

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



MUDr. Marek Sochor

**EXPRESSE A PROGNOŠTICKÝ VÝZNAM mikroRNA U PACIENTEK S ČASNÝM KARCINOMEM
PRSU**

**EXPRESSION AND PROGNOŠTIC VALUE OF microRNAs IN PATIENTS WITH EARLY BREAST
CANCER**

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Praha, 2018

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Liberci, 2.7.2018

Marek Sochor

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

SOCHOR, Marek. *Expres a prognostický význam mikroRNA u pacientek s časným karcinomem prsu. [Expression and prognostic value of microRNAs in patients with early breast cancer]*. Praha, 2018. 141 s., 1 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta. Školitel Doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

PODĚKOVÁNÍ:

Chtěl bych poděkovat všem kolegům, se kterými jsem na projektu spolupracoval.

Jmenovitě prof. MUDr. Tomáši Stopkovi, PhD za spolupráci na experimentálním designu projektu, analýze a interpretaci získaných dat a za dlouhodobý výzkum role mikroRNA u nádorových onemocnění, který umožnil zahájení a dokončení předkládané práce.

Dále RNDr. Petře Bašové, PhD za precizní zpracování vzorků sér, stanovení hodnot exprese mikroRNA, analýzu a interpretaci získaných dat.

Velké poděkování patří také RNDr. Michalu Peštovi, PhD, MSc za návrh statistického zpracování a analýzu získaných dat.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé školitelce Doc. MUDr. Petře Tesařové, CSc. za dlouhodobý profesionální vliv na mou klinickou i experimentální práci. Její odborné zkušenosti a znalosti jsou široké a jejich interpretace a aplikace v každodenním kontaktu s pacienty příkladná.

Maximální dík patří mému přednostovi MUDr. Jiřímu Bartošovi, MBA za inspirativní, klidné a přátelské pracovní prostředí, které významně pomáhá v práci i životě.

SPOLUPRÁCE NA PROJEKTU:

MUDr. Marek Sochor – návrh a rozpracování projektu, sběr vzorků, léčba a sledování pacientek, vedení dokumentace, příprava rukopisů k publikaci

Prof. MUDr. Tomáš Stopka, PhD – experimentální design, analýza dat

RNDr. Petra Bašová, PhD – příprava vzorků, měření mikroRNA, analýza dat

RNDr. Michal Pešta, PhD, MSc – statistická analýza, matematické modely

OBSAH:

PROHLÁŠENÍ	2
IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM	3
PODĚKOVÁNÍ	4
SPOLUPRÁCE NA PROJEKTU	5
OBSAH	6
Seznam použitých zkratk	8
Abstrakt	10
Abstract	11
1. Všeobecný úvod	12
1.1 Karcinom prsu	12
1.1.1 Epidemiologie a diagnostika	12
1.1.2 Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu	16
1.1.3 Dělení karcinomu prsu	17
1.1.4 Prognostické markery	18
1.1.4.1 Klinické prognostické markery	19
1.1.4.2 Histopatologické prognostické markery	20
1.1.4.3 Biochemické markery	22
1.1.4.4 Molekulární prognostické markery	23
1.2 mikroRNA	24
1.2.1 mikroRNA obecně	24
1.2.2 Vznik a mechanismus účinku mikroRNA	26
1.2.3 Detekční a normalizační techniky stanovení mikroRNA	28
1.2.4 Mechanismy uvolnění mikroRNA do cirkulace	29
1.2.5 Výzvy a limitace výzkumu a využití mikroRNA	31
1.2.6 mikroRNA u karcinomu prsu	34
1.2.6.1 Působení mikroRNA na jednotlivé stupně patogeneze karcinomu prsu	36
1.2.6.2 mikroRNA a jejich použití jako biomarkery	47
1.2.7 Cílové mikroRNA projektu	50
1.2.7.1 miR-155	50
1.2.7.2 miR-24	51

1.2.7.3 miR-19a	53
1.2.7.4 miR-181b	54
1.2.7.5 let 7a	55
2. Hypotéza a cíle dizertační práce	56
2.1 Podklady pro zformulování hypotézy	56
2.2 Hypotéza	57
2.3 Konkrétní cíle navazující na hypotézu	57
3. Pacienti a metody	58
3.1 Soubor pacientek a zdravých kontrol	58
3.1.1 Základní charakteristiky souboru pacientek a kontrol	58
3.1.2 Rozdělení souboru a kohort ke statistickému zpracování	59
3.2 Sběr a zpracování krve	63
3.3 Zpracování vzorků, extrakce a kvantifikace mikroRNA	63
3.4 Statistické metody	66
4. Výsledky	68
4.1 Expresse onkogenních mikroRNA v séru v jednotlivých fázích léčby	68
4.2 Expresse onkogenních mikroRNA v tumorech karcinomu prsu	72
4.3 Vývoj onkogenních miR v závislosti na vstupní hodnotě exprese	74
4.4 Expresse onkogenních mikroRNA podle rizikové skupiny a vývoj v závislosti na léčbě	75
4.5 Vliv a význam hodnocení počtu a kombinací jednotlivých onkogenních miR	77
4.6 Expresse onkogenních mikroRNA a význam ve stanovení prognózy karcinomu prsu	79
4.7 Multivariantní analýza exprese mikroRNA a klinicko-patologických markerů	83
4.8 Využití generalizovaného lineárního modelu k určení pravděpodobnosti relapsu EBC	85
5. Diskuze	87
6. Shrnutí závěrů dizertační práce	101
7. Použitá literatura	102
8. Publikace autora	140
9. Přílohy	141

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

ATM – **A**taxia **T**eleangiectasia **M**utated

Apaf-1 – **A**popotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor **1**

CA 15-3 – **C**arbohydrate **A**ntigen **15-3**

CDH1 – **C**adherin-**1**

CEA – Karcinoembryonální antigen (**C**arcinoembryonic **A**ntigen)

CHEK2 – **C**heckpoint **k**inase **2**

CISH – chromogenní *in-situ* hybridizace (**C**hromogenic *in-situ* **h**ybridization)

CSC – **C**ancer **S**tem **C**ell (nádorová kmenová buňka)

CTC – cirkulující nádorové buňky (**C**irculating **T**umor **C**ells)

ctDNA – cirkulující nádorová DNA (**C**irculating **T**umor **DNA**)

cDNA – komplementární DNA (**c**omplementary **DNA**)

DFS – přežití bez známek nemoci (**D**isease **F**ree **S**urvival)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (**D**eoxyribonucleic **A**cid)

DTC – diseminované nádorové buňky (**D**isseminated **T**umor **C**ells)

EBC – časný karcinom prsu (**E**arly **B**reast **C**ancer)

EGF – epidermální růstový faktor (**E**pidermal **G**rowth **F**actor)

EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor (**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor)

EMT – epiteliálně-mezenchymální tranzice (**E**pithelial to **M**esenchymal **T**ransition)

ER – estrogenové receptory (**E**strogen **R**eceptors)

FIH – **F**actor inhibiting **HIF1** (faktor inhibující HIF1)

FISH – fluorescenční *in-situ* hybridizace (**F**luorescent *in-situ* **h**ybridization)

GEE – **G**eneralized **E**stimating **E**quation (zobecněná odhadovací rovnice)

GLM – **G**eneralized **L**inear **M**odel (zobecněný lineární model)

HER2 – lidský epidermální receptor-2 (**H**uman **E**pidermal **R**eceptor-2)

HER2/neu – gen pro lidský epidermální receptor-2

HIF1alfa – **H**ypoxia inducible **f**actor **1**alfa (hypoxií indukovatelný faktor 1alfa)

HR – hormonální receptory (**H**ormonal **R**eceptors)

Hsa – **H**omo **s**apiens

IHC – imunohistochemie (**I**mmunohistochemistry)

Ki-67 – proliferační index

LU, LN – lymfatická uzlina (**L**ymphatic **N**ode)

mRNA – mediátorová **RNA** (**m**essenger **RNA**)

NGS – **n**ext **g**eneration **s**equencing (sekvenování nové generace)
OS – celkové přežití (**O**verall **S**urvival)
PALB2 – **P**artner **A**nd **L**ocalizer of **BRCA2**
PCR – polymerázová řetězová reakce (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)
PDCD-4 – **P**rogrammed **C**ell **D**eath **4**
PFS – přežití bez progresu (**P**rogression **F**ree **S**urvival)
PgR – progesteronové receptory (**P**rogesteron **R**eceptors)
PTEN – **P**hosphatase and **T**ensin homolog
RECK – **R**eversion-inducing cysteine-rich protein with **k**azal motifs
RISC – **R**NA **I**nduced **S**ilencing **C**omplex
RNA – ribonukleová kyselina (**R**ibonucleic **A**cid)
RT-qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (**R**eal **T**ime **Q**uantitative **P**olymerase **C**hain **R**eaction)
STK11 – **S**erine **T**hreonine **K**inase **11**
SPRY2 – **S**prouty homolog **2**
SPRY1/2 – **S**prouty homolog **1/2**
TGF – **T**ransforming **G**rowth **F**actor
TNBC – trojitě negativní karcinom prsu (**T**riple-**N**egative **B**reast **C**ancer)
TP53 – **T**umor **P**rotein **p53**
TPS – Tkáňově specifický polypeptidový antigen (**T**issue **P**olypeptide **S**pecific antigen)
UTR – nepřekládaná oblast (**U**ntranslated **R**egion)
XIAP – **X**-linked inhibitor of **a**poptosis **p**rotein

ABSTRAKT

Karcinom prsu je nejčastější zhoubné nádorové onemocnění žen, které je z hlediska prognózy velice heterogenní. Časný karcinom prsu má celkově vynikající prognózu s dlouhodobým přežitím přes 90%. V této skupině se však vyskytují pacientky s vysoce nepříznivým vývojem a rizikem budoucího návratu nemoci. Vzhledem k účinným možnostem protinádorové léčby, je hlavním úkolem správného léčebného rozhodování určení rizika relapsu zhoubného onemocnění. Ke stanovení prognózy máme k dispozici markery klinické (velikost nádoru, postižení uzlin) a patologické (grade, ER, PgR, HER2 a Ki-67), všechny vykazují nízkou individuální specifitu a senzitivitu. Molekulární testy založené na vícegenném hodnocení DNA nebo RNA vykazují vyšší senzitivitu a specifitu, ale jejich vzájemná shoda je nízká. Jedním z hlavních směrů výzkumu karcinomu prsu je hledání dostatečně specifických a senzitivních prognostických biomarkerů.

MikroRNA jsou malé, vysoce stabilní, nekódující RNA, které ovlivňují současně desítky mRNA a proteinů uvnitř buněk. V kancerogenezi mohou fungovat jako onkogeny nebo tumor supresorové geny a ovlivňují základní děje vzniku a udržení nádorového procesu. Jedním ze směrů výzkumu mikroRNA je jejich využití jako prognostické biomarkery. Bylo publikováno mnoho prací, které definovaly jejich využitelnost při určení prognostického rizika časného karcinomu prsu s velice rozdílnými daty.

Námi předkládaný projekt hodnotil expresi miR-155, miR-24, miR-181b a miR-19a v séru pacientek s časným karcinomem prsu v závislosti na různých fázích léčby. Všechny miR vykazovaly v době diagnózy významně vyšší hodnoty exprese oproti zdravým kontrolám. Po operačním odstranění nádoru a adjuvantní léčbě došlo k jejich poklesu a byla patrná tendence k normalizaci hodnot exprese všech miR s různou dynamikou. Pacientky ve skupině vysokého rizika měly významně vyšší expresi onkogenních miR v porovnání s pacientkami nízkého rizika a vykazovaly opožděný a méně hluboký pokles jednotlivých miR po protinádorové léčbě. U pacientek nízkého rizika docházelo po onkologické léčbě k normalizaci exprese mikroRNA, na rozdíl od pacientek vysokého rizika. Sérové hodnoty miR-155 a miR-24 významně zlepšovaly predikci pravděpodobnosti relapsu nemoci nezávisle na ostatních parametrech. Jediný marker, který zpřesňoval hodnocení rizika relapsu spolu s miR-155 a miR-24, je exprese proliferčního indexu Ki-67 > 20%. V multivariantské analýze jsme prokázali, že vliv chemoterapie, radioterapie a hormonoterapie na změny exprese miR-24, miR-155 a relapsy onemocnění nebyl signifikantní. Hodnoty miR-24 a miR-155 tak mohou představovat skutečný nezávislý prognostický biomarker.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer in women and is prognostically very heterogeneous. Early breast cancer has an excellent overall prognosis with long-term survival above 90%. In this group we can also find patients with highly unfavourable progress with a risk of future disease relapse. Due to effective anticancer treatment is a main task of precise clinical decision to determine risk of an individual patient in the term of cancer relapse. We can use clinical (tumor diameter, lymph nodes) and pathological markers (grade, ER, PgR, HER2, and Ki-67), all of them have low individual sensitivity and specificity. Molecular tests based on multigene DNA or RNA assays have higher sensitivity and specificity but their interrelated concordance is low. One of the main scientific task is to find almost specific and sensitive prognostic biomarkers.

microRNAs are small, highly stable, non-coding RNAs, which regulate tens of mRNAs and proteins inside cells. In cancerogenesis, they could act as oncogenes or tumor suppressors as well and affect main steps of initiation and progression of cancer. One of the scientific directions is to determine their prognostic significance. Many experimental and clinical studies defining prognostic significance of miRs in early breast cancer was published but their data were very different.

Our project analyzed expression of miR-155, miR-24, miR-181b a miR-19a in sera of patients with early breast cancer. All miRs were significantly over-expressed in time of diagnosis in comparison to healthy controls. After surgical tumor removal and adjuvant therapy declined and normalized expression of all miRs with different dynamics. High-risk patients had significantly higher expression of miRs in comparison with low-risk group. Patients in high-risk group had slower and less profound decline of miRs after anticancer treatment. Low-risk patients normalized miRNAs expression after anticancer treatment, but this wasn't visible in high-risk group. Serum expression of miR-155 and miR-24 improved prediction of cancer relapse independently of the other parameters. Only expression of Ki-67>20% specified relapse probability along with expression of miR-155 and miR-24. In multivariate analysis we confirmed that neither of chemotherapy, radiotherapy and hormonal therapy were able to significantly change expression of miR-24, miR-155 and affect disease relapse. Serum expression of miR-24 and miR-155 could act as independent prognostic biomarkers.

1. Všeobecný úvod

1.1 Karcinom prsu

1.1.1 Epidemiologie a diagnostika

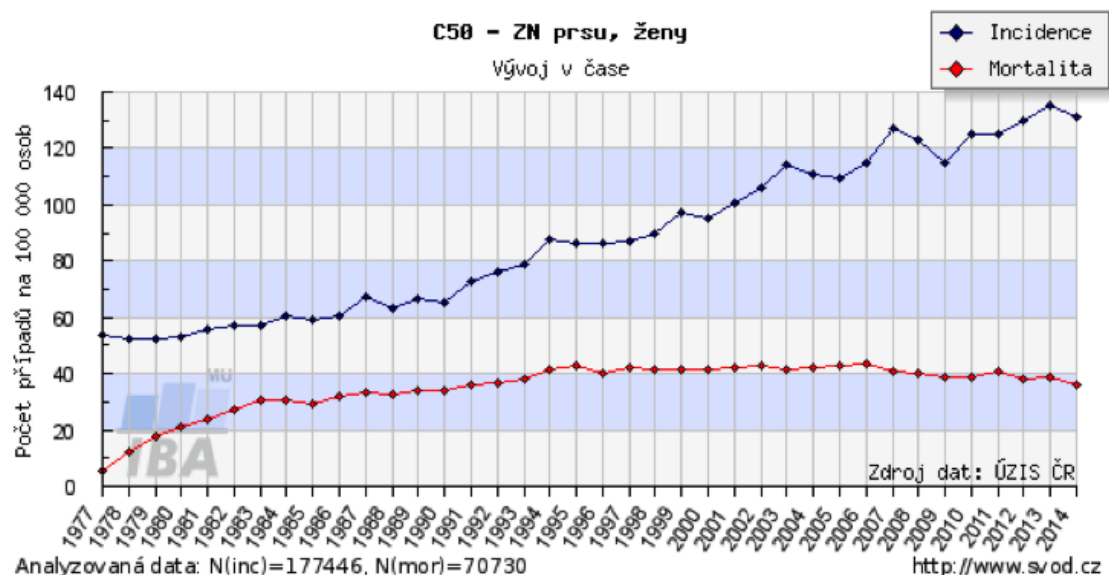
Karcinom prsu je nejčastější zhoubný nádor u žen a je zároveň nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění žen. Jeho incidence byla v roce 2014 v České republice 130/100 000 žen, což ročně představuje přibližně 7000 nových případů (obr. 1). Incidence vzrůstá s věkem, s maximem mezi 6. a 7. deceniem, ale nevyhýbá se ani ženám do 40. roku života, které tvoří asi 5% z celkového počtu nádorů prsu. Incidence karcinomu prsu setrvale vzrůstá od 70. let 20. století, v posledních letech je pozorovatelné oplošťování strmosti vzestupu. Od začátku 90. let narostl počet záchytů ve stádiu I, které nyní tvoří kolem 50% všech nově diagnostikovaných nádorů. Pokles incidence je pozorovatelný ve stádiu II a III, stádium IV je relativně stabilní v poměru asi 10% všech nových nádorů prsu (obr. 2). Nárůst klinického stádia I je dán zavedením screeningu karcinomu prsu a obecnou osvětou.

Mortalita vykazuje od roku 1995 stabilní hodnotu s mírným poklesem v posledních 5 letech. V roce 2014 zemřelo na karcinom prsu 3000 žen. Pravděpodobnost úmrtí na karcinom prsu je kolem 1 na 36 (3%) a je významně závislá na klinickém stádiu (obr. 3-6). Pokles celkové mortality se vysvětluje větším poměrem klinického stádia I v době diagnózy nádoru a zlepšením komplexní onkologické léčby časného karcinomu prsu. Klinické stádium IV je definitivně nevléčitelné, všechny postupy proto míří k tomu, abychom efektivně bránili jeho vzniku z časných karcinomů.

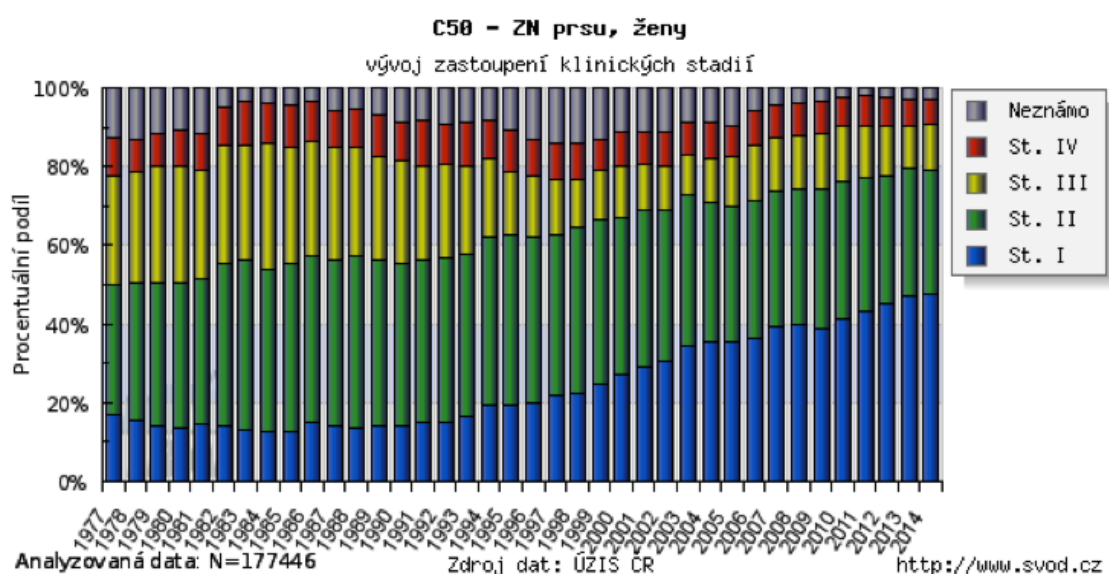
Diagnostika karcinomu prsu je v současnosti možná klinicky a zobrazovacími metodami pomocí mamografie, magnetické rezonance a ultrazvuku. Mamografie, která je standardem a je užívána jako screeningová metoda, vykazuje vysokou falešnou pozitivitu i negativitu (Kerlikowske K. et al., 2013). Magnetická rezonance je metoda s významně vyšší specificitou a senzitivitou, ale její rutinní použití není z hlediska reálné dostupnosti a ceny možné. Rezervujeme ji pro pacientky s vysokým dědičným rizikem (nosičky mutace v *BRCA 1/2*) a pacientky s nekonkluzivními nálezy na mamografii a ultrazvuku (Kilburn-Toppin F. et al., 2013). Vzhledem k tomu, že přežití a prognóza pacientek s karcinomem prsu významně závisí na velikosti nádoru a rozsahu postižení lymfatických uzlin, je jeho detekce v co nejčasnějším stádiu zcela esenciální. Snaha o nalezení nových senzitivnějších a specifitějších metod časně

detekce, včetně těch molekulárních, je důležitým faktorem, který může zlepšit prognózu pacientek s karcinomem prsu (De Abreu FB. et al., 2013).

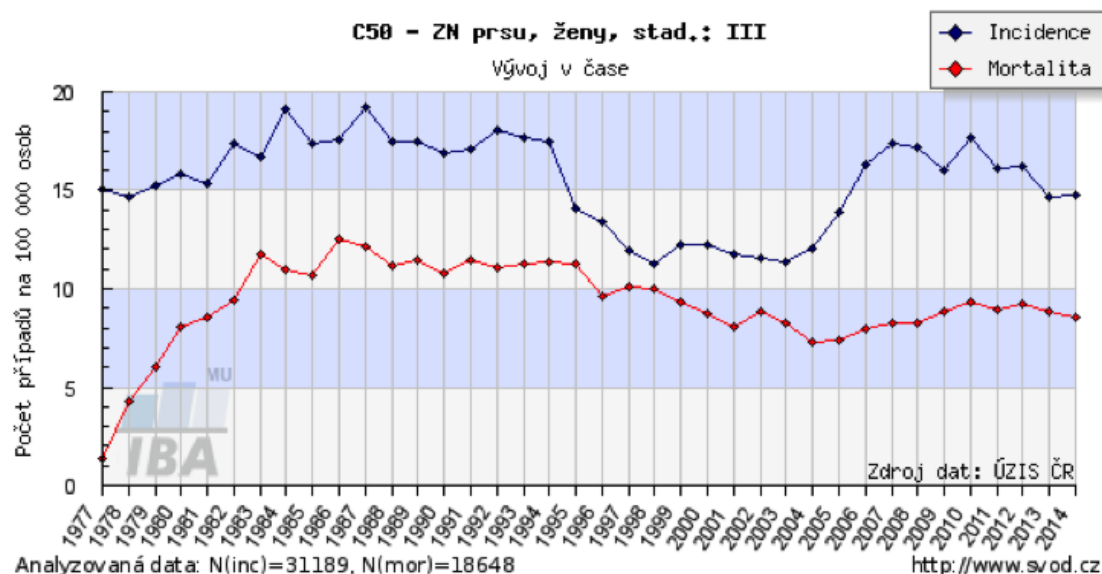
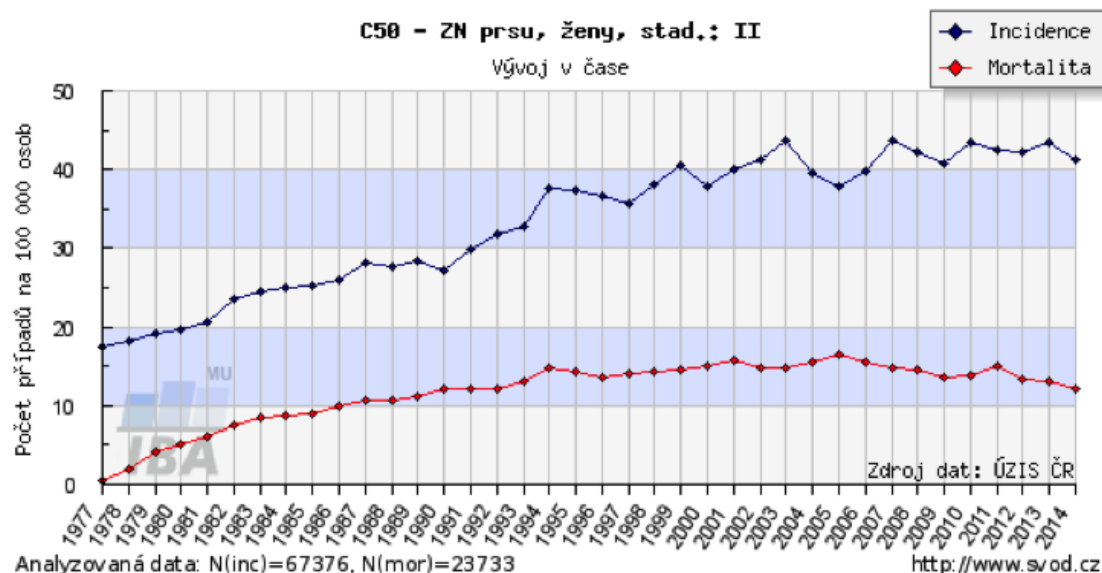
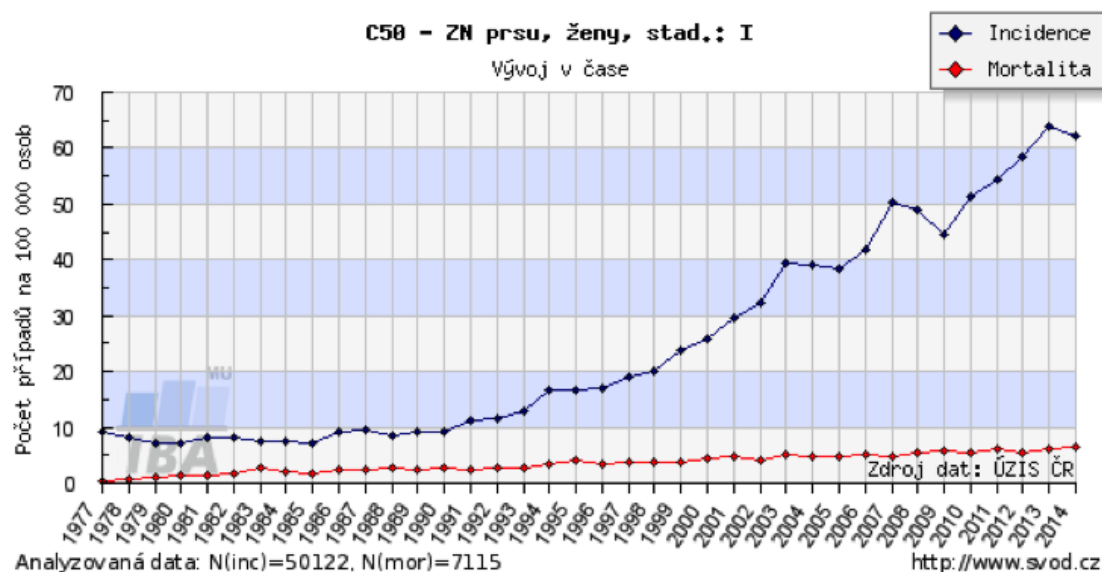
Obr. 1: Incidence a mortalita karcinomu prsu (zdroj: www.svod.cz)

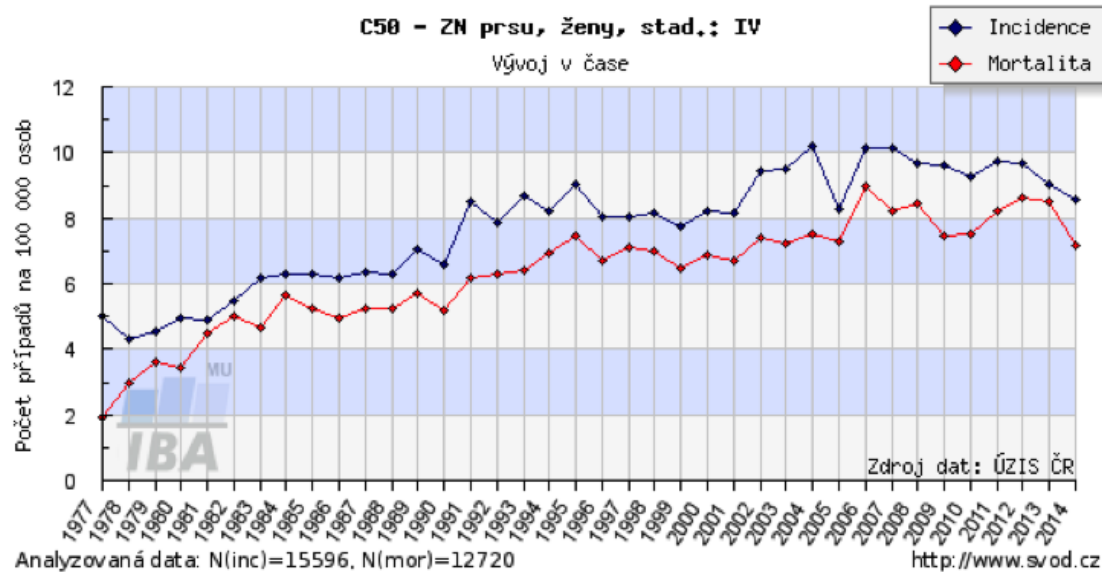


Obr. 2: Zastoupení jednotlivých klinických stádií karcinomu prsu v době diagnózy (zdroj: www.svod.cz)



Obr. 3-6: Incidence a mortalita karcinomu prsu podle klinických stádií v době diagnózy (zdroj: www.svod.cz)





V současnosti definujeme několik hlavních směrů výzkumu, které mohou vést ke snížení mortality na karcinom prsu. Jsou to 1) zlepšení detekce nádoru v časnějších fázích a identifikace vysoce rizikových pacientek, 2) stanovení prediktivních biomarkerů rezistence k hormonální terapii a anti-HER2 terapii, 3) stanovení biomarkerů k odlišení subtypů a léčebných možností trojitě negativního karcinomu prsu a 4) definice prognostických biomarkerů a biomarkerů časně detekce metastatického onemocnění.

1.1.2 Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu

Většina karcinomů prsu vzniká spontánně, nakupením náhodných mutací a epigenetickými vlivy, mezi geneticky podmíněné patří 10%-15% nádorů. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu je mezi 8%-12% podle populace. Hlavními rizikovými faktory jsou ženské pohlaví a věk, riziko s věkem roste. Obecně lze rizikové faktory rozdělit na rodinné, životního stylu a genetické. Některé jsou ovlivnitelné (užívání hormonů, obezita, alkohol, kojení), jiné nikoliv (rodinná anamnéza, genetické faktory, menarché, menopauza).

Důležitým rizikovým faktorem je zvýšená expozice k estrogenním hormonům, které vedou ke zvýšené proliferaci mamární tkáně. Zvýšená expozice estrogenům je spojená s časnou menarché, pozdní menopauzou, nuliparitou, pozdním věkem první gravidity, délkou kojení a užíváním postmenopauzální hormonální substituce. Významně zvýšené riziko při užívání hormonální antikoncepce nebylo prokázáno, naopak antikoncepce představuje ochranný faktor pro vznik karcinomu vaječnicků.

Mezi další rizikové faktory patří rodinná a osobní anamnéza karcinomu prsu a vaječnicků, denzní prsní žláza, benigní prsní onemocnění, anamnéza ozáření hrudníku v dětském věku a adolescenci, obezita, nedostatek pohybu a zvýšené užívání alkoholu.

Mezi geneticky podmíněné faktory patří mutace v celé řadě genů s různě vyjádřeným rizikem - *BRCA1* a *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *p53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*. Pacientky s geneticky podmíněnými karcinomy prsu mají zvýšené riziko vzniku již od druhého decenia. Nejvyšší riziko je u pacientek s mutacemi v genech *BRCA1/2*, proteiny produkované těmito geny slouží k opravě dvouřetězcových zlomů DNA. Při jejich chybění dochází k poruše oprav zlomů DNA a zvýšené genomové nestabilitě vedoucím ke vzniku nádorů. Mutace v genech *BRCA1/2* představují přibližně 20%-25% hereditárních karcinomů prsu a 5%-10% všech karcinomů prsu (Easton DF. et al., 1999, Campeau PM. et al., 2008). Riziko vzniku karcinomu prsu při mutaci *BRCA1* vzrůstá na 55%-65% a *BRCA2* na 45%-55% do 70 let věku (Antoniou A. et al., 2003, Chen S. et al., 2007). Mezi geny získávající pozornost z hlediska rizika vzniku karcinomu prsu se v posledních letech dostal tumor supresorový gen *PALB2*. Gen *PALB2* produkuje protein, který spolupracuje s proteiny *BRCA 1/2* při opravách dvouřetězcových zlomů DNA. Riziko vzniku karcinomu prsu je u *PALB2* mutace 33% do 70 let věku (Antoniou AC. et al., 2014). Mutace v ostatních genech zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu pouze nevýznamně oproti populačnímu průměru (Walsh T. et al., 2006).

1.1.3 Dělení karcinomu prsu

Karcinom prsu se dělí do klinických stádií podle TNM klasifikace, která rozlišuje základní charakteristiky – T (tumor), N (uzliny) a M (metastázy) a kombinuje je do klinických stádií s významně odlišnou prognózou (obr. 3-6). Aktuálně je platná 7. klasifikace dle AJCC z roku 2010 (American Joint Committee on Cancer, www.cancerstaging.net) (tab. 1).

Časný karcinom prsu, který je předmětem předkládaného projektu, je definovaný jako “karcinom *in situ* nebo invazivní karcinom, lokalizovaný v prsní žláze a/nebo svodných lymfatických uzlinách a zahrnuje klinická stádia I, IIA, IIB, IIIA” (www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=446564).

Tab. 1: Rozdělení do klinických stádií dle AJCC 7. edice 2010 (zdroj www.cancerstaging.net)

0	Tis	N0	M0	IIIA	T0	N2	M0
IA	T1	N0	M0		T1	N2	M0
IB	T0	N1mi	M0		T2	N2	M0
	T1	N1mi	M0		T3	N1	M0
IIA	T0	N1	M0		T3	N2	M0
	T1	N1	M0	IIIB	T4	N0	M0
	T2	N0	M0		T4	N1	M0
IIB	T2	N1	M0		T4	N2	M0
	T3	N0	M0	IIIC	jakékoli T	N3	M0
				IV	jakékoli T	jakékoli N	M1

1.1.4 Prognostické markery

Karcinom prsu je velice heterogenní onemocnění, morfologicky, molekulárně, prognosticky a léčebně (Polyak K. et al., 2011). Prognóza je určena hlavně klinickým stádiem v době diagnózy, molekulárními a patogenetickými charakteristikami onemocnění, nádorovou heterogenitou a efektivitou léčebných modalit. Může se významně lišit histopatologie nejenom mezi různými pacientkami (interindividuální heterogenita), ale také molekulární nálezy mezi primárním nádorem a metastázami, mezi různými lokalitami metastáz (intraindividuální heterogenita) a v rámci primárního nádoru (intratumorová heterogenita). Tato heterogenita je dále modifikována epigeneticky, stavem imunity a absolvovanou léčbou.

Riziko relapsu onemocnění nemá konstantní průběh v čase, ale vykazuje dva výrazné vrcholy, které jsou patrné 1,5-2 roky od diagnózy a 5 let od diagnózy, poté se postupně snižuje (Jatoi I. et al., 2005). Obecně platí, že nádory bez exprese HR mají tendenci relabovat časněji, mezi 2.-3. rokem od diagnózy a nádory s expresí HR mezi 5.-10. rokem (Demicheli R. et al., 2010, Hague R. et al., 2012).

Časný karcinom prsu má jako celek vynikající prognózu, nicméně v této skupině existují pacientky s vysokým rizikem návratu nemoci. U pacientek s vysokým rizikem budoucího relapsu onemocnění je indikovaná intenzivnější protinádorová léčba, zpravidla kombinovaná chemo(bio)terapie, před nebo pooperačně. Pacientky s nízkým rizikem návratu nemoci je vhodné řešit méně agresivní a méně intenzivní onkologickou protinádorovou léčbou. Snaha o precizní určení prognózy jednotlivých pacientek je vedena vysokou toxicitou cytostatik s možnými trvalými následky. Co nejpřesnější stanovení prognózy u konkrétní pacientky v době záchytu onemocnění, je tak jedním z hlavních kroků ke skutečně individualizované léčbě karcinomu prsu.

Prognostické markery lze rozdělit do několika skupin s různou závažností a silou - klinické, histopatologické, biochemické a molekulární. Mezi klinické faktory patří věk, stav menopauzy a klinické stádium v době diagnózy. Mezi histopatologické zahrnujeme histologický typ, stupeň diferenciací (grading), vaskulární, lymfatickou a perineurální invazi, proliferační aktivitu, expresi ER, PgR a HER2 antigenu, resp. amplifikaci *HER2/neu* genu (Blows FM. et al., 2010). Kombinace klinických a histopatologických prognostických markerů určuje rizikové skupiny na jejichž základě jsou definována léčebná doporučení (Coates AS. et al., 2015, www.nccn.org).

Klinické a histopatologické markery přinášejí nezanedbatelná rizika při jejich prognostickém hodnocení, která je třeba mít na paměti a která komplikují individuální rozhodování. Jejich

prognostická síla je velice rozdílná, stejný marker může mít odlišnou prognostickou hodnotu u různých molekulárních subtypů karcinomu prsu a rozdílná je jejich nezávislá prognostická síla a významnost v kombinacích (Harris L. et al., 2007).

V posledních letech se, spolu s definováním molekulárních subtypů karcinomu prsu, začínají rozvíjet molekulární prognostické a prediktivní metody, zatím jsou nejdále genomické multigenové eseje. Jejich prognostický význam zatím nedosahuje síly, která je nutná při individualizovaném plánování komplexní onkologické léčby.

Shrnuto, dosavadní známé klinicko-patologické a molekulární markery jsou pouze částečně nezávislé jeden na druhém a významně selhávají u konkrétních pacientek a jejich senzitivita a specifita jsou nízké (Viale G. et al., 2012, Schnitt SJ. et al., 2010). Pacientky s podobnými kombinacemi rizikových faktorů vykazují velice rozdílné léčebné výsledky a prognózu. Hledání nových prognostických a prediktivních markerů s dostatečnou senzitivitou a specificitou je tak, vedle hledání nových léčebných molekul, aktuálně hlavním směrem výzkumu karcinomu prsu.

1.1.4.1 Klinické prognostické markery

Hlavní klinickou determinantou prognózy je klinické stádium v době diagnózy, to je definované velikostí tumoru a postižením svodných lymfatických uzlin.

Celkové 5leté přežití karcinomu prsu ve stádiu I je kolem 87% (10ti leté přežití 78%-85%), stádiu II 68% (10ti leté přežití 52%-66%), stádiu III 41% (10ti leté přežití 28%-36%) a stádiu IV 10% (10ti leté přežití 0%-7%) (Siegel RL. et al., 2016, DeSantis C. et al., 2014).

