitu

1, Náplně kolon jsme předem resuspendovali pomocí zvotexování.

2, Z kolony jsme odlomili spodní uzávěr a horní uzávěr mírně povolili.

3, Kolony jsme umístili do zkumavek o objemu 2 ml, zcentrifugovali při 20 000 otáčkách 1 minutu.

4, Zcentrifugovanou kapalinu jsme odstranili.

5, Na kolonu jsme nanesli 300 µl vody a znovu zcentrifugovali při 20 000 otáčkách 1 minutu.

6, Znehodnocenou zkumavku s tekutinou, která do ní protekla, jsme zlikvidovali a kolonu umístili do nové zkumavky o objemu 1,5 ml.

7, Na kolonu jsme nanesli vzorek, který byl do této chvíle umístěn na ledu.

8, Zcentrifugovali jsme vzorek při 20 000 otáčkách 1 minutu.

9, Tekutinu s naznačenou DNA jsme použili pro další kroky.

3.4.4 Přesrážení s cot-1-DNA

1, Ke značené DNA jsme přidali 3 µl 3M octanu sodného o hodnotě pH 5, 10 µl cot-1-DNA a 83 µl 100 % ethanolu.

2, Roztok jsme promíchali převrácením zkumavky.

3, Vzorek jsme nechali po dobu 30 minut inkubovat v -80°C.

4, Zcentrifugovali jsme jej 30 minut při 20 000 otáčkách a 4°C.

5, Ze zkumavky jsme opatrně vylili supernatant a nechali vysušit peletu ve tmě.

6, Značenou DNA jsme resuspendovali v 25 µl hybridizačního pufru, krátce zvortexovali a nechali 5-7 minut inkubovat v termostatu při 37°C.

7, Vazebnou oblast sondy jsme ověřili na chromozomálním preparátu. Sondu uchováváme při – 20°C.

3.5 Materiál a přístroje pro FISH

3.5.1 Přístroje a zařízení

Vodní lázeň, barvící nádobky typu Copplin, termostat, centrifuga a mikrocentrifuga, výhřevná plotýnka, hybridizér, fluorescenční mikroskop, lednice a mrazák

3.5.2 Materiál a reagencie

Formalínem fixované, v parafínu zalité (FFPE) vzorky karcinomů prsu, Xylen, 96 % ethanol, 0,2M HCl, deionizovaná voda, oplachovací pufr, roztok NaSCN, pepsin, NaCl, formaldehyd, 10x PBS, rubber cement (Fixogum), promývací roztok I (0,4x SSC/0,3 % NP 40), promývací roztok II (2x SSC/0,1 % NP 40), barvivo DAPI

3.5.3 Soubor pacientů

Do pilotní studie jsme vybrali soubor 50 pacientek s invazivním duktálním karcinomem. Přednostně jsme vybírali pacientky z Onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, které byly do laboratoře primárně zaslány k vyšetření genu HER2. Věkový průměr vyšetřovaných pacientek činil 60 let.

3.6 Deparafinizace a příprava tkáňového řezu pro fluorescenční **in situ** *hybridizaci*

Jelikož jsou vzorky před nakrájením na tenké řezy uchovávány zalité v parafínovém bloku je nutné před dalším zpracováním odstranit parafín z preparátů a preparáty rehydratovat.

3.6.1 Předpříprava FFPE řezů pro FISH

1, Skla s preparáty jsme inkubovali v xylenu při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.

Tento krok jsme ještě dvakrát zopakovali. Po vyjmutí z xylenu jsme skla osušili přitisknutím hrany skel na savou podložku.

2, Skla jsme inkubovali v 96 % ethanolu při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.

Zopakovali jsme.

3, Preparáty jsme sušili na vyhřívané plotýnce při 49 °C po dobu 5 min.

4, Preparáty jsme inkubovali v roztoku 0,2M HCl po dobu 20 minut.

5, Vložili jsme preparáty do kyvety s deionizovanou vodou na 3 minuty.

6, Preparáty jsme přenesli do oplachovacího pufru, inkubovali jsme 3 minuty.

4, Inkubovali jsme preparáty v roztoku NaSCN vyhřátého na 80 °C po dobu 20 minut.

5, Oplachovali jsme je v kyvetě s deionizovanou vodou 1 minutu.

6, Vložili jsme skla do oplachovacího pufru na 5 minut. Tento krok jsme ještě jednou zopakovali s novým roztokem pufru.

7, Po vyjmutí preparátů z druhé kyvety s oplachovacím pufrem jsme je osušili přitisknutím hrany skel o savou podložku.

8, Inkubovali jsme preparáty v roztoku v proteázy (pepsin v 0,9 % NaCl, pH=2) vyhřátém na 37 °C po dobu 55 minut. Časy se liší dle typu tkáně.

9, Preparáty jsme promyli dvakrát po 5 minutách v oplachovacím pufru.

10, Vysušili jsme preparáty na vyhřívané plotýnce při 49 °C po dobu 5 minut.

11, Preparáty jsme fixovali v 10 % pufrovaném formalínu 10 minut.

12, Promyli jsme preparáty v oplachovacím pufru 5 minut. Tento krok jsme zopakovali s novým roztokem pufru. Preparáty jsme opláchli deionizovanou vodou.

13, Vysušili jsme preparáty na vyhřívané plotýnce při 49 °C po dobu 5 minut.

14, Po usušení byly preparáty připravené pro provedení FISH.

15, Preparáty jsme zkontrolovali ve světelném mikroskopu. Správně by buněčná jádra neměla být příliš rozrušená a vzorek musí obsahovat dobře natrávenou tkáň.

3.7 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

3.7.1 Denaturace a hybridizace

1, Na preparát jsme nanesli roztok sondy s hybridizačním pufrem a překryli krycím sklem.

2, Zamezili jsme odpařování sondy nanesením vhodného rubber cementu (např. Fixogum).

3, Preparáty jsme vložili do hybridizéru, nastavili jsme program pro parafínové řezy: denaturace při 85 °C na 1 minutu a hybridizace při 37 °C přes noc.

