

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Lucie Prokopová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Spojitost rakoviny prsu s BRCA geny, miRNA a metylací DNA
Bakalářská práce

2023

Lucie Prokopová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Prokopová**
Osobní číslo: **C19452**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Spojitost rakoviny prsu s BRCA geny, miRNA a metylací DNA**
Téma práce anglicky: **Relationship Between Breast Cancer And BRCA Genes, miRNA and DNA Methylation**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma BRCA geny, rakovina prsu, miRNA a metylace DNA
 - a. Rakovina prsu
 - b. BRCA geny
 - c. Epigenetické markery
 - i. miRNA
 - ii. metylaceDNA
 - d. Metody vyšetřování
 - e. Vzájemné vztahy

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Spojitost rakoviny prsu s BRCA geny, miRNA a metylací DNA jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23.6.2023

Lucie Prokopová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za skvělý přístup, cenné rady a pomoc. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, která mě plně podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá spojitostí rakoviny prsu s BRCA geny, miRNA a metylací DNA. V první části se práce věnuje obecně rakovině prsu. Dále BRCA genům, které při tomto onemocnění hrají velkou roli a epigenetickými markery, mezi které patří miRNA, metylace DNA a metylace histonů. V druhé části se práce věnuje právě spojitosti rakoviny prsu s BRCA geny, miRNA a metylací DNA.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rakovina prsu, BRCA geny, miRNA, metylace DNA, epigenetika

TITLE

Relationship between breast cancer and BRCA genes, miRNA and DNA methylation

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with relationship between breast cancer and BRCA genes, miRNA and DNA methylation. The first part describes breast cancer, BRCA genes which play a large role in this disease and epigenetic markers that include miRNA, DNA methylation and histone methylation. In the second part the bachelor thesis deals with relationship between breast cancer and BRCA genes, miRNA and DNA methylation.

KEYWORDS

Breast cancer, BRCA genes, miRNA, DNA methylation, epigenetics

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE	12
ÚVOD.....	14
1. Rakovina prsu	15
1.1 Anatomie prsu a mléčné žlázy.....	15
1.2 Epidemiologie.....	16
1.3 Etiologie a rizikové faktory	16
1.4 Prevence	18
1.5 Klinické projevy	19
1.6 Diagnostika.....	20
1.6.1 Histopatologické vyšetření	20
1.7 Léčba	21
1.7.1 Chirurgická léčba.....	21
1.7.2 Radioterapie	21
1.7.3 Chemoterapie	21
1.7.4 Hormonální terapie	22
1.7.5 Biologická léčba	22
2. BRCA geny.....	24
2.1 BRCA 1	24
2.2 BRCA 2	24
2.3 Mutace	25
2.4 Incidence.....	25
2.5 Testování BRCA	25
2.6 Laboratorní vyšetření.....	26
2.6.1 PCR – Polymerázová Řetězová Reakce	27
2.6.1.1 Speciální PCR – Multiplex Bisulfite PCR-LDR-qPCR test	28
2.6.2 High Resolution Melting	29
2.6.3 Přímé sekvenování	30
2.6.4 MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	31
2.7 Léčba	31
2.7.1 Inhibitory PARP	32
2.7.2 Chemoterapie	32
2.7.3 Chirurgický zákrok	33

2.8	Prevence	33
3.	Epigenetické markery	35
3.1	Epigenetika	35
3.2	miRNA	35
3.2.1	Identifikace miRNA.....	35
3.2.2	Nekódující RNA	36
3.3	Metylace DNA.....	37
3.3.1	Základní funkce	38
3.3.2	Laboratorní vyšetření.....	39
3.4	Modifikace histonů	40
3.5	Spojitost s rakovinou prsu	41
3.5.1	miRNA.....	41
3.5.2	Metylace DNA.....	42
	ZÁVĚR	43
	POUŽITÁ LITERATURA	45

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Průřez ženského prsu	15
Obrázek 2 – Vývoj četnosti incidence nádorů prsu a mortality na rakovinu prsu v populaci českých žen	16
Obrázek 3 – Mamografické snímky zdravého prsu a prsu se zhoubným nádorem.....	19
Obrázek 4 – Znázornění vazby trastuzumabu na HER-2 receptor	23
Obrázek 5 – Lokalizace BRCA genů na chromozomech	25
Obrázek 6 – Obecné schéma heteroduplexní analýzy	26
Obrázek 7 – Ošetření genomové DNA bisulfitem sodným.....	29
Obrázek 8 – Porovnání křivky tání zdravého DNA a zmutovaného DNA	30
Obrázek 9 – Uspořádání metody MLPA	31
Obrázek 10 – Struktura taxanu	33
Obrázek 11 – Struktura miRNA	35
Obrázek 12 – Mechanismus účinku molekul siRNA	37
Obrázek 13 – Mechanismus metylace DNA	38
Obrázek 14 – Genová exprese miRNA ovlivněna metylací.....	38
Obrázek 15 – Schématický náčrt metylace a acetylace histonu.....	40
Obrázek 16 – Molekulární mechanismus dysregulace miRNA během rakoviny	41
Obrázek 17 – Hypermetylace a hypometylace u rakoviny prsu.....	42

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

5mC – 5-methylcytosine

Acetyl-CoA – acetylkoenzym A

ADP – adenosindifosfát

BP – počet bází v genomu

BRCA – BReast CAncer

CA – karcinom antigen

cDNA – komplementární DNA

CE – kapilární elektroforéza

CEA – karcino-embryonální antigen

CpG – cytosin-guanin marker

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HA – heteroduplexní analýza

HER-2 – humánní epidermální receptor 2

HRM – High Resolution Melting, vysokorozlišovací analýza křivek tání

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

MBD – Methyl-CpG-vazebná doména

miRNA – microRNA

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, multiplexní amplifikace závislá na ligaci práb

mRNA – messengerová RNA

MSRE – Restrikční enzymy citlivé na metylaci

NGS – sekvenování nové generace

PARP – poly (ADP-ribóza) polymeráza

PCR – polymerázová řetězová reakce

piRNA – PIWI RNA

PTT – Protein Truncation Test, proteinový zkrácený test

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

siRNA – small-interfering RNA

SNP – jednonukleotidové polymorfismy

TERMINOLOGIE

Aberantní: odchylný

Adjuvantní léčba: zajišťovací léčba prováděná po základní léčebné metodě

Alela: konkrétní forma genu

Amplifikace: postup, při kterém vzniká množství kopií genetického materiálu (DNA, RNA)

Amplikon: část DNA nebo RNA, která je zdrojem/produktem amplifikace nebo replikace

Angiogeneze: proces tvorby krevních kapilár

Apoptóza: programovaná buněčná smrt k eliminaci nepotřebných nebo poškozených buněk

Areola: pigmentovaný dvorec kolem prsní bradavky

Biopsie: odběr vzorku tkáně z živého organismu k morfoloickému vyšetření

Cytostatika: léky užívané k léčbě zhoubných nádorů

Delece: druh chromozomové mutace, při níž chybí část chromozomu včetně příslušných genů na ní uložených

Denaturace: změna prostorového uspořádání molekuly, při níž dochází ke ztrátě jeho biologických funkcí

Disociace: oddělení se

DNA polymeráza: enzym, který katalyzuje polymeraci DNA

Duplikace: zdvojení genu

Dysregulace: porušená funkce regulace

Enzym: organická molekula urychlující reakce v organismech

Epigenetika: cesta přenosu dědičné informace

Exon: úsek genu, který kóduje určitou část funkční RNA

Exprese genu: vyjádření informace obsažené v genu

Fenotyp: soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků živého organismu

Fluorescence: jedná se o sekundární záření, které je charakterizováno vyzářením energie ve velmi krátké době

Gen: základní molekula dědičnosti

Genotypování: stanovení genotypu jedince

Homeostáza: udržování stálosti vnitřního prostředí organismu

Integrita: neporušenost

Interkalace: vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA

Karcinom: zhoubný nádor vznikající z epitelu

Komplementarita: schopnost se doplnit (specifické párování bází)

Kvadrantektomie: chirurgické odstranění čtvrtiny prsu

Lumpektomie: chirurgické odstranění nádorového ložiska s dodatečným lemlem zdravé tkáně

Mastektomie: chirurgické odstranění celého prsu

Melting: proces tání

Metastáza: druhotné nádorové ložisko, kdy se nádorové buňky oddělily od mateřského ložiska

Mutace: změna v molekule DNA

Neoadjuvantní léčba: léčba prováděná před plánovaným základním léčebným zákrokem

Noduly: uzlíky

Nonsense mutace: jednobodová substituční mutace, kdy vzniká z jiného kodonu kodon terminační

Nukleová báze: základní součást nukleových kyselin

Oligonukleotid: dva a více nukleotidů spojených specifickou chemickou vazbou

Paliativní léčba: léčba, jejímž cílem je komplexně zlepšit kvalitu života nemocného

Primer: řetězec nukleové kyseliny dlouhý několik aminokyselin, který slouží jako počáteční místo replikace DNA či RNA

Proliferace: chorobný růst tkáně, bujení

Protoonkogen: geny, které jsou odpovědné za proliferaci buněk

Recidiva: opětovné známky onemocnění, která již nebyla po léčbě prokazatelná

Sekvenování: určení sekvence nukleotidů dané molekuly DNA

Subfebrilie: zvýšená tělesná teplota na 37 až 38 °C

Terminátor: část sekvence nukleové kyseliny, která během transkripce označuje konec genu

Transkripce: přepis genetické informace z DNA do molekuly RNA

Translace: překlad nukleotidové sekvence mRNA do sekvence aminokyselin proteinu

Tumorigeneze: vznik nádoru

ÚVOD

Rakovina prsu patří mezi nejčastěji diagnostikovaná onkologická onemocnění u žen v České republice, ve výjimečných případech i u mužů. Většina karcinomů je odhalena až v pokročilém stádiu, kdy se zhoršuje průběh léčby a účinnost vyléčení se snižuje.

Toto onemocnění je podmíněno především genetickými faktory jako jsou přímé sekvenční změny (mutace), ale i změny epigenetické (metylace DNA) a v neposlední řadě se do tohoto procesu zařazuje i miRNA, která mění míru exprese genů.

V této práci bych ráda poukázala na spojitost mezi rakovinou prsu, BRCA geny a ovlivněním jejich exprese.

1 Rakovina prsu

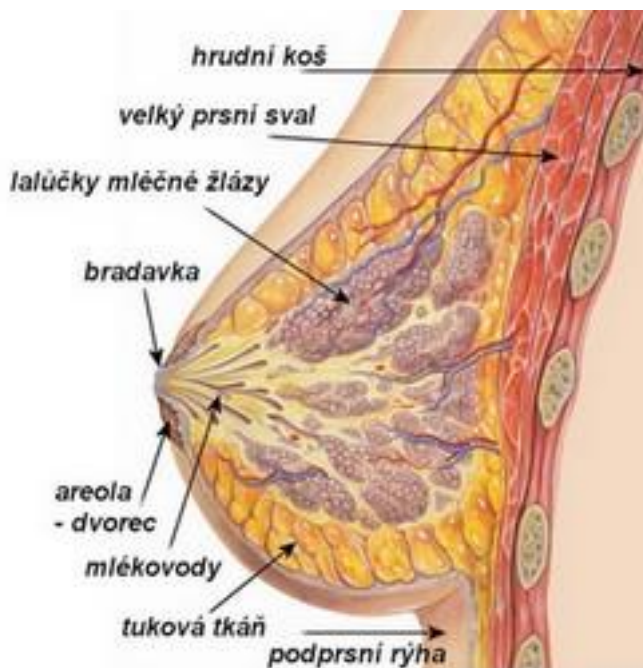
Karcinom prsu je celosvětově nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním u žen. Čím vyšší je incidence choroby a čím nižší je věk ženy, tím jsou důsledky onemocnění závažnější. Rakovina prsu však nepatří mezi moderní civilizační choroby. Jde o onemocnění s dlouhou historií, která sahá do počátku lidských dějin (Vorlíček, 2012).

1.1 Anatomie prsu a mléčné žlázy

Vlastní prs (mamma) je tvořen kožním krytem, tukovým vazivem a mléčnou žlázou. Na vrcholu prsu je silněji pigmentovaný dvorec (areola mammae), uprostřed kterého se klene prsní bradavka (papilla mammae). U bradavky je přítomná hladká svalovina, díky které se může napřímit. Prs je ke kůži fixován vazivovými pruhy, které se nachází v celé tloušťce prsu. Ke svalům je přichycen pevnou povázkou (Naňka, 2015; Merkunová, 2008; Horák, 2000).

Prs dospělé ženy se rozkládá od 2. po 6. žebro. Velikost je individuální a během života se mění, závisí na stavu organismu ženy, rase, výživě apod. Žláza je tuboalveolárního typu a skládá se z 15-20 laloků, ze kterých vychází mléčné vývody tzv. mlékovody.

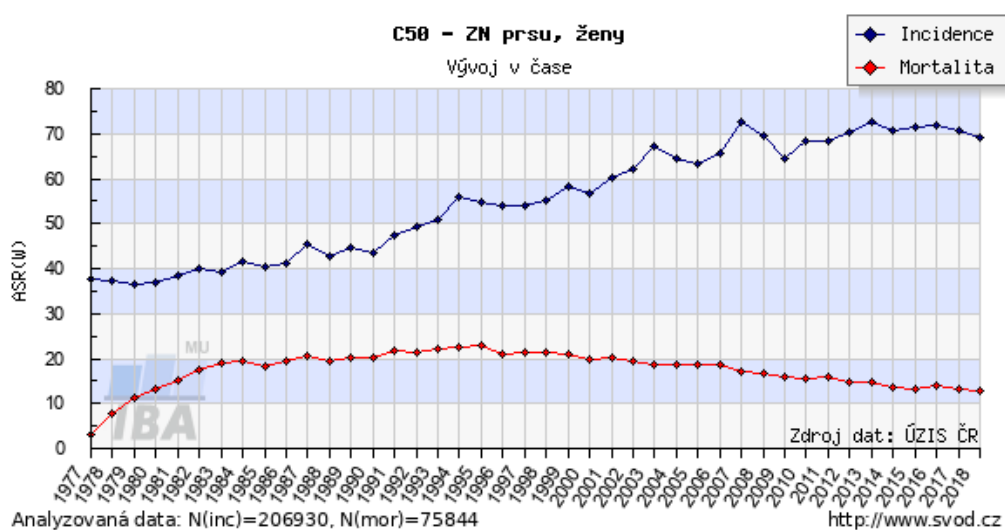
Znalost lymfatické drenáže prsu je klinicky velmi důležitá právě kvůli karcinomu prsu. Mízní systém začíná jako pletěň v oblasti dvorce a lymfa odtéká do axilárních uzlin (Naňka, 2015).



Obrázek 1 – Průřez ženského prsu
(převzato z: <https://lanotte.cz/blog/anatomie-nader-a-podprsenkova-biomechanika>)

1.2 Epidemiologie

Karcinom prsu je nejčtenějším zhoubným nádorem žen. Četnost výskytu se ve světě zvyšuje o 1–2 % ročně. Česká republika v porovnání s ostatními zeměmi světa zaujímá 34. místo a v porovnání s evropskými zeměmi 22. místo. V letech 2012–2016 byl průměrný roční nárůst nově diagnostikovaných karcinomů prsu 7150, což představuje 133,5 karcinomu na 100 tisíc žen. Četnost karcinomů prsu stoupá po 35. roku věku a největší nárůst nově diagnostikovaných karcinomů je ve věku od 20 do 49 let. V České republice v letech 2012–2016 ročně zemřelo průměrně 1649 žen (Abrahámová, 2019).



Obrázek 2 – Vývoj četnosti incidence nádorů prsu a mortality na rakovinu prsu v populaci českých žen (převzato z: <https://svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>)

1.3 Etiologie a rizikové faktory

1.3.1 Příčina vzniku karcinomu prsu

U rakoviny prsu nebyla doposud objasněna příčina vzniku. I přes intenzivní výzkum nejsme stále schopni říci, které ženy budou zhoubným nádorem prsu ohroženy a u kterých žen je obava zbytečná. Navzdory provedené epidemiologické studie jsou odhady rizika vzniku karcinomu prsu pouze pravděpodobností. Nejvýznamnější cestou k pochopení příčiny tohoto onemocnění je studium rizikových faktorů a pochopení skutečné úlohy jednotlivých rizikových faktorů (Abrahámová, 2003).

1.3.2 Rizikové faktory a význam jejich sledování

Jako rizikové faktory pro vznik rakoviny prsu rozumíme údaje ze života ženy, které zvyšují nebo snižují pravděpodobnost rozvoje onemocnění. Prostřednictvím vhodné prevence a úspěšné léčby může být dosaženo snížením počtu žen, které onemocní karcinomem prsu.

Studium rizikových faktorů umožňuje zformulovat obecné zásady prevence a dále nám vymezit skupiny žen, které mají zvýšené riziko na vznik, a tím pádem se snižuje úmrtnost na rakovinu prsu (Abrahámová, 2019).

1.3.3 Faktory životního stylu

Alkohol je trvale spojen s rizikem vzniku karcinomu prsu. Mechanismus účinku alkoholu je dán prostřednictvím ovlivnění hladiny estrogenů, narušením integrity buněčných membrán a inhibicí reparačních změn v DNA (Protheroe, 1999; Liu, 2015; Abrahámová, 2019).

Stravovací návyky. Množství a složení přijímané potravy úzce souvisí s rizikem vzniku karcinomu prsu. Mezi potraviny, které potenciálně zvyšují tvorbu karcinomu patří červené maso, zpracované maso a mléko (Kazemi, 2021).

Množství tělesného tuku, jeho rozložení v organismu a věk v době nadváhy ovlivňují metabolismus estrogenů. Tím se zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu (Engin, 2017).

Fyzická aktivita představuje vztah ke sníženému riziku vzniku karcinomu prsu. Zvýšená fyzická námaha inhibuje produkci steroidních hormonů ve vaječnících a snižuje hladinu krevního inzulinu (Ueji, 1998; Friedenreich, 2010).

1.3.4 Faktory osobní anamnézy

Věk je hlavní rizikový faktor vzniku karcinomu prsu. Riziko vzniku karcinomu s věkem narůstá nejvíce od 50 let věku (Gail, 1989).

Rasa patří také mezi rizikové faktory vzniku karcinomu prsu. Riziko vývoje onemocnění se u jednotlivých etnických skupin liší. U bělošské populace je prokázané riziko vyšší než u populace černošské a Asiatické (Abrahámová, 2003).

1.3.5 Hormonální a gynekologické faktory

První menstruace (menarché), která nastane ve dřívějším věku, patří k opakovaně potvrzovaným významným rizikovým faktorům vzniku karcinomu prsu (Khalis, 2018).

Menopauza a její vyšší věk zvyšuje riziko vývoje onemocnění. Menopauza ovlivňuje délku expozice organismu estrogenů, proto se považuje za rizikový faktor vzniku karcinomu prsu. Určení věku menopauzy je významné pro spolupůsobení s jinými faktory, jako je obezita či hormonální terapie (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012).

Věk při prvním porodu výrazně zvyšuje riziko karcinomu prsu u bezdětných žen a žen s prvním porodem po 35. roce věku. Klíčovým mediátorem zvýšeného rizika metastáz je poporodní involuce prsu (Borges, 2020).

Počet porodů je nezávislý na věku ženy při prvním porodu. U ženy s vyšším počtem dětí lze pozorovat snížení rizika vzniku karcinomu prsu, a to v důsledku kratšího životního období pod vlivem estrogenů (Abrahámová, 2019).

Hormonální léčba přímo ovlivňuje metabolismus steroidních hormonů v organismu. Obecně je možné říct, že u žen užívající hormonální přípravky existuje zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu. Důležitý je však věk při jejich užívání a délka období užívání. Řada studií prokázala zvýšené riziko u žen, které používaly hormonální antikoncepci, a to do 10 let od ukončení užívání antikoncepce (Gompel, 2019).

1.3.6 Genetické faktory

Poměrně často se u žen s karcinomem prsu prokazuje výskyt zhoubných nádorů v rodině. Tento výskyt by měl být důvodem genetického vyšetření a pouze u části rodin se podaří prokázat dědičnou dispozici. Při negativním výsledku neztrácejí informace o familiárním výskytu na důležitosti. Tyto nádory jsou důvodem k zahájení prevence v mladším věku. Pokud není mutace prokázána u známého genu, může jít o mutaci neznámých genů.

Riziko vzniku karcinomu prsu se zvětšuje u žen, u kterých pokrevní příbuzní onemocněli touto nemocí. Pokud se vyskytne karcinom prsu u matky, sestry nebo dcery, je riziko skoro dvojnásobné než u ostatní populace (Abrahámová, 2019).

1.4 Prevence

1.4.1 Samovyšetřování

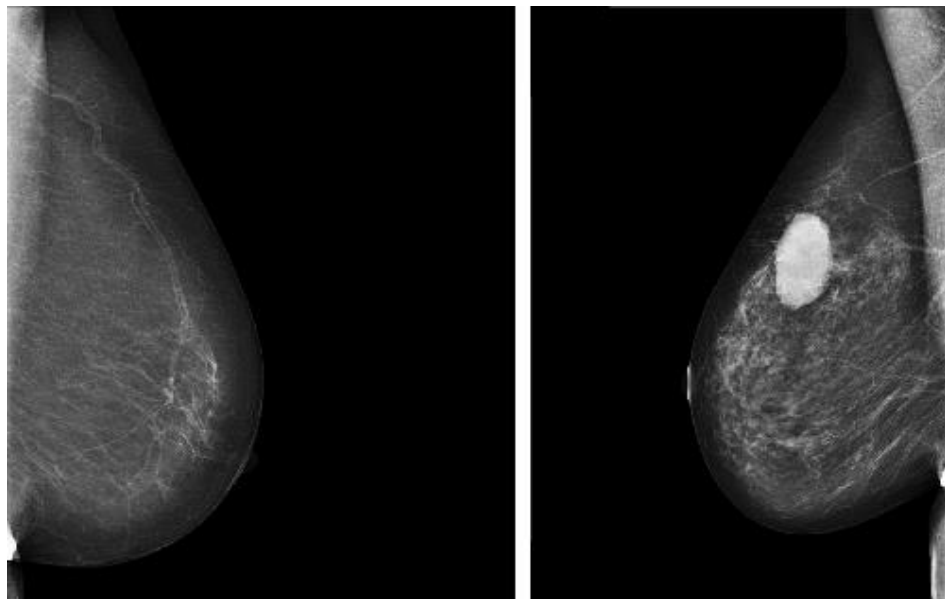
Samovyšetřování patří mezi nejjednodušší metody včasného zachytu rakoviny prsu. Toto vyšetření si žena provádí sama každý měsíc. Nejlepším obdobím pro samovyšetřování je druhý nebo třetí den po skončení menstruace, protože prsy jsou bez jakéhokoli napětí. Spoustu žen toto vyšetření neumí a správně ho provádí pouze hrstka, lze však říci, že ženy, které samovyšetřování umí, přicházejí k lékaři s menšími nádory (Abrahámová, 2019).

1.4.2 Screening

Mamografie je nejefektivnější metodou včasného zachytu nádoru prsu. Jde o základní diagnostickou a screeningovou metodu vyšetření prsu, kdy k tomuto vyšetření slouží

mamograf, který pracuje na principu rentgenového zobrazení. Při této metodě je možné zachytit rakovinu prsu dřív, než je bulka nahmatatelná, tím se zlepšují podmínky pro léčbu a vyléčení je pravděpodobnější.

Po provedených studiích se ukazuje, že absolutní efekt screeningu je menší než se čekalo. Screening vede k tomu, že u některých žen bude diagnostikována rakovina, i když by jejich nádor nevedl k nemoci nebo smrti. Tyto ženy poté podstupují léčbu zbytečně a mohlo by dojít k psychickým potížím (úzkosti a nejistota) (Gøtzsche, 2013).



Obrázek 3 – Mamografické snímky zdravého prsu a prsu se zhoubným nádorem
(převzato z: <https://www.vitalia.cz/galerie/mamma-centrum-zeleny-pruh/>)

1.5 Klinické projevy

Symptomy karcinomu prsu můžeme rozdělit na celkové a lokální. Celkové příznaky bývají nespecifické a můžeme sem zařadit subfebrilii, únavu, bolest páteře. Nejčastěji se vyskytujícím projevem karcinomu prsu je nebolestné zduření nebo rezistence s nepravidelnými okraji kdekoliv v prsu. Dále se může jednat o změny na bradavkách, jako jsou jejich deformity nebo vtažení, krvácení nebo sekrece z mlékovodu. Také se může vyskytnout změna barvy kůže jako zarudnutí, vtahování kůže vzhledem připomínající pomerančovou kůru, důlkovitění a otok. Na nádorové onemocnění také upozorní rezistence v axile nebo v nadklíčku (Chovanec, 2008).

Mezi příznaky pokročilé choroby patří zjištění metastáz do jiných orgánových systémů, např. do kostí, jater a mozku. K tomuto metastazování dochází ve 20–40 %, protože se v jizvách po operaci vyskytují satelitní podkožní noduly, které se označují jako

metastatické lentikuly. Příznaky vzdálené metastáze jsou bolest určité oblasti, dušnost a kašel a neurologické příznaky, např. závratě a bolesti hlavy (Soumarová, 2019).

1.6 Diagnostika

Základem pro diagnózu karcinomu prsu je podrobná rodinná i osobní anamnéza. Nejjednodušší metodou záchytu karcinomu je samovyšetření prsu, které si žena provádí sama. Mezi nejefektivnější metody včasné detekce patří mamografie, kdy lze detekovat mikrokalcifikace, které mohou být prvním příznakem této nemoci (Chovanec, 2008).

Kompletní krevní obraz dokáže informovat lékaře o odchylkách, které mohou ovlivnit léčebný postup. Při biochemickém vyšetření séra lze posoudit činnost ledvin a jater. Tato stanovení mohou být doplněna stanovením nádorových markerů CEA (karcinomembryonální antigen) a CA 15–3 , které ale nemohou jednoznačně potvrdit ani vyloučit přítomnost nádorových buněk (Abrahámová, 2019).

Základní metodou pro zobrazení prsu u mladých žen je ultrasonografie neboli ultrazvukové vyšetření. Toto vyšetření nepřináší nežádoucí účinky, a proto může být využíváno opakovaně a bez omezení. Vyšetření prsu se provádí v celém rozsahu prsu a lymfatických uzlin. Hlavní pozornost se však upíná na nalezené ložisko. Většinou se jedná o nález cysty, které mají typický vzhled a nejsou indikací k výraznějšímu sledování. Při růstové aktivitě ložiska je vždy důvod k bioptickému vyšetření. Maligní nádory při sonografii mají typický vzhled nepravidelného, nehomogenního ložiska s neostrým ohraničením a dorsálním stínováním (Steyerová, 2019).

Prs lze vyšetřit i za pomoci magnetické rezonance pro odhalení multifokálního postižení. Pomocí počítačové tomografie, lze hodnotit vztah nádoru k okolí. Také lze použít pozitronová emisní tomografie, kdy můžeme odlišit nenádorový původ rezistence od nádorového (Prausová, 2010).

1.6.1 Histopatologické vyšetření

Pokud lékař začne mít podezření na zhoubný nádor, musí se provést histologické vyšetření podezřelé tkáně. Toto vyšetření se provádí pomocí biopsie, což je napíchnutí ložiska jehlou. Pokud se jedná o cystu, je potřeba vyšetřit obsah cysty. Získaný tkáňový materiál vyšetřuje po zpracování patolog pod mikroskopem, kdy se určí typ nádoru (Abrahámová, 2019).

1.7 Léčba

Terapie karcinomu prsu je individuální s ohledem na pacientku její onemocnění. Nejčastěji se kombinují lokoregionální metody (chirurgie a radioterapie) a systémové metody (chemoterapie, hormonální terapie, biologická léčba). Nepostradatelnou součástí léčby je podpůrná terapie, která ovlivňuje symptomy a nálezy způsobené onemocněním. Stanovení postupu terapie probíhá pomocí multidisciplinárního týmu, který se intenzivně zabývá problematikou karcinomu prsu. Při posuzování terapie zohledňujeme dva základní aspekty, které formulují a modifikují návrh terapie. Prvním aspektem je pacientka, její věk, celkový stav, výskyt jiného onemocnění, předchozí a současná terapie. Druhým aspektem je nádor, jeho rozsah, histopatologický nález a z něj vyplývající prognostické a prediktivní faktory (Soumarová, 2019).

1.7.1 Chirurgická léčba

Při chirurgické léčbě je cílem operace odstranit nádor a minimalizovat riziko návratu rakoviny. Operace v axile dokáže určit stadium onemocnění a prognózu (Čmejlová, 2020).

V současné době se provádí modifikovaná radikální mastektomie dle Pateyho. U této metody se odstraní a histopatologicky vyšetří aspoň 10 uzlin. V posledních letech se zavedla záchovná, prs šetřící operace. Mezi tuto metodu patří kvadrantektomie, u které se odstraní příslušný kvadrant s nádorem. Dále pak lumpektomie, u které se odstraní nádor s minimálně jednocentimetrovým okrajem zdravé tkáně. Pro indikaci tohoto výkonu je nutná společná konzultace mezi chirurgem a onkologem (Prausová, 2010).

1.7.2 Radioterapie

Radioterapie využívá vysokoenergetické záření, jehož zdrojem jsou izotopové ozařovače nebo lineární urychlovače. Radioterapie lze rozdělit na zevní a intersticiální. U intersticiální radioterapie jsou zářiče implantovány po určitou dobu přímo do nádoru. Tato metoda se provádí pooperačně při konzervativních chirurgických výkonech, kdy se ozařuje zbytek prsní žlázy nebo jizva po odnětí prsu. Cílem radioterapie je snížení rizika vzniku lokoregionálních recidiv, podílet se na zmenšení nádoru nebo tlumit obtíže, které se vyskytují z důvodu přítomnosti metastáz (Chovanec, 2008).

1.7.3 Chemoterapie

Chemoterapie je systémová léčba cytostatiky, které zasahují do množení nádorových buněk a tím je ničí. Cytostatika se přenáší krví a působí v celém organismu. Nejčastěji se podávají ve formě injekcí nebo infuzí do žíly. Tato metoda zasahuje všechny buňky těla a tím

pádem se objevuje spousta nežádoucích účinků. Mezi nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky chemoterapie patří: pocit nevolnosti až zvracení, nechutenství, ztráta vlasů, vynechání až úplné vynechávání menstruace, defekty na sliznici ústní dutiny, slabost a pokles bílých krvinek (Petráková, 2006).

Existují tři základní indikační skupiny chemoterapie v systémové léčbě karcinomu prsu: adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní. Adjuvantní chemoterapie se aplikuje po chirurgickém odstranění nádoru. Cílem této metody je likvidovat zbytkovou populaci nádorových buněk – mikrometastázy, prodloužení beznádorového intervalu a celkové doby přežití. Adjuvantní chemoterapie by měla být zahájena do tří týdnů od chirurgického výkonu. Neoadjuvantní chemoterapie je podání cytostatik před chirurgickým výkonem. Tato metoda je indikována pro ženy s pokročilým, ale technicky operabilním primárním nádorem, nebo u žen s velkým primárním nádorem omezené operability. Cílem této léčby je zmenšení primárního nádoru, a tím zlepšení operability. Paliativní chemoterapie se používá u čtvrtého stádia karcinomu prsu. Cílem je pouze ústup projevů nemoci, usnadnění a prodloužení života s chorobou (Chovanec, 2008).

1.7.4 Hormonální terapie

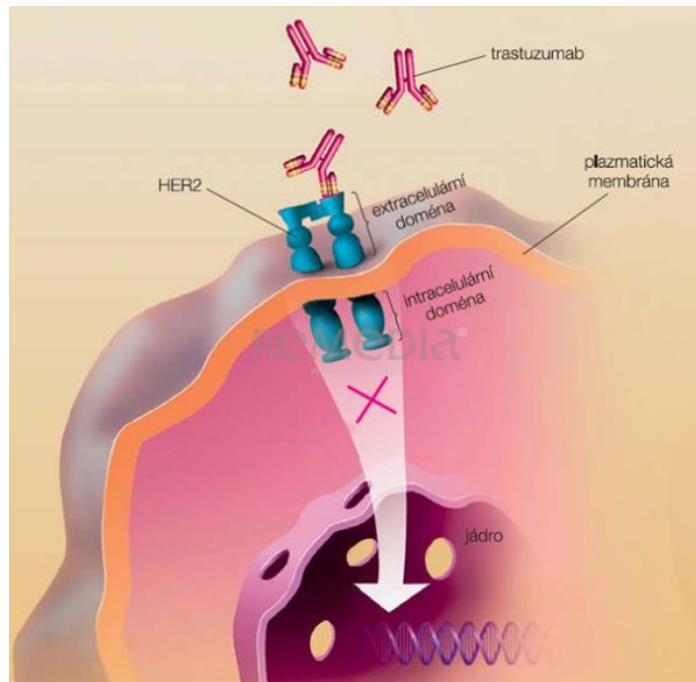
Hormonální léčba spolu s chemoterapií patří mezi systémovou léčbu. Základem pro efektivní léčbu je přítomnost hormonálních estrogenových a progesteronových receptorů na povrchu nádorových buněk. Účinkem estrogenů přes komplexy těchto receptorů dochází k transformaci a proliferaci nádorových buněk. Hormonální léčba se indikuje v adjuvantní léčbě, v léčbě pokročilého nebo metastazujícího onemocnění. Základním lékem je antiestrogen tamoxifen. Tento lék působí kompetitivním mechanismem na receptorech buněk. Pokud tamoxifen selže nebo se projeví intolerance, přechází se na léčbu inhibitory aromatáz. Z dalších hormonálních preparátů se používá čistý antiestrogen fulvestrant s vyšší protinádorovou účinností a s minimem nežádoucích vedlejších účinků (Soumarová, 2019).

1.7.5 Biologická léčba

Biologická léčba znamená podání látek, které ovlivňují řetězce dějů receptorů potřebných pro přežívání, množení a růst buněk. Biologické léky se vyskytují ve dvou hlavních formách. První forma je zaměřena na protilátky proti receptorům na povrchu buněk a druhá forma se zabývá malými molekulami, které jsou zaměřené proti nitrobuněčným komponentům řetězce nezbytných dějových drah. Protilátky se podávají nitrožilně a malé

molekuly se podávají ve formě tablet. V současnosti se používají léky s účinnou látkou trastuzumab, bevacizumab a lapatinib.

Trastuzumab je protilátkou proti receptoru HER-2, která po navázání na receptor blokuje veškeré děje zprostředkované HER-2 receptorem a výsledkem je smrt buňky. Trastuzumab se využívá pouze při zvýšeném obsahu HER-2 na buňkách.



Obrázek 4 – Znázornění vazby trastuzumabu na HER-2 receptor
(převzato z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Trastuzumab/6-I-Q1.magarticle.aspx>)

Bevacizumab je protilátka proti cévnímu růstovému faktoru. Tato látka zabraňuje novotvorbě cév vyživující nádor, a tím se nádor usmrtí. Účinkuje v kombinaci s cytostatiky a u pokročilého karcinomu.

Lapatinib se váže na nitrobuněčné části receptoru HER-2 a dalších receptorů. Tento lék způsobí zastavení růstu nádoru a jeho následnou smrt (Abrahámová, 2019).

2 BRCA geny

V roce 1994 a 1995 byly objeveny tumor supresorové geny BRCA 1 a BRCA 2. Mutace v genech BRCA (BRCAst CAncer) mnohonásobně zvyšují celoživotní rizika onemocnění karcinomem prsu a vaječnicků. Záradečné mutace těchto genů jsou zodpovědné za 20 % všech familiárních forem nádorů prsu (Foretová, 2016).

BRCA geny patří mezi tumor supresorové geny, které pomocí homologní rekombinace zajišťují opravu dvojitých zlomů DNA. Existují dva druhy těchto genů, a to BRCA 1 a BRCA 2. Produkty BRCA genů jsou jaderné proteiny, které se maximálně vylučují v G2 a S fázi. Proteiny BRCA genů se zapojují do řady pochodů při udržování genomové integrity, regulace transkripce, regulací buněčného cyklu a významně interagují s proteinem p53 (Zimovjanová, 2013).

2.1 BRCA 1

Gen BRCA 1 je tumor supresorový gen, který spoluzodpovídá za udržování genomové stability. Účastní se regulace transkripce, a může se přímo podílet na řízení buněčného cyklu a proliferace. Mutace tohoto genu zaujímají téměř polovinu všech mutací zachycených v BRCA genech (Zikán, 2005).

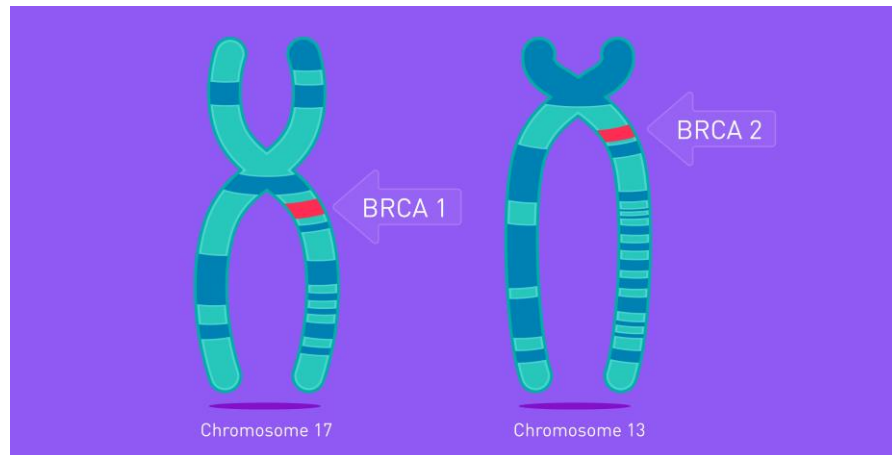
Tento gen je lokalizován na chromozomu 17q21, má 24 exonů a kóduje protein o 1863 aminokyselinách. Přítomnost genu BRCA 1 zodpovídá za predispozici ke vzniku karcinomu prsu, karcinomu vaječnicků, kolorektálního karcinomu a karcinomu prostaty (Abrahámová, 2003).

Mutace v tomto genu jsou považovány za příčinu až 30 % dědičných forem nádoru prsu. Nejčastějšími mutacemi jsou 185delAG a 5382insC, které se vyskytují častěji v populaci Aškenázi (Passarge, 2019).

2.2 BRCA 2

Gen BRCA 2 má podobnou funkci jako BRCA 1. Nachází se na chromozomu 13q12-13, má 27 exonů a kóduje protein o 3418 aminokyselinách. Při přítomnosti tohoto genu je riziko vzniku karcinomu prsu, vaječnicků, žlučníku a žlučových cest, slinivky břišní a žaludku. Podíl genu BRCA 2 na dědičných případech nádoru prsu je 32 % (Abrahámová, 2003).

BRCA 2 pozitivní karcinomy prsu jsou ojediněle nezralé, s expresí estrogenových a progesteronových receptorů. Tyto exprese se fenotypově podobají karcinomům bez průkazu mutace v genech BRCA 1 nebo BRCA 2 (Puchmajerová, 2018).



Obrázek 5 – Lokalizace BRCA genů na chromozomech
(převzato z: <https://atlasbiomed.com/blog/brca-gene-mutations/>)

2.3 Mutace

Jako klíčovým mechanismem k zahájení procesu nádorové transformace buňky se považuje defektní reparace DNA. Příčinou predispozice ke zhoubnému nádorovému onemocnění je přenos zárodečné mutace BRCA genu inaktivující jednu z alel odpovědného genu. V cílové tkáni vede následná genetická změna (ztráta druhé alely) k inaktivaci genu, která spouští tumorigenezi. U nosiček mutace je riziko onemocnění karcinomem prsu až 85 %. Některé mutace se v určitých populacích vyskytují opakovaně a tvoří velkou část všech mutací v genu BRCA 1 nebo BRCA 2. Příkladem může být populace Aškenazyů, u kterých je více než jedno procento žen nosičkami populačně specifických mutací v genu BRCA 1 nebo BRCA 2. Pro Českou republiku jsou populačně specifické tři mutace genu BRCA 1, které zaujímají téměř polovinu všech mutací zachycených v BRCA genech (Zikán, 2005).

2.4 Incidence

Mutace v genech BRCA 1 a BRCA 2 se nejčastěji spojují s dědičnými karcinomy prsu a vaječníků. Celoživotní riziko rakoviny prsu u nositelek mutace je 45–80 % (Paul, 2014).

Přibližně 5–10 % rakoviny prsu se vyskytuje z důvodu zděděné genové mutace, která pacientce zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu. Dvě třetiny těchto dědičných rakovin se vyskytuje, kvůli mutaci BRCA 1 nebo BRCA 2. Zbývající třetina je způsobena rizikovými faktory pro vznik rakoviny prsu (Carrol, 2008).

2.5 Testování BRCA

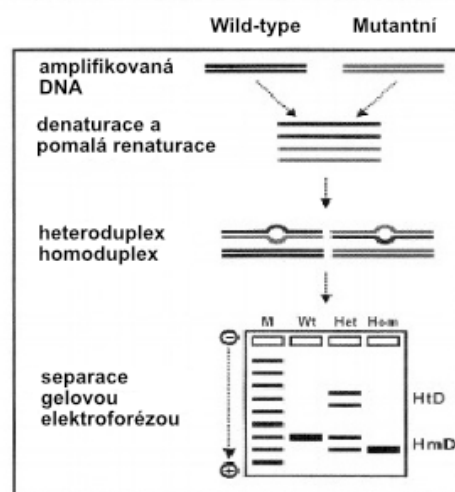
Doporučení ke genetickému testování nebo poradenství by mělo být doporučeno pacientům, u kterých se v rodině vyskytuje více případů rakoviny prsu nebo vaječníků,

rodinný příslušník s rakovinou prsu před dosažením 35 let, rodinný příslušník s rakovinou prsu a vaječníků, rodinný příslušník s primární rakovinou v obou prsech nebo člen rodiny s identifikovanou mutací BRCA 1 nebo BRCA 2. Testování mutací genů BRCA 1/2 zahrnuje krevní test z plné krve, který je dostupný v regionálních genetických centrech nebo některých onkologických centrech. Při pozitivním výsledku lze odhalit ohrožené rodinné příslušníky a lze doporučit klinický zákrok např. mastektomie snižující riziko rakoviny prsu, který může zlepšit výsledky pacienta. Negativní výsledek testu poskytuje ujištění o nevyskytující se mutaci pro jednotlivce a jejich děti. Testování se nenabízí, pokud nebyla v rodině identifikována mutace (Carrol, 2008).

2.6 Laboratorní vyšetření

Ke screeningovému vyšetření BRCA genů se využívá vertikální i horizontální elektroforetické metody, které vycházejí z PCR reakce. Výběr metody se odvíjí dle velikosti exonů. Pro exony o velikosti 200-500 bp se používá metoda heteroduplexní analýza a pro exony s větším počtem bp metoda PTT (Pavlů, 2011).

Při heteroduplexní analýze se detekuje hybridní dvoušroubovicová molekula DNA. Řetězce této molekuly pochází z různých rodičovských alel a vyznačují se neúplnou komplementaritou. Tato metoda je časově náročná a hodnotí se vizuálně, tudíž je potřeba velká zkušenost hodnotícího pracovníka (Pavlů, 2011).



Obrázek 6 – Obecné schéma heteroduplexní analýzy
(převzato z: https://www.wikiskripta.eu/w/Heteroduplexov%C3%A1_anal%C3%BDza)

Metoda PTT (Protein Truncation Test) je založena na transkripci a translaci in vitro, kdy mutace způsobuje předčasné zastavení translace. Detekují se pouze proteiny, proto lze

detekovat pouze delece, duplikace a nonsense mutace. Metoda je náročná na čas i na zkušenosti hodnotícího pracovníka, protože se také hodnotí vizuálně. Metoda heteroduplexní analýzy a metoda PTT se kvůli své limitované senzitivitě a časové náročnosti nahradily v roce 2007 metodou HRM – High Resolution Melting (Pavlů, 2011).

2.6.1 PCR – Polymerázová Řetězová Reakce

PCR je základem moderního molekulárního klonování. Pomocí PCR lze rychle a selektivně amplifikovat definovanou cílovou sekvenci, která se vyskytuje v DNA. Reakce je jednoduchá, levná (při základním provedení), dostupná. Při této reakci se požaduje znalost nukleotidových sekvencí. Používá se při sekvenování DNA, při detekci mutací, klonování cDNA a genomové DNA.

PCR reakce využívá teplotního cyklování k amplifikaci templátové DNA, kdy v každém kroku dochází ke zdvojnásobení počátečního množství DNA. V PCR reakci se klasicky střídají – denaturace, nasedání a extenze.

Denaturace templátové DNA se provádí za vysoké teploty (obvykle >90 °C) a z dvouvláknové DNA se stávají jednovláknové molekuly. Další částí je nasedání dvou syntetických oligonukleotidových primerů na denaturovanou templátovou DNA. Tyto primery jsou navrženy s využitím již existujících znalostí sekvence DNA templátu a jsou komplementární k sekvencím na opačných vláknech cílové DNA. Zároveň slouží jako počátky amplifikace DNA polymerázou. Jako poslední se provádí extenze, kdy se na 3' koncích navázaných primerů zahájí syntéza DNA. K prodloužení primerů dochází při teplotě okolo 72 °C v enzymatické reakci katalyzované termostabilní DNA polymerázou. Tento proces se opakuje asi 30krát v tepelném cyklovači (PCR cykléru). Cyklér je programovatelné zařízení, které řídí čas a udržuje teplotu každého kroku v cyklu (Green, 2018).

Real-Time PCR

Pro vyšetření jednobodových mutací, případně detekci rozhraní in/delů lze využít i metoda real-time PCR s vhodně navrženými (např. alelicky specifickými) primery. Tato metoda je vhodná pro detekci a screening jednotlivých SNP a drobných přestaveb, ale kapacitně nelze v jedné reakci vyšetřit více než 4 markery. Proto pro komplexnější vyšetření jsou vhodnější jiné metody.

Výhodou real-time PCR může být rychlost, kdy je reakce provedena v řádu hodin a může tedy sloužit jako podklad pro případné širší vyšetření (Matsuda, 2017).

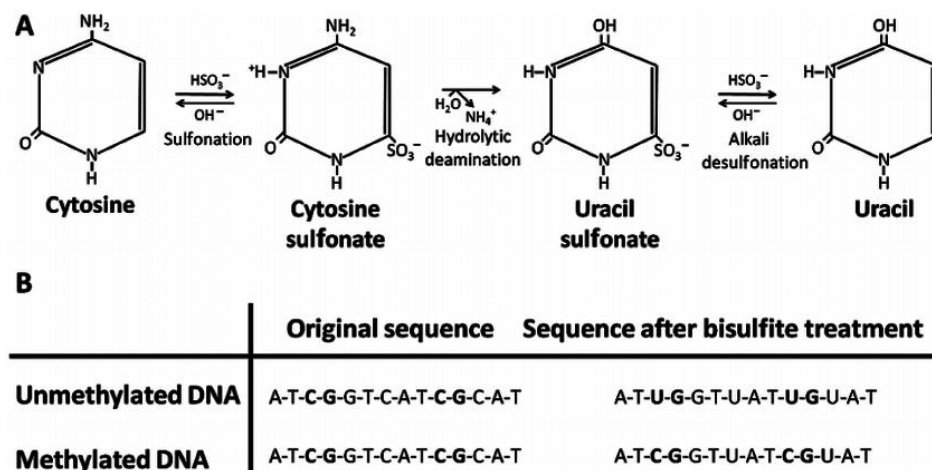
2.6.1.1 Speciální PCR – Multiplex Bisulfite PCR-LDR-qPCR test

Tento test je navržen pro detekci metylace CpG markerů, které jsou specifické pro rakovinu prsu, identifikované prostřednictvím integrovaných analýz veřejně dostupných metylačních datových souborů pro celý genom pro 31 typů primárních nádorů (včetně BRCA), jako i normální tkáně a periferní krev.

Test PCR-LDR-qPCR je schopen detekovat 30 methylových kopií každého ze 3 BRCA-specifických CpG markerů, pokud je smíchán s nadbytečným množstvím nemetylovaných CpG markerů. Bioinformaticky identifikované CpG markery se nacházejí v promotorech a v nekódující oblasti chromozomu 1. Studie zabývající se tímto testem se snaží zlepšovat krevní testy pro včasnou detekci BRCA genů, včetně charakterizace biomarkerů a bioinformatické identifikace. Testy byly prováděny pouze na simulovaných vzorcích cfDNA (volná cirkulující DNA) a v budoucích studiích se test vyhodnotí analýzou cgDNA odvozených od pacienta (Bacolod, 2020).

Bisulfite treatment

Při bisulfitové úpravě se DNA ošetří hydrogen síranem sodným (bisulfitem sodným) a všechny cytosinové zbytky se přemění na uracil kromě těch, které jsou v metylované formě. V této chemické reakci dochází k eliminaci nemetylovaného cytosinu v jednovláčkové DNA, což vede k odstranění komplementárního párování bází. Poté se tedy může při PCR s bisulfitovou přeměněnou DNA střídát thymin místo uracilu. Jedna sekvence se tedy analyzuje jako neopracovaná a druhá jako opracovaná, tím lze zjistit, který cytosin je nebo není metylován (Joz Abbasalian, 2021).



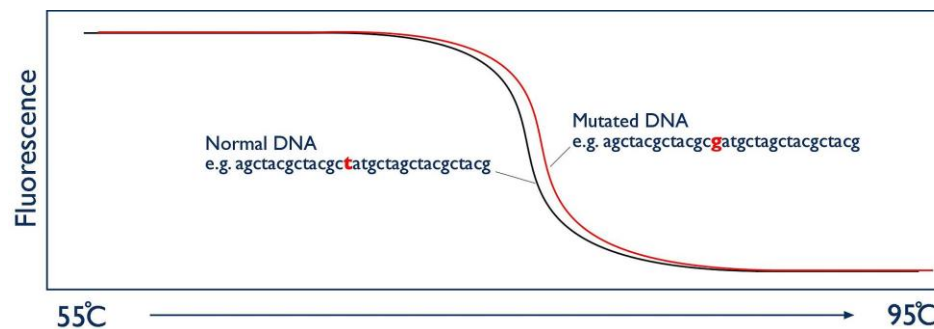
Obrázek 7 – Ošetření genomové DNA bisulfitem sodným
 (převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Sodium-bisulfite-treatment-of-genomic-DNA-A-The-procedure-is-based-on-the-chemical_fig1_26286840)

2.6.2 High Resolution Melting

Metoda HRM neboli vysokorozlišovací analýza křivek tání je rychlejší, jednodušší a levnější než metody popisované výše. Tato metoda se provádí po proběhnutí PCR (polymerázové řetězové reakci). Analýza HRM generuje profily křivky tání DNA, které jsou specifické pro rozlišení nukleových kyselin na základě malých sekvenčních změn, což umožní skenování mutací, analýzu metylace a genotypování.

HRM může být použita k detekci odhalení známých genetických mutací, například mutace BRCA genů. Principem této metody je disociační chování molekul DNA vystavené zvyšující se teplotě. V přítomnosti fluorescenčních barviv, která aktivně interkalují s dvouvláknovou DNA, přechází DNA z dvouvláknového na jednovláknové, a to vede k modifikaci signálu. Po proběhnutí reakci vznikne specifická křivka tání. HRM se využívá především pro detekce malých sekvenčních změn (především SNP) a vždy je nutné prvotní porovnání se standardem (zjištění křivek teploty tání daných sekvencí). HRM se může použít i jako doplňková metoda pro Real-Time PCR, kde se zvyšuje specifita a mohou se odhalit nesespecificky vzniklé produkty. HRM má tedy využití všude tam, kde vlivem změny sekvence DNA dochází ke změně teploty tání v porovnání se standardní sekvencí.

Hlavní aplikací analýzy HRM je skenování genů a tím určení diagnózy (Er, 2012).



Obrázek 8 – Porovnání křivky tání zdravého DNA a zmutovaného DNA
(převzato z: https://www.wikiwand.com/en/High_Resolution_Melt)

2.6.3 Přímé sekvenování

Sangerovo sekvenování

Metoda přímého sekvenování (Sangerovo sekvenování) slouží ke stanovení sekvence (pořadí jednotlivých bází) analyzovaného fragmentu. Používá se k charakterizaci pozice a typu mutací u genetických onemocnění. Fragменты s aberantní mobilitou, které se zachytí metodami HA, PTT a HRM, se v současné době sekvenují. V současné době jsou ovšem k dispozici přístroje zvládající i 96 vzorků v rámci jedné analýzy. Kapacita metody je tudíž především dána vybavením laboratoře a množstvím běžně sekvenovaných vzorků.

Při tomto sekvenování se do PCR produktů začleňují fluorescenční značky pomocí značených terminátorů. Analyzátor detekuje fluorescenci 4 fluorescenčních barev, které se používají k identifikaci bází adenin, cytosin, guanin a thymin (Pavlu, 2011).

Sekvenování nové generace

Od roku 2005 se začala komerčně využívat masivní paralelní sekvenování nebo totéž sekvenování nové generace (NGS). Nejedná se o jednu metodu, ale typově o několik heterogenních metod, které mají odlišný způsob sekvenování. To, co mají společné je obrovská kapacita metody, která se počítá v milionech bází na jednu analýzu. Tyto metody mají komplikovanější vyhodnocení získaných dat, které vyžadují bioinformatickou analýzu (Behjati, 2013).

NGS se využívá i pro sekvenování BRCA genů, protože tato metoda dokáže sekvenovat celé geny a odhalit jednotlivé mutace a poskytuje náhled na všechny změny v genech (Nicolussi, 2019).

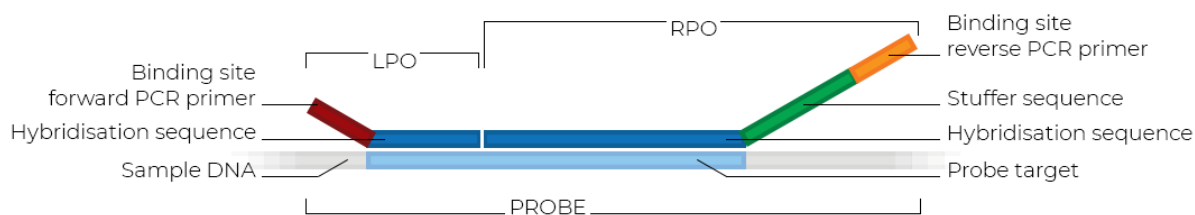
Metoda Sangerova sekvenování je považována za zlatý standard zjišťování sekvence. V současné době jí konkurují vysokokapacitní metody sekvenování nové generace, které

ovšem mají někdy nižší přesnost, proto i zde ve specifických případech dochází k doplňkovému resekvenování pomocí Sangerova sekvenování.

2.6.4 MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Multiplexní amplifikace sondy závislé na ligaci je multiplexní test k detekci variací počtu kopií sekvencí DNA. Při této metodě se používá sonda, která hybridizuje cílovou sekvenci v rámci exonu. Jedná se o dvě poloviční sondy, sonda 5' MLPA a 3' MLPA. V prvním kroku se cílová DNA denaturuje a MLPA sondy jsou hybridizovány na cílovou sekvenci. Obě sondy jsou ligovány do většího oligonukleotidu. Po ligaci se výsledná kompletní sonda amplifikuje pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery vázajícími se na univerzální místa kompletní sondy. Separace amplifikačních produktů se provádí pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí. Pomocí metody MLPA lze v jednom testu analyzovat více než 40 různých genomových sekvencí. Výsledkem MLPA je pík, který se porovnává s plochami píků referenčních vzorků a lze tak určit relativní množství každého amplikonu. Lze tedy určit změnu počtu kopií, například delecí dané cílové sekvence (Troxler, 2012).

MLPA se běžně používá v diagnostice k detekci velkých přestaveb genů BRCA 1 a BRCA 2. Test je rychlý, jednoduchý a nákladově efektivní. Omezením může být schopnost vyrovnání MLPA s genomovou nestabilitou, která může ovlivnit kontrolní sondy, a zároveň musí být tato metoda schopna detekovat přeuspořádání bází na nízké úrovni (Ellison, 2015).



Obrázek 9 – Uspořádání metody MLPA
(převzato z: <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique>)

2.7 Léčba

Většina dědičných nádorů prsu je způsobena mutacemi v genech BRCA 1 a BRCA 2. U nositelů mutace v genu BRCA 1 nebo BRCA 2 je účinných více strategií. Patří sem pravidelné sledování stavu pacientky, chemoprevence a mastektomie, která snižuje riziko onemocnění (Franceschini, 2019).

2.7.1 Inhibitory PARP

Poly(ADP-ribóza)polymerázy jsou příbuzné enzymy, které se podobají schopností katalyzovat přenos ADP-ribózy na cílové proteiny. PARP mají důležitou roli v různých buněčných procesech, například při formování struktury chromatinu, transkripci, replikaci, rekombinaci a opravě DNA (Bhattacharjee, 2022).

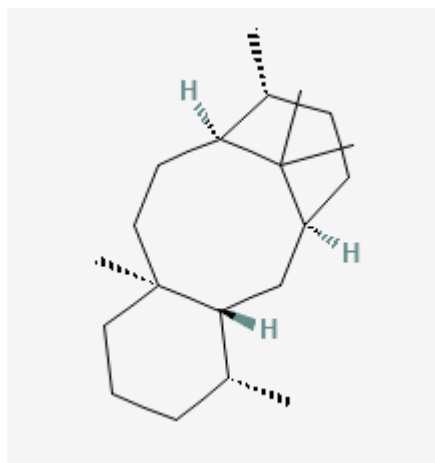
Inhibitory PARP blokuji opravu poškození DNA, a to vede k chromozomální nestabilitě, zástavě buněčného cyklu a následné apoptóze. Inhibitory napadají nádory defektní v BRCA1 nebo BRCA2 genech. Způsobují nárůst jednořetězcových tlomů DNA, které se během replikace přeměňují na nepravidelné toxické dvouřetězcové zlomy DNA v BRCA1/2 defektních buňkách. Studie ukázaly, že inhibitory PARP jsou prospěšné při léčbě pacientů, kteří jsou přenašeči zárodečných mutací BRCA. Také jsou pravděpodobně užitečné pro nositele mutací bez BRCA (Godet, 2017).

2.7.2 Chemoterapie

Rakovina prsu, která je spojena s mutací BRCA genů, se charakterizuje nedostatečnou homologní rekombinací DNA a 80 % karcinomů, které souvisejí s mutací BRCA1, vykazuje bazální molekulární podtyp. Běžně se nosiči BRCA genů léčí konvenční systémovou chemoterapií na základě charakteristik nádoru. S rostoucí znalostí BRCA genů se uznává, že nádory spojené s BRCA mohou mít odlišné biochemické vlastnosti, a proto je potřeba přizpůsobení léčebné strategie. Nádory vzniklé u pacientů s mutacemi BRCA jsou zvláště citlivé na sloučeniny platiny, inhibitory PARP nebo léky s obsahem taxanu (Bayraktar, 2012).

Mutované geny BRCA jsou citlivé na platinovou terapii. Jako chemoterapeutické činidlo se používá cisplatina, která je účinná samostatně nebo v kombinaci s jinými protinádorovými léky (Mylavarapu, 2018).

Taxany jsou protinádorová činidla blokující buněčnou proliferaci, která vede k apoptóze. Nejčastěji používanými taxany, které se využívají k léčbě rakoviny prsu jsou docetaxel a paclitaxel. Nositelé mutace BRCA 1 v podskupině hormonálně negativních rakovin vykazovali menší citlivost na chemoterapii taxanem než nositelé mutace BRCA 1, kteří nemají mutaci BRCA 1. Na druhou stranu v podskupině hormonálně pozitivních karcinomů vykazují dědičné i sporadické případy podobnou citlivost (Byrski, 2010).



Obrázek 10 – Struktura taxanu

(převzato z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Taxane#section=2D-Structure>)

2.7.3 Chirurgický zákrok

Profylaktická mastektomie poskytuje největší snížení rizika rozvoje rakoviny prsu u nositelek mutace BRCA genů. Také lze určit proměnlivý nárůst očekávání délky života ve srovnání s radiologickým dozorem. Tento zákrok má vliv i na psychiku pacientek, kdy se může vyskytovat úzkost a strach z onemocnění (Franceschini, 2019).

2.8 Prevence

Nosičky vrozených mutací genů BRCA mají ve srovnání s běžnou populací žen významně zvýšené riziko onemocnět nádory prsu i vaječníků. Z tohoto důvodu je jim poskytována specializovaná péče, jejíž součástí je provádění kroků, které snižují riziko onemocnění. Mezi postupy primární prevence patří profylaktická mastektomie, doporučení k úpravě životního stylu a chemoprevence, sekundární prevence poté zahrnuje intenzivní screening. Screeningový program zahrnuje pravidelné půlroční kontroly nosiček mutací genů BRCA1/2, jejichž náplní je nalézt nádor v časném stádiu (Novotný, 2011).

Pro prevenci vzniku karcinomu prsu se vykonává šetřící mastektomie, která zachová kožní obal a bradavku s areolou. Tento postup se obvykle provádí řezem, kdy se opatrně odřízne celá žláza. Mastektomie šetřící bradavky musí být prováděna s technickou dovedností a maximální pozorností, aby uvnitř nezůstaly makroskopické zbytky mléčné žlázy zejména v axilární oblasti, periferních končetinách žlázy a komplexu bradavka-dvorec. Pokud se pacientky rozhodnou pro bilaterální profylaktickou mastektomii, měla by být vždy provedena přesná předoperační radiologická vyšetření s mamografií, ultrazvukem a magnetickou rezonancí, aby se vyloučila přítomnost podezřelých lézí prsu (Franceschini, 2019).

Při chemoprevenci využíváme dlouhodobého, mnohaletého podávání tolerovaných léků nebo potravinových doplňků, které různými procesy narušují proces karcinogeneze. Ve větší míře se chemoprevence uplatňuje pouze u karcinomu prsu. Preventivní účinnost je prokázána pro tamoxifen, raloxifen a anastrozol. U nosiček mutace BRCA 2 tamoxifen snížil riziko o 62 % (Novotný, 2011).

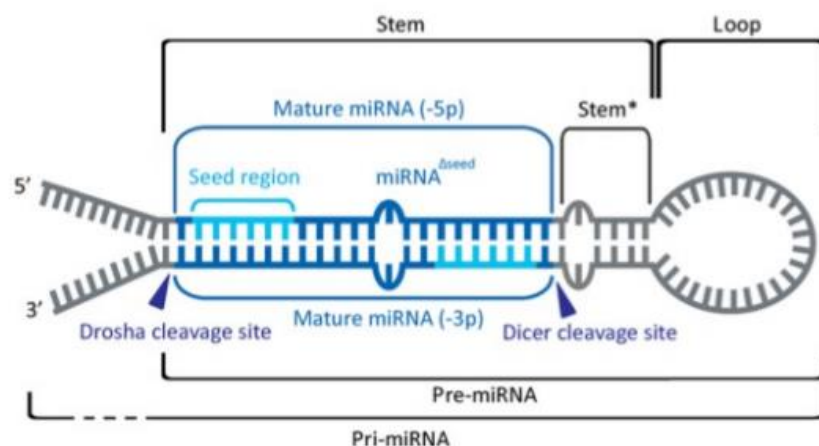
3 Epigenetické markery

3.1 Epigenetika

Epigenetika popisuje všechny reverzibilní a dědičné procesy, které regulují genovou expresi bez změny genetické sekvence. DNA a histony mohou projít chemickými modifikacemi, které se nazývají epigenetické markery. Interakce mezi DNA a histony vedou ke konformaci euchromatinu, kde je gen aktivovaný, nebo ke konformaci heterochromatinu, kdy je gen nepřístupný, a tudíž potlačen. Kromě modifikací histonů a DNA se na epigenetické modifikaci podílí také nekódující molekuly RNA (Topart, 2020).

3.2 miRNA

MikroRNA je malá nekódující molekula RNA obsahující 19 až 25 nukleotidů. Hlavní rolí těchto malých molekul RNA je ovlivňovat mRNA prostřednictvím míst v nepřekladané oblasti, což reguluje jejich stabilitu. MiRNA primárně ovlivňují hladiny genové exprese prostřednictvím cílení mRNA. Při jakékoli změně v expresi mRNA může dojít k ovlivnění rozsahu regulace cíle, a tím ovlivnit buněčnou homeostázu. Proto hladiny miRNA mají hlavní roli v karcinogenezi a dalších onemocnění (Hill, 2021).



Obrázek 11 – Struktura miRNA

(převzato z: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/77991/101064.pdf?sequence=1&isAllowed=y>)

3.2.1 Identifikace miRNA

Objevování miRNA, identifikace jejich cílů a odvození funkcí miRNA jsou důležité pro pochopení normálních biologických procesů miRNA a jejich rolí při rozvoji onemocnění. V posledních letech se kladl velký důraz na objevení miRNA, identifikaci cílů miRNA a odvození funkcí miRNA pomocí biologických metod i výpočetních postupů (Liu, 2014).

Pomocí bioinformatických metod se domnělé miRNA nejprve předpovídají v sekvencích genomu na základě strukturních rysů miRNA. Tyto algoritmy identifikují vlásenkové struktury v nekódujících a neopakujících se oblastech genomu, které jsou charakteristické pro prekurzorové sekvence miRNA. Známé prekurzory miRNA jsou důležité ve vyhledávacích algoritmech (Liu, 2014).

Přístupy k objevování miRNA přinesly mnoho tisíc miRNA, které jsou uloženy v primárním online úložišti miRBase. Ukládají se zde publikované sekvence, anotace miRNA a nové geny, které jsou před registrací a jsou uloženy v registru miRBase. Každý záznam v databázi představuje predikovanou vlásenkovou část transkriptu miRNA s informací o umístění a sekvenci zralé sekvence miRNA (Liu, 2014).

3.2.2 Nekódující RNA

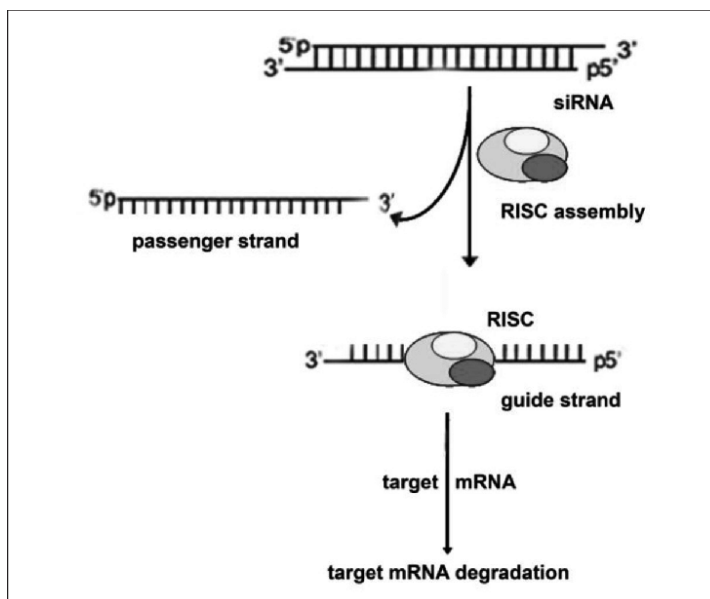
Nekódující RNA se dělí hlavně do dvou kategorií na základě jejich velikosti. První kategorií jsou nekódující RNA s krátkým řetězcem, kam patří piRNA, miRNA a siRNA. Druhou kategorií jsou nekódující RNA s dlouhým řetězcem (lncRNA). Nekódující RNA hrají významnou roli v epigenetické modifikaci a mohou regulovat expresi na úrovni genu nebo na úrovni chromozomu za účelem kontroly buněčné diferenciaci (Wei, 2017).

piRNA – Piwi Interacting RNA

Piwi interagující RNA (piRNA) představují třídu malých nekódujících molekul RNA, které jsou dlouhé přibližně 26-31 nukleotidů. PiRNA se často vážou na proteiny druhu piwi a hrají regulační roli. Tím ovlivňují umlčení transpozomu, spermiogenezi, přeuspořádání genomu, epigenetickou regulaci, regulaci proteinů a udržování zárodečných kmenových buněk. U některých rakovin jsou právě piRNA abnormálně exprimovány a mohou sloužit jako biomarkery a terapeutické cíle pro diagnostiku a léčbu nádorů (Liu, 2019).

siRNA – Short Interfering RNA

siRNA jsou molekuly RNA dlouhé 21-23 nukleotidů a mohou vznikat jako molekuly obranné v reakci na cizí nebo invazivní nukleové kyseliny, jako jsou viry, transpozomy a transgeny nebo přepisem částí genomu. Funkcí siRNA je interakce s proteinovým komplexem RISC a jeho navedení ke konkrétnímu úseku mRNA. RISC poté katalyzuje rozštěpení této cílové mRNA a dochází k posttranskripčnímu umlčení daného genu. Dále siRNA indukují tvorbu heterochromatinu, kdy siRNA blokuje samotný přepis genu (Carthew, 2009).



Obrázek 12 – Mechanismus účinku molekul siRNA

(převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-siRNA-molecules-SiRNA-molecules-are-incorporated-into-a_fig1_280714873)

lncRNA – long noncoding RNA

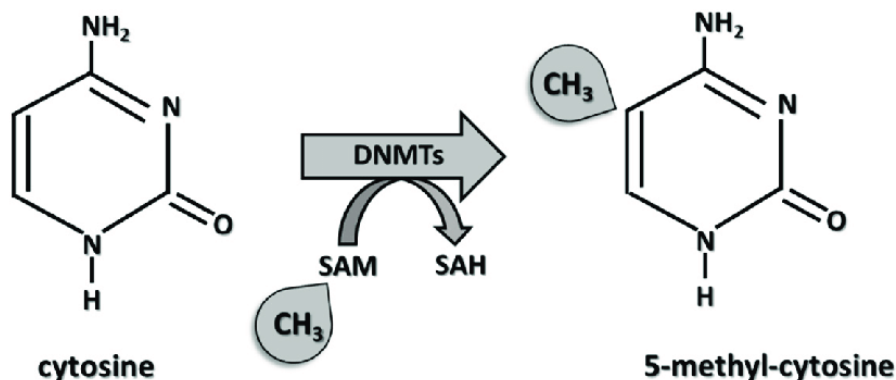
lncRNA jsou dlouhé nekódující RNA, které mají více než 200 nukleotidů. lncRNA nekódují protein a jsou samy o sobě funkčními jednotkami. lncRNA hrají zásadní roli v mnoha buněčných procesech, včetně buněčného cyklu, diferenciace a metabolismu. lncRNA mohou fungovat odlišně a mít různé interakční partnery na základě jejich lokalizace. Zatímco v jádře lncRNA potlačuje transkripci mRNA, v cytoplazmě váže mRNA, čímž brání sestavení ribozomů (Bridges, 2021).

3.3 Metylce DNA

Metylce DNA patří mezi nejintenzivněji studované epigenetické modifikace u savců. Při fyziologickém stavu zajišťuje správnou regulaci genové exprese a stabilní umlčování genů v buňkách. Metylce DNA je spojena s modifikacemi histonů a souhra těchto modifikací je zásadní pro regulaci fungování genomu. Ke kovalentní adici metylové skupiny dochází v cytosinu v rámci CpG dinukleotidů, které jsou koncentrovány ve velkých shlucích nazývaných CpG ostrůvky, a za vytvoření a udržování metylačního vzoru zodpovídají DNA metyltransferázy. Tato modifikace DNA je důležitým faktorem při regulaci transkripce, proto defekty v tomto mechanismu mohou vést k různým onemocněním, včetně rakoviny. (Kulis, 2010).

Enzymy, které zakládají, rozpoznávají a odstraňují metylaci DNA, se dělí do tří tříd na zapisovače, gummy a čtečky. Zapisovatelé jsou enzymy katalyzující adici metylových

skupin na cytosinové zbytky. Gemy upravují a odstraňují metylovou skupinu. Čtečky rozpoznávají a vážou se na metylové skupiny, aby v konečném kroku ovlivnili genovou expresi (Moore, 2013).

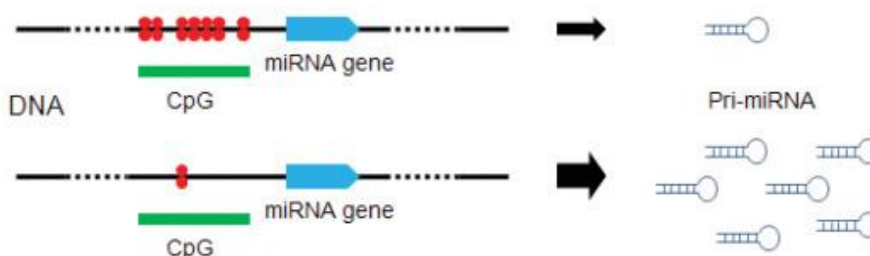


Obrázek 13 – Mechanismus metylace DNA
(převzato z: https://www.researchgate.net/figure/The-mechanism-of-DNA-methylation-DNA-methylation-is-exerted-by-DNA-methyltransferases_fig1_335375102)

3.3.1 Základní funkce

Metylace DNA reguluje expresi genů bez změn genetické informace a ovlivňuje replikaci, rekombinaci a opravy DNA nebo sestřih heterogenní nukleární RNA. Metylace tedy působí na vývoj kmenových buněk, diferenciaci a udržování buněk a tkání. Podílí se také na zachování genomové stability, potlačuje transkripci repetitivních sekvencí a během zárodečného vývoje kontroluje expresi imprintovaných genů (Holčáková, 2018).

Regulace exprese miRNA je závislá na metylaci. Některé geny miRNA jsou ovlivněny epigenetickou inaktivací v důsledku hypermetylace, která se často ukazuje jako jev při vývoji rakoviny. Dále může metylace DNA ovlivňovat transkripční faktory, takže může nepřímým způsobem řídit expresi miRNA (Cai, 2009).



Obrázek 14 – Genová exprese miRNA ovlivněna metylací
(převzato z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022908600443#s0015>)

U rakoviny lze pozorovat hypometylační a hypermetylační jevy. Hypometylace nepromotorových sekvencí DNA a strukturních částí, zvyšuje genomovou nestabilitu

a mutace genů. Hypometylace je tedy zodpovědná za nadměrnou expresi protoonkogenů, růstových faktorů a genů, které jsou zapojeny do regulace proliferace, invazivity a metastazování buněk (Holčáková, 2018).

Hypermetylace v promotorových oblastech způsobuje inaktivaci určitých tumor-supresorových genů, které jsou v nemaligních tkáních nemetylované. Toto umlčování genů hraje klíčovou roli v tumorigenezi a je charakteristickým znakem všech typů rakovin u lidí (Kulis, 2010).

3.3.2 Laboratorní vyšetření

Metylací DNA lze analyzovat pomocí tří přístupů, jmenovitě bisulfátové konverze, metylačně citlivých restrikčních enzymů a technik, které jsou založeny na afinitním obohacení. Tyto metody jsou techniky jednoho genomu. U technik celého genomu se rozlišují metody, které určují globální metylaci DNA a metody pro celogenomové profilování metylace DNA. Volba konkrétní metody závisí na cíli analýzy. Pokud jsou cíle analýzy známé a rutinně analyzované, existuje řada validovaných a registrovaných souprav pro detekci metylace. Dále také hraje roli v rozhodovacím procesu důležitou roli kvalita a množství vstupní DNA, citlivost a specifita zvolené metody, cena a dostupnost vybavení (Martisova., 2021).

Bisulfátová konverze byla již popsána v kapitole laboratorních vyšetření pro detekci BRCA genů, tudíž odkazují na ni.

Metody založené na metylačně citlivých omezovacích enzimech (MSRE) nejsou schopny štěpit DNA, pokud je jejich restrikční místo metylováno. Proto metylovaná DNA zůstává neporušená a nemetylovaná je štěpena omezovacím enzymem. Nejčastěji používaným přístupem je PCR amplifikace s primery lemujícími restrikční místo. Pokud je DNA metylováno, štěpení neprobíhá. Používají se páry enzymů HpaII a MspI, které štěpí restrikční místo CCGG (Martisova., 2021)

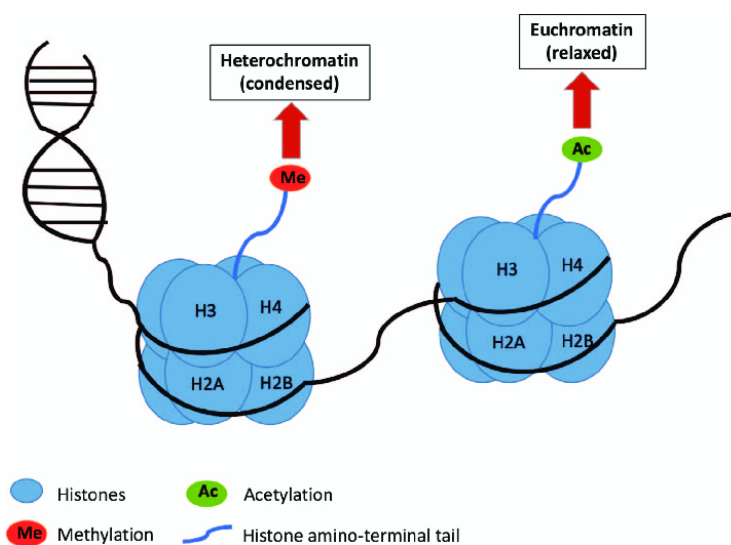
Přístupy založené na obohacení afinity, jsou přístupy, které využívají afinitní purifikaci 5mC (metyl cystosin) s MBD proteiny nebo imunoprecipitaci s protilátkami proti 5mC. Po eluci obohacených sekvencí DNA dojde k bisulfitové konverzi následované jednou z již popsaných technik nebo může být obohacená DNA použita v jednom přístupů pro celý genom (Martisova, 2021).

3.4 Modifikace histonů

Histony jsou malé bazické proteiny, které mohou být kovalentně modifikovány na jejich flexibilních N- nebo C- koncích. Posttranslační modifikace histonů ovlivňují jejich interakce s DNA a efektorovými proteiny, což vede ke změnám ve struktuře a funkci chromatinu. Histony jsou kódovány alelickými a nealelickými kopiemi genů a tím vznikají různé podtypy histonů s různými sekvencemi (Biterge, 2014).

Metylace a acetylace histonů jsou nejvíce studovanými modifikacemi histonů u karcinomu prsu. Metylace histonů je běžná modifikace, ke které dochází přidáním methylové skupiny na zbytek aminokyseliny lysinu nebo argininu. Metylace histonů jsou katalyzovány enzymy ze skupiny histon methyltransferáz, které jsou schopny přidat methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu ke svému cílovému zbytku. Dále se zde zapojují histonové demethylázy, což jsou enzymy, které odstraňují různé methylové skupiny z lysinů a argininů. Aberantní metylace histonů je pozorována u lidských onemocněních, jako je rakovina (Gong, 2019).

Další modifikací histonů je jejich acetylace. Acetylová skupina z acetyl-CoA je kovalentně přidána k aminoskupině lysinových zbytků na histonových koncích během acetylace histonů. Odstranění acetylové skupiny ruší účinek acetylace histonů a způsobuje transkripční represí. Enzymy, které katalyzují acetylaci lysinových zbytků na histonech se nazývají histonové acetyltransferázy, zatímco enzymy, které odstraňují acetylační signaturu histonů, se nazývají histonové deacetylázy (Rahman, 2019)



Obrázek 15 – Schématický náčrt metylace a acetylace histonu
(převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-drawing-of-histone-methylation-and-acetylation-in-relation-to-chromatin_fig2_312349806)

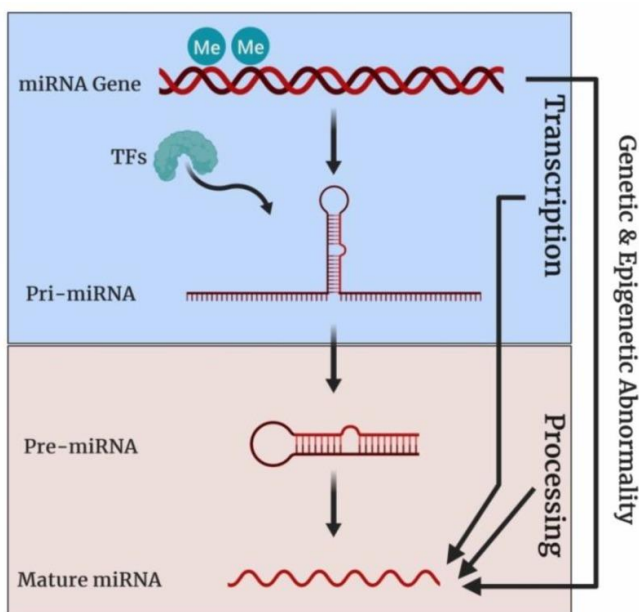
3.5 Spojitost s rakovinou prsu

Epigenetické modifikace jsou běžným rysem rakoviny prsu bez ohledu na genetické příčiny. Zatímco počáteční genetické mutace vedoucí k vícestupňové tumorigenezi prsu není fixována na určitý onkogen nebo tumor supresorový gen, epigenetické aberace následují vždy po genetické destabilizaci (Rahman, 2019).

3.5.1 miRNA

MiRNA se účastní tumorigeneze, progresu a metastázování rakoviny prsu postranskripční regulací exprese cílových genů. MiRNA mohou stimulovat onkogenezi, inhibovat růst nádoru a regulují genové cíle v metastázích. Jedna miRNA může přímo nebo nepřímo cílit na stovky mRNA, a tím vytváří komplexní síť miRNA-mRNA pro regulaci buněčných procesů, včetně metastáz rakoviny prsu. MiRNA, které byly dysregulované buď upregulací nebo downregulací, a které jsou spojené s metastázami, se nazývají metastasis miRs. (Petri, 2020).

Dysregulace miRNA je spojena s progresí v každém stádiu rakoviny prsu. Anomálie profilu miRNA byla dostatečně rozsáhlá, aby ovlivnila buněčné signální dráhy proliferace, růstu, apoptózy metastáz a angiogeneze. Nádor-supresivní miRNA inhibovaly rakovinný buněčný proces, zatímco jiné miRNA byly onkogenní povahy. Kromě molekulární funkce poskytují miRNA důležité informace pro podtypování rakoviny prsu, diagnostiku, prognózu a monitorování léčby (Rahman, 2019).

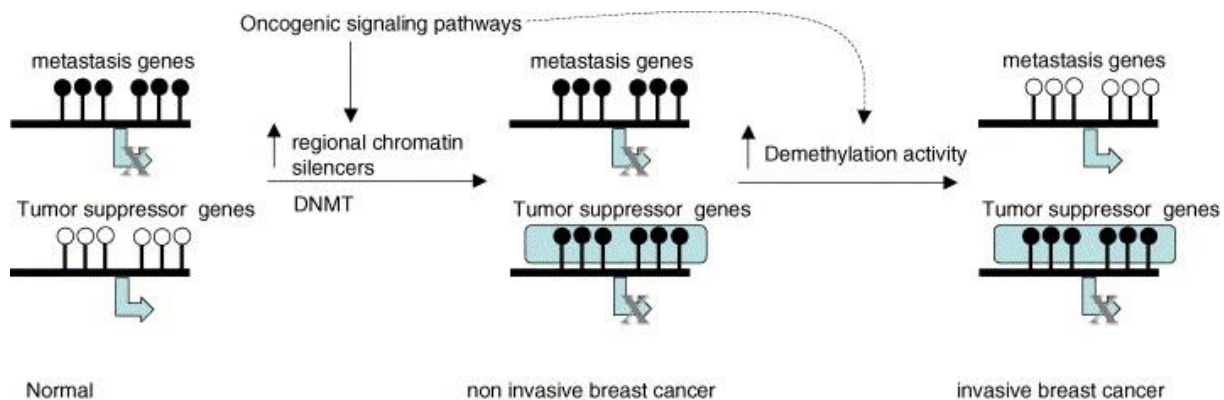


Obrázek 16 – Molekulární mechanismus dysregulace miRNA během rakoviny (převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6829616/figure/cells-08-01214-f001/>)

3.5.2 Metylace DNA

Mapování metylací DNA u nádorových buněk potvrdilo, že téměř všechny typy nádorů obsahují stovky genů, které mají abnormální metylaci. Hypermetylace promotorů u nádorových buněk jsou stejně tak časté jako výskyt mutací nádorových supresorů. Téměř 50 % genů, jejichž zárodečné mutace vedou k dědičným formám rakoviny, podléhají hypermetylaci a následnému potlačení jejich exprese (Holčáková, 2018).

U rakoviny prsu jsou pozorovány dvě protichůdné změny ve vzorcích metylace DNA, a to hypermetylace specifických genů a hypometylaci. Hypermetylace umlčuje růstové regulační geny, což vede k nekontrolovanému růstu u nádoru, a hypometylace vede k aktivaci genů, které jsou nezbytné pro metastázy (Szyf, 2004).



Obrázek 17 – Hypermetylace a hypometylace u rakoviny prsu
(převzato z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295204003764>)

ZÁVĚR

Rakovina prsu je nejčastějším maligním onemocněním u žen a studium spojitosti s různými faktory snižuje nemocnost i úmrtnost právě na tuto nemoc. V posledních letech jsou dostupnější informace o vzniku rakoviny prsu a mechanismu jejich vzniku. U karcinomu prsu je velmi důležitá včasná diagnóza a studium genetických faktorů umožňující předejít karcinomu prsu.

Spojitost rakoviny prsu s BRCA geny je podmíněna jejich mutací, která zodpovídá za nádorovou transformaci buněk. Nosičky této mutace mají až 80% šanci, že onemocní karcinomem prsu nebo vaječníků. Tato mutace v BRCA genech se vyskytují hlavně dědičnou formou, kdy pacient zdědí mutaci v genech BRCA 1 nebo BRCA 2. U pacientů, u kterých se v rodině vyskytuje více případů karcinomu prsu, je tedy velmi důležité genetické testování, které slouží jako prevence či pro včasné zachycení mutací v BRCA genech.

MiRNA ovlivňují hladiny genové exprese cílením na mRNA a při jakékoliv změně exprese mRNA může dojít k ovlivnění homeostázy, kdy tato změna vede ke karcinogenezi a jiným onemocněním. Změna regulace u miRNA je spojena s progresí v každém stádiu rakoviny prsu. MiRNA se u rakoviny prsu účastní tumorigeneze, progresu a metastazování za pomoci postranskripční regulace exprese cílových genů. MiRNA je také důležitá pro podtypování rakoviny prsu, diagnostiky, kdy miRNA slouží jako biomarker, prognózu a monitorování léčby.

Metylace DNA je důležitým faktorem při regulaci transkripce. Pokud dojde k defektům tohoto mechanismu, může dojít k různým onemocněním včetně rakoviny. Metylace DNA je úzce spojena s modifikacemi histonů, kdy souhra těchto mechanismů je zásadní pro správné fungování genomu. U rakoviny prsu byly pozorovány dvě změny při metylaci DNA. První je hypermetylace specifických genů, která umlčuje růstové regulační geny, a to vede k nekontrolovanému růstu nádoru. Druhou změnou je hypometylace, vedoucí k aktivaci genů, které jsou zodpovědné za metastazování.

Díky pokrokům v diagnostice a nástupem nových metod, se vyšetření rakovinných markerů posouvá do komplexní roviny, kdy se nevyšetřují již pouze proteiny, případně některé mutace ve vybraných genech, ale provádí se komplexní analýza např. metylačních profilů, sekvence dlouhých genových oblastí apod. Tyto vyšetření jsou sice náročnější, ale podstatně zpřesňují diagnostiku a poznání ohledně rakoviny prsu. Díky těmto novým informacím, se objevují i nové léčebné postupy, cílící nejen na zpomalení růstu buněk nebo

jejích cílenou likvidaci, ale jedná se o terapii, která může měnit metylace DNA případně v budoucnu např. sekvenci DNA.

S postupujícím poznáním se ukazuje, že rakovina je velmi komplexní nemoc a ani její diagnostika ani léčba nebude mít jednoduché řešení. Možná v budoucnu více promluví do léčby a prevence personalizovaná medicína a genová terapie, stejně jako včasná komplexní diagnostika.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABRAHÁMOVÁ, Jitka a Ladislav DUŠEK, 2003. *Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0499-4.
2. ABRAHÁMOVÁ, Jitka, 2019. *Co byste měli vědět o rakovině prsu*. 2., aktualizované a doplněné vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-271-2055-0.
3. BACOLOD, Manny D., Jianmin HUANG, Sarah F. GIARDINA, Philip B. FEINBERG, Aashiq H. MIRZA, Alexander SWISTEL, Steven A. SOPER a Francis BARANY, 2020. Prediction of blood-based biomarkers and subsequent design of bisulfite PCR-LDR-qPCR assay for breast cancer detection. *BMC Cancer*. 20(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-020-6574-4
4. BAYRAKTAR, Soley a Stefan GLÜCK, 2012. Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 135(2), 355-366. ISSN 0167-6806. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-012-2158-6
5. BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY, 2013. *What is next generation sequencing?*. 98(6), 236-238. ISSN 1743-0585. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340
6. BHATTACHARJEE, Sayani, Matthew J. SULLIVAN, Rebecca R. WYNN, Alex DEMAGALL, Andrew S. HENDRIX, Puneet SINDHWANI, Firas G. PETROS a Nagalakshmi NADIMINTY, 2022. PARP inhibitors chemopotentiate and synergize with cisplatin to inhibit bladder cancer cell survival and tumor growth. *BMC Cancer*. 22(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-022-09376-9
7. BITERGE, Burcu a Robert SCHNEIDER, 2014. Histone variants: key players of chromatin. *Cell and Tissue Research*. 356(3), 457-466. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-014-1862-4
8. BORGES, Virginia F., Traci R. LYONS, Doris GERMAIN a Pepper SCHEDIN, 2020. Postpartum Involution and Cancer: An Opportunity for Targeted Breast Cancer Prevention and Treatments?. *Cancer Research*. 80(9), 1790-1798. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-3448
9. BRIDGES, Mary Catherine, Amanda C. DAULAGALA a Antonis KOURTIDIS, 2021. LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*. 220(2). ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.202009045
10. BYRSKI, Tomasz, Jacek GRONWALD, Tomasz HUZARSKI, et al., 2010. Pathologic Complete Response Rates in Young Women With BRCA1 -Positive Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 28(3), 375-379. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2008.20.7019
11. CAI, Yimei, Xiaomin YU, Songnian HU a Jun YU, 2009. *A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation*. 7(4), 147-154. ISSN 16720229. Dostupné z: doi:10.1016/S1672-0229(08)60044-3
12. CARROL, June C., Carol CREMIN, Judith ALLANSON a et al., 2008. Hereditary breast and ovarian cancers. *Canadian Family Physician*. 54(12), 1691-1692.

13. CARTHEW, Richard W. a Erik J. SONTHEIMER, 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136(4), 642-655. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
14. COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology*. 13(11), 1141-1151. ISSN 14702045. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4
15. ČMEJLOVÁ, Vlastimila, 2020. Comprehensive treatment of early breast cancer. *Onkologie* [online]. 14(4), 148-156 [cit. 2022-03-22]. ISSN 18024475. Dostupné z: doi:10.36290/xon.2020.057
16. ELLISON, Gillian, Shuwen HUANG, Hedley CARR, Andrew WALLACE, Miika AHDESMAKI, Sanjeev BHASKAR a John MILLS, 2015. A reliable method for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fixed tumour tissue utilising multiplex PCR-based targeted next generation sequencing. *BMC Clinical Pathology*. 15(1). ISSN 1472-6890. Dostupné z: doi:10.1186/s12907-015-0004-6
17. ENGIN, Atilla, 2017. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Obesity and Lipotoxicity*. Cham: Springer International Publishing, 2017-06-06, 571-606. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-48380-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-48382-5_25
18. ER, Tze-Kiong a Jan-Gowth CHANG, 2012. High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clinica Chimica Acta*. 414, 197-201. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2012.09.012
19. FORETOVÁ, Lenka, Eva MACHÁČKOVÁ, Markéta PALÁCOVÁ, Marie NAVRÁTILOVÁ, Marek SVOBODA a Katarína PETRÁKOVÁ, 2016. Recommended Extension of Indication Criteria for Genetic Testing of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Klinická onkologie* [online]. 29(Suppl 1), S9-S13 [cit. 2022-04-13]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko2016S9
20. FRANCESCHINI, Gianluca, Alba Di LEONE, Daniela TERRIBLE, Martin Alessandro SANCHEZ a Riccardo MASETTI, 2019. Bilateral prophylactic mastectomy in BRCA mutation carriers: what surgeons need to know. *Annali Italiani di Chirurgia*. (90), 1-2.
21. FRIEDENREICH, Christine M., 2010. The Role of Physical Activity in Breast Cancer Etiology. *Seminars in Oncology*. 37(3), 297-302. ISSN 00937754. Dostupné z: doi:10.1053/j.seminoncol.2010.05.008
22. GAIL, M. H., L. A. BRINTON, D. P. BYAR, D. K. CORLE, S. B. GREEN, C. SCHAIRER a J. J. MULVIHILL, 1989. Projecting Individualized Probabilities of Developing Breast Cancer for White Females Who Are Being Examined Annually. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 81(24), 1879-1886. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/81.24.1879

23. GODET, Inês a Daniele M. GILKES, 2017. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 4(1). ISSN 20564546. Dostupné z: doi:10.15761/ICST.1000228
24. GOMPEL, Anne, 2019. Hormones et cancers du sein. *La Presse Médicale*. 48(10), 1085-1091. ISSN 07554982. Dostupné z: doi:10.1016/j.lpm.2019.09.021
25. GONG, Fade a Kyle M. MILLER, 2019. Histone methylation and the DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 780, 37-47. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2017.09.003
26. GØTZSCHE, Peter C a Karsten Juhl JØRGENSEN, 2013. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (6). ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD001877.pub5
27. GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK, 2018. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018(5). ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095117
28. HILL, Meredith a Nham TRAN, 2021. *MiRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer*. 14(4). ISSN 1754-8403. Dostupné z: doi:10.1242/dmm.047662
29. HOLČÁKOVÁ, Jitka, 2018. Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer. *Klinická onkologie*. 31(Suppl2). ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20182S41
30. HORÁK, Jaromír, Ctibor POVÝŠIL a Jitka ABRAHÁMOVÁ, 2000. *Atlas nádorů prsu*. Praha: Grada. ISBN 80-7169-771-0.
31. CHOVANEC, Josef, Zuzana DOSTÁLOVÁ a Jana NAVRÁTILOVÁ, 2008. Karcinom prsu - aktuální problém. *Interní medicína pro praxi* [online]. 84-89 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2008/02/10.pdf>
32. JOZ ABBASALIAN, Zahra, Hossein KHANAHMAD a MohammadAmin TABATABAIEFAR, 2021. Bisulfite treatment of CG-rich track of trinucleotide repeat expansion disorder: Make the sequence less CG rich. *Advanced Biomedical Research*. 10(1). ISSN 2277-9175. Dostupné z: doi:10.4103/abr.abr_144_19
33. KAZEMI, Asma, Reza BARATI-BOLDAJI, Sepideh SOLTANI, Nazanin MOHAMMADIPOOR, Zahra ESMAEILINEZHAD, Cian C T CLARK, Siavash BABAJAFARI a Marzieh AKBARZADEH, 2021. Intake of Various Food Groups and Risk of Breast Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Advances in Nutrition*. 12(3), 809-849. ISSN 2161-8313. Dostupné z: doi:10.1093/advances/nmaa147
34. KELSEY, Jennifer L., Marilie D. GAMMON a Esther M. JOHN, 1993. Reproductive Factors and Breast Cancer. *Epidemiologic Reviews*. 15(1), 36-47. ISSN 1478-6729. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115

35. KULIS, Marta a Manel ESTELLER, 2010. DNA Methylation and Cancer. *Epigenetics and Cancer, Part A*. Elsevier, 2010, 27-56. Advances in Genetics. ISBN 9780123808660. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2
36. LIU, B., J. LI a M. J. CAIRNS, 2014. Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics*. 15(1), 1-19. ISSN 1467-5463. Dostupné z: doi:10.1093/bib/bbs075
37. LIU, Ying, Nhi NGUYEN a Graham A COLDITZ, 2015. Links between Alcohol Consumption and Breast Cancer: A Look at the Evidence. *Women's Health*. 11(1), 65-77. ISSN 1745-5065. Dostupné z: doi:10.2217/WHE.14.62
38. LIU, Yongmei, Mei DOU, Xuxia SONG, et al., 2019. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Molecular Cancer*. 18(1). ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-019-1052-9
39. MARTISOVA, Andrea, Jitka HOLCAKOVA, Nasim IZADI, Ravery SEBUYOYA, Roman HRSTKA a Martin BARTOSIK, 2021. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(8). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22084247
40. MATSUDA, Kazuyuki, 2017. *PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation*. Elsevier, 2017, 45-72. Advances in Clinical Chemistry. ISBN 9780128120750. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acc.2016.11.002
41. MERKUNOVÁ, Alena a Miroslav OREL, 2008. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-1521-6.
42. MOORE, Lisa D, Thuc LE a Guoping FAN, 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 38(1), 23-38. ISSN 0893-133X. Dostupné z: doi:10.1038/npp.2012.112
43. MYLAVARAPU, Sanghamitra, Asmita DAS a Monideepa ROY, 2018. Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. *Frontiers in Oncology*. 8. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2018.00016
44. NAŇKA, Ondřej a Miloslava ELIŠKOVÁ, [2015]. *Přehled anatomie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-206-0.
45. NICOLUSSI, Arianna, Francesca BELARDINILLI, Yasaman MAHDAVIAN, et al., 2019. Next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes for rapid detection of germline mutations in hereditary breast/ovarian cancer. *PeerJ*. 7. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.6661
46. NOVOTNÝ, Jan a Martina ZIMOVJANOVÁ, 2011. Možnosti preventivních opatření u nosičů mutací genů BRCA1 a BRCA2. *Onkologie*. 5(1), 30-33.
47. PASSARGE, Eberhard, 2019. *Barevný atlas genetiky*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3099-8.
48. PAUL, Arindam, 2014. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Frontiers in Bioscience*. 19(4). ISSN 1093-9946. Dostupné z: doi:10.2741/4230

49. PAVLŮ, Hana, Zuzana JURÁŠKOVÁ, Jitka KUKLOVÁ, Marcela MACKŮ a Eva MACHÁČKOVÁ, 2011. Vývoj laboratorních vyšetřovacích metod v diagnostice genů BRCA1 a BRCA2 v MOÚ. *Linkos* [online]. (227p) [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/vyvoj-laboratornich-vysetrovacich-metod-v-diagnostice-genu-brca1-a-brca2-v-mou/>
50. PETRÁKOVÁ, Katarína a Rostislav VYZULA, 2006. *Onkologické diagnózy: nádory prsu* [online]. [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/o-nadorech-prsu/>
51. PETRI, Belinda J. a Carolyn M. KLINGE, 2020. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. *Cancer and Metastasis Reviews*. 39(3), 837-886. ISSN 0167-7659. Dostupné z: doi:10.1007/s10555-020-09905-7
52. PRAUSOVÁ, Jana, 2010. Karcinom prsu - problém i v 21. století. *Interní medicína pro praxi* [online]. 12(1), 26-32 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/01/05.pdf>
53. PROTHEROE, D., K. TURVEY, K. HORGAN, E. BENSON, D. BOWERS a A. HOUSE, 1999. Stressful life events and difficulties and onset of breast cancer: case-control study. *BMJ*. 319(7216), 1027-1030. ISSN 0959-8138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.319.7216.1027
54. PUCHMAJEROVÁ, Alena, Jannis TORNIKIDIS, Lubor MRŇA, Markéta HAVLOVICOVÁ, Markéta VLČKOVÁ, Jana CHRUDIMSKÁ, Milan MACEK a Jiří HOCH, 2018. Hereditární formy karcinomu prsu: genetická etiologie a současné možnosti prevence a chirurgické léčby. *Časopis Lékařů českých* [online]. 157(2), 90-95 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2018-2/download?hl=cs>
55. RAHMAN, Mohammad Mijanur, Andrew C. BRANE a Trygve O. TOLLEFSBOL, 2019. MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer. *Cells*. 8(10). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8101214
56. SOUMAROVÁ, Renata a Martina KUBECOVÁ, 2019. *Onkologie: Učební texty pro studenty 3. lékařské fakulty UK* [online]. 2. zcela přepracované vyd. Praha: Univerzita Karlova , 3. lékařská fakulta, Radioterapeutická a onkologická klinika 3.LF a FNKV [cit. 2022-03-11]. ISBN 978-80-87878-37-8. Dostupné z: https://www.lf3.cuni.cz/3LF-1478-version1-2019_soumarova_onkologie_978_80_87878_37.pdf#pagemode=bookmarks
57. STEYEROVÁ, Petra a Andrea BURGETOVÁ, 2019. Possibilities and pitfalls of diagnostics breast cancer in young women. *Onkologie* [online]. 13(1), 9-13 [cit. 2022-03-21]. ISSN 18024475. Dostupné z: doi:10.36290/xon.2019.002
58. SZYF, Moshe, Pouya PAKNESHAN a Shafaat A RABBANI, 2004. DNA methylation and breast cancer. *Biochemical Pharmacology*. 68(6), 1187-1197. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2004.04.030

59. TOPART, Clémence, Emilie WERNER a Paola B. ARIMONDO, 2020. Wandering along the epigenetic timeline. *Clinical Epigenetics*. 12(1). ISSN 1868-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s13148-020-00893-7
60. TROXLER, Heinz, Peter KLEINERT, Markus SCHMUGGE a Oliver SPEER, 2012. *Advances in hemoglobinopathy detection and identification*. Elsevier, 2012, 1-28. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780123943842. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394384-2.00001-2
61. UEJI, Masaru, Ei UENO, Douglas OSEI-HYIAMAN, Hideto TAKAHASHI a Katsumi KANO, 1998. Physical Activity and The Risk of Breast Cancer: A Case-control Study of Japanese Women. *Journal of Epidemiology*. 8(2), 116-122. ISSN 0917-5040. Dostupné z: doi:10.2188/jea.8.116
62. VORLÍČEK, Jiří, Jitka ABRAHÁMOVÁ a Hilda VORLÍČKOVÁ, 2012. *Klinická onkologie pro sestry*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3742-3.
63. WEI, Jian-Wei, Kai HUANG, Chao YANG a Chun-Sheng KANG, 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology Reports*. 37(1), 3-9. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2016.5236
64. ZIKÁN, Michal, Petr POHLREICH, Jan NOVOTNÝ, Zdeněk KLEIB a Markéta JANATOVÁ, 2005. *Analýza populačně specifických mutací genu BRCA 1* [online]. [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinarni-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/analyza-populacne-specificky-mutaci-genu-brca1-pilotni-studie-ve-skupine-nesel/>
65. ZIMOVJANOVÁ, Martina, 2013. Geneticky podmíněný karcinom prsu. *Onkologie* [online]. 7(5), 225-228 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/xon/2013/05/04.pdf>