

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



MORFOLOGICKÉ ZMĚNY A PREDIKTIVNÍ FAKTORY U KARCINOMU PRSU LÉČENÉHO NEOADJUVANTNÍ CHEMOTERAPIÍ

MUDr. Helena Hornychová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Patologie

Hradec Králové 2008
Práce byla podpořena grantem IGA NR 8392-3/2005

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**MORFOLOGICKÉ ZMĚNY A PREDIKTIVNÍ FAKTORY U KARCINOMU
PRSU LÉČENÉHO NEOADJUVANTNÍ CHEMOTERAPIÍ**

MUDr. Helena Homychová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Patologie

Hradec Králové 2008
Práce byla podpořena grantem IGA NR 8392-3/2005

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu Patologie na Fingerlandově ústavu patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze

Uchazeč: MUDr. Helena Hornychová
Fingerlandův ústav patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze

Školitel: prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze

Oponenti: Doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.
Ústav patologie, 1.LF a VFN, UK Praha

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.
Ústav patologie, Lékařská fakulta UP Olomouc

Stanovisko k disertační práci bylo vypracováno vedením Fingerlandova ústavu patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

S disertační prací je možné se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty v Hradci Králové, Šimkova 870.

prof. MUDr. Josef Špaček, Dr.Sc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Patologie

1. Úvod

Karcinom prsu je jedním z nejčastějších maligních novotvarů, tvořící, zejména v rozvinutých zemích, až jednu čtvrtinu všech nádorových onemocnění u žen (25).

V poslední době se k léčbě, zejména v pokročilejších stádiích, stále častěji používá neoadjuvantní chemoterapie, což je chemoterapie podaná před operačním odstraněním nádorového ložiska. Účelem tohoto typu terapie je zmenšení nádorového ložiska (což usnadní operabilitu a případně umožní provedení prs zachovávajícího výkonu) a potlačení růstu mikrometastáz, jež mohou být přítomny již v době diagnózy. Míra zmenšení nádorového ložiska je hodnocena jednak klinicky (za účelem plánování rozsahu chirurgického zákroku) a jednak při vyšetření resekátu patologem. Klasifikačních schémat je celá řada a bohužel zde není používána jednoznačná terminologie. V rámci klinických parametrů se odpověď na chemoterapii většinou člení do tří stupňů. Kompletní odpověď (complete response – CR) znamená nepřítomnost klinickými metodami detekovatelného tumoru. Parciální odpověď (partial response – PR) je zmenšení tumoru o více než 50 %. Žádná odpověď (no response – NR) je menší úbytek nebo dokonce progresse velikosti tumoru.

Tomuto členění z části odpovídá i morfologické hodnocení. Tzv. patologická kompletní odpověď (pCR) je někdy definována jako nepřítomnost invazivního tumoru v resekátu po chemoterapii (vyskytuje se v rozmezí od 3 do 27 %), jindy jako úplné chybění tumoru, tj. nepřítomnost invazivní i in situ komponenty (od 2 do 14 %); výskyt patologické kompletní odpovědi (u obou typů její definice) dobře koreluje s příznivější prognózou onemocnění. Variabilita výsledků je přičítána zejména různému typu (a počtu cyklů) použité chemoterapie (17). Většina pacientů tedy dospěje pouze k parciální odpovědi, a proto je snaha tuto skupinu ještě dále analyzovat. Skórovacích systémů je celá řada, často s arbitrárně stanovenými kritérii, většina z nich ani nemá potvrzen prognostický význam. V naší práci používáme klasifikaci dle Chevalliera (12) založenou na hodnocení přítomnosti regresivních změn (bez reziduálního tumoru – stupeň 1; bez invazivního reziduálního tumoru – 2; reziduální invazivní tumor s postchemoterapeutickými změnami v nádorových buňkách nebo ve stromatu – 3; chemoterapie bez efektu 4) a klasifikaci založenou na změně celularity tumoru dle Millera a Paynea (19) (pět stupňů – tumor bez změny celularity; zmenšení celularity do 30 %; zmenšení celularity o 30 až 90 %; zmenšení o více než 90 %; bez reziduálního invazivního tumoru), tato klasifikace má potvrzen prognostický význam (19). Protože výskyt kompletní odpovědi na chemoterapii dobře koreluje s prognózou, je snaha vyhledávat před chemoterapií znaky tumoru, které vedou ke kompletní odpovědi. Většina těchto faktorů je známa také jako standardní prognostické markery. Někdy je však jejich význam jiný. Například z mechanismu účinku cytostatik vyplývá, že působí zejména na proliferující buňky. Proto není překvapivé, že na chemoterapii lépe reagují tumory s vyšší proliferací a že v resekátech po chemoterapii je nižší proliferativní aktivita (počet mitóz nebo exprese Ki67) buněk než v původním tumoru. Částečně také v souvislosti se zahrnutím proliferativní aktivity do skórovacího systému k určení stupně diferenciacie tumoru bývá v některých pracích popisována lepší prognóza u méně diferencovaných tumorů (17). Dalším standardně vyšetřovaným prognostickým markerem je protein p53, jeho prediktivní význam vychází výrazně odlišně v různých studiích (15). Ani u hormonálních receptorů není situace jednoznačná, většina studií udává vyšší výskyt patologické kompletní odpovědi u estrogen negativních tumorů, což však může být způsobeno i tím, že tyto tumory mívají častěji vyšší mitotickou aktivitu, která je sama o sobě predikčním faktorem (9). Expresse hormonálních receptorů po neoadjuvantní chemoterapii většinou změněna není, v případě podávání antiestrogenní terapie spolu s chemoterapií je častější zvýšení exprese progesteronových receptorů (17). Protein HER 2/neu je nejen významný prognostický, ale i prediktivní faktor – tumory se zvýšenou expresí HER 2 lépe reagují na terapii antracykliny (např. doxorubicin) a

hůře reagují na terapii alkylačními činidly (25). Stupeň exprese HER 2 se po chemoterapii výrazněji nemění (9, 17). Klinicky se používá i vysoce specifická terapie v podobě monoklonální protilátky proti HER 2 – trastuzumab (Herceptin). Její aplikace v neoadjuvantním podání zatím není příliš rozšířená.

Dalším faktorem potenciálně ovlivňujícím rychlost nádorového růstu a schopnost metastazování je novotvorba cév - angiogeneze. Pro růst tumoru je zajištění dostatečného cévního zásobení stěžejní záležitostí, tento proces se však uplatňuje i za podmínek normální reparace. Při neoadjuvantním podání chemoterapie se po částečném nebo úplném vymizení tumoru obě tyto skutečnosti kombinují. Pro prostředí vyznačující se novotvorbou kapilár je typická přítomnost angiogenních faktorů, jedním z nich je vascular endothelial growth factor (VEGF), vyšší četnost kapilár (při kvantifikaci pomocí obecných endoteliálních markerů F VIII, CD 31 či CD 34), a charakteristická morfologie kapilár – chybění vyžralých pericytů exprimujících hladkosvalový aktin (SMA), nebo exprese markerů typických pro aktivované endotelie (CD 105) (5, 10, 23). Exprese VEGF v nádorových buňkách karcinomu prsu po chemoterapii přetrvává (24). Studium vztahu angiogeneze a chemoterapie pomocí kvantifikace kapilár je metodicky obtížné. Studii vztahujících se k této problematice je velmi málo, karcinomu prsu se týká pouze jedna práce, kde je popisováno snížení počtu kapilár (18). Prediktivní význam angiogeneze v odpovědi na chemoterapii pravděpodobně zkoumán nebyl. Imunitní systém má v prostředí tumoru dvojí působení. Buňky imunitního systému reagují na přítomnost nádorových buněk aktivací, následkem je nejen rozvoj protinádorové imunity, ale i aktivace složek podporujících progresi nádorového bujení – některé cytokiny a růstové faktory produkované buňkami imunitního systému zároveň podporují proliferaci nádorových buněk a stimulují tvorbu jeho cévního zásobení, proteolytické enzymy umožňují invazi nádorových buněk apod. (16).

Charakteristickým rysem makrofágů (detekovaných nejčastěji dle exprese CD 68) v prostředí tumoru je prolifinání se pro- a protinádorového vlivu prakticky ve všech oblastech jejich působení. Protinádorové působení má charakter přímého zabíjení a v ojedinělých případech mohou být makrofágy antigen prezentujícími buňkami. Pronádorové působení spočívá v produkci růstových a angiogenních faktorů a v uvolňování enzymů degradujících extracelulární matrix (podílí se na invazivitě růstu tumoru i na angiogenezi) (16). Prediktivní význam přítomnosti makrofágů v tumoru pravděpodobně nebyl blíže zkoumán. Po chemoterapii je u karcinomu rekta popisováno zvýšení počtu makrofágů (3).

Dendritické buňky jsou hlavními antigen prezentujícími buňkami. Význam dendritických buněk v protinádorové imunitě je stěžejní. Efektorovými buňkami protinádorové imunity jsou hlavně T lymfocyty, k jejichž aktivitě je nutná správná antigenní stimulace dendritickými buňkami. Nevyzrálé dendritické buňky myeloidního původu jsou charakterizovány receptorovou výbavou sloužící k rozpoznávání antigenů a schopnosti fagocytózy, jejich znakem (námi používaným k detekci) je CD 1a. Antigen je po vstupu do buňky následně zpracován na krátké peptidové fragmenty, tyto jsou navázány na molekuly HLA a exprimovány na povrchu buňky, dochází ke ztrátě exprese CD 1a a přibývá exprese CD 83. Poté dochází k migraci dendritických buněk do spádové lymfatické uzliny, kde dochází ke kontaktu s lymfocyty. Dalším obecně užívaným markerem pro dendritické buňky, nezávisle na stavu jejich aktivace je S 100 protein. Přítomnost S 100 nebo CD 83 pozitivních dendritických buněk je spojována s lepší prognózou nádorových onemocnění, používají se také k nádorové terapii (6, 13, 16). Vztah dendritických buněk a chemoterapie zatím podrobně studován nebyl.

B lymfocyty pravděpodobně nemají zásadní úlohu v oblasti nádorové imunity, nicméně protilátky jimi tvořené umocňují tumoricidní účinky elementů přirozené imunity. V rámci T lymfocytů lze identifikovat pomocné induktorové CD 4 pozitivní a tlumivé cytotoxické CD 8 pozitivní. Právě ty hrají nejdůležitější úlohu v protinádorové imunitě, způsobují apoptózu

cílových buněk (16). Vyšší četnost lymfocytů je obvykle spojována s lepší prognózou nádorových onemocnění (4, 7). Literárně není jednota v používání termínu tumor infiltrující lymfocyty. Většinou jsou tímto termínem míněny všechny lymfocyty v okolí tumoru (4), v některých novějších pracích jsou jako tumor infiltrující lymfocyty označovány lymfocyty přítomné přímo mezi nádorovými buňkami, jejich vztah k prognóze je pravděpodobně těsnější (7). Vztah chemoterapie a lymfocytů v tumoru byl zatím sledován pravděpodobně pouze v ojedinělých pracech. Demaria a kol. (7) hodnotili v souboru o 25 pacientech semikvantitativně pouze intraepiteliální lymfocyty. Prediktivní význam výskytu tumor infiltrujících lymfocytů v jejich práci prokázán nebyl, po chemoterapii došlo ke zvýšení počtu tumor infiltrujících lymfocytů. Autoři to interpretují jako následek snadnější prezentace antigenů z apoptoticky změněných nádorových buněk (7).

NK buňky jsou důležitou komponentou v protinádorové imunitě, jejich studium je poměrně obtížné (protože část znaků mají společných s lymfocyty). Prognostický a prediktivní význam jejich výskytu v tumoru byl sledován pouze v ojedinělých studiích. U karcinomu prsu jedinou nalezenou práci s hodnotitelnými výsledky byla práce Arnoulda a kol. (2) srovnávající četnost NK buněk u tumorů s overexpresí HER2 léčených nebo neléčených trastuzumabem.

Granulocyty nejsou nejzásadnější komponentou protinádorové imunity. Prognostický význam je popisován výskytu eozinofilů v nádorovém stromatu u karcinomu děložního čípku, kde se tyto elementy vyskytují také s vyšší četností než v ostatních tumorech včetně karcinomu prsu (20). Neutrofilů se týká práce Baetena a kol. srovnávající vzorky karcinomu rekta před a po radioterapii nebo chemoradioterapii, popisuje ve vzorcích z tumoru při obou typech terapie i v normální sliznici vzestup četnosti CD 16 pozitivních elementů po terapii (3).

Žírné buňky jsou elementy důležité produkci řady biologicky aktivních látek, podílí se na angiogenezi a na utváření charakteru stromatu. Prognostický význam žírných buněk je zmiňován jen ojediněle. V jediné nalezené práci zkoumající výskyt mastocytů ve stromatu karcinomu prsu na tissue microarrayích nebyl shledán prognostický význam (1). V jiných pracech je udáváno, že výskyt žírných buněk ve spádových lymfatických uzlinách u karcinomu prsu je spojován s delším přežitím (14, 26).

Nádorové stroma má jisté typické charakteristiky. Jednou z nich je přítomnost myofibroblastů (tj. SMA pozitivita stromatu), u duktálních karcinomů prsu je častá také negativita exprese CD 34 ve stromatu. Podobné změny jsou ve stromálních elementech patrné i za podmínek normální reparace (8, 11). Změny nádorového stromatu za podmínek chemoterapie pravděpodobně dosud nebyly sledovány.

2. Cíle studie

1. vypracování metodiky k hodnocení a zhodnocení vybraných parametrů ve vzorcích karcinomu prsu před a po chemoterapii

Sledované parametry:

- vybrané histologické charakteristiky tumoru – přítomnost in situ komponenty, nekróz, vrůstání tumoru do tukové tkáně, vrůstání mezi lalůčky normální prsní žlázy, celularita tumoru a zastoupení tukové tkáně ve stromatu.
- standardně vyšetřované prognostické markery – estrogenové a progesteronové receptory, p53, Ki67, HER2
- markery angiogeneze – VEGF v nádorových buňkách i ve stromálních elementech, kvantifikace kapilár a hodnocení jejich vyzrávání pomocí endoteliálních (CD 31, CD 34, CD 105) a pericytárních (SMA) markerů
- zánětlivý infiltrát – morfologicky (makrofágy, lymfocyty, neutrofilové, eozinofily a žírné buňky) a imunohistochemicky (CD 68, CD 1a, CD 83, S 100, CD 56)
- některé charakteristiky nádorového stromatu – exprese CD 34 a SMA

2. sledování rozdílů v těchto parametrech mezi vzorky před a po chemoterapii s cílem sledování vlivu chemoterapie
3. porovnání rozdílů ve vzorcích před chemoterapií ve skupinách s patologickou kompletní a bez ní s cílem zhodnocení prediktivního významu hodnocených parametrů

3. Materiál a metodika

U každé ze 73 pacientek (vybraných ze základního souboru pacientek sledovaných na Klinice onkologie a radioterapie FN Hradec Králové, léčených neoadjuvantní chemoterapií – kombinací paclitaxelu a doxorubicinu – v letech 1998-2003 na základě dostatečného množství materiálu získaného punkční biopsií nádoru) byl vyšetřován materiál z jehlové biopsie prsu nebo drobné kožní excize (u tumorů infiltrujících kůže) odebraný před podáním neoadjuvantní chemoterapie a následně resekát prsu. Materiál byl fixován 10% formalinem, standardně zpracován a zalit v parafinu. Řezy silné 4 µm byly barveny hematoxylinem eosinem a dle May-Grünwald-Giemsy. Imunohistochemická barvení byla prováděna streptavidin-biotinovou metodou s peroxidázovým detekčním systémem (EnVision, DAKO).

Tab. 1: Použité markery pro imunohistochemické vyšetření:

marker	klon	Firma	ředění
SMA	1A4	DAKO	1:200
CD 34	QBEnd 10	DAKO	1:50
CD 31	JC70A	DAKO	1:10
CD 105	SN6h	DAKO	1:5
VEGF	polyklonální	NeoMarkers	1:200
CD 68	KP1	DAKO	1:400
CD 3	polyklonální	DAKO	1:100
CD 56	1B6	Novocastra	1:100
CD 83	1H4b	Novocastra	1:20
CD 1a	O10	DAKO	1:100
S 100	polyklonální	Bio-Genex	1:4000
ER	1D5	DAKO	1:75
PR	PgR636	DAKO	1:300
p53	DO-7	DAKO	1:150
Ki67	MIB-1	DAKO	1:30

Histologický typ tumoru a stupeň diferenciace byly hodnoceny podle klasifikace WHO (25). V některých případech byl nádor v resekátu po chemoterapii natolik regresivně změněný, že nebylo možno zhodnotit přesný subtyp tumoru ani stupeň diferenciace.

Dále byla hodnocena přítomnost in situ a invazivní komponenty tumoru, přítomnost nektróz v obou komponentách tumoru, jeho celularita, procento tukové tkáně ve stromatu, přítomnost invazivního tumoru mezi lalůčky normální prsní žlázy a přítomnost přímého prorůstání invazivního tumoru do tukové tkáně. Ve vzorcích po chemoterapii byly dále hodnoceny regresivní změny: přítomnost kalcifikací v in situ komponentě, v invazivní komponentě i ve stromatu, přítomnost známek hyalinizace stromatu, přítomnost atypii v epitelu normální prsní žlázy a přítomnost dilatace větších ductů normální prsní žlázy.

Pro estrogenové a progesteronové receptory bylo hodnoceno imunoreaktivní skóre (IRS) dle metodiky Remmeleho a Stegnera (21). Semikvantitativní (negativita, slabá pozitivita, středně silná pozitivita, silná pozitivita) a procentuální hodnocení bylo použito u exprese p53 a procentuální hodnocení u exprese Ki67. Skórovací systém pro expresi HER2 byl používán dle doporučení výrobce kitu (0 – negativita nebo membránová pozitivita na méně než 10 % nádorových buněk, 1 – slabá nekompletní membránová pozitivita alespoň na 10 %

nádorových buněk, 2 – slabá kompletní membránová pozitivita alespoň na 10 % nádorových buněk, 3 – silná kompletní membránová pozitivita alespoň na 10 % nádorových buněk). Kvantifikace kapilár byla (v tumoru i ve stromatu terminální duktulolobulární jednotky) prováděna mírně modifikovanou Weidnerovou metodikou. Při malém zvětšení (40x) byla vybírána místa s největším počtem kapilár, ve kterých pak při zvětšení 400x (při průměru zorného pole 0,5 mm) byly spočítány luminizované kapiláry do průměru 10 µm. Vybírána byla – vzhledem k různé velikosti hodnocených vzorků (s různým počtem ložisek s největším počtem kapilár) pouze jedna maximální hodnota. Tato metodika byla použita pro kvantifikaci dle endoteliálních i pericytárních markerů. Tuto modifikaci (vynucenou různou velikostí vzorků před a po chemoterapii) jsme srovnávali na souboru deseti pacientek se standardní Weidnerovou metodikou (27). Na základě tohoto srovnání jsme zjistili, že výsledky z kvantifikace kapilár pomocí endoteliálních markerů lze používat celkem bez omezení, výsledky z kvantifikace pomocí SMA jsou postačující pro hodnocení prediktivního významu, pro srovnávání vzorků před a po chemoterapii metodicky zcela vhodné nejsou. Expresse VEGF byla hodnocena semikvantitativně (negativita, slabá pozitivita, středně silná pozitivita, silná pozitivita), a to selektivně v nádorových buňkách a v histiocytech ve stromatu nádoru i v lalůčcích normální prsní žlázy.

Kvantifikace zánětlivých elementů byla v barvení dle May-Grünwald-Giemsy počítána ve třech zorných polích při zvětšení 400x. Počítali jsme histiocyty, lymfocyty, neutrofilly, eozinofily a žírné buňky. Zvlášť byly počítány elementy v nádorovém stromatu a zvlášť intraepiteliálně. Z takto získaných hodnot byly počítány průměrné hodnoty a také procentuální zastoupení jednotlivých elementů. Dále byla zvlášť pro každý typ elementů vyhledávána místa s maximálním počtem hodnocených elementů. Pro hodnocení speciálních imunohistochemických markerů – CD 68, CD 3, CD 56, CD 83, CD 1a a S 100 byla použita obdobná metodika. V případě zastižení v řezu byly počítány i četnosti v in situ komponentě tumoru a v terminálních duktulolobulárních jednotkách, ve vzorcích z resektátů byly počítány i maximální hodnoty v dilatovaných vývodech prsní žlázy.

Expresse SMA a CD 34 ve stromatu byla hodnocena semikvantitativně (negativita, slabá pozitivita, středně silná pozitivita, silná pozitivita). Hodnoceno bylo stroma nádoru i stroma v lalůčcích normální prsní žlázy neinfiltrované invazivním tumorem.

Statistické zpracování dat bylo provedeno za použití programu NCSS (počítačové zpracování provedl prof. MUDr. Bohuslav Melichar Ph.D.).

4. Výsledky

Věk pacientek v souboru se pohyboval od 22 do 75 let, medián věku 56 let (průměr 57 let).

Tab. 2: Histologický typ tumoru ve vzorcích před chemoterapií:

	počet	%
duktální	53	73 %
lobulární	13	18 %
ostatní	7	9 %

Tab. 3: Histologický typ tumoru ve vzorcích po chemoterapii – v některých případech se vzhledem k regresivním změnám nebylo možno k typu tumoru vyjádřit:

	počet	%
duktální	37	58 %
lobulární	10	16 %
ostatní	8	13 %
regresivně změněný	8	13 %

Tab. 4: Rozdělení souboru dle Millerovy a Payneovy klasifikace:

stupeň dle Millerovy a Payneovy klasifikace	definice jednotlivých skupin*	počet	% ze všech resekátů	počet tumorů s pozit. uzlinami	% z dané skupiny
1	bez snížení celularity	21	29 %	9	43 %
2	snížení celularity do 30 %	7	10 %	3	43 %
3	snížení celularity o 30 až 90 %	19	26 %	7	37 %
4	snížení o více než 90 %	12	16 %	5	42 %
5	bez reziduálního invazivního tumoru	14	19 %	1	7 %

*V tabulce je oproti klasické definici dle Millera a Paynce obměna v označení stupně 1 – původně je definován jako bez změny celularity; protože v našem souboru v některých případech celularita vzrostla, použili jsme termín bez snížení celularity.

Tab. 5: Změna celularity tumoru po chemoterapii ve vztahu k četnosti metastatického postižení lymfatických uzlin v jednotlivých skupinách:

	počet	%	počet tumorů s pozit. uzlinami	% z dané skupiny
snížení celularity	38	64 %	15	39 %
změna celularity do 5 %	11	19 %	5	50 %
zvýšení celularity	10	17 %	4	40 %

Tab. 6: Rozdělení souboru dle Chevallierovy klasifikace s četností metastatického postižení lymfatických uzlin v jednotlivých skupinách:

stupeň dle Chevallierovy klasifikace	definice jednotlivých skupin*	počet	% ze všech resekátů	počet tumorů s pozit. uzlinami	% z dané skupiny
1	bez reziduálního tumoru	10	14 %	0	0 %
2	bez invazivního reziduálního tumoru	4	5 %	1	25 %
3	reziduální invazivní tumor s postchemoterapeutickými změnami v nádorových buňkách nebo ve stromatu	39	54 %	15	39 %
4	reziduální invazivní tumor bez postchemoterapeutických změn	20	27 %	9	45 %

*V tabulce je oproti klasické definici dle Chevalliera obměna v označení stupně 4 – původně je definován jako chemoterapie bez efektu, což se dle našich zkušeností nekryje zcela s chyběním regresivních změn v tumoru – ve skupině 4 bylo přítomno 5 tumorů (25 % z dané skupiny), u kterých nebyl tumor v resekátu makroskopicky identifikovatelný, což – přestože neznáme velikost původního tumoru – nelze označit jako chemoterapii bez efektu.

Tab. 7: Srovnání histologických a imunohistochemických parametrů v invazivním tumoru před neoadjuvantní chemoterapií u pacientů s patologickou kompletní odpovědí a bez ní.

parametr	pCR (n = 10)	non pCR (n = 63)	p
stupeň diferenciace (skóre)	2,3 ± 0,7	2,4 ± 0,6	0,53
celularita tumoru (%)	57 ± 25	47 ± 21	0,22
zastoupení tukové tkáně ve stromatu (%)	11 ± 10	11 ± 15	0,41
přítomnost in situ komponenty (0,1)	0,1 ± 0,32	0,14 ± 0,35	0,72
přítomnost nekrózy v invazivním tumoru (0,1)	0,2 ± 0,42	0,18 ± 0,39	0,86
přítomnost invazivního tumoru mezi lalůčky normální prsní žlázy (0,1)	0,8 ± 0,45	0,96 ± 0,19	0,16
přítomnost přímého kontaktu nádorových buněk a tukové tkáně (0,1)	0,7 ± 0,48	0,54 ± 0,5	0,35
p53 (skóre)	1,5 ± 1,3	0,6 ± 0,9	0,01
p53 (%)	31 ± 38	13 ± 27	0,03
estrogenový receptor (IRS)	5 ± 5	5 ± 5	0,80
progesteronový receptor (IRS)	1 ± 3	4 ± 4	0,01
HER-2 (skóre)	1,1 ± 1,2	1,0 ± 1,0	0,84
Ki-67 (%)	36 ± 26	26 ± 20	0,30
VEGF v nádorových buňkách invazivního tumoru (skóre)	2,0 ± 1,2	2,1 ± 0,9	0,91

VEGF ve stromálních buňkách invazivního tumoru (skóre)	2,3 ± 1,3	2,8 ± 0,7	0,18
CD31 ⁺ kapiláry (na HPF)	6 ± 2	5 ± 2	0,09
CD105 ⁺ kapiláry (na HPF)	3 ± 3	4 ± 2	0,70
CD34 ⁺ kapiláry (na HPF)	7 ± 2	7 ± 3	0,85
SMA ⁺ kapiláry (na HPF)	0,3 ± 0,7	0,7 ± 1,1	0,41
intraepiteliální histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 1	1 ± 3	0,76
intraepiteliální histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,54
stromální histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	2 ± 3	7 ± 15	0,15
stromální histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 1	0 ± 1	0,19
intraepiteliální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	27 ± 53	7 ± 8	0,18
intraepiteliální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	13 ± 23	3 ± 5	0,11
stromální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	151 ± 142	127 ± 92	0,93
stromální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	59 ± 50	48 ± 41	0,47
intraepiteliální CD83⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0,8 ± 1,6	0,1 ± 0,6	0,02
intraepiteliální CD83 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0,1 ± 0,2	0 ± 0,1	0,32
stromální CD83 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	3,8 ± 3,9	3,3 ± 5,7	0,25
stromální CD83 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,9	0,60
intraepiteliální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0,6 ± 1,9	2,1 ± 5,3	0,50
intraepiteliální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0,3 ± 1,1	0,5 ± 2,1	0,99
stromální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	1,3 ± 3,5	0,7 ± 2,1	0,96
stromální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,4	0,83
intraepiteliální S100 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 0	0,2 ± 0,8	0,31
intraepiteliální S100 ⁺ lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0,1	0,69
stromální S100 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0,4 ± 1,0	1,7 ± 7,7	0,93
stromální S100 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0,1 ± 0,4	0,48
intraepiteliální lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	7 ± 6	5 ± 5	0,19
intraepiteliální lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	4 ± 3	3 ± 3	0,11
stromální lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	277 ± 305	355 ± 412	0,47
stromální lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	50 ± 62	62 ± 80	0,21
intraepiteliální CD3⁺ lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	14 ± 14	5 ± 7	0,004
intraepiteliální CD3⁺ lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	7 ± 8	2 ± 3	0,05
stromální CD3 ⁺ lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	263 ± 251	213 ± 162	0,76
stromální CD3 ⁺ lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	34 ± 30	46 ± 51	0,61
intraepiteliální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,69
intraepiteliální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	1,00
stromální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	1,2 ± 3,8	0,3 ± 1,1	0,90
stromální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0,1 ± 0,2	0 ± 0	0,13
intraepiteliální neutrofilů v inv. tumoru (max. na HPF)	1 ± 1	3 ± 15	0,23
intraepiteliální neutrofilů v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	1 ± 6	0,33
stromální neutrofilů v inv. tumoru (max. na HPF)	9 ± 13	12 ± 24	0,42
stromální neutrofilů v inv. tumoru (prům. na HPF)	3 ± 5	5 ± 18	0,38
intraepiteliální mastocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,48
intraepiteliální mastocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,48
stromální mastocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	4 ± 3	5 ± 6	0,88
stromální mastocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	1 ± 1	1 ± 1	0,9
exprese CD 34 v nádorovém stromatu (skóre)	0 ± 0	0,3 ± 0,6	0,10
exprese SMA v nádorovém stromatu (skóre)	1,6 ± 0,8	2,2 ± 0,8	0,04

pCR patologická kompletní odpověď; non pCR bez patologické kompletní odpovědi; HPF pole velkého zvětšení

Tab. 8: Srovnání histologických a imunohistochemických parametrů v invazivním tumoru před a po neoadjuvantní chemoterapii

parametr	před NCHT	po NCHT	p
stupeň diferenciacie (skóre)	2,4 ± 0,5	2,5 ± 0,5	0,49
celularita tumoru (%)	47 ± 21	33 ± 28	0,001
zastoupení tukové tkáně ve stromatu (%)	10 ± 15	16 ± 25	0,25
přítomnost in situ komponenty (0,1)	0,14 ± 0,35	0,41 ± 0,5	0,0003
přítomnost nekrózy v invazivním tumoru (0,1)	0,18 ± 0,39	0,11 ± 0,31	0,25

přítomnost inv. tumoru mezi lalůčky normální prsní žlázy (0,1)	1 ± 0	0,67 ± 0,33	0,01
přítomnost přímého kontaktu nádorových buněk a tukové tkáně (0,1)	0,53 ± 0,5	0,56 ± 0,5	0,65
p53 (skóre)	0,6 ± 0,9	0,7 ± 1,0	0,09
p53 (%)	11 ± 25	12 ± 23	0,47
estrogenový receptor (IRS)	6 ± 5	5 ± 4	0,43
progesteronový receptor (IRS)	4 ± 4	5 ± 5	0,09
HER-2 (skóre)	0,9 ± 1,0	1,1 ± 1,0	0,47
KI-67 (%)	26 ± 20	16 ± 21	0,0002
VEGF v nádorových buňkách invazivního tumoru (skóre)	2,1 ± 1,0	1,7 ± 0,9	0,04
VEGF ve stromálních buňkách invazivního tumoru (skóre)	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,7	0,02
CD31⁺ kapiláry (na HPF)	5 ± 2	6 ± 3	0,004
CD105 ⁺ kapiláry (na HPF)	4 ± 2	3 ± 3	0,51
CD34⁺ kapiláry (na HPF)	7 ± 3	9 ± 4	0,0003
SMA⁺ kapiláry (na HPF)	1 ± 1	3 ± 3	0,00001
intraepiteliální histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	1 ± 3	2 ± 6	0,02
intraepiteliální histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	1 ± 3	0,16
stromální histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	7 ± 15	39 ± 49	0,00000
stromální histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 1	1 ± 2	0,08
intraepiteliální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	7 ± 7	10 ± 13	0,17
intraepiteliální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	3 ± 5	3 ± 6	0,34
stromální CD68 ⁺ histiocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	124 ± 90	104 ± 83	0,17
stromální CD68⁺ histiocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	48 ± 42	30 ± 32	0,003
intraepiteliální CD83 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 1	0 ± 1	0,52
intraepiteliální CD83 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,58
stromální CD83⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	3 ± 4	11 ± 19	0,0002
stromální CD83⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 1	1 ± 2	0,01
intraepiteliální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	2 ± 5	2 ± 5	0,13
intraepiteliální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 2	0 ± 1	0,30
stromální CD1a⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	1 ± 2	4 ± 14	0,01
stromální CD1a ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	1 ± 3	0,19
intraepiteliální S100 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 1	1 ± 2	0,22
intraepiteliální S100 ⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,33
stromální S100⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	2 ± 8	5 ± 9	0,0005
stromální S100⁺ dendritické buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	1 ± 2	0,01
intraepiteliální lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	5 ± 5	7 ± 10	0,34
intraepiteliální lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	3 ± 3	3 ± 4	0,85
stromální lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	322 ± 364	640 ± 613	0,0001
stromální lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	61 ± 82	57 ± 133	0,01
intraepiteliální CD3⁺ lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	5 ± 6	10 ± 16	0,05
intraepiteliální CD3 ⁺ lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	2 ± 3	3 ± 6	0,80
stromální CD3⁺ lymfocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	205 ± 156	359 ± 373	0,004
stromální CD3 ⁺ lymfocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	44 ± 51	41 ± 90	0,08
intraepiteliální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	1,0
intraepiteliální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,33
stromální CD69⁺ NK buňky v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 1	2 ± 6	0,01
stromální CD69 ⁺ NK buňky v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,32
intraepiteliální neutrofily v inv. tumoru (max. na HPF)	2 ± 8	2 ± 7	0,19
intraepiteliální neutrofily v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 2	1 ± 4	0,36
stromální neutrofily v inv. tumoru (max. na HPF)	11 ± 24	29 ± 79	0,0007
stromální neutrofily v inv. tumoru (prům. na HPF)	5 ± 18	4 ± 6	0,22
intraepiteliální mastocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	0 ± 0	0 ± 2	0,09
intraepiteliální mastocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	0 ± 0	0 ± 0	0,5
stromální mastocyty v inv. tumoru (max. na HPF)	5 ± 6	10 ± 10	0,00005
stromální mastocyty v inv. tumoru (prům. na HPF)	1 ± 1	3 ± 4	0,0002
exprese CD 34 v nádorovém stromatu (skóre)	0,3 ± 0,6	0,5 ± 0,7	0,02
exprese SMA v nádorovém stromatu (skóre)	2,2 ± 0,8	1,9 ± 1	0,14

NCHT neoadj. u jvnutí chemoterapie, HPF pole velkého zvětšení

5. Diskuse

Náš studovaný soubor je celkem srovnatelný se soubory z ostatních prací o karcinomech prsu léčených neoadjuvantní chemoterapií (19). Ze 73 pacientek dospělo 10 pacientek (14 %) k patologické kompletní odpovědi na chemoterapii (tj. nepřítomnosti tumoru v resektátu po chemoterapii). Histologické známky regresivních změn v nádorových buňkách se proti literárním údajům značně lišily. Obecně je jako typický znak pro nádorové buňky po chemoterapii udávána výrazná vakuolizace cytoplazmy (17). Tento jev byl v našem souboru zachycen zcela ojediněle, odlišení nádorových buněk od makrofágů rozhodně nečinilo obtíže. Tento rozdíl by mohl být způsoben typem chemoterapie. Ve shodě s předcházejícími pracemi byla i v našem souboru patrná hyalinizace stromatu, vyšší četnost kalcifikací v různých lokalizacích a regresivní změny či atypie v normální prsní žláze. Atypie epitelu byly někdy značné (a to zejména ve skupině Chevallier 2). Odlišení od reziduálního tumoru rostoucího in situ bylo v některých případech velice obtížné. Po chemoterapii došlo ke statisticky významnému poklesu celularity tumoru, což je v souladu s přecházejícími pracemi (19). Dle stupně regresivních změn bylo provedeno rozdělení dle Chevallierovy (12) klasifikace, dle změny celularity byl soubor rozdělen dle klasifikace dle Millera a Paynea (19). Ani jedna z těchto klasifikací se pro náš soubor nejeví jako optimální. U klasifikace Chevallierovy (12) narážíme jednak na problém definice pojmu regresivní změny a dále na charakteristiku stupně Chevallier 4 (tj. že se v našem souboru nekryje nepřítomnost regresivních změn v tumoru s chemoterapií bez efektu), u klasifikace dle Millera a Paynea (19) na naprostou odlišnost rozložení četností zastoupení případů v jednotlivých skupinách v našem souboru než je popisováno v původní práci. Literárně je popisována prognostická významnost kompletní patologické odpovědi na chemoterapii (ať definované jako Chevallier 1 nebo Chevallier 2) a je také popisována řada klasifikací pokoušejících se rozčlenit dále skupinu pacientek s parciální odpovědí na chemoterapii, za účelem možnosti diverzifikace další následné péče o tyto pacientky. Klasifikace jsou velmi různorodé a jsou závislé na různé sestavených souborech a odlišném typu použité chemoterapie (12, 17, 19). Z našeho srovnání několika klasifikací je bohužel patrné, že velmi pravděpodobně nelze stanovit jeden obecný nejvhodnější způsob klasifikace stupně odpovědi na chemoterapii.

Poměrně zajímavý je také výsledek zvýšení četnosti přítomnosti in situ komponenty tumoru po chemoterapii. Jistě to lze z části vysvětlit nižší možností zachytu in situ komponenty v jehlové biopsii, nicméně v literatuře je to v jednom případě randomizované studie taktéž popisováno (22). Naopak byl shledán pokles přítomnosti invazivního vrůstání tumoru mezi lalůčky normální prsní žlázy.

Z výsledků při sledování na našem pracovišti standardně vyšetřovaných prognostických markerů (hormonální receptory, proliferací antigen Ki 67, onkoprotein p53 a onkoprotein HER2 neu) neplynou zásadnější závěry, jež by nebyly známy z dřívějších prací, což celkem potvrzuje srovnatelnost našeho souboru se soubory ve starších pracích (9, 15, 17). Problematika hodnocení angiogeneze v souboru pacientek léčených neoadjuvantní chemoterapií je vzhledem k různé velikosti vzorků před a po chemoterapii dosti metodicky obtížná. Příspěsem metodiky kvantifikace kapilár dle Weidnera (27) umožnilo hodnocení prediktivního významu pomocí kvantifikace endoteliálních i pericytárních markerů (prediktivní význam nebyl zjištěn) a srovnání stavu angiogeneze před a po chemoterapii alespoň u endoteliálních markerů, kde nálezy spolu s výsledky z hodnocení exprese vascular endothelial growth factoru ukazují, že po chemoterapii je sice kapilár více, ale nejsou dále angiogenně aktivní. Studium změn v angiogenezi při neoadjuvantní chemoterapii u karcinomu prsu pomocí kvantifikace kapilár se zabývala pravděpodobně pouze jedna práce (18), jejíž autoři popisují menší počet CD 34 pozitivních kapilár v resektátech po neoadjuvantní chemoterapii v porovnání s resektáty bez předchozí chemoterapie. Výsledky jsou tedy odlišné

než v našem souboru, ale je patrna také značná rozlišnost výchozího souboru nemocných (práce byla prováděna na randomizovaném souboru pacientek s nižším stádiem onemocnění, jinou chemoterapií a byla použita jiná metodika hodnocení počtu kapilár). Podobně si vysvětlujeme odlišnost výsledků u exprese VEGF, kdy v jediné nalezené práci u karcinomu prsu po chemoterapii exprese VEGF přetrvávala (24).

Výsledky hodnocení přítomnosti zánětlivých elementů v tumoru přinesly mnoho zajímavých nálezů, z nichž některé otevírají spoustu dalších otázek stran pro- a protinádorového působení zánětlivých elementů. Četnost většiny hodnocených elementů po chemoterapii stoupla (maximální hodnoty makrofágů při kvantifikaci dle morfologie intraepiteliálně i ve stromatu, maximální i průměrné hodnoty CD 83 a S100 pozitivních dendritických buněk a maximální hodnoty CD 1a pozitivních dendritických buněk ve stromatu, maximální i průměrné hodnoty lymfocytů při kvantifikaci dle morfologie ve stromatu, maximální hodnoty CD 3 pozitivních lymfocytů intraepiteliálně i stromálně, maximální hodnoty NK buněk ve stromatu, maximální hodnoty neutrofilů ve stromatu a maximální i průměrné hodnoty mastocytů ve stromatu). Jedinými elementy, u kterých došlo po chemoterapii k poklesu četnosti, byly stromální makrofágy (jejich průměrné hodnoty) kvantifikované dle exprese CD 68. Tyto nálezy ukazují na to, že v tumoru dochází po chemoterapii k zánětlivé odpovědi. O tom, zda je tato reakce nespecifická nebo protinádorová, však můžeme spíše jen spekulovat z rozdílů mezi skupinami, ve kterých došlo ke vzestupu nebo naopak k poklesu celularity tumoru a z rozdílů mezi četnostmi v tumoru a v normální prsní žláze. Například reakce makrofágů byly při obou typech kvantifikace podobné v tumoru i normální prsní žláze, což svědčí spíše pro nespecifický charakter jejich reaktivity, naproti tomu u dendritických buněk a lymfocytů byl vzestup jejich četnosti v tumoru výraznější než v normální prsní žláze, u lymfocytů byl navíc patrný nejvýraznější vzestup jejich četnosti v tumorech, ve kterých došlo k poklesu celularity, z těchto nálezů lze usuzovat na určitou míru protinádorové reaktivity lymfocytů a dendritických buněk potencující přímý účinek chemoterapie na nádorové buňky. Tyto nálezy podporují literární údaje o protinádorovém působení lymfocytů a dendritických buněk (4, 6, 7, 13, 16). Asi nejvýznamnějším nálezem celé práce je zjištění prediktivního významu přítomnosti CD 3 pozitivních lymfocytů a CD 83 pozitivních dendritických buněk intraepiteliálně. Tento nález doplňuje starší údaje o prognostickém významu výskytu těchto elementů v tumoru (4, 6, 7, 13).

Výsledky hodnocení imunofenotypu nádorového stromatu přinesly také zajímavé nálezy. Po chemoterapii došlo k vzestupu exprese CD 34, exprese SMA se příliš nezměnila. Vyšší četnost výskytu patologické kompletní odpovědi na chemoterapii byla u tumorů s nižší expresí SMA. Oba tyto nálezy ukazují na důležitost problematiky nádorového stromatu a vhodnost jejího dalšího studia.

6. Závěr:

1. Bylo provedeno zhodnocení vybraných parametrů ve vzorcích karcinomu prsu před a po chemoterapii. Pro sledování angiogeneze byla upravena metodika dle Weidnera, úprava umožnila hodnocení prognostické významnosti četnosti kapilár při průkazu endoteliálních i pericytárních markerů a srovnání četnosti kapilár u vzorků před a po chemoterapii při průkazu endoteliálních markerů.

2. Bylo provedeno zhodnocení rozdílů ve vybraných parametrech mezi vzorky před a po chemoterapii s cílem sledování vlivu chemoterapie s následujícími výsledky

- vybrané histologické charakteristiky tumoru
 - zvýšení četnosti přítomnosti in situ komponenty a snížení četnosti přítomnosti tumoru mezi lalůčky normální prsní žlázy, snížení celularity tumoru.
- standardně vyšetřované prognostické markery

- snížení exprese Ki67, tedy proliferační aktivity tumoru
- markery angiogeneze
 - pokles exprese VEGF v nádorových buňkách i ve stromálních elementech
 - zvýšení četnosti kapilár při kvantifikaci pomocí endoteliálních markerů CD 31 a CD 34
- zánětlivý infiltrát
 - prakticky u všech hodnocených elementů (s výjimkou CD 68 pozitivních makrofágů) došlo ke vzestupu četnosti alespoň v jedné z hodnocených kategorií
- některé charakteristiky nádorového stromatu
 - zvýšil se stupeň exprese CD 34

3. Bylo provedeno porovnání rozdílů ve vzorcích před chemoterapií ve skupinách s patologickou kompletní a bez ní. Prediktivní význam byl zjištěn u semikvantitativního a procentuálního hodnocení exprese p53, při hodnocení IRS skóre progesteronových receptorů v nádorových buňkách invazivního tumoru, dále u maximálních intraepiteliálních četností CD 83 pozitivních dendritických buněk a u maximálních a průměrných intraepiteliálních četností CD 3 pozitivních lymfocytů v invazivním tumoru a také u exprese SMA ve stromatu invazivního tumoru.

7. Literatura

1. Amini RM, Aaltonen K, Nevanlinna H, Carvalho R, Salonen L, Heikkilä P, Blomqvist C: Mast cells and eosinophils in invasive breast carcinoma. *BMC Cancer* 7:165, 2007.
2. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, Cabaret V, Fermeaux V, Bertheau P, Garnier J, Jeannin JF, Coudert B: Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism?. *Br J Cancer* 94:259-67, 2006.
3. Baeten CI, Castermans K, Lammering G, Hillen F, Wouters BG, Hillen HF, Griffioen AW, Baeten CG: Effects of radiotherapy and chemotherapy on angiogenesis and leukocyte infiltration in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:1219-1227, 2006.
4. Black MM, Speer FD, Opler SR: Structural representations of tumor-host relationships in mammary carcinoma; biologic and prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 26:250-65, 1956.
5. Boudreau N, Myers C: Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res* 5:140-6, 2003.
6. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L: Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 29:1247-55, 2001.
7. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Yee HT, Oratz R, Formenti SC, Muggia F, Symmans WF: Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7:3025-30, 2001.
8. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G: The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48:509-17, 2004.
9. Charfare H, Limongelli S, Purushotham AD: Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Br J Surg* 92:14-23, 2005.
10. Charpin C, Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Djemli A, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P: Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res* 10:5815-9, 2004.
11. Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL: There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 56:271-6, 2003.

12. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P: Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol* 16:223-8, 1993.
13. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M, Tanigawa N: Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 104:92-7, 2003.
14. Jansa P, Riegrová D: Morfologické koreláty protinádorové imunity. IV. Mastocyty v regionálních lymfatických uzlinách. *Cesk Patol* 20:85-9, 1984.
15. Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlbock M, Gnant M, Steger G, Jakesz R: TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6:50-6, 2000.
16. Krejsek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004.
17. Länger F, Lück HJ, Kreipe HH: Therapieinduzierte Tumorregression beim Mammakarzinom. *Pathologe* 25:455-60, 2004.
18. Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, Dowsett M, Ashley SE, Harris AL: Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma. *Cancer* 85:1996-2000, 1999.
19. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, Schofield A, Heys SD: A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 12:320-7, 2003.
20. Pastrňák A, Jansa P: Morfologické koreláty protinádorové imunity. V. eozinofilní granulocyty ve stromatu karcinomů. *Cesk Patol* 20:90-3, 1984.
21. Remmele W, Stegner HE: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktives Score (IRS) für immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8:138-40, 1987.
22. Sharkey FE, Addington SL, Fowler LJ, Page CP, Cruz AB: Effects of preoperative chemotherapy on the morphology of resectable breast carcinoma. *Mod Pathol* 9:893-900, 1996.
23. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspen F, van de Kerkhof PC, de Waal RM, Ruiter DJ: Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol* 138:1335-47, 1991.
24. Singh M, Capocelli KE, Marks JL, Schleicher RB, Finlayson CA, Seligman PA: Expression of vascular endothelial growth factor and proliferation marker MIB1 are influenced by neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:147-56, 2005.
25. Tavasoli FA, Deviler P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. In Kleihues P, Sogin LH eds. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press, 2003.
26. Theoharides TC, Conti P: Mast cells: the JEKYLL and HYDE of tumor growth. *Trends Immunol* 25:235-41, 2004.
27. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8, 1991.

8. Souhrn

Úvod

Neoadjuvantní chemoterapie se používá v léčbě pacientů s pokročilejším stadiem karcinomu prsu, účelem je zejména zmenšit nádorovou masu před chirurgickým zákrokem. V současné době je známa řada morfologických a imunofenotypických změn (exprese hormonálních receptorů, proliferačních markerů, HER2, apod.), ke kterým dochází v souvislosti

s chemoterapií. Nicméně málo je známo o angiogenezi, infiltraci zánětlivými elementy nebo stromální reakci a o prediktivním významu těchto faktorů. Rovněž nejsou známé faktory, podle kterých by bylo možné predikovat odpověď na neoadjuvantní léčbu.

Metodika

U 73 pacientek léčných neoadjuvantní chemoterapií (paclitaxel, doxorubicin) byly vyšetřovány vzorky z biopsie odebírané před léčbou (jehlová biopsie nebo kožní excize) a resektát prsu (mastektomie nebo kvadrantektomie). Tkáň byla rutinně zpracována a barvena hematoxylinem eosinem a dle May Grünwald Giemsa. Imunohistochemicky byla vyšetřována exprese SMA (kapiláry s vyzrálými pericyty, exprese ve stromatu); CD 34 (kapiláry, exprese ve stromatu); CD 31, CD 105 (kapiláry); VEGF (exprese v nádorových buňkách i v buňkách nádorového stromatu); CD 68, CD 3, CD 56, CD 83, CD 1a, S 100 (exprese v intraepiteliálních a stromálních zánětlivých elementech v tumoru); ER, PR, p53 a Ki67.

Výsledky a diskuse

Ze 73 pacientek dospělo 10 pacientek k patologické kompletní odpovědi na chemoterapii (tj. nepřítomnosti tumoru v resektátu po chemoterapii). Po chemoterapii byla častěji zastižena in situ komponenta tumoru a naopak méně často bylo přítomno invazivní vrůstání tumoru do oblasti terminální duktulolobulární jednotky. Celularita a proliferační aktivita se po chemoterapii snížila, což odpovídá nálezům ze starších prací.

Po chemoterapii byly patrné i změny v angiogenezi. Snížila se exprese VEGF, celkový počet kapilár se zvýšil, nicméně počet angiogenně aktivních CD 105 pozitivních kapilár se nezměnil. Celkový angiogenní potenciál se tedy nezměnil. Tyto výsledky se liší od nálezů ve starších pracech, změny v angiogenezi budou pravděpodobně závislé na typu předcházející chemoterapie.

Počet všech vyšetřovaných zánětlivých elementů se alespoň v jedné ze sledovaných kategorií zvýšil. Výjimkou byly CD 68 pozitivní makrofágy, kde došlo ke snížení jejich četnosti. Zánětlivá reakce může být nespecifická, tento nález však ještě v souvislosti se snížením exprese CD 34 v nádorovém stromatu dokumentuje změny v prostředí tumoru po chemoterapii.

Podobně jako bylo popisováno ve starších pracech, byl v našem souboru ve vzorcích před chemoterapií zjištěn prediktivní význam exprese p53 a PR. U pacientů, jež dospěli k patologické kompletní odpovědi, byly zaznamenány vyšší maximální intraepiteliální četnosti CD 83 pozitivních dendritických buněk a vyšší maximální i průměrné intraepiteliální četnosti CD 3 pozitivních lymfocytů v invazivním tumoru a nižší stupeň exprese SMA v nádorovém stromatu před chemoterapií. Tyto výsledky dokumentují protinádorové působení lymfocytů a dendritických buněk a důležitost nádorového stromatu, zvláště pak přítomnosti myofibroblastů.

9. Summary

Introduction.

Neoadjuvant chemotherapy is used in patients with advanced breast carcinoma to reduce the tumor mass before the surgical treatment. Currently, information about the morphological and immunophenotypic changes (hormonal receptor status, expression of proliferation markers, HER2 etc.) after chemotherapy is available. However, there is only very limited knowledge about the changes in of the angiogenesis, infiltration of inflammatory elements or stromal reaction and about the predictive significance these factors. In addition, no reliable factors predicting success of primary chemotherapy are available.

Methods

In 73 patients treated with neoadjuvant chemotherapy (paclitaxel, doxorubicin), samples from pretreatment biopsy (core cut biopsy or cutaneous excision) and surgical specimens removed after primary chemotherapy (mastectomy, quadrantectomy) were compared. Tissue was

routinely processed and stained with hematoxylin eosin and May-Grünwald-Giemsa stain. Immunohistochemically, alpha-smooth muscle actin (SMA) visualizing capillaries with pericytes, and myofibroblasts in stroma); CD 34 (expressed in endothelial cells of capillaries and in stromal elements); CD 31, CD 105 (capillaries); VEGF (expression in tumor cells and stromal cells); CD 68, CD 3, CD 56, CD 83, CD 1a, S 100 (expression in intraepithelial and stromal inflammatory cells in tumor); ER, PR, p53 and Ki67, were detected.

Results and discussion

From the 73 patients, ten had pathological complete response (no tumor in the posttreatment specimen).

After the chemotherapy, in situ component was more frequently found, whereas invasive growth of the tumor into the terminal ductulobulbary unit was less frequent.

The cellularity and the proliferation activity decreased – this finding is consistent with previous studies.

Certain changes in the angiogenesis after the chemotherapy were observed. The expression of VEGF decreased, the number of all capillaries increased, but the number of CD 105 positive (immature) capillaries were unchanged. Thus, the entire angiogenetic potential was not increased. These results are different from previous studies, changes in angiogenesis are probably dependent on the type of chemotherapy.

Numbers of all studied inflammatory elements (with exception of CD 68 positive macrophages) were generally increased. Inflammatory reaction could be nonspecific, but together with decreased expression of CD 34 in tumor stroma it documents changes in tumor microenvironment after the chemotherapy.

As described in previous studies, there was shown predictive significance of the expression of p53 and PR detected in the pretreatment biopsies. Higher maximal numbers of CD 83 positive intraepithelial dendritic cells, higher maximal and mean numbers of CD 3 positive intraepithelial lymphocytes in invasive tumor and lower expression of SMA in tumor stroma were more frequently found in tumors showing pathological complete response. These results document antitumor activity of lymphocytes and dendritic cells and importance of the role of tumor stroma, namely the presence of myofibroblasts.

10. Seznam publikací

Původní práce

1. Hornychová, H., Rešl, M., Novotný, J., Šimek, J.: Nodulární typ plicní sarkoidózy imitující nádorové onemocnění. *Lék. Zpr. LF UK Hradec Králové* 2002, 47, 5-6: 177-182
2. Hornychová, H., Rešl, M., Buchta, V., Cerman, J.: Generalizovaná mukormykóza jako letální komplikace akutní myeloidní leukemie. *Derma* 2003, III, 3, s. 25-28
3. Hornychová, H., Ryška, A.: Lymfoepiteliální cysta bronchiogenního typu v terénu masivní amyloidózy štítné žlázy. *Čes.-slov. Patol.*, 41, 2005, (2), 71-75
4. Cyrany, J., Kopáčová, M., Hornychová, H., Ryška, A., Rejchrt, S., Bureš, J.: Pneumatosis cystoides intestinalis. A case report and review of the literature. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2005; 3 (2): 68-73
5. Ryška, A., Hornychová, H., Tyčová, V., Cyrany, J., Kopáčová, M.: Pneumatosis cystoides intestinalis – is it possible to diagnose it by fine-needle aspiration cytology? *Diagnostic Cytopathology*, 2006, 34, (11), s. 793-795 **IF=0,786**
6. Hornychová, H., Ryška, A., Betlach, J., Boháč, R., Čížek, T., Tomšová, M., Obermannová, R.: Mucoepidermoid carcinoma of the breast. *Neoplasma* 2007 54, 2, s. 168-172 **IF=1,247**
7. Hornychová, H., Melichar, B., Tomšová, M., Mergancová, J., Urminská, H., Ryška, A.: Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Investigation*, přijato k tisku **IF = 2,106**

Abstrakta

1. Hornychová, H., Uhrin, M.: Diskce arteria hepatica propria. Čes.-slov. Patol. 39, 2003, 4, 4 – abstrakt
2. Ryška, A., Mentzel, T., Hornychová, H., Kohout, A.: Atypický lipomatózní tumor jazyka. Sborník abstrakt 13. sjezdu českých a slovenských patológů s mezinárodní účastí 2005, 1. vyd. s. 53
3. Ryška, A., Mentzel, T., Hornychová, H., Kohout, A., Jirousek, Z., Palas, J., Horák, J., Sochorek, P.: Atypický lipomatózní tumor jazyka – popis 5 případů. Sborník přednášek IX. Seznamy dny 2005, 1. vyd. s. 40-41
4. Keprtová, P., Vižďa, J., Hornychová, H.: Galiová scintigrafie – kasuistika. Abstrakta XLIII. Dny nukleární medicíny, 2006, s. 89
5. Cyrany, J., Kopáčová, M., Hornychová, Dvořák, P., Vacek, Z., Bureš, J.: Pneumatisis cystoides intestinalis. Sborník X. Hradecké gastroenterologické dny, 1. vyd., Ú. n/L, BOS org. S.r.o., 2006, s. 45-46
6. Plíšek, S., Řeháčková, Z., Prášil, P., Ryška, A., Plíšková, L., Čermáková, Z., Hornychová, H.: Letální průběh leptospirózy u 52-letého muže. Abstrakt: X. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech, sborník, 1. vyd., Brno, TA-service, 2006, s. 33
7. Hornychová, H., Melichar, B., Tomšová, M., Ryška, A.: Intratumorální T lymfocyty u karcinomu prsu léčeného neoadjuvantní chemoterapií. Edukační sborník: XXXI. Brněnské onkologické dny, 207, s. 213-215
8. Hornychová, H., Melichar, B., Tomšová, M., Ryška, A.: Intratumoral T lymphocytes are a predictive marker of response to neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma. Virchows Archiv 2007, 451, 2, s. 135 IF = 2,029
9. Hornychová, H., Ryška, A., Melichar, B., Tomšová, M., Hovorková, E., Posltová, M., Kašparová, P., Hornych, P.: Užiti kvantifikace angiogeneze ve vzorcích z jehlové biopsie prsu jako možného predikačního faktoru odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii. Abstrakt: Onkologie v gynekologii a mammologii 2007, 2, s. 28-30

Přednášky:

1. Hornychová, H., Tomšová, M.: Rhizomucor – generalizovaná mykotická infekce. Konference slovenskej mykopatologickej spoločnosti s mezinárodnou účasťou, Tatranská Lomnica, SR, 20.-21. 6. 2002
2. Hornychová, H.: Neobvyklý případ plicní aspergilózy. Konference slovenskej mykopatologickej spoločnosti s mezinárodnou účasťou, Tatranská Lomnica, SR, 20.-21. 6. 2002
3. Hornychová, H., Uhrin, M.: Diskce arteria hepatica propria. 30. sjezd českých patológů, Brno, 23.-24.5.2003
4. Hornychová, H., Ryška, A.: Lymfoepiteliální cista branchiogenního typu v terénu masivní amyloidózy štítné žlázy. 7. Seminář mladých patológů, Litomyšl, 16.- 17. 4. 2004
5. Poláková, H., Karadzós, G., Hornychová, H., Tichý, J.: 10. Karcinoid. Harachovské chirurgické dny, Harachov, 3.-4. 6 2004
6. Ryška, A., Mentzel, T., Hornychová, H., Kohout, A.: Atypický lipomatózní tumor jazyka. 13. sjezd českých a slovenských patológů s mezinárodní účastí, Rožnov p. Radhoštěm, 14. – 16. září 2005
7. Ryška, A., Mentzel, T., Hornychová, H., Kohout, A., Jirousek, Z., Palas, J., Horák, J., Sochorek, P.: Atypický lipomatózní tumor jazyka – popis 5 případů. IX. Seznamy dny, Hradec Králové, 23.-24. září 2005
8. Ryška, A., Hornychová, H., Tyčová, V., Cyrany, J., Kopáčová, M., Bureš, J.: Pneumatisis cystoides intestinalis diagnostikovaná pomocí tenkojehlové aspirační cytologie. XVI. cytologický den, Litomyšl, 27. 9. 2005

9. Hornychová, H., Repák, R., Tyčová, V., Ryška, A., Tomšová, M., Benešová, P., Pohnětalová, D. Tenkojehlová aspirační cytologie a mikrohistologie při endosonografii gastrointestinálního traktu. 9. Sjezd mladých patologů s mezinárodní účastí, Litomyšl, 7. a 8. 4. 2006
10. Keprtová, P., Vižďa, J., Hornychová, H.: Galiová scintigrafie – kasuistika, XLIII. Dny nukleární medicíny. České Budějovice, 1.-3. 11. 2006
11. Hornychová, H., Ryška, A., Melichar, B., Tomšová, M., Hovorková, E., Posltová, M., Kašparová, P., Hornych, P.: Užití kvantifikace angiogeneze ve vzorcích z jehlové biopsie prsu jako možného predikčního faktoru odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii. 12. ročník Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 19.-20. 1. 2007
12. Hornychová, H., Melichar, B. Tomšová, M., Ryška, A.: Intratumorální T lymfocyty u karcinomu prsu léčeného neoadjuvantní chemoterapii. XXXI. Brněnské onkologické dny 23. – 25. dubna 2007