3.7.2 Odmytí nenavázané sondy

1, Z preparátu jsme odstranili krycí sklíčko a ponořili jej do promývacího roztoku I (0,4x SSC/0,3 % NP 40) vyhřátého na 73°C. Sklíčko jsme lehce v roztoku protřepávali 3-5 sekund a inkubovali 1 minutu a 45 sekund.

2, Přenesli jsme preparát do promývacího roztoku II (2x SSC/0,1 % NP 40). Opět protřepávali 3-5 sekund a inkubovali po dobu 30 sekund.

3, Krátce jsme preparát opláchli deionizovanou vodou.

4, Lehce jsme jej osušili přitisknutím hrany skla na savou podložku a nechali preparáty volně zaschnout bez přístupu světla.

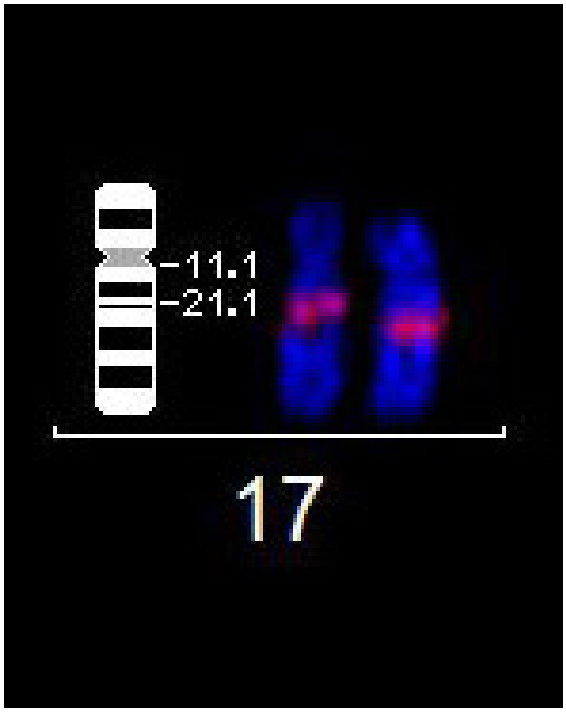
5, Podle velikosti tkáně jsme nanesli 3-10 μl DAPI (podbarví jádra tak, aby je bylo možno sledovat ve fluorescenčním mikroskopu) a překryli preparát krycím sklíčkem. Takto zpracované vzorky jsou připravené k vyhodnocení.

3.8 Vyhodnocení FISH

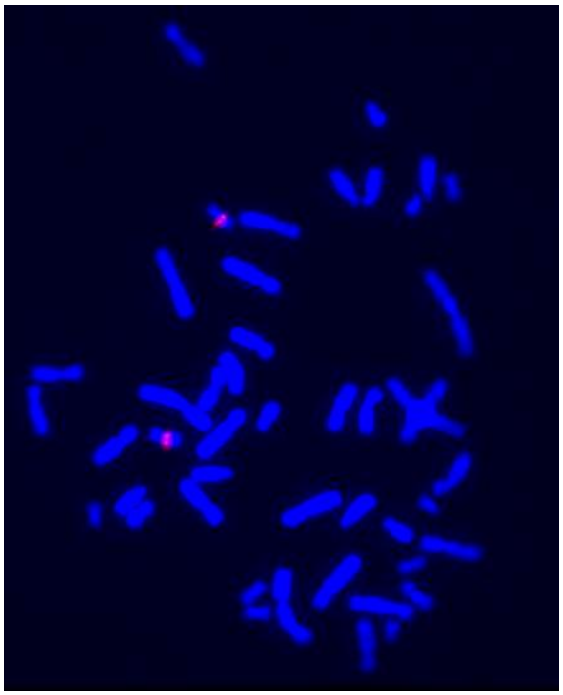
Hodnocení preparátů jsme prováděli ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX-60 s použitím příslušného filtru a imerzního oleje. Počítali jsme signály ve 100 jádrech a vypočítali průměrný počet signálů na jádro.

4. Výsledky

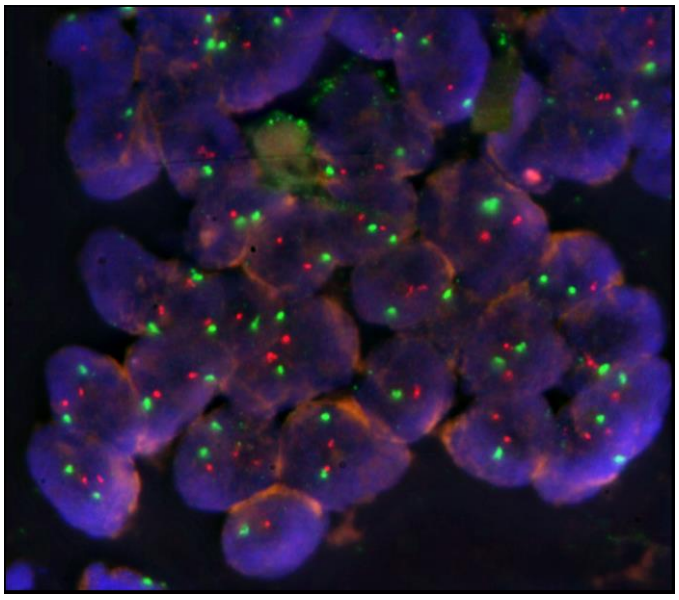
Připravili jsme fluorescenčně přímo značenou lokusově specifickou sondu pro gen HSD17B1, kombinovanou s centromerickou sondou pro oblast chromozomu 17. Vazebnou oblast jsme ověřili na chromozomálním preparátu. Následně jsme vyšetřili 50 vzorků pacientek s ca. prsu pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Ve fluorescenčním mikroskopu jsme zaznamenali počet signálů na jádro ve sto nepřekrývajících se buňkách.



Obr.5: Lokalizace genu HSD17B1 na chromozomu 17. Vazebná oblast sondy odpovídá publikované lokalizaci genu HSD17B1. Zdroj: ÚMTM UP Olomouc



Obr.6: Ověření fluorescenčně značené sondy na chromozomálním preparátu. Na snímku lze pozorovat vysokou specifitu sondy, cross-hybridizace nebyla prokázána Zdroj: ÚMTM UP Olomouc



Obr. 7: Fluorescenční in situ hybridizace u ca. prsu. LSI HSD17B1 (spectrum orange) a CEP 17 (spectrum green). Zdroj: připravená fotografie s použitím MetaSystems, ÚMTM UP Olomouc

Pro každý vzorek jsme následně vypočítali průměrný počet signálů na jádro. Průměrný počet kopií genu HSD17B1 v jádře činil 2,07. Směrodatná odchylka byla 0,27. Všechny výsledky se pohybovaly v rozmezí od 1,49 do 2,79 signálů na jádro. Vypočítaný modus byl 2,16 a medián 2,04. (tab.1).

Tab.1. Hodnoty genu HSD17B1

HSD17B1	
Průměr	2,07
Směrodatná odchylka	0,27
Min	1,49
Max	2,76
Modus	2,16
Medián	2,04
Počet vzorků	50

Zdroj: Vlastní zpracování

U pacientských vzorků jsme dále sledovali amplifikaci genu HER2, počet kopií chromozomu 17 a věk pacientek v době stanovení diagnózy. Polyzomie chromozomu 17 (průměrný počet kopií genu na jádro >2,5) byla přítomna u 28 % (14/50) vzorků. Dle průměrného počtu kopií genu HER2 vykazovalo amplifikaci genu HER2 44 % (22/50) vzorků, 4 % (2/50) výsledků dosahovalo hraničních hodnot a 52 % (27/50) vzorků bylo negativních (tab. 2). Dle poměru HER2/CEP17 bylo pozitivních 44 % (22/50) vzorků, hraničně pozitivní byla 2 % (1/50) výsledků a 54 % (27/50) vzorků bylo negativních (tab.3) (ASCO/CAP).

Tab.2. Rozdělení výsledků dle průměrného počtu kopií HER2/jádro

Průměrný počet kopií genu HER2 na jádro	Počet pacientů	Četnost
Negativní (<4)	26	52 %
Hraničně pozitivní (4-6)	2	4 %
Pozitivní (>6)	22	44 %
Počet	50	100 %

Zdroj: Vlastní zpracování

Tab.3. Rozdělení výsledků dle poměru HER2/CEP17

HER2/CEP17	Počet pacientů	Četnost
Negativní (<1,8)	27	54 %
Hraničně pozitivní (1,8-2,2)	1	2 %
Pozitivní >2,2	22	44 %
Počet	50	100 %

Zdroj: Vlastní zpracování

Dle průměrného počtu signálů na jádro vykazovalo zvýšený počet kopií genu HSD17B1 24 % vzorků (12/50). 66 % (33/50) vzorků se pohybovalo okolo fyziologického počtu kopií genu HSD17B1 na jádro (2). U 10 % (5/50) pacientských vzorků jsme prokázali deleci genu HSD17B1 (tab.4). U 50 % (6/12) mírně navýšených kopií genu byla zároveň přítomna amplifikace genu HER2. U 58 % (7/12) byla přítomna polyzomie chromozomu 17. Pouze v jednom případě (1/50) byl nalezen poměr HSD17B1/CEP17 ≥1,30.

Tab.4. Rozdělení výsledků průměrného počtu kopií HSD17B1 genu na jádro

Průměrný počet kopií genu HSD17B1/jádro	Počet pacientů	Četnost
Delece (<1,8)	5	10 %
Fyziologický stav (1,8-2,2)	33	66 %
Zmnožení (>2,2)	12	24 %
Počet	50	100 %

Zdroj: Vlastní zpracování

Vzorky jsme dále hodnotili podle zastoupení buněk se změněným počtem kopií genu (tab.5). Jako pozitivní jsme označili vzorky s více jak 20 % jader se 3 a více kopiemi genu. 26 % (13/50) vzorků bylo pozitivních. U 46 % byla zároveň přítomná amplifikace genu HER2 a u 62 % (8/13) vzorků byla přítomna polyzomie chromozomu 17 (>2,5 kopií/jádro).

Tab.5. Vzorky nad 20 % se 3 a více kopiemi genu na jádro

Pozitivní nad 20 % jader se 3 a více kopiemi genu v jádře		
CTG	**% jader s 3 a více kopiemi genu/jádro**	**Průměrný počet signálů/jádro**
9994	22 %	2,08
10129	22 %	2,15
10237	46 %	2,59
10438	25 %	2,23
10560	28 %	2,26
11101	48 %	2,56
11110	37 %	2,54
11134	25 %	2,45
11161	23 %	2,33
11178	33 %	2,68
11217	24 %	2,34
11250	31 %	2,76
11287	22 %	2,09

Zdroj: Vlastní zpracování

Vzhledem k tomu, že se gen HSD17B1 nachází na chromozomu 17, přítomná polyzomie navyšuje počet kopií genu HSD17B1 v jádře. Pro rozdělení výsledků jsme si stanovili nízké cut off pro lepší rozlišení již malých změn. Tento tzv. Coloradský systém je používán i při hodnocení EGFR. Podle poměru HSD17B1/CEP17 jsem zjistila, že pouze 2 % (1/50) výsledků bylo amplifikovaných bez přítomnosti amplifikace genu HER2. 26 % (13/50) vzorků bylo delekovaných a 72 % (36/50) vzorků dosahovalo normálních hodnot (tab.6).

Tab.6. Rozdělení výsledků dle poměru HSD17B1/CEP17

HSD17B1/CEP17	Četnosti	Procenta
Delece >0,8	13	26 %
Fyziologický stav 0,8-1,29	36	72 %
Pozitivní >1,3	1	2 %
Počet	50	100 %

Zdroj: Vlastní zpracování

Dále jsme zjišťovali, zda se mění průměrný počet kopií genu HSD17B1 v závislosti na věku pacientek. Průměrný věk pacientek činil 60,1 let s minimem 34 let a maximem 83 let. Pacientky jsme si rozdělili do 4 věkových kategorií. Nejvyšší průměrnou hodnotu genu HSD17B1 jsme zaznamenali v kategorii pacientek od 60 do 70 let (tab.7). Nicméně mezi věkem a hodnotami genu HSD17B1 jsme zjistili nesignifikantní korelaci (p=0,449). Vzhledem k počtu pacientů v jednotlivých skupinách bude nutné případnou závislost verifikovat u větší skupiny pacientů.

Tab.7. Rozdělení pacientek do věkových kategorií

Věková kategorie	Četnosti	Procenta	Průměr HSD17B1	Průměr HER2	Průměr CEP17
<50	11	22 %	1,95	12,96	2,28
50-60	11	22 %	2,09	9,36	2,47
60-70	12	24 %	2,16	7,81	2,26
>70	16	32 %	2,07	7,10	2,40
Celkem	50	100 %	2,07	9,05	2,36

Zdroj: Vlastní zpracování

Tab.8. Souhrnná tabulka výsledků

CTG	HSD17B1 (průměrný počet kopií)	% jader s 3 a více kopiemi genu/jádro	HER2 (prům. počet kopií)	CH17 (prům. počet kopií)	HSD17B1 / CH17	HER2 / CH17	Věk při stanovení diagnózy
11174	1,49	5 %	1,88	1,78	0,84	1,06	77
11136	1,56	5 %	2,29	2,16	0,72	1,06	72
11139	1,67	14 %	2,83	1,65	1,01	1,72	79
10820	1,68	4 %	17,19	2,20	0,76	7,81	46
11287	1,78	7 %	3,31	2,83	0,63	1,17	75
11167	1,80	8 %	2,13	2,10	0,86	1,01	68
10164	1,80	11 %	19,73	1,79	1,01	11,02	34
11446	1,81	14 %	20,00	2,04	0,89	9,80	56
10053	1,81	10 %	15,00	2,13	0,85	7,04	66
10625	1,81	11 %	19,63	1,83	0,99	10,73	35
10808	1,84	3 %	4,68	2,43	0,76	1,93	42
9993	1,87	7 %	2,06	2,06	0,91	1,00	61
11507	1,88	8 %	13,51	3,44	0,55	3,93	44

11527	1,93	8 %	2,99	2,50	0,77	1,20	70
10199	1,95	17 %	20,00	2,08	0,94	9,62	46
10557	1,96	4 %	2,77	2,34	0,84	1,18	78
11252	1,96	17 %	16,79	3,58	0,55	4,69	59
11083	1,97	5 %	17,71	2,68	0,73	6,61	62
10079	1,98	18 %	15,00	2,26	0,88	6,64	65
10595	2,00	16 %	20,00	2,19	0,91	9,13	40
10046	2,01	18 %	15,00	2,21	0,91	6,79	55
11208	2,02	6 %	20,00	2,30	0,88	8,70	38
10142	2,02	20 %	1,95	1,78	1,13	1,10	57
10486	2,04	8 %	2,43	2,09	0,98	1,16	56
10020	2,04	13 %	2,12	2,04	1,00	1,04	45
11216	2,04	11 %	2,35	2,26	0,90	1,04	52
11519	2,05	16 %	18,08	2,30	0,89	7,86	83
10037	2,06	19 %	2,08	1,91	1,08	1,09	73
9994	2,08	22 %	2,20	2,07	1,00	1,06	50
11287	2,09	22 %	3,31	2,83	0,74	1,17	75
11109	2,13	10 %	1,95	1,76	1,21	1,11	56
11024	2,13	10 %	2,02	1,94	1,10	1,04	72
10129	2,15	22 %	15,00	2,12	1,01	7,08	56
11166	2,16	14 %	2,07	2,02	1,07	1,02	72
11193	2,16	14 %	20,00	2,53	0,85	7,91	50
10659	2,16	14 %	2,23	2,07	1,05	1,08	60
11023	2,18	14 %	1,73	1,68	1,30	1,03	66
11152	2,20	11 %	1,86	1,90	1,16	0,98	38
11017	2,21	10 %	2,49	2,07	1,07	1,20	64
10438	2,23	25 %	3,80	2,92	0,76	1,30	34
10560	2,26	28 %	19,18	2,22	1,02	8,64	75
11219	2,29	19 %	11,27	2,38	0,96	4,74	60
11161	2,33	23 %	18,38	3,00	0,78	6,13	79
11217	2,34	24 %	18,60	2,86	0,82	6,50	64
11134	2,45	25 %	10,00	2,66	0,92	3,76	71
11110	2,54	37 %	2,82	2,38	1,07	1,18	63
11101	2,56	48 %	19,67	3,71	0,69	5,30	80
10237	2,59	46 %	5,24	4,74	0,55	1,11	53
11178	2,68	33 %	2,67	2,56	1,05	1,04	71
11250	2,76	31 %	2,63	2,40	1,15	1,10	62

Zdroj: Vlastní zpracování

5. Diskuze

Produkt genu HSD17B1, enzym 17β-hydroxysteroid dehydrogenáza je klíčovým enzymem katalyzujícím přeměnu neaktivního hormonu estronu na aktivní hormon estradiol. Aktivní estradiol se váže na estrogenové receptory přítomné v hormon-dependentních nádorech prsu a podmiňuje tak jejich další progresi.

Většina hormonálně dependentních karcinomů prsu (s pozitivními ER či PR receptory) je léčena pomocí biologické léčby, zaměřené na tyto receptory či produkci hormonů. Zmnožení genu HSD17B1 by mohlo být důvodem rezistence některých nádorů prsu na cílenou terapii. Zároveň by mohla inhibice tohoto genu mít terapeutický význam.

V ČR zatím klinické studie zabývající se studiem genu HSD17B1 nebyly publikovány. V rámci mezinárodních prací je však již význam HSD17B1 diskutován. Ve studii Husena a kol. bylo prokázáno na buněčné linii CMF-7 zmenšení nádoru o 59,8 % po 4-týdenní léčbě inhibitory genu HSD17B1 (Husen et al.,2006).

Ve studii Cecilie Gunnarsonn a kol. se zabývali významem genu HSD17B1 a genu HER2 a zkoumali amplifikaci obou genů u 221 postmenopauzálních pacientek s primárním karcinomem prsu. Pomocí real-time PCR byla popsána amplifikace genu HSD17B1 u 14,5 % (32 pacientek) a amplifikace HER2 u 21 % (46 pacientek). Byla nalezena korelace mezi amplifikací obou genů (P=0.00078) a u 14 nádorů (44%) s amplifikací HSD17B1, byl rovněž přítomna amplifikace genu HER2. Dalším důležitým zjištěním bylo, že pokud byla ve vzorku přítomna amplifikace jednoho z těchto genů, pacientky měly horší prognózu. V této studii také poukázali na to, že amplifikace genu HSD17B1 by mohla snižovat u ER pozitivních pacientek účinek léčby pomocí tamoxifenu (Gunnarsson et al., 2003).

Vzhledem k tomu, že HSD17B1 není metodou FISH standardně vyšetřován, není k dispozici komerčně dostupná CE certifikovaná fluorescenčně značená sonda. Pro naši studii jsme sondu připravili pomocí *E. Coli* transfekované plasmidem s inzertem pro gen HSD17B1 a centromerickou oblast chromozomu 17. Sonda byla ověřena

na chromozomálních preparátech a následně využita pro vyšetření 50 vzorků pacientek s karcinomem prsu. Jednalo se o pilotní studii, jejímž smyslem bylo připravit sondu a orientačně zjistit, zda se počet kopií genu HSB17B1 mění. Cílem bylo i zjistit, zda jsou tyto početní změny závislé na statusu genu HER2.

Vzorky byly hodnoceny na základě průměrného počtu kopií genu na jádro, poměru gen/chromozom 17 a i na základě procentuálního zastoupení jader se 3 a více kopiemi genu ve vzorku.

V případě, když byl hodnocen pouze absolutní počet kopií HSD17B1 na jádro, dosáhli jsme podobných výsledků jako ve výše citované studii (v našem případě 24 % vs. 14,5%). Mírný rozdíl může být dán vyšší senzitivitou metody FISH či malou statistickou chybou, danou malým souborem vyšetřených pacientů. Zároveň koamplifikace genu HER2 odpovídala publikovaným výsledkům. Jako zajímavá se jeví přítomnost delece (<1,8 kopií/jádro), který nebývá v literatuře popisována a kterou jsme detekovali u 10 % (5/50) pacientů.

V případě, že byla zohledněna polyzomie chromozomu 17, potvrdili jsme amplifikaci genu HSD17B1 pouze u 2 % případů (1/50), a to i přes velmi nízce zvolené hranice hodnocení. Je možné, že zastoupení pozitivních vzorků v naší studii je dáno předvýběrem pacientů (vzorky s předpokládanou HER2 amplifikací), či malým množstvím pacientů v souboru. Nicméně, tato pilotní studie naznačuje, že gen HSD17B1 je zmožen především díky polyzomii chromozomu 17 a stanovení absolutního počtu kopií pomocí PCR tak nemusí být bez vztažení na počet chromozomu vhodný. U těchto případů nelze jednoznačně zvažovat zvýšenou expresi genu a z tohoto důvodu nemusí být počet kopií uvedeného genu jednoznačným markerem pro cílenou léčbu tamoxifenem. (Gunnarsson et al., 2003). Otázkou zůstává i poměrně vysoké procento pacientek se sníženým počtem kopií HSD17B1 a zcela jistě bude zajímavé sledovat u těchto pacientek probíhající léčbu.

V navazující práci bude soubor pacientek významně rozšířen a doplněn klinickými údaji pacientek, včetně reakce na léčbu. V současné době většina vyšetřených případů

nepodstoupila dostatečně dlouhý léčebný režim, aby bylo možno vliv HSD17B1 na léčbu posoudit. Rozšíření souboru by mohlo pomoci zvolit nejlepší hranice pro hodnocení (cut-off) genu HSD17B1 metodou FISH, které dosud v literatuře nebyly definovány a zároveň posoudit možný vliv genu pro predikci léčby.

U 50 % případů se zvýšeným počtem kopií genu HSD17B1 byl nalezen rovněž vyšší počet kopií genu HER2. Ačkoliv autoři nejrozsáhlejší studie na toto téma ((Husen et al.,2006) koamplifikaci obou genů zkoumají, nepokládáme tento jev za hlavní cíl našeho zájmu. Důvodem je především to, že oba markery považujeme za závislé díky tomu, že gen HSD17B1 leží v těsné blízkosti genu HER2, který je u ca. prsu často amplifikován. Přesto, závislost mezi oběma geny bude nadále sledovat.

Závěrem lze říci, že připravená sonda je plně funkční a vhodná i pro vyšetření natolik obtížných vzorků jakým FFPE řezy bezesporu jsou a v budoucnu by se gen HSD17B1 mohl stát významným pro predikci léčby či prognózu pacientek s ca. prsu.

6. Závěr

Při zpracování této bakalářské práce jsem si osvojila přípravu fluorescenčně přímo značené DNA sondy pro metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), metodu FISH včetně předpřípravy a vyhodnocování vzorků ve fluorescenčním mikroskopu.

Připravila jsem fluorescenčně přímo značenou LSI HSD17B1, kombinovanou s centromerickou sondou pro chromozom 17 (CEP 17). Pomocí této sondy jsem vyšetřila soubor 50 pacientek s karcinomem prsu a získané výsledky porovnala se statusem genu HER2 a věkem pacientek.

Po analýze výsledků se zdá, že zvýšený počet kopií HSD17B1 genu je především důsledkem polyzomie chromozomu 17 a tudíž jeho zvýšenou expresi nelze odhadnout a rovněž i význam HSD17B1 jako prediktivního faktoru je diskutabilní. Při hodnocení vzorků dle poměru HSD17B1/CEP17 jsme zjistili, že pouze 2 % vzorků byla opravdu amplifikována. Koamplifikaci genu HER2 jsem zjistila u 44 % vzorků se zvýšeným počtem HSD17B1 (v souladu s publikovanými daty-Gunnarsson et al, 2003), nicméně geny HSD17B1 a HER2 považujeme za závislé faktory (díky podobné lokalizaci na stejném chromozomu). V další práci plánujeme rozšíření a porovnání našich výsledků s klinickými daty a poskytnout tak relevantnější informace o HSD17B1 jako prediktivním faktoru.

Hlavní cíl, zavést a ověřit kvalitu sondy pro vyšetřování genu HSD17B1 a počtu kopií chromozomu 17 metodou FISH u karcinomu prsu byl beze zbytku naplněn.

7. Použitá literatura

1. ABRAHÁMOVÁ, J., 2008. [online]. Adjuvantní hormonální léčba časného karcinomu prsu. *Onkologická péče.* [cit. 2017-4-9]. Česká asociace sester, onkologická sekce, pod záštitou ČLS JEP. *Kontakt.* 12(2), 6-10. ISSN 1802-7407. Dostupné z: http://www.linkos.cz/files/onkologicka-pece/8/74.pdf

2. ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. et al., 2010. *Speciální onkologie – příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén. 183–196 s. ISBN 978-80-7262-648-9.

3. ADAM, Z., VORLÍČEK, J., VANÍČEK, J. et al., 2004. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha: Grada. 213 s. ISBN 80-247-0896-5.

4. AKA, A, J., ZERRADI, M., HOULE, F., LIN, S., 2012. [databáze]. 17beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Modulates Breast Cancer Protein Profile and Impacts Cell Migration. *Breast cancer res.* [cit. 2017-3-12]. *Exp. Ther*. 14(3), 92, doi: 10.1186./bcr3207. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446355/

5. AKA, A., J., MAZUMDAR, M., CHEN, C., Q., POIRIER, D., LIN, S., X., 2010. [databáze]. 17beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Stimulates Breast Cancer by Dyhydrotestosterone Inactivation in Addition to Estradiol Production. *Mol Endocrinol.* [cit. 2017-3-28]. *Exp. Ther*. 24(4), 832-45, doi: 10.1210/me.2009-0468. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20172961/

6. AKA, A., J., MAZUMDAR, M., LIN, S., X., 2009. [databáze]. Reductive 17beta-hydroxysteroid Dehydrogenases in the Sulfatase Pathway: Critical in the Cell Proliferation of Breast Cancer. *Molecular and Cellular endokrinology.* [cit. 2017-3-28]. *Exp. Ther.* 301(1-2), 183-90, doi: 10.1016/j.mce.2008.10.042. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038308

7. ALTANER, Č., 2008. *Buněčná a molekulární biologie rakoviny.* Praha: Radix. 11-23 s. ISBN 978-80-86031-85-9.

8. ASCO/CAP HER2 Test Guideline Recommendations. 2013. [online]. *College of American Pathologists*. [cit. 2017-4-9]. Dostupné z: http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/her2-summary.pdf

9. BEY, E., MARCHAIS-OBERWINKLER, S., KRUCHTEN, P., FROTSCHER, M. et al., 2008. [databáze]. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Bis(Hydroxyphenyl) Azoles as potent and Selective Non-Steroidal Inhibitors of 17beta-hydroxysteroid Dehydrogenase type 1 (17β-HSD) for the Treatment of Estrogen-Dependent Diseases. *Bioorg Med Chem.* [cit. 2017-03-29]. *Exp.Ther.* 16(12), 6423-35, doi: 10.1016/j.bmc.2008.04.073. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514529/

10. Cílená biologická léčba. © 2017. [online]. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně.* [cit. 2017-3-7]. Dostupné z: http://www.linkos.cz/databaze-onkologickych-leciv/cilena-biologicka-lecba/

11. CIU, J., SHEN, Y., LI, R., 2013. [databáze]. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways During Ageing: from Periphery to Brain. *Trends in molecular medicine*. [cit. 2017-03-29]. *Exp. Ther.* 19(3), 197-209, doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007 Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595330/

12. COUFAL, O., FAIT, V., 2011. *Chirurgická léčba karcinomu prsu.* Praha: Grada. 48 s., 76 s. ISBN 978-80-247-3641-9.

13. DRÁBEK, J., HAJDÚCH, M., TROJANEC, R., 2012. Význam biomarkerů pro indikaci cílené léčby v onkologii. FUSEK, M., VÍTEK, L., BLAHOŠ, J., HAJDÚCH, M., RUML, T. et al., *Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe*. Praha: Grada. s. 146-147. ISBN 978-80-247-3727-0.

14. DUDA, M., 2011. Základy chirurgické onkologie. 407-408 s. In: ZEMAN, M., KRŠKA, Z. et al. *Chirurgická propedeutika.* 3. vydání. Praha: Grada. 407- ISBN 978-80-247-3770-6.

15. *Estimated incidence, mortality and prevalence*. 2012. [online]. EUCAN. [cit. 2017-3-13]. Dostupné z: http://eco.iarc.fr/EUCAN/CancerOne.aspx?Cancer=46&Gender=2

16. FABIAN, P., BERKOVCOVÁ, J., 2014. Molekulární patologie v onkologii. In: FORETOVÁ, L., SVOBODA, M., SLABÝ, O. et al., *Molekulární genetika v onkologii*. Praha: Mladá fronta-Medical Services. ISBN 978-80-204-3236-0.

17. FORETOVÁ, L., 2011. Genetické vlivy podmiňující vznik nádorů. In: ADAM, Z., VORLÍČEK, J., KREJČÍ, M., et al., *Obecná onkologie.* Praha: Grada. s. 27-31. ISBN 978-80-247-3324-1.

18. FORETOVÁ, L., MACHÁČKOVÁ, E., GAILLYOVÁ, R., SVOBODA, M., 2014. Hereditární nádorová onemocnění. In: FORETOVÁ, L., SVOBODA, M., SLABÝ, O. et al., *Molekulární genetika v onkologii*. Praha: Mladá fronta-Medical Services. ISBN 978-80-204-3236-0.

19. GUNNARSSON, C., AHNSTRÖM, M., KIRSHNER, K. et al., 2003. Amplification of HSD17B1 and ERBB2 in Primary Breast Cancer. [databáze]. *Oncogene.* [cit. 2017-3-12]. *Exp. Ther.* 22, 34-40, doi: 10.1038/sj.onc.1206078. Dostupné z: http://www.nature.com/onc/journal/v22/n1/full/1206078a.html

20. HAJDŮCH, M. et al., 2009. [online]. Prognostické a prediktivní markery I. *Onkologie.* [cit. 2017-4-25]. *Kontakt*. 3(Suppl.B), 12, ISSN 1803-5922. Dostupné z: http://www.solen.cz/incpdfs/act-000068-0001_10_1.pdf

21. HAJDÚCH, M., PYTLÍK, R., 2012. Biologická léčba v onkologii. In: FUSEK, M., VÍTEK, L., BLAHOŠ, J., HAJDÚCH, M., RUML, T. et al., *Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe*. Praha: Grada. s. 114, s. 133 ISBN 978-80-247-3727-0.

22. HALÁMKOVÁ, J., TOMÁŠEK, J., KISS, I., VORLÍČEK, J., 2011. Cílená léčba v onkologii solidních nádorů. In: ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. et al., *Obecná onkologie.* Praha: Grada. s. 159-173. ISBN 978-80-7262-715-8.

23. HE, W., GAURI, M., LI, T. et al., 2016. [databáze]. Current knowledge of the multifunctional 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD17B1). *Gene.* [cit. 2017-3-12]. *Exp.Ther.* 588(1), 54-61, doi: 10.1016/j.gene.2016.04.031. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102893

24. HEROKOVÁ, J., GATĚK, J. et al., © 2017. [online]. Diagnostika a léčba karcinomu prsu. In: DUDA, J. et al. *Speciální chirurgie.* [cit. 2017-3-7]. Dostupné z: http://eportal.chirurgie.upol.cz/portal_final/?page_id=2634

25. HOFMANOVÁ, J., 2013. *Genotoxicita a karcinogeneze.* [online]. Brno: Masarykova Univerzita. [cit. 2017-3-2]. ISSN 1802 - 128X. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/index.html

26. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., 2005. *Základy imunologie*. 3. vydání. Praha: Triton. 176-181 s. ISBN 80-7254-686-4.

27. HSD17B1 Hydroxysteroid 17 - beta Dehydrogane 1 [Homo Sapiens (Human)]. 2017. [databáze]. *Pubmed.* [cit-2017-3-7]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3292#variation

28. HUSEN, B., HUHTINEN, K., SALONIEMI, T. et al., 2006. [databáze]. Human Hydroxysteroid (17beta) Dehydrogenase 1 Expression Enhances Estrogen Sensitivity of CMF-7 Breast Cancer Cell Xenografts. *Endocrinology.* [cit. 2017-04-15]. *Exp.Ther.* 147(11), 5333-9, doi:10.1210/en.2006-0778. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916945

29. HYNKOVÁ, L., DOLEŽELOVÁ, H., ŠLAMPA, P., 2011. Radioterapie. In: ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. et al., *Obecná onkologie.* Praha: Grada. s. 113-116. ISBN 978-80-7262-715-8.

30. JAROŠOVÁ, M., POSPÍŠILOVÁ, H., PLACHÝ, R. et al., 2006. [online]. Linkos. [cit. 2017-3-17]. Dostupné z: http://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/hledani-clanku/skupina/a/zobrazit/ids/671/

31. KLENER, P., KLENER, P. jr., 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada Publishing, a.s. 21-25 s., 37-50 s., 59-72 s., 77-82 s., 113- ISBN 978-80-247-2808-7.

32. KOOLMAN, J., RÖHM, K., H., 2012. *Barevný atlas biochemie.* Praha: Grada. 422 s. ISBN 978-80-247-2977-0.

33. KOUDELÁKOVÁ, V., 2012. Práce s plazmidy. In: DRÁBEK, J. et al, *Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, s. 111-117. ISBN 978-80-244-3002-7.

34. KRŠKA, Z., HOSKOVEC, D., PETRUŽELKA, L. et al., 2014. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada. 53–64 s. ISBN 978-80-247-4284-7.

35. MICHALOVÁ, K., 2004. [online]. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. [cit 2017-3-10]. Dostupné z: www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/KMAAB.htm

36. Nádorová onemocnění. [online]. *Státní zdravotní ústav*. [cit. 2017-3-11]. Dostupné z: http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni

37. Novotvary. 2016. [online]. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*. [cit. 2017-2-26]. Dostupné z: http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary

38. O léčbě. © 2016. *Proton therapy center*. [online]. [cit. 2017-3-5]. Dostupné z: http://www.ptc.cz/protonova-lecba/princip-lecby/

39. OSTER, A., KLEIN, T., HENN, C. et al., 2011. [online.] Bicyclic Substituted Hydroxyphenylmethanone Type Inhibitors of 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17β-HSD): the Role of the Bicyclic Moiety.

ChemMedCHem. [cit. 2017-03-29]. *Exp. Ther.* 6(3), 476-87, doi: 10.1002/cmdc.201000457. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337522/

40. OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., 2012. *Základy biologie a genetiky člověka.* Praha: Karolinum. 98 s., ISBN 978-80-246-2109-8.

41. PALA, E., BAYOL, Ü., SEZER, Ö. et al., 2015. [online]. Problems In Determining Her2 Status In Breast Cancer. *Pubmed.* [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331683

42. PETRÁKOVÁ, K., VYZULA, R., 2011. Hormonální protinádorová léčba. In: ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. et al., *Obecná onkologie.* Praha: Grada. s. 149-153. ISBN 978-80-7262-715-8.

43. PETRÁKOVÁ, K., VYZULA, R., 2014. O nádorech prsu. [online]. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně.* [cit. 2017-3-6]. Dostupné z: http://www.linkos.cz/nadory-prsu-c50/o-nadorech-prsu/

44. PRAUSOVÁ, J., 2010. [online]. Karcinom prsu-problém i v 21. století. *Interní medicína pro praxi*. [cit. 2017-3-19]. Olomouc: Solen, s.r.o. *Kontakt.* 12(1), 25-32. ISSN 1803-5256. Dostupné z: http://www.solen.cz/pdfs/int/2010/01/05.pdf

45. RYŠKA, A., 2014. Histologické vyšetření karcinomu prsu. [online]. *ČOS ČLS JEP*. [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: http://www.linkos.cz/nadory-prsu-c50/histologicke-vysetreni-karcinomu-prsu/

46. SEDLÁČKOVÁ, H., 2016. *Prevence nádorových onemocnění.* [online]. Brno: Masarykův onkologický ústav. [cit. 2017-3-4]. Dostupné z: https://www.mou.cz/prevence-nadorovych-onemocneni/t3017

47. SNUSTAD, D., P., SIMMONS, J., M., 2009. *Genetika.* Brno: Masarykova univerzita, 666–686 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

48. SPADARO, A., NEGRI, M., MARCHAIS-OBERWINKLER, S., BEY, E., FROTSCHER, M., 2012. [databáze]. Hydroxybenzothyazoles as New Nonsteroidal Inhibitors of 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase type 1 (17β-HSD). *PloS One.* [cit. 2017-03-29]. *Exp.Ther.* 7(1), doi: 10.1371/journal.pone.0029252. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3252304/

49. ŠEVČÍKOVÁ, S., KUBICZKOVÁ, L., MATĚJÍKOVÁ, J., SEDLAŘÍKOVÁ, L., KRYUKOV, F., HÁJEK, R., 2013. [online]. Inhibitory proteazomu v léčbě mnohočetného myelomu. [cit. 2017-03-21]. *Kontakt.* 26(1), 11-18. ISSN 1802-5307.

50. TOMÁŠEK, J. et al., 2015. *Onkologie: minimum pro praxi*. Praha: Axonite CZ. 73-82 s. ISBN 978-80-88046-01-1.

51. TROJANEC, R., 2012. Fluorescenční *in situ* hybridizace. In: DRÁBEK, J. et al, *Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, s. 83-94. ISBN 978-80-244-3002-7.

52. VARELLA-GARCIA, M., DIEBOLD, J., EBERHARD, D.A. et al., 2009. [databáze]. EGFR Fluorescence in Situ Hybridisation Assay: Guidelines for Application to Non-small-cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Pathology.* [cit. 2017-4-27]. 62(11), 970-977, doi: 10.1136/jcp.2009.066548. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861557

53. VOKURKA, M., ŽIVNÝ, J. et al., 2012. 65 s.78 s. Poruchy imunitního systému. In: VOKURKA, M. et al., *Patofyziologie pro nelékařské obory*. 3. vydání. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-2032-9.

54. VORLÍČEK, J., ABRAHÁMOVÁ, J., VORLÍČKOVÁ, H., 2012. *Klinická onkologie pro* sestry. 2. vydání. Praha: Grada. 58 s. ISBN 978-80-247-3742-3.

55. VYZULA, R. et al., 2017. [online]. Zhoubný novotvar prsu., 2017. 23.vydání. *Doporučení České onkologické společnosti.* Brno: Masarykův onkologický

ústav. [cit. 2017-4-9]. 70-88 s. ISBN 978-80-86793-42-9. Dostupné z: http://www.linkos.cz/files/modra-kniha/16.pdf

56. WINTER, P., E., LIM, E., HUDIS, A., C. et al. 2011. Současná problematika HER2-pozitivního karcinomu prsu. [online]. *ČOS ČLS JEP*. [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: http://www.linkos.cz/asco/chapter/soucasna-problematika-her2-pozitivniho-karcinomu-prsu

57. WOLFF, A.C. et al. 2013. [databáze]. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO / CAP Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. [cit. 2017-04-25]. *Exp. Ther*. 31(31), 3997-4013, doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101045

58. ZIMOVJANOVÁ, M., 2009. [online]. Hereditární karcinom prsu. *Onkologie*. [cit. 2017-03-21]. Olomouc: Solen, s.r.o. *Kontakt*. 3(6), 348-350. ISSN-1803-5345. Dostupné z: http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2009/06/06.pdf

8. Seznam použitých zkratek

ADCC – Na protilátce závislá buněčná toxicita

AFP – Alfa-fetoprotein

Ag – Antigen

APC – Antigen prezentující buňky

ART – Adaptivní radioterapie

ASCO – Americká společnost klinické onkologie

ATPáza – Adenosintrifosfatáza

Ca. – Karcinom

CAP –Kolegium amerických patologů

CEA – Karcinoembryonální protein

ČOS ČLS JEP – Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

ČR – Česká republika

DCIS – Duktální karcinom *in situ*

DHEA – Dehydroepiandrosteron

DHT – Dihydrotestosteron

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

E1 – Estron

E2 – Estradiol

E3 – Estriol

EGFR – Receptor pro růstový faktor

ER – Estrogenový receptor

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

FNA – Aspirace tenkou jehlou

FSH – Folikuly stimulující hormon

GM-CSF – Granulocyty a makrofágy stimulující faktor

HSD17B1 – Dihydroxysteroidní dehydrogenáza typu 1

CA – Onkofetální tumor marker

CEP17 – Chromozom 17

IgG – Imunoglobulin třídy G

IHC – Imunohistochemie

IL – Interleukin

IMRT – Radioterapie s modulovanou intenzitou

INF – Interferon

LAK – lymfokiny aktivovaní zabíječi

LCIS – Lobulární karcinom *in situ*

LH – Luteinizační hormon

LOH – ztráta heterozygozity

MHC – Hlavní histokompatibilní komplex

MoAb – Monoklonální protilátka

NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NK – Přirození zabíječi

PCR – Polymerázová řetězová řeakce

PR – Progesteronový receptor

RNA – Ribonukleová kyselina

RTG – Rentgenové

S fáze – Syntetická fáze

SCF – růstový faktor pro kmenové buňky

TIL – Lymfocyty infiltrující tumor

TNBC – Triple negativní bazální karcinom

TNF – Tumor nekrotizující faktor

TNM – Klasifikace tumoru, uzlin, metastází

VEGF – Vaskulární endoteliální růstový faktor

VEGFR1/2 – Receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor