

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



POPULACE BUNĚK KARCINOMU PRSU.

VYUŽITÍ PRO STANOVENÍ OPTIMÁLNÍHO
TERAPEUTICKÉHO POSTUPU.

PREDIKTIVNÍ MODEL.

MUDr. Dušan Kolařík

2016

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

- Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka
- Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.
- Školící pracoviště: gynekologicko-porodnická klinika FN Bulovka
- Školitel: prof. MUDr. Michael Halaška, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH KOMPLETNÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

Abstrakt – česky	4
Abstract – english.....	5
1 Úvod	6
1.1 Karcinom prsu	6
1.2 Prognostické a prediktivní faktory	7
1.2.1 Hormonální receptory (HR).....	7
1.2.2 Proliferační aktivita	10
1.2.3 Parametry apoptózy	12
1.2.4 Biologické markery	16
1.2.5 Buněčná morfologie	23
1.2.6 Velikost primárního nádoru.....	25
1.3 Biopsie sentinelové uzliny.....	25
1.3.1 Historický úvod	25
1.3.2 Proč je hledána alternativa axilární disekce.....	26
1.3.3 Technika	27
1.3.4 Klinické využití	32
2 Pacienti a metodika.....	35
2.1 Soubor pacientů	35
2.2 Cíl práce	35
2.3 Metodika.....	35
2.3.1 Hodnocení tumoru mamograficky	36
2.3.2 Hodnocení tumoru a uzlin pomocí ultrazvuku	36
2.3.3 Ostatní zobrazovací metody	37
2.3.4 Bioptická verifikace.....	37
2.3.5 Označení lokalizace primárního tumoru.....	37
2.3.6 Operace.....	38
2.3.7 Histopatologické hodnocení nádoru a lymfatických uzlin.....	40
2.3.8 Soubor parametrů navržených k hodnocení prognózy karcinomu prsu.....	44
2.4 Statistické hodnocení.....	44
2.4.1 Prediktivní modely	44
2.4.2 Zpracování dat	47
3 Výsledky.....	48
3.1 Úpravy datového souboru před zahájením sestavování regresního modelu	49
3.2 Sestavení logistického regresního modelu.....	50
3.2.1 Predikce na základě dat získaných po operaci („pooperační model“)	50
3.2.2 Tvorba „předoperačního modelu“	60
4 Diskuze	67
4.1 Matematický model a jeho využití v klinické praxi	67
4.1.1 Matematické modelování pro axilární lymfatické postižení u karcinomu prsu	67
4.1.2 Aplikace výsledků našeho modelu	70
4.2 Poznatky o biologické povaze zhoubného onemocnění prsu	71
4.2.1 Velikost nádoru	71
4.2.2 Problematika karcinomu in situ (CIS)	72
4.2.3 Multifokalita nádoru	74
4.2.4 Suspektní nebo pozitivní nález na mizních uzlinách	75
4.3 Problémy predikce axilárních metastáz a možnosti jejich řešení	76
4.3.1 Aplikace modelu na vybrané podskupiny pacientek	79
5 Shrnutí a závěr.....	80
6 Přílohy a dodatky.....	81
6.1 Seznam literatury se vztahem k disertační práci.....	81
6.1.1 Publikace s impact faktorem.....	81
6.1.2 Publikace bez impact faktoru	81
6.2 Seznam použitých zkratk	82
6.3 Seznam použité literatury	83

ABSTRAKT – ČESKY

Východiska

Vlastnosti populace buněk karcinomu prsu se v běžné klinické praxi využívají ke stanovení prognózy zhoubného onemocnění (prognostické faktory) a k předpovědi reaktivity nádoru na určitou léčebnou modalitu (prediktivní faktory). Nezbytným nezávislým prognostickým faktorem u žen s časným karcinomem prsu je také stav axilárních mízních uzlin. Součástí primární operace je proto také chirurgická exstirpace axilárních uzlin a jejich histopatologické vyšetření. Rozsah tohoto výkonu je variabilní, za standardní se v současné době považuje biopsie sentinelové uzliny. Je však možné, že tento typ zákroku není nejvhodnější pro všechny pacientky s primárním prsním karcinomem.

Cíle práce

Cílem této práce je ověřit, je-li s dostatečnou přesností možné předvídat postižení axilárních lymfatických uzlin použitím neoperační metody – tedy vyhodnocením kombinace prognostických a prediktivních faktorů samotného primárního nádoru. Nástrojem pro tuto predikci je matematický model sestavený na základě souboru údajů o pacientkách léčených pro zhoubná onemocnění prsu časných stadií. Použití tohoto modelu v každodenní praxi pak může umožnit přizpůsobení radikality zákroku v axile pro každou individuální pacientku.

Pacienti a metody

V této retrospektivní studii jsme použili údaje 617 žen léčených v přední onkochirurgické jednotce Medicon Praha s.r.o., které byly léčeny primárním operačním zákrokem a při operaci byla z axily získána alespoň jedna lymfatická uzlina. První sada údajů vzešla ze zobrazovacích metod a z histologického hodnocení biopsických vzorků (tzv. „předoperační vlastnosti“), další sada byla zkompletována po operaci – hodnocením histologických preparátů (tzv. „pooperační vlastnosti“). Všechny zjištěné hodnoty byly vloženy metodou „enter“ do logistické regresní rovnice.

Výsledky

Pooperační vlastnosti jsou považovány za věrohodnější, protože mohly vzniknout na základě hodnocení veškerého materiálu nádoru. S jejich použitím byl vytvořen *pooperační model*. Pouze velikost nádoru, lymfovaskulární invaze a zastoupení progesteronových receptorů prokázaly statistickou významnost. Regresní model vykazoval dobré predikční schopnosti – plocha pod křivkou ROC = 0,78. Tato predikční schopnost byla vyšší, pokud se v modelu ponechaly také další vlastnosti, i když nedosahovaly statistické významnosti. Následně byly srovnány předoperační a pooperační hodnoty – pouze grading byl statisticky významně odlišný a proto musel být z modelu vyřazen; stejně tak musela být vyřazena lymfovaskulární invaze, která před operací nebyla k dispozici. Předoperační model vykazoval dobrou predikční schopnost, pokud se použily pooperační hodnoty (ROC = 0.77), ale pouze dostatečnou predikční schopnost, pokud se použily předoperační hodnoty (ROC = 0.66).

Diskuse

Úspěšnost predikce pooperačního modelu je plně srovnatelná s podobnými prediktivními modely dosud publikovanými v literatuře. Pro klinickou praxi je však tento model nepoužitelný, protože pooperační údaje nejsou k dispozici v době stanovení diagnózy. Ačkoliv se předoperačně získané údaje (s výjimkou gradingu) statisticky významně nelišily od pooperačních údajů, jejich dosazením do upravené předoperační regresní rovnice vznikl model, jehož predikční schopnosti jsou obtížně použitelné pro rozhodování v době diagnózy (senzitivita pouze 53%, falešná negativita 48%). Nejdůležitější příčinou tohoto stavu je pravděpodobně heterogenita nádoru, která nedovolí spolehlivě hodnotit vlastnosti nádoru již v době stanovení diagnózy. Pokusili jsme se navrhnout některé modifikace hodnocení nádoru v klinické praxi, které by mohly vést ke zlepšení predikční schopnosti modelu.

Závěry

Náš prediktivní model není v současné době schopen identifikovat ženy s vysokou pravděpodobností přítomnosti nebo naopak absence axilárních metastáz. Nemůže proto spolehlivě nahradit prognostickou informaci získanou exstirpační a histologickým vyšetřením axilárních uzlin.

ABSTRACT – ENGLISH

Background

Breast cancer cell population characteristics are used in common clinical practice for estimation of prognosis of the malignant disease (prognostic factors) and for prediction of reactivity of the tumor to certain therapeutic modality (predictive factors). Also axillary lymph node status is an independent prognostic factor in women with early breast cancer. Therefore, surgical excision and following histopathological examination of the nodes is the obligatory part of primary breast cancer surgery. The extension of axillary surgery varies widely, although sentinel lymph node biopsy is considered to be the standard procedure. However, it must be admitted that this type of procedure need not be optimal for all the breast cancer patients.

Aims of the study

The aim of this study is to verify the hypothesis whether or not the axillary lymph node metastatic affection can be effectively estimated using non-surgical methods – i.e. by evaluation of the combination of prognostic and predictive factors of the primary breast tumor. Statistical model composed on the basis of data of early breast cancer patients is the basic tool for this prediction. Application of this model in everyday practice can enable to adjust the extent of axillary surgery for each individual patient.

Patients and methods

A total of 617 women treated in the leading oncosurgical unit Medicion Praha s.r.o. were involved in this retrospective study. The inclusion criteria were primary surgery procedure and the gain of at least one axillary lymph node. First dataset was produced by imaging techniques and histological evaluation of biopsy specimen (called “preoperative values”), another dataset was available postoperatively – by evaluation of histological specimen harvested during the surgery (so called “postoperative values”). All these variables were entered into the logistic regression equation using the method “enter”.

Results

Postoperative values are considered more accurate as they are based on detailed analysis of complete tumor material. Using these values *postoperative model* has been constructed. Tumor size, lymphovascular space invasion and progesterone receptor status were the only variables that proved statistical significance. Regression model exhibited good predictive characteristics – area under curve ROC was 0,78. The predictive power was higher when all the variables (and not only those statistically significant) were left in the equation. Consequently, preoperative and postoperative values were compared – only histological grading was statistically significantly different and thus it had to be removed from the model; also the lymphovascular invasion has been excluded from the model as it was not reliably available before surgery. Preoperative model exhibited good predictive characteristics when using postoperative values (ROC = 0,77); however, predictive power was only moderate when using preoperative values (ROC = 0,66).

Discussion

Predictive power of our model is fully comparable to similar predictive models published by now in the literature. For clinical practice however, the model is completely inapplicable as the postoperative values are not available at the time of diagnosis. Preoperative values (except for grading) did not significantly differ from postoperative values. Unfortunately application of corrected preoperative regression equation for the preoperative data resulted in the model whose predictive characteristics are hardly applicable for decision making at the time of diagnosis (sensitivity of only 53%, false negativity rate of 48%). The most important reason for this situation is probably the heterogeneity of the tumor that does not allow to accurately evaluate tumor characteristics at the time of diagnosis. We were trying to suggest some modifications of tumor characteristics evaluation in clinical practice that could lead to the improvement of predictive power of our model.

Conclusions

At present, this model cannot identify patients who have sufficient chance of being axillary lymph node positive or negative. Thus, these models cannot be used to substitute for the prognostic information gained by axillary dissection (when nodal status is a critical element in adjuvant therapy decision making).

1 ÚVOD

1.1 KARCINOM PRSU

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným onemocněním u žen – tvoří 23% ze všech malignit ženské populace. Jeho incidence neustále stoupá a v roce 2013 přesáhla v České republice počet 130 případů na 100 tisíc žen, což řadí naši republiku k zemím s nejvyšší četností záchytu tohoto onemocnění. I přes stále vzrůstající incidenci má mortalita karcinomu prsu díky moderním diagnostickým a terapeutickým postupům mírně klesající trend.

Tradičním terapeutickým postupem bylo po celé 20. století snesení celého prsu a kompletní disekce axilárních lymfatických uzlin. Tato léčebná strategie byla vyvozována z Halstedova přesvědčení, že karcinom prsu je lokalizované onemocnění, které je možno zvládnout radikální (nebo superradikální) lokoregionální terapií. Operačnímu výkonu v axile byl přisuzován jak význam terapeutický (lokální kontrola onemocnění v podpažní jamce), tak stagingový (na základě správně stanoveného rozsahu onemocnění je možné stanovit adekvátní pooperační terapii).

V současnosti nikdo nepochybuje o primární systémové povaze prsních malignit, jejichž prognóza je určována daleko více vzdálenou diseminací onemocnění, nežli jejich lokálními projevy. Proto se přístup k léčbě karcinomu prsu diametrálně změnil. Jednoznačným trendem je snižování radikality operací. Ablace jsou ve většině případů nahrazeny konzervativními výkony na prsu, obvykle doplněnými adjuvantní radioterapií; podíl těchto částečných výkonů se dále zvyšuje užíváním neoadjuvantní terapie.

Snaha o podobné omezení rozsahu zákroků je patrná také v axilární chirurgii. Opakovaně bylo prokázáno, že stav mizních uzlin v axile je nejdůležitějším izolovaným prognostickým faktorem jak pro přežívání bez známkem onemocnění (DFS) tak pro celkové přežívání (OS) pacientek s karcinomem prsu. Obecně platí, že jediným doposud akceptovaným způsobem ověření stavu lymfatických uzlin je jejich **chirurgická exstirpace a následné mikroskopické vyšetření**. Tento způsob dosahuje nejvyšší úspěšnosti v záchytu časných stadií metastatického procesu v lymfatických uzlinách. Dosud naopak není k dispozici neoperační postup, který by s dostatečnou přesností umožnil hodnotit stav uzlin; radiodiagnostické metody (MRI, PET) mají limitace pro detekci uzlinového postižení o průměru menším než 1cm. Proto je zjištění stavu axilárních uzlin nedílnou součástí každého chirurgického zákroku prováděného pro histologicky verifikované zhoubné onemocnění prsu. Existuje několik způsobů, jak dosáhnout tohoto cíle:

- *kompletní axilární disekce* (axillary lymph node dissection – ALND) odstraňuje lymfatické uzliny v rozsahu I. a II. axilární etáže (tj. laterálně od mediálního okraje musculus pectoralis minor) až do úrovně axilární vény; jedná se o výkon zatížený významnou morbiditou, zřetelně vyšší, než samotný zákrok na prsu
- *axilární sampling* znamená odběr 4-5 izolovaných uzlin z I. etáže axily – axilární tuk a většina uzlin a lymfatických uzlin zůstávají neporušeny a proto se ve větší míře nevyskytují komplikace spojené s kompletní axilární disekcí; pacientky s nálezem metastáz nádoru v těchto odebraných uzlinách jsou kandidátkami pro doplnění kompletní axilární disekce, nebo pro iradiaci regionální lymfatické oblasti
- *biopsie sentinelové uzliny* (sentinel lymph node biopsy – SLNB) – pomocí radioizotopu nebo barviva se sleduje lymfatická cesta z prsu k mizním uzlinám a odebírá se první uzlina na této cestě; tento cílený postup má nižší četnost falešné negativity než sampling uzlin „naslepo“
- *úplné vynechání operačního zákroku v axile* – vysvětlení pro tento postup spočívá v tom, že jakýkoliv zákrok v axile zvyšuje morbiditu operace a že tento iatrogenní vliv nemusí být vyvážen žádným ovlivněním způsobu adjuvantní terapie; zejména u starších žen s klinicky negativními uzlinami bývá zákrok v axile vypuštěn, protože adjuvantní chemoterapie se u těchto pacientek používá jen zřídka

Argumentace pro a proti použití každého ze jmenovaných chirurgických přístupů je komplikovaná a jejich používání v klinické praxi se liší – podle typu léčené pacientky a podle zvyklostí pracoviště. Kompletní axilární disekce je v současné době rezervována většinou pouze pro případy, kdy se při biopsii sentinelové uzliny nebo axilárním samplingu zjistí metastatické postižení odebraných uzlin; doposud je ALND také jediný standardní postup v chirurgické terapii žen léčených neoadjuvantně (pomocí chemoterapie nebo hormonální terapie). Od samplingových metod je patrný odklon nejen v léčbě prsních malignit, ale také v celé onkologické chirurgii; důvodem je především nepřijatelně vysoký vliv náhodnosti spojený s odběrem lymfatické tkáně naslepo, obvykle z oblastí, které jsou chirurgovi nejlépe přístupné. Biopsie sentinelové uzliny se v posledních letech stává široce akceptovaným standardem v axilární chirurgii v případech časného karcinomu prsu.

Prognostické faktory karcinomu prsu jsou definovány jako vlastnosti nádoru, které napomáhají odhadnout prognózu nádorového onemocnění prsu. **Prediktivní faktory** naopak umožňují předpovědět, jakým způsobem bude zhoubný nádor reagovat na konkrétní léčebnou modalitu. V současné době je při indikaci pooperační léčby kladen podstatně větší důraz na vlastnosti samotného nádoru, tedy jeho prognostické a prediktivní faktory, zatímco stav mizních uzlin se dostává spíše do role ukazatele pokročilosti nádorového onemocnění. To je podstatná změna v přístupu k léčbě prsních malignit ve srovnání s minulostí, kdy byl stav axilárních mizních uzlin jedním z nejdůležitějších kritérií, které rozhodovalo o tom, zda a jaká bude použita adjuvantní terapie. Proto je v současnosti věnována taková pozornost studiu vlastností jednotlivých prognostických a prediktivních faktorů a jejich použití v klinické praxi. Literární přehled disertační práce (oddíl 1.2) se velmi podrobně věnuje

popisu jednotlivých faktorů – jejich postavení v diagnostice karcinomu prsu, metodám jejich stanovení a také prognostickému či prediktivnímu významu pro léčbu zhoubného onemocnění.

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je ověřit, zda použití neoperačních metod umožní s dostatečnou přesností předvídat postižení axilárních lymfatických uzlin. Nástrojem pro tuto predikci je matematický model sestavený na základě podrobné analýzy souboru údajů o pacientkách léčených pro zhoubná onemocnění prsu časných stadií. Tento model si klade za cíl použít známé vstupní údaje o pacientce a jejím nádoru, tj. prognostické a prediktivní faktory (získané pomocí konvenčních zobrazovacích metod a pomocí rozboru vzorku nádorové tkáně odebrané před zahájením terapie) a odhadnout riziko postižení axilárních uzlin. Hlavním cílem práce je pak použití tohoto modelu k klinické praxi k přizpůsobení radikality zákroku v axile pro každou individuální pacientku. Vedlejším cílem je shromáždit soubor poznatků, které by pomohly optimalizovat operační zákroky na samotné prsní žláze – zejména s ohledem na radikalitu a způsob provedení chirurgického výkonu.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 SOUBOR PACIENTŮ

Tato studie představuje retrospektivní analýzu záznamů získaných z lékařské dokumentace žen léčených v přední diagnosticko-terapeutické instituci pro nemoci prsu v České republice – Medicon Praha s.r.o. V letech 2008-2010 bylo v tomto zdravotnickém zařízení nově diagnostikováno **1155 případů** zhoubného onemocnění prsu. Část z nich byla indikována k neoadjuvantní cytostatické nebo hormonální léčbě, u části pacientů chyběly některé důležité údaje v dokumentaci – tyto pacientky nemohly být proto použity pro hodnocení v rámci této studie. U 724 žen bylo rozhodnuto o vhodnosti primární chirurgické léčby. Z tohoto počtu 45 pacientek operaci odmítlo nebo operace nebyla možná z důvodu závažné komorbidity, nebo se rozhodly pro operační řešení v jiném zdravotnickém zařízení (odkud se nepodařilo adekvátním způsobem doplnit potřebné údaje). Primární operaci tedy absolvovalo 679 nemocných, u 62 z nich však nebyly získány žádné axilární lymfatické uzliny – převážně proto, že jejich diagnóza neinvazivního dobře nebo středně diferencovaného karcinomu (ca.in situ grade 1-2) nezbytně nevyžadovala chirurgický staging axilárních uzlin.

K hodnocení v naší studii byla tedy k dispozici zdravotnická dokumentace **617 žen** s karcinomem prsu léčených primárním chirurgickým zákrokem na prsu (mastektomií nebo prs záchovnou tumorektomií) a také stagingovým výkonem v axile, při němž byla získána alespoň jedna lymfatická uzlina. Průměrný věku těchto pacientek byl 57,3 let, medián 58 let a věkové rozmezí 31-85 let. Z výšky a hmotnosti pacientky jsme vypočítali body mass index (BMI) a použili jsme jej ve výpočtech jako spojitou veličinu.

3.2 METODIKA

Pro podrobné vysvětlení metodiky jednotlivých postupů odkazují na plné znění disertační práce.

Podezření na diagnózu karcinomu prsu bylo vysloveno na základě klinického vyšetření a zobrazovacích metod (mamografie, ultrasonografie, magnetická rezonance). Pokud tomu nebránily jasné kontraindikace, byla diagnóza následně biopticky verifikována, nejčastěji pomocí biopsie tlustou jehlou; obvykle současně s touto biopsií bylo provedeno také označení okrajů tumoru. Pacientky dále absolvovaly předepsaná stagingová vyšetření k vyloučení přítomnosti vzdálených projevů onemocnění a také interní předoperační vyšetření. Všechny pacientky měly tedy před zahájením léčby stanoven přesný klinický staging onemocnění podle současně platného systému TNM.

V úvahu přicházejí dva základní zákroky na prsu – tumorektomie (prs záchovný výkon) a mastektomie. Ženám byla nabídnuta možnost parciálního zákroku na prsu ve všech případech, kdy jsme nenalezli jasnou kontraindikaci takového postupu. Konečná volba typu zákroku na prsu záležela samozřejmě na rozhodnutí samotné pacientky deklarovaném v jejím podepsaném informovaném souhlasu s operací. Standardním operačním výkonem v podpažní jamce byla u žen s časným karcinomem prsu **biopsie sentinelové uzliny**. Na základě našich zkušeností jsme v převážné většině případů prováděli označení sentinelových uzlin pouze pomocí radioizotopu ⁹⁹Tc. Lymfotropní barvivo (methylenová modř) byla použita pouze zřídka. Ve výrazné většině případů byla sentinelová uzlina ponechána k možnosti pečlivého „definitivního“ histopatologického vyšetření. Peroperační vyšetření těchto uzlin technikou zmrazeného řezu bylo využíváno pouze selektivně. Méně obvyklým postupem byla **primární disekce axilárních uzlin** bez užití sentinelové biopsie.

Technika zpracování a hodnocení vzorků z prsu i z uzlin respektují doporučení manuálu AJCC 2002. Srovnatelné postupy jsou používány u všech preparátů žen s karcinomem prsu. Velmi výhodná byla možnost hodnotit převážnou většinu materiálu v jediné histopatologické laboratoři – v Biolabu Praha s.r.o. Také tímto postupem je možné garantovat vysoký stupeň standardizace zpracování.

Z **bioptického vzorku** se vyšetřoval histologický typ nádoru, jeho grading, podíl buněk exprimujících estrogenové a progesteronové receptory, přítomnost HER-2/neu a proliferační aktivita. Při definitivním histologickém zpracování **operačního resektátu** se navíc hodnotila velikost ložiska a jeho multifokalita (tyto dvě vlastnosti se předoperačně určovaly pomocí zobrazovacích metod) a také přítomnost lymfovaskulární invaze.

Z hlediska statistického zpracování je proto zapotřebí **důsledně rozlišovat** mezi dvěma typy histologického vyšetření: *vyšetření bioptického vzorku* („předoperační histologie“, „bioptická diagnóza“) a *vyšetření operačního resektátu* („pooperační histologie“, „definitivní histologie“, „definitivní diagnóza“).

3.2.1.1 **Hodnocení primárního nádoru**

Před zahájením zpracování operačního resektátu prsu byly pigmentem obarveny resekční okraje – v případě tumorektomie všechny okraje, v případě mastektomie pak pectorální okraj preparace. Resekát byl zpracován podle standardního protokolu, což zajistilo dobrou prostorovou orientaci a umožnilo vyjádřit se ke vzdálenosti okrajů tumoru od okraje exstirpátu, případně k dosahu léze k okraji. Tato zjištění pomohla předcházet situacím s nekompletním odstraněním patologického ložiska (v případě dosahu léze k okrajům chirurgické exstirpace byla indikována doresekce lůžka tumoru přiléhající k příslušnému pozitivnímu okraji).

Velikost nádoru

Velikosti patologického ložiska se měří na fixovaném operačním resektátu ve třech na sebe kolmých rozměrech. Makroskopicky zjištěné rozměry se pak korigují podle mikroskopického rozsahu léze – směrodatné je právě mikroskopické měření ložiska. Pro prognózu a také pro stanovení nutnosti pooperační léčby je rozhodující pouze velikost **invazivní složky** nádoru, nikoliv jeho neinvazivní komponenty.

Invazivita nádoru

Vzhledem k heterogenitě nádoru může nastat situace, že je v bioptickém vzorku nalezen pouze neinvazivní nádor, avšak při zpracování operačního resektátu je prokázáno invazivní ložisko. Takový nádor je pak hodnocen jako invazivní a jeho staging se provede podle rozměrů invazivní komponenty v histologickém preparátu (naopak neinvazivní komponenta staging neovlivňuje).

Méně často dochází k situaci, při níž byl z biopsie prokázán zhoubný nádor a v definitivním preparátu pak již žádná invazivní komponenta není zastížena. Takový nádor se samozřejmě označí za invazivní a jeho staging se provede podle rozměru získaného pomocí zobrazovacích metod.

Lokalizace nádoru

Umístění nádoru v konkrétním prsním kvadrantu může rozhodovat o směru jeho preferenční lymfatické diseminace.

Multifokalita nádoru

Pro účely statistického zpracování jsme sloučili všechny vícečetné nádory (počet ložisek dvě a více) do jediné skupiny „multifokálního postižení“.

Histologický typ nádoru

Histologický typ tumoru musel být jednoznačně charakterizován jednou z morfologických kategorií definovaných WHO klasifikací. V případě koexistence více morfologických typů u jedné pacientky se kategorie určila podle prognosticky závažnějšího typu.

Histopatologický grading

Pro hodnocení histopatologického gradingu byla použita Nottinghamská klasifikace.

Hormonální receptory

Přítomnost steroidních receptorů byla stanovována imunohistochemicky, značením monoklonálními protilátkami proti receptorovým molekulám. Zjištěný procentní podíl pozitivních reakcí v buněčném jádře byl použit jako spojitá veličina.

HER-2/neu

Rutinně byl stanovován **proteinový produkt** genu c-erbB2, tedy transmembránový receptor HER-2/neu. V případě pozitivního skóre 2+ a 3+ jsme prováděli standardizovaný HercepTest (DAKO), případně in-situ hybridizační stanovení **amplifikace samotného genu** c-erbB2 (FISH, CISH). Pro účely prediktivního modelu jsme rozdělili pacientky na skupinu s „negativním“ HER-2/neu (skóre 0 nebo 1+) a skupinu s „pozitivním“ HER-2/neu (skóre 2+ a 3+).

Proliferační aktivita

K určení proliferační aktivity se užívalo stanovení jaderného heat-stress proteinu Ki67, hodnocení bylo provedeno při 40-násobném zvětšení na přibližně 100 maligních buňkách, a to v místě největší pozitivní zbarvení. Výsledné procento pozitivních buněčných jader bylo pro účely prediktivního modelu použito jako spojitá veličina.

Přítomnost lymfatické a/nebo vaskulární invaze

Přítomnost lymfovaskulární invaze bylo možné spolehlivě stanovit pouze z definitivního operačního preparátu.

U bioptického vzorku je toto hodnocení obtížné nebo nemožné – biopsie se totiž nejčastěji odebírá z centra suspektního ložiska, pro hodnocení angioinvaze je nutný odběr z periferie nádorového ložiska.

3.2.1.2 **Hodnocení axilárních lymfatických uzlin**

Všechny získané lymfatické uzliny byly po zafixování ve formalinu zalaty do parafinových bločků. Nesentinelové uzliny byly poté krájeny v rovině kolmé na dlouhou osu uzliny, jednotlivé řezy byly od sebe

vzdáleny 2 milimetry. Preparáty byly následně obarveny hematoxylinem a eosinem. Imunohistochemické vyšetření se u těchto nesentinelových uzlin používalo pouze výjimečně – při nálezu podezřelých ale nikoliv jasně maligních shluků buněk.

Sentinelové uzliny byly krájeny obdobným způsobem, avšak v každém bločku byly provedeny 4 sériové řezy ve vzdálenostech 10 mikrometrů. Tři z nich byly hodnoceny v barvení hematoxylinem a eosinem, čtvrtý pak po obarvení cytokeratinem užívaným k detekci maligních elementů.

3.3 STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Základní stavební kameny pro konstrukci prediktivních modelů je nutno získat pečlivou analýzou jednotlivých vstupních proměnných, v našem případě pak vlastností karcinomu prsu a dané pacientky. Následně je možné zkoumat vztah těchto prognostických faktorů (tzv. *nezávisle proměnných* – viz níže) k chování tzv. *závisle proměnné* (viz také níže), v tomto případě k riziku postižení axilárních lymfatických uzlin. Nepřímo tak lze posuzovat vliv konkrétní kompozice jednotlivých vlastností nádoru na jeho schopnost metastazovat do spádových mízních uzlin a tím také přispět k odhadu celkové prognózy maligního onemocnění a posoudit nutnost provedení exstirpace axilárních lymfatických uzlin.

Pro sestavení regresní rovnice jsme použili metodu „enter“, při které jsou do výpočtu vloženy všechny proměnné najednou a na rozdíl od metody stepwise zůstávají všechny součásti modelu. K ověření kvality modelu slouží **klasifikační tabulka**. Správnost navrženého logistického modelu lze dále posoudit pomocí tzv. **křivky ROC** (Receiver Operating Characteristic), respektive plochy pod touto křivkou AUC (Area Under Curve).

Pro počítačové zpracování dat jsme použili statistický program Statistica 9.1 licencovaný pro zaměstnance 1.lékařské fakulty Karlovy univerzity v Praze.

Veškeré testy, které jsme v rámci statistického zpracování použili, jsou počítány na 5% hladině statistické významnosti.

4 VÝSLEDKY

Údaje získané po operaci pacientky, tedy na základě definitivního zpracování operačního preparátu, odrážejí věrněji skutečnou povahu maligního onemocnění (jeho skutečnou velikost, podíl invazivní a neinvazivní složky z celkového objemu, podíl zastoupení receptorů, multifokalitu apod.). Snižuje se tak vliv případné heterogenity nádoru a možného sampling erroru při biopsické diagnostice patologického ložiska (protože vzorek tkáně získaný pomocí jehlové biopsie tvoří pouze zlomek veškeré nádorové tkáně – obvykle méně než 1%). Z tohoto pohledu můžeme tedy definitivní histologické zpracování považovat za „zlatý standard“.

Proto jsme sestavili regresní rovnici na základě těchto *pooperačních* („definitivních“) *vlastností* – nazvali jsme ji **pooperačním prediktivním** modelem. Samozřejmě si dobře uvědomujeme, že tyto vlastnosti nejsou k dispozici v době diagnózy a ve skutečnosti jich **není možno použít k predikci** rizika postižení lymfatických uzlin. Pooperační logistický regresní model (*model A*) má tvar:

$$\text{logit}(\text{metastazy_ANO}) = -1,82 - 0,21 * \text{umistení} - 0,12 * \text{histologie} + 0,36 * \text{misto(FNB)} - 0,39 * \text{misto(UPMD)} - 0,33 * \text{grade(1)} + 0,18 * \text{grade(2)} - \mathbf{0,44 * LVSI} + 0,26 * \text{c_erbB2} - 0,14 * \text{multifokalita} + \mathbf{0,15 * \text{max.rozmer}} - 0,01 * \text{ER} + \mathbf{0,01 * PR} - 0,01 * \text{KI67} + 0,01 * \text{BMI} + 0,001 * \text{vek}$$

Statisticky významné proměnné se svými parametry jsou zvýrazněny tučně. U ostatních parametrů se hypotéza jejich nulovosti nezamítá (tj. jejich p-hodnota > 0,05). Nicméně i ostatní proměnné se svými parametry přispívají svou měrou do predikce v nalezeném modelu.

Pokud bychom proměnné s parametry u nichž se hypotéza jejich nulovosti nezamítla z modelu vynechali a pro konstrukci modelu použili pouze statisticky významné proměnné ("LVSI", "max.rozmer" a "PR"), pak by vzniknul *model B* v následující podobě:

$$\text{logit}(\text{metastazy_ANO}) = -2,57 - 0,48 * \text{LVSI} + 0,14 * \text{max.rozmer} + 0,01 * \text{PR}$$

Rozdíl mezi oběma modely je především v senzitivitě a falešné negativitě – v obou případech vykazuje model A lepší prediktivní vlastnosti. Plocha pod křivkou ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) dokumentuje, že **predikční schopnost modelu A je dobrá (AUC = 0,78)** a že je lepší než predikční schopnost modelu B (AUC = 0,74), která je však také hodnocena jako dobrá. Pokud bychom tedy měli k dispozici uvedená data již před operací, dali bychom **pro odhad rizika postižení axilárních uzlin přednost modelu A**.

Pro skutečnou predikci je zapotřebí používat hodnoty získané při předoperačním vyšetření. Proto jsme **testovali míru neshody** mezi pooperačními („definitivními“) vlastnostmi a těmi, které jsou k dispozici po ukončení diagnostického procesu, tedy před návrhem terapeutického postupu a zahájením léčby – nazvali jsme je „*předoperačními hodnotami*“. Cílem této analýzy bylo identifikovat takové vlastnosti maligního onemocnění, které v našem souboru nebyly „věrohodně“ stanoveny při předoperačním vyšetření (tedy u nichž existuje

statisticky významná odlišnost mezi předoperačními a pooperačními hodnotami). Ze všech testovaných proměnných byl statisticky signifikantní rozdíl pouze u gradingu.

Hlavním cílem celé práce je pak sestavení regresního modelu, který by využíval předoperačních vlastností nádoru a **umožňoval tak predikci axilárního uzlinového postižení již v době před operací – tzv. předoperační prediktivní model**. Při jeho konstrukci jsme použili stejné proměnné jako v pooperačním modelu s výjimkou těch, u nichž se statisticky významně lišily hodnoty předoperační a pooperační (tedy ty, které nebyly „věrohodně“ stanoveny při předoperačním vyšetření – v našem případě pouze grading), a také těch, které nebyly při předoperačním vyšetření k dispozici (lymfovaskulární invaze).

Předoperační logistický regresní model (*model C*) má tedy tvar:

$$\text{logit}(\text{metastazy_ANO}) = -2,24 - 0,23 * \text{umisteni} + 0,06 * \text{histologie} + 0,29 * \text{misto(FNB)} - 0,43 * \text{misto(UPMD)} + 0,20 * \text{c_erbB2} - 0,27 * \text{multifokalita} + \mathbf{0,16 * \text{max.rozmer}} - 0,01 * \text{ER} + \mathbf{0,01 * \text{PR}} - 0,002 * \text{KI67} - 0,02 * \text{BMI} + 0,005 * \text{vek}$$

Statisticky významné proměnné se svými parametry jsou zvýrazněny tučně. U ostatních parametrů se hypotéza jejich nulovosti nezamítá (tj. jejich p-hodnota > 0,05). AUC křivky ROC pro model C s pooperačními hodnotami byla 0,77, z čehož lze vyvozovat, že **predikční schopnost modelu C je dobrá**.

V závěrečné fázi jsme aplikovali „předoperační model“ na data získaná před operací. Predikčních schopnost hodnocená plochou pod křivkou ROC byla v tomto případě 0,66, **predikční schopnost je tedy hodnocena jako dostatečná**. Sensitivita modelu je pouze 53%, tedy velmi nízká.

Závěrem lze tedy shrnout, že ačkoliv údaje získané před operací a po operaci nevykazují statisticky významný rozdíl, model, který je vytvořen na základě dat získaných po operaci **nelze aplikovat na data získaná před operací**. V tomto případě **není predikční schopnost modelu dobrá**.

5 DISKUZE

Nedílnou součástí operační léčby karcinomu prsu je kromě zákroku na samotném prsu také chirurgický staging axilárních lymfatických uzlin. Znalost stavu axilárních uzlin je nezbytná pro stanovení adekvátní adjuvantní léčby (radioterapie, chemoterapie, hormonální terapie, imunoterapie). Důvodem pro nutnost chirurgického stagingu je fakt, že žádná z méně invazivních metod (ultrazvuk, magnetická rezonance, PET-CT, lymfografie, atd.) nemá dostatečnou senzitivitu k záchytu metastáz v axilárních uzlinách.

U žen s časným karcinomem prsu lze v současné době za standardní zákrok v axile považovat biopsii sentinelové uzliny (SLNB). Ostatní axilární zákroky (kompletní disekce, sampling uzlin, úplné vynechání zákroku) se indikují méně často. Sentinelová biopsie je tedy jakýmsi univerzálním přístupem, zdaleka však nemusí být ideální pro všechny pacientky.

Cílem tohoto projektu bylo vytvořit nástroj pro individualizaci axilární chirurgie u žen s primárním karcinomem prsu. Pokusili jsme se vytvořit matematický model, který by dokázal předpovídat postižení axilárních lymfatických uzlin, a to na základě takových vlastností nádoru, jejichž stanovení používá současná klinická praxe – tedy tzv. prognostických a prediktivních faktorů. Pokud by takový model byl schopen s dostatečnou přesností (např. 95%) predikovat přítomnost nebo nepřítomnost axilárních metastáz, bylo by možné pacientkám nabídnout alternativy zmíněného „univerzálního postupu“ (tedy biopsie sentinelové uzliny):

- pokud by model předpověděl nízké riziko uzlinových metastáz, mohli bychom pacientce nabídnout možnost neprovádět žádný zákrok v axile (s velice nízkým rizikem „podléčení“, tedy toho, že pacientka nedostane adjuvantní léčbu, která by odpovídala stadiu jejího onemocnění)

- pokud by model předpověděl vysoké riziko metastáz, měli bychom zvažovat provedení kompletní axilární disekce spíše než jen biopsii sentinelové uzliny – abychom předešli nutnosti druhé operace (s nízkým rizikem „přeléčení“, tedy situace, kdy bude axilární disekce prováděna „zbytečně“, tj. v případě nepostižených axilárních uzlin)

Optimálním výsledkem naší práce by byl takový matematický model, který by byl schopen predikovat riziko axilárního postižení u všech žen s časným karcinomem prsu. Tato skupina žen i jejich onemocnění je však velmi různorodá. Není proto vyloučeno, že žádný takový „všeobecný“ model nebude predikovat s dostatečně vysokou přesností, ale bude zapotřebí hledat pouze určité podskupiny pacientek, u nichž by predikce byla spolehlivá.

5.1 MATEMATICKÝ MODEL A JEHO VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

5.1.1 MATEMATICKÉ MODELOVÁNÍ PRO AXILÁRNÍ LYMFATICKÉ POSTIŽENÍ U KARCINOMU PRSU

Stav axilárních lymfatických uzlin u pacientek s karcinome prsu byl v multivariačních analýzách opakovaně definován jako jeden z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů pro přežívání bez známek onemocnění (DFS) i pro celkové přežívání (OS). Otázka, zda je možné předpovědět stav mizních uzlin bez toho, že by musela být provedena jejich exstirpace, je poměrně stará. Důvodem stanovení takové otázky je snaha o omezení radikalit chirurgických zákroků v podpažní jamce. Téměř až do konce 20. století byla jediným lege

artis akceptovaným výkonem v axilární chirurgii kompletní disekce v rozsahu I. a II. axilární etáže. Tento zákrok byl zatížen nezanedbatelným množstvím komplikací jak pooperačních, tak zejména pozdních. Navíc bylo již tehdy známo, že velká část žen nebude mít metastaticky postiženu žádnou axilární uzlinu a že tedy veškerá operační rizika nebudou vyvážena žádným terapeutickým přínosem. Objevila se proto zcela legitimní snaha rozlišit od sebe skupinu žen s přítomností uzlinových metastáz od skupiny s intaktními uzlinami. Zobrazovací metody (včetně ultrazvuku, CT a MRI) neměly dostatečnou senzitivitu pro zachycení nízkoobjemového metastatického postižení uzlin. Jedinou schůdnou nechirurgickou cestou stanovení rizika přítomnosti axilárních metastáz se tedy jevil odhad na základě vlastností primárního tumoru. Cílem bylo nalézt skupinu žen s tak nízkým rizikem lymfatického postižení, které by dovolilo neprovádět axilární disekci.

Jednotlivé prediktivní modely uvedené v literárních zdrojích jsou tedy poměrně metodologicky podobné – využívají metod multivariační logistické regrese, i když při zpracování volí její různé modifikace. Z vlastností primárního nádoru je pro predikci uzlinového postižení zpravidla statisticky významná velikost nádoru měřená na definitivním histologickém preparátu a také invaze lymfovaskulárních prostor (LVSI). Výhodným výstupem modelů je plocha pod křivkou ROC, která umožňuje přímé srovnání prediktivní schopnosti modelu.

5.1.2 APLIKACE VÝSLEDKŮ NAŠEHO MODELU

5.1.2.1 Modelování pomocí pooperačních údajů

Pomocí multivariační regresní analýzy jsme určili **statistickou významnost** následujících faktorů: maximální rozměr primárního tumoru měřený v histologických preparátech, invaze lymfovaskulárních prostor a procentní zastoupení progesteronových receptorů. Protože jsme pro logistickou regresi použili metodu „enter“, byli jsme schopni sestavit model A obsahující nejen statisticky významné proměnné, ale také ty, u nichž se statistickou významnost nepodařilo prokázat. V modelu B jsme naopak ponechali pouze statisticky významné proměnné.

Srovnáním dvou pooperačních modelů (modelu A a B) jsme zjistili lepší schopnost predikovat metastatické postižení axilárních uzlin u modelu A, který využívá hodnot všech získaných proměnných. Ze srovnání je patrné, že pro odhad rizika axilárního postižení je vhodnější využívat i ostatní proměnné (tedy ty, u nichž nebyla prokázána statistická významnost), které svým dílem také přispívají do predikce v nalezeném modelu. Ke stejnému závěru dospěl statistický tým při sestavování regresního modelu v MSKCC a také v MOÚ Brno.

Pro sestavení modelů A a B jsme použili vlastnosti nádoru získané z pooperačních histologických preparátů, tedy podobné těm, s jakými pracovaly statistické modely uvedené v literárních zdrojích. Nabízí se tedy alespoň krátké srovnání. Naše práce vycházela z analýzy podobného počtu pacientek, použila podobnou metodiku analýzy souboru a konstrukce modelu. Srovnatelné jsou získané statisticky významné vlastnosti nádoru, zejména pak velikost primárního nádoru a lymfovaskulární invaze. A také **úspěšnost predikce našeho modelu je plně srovnatelná se všemi dosud publikovanými prediktivními modely** týkajícími se karcinomu prsu a odhadu rizika postižení axilárních uzlin. Nejlépe je to patrné z grafické podoby porovnávací velikost plochy pod křivkou ROC, která je 0,78 pro model A a 0,74 pro model B.

Z hlediska cíle stanoveného na začátku této práce je samozřejmě použitelnost tohoto modelu **pouze hypotetická**. Tyto údaje nemáme k dispozici v době stanovení diagnózy, tedy ve chvíli, kdy by náš prediktivní model měl vstoupit do plánování terapeutického postupu. Takový model jsme sestavovali proto, že pooperační údaje by měly být spolehlivé, tedy měly by odrážet skutečné vlastnosti nádoru věrněji, než údaje získané před operací. Funkčnost tohoto modelu měla tedy odpovědět na otázku, zdali je možné na základě skutečných vlastností nádoru stanovovaných soudobou diagnostikou predikovat axilární metastatické postižení. **Odpověď bohužel není jednoznačná**. Falešná negativita 39% znamená, že model by nesprávně určil negativitu axilárních uzlin u 39% žen, jejichž uzliny jsou metastaticky postižené a které by proto nebyly adekvátně léčeny. Na druhé straně má tento náš model podobné prediktivní vlastnosti, jako široce používaný model MSKCC, který účinně napomáhá při rozhodování o možnostech snížení radikality axilární chirurgie.

5.1.2.2 Aplikace modelu na údaje získané před operací

Srovnání údajů získaných po operaci s údaji dostupnými před operací neprokázalo (s výjimkou gradingu) statisticky významnou odlišnost. Statisticky významně se lišilo pouze stanovení gradingu nádoru. Tato minimální odlišnost dává naději, že kvalitní model může dobře predikovat axilární metastázy i na základě těchto údajů dostupných předoperačně (tedy v reálné klinické situaci). Z modelu jsme proto vypustili statisticky významně odlišný grading a také přítomnost lymfovaskulární invaze (protože tuto vlastnost nebylo možné relevantně stanovit z biopsie) – výsledkem byl předoperační model C. **Statisticky významné** zůstaly tedy pouze dvě vlastnosti: maximální rozměr primárního tumoru měřený pomocí zobrazovacích metod a procentní zastoupení progesteronových receptorů.

Dosažením pooperačních hodnot do takto upravené rovnice jsme prokázali, že prediktivní schopnost modelu C je stále „dobrá“, srovnatelná jako u modelu A. Jestliže jsme však do modelu C dosadili hodnoty získané před operací, byly hodnoty předpovězené modelem statisticky významně odlišné od reálných hodnot. Schopnost předoperačního modelu predikovat axilární metastatické postižení byla významně nižší, než u pooperačního modelu.

Pro reálnou klinickou situaci je takový model obtížně použitelný. Přesto, že se předoperační údaje použité v modelu C statisticky významně nelišily od údajů zjištěných po operaci, jejich dosazení do rovnice **predikovalo velmi nespolehlivě axilární uzlinové postižení.** Falešná negativita 48% znamená, že by model nesprávně předpověděl negativitu axilárních uzlin u 48% žen, jejichž uzliny jsou metastaticky postižené.

5.2 PROBLÉMY PREDIKCE AXILÁRNÍCH METASTÁZ A MOŽNOSTI JEJICH ŘEŠENÍ

Hypoteticky lze navrhnout dva důvody pro skutečnost, že přes veškerou snahu o pečlivou analýzu údajů o našich pacientkách nejsme schopni dostatečně přesné predikce axilárního metastatického postižení.

1. Klinické a laboratorní markery používané v současné klinické praxi ze své podstaty nejsou schopny validně předpovědět, jestli jsou v axilárních uzlinách přítomné metastatické buňky.

Jedinou cestou ke zlepšení takové situace by pak bylo rozšíření spektra vyšetření vlastností karcinomu prsu přidáním nových prognostických markerů.

Dosud nejsou identifikovány (nebo nejsou k dispozici pro klinické použití) takové vlastnosti nádoru, které by měly přímý vztah k metastazování. Možnými kandidáty pro tyto vlastnosti jsou některé molekuly účastníci se apokrinní a parakrinní signalizace nebo receptory a ligandy zúčastněné v procesu apoptózy. Není však vyloučeno, že k nalezení vlastností predikujících lymfatické metastazování bude zapotřebí podrobnějšího studia na úrovni nukleových kyselin. Mohou se zaměřovat na prokázání mutací určitých úseků DNA, nebo přímo na stanovení přítomnosti transkriptů určitých částí genetické informace, tedy mRNA. Podobně perspektivní může být také proteomika. Ta stanovuje přítomnost proteinových produktů určitých genů – tyto proteiny mohou být příčinou a/nebo markerem lymfatického šíření nádorových buněk.

Výhodou molekulárně biologických metodik a proteomiky je to, že mohou stanovit i zcela minimální množství konkrétního produktu, který může být zastoupen jen v malé části buněk nádorové populace. Do značné míry tak mohou eliminovat handicap heterogenity nádorové populace (viz také níže). Tyto metody tedy mohou stanovit riziko metastazování na základě průkazu přítomnosti „rizikového klonu“, bez ohledu na to, že se může jednat o zcela minoritní skupinu nádorových buněk, která by s velkou pravděpodobností byla konvenčními metodami přehlédnuta.

2. Současně používané markery by byly schopny předpovědět stav axilárních uzlin, pokud by jejich stanovení bylo spolehlivé; v praxi však spolehlivost těchto stanovení nelze garantovat.

Při zpracování našeho projektu jsme naráželi na některé metodologické problémy, které jsou zdrojem nepřesných a nevalidních údajů a tím znesnadňují sestavení prediktivního modelu a snižují možnost dosažení přesné predikce axilárního uzlinového postižení.

Největším úskalím předoperačních vyšetření je již zmiňovaná **heterogenita nádoru** – existence různých klonů nádorových buněk, které se odlišují svými vlastnostmi (některé určují reaktivitu na hormonální manipulace, jiné růst nádoru, jiné pak schopnost metastazování). Pro současné metody stanovení markerů se obvykle používá „zprůměrnění“ hodnot – nádor je pak prezentován jako homogenní skupina „univerzálních“ buněk, což je samozřejmě v rozporu s reálnou skutečností. „Zprůměrnění“ je však možné až v definitivní histologii, kdy lze vyšetřit celý nádor a porovnat vlastnosti jeho různých součástí. Naopak při biopsii může být zastížena minoritní část nádoru s odlišnými vlastnostmi, což je pak příčinou neshody se skutečnými „průměrnými“ vlastnostmi nádoru.

Nepřesnosti se objevují také při **histologickém stanovení** jednotlivých vlastností nádoru. I když je obvykle histologické vyšetření považováno za zlatý standard hodnocení maligního onemocnění, jeho přesnost není absolutní. Příkladem může být relativně nezdívka se vyskytující nález karcinomu in situ a zároveň zjištěná přítomnost axilárních metastáz. Z podstaty onemocnění in situ (lokalizovaného v prostoru nad neporušenou bazální membránou, kde nejsou přítomny žádné krevní a lymfatické cévy) vyplývá nemožnost lymfatického metastazování. Přesto jsou u některých pacientek s duktálním karcinomem in situ nalezeny metastatické buňky v axilárních uzlinách. Pravděpodobným důvodem tohoto stavu je skryté ložisko mikroinvaze, tedy penetrace nádoru skrz bazální membránu a infiltrace lymfatických cév. Histopatologové se v takových případech obvykle snaží nelézt hypotetický mikroinvazivní fokus pomocí extenzivního vyšetření okrajů nádoru, mnohdy však bez úspěchu. Není vyloučeno, že takových nepoznaných mikroinvazí může být podstatně více.

Velkou neznámou je také skutečný **stav axilárních uzlin.**

a/ Hypoteticky se dá předpokládat, že u části pacientek mohly existovat další (méně aktivní nebo méně zbarvené) sentinelové uzliny, které nebyly exstirpovány a vyšetřeny. Četnost detekce sentinelových uzlin je v dobře metodologicky vedených studiích udávána v rozmezí 95-100%. Případné metastatické postižení nevyšetřených sentinelových uzlin může být zdrojem nesprávně stanovené „negativity“ uzlin u konkrétní pacientky.

b/ Ani standardní vyšetření exstirpovaných sentinelových uzlin není stoprocentně spolehlivé. Již dříve bylo uvedeno, že podrobné a sofistikované vyšetření sentinelových uzlin (použití sériových řezů, imunohistochemie, případně molekulárně genetické metody) odhalí metastatické nádorové buňky u několika procent těch žen, jejichž sentinelové uzliny byly označeny jako negativní při použití standardních metod zpracování těchto uzlin.

c/ Je také třeba připomenout, že část údajů o axilárních uzlinách bylo získáno u pacientek s provedenou biopsií sentinelové uzliny. U nich nebyly k dispozici pro histologické vyšetření další axilární uzliny. Je tedy

nutné připustit možnost postižení nesentinelových uzlin v případech, které byly v našem souboru označeny jako „negativní“ (tj. bez zjištěných axilárních metastáz). Tato falešná negativita sentinelových uzlin bývá podle různých literárních zdrojů přítomna v 5-10% časných karcinomů prsu. Naše vlastní falešná negativita byla určena v době, kdy byla technika sentinelové biopsie zaváděna do naší klinické praxe a kdy se prováděla paralelně jak SLNB, tak následná standardní axilární disekce. Tehdy jsme prokázali, že je sentinelová uzlina falešně negativní ve 2,3% případů (nepublikovaná data).

Řešením těchto problémů by mohlo být vylepšení metodiky a tím odstranění nepřesností a nesprávných stanovení některých parametrů. Nabízí se však otázka, u kterých vlastností nádoru lze o takovém zlepšení reálně uvažovat a případně jakým způsobem jej docílit. Jedná se samozřejmě zejména o předoperační stanovení těchto parametrů, protože jedině takových údajů lze využít pro tento typ predikce v klinické praxi.

V důsledku heterogenity patologické léze si proto lze jen **obtížně představit možnost zřetelného zlepšení předoperační diagnostiky** u následujících prognostických parametrů: invazivita, multifokalita, grade (nepřesnost jeho stanovení dokazuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami před operací a po operaci), hormonální receptory, HER-2/neu, proliferační aktivita a v menší míře také histologický typ nádoru. Nemožnost validního předoperačního stanovení lymfovaskulární invaze je dána skutečností, že cílem biopsie je (zejména u menších nádorů) směřovat do centra ložiska; naopak metodika stanovení LSVI vyžaduje vyšetření lymfatických a vaskulárních prostor na periférii léze.

Určitých zlepšení lze snad dosáhnout v následujících oblastech.

a/ Zpřesnění ultrazvukové diagnostiky lymfatických uzlin. V našem souboru bylo pouze u velmi malého počtu 11 pacientek ultrazvukově a/nebo klinicky stanoveno podezření na postižení axilárních uzlin. Naproti tomu počet žen s histologicky prokázaným metastatickým postižením byl mnohonásobně vyšší (119 žen, tedy téměř 20% z celého souboru). Mnohé z uzlinových metastáz byly větších rozměrů; existuje tedy reálná šance, že při pečlivém vyšetření na kvalitním ultrazvukovém přístroji mohou být nalezeny. To by jistě zpřesnilo staging karcinomu prsu a také odhad jeho prognózy. Na druhou stranu by to žádným způsobem neovlivnilo chování našeho prediktivního modelu, protože jsme se rozhodli (z výše uvedených důvodů) předoperační stav mizních uzlin do regresního modelu nezařazovat.

b/ Přesnější stanovení velikosti nádorového ložiska. Testováním jednotlivých proměnných při sestavování regresního modelu se ukázalo, že velikost nádoru má největší prediktivní hodnotu. Exaktní měření velikosti tedy musí odrážet důležitost tohoto parametru. Pokud není ložisko ultrazvukem rozlišitelné nebo je zobrazení nejisté, pak by mělo být indikováno vyšetření magnetickou rezonancí. Tato metoda má lepší výpovědní hodnotu nejen o velikosti léze, ale také o výskytu dalších fokusů onemocnění. Zlepšila by se proto i diagnostika multifokálních lézí, což by bylo jistě přínosné pro bezpečné provádění prs zachovných operací. Limitující je samozřejmě cena a dostupnost vyšetření, respektive srovnání přínosu tohoto vyšetření a jeho ceny.

c/ Pečlivé a metodicky správné provádění biopsie sentinelové uzliny. Především se doporučuje používat vždy duální metody značení sentinelových uzlin (radionuklidem i lymfotropním barvivem) – četnost detekce je v tomto případě signifikantně vyšší, než při použití pouze jedné z těchto metod. Nelze se spokojit s jedinou exstirpovanou sentinelovou uzlinou. U značné části pacientek je nalezeno více sentinelových uzlin – ve většině publikovaných prací se průměrný počet exstirpovaných sentinelových uzlin pohyboval v rozmezí 1,5-2,1 na pacientku. Bylo prokázáno, že riziko falešné negativity sentinelové uzliny (tj. minutí lymfatické metastázy v sentinelové uzlině) se snižuje s každou další exstirpovanou sentinelovou uzlinou. Snaha o exaktní exstirpaci sentinelových uzlin by tedy mohla znamenat omezení rizika ponechání nepoznané metastaticky postižené uzliny in situ.

d/ Podrobnější histopatologické vyšetření mizních uzlin. Jak již bylo uvedeno dříve, extenzivní zpracování uzlin (sériové prokrájení, molekulárně genetické metody) je pro rutinní praxi nepoužitelné z časového i finančního hlediska. Alespoň u části pacientek, jejichž data budou použita pro účely studie, by však jistě bylo reálné (např. v rámci výzkumného projektu) provést takové vyšetření alespoň pro nejvíce aktivní a/nebo největší získanou sentinelovou uzlinou.

e/ Omezení využití samplingu axilárních uzlin. Protože byl sampling axilárních uzlin jednou z používaných technik i v rámci našeho souboru, mohl být důvodem nesprávného určení skutečného stavu axilárních uzlin a tudíž zdrojem chybného zadání vstupních údajů do regresní rovnice. Výše uvedené výhrady týkající se falešné negativity při sentinelové biopsii se týkají ve zvýšené míře také axilárního samplingu. Tento výkon je bohužel velmi nestandardní svým rozsahem i kvalitou provedení. Jeho falešnou negativitu tedy není snadné definovat – bude se lišit podle operátora, zvyklostí pracoviště, pacientky, atd. Vzhledem k necílenosti náhodného odběru lze předpokládat falešnou negativitu vyšší, nežli u cílené sentinelové biopsie. Dalším problémem je pak histologické zpracování – standardní zpracování nesentinelových uzlin je ještě daleko méně přesné, nežli je tomu u sentinelových uzlin. Rutinně není možné všechny uzliny získané samplinkem vyšetřit tak pečlivě, jako sentinelovou uzlinou; na druhé straně při samplingu neumíme určit, která ze získaných uzlin má největší riziko postižení. Riziko minutí metastázy při histologickém zpracování je proto zřetelně vyšší. Uvedené skutečnosti významným způsobem zpochybňují legitimitu samplingu axilárních uzlin v chirurgické léčbě karcinomu prsu. Tento výkon by mohl být přípustný pouze v situacích, kdy není možné nalézt sentinelovou lymfatickou uzlinou (a to pomocí předoperačního značení radionuklidem ani peroperačního značení lymfotropním

barvivem) a zároveň se domníváme, že standardní axilární disekce je nepřiměřeně radikálním výkonem pro daný typ nádoru. Mohlo by se jednat zejména o invazivní nádory malých rozměrů. Z vlastní praxe i z literárních zdrojů však víme, že riziko nenalezení sentinelové uzliny je v takových případech při použití správné techniky značení a detekce minimální (jistě nepřekračuje 1-2%). Existují tedy silné argumenty pro to, aby byl necílený axilární sampling zcela vyloučen z repertoáru axilární chirurgie.

5.2.1 APLIKACE MODELU NA VYBRANÉ PODSKUPINY PACIENTEK

Optimálním výsledkem naší práce by byl takový matematický model, který by byl schopen predikovat riziko axilárního postižení u všech žen s časným karcinomem prsu. Takový model jsme však nebyli schopni vytvořit, pravděpodobně v důsledku velké různorodosti pacientek, jejich vlastností a vlastností jejich onemocnění.

Jako řešení tohoto problému se proto logicky nabízí možnost zúžení cílové skupiny. Je zapotřebí hledat pouze určité podskupiny pacientek, u nichž by predikce byla spolehlivá. Bohužel neexistuje statistická metoda, která by dokázala určit takovou podskupinu žen, pro kterou bude možné vytvořit predikující model tak, aby se predikce dalo reálně využít v klinické praxi. Je proto potřeba postupovat obráceným směrem. Na základě znalostí o povaze zhoubného onemocnění prsu je nutno **stanovit hypotézu** o tom, u které podskupiny se dá předpokládat, že prediktivní model bude spolehlivě předvídat stav axilárních lymfatických uzlin (např. podskupina žen s jednočetným ložiskem nádoru, které je viditelné na ultrazvuku, má průměr maximálně 2cm a histologicky je verifikován invazivní karcinom grade 1-2). Platnost takové hypotézy je pak již možné **statistickými metodami ověřit**.

Pokud by se podařilo definovat jednu nebo více takových podskupin, pro něž by byl prediktivní model spolehlivý, pak by se mohl částečně změnit současný operační management axilárních uzlin. U většiny pacientek by se nadále prováděla biopsie sentinelové uzliny. U definovaných podskupin s prokázanou dobrou prediktivní schopností modelu by bylo možné na základě předpovězeného stavu axilárních uzlin nabízet alternativy SLNB (méně nebo více radikální – jak je uvedeno v úvodu do diskuse).

Pokus o definování takových podskupin však již překračuje rámec této práce a může být námětem pro další směřování našeho klinického výzkumu v této oblasti.

6 ZÁVĚRY

Podrobnou retrospektivní analýzou souboru 617 pacientek s časným karcinomem prsu se nám na základě hodnot získaných hodnocením pooperačních preparátů podařilo sestavit matematický model, který je svými vlastnostmi i schopností predikce srovnatelný s dosud publikovanými prediktivními modely týkajícími se karcinomu prsu a odhadu rizika postižení axilárních uzlin. Korekcí našeho modelu na základě předoperačních hodnot a dosažením hodnot, které jsou k dispozici v době stanovení diagnózy však výrazně klesla schopnost modelu predikovat axilární metastatické postižení. Výsledný model tedy není dostatečně přesný k tomu, aby mohl spolehlivě nahradit prognostickou informaci získanou pomocí biopsie sentinelové uzliny a/nebo axilární disekce.

Hlavní překážky tvorby prediktivního modelu je nutné hledat v heterogenitě cílové skupiny žen s časným prsním karcinomem, nemožnosti vyšetřit veškeré axilární uzliny (protože u velké části pacientek byla prováděna pouze biopsie sentinelové uzliny nebo sampling axilárních uzlin) a také nemožnosti dostatečně extenzivního histopatologického vyšetření exstirpovaných lymfatických uzlin.

V úvahu přichází několik možností modifikace prováděných vyšetření, které by mohly vést ke zkvalitnění datového souboru a poskytl naději na tvorbu spolehlivě predikujícího modelu:

- zpřesnění vstupních zobrazovacích vyšetření, zejména pak stanovení velikosti primárního tumoru a dále také pečlivého vyšetření stavu axilárních uzlin
- vynaložení veškerého úsilí k detekci všech sentinelových uzlin k zamezení výskytu falešně negativních výsledků
- alespoň pro účely výzkumu používat extenzivní vyšetření získaných sentinelových uzlin
- vyřadit necílený sampling axilárních uzlin ze spektra chirurgických výkonů v podpažní jamce

Nadějí do budoucna dává možnost vytvoření prediktivního modelu nikoliv pro celou populaci žen s časným karcinomem prsu, ale jen pro určitou podskupinu vybranou z těchto žen. Pokud by se takovou podskupinu podařilo definovat, umožnilo by to některým ženám vyhnout se chirurgické intervenci v podpažní jamce a to se zárukou, že nedojde k zanedbání žádného z platných principů onkologické léčby.

7 POUŽITÁ LITERATURA PRO KOMPLETNÍ DISERTAČNÍ PRÁCI

1. ÚZIS (Národní Onkologický Registr ČR). Novotvary 2013 ČR. Praha: Zdravotnická statistika, 2016.
2. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann.Surg.* 1894;20:497-555.
3. Haagensen CD. The surgical treatment of mammary carcinoma. *Diseases of the breast* (2 edition). Philadelphia: WB Saunders, 1971:669.
4. Beenken SW, Urist MM, Zhang Y et al. Axillary lymph node status, but not tumor size, predicts locoregional recurrence and overall survival after mastectomy for breast cancer. *Ann.Surg.* 2003;237:732-8.
5. Amersi F, Hansen NM. The benefits and limitations of sentinel lymph node biopsy. *Curr.Treat.Options Oncol.* 2006;7:141-51.
6. Craig PH, Silverstein MJ. Small invasive carcinomas: the role of axillary lymph node dissection. In: Bland KI, Copeland EN. *The breast, comprehensive management of benign and malignant disease* (2nd edition). Philadelphia: Saunders, 1998:1072-93.
7. Yancik R, Ries LG, Yates JW. Breast cancer in aging women. A population-based study of contrasts in stage, surgery, and survival. *Cancer* 1989;63:976-81.
8. Cibula D, Petruzelka L. *Onkogynekologie*. Prague: Grada Publishing, 2009.
9. Kolarik D, Halaska M, Feyereisl J. *Repetitorium gynekologie*. Prague: Maxdorf Jessenius, 2018.
10. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann.Oncol.* 2005;16:1569-83.
11. Cineri S, Orlando L, Fedele P et al. Adjuvant strategies in breast cancer: new perspectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gallen International Expert Consensus Conference. *Ann.Oncol.* 2007;18 Suppl 6:vi63-vi65.
12. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann.Oncol* 2009;20:1319-29.
13. Proceedings of the International Symposium on Colorectal Cancer. St. Gallen, Switzerland, December 4, 1998. *Int.J.Surg.Investig.* 1999;1:245-70.
14. Pichelmayr O. St.Gallen 2001: Adjuvante Brustkrebstherapie. *Jatros* 2001;3:12.
15. Glen H, Jones RJ. 8th international conference: primary therapy of early breast cancer, St Gallen, Switzerland, March 12-15 2003. *Breast Cancer Res.* 2003;5:198-201.
16. Dahmouh L, Pike MC, Press MF. Hormones and breast cell proliferation. Treatment of the postmenopausal woman. New York: Raven Press, 1994.
17. Habel LA, Stanford JL. Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiol.Rev.* 1993;15:209-19.
18. Romain S, Laine BC, Martin PM, Magdelenat H. Steroid receptor distribution in 47,892 breast cancers. A collaborative study of 7 European laboratories. The EORTC Receptor Study Group. *Eur.J.Cancer* 1995;31A:411-7.
19. Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer res.* 1995;55:3902-7.
20. Disaia PJ. Hormone replacement therapy for breast cancer survivors: facts versus fears. *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)* 1995;7:241-5.
21. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J.Clin.Pathol.* 2000;53:688-96.
22. Dew JE, Wren BG, Eden JA. Tamoxifen, hormone receptors and hormone replacement therapy in women previously treated for breast cancer: a cohort study. *Climacteric.* 2002;5:151-5.
23. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E et al. High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* 2000;37:536-45.
24. McCarty KS, Jr., Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS, Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1985;109:716-21.
25. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J.Clin.Pathol.* 2000;53:125-30.
26. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1992;339:1-15.

27. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1992;339:71-85.
28. Howell A, Harland RN, Barnes DM et al. Endocrine therapy for advanced carcinoma of the breast: relationship between the effect of tamoxifen upon concentrations of progesterone receptor and subsequent response to treatment. *Cancer res.* 1987;47:300-4.
29. Nomura Y, Tashiro H, Shinozuka K. Changes of steroid hormone receptor content by chemotherapy and/or endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 1985;55:546-51.
30. Nomura Y, Takatani O, Sugano H, Matsumoto K. Oestrogen and progesterone receptors and response to endocrine therapy in Japanese breast cancer. *J.Steroid Biochem.* 1980;13:565-6.
31. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers. *Int.J.Cancer* 2000;88:733-6.
32. Di FG, Coradini D, Cappelletti V et al. Hormone receptors and disease-free survival in breast cancer: impact of increasing threshold levels. *Anticancer Res.* 1990;10:1699-705.
33. Walker RA. Prognostic and predictive factors in breast cancer. New York: Martin Dunitz, 2003.
34. McGuire WL, Clark GM. The prognostic role of progesterone receptors in human breast cancer. *Semin.Oncol.* 1983;10:2-6.
35. Klijn JG, Berns PM, Bontenbal M, Alexieva-Figusch J, Foekens JA. Clinical breast cancer, new developments in selection and endocrine treatment of patients. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1992;43:211-21.
36. Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 1978;103:1742-51.
37. Klijn JG, Berns PM, Dorssers LCJ, et al. Molecular markers of resistance to endocrine treatment of breast cancer. *Drugs and hormonal resistance in breast cancer.* New York: Ellis Horwood, 1995.
38. Daidone MG, Silvestrini R, Luisi A et al. Changes in biological markers after primary chemotherapy for breast cancers. *Int.J.Cancer* 1995;61:301-5.
39. Sampson SA, Kreipe H, Gillett CE et al. KiS1--a novel monoclonal antibody which recognizes proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinoma. *J.Pathol.* 1992;168:179-85.
40. Amadori D, Silvestrini R. Prognostic and predictive value of thymidine labelling index in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;51:267-81.
41. Rasbridge SA, Gillett CE, Seymour AM et al. The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *Br.J.Cancer* 1994;70:335-41.
42. Ellis PA, Smith IE, Detre S et al. Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;48:107-16.
43. Genestie C, Zafrani B, Asselain B et al. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Res.* 1998;18:571-6.
44. Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 1994;73:2765-70.
45. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual (7 edition)* Springer, 2010.
46. Biesterfeld S, Farokhzad F, Kluppel D, Schneider S, Hufnagl P. Improvement of breast cancer prognostication using cell kinetic-based silver-stainable nucleolar organizer region quantification of the MIB-1 positive tumor cell compartment. *Virchows Arch.* 2001;438:478-84.
47. Imamura H, Haga S, Shimizu T, Watanabe O, Kajiwara T, Aiba M. Prognostic significance of MIB1-determined proliferative activities in intraductal components and invasive foci associated with invasive ductal breast carcinoma. *Br.J.Cancer* 1999;79:172-8.
48. Dowsett M, Archer C, Assersohn L et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* 1999;6:25-8.
49. Riccardi A, Danova M, Dionigi P et al. Cell kinetics in leukaemia and solid tumours studied with in vivo bromodeoxyuridine and flow cytometry. *Br.J.Cancer* 1989;59:898-903.
50. Silvestrini R, Benini E, Luisi A. Biology of breast cancer in elderly women. In: Figueira FA. *Mastology: Breast Disease* 1995:255.
51. Thor AD, Liu S, Moore DH, Edgerton SM. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:470-7.
52. Makris A, Allred DC, Powles TJ et al. Cytological evaluation of biological prognostic markers from primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res.Treat.* 1997;44:65-74.
53. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11:121-39.
54. Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991;3:1-7.
55. Strnad P, Danes P. *Nemoci prsu pro gynekology.* Prague: Grada Publishing s.r.o., 2001.

56. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J.Histochem.Cytochem.* 1993;41:7-12.
57. de Jong JS, van Diest PJ, van d, V, Baak JP. Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res.Treat.* 2001;66:201-8.
58. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br.J.Cancer* 2000;82:368-73.
59. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-7.
60. Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C et al. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 1995;1:189-98.
61. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO et al. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int.J.Cancer* 1994;59:619-28.
62. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br.J.Cancer* 1994;69:135-9.
63. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6.
64. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993;361:365-9.
65. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
66. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-7.
67. Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J.Biol.Chem.* 1993;268:6511-9.
68. Bhargava V, Kell DL, van de Rijn M, Warnke RA. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am.J.Pathol.* 1994;145:535-40.
69. Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P, Di FG, Mezzanotte G, Bonadonna G. Cell kinetics as a prognostic indicator in node-negative breast cancer. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 1989;25:1165-71.
70. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
71. Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN. Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature* 1992;359:426-9.
72. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
73. Nugent A, McDermott E, Duffy K, O'Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ. Enzyme-linked immunosorbent assay of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Clin.Chem.* 1992;38:1471-4.
74. Spandidos DA, Anderson ML. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J.Pathol.* 1989;157:1-10.
75. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod.Pathol.* 1998;11:155-68.
76. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1974-82.
77. Depowski PL, Brien TP, Sheehan CE, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Prognostic significance of p34cdc2 cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in breast cancer. *Am.J.Clin.Pathol.* 1999;112:459-69.
78. Press MF, Bernstein L, Thomas PA et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2894-904.
79. Muss HB, Thor AD, Berry DA et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1994;330:1260-6.
80. O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erb B-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum.Pathol.* 1996;27:955-63.
81. Leers MP, Nap M. Steroid receptor heterogeneity in relation to DNA index in breast cancer: a multiparameter flow cytometric approach on paraffin-embedded tumor samples. *Breast J.* 2001;7:249-59.

82. Barnes DM, Meyer JS, Gonzalez JG, Gullick WJ, Millis RR. Relationship between c-erbB-2 immunoreactivity and thymidine labelling index in breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res.Treat.* 1991;18:11-7.
83. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1990;114:160-3.
84. Benz CC, Scott GK, Sarup JC et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res.Treat.* 1992;24:85-95.
85. Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995;159:11-8.
86. Suen TC, Hung MC. c-myc reverses neu-induced transformed morphology by transcriptional repression. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:354-62.
87. Berns EM, Klijn JG, van Staveren IL, Portengen H, Noordegraaf E, Foekens JA. Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. *Eur.J.Cancer* 1992;28:697-700.
88. Borg A, Sigurdsson H, Clark GM et al. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *Br.J.Cancer* 1991;63:136-42.
89. Ford JM, Hanawalt PC. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:8876-80.
90. Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Milolozza A, Hengstschlager-Ottndad E. Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat.Res.* 1999;436:1-9.
91. Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990;250:1576-80.
92. Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, Varley JM. Expression of p53 protein in infiltrating and in-situ breast carcinomas. *J.Pathol.* 1991;165:203-11.
93. Silvestrini R, Benini E, Daidone MG et al. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J.Natl.Cancer Inst.* 1993;85:965-70.
94. Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast RC, Jr. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1994;170:246-52.
95. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:470-9.
96. Paradiso A, Rabinovich M, Vallejo C et al. p53 and PCNA expression in advanced colorectal cancer: response to chemotherapy and long-term prognosis. *Int.J.Cancer* 1996;69:437-41.
97. Borg A, Zhang QX, Alm P, Olsson H, Sellberg G. The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer res.* 1992;52:2991-4.
98. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr.Rev.* 1992;13:3-17.
99. Oehler MK, Rehn M, Kristen P, Sutterlin M, Caffier H. Correlation of the EGF-receptor with cell kinetic and classical prognostic factors in breast cancer. *Anticancer Res.* 1997;17:3137-40.
100. van AT, van Agthoven TL, Portengen H, Foekens JA, Dorssers LC. Ectopic expression of epidermal growth factor receptors induces hormone independence in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Cancer res.* 1992;52:5082-8.
101. Ellis MJ, Coop A, Singh B et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3808-16.
102. Reubi JC, Waser B, Foekens JA, Klijn JG, Lamberts SW, Laissue J. Somatostatin receptor incidence and distribution in breast cancer using receptor autoradiography: relationship to EGF receptors. *Int.J.Cancer* 1990;46:416-20.
103. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer res.* 1993;53:1696-701.
104. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.Treat.* 2001;65:55-61.
105. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv.Cancer Res.* 1996;68:67-108.
106. Cuny M, Kramar A, Courjal F et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer res.* 2000;60:1077-83.

107. Wilcken NR, Prall OW, Musgrove EA, Sutherland RL. Inducible overexpression of cyclin D1 in breast cancer cells reverses the growth-inhibitory effects of antiestrogens. *Clin.Cancer Res.* 1997;3:849-54.
108. Horwitz KB, McGuire WL. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* 1975;189:726-7.
109. Cho HS, NG PA, Katzenellenbogen BS. Differential regulation of gene expression by estrogen in estrogen growth-independent and -dependent MCF-7 human breast cancer cell sublines. *Mol.Endocrinol.* 1991;5:1323-30.
110. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1990;322:297-302.
111. Rochefort H, Capony F, Garcia M et al. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? *J.Cell Biochem.* 1987;35:17-29.
112. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur.J.Cancer* 1992;28A:1780-3.
113. Dickerman HW, Martinez HL, Seeger JI, Kumar SA. Estrogen regulation of human breast cancer cell line MCF-7 tissue plasminogen activator. *Endocrinology* 1989;125:492-500.
114. Janicke F, Schmitt M, Graeff H. Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin.Thromb.Hemost.* 1991;17:303-12.
115. Bettelheim R, Penman HG, Thornton-Jones H, Neville AM. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *Br.J.Cancer* 1984;50:771-7.
116. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994;24:41-7.
117. Fourquet A, Campana F, Zafrani B et al. Prognostic factors of breast recurrence in the conservative management of early breast cancer: a 25-year follow-up. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 1989;17:719-25.
118. Bedrosian I, Reynolds C, Mick R et al. Accuracy of sentinel lymph node biopsy in patients with large primary breast tumors. *Cancer* 2000;88:2540-5.
119. Ferno M. Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res.* 1998;18:2167-71.
120. Greco M, Agresti R, Cascinelli N et al. Breast cancer patients treated without axillary surgery: clinical implications and biologic analysis. *Ann.Surg.* 2000;232:1-7.
121. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol.* 2007;8:881-8.
122. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma - A metaanalysis. *Cancer* 2006;106:4-16.
123. Cabanas BR. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977;39:456-66.
124. Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer* 1960;13:77-8.
125. Morton DL, Wen DR, Wong JH et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch.Surg.* 1992;127:392-9.
126. Alex JC, Krag DN. Gamma-probe guided localization of lymph nodes. *Surg.Oncol.* 1993;2:137-43.
127. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg.Oncol.* 1993;2:335-9.
128. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann.Surg.* 1994;220:391-8.
129. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet* 1997;349:1864-7.
130. Chvalny P, Straka V, Donat R et al. [Significance of the sentinel lymph node biopsy in early breast carcinomas]. *Rozhl.Chir* 2010;89:395-401.
131. Fait V, Chrenko V. Sentinel node biopsy in breast cancer: short time results show appropriate regional control. *Neoplasma* 2007;54:256-61.
132. Gatek J, Hnatek L, Dudesek B et al. [Sentinel lymph node biopsy in the breast carcinoma in clinical practice]. *Rozhl.Chir* 2008;87:180-5.
133. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer res.* 1980;40:3863-74.
134. Fisher B, Osborne CK, Margolese R, Bloomer W. Surgical management of breast cancer. In: Holland JF, Frei EI, Bast RCJr, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine* (3 edition). Philadelphia: Lea and Febiger, 1993:1733-45.
135. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J et al. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N.Engl.J.Med.* 1997;337:949-55.

136. Overgaard M, Jensen MB, Overgaard J et al. Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial. *Lancet* 1999;353:1641-8.
137. Orr RK. The impact of prophylactic axillary node dissection on breast cancer survival--a Bayesian meta-analysis. *Ann.Surg.Oncol.* 1999;6:109-16.
138. Krag D. NSABP B-32: Sentinel node resection without axillary dissection effective for node-negative breast cancer. ASCO 2010 Annual Meeting. 7-6-2010.
139. Giuliano AE, McCall LM, Beitsch PD, et al. ACOSOG Z0011: a randomized trial of axillary node dissection in women with clinical T1-2 N0 M0 breast cancer who have a positive sentinel node. *J.Clin.Oncol.* 2010;28.
140. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann.Surg.* 2010;252:426-32.
141. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305:569-75.
142. Grube BJ, Giuliano AE. Observation of the breast cancer patient with a tumor-positive sentinel node: implications of the ACOSOG Z0011 trial. *Semin.Surg.Oncol.* 2001;20:230-7.
143. Ivens D, Hoe AL, Podd TJ, Hamilton CR, Taylor I, Royle GT. Assessment of morbidity from complete axillary dissection. *Br.J.Cancer* 1992;66:136-8.
144. Kissin MW, Querci della RG, Easton D, Westbury G. Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer. *Br.J.Surg.* 1986;73:580-4.
145. Schijven MP, Vingerhoets AJ, Rutten HJ, et al. Comparison of morbidity between axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29:341-50.
146. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703-20.
147. Povoski SP, Olsen JO, Young DC et al. Prospective randomized clinical trial comparing intradermal, intraparenchymal, and subareolar injection routes for sentinel lymph node mapping and biopsy in breast cancer. *Ann.Surg.Oncol.* 2006;13:1412-21.
148. Krag D, Weaver D, Ashikaga T et al. The sentinel node in breast cancer - A multicenter validation study. *New England Journal of Medicine* 1998;339:941-6.
149. Mamounas EP, Brown A, Anderson S et al. Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:2694-702.
150. Pijpers R, Meijer S, Hoekstra OS et al. Impact of lymphoscintigraphy on sentinel node identification with technetium-99m-colloidal albumin in breast cancer. *J.Nucl.Med.* 1997;38:366-8.
151. Xing Y, Foy M, Cox DD, Kuerer HM, Hunt KK, Cormier JN. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy after preoperative chemotherapy in patients with breast cancer. *Br.J.Surg.* 2006;93:539-46.
152. Cody HS, III. Clinical aspects of sentinel node biopsy. *Breast Cancer Res.* 2001;3:104-8.
153. Krag DN, Julian TB. Practice patterns of sentinel node biopsy at five comprehensive cancer centers. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:1498-9.
154. Salem A. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a comprehensive literature review. *J.Surg.Educ.* 2009;66:267-75.
155. Borgstein PJ. The Sentinel Node Concept. Consequences of Lymphatica Tumour Spread in Melanoma and Breast Cancer. Amsterdam: Ponsen & Looijen bv, Wageningen, 1999.
156. Derossis AM, Fey J, Yeung H et al. A trend analysis of the relative value of blue dye and isotope localization in 2,000 consecutive cases of sentinel node biopsy for breast cancer. *J.Am.Coll.Surg.* 2001;193:473-8.
157. Tew K, Irwig L, Matthews A, Crowe P, Macaskill P. Meta-analysis of sentinel node imprint cytology in breast cancer. *Br.J.Surg.* 2005;92:1068-80.
158. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2007;13:4807-16.
159. Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K et al. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am.J.Surg.* 2007;194:426-32.
160. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39.
161. Visser M, Jiwa M, Horstman A et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int.J.Cancer* 2008;122:2562-7.
162. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann.Surg.* 1995;222:394-9.

163. Dowlatshahi K, Fan M, Bloom KJ, Spitz DJ, Patel S, Snider HC, Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-6.
164. Dowlatshahi K, Fan M, Anderson JM, Bloom KJ. Occult metastases in sentinel nodes of 200 patients with operable breast cancer. *Ann.Surg Oncol* 2001;8:675-81.
165. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2345-50.
166. Leers MP, Schoffelen RH, Hoop JG et al. Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer. *J.Clin.Pathol.* 2002;55:359-66.
167. Abdessalam SF, Zervos EE, Prasad M et al. Predictors of positive axillary lymph nodes after sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am.J.Surg.* 2001;182:316-20.
168. Chu KU, Turner RR, Hansen NM, Brennan MB, Bilchik A, Giuliano AE. Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection? *Ann.Surg.* 1999;229:536-41.
169. Reynolds C, Mick R, Donohue JH et al. Sentinel lymph node biopsy with metastasis: can axillary dissection be avoided in some patients with breast cancer? *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1720-6.
170. Turner RR, Chu KU, Qi K et al. Pathologic features associated with nonsentinel lymph node metastases in patients with metastatic breast carcinoma in a sentinel lymph node. *Cancer* 2000;89:574-81.
171. Weiser MR, Montgomery LL, Tan LK et al. Lymphovascular invasion enhances the prediction of non-sentinel node metastases in breast cancer patients with positive sentinel nodes. *Ann.Surg.Oncol.* 2001;8:145-9.
172. Naik AM, Fey J, Gemignani M et al. The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection: a follow-up study of 4008 procedures. *Ann.Surg.* 2004;240:462-8.
173. Jeruss JS, Winchester DJ, Sener SF et al. Axillary recurrence after sentinel node biopsy. *Ann.Surg.Oncol.* 2005;12:34-40.
174. Guenther JM, Hansen NM, DiFronzo LA et al. Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. *Arch.Surg.* 2003;138:52-6.
175. Fant JS, Grant MD, Knox SM et al. Preliminary outcome analysis in patients with breast cancer and a positive sentinel lymph node who declined axillary dissection. *Ann.Surg.Oncol.* 2003;10:126-30.
176. Hwang RF, Gonzalez-Angulo AM, Yi M et al. Low locoregional failure rates in selected breast cancer patients with tumor-positive sentinel lymph nodes who do not undergo completion axillary dissection. *Cancer* 2007;110:723-30.
177. Coufal O, Pavlik T, Fabian P et al. Predicting non-sentinel lymph node status after positive sentinel biopsy in breast cancer: what model performs the best in a Czech population? *Pathol.Oncol.Res.* 2009;15:733-40.
178. Kohrt HE, Olshen RA, Bermas HR et al. New models and online calculator for predicting non-sentinel lymph node status in sentinel lymph node positive breast cancer patients. *BMC.Cancer* 2008;8:66.
179. Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann.Surg.Oncol.* 2003;10:1140-51.
180. Park J, Fey JV, Naik AM, Borgen PI, Van Zee KJ, Cody HS, III. A declining rate of completion axillary dissection in sentinel lymph node-positive breast cancer patients is associated with the use of a multivariate nomogram. *Ann.Surg.* 2007;245:462-8.
181. Goyal A, Newcombe RG, Mansel RE. Clinical relevance of multiple sentinel nodes in patients with breast cancer. *Br.J.Surg.* 2005;92:438-42.
182. Martin RC, Edwards MJ, Wong SL et al. Practical guidelines for optimal gamma probe detection of sentinel lymph nodes in breast cancer: results of a multi-institutional study. For the University of Louisville Breast Cancer Study Group. *Surgery* 2000;128:139-44.
183. Pecha V, Kolarik D, Kozevnikova R et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2011;117:4606-16.
184. Martin RC, Chagpar A, Scoggins CR et al. Clinicopathologic factors associated with false-negative sentinel lymph-node biopsy in breast cancer. *Ann.Surg.* 2005;241:1005-12.
185. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1999;354:896-900.
186. Rivera M, Merlin S, Hoda RS, Gopalan A, Hoda SA. Controversies in surgical pathology: minimal involvement of sentinel lymph node in breast carcinoma: prevailing concepts and challenging problems. *Int.J.Surg.Pathol.* 2004;12:301-6.
187. Chen SL, Hoehne FM, Giuliano AE. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis. *Ann.Surg.Oncol.* 2007;14:3378-84.

188. Goyal A, Douglas-Jones A, Newcombe RG, Mansel RE. Predictors of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Eur.J.Cancer* 2004;40:1731-7.
189. Cox CE, Kiluk JV, Riker AI et al. Significance of sentinel lymph node micrometastases in human breast cancer. *J.Am.Coll.Surg.* 2008;206:261-8.
190. Cserni G, Gregori D, Merletti F et al. Meta-analysis of non-sentinel node metastases associated with micrometastatic sentinel nodes in breast cancer. *Br.J.Surg.* 2004;91:1245-52.
191. Patani N, Mokbel K. The clinical significance of sentinel lymph node micrometastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 2009;114:393-402.
192. Estourgie SH, Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Rutgers EJ, Kroon BB. Should the hunt for internal mammary chain sentinel nodes begin? An evaluation of 150 breast cancer patients. *Ann.Surg.Oncol.* 2003;10:935-41.
193. Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Valagussa P, Zucali R. The dissection of internal mammary nodes does not improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomised trial. *Eur.J.Cancer* 1999;35:1320-5.
194. Matzinger O, Heimsoth I, Poortmans P et al. Toxicity at three years with and without irradiation of the internal mammary and medial supraclavicular lymph node chain in stage I to III breast cancer (EORTC trial 22922/10925). *Acta Oncol.* 2010;49:24-34.
195. Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast April 19 to 22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Hum.Pathol.* 2002;33:579-89.
196. Wilkie C, White L, Dupont E, Cantor A, Cox CE. An update of sentinel lymph node mapping in patients with ductal carcinoma in situ. *Am.J.Surg.* 2005;190:563-6.
197. Borgstein PJ, Meijer S, Pijpers RJ, van Diest PJ. Functional lymphatic anatomy for sentinel node biopsy in breast cancer: echoes from the past and the periareolar blue method. *Ann.Surg.* 2000;232:81-9.
198. Linehan DC, Hill AD, Akhurst T et al. Intradermal radiocolloid and intraparenchymal blue dye injection optimize sentinel node identification in breast cancer patients. *Ann.Surg.Oncol.* 1999;6:450-4.
199. Rahusen FD, Pijpers R, van Diest PJ, Bleichrodt RP, Torrenga H, Meijer S. The implementation of the sentinel node biopsy as a routine procedure for patients with breast cancer. *Surgery* 2000;128:6-12.
200. Cserni G. The impact of axillary lymphadenopathy on further treatment in breast cancer? A model for clinical staging. *Pathol.Oncol.Res.* 1998;4:301-3.
201. Specht MC, Fey JV, Borgen PI, Cody HS, III. Is the clinically positive axilla in breast cancer really a contraindication to sentinel lymph node biopsy? *J.Am.Coll.Surg.* 2005;200:10-4.
202. Goyal A, Mansel RE. Recent advances in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Curr.Opin.Oncol.* 2008;20:621-6.
203. Luini A, Galimberti V, Gatti G et al. The sentinel node biopsy after previous breast surgery: preliminary results on 543 patients treated at the European Institute of Oncology. *Breast Cancer Res.Treat.* 2005;89:159-63.
204. Intra M, Trifiro G, Viale G et al. Second biopsy of axillary sentinel lymph node for reappearing breast cancer after previous sentinel lymph node biopsy. *Ann.Surg.Oncol.* 2005;12:895-9.
205. Port ER, Garcia-Etienne CA, Park J, Fey J, Borgen PI, Cody HS, III. Reoperative sentinel lymph node biopsy: a new frontier in the management of ipsilateral breast tumor recurrence. *Ann.Surg.Oncol.* 2007;14:2209-14.
206. UICC (International Union Against Cancer): TNM classification of malignant tumours (7th edition) Willey-Blackwell, 2009.
207. Miltenburg DM, Miller C, Karamlou TB, Brunicardi FC. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *J.Surg.Res.* 1999;84:138-42.
208. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1995;333:1456-61.
209. AJCC Cancer Staging Manual (6th edition). Philadelphia: Lippincott Raven, 2002.
210. Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii. Česká verze. (3.vydání edition). Praha: 2004.
211. Zvárová J, Malý M, et al. Biomedicínská statistika III. Prague: Nakladatelství Karolinum, 2003.
212. Meloun M, Militký J, Hill M. Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech. Prague: Academia, 2005.
213. Rehakova B. Nebojte se logistické regrese. *Sociol.casop.* 2000;36:475-92 .
214. GreenHalgh T. Jak pracovat s vědeckou publikací (1st edition). Prague: Grada publishing, 2003.
215. Kolarik D, Pecha V, Skovajsova M et al. Predicting axillary sentinel node status in patients with primary breast cancer. *Neoplasma* 2013;60:334-42.
216. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics.* 2005;21:3940-1.

217. Ravdin PM, De LM, Vendely T, Clark GM. Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. *J.Natl.Cancer Inst.* 1994;86:1771-5.
218. Jeruss JS, Newman LA, Ayers GD et al. Factors predicting additional disease in the axilla in patients with positive sentinel lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2008;112:2646-54.
219. Kolarik D, Pecha V, Skovajsova M et al. Breast cancer characteristics-comparison of preoperative and postoperative values. *Pathol.Res.Pract.* 2013;209:433-40.

SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA SE VZTAHEM K DISERTAČNÍ PRÁCI

PUBLIKACE S IMPACT FACTOREM

1. Kolařík, D., Pecha, V., Skovajsová, M., Záhumenský, J., Trnková, M., Petruželka, L., Krofta, L., Feyereisl, J., Kolářová, H.: **Vlastnosti karcinomu prsu – srovnání předoperačních a pooperačních vyšetření**, Pathology – Research and Practice, 209, 7, s.433, 2013
english language, IF = 1,21
2. Kolařík, D., Pecha, V., Skovajsová, M., Záhumenský, J., Trnková, M., Petruželka, L., Halaška, M., Šottner, O., Otčenášek, M., Kolářová, H.: **Predikce stavu sentinelové axilární uzliny u pacientů s primárním karcinomem prsu**, Neoplasma, 60, 3, s.338, 2013
english language, IF = 1,57
3. Kolařík, D., Pecha, V., Sýkorová, J., Rauš, K., Koževníková, R., Hovorková, K., Hrabětová, P., Šottner, O., Trnková, M., Kolářová, H.: **Biopsie sentinelové lymfatické uzliny u pacientek s karcinomem prsu léčených neoadjuvantní chemoterapií**, Cancer Res., 70, 24 suppl., p1-01-33, 2011
english language, IF = 9,33
4. Pecha, V., Kolařík, D., Koževníková, R., Hovorková, K., Hrabětová, P., Halaška, M., Šottner, O., Trnková, M., Petruželka, L., Kolářová, H.: **Biopsie sentinelové lymfatické uzliny u pacientek s karcinomem prsu léčených neoadjuvantní chemoterapií**, Cancer., 117, 20, s. 4606, 2011
english language, IF = 5,418

PUBLIKACE BEZ IMPACT FAKTORU

5. Kolařík, D., Pecha, V., Skovajsová, M.: **Praktické použití prognostických a prediktivních markerů u karcinomu prsu**, Edukační sborník 17. ročníku sympózia Onkologie v Gynekologii a Mammologii, Masarykův Onkologický Ústav, Brno, 2012
6. Kolařík, D., Pecha, V., Křepelka, P., Hasilová, M., Hron, F., Krofta, L., Sehnal, B., Prudilová, M., Trnková, M., Kolářová, H.: **Vlastnosti a prognóza zhoubného onemocnění prsu u žen velmi nízkého věku**, Čes. Gynek., 76 (6), s.457, 2011
7. Kolařík, D., Levá, E. V., Křepelka, P., Verner, M., Trnková, M., Kolářová, H.: **Karcinom prsu – jak spolehlivá jsou předoperační vyšetření**, Actual. Gyn., 3, s. 21, 2011
8. Pecha, V., Kolařík, D., Menzlová, E., Dvorská, M., Trnková, M.: **Biopsie sentinelové uzliny u žen s časným karcinomem prsu**, Onkol., 5(1), s.16, 2011
9. Kolařík, D., Netíková, I., Marinov, I., Juliš, I., Halaška, M., Jr., Rauš, K., Driák, D., Záhumenský, J., Benková, K., Halaška, M.: **Populace buněk karcinomu prsu a její změny v závislosti na protinádorové léčbě**, Čes. Gynek., 1, s.43, 2006

SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA BEZ VZTAHU K TÉMĚTU DISERTACE

PUBLIKACE S IMPACT FACTOREM

1. Maxová, K., Šottner, O., Švabík, K., Mlčoch, M., Kolařík, D., Malá, I., Krofta, L., Halaška, M.J.: **Multicentrická, randomizovaná, prospektivní, kontrolovaná studie srovnávající sakrospinózní fixaci a transvaginální síťku v léčbě prolapsu vaginálního pahýlu u žen po hysterektomii.** Am. J. Obstet. Gynecol., 207, 301, e1-7, 2012
english language, IF = 4,70
2. Šottner, O., Horčíčka, L., Halaška, M., Martan, A., Mašata, J., Krofta, L., Huvar, I., Feyereisl, J., Zmrhal, J., Krahulec, P., Kolařík, D., Hurt, K.: **National registry of urogynecological procedures involving implant during years 2007-2010,** Neurol. Urodyn., 31 (289), p.183, 2012. 42nd Annual Meeting of ICS, 2012
english language, IF = 2,87
3. Halaška, M., Šottner, O., Krčmář, M., Kolařík, D., Halaška, M.J., Driák, D.: **Suburetrální miniinvazivní pásky: porovnání výsledků TVT, TOT a TVT-O,** Int.Urogyn.J., 18, suppl.1 (289), s.183, 2007. 32nd Annual IUGA Meeting, Cancún, Mexico, 12.6.-16.6.2007
english language, IF = 2,523
4. Šottner, O., Záhumenský, J., Krčmář, M., Hurt, K., Kolařík, D., Halaška, M., Brtnická, H., Dvorská, M., Zmrhalová, B., Gabriel, B., Halaška, M.J.: **Močová inkontinence a sexuální dysfunkce ve vztahu k těhotenství a porodu,** Int.Urogyn.J., 18, suppl.1 (289), s.159, 2007. 32nd Annual IUGA Meeting, Cancún, Mexico, 12.6.-16.6.2007
english language, IF = 2,523
5. Šottner, O., Záhumenský, J., Krčmář, M., Brtnická, H., Kolařík, D., Driák, D., Halaška, M.: **Močová inkontinence ve skupině prvorodiček v České republice,** Gynecol.Obstet.Invest., 62, s.33, 2006
english language, IF = 0,867
6. Gabriel, B., Gitsch, G., Watermann, D., Halaska, M., Sottner, O., Krcmar, M., Kolarik, D.: **Uterosakrální ligamenta u postmenopauzálních žen s a bez sestupu pánevních orgánů,** Neurourol.Urodynam., 25, s.533, 2006
english language, IF = 1,934
7. Driák, D., Kolařík, D.: **Dlouhodobá bezpečnost a účinnost perorálního kombinovaného extrémně nízkodávkového kontraceptiva s 15 mcg ethinylestradiolu a 60 mcg gestodenu,** Eur.J.Contr.Repr.Health., 9, suppl.1, s. 80, 2004
english language, IF = 0,571

KNIŽNÍ PUBLIKACE

1. Hlavní autor učebnice postgraduální gynekologie – Kolařík, D., Halaška, M., Feyereisl, J.: **„Repetitorium gynekologie – druhé, aktualizované vydání“**, nakladatelství Maxdorf, 2011
2. Hlavní autor učebnice postgraduální gynekologie – Kolařík, D., Halaška, M., Feyereisl, J.: **„Repetitorium gynekologie“**, nakladatelství Maxdorf, 2008
3. Pořadatel a spoluautor monografie prof. M.Halašky a kol. **„Urogynekologie“**, nakladatelství Galén, 2004

PUBLIKACE BEZ IMPACT FAKTORU

1. Křepelka,P., Kolařík, D.: **Hormonální antikoncepce a kardiovaskulární systém**, Postgrad.Med., 14 (3), s. 255, 2012
2. Sehnal,B., Driák,D., Kmoníčková,E., Dvorská,M., Hosová,M., Citterbart,K., Halaška,M., Kolařík,D.: **Současná klasifikace zhoubných nádorů v onkogynekologii – část I**, Čes. Gynek., 76 (4), s. 279, 2011
3. Sehnal,B., Driák,D., Kmoníčková,E., Dvorská,M., Hosová,M., Citterbart,K., Halaška,M., Kolařík,D.: **Současná klasifikace zhoubných nádorů v onkogynekologii – část II**, Čes. Gynek., 76 (5), s. 360, 2011
4. Sehnal,B., Driák,D., Kmoníčková,E., Kolařík,D.: **Nový stagingový systém FIGO**, Edukační sborník, s.196, Masarykův Onkologický Ústav, Brno, 2011
5. Halaška,M.J., Strnad,P., Chod,J., Malá,I., Nováčková,M., Stankušová,H., Kolařík,D., Feldmár,P., Rob,L.: **Detekce pooperačního lymfedému u pacientek s karcinomem prsu**, Čes.gynek., 72, 4, s.298, 2007
6. Záhumenský,J.,Šottner,O., Krčmář,M., Brtnická,H., Dvorská,M., Masopustová,Z., Kolařík,D., Driák,D., Halaška,M.: **Plánované a neplánované těhotenství – srovnání ženské sexuality a průběhu porodu**, J.Matern.Fet.Neonat.Med., 19, suppl. 1, s.17, 2006 (english language)
7. Šottner,O., Záhumenský,J., Krčmář,M., Brtnická,H., Dvorská,M., Masopustová,Z., Kolařík,D., Driák,D., Hurt,K., Halaška,M.: **Incidence močové inkontinence a sexuální dysfunkce v souvislosti s těhotenstvím a porodem**, J.Matern.Fet.Neonat.Med., 19, suppl. 1, s.14, 2006 (english language)
8. Driák,D., Sehnal,B., Korešová,M., Šottner,O., Kolařík,D., Halaška,M., Kmoníčková,E., Pohanka,M.: **Wirchovova uzlina jako první známka pokročilého karcinomu čípku - kazuistika**, Gynekolog, 15, s.233, 2006
9. Halaška,M.J., Komárek,V., Malá, I., Chod,J., Srnad,P., Novotný,J., Stankušová,H., Kolařík,D., Marešová,D.: **Metoda detekce pooperačního lymfedému po operaci pro karcinom prsu: multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza**, J.Appl.Biomed., 4, 2006 (english language)
10. Kolařík,D.: **Komentář ke článku „Tibolon a kardiovaskulární onemocnění“**, Klimakt.Med., 1, 16, 2006
11. Záhumenský,J., Halaška,M., Kolařík,D., Sehnal,B., Šottner,O., Krčmář,M.: **Porody mimo zdravotnické zařízení**, Čes.Gynek., 1, s.13, 2006
12. Šottner,O., Záhumenský,J., Krčmář,M., Kolařík,D., Brtnická,H., Blovský,J., Halaška,M.: **Prevalence of urinary incontinence in the group of primiparas**, Internat.Urogynec.J., 16, suppl.2, S85, 2005 (english language)
13. Kolařík,D., Driák,D.: **Poševní prostředí a jeho poruchy v klinické praxi**, MediNews, 3, 2005
14. Kolařík,D.: **Závěrečná zpráva grantu: Změny populace buněk karcinomu prsu v závislosti na neoadjuvantní léčbě s ohledem na možnosti modifikace adjuvantní terapie**, NR7875-3/2004
15. Kolařík,D.: **Konzervativní léčba inkontinence moči**, Lékařské listy, 38, 2004
16. Krčmář,M., Otčenášek,M., Halaška,M., Kolařík,D., Záhumenský,J., Halaška,M.Jr.: **Hiatus urogenitalis a jeho dorzální součást; význam pro kontinenci moči a stolice u žen**, Česká gynekologie, 2, 69, 2004
17. Kolařík,D.: **Endokrinní poruchy u dívek a dospívajících žen**, MediNews, 1, 2004
18. Kolařík,D.: **Hormonální substituce a karcinom prsu**, Moderní gynekologie, 13, 3, 2004
19. Kolařík,D., Martan,A.: **Farmakologická léčba v urogynekologii**, IN: Halaška,M., et al.: Urogynekologie, Galén, 2004
20. Kolařík,D.: **Konzervativní léčba v urogynekologii**, IN: Halaška,M., et al.: Urogynekologie, Galén, 2004
21. Kolařík,D.: **Hormonální substituční terapie a karcinom prsu**, Praktická gynekologie, 6, 2003
22. Kolařík,D., Driák,D.: **Agentura Reuters „konečně udělala jasno v problematice hormonální substituční léčby“ (aneb: Jaké informace poskytují novináři ženám)**, Gynekolog, 5, 12, 2003
23. Kolařík,D.: **Současný stav v léčbě urgentní inkontinence moči**, Postgraduální medicína, 8 (5), 2003
24. Kolařík,D., Jedličková,A., Otčenášek,M., Mašata,J.: **Racionální antimikrobiální léčba v gynekologii**, Čes.Gynek., 6, 2002
25. Kolařík,D.: **Zánětlivá onemocnění v gynekologii**, Lékařské listy, 10, 2002
26. Kolařík,D., Šimon,V., Otčenášek,M., Martan,A., Halaška,M., Mašata,J.: **Léčba stresové inkontinence moči u žen pomocí periuretrálních implantátů**, Čes.Gynek.,2,2002
27. Hájek,Z., Reissigová,J., Haaková,L., Kolařík,D., Binder,T.,Živný,J.: **Trendy provádění císařských řezů v regionálním perinatologickém centru od 1955 do 1999**, Acta obstetrica et gynecologica scandinavica, 4, 2001 (english language)
28. Hájek,Z., Haaková,L., Kolařík,D.: **Operační porody: odborné a ekonomické aspekty**, Acta obstetrica et gynecologica scandinavica, 5, 2001 (english language)
29. Kolařík,D.: **Endokrinní poruchy u dívek a dospívajících žen**, Forum Medicinae, 2, 2001
30. Drbohlav,P., Hájek,Z., Mašata,J., Klímková,M., Kolařík,D., Řežábek,K., Zvárová,J., Jirkovský,M.: **Perinatální výsledky vícečetných těhotenství po IVF a po spontánní koncepci**, Čes.Gynek,65, Suppl.1, s.24-29, 2000