

Postgraduální doktorské studium biochemie a patobiochemie

PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ BIOCHEMICKÉ FAKTORY U KARCINOMU
PRSU- DIAGNOSTIKA A ÚČINEK

Disertační práce

MUDr. Olga Přibyllová

Onkologická klinika VFN a 1. LF UK

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a 1. LF UK v Praze

Praha 2008

Poděkování

Na úvod chci poděkovat všem svým spolupracovníkům z Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN za pomoc a pochopení v průběhu mého doktorandského studia. Jmenovitě děkuji ing. Drahomíře Springer za praktickou pomoc při laboratorní práci.

Dále děkuji přednostovi Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN prof. MUDr. Luboši Petruželkovi CSc. za jeho podporu po celou dobu mého postgraduálního studia.

Zvláštní poděkování patří mému školiteli, prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., MBA za jeho cenné rady a podněty i kritické připomínky při závěrečném zpracování všech textů, které s mou prací souvisí a jeho čas, který mi věnoval.

Za trpělivost, pomoc a podporu děkuji i své rodině.

Obsah

1. Úvod do problematiky	4
1.1. Karcinom prsu.....	4
1.2. Diagnóza onemocnění.....	5
1.3. Prognostické a prediktivní faktory.....	7
1.4. Terapeutické možnosti.....	8
1.5. Statistické údaje.....	11
1.6. Prevence.....	13
1.7. Regulační mechanismy růstu karcinomu prsu.....	13
1.8. Vliv chemoterapie na hladiny hormonů u premenopauzálních žen.....	21
2. Cíle práce.....	22
3. Materiál a metody.....	23
3.1. Charakteristika souboru.....	24
3.2. Kontrolní skupiny.....	27
3.3. Stanovení analytů.....	28
3.4. Body mass index.....	32
3.5. Statistické zpracování.....	32
4. Výsledky.....	35
4.1. Imunohistochemické vyšetření tkáně.....	35
4.2. Porovnání vlivu terapie na hormonální hladiny.....	37
4.3. Porovnání vlivu chemoterapie na hladiny IGF-1 a IGFBP-3.....	43
4.4. Porovnání tkáňové exprese HER-2 s hladinou ECD HER-2.....	47
5. Diskuze.....	49
6. Závěr.....	55
7. Souhrn.....	56
8. Seznam použité literatury.....	58
9. Přílohy.....	69

1. Úvod do problematiky

1.1. Karcinom prsu

Karcinom prsu patří k nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a jeho incidence se meziročně zvyšuje o 1-2 %. Do dvaceti let věku se vyskytuje vzácně, do 35 let se v naší republice vyskytuje zhruba 100 nových případů ročně. Podle posledních údajů, publikovaných Národním onkologickým registrem, bylo v roce 2004 v České republice diagnostikováno 5628 nových případů karcinomu prsu. Nejčastěji postihuje ženy po 50 roce věku.

Karcinom prsu vzniká z epitelu ductů a lobulů mléčné žlázy. Je řazen mezi hormonálně dependentní nádory, kancerogenní účinky se přisuzují především estrogenům. Přibližně 75 - 85 % tvoří nádory sporadické (Klener 2002). Estrogeny v buňkách prsní žlázy indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů a onkogenů a tak je následně stimulována růstová aktivita. Za fyziologických okolností působí i antiproliferační faktory, např. TGF-beta. V součinnosti s dalšími kancerogenními faktory (např. ionizující záření, epitelová hyperplazie prsu, adenomy prsu, zánětlivé afekce) však může být rovnováha narušena. Spolupůsobit mohou spontánní mutace recesivních onkogenů (např. p53, Rb), opravných genů (MMR, NER) i aktivace některých onkogenů jako ras, myc či HER-2. Od prvních dysplastických změn do vzniku invazivního nádoru může uplynout dlouhá doba.

Pouze asi 15 % tvoří nádory na hereditárním podkladě, které vznikají v souvislosti s mutací BRCA-1 a BRCA-2 genu. Tyto formy se vyskytují často u mladých žen. Vznik karcinomu prsu v normálním epitelu prsu je tedy důsledkem poškození genetické informace buněk, jehož vlivem jsou buňky transformovány a nabývají fenotyp charakteristický pro maligní bujení: neregulovaná proliferace, "nesmrtelnost", schopnost metastazovat. Přestože získávají tyto nové vlastnosti, je evidentní, že buňky karcinomu prsu jsou dále regulovány signály z extracelulárního prostředí.

Kromě estrogenů jsou buňky karcinomu prsu na stimulovány k proliferaci různými růstovými faktory a cytokiny- EGF, IGF, PDGF, VEGF (Sachdev 2001).

Rizikové faktory pro vznik karcinomu prsu souvisí hlavně s dobou expozice prsní žlázy estrogenům – časná menarche, pozdní menopauza, nuliparita. S tím souvisí i vliv obezity. Uplatnit se mohou i účinky ionizujícího záření, rovněž jiná onemocnění prsu, jako cystické adenomy, duktální papilomy a jiná onemocnění spojená s buněčnými atypiiemi.

Na podkladě buněčných atypií se vyvíjejí neinvazivní formy karcinomu (karcinom in situ) a následně formy invazivní, pronikající bazální membránou se všemi znaky maligního onemocnění. Rozlišují se dva základní histologické typy karcinomu mléčné žlázy: duktální a lobulární. Infiltrující duktální karcinom se vyskytuje nejčastěji, přibližně v 75 % případů. Vzniká maligní transformací epitelu vývodů mléčné žlázy, je provázen značnou reakcí stromatu s tvorbou fibrózy. To způsobuje značnou tuhost nádoru při palpaci. Méně časté jsou některé podskupiny duktálního invazivního karcinomu

- tubulární, který se vyskytuje zhruba v 5 % a vyznačuje se lepší prognózou
- medulární tvořící rovněž přibližně 5 %, který často poskytuje mladší věkovou skupinu žen, je často hormonálně independentní a charakterizuje jej častá lymfocytární infiltrace
- mucinozní karcinom se zjistí u přibližně 3 % nemocných, vyznačuje se pomalým růstem a často dosahuje značné velikosti
- komedonový karcinom je tvořen obvykle velmi nehomogenní buněčnou populací a je velmi maligní. Tvoří asi 2 % duktálních invazivních karcinomů
- papilární karcinom mívá dobrou prognózu, zjišťuje se u 1-2 % nemocných, obvykle vyššího věku a většinou mívá pozitivní hormonální receptory. Může vznikat multicentricky.

Infiltrující lobulární karcinom se vyskytuje přibližně v 10 % případů, vzniká z epitelu lobulů žlázy. Velmi často je multicentrický a ve 30 % případů i bilaterální. Vyznačuje se častým metastazováním na serózní povrchy.

Všechny typy nádorů mléčné žlázy metastazují lymfogenní i hematogenní cestou. Uzlinové metastázy se vyskytují u 50 – 70 % nádorů v době diagnózy v závislosti na velikosti nádoru a jeho agresivitě. Regionální uzliny pro tuto lokalizaci jsou uzliny axilární a vnitřní mamární podle lokalizace nádoru v prsu. První uzlina, která bývá nádorem postižena se nazývá sentinelová. Hematogenní cestou metastazují karcinomy prsu zejména do plic, jater, kostí méně do kůže, ovárií a mozku.

1.2. Diagnóza onemocnění

Diagnóza onemocnění je založena na klinickém vyšetření, zobrazovacích metodách a vyšetření tkáně nádoru mikroskopicky a imunohistochemicky. Doplnující jsou vyšetření biochemická (nádorové markery), speciální molekulárně biologická vyšetření receptorů pro růstové faktory a vyšetření genetické.

V počátečním stádiu nemá nádor žádné klinické příznaky. Nádory velikosti zhruba 4-5 mm lze zjistit pouze mammografií. Zavedení systematického screeningu vede k diagnóze časných stádií nemoci a tím ke zlepšení celkových výsledků léčení.

Nádory větších rozměrů (nad 1 cm) lze zjistit palpací žlázy jako hmatnou resistenci tuhé konzistence. V některých případech je nádor fixován ke kůži a způsobuje defiguraci prsu, vtažení bradavky, v pokročilejších případech i lymfostázu v oblasti kůže. Velmi pokročilé nádory vedou k exulceraci kůže a postupnému spotřebování tkáně prsu.

Metastázy v uzlinách axily lze zjistit palpačně, uzliny mohou být tuhé pohyblivé, v pozdějších stádiích se fixují navzájem, vytvářejí objemné pakety a případně se fixují i ke spodině a kůži.

Celkové příznaky s sebou přináší až pokročilé metastazující onemocnění. Mohou se vyskytovat bolesti v kostech, kašel, dýchací obtíže, bolesti v pravém podžebří, ascites, hubnutí, nechutenství.

Paraneoplastické syndromy se mohou vyskytnout v podobě dermatomyositidy, neuromuskulárních poruch a v případě metastáz do kostí hyperkalcemie (Klener 2002).

Důležitou součástí klinického vyšetření je pečlivý odběr anamnestických dat, týkajících se výskytu nádorů v rodině a i údajů z osobní a gynekologické anamnézy, zejména užívání hormonálních preparátů, kojení, věku v době prvního těhotenství, počtu potratů apod.

Mezi zobrazovacími metodami má výsadní postavení mamografie. Malé nádory se mohou projevit pouze shlukem typických mikrokalcifikací a posouzení vyžaduje zkušeného odborníka. Větší nádory se zobrazí jako stín. Doplnující význam má ultrasonografie, která má rovněž typický obraz a spolehlivě posoudí i stav regionálních uzlin. U žen mladého věku bývá indikována jako první vyšetření. Mléčná žláza je do 40 let příliš denzní a mamografie nemusí být průkazná. Při podezření na karcinom je pak indikována magnetická rezonance prsu. Toto vyšetření se rovněž indikuje při zjištění lobulárního karcinomu pro vyloučení multicentrického výskytu.

Při stanovování celkového rozsahu onemocnění (stadia) se indikuje vyšetření jater (ultrasonografií nebo počítačovou tomografií), plic (skiagram hrudníku) a kostí (scintigrafie ^{99}Tc s následným rtg snímkem podezřelých lokalit). Další vyšetření se provádějí podle zjištěných projevů nemoci.

Z biochemických vyšetření se užívají testy k posouzení základních funkcí jater a ledvin a vyšetření nádorových markerů – běžně se indikuje vyšetření CEA a Ca 15-3, které mohou sloužit k monitorování efektu léčby.

Hematologické vyšetření zahrnuje vyšetření krevního obrazu a kostní dřevě k posouzení dřevěné rezervy před zahájením chemoterapie a k vyloučení minimální reziduální nemoci, shluků nádorových buněk v kostní dřevě, které mohou být zdrojem časných recidiv onemocnění po operaci.

U nemocných s pozitivní rodinnou anamnézou a u žen velmi mladého věku se provádí vyšetření mutace genů BRCA-1 a BRCA-2.

Základem pro určení diagnózy je odběr podezřelé tkáně k histologickému vyšetření. Odběr lze provést punkcí tenkou jehlou pod kontrolou mamografií nebo ultrazvukem nebo otevřenou biopsií. V získaném vzorku tkáně se určuje základní charakteristika nádoru, vyzrállost (grade, G), mitotická aktivita a důležité prognostické a prediktivní znaky jako exprese estrogenních a progesteronových receptorů, exprese HER-2. V materiálu získaném po operaci se vyšetřují i okraje odebrané části prsu a všechny vyňaté uzliny.

Diagnóza karcinomu prsu s sebou přináší četná dilemata jak pro nemocnou, tak pro lékaře. Musíme zvážit efektivitu všech dostupných léčebných modalit, vhodnost použití pro konkrétní nemocnou a uvážit pravděpodobný benefit zvolené metody a jejich vzájemné kombinace a sledu. Rozdíly v přežívání nemocných jsou nepochybným důsledkem rozdílu v invazivitě nádorů, jejich růstového a metastatického potenciálu a jiných vlastností a regulačních mechanismů, které nejsou dosud plně objasněny.

1.3. Prognostické a prediktivní faktory

Pro optimalizaci terapeutického postupu vhodného pro danou nemocnou byla stanovena celá řada měřitelných faktorů, zjistitelných v době diagnózy, tzv. prognostických a prediktivních faktorů. Na jejich podkladě je možné odhadnout délku přežití a efektivitu různých léčebných modalit.

Jednoznačný vztah k době přežití má klinické stadium nemoci, určované mezinárodním systémem klasifikace TNM, založeném na posouzení velikosti nádoru, postižení regionálních lymfatických uzlin a případné přítomnosti nádorových metastáz. Postižení lymfatických uzlin je z hlediska prognózy velmi významné. Postižení více než 3 uzlin svědčí o velkém metastaticém potenciálu. Velikost nádoru nad 5 cm a jeho prorůstání do okolních struktur (hrudní stěny, kůže) ukazuje na velkou agresivitu onemocnění a bývá provázena časnou diseminací.

Věk a ovariální funkce mají význam pro volbu metody terapie, zejména hormonální léčby.

Expres estrogenních receptorů (ER) je jedním z nejvýznamnějších biomarkerů (Clark 2000). Jasným důkazem toho jsou výsledky léčby založené na inhibici funkce estrogenních receptorů či omezení produkce estrogenů. Nádory s negativními receptory nemají schopnost odpovídat na regulaci hormonů a hormonální terapii a mají zpravidla nižší stupeň diferenciaci a též větší proliferativní aktivitu.

Receptory HER-2 při zvýšené expresi znamenají horší prognózu. Jejich pozitivita je obvykle provázena negativitou ER. Jsou doposud jediným prediktivním faktorem pro terapii trastuzumabem.

Histologický typ nádoru prognózu ovlivňuje méně, pro predikci léčebné odpovědi má rovněž omezený význam. Větší váhu v tomto ohledu má stupeň vyzrállosti nádorových buněk (G). Čím méně jsou buňky diferencovány, tím je prognóza nemoci horší.

Lymfovaskulární invaze nádoru svědčí o jeho časném pronikání do cirkulačního systému a zakládá předpoklad časného metastazování a tím i horší prognózy.

Dále se posuzuje délka anamnézy a tím i rychlost růstu nádoru, přítomnost nádorových markerů, přítomnost minimální residuální choroby v kostní dřeni.

1.4. Terapeutické možnosti

Léčení karcinomu prsu využívá všechny známé modalit a jeho plánování je výsledkem spolupráce odborníků různých specializací. Léčebné možnosti mohou být užity v různých kombinacích a sledu a zodpovědné naplánování začíná již v době první diagnózy. Významný podíl má specialista pro zobrazovací diagnostiku chorob prsu, patolog, specializovaný chirurg, gynekolog, onkolog, radioterapeut a v pozdějším období se významně mohou podílet odborníci další (rekonstrukční výkony, rehabilitace, léčba bolesti atd.)

Využití v léčení karcinomu prsu nalézají chirurgické výkony různého rozsahu, radioterapie, chemoterapie a hormonální léčba a v poslední době i léčba biomodulační – protilátky proti receptorům, inhibitory signální transdukce a léčba antiangiogenní. Vzájemnou kombinací těchto metod je možno dosáhnout dalšího zlepšení léčebných výsledků.

1.4.1. Chirurgická léčba

Chirurgické metody léčení jsou historicky nejstarší. V roce 1882 navrhl Halstedt radikální mastektomii s exenterací axily jako základní výkon, který zahrnoval odstranění žlázy, obou prsních svalů a resekci všech etází lymfatických uzlin v axille. S rozvojem dalších léčebných modalit směřuje vývoj v této oblasti k minimalizaci rozsahu operačního výkonu. Dnes je často využívána modifikovaná forma tohoto výkonu – modifikovaná radikální mastektomie, kdy se neodstraňují prsní svaly. Snahou však je uskutečnit prs zachovávající chirurgický výkon v podobě kvadrantektomie či segmentektomie případně jen tumorektomie s dostatečným lemlem zdravé tkáně. Pokud je tumor větších rozměrů (nad 2,5-3 cm) je možné před operací indikovat neoadjuvantní léčbu s cílem zmenšení nádoru a případně devitalizace buněk a operaci provést až v druhé době. Rovněž rozsah operace v oblasti uzlin se minimalizuje. Není-li podezření na postižení regionálních uzlin, provede se označení sentinelové uzliny dvojnásobným značením radiokoloidem a speciální modř, které se aplikují do místa nádoru těsně před operací a příslušná uzlina (nejčastěji 1, mohou být až 3) se lokalizuje gamasondou a vizuálně podle přítomnosti barviva. Jestliže je vyjmutá sentinelová uzlina nádoru prostá, další výkon v axille se již neprovádí. Tento postup vede k minimalizaci pooperačních otoků horní končetiny. Pokud je podezření na postižení regionálních uzlin ze zobrazovacích metod, provádí se neoadjuvantní léčba a další výkon pak podle jejího efektu. Omezení výkonu na odběr sentinelové uzliny bez exenterace axilly je v těchto případech ještě předmětem odborných diskuzí.

1.4.2. Radioterapie

Radioterapie je druhou lokální metodou užívanou v léčení karcinomu prsu. Je indikována po operaci při prs zachovávajících výkonech, kdy je nutné prozářit zbylou tkáň prsu, aby bylo dosaženo stejných léčebných výsledků jako po radikální mastektomii. Slouží k prevenci lokálních recidiv. Dále je ozáření indikováno při pozitivitě více než 3 regionálních uzlin, kdy je ozářena celá regionální oblast. Použití v paliativní léčbě je rovněž významné, užívá se zejména v terapii kostních metastáz, lokálních recidiv, ale i v dalších indikacích.

1.4.3. Chemoterapie

Chemoterapie je systémovou metodou léčení karcinomu prsu, která je indikována jak s neoadjuvantním, adjuvantním záměrem tak i v léčení generalizovaného onemocnění. Při kurativním záměru se kombinace různých cytostatik s odlišným mechanismem účinku ke zvýšení jejich efektu. Karcinom prsu je citlivý vůči celé škále preparátů. Je-li záměr léčby paliativní, je možno použít pouze monoterapii.

Cílem adjuvantní chemoterapie je likvidace zbytkové nemoci po primárním kurativním výkonu.

Neoadjuvantní chemoterapie se využívá s cílem dosažení operability primárního nádoru a uzlin a případně umožnění provedení prs zachovávající operace.

Paliativní chemoterapie je používána v léčení diseminovaného onemocnění s cílem omezení projevů nemoci a případně navození remise a prodloužení doby přežití.

Kombinace cytostatik užívaná v léčbě karcinomu prsu vycházejí z původní Bonadonnovy kombinace CMF – cyklofosamid, metotrexat, 5-fluorouracil z roku 1972. Dnes je metotrexat v této kombinaci obvykle nahrazen antracyklinem – FAC, FEC a eventuálně 5-fluorouracil taxanem – TAC, AC-T, AC-D.

1.4.4. Hormonální léčba

Hormonální léčba je rovněž terapie se systémovým účinkem a využívá se se záměrem adjuvantním, neoadjuvantním i paliativním. Předpokladem k jejímu použití a účinnosti je exprese hormonálních receptorů v buňkách karcinomu. U žen před menopauzou se užívá léčba ablační: ovariectomie, LH-RH analoga a LH-RH antagonisté. Tento postup je možné kombinovat s podáním antiestrogenu. U postmenopauzálních nemocných lze ve všech indikacích užít jak antiestrogeny tak inhibitory aromatázy. Je první cílenou léčbou v terapii karcinomu prsu.

1.4.5. Biologická terapie

Výsledkem poznání biologie nádorového růstu na podkladě molekulární biologie je cílená terapie prostřednictvím protilátek a inhibitorů různých fází signálních cest.

Zatím nejvýznamnější postavení v této oblasti u karcinomu prsu zaujímá protilátka proti HER-2 receptoru trastuzumab, která osvědčila svou účinnost u pokročilého onemocnění a při použití v adjuvanci vedla k nejvýznamnějšímu zlepšení terapeutických výsledků od doby zavedení chemoterapie. Předpokladem jejího užití je overexprese HER-2 a FISH prokázaná amplifikace tohoto genu. Používá se v kombinaci s cytostatiky (taxany a deriváty platiny) a event. i samostatně.

Další možnosti cílené léčby se zatím podrobují klinickým studiím.

Studuje se inhibice EGF receptoru protilátkou cetuximab, inhibice tyrosinových kináz irressou, inhibice angiogeneze bevacizumabem. Výsledky studií zatím nejsou k dispozici.

1.4.6. Rehabilitace

Rehabilitace je velmi důležitou součástí léčby bezprostředně po operaci jako prevence omezení habnosti v ramenním kloubu a následné periarthrititis humeroscapularis.

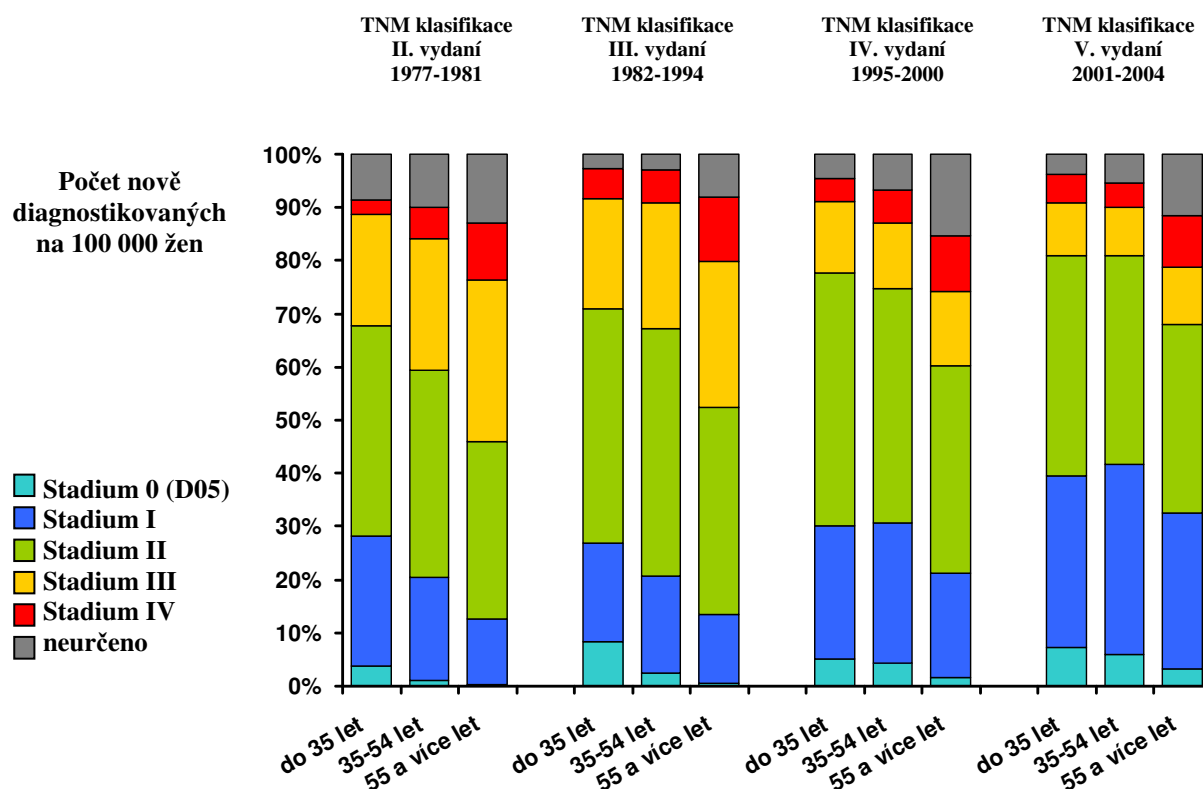
Po operaci a radioterapii často dochází k rozvoji lymfedému horní končetiny. Včasná rehabilitace může vést k jeho odstranění či alespoň minimalizaci.

1.5. Statistické údaje

Pro ilustraci incidence nemoci a jednotlivých stadií a mortality na toto onemocnění uvádím údaje z posledního zpracování dat Národního onkologického registru a ÚZIS.

Na obr. 1. Je zpracována incidence v závislosti na věku a pokročilosti nádorového onemocnění ve 4 časových obdobích.

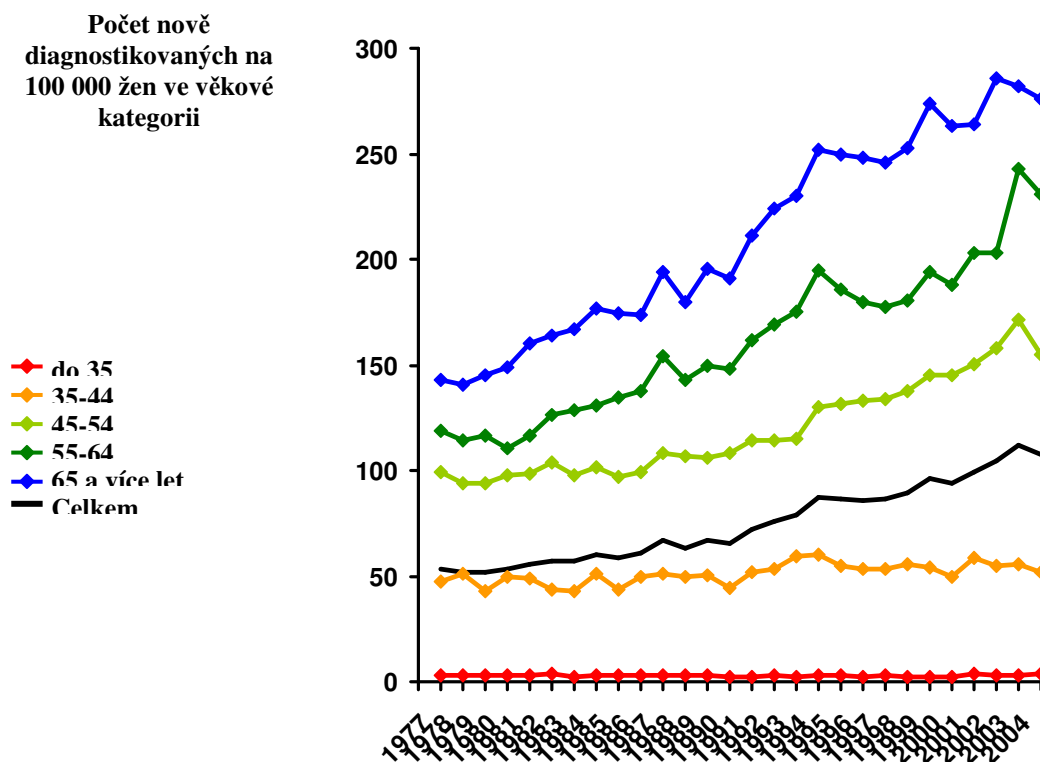
Obr. 1. Incidence jednotlivých stadií nemoci v závislosti na věku nemocných



Z obrázku 1. je jasně patrný vliv zavedení screeningu na zvýšení podílu časných stadií v době diagnózy nádoru.

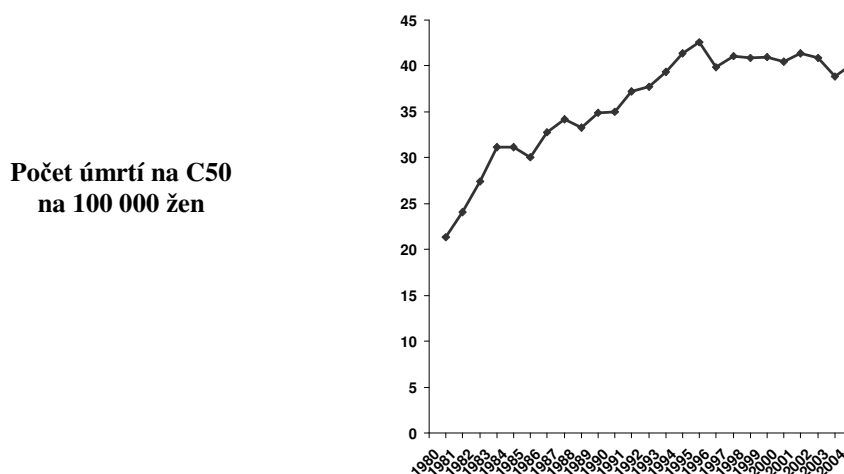
Na Obr. 2 je graficky znázorněna incidence karcinomu prsu v závislosti na věku.

Obr.2. Incidence karcinomu prsu v ČR



Grafické znázornění mortality uvádí obr. 3.

Obr. 3. Mortalita na karcinom prsu v ČR



Zdroj: Národní onkologický registr, ÚZIS ČR

Přežívání nemocných závisí na mnoha faktorech, zejména však na stádiu onemocnění. Průměrné desetileté přežití při negativním nálezu v lymfatických uzlinách bez ohledu na velikost tumoru je 75%, při postižení 1-3 lymfatických uzlin je 38% a při postižení čtyř a více uzlin je jen 13%. Při výskytu metastázy v jedné lymfatické uzlině je procento přežití jen o málo nižší než při negativním nálezu.

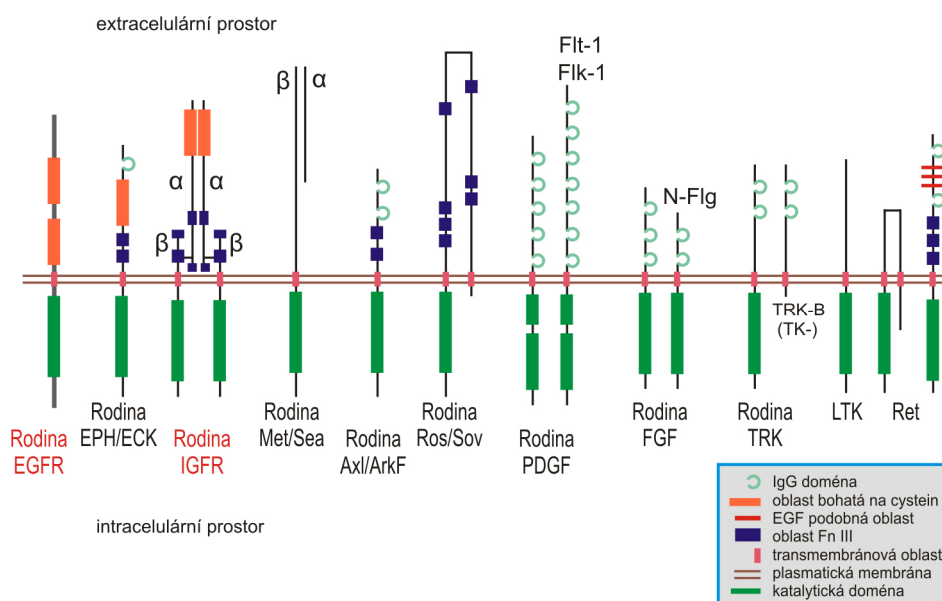
1.6. Prevence

Primární prevence karcinomu prsu není prakticky možná. Soustředěné úsilí je věnováno zejména prevenci sekundární, tedy vyhledávání časných stádií nemoci. Nejjednodušší metodou je samovyšetřování prsů, které by měla provádět každá žena jedenkrát v měsíci. Aktivní vyhledávání –screening je prováděn v období největší incidence nádorů, u žen od 45 do 65 let mamografickým vyšetřením každé 2 roky, v rizikových skupinách 1x ročně. Prevence terciární, tedy včasné vyhledávání recidiv nemoci je zabezpečeno doživotní dispenzarizací žen s karcinomem prsu.

1.7. Regulační mechanismy růstu karcinomu prsu

Na regulaci růstu buněk karcinomu prsu se podílí celá řada stimulačních i inhibičních faktorů, působících prostřednictvím receptorů charakteru tyrosinových kináz na membráně buněk i v jádře a celý proces je velmi složitý a doposud ne zcela objasněný. Existuje pravděpodobně celá řada mechanismů zkřížené aktivace cest přenosu informace.

Obr. 4. Receptory na povrchu nádorových buněk



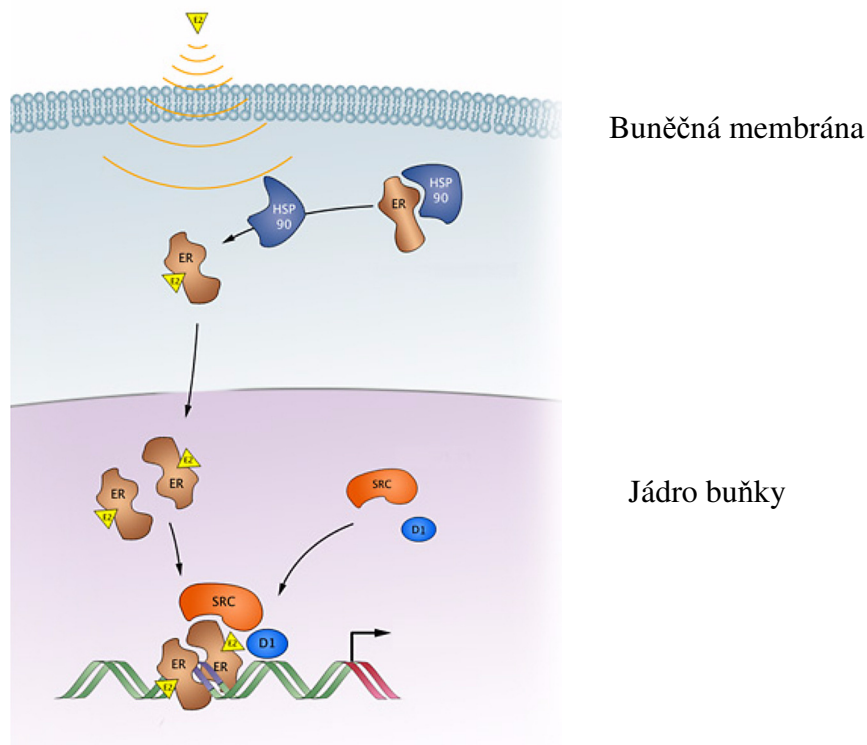
1.7.1. Hormony

Estrogeny mají jednoznačně stimulační vliv na buňky prsní tkáně. Jsou odpovědné za rozvoj duktálního systému v období puberty a společně s progesteronem ovlivňují rozvoj lobulů žlázy. Pokud buňka nabude maligního fenotypu, přestane podléhat normálním kontrolním mechanismům a přechází přes stadium neinvazivního karcinomu „in situ“, do stavu infiltrujícího nádoru. 85-90% všech případů karcinomu prsu představuje duktální infiltrující karcinom. Tento fenomén zdůrazňuje úlohu estrogenů ve vývoji nádoru. Riziko vzniku maligní transformace vzrůstá s dobou expozice endogenním estrogenům, tedy časná menarche a pozdní menopauza jej zvyšují. Závislost byla prokázána i na věku prvního těhotenství ukončeného porodem, ženy, které rodily po 30 roce věku a nullipary onemocní častěji. Exogenní hormonální působení, jako aplikace hormonální substituční léčby v menopauze, riziko vzniku karcinomu prsu rovněž zvyšuje (Parkin 2001).

Nejúčinnější endogenní estrogen je estradiol, produkováný hlavně vaječníky v premenopauzálním období. V postmenopauze je většina cirkulujícího estrogenu tvořena z estronu, vznikajícího periferní transformací androstendionu především v nadledvinách. Veškeré steroidní hormony vznikají přeměnou cholesterolu. V ovariích se na regulaci tvorby podílí luteinizační hormon (LH). Enzym aromatáza, odpovědný za konverzi androgenů na estrogeny je přítomen v různých tkáních: nadledviny, tuk, kůže, ovaria, mozek, kosti. Tyto tkáně jsou hlavním zdrojem estrogenů po menopauze a jejich význam dokazuje skutečnost, že 2/3 karcinomů prsu vznikají v tomto období. Zejména obézní postmenopauzální ženy jsou vystaveny vyšším hladinám cirkulujících estrogenů a karcinomy u nich vznikají častěji (Warner 2003). Některé nádory prsu mají schopnost produkovat značné množství estrogenu vlastní intratumorální aromatázou, produkovanou tukovou tkání žlázy (Brueggemeier 2001, Zhou 1996).

Efekt estrogenů je velmi různorodý a ne zcela objasněn. Ovlivňují estrogen senzitivní buňky prostřednictvím receptorů v jádře a spouštějí kaskádu transkripčních regulačních procesů. Steroidní hormony mají rovněž schopnost ovlivnit expresi nukleárních protoonkogenů jako c-myc, c-erbB-2 a aktivovat jejich dráhy (Schuchard 1993, Dickson 1987). V neposlední řadě mohou ovlivnit invazivitu nádoru prostřednictvím zvýšené produkce některých proteáz např. cathepsin-D (Rochefort 2001). Rovněž vliv estrogenů na apoptózu buněk prostřednictvím polyamidů bcl-2 (Shah 2001). Působení estrogenů může být modifikováno i mutací receptoru a vést k progresi nebo rezistenci buněk (Hopp 2002). Graficky je tento proces znázorněn na obrázku 5.

Obr. 5. Aktivace estrogenních receptorů



E2 – estrogen, ER – estrogenní receptor

Aktivita receptorů je ovlivňována působením signálů od tyrosinkinázových receptorů na membráně, především pro EGF a IGF. Aktivace každého z nich může způsobit získanou resistenci estrogenních receptorů (Gee 2005)

Estrogenní a progesteronové receptory jsou prediktivním faktorem i terapeutickým cílem. Estrogenní dependence je využívána v terapii selektivními modulátory estrogenních receptorů - antiestrogeny (tamoxifen), inhibitory aromatázy (letrozol, anastrozol, exemestan) a selektivními „downregulátory„ estrogenních receptorů (formestan).

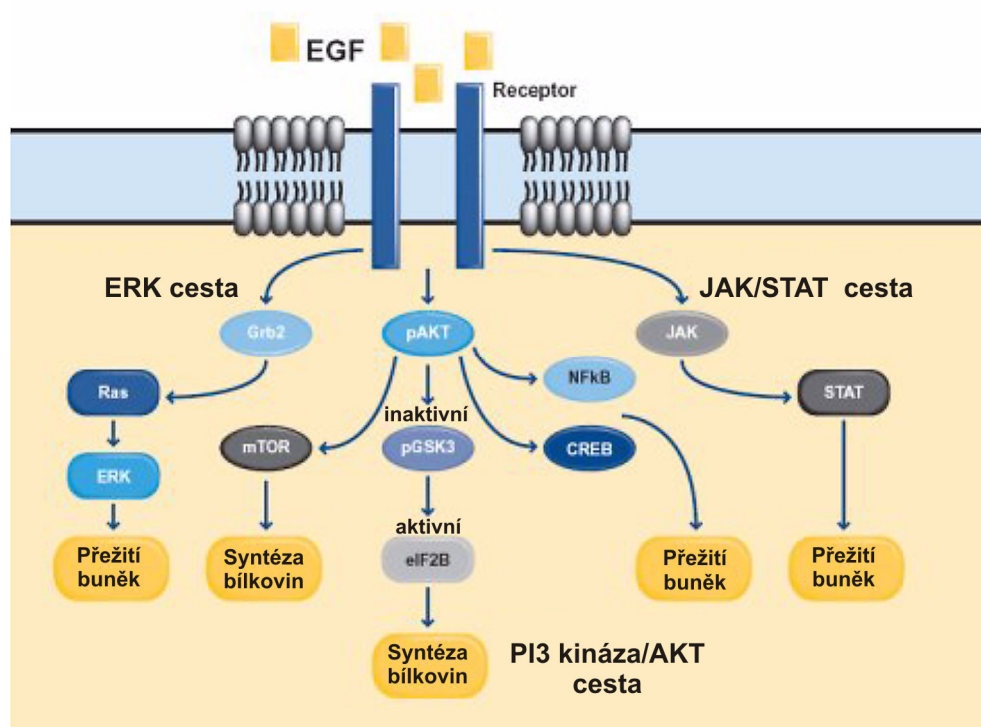
1.7.2. Epidermální růstové faktory (EGF)

Epidermální růstové faktory ovlivňují aktivitu, morfologii a přežívání buněk karcinomu prsu prostřednictvím celé rodiny receptorů (EGFR) charakteru tyrosinových kináz na membráně buňky (Yarden 2001, Jorrissen 2003). Skupina epidermálních růstových faktorů se podle vazebných specifík jejich receptorů dělí na 4 podskupiny – HER-1, HER-2, HER-3 a HER-4. Ligandy pro HER-1, HER-3 a HER-4 jsou známy: transformující růstový faktor- α , amfiregulin, betacelulin, heregulin a HER-1 sám. HER-2 bývá heterodimerizován spolu s ostatními HER receptory, má zvýšenou afinitu k různým ligandům, ale přímo je nenavazuje

(Perez 2006). HER-3 nemá aktivní tyroxin kinázovou domenu, proto tyto dva receptory jsou považovány za ko-receptory.

Předpokládá se, že vazba specifického ligandu vede k dimerizaci, aktivaci intracelulárních transdukčních mechanismů a zkřížené fosforylaci receptorů (Osborne 2007). Přesný mechanismus, jakým ligandy aktivují buňky karcinomu prsu není v současnosti znám. Je možná transaktivace mezi dvěma receptory a užití více cest k vyjádření jejich biologických funkcí. Průběh aktivace je znázorněn na obrázku 6.

Obr. 6. Aktivace EGFR



Overexprese HER-2 vede ke zvýšené tumorogenicitě, invazivitě, zvýšenému metastatickému potenciálu, inhibici apoptózy a alterované citlivosti k hormonálním a cytostatickým preparátům (Perez 2006).

Zvýšená exprese se objevuje u přibližně 30 % invazivních karcinomů prsu, u 95 % z nich bývá gen amplifikován. Zvýšená exprese může být spojena s alternativním spojováním m-RNK a následně se změnami v intra a extracelulární struktuře HER-2 domeny. Přesná funkce extracelulární domeny není jasná, je možné, že stimuluje buněčnou motilitu a proliferaci při interakci s některými proteiny či v souvislosti s jinými EGFR.

Aktivace EGFR může způsobit uvolnění vaskulárních endoteliálních faktorů (VEGF) a být tak klíčovým aktivátorem angiogeneze (DeJong 1998)

Existuje mnoho cest vzájemného ovlivnění regulace růstu nádorových buněk – vzájemné ovlivnění EGFR a ER, EGFR a IGF –1 receptoru (Gee 2005). Zkříženého vliv má pravděpodobně za následek vznik sekundární resistance vůči tamoxifenu.

Doposud nejvýznamnější z této rodiny je HER-2. Onkogen HER-2 (c-erbB-2, neu) byl objeven v roce 1981 u kancerogeny vyvolaných nádorů krys (Slamon 2001). V malém množství je exprimován na plasmatické membráně normálních lidských buněk. Jeho velikost je 185 kDa.

Expres HER-2 genu je jedním z nejvýznamnějších prognostických a prediktivních faktorů u nemocných s karcinomem prsu (Nahta 2003, Nieto 2007). Je známkou horší prognózy, nižší odpovědi vůči některým cytostatikům i hormonálním lékům (Massarweh 2008), na druhé straně je cílovou strukturou pro cílenou biologickou léčbu trastuzumabem. Přínos této léčby je dostatečně ověřen u generalizovaného karcinomu prsu (Harries 2002, Cobleigh 1999, Bewick 2001), existují i důkazy o významném zlepšení výsledků léčby při jeho použití v adjuvantním podání publikované na podkladě výsledků klinických studií studies NSABP B31, NCCTG 9831, BCIRG 006, HERA (Baselga 2006).

HER-2 může fungovat

- jako prognostický faktor: Zvýšená exprese HER-2 je spojována s horší prognózou onemocnění a obvykle se sdružuje s dalšími negativními prognostickými znaky – negativitou estrogenních a progesteronových receptorů, vysokou S-fáze frakcí, pozitivitou axillárních uzlin, mutací p53 a vysokým nukleárním gradem.

-jako prediktivní faktor: Byla publikována celá řada studií, které prokazují nižší citlivost buněk karcinomu prsu vůči antacyklinům a tamoxifenu (Harries 2002, Cobleigh 1999), problém však dosud nebyl definitivně uzavřen.

- jako terapeutický cíl: Syntéza humanizované protilátky proti HER-2 – trastuzumabu - znamená obrat v terapii karcinomu prsu jak u onemocnění generalizovaného, tak podle posledních klinických studií i při adjuvantním použití (Baselga 2006). Zlepšení výsledků při tomto podání je až 50%.

Cirkulující extracelulární doména HER-2 (solubilní HER-2, ECD)

Pomocí specifických protilátek byl v séru nemocných karcinomem prsu identifikován tzv. solubilní HER-2. Jedná se o uvolněné extracelulární části receptoru – externí domény (Hayes 1989, Yamauchi 2001, Carney 2004). Jeho velikost je 105 kDa. Prevalence zvýšené hladiny ECD u primárních nádorů je 0-38 % (Kong 2006). Ve zvýšené míře bývá detekován zejména u generalizovaného karcinomu prsu, zhruba ve 20–40 % případů (Carney 1991, Yamauchi

1997). Vyšší hladiny ECD jsou některými autory spojovány s horší odpovědí na chemoterapii a hormonální léčbu u žen s metastazujícím onemocněním (Classen 2002), jiní autoři však tuto závislost nepotvrzují (Hait 2001). Hladiny nad 15ng/ml jsou považovány za pozitivní a pozitivita odpovídá v 80-90 % případů tkáňové pozitivitě zjištěné imunohistochemicky (Ludovini 2008). V některých případech se pozitivita ECD objevuje u původně HER-2 negativních nádorů v tkáni až při generalizaci onemocnění (Carny 2004). Některými autory je pozitivní zjištění ECD v séru pokládáno za nezávislý prognostický faktor (Schippinger 2003, Brodowicz 1996, Perez 2006, Muller 2004) a je spojováno s horší prognózou nemoci. Předpokládá se, že uvolněné ECD mohou nepříznivě působit při léčbě trastuzumabem jeho neutralizací (Brodowicz 1997). V průběhu antitumorozní terapie může dojít k negativizaci ECD (Paik 1998) u generalizovaného karcinomu prsu. Rovněž po chirurgickém výkonu dochází v krátké době k negativizaci ECD v séru (Salvadori 2005). Jiní autoři naopak předpokládají jeho uvolnění do cirkulace vlivem rozpadu buněk při chemoterapii (Zabrecky 1998, Perik 2006).

1.7.3. Insulinu podobné růstové faktory (IGF)

Insulinu podobné růstové faktory jsou součástí regulační cesty buněčné proliferace, transformace a metastazování karcinomu prsu (Yee 2002, Yu 2003). Nádorové buňky ovlivňují cestou autokrinní, parakrinní i endokrinní (Osborne 1990). Celý IGF systém je tvořen IGF-1, IGF-2, příslušnými receptory a nejméně šesti vazebnými proteiny (IGFBP). Vazebné proteiny IGFBP-1 a IGFBP-3 jsou spojovány s vyšší pravděpodobností lokální recidivy a metastazování nemoci (Pollak 1998, Ren 2007). Receptory pro IGF-1 jsou přítomné v řadě tkání, tvoří je multifunkční tyrosinové kinázy. Jejich množství se zvyšuje spolu s expresí ER. U ER negativních buněk je jejich množství nízké. Jejich elevace je často spojována s rezistencí vůči radioterapii (Bartucci 2001). Receptor pro IGF-1 a ER mohou být ovlivněny stejnými ligandy, tedy i antiestrogeny (Giovanucci 1999, Laban 2003)

IGF-1 spolu s estrogeny jsou považovány za nejsilnější mitogeny v oblasti prsní žlázy (Yu 2001, Strange 2004, Lonning 2004, Dhar 2007), které působí synergisticky. Vysoké hladiny IGF-1 v cirkulaci jsou spojovány s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu u premenopauzálních žen, hlavně do 50 let věku (Hankinson 1998, Krajcik 2002, Schernhammer 2005, Keinan-Boker 2003, Allen 2005). Vyšší aktivita IGF-2 je spojována s horší prognózou onemocnění. Oba brání apoptoze a snižují citlivost vůči chemoterapii a radioterapii. Vysoké hladiny IGF-1 a IGFBP-3 jsou spojovány zejména se vznikem nádorů s pozitivitou ER (Kahan 2006, Gronbaek 2004). IGF-1 receptor bývá zvýšeně exprimován u

buněk karcinomu prsu a jeho aktivace je spojována s nižší citlivostí k trastuzumabu u HER-2 pozitivních nádorů (Yang 2001). Naopak IGFBP-3 může vést ke znovuobnovení citlivosti nádorových buněk vůči trastuzumabu u rezistentních nádorů (Lu 2001).

Význam signalizace IGF spočívá i v jeho zkříženém působení na estrogenní receptor, který se může podílet na zvýšené aktivitě IGF-1 (Sachdev 2001). Terapie antiestrogeny snižuje hladinu cirkulujícího IGF-1 snížením molárního poměru IGF-1/IGFBP-3 a zmenšuje tak jeho mitogenní potenciál (Campbell 2001, Torrisi 2001, Helle 1996). Zvýšení hladiny IGFBP-3 a současné snížení hladiny IGF-1 vlivem tamoxifenu je považováno za další možný modulační mechanismus na tkáňové úrovni (Lahti 1994, Ho 1998, Colletti 1989, Varma 2002). Některé práce prokazují vliv snížení hladiny IGFBP na rozvoj resistance vůči tamoxifenu (McCotter 1998, Wong 2001).

Působení inhibitorů aromatázy má za následek zvýšení hladiny IGF-1 u postmenopauzálních žen, hladina IGFBP-3 zůstává nezměněna (Ferrari 2002) nebo se zvyšuje (Frost 1996).

Vlivem chemoterapie se hladina IGF-1 a IGFBP-3 signifikantně nemění (Peyrat 1998, Kajdaniuk 2000).

Receptory pro IGF-1 mohou být homo i heterodimerizovány i spolu s receptory pro EGFR (Riedemann 2007, Knowlden 2007). Vzájemná aktivizace vede k trans – a autofosforylaci tyrosinových kináz a spouští mechanismus intracelulární aktivace. Tento proces vzájemného ovlivnění byl objeven teprve nedávno.

Množství IGF-1 v cirkulaci je spojován i se stimulací angiogeneze, na které se účastní spolu s působením hormonů a dalších polypeptidových růstových faktorů (Jordan 1998, Kajdaniuk 2000, Furstenberg 2003).

1.7.4. Růstové faktory cévního endotelu - VEGF

Proces angiogeneze je regulován aktivací tyrosinkinázových receptorů pro které jsou známy minimálně 4 VEGF ligandy. Receptory pro VEGF mohou být rovněž terapeutickým cílem (obr. 7).

Vlivem VEGF vznikají velmi nezralé cévy. Extracelulární matrix je tvořena pomocí matrix metaloproteinázy a urokinázového plasminogen aktivačního receptoru (uPAR). Tvarování cév do trubicového tvaru se děje vlivem dalších signálů a následně působením angiotenzinu-1 a TGF-beta se vytvářejí pericyty. Většina cév v solidních nádorech jsou cévy nezralé. Ovlivnění angiogeneze je možné jak aktivátory, tak inhibitory.

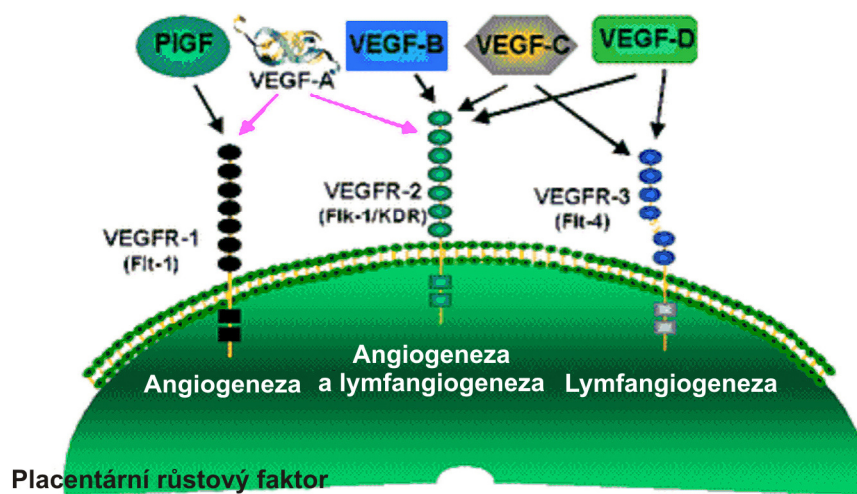
Celý proces má řadu aktivátorů a inhibitorů – tab. 1. (Panchapakesan 2007)

Tab. 1. Možnosti ovlivnění angiogeneze

Aktivátory angiogeneze	Inhibitory angiogeneze
VEGF	Trombospondin-1
TGF beta	Angiostatin
Angiopoetin-1	Endostatin
Matrix metaloproteinázy	Interferony
COX-2	Interleukiny 4, 12 a 18
Integriny	Destičkový faktor 4
Oxidy dusíku	Vasostatin
Androgeny a estrogeny	Tumstatin
bFGF	Canstatin
	SPARC
	TIMPS

Obr. 7. Ligandy a receptory VEGF

VEGF ligandy a receptory



1.8. Vliv chemoterapie na hladiny hormonů u premenopauzálních žen

Adjuvantní léčba chemoterapií způsobuje významné změny v ovariálních funkcích. Hlavní je časná menopauza. Chemoterapií indukovaná amenorhea může být dočasná a nebo permanentní v závislosti na použité kombinaci cytostatik a věku nemocných (Bines 1996, Anderson 2006), větší pravděpodobnost je u žen nad 40 let věku (Shapiro 2001) a po tomto věku dochází vzácně k obnovení ovariálních funkcí. Vznik amenorhey je vázán na poškození vývoje folikulů (Shapiro 2001). Je provázen vzestupem FSH a poklesem hladiny estrogenů (Surgeon 2004, Anjum 1991), přičemž výchozí hodnoty nemohou predikovat případný vznik menopauzy (Kutluk 2006). U nádorů s pozitivitou hormonálních receptorů je navození menopauzy vítaným vedlejším účinkem chemoterapie. Větší účinek chemoterapie u žen do padesáti let je pravděpodobně spolupodmíněn ovlivněním hormonálních poměrů organismu vlivem chemoterapie (De Vita 2005). Trvalá menopauza je chemoterapií s obsahem antracyklinů navozena u 15-25 % žen do 40 let, při použití kombinace cyklofosamid, metotrexat, 5-fluorouracil (CMF) je to až 30-40 % žen. K návratu ovariálních funkcí včetně obnovení fertility dochází po měsících až letech po ukončení chemoterapie. Skupina the Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) ve svém přehledu v roce 1996 poukázala na pozitivní vliv ovariální ablace na prodloužení beznádorového intervalu i celkovou dobu přežití. Z tohoto důvodu jsou u premenopauzálních nemocných podávána dočasně LHRH analoga nebo navozena trvalá menopauza (ovarektomie). Výsledný efekt nezávisí na způsobu jejího navození (Ejlertsen 2005). Chemoterapií navozená amenorhea může mít i příznivý dopad na výsledek léčby u mladých žen s hormonálně dependentními nádory. Bylo prokázáno prodloužení beznádorového období u premenopauzálních žen, u kterých menopauza byla navozena (Poikonen 2000).

Náhlé navození menopauzy je provázeno řadou změn v endokrinním systému a metabolickém procesu, zejména v metabolismu lipidů. V důsledku snížení hladiny estrogenů dochází k návalům horka s pocením, poruchám spánkového rytmu, atrofii vaginálního epitelu se suchostí, poruchám močení a emocionální instabilitě. Navíc je zvýšená dispozice ke kardiovaskulárním chorobám, cerebrovaskulárním příhodám, osteoporóze, zlomeninám kyčle, demenci a Alzheimerově nemoci (Turgeon 2006). Proto medikamentózní navození dočasné menopauzy je z hlediska nemocné s hormonálně dependentním nádorem, zejména ve velmi mladém věku, výhodné a snižuje výskyt krátkodobých i dlouhodobých nežádoucích účinků této terapie.

2. Cíle práce

Expres hormonálních receptorů je základním prognostickým a prediktivním faktorem u žen s karcinomem prsu a je podkladem pro ovlivnění vývoje nádoru působením hormonální manipulace. Potlačení ovariální funkce u menoaktivních nemocných s karcinomem prsu je součástí léčebného účinku chemoterapie. Úroveň a hloubka suprese je rozdílná u různých režimů. U postmenopauzálních žen je snížení hladiny estrogenů předpokladem účinku inhibitorů aromatáz. Podíl chemoterapie na útlumu syntézy estrogenů u této skupiny nemocných není znám. Podle novějších publikací je patrná zkřížená reakce mezi signální cestou aktivace estrogenního receptoru a receptoru pro inzulinu podobný růstový faktor IGF-1. Nádorové buňky mohou být tedy stimulovány jak estradiolem, tak IGF-1. Sledování cirkulujícího IGF-1 ve vztahu k sérové hladině estrogenů by mohlo být z hlediska efektu léčby perspektivní. Sledování hladin IGF-1, estradiolu a jejich vazebných proteinů bylo provedeno během substituční hormonální léčby a byly nalezeny zajímavé vztahy. Vazebný protein pro IGF-1 IGFBP-3 je negativním regulátorem růstu buněk při normálních hladinách v cirkulaci, při zvýšených hladinách je možným induktorem apoptózy nádorových buněk. Jak souvisí hladina IGF s množstvím steroidních hormonů v cirkulaci není zcela jasné, je však pravděpodobné, že ovlivňuje jejich produkci či zesiluje jejich účinek. Sledování hladin estrogenů, FSH, IGF-1 a IGFBP-3 by mohlo vést k ozřejmení nepřímého efektu chemoterapie prostřednictvím hormonálního působení.

Významnou prognostickou a prediktivní hodnotu má i HER-2 receptor, kódovaný HER-2/neu genem. Zvýšená exprese je známkou vysokého rizika časného relapsu a generalizace karcinomu prsu. Extracelulární část může být uvolněna proteolytickým štěpením do cirkulace a detekována v séru nemocných. Měření sérových hladin může být užitečné z několika důvodů: monitorování efektu léčby u generalizovaného onemocnění, detekce recidivy nemoci, předpověď tkáňové exprese, predikce účinnosti hormonální, cytostatické a biologické léčby trastuzumabem.

1. Zjistit, zda i u postmenopauzálních nemocných dochází vlivem chemoterapie k ovlivnění sérových koncentrací estradiolu a FSH, tedy zda i u této skupiny žen má chemoterapie současně i pozitivní vliv hormonální, jako je tomu u premenopauzálních pacientek.
2. Zjistit, zda hladina IGF-1 a IGFBP-3 koreluje s hladinami steroidních hormonů v séru a zda je ovlivněna působením chemoterapie.
3. Prokázat, zda sérové hladiny HER-2 jsou v korelaci s tkáňovou expresí. Zvýšené hladiny extracelulární domény HER-2 jsou zjišťovány u 37 % nemocných a jsou asociovány

s kratším celkovým přežitím pacientek. ECD v séru může být považována za nádorový marker, vzhledem ke změnám výše hladin v závislosti na množství nádorových buněk.

3. Materiál a metody

3.1. Charakteristika souboru

Soubor nemocných je tvořen 97 postmenopauzálními pacientkami s karcinomem prsu, kterým po operačním výkonu byla indikována adjuvantní léčba.

Sedmdesáti dvěma z těchto nemocných byla indikována chemoterapie.

Věk testovaných nemocných byl v rozmezí 50-84 let s mediánem 59 let. Pacientky měly odstup od poslední menstruace v rozmezí 2-34 let, medián 12 let. Adjuvantní chemoterapie byla zvolena z důvodu negativity hormonálních receptorů či pro zjištění některého z rizikových faktorů: primární nádor větší než 3 cm, pozitivita regionálních uzlin, nízký stupeň diferenciacie nádoru (G), pozitivita HER-2.

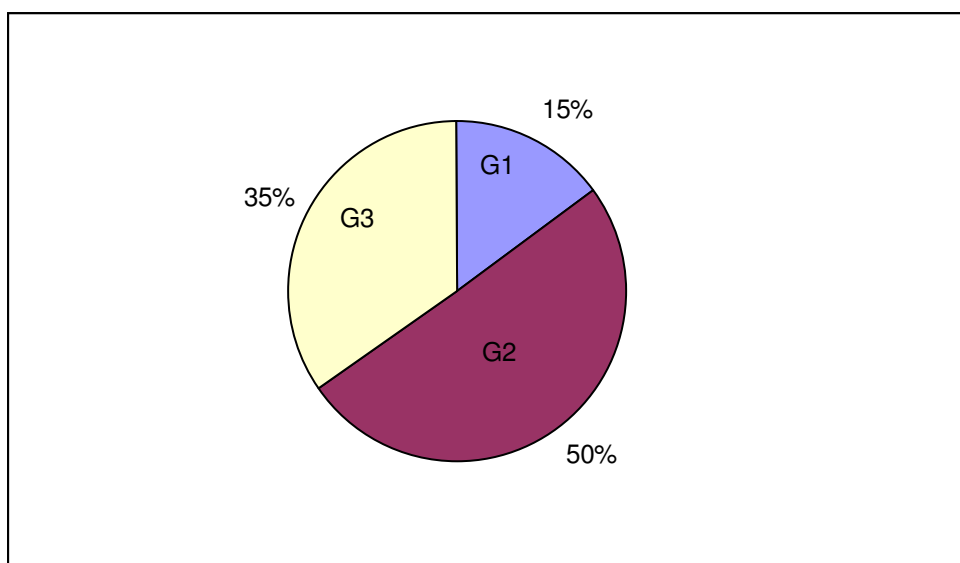
Charakteristika skupiny podle TNM klasifikace je uvedena v tabulce 2. Všechny nemocné byly bez vzdálených metastáz karcinomu (M0).

Tab.2. Charakteristika skupiny podle TNM klasifikace

T a N	Počet nemocných (N=72)
T1c,N0	11
T1, N1	16
T2, N0	13
T2, N1	15
T3, N0	8
T3, N1	9

Všechny nemocné ve skupině měly diagnostikovaný infiltrující duktální karcinom různého stupně diferenciacie - G1: 11, G2: 36 a G3: 25 nemocných (obr.8).

Obr.8 Stupeň diferenciacie nádoru – poměrné zastoupení



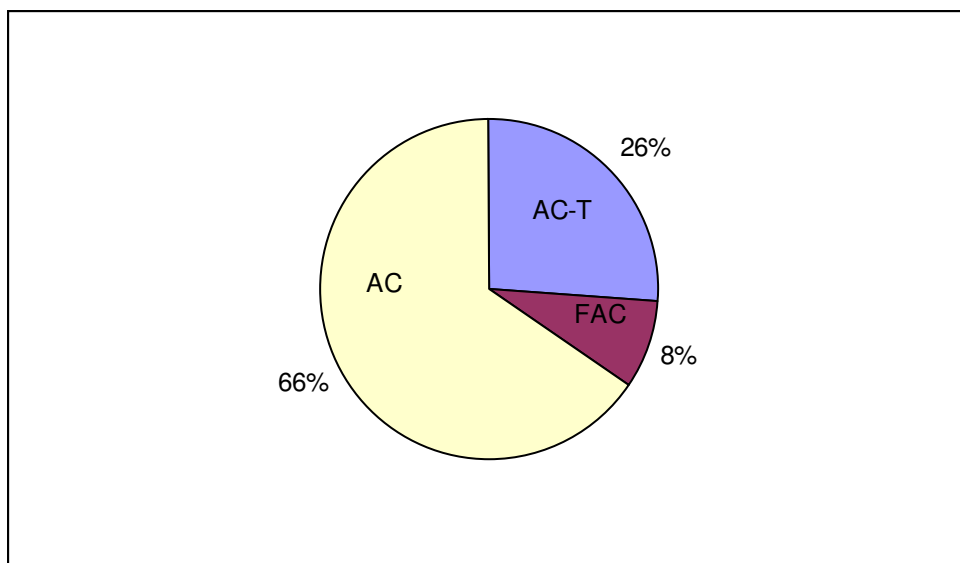
Postmenopauzální nemocné s karcinomem vysokého rizika (ER-, N+, T 2-3, HER-2 3+) byly léčeny některou z kombinací cytostatik uvedených v tabulce 3. Vesměs byly pro adjuvantní terapii použity režimy obsahující antracykliny. Kombinace doxorubicinu (A) 60 mg/m² a cyklofosfamidu (C) 600 mg/m² podávané ve třítydenních intervalech celkem čtyřikrát byla podána nejčastěji, 47 nemocným. Stejná kombinace AC doplněná 4 cykly docetaxelu 80-100 mg/m² ve třítydenním intervalu byla použita u 19 pacientek s nejvyšším rizikem recidivy. U šesti nemocných byla v adjuvantní léčbě použita kombinace 5-fluorouracilu (F) 500 mg/m², doxorubicinu 50 mg/m² a cyklofosfamidu 500 mg/m² rovněž v intervalu 3 týdnů.

Tab.3. Charakteristika skupiny podle použitých kombinací cytostatik

Kombinace cytostatik	Počet nemocných
AC-T	19
FAC	6
AC	47

Procentuální zastoupení jednotlivých kombinací je vyjádřeno na obr. 9., ze kterého jasně vyplývá, že vzhledem k věku nemocných a relativně příznivému spektru nádorů byla nejčastěji, v 66 %, užita kombinace AC.

Obr. 9. Procentuální zastoupení použitých kombinací cytostatik



Ve stejném souboru, avšak pouze u 42 postmenopauzálních nemocných s karcinomem prsu před zahájením léčby jsme testovali solubilní HER-2 v séru a porovnávali jeho hodnotu s tkáňovou expresí stanovenou imunohistochemicky.

Základní charakteristika testovaného podsouboru, ve kterém jsme HER-2 stanovili je uvedena v tabulce 4.

Tab. 4. Charakteristika souboru testovaného na sérové hladiny HER-2:

TNM	počet	ER+,PR+	ER+,PR-	ER-,PR+	ER-,PR-
T1,N0,M0	8	0	0	0	8
T1,N1,M0	14	11	0	0	3
T2,N0,M0	7	0	1	4	2
T2,N1,M0	10	8	0	0	2
T3,N0,M0	1	1	0	0	0
T3,N1,M0	2	1	0	0	1

3.2. Kontrolní skupiny

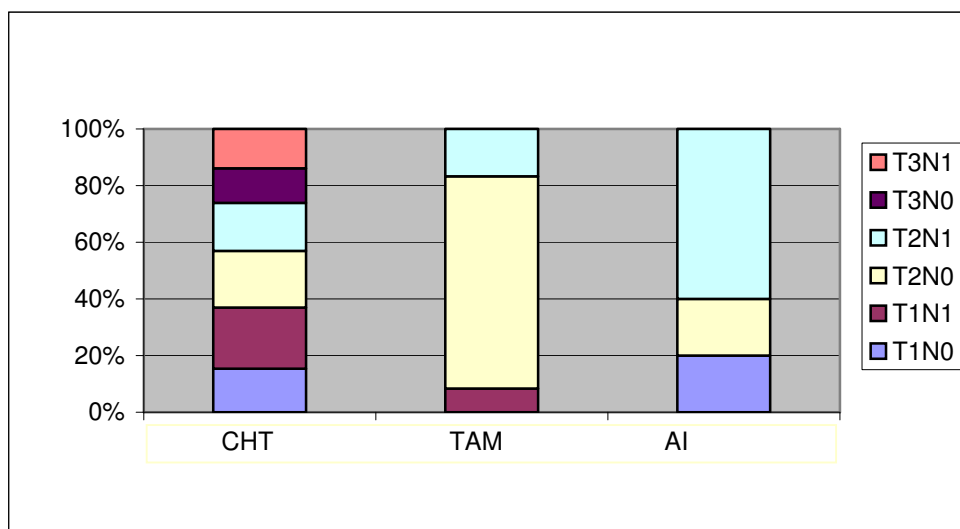
Kontrolní skupiny nemocných jsme do testování zařadili pro ověření citlivosti použitých metod. Vzhledem k nízkým hladinám cirkulujících hormonů u postmenopauzálních žen jsme zařadili 10 nemocných adjuvantně léčených inhibitory aromatázy, které jednoznačně hladinu hormonů v séru snižují (Mamoru 1999,), a zjišťovali jsme, zda tyto změny námi použité metody zachytí.

Druhou kontrolní skupinou bylo 15 nemocných léčených tamoxifenem. Po podávání tamoxifenu byly rovněž popsány změny hladin E, LH a FSH (Lonning 1995, Secreto 1983, Bhatavdekar 1987, Kostoglou-Athanassiou 1997) a zároveň i změny hladin IGF-1 a IGFBP-3 a jejich poměru (Campbell 2001)

Ve skupině 10 postmenopauzálních pacientek léčených adjuvantně inhibítorem aromatázy a v 15 nemocných léčených tamoxifenem měly všechny infiltruující duktální karcinomy a všechny měly pozitivní ER i PR. Pouze 2 nemocné měly pozitivní HER-2. Stupeň diferenciacie byl 1 nebo 2. Odstup od menopauzy byl v těchto kontrolních skupinách 2-34 let s mediánem 14 let. Věk se pohyboval mezi 52 a 84 roky s mediánem 63 let.

Rozložení podle TNM klasifikace v jednotlivých skupinách podle zvolené terapie vyjadřuje obr. 10.

Obr. 10. Charakteristika souboru podle TNM klasifikace a zvolené léčby



CHT – nemocné léčené chemoterapií TAM – nemocné léčené tamoxifenem

AI – nemocné léčené inhibítorem aromatázy

3.3. Stanovení analytů

3.3.1. Odběr krve

Všem nemocným jsme odebrali první vzorek 10 ml krve před zahájením terapie, druhý po 3 cyklu chemoterapie a třetí po jejím ukončení. U nemocných s hormonální léčbou byl odebrán pouze druhý vzorek po 3 měsících užívání. Sérum bylo rozděleno do 2 aliquotů, polovina byla zpracována průběžně a byly získány hodnoty luteotropního hormonu (LH), folikuly stimulujícího hormonu (FSH), estradiolu (E), progesteronu (P), insulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1) a jeho vazebného proteinu (IGFBP-3). Druhá část byla zamražena a vzorky byly následně použity najednou pro získání hodnot cirkulujícího HER-2. Samostatně jsem provedla vyšetření metodou ELISA v těchto vzorcích.

3.3.2. Estradiol

Stanovení estradiolu jsme prováděli pomocí chemiluminiscenční mikročasticové imunoanalýzy na automatickém analyzátoru Architect firmy Abbot.

Estradiol se stanovuje dvoukrokovou mikročasticovou chemiluminiscenční imunoanalýzou s flexibilním metodickým postupem označovaným jako Chemiflex.

V prvním kroku je společně inkubován vzorek, ředící roztok a monoklonální králičí protilátka – antiestradiol – vázaná na paramagnetické mikročastice. Estradiol přítomný ve vzorku se váže na protilátku. Po promytí se ve druhém analytickém krku přidá estradiol značený akridinovým esterem. K reakční směsi jsou přidány roztoky Pre Trigger (peroxid vodíku) a Trigger (NaOH). Výsledná chemiluminiscenční reakce je měřena v relativních světelných jednotkách (RLU). Mezi množstvím estradiolu v původním vzorku a RLU naměřenými optickým systémem Architect existuje nepřímá úměra. Analytická citlivost metody je lepší než 0,07 nmol/l. Nejistota měření 10 %.

Referenční meze jsou pro postmenopauzální ženy 0,07 – 0,404 nmol/l.

3.3.3. FSH

Stanovení FSH jsme prováděli pomocí chemiluminiscenční mikročasticové imunoanalýzy na automatickém analyzátoru Architect firmy Abbot.

FSH se stanovuje dvoukrokovou mikročasticovou chemiluminiscenční imunoanalýzou s flexibilním metodickým postupem označovaným jako Chemiflex.

V prvním kroku se společně inkubuje vzorek a anti-b FSH protilátka vázaná na

paramagnetické mikročástice. FSH přítomný ve vzorku se váže na protilátku. Po promytí se v druhém analytickém kroku přidá anti-a FSH protilátka značená akridinovým esterem. K reakční směsi jsou přidány roztoky Pre Trigger (peroxid vodíku) a Trigger (NaOH). Výsledná chemiluminiscenční reakce je měřena v RLU. Mezi koncentrací FSH v původním vzorku a RLU naměřenými optickým systémem Architect existuje přímá úměra. Analytická citlivost metody je lepší než 0,05 IU/l. Nejistota měření 9 %.

Referenční meze jsou pro postmenopauzální ženy 2,58 – 150,5 IU/l.

3.3.4. LH

Stanovení LH se provádí chemiluminiscenční imunoanalýzou na analyzátoru ADVIA Centaur BAYER.

Metoda stanovení LH je sendvičová imunoanalýza s přímou chemiluminometrickou technologií, využívající konstantního množství dvou protilátek, které jsou specifické pro beta podjednotku intaktní molekuly LH. Monoklonální myší anti-LH protilátka je značena akridiniovým esterem. Druhá protilátka, monoklonální myší anti-LH protilátka je kovalentně vázaná na paramagnetické částice. Při reakci dojde k vyvázání LH mezi obě protilátky. Separace komplexu antigen - protilátka se provádí magneticky. Detekuje se chemiluminiscenční signál vznikající rozpadem akridiniového esteru působením H₂O₂ po přidání alkalického roztoku. Mezi koncentrací LH ve vzorku a RLU naměřenými analyzátozem existuje přímá úměra.

Analytická citlivost metody je lepší než 0,07 IU/l. Nejistota měření 7 %

Referenční meze jsou pro postmenopauzální ženy 15,9-54,0 IU/l.

3.3.5. Progesteron

Progesteron se stanovuje jedнокrokovou chemiluminiscenční mikročásticovou imunoanalýzou s flexibilním metodickým postupem označovaným jako Chemiflex. Progesteron přítomný ve vzorku soutěží s progesteronem vázaným na paramagnetické mikročástice přes fluorescein a anti-fluorescein myší monoklonální protilátku o vazbu na anti-progesteron, který je ovčí monoklonální protilátkou, značenou akridinovým komplexem. Vytvoří se komplex protilátka-antigen-protilátka. Po promytí jsou přidány roztoky Pre Trigger (peroxid vodíku) a Trigger (NaOH). Výsledná chemiluminiscenční reakce je měřena optickým systémem analyzátoru Architect v RLU. Mezi koncentrací progesteronu a naměřenými RLU existuje nepřímá úměra. Citlivost metody je 0,48 nmol/l. Nejistota měření do 8 %.

Referenční meze pro postmenopauzální ženy jsou 0,32 – 0,64 nmol/l.

3.3.6. IGF-1

Je stanovován s využitím soupravy IGF-1 IMMUNOTECH, Francie.

Principem metody je sendvičová nekompetitivní IRMA. Souprava obsahuje dvě myší monoklonální protilátky proti dvěma epitopům IGF-1. Stanovení se provádí po extrakci séra v okyseleném etanolu. Standardy a extrahované vzorky se inkubují ve zkumavkách potažených první monoklonální protilátkou s druhou protilátkou značenou 125I. Po promytí se měří navázaná radioaktivita. Hodnoty ve vzorcích se získají interpolací z kalibrační křivky. Koncentrace ve vzorku jsou proporcionální naměřené radioaktivitě.

Referenční hodnoty jsou v dospělosti 107-310 ng/ml. Nejistota měření 15 %.

3.3.7. IGFBP-3

Souprava DSL, USA obsahuje dvě monoklonální protilátky proti dvěma epitopům IGFBP-3. Principem stanovení je dvoukroková sendvičová IRMA. Standardy a ředěné vzorky se inkubují ve zkumavkách potažených první protilátkou s druhou protilátkou značenou 125I. Po promytí se měří radioaktivita. Koncentrace vzorků je proporcionální naměřené radioaktivitě. Výsledek je získán interpolací z kalibrační křivky. Nejistota měření nebyla stanovena. Referenční meze pro dospělé ženy jsou 2000-7600 ng/ml.

3.3.8. HER-2 v séru

Pro stanovení sérových hladin cirkulujícího HER-2 jsme použili test BAYER ADVIA Centaur system. Využívá dvoustrannou sendvičovou imunoanalýzu s přímou chemoluminiscenční technologií. Tento způsob vyšetření se doporučuje pro sledování a monitorování nemocných s metastazujícím karcinomem prsu a může být i indikátorem časně recidivy nádoru.

Metoda užívá dvou monoklonálních protilátek, specifických pro oba epitopy extracelulární domény HER-2.

ADVIA Centaur HER-2/neu test je plně automatický.

Výrobce jsou dodávány:

- myší monoklonální protilátka proti lidskému HER-2 značená esterem akridinu
- monoklonální myší protilátka proti lidskému HER-2 značená fluoresceinem
- monoklonální myší anti-fluorescein protilátka kovalentně vázaná na paramagnetické částice
- kalibrační vzorky

Vzorek séra o objemu 20 uL inkubujeme s prvními dvěma protilátkami po dobu 5,5 minuty při teplotě 37 stupňů C. Po této době se přidá třetí protilátka a směs se ponechá 2,75 minuty při stejné teplotě. Vytvoří se imunokomplex, který po promytí vodou a přidání kyselého a zásaditého reagentu je připraven pro chemiluminiscenční reakci. Analytická citlivost se uvádí 0,5 ng/ml. Výrobce je doporučováno stanovit hranici positivity ověřovacím testem, s využitím kalibračních vzorků, který jsme provedli a pro naše podmínky odpovídá hranici positivity hodnota 12 ng/ml.

3.3.9. Imunohistochemické vyšetření tkáně nádoru

3.3.9.1. HER-2 v tkáni

Tkáňová exprese HER-2 byla stanovována semikvantitativně za použití DAKO Company Herceptestu. Jedná se o úplnou dvoustupňovou imunohistochemickou metodu. Parafinem fixovaná tkáň o tloušťce 4-5 um se na podložním sklíčku suší 12-24 hodin při teplotě 37 stupňů C. Následně se pro odmaskování vyšetřovaných struktur ponechá při teplotě 95 stupňů C v 10 mmol/l citrátovém pufru. Dalším krokem je inkubace s primární králičí protilátkou proti HER-2 a poté vizualizace pomocí reagentu složeného z kozí antikráličí protilátky a molekulární křenové peroxidázy navázané na kostru dextranového polymeru. K vytvoření viditelného produktu v místě navázané protilátky následuje vystavení 5% chromogenu a barvení hematoxilinem. Po každém kroku se sklíčko omývá promývacím pufrem. Zbarvení testovaného vzorku je porovnáváno se standardní škálou a hodnoceno 0, 1+-3+. Interpretace dat může být ovlivněna subjektivním pohledem hodnotitele. Jiné IHC testy vyjadřují intenzitu exprese v % s hodnocení slabá, střední a silná, a subjektivní chyba může být ještě výraznější. Za pozitivní pro zahájení léčby specifickou protilátkou je považována hodnota 3+. Před zahájením léčby se obvykle pozitivita ověřuje metodou FISH zejména v případě IHC hodnoty 2+, kdy pozitivita není zcela jednoznačná.

3.3.9.2. ER a PR v tkáni

ER a PR byly stanoveny imunohistochemicky za použití DAKO myších protilátek CLONE 1D5 a CLONE PgR 636.

Metoda představuje semikvantitativní detekci. Tkáňové řezy se zbavují parafinu při teplotě 95-99 stupňů C v pufrovací roztoku Target Retrieval Solution S 1700. Po promytí je tkáň inkubována s příslušnou myší protilátkou, CLONE 1D5 pro ER a CLONE PgR 636 pro stanovení PR. Následuje vizualizace DAKO LSAB roztokem a barvení hematoxilinem.

3.4. Body mass index (BMI)

Hodnota vypočtená podle vzorce: váha v kg dělená výškou v metrech na druhou. Normální váhu přitom určují hodnoty **BMI** mezi 18,5 a 25. Osoby, jejichž BMI má hodnotu pod 18,5, trpí pravděpodobně podvýživou. Hodnota **BMI** nad 25 ukazuje na nadváhu, nad 30 pak na obezitu.

3.5. Statistické zpracování

Výsledky byly zpracovány za použití párového či nepárového t-testu a jeho neparametrické alternativy (Mann-Whitney, Wicoxon). Pro korelační analýzu byl užit Spearmanův korelační koeficient. Pro některá hodnocení jsme využili Pearsnova χ kvadrát testu.

3.5.1. T- test

T-test je metodou matematické statistiky, která umožňuje ověřit některou z následujících hypotéz:

1/ normální rozdělení, z něhož pochází určitý náhodný výběr, má určitou konkrétní střední hodnotu, přičemž rozptyl je neznámý

2/ zda dvě normální rozdělení mající stejný (byť neznámý) rozptyl, z nichž pocházejí dva nezávislé náhodné výběry, mají stejné střední hodnoty (resp. rozdíl těchto středních hodnot je roven určitému danému číslu)

V prvním případě může být náhodný výběr tvořen buď jednotlivými hodnotami (pak se jedná o jednovýběrový t-test), anebo dvojicemi hodnot, u nichž se zkoumají jejich rozdíly (pak se jedná o párový t-test). Ve druhém případě jde o dvouvýběrový t-test.

V praxi se t-test často používá k porovnání, zda se výsledky měření na jedné skupině významně liší od výsledků měření na druhé skupině.

Test je založen na skutečnosti, že výběrový průměr z normálního rozdělení, od něhož se odečte střední hodnota tohoto rozdělení a rozdíl se vydělí výběrovou směrodatnou odchylkou, má T rozdělení.

3.5.1.1. Jednovýběrový t-test

Označme jednotlivé hodnoty náhodného výběru jako x_1, x_2, \dots, x_n , výběrový průměr jako \bar{x} a výběrový rozptyl jako S^2 . Test testuje hypotézu, že střední hodnota normálního rozdělení, z něhož výběr pochází, se rovná μ_0 .

Platí-li hypotéza, má náhodná veličina T rozdělení s $n-1$ stupni volnosti. Hypotézu zamítáme, je-li T příliš velké nebo příliš malé (výběrový průměr se příliš liší od očekávané střední hodnoty). Konkrétně se T porovná s kritickou hodnotou T rozdělení pro předem stanovenou hladinu významnosti.

3.5.1.2. Párový t-test

Párový t-test se od jednovýběrového liší pouze v tom, že náhodný výběr poskytuje dvojice hodnot $(y_1, z_1), (y_2, z_2), \dots, (y_n, z_n)$, přičemž uvnitř každé dvojice nemusí jít o nezávislé veličiny. V párovém t-testu ověřujeme, zda rozdíl středních hodnot rozdělení pro veličiny y a rozdělení pro veličiny z je roven určitému číslu (často nule).

Položíme-li $x_i = y_i - z_i$ a označíme-li μ_0 jako číslo, kterému se má rovnat rozdíl středních hodnot, můžeme párový test zcela převést na případ jednovýběrového t-testu.

3.5.1.3. Dvouvýběrový t-test

Označme jednotlivé hodnoty prvního náhodného výběru jako x_1, x_2, \dots, x_n , výběrový průměr jako \bar{x} a výběrový rozptyl jako s_x^2 . Obdobně označme jednotlivé hodnoty druhého náhodného výběru jako y_1, y_2, \dots, y_m , výběrový průměr jako \bar{y} a výběrový rozptyl jako s_y^2 . Oba výběry musejí být vzájemně nezávislé. Nakonec označme δ číslo, které se má rovnat rozdílu středních hodnot $\mu_1 - \mu_2$ (jak již bylo řečeno, často $\delta = 0$).

Potom veličina T má za platnosti hypotézy, že se rozdíl středních hodnot rovná δ , T rozdělení o $n+m-2$ stupních volnosti. Hypotéza se tedy zamítá v případě, že veličina T překročí kritickou hodnotu T rozdělení o uvedeném počtu stupňů volnosti.

(Anděl, 1985)

3.5.2. Neparametrické testy

Používají se v případě že distribuce proměnných je neznámá nebo porušuje podmínky pro použití parametrických testů. Slouží k posouzení statistické významnosti výsledků.

Mann-Whitney (U-Test) je podobný t-testu, používá se k porovnání různých vzorků stejné populace

Wilcoxon Signed-Rank Test je alternativou párového t-testu používá se obvykle k porovnávání páru vzorků (Harris, 2006).

Spearmanův korelační koeficient (R)

Korelační koeficient slouží k vyjádření síly asociace mezi proměnnými ve zkoumané populaci.

3.5.3. Test χ^2

Test χ^2 se užívá k posouzení pozorovaných údajů v souvislosti s vyhodnocením jejich statistické významnosti v porovnání s teoretickou distribucí. Je měřítkem mezi aktuální a očekávanou hodnotou. Ve statistice se používá společně s hodnotou P (probability). Tato hodnota udává míru shody s hypotézou, vyjadřuje míru statistické signifikance. (Harris, 2006)

4. Výsledky

4.1. Imunohistochemické vyšetření tkáně

U všech nemocných byla v tkáni nádoru stanovena exprese estrogenních receptorů (ER) a progesteronových receptorů (PR). Jako pozitivní hodnotíme expresi nad 10% nádorových buněk. Dvacet devět nemocných mělo pozitivní ER i PR, 36 mělo oba receptory negativní. Výsledky tohoto vyšetření jsou sumarizovány v tabulce 5.

Tab. 5. Exprese hormonálních receptorů v tkáni nádoru

receptor	ER+	ER-
PR+	29	2
PR-	5	36

U všech nemocných byla rovněž imunohistochemicky stanovena exprese HER-2. Hodnoty 0 a + jsou považovány za negativní, hodnota 3+ za pozitivní a hodnota 2+ může být při zjištění amplifikace genu metodou FISH pozitivní i negativní. Výsledky hodnot HER-2 jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab.6. HER-2 exprese v tkáni nádoru

HER-2	počet
0 a +	22
++	27
+++	23

V tabulce 7. je vyjádřen vztah exprese estrogenních a progesteronových receptorů k expresi HER 2 testovaného IHC v nádorové tkáni. Z tabulky je zřejmé, že maximum HER-2 pozitivních nemocných mělo zároveň negativní ER i PR.

Tab. 7. Vztah ER,PR a HER-2

HER-2	ER+,PR+	ER+,PR-	ER-PR+	ER-,PR-
0/+	2	1	0	1
++	15	0	1	2
+++	4	0	3	13

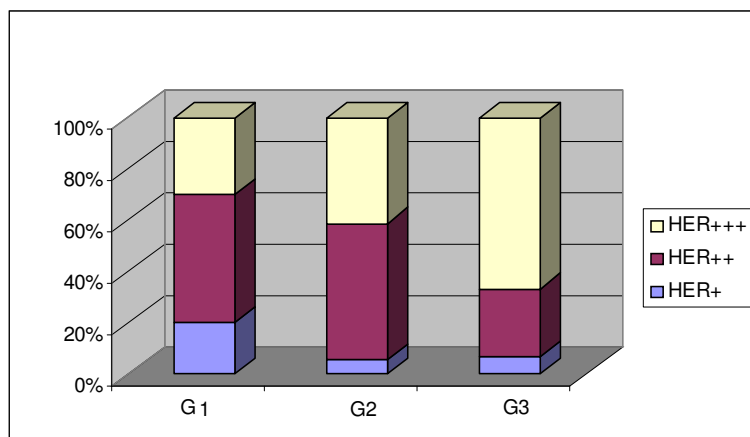
Dalším rizikovým faktorem, který se s pozitivitou HER-2 sdružuje je nízký stupeň vyžrállosti nádoru (G). Vztah exprese HER-2 a vyžrállosti nádorových buněk shrnuje tabulka 8. I v tomto malém souboru se tato skutečnost potvrzuje. Z 20 nemocných s HER-2 +++ mělo 50 % nízký stupeň vyžrállosti G3.

Tab.8 Vztah exprese HER-2 a vyžrállosti nádorových buněk

HER-2	G1	G2	G3
0/+	2	1	1
++	5	9	4
+++	3	7	10

Graficky přehledně je vztah vyžrállosti nádorových buněk a exprese HER-2 stanoveného v tkáni vyjádřeno v obr 11.

Obr. 11. Vztah G a exprese HER-2



4.2. Porovnání vlivu terapie na hormonální hladiny

Porovnávali jsme hladiny LH, FSH, progesteronu a estradiolu před zahájením adjuvantní chemoterapie s hodnotami v průběhu léčby (po 2. nebo 3. cyklu v závislosti na použité kombinaci) a po skončení terapie. Výsledky jsou sumarizovány v tabulce 9.

Tab. 9. Analýza hormonálních hladin

	Před zahájením terapie	Během terapie	Po skončení terapie
	medián ± SD	medián ± SD	medián ± SD
LH [U/l]	31,15 ± 14,1	#27,88 ± 13,29	30,62 ± 17,24
FSH [U/l]	63,47 ± 30,48	#56,31 ± 23,14	57,6 ± 31,13
Progesteron [nmol/l]	1,62 ± 1,21	#1,34 ± 1,14	1,48 ± 1,59
Estradiol [nmol/l]	0,12 ± 0,08	0,14 ± 0,25	*0,08 ± 0,06

statisticky signifikantní ($p < 0,05$) hodnoty před léčbou versus během léčby

* statisticky signifikantní ($p < 0,05$) hodnoty během léčby versus po léčbě

Nenalezli jsme žádnou statisticky významnou závislost na stadiu onemocnění, expresi hormonálních receptorů či HER-2. Rovněž nebylo pozorováno statisticky významné ovlivnění hormonálních hladin typem použité chemoterapeutické kombinace.

Hormonální hladiny v séru před zahájením léčby v porovnání se stavem během terapie byly signifikantně odlišné v hodnotách LH, FSH a progesteronu. Tyto hormony měly v porovnání s výchozím stavem hodnotu významně nižší.

Srovnání hormonálních hladin získaných v průběhu terapie s hodnotou po léčbě vykázalo signifikantní rozdíl pouze u estradiolu – $p < 0,05$.

Tyto výsledky naznačují, že pokles LH, FSH, a progesteronu začíná již na počátku a v průběhu adjuvantní chemoterapie a v dalším období již není statisticky významný. V kontrastu s tímto je pokles hladiny estradiolu zjevný až po ukončení léčby. Tato zjištění byla potvrzena neparametrickým testem.

Vztah mezi monitorovanými parametry před a během adjuvantní léčby k chemoterapii je ze

statistického hlediska pozitivní u všech hormonů, nejsilnější vazba byla identifikována u LH a FSH. Čím vyšší byla hodnota před zahájením léčby tím vyšší byly i hodnoty během terapie (pozitivní korelace).

Spearmanův korelační koeficient získaných výsledků je uveden v následující tabulce 10. Všechny hodnoty byly statisticky signifikantní ($p < 0,05$).

Tab. 10. Spearmanův korelační koeficient (R)

hormon	Před léčbou versus během léčby	Změna před léčbou versus během léčby
LH	0,83	-0,35
FSH	0,88	-0,57
Progesteron	0,59	-0,53
Estradiol	0,45	-0,48

Získané hodnoty jsme porovnávali i ve vztahu k době odstupu od menopauzy. Signifikantně negativní korelace byla odhalena pouze u hladin LH a to před, během i po léčbě (Spearmanův korelační koeficient $R = -0,27$, $R = -0,35$, $R = -0,39$). To znamená, že čím delší byl odstup od menopauzy tím nižší hladina byla detekována. Slabší negativní korelace byla u FSH, kde je signifikantní závislost na době od menopauzy pouze u hodnot během a po terapii ($R = -0,38$).

U dalších sledovaných hormonů jsme nenašli žádný vztah.

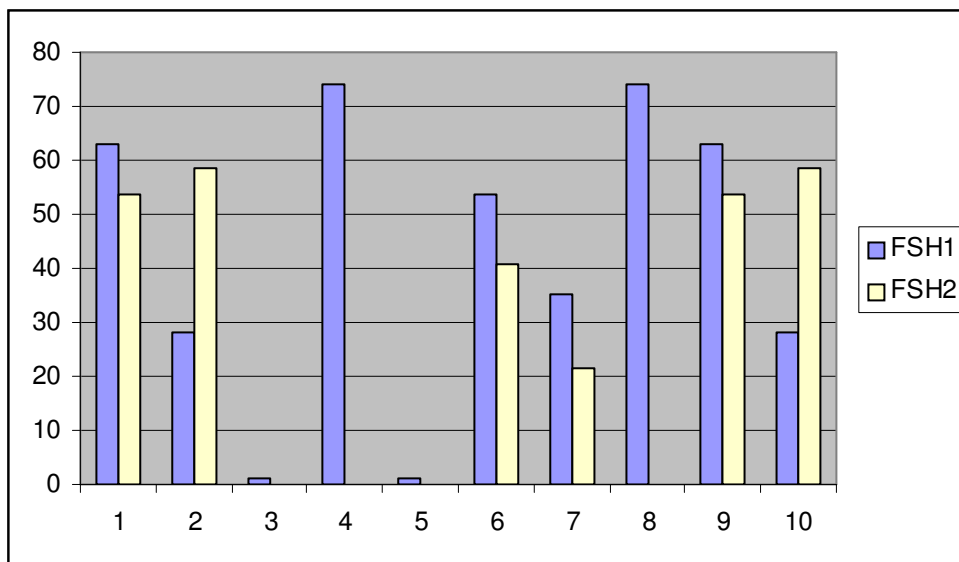
U všech nemocných jsme stanovili BMI. BMI se pohyboval v rozmezí 16,65 – 40,04 s mediánem 26,3. Nadváha, tedy BMI nad 25 byla zjištěna u 40 nemocných z 97 a obezita (BMI nad 30) u 18 pacientek. Více než polovina (58) mělo BMI vyšší než norma. Pouze u 2 nemocných jsem zjistili podnormální hodnoty BMI.

Pozornost jsme věnovali i vztahu mezi hladinou hormonů a BMI nemocné. BMI negativně koreloval s hladinou progesteronu před léčbou ($R = -0,32$) a pozitivně s hladinou progesteronu po léčbě ($R = -0,56$). Hladiny progesteronu před zahájením terapie byly nižší u nemocných s větším BMI, naopak po ukončení léčby byly u těchto nemocných vyšší. Z toho vyplývá, že pokles hladiny progesteronu byl menší u nemocných s větším BMI. Korelace BMI a změny hladiny progesteronu byla signifikantně významná ($R = 0,27$).

U kontrolní skupiny jsme hodnotili všechny sledované parametry stejně jako ve skupině nemocných léčených chemoterapií tedy estradiol, progesteron, FSH, LH. Ve skupině nemocných léčených inhibitory aromatázy se hodnoty FSH, LH a progesteronu měnily nepravidelně, u některých nemocných stoupaly, u jiných klesaly (obr. 12, 13, 14). Zcela

pravidelně jsme zaznamenali pokles hladiny estradiolu u všech nemocných. Graficky jsou tyto hodnoty vyjádřeny na obr. 15.

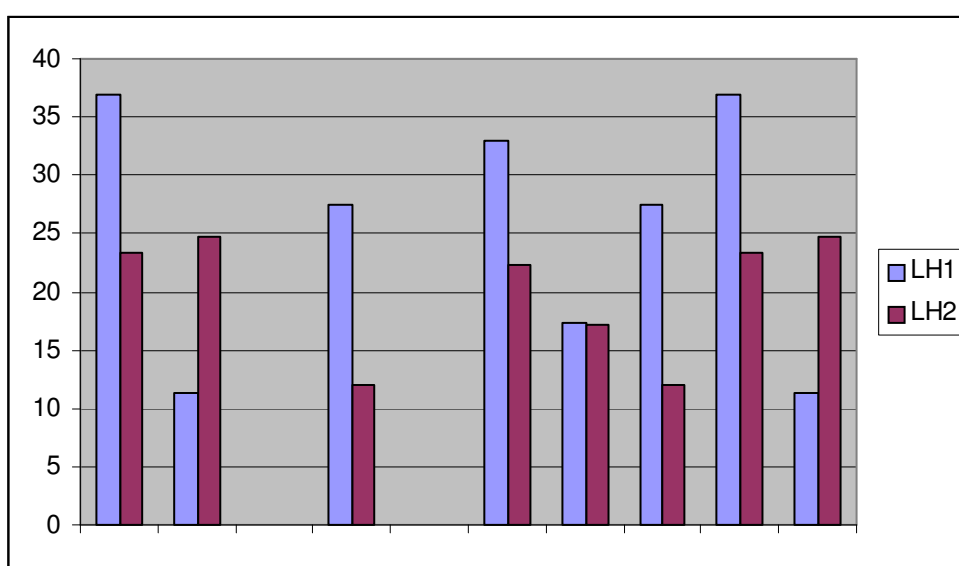
Obr 12. Hodnoty FSH v séru před a v průběhu léčby inhibítorem aromatázy



FSH 1 – hodnota před léčbou

FSH 2 – hodnota po 3 měsících léčby

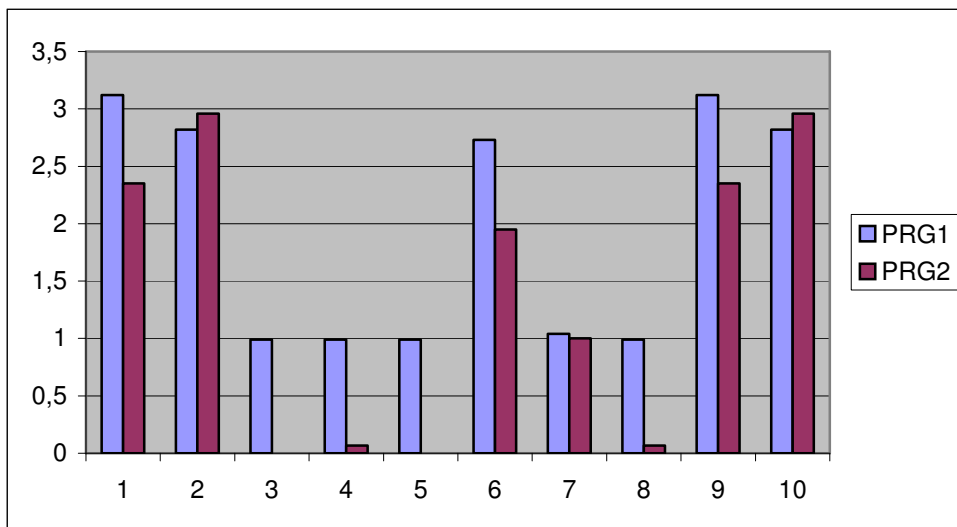
Obr. 13. Hodnoty LH v séru před a v průběhu léčby inhibítorem aromatázy



LH 1– hodnota před léčbou

LH 2 – hodnota po 3 měsících léčby

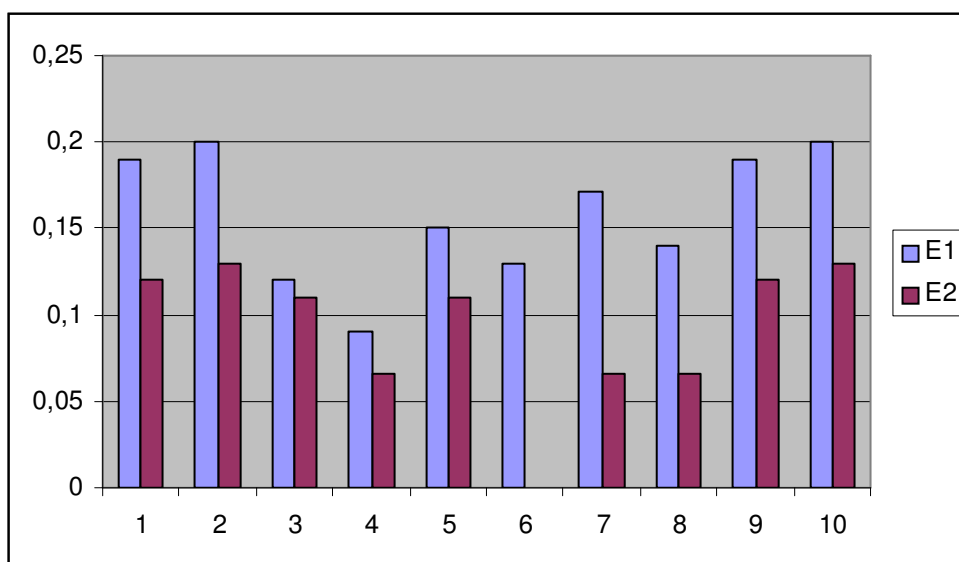
Obr. 14. Hodnoty progesteronu v séru před a v průběhu léčby inhibítorem aromatázy



PRG 1 – hodnota před léčbou

PRG 2 – hodnota po 3 měsících léčby

Obr. 15. Hodnoty estradiolu v séru před a v průběhu léčby inhibítorem aromatázy

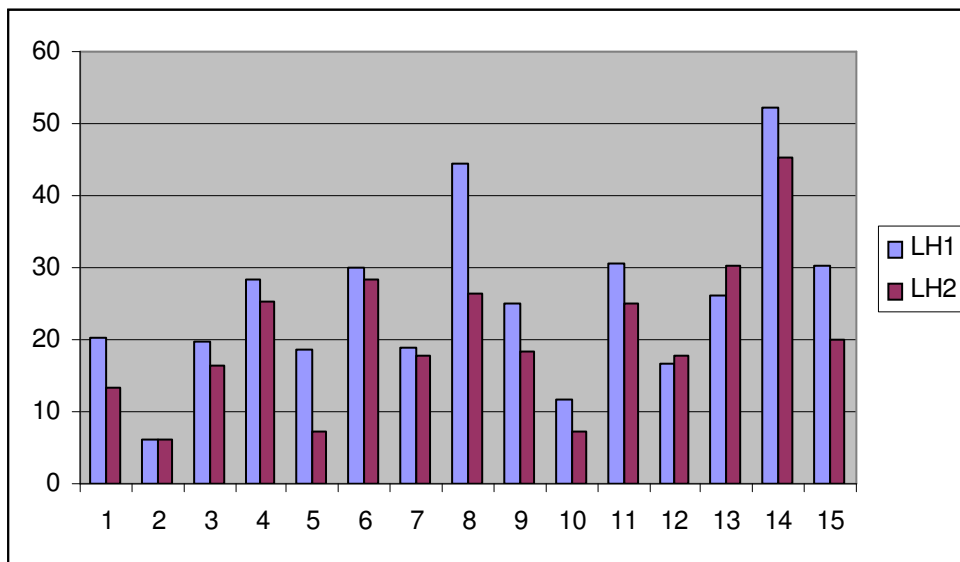


E 1 – hodnota před léčbou

E 2 – hodnota po 3 měsících léčby

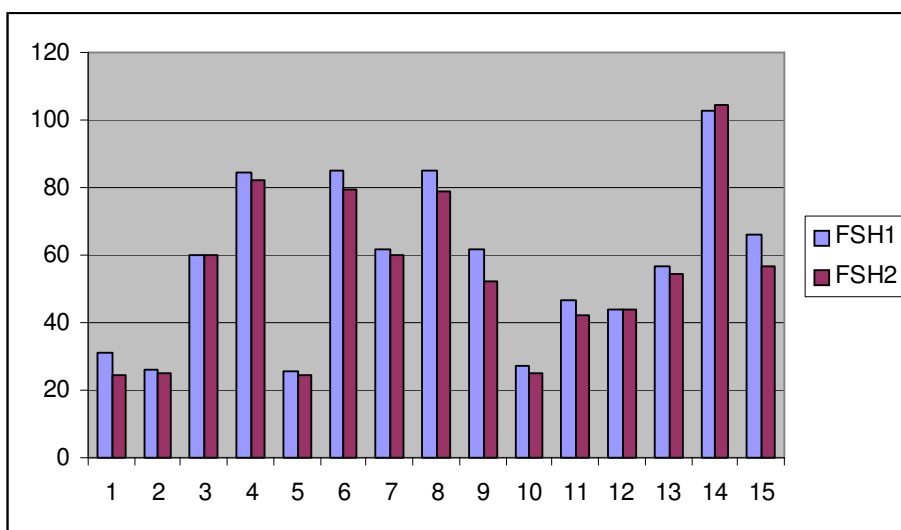
Hladiny všech sledovaných parametrů ve skupině nemocných, kterým byl adjuvantně podáván tamoxifen, se měnily nepravidelně. Tendence ke snižování hladin byla u LH a FSH, kterou ve svém souboru pozorovali i jiní autoři (Lonning 1995, Bhatavdekar 1987) Změřené hodnoty jsou uvedeny na obrázcích 16-19.

Obr. 16. Hodnoty LH v séru před a v průběhu léčby tamoxifenem



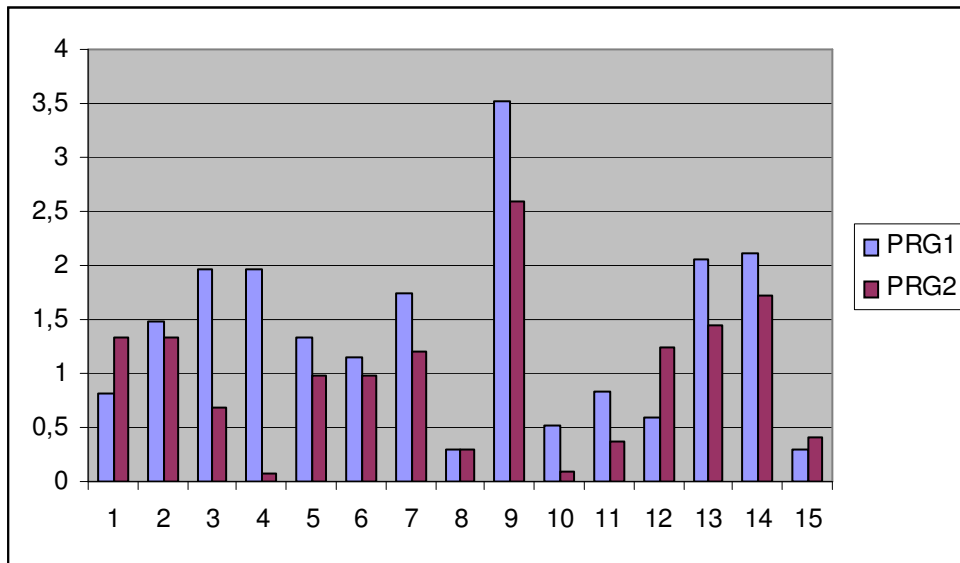
LH 1– hodnota před léčbou LH 2 – hodnota po 3 měsících léčby

Obr. 17. Hodnoty FSH v séru před a v průběhu léčby tamoxifenem



FSH 1– hodnota před léčbou FSH 2 – hodnota po 3 měsících léčby

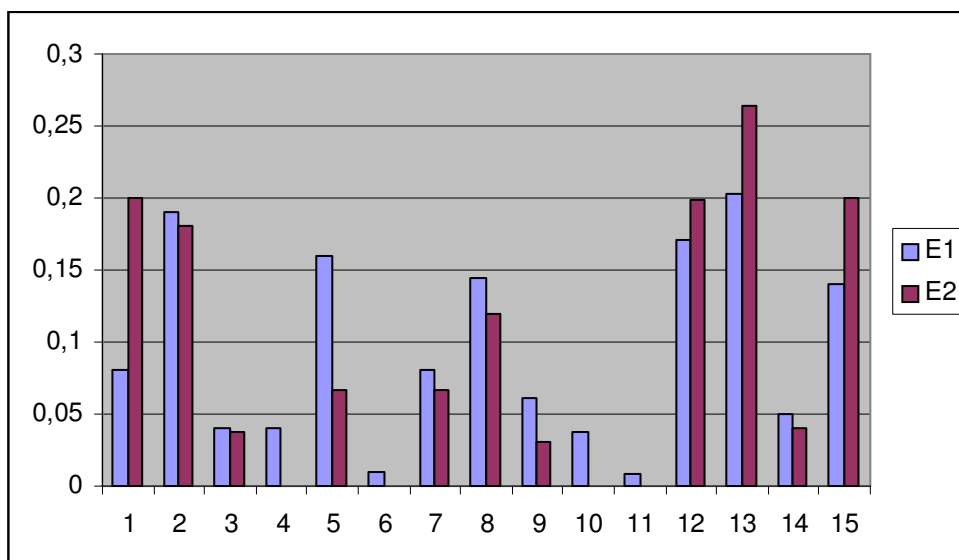
Obr. 18. Hodnoty progesteronu v séru před a v průběhu léčby tamoxifenem



PRG 1– hodnota před léčbou

PRG 2 – hodnota po 3 měsících léčby

Obr. 19. Hodnoty estradiolu v séru před a v průběhu léčby tamoxifenem



E 1– hodnota před léčbou

E 2 – hodnota po 3 měsících léčby

Pozorovali jsme pokles hladiny estradiolu u všech nemocných léčených inhibitory aromatázy a zároveň jsme prokázali dostatečnou citlivost metody.

4.3. Porovnání vlivu chemoterapie na hladiny IGF-1 a IGFBP-3

Hladiny IGF-1 nebyly v našem souboru chemoterapií statisticky významně ovlivněny. Hodnoty IGFBP-3 se vlivem chemoterapie v jejím průběhu rovněž významně neměnily, k statisticky významnému vzestupu došlo až po ukončení léčby.

Analýza změn se shrnuta v tabulce 11.

Tab.11. Analýza hladin IGF-1 a IGFBP-3

	Před zahájením terapie	Během terapie	Po skončení terapie
	medián ± SD	medián ± SD	medián ± SD
IGF-1 [μg/l]	161,75 ± 107,95	161,07 ± 85,28	158,9 ± 78,62
IGFBP-3 [mg/l]	4,15 ± 1,1	4,19 ± 1,09	*4,69 ± 1,12

- statisticky významná (p < 0,05) změna hladiny po léčbě ve vztahu k hodnotám před a během terapie

Ani u těchto sledovaných hodnot jsme nenalezli žádnou statisticky významnou závislost na stadiu onemocnění, expresi hormonálních receptorů či HER-2. Rovněž nebylo pozorováno statisticky významné ovlivnění hormonálních hladin typem použité kombinace cytostatik. U hladiny IGF-1 nedochází k významným změnám vlivem chemoterapie, velká směrodatná odchylka (SD) nasvědčuje, že rozptyl u tohoto faktoru je obrovský a je zcela nezávislý na léčbě. Výsledky byly ověřeny neparametrickým testem.

Pozitivní korelace změny mezi hladinami před, během a po léčbě byla nalezena u IGF-1, tedy čím vyšší byla výchozí hodnota, tím větší byla hodnota během léčby. Na druhé straně u IGFBP-3 byla shledána negativní korelace, tedy čím vyšší hladina před léčbou, tím hlubší pokles byl zaznamenán.

Spearmanův korelační koeficient je uveden v tab. 12.

Tab. 12. Spearmanův korelační koeficient (R) pro IGF-1 a IGFBP-3

hormon	Před léčbou versus po léčbě	Změna před léčbou versus po léčbě
IGF-1	0,72	-0,27
IGFBP-3	0,58	-0,25

Hodnoty jsou statisticky signifikantní ($p < 0,05$).

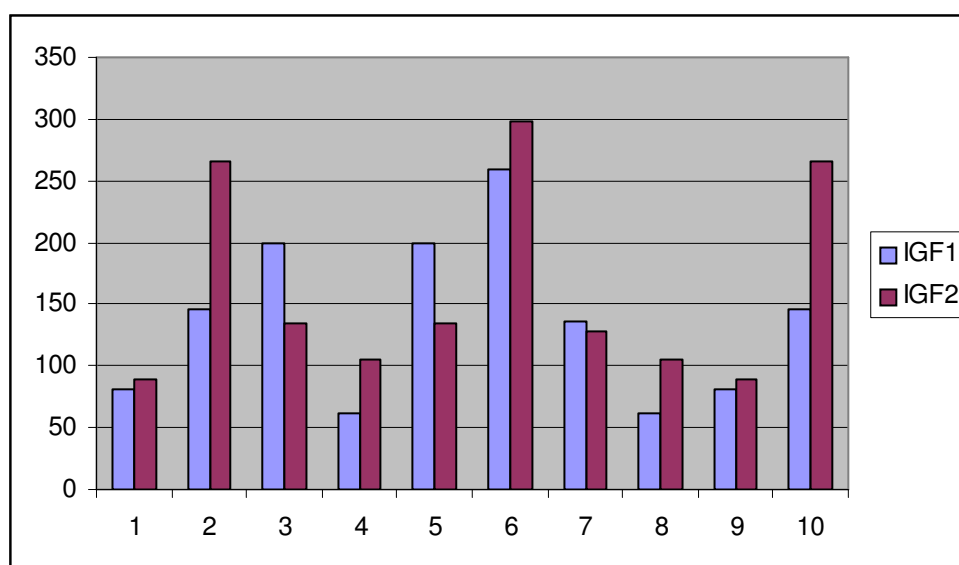
Poměr mezi IGF-1 a IGFBP-3 se zhruba u poloviny nemocných zmenšil, u druhé části naopak došlo v porovnání s poměrem před zahájením terapie k jeho vzestupu (tab. 13).

Tab. 13. Poměr IGF-1 a IGFBP-3 před a po adjuvantní léčbě chemoterapií

	Poměr vyšší	Poměr nižší	Poměr nezměněn
IGF-1/IGFBP-3	34	36	2

Hodnoty IGF-1 se při terapii inhibítorem aromatázy neměnily pravidelně, u některých nemocných stouply, u jiných po třech měsících terapie poklesly, jak vyplývá z obrázku 20.

Obr 20. Hodnoty IGF-1 v séru před a v průběhu léčby inhibítorem aromatázy

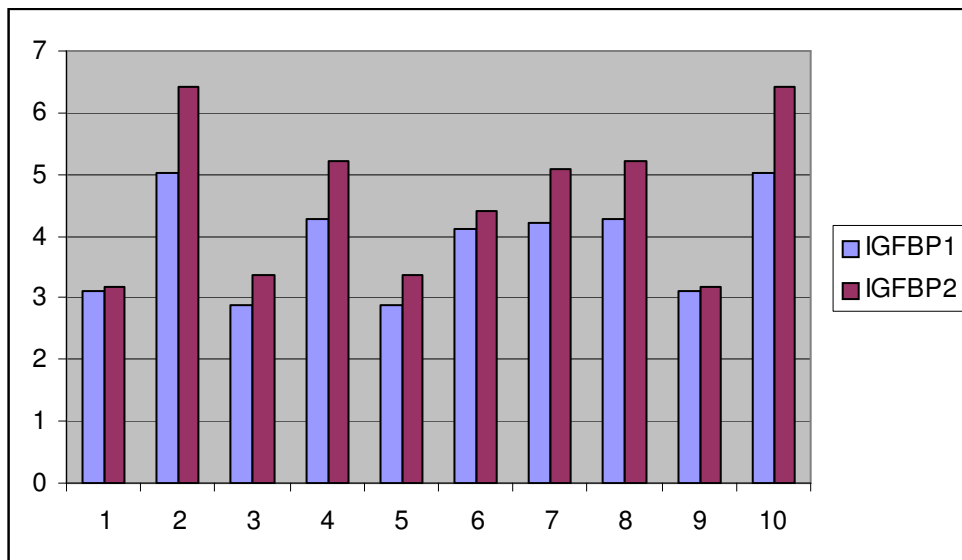


IGF 1– hodnota před léčbou

IGF 2 – hodnota po 3 měsících léčby

U všech nemocných léčených inhibítorem aromatázy došlo po třech měsících k vzestupu hladiny IGFBP-3 jak vyjadřuje i obrázek 21.

Obr. 21. Hodnoty IGFBP-3 v séru před a v průběhu léčby inhibítorem aromatázy



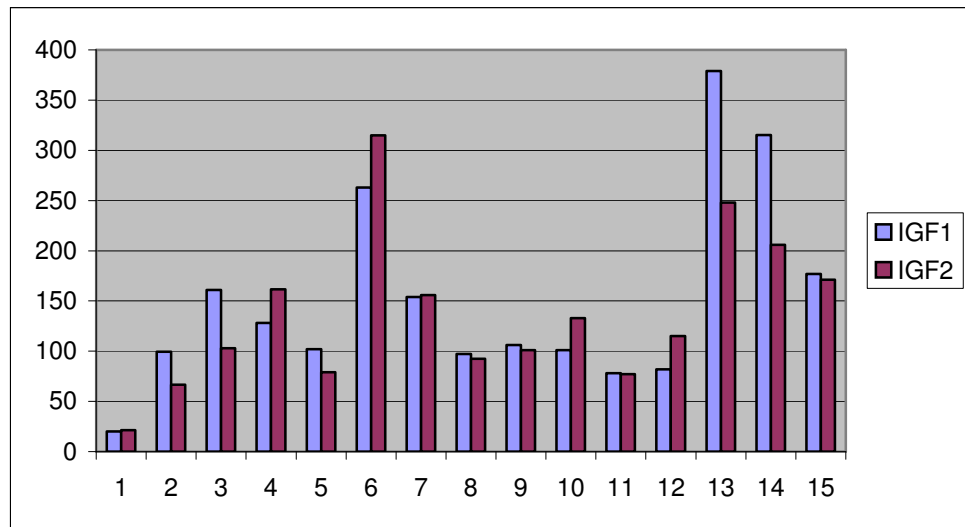
IGFBP 1 – hodnota před léčbou

IGFBP 2 – hodnota po 3 měsících léčby

Vzestup hladiny IGFBP-3 je v soulase s nálezy jiných autorů (Lonning1999), neprokázali jsme však pokles hladiny IGF-1. Soubor nemocných je však velmi malý.

Ve skupině nemocných užívajících tamoxifen jsme nepozorovali žádnou tendenci změn v IGF-1 ani IGFBP-3. Tato skutečnost vyplývá z obrázků 22 a 23.

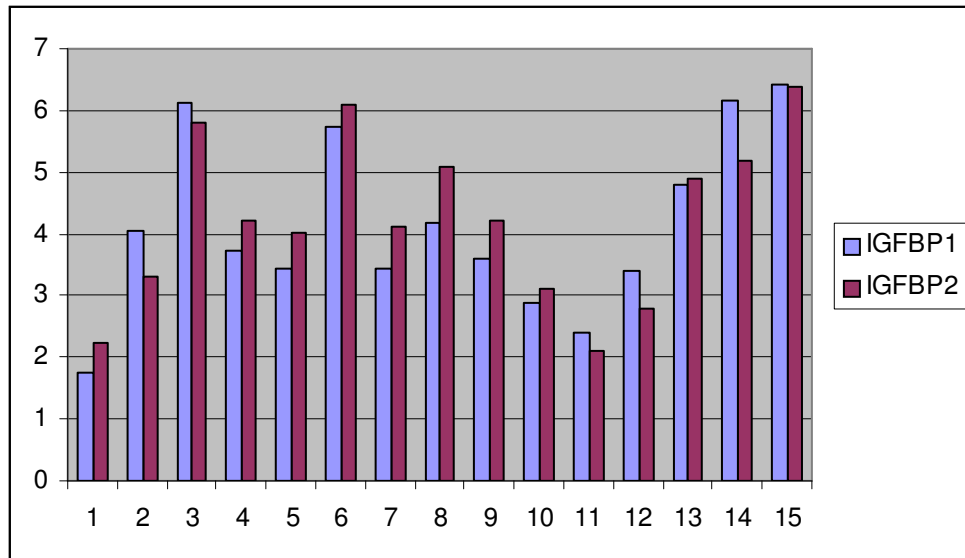
Obr 22. Hodnoty IGF-1 v séru před a v průběhu léčby tamoxifenem



IGF 1– hodnota před léčbou

IGF 2 – hodnota po 3 měsících léčby

Obr.23. Hodnoty IGFBP-3 v séru před a v průběhu léčby tamoxifenem



IGFBP1– hodnota před léčbou

IGFBP 2 – hodnota po 3 měsících léčby

4.4. Porovnání tkáňové exprese HER-2 s hladinou cirkulující extracelulární domény HER-2

Všechny nemocné v našem souboru byly imunohistochemicky testovány na expresi HER-2, estrogenních a progesteronových receptorů v tkáni nádoru. Padesát procent HER-2 pozitivních žen mělo zároveň negativní hormonální receptory ($p < 0,01$). Nízký stupeň diference nádoru, jako další negativní prognostický faktor byl zjištěn rovněž u 50 % nemocných s HER-2 +++ .

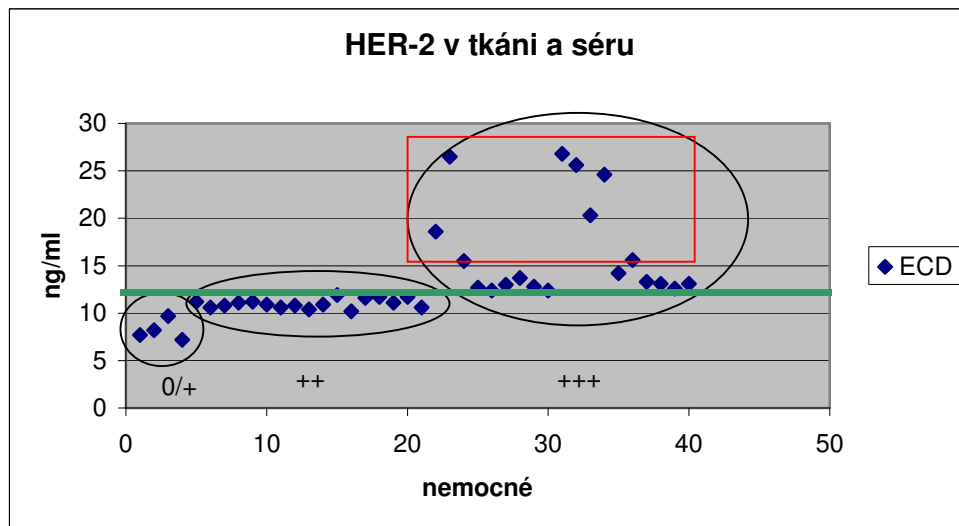
Hodnoty porovnávající HER-2 v tkáni a v séru ukazuje tab. 14 a graficky jsou znázorněny na obr. 24.

Tab. 14. Porovnání tkáňové exprese HER-2 a sérových hladin ECD

Exprese HER-2 v tkáni	Počet nemocných	HER-2 Sérové hladiny (ng/ml) (interval)	průměr +/- SD
			medián
0/+	4	7,7 - 9,8	8,75 +/- 1,05
			8,0
++	18	10,0 – 11,9	10,95 +/- 0,95
			10,5
+++	20	12,0 - 26,8	19,4 +/- 7,4
			14,5

Hodnoty hladin ECD se pohybovaly v rozmezí 7,7 – 9,1 ng/ml pro nádory imunohistochemicky negativní (0/+), od 10,0 do 11,9 ng/ml pro nádory, kde imunohistochemická hodnota byla nejistá (++) , a mezi 12,0 až 26,8 ng/ml u nádorů imunohistochemicky pozitivních (+++). Střední hodnoty a směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce 14.

Obr. 24. Porovnání tkáňové exprese a sérových hladin



Pokud respektujeme doporučenou hladinu pro pozitivitu 15 ng/ml, pak osm žen v naší skupině lze považovat za ECD pozitivní, to znamená 40 % HER-2 3+ nemocných. Pacientky s hodnotami 1 a 2+ nikdy nedosáhly této výše ECD.

Nižší hodnoty ECD HER-2 v našem souboru mohou souviset s tím, že po chirurgickém odstranění dochází k rychlému poklesu sérových hladin ECD.

Velmi silná statistická významnost byla nalezena v rozdílu mezi HER-2 negativními (0/+) a HER-2 pozitivními (3+) nemocnými. Při kalkulaci Studentovým T testem je $p < 0,003$.

Rovněž rozdíl mezi HER-2 nejistou pozitivitou (2+) a HER-2 pozitivními (3+) je při kalkulaci Studentovým T testem statisticky signifikantní $p < 0,01$. Metodou stanovení HER-2 v séru je tedy možné spolehlivě odlišit nemocné s pozitivitou HER-2 od nemocných s negativní expresí a nejistou expresí tohoto genu.

5. Diskuze

Vliv chemoterapie, hormonální léčby tamoxifenem i kombinace obou modalit na hladiny hormonů v séru byl studován zejména u premenopauzálních žen s karcinomem prsu (Yasumura 1990, Jordan 1991). Autoři popisují snížení hladin estradiolu, progesteronu a nesignifikantní snížení hladiny LH vlivem chemoterapie u premenopauzálních žen. Úroveň FSH nebyla chemoterapií ovlivněna. Pokud byly hodnoceny nemocné léčené tamoxifenem nebo kombinací chemoterapie a tamoxifenu byly hladiny estradiolu a progesteronu naopak vyšší a sníženy hladiny gonadotropinů. Změny ve funkci osy hypotalamus-hypofýza-ovaria jsou v léčbě premenopauzálních nemocných využívány v rámci hormonální manipulace. Vliv chemoterapie na steroidní hormony je popisován v celé řadě dalších prací (Anjum 1991, Shapiro 1997, Anderson 2007, Bines 1996, Ejlersen 2006, Kutluk 2006, Cobleigh 1991). Všichni popisují signifikantní pokles hladiny estradiolu a navození dočasné či trvalé ovariální ablace v závislosti na věku nemocné a použité kombinaci cytostatik. Přesto bylo zjištěno, že hladina estradiolu u chemoterapií navozené menopauzy je vyšší než u spontánně vzniklé (Braveman 2006).

V práci Bhatavdekarově (Bhatavdekar 1987) je porovnáván vliv na hladiny hormonů u premenopauzálních a postmenopauzálních nemocných. U premenopauzálních žen se hladiny LH a progesteronu před a po léčbě signifikantně nelišily signifikantně však byla snížena hladina estradiolu a testosteronu. Postmenopauzální nemocné měly signifikantní vzestup LH, FSH, prolaktinu a testosteronu a naopak vzestup estradiolu a progesteronu po chemoterapii byl malý a nesignifikantní.

U postmenopauzálních žen byl podrobněji sledován vliv hormonální léčby tamoxifenem a inhibitory aromatázy na hladiny steroidních hormonů. Tamoxifen zřejmě nezpůsobuje významné ovlivnění hormonálních hladin kromě lehké elevace estradiolu (Kostoglou – Athanassiou 1997, Lonning 1995, Secreto 1983). Působení inhibitorů aromatázy se vyznačuje snížením hladiny estrogenů (Fukuda 1999).

V souladu s těmito pracemi jsme v kontrolní skupině 15 nemocných léčených tamoxifenem nepozorovali signifikantní změny v hormonálních hladinách a v kontrolní skupině 10 nemocných užívajících inhibitor aromatázy jsme shledali jednoznačný pokles hladiny estradiolu ve všech případech.

Pokles hladiny estradiolu po ukončení chemoterapie v naší skupině, potvrzený statistickou analýzou může být podmíněn účinkem cytostatik.

Tím, že jsme prokázali statistickou korelaci mezi hladinou estradiolu po léčbě a odstupem od menopauzy (čím delší odstup, tím nižší hladina byla pozorována), jeví se jako velmi pravděpodobné ovlivnění reziduální ovariální produkce cytostatiky.

Zda se na hormonálních změnách podílí i ovlivnění tvorby estradiolu v alternativních tkáních, tedy tuku, prsní žláze a dalších není jasné. V naší práci jsme prokázali pouze mírné změny v hladinách progesteronu v závislosti na BMI. Neprokázali jsme však, že nadváha ani obezita má vliv na hladinu estrogenních hormonů, jak je uváděno v některých publikacích (Lukanova 2004).

Je možné, že na poklesu hladin estradiolu se podílí snížení cirkulujícího množství FSH a LH vlivem chemoterapie.

Chemoterapie nepochybně znamená významný zásah do regulačních mechanismů produkce hormonů i u postmenopauzálních pacientek. Jaký je přesný mechanismus tohoto vlivu však doposud nebylo jasné prokázáno.

Regulace růstu nádorových buněk prostřednictvím tyrosinkinázových receptorů a jejich ligandů je velmi složitá a doposud ne zcela dostatečně popsána. Významnou roli v regulačních pochodech zaujímá IGF-1. Má zcela zásadní úlohu ve vývoji karcinomu prsu spolu s dalšími působky IGF systému. O jeho vlivu na mitogenní aktivitu a antiapoptotickém působení podává informace celá řada prací (Sachdev 2001, Pollak 1998, Ellis 1998, Moschos 2002, Laban 2003, Furstenberger 2003), které zároveň potvrzují jeho zařazení do systému růstových hormonů. Insulinu podobné růstové faktory zaujímají významné postavení jako mediátory růstu, vývoje a přežívání buněk. Jsou syntetizovány prakticky všemi tkáněmi organismu a vytvářejí komplex molekul zahrnující jejich vazebné proteiny, proteázové systémy a receptory, které mohou modulovat jejich působení (Ellis 1998; Moschos 2002). Celý systém je v interakci s jinými komplexy, např. steroidními hormony. Možnost vzájemného ovlivňování mezi IGF systémem a estrogenními receptory popisuje řada prací (Song 2007, Westley 1998). IGF systém podporuje růst ER pozitivních nádorů prsu (Dupont 2000) a získání maligního fenotypu je ve svých počátcích rovněž vázáno na působení IGF-1 (Sarfstein 2006). Funkce IGF-1 je vázána na osu estrogen – estrogenní receptor, neboť ER je potřebný pro aktivaci IGF-1. Rovněž byla prokázána společná signální dráha pro IGF-1 a estrogeny (Hamelers 2003).

Dostupnost IGF-1 pro IGF-1 receptor je vázána na vazebné proteiny IGFBP 1-6. IGFBP-3 limituje potenciál IGF-1 vázat se na receptor. Data popsána v literatuře poukazují na to, že růstové hormony, prolaktin, estradiol, kortizon mohou odpovídat za regulaci aktivity IGF-1. (Furstenberger, 2003, Kajdaniuk 2000).

Vliv chemoterapie na hladiny pohlavních hormonů u premenopauzálních žen je dobře znám (Kutluk 2006). Stále však je málo informací o vlivu chemoterapie na růstové faktory, které podporují růst nádorů a účastní se na progresi nemoci, tedy i IGF a jejich vazebných proteinů. V některých studiích (Peyrat 1998, Barni 1994, Bruning 1995) je popsán signifikantní pokles IGF-1 po chemoterapii, přestože jiní autoři (Favoni 1995) nepozorovali žádný pohyb v koncentracích IGF-1 vlivem chemoterapie, ale je jimi popsán vzestup IGF-1 u generalizovaného onemocnění. To podporuje teorii o působení IGF-1 na progresi nemoci. V naší práci jsme nepozorovali žádné změny v hladině IGF-1 vlivem chemoterapie v souboru postmenopauzálních nemocných. To, že vlivem chemoterapie se hladina IGF-1 a IGFBP-3 signifikantně nemění popsali i jiní (Peyrat 1998, Kajdaniuk 2000).

Role IGF-1 v patogenezi karcinomu prsu je jasná, je však ještě třeba ozřejmit vliv používané léčby na hladiny tohoto působku. Studie in vitro poukazují na možnost, že IGF-1 má ochranný vliv proti cytostatikům na buňky nádoru prsu a brání indukované apoptóze (Dunn 1997).

Terapie antiestrogeny snižuje hladinu cirkulujícího IGF-1 snížením molárního poměru IGF-1/IGFBP-3 a zmenšuje tak jeho mitogenní potenciál (Campbell 2001, Torrisi 2001, Helle 1996). Zvýšení hladiny IGFBP-3 a současné snížení hladiny IGF-1 vlivem tamoxifenu je považováno za další možný modulační mechanismus na tkáňové úrovni (Lahti 1994, Ho 1998, Colletti 1989, Varma 2002). Některé práce prokazují vliv snížení hladiny IGFBP na rozvoj resistance vůči tamoxifenu (McCotter 1998, Wong 2001). Působení inhibitorů aromatázy má za následek zvýšení hladiny IGF-1 u postmenopauzálních žen, hladina IGFBP-3 zůstává nezměněna (Ferrari 2002) nebo se zvyšuje (Frost 1996).

V našem souboru jsme nepozorovali významnou změnu vzájemného poměru IGF-1 a IGFBP-3 v žádné skupině, tedy ani vlivem chemoterapie, ani vlivem tamoxifenu či inhibitorů aromatáz.

Nenalezli jsme žádný statisticky signifikantní vztah ani ke hladinám jiných sledovaných hormonů.

V poslední době je věnována vzrůstající pozornost i možnému vlivu IGF-1 na rozvoj resistance vůči léčbě tamoxifenem, inhibitorům aromatázy a trastuzumabem (Laban 2003, Lu 2001, Lonning 1995). In vitro bylo pozorováno, že IGF-1 stimuluje periferní aromatázu a vede tak ke zvýšené produkci estradiolu.

Rezistenci vůči tamoxifenu způsobuje i zvýšená exprese HER-2. Inhibicí HER-2 bylo dosaženo odstranění resistance k tamoxifenu. Zároveň bylo zjištěno, že u tamoxifen rezistentních nádorů je současně zvýšená hladina IGF-1, který je schopen reagovat jak s HER-

2 receptorem tak i a vazebnými místy pro estrogen (Massarweh 2008). I další práce potvrzují vzájemné ovlivňování receptorů (Todorovic-Rakovic 2006, Dowset 2008).

V poslední době se stále množí důkazy o vzájemném propojení všech regulačních systémů u karcinomu prsu. Některé práce (Riedemann 2007) prokazují, že aktivace IGF-1 receptoru má za následek resistenci receptorů pro epidermální růstové faktory vůči jejich inhibitorům. In vitro bylo prokázáno, že dochází k heterodimerizaci mezi receptorem pro IGF-1 a HER-2 a tak je způsobena rezistence vůči trastuzumabu. Všechna tato pozorování vedou k úvahám o nutnosti léčby, která by současně postihla více cílových struktur a bylo tak dosaženo maximální efektivity a zlepšení celkových výsledků léčby.

Cílem terapie je v současné době zejména estrogení receptor a receptor pro HER-2.

Možností stanovení HER-2 je několik s různou validitou pro rozhodování terapie.

Nejpřesnější je metoda stanovení pomocí FISH, méně přesná je imunohistochemie. Řada autorů našla korelaci mezi hladinou cirkulující extracelulární domény HER-2 (ECD) a FISH stanovenou tkáňovou hladinou (Carney 2004; Schippinger 2004; Perez 2006).

Monitorování ECD hladin v séru je snadno opakovatelná metoda a umožňuje sledování vývoje hladin ECD v čase pod vlivem terapeutických postupů a navíc umožňuje stanovení okamžité hodnoty HER-2 stavu.

Měření cirkulující ECD pomocí ELISA metod byla zjištěna prevalence zvýšených hladin u 18,1 % žen s primárním karcinomem prsu a u 45,6 % nemocných s generalizovaným onemocněním (Hayes 2001). Tento fakt může podpořit stanovování ECD v průběhu onemocnění, neboť cílená a velmi účinná terapie trastuzumabem je indikována na podkladě iniciační tkáňové exprese v primárním nádoru, přičemž exprese respektive amplifikace genu pro HER-2 v metastázách může být odlišná. V souhlase s tím jsou publikace uvádějící negativitu HER-2 v primárním nádoru a jeho pozitivitu v metastázách karcinomu prsu (El-Sawy 2002; Olsen 2007).

Vysoká koncentrace ECD HER-2 je spojována s velkou agresivitou nádoru a predikuje odpověď vůči trastuzumabu a částečně i vůči antiestrogenům a některým cytostatikům.

Další výhodou stanovování ECD v průběhu dispenzarizace je možnost, že zvýšení hladiny ECD v séru předchází klinickou manifestaci relapsu a může poskytnout důležité informace pro volbu terapeutického postupu u nemocných s metastazujícím karcinomem prsu.

V některých pracích je zvýšení hladiny ECD v cirkulaci komentováno jako časný příznak relapsu nemoci (Fornier 2005). Jiní autoři poukazují na korelaci výše hladiny ECD a velikosti nádoru (Brodowicz 1996).

Studium dynamiky sérových hladin ECD v průběhu kombinované chemioterapie

s trastuzumabem vedly k závěru, že podle poklesu po 2-3 cyklech léčby je možno potvrdit dobrou odpověď k zvolené terapii. Tak je možné posoudit prospektivní efekt velmi brzy po zahájení aplikace. (Fornier 2005; Mazouni 2007).

Pokud sérová hladina přesahuje 15 ng/ml lze predikovat dobrou odpověď k terapii, při nižších hladinách byla odpověď na aplikaci trastuzumabu slabá (Revilion 2008, Mazouni 2007, Papadopoulou 2008).

V jiných studiích sérová hladina ECD negativně korelovala s odpovědí na chemoterapii. Práce zdůrazňují, že zvýšená hladina ECD snižuje citlivost k cytostatikům a zároveň poukazují na dvojnásobně sníženou odpověď vůči hormonální terapii oproti nemocným s normálními hladinami ECD v cirkulaci (Hait, 2001, Salvadori 2005). Přestože byla potvrzena prediktivní hodnota ECD vyšetření, nebyla potvrzena prognostická významnost zvýšených hladin.

Prakticky všichni autoři uváděných studií posuzovali hladinu ECD u pokročilého onemocnění. Pouze v některých zprávách byl publikován vliv chirurgického výkonu u časného karcinomu prsu na sérové hladiny HER-2 (Isola 1994, Kong 2006). Autoři referují o 40 nemocných bez jakékoli předoperační léčby a porovnávají vzorky séra odebrané před chirurgickým výkonem s hladinami první, třetí a pátý den po operaci. Za hranici positivity je považována hladina 15 ng/ml. Počáteční koncentrace v séru významně poklesly ve vzorcích odebraných po operaci u většiny nemocných. Největší pokles byl pozorován v prvním pooperačním vzorku, v dalších dnech bylo snižování hladiny již pomalé. Toto pozorování podporuje nález nižších hladin ECD v séru u nemocných našeho souboru. Neměli jsme žádný materiál k případnému porovnání pooperačních hladin s úrovní před chirurgickým odstraněním nádoru.

Přítomnost ECD HER-2 v cirkulaci s sebou přináší celou řadu možných problémů:

Prvním z nich je, že zvýšená hladina ECD je schopna vázat na sebe trastuzumab a tím blokovat jeho funkci. To potvrzují některé studie, poukazující na nižší efekt trastuzumabu u nemocných s elevovanými hladinami ECD (Brodowicz 1997, Salvadori 2005).

Druhým problémem je možné uvolnění ECD HER-2 do cirkulace bezprostředně po aplikaci chemoterapie. Je možné toto pozorování použít jako ukazatel časně odpovědi na chemoterapii? Pokud se ECD uvolňuje do krve v důsledku destrukce nádoru, časný vzestup může indikovat dobrou odpověď k léčbě. Pokud je vzestup po aplikaci chemoterapie malý, může to znamenat, že nádor je vůči použité chemoterapii málo citlivý a pacient bude z této terapie mít jen malý prospěch (Hait 2001). Stanovování hladin ECD bezprostředně po zahájení léčby by mohlo uchránit nemocné, u kterých se léčba projeví jako málo účinná, od

dalších cyklů této chemoterapie a umožnit volbu jiné kombinace s předpokládaným účinkem. Vlivem účinné terapie dochází postupně k poklesu hodnot ECD v séru. Nemocné, u kterých se po ukončení terapie nalezne hladina ECD nad 10,5 ng/ml mají signifikantně nižší celkové přežití v porovnání s nemocnými, u kterých došlo k úplné negativizaci ECD v séru (Hayes 2001).

Naším cílem bylo zjistit, zda tkáňová exprese HER-2 zjištěná imunohistochemicky koreluje se sérovými hladinami ECD, stanovovaných v našem případě chemiluminiscenční metodou, u nemocných po operaci, před zahájením adjuvantní chemoterapie. Na podkladě našich výsledků lze konstatovat, že jsme shodu mezi oběma metodami našli. Pokud tkáňová exprese byla 3+, pak i v našem souboru jsme naměřili hodnoty nad 12 ng/ml, tedy pozitivní pro náš diagnostický set. Pokud bychom za hranici positivity považovali 15 ng/ml (hraniční hodnota pro pozitivitu u stanovení ELISA metodou), pak shoda v našem souboru je pouze 40%. V případě že tkáňová exprese nebyla zcela jednoznačně pozitivní (2+) hodnoty ECD v séru nepřekročili hladinu positivity ani jednou.

6. Závěr

- 6.1. Prokázali jsme, že i u postmenopauzálních žen dochází vlivem chemoterapie ke změnám v hladinách hormonů v cirkulaci. V porovnání s hodnotami před zahájením adjuvantní léčby jsme našli signifikantně nižší hodnoty LH, FSH a progesteronu v průběhu terapie a statisticky významné snížení hladiny estradiolu po skončení léčby chemoterapií. Toto snížení bylo tím větší, čím kratší byl odstup od menopauzy. U nemocných s vysokým BMI jsme prokázali významně nižší pokles hladiny progesteronu. Z toho je možné vyvodit, že dochází k ovlivnění zejména reziduální ovariální produkce estradiolu, možné však je i ovlivnění produkce v alternativních tkáních (tuk, mléčná žláza), lze připustit i ovlivnění procesu regulace tvorby hormonů (FSH, LH). Na výsledku terapie se tedy i u postmenopauzálních nemocných mohou podílet vlivy hormonální.
- 6.2. Neprokázali jsme statisticky významnou změnu hladin IGF-1 ani IGFBP-3 vlivem chemoterapie a hormonální léčby ani změnu ve vzájemném poměru IGF-1 a IGFBP-3. Možné ovlivnění růstu nádorů prostřednictvím změn hladin IGF-1 a IGFBP-3 jsme tedy nepotvrdili.
- 6.3. Potvrdili jsme, že hladiny ECD v séru jsou v korelaci s tkáňovou expresí HER-2. Přestože je zřejmé, že stanovení sérových hladin ECD není schopno nahradit FISH ani imunohistochemické vyšetření HER-2 v tkáni, naše výsledky nasvědčují tomu, že stanovení ECD může být použito pro predikci odpovědi na trastuzumab a případně k časné detekci relapsů a časnému monitorování efektivity léčby. V případě metastazujícího onemocnění je testování ECD využitelné pro zjištění aktuálního stavu HER-2 exprese a v případě, že není dostupná tkáň k vyšetření, může sérová pozitivita napomoci k volbě adekvátní metody léčby.

7. Souhrn

Cílená a individualizovaná léčba je posledním trendem v léčení karcinomu prsu. Musí nutně zohledňovat efektivitu a pravděpodobný přínos pro každou jednotlivou nemocnou.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda i u postmenopauzálních nemocných ovlivňuje chemoterapie hladiny estradiolu, progesteronu, LH, FSH a rovněž IGF-1 a IGFBP-3 v séru.

Vzorky krve jsme odebrali 72 nemocným před zahájením adjuvantní terapie, v jejím průběhu a po ukončení léčby. Nenalezli jsme statisticky signifikantní závislost změn sérových hladin sledovaných parametrů na stadiu onemocnění, expresi hormonálních receptorů a HER-2 ani na použité kombinaci cytostatik. Rovněž jsme neprokázali závislost zjištěných změn na věku, doby trvání menopauzy ani množství tělesného tuku.

Sérové hladiny LH, FSH a progesteronu byly statisticky významně nižší v průběhu léčby v porovnání s hodnotami před jejím zahájením. Statisticky významný rozdíl mezi hladinou výchozí a po ukončení terapie byl zjištěn pouze u estradiolu. Hladina estradiolu je však z hlediska možného hormonálního vlivu na nádorové buňky nejvýznamnější. Hladiny IGF-1 neprokázaly žádnou změnu v závislosti na terapii.

Vyšetřením sérových hladin ECD HER-2, s použitím BAYER Advia Centaur Systém, a porovnáním s tkáňovou expresí HER-2, s využitím DAKO Herceptestu, jsme našli statisticky významnou shodu těchto parametrů.

Z našich výsledků vyvozujeme, že i u postmenopauzálních žen s karcinomem prsu léčených chemoterapií dochází k hormonálním změnám, které se mohou pozitivně podílet na celkovém výsledku léčby.

Stanovení sérových hladin ECD HER-2 je využitelné k orientačnímu stanovení exprese HER-2 v nádorových buňkách v případech, kdy není k dispozici tkáň k imunohistochemickému a FISH testování a v případě generalizace nemoci, kdy exprese může být odlišná od nálezu v primárním nádorovém ložisku.

Summary

The aim of this project was to find out whether also in postmenopausal women chemotherapy can affect hormonal levels in serum and if also levels of IGF-1 and IGFBP-3 change. In the group of 72 postmenopausal breast cancer patients blood samples were taken before, during and after adjuvant chemotherapy and levels of estradiol, progesterone, LH, FSH, IGF-1 and IGFBP-3 were evaluated. Significant differences in all parameters were found except IGF-1. There was not any statistical dependence on the menopausal gap, age, weight or type of chemotherapy.

We explored the relationship between circulating HER-2 extracellular domain and tissue HER-2 status in a group of 42 postmenopausal breast cancer patients.

All patients were examined before adjuvant chemotherapy or other adjuvant treatment. Serum levels were measured by BAYER Advia Centaur System (cut off level is in our conditions considered at 12 ng/ml). Tissue expression was assayed with the DAKO Company Herceptest.

We can conclude that also in postmenopausal women hormonal changes can take part in the final effect of adjuvant treatment.

Serum levels are in consonance with tissue expression. That could be important in metastatic breast cancer, when it is impossible to get a new tumour sample and establish the actual HER-2 status, which may be different from the primary tumour.

However we know, that serum HER-2 concentration cannot substitute for IHC or FISH, we have seen a statistically significant correlation between serum level concentration and tissue HER-2 status.

8. Seznam použité literatury

- Allen, N. E., Roddam, A. W., Allen, D. S., Fentiman, I. S., dos Santos Silva, I., Peto, J., Holly, J. M. P., Key, T. J. (2005) A prospective study of serum insuline-like growth factor-1 (IGF-1, IGF-2, IGF-binding protein-3 and breast cancer risk. *British Journal of Cancer* 92, 1283-1287.
- Anděl, J. (1985) *Matematická statistika*, SNTL Praha, 56-72.
- Anderson, R. A., Cameron, D. A. (2007) Assesment of the effect of chemotherapy on ovarian function in women with breast cancer. *Journal of Clin. Oncol.* 25(12), 1630-1631.
- Anjum, S., Khan, S., Baig, S. M., Khanum, A., Haider, M. Z., Quazi, M. H. (1991) Effect of chemotherapy on circulating steroid hormone levels in postoperative premenopausal breast cancer patirnts. *J. Pak. Med. Assoc.* 41, 296-298.
- Barni, S., Lissoni, P., Bivio, F. (1994) Serum levels of insuline-like growth factor-I in operable breast cancer in relation to main prognostic variables and their perioperative changes in relation to those of prolactin. *Tumori* 80, 212-215.
- Bartucci, M., Morelli, C., Mauro, L., Ando, S., Surmacz, E. (2001) Differential insuline-like growth factor 1 receptor signaling and function in estrogen receptor (ER) positive MCF-7 and ER negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer res.* 61(18), 6747-54.
- Baselga, J., Perez, E. A., et al (2006) Adjuvant trastuzumab: A milestone in the treatment of HER 2-positive early breast cancer. *The Oncologist*, 11, suppl., 4-12.
- Baselga, J. (2001) Is Circulating HER-2 more than just a tumor marker? *Clinical Cancer Research* 7, 2605 – 2607.
- Bewick, M., Conlon, M., Gerard, S., Lee, H., Parissenti, A. M., Zhang, L., Gluck, S., Lafrenie, R. M. (2001) HER-2 expresion is a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer treated with a combination of high-dose cyclophosphamide, mitoxantrone, paclitaxel and autologous blood stem cell support. *Bone marrow transplantation* 27(8), 847-853.
- Bines, j., Oleske, D. M., Cobleigh, M. A. (1996) Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of Clin. Oncol.* 14, 1718-1729.
- Bhatavdekar, J. M., Shah, N. G., Trivedi, N. S., Karelia, N. H. (1987) Peptide and steroid hormone levels in pre- and postmenopausal breast carcinoma. *Neoplasma* 34(1), 95-9.
- Brodowicz, T., Wiltschke, Ch., Budinsky, A., Krainer, M., Michl, I., Zellinger, R., Seifert, M., Kubista, E., Zielinski Ch. C. (1996) Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer. *European Journal of cancer* 32, Suppl. 1, 17-18.
- Brodowicz, T., Wiltschke, Ch., Budinsky, A., Krainer, M., Steger, G. G., Zielinski, Ch. C. (1997) Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. *Int. J. of Cancer* 73(6), 875-879.

Braveman, A. S., Sawhney, H., Tendler, A., Patel, N., Rao, S., Kamenova, B., Weedon, J. (2006) Serum estradiol above the postmenopausal level after chemotherapy-induced amenorrhea in breast cancer patients. *Therapy* 3(5), 609-616.

Bruning, P. F., Van Doorn, J., Bonfrer, J. M. (1995) Insulin-like growth-factor-binding protein 3 is decreased in early-stage operable pre-menopausal breast cancer. *International Journal of Cancer* 62, 266-270.

Campbell, M. J., Woodside, V. J., Secker-Walker, J., Titcomb, A., Leathem, J. C. (2001) IGF status altered by tamoxifen in patients with breast cancer. *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.* 54, 307-310.

Carney, W. P., Neumann, R., Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S., Price, C. P. (2004) Monitoring the circulating levels of the HER2/neu oncoprotein in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5, (2), 105-116.

Clark, G. M. (2000) Prognostic and predictive factors, disease of the breast, 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 489–513.

Cho, H., Aronica, S. M., Katzenellenbogen, B. S. (1994) Regulation of progesteron receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 134, 658-664.

Cobleigh, M. A. (1991) Treatment of breast cancer in premenopausal women, the role of ovarian ablation. ASCO, 35th annual meeting, Atlanta, Educational book, 32-37.

Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Salamon, D. J. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2- overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic cancer disease. *Journal of Clinical Oncology* 17, 2639-2646.

Colletti, R. B., Roberts, J. D., Devlin, J. T., Copeland, K. C. (1989) Effect of tamoxifen on plasma insulin-like growth factor 1 in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 49(7), 1882-4.

Cullen, K. J., Yee, D., Sly, W. S., Perdue, J., Hampton, B., Lippman, M. E., Rosen, N. (1990) Insulin like growth factor receptor expression and function in human breast cancer. *Cancer Research* 50, 48–53.

De Vita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. (2005) *Cancer principles & practice of oncology*. 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1399–1471.

Dhar, K., Banerjee, S., Dhar, G., Sengupta, K., Banerjee, S. K. (2007) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces WISP-2/CCN5 via multiple molecular cross-talks and is essential for mitogenic switch by IGF-1 axis in estrogen receptor positive breast tumor cells. *Cancer Res.* 67(4), 1520-6.

Dickson, R. B., Lippman, M. E. (1987) Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr. Rev.* 8, 29.

Dowset, M., Allred, C., Knox, J., Quinn, E., Salter, J., Wale, Ch., Cuzick, J., Houghton, J., Mallon, E., Bishop, H., Ellis, J., Carder, P., Cussac, A. L., Forbes, J., Buzdar, A. (2008) Relation between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and HER-2 status with recurrence in arimidex, tamoxifen or in combination trial. *J. Clin. Oncol.* 26(7), 1-8.

Drebin, J. A., Link, V. C., Stern, D.F., et al (1985) Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 41, 697-706.

Dunn, S. E., Hardman, R. A., Kari, F. W., Barrett, J. C. (1997) Insuline-like growth factor-I alters drug sensitivity of HBL 100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. *Cancer Research* 57, 2687-2693.

Early Breast cancer Collaborative Group (2000) Ovarian ablation in early breast cancer: overview of randomised trials. *Lancet* 348, 1189-1196.

Ejlertsen, B, Mouridsen, H. T., Jensen, M. Bengtsson, N., Bergh, J., Cold, S., Edlund, P., Ewertz, M., de Graaf, P. W., Kamby, C., Nielsen, D. L. (2006) Similar efficacy for ovarian ablation compared with CMF. *Journal of Clin. Oncol.* 24(31), 4956-4962.

Ellis, M. J., Jenkins, S., Hanfelt, J., Redington, M. E., Taylor, M., Leek, R., Siddle, K., Harris, A. (1998) Insulin-like growth factors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 175-184.

El-Sawy, W. H., Abou Taleb, F. M., Kader, M. A., Dorgham, Y. T., Radwan, D. A. (2002) Circulating HER2 extracellular domain and response to chemotherapy in metastatic breast cancer. *Journal of the Egyptian Nat Cancer Inst* 14: 29-37.

Favoni, R. E., Cupis, A., Perrotta, A. (1995) Insulin-like growth factor-I and IGF-binding proteins blood serum levels in women with early- and late-stage breast cancer: mutual relationship and possible correlation with patients' hormonal status. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 121, 674-682.

Ferrari, L., Martinetti, A., Zilembo, N., Pozzi, P., Buzzoni, R., La Torre I. (2002) Short term effects of anastrozole treatment on insulin-like growth factor system in postmenopausal advanced breast cancer patients. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 80(4-5), 411-18.

Fornier, M. N., Seidman, A. D., Schwartz, M. K., Ghani, F., Thiel, R., Norton, L., Hudis, C. (2005) Serum HER 2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER 2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Anal. Oncology* 16, 234-239.

Frost, V. J., Helle, S. I., Lonning, P. E., van der Strappen, J. W., Holly, J. M. (1996) Effects of treatment with megestrol acetate, aminoglutethimide, or formestane on insulin-like growth factor 1 and 2, IGF-binding proteins and IGFBP-3 protease status in patients with advanced breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(6), 2216-21.

Fukuda, M., Watanabe, H., Suda, S., Schimizu, S. (1999) Sequential changes in hormone levels in postmenopausal breast cancer patients undergoing treatment with aromatase

inhibitor. *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy* 26(14), 2201-2208.

Furstenberger, G., Morant, R., Senn, H.J. (2003) Insuline-like growth factors and breast cancer. *Onkologie* 26, 290-294.

Gebhardt, F., Zanker, K., Brandt, B. (1998) Differential expression of alternatively spliced c-erbB-2 mRNA in primary tumors, lymph node, metastases, and bone marrow micro metastases from breast cancer patients. *Biochim Biophys Res Commun* 247, 319-323.

Gee, J. M., Robertson, J. F., Gutteridge, E., Ellis I. O., Pinder, S. E., Rubini, M., Nicholson, R. I. (2005) Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signaling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocrine-Related cancer* 12 (Suppl-1), 99-111.

Geisler, J., King, N., Dowsett, M., Ouestad, L., Lundgren, S., Walton, P., Lonning, P. E. (1996) Influence of anastrozol, a non steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma estrogen levels in postmenopausal women with breast cancer. *Br. J. Cancer* 74, 1286-1291.

Giovanucci, E. (1999) Insulin like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm. Res.* 51 Suppl 3, 34-41.

Hait, W.N. (2001) The prognostic and predictive values of ECD-HER-2. *Clinical Cancer Research* 7, 2601-2604.

Hamelers, I. H., Steenbergh P. H. (2003) Interactions between estrogen and insuline-like growth factor signaling pathway in human breast tumor cells. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 331-45.

Hankinson, S. E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Michaud, D. S., Rosner, B., Pollak, M. (1998) Circulating concentrations of insulin-like growth factor-1 and risk of breast cancer. *Lancet* 351, 1393-1396.

Helle, S. I., Lonning, P. E. (1996) Insulin-like growth factors in breast cancer. *Oncologica* 35, 19-22.

Harries, M., Smith, I. (2002) The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-related Cancer* 9: 75-85.

Harris, M., Taylor, G. (2006) *Medical statistics made easy*, Taylor and Francis Group.

Hayes, D. F., Yamauchi, H., Broadwater, G., Cirrincione, C. T., Rodrigue, S.P., Berry, D. A., Younger, J., Panasci, L. L., Millard, F., Duggan, D.B., Norton, L., Henderson, I. C. (2001) Circulating HER-2/erbB-2/neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and leukemia group B study 8662. *Clin Cancer Res* 7(9), 2703-11.

Herceptin package insert. Genetech Inc, South San Francisco, Calif., (1998).

Ho, G. H., Luo, X. W., Ji, C. Y., Foo, S. C., Ng, E. H. (1998) Urinary 2/16 alpha-

hydroxyestrone ratio: correlation with serum insulin-like growth factor binding protein-3 a potential biomarker of breast cancer risk. *Ann. Acad. Med. Singapore* 27(2), 294-9.

Ho, G. H., Ji, C. Y., Phang, B. H., Soo, K. C., Lee, K. O., Ng, E. H. (1998) Tamoxifen alters levels of serum insulin-like growth factors and binding proteins in postmenopausal breast cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* 5(4), 361-7.

Hope, R., Berlin, L., Westphal, L. (2002) Chemotherapy induced ovarian damage: prevention and impact. *Breast cancer research* 8, Final report.

Hynes, N. E., Stern, D. F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198, 165-184.

Isola, J. J., Holli, K., Oskala, H., Teramoto, Y., Kallioniemi, O. P. (1994) Elevated c-erbB2 oncoprotein levels in presurgery and follow-up serum sample defined in aggressive course in patients with breast cancer. *Cancer* 73, 652-8

Jordan, V. C., Fritz, N. F., Langan-Fahey, S., Thompson, M., Tormey, D. C. (1991) Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 16, 1488-91.

Jordan, V. C., Fritz, N. F., Langan-Fahey, S., Thompson, M., Tormey, D. C. (1998) Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as single agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 83(20), 1488-91.

Jorrissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garret, T., Ward, C. W., Burges, A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell. Res.* 284, 31-53.

Kahan, Z., Gardi, J., Nyari, T., Foldesi, I., Ormandi, K., Lazar G., Thurzo, L., Schally, A. V. (2006) Elevated levels of circulating insulin-like growth factor-1, IGF binding protein-3 and testosterone predict hormone-dependent breast cancer in postmenopausal women. *Int. J. Oncol.* 29(1), 193-200.

Kajdaniuk, D., Marek, B. (2000) Influence of adjuvant chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil on plasma insulin-like growth factor-I and chosen hormones in breast cancer in pre-menopausal patients. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics* 25, 67-70.

Keinan-Boker L., Bueno de Mesquita, H. B., Kaaks, R., Van Gisl, C. H., Van Nord, P. A., Rinaldi, S., Riboli, E., Grobbee, D. E., Peeters, P. H. (2003) Circulating levels of insulin-like growth factor 1, its binding proteins -1, -2, -3, C-peptide and risk of postmenopausal breast cancer. *Int. J. Cancer* 106(1), 90-95.

Klener, P a kol. (2002) *Klinická onkologie*. Galén. 495-512.

Knowlden, J. M., Jones, H. E., Barrow, D., Gee, J. M., Nicholson, R. I., Hutcheson, I. R. (2007) Insulin receptor substrate-1 in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor signaling. Implication for Gefitinib. *Breast Cancer Res. Treat.* 28, 512-18.

Kong, S. Y., Kang, J. H., Kwon, H. S., Chung, K.W., Kang, S.H., Lee, D.H., Ro, J., Lee, E. S. (2006) Serum HER-2 concentrations in patients with primary breast cancer *Journal of Clinical Pathology* 59, 373-6.

Kostoglou – Athanassiou, I., Ntales, K., Gogas, J., Makropoulos, C., Alevizou-Terzaki, V., Athanassiou, P., Georgiou, E., Proukakis, C. (1997) Sex hormones in postmenopausal women with breast cancer on tamoxifen. *Horm. Res.* 47(3), 116-20.

Krajcik, R. A., Borofsky, N. D., Massardo, S., Orentreich, N. (2002) Insulin-like growth factor +, binding proteins and breast cancer. *Cancer Eoidemiology Biomarkerrrs and Prevention* 11, 1566-1573.

Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9193-9197.

Kutluk, O., Ozgur, O. (2006) Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology* 24, 4044-4046.

Laban, C., Bustin, S. A., Jenkins, P. J., (2003) The GH-IGF-1 axis and breast cancer. *Trends Endocrinol. Meta.* 14, 28-34.

Lahti, E. I., Knip, M., Laatikainen, T. J. (1994) Plasma insulin-like growth factor 1 and its binding proteins 1 and 3 in postmenopausal oatients with breast cancer receiving long term tamoxifen. *Cancer* 74(2), 618-24.

Lee, A. V., Yee, D. (1995) Insuline-like growth factors and breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 49, 415-421.

Lonning, P. E., Johannessen, d. C., Lien, E. A., Ekse, D., Fotsis, T., Adlercreutz, H. (1995) Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 52(5), 491-6.

Lonning, P. E., Helle, S. I. (2004) IGF-1 and Breast cancer. *Novartis Found symp.* 262, 205-12.

Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., Pollak, M. (2001) Insuline like growth factor-1 receptor signaling and resistance to trastuzumab. *J. Natl. Cancer. Inst.* 93, 1852-1857.

Ludovini, V., Gori, S., Colozza, M., Pistola, L., Rulli, E., Floriani, I., Pacifico, E., Tofanetti, F. R., Sidoni, A., Basurto, C., Rulli, A., Crino, L. (2008) Evaluation of serum HER-2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Anal. of Oncology* 10, 585-587.

Lukanova, A., Lundin, E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Muti P., Mure, A., Rinaldi, S., Dossus, L., Micheli, A., Lenner, P., Shore, R. E., Krogh, V., Koenig, K. L., Riboli, E., Berrino, F., Hallmans, G., Stattin, P., Toniolo, P., Kaaks, R. (2004) Body mass index, circulating levels of sex-steroids, IGF-1, IGFBP-3: a cross-sectional study in healthy women. *Eur. J. Endocrinol.* 150 (2), 161-71.

Massarweh, S., Osborne, C. K., Creighton, C. J., Qin, L., Tsimelzon, A., Huang, S, Weiss, H., Rimawi, M., Schiff, R. (2008) Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res.* 68(3), 826-33.

Mazouni, C., Hall, A., Broglio, K., Fritsche, H., Andre, F., Esteva, F. J., Hortobagyi, G. N., Pusztai, L., Cristofanilli, M. (2007) Kinetics of serum HER-2/neu changes in patients with HER-2 positive primary breast cancer after initiation of primary chemotherapy. *Cancer* 109 (3), 496-501.

McCotter, D., van den Berg, H. W., Boylan, M., McKibben, B. (1998) Changes in Insuine-like growth factor receptor-1 expression a binding protein secretion associated with tamoxifen resistance and estrogen independence in human breast cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* 99(2), 239-45.

Moschos, S. J., Mantzoros, C. S. (2002) The role of IGF systém in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63, 317-332.

Muller, V., Witzel, I., Luck, H. J., Kohler, G., von Minckwitz, G., Mobus, V., Sattler, D., Wilczak, W., Lonning, T., Janicke, F., Pantel, K., Thomsen, Ch. (2004) Prognostic and predictive impact of the HER-2/neu ECD in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 86(1), 9-18.

Nahta, R., Hortobágyi G. N., Esteva F. J. (2003) Growth factor receptors in breast cancer: Potential for therapeutic intervention. *The Oncologist*, 8, 1, 5-17.

Nieto, Y., Nawaz, F., Jones, R. B., Shpall, E. J., Nawaz, S. (2007) Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor and the presence of truncated EGFR in locoregionally advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 25(28), 4405-13.

Olsen, D. A., Ostergaard, B., Bokmand, S., Wamberg, P. A., Jakobsen, E. H., Br ndslund, I. (2007) HER-2 protein concentrations in breast cancer cells increase before immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis turn positive. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45(2), 177-82.

Osborne, C. K., Clemmons, D. R., Artega, C. L. (1990) Regulation of breast cancer growth by insulin-like growth factors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 37(6), 805-9.

Osborne, C. K. (1998) Steroid hormone receptors in breast cancer menagement. *Breast cancer res. Treat.* 51, 228.

Osborne, C. K., Schiff, R. (2007) Novel strategies for HER targeted therapy and mechanisms of resistance. *SABCS Educational book*, 5-48.

Paik, S., Bryant, J., Park, C., Fisher, B. (1998) Erb B-2 and reponse to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl.Cancer Inst.* 90, 1361-1370.

Papadopoulou, E., Tripsianis, G., Anagnostopoulos, K., Tentes, I., Kakolyris, S., Galazios, G., Sivridis, E., Simopoulos, K, Kortsaris, A. (2008) The influence of serum HER-2 levels and HER-2 codon 655 polymorphism on breast cancer outcome. *Neoplasma* 55(2), 113-21.

Panchapakesan, B. (2007) Integrated molecular imaging and therapy for breast cancer. DTIC, Annual report.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, M. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* 94, 153

Perez, E. A. (2006) HER-2 as a prognostic, predictive, and therapeutic target in breast cancer. *The Oncologist* 11, suppl., 15-26.

Perik, P. J., Graaf, W., De Vries, E., Boomsma, F., Messerschmidt, J., (2006) Circulating apoptotic proteins are increased in long term breast cancer survivors. *Acta Oncologica* 45(2), 175-182.

Peyrat, J. P., Bonnetterre, J., Hecquet, B. (1993) Plasma insuline-like growth factor-1 concentration in human breast cancer. *European Journal o Cancer* 29A, 2139-2147.

Peyrat, J. P., Revillion, F., Bonnetterre, J. (1998) Plasma insuline-like growth factor in primary breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *British Journal of Cancer* 77, 1669-1671.

Plowman, G. D., Culouscou, J.M., Whitney, G. S., (1993) Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1746-1759.

Poikonen, P., Saarto, T., Elomaa, I., Joensuu, H., Blomqvist, C. (2000) Prognostic effect of amenorrhoea and elevated serum gonadotropin levels induced by adjuvant chemotherapy in premenopausal node-positive breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* 36, 43-48.

Pollak, M., Constantino, J., Polychronakos, C. (1990) Effect of tamoxifen on serum insulin-like growth factor I levels in breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1693-1697.

Pollak, M. (1998) IGF-I physiology and breast cancer. *Recent Results Cancer Res.* 152, 63-70.

Powels, T. J. (1998) Prognostic impact of amenorrhoea after adjuvant chemotherapy. *European Journal of Cancer* 34, 603-605.

Ren, Z., Shin, A., Cai, Q., Shu, X., Gao, Y., Zheng, W. (2007) IGFBP3 m RNA expression in benign and malignant breast tumors. *Breast Cancer Res.* 9, 1186-92.

Revillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Bonnetterre, J., Peyrat, J. P. (2008) ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the biopathological features and prognosis. *Ann. Oncol.* 19(1), 73-80.

Riedmann, J., Takiguchi, M., Sohail, M., Maculay, V. M. (2007) The EGF receptor interacts

with type 1 IGF receptor and regulates its stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355(3), 707-714.

Rocheffort, H., Chalbos, D., Cunat, S., Lucas, A., Platet, N., Garcia, M. (2001) Estrogen regulated proteases and antiproteases in ovarian and breast cancer cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 76, 119.

Sachdev, D., Yee, D. (2001) The IGF system and breast cancer. *Endocrine Related Cancer* 8, 197 – 209.

Salvadori, B., Pinzani, P., Distante, V., Casella, D., Bianchi, S., Paglierani, M., Vezzosi, V., Neumann, R., Cataliotti, L., Pazzagli, M., Orlando, C. (2005) Comparison of pre and postsurgical concentrations of blood HER-2 mRNA and HER-2 ECD reflects HER-2 status in early breast cancer. *Clinical Chemistry* 51, 254-256.

Sarfstein, R., Maor, S., Reziner, N., Abramovitch, S., Werner, H. (2006) Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor gene in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 27, 241-6.

Schernhammer, E. S., Holly, J. M., Pollak, M. N., Hankinson, S. E. (2005) Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(3), 699-704.

Schippinger, W., Regitnig, P., Bauernhofer, T., Ploner, F., Hofmann, G., Krippel, P., Wehrenschtz, M., Lax, S., Carney, W., Neumann, R., Werenecke, K. D., Samonigg, H. (2004) The course of serum HER-2/neu levels as an independent prognostic factor for survival in metastatic breast cancer. *Oncology reports* 11, 1331-1336.

Schuhard, M., Landers, J. P., Sandhu, N. P., Spelsberg, T. C. (1993) Steroid hormone regulation of nuclear protooncogenes. *Endocr. Rev.* 14, 659.

Secreto, G., Recchione, C., Cavalleri, A., Miraglia, M., Dati, V. (1983) Circulating levels of testosterone, 17beta-oestradiol, luteinising hormone and prolactin in postmenopausal breast cancer patients. *Br . J. Cancer* 47(2), 269-75.

Shah, N., Thomas, T. J., Lewis, J. S., Klinge, C. M., Gelinas, C. (2001) Regulation of estrogenic and nuclear factor kappa B functions by polyamines and their role in induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene* 20, 1715.

Shapiro, C. L., Recht, A., (2001) Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *A Engl J Med* 34, 1997.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Yarden, Y., Sliwkowski, M. X. (1997) Untangling the ErbB signaling network. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* 2001; 2:127-137

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S.G., (1997) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HEHER/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.

Slamon , D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Fleming, T., Eirmann, W.,

Wolter, J., Pegram, M., Yarden, Y., Slivkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signaling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 127-137.

Song, R. X., Zhang, Z., Chen, Y., Santen, R. J. (2007) Estrogen signalling via a linear pathway involving IGF-1 receptor, matrix metalloproteinases, and EGFR to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 148(8), 4091-4101.

Strange, K. S., Wilkinson, D., Edin, G., Emerman, J. T. (2004) Mitogenic properties of IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 and epidermal growth factor on human breast stromal cells in primary culture. *Breast Cancer Res. Treat.* 84(2), 77-84.

Sturgeon, S. R., Potischman, N., Malone, K. E., Dorgan, J. F., Daling, J., Scharier, C., Brinton, L. A. (2004) Serum levels of sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women. *Cancer Causes Control* 15, 45-53.

Todorovič-Rakovič, N., Neškovič- Konstantinovič, Z., Nikolič-Vukosavljevič, D. (2006) *Arch. Oncol.* 14, 146-50.

Turgeon, J. L., Carr, M. C., Maki, P. M., Mendelson, M. E., Wise, P. M. (2006) Complex action of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Inside from basic science and clinical studies. *Endocrine Reviews* 9, 202- 256.

Varma, H., Conrad, S. E. (2002) Antiestrogen ICI 182,780 decreases proliferation of insulin-like growth factor 1 treated MCF-7 cells without inhibiting IGF-1 signaling. *Cancer Res.* 62(14), 3985-91.

Vogel, C., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press, M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as single agent first-line treatment of HER 2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical oncology* 3, 719-726.

Wong, S. F., Reimann, K., Lai, L. C. (2001) Effect of transforming growth factor-beta1, insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-2 on cell growth and oestrogen metabolism in human breast cancer cell lines. *Pathology* 33(4), 454-9.

Yamauchi, H., Hayes, D. F. (2007) HER-2 and predicting response to therapy in breast cancer. *UpToDate*, August 2007.

Yamauchi, H., Stearns, V., Hayes, D. F. (2001) When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 9, 2334-2356.

Yarden, Z., Slivkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 127-137.

Yasumura, T., Akami, T., Mitsuo, M., Oka, T., Naitoh, K., Yamamoto, T., Honjo, H., Okada, H. (1990) The effect of adjuvant therapy with or without tamoxifen on the endocrine function of patients with breast cancer. *Jpn. J. Surg* 20, 369-375.

Yu, H., Rohan, T. (2001) The role of insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *JNCI* 92, 1472-1489.

Yu, H., Shu, X. O., Li, B. D. Dai, Q., Gao, Y. T., Jin, F., Zheng, W. (2003) Joint effect of insulin-like growth factors and sex steroids on breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12(10), 1067-73.

9. Přílohy:

Pribylova O., Springer D., Svobodnik A., Kyr M., Zima T., Petruzelka L.
Influence of chemotherapy to hormonal levels in postmenopausal breast cancer patients
Neoplasma 2008, 55, 4, 294 - 298
IF 0,648

Pribylova O., Springer D., Vítková I., Zima T., Petruzelka L.
HER-2 tissue expression correlated with serum levels in breast cancer patients
Folia Biologica, 2007, 53, 129-133
IF 0,493