Velikost nádoru určuje přežití nezávisle na ostatních parametrech, pacientek s nádory do 1 cm přežívá 90%-95%, s nádory 2-3 cm přežívá 65%. Riziko postižení lymfatických uzlin je u T1a-b nádorů 5%-15%, T1c 27%-39% a T2 a více 29%-57% (Siegel RL. et al., 2016).

Desetileté přežití pacientek s negativními lymfatickými uzlinami (LU), nezávisle na velikosti nádoru, je kolem 75%. Průměrné 5ti a 10ti leté přežití při N1 postižení je 62% a 38% a při N2 postižení je 32% a 13%. Přežití při postižení 1 LU se příliš neliší od přežití při negativních LU. Pacientky s negativními LU a nádory T1a-b přežívají bez recidivy 10 let v 91% a s nádory T1c přežívají bez recidivy v 83% (DeSantis C. et al., 2014). Mikrometastázy v lymfatických uzlinách vykazují přežití podobné jako při nepostižení LU, proto je management pacientek řešen podobně jako u negativních LU.

1.1.4.2 Histopatologické prognostické markery

Histopatologické prognostické markery představují histologický typ, grading, lymfatická, vaskulární a perineurální propagace. Pomocí imunohistochemie se dále stanovuje exprese estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR) v jádře, proliferační index Ki-67 a HER2 receptor (Hammond ME. et al., 2011). HER2 pozitivita se dourčuje amplifikací *HER2/neu* genu pomocí *in-situ* hybridizace (FISH, CISH) (Wolff AC. et al., 2013). Kombinací histopatologických markerů získáme základní terapeuticky odlišitelné podskupiny – 1) trojitě negativní karcinom (TNBC) (ER, PgR a HER2 negativní), 2) ER/PgR pozitivní a 3) HER2 pozitivní. Nejvíce kontroverzí je při rozhodování o protinádorové onkologické léčbě a její intenzitě u luminálních nádorů (ER/PgR pozitivní, HER2 negativní), které z prognostického hlediska dále rozlišujeme podle proliferačního indexu Ki-67 (Cheang MCU. et al., 2009). Hodnota exprese Ki-67 jako hranice mezi “luminal A” a “luminal B” je v současnosti 20%-29% (Coates AS. et al., 2015). Podskupina luminal A má prognózu vynikající, zatímco luminal B odpovídá prognosticky spíše HER2 pozitivnímu karcinomu. Intenzita léčby a aplikace chemoterapie se u luminálních podtypů karcinomu prsu mezi různými zeměmi významně liší (Coates AS. et al., 2012, Regan MM. et al., 2008).

Důležitým nezávislým histopatologickým prognostickým markerem je stupeň diferenciacie nádoru. Stupeň diferenciacie je jedním ze základních prognostických markerů užitých například v doporučeních St. Gallen Consensus Conference (Coates AS. et al., 2015). Pětileté přežití pacientek s nádory grade I je 90% oproti 53% u žen s grade III, desetileté přežití u grade I je 79% a grade III 25% (Rakha EA. et al., 2010, Schwartz AM. et al., 2014).

Mezi imunohistochemické prognostické markery zahrnujeme stanovení exprese hormonálních receptorů (ER, PgR), proliferačního indexu Ki-67 a HER2 receptoru.

Pozitivita hormonálních receptorů je přítomna přibližně u 60%-75% karcinomů prsu. Samotná pozitivita ještě nepredikuje účinnost hormonální léčby, která se liší podle menopauzálního stavu, pokročilosti nádoru, fáze léčby, proliferační aktivity a dalších. Stejně jako u dalších imunohistochemických metod je patrná výrazná heterogenita exprese HR uvnitř nádoru, jejich stanovení je tak zatíženo určitou chybou. Prognosticky vykazují pacientky s nádory s pozitivitou HR lepší přežití a bývá méně časté postižení lymfatických uzlin (Prat A. et al., 2013, Sestak I. et al., 2013). Pacientky s HR pozitivními nádory a postiženými LU vykazují lepší přežití než pacientky s HR negativními nádory a negativními LU. Pětileté přežití je kolem 74% u HR pozitivních a 55% u HR negativních pacientek, inverzně to platí pro pravděpodobnost recidivy (33% vs 56%) (Romain S. et al., 1995). Existuje korelace mezi pozitivitou HR a gradingem

nádoru, nádory grade I bývají HR pozitivní kolem 90% a nádory grade III kolem 50%. Negativita HR také předpovídá vyšší proliferační index Ki-67. Trojitě negativní karcinomy jsou nádory s vysoce nepříznivou prognózou a vysokým rizikem relapsu nemoci. U těchto nádorů nelze využít cílené modality léčby, hormonální nebo antiHER2. Aktuální výzkum se zaměřuje na definování podskupin TNBC pomocí molekulárních metod, určení převládajících signálních cest udržujících nádor a vývoj specifické cílené terapie (Masuda H. et al., 2013, Lehmann BD. et al., 2011).

Nález onkogenu *HER2/neu (c-erbB2)* a jeho významu v patogenezi, prognóze a léčebném ovlivnění znamenal zásadní průlom v managementu karcinomu prsu. Produkt genu je homologní s proteinem EGFR exprimovaným na některých buňkách karcinomu prsu, který vytváří vazebné místo pro celou řadu růstových faktorů (EGF, TGF). Zvýšená exprese nebo amplifikace HER2 bývá častější u HR negativních nádorů, nádorů s vyšší proliferační aktivitou a vyšším gradingem. Z toho vyplývá častější postižení lymfatických uzlin, kratší interval přežití bez progresu a nižší celkové přežití. Změnu prognózy znamenalo zavedení monoklonálních protilátek proti HER2 (trastuzumab, pertuzumab), které významně zlepšují přežití pacientek s časným i pokročilým karcinomem prsu.

Posledním histopatologickým prognostickým markerem je proliferační index Ki-67. Jeho prognostická síla je v multivariantních analýzách nezávislá na ostatních parametrech, exprese Ki-67 představuje významný nezávislý prognostický marker a vysoké hodnoty zvyšují riziko recidivy a predikují benefit cytotoxické chemoterapie (de Azambuja E. et al., 2007, Criscitello C. et al., 2014). Imunohistochemické stanovení proliferační aktivity pomocí Ki-67 je zatížené vysokou variabilitou a chybovostí, užitím různých metod a setů, intratumorovou heterogenitou exprese a dalšími (Viale G. et al., 2008). Studie porovnávající různé vysoce akreditované laboratoře vykazovaly neshodu v hodnocení exprese až ve 30%. Obtížné je také stanovení konkrétní hodnoty exprese určující vysoké riziko, protože ta vykazuje kontinuální distribuci (Denkert C. et al., 2014). Analytické a preanalytické postupy stanovení exprese Ki-67 nejsou standardizované a porovnání hodnot exprese mezi různými laboratořemi není možné, je snaha o jejich standardizaci, ale zatím bez výsledku (Polley MY. et al., 2013). Různé multiparametrické genomické eseje, uvedené v dalším textu, obsahují geny reflektující proliferační aktivitu a prognostické informace plynoucí z těchto molekulárních metod vycházejí z velké části právě z proliferace.

1.1.4.3 Biochemické markery

Mezi biochemické markery řadíme CA 15-3 (Carbohydrate antigen 15-3) a CEA (Carcinoembryonic antigen). Jejich předpovědní hodnota je nízká, vykazují nízkou senzitivitu i specifitu a využitelnost u časného karcinomu prsu je velice omezená. Hladina CA 15-3 bývá zvýšena přibližně u 10% pacientek se stádiem I a 20% pacientek ve stádiu II (Duffy MJ. et al., 2010). Další sérový marker CEA vykazuje ještě nižší senzitivitu a specifitu (Guadagni F. et al., 2001). Hladiny CEA a CA 15-3 mohou být falešně zvýšené 6-12 týdnů po zahájení protinádorové terapie z důvodu lékově indukované destrukce buněk (Duffy MJ. et al., 2010). Vzhledem k neznámému poločasu CA 15-3 a CEA, neodpovídá monitorování jejich hladin dostatečně přesně dynamice nemoci, efektu terapie a prognóze (Wu SC. et al., 2010). Nízká specifita je dokumentována relativně častou elevací CEA a CA 15-3 u jiných malignit, ale i běžných zánětů a ostatních komorbidit (Wang JH. et al., 2010). Současné postavení CEA a CA 15-3 je v monitoraci metastatického karcinomu prsu, spolu s dalšími klinickými a zobrazovacími metodami (Harris L. et al., 2007).

1.1.4.4 Molekulární prognostické markery

Rozhodování o adekvátní léčbě u časného karcinomu prsu determinují, vedle klinických a histopatologických charakteristik, v posledním desetiletí molekulární prognostické markery (Sotiriou T. et al., 2009). Multigenové prognostické eseje vycházejí z genomického profilování, které definovalo pět základních podtypů karcinomu prsu – luminal A, luminal B, HER2, basal-like a claudin-low (Sorlie T. et al., 2001, Eroles P. et al., 2011, Prat A. et al., 2011). Propojení genomických a transkriptomických metod sledujících vliv aberací v počtu kopií (somatic copy number aberrations) v transkriptomu, umožnilo charakterizaci dokonce 10 molekulárních podskupin (IntClusts 1-10) (Curtis C. et al., 2012, Dawson SJ. et al., 2013). Jednotlivé molekulární subtypy se významně liší prognosticky a lze z nich odvodit i citlivost k různým typům léčby.

Základ multigenových esejí tvoří geny estrogenové a progesteronové signalizace, geny proliferace a další genové klastry podle jejich významu u karcinomu prsu (Bastien RR. et al., 2012). Jejich významné omezení je v tom, že některé významné klinicko-patologické faktory (velikost tumoru, stav uzlin) nemají molekulární genový korelát a nejsou tak v genových esejích zahrnuté (Gyorffy B. et al., 2015). Druhým omezením je to, že nebyly identifikovány nové silné prognostické geny mimo estrogenovou signalizaci a proliferaci a pokud ano, tak s pouze malou prognostickou silou. I přes uvedené limitace lze považovat standardizované

komplementární informace získané z multigenových prognostických esejí za pozitivní přínos ke klinicko-patologickým prognostickým markerům. Z hlediska konkrétního pacienta není podstatné, do jaké molekulární podskupiny nádor patří, ale jakou má prognózu a jaká léčba bude nejefektivnější z hlediska snížení rizika recidivy nádoru (Dowsett M. et al., 2013, Eiermann W. et al., 2013). Multiparametrické molekulární prognostické testy jsou aktuálně klinicky použitelné jako pomocný nástroj stanovení indikace adjuvantní chemoterapie u ER pozitivních nádorů s maximálně 3 pozitivními LU. Testy Oncotype DX, MammaPrint, PAM-50/ROR score, EndoPredict, Breast Cancer Index a Genomic grade index jsou všechny aplikovatelné pro stanovení prognózy v prvních 5 letech (Wolmark N. et al., 2014, Sestak I. et al., 2015, Dubsky P. et al., 2013, Zhang Y. et al., 2013, Knauer M. et al., 2010, Nielsen T. et al., 2014). Výhoda Breast Cancer Index a EndoPredict je v předpovědi časných i pozdních recidiv nad 5 let (SgROI DC. et al., 2013, Muller BM. et al., 2013). Jedním z omezení, která komplikují hodnocení rizika relapsu u jednotlivých pacientek je to, že pokud se aplikuje více multigenových esejí na jeden vzorek, přináší významně diskordantní výsledky ve 20%-30% a jejich shoda je tudíž malá (Kelly CM. et al., 2012, Iwamoto T. et al., 2011).

Jako optimální se pro hodnocení rizika relapsu jeví kombinace klinicko-patologických markerů a molekulárních esejí (Hess KR. et al., 2011). V současnosti probíhá několik rozsáhlých klinických studií validujících prognostickou sílu multigenových esejí, které mohou změnit nahlížení na management časného karcinomu prsu.

Vzhledem ke stále se rozšiřujícím znalostem o vzniku, vývoji a udržování nádorových onemocnění je další budoucnost věnována prognostickému a prediktivnímu významu hodnocení imunitních vlastností nádorů a organismu, RNA sekvenování nové generace a profilování mikroRNA.

1.2 MikroRNA

1.2.1 MikroRNA obecně

MikroRNA (miRNA, miR) patří do skupiny nekódujících RNA (ncRNA), přičemž se odhaduje, že přibližně 98% savčího genomu je transkribováno do ncRNA (Mattick JS. et al., 2006). Mezi nekódující RNA patří transferové RNA (tRNA), ribozomální RNA (rRNA), malé nukleolární RNA (snoRNA), dlouhé nekódující RNA (lncRNA) a mikroRNA (miRNA) (Amorim M. et al., 2016). Dříve se považovaly ncRNA za určitou formu transkripčního šumu, ale výzkum prokázal jejich významný vliv na kontrolu genové exprese na různých úrovních, ncRNA hrají roli v buněčné homeostáze a jejich deregulace vede k celé řadě onemocnění, včetně nádorových (Palmero EI. et al., 2011).

MikroRNA jsou endogenní, krátké, jednořetězcové RNA s délkou 18-25 nukleotidů (nt). MiRNA jsou klíčové regulátory celé řady biologických procesů působením na genovou expresi na posttranskripční úrovni (Huntzinger E. et al., 2011). MiRNA jsou extrémně stabilní a mohou současně regulovat stovky mRNA a proteinů uvnitř buněk (Zhang B. et al., 2007, Lewis BP. et al., 2005). Tento fakt je dán tím, že jednotlivé miR nepotřebují k vazbě na mRNA úplnou komplementaritu ve vazebné sekvenci, rozsah regulace jednotlivých cílových genů je tak dán aktuálním kontextem při kterém různé buněčné typy exprimují miR (Di Leva G. et al., 2014). V současnosti je známo přes 2500 miR (www.mirbase.org) a vzhledem k tomu, že jednotlivá miR má desítky až stovky cílových mRNA a jeden gen může být kontrolován více miR, získáme obrovské množství regulovaných částí lidského genomu (Andorfer CA. et al., 2011). Odhaduje se, že přibližně 2/3 lidských genů jsou přímé cíle mikroRNA (Friedman RC. et al., 2009). Díky těmto skutečnostem je biologická role většiny miR neznámá a čeká na své definování.

MikroRNA hrají důležitou roli v celé řadě buněčných pochodů – buněčném cyklu, diferenciaci, proliferaci, invazivitě, angiogenezi, apoptóze, migraci a odpovědi na stres (Hatfield SD. et al., 2005, Croce CM. et al., 2005, Herranz H. et al., 2010, Rutnam ZJ. et al., 2012). Všechny tyto role jsou patrné za fyziologických podmínek a významné jsou i za patologických stavů, včetně kancerogeneze. Jejich roli v kancerogenezi podtrhuje to, že více než 50% mikroRNA je lokalizováno v oblastech genomu asociovaných s nádorovými chorobami (Calin GA. et al., 2004). Během kancerogeneze mohou vstupovat do regulace molekulárních signálních cest maligní transformace vlivem na onkogeny a tumor supresorové geny. Dále působí na nádorové kmenové buňky, epiteliálně-mezenchymální tranzici a angiogenezi, což vše podporuje růst a metastazování nádorů (Chhabra R. et al., 2014, Sun X. et al., 2014, Zhang ZJ.

et al., 2012, Schwarzenbacher D. et al., 2013).

Hlavní úsilí ve výzkumu miR se soustředí na určení cílových mRNA, proteinů a signálních cest, což představuje předpoklad stanovení jejich významu v patogenezi nemocí (Krek A. et al., 2005, Ekimler S. et al., 2014). Predikce cíle, resp. cílů, je primárně založena na komplementaritě sekvencí mezi 5'UTR koncem zralé mikroRNA a 3'UTR cílových genů (Martin G. et al., 2007). K identifikaci kandidátních cílů miR byly sestaveny výpočetní algoritmy, které odhadují, na základě hledání komplementárních sekvencí, že každá miR se může vázat přibližně na 200 cílových genů (Lewis BP. et al., 2005). Každý systém má své výhody a limity, které determinují za jakých podmínek a při jakém typu experimentu jsou využitelné a optimální (Allmer J. et al., 2012). Mezi nejčastěji používané metody k vlastní validaci cílů miR patří cDNA eseje a metody založené na RT-PCR. Vzhledem k tomu, že miR regulují genovou expresi převážně inhibicí translace a méně degradací mRNA, jsou tyto metody obtížně použitelné při určení přímých cílů (Lim LP. et al., 2005, Wang XW. et al., 2006). Vedle genomických metod, lze vyhledávat cíle miR také tím, že zjišťujeme změny syntézy proteinů po působení určitých miR (proteomické techniky) (Wang X. et al., 2006).

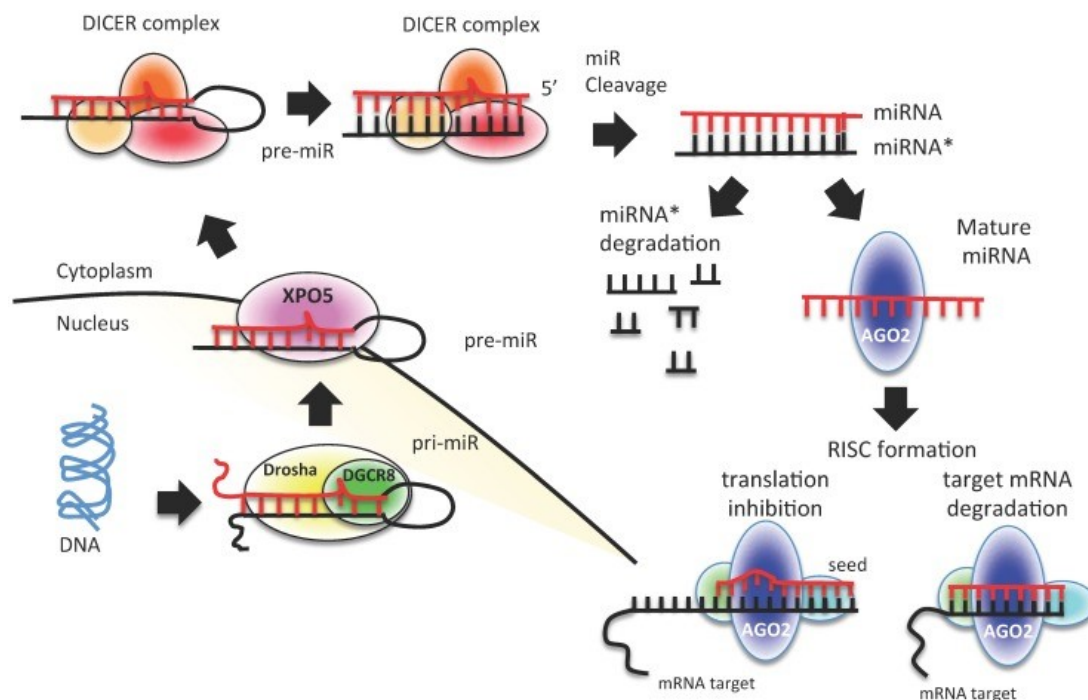
MikroRNA jsou transportované extracelulárně a díky extrémní stabilitě a malé molekule jsou detekovatelné v celé řadě tělesných tekutin, včetně séra a plazmy (Wang F. et al., 2010, Roth C. et al., 2010, Heneghan HM. et al., 2010). Díky srovnávacím studiím je zřejmé, že cirkulující miR odrážejí intracelulární pochody, ale vedle toho také zrcadlí děje v nádorovém mikroprostředí, imunitním systému a dalších procesech. V současnosti není zcela zřejmé nakolik jsou cirkulující miR důsledkem nemoci (nádor, záněť a jiné) a nakolik změny exprese jednotlivých miR nemoci vyvolávají, pravděpodobný je vliv obou efektů na expresi cirkulujících miR (Chevillet JR. et al., 2014). S ohledem na výše uvedené mohou být miR využity jako cirkulující diagnostické, prognostické a prediktivní biomarkery a v budoucnu i jako léčiva (Kosaka N. et al., 2010, Volinia S. et al., 2012, Shen J. et al., 2013, Ashby J. et al., 2014). Jejich použití v kombinaci s klinicko-patologickými a molekulárními markery může dále upřesňovat a individualizovat prognózu a predikovat účinnost terapie karcinomu prsu (Cava C. et al., 2014).

I přes odhalení tisícovek mikroRNA, jejich cílů a signálních cest, jsou znalosti o jejich prognostickém významu a možnostech monitorace nádorových onemocnění zatím omezené (Kong YW. et al., 2012, Schwarzenbach H. et al., 2013, Hamam R. et al., 2017, Armand-Labit V. et al., 2017).

1.2.2 Vznik a mechanismus účinku mikroRNA

MikroRNA jsou krátké, evolučně konzervativní, nekódující RNA s délkou 18-25 nt, v somatických tkáních tvoří dominantní skupinu malých RNA (Ha M. et al., 2014). MiRNA jsou přepisovány z jednotlivých genů za účasti vlastního promotoru. MikroRNA jsou přepisovány specifickým promotorem pomocí RNA polymerázy II do transkriptu nazývaného primární miRNA (pri-miRNA) (obr. 7) (Winter J. et al., 2009).

Obr. 7: Vznik mikroRNA (zdroj Bertoli G. et al., 2015)



Některé pri-miRNA jsou lokalizovány uvnitř intronů hostitelských genů, což podporuje to, že transkripční regulace biogenezy miR může být pod kontrolou promotorů hostitelských genů (Li SC. et al., 2007). Pro další proces musí být pri-miRNA rozpoznány Drosha ribonukleázou a proteinem DGCR8 vázajícím dvojřetězcovou RNA (Denli AM. et al., 2004). Zpracováním pri-miRNA vznikají prekurzorové mikroRNA (pre-miRNA) o délce přibližně 70 nt, které jsou následně exportovány z jádra do cytoplazmy pomocí exportinu 5 (XPO5) (Czech B. et al., 2011). V cytoplasmě jsou pre-miRNA štěpeny enzymem Dicer I (RNáza III) a vzniká dvouřetězcový miRNA-miRNA* duplex (Diederichs S. et al., 2007). Následně jsou oba řetězce odděleny, zralé vodící miRNA jsou inkorporovány do RISC (RNA-induced silencing complex) a druhý řetězec (miRNA*) je degradován nebo také zahrnut do RISC. RISC je tvořen miR, enzymem Dicer, proteiny TARBP2 (transactivation-responsive RNA-binding protein 2) a AGO2 (Protein

Argonaute-2). Zralá miRNA navádí AGO protein ke komplementární sekvenci cílové mRNA a potlačuje její expresi (Gregory RI. et al., 2005).

Hlavní determinantou vazby mikroRNA na cílovou mRNA je 6-8 nukleotidová sekvence na 5'UTR konci miRNA, tzv. "seed sequence" (Czech B. et al., 2011). miRNA se mohou vázat na kteroukoli část cílové mRNA, ale nejčastěji se váží na 3'UTR konec mRNA (Lytle JR. et al., 2007). V závislosti na stupni homologie k 3'UTR cílové sekvenci způsobuje mikroRNA pokles translace nebo degradaci mRNA (Jackson RJ. et al., 2007). Stupeň komplementarity je významný prediktor efektu na cílovou mRNA, kdy částečná komplementarita vede k bloádě translace a plná komplementarita k degradaci mRNA. Tento odlišný vliv na genovou expresi je unikátní pro miR a umožňuje jim velice precizně doladřovat expresi genů. Díky této specifické roli stanovily miR nové paradigma toho, jaké jsou další možnosti regulace genové exprese (Hobert O. et al., 2008).

Mimo uvedené mechanismy účinku mohou miR ovlivňovat translaci mRNA modulací proteinů, které slouží k její bloádě. Dále mohou mikroRNA zvyšovat syntézu ribozómů a tím ovlivňovat proteosyntézu nebo překonat zástavu buněčného cyklu a aktivovat potlačení cílových genů (Vasudevan S. et al., 2007). Vedle ovlivnění translace mohou miR působit i epigeneticky, deacetylací nebo metylací histonů a remodelací chromatinu (Chuang JC. et al., 2007).

Stejně jako ostatní nukleové kyseliny, podléhají miRNA regulaci pomocí nekódujících RNA transkriptů. Skupina ceRNA (competing endogenous RNA), které tvoří cirkulární RNA (ciRNA), pseudogeny a lncRNA, představují hlavní regulátory účinku miRNA (Poliseno L. et al., 2010, Liu XH. et al., 2014, Lasda E. et al., 2014).

Biosyntéza miR podléhá stejným kontrolním mechanismům jako syntéza jiných nukleových kyselin. Dysregulace miR může být způsobena epigeneticky (methylací), modifikací histonů a změnami enzymů ovlivňujících biogenezu miR (Mulrane L. et al., 2013). Modifikace koncentrací kooperujících enzymů RISC komplexu (AGO2, DICER1, TARBP2) ovlivňuje kvalitu a funkci miR a tím diagnostickou, prognostickou a prediktivní schopnost určité miR. Například nízké hladiny DICER1 jsou signifikantně asociované s kratším přežitím bez známek nemoci (DFS) (Grelier G. et al., 2009). Sung a kol. popsali sedm SNP (single-nucleotide polymorphism) variant genů kódujících proteiny miR biogeneze, které signifikantně ovlivňovaly přežití karcinomu prsu (Sung H. et al., 2012).

1.2.3 Detekční a normalizační techniky stanovení mikroRNA

Komplexní přehledy studia cirkulujících mikroRNA přinášejí značně odlišné výsledky mezi jednotlivými projekty (Jarry J. et al., 2014). Tyto rozdíly mohou být částečně vysvětleny metodologickými rozdíly, které postihují všechny kroky analýzy miR od odběru vzorků po postanalytické kroky (Moldovan L. et al., 2014). V přehledech hodnotících metodologii studií je kladen důraz na precizní a standardizovaný odběr vzorků, jejich zpracování a skladování (Khan J. et al., 2017, Glinge C. et al., 2017).

Extrakční metody RNA představují první krok analýzy a zahrnují různé techniky přípravy založené na fenolové extrakci nebo použití dalších RNA izolačních postupů (Moldovan L. et al., 2014). Jednotlivé metody se odlišují různou účinností (Ono S. et al., 2015, Li P. et al., 2017).

Pro vlastní detekci mikroRNA lze použít celou řadu molekulárně biologických metod (tab. 2). Z nízkokapacitních metod je standardizované stanovení pomocí northern blottingu, avšak jeho nevýhodou je detekce malého počtu mikroRNA (Várallyay É. et al., 2008). Z vysokokapacitních metod lze použít oligonukleotidovou miRNA microarray nebo reverzní kvantitativní PCR (RT-qPCR) (Balcells I. et al., 2011). Výhodou microarray technik je možnost současné analýzy stovek mikroRNA (genome-wide) ve velkém množství vzorků. Nevýhodou je malé dynamické rozpětí, neschopnost detekovat nové neannotované miR a potřeba velkého množství analyzovaného vzorku. RT-qPCR je nejčastěji užívaná detekční metoda kvůli jednoduchosti, rychlosti, senzitivě, specifitě a reprodukovatelnosti. Výhodou je dále to, že pro analýzu postačí pouze malé množství RNA. Nevýhodou je, v porovnání s metodami microarray a NGS, že nemůže být použita pro vysokokapacitní profilování. RT-qPCR dnes představuje určitý standard validační techniky pro výsledky profilování, které získáme pomocí microarray nebo NGS (Ono S. et al., 2015). Integrací získaných mikroRNA dat s daty získanými analýzou exprese mRNA můžeme objevovat nové genové interakce. Mezi další techniky patří průtoková cytometrie a *in-situ* hybridizace, jejichž limitací je použití pouze u známých miR (Li W. et al., 2009). Metody sekvenování nové generace (NGS) představují další možnost objevování nových a confirmaci známých mikroRNA (Wu X. et al., 2012). NGS produkuje obrovské množství dat, které je nutné zpracovat komplexními biostatistickými nástroji. Vzhledem k výhodám a limitacím jednotlivých metod, je jejich volba závislá na hodnoceném materiálu, designu a zaměření projektu, zkušenostech s danými metodami, technických a finančních možnostech.

Tab. 2: Srovnání detekčních metod mikroRNA

Detekční metoda	Kapacita	Senzitivita	Specifická
nothern blotting	nízká	nízká	vysoká
microarray	vysoká	nízká	nízká
průtoková cytometrie	vysoká	střední	vysoká
qRT-PCR	vysoká	vysoká	vysoká
<i>in-situ</i> hybridizace	nízká	nízká	nízká
NGS	vysoká	vysoká	vysoká

Vedle rozdílů v analyzovaném materiálu, izolačních a detekčních technikách, představuje normalizace hrubých dat další kritický krok k odstranění variability, která nesouvisí přímo s biologickou podstatou miR (Marabita F. et al., 2016, Occhipinti G. et al., 2016). V současnosti není úplný konsenzus v normalizační strategii pro detekci cirkulujících mikroRNA, ale lze definovat některé doporučené postupy (Farina NH. et al., 2014, www.gene-quantification.de). Normalizační technikou pro kvantitativní RT-PCR je užití vnitřních kontrol, jakými jsou například referenční miR (miR-16, let-7a) nebo některé další malé nekódující RNA (snoRNA), např. RNU6. Problémem užití miR-16 je to, že není vždy konzistentně exprimovaná u případů a kontrol a je citlivá k hemolýze (McDonald JS. et al., 2011). Na rozdíl od buněčných RNA analyzovaných přímo v nádorové tkáni, nemusí být geny jako snoRNA U6 v séru konzistentně detekovatelné. Ideální endogenní kontrola by měla mít stabilní expresi, podobnou stabilitu, extrakční a kvantifikační výsledky (Pelder HJ. et al., 2008). Jinou možností normalizace je využití syntetických mikroRNA (např. cel-miR-39), nevýhodou je jejich malá stabilita oproti endogenním miR (Creemers EE. et al., 2012). Užití více referenčních miR najednou je doporučované ke zlepšení přesnosti a zmírnění chyb v možné variabilitě zvolených miR (Schwarzenbach H. et al., 2015). Zajímavá data přinesla studie Hu Z a kol., kde kombinace miR-484 a miR-191 fungovala optimálně jako endogenní kontrola pro většinu diagnostikovaných nádorů (Hu Z. et al., 2012). Obecně se pro normalizaci doporučuje použít kontrolní molekuly ze stejné skupiny RNA vzhledem k totožným fyzikálně-chemickým vlastnostem (Vandesompele J. et al., 2002).

1.2.4 Mechanismy uvolnění mikroRNA do cirkulace

Spolu s objevem tkáňových mikroRNA bylo zjištěno, že jejich detekce je možná ve všech tělesných tekutinách v různých koncentracích. Přítomnost miR v cirkulaci reflektuje množství lyzovaných nádorových buněk, ale i dalších buněk v mikroprostředí nádoru, množství nenádorových buněk exprimujících a secernujících konkrétní miR a konečně množství buněk, které odpovídají imunitním a dalším fyziologickým reakcím proti nádoru. Ideálně by pro užití miR jako biomarkeru měly koncentrace v cirkulaci odpovídat těm, které jsou syntetizovány a uvolňovány nádorovou tkání. Během studia miR byly porovnávány profily miR v nádorových tkáních a krvi, které prokázaly shodu v detekci jednotlivých mikroRNA a jejich setů (Taylor DD. et al., 2008, Ohshima K. et al., 2010). Z hlediska analýzy krve se detekuje vyšší koncentrace miR v séru oproti plazmě, což je patrně důsledkem uvolnění miR z krevních buněk při srážení krve (Wang K. et al., 2012, McDonald JS. et al., 2011). Sérum je v porovnání s plazmou méně náchylné k hemolýze a vzorky se zjevnou hemolýzou by neměly být pro analýzu použity.

V krvi jsou cirkulující miR přítomné v různých podobách, nejčastěji jako extracelulární vezikuly – mikrovezikuly, exosomy nebo apoptotická tělíčka (Gallo A. et al., 2012, Chevillet JR. et al., 2014). Dále mohou být v komplexu s RNA vazebnými proteiny (AGO2, nucleophosmin) a inkorporované do HDL (Turchinovich A. et al., 2011, Wang K. et al., 2010, Vickers KC. et al., 2011). Exosomy, vedle transportní funkce, umožňují vyzrání miR z jejich prekurzorů nezávisle na rodičovských buňkách (Melo SA. et al., 2014). Tato schopnost je možná díky přítomnosti komponent RISC komplexu a dalších proteinů v exosomech. Exosomy tak mohou rychle a efektivně ovlivňovat transkripci v cílových buňkách. V různých publikacích se odlišuje poměr zastoupení cirkulujících miR v jednotlivých formách, souvislost lze nalézt v různých extrakčních a detekčních metodách, ale i v preanalytické fázi (odběr a zpracování krve). Kompletní mechanismus regulace uvolnění miR do cirkulace není zcela znám. Jako možné se jeví RAB proteiny, které regulují intracelulární transport vezikul, nebo ceramidy (Colombo M. et al., 2014, Kosaka N. et al., 2010b). miR mohou být uvolněné pasivně během patologických stavů (nekróza, apoptóza, zánět) nebo aktivně a selektivně, případně jako kombinace obojího. Exosomálně lokalizované miR se uvolňují do cirkulace aktivně a vysoce selektivně regulovaným procesem (Cheng G. et al., 2015). Přesto se profily exosomálních a buněčných miR poněkud odlišují, převážná většina miR je v exosomech exprimována méně než v buňkách (Pigati L. et al., 2010, Zhong S. et al., 2016).

Cirkulující miR hrají v organismu důležité funkce, vedle pasivní role biomarkerů, představují zprostředkovatele mezibuněčné a meziorgánové komunikace (Kosaka N. et al., 2010a, Larrea E. et al., 2016). Mohou působit jako parakrinní signální molekuly, ale i systémově, endokrinním způsobem. Mezi podporující důkazy patří to, že jsou selektivně uvolňovány do cirkulace, jsou chráněné před RNázami pomocí lipoproteinů nebo mikrovezikul a cirkulující miR mohou ovlivňovat genovou expresi v cílových buňkách a podporovat jejich funkční změny (Turchinovich A. et al., 2011). Mechanismus internalizace extracelulárních miR může probíhat pomocí endocytózy, fagocytózy, fúzí vezikul s plazmatickou membránou a vychytáváním komplexu miR-AGO2 buněčnými povrchovými receptory (Matsuda A. et al., 2016). Vzhledem k uvedeným skutečnostem reflektují cirkulující miR homeostatické odpovědi organismu na různé patologické situace, včetně nádorového onemocnění. Změny jejich množství a složení v krvi odpovídají změnám na lokální a celkové úrovni, včetně perzistence nebo progresu nádoru.

Přítomnost mikroRNA v tělesných tekutinách představuje možnost jejich využití jako relativně snadno dosažitelného biomarkeru s diagnostickým, prognostickým a prediktivním potenciálem. V éře personalizované medicíny jsou neinvazivní cirkulující biomarkery k dynamickému hodnocení patologie nemoci a jejího vývoje vysoce žádané, vzhledem k tomu, že opakované biopsie nádoru nebo metastáz nejsou bezpečné, případně technicky možné. Rychlý a neinvazivní vhled do molekulárního profilu nádorového onemocnění a jeho dynamických změn představuje jeden z důležitých směrů současného výzkumu v onkologii. Studium cílené na využití miR jako tekuté biopsie (liquid biopsy) je v posledních letech na vzestupu a přibývá celá řada publikací translačního výzkumu hodnotících jejich využitelnost. V dalším textu budou cirkulující mikroRNA jako biomarkery diskutovány, včetně limitací a komplikací při jejich využití.

1.2.5 Výzvy a limitace klinického výzkumu a využití mikroRNA

Hlavní překážkou přenosu studia mikroRNA z bazálního a translačního výzkumu do klinického využití jsou nekonzistentní výsledky mezi publikacemi, postrádající dostatečnou signifikanci a s mnoha protichůdnými daty o významu exprese jednotlivých miR a jejich setů. Jedním z důvodů nízké reprodukovatelnosti je velice málo studií vedených multiinstitucionálně a s nedostatečně nadimenzovanými kohortami. Dalším faktorem je vysoká interindividuální variabilita v expresi mikroRNA ve zdraví a u jednotlivých onemocnění, včetně nádorových (Margue C. et al., 2015, Larrea E. et al., 2016). Rozdíly mezi publikacemi jsou v hodnocení

rozdílných tkání a tekutin, použitých extrakčních metodách, různých kontrolách, platformách pro stanovení miR (microarray, PCR, NGS), normalizačních technikách a metodách statistického hodnocení.

Prvním faktorem, který ovlivňuje dosažené výsledky, jsou rozdíly v designu experimentů a patientských charakteristikách. Patientské soubory se liší věkem, etnikem, stádiem nádoru, histologiemi, molekulárními podtypy a absolvovanou léčbou (Jarry J. et al., 2014). Z hlediska experimentálního designu se odlišuje velikost kohort, zahrnutí zdravých kontrol, jsou různé tréninkové a validační sety a jejich užití, jsou aplikovány různé statistické metody (De Cecco L. et al., 2013). Všechny tyto faktory ovlivňují statistické zpracování a jeho sílu. Studie s miR by se měly vyhnout malým kohortám, nevhodnému experimentálnímu designu a měli bychom dobře volit statistické metody (Dobbin KK. et al., 2014).

Sběr a zpracování krve představují další kritický bod v rozdílech mezi studii cirkulujících mikroRNA. V první řadě může dojít ke kontaminaci miR v místě venepunkce z okolních tkání, kterými jehla prochází. Odlišný čas mezi odběrem a zpracováním krve vede k lýze krve a buněčné kontaminaci vzorků, které dále prohlubují rozdíly mezi vzorky (Witwer KW. et al., 2013, McDonald JS. et al., 2011). Samozřejmě i druh antikoagulans při odběru plazmy ovlivňuje detekční technologie, při aplikaci RT-qPCR bychom neměli používat heparinové odběrové zkumavky (Al-Soud WA. et al., 2001). Dalším zdrojem rozdílů je vlastní volba výchozího materiálu, zda je vhodnější sérum nebo plazma a dále zda extrahovat jednotlivé exosomy nebo zpracovat celé sérum/plazmu (Cheng HH. et al., 2013).

Další problémy interpretace a důvody rozdílů mezi expresí mikroRNA mezi různými publikacemi jsou analytického charakteru. Týká se to zejména purifikačních metod, které mohou ovlivňovat malé molekuly RNA přítomné v nízkých koncentracích ve vzorcích (Kim YK. et al., 2012). Dále, jak již bylo krátce zmíněno výše, je významné jaké použijeme kontroly a normalizace, celá řada referenčních genů z tkáňových studií není přítomna v cirkulaci z důvodu jejich degradace (McDermott AM. et al., 2013). Konečně hraje důležitou roli v analytickém hodnocení vlastní použitá metoda k měření cirkulující mikroRNA, mnohé studie a publikace se liší v použitých platformách (Watson AK. et al., 2012). Volba detekční metody by měla vycházet z výchozího materiálu, typu projektu, experimentálního designu (detekce nových miR, validace známých) a zkušeností s metodou (Larrea E. et al., 2016).

