

„TRIPLE“ NEGATIVNÍ KARCINOMY MLÉČNÉ ŽLÁZY

Kniha byla vydána za laskavé podpory:



Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

MUDr. Mgr. Markéta Kolečková, Ph.D.,
MUDr. Katherine Vomáčková, Ph.D.,
a kolektiv

„TRIPLE“ NEGATIVNÍ KARCINOMY MLÉČNÉ ŽLÁZY

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ

Autoři i nakladatel vynaložili velkou péči a úsilí, aby všechny informace v knize obsažené týkající se dávkování léků a forem jejich aplikace odpovídaly stavu vědy v okamžiku vydání. Nakladatel však za údaje o použití léků, zejména o jejich indikacích, kontraindikacích, dávkování a aplikačních formách, nenese žádnou odpovědnost, a vylučuje proto jakékoli přímé či nepřímé nároky na úhradu eventuálních škod, které by v souvislosti s aplikací uvedených léků vznikly. Každý uživatel je povinen důsledně se řídit informacemi výrobců léčiv, zejména informací přiloženou ke každému balení léku, který chce aplikovat.

Ochranné obchodní známky (chráněné názvy) léků ani dalších výrobků nejsou v knize zvlášť zdůrazňovány. Z absence označení ochranné známky proto nelze vyvozovat, že v konkrétním případě jde o název nechráněný.

Toto dílo, včetně všech svých částí, je zákonem chráněno. Každé jeho užití mimo úzké hranice zákona je nepřipustné a je trestné. To se týká zejména reprodukování či rozšiřování jakýmkoli způsobem (včetně mechanického, fotografického či elektronického), ale také ukládání v elektronické formě pro účely rešeršní i jiné. K jakémukoli využití díla je proto nutný písemný souhlas nakladatele, který také stanoví přesné podmínky využití díla. Písemný souhlas je nutný i pro případy, ve kterých může být udělen bezplatně.

© Markéta Kolečková, Katherine Vomáčková, Zdeněk Kolář, Čestmír Neoral, 2022

© Maxdorf, 2022

Illustrations © Maxdorf, 2022

Cover layout © Maxdorf, 2022

Vydal Maxdorf s. r. o., nakladatelství odborné literatury, Na Šejdru 247/6a, 142 00 Praha 4

e-mail: info@maxdorf.cz, internet: www.maxdorf.cz

Jessenius® je chráněná značka [No. 267113] označující publikace určené odborné zdravotnické veřejnosti

Odpovědný redaktor: **Ing. Veronika Pátková**

Jazyková redakce: **Mgr. Zuzana Samohylová**

Ilustrace: **Ing. Jaroslav Nachtigal, Ph.D., Mgr. Veronika Mrázová**

Obálka: **Grafické studio Maxdorf**

Sazba: **Mgr. Tereza Škrobánková, Denisa Honzalová**

Tisk: Books Print s.r.o.

Printed in the Czech Republic

ISBN 978-80-7345-723-5

HLAVNÍ AUTORKY

- MUDr. Mgr. Markéta Kolečková, Ph.D., Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc
- MUDr. Katherine Vomáčková, Ph.D., I. chirurgická klinika, LF UP a FN Olomouc

SPOLUAUTOŘI

- Mgr. Zuzana Čapková, Ústav lékařské genetiky, LF UP a FN Olomouc
- Doc. RNDr. Ondřej Holý, Ph.D., Ústav veřejného zdravotnictví, LF UP v Olomouci
- Doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc., Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc
- Prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc., Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc
- Prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc
- Prof. MUDr. Čestmír Neoral, CSc., I. chirurgická klinika, LF UP a FN Olomouc
- Prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D., Ústav lékařské genetiky, LF UP a FN Olomouc
- MUDr. Alona Řehulková, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc
- MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc
- MUDr. Lucia Veverková, Ph.D., Radiologická klinika, LF UP a FN Olomouc

RECENZENTI

- Prof. MUDr. Marie Černá, Ph.D., Radiologická klinika LF UP a FN Olomouc
- Prof. MUDr. Jan Daneš, CSc., Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN Praha

OBSAH

Předmluva	6
1 Shrnutí obecných mechanismů vzniku nádorů	10
1.1 Úvod	10
1.2 Mechanismy vzniku a růstu nádorů	10
1.3 Histologická stavba nádorů	16
1.4 Makrofágy asociované s nádory	17
1.5 Fibroblasty asociované s nádory	18
1.6 Úloha imunitního systému v kancerogenezi	19
1.7 Význam epitel-mezenchymové tranzice	21
2 Epidemiologie karcinomu mléčné žlázy a „triple“ negativního karcinomu ve světě a v České republice	25
2.1 Epidemiologie karcinomu mléčné žlázy ve světě	25
2.2 Epidemiologie karcinomu mléčné žlázy v České republice	30
2.3 Epidemiologie „triple“ negativního karcinomu mléčné žlázy ve světě	34
2.4 Epidemiologie „triple“ negativního karcinomu mléčné žlázy v České republice	34
3 Patogeneze vzniku prekurzorových lézí karcinomu mléčné žlázy a riziko jejich progresu in situ a invazivní karcinom	36
3.1 Úvod	36
3.2 Atypická duktální hyperplazie	37
3.3 Lobulární neoplazie	41
3.4 Papilární neoplazie	46
3.5 Duktální karcinom <i>in situ</i>	48
3.6 Rizikové faktory progresu DCIS v invazivní karcinom	50
4 Morfologické prognostické a prediktivní znaky karcinomů mléčné žlázy	53
4.1 Úloha patologa v diagnostice a terapii karcinomu mléčné žlázy	53
4.2 Histologické typy a morfologické charakteristiky karcinomů mléčné žlázy	55
4.3 Koncepte imunitního dozoru – význam hodnocení TIL	63
4.4 Terciární lymfatické struktury	67
5 Klasifikace karcinomů mléčné žlázy	69
5.1 Úvod do historie klasifikace karcinomů mléčné žlázy	69
5.2 „Triple“ negativní karcinomy mléčné žlázy	75
5.3 Analýza TNBC podle Lehmannových fenotypů – Vanderbiltská klasifikace	78
5.4 Analýza TNBC podle Bursteina – Baylorská klasifikace	79
5.5 Analýza TNBC podle Jézéquela	81
5.6 Karcinom mléčné žlázy u mužů	82

6	Molekulární prognostické a prediktivní znaky u „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	85
6.1	Úvod	85
6.2	Geny a proteiny uplatňující se při opravě poškozené DNA	86
6.3	Geny a proteiny regulující buněčnou proliferaci, migraci a angiogenezi	89
6.4	Proteiny regulující apoptózu	92
6.5	Regulace genové exprese	94
6.6	Androgenní receptor	99
6.7	Proteiny kontrolních bodů imunitního systému	99
7	Korelace radiologických obrazů s histopatologickou morfologií „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	102
7.1	Úvod	102
7.2	BI-RADS systém hodnocení mamogramů	106
7.3	Hodnocení ultrasonografických nálezů mléčné žlázy	107
7.4	Přehled bioptických intervenčních a lokalizačních výkonů	107
7.5	Histopatologická a radiologická kritéria benigních nádorů, prekursorových lézí a maligních nádorů mléčné žlázy	108
7.6	Histopatologická a radiologická specifika „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	110
7.7	Určení rozsahu a stadia onemocnění	113
8	Cyodiagnostika karcinomů mléčné žlázy	117
9	Tekutá biopsie u „triple“ negativního karcinomu prsu	126
9.1	Úvod	126
9.2	Formy tekuté biopsie	128
9.3	Možnosti klinického využití tekuté biopsie	130
9.4	Metody detekce cirkulujících nádorových buněk	131
10	Zobrazovací metody v diagnostice a léčbě karcinomu prsu	139
10.1	Mamografie	139
10.2	Ultrasonografie	142
10.3	Výpočetní tomografie	149
10.4	Magnetická rezonance	151
10.5	Biopsie	153
10.6	Předoperační lokalizace	155
10.7	Lokalizace nádorů před onkologickou léčbou a značení axilárních lymfatických uzlin	157
10.8	Terapie benigních a rizikových lézí	159
10.9	Multidisciplinární tým	161
11	Současné možnosti farmakoterapie „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy ve světle molekulární patologie	163
11.1	Úvod	163
11.2	Neoadjuvantní léčba časných forem „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	164
11.3	Možnosti terapie pokročilých „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	165
11.4	Adjuvantní terapie „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	170
11.5	Léčba karcinomu mléčné žlázy u těhotných žen	171

12	Chirurgické výkony u „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	174
12.1	Úvod	174
12.2	Historie chirurgie prsu	174
12.3	Výkony na prsu	177
12.4	Výkony na lymfatických uzlinách v axile	185
12.5	Onkoplastické výkony	187
12.6	Chirurgická léčba metastáz TNBC	188
13	Genetická podstata „Triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy	190
13.1	Úvod	190
13.2	Geny zapojené do rozvoje TNBC – vrozené patogenní varianty	191
13.3	Geny zapojené do rozvoje TNBC – získané patogenní varianty	197
13.4	Lékařská genetika	198
13.5	Diagnostika hereditárních nádorových syndromů v lékařské genetice	198
13.6	Bezpriznakoví nositelé patogenní varianty genu asociovaného s HBOC v lékařské genetice	200
13.7	Terapeutický význam patogenních variant v genu asociovaných s HBOC pacientů s TNBC	200
	Přehled použitých zkratk	202
	Rejstřík	204

1 SHRNUTÍ OBECNÝCH MECHANISMŮ VZNIKU NÁDORŮ

Markéta Kolečková, Zdeněk Kolář

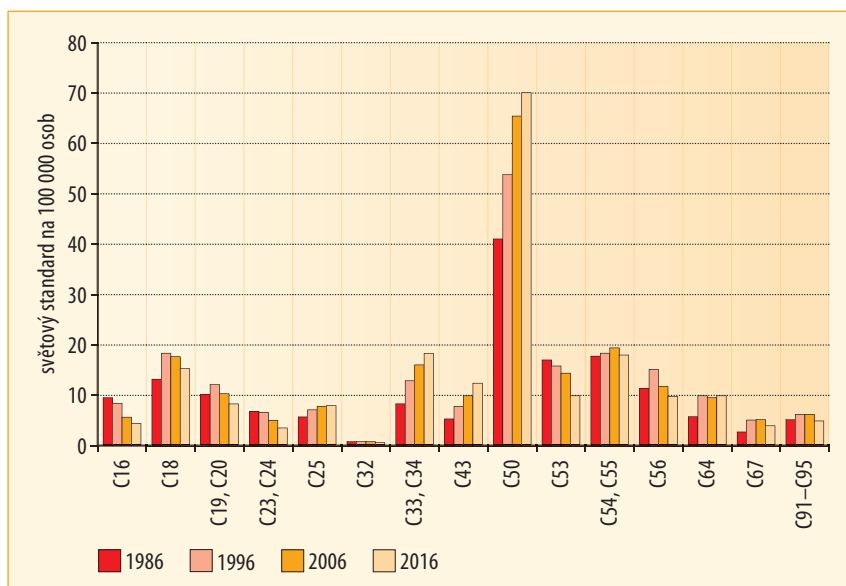
1.1 ÚVOD

V rozvinutých zemích došlo od začátku 20. století k výrazné změně v dynamice příčin úmrtí v populaci. Zatímco na začátku minulého století souvisely nejčastější příčiny úmrtí s infekčními onemocněními, nádorové onemocnění bylo příčinou smrti pouze v řádu jednotek procent a kardiovaskulární onemocnění přibližně u 10 % případů. Otázkou zůstává správná diagnostika těchto onemocnění v daném období. V nynější době je tomu právě naopak. Nemoci srdce a oběhové soustavy jsou příčinou přibližně jedné třetiny úmrtí v populaci a stejný podíl představují rovněž nádorová onemocnění. Příčin tohoto jevu je několik: objev antimikrobiálních přípravků, zlepšená diagnostika a obecně pokroky v medicíně, kvalita socioekonomického prostředí a s tím související vyšší průměrná délka dožití člověka.

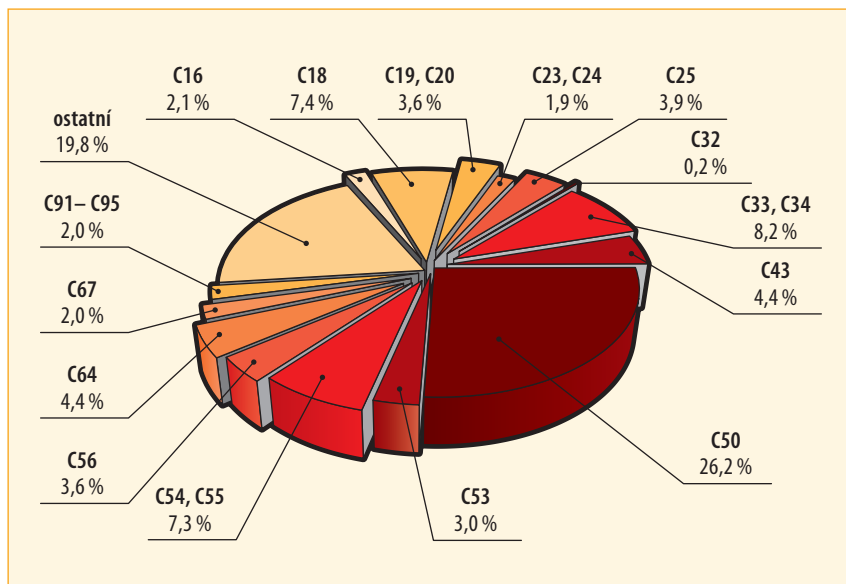
Nejčastějšími zhoubnými novotvary (ZN) v České republice jsou nemelanomové nádory kůže. V závislosti na pohlaví se u žen suverénně setkáváme se ZN prsu (diagnóza C50 dle Mezinárodní klasifikace nemocí), následované ZN dělohy a ZN průdušek a plic (obr. 1.1 a 1.2). U mužů je nejčastější onkologickou diagnózou ZN prostaty (diagnóza C61 dle Mezinárodní klasifikace nemocí), dále ZN průdušek a plic a na třetí pozici ZN tlustého střeva (obr. 1.3 a 1.4).

1.2 MECHANISMY VZNIKU A RŮSTU NÁDORŮ

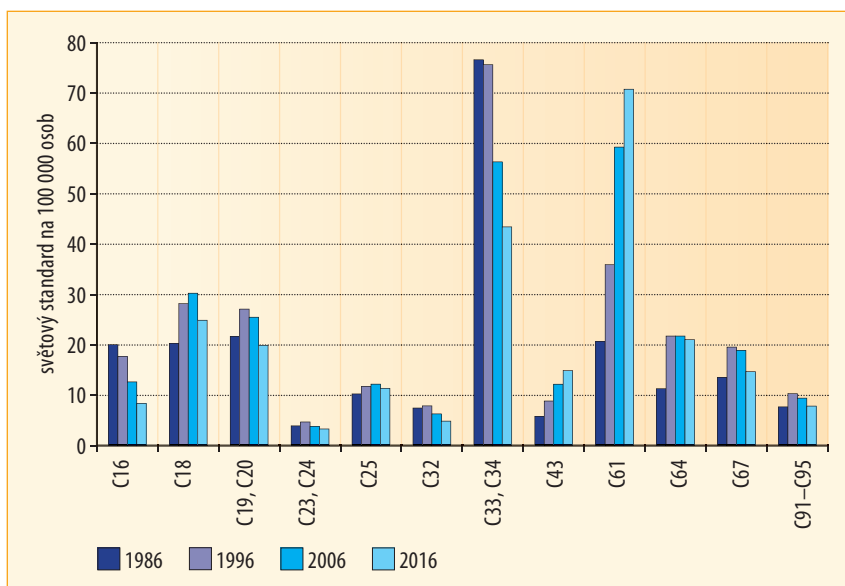
Nádor je definován jako abnormální, geneticky podmíněná, zpravidla monoklonální proliferace jedné progenitorové buňky. V takto nově vzniklé mase tkáně dochází k deregulaci fyziologicky probíhajících metabolických drah, prodloužení životaschopnosti buňky a kvantitativní diferenační poruše, tedy určitému stupni blokády plného funkčního vyžívání ve všech fenotypových znacích.



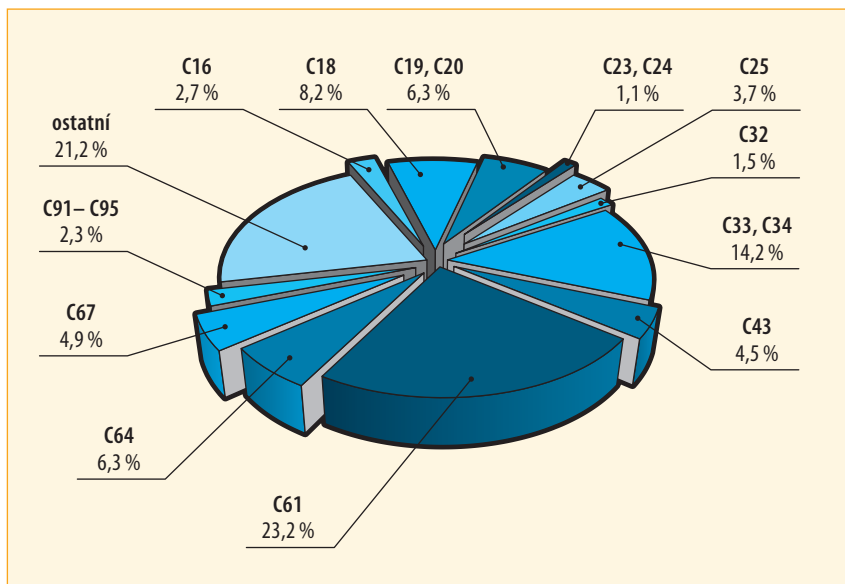
Obr. 1.1 Incidence zhoubných novotvarů u žen dle diagnózy (zdroj: ÚZIS ČR)



Obr. 1.2 Struktura hlášených zhoubných novotvarů u žen v roce 2016 dle diagnózy (zdroj: ÚZIS ČR)



Obr. 1.3 Incidence zhoubných novotvarů u mužů dle diagnózy (zdroj: ÚZIS ČR)



Obr. 1.4 Struktura hlášených zhoubných novotvarů u mužů v roce 2016 dle diagnózy (zdroj: ÚZIS ČR)

■ Tabulka 1.1 Změny probíhající v rámci kancerogeneze

Genetické změny	aktivace protoonkogenu na onkogen			
	inhibice nádorových supresorových genů			
	porucha mechanismu oprav poškozené DNA	oprava chybného párování bází		
		nukleotidová excizní oprava		
		bázová excizní oprava		
oprava dvouřetězcových zlomů DNA		HR	NHEJ	
Epigenetické změny	geny regulující apoptózu			
	methylace DNA			
	posttranslační modifikace histonů	fosforylace		
		ubikvitinace		
		methylace a demethylace		
acetylace a deacetylace				
změny v expresi miRNA				
Fenotypové změny	genomová nestabilita			
	nezávislost na růstových signálech buňky	geny <i>MYC</i> , <i>Ras</i> , <i>LC3</i> , <i>Beclin-1</i> ; CDK, FGFR, IGF		
	ztráta zpětně vazebné a kontaktní inhibice buněk			
	indukce procesu angiogeneze	TNF- α , VEGF, FGF, PDGF, HGF, integriny, interleukiny, angiopoetiny		
	neomezený replikační potenciál	telomeráza, shelterin; geny <i>TP53</i> a <i>RB</i>		
	poškození mechanismu apoptózy	proapoptotické a antiapoptotické proteiny		
	únik z imunitního dozoru			
	invasze do okolní tkáně, angioinvasze a metastazování	epitelo-mezenchymová tranzice		

CDK – cyklin-dependentní kináza, FGFR – fibroblastový růstový faktor, HGF – růstový faktor hepatocytů, HR – homologní rekombinace, IGF – inzulinu podobný růstový faktor, NHEJ – nehomologní spojení konců, PDGF – destičkový růstový faktor, TNF – tumor nekrotizující faktor, VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor

Mechanismus vzniku nádorů (kancerogeneze) představuje komplexní mnohastupňový proces, který zahrnuje *změny genetické, epigenetické a fenotypové* (tab. 1.1). Průběh kancerogeneze a růstu nádoru rozdělujeme do tří stadií:

- **Iničiační stadium** je zahájeno *alterací funkce regulačních genů*. Mezi tyto regulační geny řadíme *protoonkogeny, supresorové geny, geny ovlivňující apoptózu a geny zajišťující reparaci poškozené DNA*. Genetické změny probíhají na úrovni nukleotidů či karyotypu. Následné selhání kontrolních mechanismů buněčného cyklu (reparace chybného párování, reparace rekombinací) vůči působení fyzikálních, chemických či biologických mutagenů vede k neletálním změnám genomu (genomová nestabilita). Spolu s přítomností imunokompetentních buněk má pak nestabilita genomu zásadní vliv na vznik a progresi nádorového onemocnění.
- **Stadium promoce** představuje dělení nádorově transformované buňky, způsobené vymizením zpětně vazebné a kontaktní buněčné inhibice. Zpočátku je stadium reverzibilní, později ireverzibilní. Výsledkem je hromadění poškozených klonů buněk. Na průběhu promočního stadia se obdobně jako ve stadiu progresu podílejí změny epigenetické či negenotoxické.
- **Progrese** nádorového onemocnění je dána diverzitou subklonu nádorové tkáně s doprovodnou kumulací dalších genových a epigenetických změn a deregulačních mechanismů (transkripční faktory).

Protoonkogeny regulují buněčný růst, diferenciaci, proliferaci i programovanou buněčnou smrt – apoptózu. V důsledku jejich aberantní aktivace vznikají dominantní mutantní alely, tzv. *onkogeny*, stimulující nekontrolované buněčné dělení. Abnormální aktivace protoonkogenů na onkogeny může být způsobena bodovou mutací, zvýšením počtu kopií / amplifikací genu, translokací genů do transkripčně aktivního místa či fúzí genů na základě chromozomální přestavby. Mezi nejvýznamnější protoonkogeny, uplatňující se při vzniku karcinomu mléčné žlázy, patří například geny pro protein HER2/neu/ErbB2, receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), cyklin-dependentní kinázy (CDK), PI3K, MYC, Ras, PTEN, AKT1, mTOR, MAPK, STAT3, PLC γ či PKC.

Nádorové supresory můžeme rozdělit na strážce genomu („gatekeepers“) a dozorčí geny („caretakers“). V obou případech se jedná o recesivní geny, inhibující rozvoj nádoru. Zatímco mutace genů strážců genomu vedou k nádorové transformaci uvolněním mechanismů inhibujících buněčnou proliferaci, v případě dozorčích genů k tomu dochází vlivem ztráty integrity genomu a schopnosti poškozené geny opravovat. Význam nádorových supresorů při vzniku hereditárních nádorových onemocnění popisuje Knudsonova teorie. Z nádorových supresorů hrají důležitou roli v patogenezi karcinomů mléčné žlázy například geny *BRCA1/2, TP53, PTEN, ATM, RB1, LKB, NM23 (NME1), NISCH* či *CDKN2A* pro protein p16.

Epigenetické změny jsou hereditárně podmíněné a reverzibilní procesy. Zahrnují převážně změny methylace DNA (methylace CpG promotorů regu-

lačních genů prostřednictvím DNA methyltransferáz; geny *DNMT1*, *DNMT3a* a *DNMT3b*), posttranslační modifikaci histonů (fosforylace, ubikvitinace, methylace/demethylace, acetylace/deacetylace) a alteraci exprese mikroRNA s onkogenní či nádorově supresorovou funkcí. Identifikace těchto epigenetických změn a modulace detekovaných epigenetických regulátorů má v onkologii slibný prognostický a prediktivní potenciál.

Růst nádoru je umožněn získáním několika vlastností, které v roce 2000 poprvé popsali a v roce 2011 doplnili autoři Hanahan a Weinberg. Mezi tyto vlastnosti patří:

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

Pro udržení **integrity genomu**, správný průběh buněčného cyklu, rozdělení a přežití normálních buněk jsou nezbytné funkční **mechanismy oprav poškozené DNA**. Ty zahrnují opravu chybného párování bází (mismatch repair, MMR), nukleotidovou a bázovou excizní opravu (nucleotide excision repair, NER; base excision repair, BER) či opravu dvouřetězcových zlomů DNA cestou homologní rekombinace (HR) nebo nehomologním spojením konců (NHEJ). Poškození DNA nejprve vede k aktivaci senzorů poškození, přenašečů signálu a regulátorů transkripce (protein p53 a jeho cílové proteiny). Teprve až sekundární odezvou na poškození DNA je apoptóza. Kromě proteinu p53 (gen *TP53*) patří mezi důležité strážce genomu také proteiny reparace chybného párování (proteiny MMR), které iniciují apoptózu mutacemi poškozených buněk až po selhání oprav DNA. K dalším genům regulujícím opravu poškozené DNA patří například *MPPED2*, *BRCA1/2*, *PTEN* a *lncRNA* či *mikroRNA*.

Nezávislost na růstových signálech je dána aktivací receptorů pro růstové faktory. Vedou k ní genové alterace a nadměrná exprese či zvýšená autokrinní produkce růstových faktorů. Výsledkem je trvalý přenos mitogenních signálů do jádra buňky s následnou transkripcí DNA a stimulací buněčného cyklu. Centrální úlohu má v tomto procesu rodina *transkripčních faktorů MYC*, která se podílí na regulaci exprese proteinové i nekódující RNA a tím na řízení ústředních drah buněčného metabolismu, apoptózy, proliferace a diferenciaci i ovlivnění mechanismů lékové rezistence. Aktivace *protoonkogenu MYC* na onkogen byla prokázána u řady nádorových onemocnění. Stěžejní pro regulaci buněčného dělení je rovněž aktivace *protoonkogenu Ras*, stimuluje kinázy PI3K či RAF serin/threonin kinázy. MAPkinázová mitogenní kaskáda dále reguluje *transkripční faktor AP-1*. Ten se podílí na řízení buněčného cyklu mimo jiné aktivací genů pro *cyklin D1*

(*CCND1*), který spolu s CDK4/6 zajišťuje průběh G1 fáze buněčného cyklu. Cílené ovlivnění *genů autofagie LC3 a Beclin-1* inhibicí cyklinu D1 a genů signální dráhy uPAR/integrin β 1/Src vede u „triple“ negativních karcinomů mléčné žlázy (TNBC) k útlumu buněčné proliferace, migrace a schopnosti invaze.

Schopnost buňky vyvarovat se abnormálnímu dělení závisí na **funkci zpětně vazebných regulačních mechanismů**, jež zajišťují apoptóza a mechanismus zkracování telomer. Geny regulující *programovanou buněčnou smrt – apoptózu*, za účelem ochrany organismu před dělením poškozených buněk, mají funkci proapoptotickou i antiapoptotickou. Porucha iniciace apoptózy může být způsobena jak aberantní aktivací exogenní cesty (eliminace regulačního vlivu imunokompetentních buněk), tak endogenní cesty (přežívání a dělení nádorových buněk navzdory poškození DNA). V patogenezi karcinomů mléčné žlázy se uplatňují geny *APAF1*, *DAPK1* s proapoptotickou funkcí a geny *BCL-2*, *PSMC3IP*, *EPSTII* s protiapoptotickou funkcí.

Neomezený replikační potenciál nádorových buněk souvisí s *poruchou funkce telomer*. Telomery představují nukleoproteinové komplexy na koncích chromozomů s opakující se sekvencí DNA bohatou na guanin (TTAGGG). Zabraňují ztrátám a aberantním fúzí chromozomů v průběhu dělení buňky. Délka telomer je udržována pomocí reverzní transkriptázy (telomerázy) a bílkovinného komplexu telomer (shelterin). Zvýšená aktivita telomeráz byla zjištěna až u 85 % nádorů. Cílené ovlivnění katalytické podjednotky telomeráz (hTERT) je aktuálně zkoumána především v souvislosti s imunoterapií pokročilých karcinomů nejen mléčné žlázy.

Nádorová angiogeneze je umožněna stimulací novotvorby cév z kapilárního řečiště v okolí nádoru a přísunem endotelií z cirkulujících endotelových progenitorových buněk kostní dřene. Cílem neovaskularizace je přísun živin a růstových faktorů nezbytných pro vyvíjející se nádor a následně k invazi nádorových buněk do krevních či lymfatických cév a metastazování. Angiogenní faktory mohou být produkovány doprovodnou zánětlivou populací i buňkami nádorového stromatu (viz níže).

Schopnost invaze a migrace nádorové buňky je stimulována snížením či vymizením proteinů intercelulárních spojů, k čemuž dochází mutací jejich genů, hypermethylací promotoru, potlačením transkripce či proteolytickou degradací. Tyto vlastnosti vysvětluje teorie *epitelo-mezenchymové tranzice* (epiteliálně-mezenchymového přechodu, *EMT*).

1.3 HISTOLOGICKÁ STAVBA NÁDORŮ

Nádory jsou tvořeny nádorovým parenchymem a mezenchymovým nádorovým stromatem. **Nádorový parenchym** představuje vlastní nádorovou tkáň. Heterologie nádorového parenchymu je odvozena z metaplazie indukované jiným patologickým procesem, embryonálních odchylek nebo nádorové transformace buněk. Nádorové buňky vykazují určitý stupeň atypií, jimiž reflektují své biolo-

gické chování. Patří mezi ně změny ve velikosti a tvaru buněk ve smyslu zvětšení a ztráty formy či polarizace nádorových buněk, zvýšení bazofilie cytoplasmy podmíněné zmnožením ribozomálních RNA či změny ve struktuře cytoskeletu buňky. Jaderné atypie zahrnují zvětšení s posunem nukleocytoplasmatického poměru ve prospěch jádra, zmnožení, hyperchromazii v důsledku odlišné konformace a zmnožení DNA, zmnožení a zvětšení nukleolů a nakonec i změny ve struktuře chromatinu či karyolemy. **Nádorové stroma** poskytuje výživu proliferujícím nádorovým buňkám. Představuje také pasivní podporu pro růst nádoru a transportní médium pro přenos humorálních mezibuněčných signálů. Svůj původ má v hostitelském organismu. Růst nádorového stromatu koreluje se zvětšujícím se rozsahem nádorového parenchymu. Sestává z pojivové tkáně, cév a zánětlivých elementů (lymfocyty, plasmocyty, makrofágy, NK buňky), jakožto součásti protinádorové imunitní odpovědi organismu. Neovaskularizace je dána působením matrixových metalo-proteáz (MMP) aktivovaných tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF- α), s uvolněním dalších proangiogenních faktorů (vaskulární endotelový růstový faktor, VEGF; transformující růstový faktor α , TGF- α ; růstový faktor fibroblastů, FGF a hepatocytů, HGF; destičkový růstový faktor, PDGF; destičkový endotelový růstový faktor, PD-EGF; integriny, interleukiny, IL-1, IL-6, IL-8, a angiopoetiny), ale i inhibičních faktorů ke zpětnovazebné regulaci (například trombospondin, angiostatin, endostatin, tumstatin, tkáňové inhibitory metaloproteáz). Nádorové stroma často podléhá sekundárním patologickým procesům jako je hyalinní dystrofie proliferujícího vaziva, intracelulární depozice hyalinu ve formě Russelových tělísek či nekróza.

1.4 MAKROFÁGY ASOCIOVANÉ S NÁDORY

Makrofágy představují buněčnou součást vrozené imunity. Jejich hlavní funkce spočívá ve schopnosti fagocytózy, prezentace antigenu a produkce cytokinů či modulátorů zánětlivé odpovědi. Působením cytokinu interferonu gamma (IFN- γ) vznikají tzv. prozánětlivé makrofágy typu M1. Interleukiny (IL-4, IL-13) jsou naopak zodpovědné za existenci protizánětlivých makrofágů typu M2, které podporují jak hojení a regenerace tkání, tak infiltrují nádory. V literatuře se setkáváme s označením makrofágy asociované s nádory (tumor-associated macrophages, TAM). Aktivované TAM jsou známé produkcí pronádorových molekul a ligandů epidermálního růstového faktoru – EGFR (epidermální růstový faktor, EGF; onkostatin M, heparin vázající růstový faktor podobný EGF) a rovněž i schopností ovlivňovat signální dráhu PD-1/PD-L1. TAM mají velmi blízký vztah k fibroblastům asociovaným s nádory (TAF), které aktivují. Aktivované TAF se recipročně starají o migraci monocytů a jejich diferenciaci v TAM produkci interleukinů (IL-6, IL-8, IL-10), transformujícího růstového faktoru beta – TGF- β , faktoru 1 stimujícího kolonie makrofágů (M-CSF) a ligandu chemokinů (Ccl2). Produkce TGF- β a IL-10 vede k navození imunoprese, podpoře

nádorového růstu a angiogeneze. U karcinomů mléčné žlázy je prognostický dopad míry infiltrace TAM ovlivněn hormonálním profilem nádoru. U hormonálně dependentních nádorů jsou TAM považovány za nepříznivý prognostický ukazatel, kdežto u nádorů s „triple“ negativním imunofenotypem je tomu naopak. Nejnovější studie navíc prokazují význam cirkulujících monocytů podobných makrofágům typu M2, odrážejících progresi nádorového onemocnění.

1.5 FIBROBLASTY ASOCIOVANÉ S NÁDORY

Fibroblasty jsou buňky, které se vyvíjejí převážně z mezodermy, v menším počtu také neuroektodermy. Za fyziologických okolností jsou fibroblasty zodpovědné za tvorbu extracelulární matrix (ECM) a kolagenu, které zajišťují integritu tkání. Podílejí se tak i na organogenezi a diferenciaci epitelu. Nezastupitelnou pozici mají mimo jiné v rámci imunitního systému, kde retikulární buňky fibroblastů (FRCs) vytvářejí dráhu pro migraci leukocytů a antigenů k rozpoznání. Fibroblasty asociované s nádory (TAF) jsou spolu s endoteliemi, pericyty a buňkami imunitního systému (lymfocyty, plasmocyty, makrofágy) důležitou součástí nádorového stromatu a jsou považovány za klíčové elementy podporující růst a metastazování nádorových buněk. TAF tvoří heterogenní populace buněk se specifickým expresním profilem. Účinkem hypoxie, oxidačního stresu a růstových faktorů dochází k aktivaci TAF fibroblasty a vřetenitými buňkami původní nenádorové tkáně, mezenchymovými kmenovými buňkami či cirkulujícími fibrocyty, které vycestovaly z kostní dřeně, ale i hladkými svalovými buňkami, tukovými buňkami a epitelovými buňkami v rámci procesu epitelálně-mezenchymového přechodu (EMT). Vznik TAF je přisuzován ireverzibilní aktivaci Cre rekombinázy. TAF exprimují markery fibroblastů (protein specifický pro fibroblasty, FSP; protein aktivující fibroblasty, FAP; podoplanin, PDPN), myofibroblastů (hladkosvalový aktin alfa, α -SMA; vaskulární endotelový růstový faktor, VEGF; desmin), růstových faktorů (transformující růstový faktor beta, TGF- β ; hepatocytární růstový faktor – „scatter factor“, HGF; růstový faktor fibroblastů, bFGF; epidermální růstový faktor, EGF; destičkové růstové faktory alfa a beta, PDGFR α , PDGFR β) a jsou asociovány s alterací genů, regulujících proteiny buněčného růstu (stromelysin-1 – SL-1, thrombospondin-1 – Tsp-1, tenascin-C – Tn-C, protein S100A4). Produkci různých faktorů vedou TAF k degradaci ECM a stimulují angiogenezi. Jejich vliv byl prokázán i na metabolismus buňky. V této souvislosti byl zjištěn význam snížené exprese fokální adhezivní kinázy (FAK), jež vede ke zvýšené aktivaci ligandů chemokinů (Ccl6, Ccl11, Ccl12) a pentraxinu-3 za účelem zesílení anaerobní glykolýzy v nádorových buňkách.

Do popředí zájmu se TAF dostávají zejména v souvislosti s jejich cíleným ovlivněním v rámci protinádorové terapie. Výzkumy jsou zaměřeny především na redukci počtu FAP pozitivních TAF, díky níž dochází v nádoru k urychlení

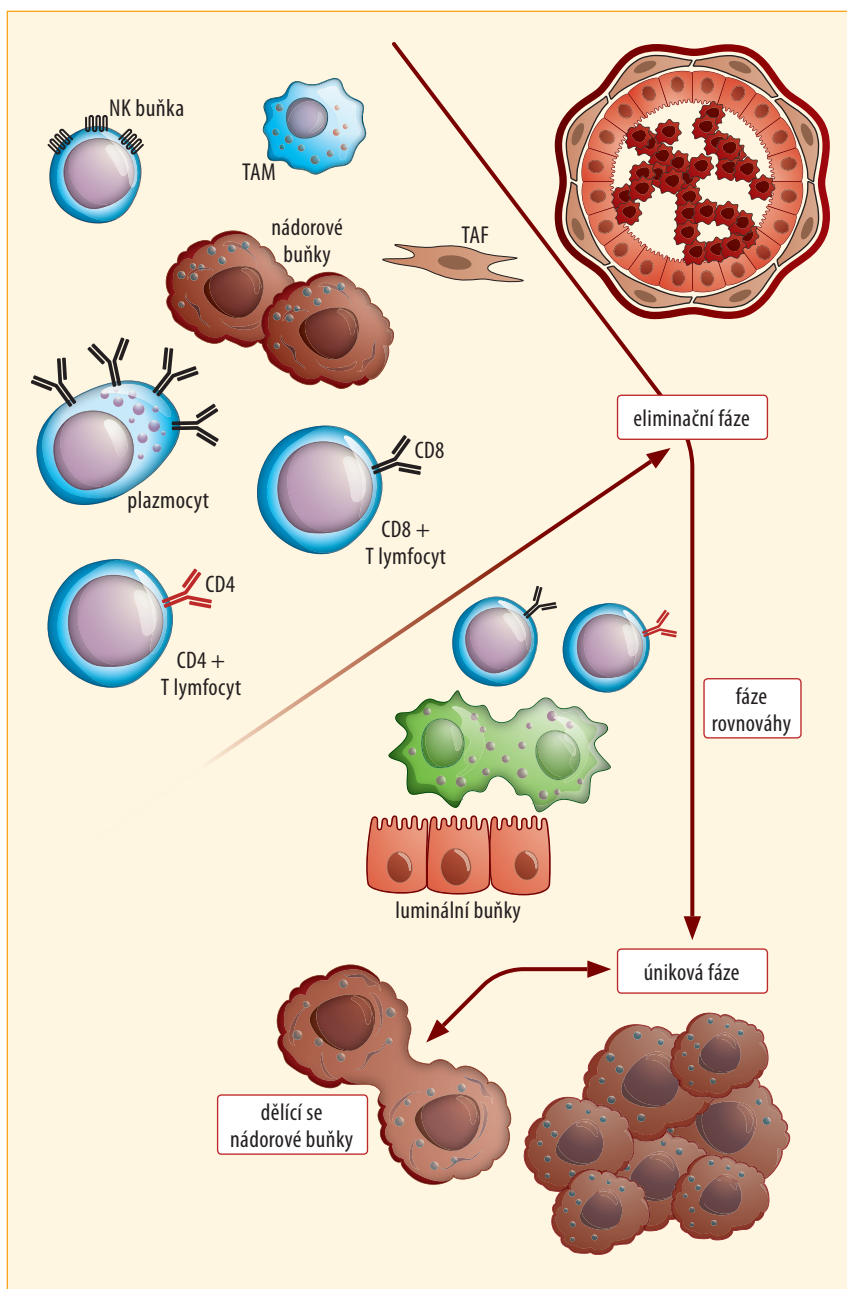
regresivních změn, přílivu hojných cytotoxických CD8 pozitivních T lymfocytů, a tudíž i ke zvýšené odpovědi na aplikovanou chemoterapii. Synergický účinek byl pozorován s inhibitory PD-L1. Dále se uvažuje o cílené terapii inhibující produkci IL-6 a TGF- β .

1.6 ÚLOHA IMUNITNÍHO SYSTÉMU V KANCEROGENEZI

Nedávné objevy ukázaly, že selhání nebo přeprogramování imunitní odezvy má v patogenezi vzniku a růstu nádorů zásadní roli. Vzájemnou interakci mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem hostitele popisuje termín „cancer immunoediting“. Tento termín vyjadřuje jakýsi dynamický vztah mezi nádorem a imunitním systémem hostitele. Zaměřuje se na význam nádorového mikroprostředí a na mechanismy umožňující nádorům unikat z *imunitního dozoru*. Na imunitním dozoru nádorů se podílí jak vrozená, tak získaná imunita. Průběh je rozdělen do tří fází:

- fáze eliminační
- fáze rovnováhy mezi hostitelem a nádorem
- fáze únikové

Tumor infiltrující lymfo-/plasmocyty (TIL) jsou v různé intenzitě spolu s TAM, NK buňkami i TAF standardní součástí nádorového mikroprostředí. Po interakci TCR receptoru CD8 pozitivních T lymfocytů s antigeny prezentovanými hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) I. třídy dochází k iniciaci jejich cytotoxické odpovědi a počáteční eliminaci nádorových buněk. Ty se však prostřednictvím nízké exprese molekul MHC I. třídy, ztráty exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 či inhibicí apoptózy dokážou před cytotoxickými T lymfocyty i NK buňkami efektivně maskovat a imunitnímu dozoru tak uniknout. Produkci TGF- β a IL-10 navíc navozují nádorové buňky, TAM a myeloidní supresorové buňky v nádoru lokální imunosupresi. Zvýšená exprese transmembránového receptoru Fas (z rodiny TNF-receptorů), byla zaznamenána u 16–20 % hormonálně dependentních, 29 % „HER2-enriched“ a 49 % TNBC. Navázáním solubilního membránového ligandu cytotoxických T lymfocytů CD95L (FasL) dochází k tvorbě komplexu DISC a spuštění vnější apoptotické dráhy k destrukci T lymfocytů. Současné hodnocení receptoru Fas a intenzity CD8 pozitivních T lymfocytů se u TNBC jeví jako důležitý prognostický ukazatel. Detekce solubilního ligandu v krevním séru může rovněž předpovídat metastatický potenciál nádoru. Obecně lze říci, že intenzita protinádorové imunitní odpovědi koreluje s delším celkovým přežitím (overall survival; OS) pacientů, delším obdobím bez vytvoření metastáz (metastasis-free survival; MFS) či bez relapsu onemocnění (relapse-free survival; RFS) (obr. 1.5).



Obr. 1.5 Buněčné komponenty účastníci se imunitních reakcí v nádorech (zdroj: MUDr. Kolečková, www.biorender.com); TAF – fibroblasty asociované s nádory, TAM – makrofágy asociované s nádory

1.7 VÝZNAM EPITELO-MEZENCHYMOVÉ TRANZICE

Epitelo-mezenchymová tranzice (EMT) je dynamický proces, při kterém dochází ke změně epitelového fenotypu na fenotyp mezenchymový. EMT má významnou úlohu při morfogenezi orgánů (typ I), regeneraci a reparaci tkání v místě jejich poškození (typ II) i metastatickém rozsevu primárních epitelových nádorů (typ III).

1.7.1 Epitelo-mezenchymová tranzice I. typu

EMT I. typu zahrnuje všechny tranzice, které se odehrávají v průběhu vývoje embrya. Největší význam má v období utváření trofoblastu (stadium blastocysty) a gastrulace, kde je klíčová pro správnou diferenciaci všech tří zárodečných listů. Poprvé byla popsána americkou bioložkou Elizabeth Dexter Hay v roce 1995 na embryu kuřete. EMT I. typu je řízená převážně molekulami Wnt signální dráhy (proteiny rodiny TGF- β), produkovanými časnými zárodečnými organizéry (například Spemannovým-Mangoldovým organizérem), spolu s receptory pro fibroblastový růstový faktor (FGF), transkripčními faktory Snail, Eomes a Meps a dále proteiny BMP, c-Myb a MSX1. Deficit těchto proteinů z rodiny TGF- β je asociován s různými vývojovými abnormalitami mezodermy.

1.7.2 Epitelo-mezenchymová tranzice II. typu

EMT II. typu je vícestupňový proces, spojený s hojením ran, regenerací či reparací tkání. EMT je indukována zánětlivou reakcí v místě poškození tkáně a naopak ukončena až jejím vymizením. V rámci procesu *hojení ran* dochází nejprve ke slepení rány fibrinem a migraci neutrofilů do místa poškození. Později jsou neutrofilové nahrazeny makrofágy, které aktivují fibroblasty. Spolu s endoteliemi krevních cév jsou fibroblasty podkladem pro vznik nespecifické granulační tkáně. Díky produkci kolagenu a postupným vymizením zánětlivých buněk vzniká buněčnější jizva, která se po asi 4 týdnech mění v kolagenní jizvu. *Regenerace tkání* je charakterizována funkční i strukturální obnovou poškozené tkáně. U dospělých jedinců mají tuto možnost pouze tkáně obsahující kmenové buňky. *Reparaci* tkání se rozumí náhrada původní tkáně méněcenným vazivem v rámci remodelace nově vzniklé mezibuněčné hmoty.

1.7.3 Epitelo-mezenchymová tranzice III. typu

Aberantní aktivace EMT je esenciální pro progresi primárních epitelových nádorů, jež je spojena s reverzibilní transformací nádorových buněk do mnoha fenotypů (obr. 1.6). EMT představuje geneticky a molekulárně striktně regulovaný proces, při němž dochází ke ztrátě typických vlastností epitelového fenotypu (těsné mezibuněčné spoje a buněčná koheze, apiko-bazální polarizace buněk) a nabytí