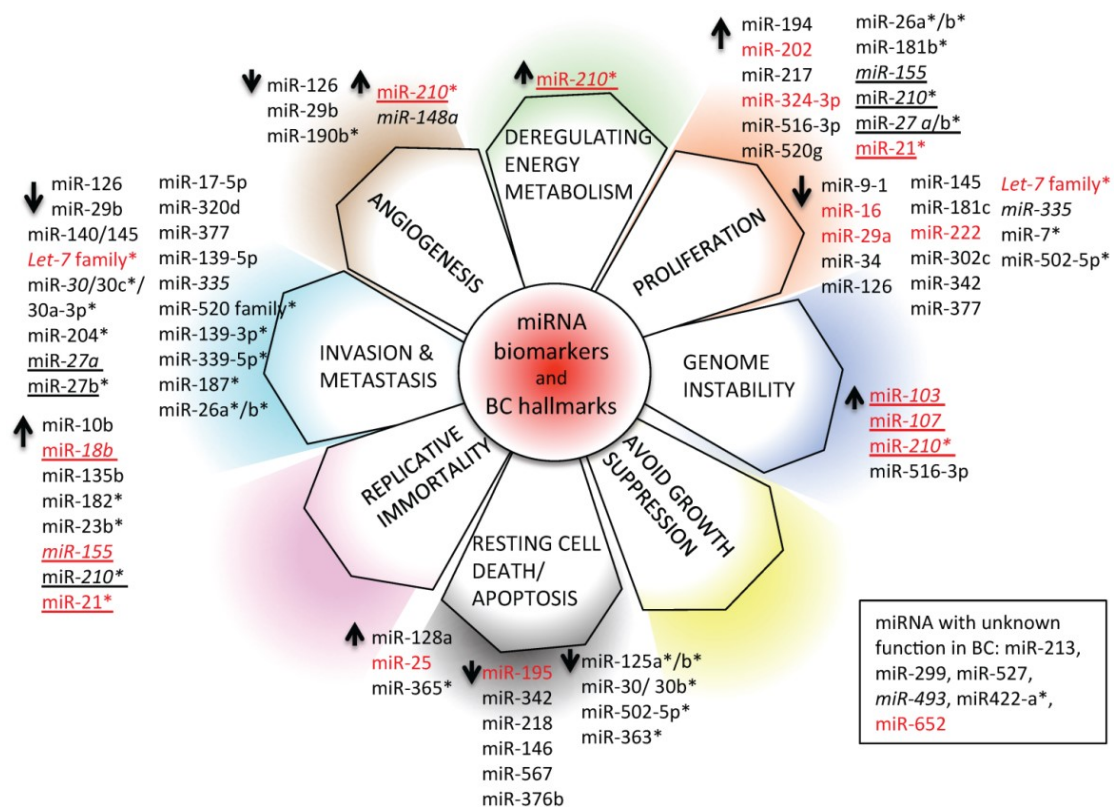
Molekulární aberace interferující s biogenezí miR, jejím exportem a zráním, ovlivňují hladiny a biologické funkce zralé miR (Kita Y. et al., 2014). Většina detekčních metod se zaměřuje na

analýzu zralých miR, protože nejlépe korelují s jejich biologickými funkcemi, žijí déle a jsou rezistentnější k nukleázám oproti primárnímu miR transkriptu (pri-miRNA), pre-miR nebo mRNA (Pritchard CC. et al., 2012).

1.2.6 MikroRNA u karcinomu prsu

První zmínka o dysregulaci mikroRNA u nádorových onemocnění pochází z roku 2002 a od té doby představuje výzkum mikroRNA jeden z důležitých pokroků k pochopení nádorové biologie. Mnoho prací demonstrovalo odlišnosti v expresi a obecné dysregulaci mikroRNA u nádorů v porovnání se zdravými tkáněmi, včetně karcinomu prsu (Shah NR. et al., 2014, Zhang ZJ., Ma SL., 2012). Jejich role v kancerogenezi jsou široké, spoluvytvářejí nádorové kmenové buňky, ovlivňují buněčný cyklus, apoptózu, angiogenezi a podílejí se na progresi karcinomu prsu zvýšenou invazivitou a schopností metastazování (Serpico D. et al., 2014, Bertoli G. et al., 2015, Goh JN. et al., 2016, Dvinge H. et al., 2013) (obr. 8).

Obr. 8: Hlavní patogenetické mechanismy a působení miR u karcinomu prsu (zdroj Bertoli G. et al., 2015)



Vysvětlivky obr. 8: červené – cirkulující, kurzíva – prognostický význam, podtržené – multifunkční miR, označené hvězdičkou - prediktivní význam, šipky označují expresi (zvýšená, snížená)

MikroRNA působí u karcinomu prsu podle vlivu na buněčnou proliferaci jako onkogeny (onkomiR) nebo tumor supresorové miR (Tang J. et al., 2012, Ahmad A. et al., 2011, Baffa R. et al., 2009, O'Day E. et al., 2010). OnkomiR potlačují expresi tumor supresorových genů a jsou u karcinomu prsu zvýšeně exprimované. Tumor supresorové miR zaměřují svůj účinek na onkogeny a jsou zpravidla sníženej exprimované (Zhang B. et al., 2007, Corsini LR. et al., 2012, Bertoli G. et al., 2015). Vzhledem k tomu, že globálně jsou miR u nádorů sníženej exprimované je předpoklad, že většina miR působí jako nádorové supresory. Rozdělení na onkomiR a tumor supresorové miR je pouze orientační, protože celá řada miR funguje duálním způsobem, podle druhu nádoru, buněčných vlastností a fáze kancerogeneze (Kasinski AI. et al., 2011, Keklikoglou I. et al., 2012, Sempere LF. et al., 2007). Expresce miR může být také odlišná během progresu nádorové choroby od prekanceróz, neinvazivních nádorů, přes časné nádory až po ty ve stádiu metastazování (Ma L. et al., 2007, Volinia S. et al., 2012). Různá úroveň exprese, podle fáze kancerogeneze a pokročilosti nádorového onemocnění, představuje jeden z důvodů rozdílných výsledků v publikacích věnovaných miR z hlediska jejich diagnostického, prognostického a prediktivního potenciálu.

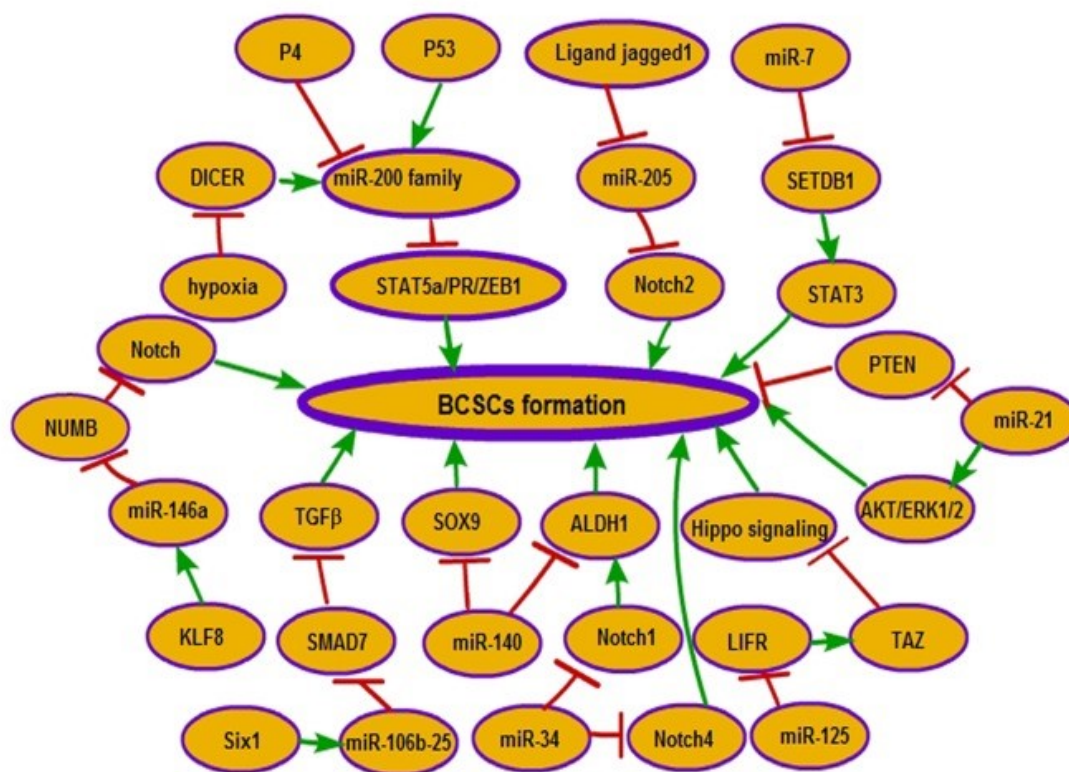
1.2.6.1 Působení mikroRNA na jednotlivé stupně patogeneze karcinomu prsu

Kancerogeneze je tvořena celou řadou na sebe navazujících kroků. Její podstatou je nakupe ní náhodných mutací genomové DNA, které transformované populaci buněk umožní excesivní dělení, přežití za energeticky nevýhodných podmínek a získání vlastností invazivity a metastazování. Hlavní kroky obecně přijímané teorie kancerogeneze vycházející z nádorových kmenových či progenitorových buněk byly formulovány Hanahanem a Weinbergem (Hanahan D., Weinberg RA., 2011). V následujících odstavcích budou hlavní kroky kancerogenezy popsány s důrazem na role mikroRNA.

Jedním z významných pokroků bazálního a translačního výzkumu nádorových onemocnění byl objev **nádorových kmenových buněk (CSC)**. Jedná se o velmi malou populaci buněk s fenotypickými znaky blízkými fyziologickým kmenovým buňkám, které jsou schopné iniciovat nádorový proces a svými unikátními vlastnostmi umožnit jeho udržení, rozvoj, recidivy a metastazování (Valent P. et al., 2012). Podle současných znalostí jsou CSC hlavní nádor-iniciační buňky s vlastnostmi sebeobnovy, pluripotence, vysokým tumorigenním potenciálem, schopné přežití v hypoxických podmínkách a s vysokou rezistencí k protinádorové léčbě (Creighton CJ. et al., 2009). Nádory špatně diferencované vykazují vyšší obsah CSC než nádory dobře diferencované, což dále podporuje vztah mezi stupněm malignity a množstvím CSC (Pece S. et al., 2010). Zásoba CSC je spojena s agresivitou a negativní prognózou u karcinomu prsu a hraje významnou roli v rezistenci k protinádorové terapii. Nádorové kmenové buňky unikají běžné kontrole buněčného cyklu a apoptózy. Nádorové kmenové buňky vykazují vysokou schopnost přežít v hypoxických podmínkách, které přímo generuje rychlý růst nádoru a porušený průtok krve (Liu S. et al., 2014). Nádory s hypoxickým mikroprostředím vykazují agresivní fenotyp, větší tendenci k metastazování, zvýšenou odolnost k chemo a radioterapii a celkově horší prognózu (Li Z. et al., 2010).

MikroRNA ovlivňují kmenový potenciál nádorových kmenových buněk a představují regulátory jejich diferenciace, kontroly sebeobnovy, pluripotence a buněčné smrti (Sheherbata HR. et al., 2006, Polyarchou C. et al., 2012, Visvader JE. et al., 2014, Garofalo M. et al., 2010) (obr. 9).

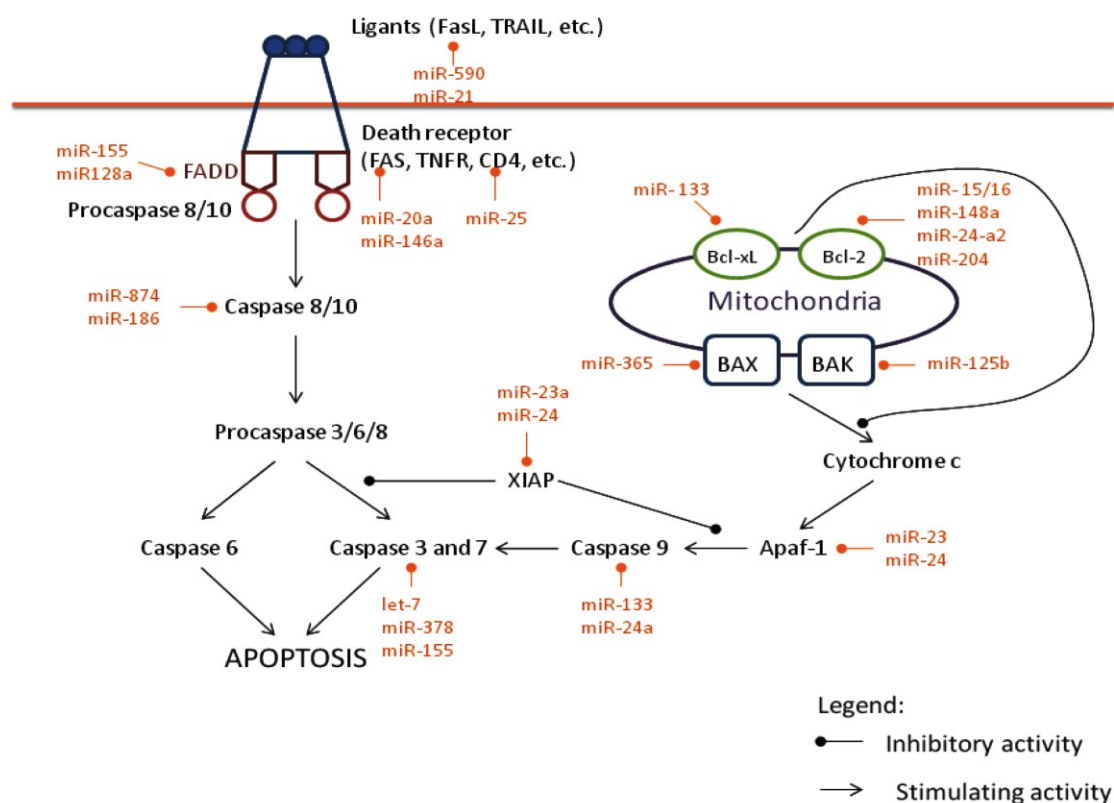
Obr. 9: Vliv jednotlivých miR na nádorové kmenové buňky (zdroj Fan X. et al., 2017)



Nádorové kmenové buňky exprimují specifické znaky miR a specifické miR regulují a jsou regulovány klíčovými geny kmenových buněk (Houbaviv HB. et al., 2003, Marson A. et al., 2008). Prvním, kdo identifikoval a izoloval nádorové kmenové buňky u karcinomu prsu byli Al-Hajj a kol., kteří popsali linii CD44⁺/CD24^{-/low} (Al-Hajj M. et al., 2003). Následně Yu a kol. dokumentovali, že miR let-7 je jedním z hlavních regulátorů sebeobnovy a metastazování CSC u karcinomu prsu (Yu F. et al., 2007). Jejich práce prokázala sníženou expresi let-7 v CSC a význam let-7 v inhibici a dediferenciaci buněk karcinomu prsu přímým vlivem na geny kódující RAS a HMGA2 (Yu F. et al., 2007). Schopnost sebeobnovy CSC je u karcinomu prsu dáována do souvislosti se signální cestou Hedgehog a ovlivněním Bmi-1 (Liu S. et al., 2006). Z mikroRNA snižujících schopnost sebeobnovy CSC cestou Bmi-1 lze uvést miR-200c, která bývá u karcinomu prsu sníženě exprimovaná (Shimono Y. et al., 2009). miR-30 ovlivňuje schopnost sebeobnovy CSC karcinomu prsu snížením Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9) s dalším vlivem na expresi proteinů SUMO (Small ubiquitin-related modifier) a Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4) (Yu F. et al., 2010). Integriny představují další cíl mikroRNA a zároveň důležité faktory sebeobnovy CSC, miR-30 přímo ovlivňuje funkci Integrinu beta3 (Pontier SM. et al., 2009).

Apoptóza a její mechanismy jsou v současnosti poměrně dobře vysvětleny a popsány. Je dělena na extrinzickou a intrinzickou cestu. Extrinzická cesta je spouštěna tzv. death receptory z rodiny TNF (TNFR1, TRAIL, CD95) a jejich ligandy a významnou roli zde hraje prokaspáza 8, aktivovaná FADD na kaspázu 8. Kaspáza 8 patří spolu s kaspázami 2, 9 a 10 mezi iniciační kaspázy, které aktivují exekutivní kaspázy 3, 6 a 7. Intrinzická cesta je řízena BCL-2 rodinou s proapoptotickými proteiny (BAX, BAK) a jejich senzitizerů (BAD, NOXA, Puma) a aktivátory (BID, BIM) a antiapoptotickými (BCL2, BCL-XL) zástupci. Proapoptotické proteiny řídí zvýšenou permeabilitu mitochondriální membrány (MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilization). To způsobí uvolnění cytochromu C s aktivací APAF1 (Apoptotic protease activating factor) s převodem prokaspázy 9 na aktivní kaspázu 9. Dále se uvolňují proteiny SMAC a Omi, jejichž hlavní funkcí je neutralizace XIAP (X linked inhibitor of apoptosis protein) a tím uvolnění exekutivních kaspáz z vazby a jejich aktivaci.

Obr. 10: Hlavní mechanismy apoptózy s působením vybraných miR (podle Pileczki V, et al., 2016)

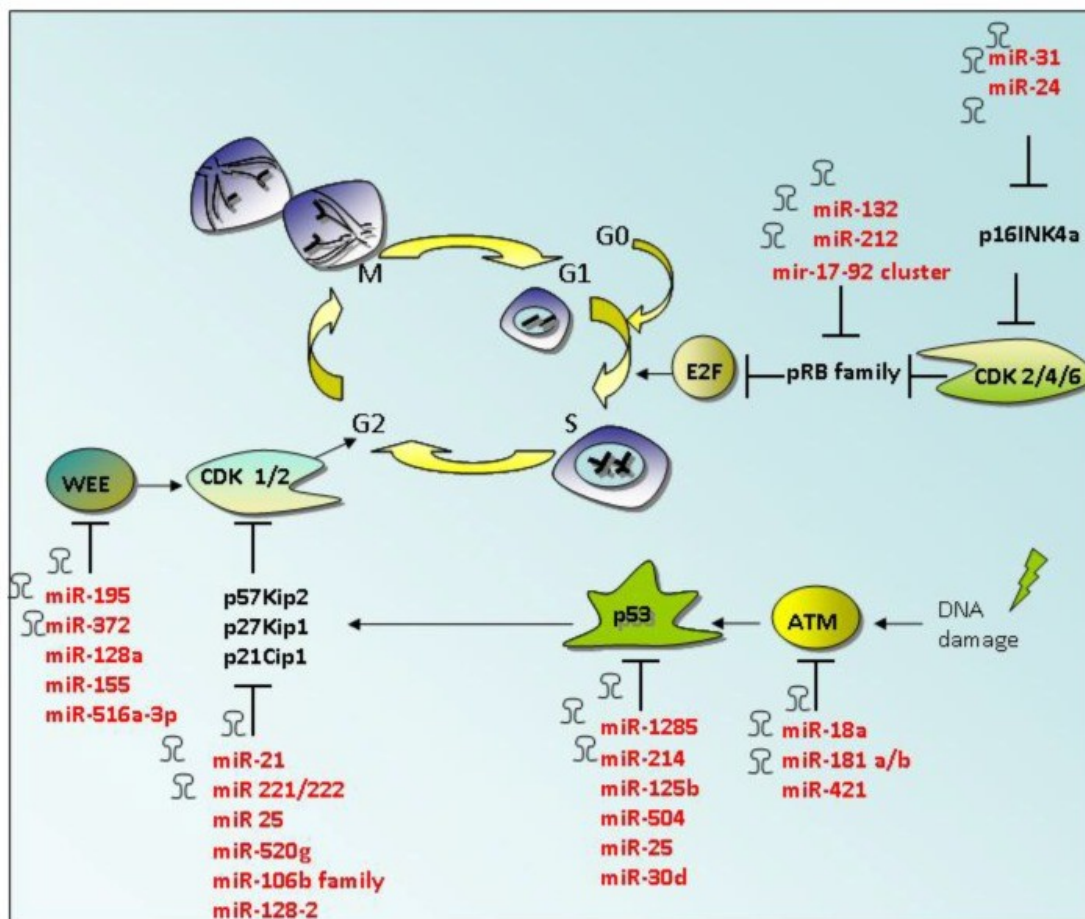


Výzkum prokázal důležitou roli mikroRNA v regulaci těchto signálních cest. Skupina BCL-2 proteinů má pro i antiapoptotické vlastnosti, byly detekovány miR s vlivem na tyto proteiny

(Cimmino A. et al., 2005). Konkrétně se jedná o miR-21 (BCL-2), miR-145 (RTKN), miR-155 (FOXO3a), mi-34a (p53) (Raver-Shapira N. et al., 2007, Si ML. et al., 2006, Wang S. et al., 2009, Kong W. et al., 2010). Integrin beta3 (ITGB3) je faktor, který atrahuje kaspázu 8 na buněčnou membránu a aktivuje tak apoptózu touto cestou, ITGB3 je přímý cíl miR-30 (Yu F. et al., 2010). Výzkum role miR v regulaci apoptózy se rozšiřuje a jsou publikovány další miR regulující geny zodpovědné za apoptózu (obr. 8,10).

Nádorové buňky jsou charakterizované deregulací buněčné proliferace, ovlivnění **buněčného cyklu** je dalším cílem působení mikroRNA. Podstatou řízení buněčného cyklu je aktivita jednotlivých komplexů cyklinů s cyklin dependentními kinázami (CDK - cyclin dependent kinase) (obr. 11).

Obr. 11: Vliv jednotlivých miR na řízení buněčného cyklu (zdroj: Frixia T. et al., 2015)



Klastr miR-17-5p/miR-20a oslabuje aktivitu cyklinu D1, u karcinomu prsu je prokázána snížená exprese miR-17-5p/miR-20a, tím mizí ovlivnění cyklinu D1 a buňka vstupuje do S fáze buněčného cyklu a je zvýšená proliferace (Yu Z. et al., 2008). miR-27a je další miR, která

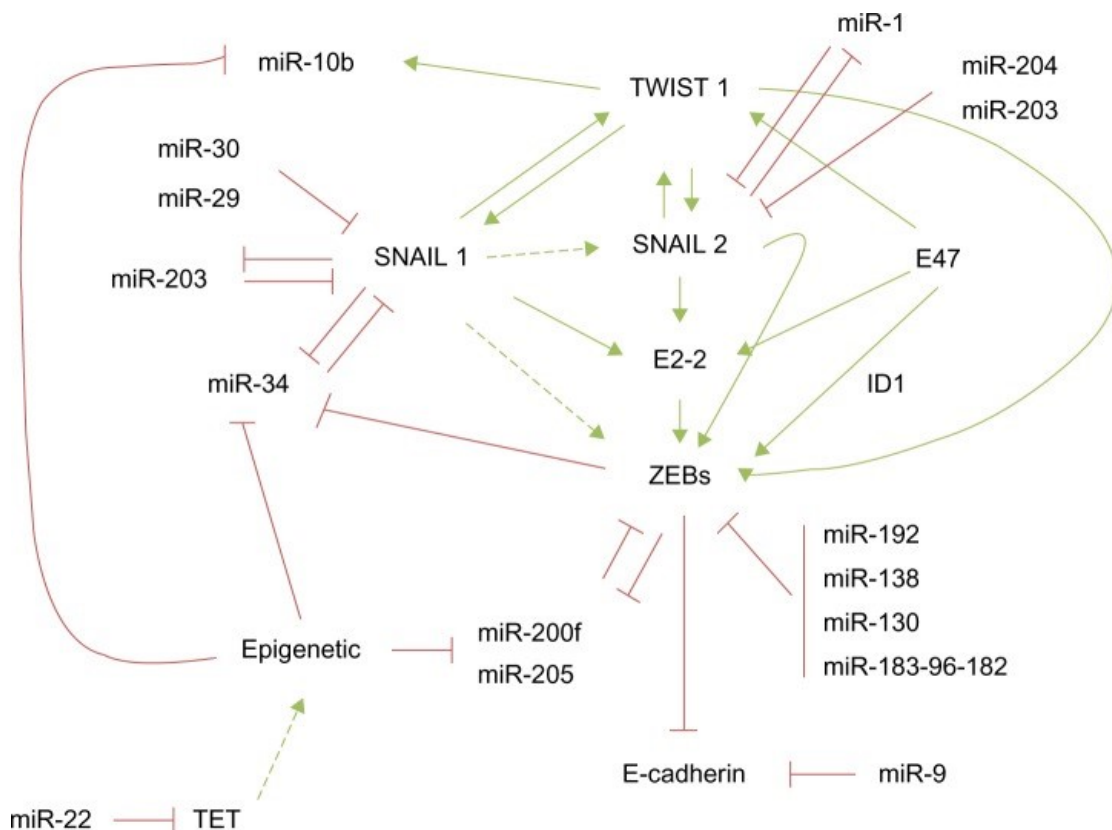
ovlivňuje cyklin D1 a cyklin B (Mertens-Talcott SU. et al., 2007). Důležitým regulátorem buněčného cyklu je transkripční faktor E2F, miR-106b, miR-93 a miR-25 mohou zvyšovat fosforylaci Rb, čímž uvolní z vazby E2F a umožní jeho funkci (Brosh R. et al., 2008). miR-17-5p ovlivňuje proliferaci cestou onkogenu *AIB1* (amplified in breast cancer 1) a ten dále podporuje transkripční aktivitu ER (Hossain A. et al., 2006). Vazba mezi estrogenní signalizací a mikroRNA byla dále prokázána pro miR-206, miR-18a,b, miR-193b, miR-302c a miR-221/222 (Leivonen SK. et al., 2009, Bhat-Nakshatri P. et al., 2009).

MikroRNA, vedle ovlivnění iniciace a progresu karcinomu prsu vlivem na kmenové buňky, uplatňují apoptózu a buněčný cyklus nádorově transformovaných buněk a podílejí se i na modulaci jejich invazivity a metastazování. Mezi hlavní patogenetické charakteristiky invazivity a metastazování epiteliálních buněk patří **epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT)**, která umožňuje buňkám karcinomu prsu získat vlastnosti potřebné pro opuštění primárního nádoru, invazi do intersticiálního stromatu, vstup do cirkulace a následné uchycení ve vzdálených tkáních. EMT je proces, při kterém nádorové buňky ztrácejí svůj epiteliální charakter, což dokumentuje ztráta epiteliálních markerů (E-cadherin) a zvýšená exprese mezenchymálních markerů (N-cadherin, vimentin) (Mani SA. et al., 2008). Dochází k poklesu mezibuněčné adhezivity a buněčné polarity a nádorové buňky získávají invazivní vlastnosti. Jsou schopné uvolnění z mateřského nádoru, vstupují do lymfatických a krevních cév, jsou odolné k destrukci a putují k cílovým orgánům, kde iniciují vznik vzdálených metastáz. Na EMT se podílí celá řada signálních cest a jejich vzájemná komunikace, mezi hlavní patří Wnt, Hedgehog, PI3K, NFkB, TGFb a Notch (Zhang J. et al., 2016).

Molekulární vazba mezi EMT a mikroRNA byla v literatuře popsána (Abba ML. et al., 2016, Hu Y. et al., 2014). Recentní přehled znalostí o miR a EMT byl publikován autory Zhao a kol. (Zhao M. et al., 2017). V přehledu zmiňují základní interakce mezi miR a signálními cestami ovlivňujícími EMT (obr. 12). miR-9 přímo ovlivňuje *CDH1*, gen pro E-cadherin a zvyšuje motilitu a invazivitu buněk karcinomu prsu (Ma L. et al., 2010). Gregory a kol. dokumentovali sníženou expresi miR-205, miR-200 a miR-429 u nádorových buněk se změnami charakterizujícími EMT (Gregory PA. et al., 2008). Zvýšená exprese miR-200 inhibuje EMT fenotyp indukovaný cestou TGFb přímým vlivem na geny kódující transkripční represor E-cadherinu ZEB1 a ZEB2 (zinc finger E-box-binding homeobox 1 a 2) (Gregory PA. et al., 2008). Na druhou stranu ZEB1 potlačuje transkripci miR-141 a miR-200c, které jsou silné induktory epiteliální diferenciace (Burk U. et al., 2008). Martelo a kol. popsali vliv miR-103/107 na globální snížení exprese miR, včetně miR-200, cílením na geny kódující Dicer s následným rozvojem EMT a metastatickým fenotypem nádorových buněk (Martello G. et al., 2010). miR-181b patří mezi induktory EMT

cestou Snail ovlivněním genu *YWHAG* kódujícím protein 14-3-3 gama (Yoo JO. et al., 2016). Song a kol. popsali epigenetickou regulaci exprese miR-200 cestou miR-22 mediované suprese rodiny *TET1-3* (ten eleven translocation), která indukuje DNA demetylaci (Song SJ. et al., 2013). Song a kol. tak poprvé zdokumentovali regulační vliv rovnováhy mezi určitými mikroRNA, chromatinovým systémem a indukcí EMT. miR-10b patří mezi induktory EMT a její ektopická exprese cílí na gen kódující homeobox D10 a tím zvyšuje regulaci genů rodiny *RAS* a zvyšuje se invazivita a metastazování. miR-155 přímo ovlivňuje RhoA a zvyšuje tak EMT cestou TGFb/Smad4, nepřímo působí na EMT sníženou expresí E-cadherinu (Kong W. et al., 2008). Tyto nálezy dokumentují multifázický vliv RhoA na EMT a to, že RhoA působí jako cíl tumor supresoru miR-31 a onkogenu miR-155. Mezi hlavní promotéry EMT patří miR-10b, miR-21, miR-155, miR-9, miR-29a, miR-181b-3p, miR-373 a miR-200 (Zhao M. et al., 2017). Mezi hlavní inhibitory EMT patří miR-34, miR-497, miR-125b, miR-206, miR-30a, miR-195, miR-143 (Zhao M. et al., 2017). Jejich výčet není a nemůže být kompletní, protože výzkum objevuje další potenciální kandidátní miR se vztahem k EMT, invazi a metastazování.

Obr. 12: Vliv jednotlivých miR na hlavní mechanismy patogeneze EMT (zdroj: Diaz-López A. et al., 2014)



Metastazování je základní vlastnost zhoubných nádorů a je příčinou úmrtí většiny pacientů. Metastazování představuje vícestupňový komplexní proces začínající v primárním nádoru s iniciací novotvorby cév, ztrátou adhezivity nádorových buněk, jejich uvolněním, schopností invazivity a mobilizace, cirkulací v krvi a vstupem do vzdálených tkání s následným vznikem metastáz (Gupta GP. et al., 2006). V současnosti se odlišují čtyři základní modely metastatického procesu zahrnující (Weigelt B. et al., 2005):

a) tradiční model, kdy metastatická kapacita je pozdní, získaná vlastnost během tumorigeneze

b) model, kdy je schopnost metastazovat časná, vrozená vlastnost tumoru

c) model, kdy je metastazování mechanický, náhodný proces

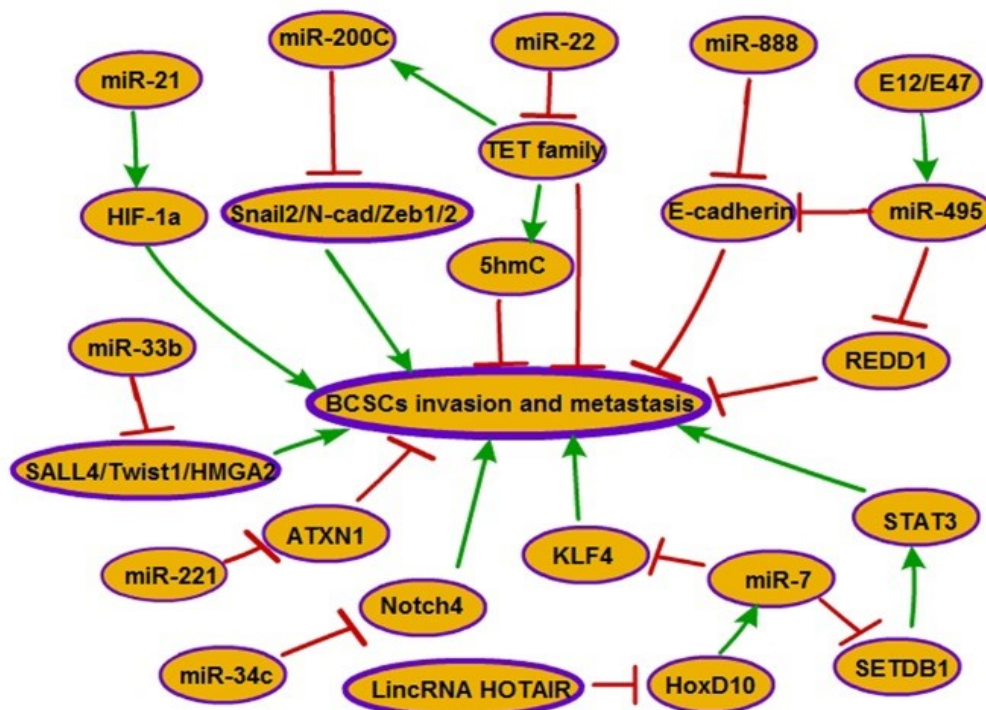
d) model, kdy cirkulující nádorová DNA vstupuje do vnímavých buněk ve vzdálených orgánech.

Klinická aplikace těchto modelů odpovídá schopnosti detekovat a předpovídat budoucí vznik metastáz v době diagnózy časného nádoru nebo později v době jejich rozvoje. Přeneseně do předkládané práce a tématu, zda monitorování exprese vybraných mikroRNA může včas upozornit na hrozící recidivy a metastazování. Hosseini a kol. prokázali schopnost časných nádorových lézí karcinomu uvolňovat do cirkulace nádorové buňky schopné zakládat metastázy (Hosseini H. et al., 2016). Tyto diseminované nádorové buňky představují formu minimální reziduální choroby a jejich detekce má prognostický význam (Klein CA. et al., 2009, Schmidt-Kittler O. et al., 2003). Přesná předpověď prognózy v době diagnózy je důležitá pro volbu intenzity peroperační protinádorové léčby k maximalizaci efektivity a minimalizaci toxicity. Naproti tomu včasná detekce metastáz během dispenzarizace je příležitost pro okamžité zahájení protinádorové léčby, včetně cílené terapie. Pokud metastázy zachytíme v době jejich časného rozvoje, je potenciální možnost trvalé eradikace nemoci (Polzer B. et al., 2013).

Význam mikroRNA v metastatické kaskádě je mnohostranný (obr. 13). Ma a kol. popsali vliv miR-10b na zvýšenou invazivitu a metastazování cestou genů kódujících homeobox D10 (*HOXD1*) a následnou zvýšenou regulací genů rodiny *RAS* (Ma L. et al., 2007). Naproti tomu Tavazoie a kol. identifikovali miR-126, miR-206 a miR-335 jako supresory metastazování, u miR-335 cestou přímé suprese genů kódujících transkripční faktor *SOX4* a *Tenascin C*, který je součástí extracelulární matrix (Tavazoie SF. et al., 2008). Valastyan a kol. popsali sníženou expresi miR-31 u metastatických karcinomů prsu s potlačením invazivity a metastazování vlivem na geny *RHOA* a *ITGA5* (kódující integrin 5 alfa) (Valastyan S. et al., 2009).

Metaloproteinázy (MMP) degradují extracelulární matrix (ECM) a umožňují zvýšenou invazivitu, jejich tkáňové inhibitory (TIMP) jsou dalším cílem různých mikroRNA. miR-21 snižuje expresi TIMP3 a zvyšuje invazivitu buněk karcinomu prsu (Song B. et al., 2010). Mezi další cíle miR-21 se vztahem k invazivitě patří tropomyozin 1 (TPM1), PDCD4 (programmed cell death 4) a maspin, cestou ovlivnění cytoskeletu a ECM (Zhu S. et al., 2008). miR-29b patří mezi mikroRNA potlačující invazivitu a metastazování inhibicí prometastatických regulátorů spojených s angiogenezou, remodelací kolagenu a proteolýzou (Chou J. et al., 2013). Ryu a kol. popsali, že miR-708 potlačuje migraci a metastazování buněk karcinomu prsu supresí genu pro neuronatin, protein endoplazmatického retikula regulující hladiny intracelulárního kalcia (Ryu S. et al., 2013). Následně dochází k inaktivaci proteinů asociovaných s migrací buněk, kinázami SRK (signal-regulated kinase) a FAK (focal adhesion kinase) (Ryu S. et al., 2013). Zhou a kol. dokumentovali vysoký metastatický potenciál při zvýšené expresi miR-105, která rozrušuje spoje mezi buňkami (tight junctions) supresí proteinu ZO-1, indukuje se tak zvýšená cévní permeabilita a metastatická aktivita (Zhou W 2014).

Obr. 13: Vliv jednotlivých miR na invazivitu a metastazování (zdroj: Fan X. et al., 2017)



V neposlední řadě je metastazování podmíněné dostatečným zásobováním nádorových buněk kyslíkem a živinami, jehož předpokladem je **nádorová angiogeneze** (Suarez Y. et al., 2009). Jedním z hlavních faktorů signálních regulací v hypoxických podmínkách je heteromerní transkripční faktor HIF (hypoxia inducible factor), jehož aktivita podporuje nádorovou progresi zvýšením exprese VEGF, glykolytických enzymů, glukózových transportérů a proteinů zvyšujících buněčnou mobilitu a metastazování a dále vlivem na CSC a EMT (Heddleston JM. et al., 2010). Publikované studie například prokázaly sníženou expresi miR-126 u karcinomu prsu a zvýšenou aktivaci signální cesty VEGF (Zhu N. et al., 2011, Iva N. et al., 2010).

Rozvoj karcinomu prsu je komplexní vícestupňový proces zahrnující tři hlavní fáze – iniciaci, progresi a metastazování. Tyto fáze jsou tvořené sekvencemi událostí, z nichž mezi nejvýznamnější patří změny v apoptóze, buněčném cyklu a mobilitě nádorových buněk. Jak bylo výše uvedeno, mikroRNA představují důležité regulátory těchto dějů, byly popsány desítky z nich s různým vlivem na jednotlivé fáze patogeneze karcinomu prsu, přesto neznáme role většiny z nich. To je, mimo jiné, způsobené tím, že jedna miRNA může ovlivňovat expresi stovek genů a naopak jeden transkript může být cílem více miR (Krek A. et al., 2005). Zatím jsou znalosti o tom, jak miR simultánně regulují více proteinů a odhalení všech cílových genů s jejich funkcemi velice limitované. Jedna z dalších cest porozumění patogenezi karcinomu prsu vede přes identifikaci cílů jednotlivých mikroRNA, jejich vzájemných interakcí a funkcí a určení faktorů podmiňujících tkáňově a buněčně specifickou expresi miR (tab. 3).

Tab. 3.: Přehled miR a jejich role v kancerogenezi

miR	funkce	cíle	exprese u BC
miR-200c	Suprese sebeobnovy SCS, snížení proliferace, EMT, metastazování	Bmi-1, ZEB1/2, SNAIL1/2	snížená
Let-7	Suprese sebeobnovy a diferenciace SCS, tumor supresor	RAS, HMGA2	snížená
miR-30	Suprese sebeobnovy SCS	Ubc9, integrin b3, Slug	snížená
miR-21	Antiapoptotická, indukce proliferace, EMT, angiogeneze, invazivity, migrace, metastazování	PTEN, TIMP1, TIMP3, PDCD4, HIF-1a, MMP3, Smad7, Maspin	zvýšená
miR-145	Indukce apoptózy, suprese EMT	RTKN, ER, MUC-1	snížená
miR-155	Antiapoptotická, indukce EMT, podpora buněčného růstu a proliferace	FOXO3a, E-cadherin, VHL, SOCS1, RhoA, TP53INP1, Rad51, HK2	zvýšená
miR-34a	Indukce apoptózy, proliferace	Bcl-2, Cyklin D1, CDK4/6, SIRT1, Bcl-2, ZNF281, CD44, E2F3, SNAIL, Notch4	snížená
miR-17/20	Suprese proliferace, podpora protinádorové aktivity NK bb	Cyklin D1, SRC, Mekk2	snížená
miR-23/27a	Indukce proliferace	Myt-1, ZBTB10, FOXO1, CYP1B1, ST14	zvýšená
miR-17-5p	Suprese proliferace	AIB1, IGF1, IL-8, Cyklin D1, HBP-1	snížená
miR-106b/93/25	Indukce proliferace	pRb	zvýšená
miR-206	Indukce/inhibice proliferace	ERa, SRC-1, SRC-2, GATA-3, <i>Cyklin D2</i> , TGFb, NRPI, Smad2	zvýšená/snížená
miR-18a/b/221/222	Indukce proliferace	ERa, p27, p57, TRPS1	zvýšená
miR-205/200	Suprese EMT, CSC, proliferace, invazivity	ZEB1, ZEB2, Bmi-1, Notch, ErbB2/3, HMGB3	snížená
miR-31	Suprese EMT, progrese, metastazování	RhoA, MIRP, MMP16, Radixin, WAVE3, ITGA5	snížená
miR-373/520c	Indukce EMT, podpora buněčné migrace, invazivity	CD44, TRPS1	zvýšená

	metastazování		
miR-335	Indukce EMT	TNC, SOX4	zvýšená
miR-10b	Indukce EMT, buněčné migrace, angiogeneze, invazivity, metastazování	HOX10D, Tiam1, E-cadherin, PTEN	zvýšená
miRNA-672	Suprese EMT	PRDX6	snížená
miR-126	Suprese angiogeneze, antimetastatický	VEGF, IRS1, PBK, IGFBP2, MERTK	snížená
miR-9	Indukce EMT, proliferace a angiogeneze	E-cadherin, SOCS5	zvýšená
miR-20b	Suprese angiogeneze	HIF-1a	snížená
miR-29	Indukce EMT, angiogeneze	Buněčné adhezivní molekuly, hypometylace DNA tumor supresorů, N-myc, VEGFA, ANGPTL4, LOX	zvýšená
miR-495	Indukce EMT, CSC	E-cadherin, REDD1, JAM-A	zvýšená
miR-181a/b	Indukce EMT, CSC	PHLDA1, ATM, YWHAG	zvýšená
miR-130a	Suprese EMT	ER, c-MET	snížená
miR-7	Suprese EMT	SETDB1 (STAT1), Myc, Twist	snížená
miR-375	Suprese EMT	SHOX2, IGFR, RASD1	snížená
miR-379	Tumor supresor	Cyklin B1, IL-11	snížená
miR-497	Tumor supresor	Cyklin D1, Cyklin E1, Smad7	snížená
miR-22	Tumor supresor	ErbB3, ERa, CDK6, SIRT1, Sp1, TET1-3	snížená
miR-105	Indukce EMT	ZO-1, DNMT3A/B, ZFP36	zvýšená
miR-125b	Inhibice proliferace, diferenciace, migrace a invazivity	EPO, EPOR, ENPEP, CK2-a, CCNJ, MEGF9, ERBB2, MAP2K7	snížená
miR-146b	Snížené přežití nádorových buněk a metastazování	NFkB, STAT3	snížená
miR-103/107	EMT	DICER	
miR-708	Inhibice EMT, migrace, metastazování	NNAT	snížená

1.2.6.2 mikroRNA a jejich použití jako biomarkery

V současnosti je dobře definované, že cirkulující mikroRNA jsou vázané na jejich původ z nádorů a lze je tak využít jako relativně neinvazivní a spolehlivé biomarkery (Pigati L. et al., 2010). Dle National Cancer Institute je biomarker definovaný jako “biologická molekula detekovatelná v krvi, jiných tělesných tekutinách a tkáních, která je známkou fyziologických a patologických procesů nebo známkou choroby”. Nádorové biomarkery slouží k detekci nemoci (markery diagnostické), stanovení prognózy (markery prognostické) a markery předpovídající efekt terapie (markery prediktivní). Optimální biomarker má být jednoduchý ke stanovení, stabilní, neinvazivní, resp. minimálně invazivní, objektivně kvantifikovatelný, schopný opakovaného měření pro dynamické monitorování, měl by mít vysokou specifitu, senzitivitu a prediktivní sílu. Dosavadním zlatým standardem diagnostiky nádorových onemocnění je biopsie, operační nebo navigovaná jehlou. Biopsie představuje vysoce invazivní a rizikový zákrok, který nemusí být vždy technicky možný. Dále, vzhledem k heterogenitě primárního nádoru a metastáz, je vhodné při každé recidivě znovu ověřovat histopatologické parametry, které odrážejí molekulární vývoj nádoru. V posledních letech navíc přibývá důkazů o tom, že nádory velice rychle reagují na léčbu vznikem odolných mutací proti cílené léčbě, biopsický odběr bychom tak ideálně měli provádět i během léčby. Je proto zjevné, že potřebujeme metody s minimální invazivitou a neomezenou opakovatelností, schopné dynamického pohledu na nádor, tyto důvody vedly k rozvoji metod tekuté biopsie (liquid biopsy). V posledních letech se stále více uveřejňují data využití CTC, ctDNA nebo mikroRNA v diagnostice, prognostice a monitorování nádorových onemocnění (Garcia-Murillas I. et al., 2015, Alix-Panabieres C., Pantel K., 2013, Wan JC. et al., 2017, Jillian-Phallen MSV. et al., 2017). Tyto metody jsou schopné s minimální invazivitou zobrazovat genomické variability nádorů a jejich dynamického vývoje během protinádorové léčby a umožňují monitorování nádorových onemocnění během sledování po primární léčbě (Yang M. et al., 2018).

MikroRNA splňují teoreticky většinu podmínek a předpokladů pro ideální biomarkery. Jsou vysoce specifické, expresní profily miR dostatečně odlišují zdravé a nádorové tkáně, dále odlišují jednotlivé typy nádorů, jsou odlišné exprese podle stádií a pokročilosti nádorů a to i ve srovnání s genomickými metodami (Lu J. et al., 2005). Dále jsou vysoce stabilní ve všech tkáních a tělesných tekutinách a to nejenom v čerstvých vzorcích, ale i ve formalínem fixovaných a parafínem zalitých vzorcích (FFPE) (Mo MH. et al., 2012). Na rozdíl od RNA jsou odolné ke změnám teplot, pH, opakovanému zmrazení a rozmrazení a chemickému nebo enzymovému štěpení (Cortez MA. et al., 2011). Předpoklady a podmínky pro použití mikroRNA

jako cirkulující biomarkery jsou splnitelné, v textu byla uvedena celá řada limitací a komplikací při jejich analýze a hodnocení, ale všechny lze překonat a miR se blíží ideálnímu biomarkeru (Ortiz-Quintero B. et al., 2016, Cheng D. et al., 2015, He Y. et al., 2015, Ghal V. et al., 2016, Schwarzenbach H. et al., 2014). Jejich malá invazivita umožňuje pravidelné odběry, získáme tak dynamický pohled na vývoj nemoci, hodnocení reziduální choroby a během léčby její aktuální efektivitu. Studium miR jako biomarkerů u nádorových onemocnění je velice expandující část vědeckého zájmu, v prosinci 2017 bylo na Pub Med pod řetězcem miR AND cancer AND biomarker nalezeno 8176 publikací (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Diagnostický význam mikroRNA byl popsán ve stovkách prací, jak jednotlivých miR, tak i různých setů více miR, deregulace mikroRNA byla popsána jak v nádorových tkáních, tak i v séru nebo plazmě s vysokou stabilitou vůči degradaci (Wang F. et al., 2010, Chen X. et al., 2008, Weber JA. et al., 2010, Cortez MA. et al., 2011, Schwarzenbach H. et al., 2011, Kosaka N. et al., 2010, Brase JC. et al., 2010, Larrea E. et al., 2016, Si H. et al., 2013). Byly popsány deregulace jednotlivých mikroRNA a celých profilů miR v závislosti na histologickém typu, expresi HR a HER2, proliferační aktivitě, gradingu a dalších faktorech (Heneghan HM. et al., 2010, Wu Q. et al., 2012, Zhang L. et al., 2015, Chan M. et al., 2013, Lowery AJ. et al., 2009, Frères P. et al., 2016, Tashkandi H. et al., 2015). Obecně se jeví, že senzitivita a specificita metod hodnotících expresi miR se zvyšuje s počtem hodnocených mikroRNA (Blenkiron C. et al., 2007, Endo Y. et al., 2013, Iorio MV. et al., 2005, de Rinaldis E. et al., 2013).

Prognostický význam různých mikroRNA byl korelován ve vztahu s dalšími klinicko-patologickými markery a to jak u časných, tak metastatických nádorů (Iorio MV. et al., 2008, Madhavan D., et al. 2016). Výzkum prognostického významu různých mikroRNA je kontinuální a fundamentální proces, protože pacienti s různým rizikem recidivy onkologického onemocnění vyžadují odlišné způsoby protinádorové léčby. Zvláště u časného karcinomu prsu, kde mohou rizika cytostatické chemoterapie dlouhodobě komplikovat a zkracovat život vyléčených pacientek. Prognostické mikroRNA u karcinomu prsu mohou představovat jak onkomiR tak i tumor supresorové miR. Detekce cirkulujících miR po léčbě karcinomu prsu může fungovat jako detekce minimální reziduální nemoci a určovat tak riziko budoucího relapsu (Madhavan D. et al., 2012). Stejně jako u diagnostiky, byly u prognostického významu popsány desítky mikroRNA, zvýšeně nebo sniženě exprimovaných (Markou A. et al., 2014, Png KJ. et al., 2012, Peng F. et al., 2016, Kleivi-Sahlberg K. et al., 2015, Bertoli G. et al., 2015, Nassar FJ. et al., 2017, Inns J. et al., 2015, Huo D. et al., 2016, Joosse SA. et al., 2014, Mangolini A. et al., 2015, Chen W. et al., 2013, Roth C. et al., 2010, Si H. et al., 2013). Většina studií určila

prognostický význam jednotlivých miR nebo setů více miR, nejčastěji v korelaci s pokročilostí onemocnění, metastazováním, rizikem relapsu a celkovým přežitím (van Schooneveld E. et al., 2015). Některé studie provedly multivariantní porovnání s klinickými, patologickými, případně molekulárními rizikovými markery a určily tak vzájemné vztahy a nezávislost miR na ostatních parametrech.

Přes všechny pokroky v poznání role mikroRNA u karcinomu prsu je v metaanalýzách a systematických přehledech patrná malá shoda mezi publikacemi z hlediska hodnocených mikroRNA (Witwer KW. et al., 2015). Důvody byly uvedené v obecné části a jsou metodologického, preanalytického a analytického charakteru. Liší se počty stanovovaných miR, jejich kombinace, hodnoty exprese a jejich význam v diagnostice, prognostice a predikci. Rozdílů jsou i v kohortách pacientů, jejich složení, v heterogenitě nádorového onemocnění, absolvované léčbě, délce sledování a dalších faktorech. Není shoda na vyšetřovaném materiálu (krev, tkáň), metodologii odběru, analytických metodách stanovení miR, normalizačních technikách a statistických metodách. Publikace tak přinášejí dostatek důkazů o působení miR u karcinomu prsu a jejich využitelnosti jako biomarkery, ale zatím s malou shodou.

Systematický výzkum mikroRNA u karcinomu prsu přináší cenné údaje o patogenezi v časných a pokročilých fázích nemoci. Studium cirkulujících mikroRNA zjednodušuje jejich dosažitelnost a opakované hodnocení umožňuje dynamický pohled na změny během léčby a sledování nádorového onemocnění. Vzhledem k vysoké komplexnosti a heterogenitě karcinomu prsu jsou preciznější metody k odlišení rizikových skupin a efektu terapie vysoce nutné a mikroRNA představují jednu z možných cest.

1.2.7 Cílové mikroRNA projektu

Poznání významné role mikroRNA ve vzniku a udržování nádorového procesu ve všech fázích kancerogeneze vedlo k výběru cílových mikroRNA, které jsme v předkládaném projektu hodnotili s cílem určit jejich prognostický význam u časného karcinomu prsu.

Pro náš projekt jsme vybrali miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b, které představují důležité molekuly nádorového růstu a agresivity karcinomu prsu. Jako normalizační kontrolu jsme zvolili let-7a, která vykazuje stabilní expresi mezi zdravými a nádorovými tkáněmi.

1.2.7.1 miR-155

MiR-155, lokalizovaná na chromozómu 21q21 patří mezi multifunkční miR. Byla popsána jako důležitý faktor vzniku, rozvoje a udržení nádorového procesu, stejně jako zánětu a imunity (Mattiske S. et al., 2012). Ve studiích byla popsána významně zvýšená exprese miR-155 u žen s karcinomem prsu ve srovnání se zdravými kontrolami (Wang F. et al., 2010, Liu J. et al., 2013, Wang F. et al., 2014, Roth C. et al., 2010), která korelovala s pokročilostí choroby a prognózou (Eichelser C. et al., 2013, Kim S. et al., 2015, Guo J. et al., 2016). V jiné publikaci byla zvýšená hladina miR-155 v korelaci se stavem estrogenových a progesteronových receptorů a horší prognózou (Lu Z. et al., 2012). Sun a kol. detekovali zvýšenou expresi miR-155 v sérech a nádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu, hodnoty exprese klesaly po operačním odstranění nádorů a chemoterapii a korelovaly s prognózou (Sun Y. et al., 2012). Je zajímavé, že sérové hodnoty miR-155 klesaly dříve ve srovnání s jinými biomarkery. Zhu W a kol. prokázali zvýšenou expresi miR-155 u žen s karcinomy prsu a pozitivními hormonálními receptory v porovnání s nádory HR negativními (Zhu W. et al., 2009). Jiné publikace prokázaly, že monitorování mikroRNA během léčby karcinomu prsu koreluje s nádorovou masou a dynamicky tak odráží její změny, což může být využito v monitoraci choroby. Perzistence zvýšených hodnot exprese miR-155 může ukazovat na mikroskopickou perzistenci reziduální choroby a dynamika poklesu během léčby na její úspěšnou eradikaci (marker prognostický a prediktivní). Naproti tomu Heneghan a kol. nenašli signifikantní rozdíl miR-155 v krvi mezi zdravými ženami a ženami s karcinomem prsu (Heneghan HM. et al., 2010).

Přehled publikovaných studií u karcinomu prsu určil přibližně 147 cílových genů miR-155 ve vztahu ke kancerogenezi, zahrnujících geny pro apoptózu, diferenciaci, angiogenezi, proliferaci a EMT (Mattiske S. et al., 2012, Wang J. et al., 2012). miR-155 podporuje proliferaci a růst nádorových buněk karcinomu prsu downregulací genu *TP53INP1* (Zhang CM. et al.,

2013). Jedním ze způsobů udržení růstu nádoru je nádorová angiogeneza, zde působí miR-155 vlivem na VHL tumor supresorový protein (Kong W. et al., 2014). Další práce popsaly zvýšenou expresi miR-155 u karcinomu prsu inhibující mRNA kódovaný SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling 1) vedoucí k perzistentní aktivaci STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3) (Jiang S. et al., 2010). Další z mechanismů progresu nádorového procesu je ovlivnění apoptózy, miR-155 působí antiapoptoticky. Kong a kol. prokázali, že miR-155 indukuje buněčné přežití supresí FOX3a (Forkhead box 3a) (Kong W. et al., 2010). FOX3a je lokalizován v buněčném jádře a ovlivňuje apoptózu zvýšením exprese *BIM*, který patří mezi důležité tumor-supresorové geny (Sunters A. et al., 2003). EMT je důležitý moment umožňující nádorovým buňkám metastázovat, miR-155 přímo ovlivňuje TGFbeta/Smad4 (mothers against DPP homolog 4) indukovanou EMT vlivem na *RHOA* (Ras homolog gene family, member A) a potlačením E-cadherinu (Kong W. et al., 2008, Vincent-Salomon A. et al., 2003). Další možností ovlivnění cestou EMT je ztráta *C/EBPb* vlivem zvýšené exprese miR-155 a změna TGFb mediované růstové inhibice na EMT, invazivitu a metastazování (Johansson J. et al., 2013). V zajímavé publikaci Dinami a kol. popsali, že zvýšená exprese miR-155 podporuje fragilitu telomer a mění strukturu chromozómů v metafázi cestou ovlivnění TERC1 (Telomeric repeat factor 1) a prokázali, že exprese miR-155 koreluje se špatnou prognózou pacientek s lumenálními karcinomy prsu (Dinami R. et al., 2014). Mezi méně studované a popsané patří vliv miR na energetický metabolismus nádorových buněk, miR-155 může aktivací exprese hexokinázy 2 podporovat glykolýzu (Jiang S. et al., 2012).

1.2.7.2 miR-24

miR-24 zahrnuje mikroRNA zvýšeně exprimované v různých fyziologických a patologických stavech. Nachází se v klastru s dalšími dvěma miR na chromozómu 9 (klastr 1: miR-23b, miR-27b, miR-24-1) a chromozómu 19 (klastr 2: miR-23a, miR-27a, miR-24-2). Ve většině experimentálních pracích byla miR-24 definována jako onkogen, včetně karcinomu prsu, ale například u karcinomu laryngu působí jako tumor supresorová miR (Chhabra R. et al., 2010). miR-24 je zvýšeně exprimovaná v sérech i tkáních karcinomu prsu (Wu Q. et al., 2012). Role miR-24 v kancerogenezi je vlivem na kmenové buňky, diferenciaci, proliferaci, apoptózu, adhezivitu a buněčnou migraci, podporuje růst, invazivitu a metastazování (Wang X. et al., 2008, Zaidi SK. et al., 2009, Lin SC. et al., 2010, Musto A. et al., 2015, Amelio I. et al., 2012, Roy L. et al., 2015). Podle online databáze MIRUMIR, která analyzuje mikroRNA jako potenciální biomarkery, je vysoká exprese miR-24 spojená s horší prognózou karcinomu prsu

(<http://www.bioprofiling.de/GEO/MIRUMIR/mirumir.html>) (Antonov AV. et al., 2013). Byl prokázán vliv exprese miR-24 na snížení exprese fosfatáz PTPN9 a PTPRF vedoucí ke zvýšené fosforylaci EGFR u metastatických karcinomů prsu a následnému zvýšení buněčné invazivity, migrace a metastazování (Du WW. et al., 2013). Dále byl prokázán vliv miR-24 na zvýšenou expresi MMP2, MMP11 (matrixové metaloproteinázy), ERK (extracellular signal-regulated kinases), ADAM15 (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 15) a sníženou expresi TIMP2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2), což dále potvrzuje její roli v invazivitě a metastazování (Du WW. et al., 2013). V jiné publikaci byl prometastatický potenciál dáván do souvislosti s ovlivněním prosaposinu, tumor supresorového genu (Ell B. et al., 2014). Vznik a udržení nádorového procesu může regulovat miR-24 také snížením exprese tumorového supresoru p16^{INK4a} (Lal A. et al., 2008). Dalšími mechanismy ovlivňujícími apoptózu je vliv na p27Kip1, FAG1, kaspázu 9, Bim, Apaf-1 a XIAP (Lu K. et al., 2015, Chen Q. et al., 2014, Qin W. et al., 2010, Bueno MJ. et al., 2011, Xie Y. et al., 2013). miR-24 podporuje invazivitu a metastazování represí SPRY2 a následnou aktivací MAPK (Li X. et al., 2013). ING5, který patří do rodiny ING (inhibitor of growth – inhibitory růstu), je důležitý tumorový supresor mající roli ve zpomalení buněčného cyklu, remodelaci chromatinu, senescenci, apoptóze a opravách poškození DNA, což vede k poklesu proliferace, invazivity a metastazování a vzestupu apoptózy a diferenciace (Zhao QY. et al., 2015). miR-24 funguje jako vzestupný negativní regulátor ING5 a přímo působí na potlačení jeho aktivity (Cui S. et al., 2017). Vedle výše zmíněného působení působí miR-24 na EMT cestou ovlivnění TGFβ (Transforming growth factor β) (Papadimitriou E. et al., 2012). Významnou roli hraje miR-24 v patogenezi nádorových kmenových buněk, které se podílejí na vzniku a udržení nádorového procesu. miR-24 byla zvýšeně exprimována na kmenových buňkách karcinomu prsu, tato zvýšená exprese vedla k další amplifikaci množství CSC a expresi markerů nádorových kmenových buněk (Rosigno G. et al., 2017). miR-24 snižuje expresi FIH a zvyšuje expresi HIF1alfa a jeho přímých cílů, Snail a VEGFA. FIH je betahydroxyláza, která podporuje transkripční represí HIF1, který je spolu se Snail a VEGF zásadní v angiogenezi. miR-24 tak přímo zvyšuje odolnost buněk karcinomu prsu v hypoxických podmínkách cestou regulace FIH1-HIF1alfa (Rosigno G. et al., 2017). Zvýšená exprese miR-24 snižuje aktivaci kaspázy 3 a štěpení PARP, což dále podporuje rezistenci k apoptóze a odolnost vůči chemoterapii (Rosigno G. et al., 2017). Obsáhlý přehled cílů miR-24 přinesl článek Masahi Katoha, který zpracoval rešerši různých zdrojů informací o působení vybraných miR v kancerogenezi, miR-24 dále podporuje proliferaci a invazivitu vlivem na *FAF1*, *ST7L*, *AURKB*, *CCNA2*, *CDC2*, *CDK4*, *E2F2* a *MYC* (Katoh M. et al., 2014).

1.2.7.3 miR-19a

mikroRNA-19a je jedním z členů klastru miR-17-92 (oncomir-1), který dále zahrnuje miR-17-5p, -17-3p, -18a, -20a, -19b a -92-1 (Tanzer A., Stadler P.F., 2004). Tyto mikroRNA jsou děleny do 4 oddělených rodin s ohledem na jejich charakteristickou seed sekvenci: miR-17, miR-18, miR-19 a miR-92 (Olive V. et al., 2009). Zvýšená exprese klastru miR-17-92 byla pozorována u různých zhoubných nádorů, včetně karcinomu prsu (Kim K. et al., 2012). Práce prokazující zvýšenou expresi miR-19a u karcinomu prsu byla publikována, tito autoři prokázali, že miR-19a přímo ovlivňuje posttranskripční regulaci genů kódujících proteiny IMPDH1 (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1) a NPEPL1 (aminopeptidase like-1) (Ouchida M. et al., 2012). V jiné publikaci byl vliv miR-19a na patogenezi karcinomu prsu dáván do souvislosti s inhibicí tumor supresorového genu *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) a následnou aktivací Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) signální dráhy (Farazi T.A. et al., 2011, Olive V. et al., 2009, Mu P. et al., 2009). Vliv na PI3K/Akt/mTOR, MYC a PTEN byl prokázán v dalších publikacích (Cascione L. et al., 2013, de Rinaldis E. et al., 2013). Aktivace Akt/mTOR dráhy může zvýšit expresi MDR-1, MRP1 a BCRP, které představují hlavní proteiny zodpovědné za rezistenci k chemoterapii (Choi B.H. et al., 2008). Zajímavé je, že androgenní receptor může zvyšovat expresi miR-19a a dle údajů ze studií je patrné, že karcinomy prsu s pozitivním androgenním receptorem vykazují nízkou senzitivitu k chemoterapii (Qian L. et al., 2014). Existují i další cíle miR-19a, případně klastru miR-17-92 – *SOCS-1* (suppressor of cytokine signaling-1) (Pichiorri F. et al., 2008), *RBL2* (retinoblastoma-like protein 2) (Lu Y. et al., 2007), *HIF1A* (hypoxia-inducible factor 1-alpha) (Taguchi A. et al., 2008), *RAB14* (Ras related protein RAB-14) (Kanzaki H. et al., 2011). V dalších studiích byl prognostický význam miR-19a u karcinomu prsu dáván do souvislosti s cílením na HBP1 (HMG box-containing protein 1) a ZBTB4 (zinc-finger and BTB domain containing 4) (Li H. et al., 2011, Zhang B. et al., 2007). Zajímavá data přinesla publikace Anfossiho a kol., kteří prokázali, že zvýšená exprese miR-19a koreluje s dobrou prognózou HER pozitivního inflamatorního karcinomu prsu (Anfossi S. et al., 2014). Publikací prokazující prediktivní možnosti miR-19a byla práce Li a kol., kteří asociovali hladiny miR-19a s efektem neoadjuvantní chemoterapie u lumenálních karcinomů prsu (Li Q. et al., 2014).

1.2.7.4 miR-181b

MikroRNA miR-181b je tvořena dvěma podjednotkami, miR-181b-1 lokalizované na chromozómu 1 a miR-181b-2 lokalizované na chromozómu 9. miR-181b patří převážně mezi onkomiR a její zvýšená exprese v tumorech a séru byla popsána u různých druhů nádorů, včetně karcinomu prsu (Li S. et al., 2012, Wu Q. et al., 2012, Liu J. et al., 2014, Sun X. et al., 2012). Existují i údaje o vlivu miR-181b na inhibici metastazování karcinomu prsu cestou ovlivnění cytokinů CXCL-1 a CXCL-2 (C-X-C motif ligand) (Kroski E. et al., 2014). Jiní autoři dokumentují onkogenní vliv miR-181b působením na CSC, ovlivněním apoptózy, invazivity, migrace a metastazování (Neel JC. et al., 2013, Wang Y. et al., 2011, Chen J. et al., 2011). Analýza tumorů karcinomu prsu odhalila vzájemné vztahy mezi miR-181b, *HMGA 1* a *CBX7*, bylo zjištěno, že zvýšená exprese *HMGA 1* zvyšuje expresi miR-181b a snižuje expresi *CBX7* genu (Mansueto G. et al., 2010). Zvýšená exprese miR-181b přímo snižuje koncentraci proteinu CBX 7, CBX 7 naproti tomu snižuje expresi miR-181b (Mansueto G. et al., 2010). HMGA proteiny (High mobility group A) jsou vysoce exprimované u zhoubných nádorů, včetně karcinomu prsu, zvýšená exprese HMGA je asociovaná s vysoce maligním fenotypem a je známkou špatné prognózy, protože koreluje s metastazováním a zkráceným přežitím (Fusco A. et al., 2007). Naproti tomu pokles v koncentraci proteinu CBX7 (Chromobox homolog 7) způsobuje zvýšenou proliferaci a zvýšený přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu u miR-181b pozitivních buněk (Pallante P. et al., 2008). miR-181b ovlivňuje další geny, které hrají důležitou roli v kontrole buněčné proliferace a nádorové transformace, hlavně ovlivněním apoptózy – *PCDC4* (programmed cell death 4), *BCL2L11* (BCL2-like 11) a *BCLAF1* (BCL2-associated transcription factor 1). Zajímavá práce prokázala roli miR-181b v opravách poškození DNA downregulací *ATM* genu (ataxia teleangiectasia mutated) při léčbě trojitě-negativních karcinomů prsu PARP1 inhibitory (Bisso A. et al., 2013). Práce Iliopoulose a kol. našla propojení mezi expresí miR-19a a miR-181b, prokázali, že miR-19a řízená inhibice *SOCS1* aktivuje expresi miR-181b cestou *STAT3* (Iliopoulos D. et al., 2010). Další experimentální práci autoři popsali vliv zvýšené exprese miR-181b na proliferaci, invazivitu a metastazování karcinomu prsu ovlivněním signální cesty NF-kB (Wang L. et al., 2016). Aktivace NF-kB ovlivňuje inflamatorní cytokiny a moduluje nádorové mikroprostředí, které má zásadní význam pro migraci nádorových buněk a metastazování (Su S. et al., 2014). miR-181b podporuje také aktivitu metaloproteináz (MMP2, MMP9) a tím zvyšuje růst, invazivitu a migraci (Wang B. et al., 2010).

1.2.7.5 let-7a

MikroRNA let-7a byla vybrána jako kontrola, protože vykazuje minimální variabilitu v sérech pacientů se zhoubnými nádory, včetně karcinomu prsu (Song J. et al., 2012, Kim SJ. et al., 2012, Liu Y. et al., 2013, Cai WY. et al., 2013). Další práce prokázala stabilní a srovnatelnou expresi let-7a a miR-195 v plazmě pacientek s karcinomem prsu v porovnání se zdravými kontrolami (Zhao H. et al., 2010). Vysvětlení je takové, že je produkována hlavně diferencovanými somatickými buňkami a exprimovaná minimálně kmenovými a nediferencovanými prekursorovými buňkami (Newman MA. et al., 2008).

2. Hypotéza a cíle dizertační práce

2.1 Podklady pro zformulování hypotézy

Karcinom prsu je nejčastější zhoubné nádorové onemocnění žen s velice rozdílnou prognózou závislou na celé řadě klinických, patologických a molekulárních markerů. Časný karcinom prsu má prognózu celkově dobrou, ale existují zde podskupiny pacientek s vysokým rizikem relapsu a metastazování. Prognostické markery, které využíváme v současnosti, nemají u jednotlivých pacientek dostatečnou senzitivitu a specifickou. Hledání dostatečně silných prognostických markerů patří mezi významné směry výzkumu karcinomu prsu.

MikroRNA se účastní regulace genů na posttranskripční úrovni a jejich deregulace byla popsána u celé řady nemocí, včetně nádorových. V případě nádorových onemocnění byl zjištěn jejich podíl na vzniku a rozvoji nádorového procesu včetně ovlivnění buněčného cyklu, diferenciaci, proliferaci, angiogeneze, apoptózy, migrace a invazivity. Během kancerogeneze působí jako onkogeny nebo tumor supresorové geny. Jejich proměnlivá exprese, která byla detekována ve tkáních ve fázi prekanceróz a u rozvinutých zhoubných nádorů naznačuje, že mohou být užity jako diagnostický marker časně fáze vzniku nádorů. Vedle exprese ve tkáních byla popsána jejich detekce v různých tělesných tekutinách, včetně krve, s vysokou stabilitou. Detekce mikroRNA v séru nebo plazmě přináší možnost hodnotit expresi mikroRNA a její změny s relativně malou invazivitou, opakovaně během léčby nádoru. V posledních 20 letech byly popsány desítky mikroRNA u karcinomu prsu, zvýšeně nebo sniženě exprimovaných. Změny exprese mikroRNA v závislosti na léčbě a jejich korelace ke klinickým výsledkům mohou určovat jejich prognostický význam. I přes celou řadu experimentálních a klinických prací je role mikroRNA a jejich kombinací v určení prognózy nádorového onemocnění zatím nejasná. Vzhledem k důležité roli mikroRNA u nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu, představují změny jejich exprese před a po léčbě unikátní marker, který může lépe specifikovat riziko návratu nemoci. Lze tak odvozovat z dlouhodobého hodnocení změn exprese jednotlivých mikroRNA a jejich kombinací v závislosti na přežití a recidivách karcinomu. U onkogenních mikroRNA by jejich exprese s úspěšnou léčbou měla klesat pod detekovatelnou nebo významnou hodnotu. Přetrvávání jejich exprese nebo vzestup po léčbě by tak mohly být charakteristické pro reziduální nemoc s dopadem na budoucí prognózu.

2.2 Hypotéza

Onkogenní mikroRNA jsou zvýšeně exprimované v sérech pacientek s časným karcinomem prsu. Po odstranění nádoru a svodných lymfatických uzlin by jejich exprese měla klesat pod významnou hodnotu. Přetrvávání zvýšené exprese může být korelováno s dlouhodobými výsledky přežití a recidivami onemocnění a představovat cirkulující prognostický biomarker.

2.3 Konkrétní cíle navazující na hypotézu

Mezi hlavní cíle projektu patří

- Detekovat expresi miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b v séru pacientek s časným karcinomem prsu
- Zjistit rozdíly exprese pro skupinu nízkého a vysokého rizika podle klinicko-patologických markerů
- Zjistit změny exprese mikroRNA v závislosti na fázích léčby karcinomu prsu
- Zjistit změny exprese mikroRNA před a po léčbě v závislosti na klinicko-patologických rizikových markerech
- Zjistit prognostický význam dlouhodobých změn exprese před a po léčbě časného karcinomu prsu
- Porovnat vztah exprese mikroRNA a klinicko-patologických markerů na určení prognózy karcinomu prsu

3. Pacienti a metody

3.1 Soubor pacientek a zdravých kontrol

3.1.1 Základní charakteristiky souboru pacientek a kontrol

Předkládaný projekt prospektivního sběru sér pacientek s časným karcinomem prsu byl zahájen v září 2010 po souhlasném stanovisku Etické komise Krajské nemocnice Liberec a.s. (EK/83/2010 ze dne 23.6.2010). Jednalo se o dlouhodobý prospektivní neintervenci projekt s cílem sledovat expresi cílových onkogenních mikroRNA v sérech pacientek s karcinomem prsu, jejich změny v závislosti na léčbě, rozdíly podle klinicko-patologických rizikových markerů a potenciální význam v rozlišení rizika relapsu onemocnění.

Cílovou skupinou byly konsektivní pacientky s časným karcinomem prsu indikované primárně k operačnímu řešení. Každá vhodná pacientka, která byla vytipována na základě konzultace v mamologickém týmu Krajské nemocnice Liberec, byla den před operací seznámena s projektem. Pokud souhlasila se zařazením do projektu, podepsala informovaný souhlas (kap. 9: příloha 1).

V projektu byly předem definované 4 odběry krve na zpracování séra. První odběr byl den před operačním výkonem (bod I, time point I), druhý následoval za 14-28 dnů po operačním výkonu před zahájením protinádorové léčby (bod II, time point II) a třetí za 14-28 dnů po první léčebné modalitě (chemoterapie nebo radioterapie) (bod III, time point III). Čtvrtý bod odběru (bod IV, time point IV) byl v době záchytu recidivy onemocnění, ještě před zahájením protinádorové léčby (operace, chemoterapie, hormonoterapie nebo radioterapie).

Pacientky byly operované podle aktuálních standardů léčby časného karcinomu prsu. Ve většině případů podstoupily parciální odstranění nádoru (segmentektomie, kvadrantektomie), mastektomie byla volena při kontraindikaci parciálního výkonu, nebo v případě nutnosti vyhnout se radioterapii (kardiální nebo plicní rizika). Svodné lymfatické uzliny byly vyšetřovány nejčastěji odběrem sentinelových uzlin (SLNB – sentinel lymph node biopsy). V případě pozitivních SLN byl další postup dle volby chirurga - provedení axilární lymfatické disekce nebo bez další intervence na lymfatických.

Zpracování nádoru podléhalo zásadám správné laboratorní praxe dle doporučení Společnosti českých patologů. Byla zhodnocena velikost a okraje nádoru, histologický typ a diferenciací (grade), lymfatická, vaskulární a perineurální propagace nádoru. Imunohistochemicky se stanovovala exprese hormonálních receptorů (ER, PgR) v jádře (0%-100%), exprese

proliferačního markeru Ki-67 (0%-100%) a exprese HER2 (0, 1+, 2+, 3+). V případě exprese HER2 2+ a 3+ byla vyšetřena amplifikace genu *HER2/neu in-situ* hybridizací. Vyšetření uzlin probíhalo ve formě zmrazeného preparátu s okamžitou informací operujícímu chirurgovi o postižení nebo nepostižení uzlin(y) metastázami a dále definitivně po formolové fixaci.

Kombinací klinických a patologických markerů bylo stanoveno klinické stádium, riziková skupina a po zhodnocení dalších faktorů (celkový klinický stav, věk, menopauzální status, komorbidita a souběžná medikace) stanoven léčebný plán podle současných znalostí. Projekt a jeho výsledky nezasahovaly do léčebného onkologického rozhodování.

Po absolvování základní pooperační (adjuvantní) léčby byly a nadále jsou pacientky dlouhodobě sledovány podle standardního postupu se základním fyzikálním vyšetřením ve frekvenci á 3 měsíce první 2 roky, poté á 4-6 měsíců do doby 5 let a poté á 6-12 měsíců dlouhodobě. Klinické vyšetření může být doplněno odběrem nádorových markerů dle volby lékaře. Dále se jednou ročně provádí mamografie, ultrazvuk břicha a rentgen plic.

V případě relapsu onemocnění, který mohl být ve formě lokální recidivy, druhostranného nádoru prsu nebo vzdálené generalizace (metastazování), byly pacientky konzultovány v mamologickém týmu a stanoven odpovídající léčebný plán.

U pacientek jsme zaznamenali základní demografické údaje – věk v době diagnózy, menopauzální stav, anamnézu nádorového onemocnění a rodinnou anamnézu, datum diagnózy, datum operačního výkonu, data a druh absolvované léčby a datum případné recidivy.

Zdravé kontroly projektu tvořilo 21 žen s věkovým rozmezím 25-60 let, bez zjevných známek onkologického onemocnění a bez onkologického onemocnění v osobní anamnéze.

3.1.2 Rozdělení souboru a kohorty ke statistickému zpracování

Časný karcinom prsu má obecně vynikající prognózu, přežití se liší podle vstupního klinického stádia a v současnosti uznávaných klinicko-patologických markerů. Jak bylo výše uvedeno v kapitole 1.1.4, riziko recidivy je nejvyšší mezi 2.-3. rokem od diagnózy a poté kolem 5 let od diagnózy.

Pacientky jsme si rozdělili podle klinicko-patologických markerů do dvou rizikových skupin. Do skupiny vysokého rizika patřily všechny ženy s alespoň jedním z následujících markerů – trojitě negativní karcinom (ER, PgR a HER2 negativita), pozitivita LU, Ki-67 rovno nebo nad 20%, HER2 pozitivita, grade III. Do skupiny nízkého rizika patřily všechny ženy bez jakéhokoliv z výše uvedených faktorů.

První část projektu zahrnovala hodnocení základních charakteristik stanovení mikroRNA v sérech pacientek s časným karcinomem prsu – aplikovatelnost vybraných analytických metod, získání základních údajů o expresi cílových mikroRNA v sérech a tumorech, změny jejich koncentrací v závislosti na léčbě a rozdíly mezi vysokým a nízkým rizikem dle klinicko-patologických faktorů. Do této kohorty bylo zařazeno celkem 63 pacientek (medián věku 58 let), které odevzdaly séra ve všech definovaných bodech (I, II, III) mezi roky 2010-2013. Medián sledování této kohorty byl v době statistického zpracování 27 měsíců (9,5-36,3 měsíců) (tab. 4).

Do hodnocení další fáze předkládaného projektu, prognostického významu mikroRNA a korelace s klinicko-patologickými markery, jsme zařadili 133 pacientek, které mezi zářím 2010 a květnem 2014 odevzdaly alespoň vzorek I a II (tab. 5). V této kohortě nebyl odběr po první protinádorové modalitě (bod III) a při recidivě (bod IV) podmínkou zařazení. Klinické rozhodování o adjuvantní léčbě se koná v časném pooperačním období, zpravidla 2-3 týdny po operaci a optimální doba pro zahájení pooperační léčby je 4-6 týdnů po operaci. Prognostický marker by proto měl být validován po operaci po odstranění tumoru a svodných lymfatických uzlin, v našem projektu v době odběru II.

Adjuvantní chemoterapii podstoupilo 42 pacientek (31%), pooperační ozáření jsme indikovali u 97 pacientek (73%) a hormonální léčba byla nasazena u 118 pacientek (88%).

Závěrečné statistické zpracování proběhlo v prosinci 2017, medián sledování souboru byl 73 měsíců (rozmezí 21,6-88 měsíců). V době statistického zpracování jsme zaznamenali celkem 13 recidiv karcinomu prsu (9,7%) (medián PFS 71 měsíců, rozmezí 12-88) měsíců). Byly zastoupeny všechny typy recidivy – lokální, druhostranný karcinom, vzdálené metastázy. V souboru ve sledovaném období zemřelo celkem 8 pacientek (6%), z toho 4 na progresi karcinomu prsu (3%) a 4 z neonkologických příčin.

Tab. 4: Kohorta 1 projektu

Počet pacientek (počet tumorů)	63 (64)
Doba sledování	medián 27 měsíců (9,5-36,3 měsíců)
Medián věku (rozptyl)	58 let (37-82 let)
Premenopauzální	16 (25%)
Postmenopauzální	47 (75%)
pT1a	1 (2%)
pT1b	10 (15%)
pT1c	32 (50%)
pT2	21 (33%)
G I	11 (18%)
G II	38 (62%)
G III	12 (20%)
duktální	50 (69%)
lobulární	11 (15%)
jiné	11 (15%)
Ki-67 0%-5%	21 (34%)
Ki-67 6%-19%	28 (45%)
Ki-67 20% a více	13 (21%)
ER +	54 (84%)
ER -	10 (16%)
PgR +	54 (84%)
PgR -	10 (16%)
HER2 0-1+	58 (90%)
HER2 2+	3 (5%)
HER2 3+	3 (5%)
N +	15 (23%)
N -	49 (77%)
Trojité negativní nádory	5 (8%)
Skupina nízkého rizika	29 (46%)
Skupina vysokého rizika	34 (54%)

Tab. 5: Kohorta 2 projektu

Počet pacientek (počet tumorů)	133 (134)
Věk	medián 61.5 (37-84) roků
Doba sledování	medián 73 (21.6-88) měsíců
Premenopauzální/postmenopauzální	23/110
Histologie duktální	97 (72%)
Histologie lobulární	10 (8%)
Histologie ostatní	27 (20%)
pT1a	3 (2%)
pT1b	21 (16%)
pT1c	70 (52%)
pT2	40 (30%)
pT3	0
pT4	0
N +	26 (19%)
N -	108 (81%)
G I	27 (20%)
G II	72 (54%)
G III	27 (20%)
Bez hodnocení grade	8 (6%)
HR +	119 (89%)
HR -	15 (11%)
HER +	4 (3%)
HER -	125 (93%)
Bez hodnocení HER	5 (4%)
Ki-67 0-19%	100 (75%)
Ki-67 >20%	29 (21%)
Bez hodnocení Ki-67	5 (4%)
Trojité negativní nádory	12 (9%)
Skupina nízkého rizika	65 (49%)
Skupina vysokého rizika	68 (51%)

3.2 Sběr a zpracování krve

Krev byla odebírána pacientkám s časným karcinomem prsu indikovaným k primárnímu chirurgickému řešení po poučení a podpisu informovaného souhlasu.

Výše byly definovány 4 základní časové body odběru (I, II, III, IV), odstup 2-4 týdnů od operace nebo léčby byl stanoven na základě možného falešného vlivu zánětlivé reakce nebo aktivizace imunitního systému operací, radioterapií nebo chemoterapií. Propojení zánětlivé kaskády a mikroRNA je popsáno v literatuře.

Odběr krve probíhal standardním způsobem do 10 ml zkumavky s polymerovým gelem a aktivátorem srážení (BD Vacutainer SST™ tubes). Zkumavky se ponechaly při pokojové teplotě 30-60 minut, poté se odstředily při rychlosti 3000 otáček za minutu po dobu 10 minut, sérum rozplnilo do 200 μ l alikvotů (kolem 10 alikvotů na odběr) a okamžitě zmrazilo na -80°C . Vzorky rozmrazené kvůli extrakci a kvantifikaci nukleových kyselin se již znovu nezamrazovaly.

3.3 Zpracování vzorku, extrakce a kvantifikace mikroRNA

Izolace RNA a přepis do cDNA

RNA byla izolována z 200 μ l séra (lyzováno 1 ml QIAzol® Lysis reagent) za užití kitu miRNeasy® Mini Kit (Qiagen) s několika modifikacemi:

- a) intenzivní promíchání na míchačce vortex po přidání předchlazeného CHCl_3
- b) centrifugace při 4°C , 15 minut na 10800 otáček za minutu
- c) přidání 1 μ l glykogenu během ethanolové precipitace
- d) opakované (3 \times) promytí 500 μ l RPE pufrem
- e) eluce mRNA z kolony pomocí 40 μ l ddH₂O bez nukleáz s RNA inhibitory.

Koncentrace mRNA byla velmi nízká, proto nebylo možné ji stanovit pomocí přístroje Spectrophotometer ND-1000. 10 μ l mRNA bylo použito na přepis do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu v celkovém reakčním objemu 50 μ l. Reverzní transkripce s miR-specifickými primery (Life Technologies) proběhla na přístroji Mastercycler Gradient.

Složení směsi pro reverzní transkripci RNA:

	μl/1 vzorek
10x RT pufr	0,8
dNTPs	0,6
RNase inhibitor	0,8
Random primer	1,0
5x let7a primer	2,0
5x hsa-miR-155 primer	2,0
5x hsa-miR-19a primer	2,0
5x hsa-miR-181b primer	2,0
5x hsa-miR-24 primer	2,0
RT enzym	2,0
RNA	10 μl
ddH ₂ O bez RNázy doplnit do celkového objemu 40 μl	

Teplotní profil pro reverzní transkripci RNA:

- 1) T=16°C, 30 minut
- 2) T=42°C, 30 minut
- 3) T=85°C, 5 minut
- 4) T=4°C, 5 minut.

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a vyhodnocení mRNA exprese

Pro RT-qPCR reakci byly připraveny dvě oddělené směsi: cDNA-směs pro každý jednotlivý vzorek a primer-směs pro referenční let-7a a specifické mikroRNA (hsa-miR-155; hsa-miR-19a; hsa-miR-24; hsa-miR-181b). Následně byly tyto reakční směsi postupně napipetovány na destičku o 384 jamkách tak, aby do každé jamky byla napipetována kombinace jedné cDNA směsi (4 μl) a jedné primer směsi (4 μl). Celkový objem RT-qPCR reakce na jednu jamku byl 8 μl. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR) proběhla na přístroji 7900HT Fast Real-time PCR System. Každá RT-qPCR reakce (unikátní kombinace cDNA směsi a primer směsi) byla v daném experimentu napipetována v dubletu.

Složení PCR reakce s barvivem TaqMan (pro jednu jamku):

1) cDNA-směs: TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,2 μ l; cDNA 0,8 μ l

2) primer směs (let-7a; hsa-miR-155; hsa-miR-19a; hsa-miR-24; hsa-miR-181b): TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,6 μ l; primer 0,4 μ l;

Amplifikace probíhala inkubací v cykléru za následujících podmínek: Počáteční denaturace a aktivace AmpliTaq polymerázy (T = 95°C, 10 minut); 40 cyklů (Denaturace při 95°C po dobu 15 sekund; anelace primedrů a polymerace T = 60°C po dobu 1 minuta).

Vyhodnocení qPCR:

C_T hodnoty (hodnota PCR cyklu, kdy amplifikační křivka překročí prahovou hodnotu fluorescenčního signálu umístěnou do fáze exponenciálního růstu kopií PCR produktu) pro specifický onkomiR (miR-155, miR-19a, miR-181b, miR-24) (C_{Tspec}) byly odečteny od C_T hodnot pro referenční mikroRNA let-7a (C_{Tnorm}). Relativní hodnota exprese mRNA u pacientek s EBC je vypočtena jako průměr hodnot $2^{-(C_{Tnorm}-C_{Tspec})}$ v duplikátu pro každý vzorek s určením standardní chyby měření. Střední hodnoty a standardní odchylky dCT hodnot (každého vzorku a průměrného vzorku kontrol) referenční mikroRNA let-7a v patientských vzorcích v každém odběrovém bodě (I-III) a ve vzorcích kontrol dokumentují, že let-7a je stabilně exprimována ve vzorcích sér.

Střední hodnota_I = -0.06818, standardní odchylka_I = 0.6640

Střední hodnota_{II} = -0.01103, standardní odchylka_{II} = 0.8948

Střední hodnota_{III} = 0.01014, standardní odchylka_{III} = 0.8488

Střední hodnota_{CTRL} = 0.05397, standardní odchylka_{CTRL} = 0.6604

Vysvětlivky: I, II, III body odběru, CTRL - kontrola

3.4 Statistické metody

Sérové hodnoty všech onkogenních miR (miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24, všechny vztažené k let-7a) byly zaznamenány pro každou pacientku v časových intervalech během onkologické léčby: v době diagnózy (I), po operačním výkonu (II), po chemo nebo radioterapii (co skončí dříve) (III) a v případě recidivy onemocnění (IV). Sérové hodnoty zdravých kontrol byly měřeny pouze jednou.

Mnohorozměrná longitudinální analýza dat byla provedena ke stochastickému modelování sérových hodnot každé miR. Následující rovnice byla použita pro miR-19a a miR-181b

$$E[miR_{i,t}|b_i] = 1/\{\beta_I + \beta_{II}(Patient_i \text{ in } II) + \beta_{III}(Patient_i \text{ in } III) + \beta_C(Control_i) + \beta_L(LowRisk_i) + b_i\},$$

a pro miR-155 a miR-24

$$E[miR_{i,t}|b_i] = \exp\{\beta_I + \beta_{II}(Patient_i \text{ in } II) + \beta_{III}(Patient_i \text{ in } III) + \beta_C(Control_i) + \beta_L(LowRisk_i) + b_i\}.$$

V těchto rovnicích je $E[miR_{i,t}|b_i]$ podmíněná střední hodnota sérových hladin $miR_{i,t}$ pro každou pacientku/kontrolu i v časovém bodě $t = I, II, III$ podmíněna náhodným efektem b_i , který je specifický pro každou pacientku/kontrolu a má mnohorozměrné normální rozdělení se střední hodnotou 0. Interpretace matematických zápisů, např. $(Patient_i \text{ in } II)$, je taková, že závorka je rovna jedné právě tehdy a jen tehdy, když i -tá pacientka/kontrola je v časovém bodě II (a tedy se jedná o pacientku, nikoliv kontrolu); jinak nula.

V dalším pokračování projektu byly opět zaznamenány sérové hodnoty onkogenních miR (miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24, vztažené k let-7a) pro každou pacientku s EBC ve čtyřech definovaných časových bodech (I-IV) během léčby. Mnohorozměrná longitudinální analýza dat byla aplikována, aby stochasticky modelovala sérové hladiny každé mikroRNA. Pro náš projekt byla použita modifikace zobecněného lineárního modelu (generalized linear model, GLM) nazvaná zobecněné odhadovací rovnice (generalized estimating equations, GEE). Důvodem je to, že všechny klasické regresní přístupy vycházejí z předpokladu, že sérové hodnoty jednoho pacienta v odlišných časech jsou nezávislé. Nicméně tento předpoklad nemusí být v biostatistice pravdivý, resp. je minimálně otazný. GEE byly aplikovány poprvé Liangem a kol. v roce 1986 jako metoda k odhadovanému modelování pokud není jistý předpoklad nezávislosti efektů (Liang K, Zeger SL., 1986).

Následující zobecněné odhadovací rovnice (generalized estimating equations, GEE) byly použity jako model:

$$E[miR_{i,t}] = \exp\{\beta_R(Patient_i \text{ relapsed}) + \beta_N(Patient_i \text{ not relapsed}) \\ + \beta_I(Patient_i \text{ in I}) + \beta_{II}(Patient_i \text{ in II}) + \beta_{III}(Patient_i \text{ in III}) \\ + \beta_{IV}(Patient_i \text{ in IV})\}.$$

V tomto vzorci je $E[miR_{i,t}]$ očekávaná sérová hodnota $miR_{i,t}$ pro každou pacientku s EBC identifikovanou i v časovém bodě $t = I, II, III, IV$. Distribuce sérových hodnot miR má Gamma rozdělení a autoregresní korelační struktura řádu jedna je zvolena pro modelování závislosti v rámci každého měření miR hodnoty v jednotlivých časových bodech. Interpretace matematických zápisů, např. $(Patient_i \text{ in II})$, je taková, že závorka je rovna jedné právě tehdy a jen tehdy, když i -tá pacientka je v časovém bodě II; jinak nula. Regresní koeficienty β představují kvantitativní vliv následného pravdivého/nepravdivého indikátoru v závorce. Například β_R kvantifikuje vliv relabované pacientky na odpovídající sérovou hodnotu miR. Detailnější praktickou statistickou ilustraci o GEE je možné najít např. v Hudecová S., Pesta M., 2013.

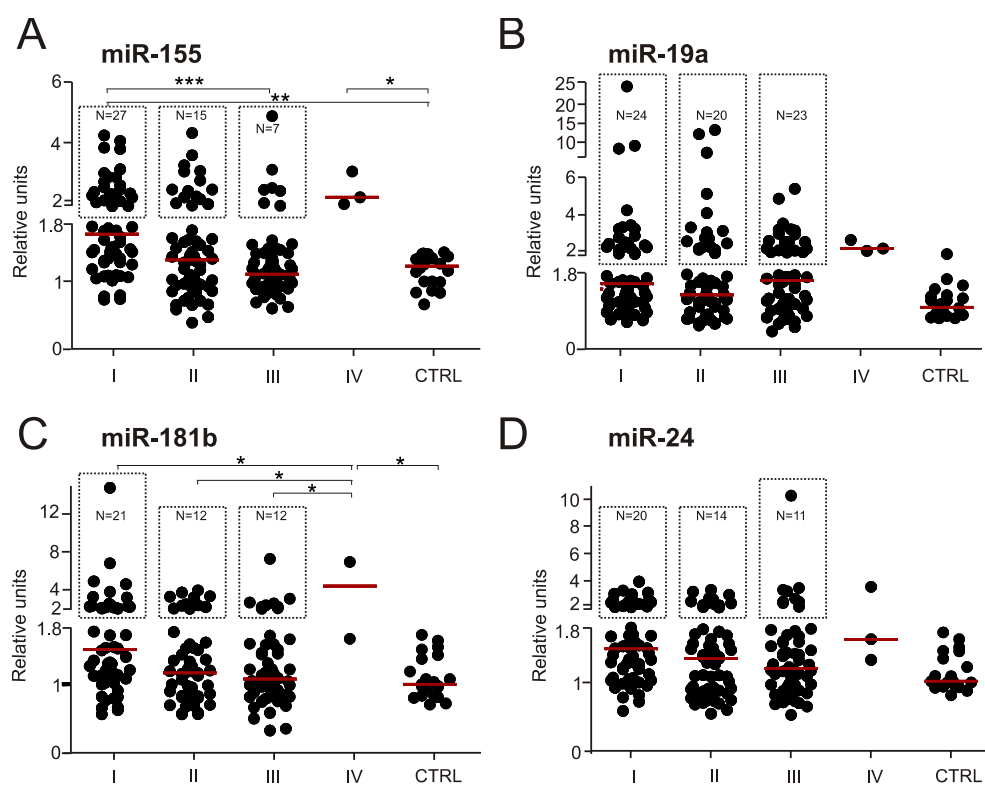
Vlastní statistické zpracování bylo prováděno pomocí statistického softwaru R (<http://www.r-project.org>).

4. Výsledky

4.1 Exprese onkogenních mikroRNA v séru v jednotlivých fázích léčby

V první fázi projektu jsme stanovili profily exprese miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b v séru 63 pacientek (kohorta 1, tabulka 4) v předem definovaných bodech I, II a III a porovnali je s expresí miR v séru zdravých kontrol. Jako vnitřní normalizační kontrola byla použita exprese let-7a, která je stabilně exprimovaná v sérech zdravých i nemocných (viz kap. 1.2.7.5). Za významnou (informativní) hranici jsme stanovili hodnotu exprese 1,8x nad arbitrárně definovanou hranici významnosti, která byla určena na základě předchozích publikací podle mediánu vzestupu onkogenních miR (Iorio MV. et al., 2005). Jako zdravé kontroly jsme použili séra 21 zdravých žen, které v době odběru nevykazovaly známky nádorového ani jiného chronického onemocnění a nádorové onemocnění neprodělaly v osobní anamnéze. Předoperačně (bod I) překračovaly hranici významnosti jednotlivé onkomiR následovně – miR-155 byla 1,8-4,2x více exprimovaná ve 43% (27 pac.), miR-19a byla 1,8-25,1x více exprimovaná ve 38% (24 pac.), miR-181b byla 1,8-14,7x více exprimovaná ve 33% (21 pac.) a miR-24 byla 1,8-3,7x více exprimovaná ve 32% (20 pac.) (obr. 14A-D).

Obr. 14: Hodnoty sérové exprese onkomiR v jednotlivých časových bodech



Vysvětlivky obr. 14: sérové hodnoty onkomiR u pacientek s EBC (N=63) a zdravých kontrol (N=21). 200 ul séra bylo užito k extrakci celkové RNA, která sloužila ke specifické reverzní transkripci a TaqMan PCR amplifikaci miR-155 (A), miR-19a (B), miR-181b (C) a miR-24 (D) a let-7a, která sloužila jako normalizační kontrola. Pacientky s EBC byly analyzovány v době diagnózy (I), po operaci (II) a po adjuvantní léčbě (III). 3 pacientky byly analyzovány také v době relapsu (IV). Osa Y představuje sérové hodnoty onkomiR vztažené k let-7a. Průměrné hodnoty zdravých kontrol byly vztažené k 1. ANOVA test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, průměry jsou označeny vodorovnou čarou. Počty pacientek s hodnotami miR > 1,8 jsou zvýrazněny v okénku.

Tato data dokumentují to, že onkomiR jsou zvýšené exprimované v sérech pacientek v době diagnózy EBC, toto zvýšení není patrné u všech nemocných. Jak bude uvedeno v odstavci 4.4, po rozdělení pacientek do rizikových skupin podle klinicko-patologických markerů a kombinaci více mikroRNA dochází ke zvýšení citlivosti a lze tak odlišit významně více pacientek.

Z výsledků předoperačních hodnot exprese vyplývá, mimo jiné to, že miR-19a a miR-181b vykazovaly vysokou variabilitu v rozsahu exprese (až do 25x resp. 15x), zatímco miR-155 a miR-24 vykazovaly maximálně 4x zvýšenou hodnotu exprese a rozptyl hodnot byl tak v úzkém rozmezí.

Pro statistické zhodnocení vývoje exprese onkogenních mikroRNA v jednotlivých fázích léčby jsme vytvořili a aplikovali model longitudinální mnohorozměrné analýzy dat pro každou onkomiR (viz Statistické metody). Tento model umožnil analyzovat každou hodnotu exprese onkomiR v séru s ohledem na dobu odběru a rizikovou skupinu a definovat očekávanou hodnotu každé mikroRNA v každém bodě odběru. Parametry longitudinálního modelu jsou uvedené v tabulce 6A-D (miR-155 A, miR-19a B, miR-181b C, miR-24 D).

Jako první jsme hodnotili změny exprese všech onkomiR po operačním odstranění primárního nádoru a svodných lymfatik. Mezi bodem I a II hladiny miR-155, miR-181b a miR-24 signifikantně poklesly (p -hodnoty < 0,05, miR-155: 1,89e-05, miR-181b: 5,41e-06, miR-24: 0,00638) u všech pacientek nezávisle na rozdělení podle rizika (nízké i vysoké riziko) (tab. 6). Naproti tomu jsme nezaznamenali po operaci (bod II) významný pokles miR-19a. Tento fakt může svědčit pro její větší stabilitu nebo to, že její produkce nereflexuje odstranění nádorové masy.

Tab. 6: Souhrn dat longitudinální multivariantní analýzy

A) miR-155			
Parametr	Odhad	Standardní odchylka	p-hodnota
β_I	0.61774	0.06440	< 2e-16
β_{II}	-0.24024	0.05617	1.89e-05
β_{III}	-0.34474	0.05684	1.32e-09
β_C	-0.51148	0.11103	4.10e-06
β_L	-0.18353	0.08245	0.026
B) miR-19a			
Parametr	Odhad	Standardní odchylka	p-hodnota
β_I	0.60941	0.04843	< 2e-16
β_{II}	0.03224	0.03187	0.31183
β_{III}	0.09981	0.03804	0.00869
β_C	0.34506	0.11439	0.00256
β_L	0.15711	0.07041	0.02567
C) miR-181b			
Parametr	Odhad	Standardní odchylka	p-hodnota
β_I	0.70370	0.05176	< 2e-16
β_{II}	0.17814	0.03917	5.41e-06
β_{III}	0.17263	0.03884	8.80e-06
β_C	0.27792	0.10095	0.0059
β_L	0.16588	0.07403	0.0250
D) miR-24			
Parametr	Odhad	Standardní odchylka	p-hodnota
β_I	0.50276	0.06718	7.19e-14
β_{II}	-0.14807	0.05429	0.00638
β_{III}	-0.12527	0.05527	0.02343
β_C	-0.34034	0.11512	0.00311
β_L	-0.22631	0.08774	0.00990

Vysvětlivky tab. 6: Zobrazené jsou parametry k výpočtu podmíněně očekávané sérové hodnoty pro každou pacientku/kontrolu v určitém časovém bodě a jejich odhadované sérové hodnoty, standardní odchylky a p-hodnoty pro miR-155 (A), miR-19a (B), miR-181b (C), a miR-24 (D), všechny vztažené k let-7a. Parametry hodnot onkomiR: β_I : bod I, β_{II} : rozdíl mezi body I a II, β_{III} : rozdíl mezi body I a III, β_C : rozdíl mezi bodem I a zdravými kontrolami, a β_L : rozdíl mezi pacientkami vysokého a nízkého rizika. Odhadované hodnoty parametrů jsou užity k výpočtu podmíněného očekávání sérových hodnot jednotlivých mikroRNA pro každou pacientku v každém časovém bodě (viz Statistické metody). Pro vysvětlení modelu, predikce hodnoty miR-19a po léčbě vysoce rizikové pacientky, predikovaná hodnota je $1/\{0.60941 + 0.09981\} \approx 1.410$ (viz odhad z tabulky 6B). Pro nízké riziko je odhad sérové hodnoty miR-24 po operaci $\exp\{0.50276 + (-0.14807) + (-0.22631)\} \approx 1.137$ (tab. 6D).

V dalším kroku jsme zjišťovali rozdíl exprese všech onkomiR před operací (bod I) a po první léčebné modalitě, chemo nebo radioterapii (bod III). Zde již došlo k signifikantně významnému poklesu všech 4 mikroRNA (p -hodnoty $< 0,05$, miR-155: 1.32e-09, miR-19a: 0.00869, miR181b: 8.80e-06, miR-24: 0.02343). Tento fakt nás vedl k závěru, že nesignifikantní pokles miR-19a po operaci reflektuje spíše její vyšší stabilitu, případně se může jednat o formu molekulární reziduální choroby, než produkci nezávislou na nádorové tkáni. Data jsou přehledně znázorněna na obrázku 14 a v tabulce 6.

Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že hodnoty onkomiR jsou signifikantně odlišné v době diagnózy a po operaci (bod I a II), mimo miR-19a, která se jeví stabilnější v bodě II a klesá po adjuvantní léčbě (bod III). Dále jsou hodnoty onkomiR zdravých žen signifikantně nižší než hodnoty onkomiR pacientek s karcinomem prsu v bodě III.

Dle dostupných dat exprese onkogenních miR je patrné, že část pacientek vykazovala v bodě III (po první protinádorové léčebné modalitě) zvýšené hladiny v porovnání se zdravými kontrolami. Jednalo se o pacientky bez detekovatelné choroby, měly odstraněný primární nádor a svodná lymfatika a byly po adjuvantní onkologické léčbě (chemoterapie nebo radioterapie). Zjevný zdroj produkce onkogenních miR by neměl být v této fázi v organismu přítomen. Vysvětlení může být dvojí, první se týká větší stability konkrétních miR v cirkulaci. Vzhledem k tomu, že od operace většinou uběhla doba delší než 3 měsíce, se nezdá toto vysvětlení jako pravděpodobné. Mnohem pravděpodobnější se jeví důvod ten, že v organismu perzistovala reziduální nemoc ve formě jednotlivých cirkulujících nádorových buněk secernujících miR. Tyto cirkulující nádorové buňky mohou být dále eliminovány imunitním systémem a hormonální terapií, ale část může být základem pro budoucí relaps. Jeví se tak možný předpoklad užitečnosti monitorování cirkulujících mikroRNA na sledování aktivity nemoci a rizika relapsu (liquid biopsy).

V době vyhodnocování kohorty 1 byl relaps karcinomu prsu zaznamenán u 3 pacientek. Tyto 3 pacientky darovaly sérum v době relapsu před zahájením jakékoliv protinádorové léčby (bod IV). Stanovili jsme expresi všech 4 onkomiR podle předchozí metodiky a zjistili, že všechny mikroRNA vykazovaly zvýšenou expresi, která korelovala s návratem nemoci (obr. 14A-D).

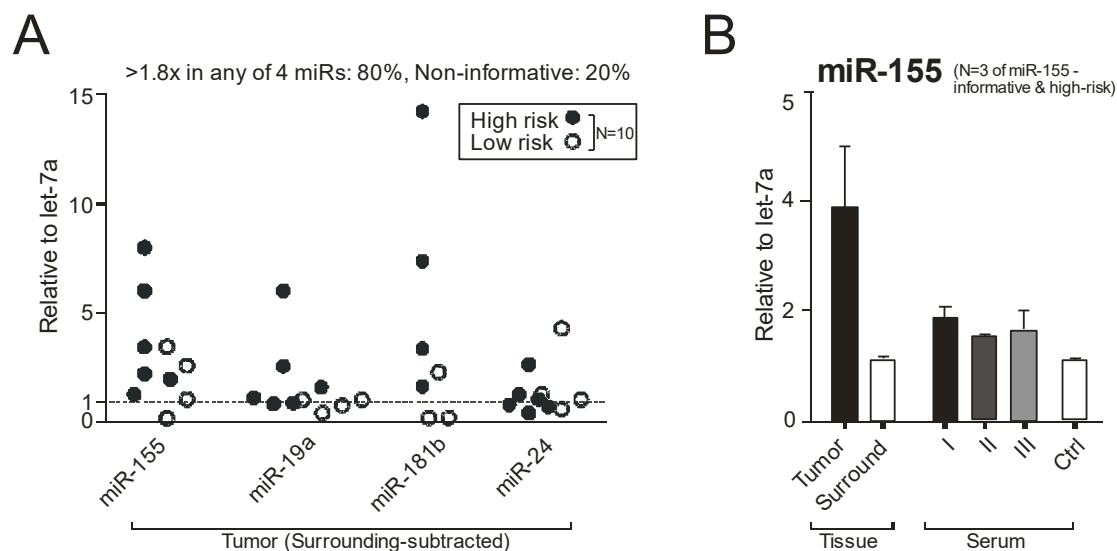
4.2 Exprese onkogenních mikroRNA v tumorech karcinomu prsu

Ke zjištění, zda jsou onkomiR produkované nádorovou tkání, jsme analyzovali také vzorky tumorů a vzorky okolní zdravé tkáně u 10 pacientek, které zároveň odevzdaly séra ve všech definovaných bodech.

Analýzou exprese onkomiR v nádorové tkáni, vztažené k okolní zdravé tkáni, jsme identifikovali, že 8/10 pacientek vykazovalo jejich zvýšenou expresi (obr. 15A) srovnatelně s elevací v séru (obr. 15B). Po rozdělení pacientek na rizikové skupiny vykazovaly pacientky ve skupině vysokého rizika vyšší expresi onkomiR oproti skupině nízkého rizika (obr. 15A, černá kolečka). Podobně jako v sérech, exprimovaly tumorové tkáně zvýšeně jednu, dvě nebo více miR, což dokumentuje molekulární heterogenitu tumorové tkáně karcinomu prsu.

Podle dat exprese miR-155 v nádorech jsme analyzovali její hodnotu v séru u 3 vysoce rizikových pacientek a zjistili její významně zvýšenou hodnotu (v porovnání se zdravými kontrolami) v době diagnózy (I), která přetrvávala navzdory léčbě (II, III) (obr. 15B). Tyto údaje potvrzují agresivnější povahu této podskupiny pacientek a zároveň možnosti využití onkomiR v detekci reziduální choroby, která může být základem budoucích recidiv onemocnění.

Obr. 15: Hodnoty exprese onkogenních miR v tumorech, zdravé tkáni a sérech



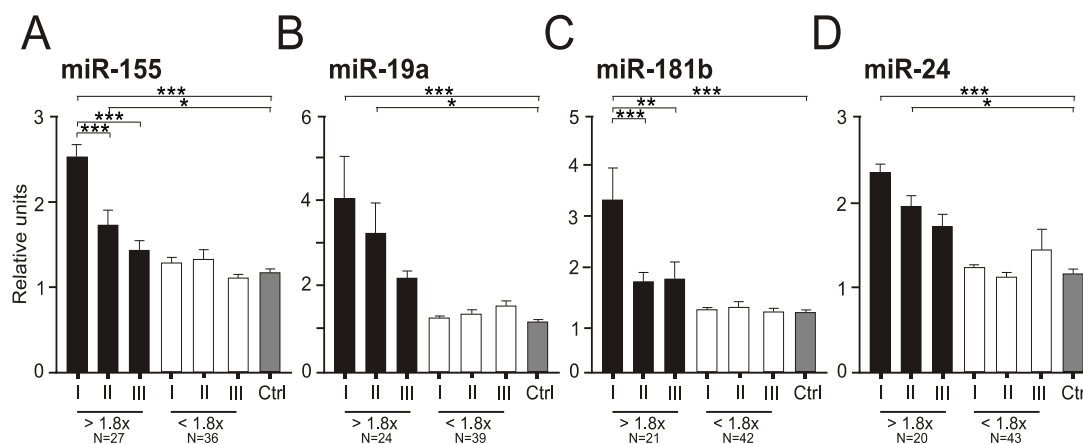
Vysvětlivky obr. 15: Hodnoty onkomiR v tumorech jsou zvýšené oproti zdravé tkáni. Nádorová a okolní zdravá tkáň (N=10, levý panel A) byly po odstranění chirurgem lyzovány a následně extrahovaná celková RNA a po reverzní transkripci a TaqMan PCR amplifikaci zjištěna exprese miR-155, miR-19a, miR-181b, miR-24 a let-7a jako normalizační kontroly. Riziková skupina byla

rozlišena (vysoké riziko: černé kolečka, nízké riziko: prázdná kolečka). Vysoce rizikové pacientky (N=3, pravý panel B) jsme porovnali zároveň se séry z hlediska exprese miR-155 v době diagnózy (I), po operaci (II) a po léčbě (III). Osa Y reprezentuje hladiny onkomiR vztažené k expresi let-7a po odečtení hodnot okolní tkáně. Průměrné hodnoty kontrol byly vztaženy k 1.

4.3 Vývoj onkogenních miR v závislosti na vstupní hodnotě exprese

Na obr. 16 jsou exprese jednotlivých mikroRNA a jejich vývoj v závislosti na době odběru přehledně rozdělené podle vstupní úrovně exprese (< 1,8x bílé, > 1,8x černě). Pokud byla vstupní hodnota exprese informativní (tj. > 1,8x) byl pokles mezi jednotlivými odběry dynamičtější a větší než pro vstupní hodnoty exprese < 1,8x. Tato data dokumentují to, že vstupně zvýšeně exprimované mikroRNA v sérech pacientek s EBC po léčbě významně poklesly, ale častěji nenormalizovaly své hodnoty exprese v porovnání se zdravými kontrolami (obr. 16). Naproti tomu pacientky se vstupní hodnotou exprese pod 1,8x nevykazovaly v průběhu léčby dynamiku poklesu mikroRNA a nelišily se tak od hladin exprese zdravých kontrol. Jak je patrné, některé pacientky vykazovaly po ukončené léčbě zvýšené hodnoty exprese onkomiR v porovnání se zdravými kontrolami. Byly to pacientky, které neměly dle zobrazovacích metod známky perzistence onkologického onemocnění, může se tedy jednat o určitou formu molekulární reziduální choroby.

Obr. 16: Vývoj onkogenních miR v závislosti na vstupní hodnotě exprese



Vysvětlivky obr. 16: Sérové hodnoty onkomiR u pacientek s EBC klesají po léčbě. Detekce miR-155 (A), miR-19a (B), miR-181b (C) a miR-24 (D) v sérech pacientek s EBC byla analyzována v době diagnózy (I), po operaci (II) a po adjuvantní léčbě (III). Osa X odlišuje pacientky s vysokou expresí miR > 1,8x (černé sloupce) a nízkou expresí < 1,8x (bílé sloupce). Osa Y představuje exprese onkomiR vztažené k let-7a. Průměrné hodnoty zdravých kontrol vztažené k 1. ANOVA test, * p<0.05, ** p<0.001, ***p<0.0001. Počty pacientek podle exprese jsou znázorněné.

4.4 Exprese onkogenních mikroRNA podle rizikové skupiny a vývoj v závislosti na léčbě

Další otázkou našeho projektu, která směřovala k prognostickému významu bylo, zda pacientky vysokého rizika exprimují jednotlivé onkomiR odlišně v porovnání s pacientkami nízkého rizika a jak se tyto hodnoty mění v závislosti na léčbě. Pacientky s časným karcinomem prsu jsme si pro analýzu rozdělili podle uznávaných klinicko-patologických markerů na dvě skupiny – nízkého a vysokého rizika (viz Pacienti a metody).

Pacientky vysokého rizika vykazovaly signifikantně zvýšené hodnoty exprese jednotlivých onkomiR (miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24) oproti zdravým kontrolám (p -hodnota miR-155: 4.10e-06, miR-19a: 0.00256, miR-181b: 0.0059, miR-24: 0.00311).

Pacientky nízkého rizika vykazovaly signifikantně nižší hodnoty exprese oproti vysoce rizikovým pacientkám (p -hodnota miR-155: 0.026, miR-19a: 0.02567, miR-181b: 0.0250, miR-24: 0.00990).

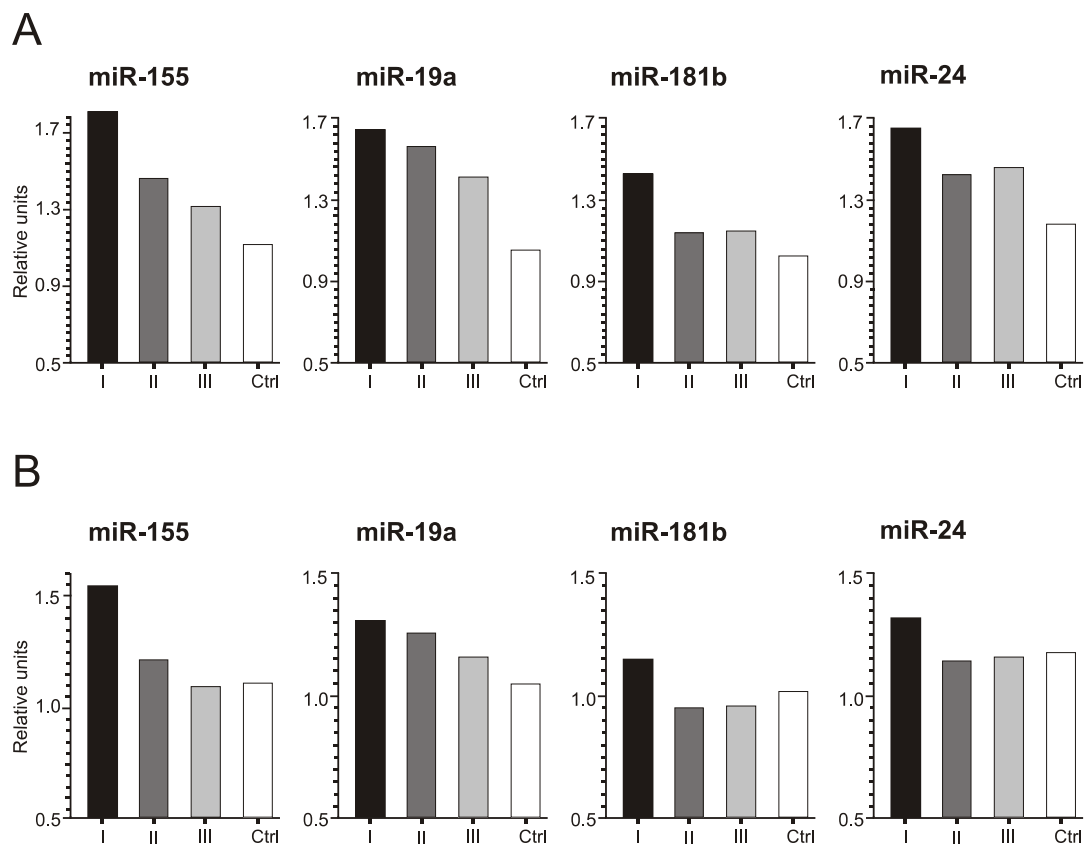
Z těchto údajů vyplývá, že existuje definovatelná hodnota exprese jednotlivých onkomiR, která má diagnostický potenciál a dále rozlišuje pacientky vysokého a nízkého rizika. Klinicko-patologické charakteristiky rozdělující pacientky do rizikových skupin korelují signifikantně s hodnotami exprese všech čtyř onkomiR (parametr β_L v tabulce 6A-D). Hodnoty významnosti byly pro všechny čtyři onkogenní mikroRNA méně než 0,05, tento fakt svědčí pro to, že na základě odlišné exprese jednotlivých onkomiR lze rozdělit pacientky s časným karcinomem prsu do nízkého a vysokého rizika.

Další analýza byla zaměřená na změny exprese jednotlivých onkomiR v různých fázích léčby v závislosti na rizikové skupině. Exprese miR-155 a miR-19a v sérech pacientek vysokého rizika klesá v průběhu celé léčby (obr. 17, horní panel A). Naproti tomu miR-181b a miR-24 poklesnou po operačním odstranění nádoru a poté zůstávají stabilní a zvýšené oproti zdravým kontrolám.

Pacientky nízkého rizika vykazují nevýznamný pokles exprese onkomiR po chirurgickém odstranění nádoru a následně zůstávají prakticky konstatní v průběhu léčby s přibližně stejnými hodnotami jako kontroly (obr. 17, dolní panel B).

Shrnuto, hodnoty exprese onkogenních miR u pacientek vysokého rizika klesají rychleji a významněji než u pacientek nízkého rizika (tabulka 6A-D). Dále, pacientky vysokého rizika nedosáhnou po onkologické léčbě normálních hodnot exprese onkomiR na rozdíl od pacientek nízkého rizika.

Obr. 17: Vývoj exprese onkogenních miR pro jednotlivé fáze léčby v závislosti na rizikové skupině



Vysvětlivky obr. 17: A – pacientky vysokého rizika, B – pacientky nízkého rizika, I-III – body odběru krve, Ctrl – kontroly

4.5 Vliv a význam hodnocení počtu a kombinací jednotlivých onkogenních miR

V tabulce 7 jsou podrobně rozepsány zvýšené exprese pro skupinu nízkého a vysokého rizika v době odběru I/II a III, jsou zde uvedeny počty a procenta pacientek se vzestupem v jedné, dvou, třech a všech čtyřech onkomiR (tab. 7A).

Tab. 7: Souhrn dat exprese onkogenních miR – kombinace, jednotlivé miR

A	low risk (N=29)		high risk (N=34)	
	I/II	III	I/II	III
Increase in one of 4 miRs	5 (17%)	6 (21%)	8 (24%)	9 (26%)
Increase in two of 4 miRs	6 (21%)	1 (3%)	9 (26%)	7 (21%)
Increase in three of 4 miRs	3 (10%)	2 (7%)	6 (18%)	5 (15%)
Increase in all four miRs	4 (14%)	0 (0%)	7 (21%)	2 (6%)

B	low risk (N=29)		high risk (N=34)	
	I/II	III	I/II	III
Increase in any 4 miRs	18 (62%)	9 (31%)	30 (88%)	23 (68%)
Noninformative on 4 miRs	11 (38%)	20 (69%)	4 (12%)	11 (32%)

C	low risk (N=29)		high risk (N=34)	
	I/II	III	I/II	III
miR155	15 (52%)	1 (3%)	19 (56%)	9 (26%)
miR19a	11 (38%)	6 (21%)	21 (62%)	20 (59%)
miR181b	9 (31%)	3 (10%)	17 (50%)	9 (26%)
miR155 + miR19a	17 (59%)	7 (24%)	26 (76%)	21 (62%)
miR155 + miR181b	18 (62%)	3 (10%)	25 (74%)	14 (41%)
miR19a + miR181b	15 (52%)	8 (27%)	26 (76%)	23 (68%)
miR155 + miR19a + miR181b	18 (62%)	8 (27%)	29 (85%)	23 (68%)

Vysvětlivky tab. 7: Souhrn dat exprese onkomiR v sérech pacientek s EBC (N=63). Tabulka znázorňuje počty a procenta pacientek exprimujících onkomiR (> 1,8x) ve vzorcích I nebo II a III. Pacientky jsou rozděleny podle rizikové skupiny – vysoké (N=34) a nízké (N=29). A: pacientky vykazující vzestup v jedné, dvou, třech nebo čtyřech onkomiR. B: pacientky vykazující vzestup v jakékoliv nebo žádné onkomiR. C: pacientky vykazující vzestup v jednotlivých onkomiR a vybrané kombinace onkomiR.

Pokud hodnotíme expresi pouze jedné onkomiR, jsou hodnoty informativní pro 17% pacientek nízkého a 24% pacientek vysokého rizika. Při hodnocení dvou miR je informativní pro 38% pacientek nízkého a 50% pacientek vysokého rizika. Při hodnocení tří miR je informativní pro 48% pacientek nízkého a 68% pacientek vysokého rizika. Při hodnocení čtyřech miR je informativní pro 62% nízkého a 89% pacientek vysokého rizika. Vždy je hodnocení exprese onkomiR informativnější pro skupinu vysokého oproti nízkému riziku. Hodnocení exprese onkomiR tak získává svoji užitečnost se zvýšením počtu hodnocených miR a jejich kombinacích.

Při rozdělení na dobu odběru je obecně zvýšená exprese onkomiR ve skupině vysokého rizika před i po léčbě oproti zdravým kontrolám, nezávisle na počtu vstupně zvýšených onkomiR. Po léčbě (bod III) je ve skupině vysokého rizika významně vyšší procento pacientek s přetrvávajícími zvýšenými hodnotami miR, nezávisle na tom jestli hodnotíme 1, 2, 3 nebo 4 onkomiR (tab. 7A).

V oddílu B tabulky 7 je znázorněna dynamika exprese podle rizikové skupiny v závislosti na léčbě. Zatímco u pacientek nízkého rizika klesá významná exprese o 50% (z 62% na 31%), tak u vysokého rizika je pokles významné exprese pouze o 20% (z 88% na 68%). Z těchto údajů je zřejmé, že významné zvýšení hodnoty onkomiR u pacientce vysokého rizika je v době po onkologické léčbě 68% (31% u pacientek nízkého rizika). Lze tak odvozovat, že zvýšená exprese onkomiR po adjuvantní léčbě může ve skupině vysokého rizika představovat marker reziduální molekulární choroby.

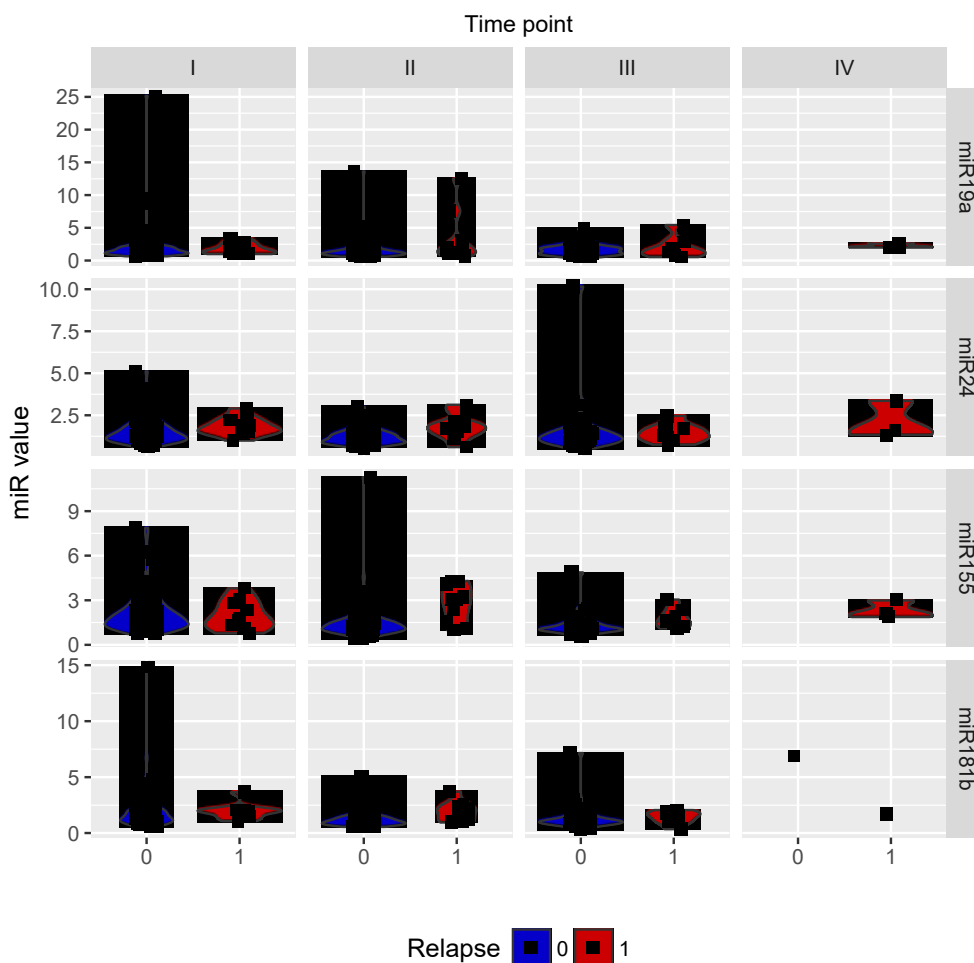
V oddílu C tabulky 7 jsou zvýšené exprese rozepsány pro jednotlivé miR a jejich kombinace odděleně pro vysoké a nízké riziko opět v bodech I/II a III. Je zde vidět superiorita testování všech čtyřech onkomiR v porovnání s hodnocením jednotlivých onkomiR. Pokud ovšem hodnotíme 3 onkomiR, výtěžnost se zvyšuje do srovnatelné úrovně (miR-155, miR-19a a miR-181b). A například testování kombinace miR-19a + miR-181b pokryje všechny vysoce rizikové pacientky se zvýšenou expresí miR v bodě III po léčbě (68%).

4.6 Exprese onkogenních mikroRNA a jejich význam ve stanovení prognózy karcinomu prsu

Pro hodnocení prognostického významu exprese onkogenních mikroRNA v sérech pacientek s časným karcinomem prsu jsme kohortu rozšířili na 133 pacientek (kohorta 2, tab. 5), které darovaly séra alespoň před a po operaci (bod I a II), medián doby sledování souboru byl v době statistického zpracování 73 měsíců (21,6-88 měsíců). Jak bylo uvedeno v teoretickém úvodu (viz kapitola 1.1.4), relapsy karcinomu prsu nastávají ve dvou vrcholech, prvním 2-3 roky a druhém 5 let od primární léčby, medián doby sledování našeho souboru se tak jeví dostatečný. V době statistického zpracování jsme zachytili celkem 13 pacientek s relapsem onemocnění (9,7%), tato frekvence odpovídá obecně dobré prognóze pro časný karcinom prsu při hodnocení celé skupiny nezávisle na rizikových faktorech. V této sledované a hodnocené kohortě jsme již nevyžadovali expresi onkomiR po adjuvantní léčbě (bod III), protože stanovení rizika je významné před vlastním zahájením protinádorové léčby, následná intenzita léčby odpovídá rizikové skupině podle klinických, patologických a případně molekulárních markerů.

Stanovili jsme expresi miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 (normalizace k let-7a) v sérech všech 133 pacientek s EBC v definovaných bodech a získali skupiny hodnot z každého bodu, pro každou miR a pacientku. Tyto hodnoty ukazují, že relabující pacientky zřetelně zvýšeně exprimují v bodech II-IV onkomiR (miR-155 a miR-24) (obr. 18).

Obr. 18: Expres onkomiR v jednotlivých bodech podle přítomnosti relapsu

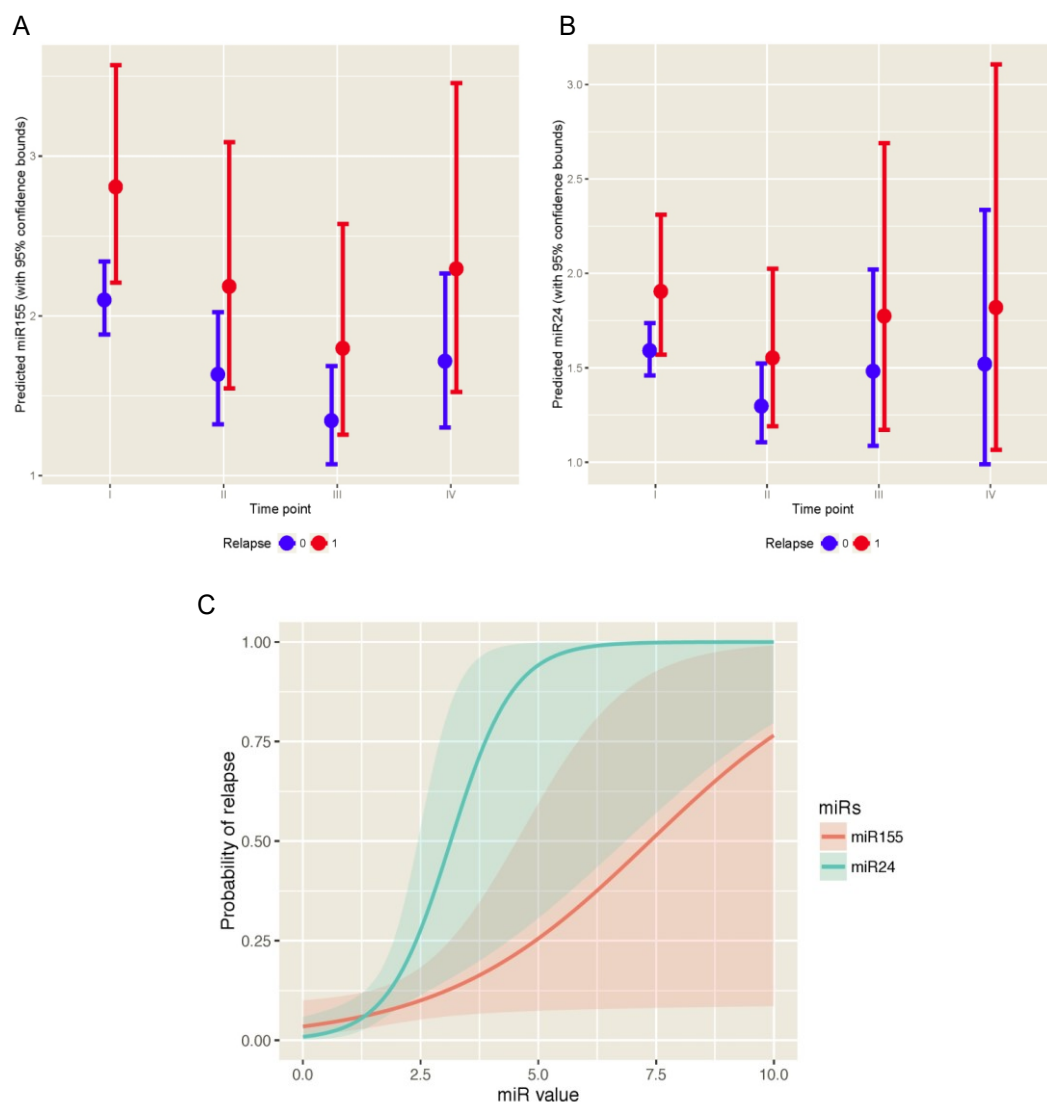


Vysvětlivky obr. 18: hodnoty exprese miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 v bodech odběru I-IV, zobrazeno odděleně pro pacientky s relapsem a bez relapsu.

Ke statistickému zhodnocení jsme použili longitudinální multivariantní analýzu dat, konkrétně zobecněné odhadovací rovnice (GEE), pro každou onkomiR (viz Statistické metody). Tento model umožnil analyzovat hodnotu konkrétní onkomiR v sérech pacientek s EBC s ohledem na bod odběru a přítomnost relapsu choroby. Dále jsme měli za cíl definovat očekávanou hodnotu každé jednotlivé onkomiR v každém bodě odběru podle pravděpodobnosti rizika relapsu.

Multivariantní GEE model prokázal, že miR-155 a miR-24 byly prognostické z hlediska relapsu ve všech bodech odběru ($p= 0,025$ a $0,041$). Hodnoty miR-155 a miR-24 jsou přehledně znázorněny odděleně pro pacientky s relapsem a bez relapsu na obr. 19A,B.

Obr. 19: Změny exprese miR-155 a miR-24 v jednotlivých bodech dle relapsu



Vysvětlivky obr. 19: miR-155 a miR-24 jsou prediktivní z hlediska relapsu EBC ($p=0,025$, resp. $0,041$). Predikované hodnoty miR-155 (A) a miR-24 (B) v jednotlivých bodech I-IV s 95% intervalem spolehlivosti pro relabované (červený interval, 1) a pacientky bez relapsu (modrý interval, 0) založené na GEE modelu. (C) hodnoty miR-155 a miR-24 zvyšují pravděpodobnost určení rizika relapsu ($p=0,028$ resp. $0,020$), 95% intervaly spolehlivosti rizika relapsu jsou znázorněny.

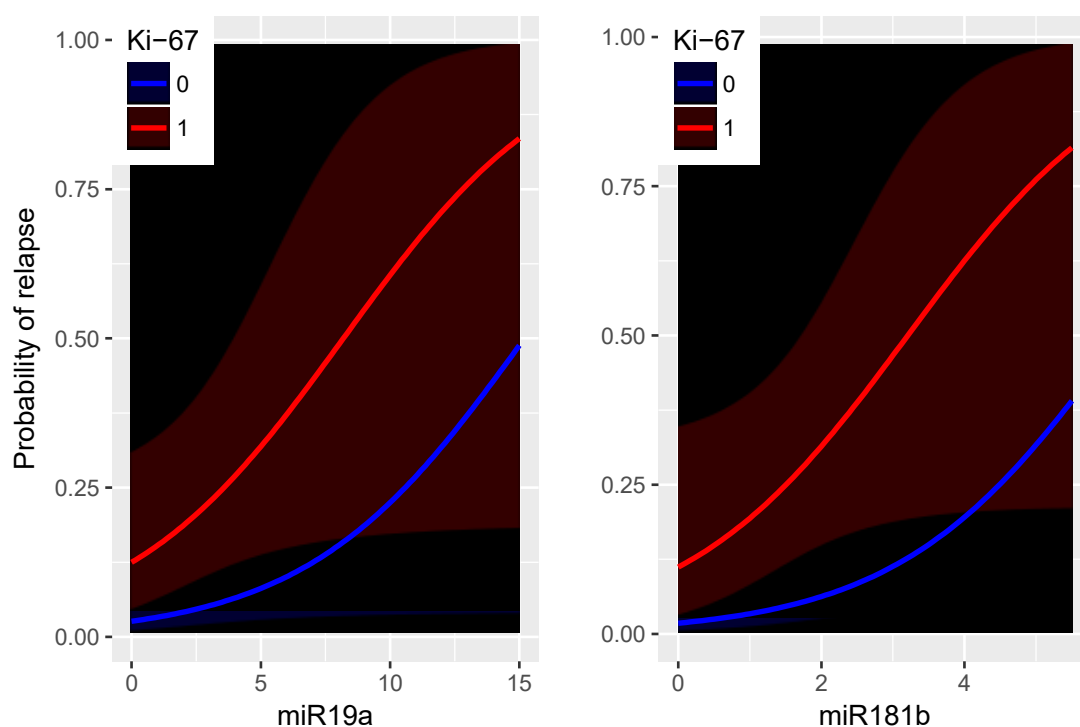
Sérové hodnoty exprese miR-155 pacientek s relapsem byly zvýšené v době diagnózy (bod I) a postupně klesaly během léčby v bodech II a III, mezi body II a III byla hodnota exprese miR-155 1,22x nižší. V době relapsu (bod IV) se hodnoty exprese miR-155 zvyšovaly a překonaly 1,05x hodnotu v bodě II.

Sérové hodnoty miR-24 u pacientek s relapsem zřetelně klesaly v bodě II ze zvýšených předoperačních hodnot (bod I). V bodě III a IV se hodnoty miR-24 zvýšily 1,14x, resp. 1,17x. Kromě toho byly sérové hodnoty miR-24 1,34x vyšší u pacientek s relapsem ve srovnání s pacientkami bez relapsu v každém bodě (I, II a III) ($p=0,025$). Pro pacientky s relapsem byly sérové hodnoty miR-24 vyšší 1,20x ve srovnání s pacientkami bez relapsu ($p=0,086$).

Měřeními hodnot miR-155 a miR-24 po operaci (bod II) získáme signifikantní údaje pro stanovení pravděpodobnosti rizika relapsu ($p=0,028$ a $0,020$). Pravděpodobnost předpovědi rizika relapsu měřeními hodnot miR-155 a miR-24 v bodě II může být získána pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM, generalized linear model) s Bernoulliho distribucí a je znázorněna graficky na obrázku 19C.

Sérové hodnoty exprese miR-19a a miR-181b měřené ve všech bodech nejsou z hlediska odhadu rizika relapsu signifikantní ($p=0,250$ a $0,240$) (obr. 20). Nesignifikantní z hlediska předpovědi pravděpodobnosti relapsu zůstávají i hodnoty miR-19a a miR-181b měřené specificky v bodě II ($p=0,054$ a $0,062$).

Obr. 20: Multivariantní analýza vlivu hodnot Ki-67, miR-19a a miR-181b na riziko relapsu



Vysvětlivky obr. 20: Predikovaná pravděpodobnost relapsu s ohledem na hodnoty exprese miR-181b a miR-19a v bodě II se započtením Ki-67 ($>20\% = 1$, $<20\% = 0$), znázorněné 95% intervaly spolehlivosti, $p=0,240$ v případě miR-181b/Ki-67, $p=0,249$ v případě miR-19a/Ki-67.

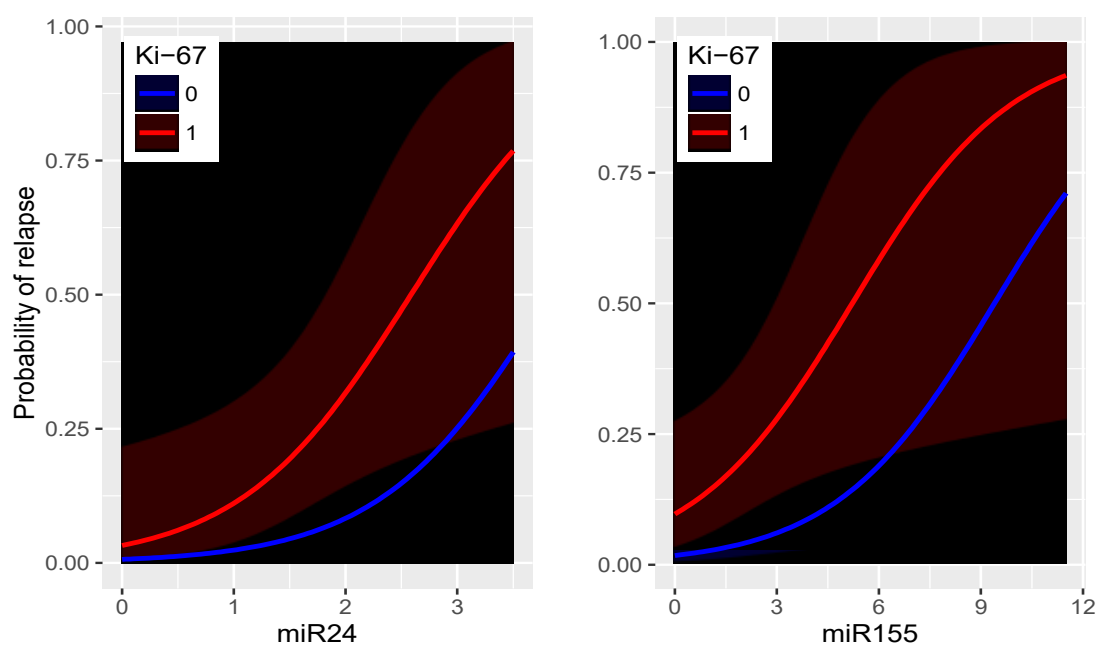
4.7 Multivariantní analýza exprese onkogenních mikroRNA a klinicko-patologických markerů

Jak bylo uvedeno v obecné části, hodnocení rizikových faktorů a markerů má tím větší prognostickou sílu, čím více se jich zkombinuje. Jako optimální se jeví kombinace klinických, patologických a molekulárních markerů. Některé silné nezávislé klinické (velikost tumoru, postižení uzlin) a patologické (grade) markery nemají korelát v molekulárních metodách. Naproti tomu hodnocení významných prognostických markerů (estrogenní signalizace, proliferace) vychází přesněji hodnocením multigenových esejí než pomocí konvenčních patologických technik (imunohistochemická exprese ER, PgR a Ki-67). Každá nová molekulární metoda se validuje proti stávajícím klinicko-patologickým markerům a hledá se její nezávislá prognostická síla a případná korelace s těmito markery.

Po zjištění statisticky významného vlivu hodnocení exprese miR-155 a miR-24 na predikci pravděpodobnosti relapsu onemocnění jsme následně provedli multivariantní analýzu exprese onkomiR s klinicko-patologickými markery zvýšeného rizika (TNBC, HER+, grade III, LN+, Ki-67>20%) a dále s absolvovanou léčbou (chemoterapie, radioterapie a hormonoterapie). Statistickým zpracováním nevykazovaly TNBC, HER2 pozitivita, grade III a pozitivní lymfatické uzliny statisticky významný dopad na předpověď pravděpodobnosti relapsu (všechny p -hodnoty nad 0,05 pokud byly simultánně hodnoceny s hodnotami exprese miR-155 a miR-24). Lze tak dokumenovat nezávislost samostatného hodnocení miR-155 a miR-24 na predikci pravděpodobnosti relapsu, miR-155 a miR-24 tak mohou představovat nezávislé prognostické markery. Jediný rizikový faktor, který statisticky signifikantně predikoval pravděpodobnost relapsu (spolu s hodnotami miR-155 a miR-24) byl proliferační index Ki-67>20% (p -hodnota miR-155: 0,013 a miR-24: 0,023). Společné hodnocení miR-155, miR-24 a Ki-67 tak zpřesňuje předpověď rizika relapsu onemocnění (obr. 21). Na obr. 20 je uvedeno grafické znázornění pro onkomiR bez statistické signifikance – miR-181b a miR-19a.

Abychom vyloučili falešný vliv absolvované léčby na hodnoty exprese miR, provedli jsme multivariantní analýzu také s chemoterapií, hormonoterapií a ozařováním a žádný z těchto hodnocených parametrů nevykazoval signifikantní vliv. Hodnoty p jsou následující – chemoterapie a miR-24: 0,55, chemoterapie a miR-155: 0,35, radioterapie a miR-24: 0,63, radioterapie a miR-155: 0,17, hormonoterapie a miR-24: 0,60, hormonoterapie a miR-155: 0,18.

Obr. 21: Multivariantní analýza vlivu hodnot Ki-67, miR-24 a miR-155 na riziko relapsu



Vysvětlivky obr. 21: Predikovaná pravděpodobnost relapsu s ohledem na hodnoty exprese miR-155 a miR-24 v bodě II se započtením Ki-67 (>20% = 1, <20% = 0), znázorněné 95% intervaly spolehlivosti, $p=0,013$ v případě miR-155/Ki-67, $p=0,023$ v případě miR-24/Ki-67.

4.8 Využití generalizovaného lineárního modelu k určení pravděpodobnosti relapsu EBC

Vedle výše uvedených analýz, které byly provedeny s cílem definovat role onkogenních miR ke stanovení pravděpodobnosti rizika relapsu a jejich závislosti na klinicko-patologických markerech a terapii, byl další záměr projektu směřován k výpočtu rizika relapsu měřením hodnot miR-155 a miR-24. Tyto výpočty tak slouží k určení rizika relapsu onemocnění od 0 do 100% z hodnot exprese miR-155, miR-24 a naopak lze definovat jaká hodnota exprese onkomiR je nutná pro určité riziko relapsu (0-100%). Ke konstrukci rovnic byl využit zobecněný lineární model (GLM), který lze rozdělit do třech možností:

a. Je k dispozici pouze hodnota miR-155

$$Probability[Relapse_i] = 1/[1 + \exp\{4.019 - 0.428(miR155II_i) - 1.788(Ki67_i \geq 20\%)\}].$$

b. Je k dispozici pouze hodnota miR-24

$$Probability[Relapse_i] = 1/[1 + \exp\{5.023 - 1.311(miR24II_i) - 1.633(Ki67_i \geq 20\%)\}].$$

c. Jsou k dispozici hodnoty miR-155 a miR-24 současně

$$Probability[Relapse_i] = \frac{1}{1 + \exp\{5.687 - 0.396(miR155II_i) - 1.206(miR155II_i) - 1.605(Ki67_i \geq 20\%)\}}.$$

Například, $miR155II_i$ znamená měření v bodě II pro i -tého pacienta.

Jako praktický návod aplikace a užití tohoto vzorce si stanovíme pacientku s $Ki-67 < 20\%$ a dostupnou hodnotou miR-24 v bodě II (naměřená hodnota 2.00), v tom případě je riziko relapsu 8,31% (podle *b*). Naproti tomu, pokud chceme znát hodnotu exprese miR-155 v bodě II u pacientky s $Ki-67 > 20\%$ a rizikem relapsu 90%, vyjde nám podle *a* hodnota 10.3.

Shrnutím lze konstatovat, že standardně stanovená hodnota Ki-67 spolu s expresí miR-155 a miR-24 nám může pomoci definovat pravděpodobnost rizika relapsu (0-100%) a zároveň určit konkrétní hodnotu miR podle rizika relapsu (5%, 10%, ..., 90%). Kompletní kvantifikace odhadovaného efektu rizikových charakteristik spolu s odpovídajícími hodnotami standardních odchylek a p hodnot je uvedena v tabulce 8.

Tab. 8: Predikce pravděpodobnosti relapsu**A. je dostupná hodnota miR-155**

<i>Rizikové charakteristiky</i>	<i>Odhad</i>	<i>Stand. odchylka</i>	<i>P-hodnota</i>
Intercept	4.019	0.715	<0.001
miR-155	-0.428	0.194	0.028
Ki67>=20%	-1.788	0.717	0.013
TNBC	-0.093	1.937	0.961
HER2 pozitivní	-0.536	1.865	0.774
Grade III	-0.960	0.897	0.284
Pozitivní LN	-0.113	1.035	0.913
Chemoterapie (ano)	-1.738	1.163	0.135
Radioterapie (ano)	1.600	1.188	0.178
Hormonální terapie (ano)	0.936	1.674	0.576

B. je dostupná hodnota miR-24

<i>Rizikové charakteristiky</i>	<i>Odhad</i>	<i>Stand. odchylka</i>	<i>P-hodnota</i>
Intercept	5.023	1.038	<0.001
miR-24	-1.311	0.565	0.020
Ki67>=20%	-1.633	0.719	0.023
TNBC	1.444	2.287	0.528
HER2 pozitivní	-0.030	2.047	0.988
Grade III	-0.991	0.875	0.258
Pozitivní LN	-0.593	1.007	0.556
Chemoterapie (ano)	-2.364	1.239	0.056
Radioterapie (ano)	1.526	1.174	0.194
Hormonální terapie (ano)	1.682	1.968	0.393

C. Jsou dostupné hodnoty miR-155 a miR-24 současně

<i>Rizikové charakteristiky</i>	<i>Odhad</i>	<i>Stand. odchylka</i>	<i>P-hodnota</i>
Intercept	5.687	1.179	<0.001
miR-155	-0.396	0.190	0.038
miR-24	-1.206	0.591	0.041
Ki67>=20%	-1.605	0.743	0.031
TNBC	0.681	2.331	0.770
HER2 pozitivní	-0.282	2.028	0.889
Grade III	-1.197	0.949	0.207
Pozitivní LN	-0.369	1.117	0.741
Chemoterapie (ano)	-3.005	1.549	0.052
Radioterapie (ano)	1.709	1.337	0.201
Hormonální terapie (ano)	1.298	1.939	0.503

Vysvětlivky tab. 8: Odhadovaný efekt rizikových faktorů se standardními odchylkami a hodnotami *p* (A) zahrnujeme hodnoty exprese miR-155; (B) zahrnujeme hodnoty exprese miR-24; nebo (C) zahrnujeme hodnoty exprese miR-155 a miR-24 současně.

5. Diskuze

Časný karcinom prsu je nejčastější zhoubné nádorové onemocnění u žen, které je velice heterogenní z hlediska patologického, molekulárního, prognostického a léčebného. Pacientky s nízkým rizikem recidivy přežívají trvale a jejich nemoc je definitivně vyléčitelná, naproti tomu pacientky s vysokým rizikem mohou recidivovat, lokálně nebo systémově a karcinom prsu vede i přes komplexní onkologickou léčbu k jejich smrti.

Vzhledem k současným léčebným možnostem je, pro dlouhodobou prognózu pacientek, zásadní správně definovat individuální riziko recidivy a jejich pooperační nebo předoperační protinádorovou léčbu adekvátně přizpůsobit. V léčebné rozvaze hledáme rovnováhu v indikaci chemoterapie, cílené léčby a hormonoterapie, abychom pacientky nepodléčovali a naopak nepřeléčovali. Podléčení zvyšuje riziko vyhnutelných recidiv a zvýšená intenzita protinádorové léčby přináší dlouhodobá rizika pro organismus s možnými trvalými následky. Hledání vysoce specifických, senzitivních a personalizovaných prognostických biomarkerů a prediktivních biomarkerů účinku protinádorové léčby tak představuje jeden z hlavních směrů výzkumu karcinomu prsu.

Základní a klinický výzkum definoval hlavní molekulární děje, které pravděpodobně vedou ke vzniku, udržení a rozvoji onkologického onemocnění. Byly popsány genetické a epigenetické změny iniciace, diferenciaci, apoptózy, buněčného cyklu, angiogenezy, epiteliálně-mezenchymální tranzice, vlivů nádorového mikroprostředí a imunity (Hanahan D., Weinberg RE., 2011). Molekulární výzkum umožnil určit základní signální dráhy a změny na buněčné úrovni, které představují řídicí děje vzniku a udržení nádorového procesu, jejich detekce může hrát roli jak prognostickou, tak i prediktivní. Zároveň se s pomocí translačního výzkumu celá řada definovaných signálních cest využívá léčebně k cílenému ovlivnění nádorového procesu. Recidivy a metastazování představují hlavní příčiny úmrtí na nádorová onemocnění, výzkum se proto snaží o jejich prevenci určením rizikových pacientů a případnou časnou detekci a léčebné ovlivnění. Teorie, která definuje metastazování jako vrozenou vlastnost nádorů, má oporu v dostupných datech z výzkumu a díky těmto skutečnostem lze prognózu karcinomu prsu určit již v době diagnózy a individuálně přizpůsobit rozsah a intenzitu onkologické léčby (Huo D. et al., 2016, Madhavan D. et al., 2016).

V současnosti máme při rozhodování o prognóze pacientek s karcinomem prsu a co nejindividuálnějším plánování komplexní onkologické léčby k dispozici markery klinické, patologické a molekulární. Mezi klinické markery patří klinické stádium v době diagnózy nádorového onemocnění, obecně platí, že čím je nádor pokročilejší, tím horší má prognózu.

Významným omezením je to, že nelze pouze na základě klinického stádia, určit optimální léčbu u každé jednotlivé pacientky. Složitě děje vzniku a udržení nádorového procesu, vlivy genetické, epigenetické, stav imunity a další modifikují vývoj, kterým se nádorový proces bude ubírat. Pacientky s pokročilým nádorem mohou mít nakonec prognózu významně lepší než pacientky s minimálním rozsahem nemoci. Patologické markery umožňují zvýšit prognostickou sílu klinických markerů, z rozsáhlých studií vychází hodnocení diferenciacie nádoru a jeho proliferační aktivity jako významné nezávislé prognostické markery. Další patologické markery, stanovení HR a HER2, představují nejenom prognostické markery, ale umožňují predikovat účinek cílené terapie (hormonální, anti-HER2). Vzhledem ke složitosti nádorového procesu ovšem ani kombinace klinických a patologických markerů nemá dostatečnou sílu při individualizovaném rozhodování.

Jako krok ke skutečně personalizované medicíně se jeví rozvoj různých molekulárních metod a markerů, v případě karcinomu prsu jsou nejdále genomické eseje hodnotící různé geny zodpovědné za řízení karcinomu prsu (Sorlie T. et al., 2001, Sotiriou C. et al., 2009). I přes jejich vysokou senzitivitu a specifitu, potvrzenou velkými studiemi, je nevýhoda v malé shodě hodnocení prognostického rizika mezi různými metodami užitými u jednoho pacienta (Gyorffy B. et al., 2015). Druhou nevýhodou je to, že se aplikují pouze na vzorky nádorové tkáně, vyžaduje se tak pokaždé nová biopsie. Rozvoj molekulárních metod umožnil detekci markerů, které cirkulují v krvi a jsou odrazem molekulárních dějů na úrovni nádoru a celého organismu. Tyto tzv. tekuté biopsie (liquid biopsy) představují minimálně invazivní sledování nádorového procesu od časných fází rozvoje až po vznik metastáz (Heitzer E. et al., 2015, Cheng F. et al., 2016, Ignatiadis M. et al., 2014). Dále lze, při jejich opakovaném hodnocení během léčby, určit převládající řídicí mutace, případně detekovat časnou rezistenci k léčbě a terapii tak dynamicky individualizovat. Využití cirkulujících biomarkerů lze také efektivně využít při sledování již vyléčených pacientů a včas zjistit riziko rozvoje recidiv a metastazování, u některých metod s mnohaměsíčním předstihem oproti konvenčním zobrazovacím metodám (Madhavan D. et al., 2016). Nejdále jsou metody hodnocení cirkulujících nádorových buněk, bezbuněčné nádorové DNA a v posledních letech studium dalších forem nukleových kyselin (nekódující RNA), mezi které patří i mikroRNA.

Kombinace více prognostických markerů a metod zpřesňuje a individualizuje onkologickou léčbu, v současnosti dostupné metody však stále nedosahují senzitivitou a specifitou na skutečně personalizovanou medicínu.

Ideální biomarker by měl mít dostatečnou senzitivitu, specifitu, pozitivní a negativní prognostickou sílu. Měl by odlišit s pravděpodobností blížíící se 100% pacientky vysokého a

nízkého rizika a umožnit vysoce individuální plánování protinádorové léčby. V neposlední řadě je pro ideální biomarker vhodná zavedená analytická metoda s dostatečnou kapacitou (high-throughput) a citlivostí pro detekci i minimálního množství biomarkeru. Ideální analytická metoda by měla být dostatečně standardizovaná, relativně snadno proveditelná, opakovatelná a s odpovídající cenou.

V tomto rámci se nacházelo i naše uvažování při koncepci předkládaného projektu, který byl veden myšlenkou výzkumu molekulárních prognostických markerů. Naším cílem bylo na vzorku pacientek s časným karcinomem prsu zjistit expresi onkogenních mikroRNA v séru, změny v závislosti na onkologické léčbě, použitelnost při monitoraci onemocnění a podle rozdílů v expresi u pacientek vysokého a nízkého rizika v závislosti na přežití určit jejich prognostický potenciál.

Cílové mikroRNA našeho projektu byly vybrány podle znalostí o jejich působení při vzniku a udržení nádorového procesu, vycházeli jsme z experimentálních prací, které určily cílové struktury působení jednotlivých miR a dále z dat translačního výzkumu jejich diagnostického, prognostického a prediktivního potenciálu. Hlavní cíle působení miR-155, miR-24, miR-181b a miR-19a byly uvedeny v obecném úvodu, jejich působení je na úrovni řízení buněčného cyklu, nádorových kmenových buněk, apoptózy, epiteliálně-mezenchymální tranzice a angiogeneze. Jako námátkou lze zmínit významný vliv miR-19 a celého miR-17-92 klastru v patogenezi trojitě-negativního karcinomu prsu (Farazi TA. et al., 2011). V další publikaci byla definována významná role miR-181b u agresivních karcinomů prsu charakterizovaných vysokým gradem, Ki-67 a trojitou negativitou (Bisso A. et al., 2013). Role miR-181b byla dávána do souvislosti se sníženou regulací ATM a vlivem na odpověď na poškození DNA (Bisso A. et al., 2013). miR-24 hraje důležitou roli v metastatickém potenciálu karcinomu prsu cestou epiteliálně-mezenchymální tranzice (Papadimitriou E. et al., 2012). V jiné experimentální práci byl prometastatický potenciál miR-24 dán do vztahu ovlivněním antimetastatického genu prosaposinu (Ell B. et al., 2014). Nezastupitelnou roli u karcinomu prsu hraje i působení miR-24 cestou MYC a represe SPRY2 s následnou aktivací MAPK (Li X. et al., 2013). Role miR-155 v patogenezi a udržení nádorového procesu byla v literatuře hojně popsána. Z hlediska metastatického potenciálu je zajímavý proangiogenní účinek zprostředkovaný cestou produktu *VHL* genu (Kong W. et al., 2014). Jiná studie byla zajímavá s ohledem na pooperační ozařování, byla dána do souvislosti exprese miR-155 se sníženou efektivitou homologních rekombinantních oprav DNA a zvýšenou citlivostí k ozařování ovlivněním exprese *RAD51* s následnou akcelerovanou klonální evolucí nádorových kmenových buněk (Gasparini P. et al., 2014a). Výzkum rolí jednotlivých mikroRNA v patogenezi karcinomu prsu roste geometrickou

řadou a přibývá řada publikací (Serpico D. et al., 2014, Bertoli G. et al., 2015, Goh JN. et al., 2016, Dvinge H. et al., 2013). Výčet působení námi vybraných onkogenních miR na patogenezu karcinomu prsu je rozsáhlý a představuje desítky regulovaných genů.

V první fázi projektu jsme zjišťovali expresi miR-155, miR-24, miR-181b a miR-19a v sérech pacientek s časným karcinomem prsu v porovnání se zdravými kontrolami v době diagnózy. Jednotlivé onkogenní miR byly významně zvýšeně exprimované u pacientek s karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám. Z námi zjištěných dat byly významně zvýšené hodnory exprese u části, ale ne všech pacientek s karcinomem prsu, zastoupení zvýšeně exprimovaných miR se lišilo u jednotlivých pacientek. Tento fakt dokumentují údaje i od jiných autorů napříč publikacemi, jak bylo uvedeno v obecné části a dokládá patologickou a molekulární heterogenitu karcinomu prsu (Wang F. et al., 2010, Chen X. et al., 2008, Weber JA. et al., 2010, Cortez MA. et al., 2011, Schwarzenbach H. et al., 2011, Kosaka N. et al., 2010, Brase JC. et al., 2010, Larrea E. et al., 2016, Si H. et al., 2013). Odlišnosti mezi publikacemi z hlediska změn exprese jednotlivých miR a jejich setů jsou dané různými studovanými populacemi, pokročilostí nádorů, absolvovanou léčbou, rozdíly v hodnoceném materiálu, extrakčních a detekčních metodách, normalizačních strategiích a aplikovaných statistických modelech. I přes tyto rozdíly je základní shoda na tom, že onkogenní miR jsou v době diagnózy karcinomu prsu zvýšeně exprimované oproti zdravým kontrolám a mohou být tak považované za diagnostický marker (Amorim M. et al., 2016, Armand-Labit V., Pradines A., 2017). Pokud jsme hodnotili více miR najednou, vzrůstala jejich informativní hodnota a odlišnost od zdravých kontrol. To je opět ve shodě s řadou publikací, které definovaly vyšší senzitivitu a specificitu monitorování exprese miR, pokud se kombinuje více miR oproti jednotlivým miR (Blenkiron C. et al., 2007, Endo Y. et al., 2013, Iorio MV. et al., 2005, de Rinaldis E. et al., 2013). Tento fakt vychází z výše popsané heterogenity karcinomu prsu, jednotlivé miR ovlivňují různé signální cesty a mají různé role v patogenezi karcinomu prsu, kombinace miR tak mohou pokrýt více patogenetických mechanismů (Bertoli G. et al., 2015, Frixia T. et al., 2017).

Pro potvrzení produkce miR nádorem jsme doplnili náš projekt o vyhodnocení několika nádorů a okolní nenádorové tkáně na expresi cílových miR. Významná většina nádorů zvýšeně exprimovala onkogenní miR, v různém poměru a zastoupení a odpovídala sérovým hodnotám pacientek. Naproti tomu okolní nenádorová tkáň neexprimovala onkogenní miR, respektive jejich exprese nebyla významná a blížila se expresi zdravých kontrol. Jak bylo uvedeno v obecné části, je tento fakt ve shodě s dostupnými daty a umožňuje stanovovat expresi cirkulujících mikroRNA v krvi jako molekulární obraz nádoru (Mo MH. et al., 2012). Vedle přímé produkce nádorem jsou cirkulující miR ovlivněny reakcí organismu na přítomnost

nádorového procesu, jejich exprese tak může být modifikována např. imunitní reakcí na nádor nebo operační výkon. Tento fakt s sebou nese určité riziko falešného ovlivnění hodnot exprese a vyžaduje správné načasování odběru krve s ohledem na operaci a případné zánětlivé komplikace.

První fáze projektu potvrdila základní hypotézu o zvýšené expresi onkogenních miR v sérech pacientek s karcinomem prsu, jejich odlišné poměry a zastoupení mezi jednotlivými pacientkami. Dále potvrdila užitečnost monitorování více miR najednou, protože se zvyšuje jejich informativní hodnota. V neposlední řadě byla první fáze projektu určena ke zjištění aplikovatelnosti námi vybraných metod extrakce, detekce a normalizační strategie. V obecném úvodu byla metoda detekce pomocí reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase se specifickými primery hodnocena jako určitý standard pro stanovení exprese známých mikroRNA (Ono S. et al., 2015). Metody reverzní transkripce RNA do cDNA a RT-qPCR jsou v současnosti dobře propracované a díky automatizaci a kompletním analytickým kitům jsou rychlé a dostupné. Metody sekvenování nové generace jsou vhodné pro vysokokapacitní screening a hledání nových miR a jejich cílů. Poskytují velké množství dat, které je nutné zpracovávat komplexními biostatistickými nástroji, aby jejich výtěžnost byla skutečně využitelná (Wu X. et al., 2012). Jako normalizační strategie byla vybrána let-7a, která vykazovala stabilní expresi u zdravých a nemocných (viz Vyhodnocení qPCR). Normalizační strategie nejsou v publikacích jednotné, což přináší další analytické důvody odlišných výsledků mezi studii. Obecně je doporučované užití miR ze stejné skupiny z důvodu stejných fyzikálně-chemických vlastností, dále se doporučuje využití více normalizačních miR ke zvýšení citlivosti (Schwarzenbach H. et al., 2015). Jsou formulované doporučené postupy pro normalizaci, ale jejich aplikace není zatím standardem (Farina NH. et al., 2014, www.gene-quantification.de). V dalším pokračování projektu jsme hodnotili změny exprese jednotlivých onkomiR v závislosti na fázi protinádorové léčby. Naše hypotéza předpokládala, že exprese onkogenních miR, zvýšeně exprimovaných v době diagnózy karcinomu prsu, bude klesat s úspěšnou léčbou. U časného karcinomu prsu by jediným významným zdrojem produkce onkogenních miR měl být primární nádor a případně postižené lymfatické uzliny. Po operačním odstranění nádoru a lymfatických uzlin by tak měla produkce onkogenních miR významně klesat na úroveň srovnatelnou se zdravými kontrolami. V námi zjištěných datech je dokumentováno, že statisticky významně poklesla exprese miR-155, miR-24 a miR-181b s tendencí k normalizaci pro celou neselektovanou kohortu pacientek po operačním odstranění nádoru a svodných lymfatických uzlin. miR-19a vykazovala vyšší stabilitu v bodě II a signifikantně poklesla až po první léčebné modalitě v odběrovém bodě III. Z výsledků je patrné, že pokles exprese nebyl pozorovatelný

u všech pacientek, u některých přetrvávala zvýšená hodnota exprese v porovnání se zdravými kontrolami. Vzhledem k tomu, že produkce onkogenních miR je vázaná převážně na nádorové buňky, může zvýšená hodnota jejich exprese po odstranění nádoru a protinádorové léčbě představovat molekulární marker reziduální choroby. Tento nález přináší potenciál využití miR v dlouhodobé monitoraci odléčených pacientek.

V pokračování projektu jsme pacientky rozdělili na skupinu vysokého a nízkého rizika pomocí klinicko-patologických markerů (viz Pacienti a metody). Tyto markery, jak bylo uvedeno v obecném úvodu, představují v současnosti uznávané faktory stratifikující pacientky do rizikových skupin a volby druhu a intenzity onkologické léčby. Expese jednotlivých miR a vývoj během onkologické léčby se lišily ve skupině nízkého a vysokého rizika. Pacientky vysokého rizika vykazovaly zvýšené hodnoty exprese jednotlivých onkomiR oproti zdravým kontrolám a pacientkám nízkého rizika. Z námi zjištěných údajů vyplývá, že existuje definovatelná hodnota exprese jednotlivých onkomiR, která má diagnostický potenciál a rozlišuje pacientky vysokého a nízkého rizika. Analýzou změn exprese jednotlivých onkomiR v různých fázích léčby v závislosti na rizikové skupině bylo zjištěno, že onkomiR u pacientek vysokého rizika klesaly v průběhu celé léčby, ale nedosahovaly normálních hodnot. Naproti tomu pacientky nízkého rizika vykazovaly nevýznamný pokles hodnot exprese onkomiR po chirurgickém odstranění nádoru a následně zůstávaly prakticky konstatní v průběhu léčby s přibližně stejnými hodnotami jako kontroly. Shrnuto, hodnoty exprese onkogenních miR u pacientek vysokého rizika klesají rychleji a významněji než u pacientek nízkého rizika, ale nedosáhnou po onkologické léčbě normálních hodnot exprese na rozdíl od pacientek nízkého rizika. Tato zjištěná data potvrzují hypotézu využitelnosti onkogenních miR jako pomocného diagnostického markeru umožňujícího odlišit zdravé a nemocné, stratifikovat pacientky podle rizikové skupiny a monitorovat odléčené pacientky z hlediska dynamiky vývoje hodnot exprese miR.

Vyšší hodnoty exprese onkogenních miR u většího počtu pacientek vysokého rizika, které přetrvávaly po operaci a následné onkologické léčbě nejsou překvapivým zjištěním. Tento údaj může svědčit pro molekulární reziduální nemoc, kdy je zvýšená produkce onkogenních miR realizována jednotlivými nádorovými buňkami. Tyto nádorové buňky mohou být ve formě cirkulujících (CTC) nebo diseminovaných (DTC) buněk, jejich potenciál ve zvýšeném riziku budoucích recidiv byl popsán v literatuře (Krawczyk N. et al. 2014, Rack B. et al., 2014, Cabel L. et al., 2017). Jak CTC tak DTC představují zásobu nádorových buněk, z nichž některé vykazují znaky nádorových kmenových buněk a epiteliálně-mezenchymální tranzice (Grzelak CA., Ghajar CM., 2017, Linde N. et al., 2016, Melzer C. et al., 2017). Tyto nádorové buňky mají

schopnost dlouhodobě přežívat v klidovém stádiu v cirkulaci nebo v jednotlivých orgánech a mohou být příčinou budoucích recidiv. Indikace chemoterapie po odstranění nádoru a svodných lymfatických uzlin je zacílena na tyto nádorové buňky s cílem maximální eradikace onkologického onemocnění. Následný pokles a normalizace onkogenních miR po protinádorové léčbě může znamenat vymizení těchto CTC a DTC. Je zřejmé, že potenciál chemoterapie není v úplném vyčištění organismu od všech CTC a DTC, zbytek nemoci může efektivně eradikovat vlastní imunitní systém a hormonální léčba.

Vedle dat zjištěných pro pacientky vysokého rizika, byla zajímavá data pro pacientky nízkého rizika. Pacientky nízkého rizika vykazovaly normalizaci exprese onkogenních miR již po operačním odstranění nádoru, ovšem tato normalizace nebyla patrná u všech pacientek. Jedním důvodem je to, že některé miR mohou odrážet také děje na úrovni nádorového mikroprostředí, imunity a obecné reakce na operační výkon. Druhým důvodem je, že část pacientek klinicko-patologicky nízkého rizika, je molekulárně v riziku vysokém a pravděpodobnost relapsu je srovnatelná s pacientkami vysokého rizika. Tento údaj představuje přidanou hodnotu molekulárních metod a umožňuje vyselektovat molekulárně vysoce rizikové pacientky ve skupině, která je definovaná na základě klinicko-patologických markerů jako nízké riziko.

Monitorování onkogenních miR tak funguje více způsoby, první je v určení rizikové skupiny, podle které aplikujeme dostatečně intenzivní protinádorovou léčbu. Další je v následném sledování efektivity léčby, kdy by po úspěšné chemoterapii mělo dojít k poklesu a normalizaci hladin miR. V neposlední řadě je sledování hladin exprese onkogenních miR užitečné v monitoraci dynamiky nemoci u odléčených pacientek, které podstupují rutinní sledování. Vzhledem k počtu recidiv v našem souboru nebyl projekt zaměřen na využitelnost monitorace odléčených pacientek. Z uvedených dat bylo patrné, že pacientky s recidivami, které odevzdaly krev v době relapsu onemocnění (odběrový bod IV), vykazovaly významnou elevaci onkogenních miR. V dalším pokračování našeho projektu bychom se chtěli zaměřit na dlouhodobé hodnocení změn exprese mikroRNA u odléčených pacientek a definovat jejich užitečnost v monitoraci nemoci. Pro sledování odléčených pacientek máme v současnosti k dispozici klinické vyšetření, zobrazovací metody a biochemické markery (CEA, CA 15-3). Všechny metody jsou zatíženy nízkou senzitivitou a specificitou, často se zachytí pacientky až ve stádiu pokročilé recidivy s vyjádřeným metastazováním. Citlivé molekulární metody tak mohou představovat možnost jak včas detekovat hrozící recidivu onemocnění a zahájit protinádorovou léčbu s potenciálně kurativním záměrem.

Poslední fáze projektu byla zaměřena na zhodnocení prognostického potenciálu sérové exprese onkogenních miR a jejich porovnání s klinicko-patologickými markery. Vzhledem k tomu, že se jednalo o projekt prospektivní a recidivy časného karcinomu prsu nastávají typicky mezi 2.-5. rokem od diagnózy, přizpůsobili jsme tomu dobu sledování našeho souboru. V konečném hodnocení byl medián sledování 73 měsíců, který lze považovat za dostatečný. Recidiv onemocnění jsme v době statistického zpracování zachytili celkem 13, což představuje 10% a odpovídá prognóze časného karcinomu prsu v neselektované skupině.

Expresí onkogenních miR byla zřetelně zvýšená v odběrových bodech II-IV ve skupině pacientek s relapsem oproti pacientkám bez relapsu. Sérové hodnoty exprese miR-155 pacientek s relapsem byly zvýšené v době diagnózy a postupně klesaly během léčby, v době relapsu se hodnoty exprese miR-155 zvyšovaly a překonaly pooperační hodnotu. Sérové hodnoty miR-24 u pacientek s relapsem zřetelně klesaly po operaci ze zvýšených předoperačních hodnot. Kromě toho byly sérové hodnoty miR-24 vyšší u pacientek s relapsem ve srovnání s pacientkami bez relapsu v každém bodě. Multivariantní GEE model prokázal, že miR-155 a miR-24 byly prognostické z hlediska relapsu ve všech bodech odběru a specificky v bodě II (po operaci). Sérové hodnoty exprese miR-19a a miR-181b měřené ve všech bodech nebyly z hlediska odhadu rizika relapsu signifikantní, nesignifikantní z hlediska předpovědi pravděpodobnosti relapsu zůstaly i hodnoty miR-19a a miR-181b měřené specificky po operaci (bod II).

Námi zjištěné údaje potvrdily pro miR-155 a miR-24 jejich význam v predikci pravděpodobnosti relapsu karcinomu prsu. Prognostický význam nebyl potvrzen pro miR-181b a miR-19a i přesto, že patří mezi významné onkogenní miR. Jak bylo uvedeno v obecném úvodu, porovnání jednotlivých publikací vzájemně mezi sebou přináší určité limity. Mezi publikacemi se liší kohorty pacientek podle pokročilosti onemocnění, absolvované léčby, analytických metod, spektru a počtu hodnocených mikroRNA. Hodnocení exprese miR-155 v diagnostice, prognostice a predikci karcinomu prsu lze v publikacích nalézt poměrně často, hodnocené samostatně nebo spolu s dalšími miR (Eichelsner C. et al., 2013, Kim S. et al., 2015, Dinami R. et al., 2014, Lu Z. et al., 2012). Jedná se o typickou onkogenní mikroRNA a její molekulární působení je na různých úrovních iniciace, progresu a metastazování, v obecném úvodu jsou uvedeny základní patofyziologické cesty působení miR-155 u nádorových onemocnění. Jedna z experimentálních prací se věnovala hodnocení exprese miR-155 v sérech pacientek s karcinomem prsu pomocí RT-qPCR (Guo J. et al., 2016). Prokázali významně zvýšenou expresi miR-155 u nemocných v porovnání se zdravými kontrolami, sérová exprese signifikantně korelovala s klinickým stádiem nemoci a zvyšovala se s pokročilostí nemoci.

Pacientky s vysokou expresí miR-155 vykazovaly horší prognózu onkologického onemocnění nezávisle na absolvované léčbě (Guo J. et al., 2016). V dalším experimentu autoři hodnotili pomocí RT-qPCR význam sérové exprese miR-155 a změny v závislosti na léčbě u pacientek s karcinomem prsu (Sun Y. et al., 2012). Opět prokázali významně zvýšené sérové exprese miR-155 u nemocných v porovnání se zdravými. Dále zjistili významný pokles exprese miR-155 po operačním zákroku a chemoterapii, který koreloval s prognózou pacientek (Sun Y. et al., 2012). Změny exprese miR-155 nekorelovaly se změnami koncentrace v současnosti používaných markerů (CA 15-3, CEA, TPS). Oba tyto experimenty se shodly na užitečnosti sledování sérové exprese miR-155 během diagnózy, léčby a sledování pacientek s karcinomem prsu. miR-24 hraje dle dostupné literatury důležitou roli v jednotlivých krocích kancerogeneze karcinomu prsu (Lin SC. et al., 2010, Musto A. et al., 2015, Amelio I. et al., 2012, Roy L. et al., 2015). Podle online databáze MIRUMIR, která analyzuje mikroRNA jako potenciální biomarkery, je vysoká exprese miR-24 spojená s horší prognózou karcinomu prsu (Antonov AV. et al., 2013). Námí uvedená data tak jsou potvrzena v dalších studiích a systematických přehledech. Data získaná pro miR-181b a miR-19a neprokázala signifikantní význam pro stanovení prognózy i přesto, že jejich proliferativní, antiapoptotický a prometastatický potenciál byl popsán (Farazi TA. et al., 2011, Bisso A. et al., 2013, Serpico D. et al., 2014). Z námí zjištěných dat miR-181b a miR-19a nadále představují významný diagnostický a monitorovací marker. Jejich hodnoty exprese v době diagnózy jsou významně vyšší než zdravých kontrol a dynamika vývoje během onkologické léčby a rozdíly ve skupině nízkého a vysokého rizika podporují jejich využitelnost ve sledování odléčených pacientek.

Porovnání s literaturou je komplikované, jak bylo uvedeno v obecném úvodu jednotlivé projekty se lišily studovanými kohortami, často byly hodnoceny určité podskupiny karcinomu prsu (TNBC, HER pozitivní, HR pozitivní) nikoliv celá neselektovaná populace konsekutivních pacientek. Poměrně často se jednalo o retrospektivní zpracování nádorů nebo sér z biobank, prospektivní projekty byly poměrně vzácné. Velká část dostupných prací byla hodnocena na vzorcích nádorové tkáně, pouze menší část z nich sledovala cirkulující biomarkery. Dalším rozdílem byly i počty a kombinace různých mikroRNA, odlišovaly se analytické metody a biostatistické nástroje. Pro porovnání s naším projektem zmiňují některé prognosticky zaměřené publikace. Například při hodnocení 2033 pacientek byly vázány vyšší hodnoty let-7b v tumorech karcinomu prsu s lepší prognózou v kohortě ER pozitivních pacientek (Quesne JL. et al., 2012). Jiní autoři našli u zvýšené exprese miR-7, miR-128a, miR-210 a miR-516-3p u ER pozitivních a LU negativních pacientek kratší interval do recidivy (Foekens JA. et al., 2008). Pro ER pozitivní kohorty pacientek byl prognostický potenciál dále nalezen pro miR-10a, miR-

126, miR-30c, miR-210 a miR-519a (Hoppe R. et al., 2013, Rodriguez-González FG. et al., 2011, Rothe F. et al., 2011, Ward A. et al., 2014). Hodnocení klastru 10 miR (miR-139-3p, miR-190b, miR-204, miR-339-5p, miR-363, miR-365, miR-502-5p, miR-520c-3p, miR-520g/h, miRPlus-E1130) bylo spojeno s klinickými výsledky v kohortě ER pozitivních pacientek léčených tamoxifenem, ale data nebylo možné zopakovat dvěma nezávislými patientskými kohortami (Lyng MB. et al., 2012). Vysoké hodnoty exprese miR-210 korelují s kratším DFS u ER pozitivních pacientek s časným karcinomem prsu, prognostická síla miR-210 byla srovnatelná s mRNA genovými esejemi, včetně 21 genového Oncotype Dx (Rothe F. et al., 2011). Prognostický význam miR-210 není ovšem vázaný pouze na ER pozitivní karcinomy, ale i další kohorty pacientek s karcinomem prsu (Foekens JA. et al., 2008, Hong L. et al., 2012, Buffa FM. et al., 2011). Pro HER2 pozitivní pacientky byla nalezena prognostická korelace s expresí miR-21, miR-210 a miR-373 (Gong C. et al., 2011, Jung EJ. et al., 2012, Muller V. et al., 2014). Vysoké hodnoty exprese miR-221 korelují s postižením lymfatických uzlin a HER2 pozitivitou (Falkenberg N. et al., 2013). Negativní prognostický potenciál miR-155 spolu s miR-16, miR-125b, miR-21 a miR-374a pro trojitě-negativní karcinom prsu prokázal Cascione a kol. (Cascione L. et al., 2013). Gasparini a kol. zjistili prognostický potenciál miR-155 spolu s miR-27a, miR-493 a miR-30e opět v kohortě trojitě-negativních karcinomů prsu, tyto 4 miRNA odlišovaly vysoce a níže rizikovou skupinu (Gasparini P. et al., 2014). Celá řada autorů určila prognostický potenciál různých miR a jejich kombinací u trojitě-negativního karcinomu prsu, bez uvedení námi hodnocených mikroRNA (Graveel CR. et al., 2015). Nejčastěji se v prognostických esejích vyskytovaly u TNBC miR-10b, miR-21 a miR-155, které všechny vykazují negativní prognostickou sílu. Tyto miR jsou exprimované i v jiných typech buněk, imunomodulačních a mezenchymálních, které hrají významnou roli v okolním mikroprostředí karcinomu prsu (Sempere LF. et al., 2010, Susman S. et al., 2014). Zvýšená exprese miR-21 podporuje myofibrogenезu, reguluje antimetastatické a proapoptotické geny (*RECK*, *SPRY1/2*, *PDCD-4*, *PTEN*). Vysoké hodnoty exprese miR-21 v okolním stromatu časných TNBC korelovaly s kratším intervalem do progresu a přežitím (Mackenzie TA. et al., 2014). Zvýšená exprese cirkulující miR-10b byla pozorována u pacientek s postižením lymfatických uzlin (Chen W. et al., 2013). Naproti tomu korelace s hodnotami exprese miR-10b a DFS a OS nebyla prokázána (Gee HE. et al., 2008). Přes všechny rozdíly v bazálním a translačním výzkumu miR v monitorování sérových hodnot exprese je většina autorů přesvědčena o jejich významu a budoucím potenciálu prohloubení znalostí o molekulární podstatě patogeneze karcinomu prsu.

Na hodnocení prognostického významu onkogenních miR navazovala multivariantní analýza porovnávací vzájemné vztahy a závislosti hodnocení miR a jednotlivých klinicko-patologických markerů. Z námi zjištěných dat neovlivňovaly HER2, TNBC, grading a stav lymfatických uzlin predikci pravděpodobnosti rizika relapsu stanoveného pomocí miR-155 a miR-24. Jediný marker, který zpřesňoval predikci prognózy spolu s hodnocením miR-155 a miR-24 byla exprese proliferačního indexu Ki-67 nad 20%. Vzájemná nezávislost uvedených klinicko-patologických markerů a miR je důležitá informace, protože umožňuje oddělené hodnocení a stanovení rizika relapsu pomocí jednotlivých markerů. Jejich společným hodnocením se dále zpřesňuje rozdělení do rizikových skupin a optimalizace a individualizace onkologické léčby. Vliv Ki-67>20% na zpřesnění prognózy karcinomu prsu není překvapivý, v obecném úvodu byl význam proliferačního indexu zmíněn, jak samostatné hodnocení pomocí imunohistochemie, tak i zastoupení genů proliferace v genomických esejích. Předchozí experimentální práce prokázala korelaci mezi expresí Ki-67 a hladinami miR-155 v nádorových buňkách (Bacci M. et al., 2016). Pro vyloučení vlivu absolvované léčby jsme porovnali v multivariantní analýze také chemoterapii, hormonoterapii a radioterapii a opět jsme nezaznamenali významný vliv na změny exprese miR-155 a miR-24 v jednotlivých fázích léčby. Toto zjištění opět dokumentuje nezávislost prognostického významu miR-155 a miR-24 u časného karcinomu prsu.

Data z předkládaného projektu představují jeden z mnoha pohledů na složitost patogeneze karcinomu prsu, jeho vzniku a recidivách. Definování rolí mikroRNA u karcinomu prsu představuje směr výzkumu, který může v budoucnosti přispět k dalšímu zlepšení diagnostiky, prognostiky a predikce terapie tohoto významného onemocnění. V neposlední řadě je odhalení signálních cest, které ovlivňují různé mikroRNA základem pro vývoj cílené terapie. I přes nesporná pozitiva je studium mikroRNA zatíženo celou řadou limitací, které je nutné překonat, aby jejich hodnocení získalo dostatečnou validitu a interpretovatelnost (Huo D. et al., 2016).

Prvním omezením nebo obtížností interpretace hodnocení mikroRNA ve tkáních nebo tekutinách vychází ze samotné podstaty miR, kdy díky nízké vazebné specifitě může jedna mikroRNA ovlivňovat stovky mRNA a proteinů. Rozsah a způsob ovlivnění cílových genů se liší a je determinován druhem onkologického onemocnění, jeho fází, typem buněk a mnoha dalšími, často neznámými, faktory (Di Leva G. et al., 2014). Interpretace dosažených výsledků může být napříč publikacemi odlišná a někdy i zcela opačná. Většina metod, které jsou schopné hodnotit s velikou citlivostí změny na úrovni různých druhů nukleových kyselin a často současně stanovit desítky až tisíce mutací přináší výrazné interpretační obtíže. Při nálezu

celé řady molekulárních změn je obtížné stanovit ty, které patří mezi řídící v patogenezi a rozvoji nádorového procesu.

Další limitace je ve způsobu detekce, zralá mikroRNA i přes výhody robustního bioanalytu, působí zároveň výzvy pro specifické a senzitivní detekční techniky (Leidner RS. et al., 2013). Platformy založené na microarray byly průlomem umožňujícím vysokokapacitní charakterizaci exprese mikroRNA ve tkáních. Jejich nevýhodou je potřeba velkého množství vzorku, které je činí obtížně použitelné pro hodnocení krve a dalších tekutin s nízkým obsahem a koncentrací mikroRNA. Tato limitace se částečně vyřešila využitím kvantitativní PCR s reverzní transkripcí, která umožňuje detekci malého počtu kopií miR. V současnosti jsou nejmodernější analytické techniky NanoString a RNA-Seq schopné detekovat jednotlivé molekuly (De Cecco L. et al., 2013, Zhang X. et al., 2013, de Planell-Saguer M. et al., 2013, Pritchard CC. et al., 2012). V našem výzkumu jsme použili speciálně upravenou a propracovanou metodu založenou na kvantitativní RT-PCR v reálném čase, která umožňuje senzitivní a specifickou detekci sérové exprese mikroRNA podle specifických primerů.

Hodnocení mikroRNA v krvi je výhodnější než ve tkáních s ohledem na minimální invazivitu krevního odběru, cirkulující bezbuněčné mikroRNA představují velice slibný biomarker díky své vysoké stabilitě (Taylor DD. et al., 2013). MikroRNA v cirkulaci mohou vycházet z odlišných buněčných typů primárního nádoru a odrážejí: 1) množství lyzovaných nádorových buněk nebo buněk v nádorovém mikroprostředí, 2) množství buněk exprimujících a secernujících specifické miRNA, 3) množství buněk aktivujících zánětlivou a jiné fyziologické reakce proti nádoru. V ideálním případě odpovídá spektrum cirkulujících mikroRNA těm, které jsou přímo produkovány nádorem, ale ve všech publikacích byla zřetelná nižší exprese v séru oproti tumorové tkáni (Schrijver W. et al., 2017). Pro stanovení cirkulujících miR lze použít plnou krev, sérum nebo plazmu. Plná krev obsahuje řadu buněčných elementů (leukocyty, trombocyty, erytrocyty), které vylučují vlastní miR a komplikují interpretaci výsledků. Sérum obsahuje pouze proteiny a další cirkulující molekuly, bez buněčných částic. Plazma, jako nesrážlivá krev, obsahuje buněčné elementy, srážlivé faktory, proteiny a cirkulující molekuly, které nemusí být obsaženy v séru. Při zpracování vzorků může situaci komplikovat hemolýza, která uvolní do séra nebo plazmy specifické miR obsažené v krvinkách. Byla provedeno několik studií a jeví se, že koncentrace miR je poněkud vyšší v séru než v plazmě, přímé srovnání je tak problematické (Wang K. et al., 2012). V našem experimentu jsme primárně volili krevní sérum, jehož zpracování je jednoduché, přináší dostatečné množství RNA pro přepis, zpracování a detekci mikroRNA.

Vedle volby způsobu zpracování vzorku a volby detekční techniky, je významný prvek normalizace cirkulujících mikroRNA. Vzhledem k různým zdrojům produkce cirkulujících mikroRNA není volba referenční miR nebo jiných ncRNA jednoznačně definovaná, výše byly zmíněné některé doporučené postupy. V našem experimentu byla zvolena jako referenční let-7a vzhledem ke stabilitě v různých tkáních a stabilitě mezi nádorovými pacienty a nenádorovými kontrolami (Song J. et al., 2012, Kim SJ. et al., 2012, Liu Y. et al., 2013, Cai WY. et al., 2013, Zhao H. et al., 2010, Newman MA. et al., 2008).

Celá řada studií hodnotila rozdíly v expresi mezi nemocnými s karcinomem prsu a zdravými kontrolami, mezi jednotlivými kohortami karcinomu prsu, podle absolvované léčby, podle různých fází léčby ve snaze zjistit diagnostický, prognostický a prediktivní potenciál. Porovnání různých studií je velice obtížné pro významné odlišnosti v charakteristikách pacientů, designu experimentů, přípravě vzorků a metodologii detekce. Tyto faktory představují další limitace v porovnávání výzkumu mikroRNA mezi jednotlivými autory a zobecnění jejich výsledků.

Za hlavní pozitiva našeho projektu považují jeho prospektivní charakter a dobu sledování, která v mediánu pokrývá hlavní období recidiv časného karcinomu prsu. Dále se potvrdil diagnostický potenciál námi zvolených mikroRNA, byly významně odlišitelné hodnoty exprese u zdravých a nemocných. Po rozdělení pacientek do rizikových skupin byly odlišné hodnoty exprese mezi nízkým a vysokým rizikem. Tento údaj tak dokumentuje využitelnost miR jako pomocného nástroje stratifikace dle rizikové skupiny. Dynamika vývoje exprese během léčby karcinomu prsu vykazovala odlišnosti mezi rizikovými skupinami, což dále podporuje prognostický potenciál. Zvýšené hodnoty exprese miR u některých pacientek po dokončené onkologické léčbě mohou představovat molekulární marker reziduální choroby. Zároveň lze sledováním hodnot exprese a dynamiky jejich vývoje u odléčených pacientek monitorovat chorobu a s předstihem oproti konvenčním metodám zachytit recidivy. Monitorace odléčených pacientek pomocí miR bude cílem pokračování našeho projektu. Významné pozitivum je potvrzení hlavního cíle našeho projektu, prognostického potenciálu miR-155 a miR-24 a jeho nezávislost na ostatních parametrech. Nepotvrzení prognostického významu miR-181b a miR-19a byl překvapením, vzhledem k jejich onkogenní roli, ale s ohledem na složitost kancerogeneze vysvětlitelný.

Za hlavní limitaci našeho projektu považují velikost souboru se kterým souvisí počet zachycených recidiv. Pro klinickou aplikovatelnost hodnocení exprese miR a využití v každodenní klinické praxi je nutné provést validační studii s kohortou v počtu jednotek tisíc pacientek. V současnosti rozšiřujeme projekt o využití vzorků z biobank onkologických center v ČR s cílem validace zjištěných dat. Tímto postupem bychom vyloučili i další limitaci našeho

projektu, která byla dána tím, že byl veden pouze na jednom pracovišti. Jistým omezením může být i počet hodnocených miR, zvolili jsem čtyři onkogenní miR vzhledem k tomu, že se jednalo o testovací projekt. V budoucnosti budeme hodnocený panel rozšiřovat podle dostupných údajů o významu jednotlivých miR v patogenezi karcinomu prsu. S tím souvisí také záměr sledovat, paralelně spolu s miR, cirkulující nádorovou DNA, která umožňuje dynamický pohled na změny během protinádorové léčby.

Budoucnost využití exprese mikroRNA jako biomarkerů nádorových onemocnění se jeví slibně. Jejich chemická stabilita ve tkáních a tělesných tekutinách, stejně jako ovlivnění desítek a stovek buněčných signálních cest jsou atraktivní pro další výzkum. U karcinomu prsu je zatím malá shoda na hodnocení jednotlivých miR a jejich kombinací mezi jednotlivými studiemi, nezávisle na tom jestli jsou sledované ve tkáních nebo krvi. Odlišují se pacientské charakteristiky, experimentální design, velikost souborů, metodologie stanovení a normalizace miR a statistické zpracování. Další limitací studia exprese mikroRNA je to, že hodnotí expresi z různých buněčných typů. Intra a intertumorová heterogenita na buněčné a molekulární úrovni komplikují interpretaci exprese mikroRNA. To dále vysvětluje malý překryv výsledků různých studií na hodnocení jednotlivých miR a jejich kombinací.

Je předčasné doporučit specifické mikroRNA a jejich klastry jako validní biomarkery detekce, prognózy, monitorace a predikce terapie karcinomu prsu. V dalším výzkumu jsou potřebné multiinstitucionální a dlouhodobé studie velkých kohort pacientů s precizně zpracovanými klinickými, patologickými a molekulárními charakteristikami k validaci klinického využití mikroRNA u karcinomu prsu.

6. Shrnutí závěrů dizertační práce

1. Naše data prokázala signifikantně vyšší expresi čtyř onkogenních mikroRNA (miR-155, miR-24, miR-19a a miR-181b) v sérech pacientek s časným karcinomem prsu v době diagnózy v porovnání se zdravými kontrolami.

2. Expese onkomiR je významně vyšší v nádorové tkáni karcinomu prsu v porovnání s okolní nenádorovou tkání. Tato zvýšená expese koreluje s významně vyšší expresí miR v sérech pacientek.

3. Hodnoty expese jednotlivých onkomiR klesají odlišně v různých fázích léčby, po operaci a po chemoterapii nebo ozáření. Onkogenní miR miR-155, miR-24 a miR-181b klesaly k normě po operačním zákroku. Onkogenní miR-19a jevila tendenci k normalizaci až po skončení protinádorové léčby.

4. Pacientky ve skupině vysokého rizika na základě klinicko-patologických markerů vykazovaly významně vyšší expresi onkogenních mikroRNA v porovnání s kontrolami a pacientkami nízkého rizika. Pacientky vysokého rizika vykazovaly opožděný a méně hluboký pokles jednotlivých mikroRNA po protinádorové léčbě. U pacientek nízkého rizika docházelo po onkologické léčbě k normalizaci expese onkogenních mikroRNA. U některých pacientek vysokého rizika i přes pokles v onkomiR nedošlo k jejich normalizaci po onkologické léčbě.

5. Hodnoty expese miR-155 a miR-24 měřené v sérech pacientek s časným karcinomem prsu po odstranění nádoru a svodných lymfatik zlepšují predikci pravděpodobnosti relapsu nemoci nezávisle na ostatních parametrech. Hodnoty expese miR-155 a miR-24 mohou představovat nezávislý cirkulující biomarker.

6. Jediný klinicko-patologický marker, který dále zpřesňuje hodnocení rizika spolu s miR-155 a miR-24 je expese proliferačního markeru Ki-67 > 20%. V multivariantsní analýze jsme neprokázali vliv chemoterapie, radioterapie, hormonoterapie na změny expese miR-24, miR-155 a relapsy onemocnění.

7. Použitá literatura

Abba ML, Paul N, Leupold JH, et al. MicroRNA regulation of epithelial to mesenchymal transition. *J Clin Med* 2016;5:8

Ahmad A, Aboukameel A, Kong D, Wang Z, Sethi S, Chen W, et al. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells. *Cancer Res* 2011;71:3400–9.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983-3988

Allmer J, Yousef M. Computational methods for ab initio detection of microRNAs. *Front Genet* 2012;3:209.

Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001;39:485-493

Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013;59(1):110-118

Amelio I, Lena AM, Viticchie G, Shalom-Feuerstein R, et al. miR-24 triggers epidermal differentiation by controlling actin adhesion and cell migration. *J Cell Biol* 2012;199:347-363

Amorim M, Salta S, Henrique R, Jerónimo C. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. *J Transl Med* 2016;14:265-279.

Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, Perez EA. MicroRNA signatures: Clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends Mol Med* 2011;17:313-319

Anfossi S, Giordano A, Gao H, et al. High serum miR-19a levels are associated with inflammatory breast cancer and are predictive of favorable clinical outcome in patients with metastatic HER2+ inflammatory breast cancer. *PLoS One* 2014;9(1):e83113

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics* 2003; 72(5):1117–1130.

Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(6):497–506.

Antonov AV, Knight RA, Melino G, Barlev NA, Tsvetkov PO. MIRUMIR: an online tool to test microRNAs as biomarkers to predict survival in cancer using multiple clinical data sets. *Cell death and differentiation* 2013;202:367

Armand-Labit V, Pradines A. Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *BioMol Concepts* 2017;8(2):61-81

Ashby J, Flack K, Jimenez LA et al. Distribution profiling of circulating microRNAs in cancer. *Anal Chem* 2014;86:9343-9349.

Bacci M, Giannoni E, Fearn A, Ribas R, et al: miR-155 Drives Metabolic Reprogramming of ER+ Breast Cancer Cells Following Long-Term Estrogen Deprivation and Predicts Clinical Response to Aromatase Inhibitors. *Cancer Research* 2016;76(6):1615-1626.

Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu C, Palazzo JP, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol* 2009;219:214–21.

Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 2011;11:70.

Bastien RR, Rodriguez-Lescure A, Ebbert MT et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics* 2012; 5:44

Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. microRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5:1122–43.

Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, et al. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acid Res* 2009;37:4850-4861

Bisso A, Faleschini M, Zampa F, Capaci V, De Santa J, Santarpia L, Piazza S, Cappelletti V, Daidone M, Agami R. Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer. *Cell Cycle* 2013; 12(11):1679–1687

Blenkiron C, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 2007;8:R214

Blows FM, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010;7:e1000279

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;59:744-749

Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 2010;9:306

Brosh R, Shalgi R, Liran A, et al. p53-repressed miRNAs are involved with E2F in a feed forward loop promoting proliferation. *Mol Syst Biol* 2008;4:229

Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;18125:592-601

Buffa FM, Camps C, Winchester L, et al. microRNA associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Res* 2011;71(17):5635-5645.

Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008;9:582-589

Cabel L., Proudhon C., Gortais H., Loirat D. et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol* 2017;22(3):421-430

Cai WY, Wei TZ, Luo QC, Wu QW, et al. The Wnt-beta-catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 13):2877–2889.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999-3004

Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues. *Human Genetics* 2008; 124(1):31–4

Cascione L, Gasparini P, Lovat F, et al. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple-negative breast cancer. *PLoS One* 2013;8(2):e55910

Cava C, Bertoli G, Ripamonti M et al. Integration of mRNA expression profile, copy number alterations, and microRNA expression levels in breast cancer to improve grade definition. *PLoS One* 2014;9:c97681.

Cimmino A, Calin G, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13944-13949

Coates AS, Millar EK, O'Toole SA et al. Prognostic interaction between expression of p53 and estrogen receptor in patients with node-negative breast cancer: results from IBCSG Trials VIII and IX. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R143

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Gebhart-Piccart M et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26(8):1533-1546

Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255-289

Corsini LR, Bronte E, Terrasi M, Amodeo V, et al. The role of microRNAs in cancer: diagnostic and prognostic biomarkers and targets of therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16(Suppl2):S103-109

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 467–477

Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012;110:483-495

Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;10633:13820-13825

Criscitiello C, Disalvatore D, De Laurentiis M et al. High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in Luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 2014; 23[1], 69-75

Croce CM and Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 2005;122:6-7

Cui S, Liao X, Ye CH, Yin X, et al. ING5 suppresses breast cancer progression and is regulated by miR-24. *Molecular Cancer* 2017;16:89

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012; 486: 346–352.

Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 2011;12:19-31

Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J* 2013; 32: 617– 628

De Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine. *Am J Pathol* 2013;182(4):1075-1083

de Azambuja E., Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504- 13

De Cecco L, Dugo M, Canevari S, Daidone MG, Callari M. Measuring microRNA expression levels in oncology: from samples to data analysis. *Crit Rev Oncog* 2013;18(4):273-287

De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem* 2013;46(10-11):869-878

de Rinaldis E, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, et al. Integrated

genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics*. 2013;14:643

DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2014;64:52-62

Demicheli R, Biganzoli E, Ardoino I, Boracchi P, Coradini D, et al. Recurrence and mortality dynamics for breast cancer patients undergoing mastectomy according to estrogen receptor status: different mortality but similar recurrence. *Cancer Sci* 2010; 101: 826–830

Denkert C, von Minckwitz G. Reply to Ki67 in breast cancer: a useful prognostic marker! *Ann Oncol* 2014; 25: 542-3

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-235

Diaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res* 2014;25(6):205-216

Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 2007;131:1097-1108

Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014;9:287-314

Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, et al. MiR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res* 2014;74:4145-4156

Dobbin KK. Statistical design and evaluation of biomarker studies. *Methods Mol Biol* 2014;1102:667-677

Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E et al. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2783-90

Du WW, Fang L, Li M, Yang X, Liang Y, et al. MicroRNA miR-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting PTPN9 and PTPRF to promote EGF signaling. *J Cell Sci* 2013;126:1440-1453

Dubsky P, Brase JC, Jakesz R et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer* 2013; 109: 2959-64

Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* 2010;411:1869-1874

Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* 2013;497:378–82

Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Research* 1999; 1(1):14–17

Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem* 2013; 59(10):1489–1496

Eiermann W, Rezai M, Kummel S et al. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use. *Ann Oncol* 2013; 24: 618-24

Ekimler S, Sahin K. Computational methods for microRNA target prediction. *Genes (Basel)* 2014;5:671-683

Ell B, Qiu Q, Wei Y, et al. The MicroRNA23b/27b/24 cluster promotes breast cancer lung metastasis by targeting metastasis-suppressive gene prosaposin. *J Biol Chem* 2014;289(32):21888-21895

Endo Y, et al. miR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor alpha-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20:91–102

Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 2011;38:698-707

Falkenberg N, Anastasov N, Rappl K, et al. MiR-221/-222 differentiate prognostic groups in advanced breast cancers and influence cell invasion. *Br J Cancer* 2013;109(10):2714-2723

Fan X, Chen W, Fu Z, Zeng L, et al. MicroRNAs, a subpopulation of regulators, are involved in breast cancer progression through regulating breast cancer stem cells. *Oncol Lett* 2017;14(6):5069-5076

Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, Brown M, Hafner M, Reyat F, van Kouwenhove M. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* 2011; 71(13):4443–4453

Farina NH, Wood ME, Perrapato SD, Francklyn CS, et al. Standardizing analysis of circulating microRNA: clinical and biological relevance. *J Cell Biochem* 2014;115:805-811

Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(35):13021-13026

Frères P, et al. Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(5):5416–28

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105

Frixa T, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers (Basel)* 2015;7(4):2466-2485

Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA protein in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 899-910

Gallo A, Tandon N, Alevizos J, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012;7:e30679

Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 2015;7(302):302ra133

Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell death and differentiation* 2010;172-200-208

Gasparini P, Lovat F, Fassan M, Casadei L, et al: Protective role of miR-155 in breast cancer

through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014a;111(12):4536-4541

Gasparini P, et al. microRNA expression profiling identifies a four micro-RNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget*. 2014;5:1174–84

Gee HE, Camps C, Buffa FM, et al. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. *Nature* 2008;455(7216):E8-E9

Ghai V, Wang K. Recent progress towards the use of circulating microRNAs as clinical biomarkers. *Arch Toxicol* 2016;90:2959-2978

Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, et al. Stability of circulating blood-based microRNAs – pre-analytic methodological considerations. *PLoS One* 2017;12:e0167969

Goh JN, et al. microRNAs in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016;91:409–28

Gong C, Yao Y, Wang Y, et al. Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer. *J Biol Chem* 2011;286(21):19127-19137

Graveel CR, Calderone HM, Westerhuis JJ, Winn ME, Sempere LF. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast cancer:targets and Therapy* 2015;7:59-79

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123:631-640

Grelier G, Voirin N, Ay AS, Cox DG, et al. Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. *Br J Cancer* 2009;101:673-683

Grzelak CA., Ghajar CM. Metastasis 'systems' biology: how are macro-environmental signals transmitted into microenvironmental cues for disseminated tumor cells? *Curr Opin Cell Biol* 2017;48:79-86

Guadagni F, Ferroni P, Carlini S, Mariotti S, et al. A reevaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) as a serum marker for breast cancer: a prospective longitudinal study. *Clin Cancer Res* 2001;7:2357-2362

Guo J, Jiang W, Xu X, Zheng X. Serum microRNA-155 in early diagnosis and prognosis of breast cancer. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(6):10289-10296

Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* 2006;127:679-695

Gyorffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Research* 2015;17:11

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cel Biol* 2014;15:509-524.

Hamam R, Hamam D, Alsaleh K, Kassem M, et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death and Disease* 2017;8:e3045

Hammond ME. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19:499-500.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 25: 499-505

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674

Haque R, et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2012;21:1848–55

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287–312

Hatfield SD, Sheherbata HR, Fischer KA, Nakahara K et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005;435:974-978

He Y, Lin J, Kong D, Huang M, et al. Current state of circulating microRNAs as cancer biomarkers. *Clin Chem* 2015;61:1138-1155

Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, et al. Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010;1025:789-795

Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem* 2015;61(1):112-123

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 25: 499-505

Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. *Cancer Dev* 2010;24:1339-1344

Hess KR, Wei C, Qi Y, Iwamoto T, Symmans WF, Pusztai L. Lack of sufficiently strong informative features limits the potential of gene expression analysis as predictive tool for many clinical classification problems. *BMC Bioinformatics* 2011;12:463

Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* 2008;319:1785-1786

Hong L, Yang J, Han Y, Lu Q, Cao J, Syed L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Gene* 2012;507(2):135-138

Hoppe R, Achinger-Kawecka J, Winter S, et al. Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. *Eur J Cancer* 2013;49(17):3598-3608

Hossain A, Kuo MT and Saunders GF. MiR-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 2006;26:8191-8201

Hosseini H, Obradovic M, Hoffmann M, Harper K, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature* 2016;540:552-558

Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Developmental Cell* 2003;52:351-358

Hu Z, Dong J, Wang LE, Ma H, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis* 2012;33(4):828-834

Hu Y and Tang H. MicroRNAs regulate the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cancer progression. *Microna* 2014;3:108-117

Hudecova S, Pesta M: Modeling dependencies in claims reserving with GEE. *Insur Math Econ* 2013;53(3):786-794

Huntzinger E, Izaurraide E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;12:99-110

Huo D, Clayton WM, Yoshimatsu TF, Chen J, Olopade OI. Identification of an circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. *Oncotarget* 2016;7:55231-55248

Chan M, et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2013;19:4477-87

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736-750

Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, et al. CCL 18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell* 2011;19:541-555

Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007; 25(11):1329-1333

Chen Q, Xu J, Li L, Li H, et al. MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death and Disease* 2014;5:e1132

Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z, Zhong XY. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biol* 2013;34(1):455-462

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, et al. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18: 997–1006

Cheng D. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;81:75-93

Cheng F, Su L, Qian CH. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* 2016;30(7):48832-48841

Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One* 2013;8:e64795

Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:14888-14893

Chhabra R, Dubey R, Saini N. Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a-27a-24-2 cluster and its implication in human diseases. *Mol Cancer* 2010;9:232

Chhabra R, Saini N. MicroRNAs in cancer stem cells: current status and future directions. *Tumour Biol* 2014; 35:83958405

Choi BH, Kim CG, Lim Y, Shin SY, Lee YH. Curcumin down-regulates the multidrug-resistance *mdr 1b* gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF kappa B pathway. *Cancer Lett* 2008;259:111-118

Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim JW, et al. Gata3 suppresses metastasis and modulates the tumor microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol* 2013;15:201-213

Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 2007;61:24-29

Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA for precision medicine. *Ann Oncol* 2014;25(12):2304-2313

Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell* 2010; 39(4):493–506

Inns J, James V. Circulating microRNAs for the prediction of metastasis in breast cancer patients diagnosed with early stage disease. *Breast* 2015;24:364-369

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16):7065–7070

Iorio MV, Casalini P, Tagliabue E, Ménard S, Croce CM. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:2753–9

Nikolic I, Plate KH, Schmidt MH. EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *J Angiogenes Res* 2010;2:9

Iwamoto T, Lee JS, Bianchini G, Hubbard RE, Young E, Matsuoka J, et al. First generation prognostic gene signatures for breast cancer predict both survival and chemotherapy sensitivity and identify overlapping patient populations. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:155–64

Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007;2007:re1

Jarry J, Schadendorf D, Greenwood C, Spatz A, van Kempen LC. The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol Oncol* 2014;8:819-829

Jatoi I, Tsimelzon A, Weiss H, Clark GM, Hilsenbeck SG. Hazard rates of recurrence following diagnosis of primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89: 173–178

Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y. MicroRNA-155 functions as an Oncomir in breast cancer by targeting the suppressor of cytotoxic signaling I gene. *Cancer Res* 2010; 70: 3119-3127

Jiang S, Zhang LF, Zhang HW, Hu S, et al. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells. *EMBO J* 2012;31:1985-1998

Jillian-Phallen MSV, Adleff A, Leal C, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017;9(403), pii: ean2415

Johansson J, Berg T, Kurzejamska E, Pang MF, et al. miR-155 mediated loss of C/EBPbeta shifts the TGFbeta response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene* 2013;32:5614-5624

Joose SA, Mller V, Steinbach B, Oantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* 2014;111:909-917

Jung EJ, Santarpia L, Kim J, et al. Plasma microRNA-210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer* 2012;118(10):2603-2614

Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, et al. Identification of direct targets for the miR-17–92 cluster by proteomic analysis. *Proteomics* 2011; 11: 3531–3539

Kasinski AL, Slack FJ. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;11:849-864

Katoh M. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases. *Front Cell Dev Biol* 2014 Oct 16;2:61

Keklikoglou I, Korner C, Tschulens U, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* 2012;31:4150–63

Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, Wang B, Ebbert MT, Bastien RR, et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX(R)) and the PAM50

breast cancer intrinsic classifier in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist* 2012;17:492–8

Kerlikowske K, Zhu W, Hubbard RA, et al. Breast Cancer Surveillance Consortium. Outcomes of screening mammography by frequency, breast density, and postmenopausal hormone therapy. *JAMA Intern Med* 2013;173(9):807-816

Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:608-621

Kilburn-Toppin F, Bartel SJ. New horizons in breast imaging. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2013;25(2):93-100

Kim K, Chadalapaka G, Lee SO, Yamada D, Sastre-Garau X, Defossez PA, Park YY, Lee JS, Safe S. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene* 2012; 31(8):1034–1044

Kim S, Rhee JK, Yoo HJ, Lee EJ, et al. Bioinformatics and metabolomic analysis reveals miR-155 regulates thiamine level in breast cancer. *Cancer Lett* 2015;357:488-497

Kim SJ, Shin JY, Lee KD, Bae YK, Sung KW, Nam SJ, Chun KH. MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7. *Breast Cancer Res* 2012; 14(1):R14

Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, Kim VN. Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from small number of cells. *Mol Cell* 2012;46:893-895

Kita Y, Vincent K, Natsugoe S, Berindan-Neagoe I, Calin GA. Epigenetically regulated microRNAs and their prospect in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2014;14(6):673-683

Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9:302-312

Kleivi Sahlberg K, Bottai G, Naume B, Burwinkel B, et al. A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1207-1214

Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, et al. The predictive value of 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 655-661

Kong YW, McCollough DF, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *The Lancet Oncol* 2012; 13: e249-e258

Kong W, Yang H, He L, et al. MicroRNA-155 is regulated by transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 2008;28:6773-6784

Kong W, He L, Coppola M, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem* 2010;285:17869-17879

Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2014;33(6):679-689

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010a; 101: 2087-2092

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010b;285:17442-17452

Krawczyk N., Meier-Stiegen F., Banys M., Neubauer H., et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:415721

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495-500

Kroski E, Fiori ME, Barbieri O, Astigiano S, et al. miR-181b is induced by the chemopreventive polyphenol curcumin and inhibits breast cancer metastasis via down regulation of the inflammatory cytokines CXCL-1 and -2. *Mol Oncol* 2014;8:581-594

Lal A, Kim HH, Abdelmohsen K, Kuwano Y, et al. p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PLoS One* 2008;3:e1864

Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, et al. New concepts in cancer biomarkers: Circulating miRNAs in liquid biopsies. *Int J Mol Sci* 2016;17:627

Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* 2014;20:1829-1842

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121: 2750-67

Leidner RS, Li L, and Thompson CL. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS ONE* 2013;8:e57841

Leivonen SK, Makela R, Ostling P, et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene* 2009;28:3926-3936

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20

Liang K, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986;73:13-22

Li H, Bian C, Liao L, Li J, Zhao RC. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 565–575

Li Q, Liu M, Ma F, Luo Y, et al. Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal A subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel. *PLoS ONE* 2014;9:e104870

Lin SC, Liu CJ, Lin JA, Chiang WF, Hung PS and Chang KW. miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol* 2010; 46: 204-208

Linde N., Fluegen G., Aguirre-Ghiso JA. The Relationship Between Dormant Cancer Cells and Their Microenvironment. *Adv Cancer Res* 2016;132:45-71

Liu XH, Sun M, Nie FO, Ge YB, et al. LncRNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. *Mol Cancer* 2014;13:92

Liu Y, Li H, Feng J, Cui X, Huang W, Li Y, Su F, Liu Q, Zhu J, Lv X. Lin28 induces epithelial-to-mesenchymal transition and stemness via downregulation of Let-7a in breast cancer cells. *PLoS One* 2013; 8(12):e83083

Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics* 2017;7:789-804

Li SC, Tang P, Lin WC. Intronic microRNA: discovery and biological implications. *DNA Cell Biol* 2007;26:195-207

Li S, Yang C, Zhai L, Zhang W, Yu J, Gu F, Lang R, Fan Y, Gong M, Zhang X. Deep sequencing reveals small RNA characterization of invasive micropapillary carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136(1):77–87

Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 2009;394:1117–24

Li X, Liu X, Xu W, Zhou P, et al. c-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting Sprouty2. *J Biol Chem* 2013;288:18121–18133

Li Z, Rich JN. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2010;345:21-30

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769-773

Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin J Cancer Res* 2013;25:46-54

Liu J, Wu C, Ju J, and Jiang J. miR-181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer (Review). *Biomed Rep* 2014;2:7-11

Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006;66:6063-6071

Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Rep* 2014;21:78-91

Lowery AJ, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11:R27

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saaverda E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838

Lu K, Wang J, Song Y, Zhao S, et al. miRNA-24-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting p27Kip1. *Oncology Reports* 2015;342:995-1002

Lu L, Mao X, Shi P, He B, et al. MicroRNAs in the prognosis of triple-negative breast cancer. *Medicine* 2017;96(22):e7085

Lu Y, Thomson JM, Wong HYF, Hammond SM, Hogan BLM. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17–92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Developmental Biology* 2007; 310: 442–453.

Lu Z, Ye Y, Jiao D, Qiao J, et al. miR-155 and miR-31 are differentially expressed in breast cancer patients and are correlated with the estrogen receptor and progesterone receptor status. *Oncol Lett* 2012;4:1027-1032

Lyng MB, Laenkholm AV, Sokilde R, Gravgard KH, Litman T, Ditzel HJ. Global microRNA expression profiling of high-risk ER+ breast cancers from patients receiving adjuvant tamoxifen mono-therapy: a DBCG study. *PLoS One* 2012;7(5):e36170

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNA are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2007;104:9667-9672

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449:682–688

Ma L, Young J, Prabhala H, et al. miR-9, a MYC/MYCN activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010;12:247-256

Mackenzie TA, Schwartz G, Calderone HM, et al. Stromal expression of miR-21 identifies high-risk group in triple-negative breast cancer. *Am J Pathol* 2014;184(12):3217-3225

Madhavan D, et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:5972–82

Madhavan D, Peng C, Wallwiener M, Zucknick M, et al. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis* 2016;37(5):461-470

Mangolini A, Ferracin M, Zanzi MV, Saccenti E, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomark Res* 2015;3:12

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-715

Mansueto G, Forzati F, Ferraro A, Pallante P, Bianco M, et al. Identification of a new pathway for tumor progression: MicroRNA-181b up-regulation and CBX 7 down-regulation by HMGA I protein. *Genes and Cancer* 2010; 1(3): 210-224

Marabita F, Candia P, Torri A, Tegner J, et al. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* 2016;17:204-212

Margue C, Reinsbach S, Philippidou D, Beaume N, et al. Comparison of healthy miRNomes with melanoma patients miRNomes: Are microRNAs suitable serum biomarkers for cancer? *Oncotarget* 2015;6:12110-12127

Markou A, Yousef GM, Stathopoulos E, Georgoulas V, Lianidou E. Prognostic significance of metastasis-related microRNAs in early breast cancer patients with a long follow-up. *Clin Chem* 2014;60:197–205

Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampion GM, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 2008;1343:521-533

Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, et al. A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 2010;141:1195-1207

Martin G, Schouest K, Kovvuru P, Spillane C. Prediction and validation of microRNA targets in animal genomes. *J Biosci* 2007;32:1049-1052

Masuda H, Baggerly KA, Wang Y et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5533- 40

Matsuda A, Yan IK, Foye C, Parasramka M, Patel T. MicroRNAs as paracrine signaling mediators in cancers and metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30:577-590

Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 2006;15(1):17-29

Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF The Oncogenic Role of miR-155 in Breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(8):1236-1243

McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RT-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS ONE* 2013;8:e83718

McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 2011; 57: 833–840

Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;26:707-721

Melzer C., von der Ohe J., Hass R. Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. *Biomed Res Int* 2017;2017:8534371

Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, and Safe S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:11001-11011

Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free circulating miRNA biomarkers in cancer. *J Cancer* 2012;3:432-448

Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, et al. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 2014;18:371-390

Muller BM, Keil E, Lehmann A, Winzer KJ, Richter-Ehrenstein C, Prinzler J, ^[11]_[56] et al. The EndoPredict gene-expression assay in clinical practice – performance and impact on clinical decisions. *PLoS One* 2013;8:e68252

Muller V, Gade S, Steinbach B, et al. Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(1):61-68

Mulrane L, McGee SF, Hallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res* 2013;73:6554-6562

Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, et al. Genetic dissection of the miR-17,92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev* 2009; 23: 2806–2811

Musto A, Navarra A, Vocca A, Gargiulo A, et al. miR-23a, miR-24 and miR-27a protect differentiating ESCs from BMP4-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2015;226:1047-1057

Nassar FJ, Nasr R, Talhouk R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. *Pharmacol Ther* 2017;172:34-49

Neel JC, Lebrun JJ. Activin and TGFb regulate expression of the microRNA-181 family to promote cell migration and invasion in breast cancer cells. *Cell Signal* 2013;25:1556-1566

Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 2008; 14(8):1539–1549

Nielsen T, Wallden B, Schaper C et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* 2014; 14:177

Occhipinti G, Giulietti M, Principato G, Piva F. The choice of endogenous controls in exosomal microRNA assessments from biofluids. *Tumour Biol* 2016;37:11657-11665

O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:201

Ohshima K, Inoue K, Fujiwata A, Hatakeyama K, et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010;5:e13247-13256

Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17–92. *Genes Dev* 2009;23: 2839–2849

Ono S, Lam S, Nagahara M, Hoon DS. Circulating microRNA biomarkers as liquid biopsy for cancer patients: pros and cons of current assays. *J Clin Med* 2015;4:1890-1907

Ortiz-Quintero B. Cell free microRNAs in blood and other body fluids, as biomarkers. *Cell Profil* 2016;49:281-303

Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, et al. Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a quantitative proteomic approach. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e44095

Pallante P, Federico A, Berlingieri MT, Bianco M, Ferraro A, Forzati F, et al. Loss of the CBX 7 gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer: *Cancer Res* 2008; 68(16): 6770-6778

Palmero EI, de Campos SG, Campos M et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol* 2011;34:363-370

Papadimitriou E, Vasilaki E, Vorvis C, Iliopoulos D, Moustakas A, Kardassis D, Stournaras C. Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF-beta and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 2012; 31(23):2862–2875

Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazarrol G, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 2010;1401:62-73

Pelder HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14:844-852

Peng F, et al. Identification of differentially expressed miRNAs in individual breast cancer patient and application in personalized medicine. *Oncogenesis* 2016;5:e194

Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12885–12890

Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 2010;5:e13515

Pileczki V, Cojocneanu-Petric R, Maralani M, Neagoe B, Sandulescu R. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med* 2016;89(1):50-55

Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 2012;481:190–4

Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, et al. An International Ki67 reproducibility Study. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(24):1897-1906

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumor biology. *Nature* 2010;465:1033-1038

Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* 2011; 121: 3786-3788

Polytarchou C, Iliopoulos D, Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14470-14475

Polzer B, Klein CA. Metastasis awakening: the challenges of targeting minimal residual cancer. *Nature Med* 2013;19:274-275

Pontier SM and Muller WJ. Integrins in mammary stem cell biology and breast cancer progression – a role in cancer stem cells? *J Cell Sci* 2009;122:207-214

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5:5-23

Prat A, Cheang MC, Martin M et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 203-9

Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 2012;13(5):358-369

Qian L, Liu M, Ma F, Luo Y, et al. Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal A subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel. *PLoS One* 2014;9(8):e104870

Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J, and Jin Y. miR-24 regulates apoptosis by targeting open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* 2010;5:e9429

Quesne JL, Jones J, Warren J, et al. Biological and prognostic associations of miR-205 and let-7b in breast cancer revealed by in situ hybridization analysis of micro-RNA expression in arrays of archival tumor tissues. *J Pathol* 2012;227(3):306-314

Rack B., Schindibeck C., Juckstock J., Andergassen U. et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014;15(5):106

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010;12(4):207

Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2007;26:731-743

Regan MM, Pagani O, Walley B et al. Premenopausal endocrine-responsive early breast cancer: who receives chemotherapy? *Ann Oncol* 2008; 19: 1231-41

Rodriguez-González FG, Sieuwerts AM, Smid M, et al. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127(1):43-51

Romain S, Laine-Bidron C, Martin PM, Magdelant H. Steroid receptor distribution in 47 892 breast cancers. A collaborative study of 7 European laboratories. *Eur J Cancer* 1995;31:411-417.

Roscigno G, Puoti I, Giordano I, Donnarumma E, et al. MiR-24 induces chemotherapy resistance and hypoxic advantage in breast cancer. *Oncotarget* 2017;8(12):19507-19521

Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R90

Rothe F, Ignatiadis M, Chaboteaux C, et al. Global microRNA expression profiling identifies miR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS One* 2011;6(6):e20980

Roy L, Bikorimana E, Lapid D, Choi H, et al. MiR-24 is required for hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS Genetics* 2015;e1004959

Rutnam ZJ, Yang BB. The involvement of microRNAs in malignant transformation. *Histol Histopathol* 2012;27:1263-1270

Ryu S, McDonnell K, Choi H, Gao D, et al. Suppression of miRNA-708 by polycomb group promotes metastases by calcium-induced cell migration. *Cancer Cell* 2013;23:63-76

Sempere LF, Christensen M, Silaharoglu A, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67(24):11612– 11620

Sempere LF, Preis M, Yezefski T, et al. Fluorescence-based codetection with protein markers reveals distinct cellular compartments for altered microRNA expression in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16(16):4246-4255

Serpico D, Molino L, Di Cosimo S. microRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer Treat Rev* 2014;40:595–604

Sestak I, Dowsett M, Zabaglo L et al. Factors Predicting Late Recurrence for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2013; 105: 1504- 11

Sestak I, Cuzick J, Dowsett M et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. *J Clin Oncol* 2015; 33: 916-22

Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder B, et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol* 2013;14:1067–76

Shah NR, Chen H. MicroRNAs in pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis and treatment. *World J Clin Oncol* 2014;5(2):48-60

Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* 2013;329:125-136

Sheherbata HR, Hatfield S, Ward EJ, Reynolds S, et al. The MicroRNA pathway plays a regulatory role in stem cell division. *Cell Cycle* 2006;52:172-175

Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009;138:592-603

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7737-7742

Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mol Pathol* 2010;23 Suppl 2:S60-64.

Schrijver W, van Diest P, Moelans C, et al. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. *Oncotarget* 2017;8(2):3111-3123

Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic Grade Remains a Prognostic Factor for Breast Cancer Regardless of the Number of Positive Lymph Nodes and Tumor Size. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1048-1052

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426–437

Schwarzenbach H. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013; 15(5):211

Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:145-156

Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem* 2015;61:1333-1342

Schwarzenbacher D, Balic M, Pichler M. The role of microRNAs in breast cancer stem cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 14712-14723

van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res* 2015;17:21

Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, and Mo YY. miR-21 mediated tumor growth. *Oncogene* 2006;26:2799-2803

Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:223-229

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30

Song B, Wang C, Liu J, et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:29

Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell* 2013;154:311-324

Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, Han S, Zhang Z. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 2012;57(4):897–904

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869-74

Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009;360:790–800

Su S, Liu Q, Chen J, Chen F, He C, et al. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 2014;25:605-620

Suarez Y and Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res* 2009;104:442-454

Sun X, Jiao X, Pestell TG et al. MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield. *Oncogene* 2014; 33: 4967-4977

Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, et al. MicroRNA-181b regulates NF-κB-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* 2012;122:1973-1990

Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, Li J. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(10):e47003

Sung H, Jeon S, Lee KM, Han S, et al. Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival. *BMC Cancer* 2012;12:1-12

Sunters A, Fernández de Mattos S, Stahl M, et al. FOXO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2003;278:49795-49805

Susman S, Tomuleasa C, Fekete Z, Pilato B, Irimie A, Berindan-Neagoe I. The importance of microRNAs in the stroma-breast cancer cell interplay. *Cancer Biomark* 2014;14(2-3):137-144

Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* 2012;13:13414–37

Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17–92 microRNA cluster. *Cancer Research* 2008; 68: 5540–5545

Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of Molecular Biology* 2004;339: 327–335

Tashkandi H, Shah N, Patel Y, Chen H. Identification of new miRNA biomarkers associated with HER2-positive breast cancers. *Oncoscience* 2015;2:924–9

Tavazoie SF, Alacron C, Oskarsson T, Padua D, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008;451:147–52

Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110:13-21

Taylor DD, Gercel-Taylor C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet* 2013;4:142

Turchinovich A, Welz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acid Res* 2011;39:7223-7233

Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009;137:1032-1046

Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, et al. Cancer stem cells definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* 2012;1211:767-775

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:1–12

Várallyay É, Burgyan J, Havelda J. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* 2008;3:190–6

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931-1934

Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 207-212

Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 10:S207-210

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered in recipients cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423-433

Vincent-Salomon A and Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res* 2003;5:101-106

Visvader JE, Stingl J. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes and development* 2014;2811:1143.1158

Volinia S, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2012;109(8):3024-9

Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumor DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17(4):223-238

Wang B, Hsu SH, Majumder S, Kutay H, et al. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene* 2010;29(12):1787-1797

Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantification of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 586-593

Wang F, Hou J, Jin W, Li J, Yue Y, Jin H, Wang X. Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: A meta-analysis. *Molecules* 2014;19:6282-6293

Wang J, Hua HJ. Role of miR-155 in breast cancer. *Front Biosci* 2012; 17: 2350–2355

Wang JH, Shi CY, Liu SZ. Application of CA 15-3 on the aspect of the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Med Res Educ* 2010;27:40-41

Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acid Res* 2010;38:7248-7259

Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012;7(7):e41561

Wang L, Wang YX, Chen LP, Ji ML. Upregulation of microRNA-181b inhibits CCL18-induced breast cancer cell metastasis and invasion via the NF- κ B signaling pathway. *Oncol Lett* 2016;12:4411-4418

Wang S, Bian C, Yang Z, et al. miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int J Oncol* 2009;34:1461-1466

Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE* 2008; 3: e2557

Wang XW, Wang XH. Systematic identification of microRNA functions by combining target prediction and expression profiling. *Nucl Acid Res* 2006;34:1646-1652

Wang Y, Yu Y, Tsuyada A, Ren X, et al. Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene* 2011;30:1470-1480

Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006; 295(12):1379–1388

Ward A, Shukla K, Balwierz A, et al. MicroRNA-519 is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumor-suppressor genes in ER+ breast cancer. *J Pathol* 2014;233(4):368-379

Watson AK, Witwer KW. Do platform-specific factors explain microRNA profiling disparities? *Clin Chem* 2012;58:472-474

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733-1741

Weigelt B, Peterse JL and van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5:591-602

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009;11:228-234

Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013;2:20360

Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015;61:56-63

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:3997-4013

Wolmark N, Mamounas EP, Baehner FL et al. Recurrence score and quantitative ER expression to predict in late distant recurrence risk in ER+ BC after 5 years of tamoxifen. *J Clin Oncol* 2014;32[5s], (suppl, abstr 11024)

Wu SC, Chou FF, Rau KM. Clinical significance of a serum CA 15-3 surge and the usefulness of CA 15-3 kinetics in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:879-882

Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clini Chim Acta* 2012; 413(13–14):1058–1065

Wu X, Somlo G, Yu Y, Palomares MR, Li AX, Zhou W, et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med* 2012;10:42

Xie Y, Tobin LA, Camps J, Wangsa D, et al. MicroRNA-24 regulates XIAP to reduce the apoptosis threshold in cancer cells. *Oncogene* 2013;3219:2442-2451

Yang M, Forbes ME, Bitting RL, O'Neill SS, et al. Incorporating blood-based liquid biopsy information into cancer staging: time for a TNMB system? *Ann Oncol* 2018;29:311-323

Yoo JO, Kwak SY, An HJ, et al. miR-181b-3p promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells through Snail stabilization by directly targeting YWHAG. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:1601-1611

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, et al. let-7 regulates self-renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007;131:1109-1123

Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F, and Song E. miR-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene* 2010;29:4194-4204

Yu Z, Wang C, Wang M, et al. A cyclin D1/microRNA-17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol* 2008;182:509-517

Zaidi SK, Dowdy CR, van Wijnen AJ, Kian JB, Raza A, Stein JL, Croce CM, and Stein GS. Altered Runx1 subnuclear targeting enhances myeloid cell proliferation and blocks differentiation by activating a miR-24/MKP-7/MPK network. *Cancer Res* 2009;69:8249-8255

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12

Zhang J, Tian XJ and Xing J. Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- β , SHH and WNT and their crosstalks. *J Clin Med* 2016;5:E41

Zhang L, Xu Y, Jin X, Wang Z. et al. A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;154:423–34.

Zhang X, Lu X, Lopez-Berestein G, Sood A, Calin G. In situ hybridization-based detection of microRNAs in human diseases. *microRNA Diagn Ther* 2013;1(1):12-23

Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE et al. Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 4196-205

Zhang ZJ, Ma SL. miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncol Rep* 2012; 27: 903-910

Zhao M, Ang L, Huang J and Wang J. MicroRNAs regulate the epithelial-mesenchymal transition and influence breast cancer invasion and metastasis. *Tumor Biol* 2017;39(2):1010428317691682

Zhao QY, Ju F, Wang ZH, Ma XZ, Zhao H. ING5 inhibits epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by suppressing PI3K/Akt pathway. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:15498-15505

Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 2010; 5(10):e13735

Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 2014;25:501-515

Zhong S, Chen X, Wang D, Zhang X, et al. MicroRNA expression profiles of drug-resistance breast cancer cells and their exosomes. *Oncotarget* 2016;7:19601-19609

Zhu N, Zhang D, Xie H, et al. Endothelial specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. *Mol cell Biochem* 2011;351:157-164

Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008;18:350-359

Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009; 2: 89

8. Publikace autora vztahující se k dizertační práci

1. Sochor M., Basova P., Pesta M., Dusilkova N., Bartos J., Burda P., Pospisil V, and Stopka T. Oncogenic MicroRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 Enable Monitoring of Early Breast Cancer in Serum. *BMC Cancer* 2014;14(1):448 (**IF 3.362**)
2. Bašová P., Pešta M., Sochor M., and Stopka T. Prediction Potential of Serum miR-155 and miR-24 for Relapsing Early Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(10): 2116 (**IF 3.226**)

9. Přílohy

Příloha 1:

INFORMOVANÝ SOUHLAS PRO PACIENTKY VSTUPUJÍCÍ DO PROJEKTU SLEDOVÁNÍ RIZIKOVÝCH UKAZATELŮ U KARCINOMU PRSU

Cíl projektu:

Zhoubné nádory jsou tvořeny rozsáhlým spektrem chorob s rozdílným chováním nejen mezi různými druhy nádorů, ale i uvnitř skupiny nádorů se stejným mikroskopickým nálezem. Rozdílné chování vychází z vnitřní charakteristiky jednotlivých nádorů, jejich rozsahu a lokalizace. Částečnou předpověď možného chování mohou poskytovat klasické metody mikroskopického hodnocení nádoru, lymfatických uzlin a vzdáleného postižení (metastáz). I přes propracované metody je osud pacientů uvnitř jednoho klinického stadia natolik rozdílný, že je snaha vyvíjet další nové metody hodnocení a možné předpovědi budoucího chování konkrétního nádoru u konkrétního pacienta. Většina vyvíjených metod hodnotí různé druhy nukleových kyselin, jejich hladiny, změny během léčby a vliv na další osud a chování zhoubného nádoru. Snahou je odlišit v rámci klinických stádií další podskupiny s rozdílným chováním a agresivitou. Využití v onkologické praxi budoucnosti spočívá v časném zjištění nádorových onemocnění, v předpovědi chování nádorů a úpravě terapie pro konkrétní nádor, v neposlední řadě potom sledování účinku terapie a případných nežádoucích účinků onkologické léčby.

Průběh výzkumu:

K hodnocení se využívá srážlivá nebo nesrážlivá krev. V přesně stanovených termínech předoperačně, pooperačně, po terapii a v případech návratu/metastazování nádoru bude odebíráno 10-15ml žilní krve standardním způsobem. Rizika jsou běžná, související s odběrem žilní krve, bez dalších známých přidaných rizik. Tato krev bude odstředěna, rozdělena do malých množství a zamražena. Hodnocení bude probíhat v laboratořích Ústavu fyziologie a patofyziologie 1. LF UK a VFN Praha. Veškeré činnosti probíhají podle správné laboratorní a lékařské praxe a jsou schváleny etickou komisí. Část vzorků se bude v zamrazeném stavu uchovávat dlouhodobě po celou dobu projektu tak, aby bylo možné v případě nutnosti dohledat další faktory, jak budou známé výsledky z dalších pracovišť a v literatuře. Porovnávat se budou vzorky mezi pacienty jednotlivých stádií. Jako srovnávací kontrola budou nabírány

zdravé ženy s věkovým rozložením podobným skupině sledovaných pacientek. Od zařazení do studie můžete kdykoli odstoupit. Výsledky studie budou chráněny lékařským tajemstvím, jsou přísně důvěrné a materiál bude veden pouze pod číselným kódem zamezující výsledek (pro nezasevčeného pracovníka) spojovat s konkrétní osobou. Se vzorkem krve bude po celou dobu uchování zacházeno dle platných norem ochrany osobních údajů. S výsledky a možnými předběžnými závěry budeme účastnice studie na vyžádání informovat.

Výsledky a jejich zpracování:

Získané údaje budou využity k dalšímu statistickému zpracování. V tomto případě budou výsledky zbaveny jakýchkoliv identifikačních údajů a nebude tedy možno nalézt spojitost mezi uvedenými výsledky a konkrétní osobou.

Souhlas s odběrem krve a účastí v projektu výzkumu:

Potvrzuji tímto, že jsem si pečlivě pročetla a pochopila informace pro pacienta a měla jsem příležitost vznést dotazy. Svým podpisem potvrzuji, že s vyšetřením souhlasím.

Dodatečné otázky a odpovědi:

Jméno pacientky:

Podpis pacientky:

datum:

Jméno lékaře:

Podpis lékaře:

datum: