

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE



Lékařská fakulta v Plzni

MUDr. Monika Černá

STANOVENÍ PERIOPERAČNÍCH
PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ KARCINOMU
MLÉČNÉ ŽLÁZY

Doktorandská disertační práce

Chirurgická klinika FN a LF v Plzni

Plzeň 2012

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Plzni



MUDr. Monika Černá

Školitel: prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.

STANOVENÍ PERIOPERAČNÍCH
PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ KARCINOMU
MLÉČNÉ ŽLÁZY

Doktorandská disertační práce

Chirurgická klinika FN a LF v Plzni

Plzeň 2012

Obsah

1. Souhrn	- 6 -
2. Summary	- 9 -
3. Předmluva	- 12 -
4. Poděkování.....	- 13 -
5. Přehled použitých symbolů a zkratek.....	- 14 -
6. Nádorová onemocnění mléčné žlázy	- 16 -
6.1 Benigní nádory.....	- 16 -
6.2 Maligní nádory.....	- 17 -
7. Karcinom prsu.....	- 17 -
7.1 Incidence, mortalita.....	- 17 -
7.2 Etiologie.....	- 19 -
7.3 Patogeneze nádorového onemocnění	- 19 -
7.4 Symptomatologie a diagnostika	- 25 -
7.5 TNM klasifikace a stádia nádorového onemocnění	- 28 -
7.6 Typy karcinomu prsu	- 30 -
7.6.1 Karcinomy in situ.....	- 30 -
7.6.2 Invazivní karcinomy.....	- 31 -
7.6.3 Méně obvyklé formy karcinomu prsu	- 32 -
7.7 Léčba karcinomu prsu, biopsie sentinelové uzliny, pooperační komplikace	- 35 -
7.7.1 Chirurgická léčba	- 35 -
7.7.2 Radioterapie	- 39 -
7.7.3 Systémová léčba.....	- 40 -
7.8 Prognostické faktory	- 46 -
7.9 Genetický karcinom	- 47 -

8.	Lokální a regionální recidivy, vzdálené metastázy	- 49 -
8.1	Lokální a regionální recidivy	- 49 -
8.2	Vzdálené metastázy.....	- 50 -
9.	Nádorové markery.....	- 52 -
9.1	Nádorové markery, rozdělení a jejich klinický význam.....	- 52 -
9.2	Biologie nádorových markerů.....	- 53 -
9.3	Indikace a interpretace výsledků	- 55 -
9.4	Nádorové markery a karcinom prsu	- 57 -
9.4.1	Specifický marker karcinomu prsu (CA 15-3).....	- 57 -
9.4.2	Karcinoembryonální antigen (CEA).....	- 58 -
9.4.3	Thymidinkináza (TK).....	- 58 -
9.4.4	Tkáňový polypeptidický antigen (TPA).....	- 59 -
9.4.5	MonoTotal.....	- 60 -
10.	Růstové faktory	- 61 -
10.1	Obecná charakteristika	- 61 -
10.2	Jednotlivé růstové faktory a jejich uplatnění v nádorovém procesu	- 63 -
10.2.1	EGF = epidermal growth factor = epidermální růstový faktor.....	- 63 -
10.2.2	VEGF = vascular endothelial growth factor = vaskulární endoteliální růstový faktor	- 63 -
10.2.3	HGF = hepatocyte growth factor = hepatocytární růstový faktor	- 64 -
10.2.4	IGF = insulin-like growth factor = inzulinu podobný růstový faktor.....	- 65 -
10.2.5	Leptin	- 65 -
10.2.6	TGF = transforming growth factors = transformující růstové faktory	- 66 -
11.	Pracovní hypotéza	- 68 -
12.	Cíle dizertační práce.....	- 69 -
13.	Materiál a metodika.....	- 71 -
13.1	Chirurgická složka vědecké práce.....	- 73 -

13.2	Metodika laboratorního zpracování vzorků	- 74 -
13.3	Metodika histologického zpracování	- 75 -
13.4	Metodika statistického zhodnocení, užití analýzy	- 77 -
13.5	Popis souboru nemocných.....	- 77 -
14.	Výsledky	- 80 -
15.	Diskuze.....	- 112 -
16.	Význam vědecké práce pro klinickou praxi	- 126 -
17.	Závěry	- 128 -
18.	Literatura.....	- 130 -
19.	Publikační a prezentační činnost autora	- 148 -
20.	Přílohy	- 152 -
20.1	Příloha 1 - Informovaný souhlas pacienta s klinickou studií	- 152 -
20.2	Příloha 2 – Přehledný seznam obrázků	- 153 -
20.3	Příloha 3 – Přehledný seznam tabulek	- 155 -

1. Souhrn

Úvod:

Karcinom prsu zůstává stále nejčastějším maligním onemocněním žen s pomalu narůstající incidencí. Díky moderním diagnostickým metodám, mammárnímu screeningu, komplexní a cílené onkologické léčbě se v posledních 10 letech podařilo výrazně snížit mortalitu. Moderní diagnostické možnosti dovolují nejen časnou diagnostiku primární nádorové léze, přesné určení její biologické povahy před zahájením léčby, ale taktéž dovolují časnou diagnostiku lokálních i regionálních recidiv včetně diagnostiky metastatických ložisek ve vzdálených orgánech.

Kromě klinického vyšetření, konvenčních i doplňkových zobrazovacích vyšetření a vyšetření nádorových markerů bylo naším cílem stanovit význam a využití růstových faktorů ve vztahu k celkové prognóze. Fyziologicky se uplatňují již v době ontogenetické v řízení buněčného růstu, proliferačních, diferenciacních a apoptotických procesů. Je známé, že svou roli hrají i v procesech nádorového bujení, jenž je charakteristické autonomním chováním, zvýšenou proliferační aktivitou, odlišnou diferenciacní aktivitou a sníženou apoptózou. Růstové faktory se v nádorovém procesu uplatňují jako autoregulační faktory i svým parakrinním působením prostřednictvím více či méně specifických receptorů.

Cíl práce:

Naším cílem bylo stanovit takové růstové faktory, které by byly využitelné v předléčebné diagnostické fázi k určení rizika pacientky stran progresu onemocnění a dlouhodobého přežití.

Materiál a metodika:

Výzkumný projekt probíhal od ledna 2008 do prosince 2011. Jednalo se o prospektivní nerandomizovanou studii, která zahrnovala ve zkoumané skupině pacientky s primárně chirurgicky léčeným karcinomem mléčné žlázy, v kontrolní skupině pacientky operované pro benigní lézi.

Pacientky zkoumaného souboru byly podle klinického stádia nemoci rozděleny do 3 podskupin: G1 – klinické stádium I, G2 – klinické stádium IIa, G3 – klinická stádia IIb a III. U

všech nemocných byly odebírány krevní vzorky těsně před operací a 9. pooperační den. Ze vzorků byly stanoveny hladiny vybraných růstových faktorů (RF) – IGF-1, IGFBP-3, Leptin, HGF, EGF, TGF, VEGF a hladiny nádorových markerů (NM) – CA 15-3, CEA, TK, TPA a MonoTotal. Výsledky byly statisticky zpracovány a hodnoceny rozdíly mezi jednotlivými podskupinami, stanoveny prognosticky využitelné RF a NM ve vztahu k přežití bez nádorové recidivy (DFI) a celkovému přežití (OS). Pro vybranou skupinu pacientek s maligním onemocněním byly provedeny korelace s anamnestickými rizikovými faktory a nepříznivými prognostickými faktory nádoru. Porovnáním předoperačních hodnot ve zkoumané a kontrolní skupině bylo naším cílem stanovit takovou hodnotu RF a NM, která by mohla pomoci v primární, resp. diferenciální diagnostice.

Výsledky:

Do studie bylo zařazeno 98 nemocných s maligním onemocněním, v podskupině G1- 54 pacientek, v podskupině G2 - 25 pacientek a v podskupině G3 - 19 pacientek. Kontrolní skupina čítala 25 nemocných. Celkově u 13 nemocných došlo k progresi nádorového onemocnění, 10 pacientek zemřelo.

Testování mezi podskupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly v gradingu tumoru, expresi estrogenových receptorů a proliferační aktivitě vždy ve prospěch nepříznivých faktorů pro podskupinu G3. Významně vyšší četnosti u lokálně pokročilých nádorů byly prokázány u negativity progesteronových receptorů, amplifikace HER2 genu, onkologické pozitivitu včetně karcinomu mléčné žlázy v rodinné anamnéze, BMI>30, nullipar a nekojících pacientek a žen s klimakteriem po 50. roce věku.

Mezi skupinovým testováním byl zaznamenán výrazně kratší DFI i OS v podskupině G3, pro niž byly dále hodnoceny předoperační i časné pooperační hladiny RF a NM. Stran DFI představuje zvýšené riziko elevace MonoTotalu, Leptinu, HGF, CA15-3, TK, TPA a CEA, resp. MonoTotalu, HGF, VEGF, TK a TPA předoperačně, resp. pooperačně. Ve vztahu k OS představují riziko zvýšené hodnoty MonoTotal, HGF, VEGF, CA 15-3, TK a TPA, resp. MonoTotalu, HGF, VEGF, TK a TPA předoperačně, resp. pooperačně. Nepříznivými prognostickými faktory pro celkové přežití byly zjištěny předoperačně nižší hodnoty TGF a EGF. Pro IGF1, IGFBP-3, pooperačně pro Leptin, CEA, TGF a EGF se nepodařilo prokázat jejich prognostický význam. Korelacemi s prognosticky využitelnými RF a NM byla zjištěna spojitost s onkologickou pozitivitou rodinné i osobní anamnézy, hormonoterapií včetně hormonální antikoncepce, obezitou, kouřením, výskytem karcinomu pod 40. rokem věku, 1.

porodem po 30. roce věku, klimakteriem po 50. roce věku. Stran nádoru byla zjištěna korelace s amplifikací HER2 genu a negativitou estrogenových receptorů. U časných karcinomů (podskupina G1 a G2) vzhledem k nízkému počtu událostí (progrese, úmrtí) nebyl vztah předoperačních ani časných pooperačních hladin RF a NM k prognóze nemocných statisticky hodnotitelný.

Porovnáním předoperačních hodnot RF a NM mezi zkoumanou a kontrolní skupinou se nepodařilo najít takovou hodnotu, která by determinovala biologickou povahu léze.

Závěr:

Předoperační a časné pooperační hodnoty TK, TPA, Monototalu , HGF a předoperační hodnota CA 15-3 jsou významnými prognostickými faktory progrese onemocnění i celkového přežití, perioperační stanovení VEGF je významným prognostickým ukazatelem celkového přežití u lokálně pokročilých nádorů prsu. S přihlédnutím k dalším rizikovým faktorů selektují již v době stanovení diagnózy „rizikovější“ skupinu nemocných. Domníváme se proto, že zlepšení prognózy pro tyto pacientky by mohla přinést neoadjuvantní personalizovaná onkologická léčba a zintenzivnění dispenzární péče.

Klíčová slova:

karcinom prsu – prognostické faktory – růstové faktory – nádorové markery – bezpříznakový interval – celkové přežití – dispenzarizace

2. Summary

Introduction:

Breast cancer still remains the most common malignancy in women and its incidence is slowly increasing. A marked reduction of mortality has been achieved in the last 10 years thanks to modern diagnostic methods, mammary screening, and comprehensive and targeted cancer therapy. Modern diagnostic capabilities not only allow early diagnosis of a primary tumor lesion and precise determination of its biological nature before commencing treatment, but they also enable early diagnosis of local and regional recidives, including diagnosis of metastases in distant organs.

In addition to clinical examination, conventional and complementary imaging examinations and tumor markers our objective was to determine the importance and use of growth factors in relation to the overall prognosis. The growth factors physiologically act already during the ontogenetic period when they control cell growth, proliferation, differentiation and apoptotic processes. It is known that they take part in the tumor growth processes which are characterized by autonomous behavior, increased proliferative activity, distinct differentiation activity and reduced apoptosis. Growth factors work as autoregulation factors in the neoplastic process as well as through their paracrine effects mediated by more or less specific receptors.

Objective of the study:

Our goal was to determine such growth factors that would be useful in the pre-treatment diagnostic phase to determine the risk for a female-patient related to progression of the disease and long-term survival.

Material and methods:

The research project was conducted from January 2008 to December 2011. It was a prospective, non-randomized study that included female-patients with primarily surgically treated breast cancer in the study group, and those who underwent surgery due to a benign lesion in the control group.

The female-patients from the studied cohort were divided into 3 subgroups based on the clinical status: G1 - clinical stage I, G2 - clinical stage IIa, G3 - clinical stage IIb and III. Blood samples were taken immediately before the surgery and on Day 9 following the surgery in all

patients. The samples were tested for the levels of the selected growth factors (GF) – IGF-1, IGFBP-3, Leptin, HGF, EGF, TGF, VEGF levels and tumor markers (TM) - CA 15-3, CEA, TK, TPA and MonoTotal. The results were statistically analyzed, differences between the single subgroups were evaluated, and the GF and TM with a predictive value in relation to disease free interval (DFI) and overall survival (OS) were determined. Correlations with anamnestic risk factors and adverse prognostic tumor factors were performed for a selected group of female-patients with a malignant disease. By comparing the preoperative values in the studied and control group we focused on determination of a value of GF and TM that could help in primary or differential diagnosis.

Results:

The study included 98 patients with a malignant disease, 54 in the G1 subgroup, 25 in the G2 subgroup, and 19 patients in the G3 subgroup. The control group consisted of 25 patients. Overall, 13 patients experienced progression of cancer and 10 patients died.

Testing between the subgroups found statistically significant differences in tumor grading, expression of estrogen receptors and proliferative activity always in favor of the unfavorable factors for the G3 subgroup. Significantly higher frequencies in locally advanced tumors were found in progesterone receptor negativity, amplification of the HER2 gene, oncological positivity including family history of breast cancer, BMI > 30, in nulliparae and female-patients who do not breastfeed and women with menopause after 50 years of age.

A significantly shorter DFI and OS was found in the group testing for the G3 subgroup, in which the pre-operative and early post-operative levels of GF and TM were further evaluated. As for DFI, an increased risk is indicated by elevation of MonoTotal, Leptin, HGF, CA15-3, TK, TPA and CEA, and by elevation of MonoTotal, HGF, VEGF, TK and TPA, preoperatively and postoperatively, respectively. In relation to OS a risk is indicated by elevated MonoTotal, HGF, VEGF, CA 15-3, TK and TPA, and by elevated MonoTotal, HGF, VEGF, TK and TPA, pre-operatively and post-operatively, respectively. Pre-operatively reduced levels of TGF and EGF were found to be adverse prognostic factors of overall survival. We failed to prove any prognostic importance for IGF-1, IGFBP-3, and postoperatively for Leptin, CEA, TGF and EGF as well. Correlations with the prognostic usable GF and TM found association with oncological positive family and personal history, hormone therapy, including hormonal contraception, obesity, smoking and cancer incidence below the 40 years of age, first delivery after 30 years of age and menopause after 50 years of age. With regard to cancer we found a correlation with

HER2 gene amplification and estrogen receptor negativity. For early cancers (subgroup G1 and G2) a relation between pre-operative and early the post-operative GF and TM levels and prognosis of patients was not statistically assessable.

By comparing the preoperative values of GF and TM between the studied and control group we failed to find a value that would determine a biological nature of the lesion.

Conclusion:

Pre-operative and early post-operative values of TK, TPA, Monototal, HGF, and pre-operative CA 15-3 value are important prognostic factors for disease progression and overall survival, while a perioperative determination of VEGF is an important prognostic indicator of overall survival in locally advanced breast cancer. When considering other risk factors they can select a "more risky" group of patients at the time of diagnosis. Therefore, we believe that neoadjuvant personalized oncological therapy and intensification of dispensarization care could provide improvement of prognosis for female-patients.

Keywords:

breast cancer - prognostic factors - growth factors - tumor markers – disease free interval - overall survival - dispensarization

3. Předmluva

Autorka dizertační práce prohlašuje, že práci vyhotovila samostatně a práce nebyla využita k získání jiného ani stejného titulu. Všechny použité prameny a literární zdroje jsou řádně citovány a jejich seznam je uveden v seznamu použité literatury.

Souhlasím se zapůjčením disertační práce pro vědecké a pedagogické účely

V Plzni dne 10.3.2012

MUDr. Monika Černá

4. Poděkování

Ráda bych poděkovala všem osobám, kteří přispěli ke vzniku této práce. Jmenovitě a zejména svému školiteli prof. MUDr. Vladislavovi Třeškovi, DrSc. za poskytnutí zajímavého tématu k vědecké práci, systematické odborné vedení, poskytnutí svých znalostí i praktických zkušeností v průběhu celého studia a podnětných připomínek při vypracování dizertační práce. Velké poděkování zasluhuje celý kolektiv lékařských i nelékařských pracovníků bioptické laboratoře Šiklova patologicko-anatomického ústavu FN v Plzni pod vedením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D a Oddělení imunoanalýzy FN v Plzni pod vedením prof. MUDr. Ondřeje Topolčana, CSc. Další poděkování zasluhuje celá mammologická skupina Chirurgické kliniky FN v Plzni, která se podílela na sběru klinických dat, operativě a dispenzární péči o nemocné, sesterskému kolektivu Chirurgické kliniky, který zajišťoval odběr biologického materiálu. Za pomoc při statistickým zpracování náleží zvláštní poděkování ing. Stanislavovi Kormundovi. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i své rodině a přátelům, zejména za jejich trpělivost a psychickou podporu.

5. Přehled použitých symbolů a zkratek

BMI	body mass index
BP	binding proteins - vazebné proteiny
BRCA 1	gen breast cancer 1
BRCA 2	gen breast cancer 2
CA 15-3	specifický marker karcinomu prsu
CEA	karcinoembryonální antigen
CT	počítačová tomografie
DCIS	duktální karcinom in situ
DFI	disease free interval (přežití bez progresu onemocnění)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermal growth factor = epidermální růstový faktor
EGFR	skupina receptorů pro epidermální růstový faktor
ER	estrogenový receptor(y)
FGF	fibroblast growth factor = fibroblastový růstový faktor
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FNA	fine-needle aspiration = biopsie tenkou jehlou
GF	growth factor(s) = růstový faktor(y)
GIST	gastrointestinální stromální tumor
HATK	hormonální antikoncepce
HDL	high-density lipoprotein
HGF	hepatocyte growth factor = hepatocytární růstový faktor
HIF	hypoxia inducible factor
HT	hormonální léčba
CHT	chemoterapie
IDCa	invazivní ductální karcinom
IGF1	insulin-like growth factor = inzulínu podobný růstový faktor
IGF-BP3	insulin-like growth factor binding protein 3 = vazebný protein IGF
ILCa	invazivní lobulární karcinom
LCIS	lobulární karcinom in situ
LDL	low-density lipoprotein
LHRH	luteinising-hormone realising hormon (též GnRH = gonadotropiny uvolňující hormon)
MFC	fibrózně cystická mastopatie
MIB1	mitotická aktivita
MMP	matrix metalloproteases = metaloproteázy
MoAb	monoklonární protilátka
MRI	magnetická rezonance
mTOR	mammalian target of rapamycin
NM	nádorový marker(y)

NPI	Nottingham prognostic index
OA	osobní anamnéza
OS	overall survival (celkové přežití)
PARP	poly ADP-ribose polymerase
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor = endotelový destičkový faktor
PDGF	platelet-derived growth factor
PET	pozitronová emisní tomografie
PET/CT	fúze výsledků pozitronové emisní tomografie a počítačové tomografie
PF-4	platelet factor 4 = destičkový faktor 4)
PI3K/Akt	fosfatidylinositol-3-kináza/protein Akt
PR	progesteronový receptor(y)
RA	rodinná anamnéza
RF	růstový faktor(y)
RNA	ribonukleová kyselina
RT	radioterapie
RTG	rentgen
TGF	transforming growth factor = transformující růstový faktor
TIMPs	tissue inhibitors metalloproteases = inhibitory metaloproteáz
TK	thymidinkináza
TM	tumor marker(s) = nádorový marker(y)
TNF α	tumor necrosis factor = faktor nekrotizující nádory
TNM	mezinárodní klasifikace zhoubných novotvarů
TPA	tkáňový polypeptidový antigen
USG	ultrasonografie
VEGF	vascular endothelial growth factor = vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální faktor

6. Nádorová onemocnění mléčné žlázy

6.1 Benigní nádory

Mezi zcela benigní nádory prsu jsou řazeny dvě nosologické jednotky – intraduktální papilom a fibroadenom.

Intraduktální papilom je epiteliální nádor, který je lokalizován pod areolou v sinus lactiferus. Jeho hlavním klinickým projevem je krvavá sekrece z bradavky. Mezi základní diagnostické metody patří biochemické a cytologické vyšetření sekretu a RTG – duktografie. Z léčebné strategie u mladých žen je možné provést po nasondování ductu tzv. cílenou mikrodochektomii. Nicméně při krvavém sekretu z bradavky dáváme spíše přednost chirurgické excizi z centra prsu s řádnou histologickou verifikací pro možnost maligního zvratu, který je dle literárních zdrojů popisován až v 10%.

Fibroadenom je pouzdřený, solidní, dobře ohraničený nádor, který se vyskytuje převážně u mladých dívek a žen do 30. roku věku. Může se vyskytovat solitárně nebo být vícečetný i s postižením obou mléčných žláz (tzv. fibromatóza). U mladých dívek s malým nádorem je možný konzervativní postup s pečlivou dispenzarizací, k chirurgické exstirpaci přistupujeme tehdy, pokud dochází ke zvětšování nádoru, na přání nemocné a u žen starších 35 let bychom měli provádět exstirpaci fibroadenomů vždy.

Na pomyslné hranici mezi benigními a maligními nádory stojí *fyloidní nádory*, které jsou typicky laločnatého tvaru, charakteristické 2fázovým růstem - zpočátku pomalý a plíživý růst se zvratem v rychlou progresi - dorůstající do obrovských rozměrů a mohou vytvářet až bizarní tvary. Nezřídka vyplní celou mléčnou žlázu a jejich zrádnost spočívá v tom, že velice často recidivují, s každou další recidivou se zvyšuje riziko vzniku biologicky nepříznivého nádoru a až ve 20% mohou přecházet v maligní formu [84]. Jejich léčba je vždy chirurgická, avšak často si vzhledem ke svému rozsahu či maligní transformaci vyžádají mastektomii [10].

6.2 Maligní nádory

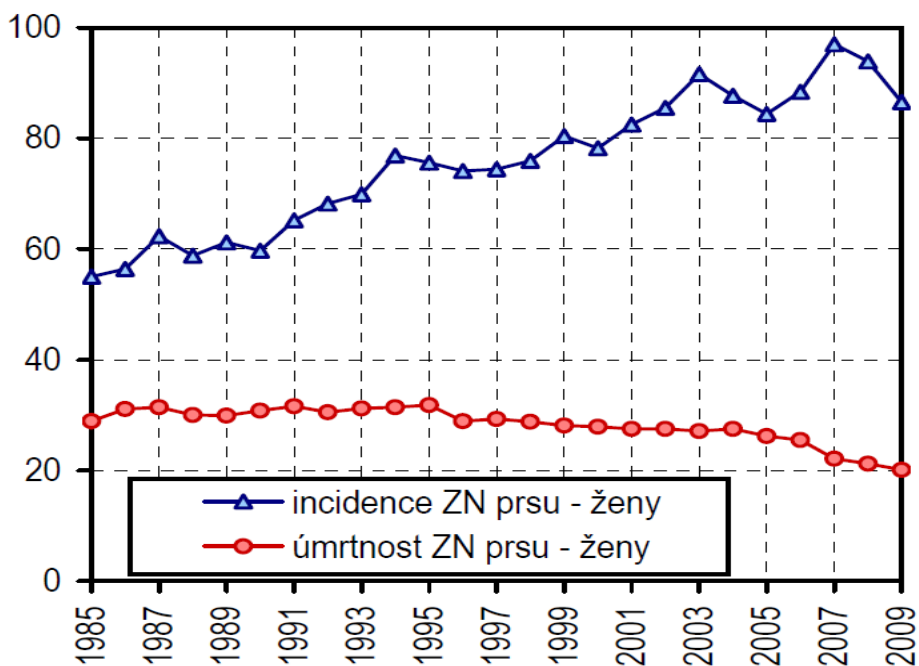
Do skupiny maligních nádorů řadíme různé histologické varianty invazivního karcinomu prsu a neinvazivní formy karcinomu mléčné žlázy.

7. Karcinom prsu

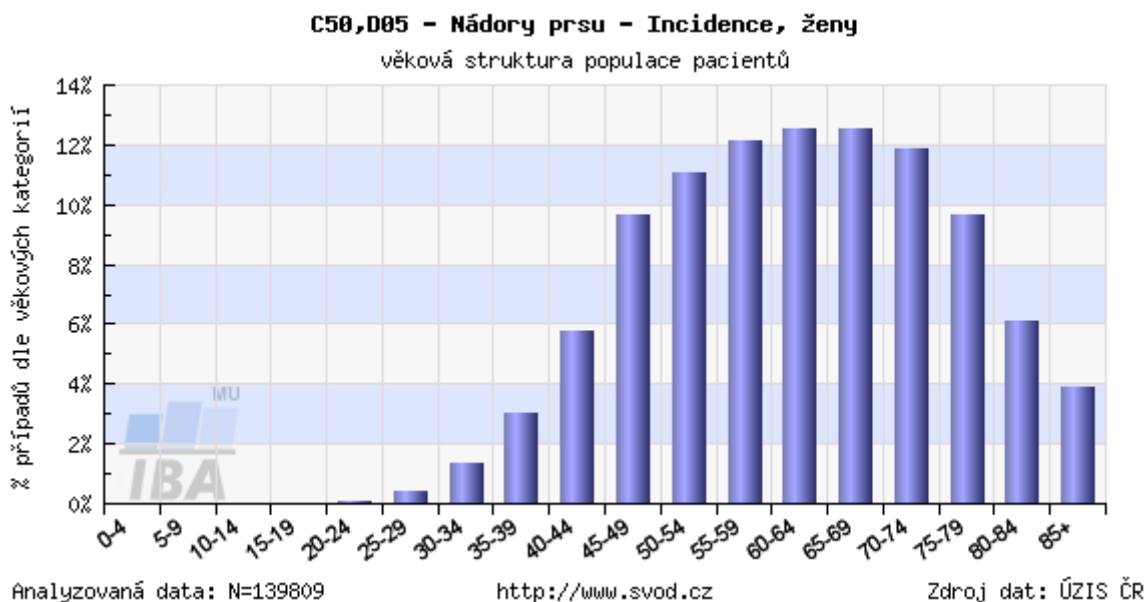
7.1 Incidence, mortalita

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným novotvarem u žen a v roce 2009 představoval 16% všech nově diagnostikovaných malignit v ženské populaci. Trend incidence je v celém sledovaném období setrvale rostoucí, prudký nárůst byl zaznamenán po roce 2003 v souvislosti se zavedením plošného mammárního screeningu. V roce 2005 dosáhl počet nově diagnostikovaných nádorů prsu u žen počtu 5 533, v roce 2009 počtu 5 975, což představuje v přepočtu 111,9 nádorů na 100 tisíc žen [186]. V současné době karcinom prsu představuje ¼ všech maligních novotvarů u žen, postihuje asi 6% ženské populace a přestože je jeho léčba zejména v raných stádiích velmi úspěšná, představuje nejčastější onkologickou příčinu úmrtí u žen [136]. Vysoká incidence nádorů prsu je pozorována ve všech vyspělých zemích světa, především v zemích severní a západní Evropy a severní Ameriky. Česká republika zaujímá ve srovnání s ostatními zeměmi světa 23. místo v počtu nově diagnostikovaných nádorů na 100 tis. žen, ve srovnání s evropskými zeměmi pak 17. místo. Incidence nádorů prudce stoupá do 40. roce věku, maximální výskyt tohoto onemocnění je kolem 65. roku ženy, u vyšších věkových skupin lze hovořit spíše o stagnaci (Obrázek 2).

Obrázek 1 - Incidence a mortalita karcinomu prsu (převzato z ÚZIS) [186]



Obrázek 2 – Rozložení karcinomu prsu dle věkových kategorií (převzato z www.svod.cz) [136]



Dle Obrázku 1 stojí proti křivce incidence křivka mortality, která vykazuje v posledních 10 letech spíše klesající trend, na němž se spolupodílejí zlepšující se diagnostické i léčebné možnosti. Zavedením mammárního screeningu se sice zvýšil počet nově diagnostikovaných nádorů, ale podíváme-li se na ně z hlediska pokročilosti, došlo k výraznému posunu do časných a preinvazivních nádorů, které lze nejen radikálně léčit, ale i zcela vyléčit. Na straně druhé stojí multimodální moderní léčebné možnosti včetně možností léčby diseminovaného nádorového onemocnění [48].

7.2 Etiologie

Etiologie karcinomu prsu stejně jako u zhoubných nádorů jiných orgánů není známá, přesto existují rizikové faktory, o nichž je prokázáno, že zvyšují relativní riziko rakoviny prsu. Jsou to především pozitivní rodinná anamnéza, výskyt karcinomu prsu v předchorobí, délka menoaktivního období (menarche-klimakterium), nulliparita, dlouhodobé užívání estrogenů, ozařování hrudníku v mladém věku, proliferační mastopatie (hyperplazie a buněčné atypie, mikrokalciifikace), demografické faktory, strava bohatá na tuky a s ní související obezita, zvýšená konzumace alkoholu, kouření.

7.3 Patogeneze nádorového onemocnění

Nádorové onemocnění je obecně charakterizováno jako neregulovaný růst buněk autonomní povahy s poruchou regulačních mechanismů buněčné proliferace, alterací buněčné diference a inhibicí apoptózy. Dnes je nádorové onemocnění chápáno jako genetické onemocnění, kdy za vznik mutací jsou zodpovědné četné zevní faktory, tzv. mutageny. Při expozici různým mutagenům vznikají chybné geny, jejichž produkty negativně zasahují do normálně probíhajícího buněčného cyklu a nejsou-li tyto geny reparačními mechanismy eliminovány či opraveny, je nastartován složitý proces kancerogeneze.

Stručně lze tento proces shrnout do 5 etap. Zahájení procesu (*iniciace*) nastává účinkem zevních nebo vnitřních faktorů vedoucí ke genetické poruše. Spoluúčastí dalších podnětů se

objevují poruchy diferenciacie (*promoce*) a klinicky se objevují preinvazivní formy nádorů, tzv. *in situ*. Pokračuje-li proces dále, dochází ke změně fenotypu buněk a vzniká maligní klon (*transformace*). Transformované buňky ztrácejí schopnost odpovědi na regulační mechanismy, dochází k lokálnímu růstu (*progrese*) a posléze šíření nádorových buněk mimo primární ložisko (*metastazování*) [148].

Faktory fungující jako spouštěcí jsou označovány jako kancerogenní faktory, zevní nebo vnitřní. Podle povahy je lze rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Jejich společnými vlastnostmi jsou aktivace onkogenů a inaktivace antionkogenů. Od faktorů, které jsou schopny vyvolat genetickou změnu je potřeba odlišit tzv. pomocné faktory (kokarcinogeny), které nemají schopnost působit genetické změny, ale existující změny prohlubují.

Onkogeny jsou patologicky alterované normální geny, jejichž proteinové produkty působí transformaci buňky, tj. jsou zodpovědné za transformaci zdravého fenotypu buňky v nádorový. Vznikají z normálních genů (protoonkogenů), které za fyziologických okolností kontrolují růst, proliferaci a diferenciaci. Alterované protoonkogeny produkují proteiny, které si zachovávají svou základní funkci, ale jsou produkovány buď v nadměrném množství (kvantitativní změna) nebo jsou kvalitativně odlišné a jeví zvýšenou aktivitu. Onkogeny lze rozdělit podle charakteru regulačních pochodů, které onkoprotein ovlivňuje, na onkogeny kódující růstové faktory, onkogeny kódující receptory pro růstové faktory (HER2-neu, Met), onkogeny kódující nerekceptorové kinázy (Ras), onkogeny kódující faktory intracelulární signalizace, onkogeny kódující transkripční faktory a onkogeny kódující regulační faktory apoptózy (protein p53) [11,148].

Antionkogeny, také nádor supresorové geny, prostřednictvím svých produktů omezují buněčnou proliferaci a transformaci. Nejznámějšími zástupci této skupiny v souvislosti s karcinomem prsu jsou geny BReast CAncer 1 a 2 (BRCA 1 a BRCA 2), jejichž mutace je zodpovědná za vznik hereditárního karcinomu mléčné žlázy.

Geny kódující opravné systémy jsou přítomny ve všech buňkách, kde probíhá replikace DNA. Jejich produkty zajišťují opravy chyb DNA, které vznikají v průběhu replikace. Na rozdíl od antionkogenů mají spíše pasivní funkci, nicméně jejich porucha usnadňuje maligní transformaci [11].

Genetické změny v uvedených protoonkogenech spočívají v mutacích, které vznikají na podkladě záměny jejich bazí (bodová mutace), ztráty genetického materiálu (delece), přidání genetického materiálu (inzerce), dvojitého zlomu a rotace v témž chromozómu (inverze), vzniku hybridního genu (translokace) nebo zmnožení genetického materiálu se zvýšenou produkcí funkčně normálního proteinu (amplifikace) [148].

Vznik mutací v tumor-supresorových genech a opravných genech jsou častým nálezem u sporadických nádorů. Zárodečné mutace v těchto genech jsou zodpovědné za vznik dědičných nádorových syndromů. Dědičná nádorová onemocnění představují 1-5% všech zhoubných nádorů. Nemocní s pozitivní rodinou anamnézou zasluhující mimořádnou péči, cytogenetické vyšetření a při pozitivním nálezu intenzivní sledování případně profylaktický léčebný přístup.

Podstatou vlastního nádorového růstu je proliferace, která se vymkla zákonitostem zdravé tkáně. Růst nádoru je stimulován produkty onkogenů, zejména růstovými faktory, membránovými receptory pro růstové faktory a transformujícími intracelulárními proteiny (zvláště tyrozinkinázami). Na počátku vzniku nádoru je charakteristické zkrácení buněčného cyklu a účastní-li se proliferace všechny buňky, během jednoho buněčného cyklu zdvojnásobí svůj počet. Tento rychlý exponenciální způsob růstu nádoru se postupně zpomaluje v nepřímé úměrnosti k velikosti nádoru. Příčinami zpomalení buněčného cyklu je jednak nedostatek nutričních faktorů, přechod buněk do klidové fáze buněčného cyklu a úbytek buněk v důsledku nekrózy, migrace a apoptózy. V průběhu růstu nádoru dochází k mutacím zodpovědným za vznik nových klonů, které mají zpravidla větší proliferační aktivitu, postupně získávají v nádorové mase převahu, mají výraznější tendenci k metastazování a jejich odpověď na protinádorovou léčbu je omezená. Vzniká nový fenotyp nádorových buněk charakterizovaný zvýšenou produkcí angiogenních působků, jenž zahájí proces patologické angiogeneze. Tato změna je označována jako „angienní switch“ [148].

Paralelně s nárůstem buněčné populace dochází k tvorbě nádorového stromatu, jehož podstatou je plasminogen, fibrinogen a další koagulační faktory, které pronikají z cév při zvýšené permeabilitě, za kterou je zodpovědný VEGF uvolňovaný z nádorových buněk. Proliferace nádorových buněk a růst nádoru jsou podmíněny vhodným mikroprostředím, které je rovněž zodpovědné za lokální migraci buněk, posléze do cév a metastazování. V tomto procesu hraje klíčovou roli skupina enzymů - metaloproteázy (MMP = matrix metalloprotease) – vznikající ve stromálních buňkách jako odpověď na přítomnost nádorových buněk. MMP se významně uplatňují v procesech metastazování a angiogeneze. Za fyziologických okolností je

jejich aktivita tlumena inhibitory (TIMPs = tissue inhibitors of metalloproteases), ale za patologických okolností je exprese MMP zvýšena a koreluje s progresí nádoru [140,141,148].

Metastazování je charakteristická vlastnost zhoubných nádorů a pod jejím pojmem se rozumí šíření nádorových buněk do míst vzdálených primárnímu ložisku. Metastatický proces probíhá ve 4 etapách a je výsledkem porušené rovnováhy mezi aktivačními a inhibičními faktory. První etapou je invaze nádoru do okolí, kdy dochází k přilnutí nádorové buňky k bazální membráně pomocí integrinů. Ztrátou vzájemné adherence buněk (působí E-cadherin) a enzymatickým narušením bazální membrány (metalo proteázy) dochází k pronikání nádorových buněk přes bazální membránu, což je podstatou migrace buněk do krevních a lymfatických cév. Z parakrinních faktorů usnadňuje migraci nádorových buněk HGF. Druhou fází představuje transport nádorových buněk lymfatickým či krevním řečištěm. Zde může být jejich transport zpomalen v mízních uzlinách, vyvolaná imunitní reakce je příčinou zvětšení uzliny. Ani přítomnost cirkulující nádorových buněk neznamena ještě vznik vzdálených metastáz. Nádorové buňky se snaží organismus eliminovat pomocí imunologických mechanismů. Třetí etapou je nidace nádorových buněk a jejich průnik do nové tkáně. V této fázi odolávající nádorové buňky vytváření s trombocyty mikrotromby a na úrovni mikrocirkulace se uchyť v parenchymatózních orgánech v místech poškozeného endotelu za pomoci adhezivních molekul. Vlastní trombocyty produkují růstový faktor destiček stimulující proliferaci nádorových buněk mikrometastázy. Poslední fází je růst metastázy v novém prostředí, jenž je zajištěna přítomností růstových (proliferčních) faktorů ovšem za podmínky dostatečného přísunu kyslíku zajištěného cestou novotvořených cév [26,74].

Novotvorba cév je zásadní proces nezbytný pro růst nádorů. Za fyziologických okolností se jedná o proces, který je udržován v rovnováze působením angiogenních a antiangiogenních faktorů. Převaha angiogenních faktorů je zodpovědná za fibroproliferční pochody a uplatňují se zejména v patogenezi revmatoidní artritidy a chronických zánětů. Při převaze antiangiogenních faktorů dochází k poruchám hojení ran a kostí. Angiogeneze je vícestupňový proces, při kterém dochází disoluci bazální membrány, aktivaci endotelií, migraci a proliferaci endotelových buněk, vytvářející pupeny na stávajících cévách. Vytráváním nových endotelových buněk a tvorbou lumen vzniká nová céva schopna krevního transportu. Mezi nejdůležitější angiogenní faktory patří (Tabulka 1): FGF (fibroblast growth factor = fibroblastový růstový faktor), VEGF (vascular endothelial growth factor = endotelový růstový faktor), TNF α (tumor necrosis factor = faktor nekrotizující nádory), MMP (matrix metalloproteases = metalo proteázy), PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor =

endotelový destičkový faktor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF α (transforming growth factor = transformující růstový faktor), EGF (epidermal growth factor = epidermální růstový faktor), HGF (hepatocyte growth factor = hepatocytární růstový faktor), angiogenin, angiopoetin 1 a 2, integriny [140,148,167].

Tabulka 1 - Přehled angiogenních faktorů

Angiogenní faktor	Biologická povaha	Proangiogenní funkce	Zdroj
FGF	růstový faktor	mitogen endotelových buněk	T-lymfocyty, makrofágy, nádorové buňky
VEGF	růstový faktor	mitogen endotelových buněk, podporuje migraci endotelií, zvyšuje permeabilitu cév, stimuluje produkci proteolytických enzymů (MMP)	fibroblasty nádorové buňky
TNF α	růstový faktor	degradace bazální membrány (aktivace MMP)	makrofágy, monocyty
MMP	enzymy	degradace bazální membrány a extracelulární matrix, podporují migraci endotelií a invazi nádorových buněk	aktivované endotelie
PD-ECGF	enzym	migrace endotelií	Trombocyty
PDGF	růstový faktor	mitogen, proliferace fibroblastů, syntéza kolagenu, formuje lumen nové cévy	trombocyty
TGF α	růstový faktor	proliferace endotelií	mikrofágy, nádorové buňky
EGF	růstový faktor	proliferace endotelií	endotelie, nádorové buňky
HGF	růstový faktor	proliferace endotelií	fibroblasty, makrofágy, endotelie
angiogenin	enzym	omezuje produkci adhezivních molekul	endotelové buňky
angiopoetin 1	protein	stabilizace nově tvořené cévy	hladké svalové buňky
angiopoetin 2	transmembránový receptor	receptor endotelových buněk pro působení	endotelové buňky

		ostatních angiogenních faktorů (VEGF)	
integriny	transmembránové glykoproteiny	modulují adhezi a migraci buněk	endotelové buňky

Antiangiogenní faktory udržují rovnováhu s angiogenními faktory. Jejich potlačení usnadňuje angiogenezi. Nejznámějšími zástupci v této skupině jsou: TGF β (antagonizuje účinky EGF, inhibuje proliferaci a migraci endotelií a podporuje stabilitu bazální membrány), inhibitory proteolýzy produkované kladovými endoteliemi (např. inhibitory metaloproteáz = TIMPs), trombospondin, angiostatin, endostatin, PF-4 (platelet factor 4 = destičkový faktor 4) a interferon α, β [141,148].

Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout nejvýše velikosti 1-2 mm³. Nádor zůstává vitální a proliferace je v rovnováze s apoptózou. Nicméně hypoxický nádor je geneticky nestabilní, vznikají mutace a objevují se nové fenotypy s produkcí angiogenních působků – „angiogenní switch“. Jakmile dosáhnou cévy k nádorovému ložisku, umožní jeho perfuzi a další růst. Vlastní endotelové buňky produkují další mitogenní faktory, které parakrinně ovlivňují nádorové buňky (FGF, IGF-1, IGF-2, PDGF).

Z uvedeného vyplývá, že angiogeneze a metastazování jsou v úzkém vztahu a čím je angiogeneze intenzivnější, tím je větší riziko vzniku metastáz a horší prognóza nádorového onemocnění. Tento poznatek má praktické využití, neboť stupeň angiogeneze je užitečný prognostický faktor a inhibice angiogeneze je jednou z ovlivnitelných léčebných modalit v onkologické léčbě. Podle místa zásahu lze antiangiogenní léčbu rozdělit do 3 skupin – přirození antagonisté angiogeneze a inhibitory stimulátorů (monoklonální protilátky, inhibitory receptorů, inhibitory proteinkináz, rekombinantní destičkový faktor, trombospondin), inhibitory endotelové proliferace (interferony) a stabilizátory buněčné membrány a extracelulární matrix (TIMPs – inhibitory metaloproteáz) [172].

7.4 Symptomatologie a diagnostika

Nejčastěji je karcinomem postižen horní zevní kvadrant (45%), centrum prsu (25%), horní vnitřní kvadrant (15%), dolní zevní kvadrant (10%) a dolní vnitřní kvadrant (5%).

Symptomatologie je odlišná podle stádia choroby. Typickou klinickou manifestací nemoci je hmatná „bulka“, kterou popisujeme jako nebolestivou rezistenci, neostře ohraničenou příslušné velikosti. V případě lokálně pokročilého nálezu jsou patrné kožní změny charakteru peau d'orange, retrakce kůže, při lokalizaci v centru prsu uchýlení nebo retrakce bradavky, popř. u velmi pokročilých karcinomů kožní exulcerace či lentikulární rozsev. Zarudnutí s lymfédem kůže je charakteristické pro inflamatorní (zánětlivý) karcinom. V některých případech může na patologický proces v prsu upozornit až nález zvětšených uzlin v axile, nadklíčkových nebo podklíčkových oblastech. V souvislosti s metastatickým postižením axilárních uzlin můžeme zaznamenat lymfédem příslušné horní končetiny. Mezi další méně časté klinické projevy řadíme výtok z bradavky, zejména je-li jednostranný a krvavý, a mastodynie. Na druhé straně stojí nepalpovatelné léze, které jsou diagnostikovány pomocí objektivních zobrazovacích metod, u nichž klinické vyšetření prsů i spádových uzlin je negativní.

Protože primární prevence karcinomu prsu prakticky neexistuje, je třeba zaměřit hlavní pozornost směrem k sekundární prevenci. Naším cílem je co nejčasnější záchyt nádorového onemocnění, příp. preinvazivního nádoru a soustředění pozornosti na rizikové skupiny žen. K tomu významně přispělo zavedení tzv. mamární screeningu, který v České Republice nabyl platnosti v září roku 2002. Jedná se o vyšetřování asymptomatických žen a aktivní vyhledávání nádorového onemocnění v časných stádiích pomocí mamografického vyšetření u žen starších 45 let. Vyšetření se opakuje ve 2letých intervalech a je propláceno zdravotními pojišťovnami.

Časné diagnostice karcinomu prsu přispívá kombinace samovyšetření, klinického vyšetření a objektivní vyšetřovací metody. Samovyšetření by měla provádět každá žena starší 20 let jedenkrát měsíčně, vždy ve stejné fázi menstruačního cyklu. Klinické vyšetření provádí praktický lékař, gynekolog nebo specialista v oboru mamologie minimálně jedenkrát ročně. Na základě tohoto vyšetření je indikováno některé z objektivních metod vyšetření. Mezi základní vyšetřovací metody patří mamografie a sonografie [1,67,113].

Mamografie představuje nejužitečnější metodu k detekci časných stádií karcinomu prsu a je schopna odhalit nádor dříve, než je palpovatelný, tedy nádor o velikosti několika milimetrů. Její další předností je vyloučení víceložiskového nádorového procesu, nezastupitelná je v průkazu patologických mikrokalcifikací [130]. Pro svou vysokou senzitivitu (v průměru 90%) a specifitu (85-95%) byla zvolena jako plošné screeningové vyšetření. U žen starších 30 let je vyšetření indikováno spíše výjimečně, jedná se o případy, kde z klinického vyšetření je důvodné podezření na patologickou změnu v prsu. U žen mladší 30 let je indikace k mamografii zcela individuální a omezuje se na případy důvodného podezření na maligní lézi při nejasném nálezů na primárně indikovaném sonografickém vyšetření.

Sonografie je považována za vyšetřovací metodu první volby u žen do 30 roku věku, u těhotných a kojících žen. V ostatních případech je využívána jako vyšetření doplňkové, které lze provádět společně s mamografickým vyšetřením pro zvýšení citlivosti diagnostiky nebo samostatně v obdobích mezi dvěma mamografickými vyšetřeními. Nespornou výhodou sonografického vyšetření je absence ionizujícího záření, nevýhodou je nízká specifita, menší spolehlivost v detekci malých nádorů a horší přehlednost prsů s tukovou přestavbou ve vyšším věku [130]. Naopak sonografie má své nezastupitelné místo v diagnostice patologického procesu v axilách [125]., vyšetření jizev po mastektomiích v rámci dispenzární péče a u rizikových žen vyžadující kontroly mléčné žlázy v kratších časových intervalech.

Je dokázáno, že sonografie velmi dobře doplňuje mamografické vyšetření a při správně zvolené indikaci zejména u denzní mléčné žlázy, špatně mamograficky hodnotitelných nálezů zvyšuje její senzitivitu o dalších 3-5% [130]. Další neopominutelné využití obou vyšetřovacích metod je odběr tkáně na histologické vyšetření pod zrakovou kontrolou a značení nehmátných lézí i patologických mikrokalcifikací před chirurgickou excizí.

Ostatní vyšetřovací metody jsou považovány pouze za doplňkové a každá v nich má svá vlastní indikační kritéria. V této skupině mezi nejužitečnější patří *magnetická rezonance* (MRI). Toto vyšetření je nejčastěji využíváno k odlišení jizvy či recidivy v případech, kde mamografický i sonografický nález není jednoznačný, dále pro stanovení recidivy u žen, které v minulosti podstoupily rekonstrukční operaci s použitím silikonové protézy, při hledání primárních nádorů v prsu při nálezů metastáz v axilárních mízních uzlinách při negativním klinickém, mamografickém i sonografickém vyšetření [125], vyloučení přítomnosti mnohočetných ložisek karcinomu prsu, sledování mladých žen s velmi vysokým rizikem vzniku

karcinomu prsu při mutaci genu BRCA1 a BRCA2 a sledování efektu neoadjuvantní chemoterapie při plánování operačního řešení [24].

Mezi méně časté vyšetření patří *duktografie*, což je modifikace mamografie, kdy je přímo do ductů vpravena kontrastní látka. Indikace k tomu vyšetření je při zjištění serózní či krvavé sekrece z bradavky. Duktografie je schopna detektovat především intraduktální papilomy či papilokarcinomy [113]. Další vyšetřovací metody jsou využívány dle zvyklostí a možností pracoviště, některé z nich jsou využívány v rámci klinických studií. Jedná se zejména o elastografii, termografii, CT laserovou mamografii a elektroimpedanční mamografii. Principem těchto metod je využití odlišných fyzikálních vlastností nádorové tkáně (tuhost a kompresibilita, teplota kůže, vodivost, absorpce laserového paprsku) od zdravé mléčné žlázy.

Dnes již nezbytným vyšetření pro stanovení definitivní diagnózy je odběr biopsie. Toto vyšetření probíhá pod zrakovou kontrolou sonografem či mamografem, s výběrem té vyšetřovací metody, kterou je léze lépe detekovatelná. Od biopsií tenkou jehlou (FNA) se postupně upouští a do popředí se dostává standardní metoda core-cut biopsie, v případě výskytu mikrokalciifikací se provádí odběr tkáně vakuovou biopsií (mamotom), která umožňuje vícenásobný odběr tkáně z jednoho místa [67,113]. Histologickým zpracováním je potvrzena eventuelně vyvrácena diagnóza karcinomu a na základě tohoto výsledku je plánována další terapie. Při histologicky potvrzené malignitě je požadováno určení histopatologického typu nádoru, stanovení hormonálních receptorů v nádorové tkáni (estrogenové a progesteronové receptory), určení stupně diferenciace (grade 1-3), určení exprese onkoproteinu HER-2-neu a určení mitotické aktivity nádoru (MIB1). Tyto charakteristiky nádoru jsou nezbytné pro plánování jak případné neoadjuvantní onkologické léčby, tak adjuvantní po primárním chirurgickém zákroku.

Při průkazu maligní léze prsu je nezbytné před chirurgickou i primárně onkologickou léčbou doplnit vyšetření potvrzující či vylučující diseminaci. Karcinom prsu je typický tím, že zakládá vzdálené metastázy predilekčně do jater, skeletu, plic a mozku. Z této znalosti vycházejí i stagingová vyšetření, která předcházejí zahájení terapie. Jedná se o rentgenový snímek plic, sonografické vyšetření břicha a scintigrafie skeletu. CT vyšetření mozku se před zahájením léčby standardně neprovádí, pokud není přítomna zjevná neurologická symptomatologie. V rámci stážovacích vyšetření, sledování a hodnocení odpovědi na onkologickou léčbu je možné využití PET CT. Své místo má PET CT také při nález axilární lymfadenopatie v rámci hledání primárního origa.

7.5 TNM klasifikace a stádia nádorového onemocnění

Stádium nádorového onemocnění v době stanovení diagnózy spolu s histologickým typem a gradingem nádoru jsou důležité prognostické faktory stran dlouhodobého přežití a jsou nezbytné pro plánování léčebné strategie. K určení stádia choroby je nutná znalost TNM klasifikace, která je založena na znalosti velikosti primárního nádoru (T), stavu regionálních uzlin (N) a přítomnosti nebo nepřítomnosti vzdálených metastáz (M) [114]. TNM klasifikaci rozlišujeme na klasifikaci klinickou (značená písmenem „c“), která vychází z klinického vyšetření a výsledků objektivních zobrazovacích metod, a na patologickou klasifikaci (značená písmenem „p“), která zahrnuje informace získané histologickým vyšetřením (Tabulka 2) [24]. Z výše uvedeného vyplývá, že patologická klasifikace poskytuje přesnější informace o nádoru i stavu lymfatických uzlin, a právě proto je využívána k určení stádia nádorového onemocnění (Tabulka 3).

Tabulka 2 - Patologická TNM klasifikace

T – velikost tumoru	
TX	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez přítomnosti primárního nádoru
pTis	Karcinom in situ (duktální, lobulární), Pagetova choroba bradavky bez prokazatelného nádoru
pT1	pT1 mic - mikroinvazivní nádor (1 mm nebo menší v největším rozměru) pT1a - nádor o rozměru 1-5 mm pT1b - nádor o rozměru 5-10 mm pT1c - nádor o rozměru 10-20 mm
pT2	Nádor o rozměru 20-50 mm
pT3	Nádor o rozměru více než 50 mm
pT4	pT4a – nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením do hrudní stěny pT4b – nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením do kůže (peau d'orange) pT4c – nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením do kůže i hrudní stěny pT4d – inflamatorní karcinom

N – stav regionálních lymfatických uzlin	
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
pN0 pN0(i+)	V regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy Izolované nádorové buňky, submikrometastáza (< 0,2mm)
pN1 pN1(mic)	Přítomnost metastáz ve stejnostranných axilárních uzlinách (1-3) Přítomnost 1 mikrometastázy (< 2 mm)
pN2	Přítomnost metastázy ve stejnostranných axilárních uzlinách (4-9) nebo stejnostranných vnitřních mamárních uzlinách bez postižení axilárních uzlin
pN3	Přítomnost metastáz v axilárních uzlinách (≥10 uzlin) nebo kombinace postižení vnitřních mamárních uzlin a axilárních, postižení stejnostranných nad- a podklíčkových uzlin
M – přítomnost vzdálených metastáz	
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Vzdálené metastázy nejsou přítomny
M1	Vzdálené metastázy jsou přítomny

Tabulka 3 - Stádia nádorového onemocnění

Stádium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIa	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIb	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIa	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIb	jakékoliv T	N3	M0
	T4	jakékoliv N	M0
IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

7.6 Typy karcinomu prsu

Z hlediska patologického existuje řada klasifikačních systémů rozdělující nádory dle příslušného kritéria. Pro tuto práci bude pro přehlednost a srozumitelnost použito jednoduché rozdělení z hlediska přítomnosti invaze do stromatu na nádory neinvazivní (in situ) a invazivní, a z hlediska směru diferenciacie nádorové populace na duktální a lobulární [105].

7.6.1 Karcinomy in situ

Karcinomy in situ nebo jinými slovy neinvazivní karcinomy lze rozdělit podle buněčné nádorové populace na duktální karcinom in situ a lobulární karcinom in situ [4,97].

- **Duktální karcinom in situ (DCIS)**

Je charakterizován proliferací maligních epitelových buněk ve vývodech mléčné žlázy, ale bez průkazu invaze do okolního stromatu. Na mamogramu vytváří typický obraz – shluk atypických mikrokalcifikací. Tento typ nádoru je považován z patologického hlediska za prekursor invazivního karcinomu [6,12,52].

Podle typu růstu a cytologického obrazu zahrnuje *komedo typ*, jenž je charakteristický přítomností nekrózy v postižených duktálních segmentech, *kribriformní typ* typický svým pruhovitým uspořádáním vytvářející okénka, *mikropapilární typ* tvořící papilární buněčné shluky prominující do lumen duktů, *papilární typ* vytvářející intraluminární papily s fibrovaskulárním stromatem a *solidní typ* vyplňující lumen vývodu. Reálně se vyskytuje řada kombinovaných a smíšených typů.

V souvislosti s DCIS nelze opomenout tzv. *mikroinvazivní karcinom* (pT1mic). Pod touto patologickou jednotkou se skrývá duktální karcinom in situ, u něhož je histologicky prokázána mikroinvaze, což znamená šíření nádorových buněk přes bazální membránu do okolního stromatu s ložiskem nepřesahující 1 mm v největším rozměru.

Je-li diagnostickou core cut biopsií prokázán DCIS, je primárně indikována dle rozsahu léze chirurgická excize, resp. mastektomie při víceložiskovém postižení, v obou případech s biopsií sentinelové uzliny.

- **Lobulární karcinom in situ (LCIS)**

Tento typ nádoru zpravidla nemá makroskopicky ani zobrazovacími metodami typický obraz, spíše bývá zjištěn náhodně při histologickém vyšetření části mléčné žlázy. Histologicky je obraz LCIS v porovnání s DCIS spíše uniformní, je charakterizován proliferací nekohezivních E-cadherin negativních buněk v terminálních lobulech bez porušení bazální membrány. LCIS je z patologického hlediska považován spíše za marker zvýšeného rizika vzniku invazivního nádoru lobulární či duktální diferenciace než jako preinvazivní forma rakoviny [6,12].

Co se týká léčby LCIS, nevyžaduje chirurgickou intervenci. Pro pacientku představuje zvýšené riziko vzniku karcinomu mléčné žlázy, proto by měla být hlavní pozornost soustředěna na intenzivní sekundární prevenci.

7.6.2 Invazivní karcinomy

Podle stejného kritéria jako u karcinomů in situ lze invazivní nádory rozdělit podle typu buněčné populace na duktální, lobulární a smíšené.

- **Invazivní duktální karcinom (IDCa)**

Tento typ nádoru je nejčastějším histologickým typem karcinomu prsu vůbec (představuje 80% všech nádorů) a vykazuje zároveň nejhorší prognózu. Kromě metastáz do spádového lymfatického aparátu je pro něj typický hematogenní rozsev a vytváření vzdálených metastáz v játrech, plicích, kostech a mozku.

Z histologického hlediska se jedná o heterogenní léze, kdy v rámci jednoho nádoru nalézáme nádorové buňky tvořící tubuly, solidní ložiska, pruhy a nekrózy v různé intenzitě. Podle převažující složky lze nádory rozdělovat do subtypů podobně jako DCIS (tubulární,

papilární, kribriformní a medulární). Cytologicky se mohou nádorové buňky do jisté míry podobat původní epiteliím nebo vykazující značný polymorfismus a jaderné atypie. Rovněž mitotická aktivita může být různá. Vyhodnocení buněčných a jaderných atypií slouží ke skórování a stanovení gradingu a mitotické aktivity nádoru jako významných prognostických faktorů.

- **Invazivní lobulární karcinom (ILCa)**

ILCa s 5-10% výskytem představuje druhý nejčastější typ invazivního karcinomu. Typickým znakem je víceložiskový výskyt ve stejnostranném prsu a v porovnání s IDCa se vyskytuje častěji oboustranně.

Makroskopicky je ILCa neodlišitelný od IDCa. Histologicky ovšem infiltruje stroma a roste koncentricky kolem vývodů, které zužuje nebo uzavírá. Oproti IDCa mají nádorové buňky lobulárního karcinomu menší soudržnost v důsledku chybění nebo nižší exprese kohezivních molekul, jsou E-cadherin negativní.

Podle buněčného uspořádání se lobulární karcinom vyskytuje ve třech variantách, tj. solidní, alveolární a tubuloalveolární typ.

Co do prognózy, v porovnání s IDCa méně často zakládá metastázy v regionálních mízních uzlinách a plicích, zatímco častěji se setkáváme s metastázami v gastrointestinálním traktu, gynekologických orgánech, mozkomíšních obalech a kostech [61].

Léčba invazivních karcinomů bude probrána v samostatné kapitole (7.7)

7.6.3 Méně obvyklé formy karcinomu prsu

Kromě maligních nádorů uvedených v předešlé kapitole se můžeme setkat i s nádory vyskytujícími se v malém procentu nebo vzácně. Do této skupiny jsme zařadili čtyři samostatné nosologické jednotky - Pagetovu karcinom bradavky, erysipeloidní karcinom, karcinom v ektopické mléčné žláze a mucinózní karcinom.

- **Pagetův karcinom bradavky**

Primární Pagetův karcinom bradavky v nejužším smyslu patří mezi velmi vzácné onemocnění, které se klinicky projevuje svěděním, pálením, mokváním, ekzematoidní či ulcerózní lézí bradavky s krvavou sekrecí, často s tvorbou eschary. Pro tento typ nádoru je typické šíření nádorových buněk v kůži bradavky a podle TNM klasifikace je řazen do kategorie pTis.

Bohužel téměř u všech pacientek bývá přítomno i postižením přilehlých hlavních vývodů nebo hlubších žlazových struktur, a to nádory jak neinvazivními tak invazivními. Proto při podezření na Pagetův karcinom bradavky je nezbytné provést komplexní vyšetření prsu a dle výsledků plánovat rozsah chirurgického výkonu (od lokálního – centrální excize včetně areolomamilárního komplexu až po radikální výkon – mastektomie). Přítomnost nádorového ložiska v mléčné žláze mění klasifikaci nemoci dle velikosti a invaze nádoru.

- **Erysipeloidní karcinom**

Erysipeloidní karcinom prsu, nebo též inflamatorní karcinom či zánětlivý karcinom, představuje asi 2% nádorů prsu. Na první pohled, jak vyplývá z názvu, připomíná pokročilé zánětlivé onemocnění prsu. Je charakterizován zarudnutím kůže prsu typicky s erysipeloidním okrajem, v důsledku infiltrace kožních lymfatik dochází ke karcinomatózní lymfangiopatii projevující se důlkováním charakteru peau d'orange, bez doprovodné teploty, v axile jsou zpravidla palpovatelné zvětšené uzliny. Klinický nálezní obraz imituje obraz mastitidy, ale je typicky rezistentní na léčbu antibiotiky.

Před zahájením léčby je nutná histologická verifikace, která se obvykle provádí z drobné kožní excize. Dle TNM klasifikace je inflamatorní karcinom po histologické verifikaci řazen do kategorie pT4 a z toho vyplývá i přístup k terapii. Jedná se o nádor s nepříznivou prognózou, který časně zakládá lymfogenní i hematogenní metastázy, jenž bývají přítomny až u 60% nemocných již v době stanovení diagnózy. Nutno připomenout, že i z důvodu velkoplošného lymfogenního šíření nemá primární operace význam, naopak při jejím provedení je nutno počítat s velmi časnou lokální recidivou, resp. s progresí reziduí vlastního nádoru v ponechaných kožních lalocích.

Primární léčbou erysipeloidního karcinomu prsu je zpravidla onkologická léčba, zastoupená chemoterapií. V případě neúspěchu je doporučováno ozáření prsní žlázy včetně hrudní stěny a

regionální lymfatické oblasti. Po ukončení onkologické léčby a zhodnocení odpovědi nádoru je plánován chirurgický výkon, vždy radikální v rozsahu mastektomie a exenterace axily.

- **Mucinózní (gelatinózní) karcinom**

Jedná se o skupinu nádorů, které jsou charakterizovány výraznou produkcí extracelulárního hlenu.

Histologicky jsou prokazovány nádorové buňky, které „plavou“ v hlenu, ve 100% jsou pozitivní na estrogenové i progesteronové receptory, vykazují nízkou mitotickou aktivitu, s níž souvisí pomalý růst nádoru.

Tento typ nádoru se vyskytuje spíše se vyšších věkových skupinách a není-li přítomna duktální komponenta, má tento typ nádoru velmi příznivou prognózu, jen vzácně metastazuje a 10leté přežití je až u 80% pacientek.

Jeho léčba je shodná s obecnými zásadami léčby invazivního karcinomu mléčné žlázy.

- **Karcinom v ektopické mléčné žláze**

Tato forma nádorového onemocnění je v literatuře popisována velmi vzácně, tvoří jen 0,3% všech karcinomů mléčné žlázy. Vyskytovat se může v podstatě kdekoliv v rozsahu celé délky mléčných lišt, ovšem zdaleka nejčastěji bývá lokalizována v axilární části, kde bývá taktéž její odhalení vzhledem k dostupnosti nejproblematičtější [64,92,110,135]. Ve shodě s karcinomem prsu bývá histologicky nejčastěji zastoupen duktální karcinom, ostatní typy jsou vzácnější [106].

Klinicky se projevuje zduřením kůže, popř. vyvýšením pod přídatnou bradavkou, je-li přítomna, a cyklickou bolestivostí v závislosti na menstruačním cyklu. Definitivní diagnózu stanoví až histologické vyšetření. Zcela zásadní a nezbytné je vyšetření obou prsů včetně regionálních lymfatických uzlin a všechna stagingová vyšetření. V případě patologické léze pouze v přídatné mléčné žláze je postačujícím léčebným výkonem široká excize do zdravé tkáně. V případě výskytu v axilární části mléčné lišty je standardně prováděna i exenterace axily. Stejně jako u karcinomu prsu následuje onkologická léčba indikována podle stádia nádorového onemocnění.

7.7 Léčba karcinomu prsu, biopsie sentinelové uzliny, pooperační komplikace

Zásadou je, že léčba karcinomu mléčné žlázy vyžaduje komplexní péči a jednotlivé léčebné modalitty na sebe musí navazovat a vzájemně se doplňovat. Strategie léčby by měla vždy respektovat stádium choroby a biologickou i histologickou povahu nádoru.

Základní léčebné modalitty lze rozdělit ze dvou hledisek. Jednak z hlediska přístupu k léčbě na lokální a systémovou a z hlediska oborového na chirurgickou a onkologickou. Lokální léčbou rozumíme na straně jedné chirurgický výkon na prsu a v axile, na straně druhé radioterapii. Systémová léčba zahrnuje chemoterapii, hormonální a biologickou léčbu.

7.7.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba zahrnuje operační zákrok na prsu a v axile a představuje jedinou radikální formu léčby karcinomu mléčné žlázy [24,39,107].

Operace prsu

Operační výkony na prsu lze rozdělit do třech skupin [28]:

1. radikální chirurgický výkon
2. konzervativní chirurgický výkon
3. rekonstrukční výkon

Radikálním chirurgickým výkonem v současné době rozumíme modifikovanou radikální mastektomii podle Pateye – Dixona, při níž se provádí snesení mléčné žlázy včetně kožního krytu, areolomamilárního komplexu a pektorální fascie, oba prsní svaly se ponechávají. Součástí mastektomie je ve většině případů i výkon v axile. Tento typ výkonu je v současné době vyhrazen pro lokálně pokročilé nádory, pro nádory, jejichž rozsah s ohledem na velikost

prsu nedovoluje provést konzervativní chirurgický výkon, pro multicentrické nádorové léze, pro nemocné, u jichž je kontraindikována adjuvantní radioterapie, pro nemocné, které upřednostňují radikální chirurgický výkon, pro řešení lokálních recidiv po prs šetřícím chirurgickém výkonu a léčbu inflamatorního karcinomu po onkologické léčbě. Samostatnou kapitolou jsou tzv. sanační mastektomie indikované u pokročilých exulcerovaných nádorů ohrožující nemocné krvácením či infekcí.

Konzervativní chirurgický výkon označován také jako prs šetřící výkon, resp. parciální mastektomie představuje odstranění nádorového ložiska s okolním bezpečnostním lemlem mléčné žlázy z přístupu, který volíme podle uložení nádoru v prsu. Jeho součástí je dále operace v axile, dle indikačních kritérií (viz níže) buď charakteru exenterace nebo biopsie sentinelové uzliny. Po odstranění nádorového ložiska vkládá operatér do místa uložení tumoru titanové klipy, které vymezují původní místo uložení nádoru a které posléze umožní radioterapeutovi aplikaci dosycovací dávky (boostu) do lůžka nádoru [24,36].

Konzervativní chirurgický výkon můžeme provést v případě, jedná-li se o nádor takové velikosti, který jsme schopni bezpečně odstranit do čistého resekcčního okraje za přijatelného kosmetického výsledku (spíše než velikost vlastního nádoru je rozhodující poměr velikosti nádoru a prsu), je vyloučena multicentricita tumoru, nejsou přítomny difúzní mikrokalcifikace podle mamogramu, nebyla-li vyčerpána radioterapeutická dávka v předchorobí a za souhlasu pacientky. V ostatních případech není konzervativní výkon indikován a provádí se mastektomie. Při rozhodování o rozsahu chirurgického výkonu bychom měli brát v úvahu biologické vlastnosti nádoru a celkový zdravotní stav pacientky, přidružená onemocnění, včetně systémových onemocnění typu kolagenóz, revmatických onemocnění, která jsou spojena s těžkými postradiačními komplikacemi. Po konzervativním chirurgickém výkonu vždy následuje radioterapie zbývající tkáň prsu a dle postižení axilárních mízních uzlin zahrnuje i regionální mízní uzliny. Systémová léčba je indikována dle výsledků histologického vyšetření nádoru i uzlin a stanovení individuálního rizika progresu [36].

Rekonstrukční plasticko-chirurgické výkony představují možnost rekonstrukce prsu po mastektomiích, popř. i konzervativním chirurgickém výkonu při neuspokojivém estetickém výsledku. Výkony probíhají v režii plastického chirurga [25]. Existuje možnost rekonstrukce tkáňovými expandéry, implantáty, vlastní tkání – laloky nebo kombinací využití implantátu a laloku [30]. Samostatnou kapitolou je rekonstrukce mamily a dvorce. Rekonstrukční výkon v případě maligního onemocnění je doporučován s časovým odstupem 12 měsíců po skončené

léčbě v případě kompletní remise onemocnění (odložená rekonstrukce) [14,39]. Výjimečně lze provést na přání pacientky rekonstrukční výkon v jedné době s onkochirurgickým (okamžitá rekonstrukce), přičemž je nutné respektovat indikaci následné onkologické léčby, která obvykle celkový estetický výsledek operace ještě ovlivní. Okamžité rekonstrukce mají své opodstatnění v profylaktických mastektomiích u vysoce rizikových žen. Jedná se o výkony, které jsou plně hrazené zdravotními pojišťovnami.

Operace v axile

Operační výkon v axile je považován spíše než na terapeutický za výkon stagingový, který slouží k upřesnění rozsahu a stádia nádorového onemocnění. Následným histologickým vyšetřením lymfatických uzlin je potvrzena přítomnost nebo absence metastatického postižení a podle výsledku je plánována další strategie léčby.

Dříve byla jediným a standardně prováděným výkonem exenterace (disekce) axily, při níž se provádí en bloc resekce lymfatických uzlin I. a II. etáže společně s tukovou tkání. K histologickému vyšetření je požadován minimální počet 10 uzlin. Avšak s přibývajícím zkušenostmi a navýšením počtu operací nádorů do 20 mm, u nichž je pravděpodobnost metastatického postižení regionálních lymfatických uzlin velice nízká, došlo k rozšíření operačních možností v axile o tzv. biopsii sentinelové uzliny [17,19,28,39,87].

Biopsie sentinelové uzliny je považována za miniinvazivní metodu, která stejně jako disekce axily představuje stagingovou operaci [129], ale výrazně snižuje riziko pooperačních komplikací plynoucích z exenterace axily [18]. Princip tohoto výkonu pochází z anatomické znalosti lymfatické drenáže, která je zajišťována cestou několika aferentních lymfatických uzlin, které ústí v axile do jedné, maximálně do dvou prvních, tzv. strážných lymfatických uzlin. Tyto uzliny jsme schopni detekovat pomocí barevného mapování za použití lymfotropního lipofilního barviva (např. patentní modř), mapování pomocí radiofarmaka (např. koloid lidského albuminu značený ^{99m}Tc) nebo kombinací obou metod [37,38,54]. Aplikace barviva i radiofarmaka se provádí nejčastěji periareolárně, je možné i subkutánně nebo peritumorálně před operačním výkonem. V případě barviva jsme schopni během 5 minut pod zrkovou kontrolou identifikovat obarvenou uzlinu, v případě radiofarmaka je optimální operovat po 2 hodinách od aplikace a vlastní detekce probíhá pomocí radionavigační sondy. Obě metody je možné kombinovat, čímž dochází ke zvýšení citlivosti metody až na 95-99% [21,81]. Počet sentinelových uzlin je udáván

až do čísla čtyři, nicméně nejčastěji se setkáváme s jednou popř. dvěma sentinelovými uzlinami [36,119].

Aby byla zachována vysoká senzitivita této metody je nutné respektovat přísná indikační kritéria, stejně jako její kontraindikace [37,38,51,119]. Biopsie sentinelové uzliny je indikována pouze u histologicky verifikovaných karcinomů [16,19,20], jejichž velikost nepřesahuje 30 mm a bez známek postižení lymfatického aparátu v axile [14,22,76,83].

Po exstirpaci sentinelové uzliny probíhá její peroperační vyšetření metodou tzv. „frozen sectio“ a následně podle sdělení patologa je během jedné operace a jedné anestezie rozhodnuto o dalším postupu. V případě nepřítomnosti metastázy výkon v axile je ukončen a kategorizován jako pN0. V opačném případě, tedy při postižení uzliny metastázou, následuje dokončení exenterace axily dle schématu popsaném výše [36,115,129]. Tyto uzliny jsou dále ponechány k definitivnímu histologickému zpracování a podle počtu postižených uzlin je přiřazena kategorie pN a příslušné stádium nemoci [51,54]. Mezi těmito pólovými situacemi stojí nález mikrometastázy (tj. metastáza velikosti 0,2 – 2 mm), nebo submikrometastázy (tj. metastáza menší než 0,2 mm) nebo izolovaných nádorových buněk, které jsou však detekovatelné pouze imunohistochemicky, tedy nikoliv peroperačně. Otázkou zůstává, co dále. V druhé době exenterace axily nebo žádná další operace. Existuje řada kontroverzních názorů, nicméně v případě submikrometastázy a izolovaných nádorových buněk lze exenteraci axily vypustit, v případě mikrometastázy zatím neexistuje dostatek přesvědčivých důkazů, které by dovolovaly jednoznačně od dalšího operačního výkonu ustoupit. Bolondi udává až 19,7% riziko postižení non-sentinelových uzlin při nálezu mikrometastázy v sentinelové uzlině. V současné době se tedy doporučuje v případě nálezu metastázy menší než 2 mm (mikrometastázy) dokončit exenteraci axily [14,116]. Podle některých autorů je možné výjimečně disekci vynechat a uzlinové mikrometastázy posuzovat v kontextu s parametry primárního nádoru. Dovolují vynechání exenterace axily u primárního nádoru do velikosti 10 mm, s mitotickým indexem do 10%, low-grade karcinomu a bez známek lymfangioinvaze [14,23,24,118,137,138,144].

Další nové přístupy k řešení mikrometastáz nám ukáže v budoucnu právě probíhající studie porovnávající délku přežívání bez známek recidivy u žen s mikrometastázou v sentinelové uzlině, u kterých byla nebo nebyla provedena disekce axily [138,142,143]. Další velká studie (NSABP B-32: Regional recurrence in breast cancer patients with sentinel node micrometastases and isolated tumor cells) sleduje prognózu žen s pozitivní sentinelovou uzlinou léčených exenterací axily nebo radioterapií.

V souvislosti s operačním řešením nelze opominout ani komplikace, které výkony na prsu a v axile doprovázejí. Co se týká prsu, zde se setkáváme s komplikacemi velice zřídka, jedná se zejména o obecné chirurgické komplikace vznikající poruchami hojení v důsledku ischemie okrajů či infekce. Po operacích v axile se jako nejzávažnější komplikace může vyskytnout lymfedém příslušné končetiny v důsledku přerušení lymfatických cév v podpažní jamce nebo poruchy hybnosti ramene a horní končetiny jako následek přerušení inervace jednotlivých svalových skupin [24]. Riziko těchto komplikací významnou měrou snižuje miniinvazivní výkon omezený na biopsii sentinelové uzliny [37,38,47,87].

7.7.2 Radioterapie

Radioterapie je řazena do kategorie lokální léčby a zaujímá významné místo v komplexní léčbě rakoviny prsu. Podle načasování ve vztahu k operaci ji lze rozdělit na předoperační, pooperační a paliativní [11,44,93].

Jednoznačně je nejvíce využívána pooperačně k léčbě tzv. minimální reziduální nemoci, kdy její přínos spočívá v tom, že snižuje riziko vzniku lokoregionální recidivy po konzervativním chirurgickém výkonu, po němž následuje ozáření zbylé mléčné žlázy a v případě metastatického postižení axilárních uzlin je doplněno ozáření spádových lymfatických oblastí [62]. Podle řady studií je dokázáno, že radioterapie následovaná po prs zachovném chirurgickém výkonu přináší stejné výsledky s ohledem na vznik lokální recidivy a celkového přežití jako radikální chirurgický výkon [8,43,46,127].

Ozáření by mělo být optimálně zahájeno po zhojení operační rány, tedy do 6-8 týdnů po operaci a je rozděleno do několika frakcí, které jsou aplikovány 5 dní v týdnu po dobu 5-7 týdnů. Cílem je ozářit co největší část zbylého prsu v celkové dávce 50 Gy, do lůžka je posléze aplikována dosycovací dávka (boost) do celkové dávky 60 Gy [24,95].

Využití předoperační radioterapie se provádí u lokálně pokročilých inoperabilních nádorů a jejím cílem je zmenšení nádoru na operabilní velikost. V případě absolutní inoperability je jejím úkolem dosažení lokální kontroly nádoru [44].

Paliativní radioterapie má význam u diseminovaného karcinomu, zejména u metastatických ložisek ve skeletu a mozkových metastáz.

Toxicita radioterapie se může projevit vznikem časných nebo pozdních komplikací. Mezi časně toxické projevy patří radiodermatitida projevující se erytémem a vlhkou deskvamací kůže, mezi pozdní toxické reakce patří fibróza, radiační pneumonitida, kardiotoxicita, osteoradionekróza, lymfedém horní končetiny a syndrom zmrzlého ramene [24,95].

7.7.3 Systémová léčba

Systémová léčba zahrnuje již výše zmíněnou chemoterapii, hormonální terapii a biologickou léčbu. Při rozhodování o druhu léčby je třeba brát v úvahu nejen rozsah nádorového onemocnění, ale také citlivost konkrétního nádoru na zvolený typ léčby [93]. V zásadě existují tři indikační skupiny systémové léčby: adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní.

Adjuvantní systémová léčba je podávána v návaznosti na chirurgický výkon, při které došlo k odstranění nádoru a nejsou přítomny vzdálené metastázy [11]. Cílem léčby je postihnout a zničit případná metastatická mikroložiska a prodloužit přežití bez nádorové recidivy (DFI) i celkovou dobu přežití (OS).

Neoadjuvantní systémová léčba nabízí ženám s lokálně pokročilým primárním nádorem nebo ženám s metastaticky postiženými regionálními uzlinami bez známek generalizace zmenšení vlastního nádoru, popř. uzlin a zlepšení operability nádoru. Zároveň u předešlých lokálně pokročilých nálezů může při dobré odpovědi umožnit provedení prs zachovné operace [14,48,85]. Neoadjuvance představuje přípravu k operaci, při dobré odpovědi na léčbu hovoříme o tzv. downstagingu [45,68]. Stejně jako adjuvantní chemoterapie tak i neoadjuvance předpokládá postižení případných objektivně neprokazatelných mikrometastatických ložisek [11].

Paliativní systémová léčba je vyhrazena pro pacientky s metastatickým karcinomem prsu, jejímž cílem je navození částečné či kompletní remise onemocnění, prodloužení a zlepšení kvality života s nemocí, v případě kompletní remise navození co nejdelší doby přežití bez progresu nádoru.

Chemoterapie

Chemoterapie znamená léčbu chemickými látkami s protinádorovým účinkem. Jejich podstatou je, že působí v různé fázi buněčného cyklu a mají různý mechanismus účinku. Některé z nich působí v průběhu celého buněčného cyklu, jiné pouze v určitých fázích, některé zasahují do nejrůznějších metabolických procesů, jiné blokují enzymatické systémy. Výsledkem je narušení struktury a funkce nukleových kyselin, což má za následek poškození biologické funkce buňky a její smrt. Chemoterapeutika je možné podávat v monoterapii nebo pro dosažení lepšího léčebného účinku kombinovat preparáty s různým mechanismem působení [148].

Léčbu chemoterapeutiky lze ve vztahu k chirurgickému výkonu rozdělit na neoadjuvantní a adjuvantní, u metastatického onemocnění hovoříme o paliativní chemoterapii. Pro plánování léčebné strategie v adjuvantním režimu je důležité stanovení individuálního rizika (nízké, střední, vysoké), na jehož pokladě je nebo není indikována léčba chemoterapeutiky. Rizikové skupiny pacientek s nádorem prsu podle závěrů konference v St Gallen 2007 vyjadřuje Tabulka 4.

Tabulka 4 - Rizikové skupiny pacientek s karcinomem prsu (St Gallen 2007)

Prognostický faktor	Nízké riziko	Střední riziko		Vysoké riziko	
		N0 a alespoň jedno z následujících kritérií	N1-3 a všechna následující kritéria	N1-3 a všechna následující kritéria	N \geq 4
N	N0 a všechna následující kritéria	N0 a alespoň jedno z následujících kritérií	N1-3 a všechna následující kritéria	N1-3 a všechna následující kritéria	N \geq 4
pT	pT \leq 2cm	pT>2cm	-	-	-
Grade	G1	G2-3	-	-	-
ER, PR	ER+ a/anebo PR+	ER- a PR-	ER+ a/anebo PR+	ER- a PR-	-
HER2	HER2-	HER2+	HER2-	HER2+	-
Věk	\geq 35 let	< 35 let	-	-	-

Základem léčby v adjuvantním podání jsou taxany, které se podávají u nemocných se středním a vysokým rizikem, u nichž nelze předpokládat odpověď na hormonální léčbu. Nejčastější kombinace cytostatik jsou: CMF (cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil), FAC (5-fluorouracil, doxorubicin, cyklofosfamid), AC-T (doxorubicin, cyklofosfamid, paklitaxel),

AC-D (adriamycin, cyklofosfamid, docetaxel), TAC (docetaxel, doxorubicin, cyklofosfamid), TC (docetaxel, cyklofosfamid) nebo FEC (fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid) a docetaxel. Pro HER2+ pacientky existují režimy s trastuzumabem. Jejím cílem je likvidace tzv. zbytkové nemoci a prodloužení přežití bez progresu i celkového přežití.

Neoadjuvantní chemoterapie by měla být založena na bázi antracyklinů a taxanů. Doporučuje se podat nejméně 6 cyklů chemoterapie v rozmezí 4-6 týdnů a měla by být ukončena před operací. Optimální doba vyhodnocení léčebné odpovědi je za 6-9 týdnů po zahájení léčby. Cílem je minimalizace zbytečné toxicity u pacientek, které nemají dostatečnou léčebnou odpověď, tj. léčbou dosáhnou pouze stabilizace nemoci nebo při ní nemoc progresuje. Základní režimy jsou: AC/docetaxel (doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel), AT (doxorubicin, paklitaxel) a TAC (docetaxel, doxorubicin, cyklofosfamid). Jejím úkolem je kromě předoperačního zmenšení primárního nádoru i prodloužení bezpříznakového období a celkového přežití po chirurgické léčbě.

Paliativní chemoterapie je hlavní léčebnou modalitou metastatického karcinomu prsu a je indikována pro pacientky s negativními hormonálními receptory nebo po selhání hormonální léčby u nemocných s pozitivními hormonálními receptory. Metastatický karcinom prsu je považován za inkurabilní onemocnění. Hlavním cílem léčby je stabilizace a kontrola onemocnění, zlepšení kvality života a prodloužení přežití. V 1. linii léčby byly prokázány nejlepší výsledky léčby s antracykliny a taxany. U pacientek, které nebyly v adjuvanci léčené antracykliny, je možné jejich podání v 1. linii u metastatického karcinomu prsu. Při selhání léčby antracykliny nebo její vyčerpání v adjuvanci jsou podávány taxany (paclitaxel, docetaxel) v monoterapii nebo v kombinaci s capecitabinem, gemcitabinem. Po selhání léčby taxany byla prokázána účinnost gemcitabinu, capecitabinu, vinorelbinu a lipozomálního doxorubicinu u pacientek předléčených taxany a antracykliny. V léčbě kostní metastáz se osvědčily bisfosfonáty. U všech pacientek s amplifikací HER2 genu by měla být v 1. linii zvažována léčba v kombinaci s trastuzumabem.

Součástí chemoterapeutické léčby je léčba podpůrná, která zlepšuje snášenlivost jednotlivých preparátů, potlačuje a léčí nežádoucí účinky.

Hormonální terapie

Podávání hormonální léčby je založeno na průkazu hormonálních receptorů v nádorové tkáni. Bez jejich přítomnosti je hormonoterapie neúčinná. Existují tři typy hormonální léčby: ablativní, kompetitivní a inhibiční [24].

Ablativní léčba spočívá v odstranění zdroje produkujícího hormonu se stimulačním účinkem na karcinom prsu. V podstatě je jedná o vyřazení hormonální funkce vaječnicků – ovariectomie (kastrace) - cestou chirurgickou, radiační nebo medikamentózní. Tento způsob léčby je využíván zásadně jen u premenopauzálních žen a představuje podávání analog luteinizačního stimulačního hormonu (LHRH – luteinizing-hormon releasing hormone).

Kompetitivní hormonální léčba spočívá se vazbě antiestrogenu na estrogenový receptor, čímž obsadí místo přirozenému hormonu. Nejčastěji využívaným antiestrogenem je Tamoxifen, který kromě antiestrogenního účinku působí částečně i jako estrogenní agonista. Obsazením receptoru blokuje proliferaci a růst.

Inhibiční hormonální léčba spočívá v blokádě tvorby estrogenu v periferních tkáních již při vyřazené funkci vaječnicků, tzn. jedná se o léčbu vyhrazenou pro postmenopauzální pacientky. Do této skupiny řadíme preparáty označované jako inhibitory aromatázy. Principem je blokáda enzymu aromatázy zajišťující přeměnu steroidů na estrogenu v nadledvinkách.

Hormonální léčba má své místo v léčbě časných stádií karcinomu prsu v adjuvantním režimu, v léčbě lokálně pokročilého karcinomu prsu v neoadjuvantním režimu i v paliativní léčbě metastazujícího karcinomu prsu. Jednotlivé preparáty lze využívat jak v monoterapii, tak ve vzájemné kombinaci.

Neoadjuvantní hormonální léčba je vyhrazena pro postmenopauzální pacientky, u nichž není indikována neoadjuvantní ani adjuvantní chemoterapie a lze očekávat odpověď na hormonální léčbu – nádory s pozitivními ER i PR, nízký grade, nízkou mitotickou aktivitou a invazivní lobulární karcinom. V této indikaci jsou preferovány inhibitory aromatáz a doporučená doba podávání je 6 měsíců.

V adjuvantním podání je situace odlišná pro pre- a postmenopauzální pacientky. Premenopauzálně se doporučuje podání alespoň 2 roky analog LHRH (luteinising-hormone realising hormon) v kombinaci s antiestrogeny (Tamoxifen). U postmenopauzálních nemocných

je podle stupně rizika podáván antiestrogen (Tamoxifen) po dobu 5 let v případě nízkého rizika. U pacientek se středním a vysokým rizikem je součástí léčby inhibitor aromatázy podávaný po dobu 5 let, nebo po 2-3 letech léčby antiestrogeny změněn za inhibitor aromatázy.

V paliativním režimu u premenopauzálních nemocných je doporučována ovariální ablace v kombinaci s inhibitory aromatázy. U postmenopauzálních pacientek léčených v adjuvanci antiestrogeny je doporučováno podání inhibitorů aromatáz v 1. linii, v dalších liniích je možno podat opět antiestrogeny, event. inhibitory aromatáz 3. generace.

Obecně platí, že v případě pozitivity hormonálních receptorů v nádorové tkáni, je primárně indikována hormonální systémová léčba, která se podává až do rekurence onemocnění. V případě jejího selhání se přistupuje k podávání systémové chemoterapie, která je všeobecně zatížena horší snášenlivostí a vyšším výskytem nežádoucích účinků.

Biologická léčba

Biologická léčba představuje nový směr v léčbě karcinomu prsu. Díky experimentální onkologii a získávání znalostí molekulárních mechanismů došlo k rozvoji nové skupiny léků, které cíleně ovlivňují specifickou molekulu a tím selektivně ničí nádorové buňky [24].

Biologickou léčbou označujeme léky, které mají za cíl specificky ovlivnit signální dráhy cytokinových receptorů, které jsou pro přežívání a proliferaci nádorové buňky nezbytné. Biologická léčba má ve srovnání s klasickými cytostatiky odlišný profil toxicity, proto je možné tyto léky navzájem kombinovat. Lze je využívat jak v adjuvantním režimu léčby po chirurgickém odstranění nádoru, tak jako paliativní možnost léčby u metastatického karcinomu.

Biologické preparáty existují ve dvou formách – jako monoklonální protilátky, které účinkují na povrchu buněk, a jako - malé molekuly, které pronikají do buněk a blokují receptor „zevnitř“ nebo přerušují signální dráhu. V současné době jsou schváleny léky, jejichž cílovými molekulami jsou receptor HER2 z rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR). Podle tohoto kritéria lze rozdělit léky biologické léčby na dvě skupiny: inhibitory HER2 a inhibitory VEGF [79].

Inhibitory HER2 jsou monoklonální protilátky proti molekule HER-2 neu, která se nachází na povrchu nádorových buněk karcinomu prsu. Zablokování receptoru způsobí zastavení buněčného dělení a apoptózu. Zvýšená exprese HER2 se vyskytuje až u 30 % karcinomů prsu a je spojena s horší prognózou onemocnění. U nádorů, které nevykazují expresi HER2 není tento typ biologické léčby účinný. Proto nezbytným, dnes již standardním vyšetřením, je imunohistochemické stanovení exprese HER-2 neu. Pozitivní výsledky (skóre 3+) se potvrzují fluorescenční in situ hybridizací (FISH metodika) a pozitivní výsledek selektuje pacientky vhodné k adjuvantní biologické léčbě trastuzumabem (Herceptin) [78,120]. V případě skóre 2+ (slabě pozitivní) je FISH prováděna pouze na žádost klinika, zejména onkologa, a nově od 1.6.2011 v Národních referenčních laboratořích jsou vyšetřovány i nádory se skóre 0 a skóre 1+ (negativní) v případech, že jsou negativní hormonální receptory, nádory větší než 20 mm a nejedná se o typ mucinózní, tubulární a lobulární. V případě průkazu amplifikace genu pro HER2 hovoříme o tzv. diskordantním typu nádoru a vymezuje se tím další skupina nemocných vhodných k biologické léčbě monoklonálními protilátkami proti HER2 [35]. Zástupcem této skupiny je trastuzumab (Herceptin), který se svou velkou molekulou váže přímo na HER2, je nejčastěji používanou formou biologické léčby [102] a jeho podání je podmíněno průkazem amplifikace HER2 genu. Biologická léčba trastuzumabem je vhodná k monoterapii i v kombinaci s chemoterapií (taxany) a hormonální léčbou (inhibitory aromatázy) v adjuvantním i v paliativním podání.

Lapatinib (Tyverb) představuje zástupce s malou molekulou pronikající do buňky a blokující signalizaci receptoru HER2 i HER1, což je další podtyp epidermálního růstového faktoru, a inhibující jejich tyrozinkinázové domény [72,102,120]. Podobně jako u trastuzumabu jeho podávání je podmíněno průkazem overexprese HER2. Lapatinib je v současné době volen jako biologická léčba 2. linie při progresi nádorového onemocnění při léčbě trastuzumabem.

Inhibitory VEGF jsou monoklonální protilátky blokující vaskulární endoteliální růstové faktory, které se vytvářejí v nádorové tkáni za účelem podpory proliferace endotelových buněk a vrůstání nových cév do nádoru. Zástupcem této skupiny je bevacizumab (Avastin), pro něhož na rozdíl od předchozí skupiny neexistuje buněčný marker, který by předpovídal, kteří pacienti budou na podání léku reagovat. V případě karcinomu prsu je tento lék podáván v 1. linii metastazujícího karcinomu u nemocných s HER2 negativitou.

7.8 Prognostické faktory

Mezi základní prognostické faktory jsou řazeny *histologický typ nádoru, stádium nádorového onemocnění v době stanovení diagnózy* určené dle TNM klasifikace vyhodnocením velikosti nádoru, postižení regionálních lymfatických uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz [40], *histopatologický grading* určující diferenciaci nádorových buněk. Kromě histopatologického gradingu bývá vyhodnocován i tzv. *jaderný grading*, jenž posuzuje strukturální vlastnosti jader nádorových buněk a *mitotická aktivita*. Imunohistochemickým vyšetřením je zjišťována *pozitivita hormonálních receptorů estrogenových a progesteronových a exprese membránového proteinu HER-2 neu*.

Obecně platí, že nepříznivou prognózu mají nádory s rozměry nad 50 mm, nádory s metastatickým postižením regionálních mízních uzlin a přítomností vzdálených metastáz, histologicky invazivní typy nádorů a zánětlivý karcinom, nádory hůře a špatně diferencované, s vysokou mitotickou aktivitou, buněčnými a jadernými atypii, s negativními hormonálními receptory a overexpresí HER-2 neu [108]. Rovněž krátká anamnéza klinické manifestace svědčí pro rychlou progresi a rychlý růst. Přesto nejsilnějším prognostickým faktorem stran přežití bez progresu i celkového přežití zůstává stádium nádorového onemocnění v době stanovení diagnózy.

Tabulka 5 - Stupeň diferenciaci

GX	Stupeň diferenciaci nemůže být hodnocen
G1	Nádor dobře diferencovaný
G2	Nádor středně diferencovaný
G3	Nádor špatně diferencovaný
G4	Nádor nediferencovaný

Doba přežití v případě přítomnosti vzdálených metastáz je závislá na počtu a lokalizaci metastatických ložisek, nicméně studii je prokázáno, že v případě resektability přispívá operační řešení k prodloužení celkového přežití.

K hodnocení výsledků léčby karcinomu prsu se používá vyhodnocení doby bez příznaků nemoci (disease free interval – DFI), doby celkového přežití (disease free survival - DFS) a přežití v 5letém a 10letém intervalu.

7.9 Genetický karcinom

V dosavadním textu bylo pojednáváno o tzv. sporadickém karcinomu. Genetický karcinom tvoří samostatnou skupinu, u níž je vznik podmíněn geneticky na pokladě genových mutací. Nádory vznikající na základě dědičné dispozice tvoří 10% z celkového počtu všech karcinomů prsu [11,24].

Hlavní predispoziční geny pro vznik karcinomu prsu se vyskytují na 17., resp. 13. chromozómu a byly pojmenovány BRCA 1 (BREast CANcer 1), resp. BRCA 2 (BREast CANcer 2). Jedná se o tumor supresorové geny, jejichž produkty se účastní jako transkripční faktory na opravách chyb DNA. Při chybění nebo neúplné funkci těchto proteinů nedochází k opravám škod DNA a dysregulaci buněčného cyklu vedoucímu ke vzniku autonomního chování buněk a vzniku nádorového bujení. Mutace v genu BRCA 1 představuje pro nosičku až 85% celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu, v případě mutace BRCA 2 je riziko o něco nižší (60-84%). V případě geneticky podmíněného karcinomu se častěji setkáváme s bilaterálními a multicentrickými karcinomy, výskytem v mladším věku, histopatologicky nepříznivými typy a triple negativními nádory. Přítomnost mutace zvyšuje i riziko nádorů jiné lokalizace, zejména karcinomu ovarií, ale i nádorů zažívacího traktu a maligního melanomu. Až u 60% žen nosiček genové mutace BRCA 1 je během života diagnostikován ovariální karcinom, v případě mutace BRCA 2 u 20%. Na genetický karcinom je nutné pomýšlet vždy, vyskytne-li se ve věku pod 35 let, je oboustranný, je triple negativní ve věku do 50 let a při výskytu karcinomu prsu a ovaria u jedné pacientky. Z rodinné anamnézy bychom měli být ostražití při výskytu karcinomu prsu u muže (nejčastěji mutace BRCA 2) a výskytu karcinomu prsu u 2-3 příbuzných žen [24].

K vyloučení nebo potvrzení genetického karcinomu slouží genetické vyšetření. Testování se začíná obvykle u nemocné ženy s nádorem prsu nebo ovaria. Pokud je nalezena patogenní mutace, je možné všem rizikovým příbuzným nabídnout tzv. prediktivní testování ke zjištění nosičství detekované mutace. Tímto vyšetřením jsme schopni zdravé, příbuzné ženě potvrdit nebo vyloučit dědičné riziko. Jestliže u nemocné pacientky není nalezena genová mutace, ostatní příbuzné již nejsou dále testované, přesto je nutné všem rizikovým ženám doporučit pravidelná preventivní vyšetření.

Velmi vzácně se můžeme setkat s časným výskytem karcinomu prsu jako součástí syndromů, které taktéž vznikají na podkladě genových mutací a jsou charakterizovány vznikem

souboru maligních nádorů rozličné lokalizace. Jedná se o Liův-Fraumeniův syndrom, ataxia teleangiectatica, Peutz-Jeghersův syndrom, Cowderův sandrom a Lynchův syndrom.

Co se týká péče a léčby žen nosiček mutace genu BRCA 1 a BRCA 2 uplatňují se schémata primární i sekundární prevence. V primární prevenci se snažíme o úpravu životosprávy ve smyslu dodržování zásad zdravé výživy, pravidelné fyzické aktivity, omezení styku se škodlivinami (alkohol, kouření), prevence nadměrného slunění a nadměrného působení stresu. V rámci primární prevence jsme schopni ženám nabídnout tzv. profylatické (preventivní) operace, které významnou měrou snižující celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu i ovaria. Podmínkami k provedení těchto výkonů je geneticky potvrzená genová mutace a souhlas pacientky. Konkrétně se jedná o profylatickou oboustrannou mastektomii, nejčastěji v rozsahu prosté kůži šetřící mastektomie nebo subkutánní mastektomie. Tímto výkonem jsme schopni snížit 85% riziko vzniku karcinomu prsu na 1%. Ke snížení rizika vzniku ovariálního karcinomu je ženám nabízena profylaktická adnexektomie, která je doporučována mezi 35.-40. rokem věku a sníží riziko vzniku malignity na 1-5% [30].

Pojem sekundární prevence zahrnuje intenzivní a pravidelné sledování žen, u nichž genetickým testováním nebyla prokázána genová mutace nebo u nichž bylo potvrzeno nosičství mutace, ale rozhodli se nepodstoupit profylaktické operace. Péče o tyto ženy by měla být zahájena kolem 20. roku věku a měla by být soustředěna do onkologických center, kde je příslušné přístrojové i personální vybavení se zkušenostmi v péči o vysoce rizikové ženy.

8. Lokální a regionální recidivy, vzdálené metastázy

8.1 Lokální a regionální recidivy

Pod pojmem lokální recidiva rozumíme znovuobjevení nádorového onemocnění na stejné straně primárního nádoru v pektorální oblasti, resp. v té části prsu, ze které byl primární nádor odstraněn nebo v jizvě po mastektomii. Za regionální recidivu je považován opětovný výskyt nádoru v oblasti stejnostranných regionálních mízních uzlin [24]. V některých případech bývá obtížné rozhodnout, zda se jedná o skutečnou recidivu nebo nově vzniklý karcinom (tzv. de novo karcinom). Rozřešení přináší histologické vyšetření, z klinického vyšetření se kloníme k recidivě při přítomnosti nádoru v oblasti jizvy a z hlediska časového při výskytu do 2-3 let po primární operaci. Skutečná recidiva vzniká v důsledku nedostatečné účinnosti lokálně-regionální léčby, zatímco karcinom de novo vzniká jako nový nádor v ponechaném žlazovém parenchymu.

Četnost lokálních recidiv během 10 let po operaci dosahuje dle literárních údajů 2-9% po mastektomii a 4-20% po prs šetřícím chirurgickém výkonu s radioterapií. Z hlediska rozsahu primárního chirurgického výkonu je častější výskyt lokálních recidiv po parciální mastektomii v porovnání s totální mastektomií, nicméně z onkologického hlediska je v indikovaných případech zachovný chirurgický výkon doplněný adjuvantní radioterapií ekvivalentní k totální mastektomii [8,43,128]. Po prs šetřících operacích převažují lokální recidivy v operovaném prsu, zatímco po totální mastektomii jsou častější recidivy v oblasti regionálních mízních uzlin (regionální recidivy). Při adekvátní léčbě je akceptovatelné 1% lokálních recidiv ročně [24,55,75].

Prediktory vzniku lokální recidivy se částečně rozcházejí podle rozsahu chirurgického výkonu. V případě parciální mastektomie představuje hlavní rizikový faktor vzniku lokální recidivy těsný, resp. pozitivní resekcční okraj, rozsah (multicentricita, přítomnosti složky DCIS) a biologické vlastnosti vlastního nádoru [122]. Po totální mastektomii je náhled na vznik lokální recidivy odlišný, neboť vlastní operací je naprostá většina mammárního parenchymu odstraněna a za hlavní příčinu vzniku recidivy se považuje pozdější proliferace nádorových buněk v lymfatických cévách kůže a hrudní stěny. Proto nejsilnějším prediktorem rizika recidivy po

mastektomii je stupeň postižení lymfatických uzlin [133]. Z dalších faktorů se uplatňují velikost nádoru, postižení kůže a hrudní stěny, šíře resekcčního okraje a biologické vlastnosti tumoru [24,53,55,75].

Regionální recidivy nejsou v praxi příliš časté. Teoreticky mohou vzniknout rozšířením nádorových buněk z ložiska lokální recidivy do lymfatických uzlin nebo jde o klinickou manifestaci původně postižených uzlin při nedostatečné léčbě. Prakticky se na vzniku regionálních recidiv může podílet falešná negativita sentinelové biopsie, nedostatečná disekce axily z ponechaných pozitivní uzlin nebo relaps v uzlinách mimo rozsah standardní disekce [24,53,91].

Při podezření na lokoregionální recidivu následuje její histologická verifikace a standardní stagingová vyšetření, na jejichž podkladě následuje léčebná rozvaha. Obecně platí, že recidiva po konzervativním chirurgickém výkonu si vyžádá mastektomii, recidiva v jizvě po mastektomii excizi léze. Regionální recidiva po sentinelové biopsii zahrnuje dokončení disekce axily, resp. její revizi po primární exenteraci [55]. V případě synchronního výskytu lokální recidivy i vzdálených metastáz je prioritou systémová onkologická léčba, nicméně individuálně lze přistoupit k chirurgické léčbě jak lokální recidivy tak resekcibilních metastáz [26,41,122].

8.2 Vzdálené metastázy

Karcinom prsu metastazuje nejčastěji do kostí, plic, jater a mozku [26]. Nález synchronních metastáz je vzácný (do 5%), u většiny nemocných se rozvinou až s odstupem (metachronní metastázy). Pro diseminované onemocnění je vymezeno klinické stádium IV, obecně považováno za nevléčitelné, odkázané na paliativní systémovou léčbu. Medián přežití se udává kolem 2 let, ale v případě izolovaného kostního postižení může být onemocnění dlouhodobě stabilní, na druhé straně v případě mozkových či viscerálních metastáz je prognóza horší [24].

Stále neexistují jednotná a ucelená indikační kritéria k řešení vzdálených metastáz. Dle dosavadních zkušeností v individuálních případech lze zvažovat chirurgický resekcční výkon v případě solitárních a radikálně resekcibilních metastáz [86]. Pro správné rozhodnutí je vždy nezbytné individuální posouzení poměru rizika a potenciálního prospěchu operace [99].

V současné době je prokazatelné signifikantní prodloužení celkového přežití u nemocných po resekci orgánových metastáz ve správně indikovaných případech [26,111].

Samostatnou kapitolou jsou paliativní chirurgické výkony, zejména stabilizační u kostních metastáz páteře s hrozící míšní kompresí, u patologických fraktur nosného skeletu či exstirpace mozkových metastáz při náhlých projevech nitrolební hypertenze [24].

9. Nádorové markery

9.1 *Nádorové markery, rozdělení a jejich klinický význam*

Nádorové markery jsou látky, které vznikají v souvislosti se změněným metabolismem nádorově transformované buňky, a proto jejich hladiny v přítomnosti malignity výrazně stoupají. Lze je prokázat přímo v nádorové tkáni (celulární markery) nebo v tělních tekutinách (humorální nádorové markery).

Jejich význam spočívá v tom, že mohou přispět k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k odhadu stádia onemocnění a především jsou využívány pro včasný záchyt recidivy onemocnění. Předpokladem stanovení nádorových markerů je vaskularizace nádoru zajišťující vyplavení markerů do tělních tekutin. Jeho hladina je tedy závislá nejen na vaskularizaci vlastního nádoru, ale také na velikosti nádorové masy. Teoreticky nádorové markery umožňují v optimálním případě odhalit nádor již od hmotnosti 1 mg, čemuž odpovídá 10^6 nádorových buněk, zatímco klinická diagnóza pomocí zobrazovacích technik bývá stanovena až u nádoru, který obsahuje 10^9 nádorových buněk [69].

Při vyšetřování nádorových markerů je potřeba si uvědomit jejich optimální indikace a limitace. Orgánová specifita při vyšetřování jednoho markeru je relativně nízká a zvyšuje se především stanovením jejich vhodné kombinace.

U jednotlivých diagnóz maligních onemocnění rozlišujeme vždy markery hlavní, vedlejší a doplňkové. *Hlavní marker* je marker první volby s vysokou senzitivitou a specificitou pro daný typ nádoru. *Vedlejší marker* je určován jako marker druhé volby, který se zpravidla stanovuje paralelně s markerem první volby. Pro daný nádor má samostatně nižší senzitivitu i specificitu, ale v kombinaci s hlavním markerem zvyšuje pravděpodobnost záchytu příslušného tumoru. *Doplňkový marker* má většinou poměrně malou senzitivitu pro detekci maligního onemocnění, ale vyznačuje se většinou vysokou orgánovou specificitou. Kromě toho jeho pozitivita bývá často signálem generalizace tumoru.

9.2 *Biologie nádorových markerů*

Rakovina je nemoc abnormálního růstu a vývoje. Jakmile se růst a vývoj normální buňky vymkne biologickým kontrolním mechanismům, objeví se nádorové buňky. Buněčný cyklus zahrnuje dva základní procesy – proliferaci a diferenciaci. Oba procesy jsou během vývoje regulované děje, které určují konečnou velikost, tvar a funkci buněk, tkání a orgánů. Buněčná proliferace je udržována kontrolními mechanismy, které řídí buněčné dělení i apoptózu (řízená buněčná smrt). Většina tkání u dospělého jedince je v konečném stádiu diferenciaci, proto každý nový růst v tomto stádiu vede buď k hyperplazii (znásobení počtu buněk vedoucí ke zvětšení objemu orgánu nebo tkáně) nebo ke vzniku neoplazie, při níž dochází k proliferaci za sníženého nebo úplného chybění kontrolních mechanismů. Se stupněm růstu nádoru koresponduje i stupeň diferenciaci. Nádorové buňky se odlišují od normálních enzymatickým vybavením, metabolickými změnami, ztrátou diferenciaci, zvýšením invazivity a ztrátou citlivosti na léky či jiné chemické preparáty.

V důsledku zvýšené proliferace nádorových buněk dochází k uvolňování do krevního oběhu mnoha molekul, které se v krvi normálně vyskytují, ale v přítomnosti neoplazie či benigního nádoru jsou detekovány zvýšené hodnoty. Proto tyto markery většinou vykazují nízkou specificitu. V pokročilých stádiích nádorového onemocnění dochází v důsledku vystupňované proliferace také k dediferenciaci nádorových buněk, což vede k produkci nových látek, které se u zdravých dospělých jedinců neobjevují. Jedná se o molekuly označované jako karcinoembryonální antigeny a ektopické molekuly. Typický je pro ně výskyt ve vysokých koncentracích ve fetálních tkáních, ale ve tkáních zdravých dospělých jedinců se nevyskytují. Přítomnost těchto markerů je spojena s pokročilým stádiem nádoru a horší prognózou.

Nádorové markery jsou produkovány buď vlastními nádorovými buňkami nebo normálními buňkami jako odpověď organismu na nádorové bujení. Od látek produkováných zdravými buňkami se odlišují kvalitativně – jsou nádorově specifické, protože zdravé buňky je neprodukují, či kvantitativně. Může se jednat o povrchové membránové antigeny, enzymy metabolických drah nebo fragmenty cytoplazmatických struktur uvolňovaných po rozpadu buněk. Tyto molekuly jsou stanovovány jako cirkulující látky v krvi nebo jiných tělních tekutinách.

Nádorové markery lze třídit podle různých hledisek [90]. *Podle chemické struktury* na glykoproteiny, polypeptidy, glykolipidy, bílkoviny, polyaminy, imunoglobuliny, glycidy nebo cukerné determinanty glykoproteinů. Častěji se setkáváme s dělením *podle biologické funkce* v organismu – onkofetální antigeny, enzymy, hormony, receptory a blíže nespecifikované látky.

Onkofetální antigeny - *karcinoembryonální antigen, alfa-1-fetoprotein, lidský choriový gonadotropin, specifický těhotenský beta-1 protein, CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 50, CA 72-4* - tvoří nejrozsáhlejší skupinu. Jedná se o látky, které jsou ve vysokých koncentracích u plodu, kde se vyskytují na povrchu diferencujících se buněk (označují se jako diferenciacní antigeny) a hrají významnou roli ve vývoji plodu. U zdravých dospělých osob je jejich hladina velice nízká. Při většině nádorových onemocnění se jejich hladina výrazně zvyšuje. Typický je pro ně výskyt především u diferencovaných nádorů a jejich hladina většinou koreluje s objemem nádorové masy. Jejich stanovení má význam zejména pro určení prognózy nádorového onemocnění a kontrolu terapie.

Enzymatické nádorové markery – *fukosyltransferáza, kyselá prostatická fosfatáza, laktátdehydrogenáza, neuronspecifická enoláza, prostatický specifický antigen, thymidinkináza, thymidilátsynthetáza* – lze rozdělit do dvou podskupin. První podskupinu tvoří enzymy, které se uplatňují v buněčném dělení. Jejich hladina je zvýšena u všech stavů spojených se zvýšenou buněčnou proliferací, proto se uplatňuje při určování prognózy a stádia nádorového onemocnění. Druhou podskupinu tvoří enzymy, které se vyskytují ve zdravých tkáních, kde plní svou biologickou funkci. Tyto markery jsou vysoce orgánově specifické, proto jsou využívány k určení primární lokalizace nádoru.

Hormony – *adrenokortikotropní hormon, antidiuretický hormon, placentární laktogen, kalcitonin, parathormon, prolaktin* – jsou produkovány buď přímo endokrinními buňkami nebo ektopicky. Tyto nádorové markery jsou používány nejčastěji ke kontrole efektu operační nebo medikamentózní léčby.

U nádorů hormonálně aktivních se stanovují i počty receptorů – *estrogenové a progesteronové*. Na rozdíl od předchozích jde o tkáňové markery, které se stanovují přímo v biotickém materiálu. Mají význam pro určení prognózy nádoru, ale především pro volbu a kontrolu terapie.

Poslední jmenovanou skupinu tvoří nejrůznější, tkáněmi produkované blíže nespecifikované látky, které se v krvi zvyšují jako nespecifická reakce organismu na

přítomnost nádorového bujení – *ferritin*, *β₂-mikroglobulin*, *imunoglobuliny*, *tkáňový polypeptidický antigen*, *tkáňový polypeptidický specifický antigen*, *CYFRA 21-1*.

9.3 Indikace a interpretace výsledků

Při indikaci vyšetření nádorových markerů je vhodné se řídit klinickou otázkou, proč nádorový marker chceme stanovit, co od výsledku očekáváme a jaký bude mít vyšetření přínos pro pacienta. Rozhodneme-li se pro vyšetření nádorových markerů je nezbytné znát a vybrat správnou kombinaci markerů s ohledem na lokalizaci tumoru, stádium onemocnění a histologický typ. Vyšetření nádorových markerů musí být plánovaně indikované, poněvadž výtěžnost nahodilých vyšetření je nulová a nemá pro lékaře žádnou výpovědní hodnotu. Pro hodnocení nádorových markerů je nejdůležitější sledování dynamiky markerů nikoliv absolutní hodnoty hladin [145].

Z klinického hlediska má vyšetření nádorových markerů význam zejména pro dlouhodobé monitorování průběhu choroby a sledování efektu terapie, s čímž úzce souvisí včasná diagnostika recidivy nebo progresse nádorového onemocnění. Ze zkušeností vyplývá, že nejvhodnějším postupem je provést první stanovení markeru před operací, resp. zahájením léčby, dále navázat po operaci, resp. po skončení léčby ve 3-4 měsíčních intervalech v průběhu prvních 3 let, v dalším období postačuje dle klinického stavu 1-2krát ročně. Předoperační vyšetření má svůj zásadní význam. Pokud byl nádorový marker zvýšen již předoperačně, lze v 88-95% očekávat jeho elevaci i v případě progresse malignity, naopak byla-li jeho hodnota normální, při progresi onemocnění lze očekávat vzestup pouze v 30% [90,94].

Hodnocení nádorových markerů má omezené využití při hodnocení prognózy nemocného, lze pouze usuzovat, že velmi vysoké hodnoty nádorových markerů souvisí s pokročilostí nádorového onemocnění, tedy se špatnou dlouhodobou prognózou pacienta. Zcela nevhodné je stanovení nádorových markerů v primární diagnostice a screeningu, což souvisí s jejich nízkou senzitivitou v časných stádiích a malou orgánovou specificitou. Obecnou podmínkou screeningu je, aby při 95% specificitě byla senzitivita 97%.

Při indikaci a interpretaci nádorových markerů je nutné brát na zřetel ještě dva faktory – biologický poločas a biologickou variabilitu. Respektování biologického poločasu je důležité

tehdy, pokud jsou využívány nádorové markery pro kontrolu efektu terapie, kdy volba prvního stanovení po operaci, resp. po ukončené léčbě musí být minimálně dvoj- až trojnásobkem jejich biologického poločasu. Znalost biologické variability nádorového markeru je důležitá pro posouzení významnosti změny jeho hladiny [69,90,94].

Pro správnou interpretaci výsledků hladin nádorových markerů je základním předpokladem stanovení referenční hladiny (cut off – hladina markeru, pod níž jsou hodnoty 95% zdravé populace, resp. 95% pacientů v kompletní remisi) mezi benigním a maligním nádorem, mezi remisí a progresí onemocnění a je nezbytná znalost průběhu onemocnění u konkrétního pacienta.

Při hodnocení výsledků je nutné si uvědomit, že ani negativní výsledek nemusí vždy znamenat nepřítomnost nádorového onemocnění (falešně negativní výsledek), na druhé straně existence nemaligního onemocnění může vyvolat nespecifické zvýšení hladin nádorového markeru (falešně pozitivní výsledek). Zároveň i onemocnění orgánů, které ovlivňují metabolismus nádorových markerů, jako jsou játra a ledviny, mohou být příčinou falešného zvýšení. Pro objektivní posouzení dynamiky by měli být nádorové markery zpracovávány vždy v jedné laboratoři a pokud možno jednou metodikou.

9.4 Nádorové markery a karcinom prsu

V případě diagnózy karcinomu prsu má význam sledování dynamiky kombinace čtyř nádorových markerů. Jako hlavní nádorový marker stanovujeme specifický marker karcinomu prsu (CA 15-3), vedlejším markerem je karcinoembryonální antigen (CEA) a jako doplňkové thymidinkináza (TK) a tkáňový polypeptidický antigen (TPA). Nově byl mezi vyšetřované nádorové markery v rámci našeho výzkumu zařazen MonoTotal.

9.4.1 Specifický marker karcinomu prsu (CA 15-3)

Specifický marker karcinomu prsu CA 15-3 patří do skupiny onkofetálních antigenů, má mucin-glykoproteinovou strukturu. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách bronchů a jater. U dospělých je povrchním antigenem žlazových buněk ve vývodech mléčné žlázy, který je orientován do lumen žlazových vývodů. Jeho biologický poločas je 7 dní.

Zvýšené hladiny nalézáme kromě karcinomu prsu i u nemocných s bronchogenním karcinomem, karcinomem žaludku, jater, pankreatu, ovarií, endometria a dělohy.

Z ostatních onemocnění dochází k elevaci i u benigních onemocnění prsu, benigních onemocnění gastrointestinálního traktu, jaterní cirhózy, hemodialyzovaných pacientů s chronickou renální insuficiencí, u HIV infekce, onemocnění dýchacího systému (chronické bronchitidě, bronchopneumonii, tuberkulóze), u akutní i chronické hepatitidy, revmatických onemocnění a fyziologicky v těhotenství.

CA 15-3 je hlavní nádorový marker, který se používá k monitoraci nemocných s karcinomem prsu. Dle Martina jeho předoperační hladina koreluje s velikostí nádoru a stupněm postižení lymfatických uzlin [88], jinými slovy hladina CA 15-3 koreluje se stádiem nádorového onemocnění. Dle Sandri představuje významný nezávislý prognostický faktor [109,126]. Jeho senzitivita se zvyšuje v kombinaci s CEA [89,108] a proliferativními nádorovými markery [5,70].

9.4.2 Karcinoembryonální antigen (CEA)

Vedlejší nádorový marker – CEA - patří do skupiny onkofetálních antigenů. Chemicky má glykoproteinovou strukturu, ze 45% je tvořen bílkovinou, která má konstantní strukturu, z 55% je tvořen sacharidovou složkou, která je heterogenní.

Ve fetálním období lze CEA prokázat v epitelových buňkách trávicího ústrojí a bronchů. V prvním trimestru je obsažen v buněčné cytoplasmě, od druhého trimestru se stává součástí povrchu buněčných membrán. U dospělých je produkován ve stopovém množství epiteliálními buňkami bronchů, mléčné žlázy a gastrointestinálního traktu. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. Nejvyšší koncentrace dosahuje ve slinných žlázách a jejich vývodech. CEA je metabolizován v játrech.

Z maligních onemocnění způsobují zvýšení hladiny zejména malignity v oblasti gastrointestinálního traktu (karcinom tračnicku, rekta, žaludku), z dalších karcinom plic, prsu, vaječnicků, dělohy a prostaty.

U ostatní populace bývá zvýšen u kuřáků, při chronickém onemocnění ledvin, chronickém onemocnění jater, u chronické pankreatitidy, nespecifických střevních zánětech, onemocnění plic (chronická bronchitida, tuberkulóza, bronchopneumie), u autoimunitních onemocnění, v tekutině cyst mléčné žlázy a vaječnicků, v kloubní tekutině u revmatoidní artritidy.

Praktické využití má zejména v onkologii trávicího ústrojí ke sledování léčby a stanovení prognózy u karcinomu tračnicku, rekta, žaludku. U karcinomu prsu je využíván ke kontrole léčby společně s CA 15-3 a proliferačními markery [5,89].

9.4.3 Thymidinkináza (TK)

Thymidinkináza je enzym, který v buňkách katalyzuje přeměnu thymidinu na thymidinmonofosfát, který je poté v několika krocích převeden na thymidintrifosfát, kdy pouze v této fosforylované formě může být zabudován do DNA. Thymidinkináza hraje v buňce podstatnou roli při zpracování thymidinu. Její biologický poločas je 2 dny.

U zdravého jedince se v séru nacházejí pouze velice nízké koncentrace, vyšší hodnoty se vyskytují u neoplastických onemocnění, virových infekcí, zánětlivých onemocnění plic, GIT a revmatických onemocnění.

Thymidinkináza je tedy velice nespecifický nádorový marker, který je schopen odhalit maligní růst v různých orgánech.

U karcinomu prsu stejně jako u jiných malignit slouží jako doplňkový marker odrážející stupeň proliferace a poskytuje informace o agresivitě nádorového procesu. Své opodstatnění nachází také v monitorování průběhu onemocnění a úspěšnosti léčby. Své místo má v diagnostice a monitoraci hemoblastóz a lymfomů.

9.4.4 Tkáňový polypeptidický antigen (TPA)

Tkáňový polypeptidický antigen představuje fragmenty cytokeratinových intermediárních filament, které jsou uvolňovány do tělních tekutin během proliferace nádorových buněk či během buněčné nekrózy. Proto také bývá označován jako proliferační nádorový marker.

Fyziologicky je tento marker produkován trofoblastem placenty, v játrech, plicích, střevě a ledvinách vyvíjejícího se plodu. U zdravých dospělých ho lze zjistit v epiteliální výstelce vývodů mléčné žlázy, močového měchýře, plicích a v orgánech trávicího traktu. Jeho biologický poločas je 7 dní. TPA je markerem s nejvyšší senzitivitou k monitoraci nemocných s karcinomem močového měchýře. Nespecificky může být zvýšen při některých onemocnění jater (cirhóza, hepatitida) a infekčních onemocnění.

Tkáňový polypeptidický antigen je typickým nespecifickým nádorovým markerem, který je schopen poukázat na maligní růst v různých orgánech. Jeho klinické využití spočívá v monitoraci maligního onemocnění, včetně karcinomu prsu.

9.4.5 MonoTotal

MonoTotal je polypeptid ze solubilních fragmentů cytokeratinů typu středních filament (cytokeratin 8, 18 a 19). Jde o velmi nespecifický nádorový marker, který odráží intenzitu aktivity nádorových buněk, a jeví se jako užitečný ukazatel časného záchytu recidivy a ukazatel prognózy [121]. MonoTotal je nádorovým markerem vhodným především pro monitorování a hodnocení účinnosti terapie malobuněčného karcinomu plic [100,134]. Vyšetření tohoto markeru nelze použít pro screening, diagnózu a staging onemocnění. Dále se užívá jako doplňkový nádorový marker u nemocných s nádory v oblasti hlavy. Nespecificky je MonoTotal v séru zvýšen při některých onemocněních jater (cirhóza, hepatitida), rovněž tak u infekčních onemocnění.

10. Růstové faktory

10.1 Obecná charakteristika

Růstové faktory (RF) jsou specifické látky zejména bílkovinné povahy stimulující buněčnou proliferaci a diferenciaci. Zpravidla se účastní i signalizace mezi buňkami. Jejich působení se uplatňuje jak v průběhu ontogeneze, tak v dospělosti fyziologicky při reparaci a regeneraci poškozených tkání.

RF jsou syntetizovány rozsáhlou skupinou buněk mezenchymálního původu, které se více či méně specificky vážou na receptory buněčných membrán za účelem indukce proliferace a/nebo diferenciaci. Většina RF je vysoce účinná již při nanomolárních koncentracích a jejich účinky mohou být apokrinní, parakrinní i endokrinní. Mechanismus účinku spočívá v jejich vazbě na příslušný membránový receptor, což vede k fosforylaci karboxylové skupiny cytoplasmatické domény. Fosforylace receptoru poté indukuje intracelulární odpověď, tj. proliferaci a proteosyntézu.

Jak již bylo řečeno, RF se uplatňují při fyziologických dějích, nicméně jejich působení na buňky je stejné i v patologických lézích. Mnohaletými výzkumnými projekty a nastudováním jejich účinků nacházejí RF své místo na poli diagnostickém i terapeutickém.

Pro potřeby našeho výzkumu byly vybrány růstové faktory, o nichž je známé uplatnění v patogenezi nádorového onemocnění. Přehled vybraných růstových faktorů, jejich receptorů, funkcí a cílových buněk je shrnut v Tabulce 6.

Tabulka 6 - Přehled vybraných RF, jejich receptorů, funkcí a cílových buněk

Růstový faktor (RF)	Cílové buňky	Hlavní funkce	Receptory
EGF (epidermální RF)	Epiteliální buňky	Regulace buněčného růstu, proliferace a diferenciací	EGFR
VEGF (vaskulární endoteliální RF)	Endotelové buňky	Stimulace mitózy, migrace buněk, vazodilatační účinek, zvýšení permeability cév	VEGFR 1-3
HGF (hepatocytární RF)	Epitelové buňky, endotelie, hepatocyty, epitelové buňky bronchů, ductů mléčné žlázy	Stimulace proliferace epitelii a endotelií, inhibice apoptózy, disociace a migrace buněk	Met-R
IGF (insulin-like RF) - IGF-1 - IGF-2	Všechny buňky	Podpora proliferace, inhibice apoptózy	IGFBR 1-6
Leptin	Hypothalamus Epitelové buňky Endotelové buňky Nádorové buňky	Stimulace růstu, proliferace, antiapoptotický účinek, podporuje migraci buněk, stimuluje systézu růstových faktorů, podporuje angiogenezi	ObRa-ObRf
TGF (transformující RF) TGF- α TGF- β	Epiteliální buňky Všechny buňky	Stimulace proliferace, růstu Inhibice proliferace, imunosuprese, podpora diferenciací, regulace embryonálního vývoje, podpora regenerace,	EGFR TGF β R I-III

10.2 Jednotlivé růstové faktory a jejich uplatnění v nádorovém procesu

10.2.1 EGF = epidermal growth factor = epidermální růstový faktor

EGR byl poprvé izolován ze sekretu z podčelistní žlázy u myši. Posléze byla zjištěna jeho sekrece epiteliálními buňkami obecně. Jeho hlavní úloha je stimulace buněčného růstu, proliferace a diferenciací.

Působí prostřednictvím EGFR (epidermal growth factor receptor), což je transmembránový receptor s tyrosinkinázovou intracelulární doménou, jenž je exprimován na povrchu zdravých i nádorových epiteliálních buněk. Svou vazbou stimuluje tyrosinkinázovou aktivitu vedoucí ke zvýšení intracelulární koncentrace kalia, glykolýze a proteosyntéze [31]. Výsledkem je také stimulace genové exprese, jejichž produktem je EGFR a tudíž autokrinní zvýšení vnímavosti buňky k EGF [13].

Stimulace EGFR vede k podpoře nejen růstové aktivity buňky, ale také k podpoře angiogeneze a migrace buněk, která je podkladem pro vznik vzdálených metastáz [65].

Ve zdravé tkáni výše popsaný proces podléhá přísné kontrole a ztráta regulace v důsledku overexprese EGFR na pokladě genové amplifikace vede k rozvoji, resp. progresi nádorového onemocnění. Na podkladě těchto znalostí vznikla a byla uvedena do praxe vysoce účinná cílená biologická léčba monoklonálními protilátkami zaměřená na blokádu EGFR (trastuzumab – Herceptin), resp. signální intracelulární dráhy (lapatinib – Tyverb).

10.2.2 VEGF = vascular endothelial growth factor = vaskulární endoteliální růstový faktor

VEGF je důležitým proteinem pro vaskulogenezi, jehož cílovými buňkami jsou endotelie. VEGF stimuluje buněčnou mitózu a migraci buněk, zvyšuje permeabilitu cév a má vazodilatační účinek [74].

VEGF je skupina proteinů tvořena podtypy A, C, D působící pomocí receptorů VEGFR 1-3. Zatímco VEGF-A stimuluje angiogenezi, subtypy C a D stimulují spíše lymfangiogenezi [2,3,66,101]. Účinným stimulem syntézy VEGF je hypoxia inducible factor (HIF) – transkripční faktor, který je produkován buňkami z nedostatku kyslíku [73].

VEGF je stanovován jako prognostický faktor, jeho zvýšené hladiny jsou spojovány s pokročilými, resp. metastatickými nádory se špatnou prognózou [56]. V praxi jsou využívány monoklonální protilátky inhibující tyrosinkinázovou aktivitu VEGFR (bevacizumab – Avastin).

10.2.3 HGF = hepatocyte growth factor = hepatocytární růstový faktor

HGF je produkován buňkami mezenchymálního původu jako inaktivní prekurzor proHGF, je proteolyticky štěpen HGF-proteázou za vzniku biologicky aktivního HGF. Cílovými buňkami jsou epitelové a endotelové buňky, hepatocyty. V případě mléčné žlázy syntézu zajišťují stromální buňky a cílovými buňkami jsou epiteliie duktů, které jsou jejím prostřednictvím stimulovány k růstu a proliferaci.

HGF působí prostřednictvím tyrosinkinázového receptoru Met-R [50,82,112], jehož stimulací se spouští signální dráha podporující růst nádoru, novotvoření cév a migraci nádorových buněk. Jeho exprese je stimulována HIF (hypoxia inducible factor) produkováného hypoxickými buňkami, čímž je zajištěna zvýšená senzitivita cílové buňky k HGF a zároveň zvýšena produkce VEGF [73]. Deregulace signální dráhy je popisována u několika typů lidských nádorů, zejména u karcinomu ledvin, jater, žaludku, prsu a mozku. V klinické praxi jsou již využívány preparáty blokující Met-R, prozatím v indikacích pro gastrointestinální stromální tumory (GIST) a renální karcinom [146].

Mezi další účinky HGF patří inhibice apoptózy, zvyšování přežívání buněk a stimulace syntézy proteáz vedoucí k disociaci buněk, jejich migraci a podpoře metastazujícího procesu [131,132].

10.2.4 IGF = insulin-like growth factor = inzulínu podobný růstový faktor

Inzulínu podobný růstový faktor je produkován celý život, s věkem jeho produkce klesá a jeho hlavní funkce spočívá ve stimulaci syntézy, v době dospívání regulace růstu, v dospělosti má anabolický účinek. Primárně je produkován v játrech jako endokrinní hormon, jehož sekrece je stimulována růstovým hormonem.

Existují 2 subtypy – IGF-1 a IGF-2, jejichž cílovými buňkami jsou všechny buňky a působí prostřednictvím specifické skupiny receptorů IGFBR 1-6 a nespecifických inzulínových receptorů. Až 95% IGF je vázáno na vazebné proteiny (binding proteins – BP), 80% z nich na IGFBP-3. Svou vazbou na receptor stimuluje syntézu DNA, proliferaci a inhibuje apoptózu [57,63,104]. Jeho hladina je zcela individuální, je dána geneticky, věkem, pohlavím, rasou, stavem nutrice, fyzickou kondicí, celkovým zdravotním stavem a kolísá s denní dobou.

V případě karcinomu prsu je IGF-1 produkován stromálními, nikoliv nádorovými buňkami, dostává se do krevního oběhu a stimulace růstu nádorových buněk je zajištěna para- a endokrinně [34]. IGF-2 produkují stromální i nádorové buňky, jeho účinek je tedy para – i autokrinní. Hlavní mitogenní efekt je zajištěn vazbou na IGF1R a inzulínové receptory [32,124].

10.2.5 Leptin

Leptin je peptidový hormon produktem Ob genu, který je syntetizován především tukovou tkání a jeho hladina je přímo úměrná množství tělesného tuku jedince. Klíčovou roli hraje v regulaci příjmu a výdeje energie, snižuje chuť k jídlu a zvyšuje metabolismus. Kromě bílé tukové tkáně je produkován též hnědou tukovou tkání, epitelovými buňkami mléčné žlázy, slizničními žlazkami žaludku, oocyty, kosterními svaly, hypotalamem, hypofýzou a ve fetálním období placentou.

Leptin jako růstový faktor funguje jako aktivátor transkripce, stimuluje buněčnou proliferaci, migraci buněk, syntézu ostatních růstových faktorů a inhibuje apoptózu [15,32].

Působí prostřednictvím 6 receptorů ObRa-ObRf. Pouze přes receptor ObRb aktivuje intracelulární buněčné signály a navozuje cestou hypotalamu pocit sytosti a informuje CNS o

dostatku přijaté energie [49]. U obézních nemocných je tento zpětnovazebný mechanismus narušen v důsledku rezistence na hyperleptinémii [29]. Z toho důvodu je obezita považována za rizikový faktor karcinomu prsu [60,103]. Obézní ženy vykazují zvýšenou hladinu Leptinu, IGF a inzulinu, jejichž účinek je synergický - prokancerogenní [9], na druhé straně tuková tkáň je zdrojem estrogenů podporující proliferaci buněk mléčné žlázy a vytváří příznivé prostředí pro jejich růst. Předmětem studií je, že Leptin stimuluje cestou HIF syntézu VEGF, čímž podporuje proangiogenní účinek [59].

10.2.6 TGF = transforming growth factors = transformující růstové faktory

TGF zahrnuje skupinu polypeptidových cytokinů, které jsou odlišné geneticky i strukturálně a působí prostřednictvím odlišných receptorů. TGF lze rozdělit na 2 podskupiny – *TGF α* a *TGF β* .

TGF α indukuje vývoj epitelových buněk, je produkován mikrořágy, keratinocyty. Svou strukturou je podobný EGF, proto působí prostřednictvím jeho receptoru (EGFR) se stejným efektem. TGF α je produkován taktéž nádorovými buňkami a vazbou na EGFR autokrinně stimuluje jejich růst a proliferaci [7].

TGF β fyziologicky hraje důležitou roli v regeneraci buněk, buněčné diferenciaci a regulaci imunitního systému. Existují 3 izoformy TGF β 1, TGF β 2 a TGF β 3, působí prostřednictvím receptorů s intracelulární serin/threonin kinázovou aktivitou (TGF β R I-III). Během fetálního vývoje se mění poměr zastoupení jednotlivých forem, v časném období jsou produkovány zejména TGF β 1 a 3 (období morfogeneze) a dalším období převažuje syntéza TGF β 2 (období maturace a diferenciaci).

TGF β je produkován prakticky všemi buňkami lidského těla a mezi jeho hlavní funkce patří: inhibice proliferace, imunosuprese, podpora diferenciaci, regulace embryonálního vývoje, podpora regenerace (uplatňuje se v procesu hojení ran) a indukce apoptózy [117].

TGF β jsou syntetizovány jako prekurzory, v extracelulární matrix vázané na propeptidy (tzv. latentní TGF β) a na příslušné receptory (TGF β R I-III) se váží až po uvolnění z vazby. Signální intracelulární dráhu představují signální molekuly SMAD, jejichž fosforylace vede k regulaci transkripce v jádře [77,98].

Uplatnění TGF β v procesu kancerogeneze vychází z jeho biologické funkce jako potencionálního inhibitoru proliferace, zastavuje buněčný cyklus a inhibuje syntézu dalších regulátorů buněčného cyklu [7,96], obecně má tedy antikancerogenní účinek. Mutace TGF β či jeho signální dráhy způsobí nekontrolovatelnou proliferaci nádorových buněk, změna složení extracelulární matrix mění adhezivní vlastnosti a zvyšuje migraci buněk, imunosupresivní účinek podporuje růst tumoru [27,33,58,71,80,98].

11. Pracovní hypotéza

Předkládaná práce vychází z obecné charakteristiky růstových faktorů, vlastností nádorové tkáně a přirozeného působení růstových faktorů na buňky, včetně buněk nádorových. U nádorového onemocnění předpokládáme zvýšené hladiny růstových faktorů i overexpresi membránových receptorů, jejichž prostřednictvím je realizován přenos signálu a aktivace intracelulárních buněčných mechanismů ovlivňující buněčný cyklus ve smyslu zvýšené proliferační aktivity, alterace diferenciační aktivity a inhibice apoptotických procesů. Proto se domníváme, že změny jejich sérových koncentrací budou citlivým ukazatelem rizika onemocnění z hlediska jeho lokální nebo systémové recidivy a délky celkového přežití nemocné.

Očekáváme tak možnost využití vybraných faktorů pro časný záchyt recidivy onemocnění a zejména využití v predikci biologického chování a agresivity nádoru ve spojení se známými rizikovými faktory a prognostickými vlastnostmi nádoru již v době stanovení diagnózy. Společně s růstovými faktory byly stanovovány i standardní nádorové markery, nově MonoTotal. Praktický a klinický dopad očekáváme pro volbu strategie primární léčby, taktiku vedení dispenzární péče a fortifikaci onkologické léčby.

12. Cíle dizertační práce

Náplní naší práce bylo sledovat hladiny vybraných růstových faktorů předoperačně a změny jejich koncentrací po operačním odstranění nádoru. Získané výsledky jsme korelovali s běžně používanými prognostickými vlastnostmi vlastního tumoru - histopatologický typ nádoru, hormonální dependence, grading, exprese HER2-neu, velikostí tumoru, přítomnosti/nepřítomnosti metastatického postižení axilárních mízních uzlin a známými anamnestickými rizikovými faktory - věk v době stanovení diagnózy, genetická zátěž, hormonální faktory (délka menopaузního období, hormonální substituční léčba, hormonální antikoncepce), nulliparita, věk 1. porodu, druhostranný karcinom, jiné malignity v osobní anamnéze a body mass index (BMI) [42].

V rámci dispenzární péče byly pacientky pravidelně klinicky vyšetřovány, kontrolovány grafickými metodami (mamografie, USG prsů a axil, USG břicha, rtg plic, scintigrafie skeletu) v rámci restagingu, laboratorně stanovován standardní panel nádorových markerů jako pomocná metoda k časně diagnostice lokoregionální recidivy či generalizace.

Jednotlivé cíle:

- I. Posouzení vztahu jednotlivých růstových faktorů (RF) a nádorových markerů (NM) ke stádiu nádorového onemocnění v době stanovení diagnózy a jejich dynamiky po operačním odstranění nádoru

- II. Posouzení vztahu předoperačních a časných pooperačních hodnot definovaných RF a NM k celkovému přežití a přežití bez nádorové recidivy

- III. Definování rizikové skupiny pacientek stran časně generalizace a lokální recidivy v korelaci s anamnestickými rizikovými faktory a nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru

IV. Aplikace závěrů vědecké práce do klinické praxe, metody zlepšení follow up a prodloužení disease free intervalu (DFI) a dlouhodobého přežití (OS), možnosti uplatnění neoadjuvantní systémové léčby

13. Materiál a metodika

Jedná se o prospektivní nerandomizovanou studii. Do studie byly zařazeny pacientky s primárně chirurgicky léčeným karcinomem mléčné žlázy. Všechny nemocné byly podrobně seznámeny s výzkumným projektem a svým podpisem stvrdily souhlas se zařazením do studie (Příloha 1).

Pacientky byly rozděleny do 2 základních skupin. 1. skupinu tvořily nemocné s maligním onemocněním prsu (N=98) a 2. skupina byla kontrolní, pacientky operované pro benigní lézi (N=25).

V rámci 1. skupiny byly nemocné rozdělené do 3 podskupin podle stádia nádorového onemocnění dle TNM klasifikace:

- 1. podskupina – G1** – klinické stádium I - tvořena souborem 54 nemocných,
- 2. podskupina – G2** – klinické stádium IIa - tvořena souborem 25 nemocných a
- 3. podskupina – G3** – zahrnující klinická stádiuma IIb a III - je tvořena počtem 19 nemocných.

Rozdělení do těchto skupin respektuje TNM klasifikaci a zároveň bylo stanoveno s ohledem na rozdílnou prognózu časných karcinomů bez postižení regionálních mízních uzlin, časných karcinomů s postižením mízních uzlin a lokálně pokročilejších karcinomů.

Ve 2. skupině - **kontrolní skupině – K**- jsou zahrnuty pacientky operované pro benigní léze prsu (N=25).

V obou základních skupinách byly odebírány 2 vzorky krve, jeden srážlivé a jeden nesrážlivé krve vzhledem k tomu, že některé analyty nelze v séru stanovit. Odběry krve byly plánovány těsně před operací a 9. pooperační den při extrakci stehů. Všechny pacientky zařazené do studie podstoupily jak předoperační, tak pooperační odběr biologického materiálu.

Ze všech vzorků séra byly stanovovány růstové faktory - epidermální růstový faktor (EGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), jaterní růstový faktor (HGF), transformující růstový faktor (TGF), inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), vazebný protein 80% IGF (IGFBP-3), Leptin a panel nádorových markerů - karcinoembryonální antigen (CEA), specifický marker karcinomu prsu (CA 15-3), nádorový marker buněčné proliferace -

thymidinkináza (TK), cytokeratinový marker - tkáňový polypeptidový antigen (TPA) a MonoTotal.

Výběr stanovovaných růstových faktorů byl prováděn na základě znalosti jejich uplatnění v kancerogenezi a metastatickém procesu nádorového onemocnění. Paleta nádorových markerů zahrnuje jednak markery specifické pro karcinom prsu (CA 15-3) a nespecifické (CEA, TK, TPA, MonoTotal). Perioperačním stanovením koncentrací jednotlivých růstových parametrů jsme sledovali jejich změny následující chirurgickou léčbu. Následnou dlouhodobou dispenzarizací nemocných jsme selektovali ty ženy, u nichž byla ve sledovaném období prokázána lokální recidiva či generalizace nádorového onemocnění. U každé nemocné byl veden protokol zahrnující její anamnestické údaje dle znalostí rizikových faktorů a údaje týkající se vlastního nádoru. Konkrétní údaje z anamnézy zahrnují údaje o věku v době stanovení diagnózy, přítomnosti diabetu a hyperlipidemie v osobní anamnéze, věku menopauzy, užívání hormonální substituční léčby či hormonální antikoncepce, věk 1. porodu/nulliparitu, kojení, hodnotu BMI, kouření, přítomnost jiné malignity v osobní anamnéze, druhostranný karcinom prsu, genetický karcinom, výskyt karcinomu prsu v rodinné anamnéze, onkologickou pozitivitu rodinné anamnézy. U vlastního nádoru jsme hodnotili jeho histopatologický typ, přítomnost hormonálních receptorů (estrogenových a progesteronových), mitotickou aktivitu (MIB1), přítomnost overexprese membránového receptoru HER2-neu, grading, rozměry vlastního tumoru a metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin pro stanovení stádia nádorového onemocnění dle TNM klasifikace.

Dispenzární péče probíhala formou ambulantních kontrol ve specializované poradně mléčné žlázy Chirurgické kliniky FN v Plzni a byla zahájena ihned po operaci, resp. po skončené onkologické léčbě. Pacientky byly v 1. roce po operaci vyšetřovány v 6měsíčních intervalech včetně sonografické kontroly, po 1. roce po operaci kromě klinického vyšetření následovala sonografie i mammografické vyšetření včetně restagingu (rtg plic, sonografie jater a scintigrafie kostí dle potíží nemocné). V dalším období byly nemocné kontrolovány podle stejného protokolu v 1ročních intervalech.

V případě kontrolní skupiny – K- jsme postupovali podle stejného protokolu, z krevních vzorků byly stanovovány stejné analyty ve stejných časových intervalech z důvodů kompatibility se sledovanou skupinou. U těchto žen spočívaly dispenzární kontroly v 1. roce po operaci v klinickém vyšetření v půlročním intervalu, z objektivních metod byla doplňována sonografie s ohledem na věkovou strukturu skupiny a lepší hodnotitelnost fertlilní žlázy touto

zobrazovací metodou. V dalších letech následovaly klinické i sonografické kontroly v 1ročních intervalech.

13.1 Chirurgická složka vědecké práce

Ženy s maligním i benigním onemocněním prsu zařazené do studie byly operovány na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Plzni chirurgy specializovanými na poli mammární chirurgie, vlastní dispenzární péče byla zajištěna Mammologickou poradnou Chirurgické kliniky. Objektivní vyšetřovací metody hodnotili lékaři Kliniky zobrazovacích metod Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Plzni.

Indikace k operaci respektovaly celosvětová doporučení pro léčbu karcinomu prsu. Časná stádia nádorů byla řešena parciální mastektomií, při nehmavných lézích byly nádory excidovány po předchozím předoperačním označení pomocí zobrazovací metody, kterou byly detekovány. V případě klinicky i sonograficky negativních uzlin byla indikována sentinelová biopsie, v případě jejího metastatického postižení dokončena disekce axily. V případě předoperačně suspektních axilárních uzlin byla primárně provedena disekce axily. U nádorů větších rozměrů, nepoměru velikosti prsu a nádoru, přání nemocné byla provedena mastektomie, dle postižení lymfatického aparátu se sentinelovou biopsií či disekcí axily.

Benigní léze byly řešeny exstirpací, bez operace na regionálních mízních uzlinách.

Po chirurgické léčbě byly nemocné formou konzilia vyšetřeny klinickým onkologem a po zhodnocení rozsahu chirurgického výkonu a vlastností nádoru byla plánována adjuvantní onkologická léčba, kterou zajišťovalo ve většině případů Onkologické a radioterapeutické oddělení Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Plzni, některé pacientky byly na vlastní žádost předány na Onkologické oddělení krajských či okresních nemocnic.

13.2 Metodika laboratorního zpracování vzorků

Zpracování a analýza krevních vzorků byly zajišťovány Oddělením imunoanalýzy Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Plzni.

Uvedené faktory byly stanovovány pomocí klasických biochemických metod a multiplexové analýzy- tzv.xMAP technologie. Pro odběr vzorků byl použit odběrový systém krve VACUETTE[®] (Greiner Bio-One, Austria). Po vysrážení bylo separováno sérum centrifugací při 1300 g, vzorky séra byly rozaliquotovány. Pro speciální stanovení byly vzorky zamrazeny a skladovány při -70°C. Vzorky nebyly rozmrazeny více než jednou. Před multiplexovou analýzou byly alikvoty centrifugovány 5 min. při 10000g pro odstranění jakýchkoli sraženin.

Ve vzorcích séra byly imunoradiometrickou (IRMA) metodou stanoveny hladiny IGF-1 (Immunotech - a Beckman Coulter Comp., ČR), IGFBP-3 (*DiaSource Immunoassays, Belgie*), TPA (DiaSorin, USA) a Monototal (IDL Biotech AB, Švédsko). Dále byly stanoveny hladiny CEA a CA15-3 automatizovanou chemiluminiscenční imunoanalýzou na přístroji UniCel DxI 800 (Beckman Coulter, USA). Hladiny cytokinů HGF, Leptin, EGF, TGF a VEGF byly stanoveny pomocí multiplexové imunoanalýzy využívající xMAP technologii. K analýze byly využity komerčně dostupné soupravy Human Cytokine/Chemokine Milliplex MAP kit a Human Adipokine Panel (fy. Millipore Corporation USA). Multiplexová měření proběhla na přístroji Luminex 100 (Luminex Corporation, USA).

Principem multiplexové imunoanalýzy založené na xMAP technologii je vazba antigenu na protilátku navázanou na povrch spektrálně kódovaných mikrokuliček. Množství navázané látky je stanoveno díky druhé protilátce spojené s fluorescenční molekulou. Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru, který určuje jedním laserem spektrální kód kuličky (druh analytu) a druhým laserem množství navázané druhé protilátky (kvantitu analytu). Koncentrace jednotlivých analytů jsou vypočteny na základě standardních kalibračních křivek. Tento postup kombinující imunoanalýzu a průtokovou cytometrii umožňuje stanovení teoreticky až 100 analytů v jediném alikvotu vzorku o objemu 10–50 mikrolitrů. Tato technologie je dnes využívána v celosvětovém měřítku v projektech zaměřených na studium biomarkerů v onkologii.

13.3 Metodika histologického zpracování

Peroperační i definitivní histologické zpracování primárního nádoru, sentinelové uzliny a resekátu axily bylo prováděno ve spolupráci s Šiklovým patologicko-anatomickým ústavem Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Plzni.

Zpracování primárního nádoru

Zpracovávána je vždy celá rezistence, kdy absolutní minimum je 1 bloček na 1 cm v největším rozměru tumoru. Je-li to možné je odebírán jeden bloček na peroperační vyšetření (ten je pak dále zpracováván v definitivních řezech), 1 bloček pro imunohistochemii, 2 drobné vzorky jsou mrazeny v -80°C pro eventuální vyšetření molekulárně-genetické. Zbytek nádoru a okolí je zablokováno do definitivních řezů. Nádor je fixován ve formalínu a po automatické dehydrataci v tkáňovém procesoru zalit do parafínu. Materiál se fixuje 2 dny. Následně jsou řezy barveny automaticky hematoxalinem-eosinem. V imunostaineru Ventana-Roche je blok pro imunohistochemii barven s protilátkami proti estrogenovým a progesteronovým receptorům a proti Ki67 (MIB1). Status hormonálních receptorů se stanovuje semikvantitativně [123]. Jako pozitivní výsledek pro adjuvantní systémovou hormonální léčbu je považována hodnota 1% a vyšší. Stanovení Ki67 je podstatné pro hodnocení mitotické aktivity nádoru, jenž se vyjadřuje v procentech a představuje jeden z hlavních prognostických faktorů. Za nízkou mitotickou aktivitu je považován výsledek 0-20%, střední 20-40% a vysokou více než 40%. Barvení pro stanovení HER2-neu probíhá stejným způsobem a hodnotí se podle schématu: skóre 0,1+ negativní, skóre 2+ slabě pozitivní, skóre 3+ pozitivní. Výsledek 3+ se potvrzuje fluorescenční in situ hybridizací (FISH metodika) a pozitivní výsledek selektuje pacientky vhodné k adjuvantní biologické léčbě trastuzumabem (Herceptin). V případě skóre 2+ (slabě pozitivní) je FISH prováděna pouze na žádost klinika, zejména onkologa, a nově od 1.6.2011 v Národních referenčních laboratořích jsou vyšetřovány i nádory se skóre HER 0 a HER 1+(negativní) v případech, že jsou negativní hormonální receptory, nádory větší než 20 mm a nejedná se o typ mucinózní, tubulární a lobulární. V případě průkazu amplifikace genu pro HER2 – neu hovoříme o tzv. diskordantním typu nádoru a vymezuje se tím další skupina nemocných vhodných k biologické léčbě monoklonálními protilátkami proti HER2 (trastuzumab). Nádory byly klasifikovány dle WHO, grading duktálního invazivního karcinomu dle Nottinghamské klasifikace, duktální karcinom in situ (DCIS) dle van Nuyské klasifikace.

V praxi bylo využíváno peroperačního vyšetření resekátů primárního nádoru při prs zachovném chirurgickém výkonu, kdy od patologa bylo požadováno zhodnocení velikosti léze ve 3 rozměrech a odečtení čistých, event. těsných či pozitivních resekčních okrajů. Vyšetření bylo využíváno i s ohledem na jeho limitaci zejména při operaci lipomatózních prsů, velmi malých nepalpovatelných nádorů a vždy byl respektován odkaz na definitivní histologické zpracování. V případě radikálních výkonů typu mastektomie nebylo peroperační vyšetření požadováno a preparát byl ještě před transportem do patologické laboratoře fixován ve formalínu.

Praktický dopad závěru peroperačního vyšetření tumoru spočívá v možnosti event. rozšíření operačního výkonu v rámci jednoho operačního výkonu s ohledem na velikosti tumoru, jeho vztahu ke kůži, mamile a hrudní stěně. Případné pozitivní resekční okraje dovolují v jedné době provést reresekci a ušetřit nemocnou zátěže spojené s dalším operačním výkonem.

Vyšetření sentinelové uzliny

Po detekci a exstirpaci sentinelové uzliny, resp. uzlin bylo standardně využíváno jejich peroperačního vyšetření. Zpracovány jsou vždy všechny sentinelové uzliny, z každé polovina peroperačně, druhá polovina byla zabločkována a ponechána pro definitivní zpracování. Technika peroperačního zpracování spočívá v makroskopickém posouzení uzliny, její rozdělení, zmražení na -21°C a prokrájení po sérii s výškou řezu 2-3 mikrometry. Řezy jsou obarveny v rychlé modifikované řadě hematoxylinem a eosinem pro posouzení eventuální přítomnosti metastáz.

Vyšetření resekátu z axily

Resekát z axily získaný exenterací je před transportem do bioptické laboratoře fixován ve formalínu a ponechán na definitivní histologické zpracování. Manuálně jsou vyhledávány rezistence (vždy se vyšetřuje vše hmatné v tkáni), jednotlivé lymfatické uzliny jsou započteny a následně se zpracovávají standardním protokolem (viz zpracování primárního tumoru). Uzliny se krájí v dlouhých sériích vždy celé. Teoreticky je z hlediska patologické TNM klasifikace požadováno vyšetření alespoň 10 uzlin.

13.4 Metodika statistického zhodnocení, užití analýzy

Statistická signifikance byla stanovena na hranici $\alpha = 0.05$ (5%).

Pro měřené parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot diagramů. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách byly použity neparametrické testy (Kruskal-Wallisův test a Wilcoxonův test). V zásadě byly používány dvouvýběrové varianty těchto testů. Pro zjištění závislostí zkoumaných znaků, vzhledem k neggausovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Pomocí specifit a senzitivit dané metody jsme stanovovali referenční meze (cut off) mezi skupinami benigních a maligních pacientek pro každý parametr a tyto výsledky byly graficky zpracovány do tzv. ROC křivek. Byly zkoumány různé varianty - tedy jednotlivé skupiny benigních a maligních nádorů nebo jejich sdružené varianty.

Vliv jednotlivých proměnných na bezpříznakové přežití (DFI), resp. celkové přežití (OS) byl zkoumán užitím Kaplan-Maierovy metody odhadu distribuční funkce DFI, resp. OS. Pro zjištění vlivu předoperačních a pooperačních hladin markerů na délku DFI, resp. OS byly nejdříve pacientky rozděleny do 2 skupin na základě mediánu, resp. cut off zkoumaného markeru. Následně byly ve vztahu k DFI a OS počítány tzv. Log-rank test a Wilcoxon test, pomocí kterých byl testován vliv zkoumaného markeru na DFI, resp. OS. Na základě rozdělení pacientek dle mediánu, resp. cut off zkoumaného parametru ve vztahu k DFI, resp. OS bylo poté užitím Coxova regresního modelu stanoveno tzv. Hazard Ratio.

13.5 Popis souboru nemocných

Ve zkoumaném vzorku pacientek s maligním onemocněním je zařazeno 98 nemocných s primárně chirurgicky řešeným invazivním karcinomem mléčné žlázy. Průměrný věk v době stanovení diagnózy je 59,46 roku, z nichž u 6 nemocných (6%) byla diagnóza stanovena ve věku 40 let a méně. Z hlediska zastoupení histologického typu 82 pacientek (84%) mělo invazivní duktální karcinom, 13 (13%) invazivní lobulární karcinom a 3 (3%) mucinózní

karcinom. Pro volbu rozsahu chirurgického výkonu byly rozhodující velikost nádoru, poměr velikosti prsu a nádoru, přání nemocné a biologické vlastnosti nádoru z předoperační core cut biopsie. V 73 případech (74%) jsme provedli parciální resekci prsu, ve 25 případech (26%) byla provedena mastektomie. V axile se plánování operačního postupu řídilo klinickým a sonografickým vyšetřením, v případě nepřítomnosti patologických uzlin byla indikována sentinelová biopsie. V případě suspektních či pozitivních uzlin předoperačně jsme primárně přistoupili k disekci axily, stejně jako v případě peroperační pozitivní biopsie sentinelové uzliny. V praxi jsme v 54 případech (55%) provedli sentinelovou biopsii, ve 44 případech (45%) exenteraci axily z výše uvedených důvodů.

Z hlediska TNM klasifikace lze říci, že 68 nádorů (69%) dosahovalo velikosti do 2 cm (pT1), 28 nádorů (29%) bylo v rozsahu 2-5 cm (pT2) a 2 (2%) nádory byly ve svém největším průměru větší než 5 cm (pT3). 29 (30%) pacientek mělo metastatické postižení axilárních uzlin, z nichž 4 nemocné (14%) měly pozitivní pouze sentinelovou uzlinu, v jednom případě byla popsána mikrometastáza v sentinelové uzlině. Zbýlých 25 pacientek (86%) mělo po disekci axily pozitivní více než 1 uzlinu, v jednom případě při pozitivitě sentinelové uzliny na mikrometastázu. Všechny operované nemocné byly v době stanovení diagnózy dle stagingových vyšetření bez průkazu vzdálených metastáz (pM0).

Podle TNM klasifikace byly nemocné s karcinomem prsu rozděleny do klinických stádií nádorového onemocnění, klinické stádium I - podskupina G1, klinické stádium IIa – podskupina G2 a klinické stádium IIb a III – podskupina G3. K primární chirurgické léčbě u nemocných s lokálně pokročilým karcinomem (stádium III) bylo přistoupeno po konzultaci s onkologem a na přání nemocné s vědomím, že zvolený způsob léčby není zcela dle současných celosvětových doporučení léčby karcinomu prsu. Rozdělení do uvedených skupin bylo voleno na základě známé výrazně rozdílné prognózy jednotlivých stádií stran přežití bez nádorové recidivy i celkového přežití [40].

Podskupina - G1 - zahrnovala 54 pacientek (55%), podskupina - G2 - 25 pacientek (26%) a podskupina - G3 - 19 pacientek (19%). Celkově u 13 nemocných došlo k progresi nádorového onemocnění, u 1 pacientky byla zjištěna lokální recidiva současně s diseminací nádorového onemocnění. 10 pacientek ve sledovaném období zemřelo, 7 z nich na generalizaci karcinomu prsu, 2 pacientky na sepsi (infekční enterokolitida, pleuropneumonie) a 1 nemocná na jiné maligní onemocnění (maligní mezoteliom). Z hlediska rozložení do jednotlivých podskupin, v podskupině G1 zemřeli 3 pacientky, pouze jedna na generalizaci karcinomu prsu, 2 na sepsi, v

podskupině G2 zemřela 1 pacientka na jiné nádorové onemocnění, v podskupině G3 zemřelo 6 pacientek, všechny na generalizaci karcinomu prsu. V podskupině G1 došlo k progresi nádorového onemocnění u 3 pacientek, v podskupině G2 také u 3 pacientek a v podskupině G3 u 7 pacientek, u jedné z nich byla zjištěna současně lokální recidiva i vzdálená diseminace. Medián follow up ve skupině nemocných pacientek činil 28 měsíců.

V kontrolní skupině – K -nemocných s benigním onemocněním je zařazeno za příslušné období 25 pacientek, z nichž 14 (56%) bylo operováno pro fibroadenom, 4 (16%) pro papilom, 4 (16%) pro fibrózní mastopatii, 2 (8%) pro liponekrózu a 1 (4%) pro hamartom. Ve všech případech byla provedena prostá excize léze. U žádné z pacientek nebyla ve sledovaném období zjištěna recidiva benigního onemocnění ani vznik primární nádorové léze. Medián follow up činil 22 měsíců.

Tabulka 7 - Přehledná tabulka struktury zkoumaného souboru

	Skupiny podle biologické povahy léze (počet pacientek)	Podskupiny podle stádia nádorového onemocnění (počet pacientek)
Zkoumaná skupina	Maligní (98)	G1 (54)
		G2 (25)
		G3 (19)
Kontrolní skupina	Benigní (25)	-

14. Výsledky

Nejprve jsme se věnovali skupině pacientek s maligním onemocněním rozdělené do 3 podskupin (G1-G3). Mezi podskupinami jsme testovali četnosti anamnestických údajů a parametrů nádoru a snažili jsme se najít statisticky významné rizikové faktory z anamnézy a prognosticky nepříznivé vlastnosti nádoru.

Při zvolené hladině významnosti 5% byly statisticky významnými faktory nádoru mezi skupinami zjištěny grading tumoru, exprese estrogenových receptorů a mitotická aktivita vždy ve prospěch nepříznivých faktorů pro podskupinu G3. Statistická významnost na hladině 5% nebyla prokázána v případě exprese progesteronových receptorů a amplifikace HER2 genu, přesto ze statistické deskripce je patrná výrazně vyšší četnost nepříznivých faktorů v podskupině G3. Testováním mezi skupinami nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl četností jednotlivých histologických typů nádoru.

Tabulka 8 - Výsledky testování četností vlastností nádoru mezi skupinami

<i>Testovaný faktor</i>	<i>p - value</i>
Histologický typ nádoru	0,1260
Estrogenové receptory	0,0437
Progesteronové receptory	0,0692
Mitotická aktivita	0,0053
Expresce HER2-neu	0,1157
Grade	0,0370

Z anamnestických údajů je patrné, že v podskupině G3 se s výrazně vyšší četností vyskytuje onkologická pozitivita rodinné anamnézy a v podskupinách G2 a G3 pozitivní rodinná anamnéza na karcinom prsu. Relativně vyšší četnosti v podskupině G3 byly shledány u obézních pacientek (BMI >30), nerodících a nekojících pacientek, u žen s klimakteriem nad 50 let věku.

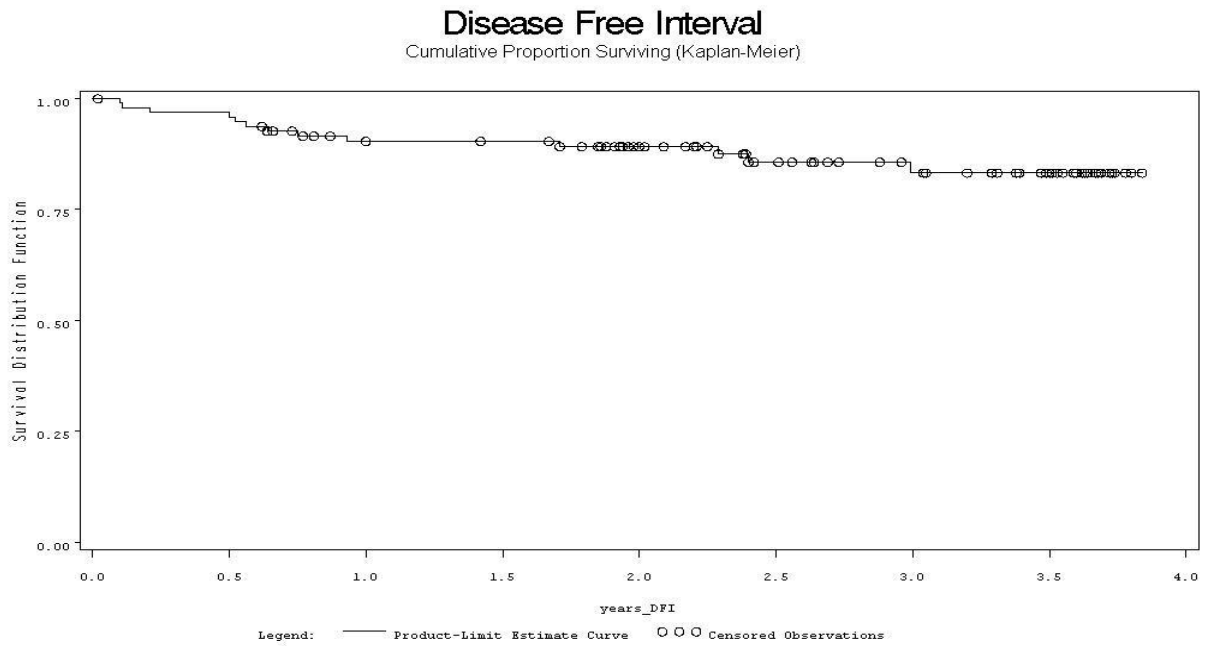
Tabulka 9 - Výsledky testování četností rizikových faktorů mezi skupinami

<i>Testovaný faktor</i>	<i>p- value</i>
<i>Karcinom prsu v rodinné anamnéze</i>	0,0813
<i>Onkologická pozitivita rodinné anamnézy</i>	0,0882
Onkologická pozitivita osobní anamnézy	0,1952
Diabetes mellitus v osobní anamnéze	0,5351
Hyperlipidemie v osobní anamnéze	0,3471
<i>Obezita</i>	0,6724
Kouření	0,2430
Hormonální substituční léčba	0,7477
Hormonální antikoncepce	0,6292
<i>Porody/nulliparita</i>	0,6683
Věk 1. porodu (cut off 30 let)	0,2849
<i>Kojení</i>	0,9498
<i>Klimakterium (cut off 50 let)</i>	0,6600
Druhostranný karcinom	0,6889
Věk stanovení diagnózy (cut off 40 let)	0,8731

Četnosti ostatních parametrů (věk v době stanovení diagnózy, výskyt jiného onkologického onemocnění v osobní anamnéze, druhostranný karcinom, diabetes mellitus a hyperlipidemie v osobní anamnéze, kouření, hormonoterapie, věk 1.porodu) nebyly mezi skupinami shledány jako statisticky významné a nebyla zjištěna přímá úměra mezi četností a pokročilostí nádorového onemocnění.

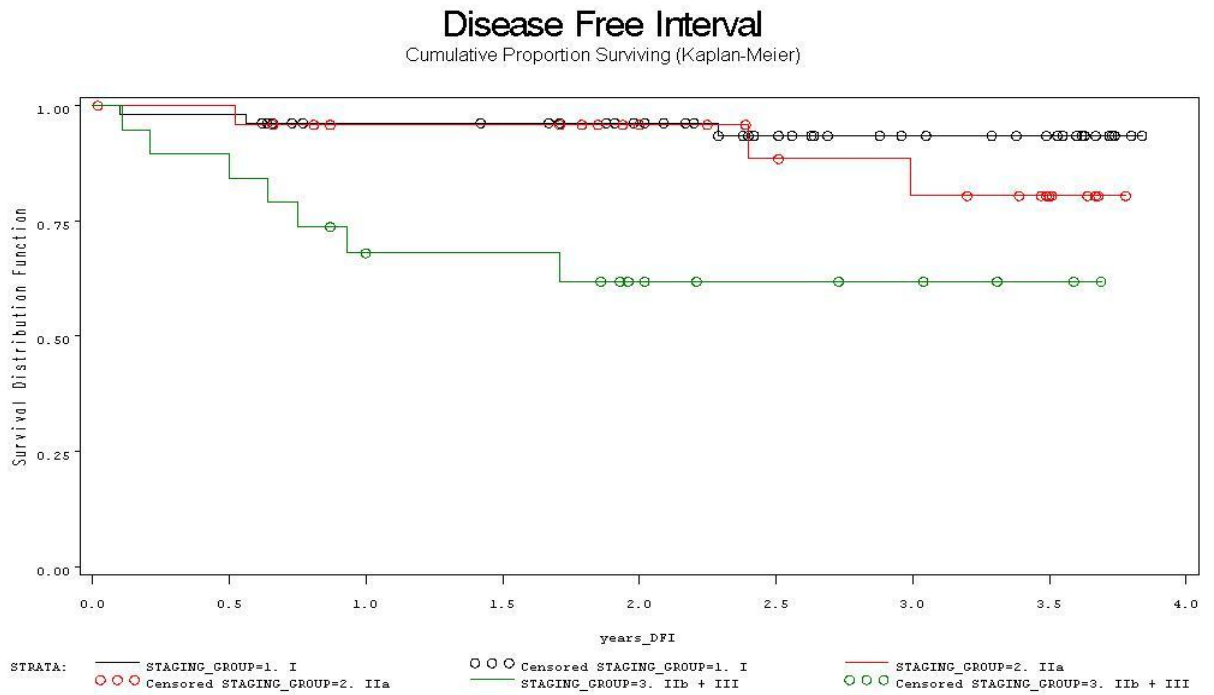
Přežití bez lokální či systémové recidivy (DFI) a celková délka přežití (OS) byly hodnoceny pro všechny pacientky s maligním onemocněním bez ohledu na podskupinové zařazení a poté v rámci jednotlivých podskupin.

Obrázek 3- Bezpříznakový interval pro všechny pacientky s maligním onemocněním

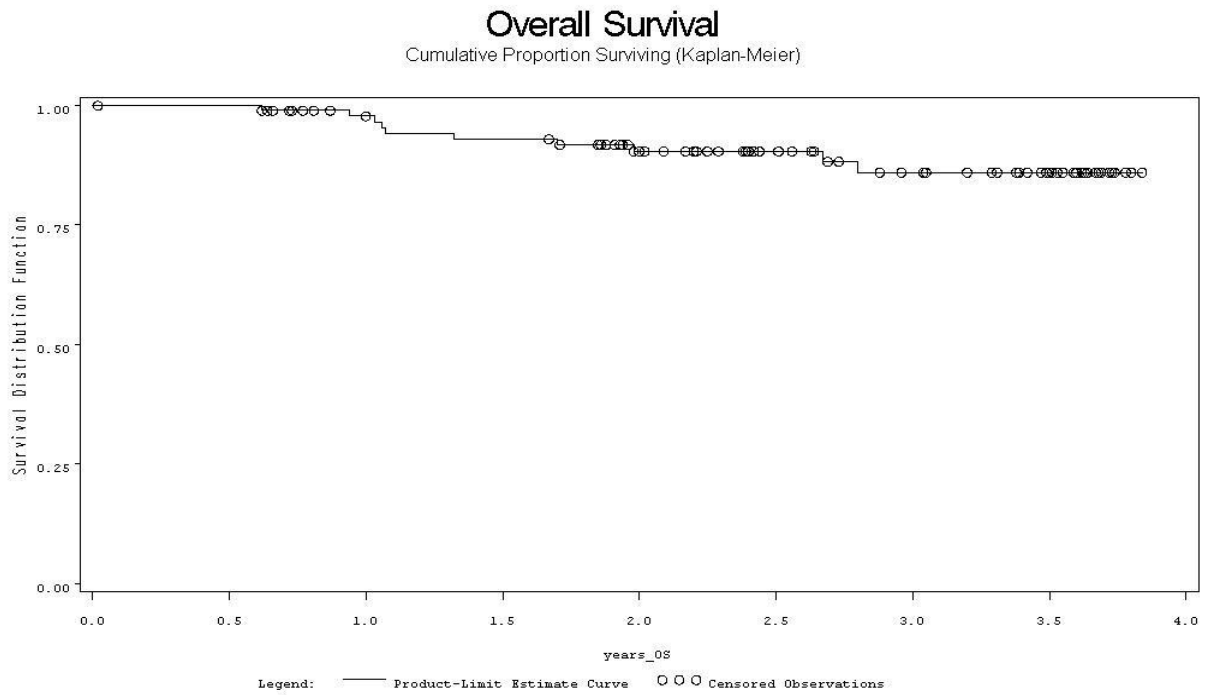


Legenda: censored = poslední kontrola, kdy nemocná žije nebo je bez progresse

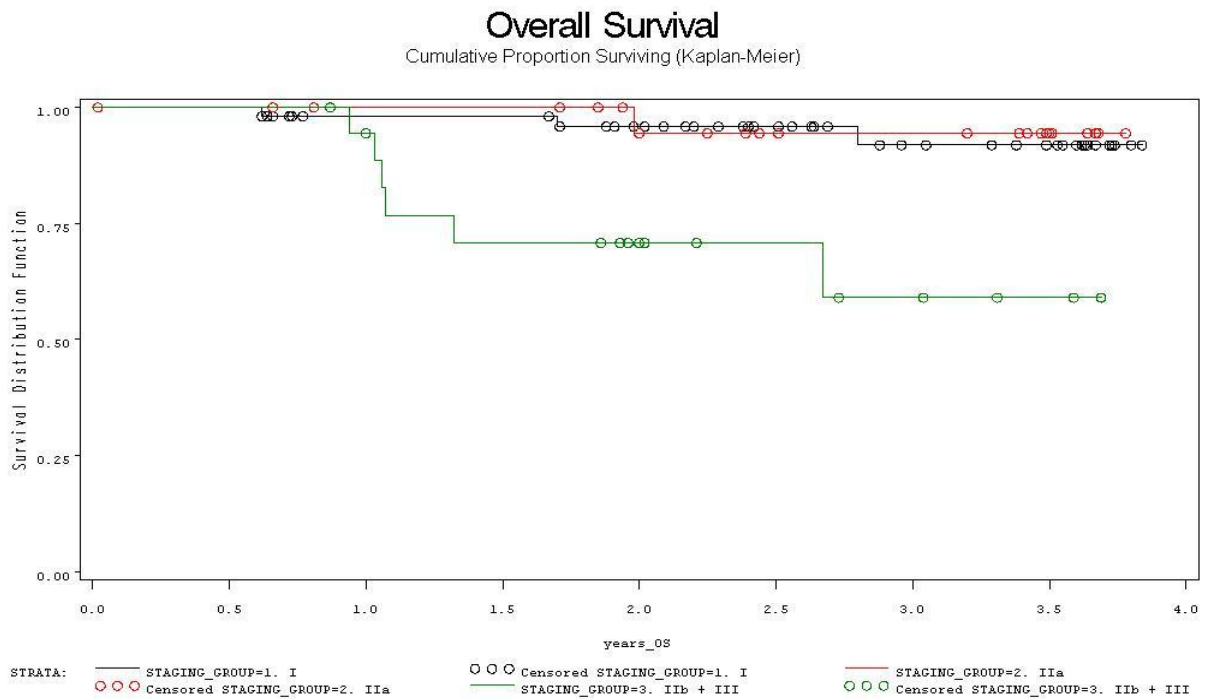
Obrázek 4 - Bezpříznakový interval podle stádia onemocnění (G1-G3)



Obrázek 5 - Celkové přežití pro všechny pacientky s maligním onemocněním



Obrázek 6 - Celkové přežití podle stádia onemocnění (G1-G3)



Statistickým testováním našeho souboru bylo ve shodě s literárními údaji potvrzeno, že staging, podle kterého byly pacientky rozdělené do jednotlivých podskupin, je základní prognostický faktor z hlediska progresu nádorového onemocnění a celkového přežití obecně.

Z našeho souboru zemřelo 10 pacientek, 7 (70%) z nich na generalizaci karcinomu prsu, 2 (20%) na sepsi při infekční enterokolitidě, resp. pleuropneumonii a 1 (10%) na jiné maligní onemocnění (maligní mezoteliom). U 13 pacientek došlo za sledované období k diseminaci nádorového onemocnění, u jedné z nich k současnému výskytu generalizace i lokální recidivy, 6 z nich díky paliativní onkologické léčbě přežívá. V podskupině G1 - jsme zaznamenali 3x progresi nádorového onemocnění a 3x úmrtí (1x na karcinom prsu, 2x na sepsi z výše uvedených příčin), v podskupině G2 - 3x progresi a 1 úmrtí (na jiné maligní onemocnění – maligní mezoteliom), v podskupině G3 - 7x progresi a 6x úmrtí (vždy na generalizaci karcinomu prsu). Vzhledem ke krátké době probíhajícího výzkumného projektu nelze z křivky disease free intervalu (DFI) ani overall survival (OS) určit medián progresu a celkového přežití, přesto lze jednoznačně říci, že statisticky významně horší prognózu vykazuje podskupina G3.

Porovnáme-li přežití bez progresu onemocnění podle klinických stádií v podskupinách G1-G3, lze říci, že v podskupině G1 přežívá 1 rok bez progresu 96%, resp. 95% a 68% v podskupině G2 a G3, 2 roky v podskupině G1 96%, resp. 95% a 61% v podskupině G2 a G3, 3 roky v podskupině G1 93%, resp. 80% a 61% v podskupině G2 a G3 (Tabulka 10).

Tabulka 10 - DFI ve zkoumaném souboru

Roky	G1	G2	G3
1 rok	96%	95%	68%
2 roky	96%	95%	61%
3 roky	93%	80%	61%

Porovnáme-li přežívání pacientek podle zařazení do podskupin G1-G3, 1leté přežití v podskupině G1 je 98%, resp. 100% a 94% v podskupině G2 a G3; 2leté přežití v podskupině G1 95%, resp. 94% a 70% v podskupině G2 a G3; 3leté přežití v podskupině G1 92%, resp. 94% a 59% v podskupině G2 a G3 (Tabulka 11).

Tabulka 11 - OS ve zkoumaném souboru

Roky	G1	G2	G3
1 rok	98%	100%	94%
2 roky	95%	94%	70%
3 roky	92%	94%	59%

Průměrná doba vzniku recidivy, resp. generalizace od primární operace je 12,77 měsíce (rozpětí 1-48 měsíců).

I. Prediktivní význam růstových faktorů a nádorových markerů stanovovaných předoperačně a časně pooperačně pro kratší přežití (OS) a pravděpodobnost progresse onemocnění (DFI)

Při zvolené hladině významnosti 5% byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi podskupinami v hladinách TPA, CEA, Monototalu a HGF. Rozdíly hladin ostatních markerů a růstových faktorů (IGF-1, IGFBP-3, TK, CA 15-3, Leptin, EGF, TGF a VEGF) nebyly shledány jako statisticky významné (Tabulka 12).

Tabulka 12 - Výsledky testování RF a NM mezi skupinami

<i>RF</i>	<i>p – value</i>
IGF1	0,3217
IGFBP-3	0,7669
Leptin	0,3194
HGF	0,0350
EGF	0,2423
TGF	0,9497
VEGF	0,7378
<i>NM</i>	<i>p – value</i>
TK	0,3967
TPA	0,0017
CA 15-3	0,4805
CEA	0,0066
MonoTotal	0,0095

U všech nemocných s karcinomem prsu (N=98) byly stanoveny předoperační i časné pooperační hladiny sledovaných RF i NM. V rámci celého souboru byla zaznamenána progresse u 13 a úmrtí u 10 nemocných, z nichž 7 nemocných zemřelo v souvislosti s progresí karcinomu mléčné žlázy. Rozložení jednotlivých událostí je shrnuto v Tabulce 13.

Tabulka 13 - Přehled událostí ve skupině nemocných s karcinomem mléčné žlázy

	Počet nemocných ve skupině	Progrese	Úmrtí	Úmrtí na karcinom prsu	Počet žijících pacientek	% žijících pacientek
G1	54	3	3	1	51	94%
G2	25	3	1	0	24	96%
G3	19	7	6	6	13	68%
Celkem	98	13	10	7	88	90%

Z Tabulky 13 je patrné, že v podskupinách G1 a G2, tedy u časných karcinomů, je procento přežívajících nemocných výrazně vyšší než v podskupině G3 (lokálně pokročilé nádory). Pro statistické zhodnocení předoperačních a časných pooperačních hodnot RF a NM nebyl zjištěn dostatečný počet událostí, abychom mohli hodnotit jejich prognostický význam ve vztahu k celkovému přežití i přežití bez progresse v podskupinách G1 a G2. Na základě výpočtu pomocí Long-Rank a Wilcoxonova testu DFI a OS lze říci, že nemocné s lokálně pokročilými nádory (podskupina G3) vykazují statisticky významně kratší přežití bez progresse ($p=0,0008$) i kratší celkové přežití ($p=0,0011$). Grafické znázornění DFI a OS podle klinických stádií, resp. zařazení nemocných do podskupin vyjadřuje Obrázek 4 a 6 pomocí Kaplan-Meierovy křivky.

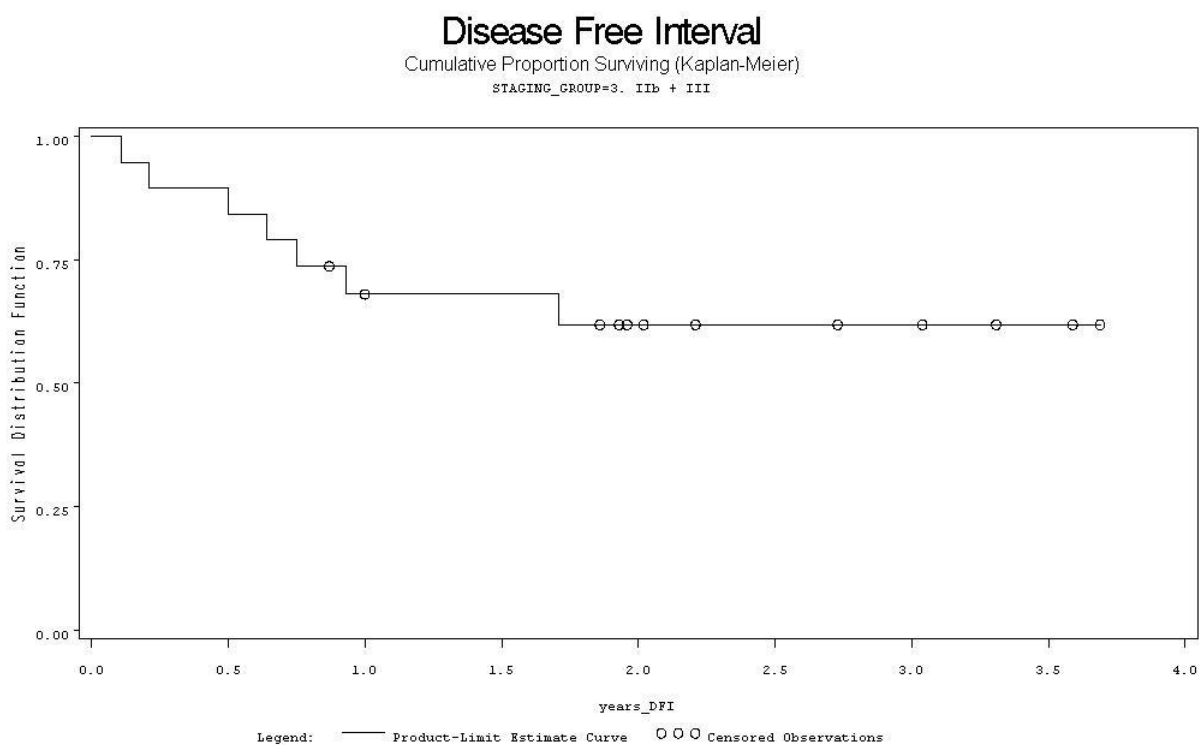
V podskupině G3 (klinická stádia IIb a III) byl zjištěn dostatečný počet událostí k hodnocení DFI a OS, které graficky znázorňuje Obrázek 7 a 20. Vzhledem ke krátké době probíhajícího výzkumného projektu není možné hodnocení mediánu přežití bez příznaků nemoci a celkového přežití, nicméně výsledky lze v rámci jednotlivých podskupin vyjádřit formou 1letého, 2letého, resp. 3letého přežití, což shrnují Tabulky 10 a 11.

Hodnocení prognostického významu sledovaných RF a NM mohlo být v našem souboru statisticky zhodnoceno pouze v rámci podskupiny G3 s dostatečným počtem událostí.

Vztah hodnot růstových faktorů a nádorových markerů k DFI v podskupině G3 (stádium I Ib a III):

Pro hodnocení vztahu růstových faktorů byly pacientky vždy rozděleny podle spočtené hodnoty mediánu příslušného RF na 2 skupiny. Pro hodnocení vztahu nádorových markerů byly nemocné rozděleny podle cut off (horní hodnota fyziologického rozmezí příslušného NM) také na 2 skupiny a pro každý RF a NM byla stanovena rizikovější skupina ve vztahu k mediánu, resp. cut off vzhledem k DFI. Pro rizikovější skupinu bylo spočteno tzv. Hazard Ratio (HR), kdy právě hodnoty 1 a vyšší lze považovat za rizikové stran nepříznivé prognózy.

Obrázek 7- Bezpříznakový interval v podskupině G3 (stádium I Ib+III)

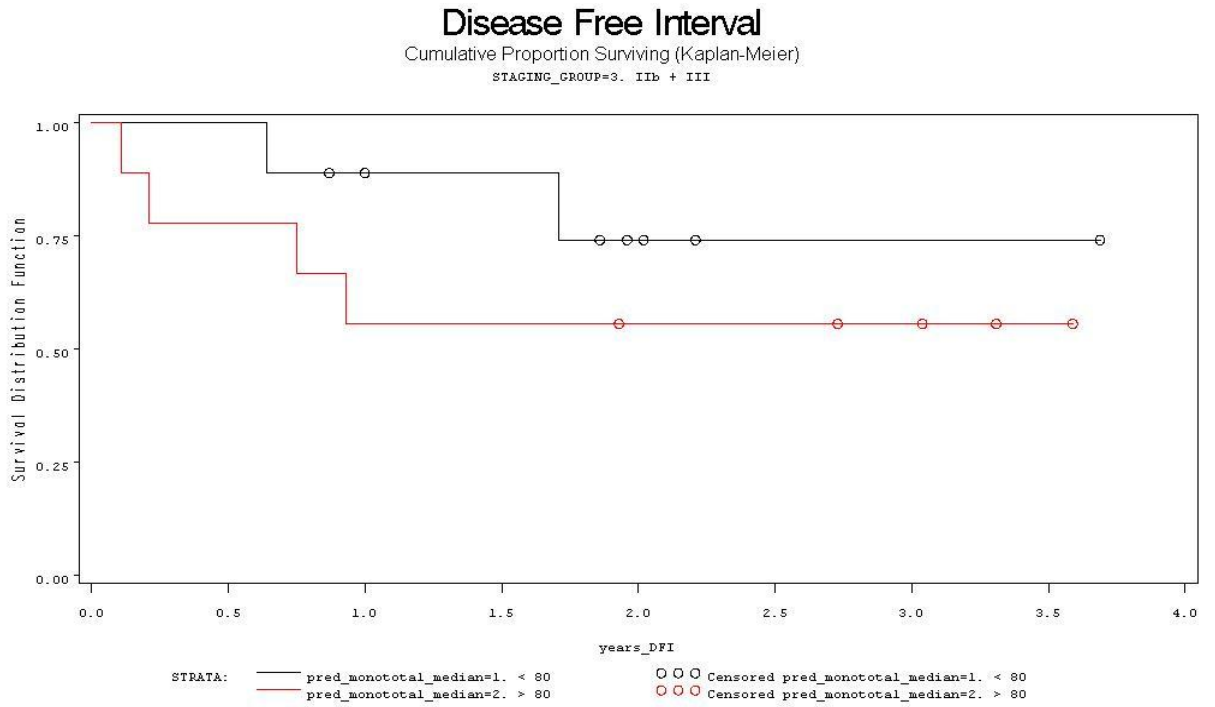


Z předoperačního náběru byla hodnota Hazard Ratio ≥ 1 zjištěna u NM s hodnotou vyšší než cut off u TK, TPA, CA 15-3 i CEA a vyšší než medián u MonoTotalu, u RF s hodnotou vyšší než medián u HGF a Leptinu (Tabulka 14).

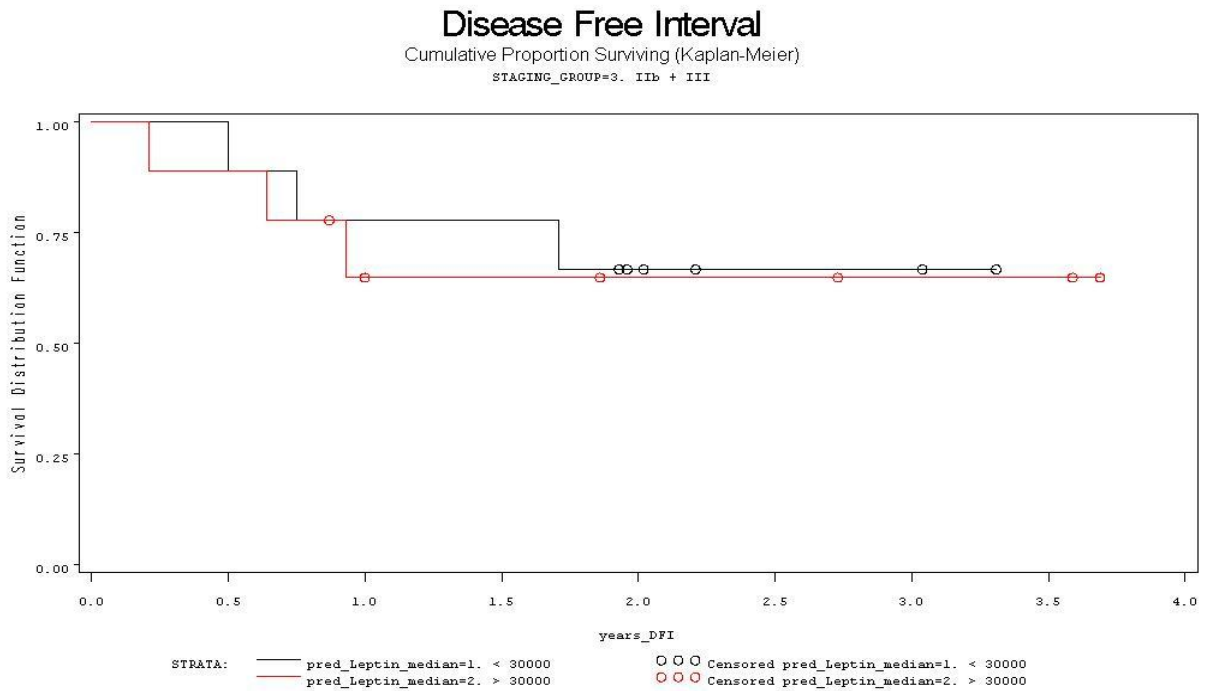
Tabulka 14- Hazard Ratio ve vztahu k DFI před operací

Růstový faktor	Medián RF	Riziková skupina dle mediánu	Hazard Ratio
IGF1	140	< 140	0,284
IGF-BP3	4000	< 4000	0,976
Leptin	30000	>30000	1,174
HGF	3500	>3500	2,413
EGF	300	<300	0,679
TGF	12	<12	0,811
VEGF	200	<200	0,941
Nádorový marker	Cut off NM	Riziková skupina dle cut off	Hazard Ratio
TK	8	>8	5,462
TPA	80	>80	3,513
MonoTotal	80 (medián)	>80	2,302
CA 15-3	24	>24	3,022
CEA	3	>3	1,033

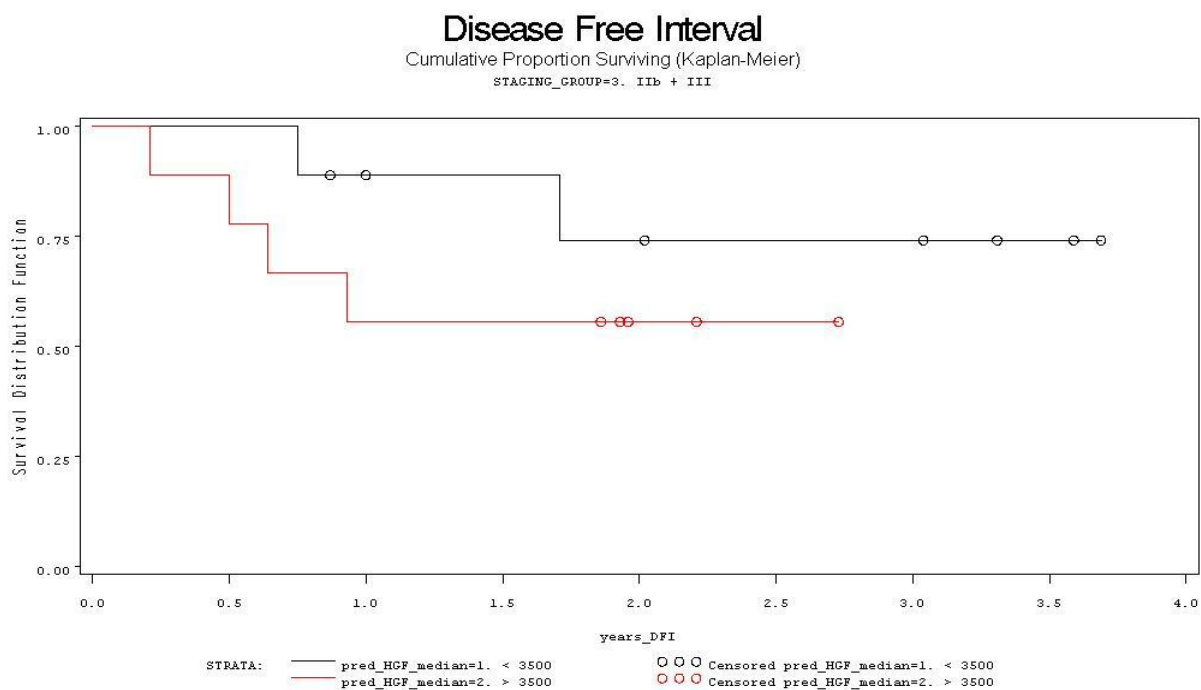
Obrázek 8- DFI podle předoperační hodnoty MonoTotalu (medián 80)



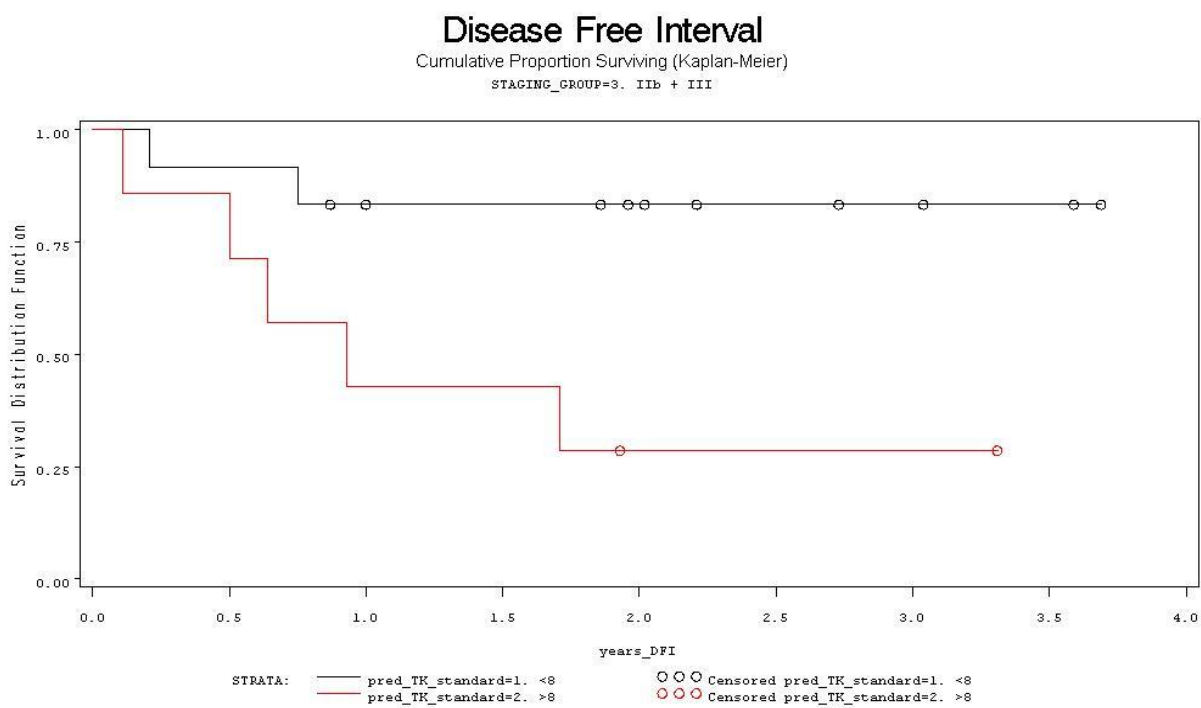
Obrázek 9 - DFI podle předoperační hodnoty Leptinu (medián 30000)



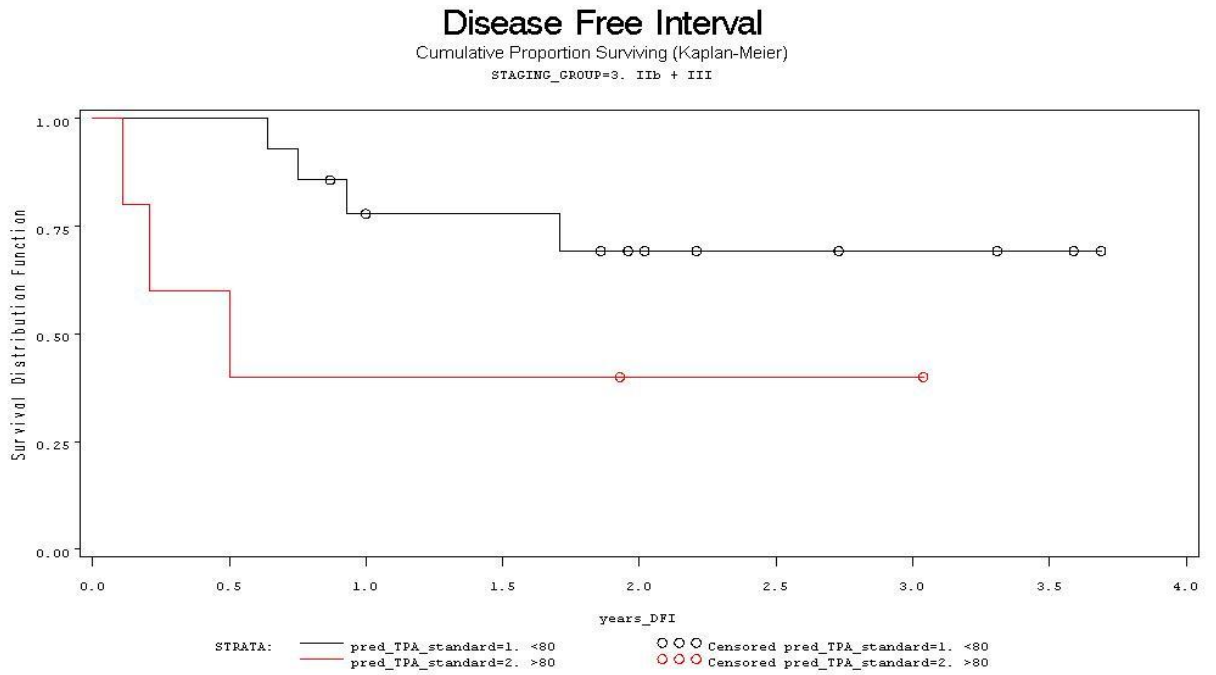
Obrázek 10 - DFI podle předoperační hodnoty HGF (medián 3500)



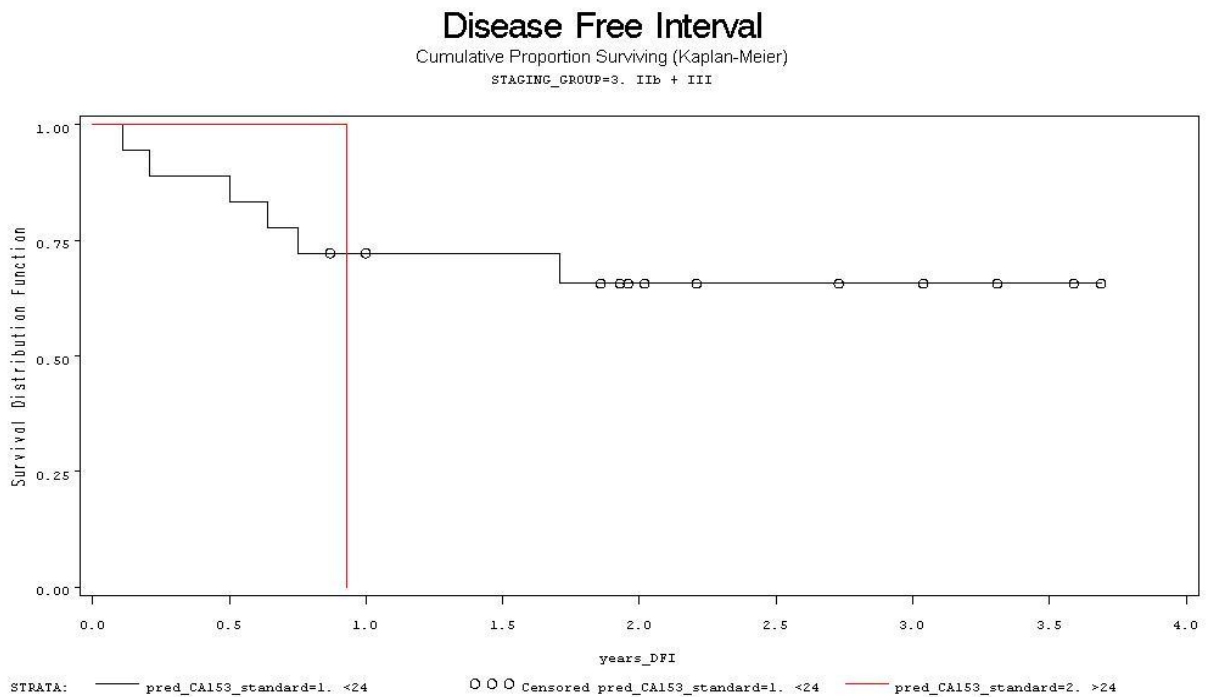
Obrázek 11 - DFI podle předoperační hodnoty TK (cut off 8)



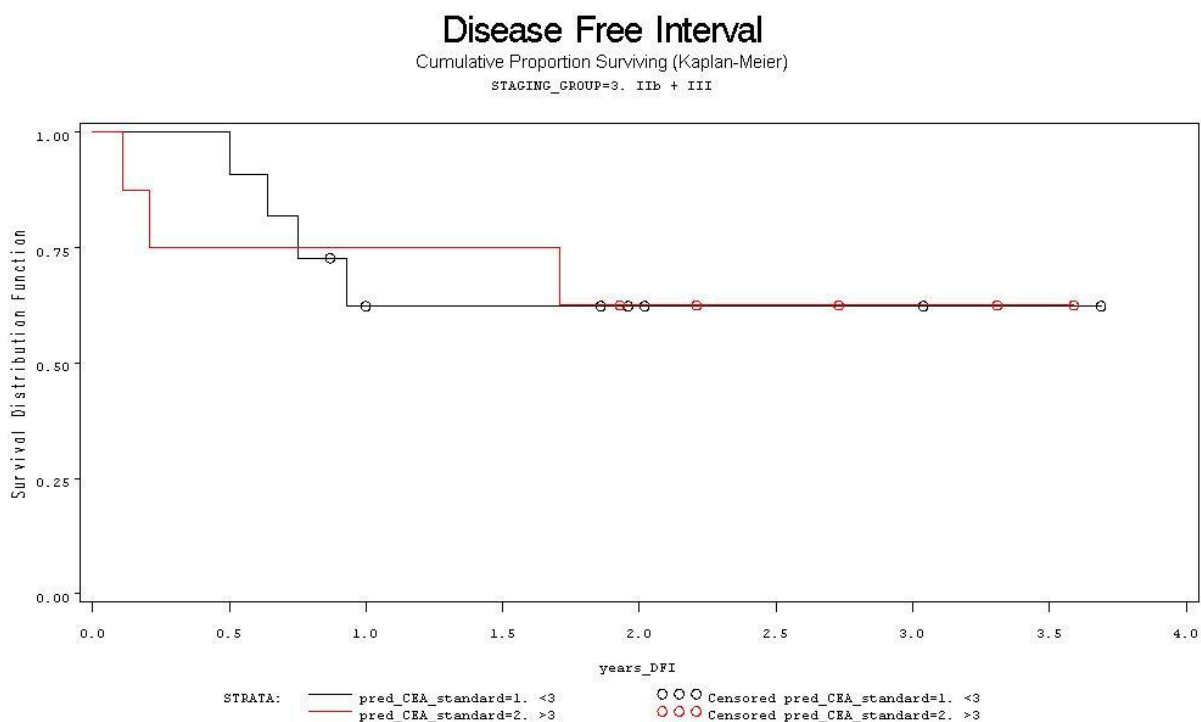
Obrázek 12 - DFI podle předoperační hodnoty TPA (cut off 80)



Obrázek 13 - DFI podle předoperační hodnoty CA 15-3 (cut off 24)



Obrázek 14 - DFI podle předoperační hodnoty CEA (cut off 3)



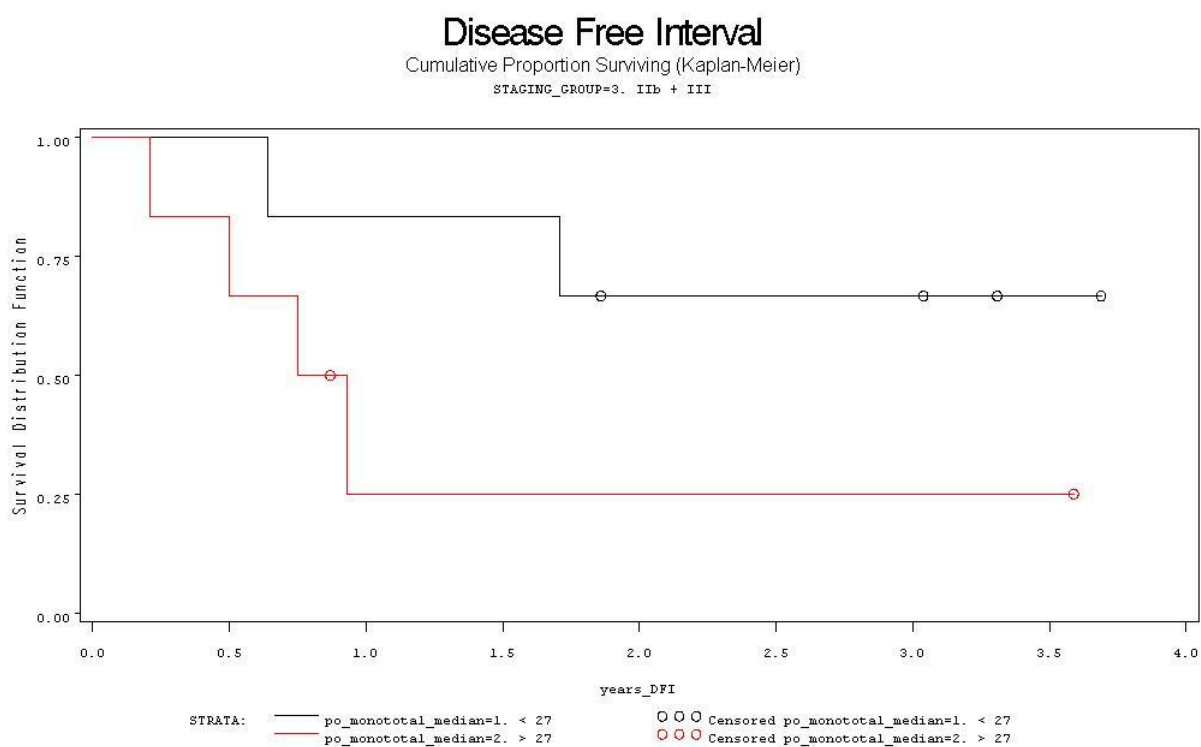
Z pooperačního náběru byla hodnota Hazard Ratio ≥ 1 zjištěna u NM s hodnotou vyšší než cut off u TK, TPA a vyšší než medián u MonoTotalu, u RF s hodnotou vyšší než medián u HGF a VEGF (Tabulka 15).

Tabulka 15- Hazard Ratio ve vztahu k DFI po operaci

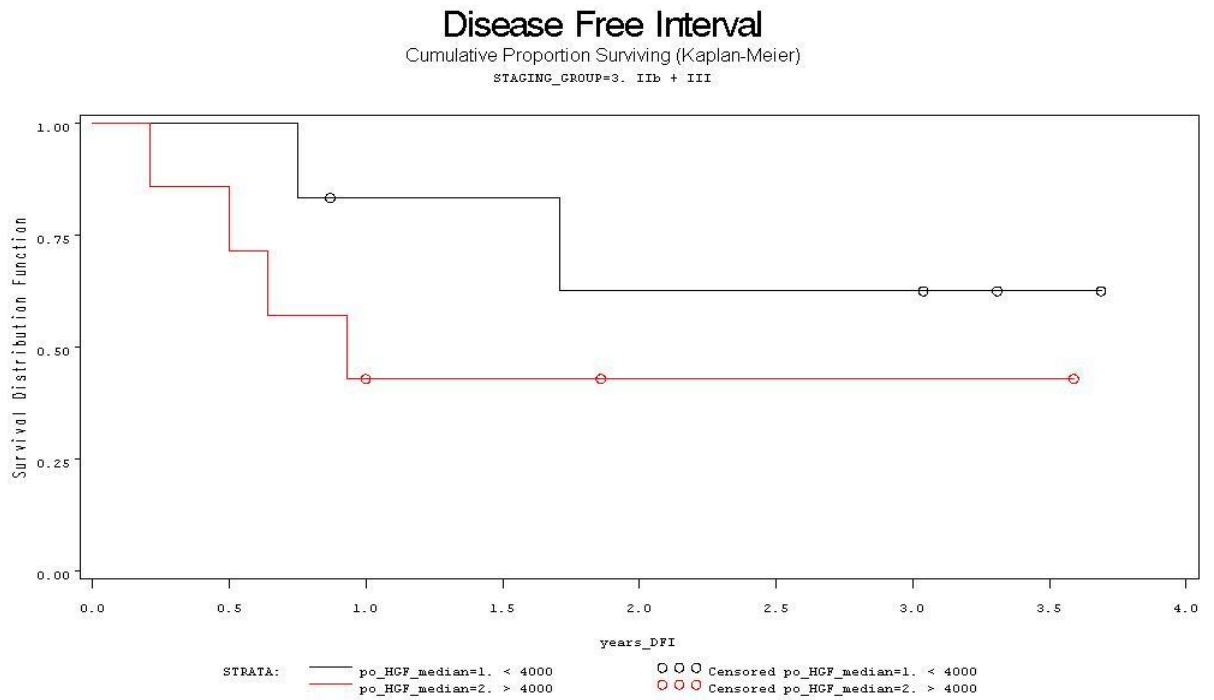
Růstový faktor	Medián RF	Riziková skupina dle mediánu	Hazard Ratio
IGF1	160	<160	0,340
IGF-BP3	3500	<3500	Nehodnotitelné
Leptin	26500	<26500	0,727
HGF	4000	>4000	2,444
EGF	310	<310	0,266
TGF	16	<16	0,497
VEGF	300	>300	2,351

Nádorový marker	Cut off NM	Riziková skupina dle cut off	Hazard Ratio
TK	8	>8	3,938
TPA	80	>80	8,603
MonoTotal	27 (medián)	>27	3,630
CA 15-3	24	>24	Nelze stanovit, všechny
CEA	3	<3	0,410

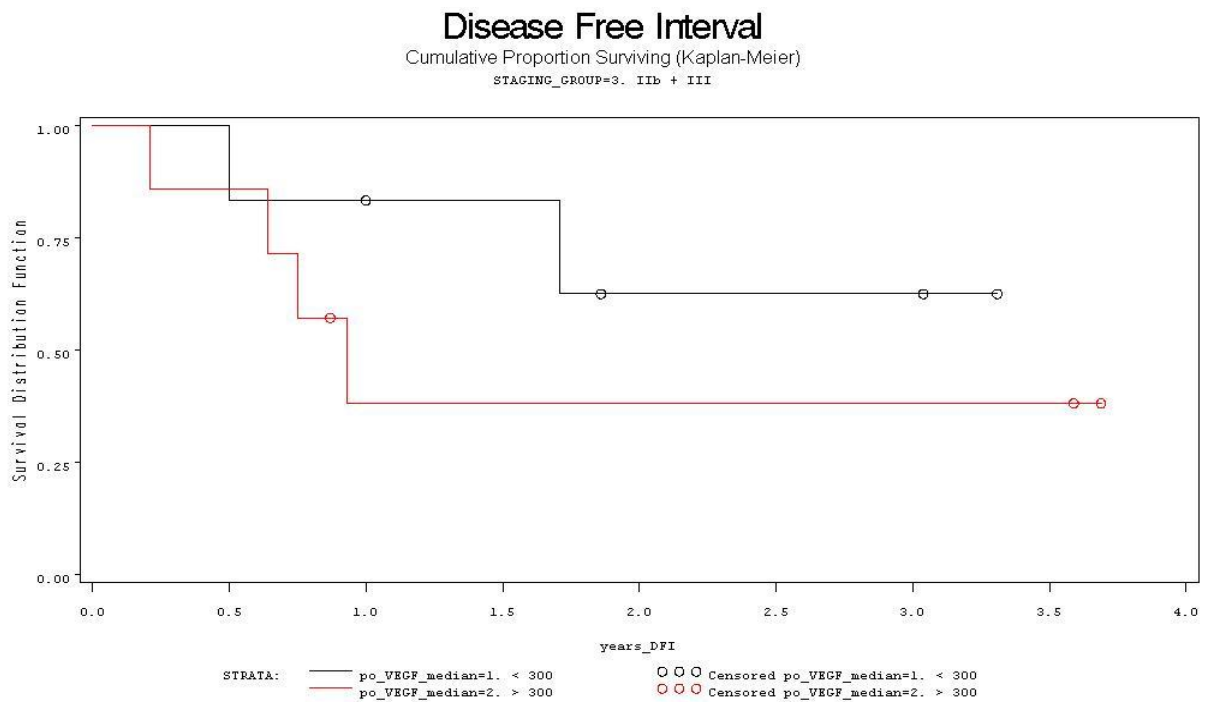
Obrázek 15 - DFI podle pooperační hodnoty MonoTotalu (medián 27)



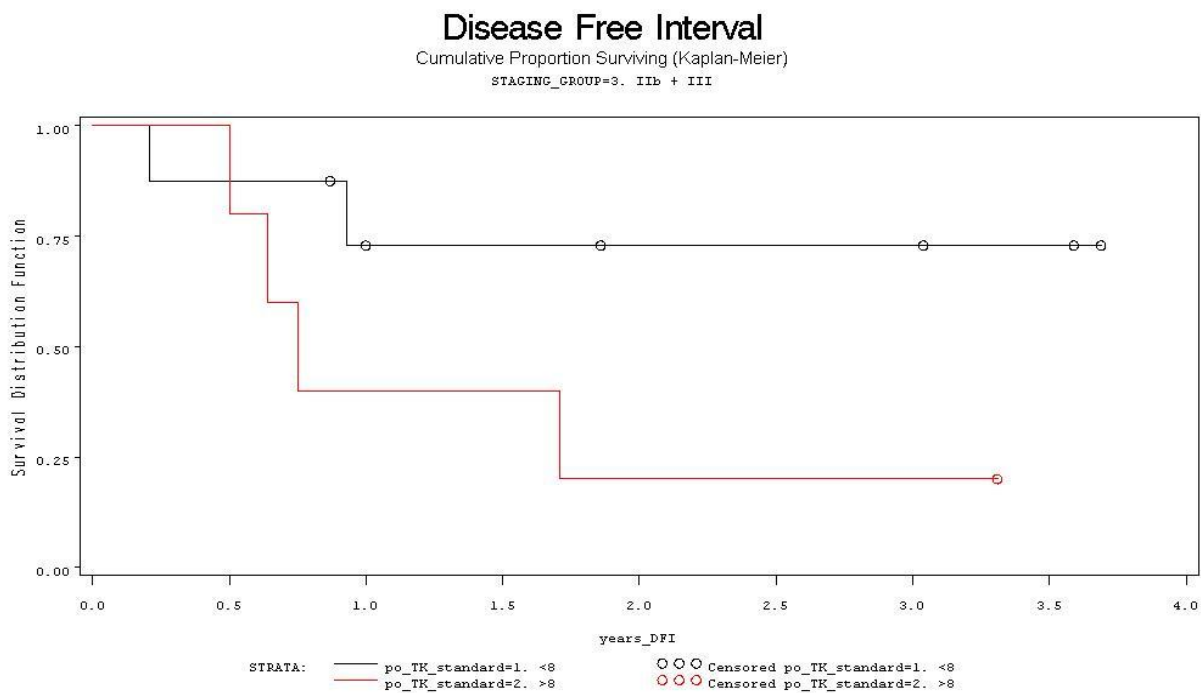
Obrázek 16 - DFI podle pooperační hodnoty HGF (medián 4000)



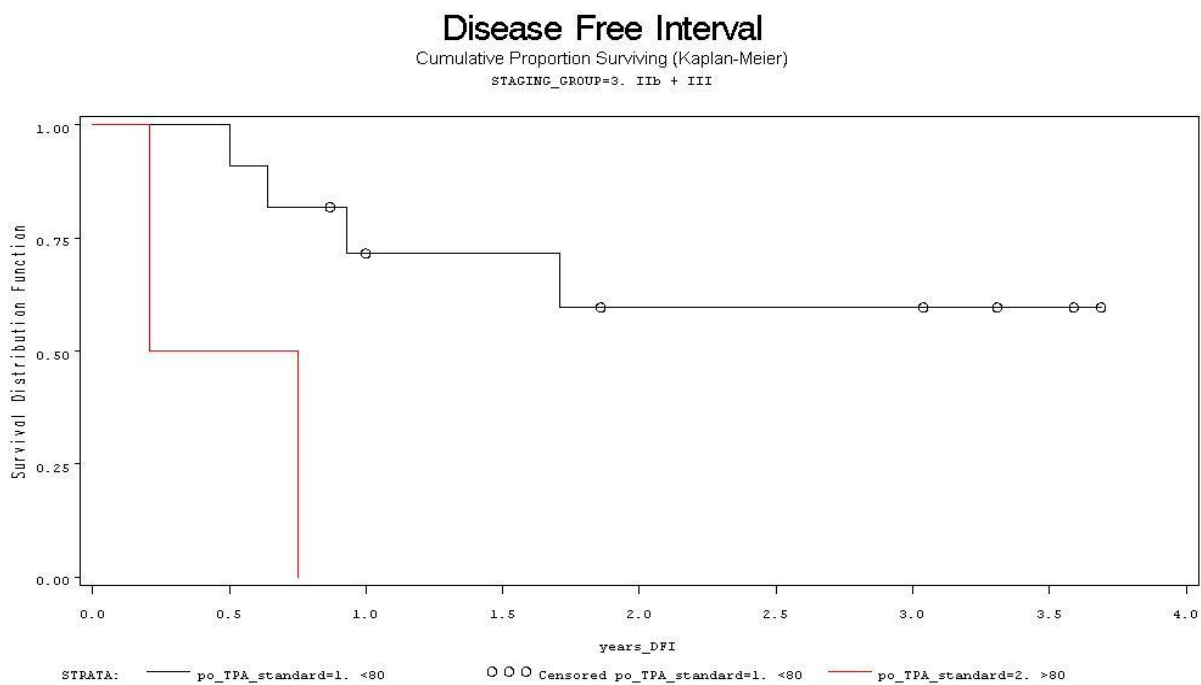
Obrázek 17 - - DFI podle pooperační hodnoty VEGF (medián 300)



Obrázek 18 - DFI podle pooperační hodnoty TK (cut off 8)



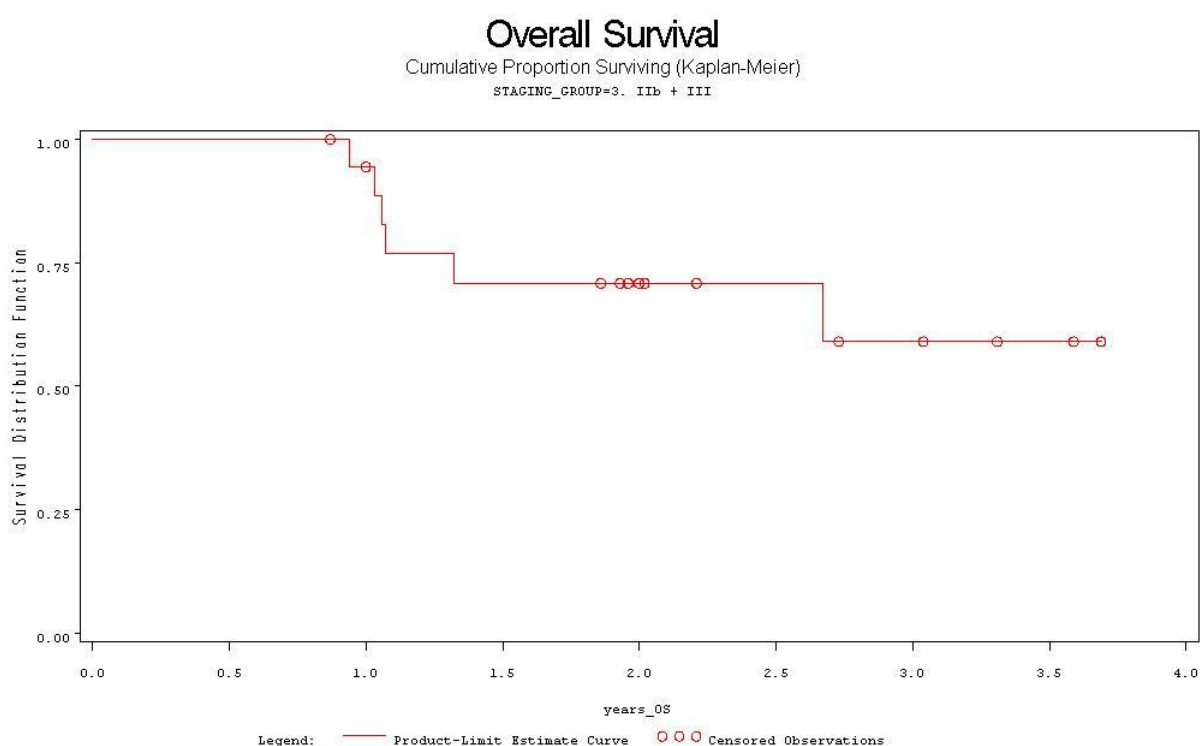
Obrázek 19 - DFI podle pooperační hodnoty TPA (cut off 80)



Vztah hodnot růstových faktorů a nádorových markerů k OS v podskupině G3 (stádium IIB a III):

Vztah růstových faktorů a nádorových markerů k celkovému přežití byl hodnocen stejným způsobem jako vztah k DFI. Pro výpočet HR ve skupině růstových faktorů a MonoTotalu byly pacientky děleny dle mediánu, pro hodnocení ostatních nádorových markerů dle cut off horní hladiny referenčního rozmezí.

Obrázek 20 - Celkové přežití v podskupině G3 (stádium IIB+III)

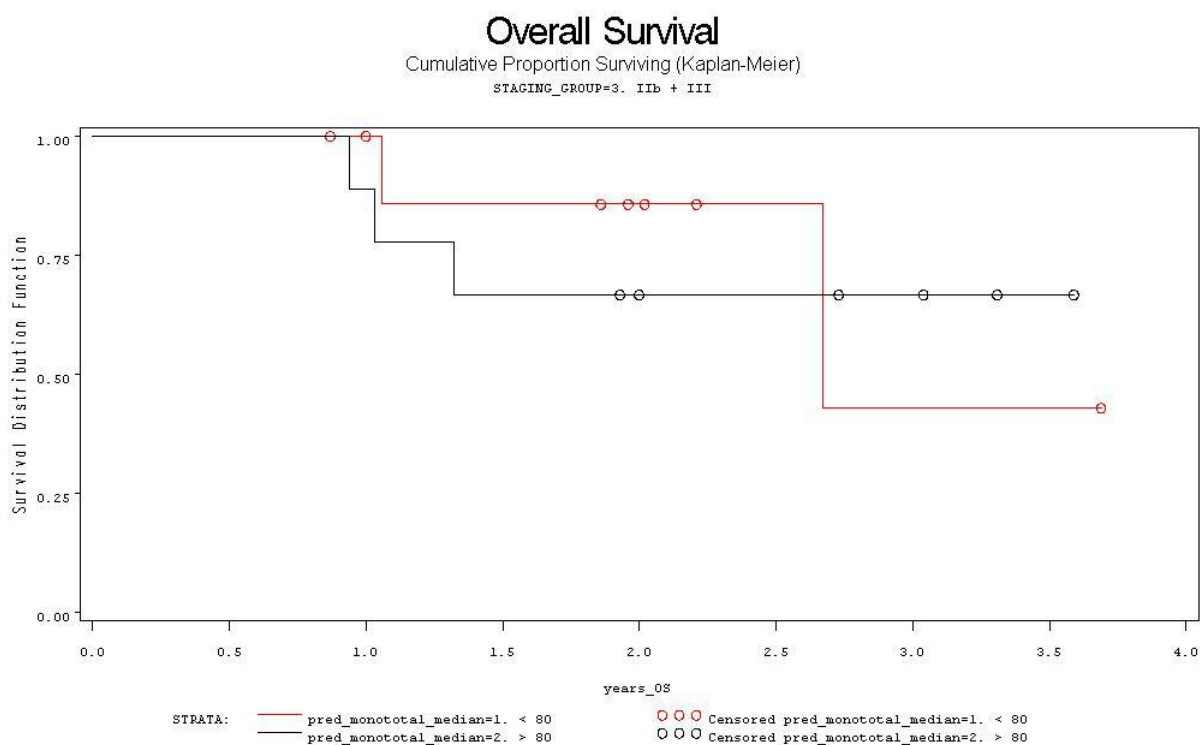


Z předoperačního náběru byla hodnota Hazard Ratio ≥ 1 zjištěna u NM s hodnotou vyšší než cut off u TK, TPA, CA 15-3 a vyšší hodnotou než medián u MonoTotalu, u RF s hodnotou vyšší než medián u HGF a VEGF, s hodnotou nižší než medián u TGF a EGF (Tabulka 16).

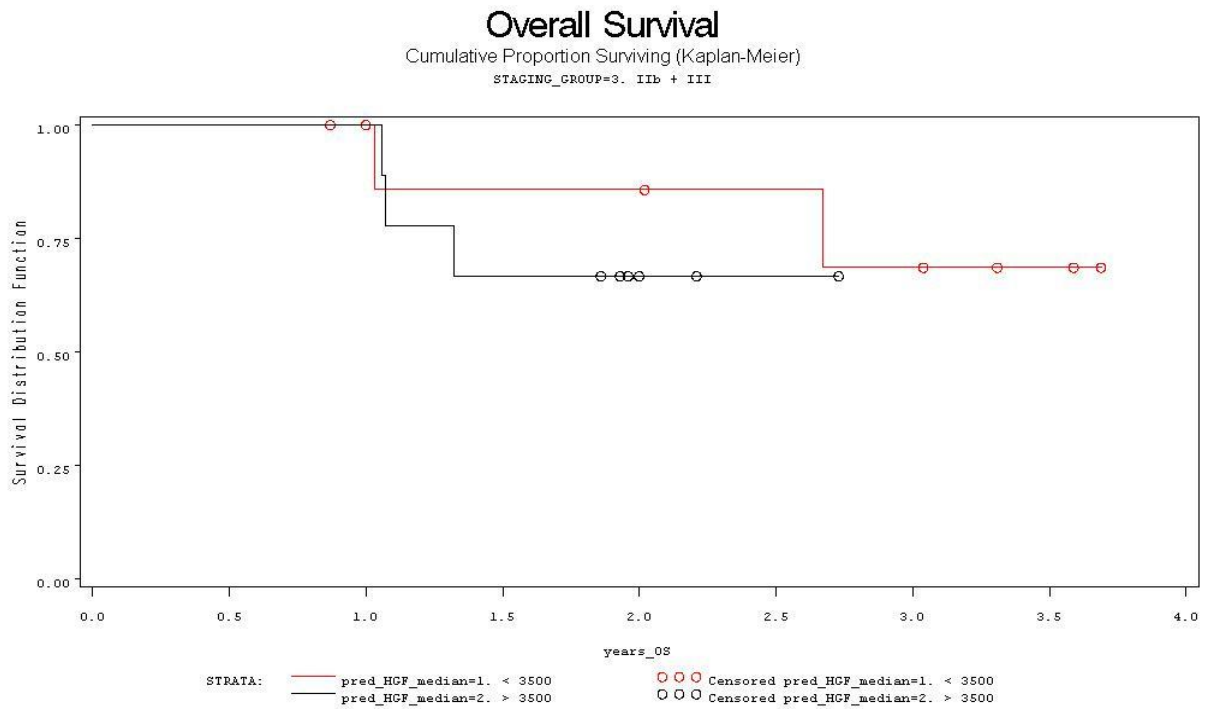
Tabulka 16 - Hazard Ratio ve vztahu k OS před operací

Růstový faktor	Medián RF	Riziková skupina dle mediánu	Hazard Ratio
IGF1	140	<140	0,312
IGF-BP3	4000	<4000	0,935
Leptin	30000	<30000	0,786
HGF	3500	>3500	1,673
EGF	300	<300	1
TGF	12	<12	1,1
VEGF	200	>200	1,9
Nádorový marker	Cut off NM	Riziková skupina dle cut off	Hazard Ratio
TK	8	>8	8,959
TPA	80	>80	1,537
MonoTotal	80(medián)	>80	1,213
CA 15-3	24	>24	3,509
CEA	3	<3	0,473

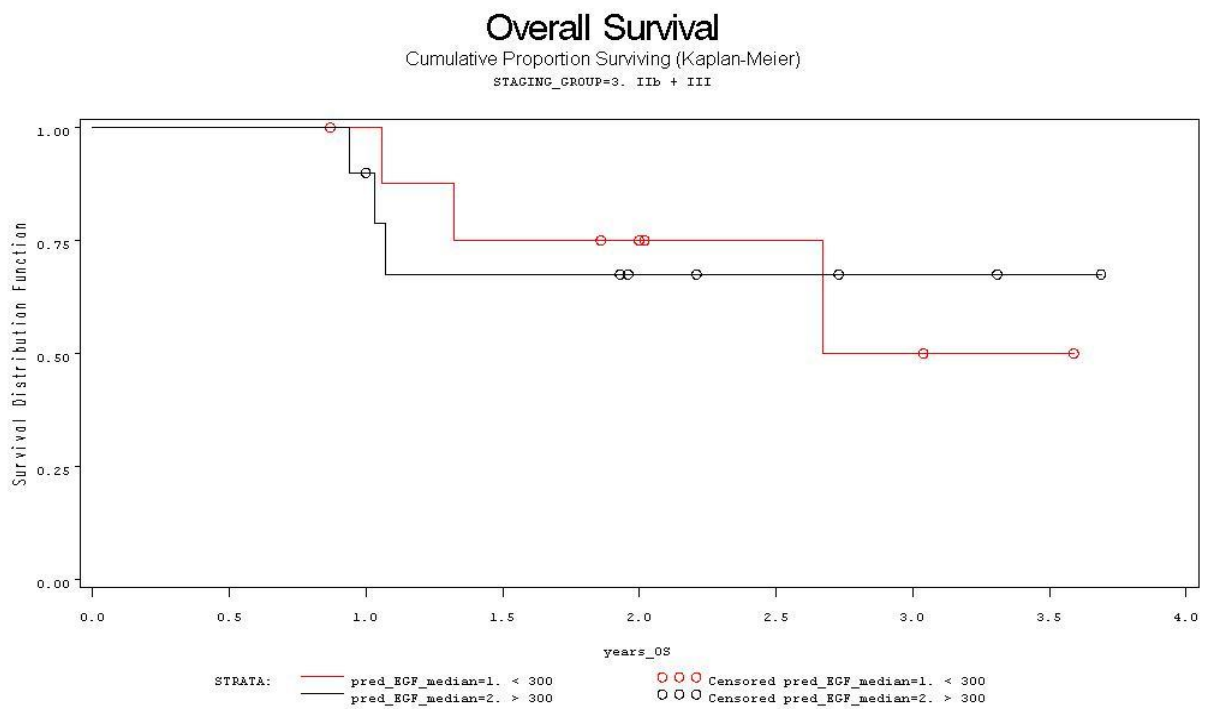
Obrázek 21 - OS podle předoperační hodnoty MonoTotalu (medián 80)



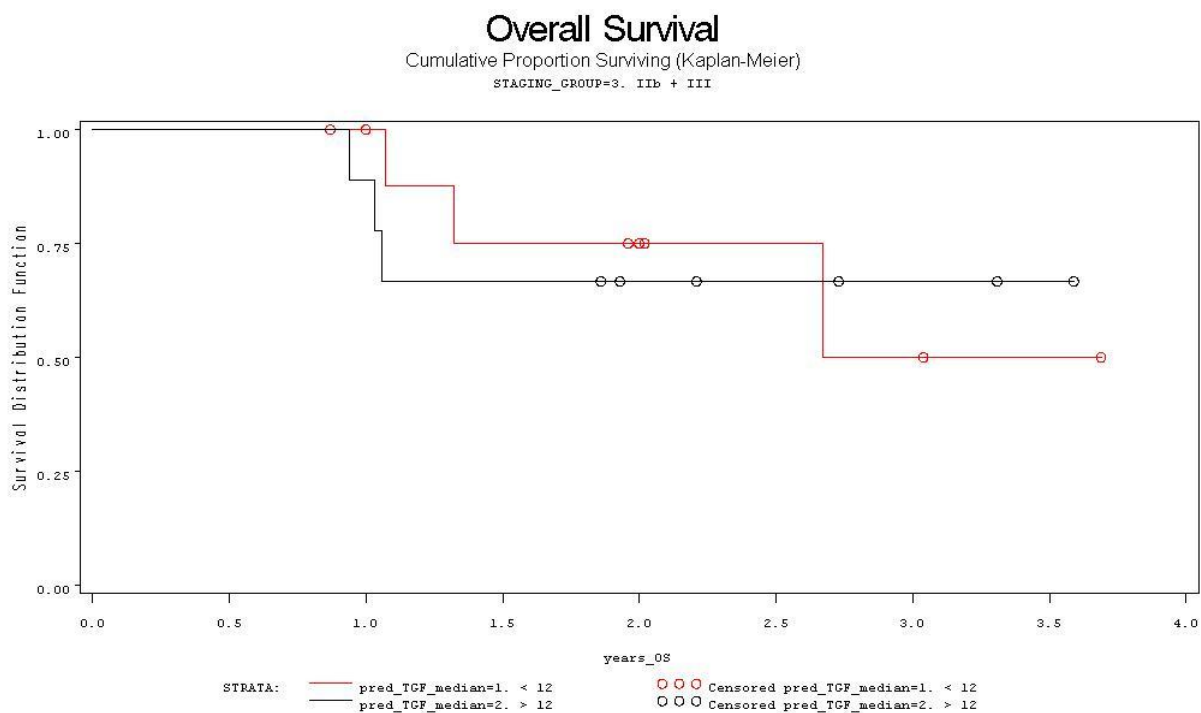
Obrázek 22 - OS podle předoperační hodnoty HGF (medián 3500)



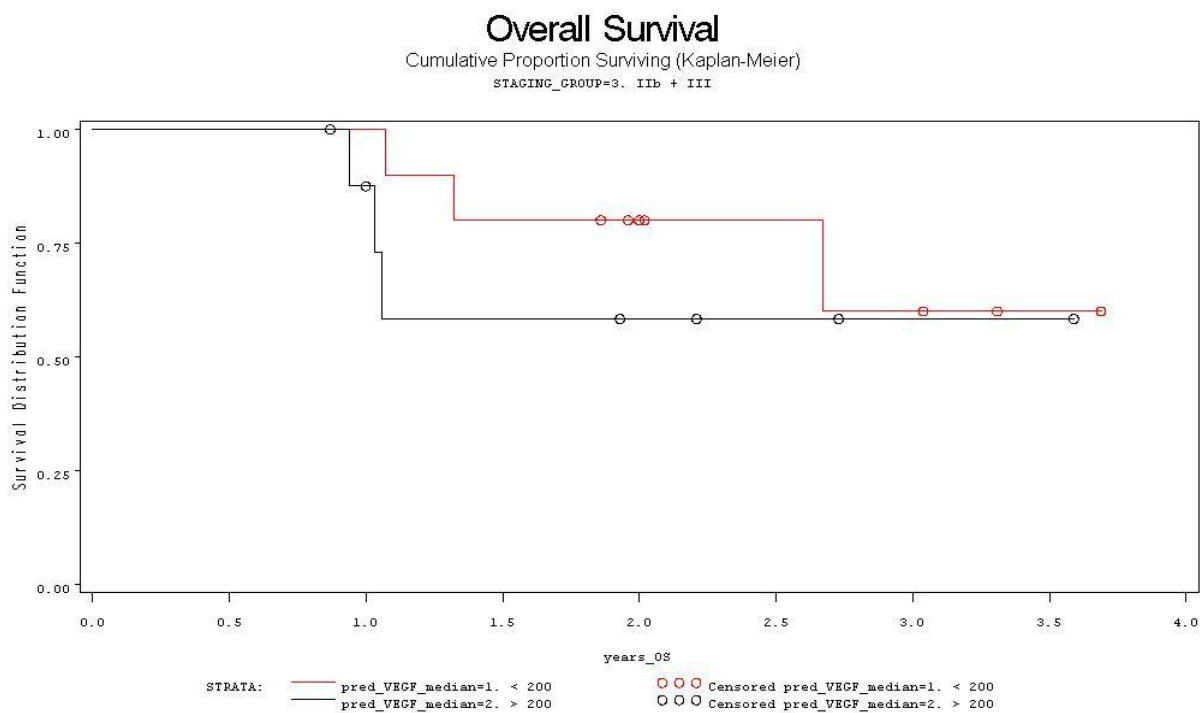
Obrázek 23 - OS podle předoperační hodnoty EGF (medián 300)



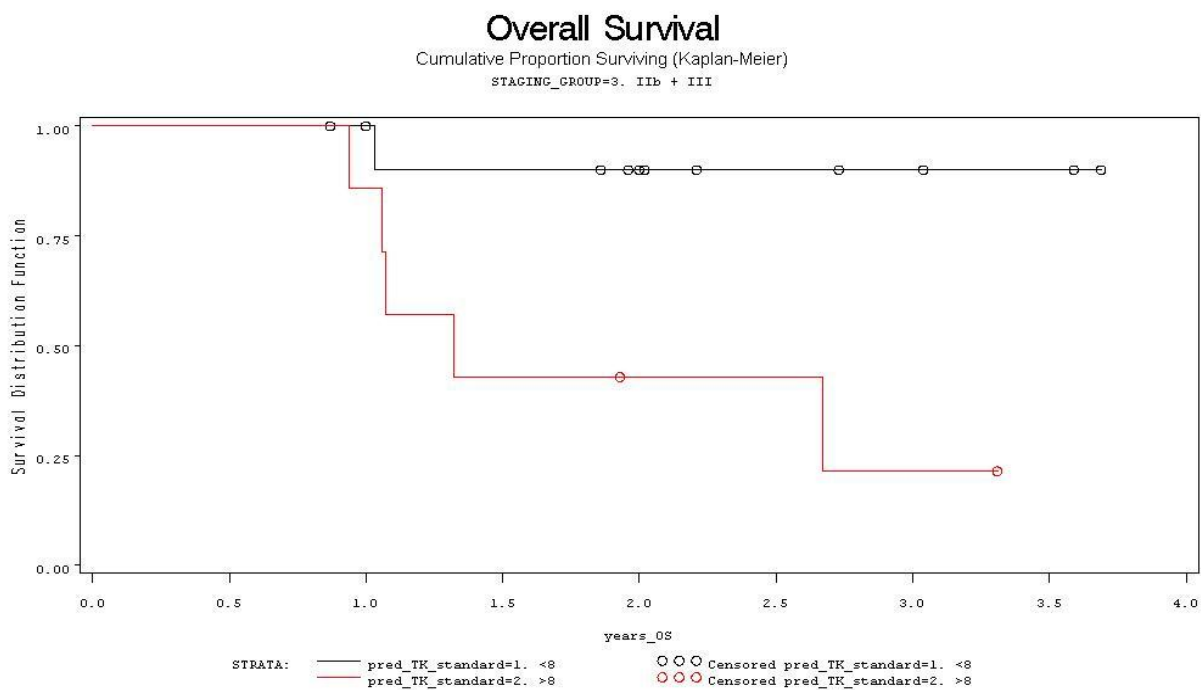
Obrázek 24 - OS podle předoperační hodnoty TGF (medián 12)



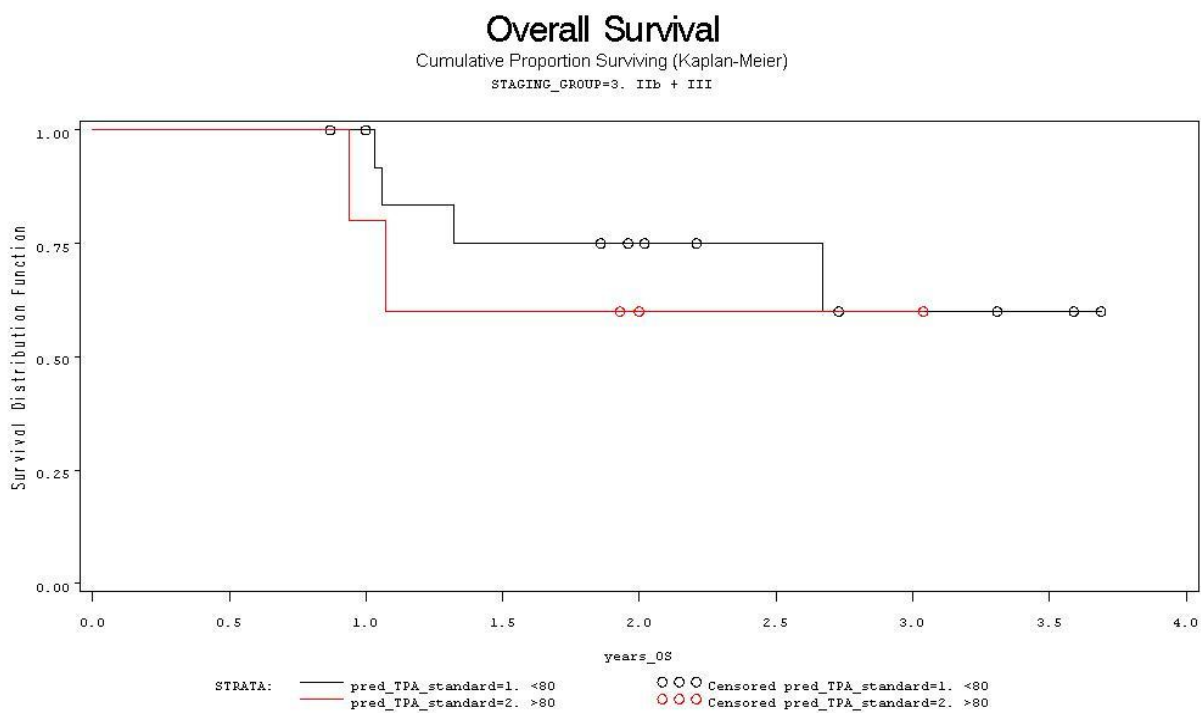
Obrázek 25 - OS podle předoperační hodnoty VEGF (medián 200)



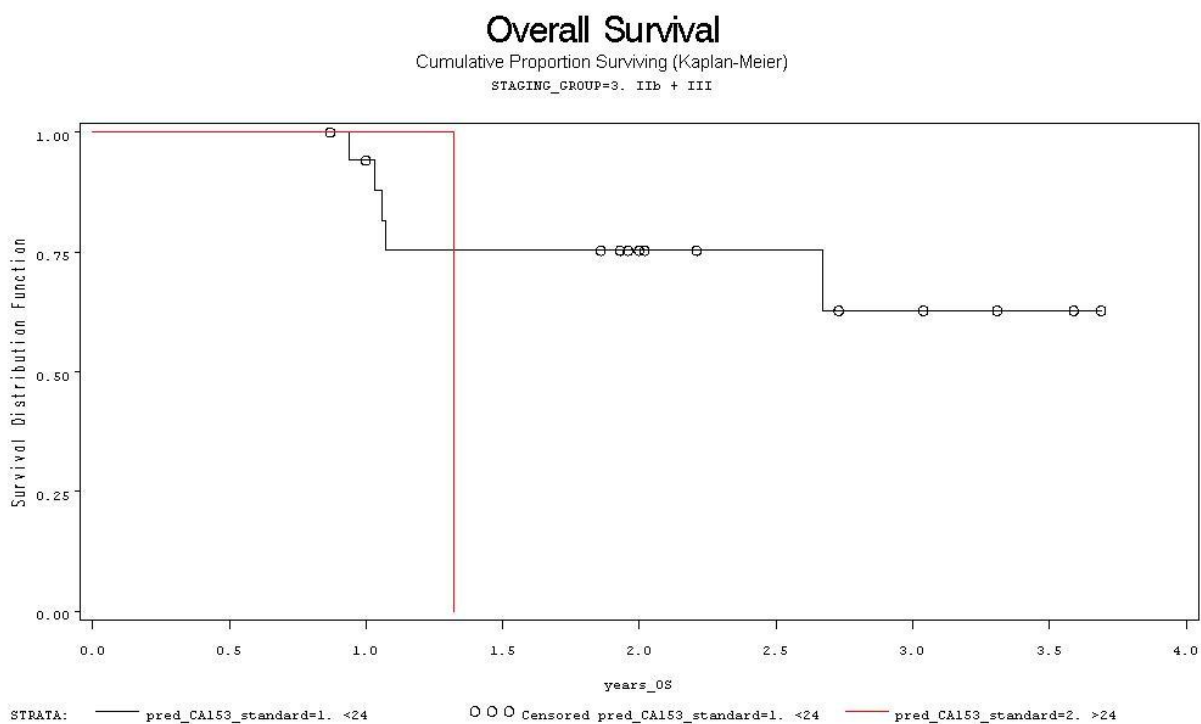
Obrázek 26 - OS podle předoperační hodnoty TK (cut off 8)



Obrázek 27 - OS podle předoperační hodnoty TPA (cut off 80)



Obrázek 28 - OS podle předoperační hodnoty CA 15-3 (cut off 24)



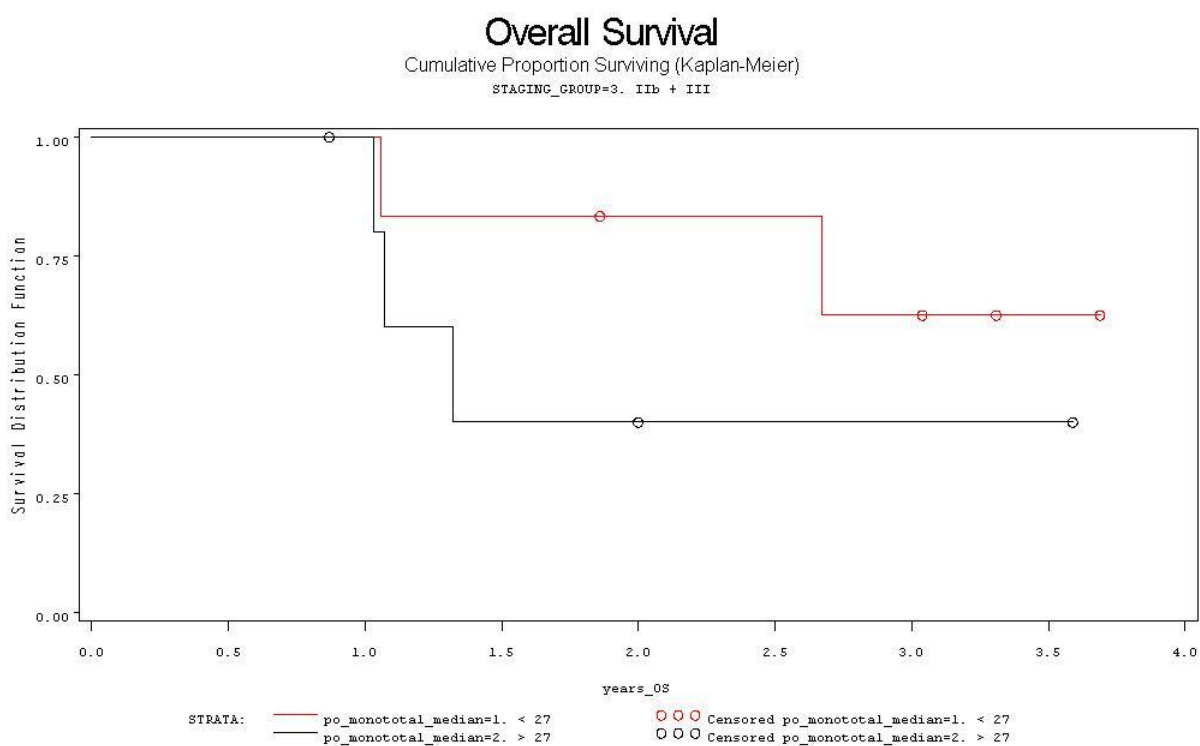
Z pooperačního náběru byla hodnota Hazard Ratio ≥ 1 zjištěna u NM s hodnotou vyšší než cut off u TK, TPA a hodnotou vyšší než medián u MonoTotalu, u RF s hodnotou vyšší než medián u HGF a VEGF (Tabulka 17).

Tabulka 17- Hazard Ratio ve vztahu k OS po operaci

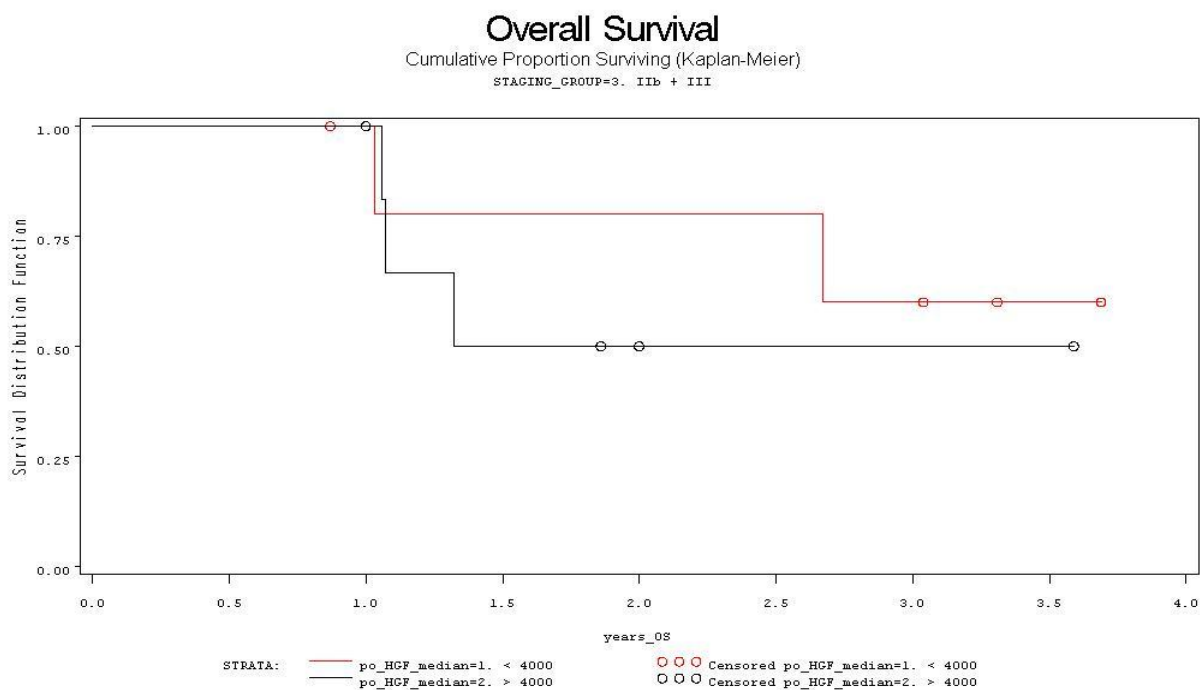
Růstový faktor	Medián RF	Riziková skupina dle mediánu	Hazard Ratio
IGF1	160	<60	0,461
IGF-BP3	3500	<3500	Nehodnotitelné
Leptin	26500	<26500	0,417
HGF	4000	>4000	1,704
EGF	310	<300	0,510
TGF	16	<16	0,870
VEGF	300	>300	1,647

Nádorový marker	Cut off NM	Riziková skupina dle cut off	Hazard Ratio
TK	8	>8	7,193
TPA	80	>80	2,262
MonoTotal	27(medián)	>27	2,606
CA 15-3	24	>24	Nelze stanovit, všechny
CEA	3	<3	0,394

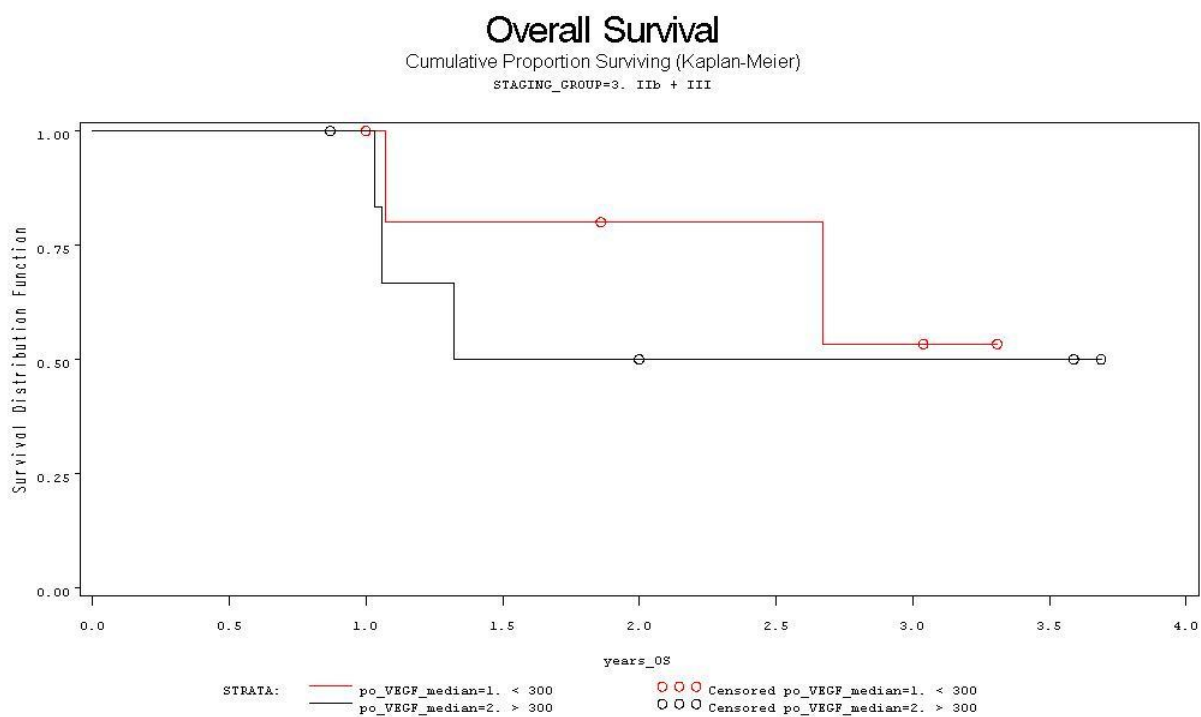
Obrázek 29 - OS podle pooperační hodnoty MonoTotalu (medián 27)



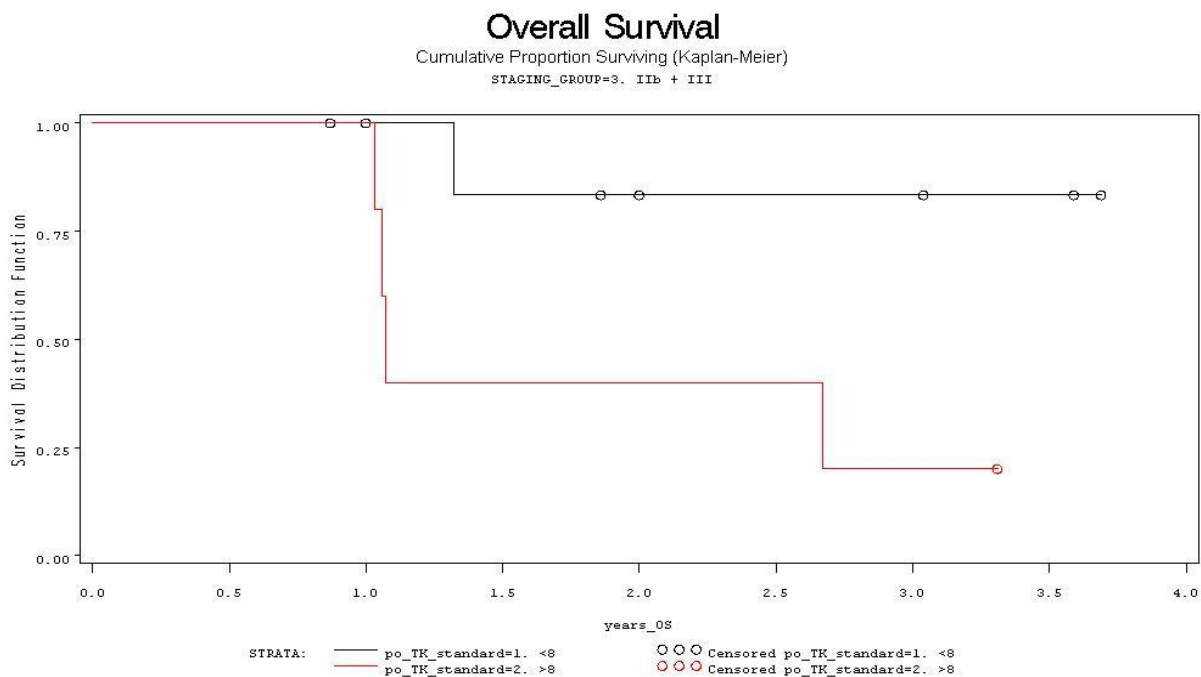
Obrázek 30 - OS podle pooperační hodnoty HGF (medián 4000)



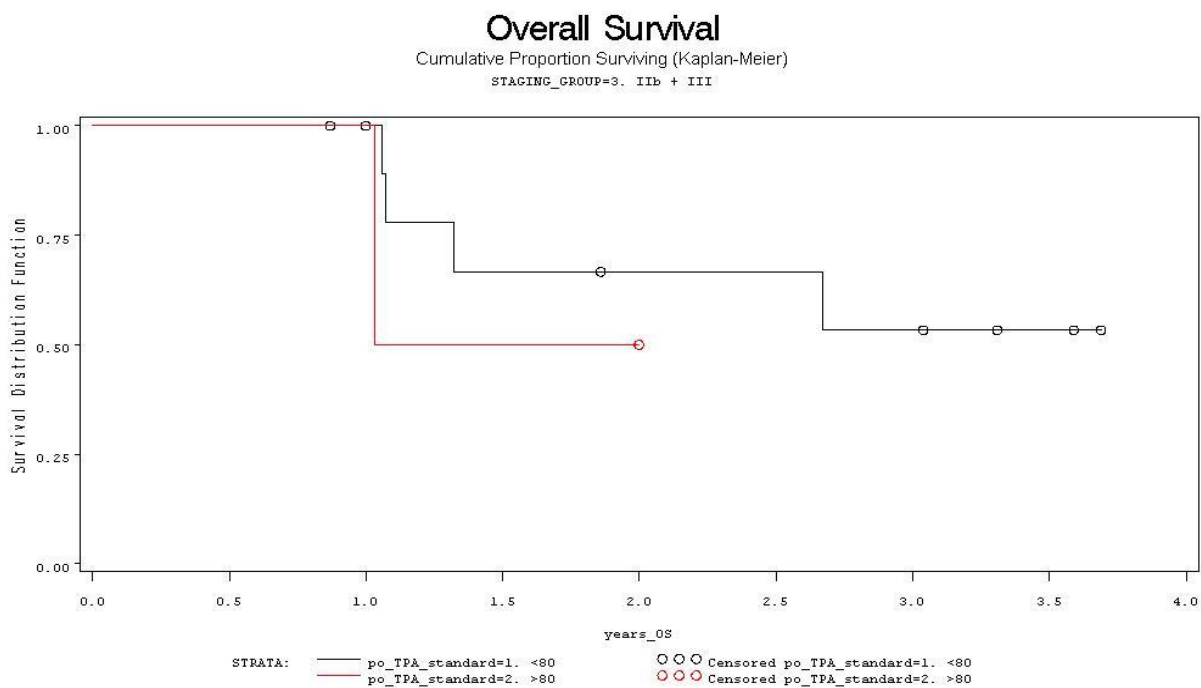
Obrázek 31 - OS podle pooperační hodnoty VEGF (medián 300)



Obrázek 32 - OS podle pooperační hodnoty TK (cut off 8)



Obrázek 33 - OS podle pooperační hodnoty TPA (cut off 80)



Z pooperačního náběru je patrné, že hladiny CA 15-3 se v průběhu 1 týdne po chirurgickém výkonu posouvají pod stanovenou hodnotu cut off (posun do referenčního rozmezí), proto není CA 15-3 v pooperačním období statisticky hodnotitelné ve vztahu k DFI ani OS.

Z našich výsledků je patrné, že z vybraných RF a NM jsou ve vztahu k DFI i OS prognosticky využitelné předoperačně i časně pooperačně stanovené hodnoty HGF, TK, TPA a MonoTotalu. Předoperačně má prognostický význam hodnota CA 15-3, předoperačně i pooperačně zejména pro OS hodnota VEGF. Nízké hodnoty EGF a TGF byly zjištěny v souvislosti s horší prognózou stran celkového přežití.

Z hodnot Hazard Ratio sledovaných RF a NM nelze jako prognostický faktor ve vztahu k DFI využít předoperační ani časné pooperační hodnoty IGF-1, IGFBP-3, EGF a TGF, pooperačně hladinu CEA a Leptinu.

Ve vztahu k OS nelze jako prognostický faktor využít předoperační ani časné pooperační hodnoty IGF-1, IGFBP-3, pooperačně hladinu EGF, TGF, Leptinu a CEA.

Obecně lze říci, že jako perioperační prognostické faktory karcinomu prsu nelze využít IGF-1, IGFBP-3 a pooperačně EGF, TGF, Leptin a CEA.

II. Souvislost předoperačních hladin růstových faktorů a nádorových markerů se známými rizikovými faktory z anamnézy

V tomto oddíle bylo naším cílem zhodnotit vztah předoperačních hodnot definovaných RF a NM k anamnestickým rizikovým faktorům. V případě dostatečně silné korelace parametru s rizikovým faktorem byla dále hodnocena statistická významnost tohoto korelačního koeficientu. Korelační koeficient byl počítán pro celou skupinu nemocných pacientek a poté pro každou podskupinu samostatně. Korelační koeficienty byly hodnoceny pouze pro RF a NM, jejichž předoperační hodnoty byly shledány jako prognosticky využitelné (TK, TPA, CA 15-3, MonoTotal, HGF, VEGF, Leptin, EGF a TGF).

Ve výpočtu pro celou skupinu pacientek s maligním onemocnění byly zjištěny korelace mezi TK a výskytem malignity v osobní anamnéze (OA), hodnotou BMI a kouřením; TPA a onkologickou pozitivitou rodinné anamnézy (RA), klimakteriem po 50.roce věku a hodnotou BMI > 30; CA 15-3 a hodnotou BMI > 30; MonoTotalem a onkologickou pozitivitou rodinné anamnézy, hodnotou BMI > 30 a hormonální antikoncepcí v osobní anamnéze (HATK); Leptinem a hodnotou BMI > 30 a hormonální antikoncepcí v osobní anamnéze; HGF a hodnotou BMI. (Tabulka 18)

Tabulka 18 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory ve skupině nemocných s maligním onemocněním

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
TK	maligní onemocnění v OA	0,25	0,0149
	BMI > 30	0,25	0,0154
	Kouření	0,27	0,0095
TPA	onkologická pozitivita RA	0,28	0,0040
	klimakterium nad 50 let	0,25	0,0463
	BMI > 30	0,25	0,0144
CA 15-3	BMI > 30	0,27	0,0071
MonoTotal	BMI > 30	0,34	0,0007
	onkologická pozitivita RA	0,20	0,0498
	HATK	0,21	0,0441
Leptin	BMI > 30	0,55	< 0,0001
	HATK	0,30	0,0032
HGF	BMI > 30	0,23	0,0262

V podskupině G1 byly zjištěny statisticky významné korelace mezi hodnotami TPA a onkologickou pozitivitou rodinné anamnézy a hodnotou BMI > 30; CA 15-3 a stanovením diagnózy karcinomu prsu před 40. rokem věku; MonoTotalem a hodnotou BMI > 30 a hormonoterapií v osobní anamnéze; HGF a 1. porodem po 30. roce věku; Leptinem a hodnotou BMI > 30 a hormonální antikoncepcí v osobní anamnéze (Tabulka 19).

Tabulka 19 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory v podskupině G1

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
TPA	onkologická pozitivita RA	0,37	0,0058
	BMI > 30	0,36	0,0069
CA 15-3	diagnóza před 40. roce věku	0,27	0,0460
MonoTotal	BMI > 30	0,43	0,0013
	Hormonoterapie	0,34	0,0132
HGF	1. porod po 30 roce	0,32	0,0455
Leptin	BMI > 30	0,68	< 0,0001
	HATK	0,27	0,0500

V podskupině G2 byly zjištěny statisticky významné korelace mezi hladinou TK a užíváním hormonální antikoncepce, výskytem malignity v osobní i rodinné anamnéze a onemocněním před 40. rokem věku; mezi TPA a diabetem v osobní anamnéze; mezi hladinou Monototalu a diabetem, hormonální antikoncepcí v osobní anamnéze, výskytem malignity v osobní i rodinné anamnéze; mezi HGF a klimakteriem po 50. roce věku; Leptinem a užíváním hormonální antikoncepce v anamnéze (Tabulka 20).

Tabulka 20 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory v podskupině G2

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
TK	HATK	0,51	0,0087
	maligní onemocnění v OA	0,47	0,0166
	onkologická pozitivita RA	0,42	0,0386
	diagnóza před 40. rokem	0,40	0,0500
TPA	diabetes mellitus v OA	0,50	0,0108
MonoTotal	diabetes mellitus v OA	0,58	0,0029
	maligní onemocnění v OA	0,53	0,0083
	HATK	0,43	0,0326
	onkologická pozitivita RA	0,44	0,0308
Leptin	HATK	0,44	0,0334
HGF	klimakterium po 50. roce	0,52	0,0466

V podskupině G3 byly statisticky významné korelace zjištěny mezi TK a hormonální substituční léčbou a kouřením v osobní anamnéze; TPA, HGF, Leptinem a onkologickou pozitivitou rodinné anamnézy (Tabulka 21).

Tabulka 21 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory v podskupině G3

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
TK	hormonoterapie	0,53	0,0194
	kouření	0,49	0,0362
TPA	onkologická pozitivita RA	0,48	0,0348
HGF	onkologická pozitivita RA	0,46	0,0500
Leptin	onkologická pozitivita RA	0,46	0,0500

III. Souvislost předoperačních hladin růstových faktorů a nádorových markerů s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru

Vztah nepříznivých prognostických vlastností nádoru (negativita estrogenových receptorů, negativita progesteronových receptorů, overexprese HER2-neu, grade 3 a vysoká mitotická aktivita) byl hodnocen stejnou metodikou jako vztah s anamnestickými rizikovými faktory, spočten korelační koeficient a posléze hodnocena jeho statistická významnost.

Ve výpočtu pro celou skupinu pacientek s maligním onemocněním byla zjištěna jediná statisticky významná korelace mezi Leptinem a negativitou estrogenových receptorů (Tabulka 22).

Tabulka 22 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru ve skupině pacientek s maligním onemocněním

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
Leptin	negativita ER	0,30	0,0500

V podskupině G1 byla zjištěna statisticky významná korelace mezi HGF a negativitou estrogenových receptorů (Tabulka 23).

Tabulka 23 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru v podskupině G1

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
HGF	negativita ER	0,34	0,0429

V podskupině G2 byly zaznamenány statisticky významné korelace mezi hladinou TK, TPA, MonoTotalem a expresí HER2-neu (Tabulka 24).

Tabulka 24 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru v podskupině G2

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
TK	overexprese HER2-neu	0,48	0,0142
TPA	overexprese HER2-neu	0,47	0,0177
MonoTotal	overexprese HER2-neu	0,40	0,0500

V podskupině G3 byly u vybraných RF a NM zjištěny statisticky významné korelace mezi Leptinem a expresí HER2-neu a negativitou estrogenových receptorů (Tabulka 25).

Tabulka 25 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru v podskupině G3

RF/NM	Rizikový faktor	Spearmanův korelační koeficient	p- value
Leptin	overexprese HER2-neu	0,64	0,0037
	negativita ER	0,52	0,0261

IV. Srovnání vyšetřovaného souboru (nemocné s maligním onemocněním) s kontrolní skupinou (pacientky operované pro benigní lézi)

V tomto bodě bylo naším cílem srovnat nemocnou a „zdravou“ (tj. kontrolní) skupinu pacientek a u jednotlivých RF a NM stanovit z předoperační hodnoty cut off, při kterém je možné, co nejvíce nemocných pacientek označit za nemocné (správně pozitivní) a co nejvíce zdravých za zdravé (správně negativní).

Pro každý parametr při stanovené specifitě 80% byla zjišťována senzitivita každého parametru a na základě výsledku možnost jejího využití v předoperační diagnostice benigních vs. maligních lézí. Při zvolené specifitě byly všechny RF i NM shledány jako nízké specifické, tedy nepoužitelné v klinické praxi v předoperační diagnostice.

15. Diskuze

Prognostické faktory vlastního nádoru

K predikci prognózy stran bezpříznakového intervalu i celkového přežití slouží na jedné straně TNM klasifikace, podle níž je nádorové onemocnění klasifikováno do jednotlivých klinických stádií dle velikosti primárního ložiska, postižení regionálních lymfatických uzlin a průkazu vzdálených metastáz (Tabulka 2,3). S pokročilostí nádorového onemocnění se obecně zhoršuje prognóza, nemocné mají vyšší riziko vzniku lokální recidivy, progresu a vzniku vzdálených metastáz a kratší délku celkového přežití.

Pro jednotlivá stádia lze prognózu vyjádřit pomocí mediánů bezpříznakového i celkového přežití a pomocí procentuálního vyjádření 5letého, resp. 10letého přežití. V rámci našeho výzkumu jsme vzhledem ke krátké době probíhajícího výzkumného projektu a prozatím krátkému follow up nebyli schopni spočítat mediány DFI ani OS, stejně jako vyjádřit procentuální přežívání nemocných v 5letém, resp. 10letém intervalu. Nicméně vyhodnocením bezpříznakového období i celkového přežití v období sledování 3 let můžeme potvrdit výrazně horší prognózu nemocných v klinických stádiích IIb a III. Zatímco pacientky s časným karcinomem (klinická stádia I a IIa) dosahují celkového přežití v 3letém intervalu přes 90% (92% ve stádiu I, resp. 94% ve stádiu IIa), nemocné s lokálně pokročilými nádory přežívají 3 roky v méně než 60% (Tabulka 11). Stran celkového přežití nebyl v našem souboru zaznamenán významný rozdíl pro nemocné s nádorovým onemocněním ve stádiu I vs. IIa. Podíváme-li se na bezpříznakové přežití, zaznamenali jsme ve sledovaném období vzájemně výrazné rozdíly mezi jednotlivými podskupinami v souladu s pokročilostí nádorového onemocnění. Lze říci, že nemocné v klinickém stádiu I, tedy s nádory do 2 cm a bez průkazu migrace nádorových buněk mimo primární ložisko, tedy bez postižení regionálních mízních uzlin, mají výrazně lepší bezpříznakové přežití než nemocné s časnými karcinomy buď většími než 2 cm nebo s metastaticky postiženými axilárními uzlinami. Porovnáme-li skupinu časných karcinomů bez postižení lymfatického aparátu a lokálně pokročilé nádory (podskupina G1 vs. G3), lze říci, že ve 3letém období po operaci je riziko progresu pokročilejších nádorů o 30% vyšší (Tabulka 10). Obecně se udává, že největší procento všech karcinomů progreduje do 2 let po operaci, kdy dosahuje téměř 10%, poté má postupně klesající trend a 5 let po operaci dosahuje poloviční hodnoty (5%). Průměrná doba vzniku recidivy, resp. generalizace byla v našem souboru nemocných 12,77 měsíců.

K určení celkového rizika nemocných lze kromě TNM klasifikace využít i charakteristiky vlastního nádoru. Zatímco TNM klasifikace hodnotí velikosti primárního nádoru, (ne)přítomnost a počet metastaticky postižených lymfatických uzlin a průkaz vzdálených metastáz, z hlediska celkové prognózy je nezbytné vyhodnocení i dalších prognosticky silných ukazatelů vlastního nádoru. Jednoznačně nejsilnějším prognostickým markerem je *grading*. Grading nádoru je vyjadřován dle Nottinghamské klasifikace - grade 1,2,3. Pro jeho vyjádření jsou posuzovány jaderné a buněčné odlišnosti od zdravých nenádorových buněk. Jednotlivě jsou skorovány velikost buněčného jádra, jaderný pleomorfismus, počet mitóz a architektura (vytváření tubulárních formací). Histologický grading přináší prognostické informace o nádorovém onemocnění již předoperačně po histologické verifikaci nádoru core cut biopsií a je považován za nejsilnější prediktivní faktor celkového přežití. Nebudeme-li brát v úvahu další nádorové vlastnosti a porovnáme-li 10leté přežití nemocných s nádory grade 1 vs. grade 3, můžeme konstatovat, že nemocné se špatně diferencovanými nádory vykazují téměř poloviční počet žijících pacientek v 10letém období (85% grade 1 vs. 45% grade 3) [155].

Druhým nejsilnějším prognostickým faktorem je postižení *lymfatického aparátu*, který byl zohledněn již v diskuzi klinických stádií. Přesto dosud ne zcela vyjasněnou problematikou je nález mikrometastázy (metastáza o velikosti ≤ 2 mm) v sentinelové uzlině. Vycházíme-li z patogeneze metastatického procesu a přítomnost nádorového ložiska v axilární uzlině klasifikujeme jako pN1, musíme i mikrometastázu považovat za postižení lymfatického aparátu vycestovanými nádorovými buňkami a pro její přítomnost je vymezeno označení pN1mic. Zpočátku byl nález mikrometastázy považován za nepříznivý prognostický faktor rovnocenný s postižením makrometastázou [156] a byl indikací k systémové léčbě s cílem prodloužení celkového přežití [156,157]. V současné době převládá názor, že nález mikrometastázy v sentinelové uzlině není indikací k systémové léčbě a v prvních 5 letech od stanovení diagnózy neovlivňuje délku celkového přežití [158]. Některé práce uvádějí, že při nálezu mikrometastázy není nezbytné doplnění disekce axily. Izolované nádorové buňky nemají prognostický význam a ani nezvyšují riziko lokální recidivy [159]. Jiní autoři zdůrazňují, že rozhodujícími faktory pro přístup k léčbě mikrometastázy jsou ostatní fenotypové vlastnosti nádoru [160]. *Velikost primárního nádoru* je třetí nejsilnější prognostický faktor, který je zohledněn v TNM klasifikaci.

Zhodnotíme-li *histologický typ* nádoru ve vztahu k prognóze jako nezávislý prognostický faktor, jsou považovány tubulární, mucinózní a tubulo-lobulární karcinom za

prognosticky nejpříznivější s 10letým přežitím ve více než 80%, zatímco invazivní duktální, dukto-lobulární a solidní lobulární karcinom mají nejhorší prognózu, tj. 10leté přežití v méně než 50%. Přihlédneme-li k nádorovému gradingu v rámci multivariační analýzy je zřejmé, že grading je silnějším prognostickým faktorem než histologický typ, jenž lze samostatně k predikci přežití využít pouze limitovaně [155].

Hodnocení *vaskulární- a lymfangioinvaze* je využitelné k predikci celkového přežití, nicméně významnější uplatnění nachází na poli stanovení rizika lokální recidivy zejména po konzervativních chirurgických výkonech, u lokálně pokročilých nádorů i po mastektomiích [155].

Využití tří nejsilnějších prognostických faktorů (velikost nádorového ložiska, grading a postižení regionálních mízních uzlin) slouží ke stanovení tzv. Nottinhamského prognostického indexu (NPI) vypočteného podle vzorce $NPI = (0,2 \times \text{velikost tumoru}) + pN (1-3) + \text{grade} (1-3)$. Čím vyšší index, tím horší prognóza, tím kratší OS. Podle hodnoty NPI existují doporučení k zahájení systémové adjuvantní léčby [155].

Standardními vyšetřeními při histologickém zpracování tumoru je určení mitotické aktivity nádoru (MIB1), exprese hormonálních receptorů (estrogenových a progesteronových) a exprese HER2-neu, jenž mají význam prognostický – určení agresivity biologického chování nádoru a rizika progresu nádorového onemocnění, a význam prediktivní – volba vhodné léčebné strategie.

V našem případě jsme převážnou část věnovali lokálně pokročilým nádorům (klinická stádia IIb a III), které jsou charakteristické větším rozměrem primárního tumoru a postižením regionálních mízních uzlin a tedy všeobecně zatíženy horší celkovou prognózou. Lze se domnívat, že tyto nádory budou mít prognosticky horší vlastnosti než nádory časnějších stádií. Právě s procesem šíření nádorových buněk a zakládání metastatických ložisek v regionálních mízních uzlinách a posléze ve vzdálených orgánech souvisí stupeň agresivity primárního tumoru, jenž je určena stupněm diferenciací (grade), mitotickou aktivitou a přítomností amplifikace HER2 genu. Tyto charakteristické rysy jsou zodpovědné nejen za šíření nádorových buněk mimo primární ložisko, ale také za rychlost růstu vlastního primárního nádoru.

Mitotická aktivita vyjadřovaná pomocí mitotického indexu je významným prognostickým faktorem, vyjadřuje počet mitóz ve vyšetřovaném nádoru a představuje jedno z hodnotících kritérií pro určení gradingu a také slouží jako prostředek stanovení proliferace

aktivity nádoru [177,179]. Vlastní proliferační aktivita, resp. proliferační index je procentuální vyjádření MIB1 pozitivních buněk, jenž se stanoví pomocí monoklonálních protilátek MIB1 proti antigenům Ki-67 exprimovaných buněčným jádrem mimo G0 fázi buněčného cyklu. Čím větší počet mitóz, tím vyšší mitotický index, resp. čím méně buněk v G0 fázi buněčného cyklu, tím vyšší proliferační index (= proliferační aktivita). Vysoká mitotická aktivita je hlavním ukazatelem rychlosti růstu nádorového ložiska a lokální progresi [178]. Čím větších rozměrů nádor při stanovení diagnózy dosahuje, tím má vyšší kategorii pT, která patří mezi tři nejsilnější prognostické faktory vlastního nádoru. Při histologickém vyšetření nádoru je spolehlivým ukazatelem vysoké mitotické aktivity nález nekrotických ložisek, která vznikají v důsledku rychlého růstu a nedostatečného cévního zásobení v celém rozsahu nádorového ložiska při rychlé progresi. Proto vysoký proliferační index a histologický průkaz nekrotických ložisek představují nepříznivé prognostické ukazatele [182]. Stejná teorie se týká i růstu a progresi metastatických ložisek ve vzdálených orgánech, jejichž vysoký proliferační index představuje pro nemocné vysoké riziko další progresi. Úroveň proliferační aktivity je zohledňována při plánování adjuvantní léčby s cílem zlepšení celkové prognózy nemocných a zároveň slouží jako prediktivní faktor odpovědi na systémovou onkologickou léčbu [180,181].

Hodnocení stupně *diferenciace* vychází ze skórování zastoupení tubulárních struktur, hodnocení jaderného gradingu a počtu mitóz. Čím větší odchylky od zdravých nenádorových buněk, tím je nádor hodnocen jako méně diferencovaný, s čímž souvisí jeho vyšší míra agresivity.

Receptory *HER2-neu* patří do velké skupiny receptorů pro epidermální růstové faktory (EGFR), jsou exprimovány na povrchu epitelových nádorových buněk a jejich protřednictvím se uplatňuje biologická aktivita nejen EGF, ale i dalších růstových faktorů, které stejným mechanismem aktivují intracelulární signální dráhy vedoucí k jejich proliferaci. V praxi se stanovuje amplifikace genu HER2, jehož zvýšená exprese je prokazatelná až u 25-30% karcinomů. Pozitivní výsledek představuje vyšší vnímavost nádorových buněk k růstovým faktorům stimulující jejich proliferaci a migraci, což představuje z hlediska progresi nepříznivý prognostický faktor. Zároveň průkaz amplifikace HER2 genu vymezuje skupinu vhodných kandidátek k biologické léčbě monoklonálními protilátkami (Herceptin, Tyverb).

Mezi standardní vyšetření při histologickém zpracování karcinomu prsu patří hodnocení exprese *estrogenových a progesteronových receptorů*. Výsledné vyjádření v procentech vymezuje skupinu nemocných, jejichž nádor bude s vysokou pravděpodobností senzitivní na

hormonální léčbu. Již hodnota 1% a vyšší je považována za pozitivní výsledek. Negativita hormonálních receptorů není považována za nepříznivý faktor stran lokální progresu a šíření nádoru, ale jedná se o parametr, který je rozhodující právě při volbě léčebné strategie. Obecně platí, že nádory hormonálně dependentní (estrogenové i progesteronové receptory pozitivní) predikují nemocnou k lepší odpovědi na dlouhodobou systémovou léčbu, mnohdy v případě příznivých dalších parametrů bez nutnosti sekvenčně podávané chemoterapeutické léčby [161].

Co se týká *histopatologického typu* nádoru, 80% všech nádorů mléčné žlázy představuje IDCa charakterizovaný větším potenciálem k lymfogennímu i hematogennímu šíření. Na rozdíl ILCa infiltrující žlazové stroma a díky chybění adhezivních molekul (E-cadherin negativní) se častěji vyskytuje jako víceložiskový tumor – multifokální či multicentrický. Jeho lymfogenní metastatický potenciál je nižší, nicméně nevyzpytatelný v zakládání ložisek v méně typických lokalitách (GIT, gynekologické orgány, mozkomíšní obaly). Z uvedeného vyplývá, že i menší IDCa může ohrozit nositelku časnějším a častějším vznikem vzdálených metastáz, zatímco ILCa při svém víceložiskovém postižení si častěji vyžádá primárně radikálnější chirurgický výkon.

V našem souboru ve shodě s literárními údaji byl zastoupen IDCa ve významné převaze (84%), nicméně se nepodařilo prokázat významně vyšší incidence IDCa v souvislosti s pokročilostí nádorového onemocnění. Nejsilnější vztah k pokročilosti nádorového onemocnění mají vysoký grading, vysoká mitotická aktivita a negativita estrogenových receptorů. Slabší vztah vykazují pozitivita HER2-neu a negativita progesteronových receptorů.

Anamnestické rizikové faktory

Nejsilnějším rizikovým faktorem vzniku karcinomu mléčné žlázy je beze sporu genetická dispozice, tedy vznik nádorového onemocnění na podkladě genové mutace. „Genetický“ karcinom představuje 10% všech karcinomů a vzniká na podkladě vrozené mutace protoonkogenů či tumor supresorových genů, jejichž produkty ztrácejí svou biologickou funkci. Včasnou diagnostikou genové mutace lze snížit riziko vzniku karcinomu prostřednictvím preventivních opatření – profylaktická oboustranná mastektomie, profylaktická oboustranná ovariectomie nebo zaměření a zintenzivnění sekundárních preventivních opatření v rámci specializovaných center na mamologickou problematiku. Bez geneticky podmíněné dispozice, ale přesto při zvýšené incidenci karcinomu prsu v rodinné anamnéze hovoříme o tzv.

familiárním karcinomu, kde vyšší riziko představují hlavně příbuzné ženy 1. a 2. linie, které onemocněly před 40. rokem věku. Kromě karcinomu prsu taktéž výskyt jiných maligních chorob v rodinné anamnéze představuje rizikový faktor stran vzniku maligního onemocnění, tedy i karcinomu prsu. Lze předpokládat, že jisté buněčné metabolické pochody a aktivita enzymatických systémů jsou dědičné, což predisponuje vnímavost zdravých buněk k vnitřním i vnějším vlivům uplatňujících se v procesu kancerogeneze. Výskyt karcinomu prsu i jiného maligního onemocnění v osobní anamnéze znamená pro nositelku rovněž vyšší riziko vzniku druhostranného karcinomu, ať už na pokladě zvýšené vnímavosti k rizikovým faktorům kancerogeneze nebo v důsledku systémové léčby předešlého maligního onemocnění. Riziko vzniku druhostranného karcinomu u ženy se sporadickým karcinomem je dvojnásobné. Na našem souboru pacientek jsme zaznamenali vyšší četnosti onkologické positivity rodinné anamnézy včetně výskytu karcinomu prsu v přímé úměrnosti s pokročilostí nádorového onemocnění, druhostranný karcinom ani výskyt jiného maligního onemocnění v osobní anamnéze nebyl pro stádium nádorového onemocnění významný.

Samostatnými rizikovými faktory je nález tzv. premaligních lézí, mezi které jsou řazeny DCIS a LCIS a benigní proliferativní změny s atypii. Z nich pouze DCIS představuje klinickou jednotku klasifikovanou jako tumor (Tis), ostatní léze byt' představují pro nositelku zvýšené riziko vzniku karcinomu, péče o tyto ženy spočívá v intenzivní sekundární prevenci [84].

Přestože prudký nárůst počtu nemocných s karcinomem mléčné žlázy je ve věku 40-65 let, není jeho výskyt žádnou výjimkou ani v mladších věkových skupinách. U těchto žen se setkáváme častěji s prognosticky nepříznivými nádory, často bez hormonální dependence, s vysokou mitotickou aktivitou a nižším stupněm diferenciací. Tyto vlastnosti predisponují nádor k agresivnějšímu biologickému chování, rychlejšímu růstu i šíření mimo primární ložisko a s ohledem na histopatologické charakteristiky jedná se o nádory s horší odpovědí na systémovou onkologickou léčbu, tedy o nádory s výrazně horší celkovou prognózou.

Velmi diskutovanou problematikou mezi rizikovými faktory jsou hormonální aspekty. Z teorie, že vznik karcinomu prsu je podmíněn delší expozicí estrogenů, potom délka menoaktivního období je přímo úměrná riziku vzniku karcinomu. Jinak řečeno, čím více menstruačních cyklů během reprodukčního období ženy proběhne, tím je její mléčná žláza déle pod vlivem hormonálních změn, resp. estrogenů a tím je riziko vzniku karcinomu mléčné žlázy větší. Délka reprodukčního období je počítána od menarche po klimakterium, tzn. že časná

menarche a pozdní menopauza představují stran rizika nepříznivé anamnestické faktory. Z uvedeného vyplývá, že časná menarche (před 12. rokem), pozdní menopauza (po 50. roce), 1. gravidita po 30. roce věku a nekojení, užívání hormonální substituční léčby a nulliparita představují rizikové faktory vzniku karcinomu mléčné žlázy. Protektivní efekt gravidity a kojení spočívá v časně diferenciaci epitelu prsní žlázy ve zralé žlazové buňky, u nichž se po skončeném kojení výrazně prodlužuje buněčný cyklus, což vede k malé náklonnosti ke vzniku mutací. Na užívání hormonální antikoncepce jsou stále nejednotné názory, někteří autoři ji zcela nepovažují za rizikový faktor [162], nicméně převažují názory, že dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce zejména v mladém věku riziko oproti běžné populaci zvyšuje [163,165,166,168] a užívání hormonálních preparátů ve velmi mladém věku koreluje se vznikem karcinomu prsu v průměru o 3-4 roky dříve než u nezátížené populace [164].

Nadváha, resp. obezita a životní styl (strava bohatá na tuky, kouření, alkohol, nedostatek pohybové aktivity) jsou zástupci ovlivnitelných rizikových faktorů a nepředstavují rizikové faktory pouze pro karcinom mléčné žlázy, nýbrž riziko vzniku maligního onemocnění obecně. Nedostatek pohybu a nevyvážená strava s vysokým obsahem tuku jde ruku v ruce s nadváhou, resp. obezitou. Nadměrná tuková zásoba je spojena se zvýšenou plasmatickou koncentrací estrogenů, které mimo jiné vznikají i v tukové tkáni konverzí z androgenních prekurzorů. Pravidelná konzumace alkoholu ve zvýšené míře vede nepřímo ke zvýšení hladiny estrogenů [169]. Kouření představuje obecně zevní kancerogenní faktor, v případě karcinomu prsu byla zjištěna možná interakce nikotinu a EGFR [170].

Metabolická onemocnění, reprezentovaná diabetem a hyperlipidemií, vedou k alteraci fyziologických regulačních mechanismů. Diabetes mellitus je charakterizovaný hyperglykemií a hyperinzulinemií v důsledku inzulínové rezistence. V patogenezi nádorového procesu se inzulín jako růstový hormon uplatňuje stimulací receptorů pro růstový hormon, zvyšuje syntézu IGF-1 v játrech. Inzulín i IGF-1 coby růstové hormony působí prostřednictvím strukturálně podobných receptorů, cestou inzulínového receptoru jsou ovlivňovány především metabolické procesy, cestou receptoru IGF-1 stimuluje buněčný růst a proliferaci, čímž se uplatňuje v procesu kancerogeneze v důsledku inzulínové rezistence [150,151,152]. Hyperlipidémie, resp. změna lipidového spektra ve prospěch hypercholesterolemie, zvýšené hladiny LDL (low-density lipoprotein), snížené hladiny HDL (high-density lipoprotein) a hypertriglycerinémie je asociována s vyšší incidencí karcinomu prsu [153]. Alterace lipidového spektra je pozorována výrazně častěji ve spojitosti s obezitou [154].

Ve shodě s literárními údaji jsme v souvislosti s pokročilostí nádorového onemocnění zaznamenali vyšší četnosti onkologické pozitivivity rodinné anamnézy, včetně karcinomu mléčné žlázy, obezity, nerodících a nekojících pacientek a žen s klimakteriem po 50. roce věku. Statistická významnost ani vyšší četnosti v souvislosti s pokročilostí nádorového onemocnění nebyly v našem souboru zjištěny pro maligní onemocnění v osobní anamnéze včetně druhostranného karcinomu, stanovení diagnózy před 40. rokem věku, hormonální substituční léčbu ani hormonální antikoncepci v osobní anamnéze, 1. porod po 30. roce věku ani metabolická onemocnění.

Růstové faktory a nádorové markery

Meziskupinovým testováním předoperačních a časných pooperačních hodnot RF a NM byla prokázána statistická významnost mezi hladinami TPA, MonoTotalu, CEA a HGF, z nichž bylo posléze zjištěno, že perioperační hodnoty TPA, MonoTotalu a HGF jsou využitelnými prognostickými ukazateli bezpříznakového i celkového přežití. Hladiny ostatních parametrů (IGF-1, IGFBP-3, TGF, EGF, VEGF, CA 15-3, Leptin a TK) nebyly zjištěny jako statisticky významné. Při testování v rámci jednotlivých podskupin jsme vzhledem k nedostatku událostí (úmrť, progresse) u časných karcinomů (klinické stádium I a IIa) nebyli schopni hodnotit hladiny předoperačních ani pooperačních hodnot vybraných parametrů ve vztahu k horší prognóze onemocnění a naše šetření bylo omezeno na hodnocení pouze ve skupině lokálně pokročilých nádorů (klinické stádium IIb a III).

Ze statistického popisu našeho souboru zahrnující počet progresí a úmrť je patrné, že staging, resp. klinické stádium nemoci je rozhodující prognostický faktor karcinomu mléčné žlázy. Ve shodě s literárními údaji bylo shledáno výrazně horší celkové přežití pro lokálně pokročilé nádory primárně léčené chirurgicky, což lze dokumentovat procentuálním vyjádřením přežití v jednotlivých podskupinách. Z podskupiny časných karcinomů bez postižení regionálních mízních uzlin (stádium I) z našeho souboru dosud přežívá 94% nemocných, v klinickém stádiu IIa 96% nemocných a v podskupině lokálně pokročilých nádorů (klinické stádium IIb a III) byl zaznamenán výrazný pokles, dosud přežívá 68% nemocných (Tabulka 13).

Právě pro prognosticky nejhorší skupinu jsme byli schopni zhodnotit prediktivní význam RF a NM stanovených předoperačně a časně pooperačně. Z definovaných RF byl prokázán prognostický význam HGF, pro celkové přežití VEGF. HGF patří mezi růstové

faktory produkované mezenchymálními buňkami, v mléčné žláze stromálními buňkami, a cílovými buňkami jsou epitelie ductů, exprimující specifické Met-R prostřednictvím nichž stimulují epitelové buňky k růstu a proliferaci. Zároveň podporují syntézu proteolytických enzymů vedoucí k disociaci buněk, migraci a zakládáním vzdálených ložisek a spolu s dalšími působky stimulují proliferaci endotelových buněk, čímž se podílí na angiogenezi. Exprese specifického receptoru Met-R je stimulována HIF (hypoxia inducible factor) produkovaného hypoxickými buňkami v důsledku zvětšování objemu nádoru. Nádorové buňky tak získávají vyšší senzitivitu k HGF, který podporuje další lokální progresi i šíření nádorového procesu. HIF zároveň podporuje produkci VEGF s cílem přivodu kyslíku a živin do celého objemu nádoru. Jeho hlavními cílovými buňkami jsou endotelie. Na endotelové buňky působí jako hlavní mitogenní faktor, zvyšuje permeabilitu cév, stimuluje produkci proteolytických enzymů (metaloproteáz) a podporuje migraci endotelových buněk zodpovědných za novotvorbu krevních i lymfatických cév. VEGF je nejdůležitějším proteinem nezbytným pro vaskulogenezi. Je stanovován jako prognostický faktor a v praxi jsou využívány monoklonální protilátky inhibující receptory (VEGFR) v léčbě metastazujícího karcinomu mléčné žlázy.

Z nádorových markerů se jeví jako prognosticky využitelné TK, TPA a MonoTotal. TK a TPA patří do skupiny nespecifických, v užším slova smyslu do skupiny proliferčních nádorových markerů. Z jejich vlastností vyplývá, že zvýšené sérové hladiny jsou asociovány s proliferativními procesy, kterým beze sporu neoplastické onemocnění je. Proto své hlavní využití nalézají na poli follow up, monitoraci průběhu onemocnění a úspěšnosti léčby. Lze se domnívat, že jejich vyšší hladiny předoperačně a časné pooperačně souvisí s proliferací aktivitou a růstovou agresivitou primárního nádoru, které samy o sobě představují nepříznivé prognostické vlastnosti. Jejich vyšší perioperační hladiny vymezují skupinu nemocných s horší prognózou.

MonoTotal jako nádorový marker vhodný k monitorování a hodnocení účinnosti terapie zejména malobuněčného karcinomu plic se rovněž jeví v perioperačním stanovení u karcinomu prsu jako vhodný ukazatel odrážející intenzitu aktivity nádorových buněk, jako významného prognostického faktoru.

Z předoperačního náběru se jeví prognosticky využitelná hladina CA 15-3, jako specifického NM karcinomu prsu. Jeho sérová hladina přímo úměrně souvisí s objemem nádorového ložiska a stupněm postižením regionálních mízních uzlin, které jsou hlavními kritérii pro stanovení stagingu, resp. klinického stádia nemoci dle TNM klasifikace [88]. Je tedy

zřejmé, že předoperační hladina CA 15-3 významně koreluje s pokročilostí nádorového onemocnění, přesto však její vyšší hodnoty predikují nemocné k horší prognóze v porovnání s ostatními nemocnými příslušného klinického stádia. V časném pooperačním stanovení jsme na našem souboru nemocných prokázali, že hladina markeru po operačním odstranění nádoru v průběhu jednoho týdne klesá do referenčního rozmezí. Vzhledem k tomu, že dané šetření probíhalo v rámci lokálně pokročilých nádorů bez přítomnosti vzdálených metastáz, lze předpokládat, že v případě diseminovaného nádorového onemocnění by i po radikálním odstranění primárního nádoru nedošlo k normalizaci jeho sérových hladin. To je v souladu s teorií, že CA 15-3 jako specifický marker karcinomu prsu je elevován v případě progresse nádorového onemocnění či selhání systémové léčby u diseminovaného onemocnění [171].

CEA je nádorový marker, který je produkován v dospělosti ve stopovém množství mimo jiné i epitelovými buňkami mléčné žlázy a jeho vysoké sérové hladiny jsou asociovány s nádorovými onemocněními zejména z oblasti GIT, plic, prsu, gynekologických orgánů a prostaty. Jedná se o velice nespecifický marker často zvýšený u chronických onemocnění ledvin, jater, plic, nespecifických střečních zánětů a u kuřáků. Jeho vyšší sérové hladiny, jenž byly statisticky významné v našem souboru lokálně pokročilých nádorů, byly zaznamenány pouze předoperačně v souvislosti s vyšším rizikem progresse nádorového onemocnění. Pro celkově horší prognózu stran přežití nebylo shledáno jeho perioperační stanovení prognosticky významné.

V souvislosti s nepříznivou prognózou stran přežití byly v našem souboru shledány nižší hodnoty TGF a EGF u lokálně pokročilých nádorů. Z fyziologické funkce TGF vyplývá, že jeho působení je antikancerogenní, působí totiž jako inhibitor proliferace, zastavuje buněčný růst, inhibuje syntézu dalších regulátorů buněčného cyklu a podporuje apoptotické procesy [7,96]. Mutace v genu TGF nebo jeho signální dráhy vede k porušení jeho biologické funkce, což vede ke ztrátě kontroly buněčné proliferace, změně složení extracelulární matrix a změně adhezivních vlastností buněk se zvýšením migrace buněk. Snížené hladiny TGF podporují lokální růst nádoru i šíření nádorových buněk mimo primární ložisko. Je zřejmé, že u nádorů s progresivním potenciálem je předoperačně hladina TGF coby faktoru s antikancerogenním působením nižší.

Co se týká EGF, jeho prokancerogenní efekt je realizován prostřednictvím receptoru, který je členem velké „rodiny“ receptorů epidermálního růstového faktoru EGFR1-4 (= ErbB1-4). EGF má specifickou afinitu k ErbB1, nicméně prostřednictvím ostatních receptorů (ErbB

2,3,4) se uplatňují v kancerogenezi i další růstové faktory (TGF α , epiregulin, amphiregulin, neuregulin 1-4) [183,184,185]. V podskupině G3 byla zjištěna významně vyšší četnost HER2 pozitivních nádorů (tzn. ErbB2 pozitivní), jejichž prostřednictvím uplatňují svou biologickou funkci právě ostatní růstové faktory, jejichž princip působení je shodný s EGF, tzn. vedou k fosforylaci intracelulární tyrosinkinázové domény příslušného receptoru, aktivují intracelulární kaskádu vedoucí k transkripci a proliferaci nádorových buněk. Nádorové buňky HER2 pozitivních nádorů vykazují tedy vysokou citlivost k růstovým faktorům působící ve shodném efektu jako EGF, lze tedy předpokládat, že zpětnovazebným mechanismem není ve zvýšené míře stimulována syntéza EGF. Zřejmě proto v případech prognosticky nepříznivých nádorů nebyly perioperačně zaznamenány vyšší hodnoty EGF v souvislosti s progresí či kratším celkovým přežitím, dokonce předoperačně nižší hodnoty byly zaznamenány v souvislosti s kratším celkovým přežitím u nemocných s lokálně pokročilým karcinomem prsu.

Z našeho šetření bylo zjištěno, že předoperačně vyšší hladiny Leptinu jsou asociovány s vyšším rizikem progresu nádorového onemocnění. Leptin jako marker korelující s množstvím tukové tkáně podporuje teorii, že obézní pacientky mají obecně horší prognózu [60,103]. U obézních nemocných je narušen zpětnovazebný mechanismus, který cestou hypothalamu navozuje pocit sytosti [49]. V důsledku hyperleptinémie se uplatňuje jeho prokancerogenní účinek jako mitogenního faktoru [29] a mimo jiné cestou HIF stimuluje syntézu VEGF, významného angiogenního faktoru [59]. Kromě Leptinu byla u obézních pacientek zjištěna i vyšší hladina IGF-1 a na druhé straně i vlastní tuková tkáň produkuje estrogeny. Všechny uvedené faktory (Leptin, IGF-1 a estrogen) mají synergický prokancerogenní účinek.

Zcela nevyužitelné perioperační prognostické faktory karcinomu prsu se z našeho výzkumu jeví IGF-1 a IGFBP-3, nicméně ve vztahu k progresi a kratšímu intervalu přežití jsme shledali nepříznivé nižší perioperační hladiny těchto parametrů. Tato skutečnost je v souladu s teorií, že signální dráha IGF-1 se v růstu nádoru uplatňuje především v časných stádiích. Proto čím větší nádor, resp. vyšší klinické stádium, uplatňují se v buňkách jiné signální dráhy vedoucí k růstu nádoru a signální dráha IGF-1 ustupuje do pozadí [147]. S nižšími hladinami a snížením uplatnění v růstovém procesu nádoru souvisí nižší potřeba vazby IGF-1 na vazebné proteiny, což vysvětluje nepřímo úměrný vztah hladiny IGFBP-3 s pokročilostí nádorového onemocnění.

Korelacemi prognosticky využitelných RF (HGF, VEGF, Leptin) a NM (TK, TPA, CA 15-3, MonoTotal) stanovených předoperačně se podařilo prokázat, že nejsilnějšími anamnestickými rizikovými faktory karcinomu prsu jsou onkologická pozitivita rodinné

anamnézy i výskyt maligní choroby v osobní anamnéze, stanovení diagnózy před 40. rokem věku, klimakterium po 50. roce věku, hormonální substituční léčba i užívání hormonální antikoncepce, obezita a kouření. Z hlediska stádia nádorového onemocnění lze říci, že pro skupinu nemocných s lokálně pokročilým nádorem, nota bene pro které mají uvedené RF a NM prognostický význam, jsou nejsilnějšími rizikovými faktory pozitivní rodinná anamnéza, hormonální substituční léčba a kouření. Z prognostických vlastností tumoru se podařilo prokázat, že obecně nejsilnějšími rizikovými faktory pro karcinom prsu jsou overexprese HER2-neu a negativita estrogenových receptorů, což se mimo jiné podařilo prokázat shodně pro všechny vyšetřované podskupiny.

Z obecné charakteristiky RF vyplývá, že se uplatňují nejen v nádorovém onemocnění, ale fyziologicky již v době ontogenetické stimulují proliferaci a diferenciaci buněk. Dále v dospělosti hrají důležitou úlohu v reparaci a regeneraci poškozených tkání. Většina RF je vysoce účinná v nanomolárních koncentracích a právě u nádorových onemocnění dochází ke zvyšování sérových hladin prokancerogenních faktorů, resp. snižování hladin antikancerogenních faktorů. Mimo jiné zvýšení vnímavosti nádorových buněk je regulováno a zajištěno zvýšenou expresí membránových receptorů, prostřednictvím nichž RF uplatňují svou biologickou funkci. U nádorových markerů je situace částečně odlišná. Specifické NM, v případě karcinomu prsu CA 15-3, jsou antigeny žlazových buněk ve vývodech mléčné žlázy a jejich hladiny jsou přímo úměrné objemu nádorového ložiska, nicméně jeho vyšší hladiny jsou popisovány i v souvislosti s benigními lézemi mléčné žlázy. Nespecifické nádorové markery (CEA, TK, TPA, MonoTotal) jsou spíše ukazatele proliferačního procesu v organismu a jejich zvýšené hladiny nemusí vždy korelovat s onkologickým onemocněním. Právě tyto NM jsou často elevovány při chronických onemocněních zejména jater a ledvin, GIT, plic a infekčních onemocněních. Porovnáním předoperačních hodnot vybraných RF a NM mezi zkoumanou a kontrolní skupinou se nepodařilo pro žádný faktor najít takové hodnoty, které by mohly pomoci v předoperační diagnostické rozvaze. Nejspíše vzhledem k tomu, že benigní nádorová onemocnění jsou ve své podstatě léze rovněž charakterizované zvýšenou proliferací určité buněčné populace.

Studium patogenetických mechanismů kancerogeneze na molekulární úrovni přineslo důležité poznatky, které jsou dnes využívány v moderní onkologické léčbě, některé ještě ve stádiu klinických studií. Nejprve průkaz povrchových specifických antigenů a membránových receptorů pro růstové faktory (v případě karcinomu prsu VEGFR a HER2-neu) vedl k zavedení léčby monoklonálními protilátkami (MoAb). Principem účinku je vazba MoAb na specifický antigen, aktivace buněk lymfatického systému a výrazný nárůst fagocytózy nebo navození

apoptózy aktivací komplementu. Dalším mechanismem je přímý cytotoxický účinek vedoucí k buněčné smrti nebo blokáda aktivace signální dráhy vazbou MoAb na specifický receptor. Právě této inhibice je využíváno v léčbě HER2 pozitivních karcinomů mléčné žlázy, a sice látkou transtuzumab (Herceptin) v adjuvantním režimu a u diseminovaného nádorového onemocnění je součástí paliativní léčby. Druhou možností specifické blokády HER je lapatinib (Tyverb), fungující jako intracelulární blokátor tyrosinkinázové domény receptoru HER (HER1 i HER 2). Je využíván jako lék 2. linie při progresi nádorového onemocnění při léčbě Herceptinem. Využití monoklonálních protilátek proti VEGFR (bevacizumab – Avastin) našlo své uplatnění zejména u metastatického HER2 negativního karcinomu prsu v 1. linii.

V současné době se dostává do popředí zájmu tzv. cílená léčba. Pod tímto pojmem rozumíme taková terapeutika, která působí specificky na konkrétní proteiny a signální dráhy, které jsou zodpovědné za kaskádovitou aktivaci signálních drah nádorových buněk a zajišťují jejich přežití a množení. Z praktického hlediska lze tyto látky rozdělit podle funkční charakteristiky na 2 skupiny: látky, jejichž protinádorový účinek je zacílen predominantně proti samotným nádorovým buňkám a látky, které zasahují do patologicky změněných vztahů mezi nádorovými buňkami a mikroprostředím. Do první skupiny lze zařadit látky, které inhibují sebeobnovu nádorových buněk, inhibují proliferaci a indukují apoptózu. Do druhé skupiny spadají imunomodulační látky, inhibitory neovaskularizace a inhibitory invazivity a metastazování [172].

Ve stádiu klinických studií léčby karcinomu prsu jsou tzv. mTOR inhibitory (mammalian target of rapamycin), které lze zařadit do skupiny látek inhibující proliferaci. Vychází z teorie, že aktivace signální dráhy PI3K/Akt (fosfatidylinositol-3-kináza/protein Akt) poskytuje buňce signály pro neomezený růst a přežití, tj. hlavní charakteristiky maligního buněčného fenotypu. K aktivaci signální dráhy vede aktivace, resp. fosforylace intracelulární domény membránového receptoru. Deregulovaný přenos signálu prostřednictvím signální dráhy PI3K/Akt/mTOR je společným jmenovatelem většiny typů nádorových buněk a v případě karcinomu prsu byly identifikovány mutace ve 20 až 25 %. Propojení vazby mezi estrogenovým receptorem a signální dráhou má za následek vznik rezistence na hormonální léčbu u nemocných ER pozitivních a předpokládá se, že právě tato signální dráha chrání nádorové buňky před apoptózou indukovanou antiestrogeny. Byly vyvinuty antagonisté mTOR, které blokují signální kaskádu a mají jednoznačně antiproliferativní účinek u nádorových buněk karcinomu prsu s aktivní PI3K/Akt. V preklinických modelech byl prokázán povzbuzující synergistický účinek kombinující endokrinní terapii s inhibitory mTOR a do budoucna by

mohly představovat slibnou léčbu hormonálně dependentních karcinomů prsu rezistentních na endokrinní léčbu [172,173].

Další novinkou v léčbě karcinomu prsu jsou PARP inhibitory, které lze podle uvedeného rozdělení cílené léčby zařadit do skupiny induktorů apoptózy. PARP (poly ADP-ribose polymerase) je skupina enzymů podílející se na opravách DNA a hraje důležitou roli v procesu apoptózy. PARP jsou enzymy aktivované chybami DNA a jejich inhibice vede k zastavení buněčného cyklu nádorové buňky, snížení cytotoxického práhu k účinkům chemoterapeutik a k její apoptóze. Největší účinek může mít teoreticky u nádorů s preexistujícími poruchami opravných mechanismů, nejčastěji v důsledku mutace BRCA 1, BRCA 2 či p53. Ze závěrů preklinických studií vyplývá, že terapie PARP inhibitory zvyšuje účinnosti chemoterapeutické léčby a skýtá naději na lepší výsledky léčby zejména hereditárních a triple negativních karcinomů [174,175,176].

16. Význam vědecké práce pro klinickou praxi

Z našich výsledků vyplývá, že obecně předoperační hladiny vybraných nádorových markerů a růstových faktorů nelze využít v primární diagnostice ani jako pomocné vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky maligních vs. benigních lézí.

U nemocných s karcinomem prsu bylo naším cílem selektovat ty ženy, které již v době stanovení diagnózy budeme moci označit za rizikové stran progresu onemocnění i kratšího celkového přežití. Nemocné byly rozděleny podle nejsilnějšího prognostického faktoru – stagingu, resp. klinického stádia. Pro časné karcinomy (klinická stádia I a IIa) se nepodařilo prokázat jednoznačný přínos perioperačního stanovení růstových faktorů a nádorových markerů z důvodu nedostatku událostí (progrese, úmrtí). Pro lokálně pokročilé nádory (klinická stádia IIb a III) byl prokázán prognostický význam perioperačního stanovení HGF, TK, TPA, MonoTotalu a předoperačního stanovení CA 15-3. V dané skupině již po stanovení diagnózy můžeme označit ty nemocné, které mají vyšší riziko progresu onemocnění i riziko kratšího celkového přežití.

Předoperační stanovení Leptinu a CEA jsou užitečné prognostické faktory kratšího DFI, před- i pooperační stanovení VEGF je významným prognostickým ukazatelem celkového přežití. Ve spojitosti s kratším celkovým přežitím jsme zaznamenali významně nižší hodnoty EGF a TGF stanovené předoperačně, význam pro predikci DFI nebyl prokázán. Jako prognosticky nevyužitelné markery DFI a OS se z našeho šetření jeví perioperačně stanovené IGF-1 a IGFBP-3, resp. CEA a Leptin jako prognostické faktory OS.

Shrneme-li naše poznatky, lze obecně říci, že perioperační stanovení uvedených markerů má prognostický význam pro nemocné s lokálně pokročilým karcinomem prsu. Selektuje nám v daných klinických stádiích „rizikovější“ skupinu žen, které by beze sporu profitovaly z intenzivnější dispenzární péče. Konkrétně v našem případě shledáváme rezervy ve zkrácení časových intervalů pravidelných klinických kontrol, tzn. od operace provádět pravidelné klinické a sonografické kontroly v ½ ročních intervalech, v 1ročních intervalech mammografické vyšetření, stážovací vyšetření (rtg plic, sonografie jater a scintigrafie kostí) a hladiny standardního panelu nádorových markerů (CA 15-3, CEA, TK a TPA) doplněné o prognosticky slibný MonoTotal. S přihlédnutím k průměrné době progresu onemocnění od operace se zdají dostatečné kontroly v ½ ročním intervalu do 5. roku od primární operace, v

dalším období by měly být dostatečné ve stejném rozsahu 1x ročně. Cílem těchto opatření zůstává co nejčasnější záchyt lokální recidivy, kterou je možné řešit radikálně chirurgicky, či časný záchyt diseminace se zvážením chirurgického řešení nebo včasného zahájení adekvátní onkologické léčby s cílem udržet co nejdéle co nejlepší kvalitu života.

Vycházíme-li z konceptu, že karcinom prsu je systémové onemocnění, pak otázkou zůstává, zda bychom „rizikovější“ ženy neměli paušálně indikovat k neadjuvantní onkologické léčbě a teprve v druhé době operovat. Hovoříme-li o pokročilejších klinických stádiích (IIb a III) obvykle již nyní volíme tento způsob léčby, nicméně nejčastějším faktorem našeho rozhodnutí je po domluvě s nemocnou možnost provedení konzervativního chirurgického výkonu na místo radikálního, méně často z důvodu učinit nádor operabilní. Z našich výsledků, kdy v případě progresu byla zastižena pouze 1krát lokální recidiva a to ve spojení s diseminací, shledáváme přínos neoadjuvantní onkologické léčby zejména v systémovém působení. Nicméně pouze další studie a výzkumy v této oblasti mohou přinést nové a progresivní výsledky stran ovlivnění dlouhodobého přežití.

Při selekci „rizikové“ skupiny nemocných se ukázalo užitečné přihlídnutí k jistým rizikovým faktorům anamnestickým i nepříznivým vlastnostem tumoru, u nichž byla zjištěna statisticky významná korelace s vyššími hodnotami RF a NM. I tato spojitost by nám mohla pomoci při rozhodování o neoadjuvantní onkologické léčbě a intenzivnějším režimu dispenzární péče. Významná spojitost s prognosticky využitelnými RF a NM se jeví výskyt maligního onemocnění v rodinné i osobní anamnéze, hormonální léčba včetně hormonální antikoncepce, obezita, kouření, stanovení diagnózy karcinomu prsu před 40. rokem věku, věk 1. porodu po 30. roce, klimakterium po 50. roce věku. Stran nádoru lze jako nejsilnější nepříznivé faktory označit negativitu estrogenových receptorů a průkaz amplifikace HER2 genu.

Otázkou zůstává, jaký by byl vývoj a dynamika hladin RF a NM ve spojitosti s progresí onemocnění, zda jejich rutinní vyšetření v rámci follow up může znamenat přínos na poli časnější preklinické diagnostiky a vést klinického pracovníka k vyšší ostražitosti v rámci dispenzární péče. Odpovědi na tyto otázky jsou mimo rozsah naší práce, nicméně další výzkum věnovaný studiu prognosticky využitelných RF a NM může v budoucnu přinést rozřešení.

17. Závěry

- I.** Přínos předoperačního a časného pooperačního stanovení RF a NM coby prognostických ukazatelů DFI a OS byl naší prací prokázán pouze pro skupinu lokálně pokročilých karcinomů mléčné žlázy (klinická stádia IIb a III). Pro nemocné s časným karcinomem (I a IIa) jsme vzhledem ke statisticky významně lepší celkové prognóze a nedostatku událostí (progrese, úmrtí) nebyli schopni prognostický význam vybraných RF a NM posoudit. U pokročilých nádorů jsme zaznamenali výrazně vyšší četnosti nepříznivých prognostických parametrů vlastního nádoru i anamnestických rizikových faktorů. Pro klinická stádia IIb a III byl zjištěn statisticky významný kratší DFI i OS, což potvrzuje teorii, že staging nádorového onemocnění v době stanovení diagnózy je nejsilnějším prognostickým parametrem.
- II.** Ve skupině lokálně pokročilých nádorů jsme ve vztahu k DFI a OS zjistili prognostický význam těchto RF: HGF, VEGF, EGF, TGF, Leptinu. Je patrné, že před- i pooperační stanovení HGF má prediktivní význam pro DFI i OS, zatímco VEGF lze využít pouze jako prognostický ukazatel OS. Předoperační hladiny EGF a TGF lze využít jako prognostické ukazatele, které nepřímo úměrně korelují s celkovou délkou přežití. Jejich pooperační stanovení ve vztahu k OS, resp. perioperační stanovení ve vztahu k DFI nemá prognostický význam. Vyšší hladiny Leptinu souvisí s vyšší hodnotou BMI a jeho předoperační stanovení bylo prokázáno jako přínosný prognostický faktor stran DFI. Přikláníme se proto k názoru, že obézní pacientky (BMI > 30) mají vyšší riziko progrese onemocnění v porovnání s běžnou populací. Ostatní parametry (IGF-1 a IGFBP-3) nebyly prokázány jako statisticky významné ukazatele prognózy nemocných s lokálně pokročilým karcinomem prsu, nicméně z výsledků je patrné, že s kratším bezpříznakovým intervalem a kratším celkovým přežitím korelují nižší hladiny obou parametrů.
- III.** Z perioperačně stanovených nádorových markerů mají významný prognostický přínos MonoTotal, TK, TPA, jak ve vztahu k DFI, tak k OS. Co se týká CA 15-3, lze předoperační hodnotu využít také jako prognostický ukazatel, ale dle obecné charakteristiky markeru můžeme potvrdit, že v případě radikálního chirurgického odstranění nádorového ložiska bez

přítomnosti vzdálených metastáz dochází časně pooperačně k poklesu markeru do referenčních rozmezí, proto jeho pooperační stanovení u lokálně pokročilých nádorů nemá prognostický význam. Předoperační hodnota CEA je přímo úměrná riziku progresse nádorového onemocnění, jako ukazatel celkového přežití nemá prognostický význam.

IV. Přihlédneme-li k prognosticky využitelných RF a NM a statisticky významným rizikovým faktorů v anamnéze (výskyt onkologického onemocnění v osobní i rodinné anamnéze, hormonoterapie včetně hormonální antikoncepce, obezita, kouření, stanovení diagnózy karcinomu prsu před 40. rokem věku, věk 1. porodu po 30. roce, klimakterium po 50. roce věku) a nepříznivým prognostickým faktorům vlastního nádoru (negativita estrogenových receptorů, amplifikace HER2-genu), jsme schopni ve skupině lokálně pokročilých nádorů selektovat ty pacientky, u nichž je riziko progresse vyšší v porovnání s ostatními ženami v dané skupině. Domníváme se, že v „rizikové“ skupině může přinést zlepšení celkové prognózy personalizovaná primárně indikovaná onkologická léčba a zintenzivnění dispenzární péče s cílem co nejčasnějšího zachytu lokální recidivy či diseminace nádorového onemocnění.

V. Porovnáním a statistickým zpracováním předoperačních hodnot RF i NM mezi skupinou patientek s maligním onemocněním a skupinou patientek operovaných pro benigní lézi se nepodařilo pro žádný parametr stanovit takovou hodnotu RF, resp. NM, který byl mohl být klinicky využitelný v předoperační primární diagnostice, resp. diferenciální diagnostice maligních vs. benigních lézí.

18. Literatura

1. Adam Z., Vorlíček J., Vaniček J. et al. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2. Vyd., Grada Publishing, Praha 2004. ISBN 80-247-0896-5
2. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene*. 2011 Dec 19.
3. Al-Mowallad A, Kirwan C, Byrne G, McDowell G, Li C, Stewart A, Al-Qouzi A, Kumar S. Vascular Endothelial Growth Factor - C in Patients with Breast Cancer. *In Vivo*, 2007 May-Jun;21(3):549-51.
4. Arpino G, Laucirica R, Elledge RM. Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2005 Sep 20;143(6):446-57.
5. Arslan N, Serdar M, Deveci S, Ozturk B, Narin Y, Ilgan S, Ozturk E, Ozguven MA. Use of CA15-3, CEA and prolactin for the primary diagnosis of breast cancer and correlation with the prognostic factors at the time of initial diagnosis. *Ann Nucl Med*. 2000 Oct;14(5):395-9.
6. Aulmann S. Ductal and lobular preneoplasia: role in breast cancer development. *Pathologe*. 2011 Nov;32 Suppl 2:316-20.
7. Barcellos-Hoff MH, Ewan KB. Transforming Growth Factor - beta and Breast Cancer: Mammary gland Development. *Breast cancer Res.*, 2000;2(2):92-9.
8. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, Fourquet A, Borger J, Jager J, Hoogenraad W, Collette L, Pierart M; European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Breast Cancer Groups. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1378-87.
9. Bartella V, Cascio S, Fiorio E, Auriemma A, Russo A, Surmacz E. Insulin-dependent leptin expression in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4919-27.
10. Barth RJ Jr, Wells WA, Mitchell SE, Cole BF. A prospective, multi-institutional study of adjuvant radiotherapy after resection of malignant phyllodes tumors. *Ann Surg Oncol*. 2009 Aug;16(8):2288-94.
11. Becker HD., Hohenberger W., Junginger T., Schlag PM. Chirurgická onkologie. Grada Publishing a.s., Praha 2005. s. 21-27, 115-165. ISBN 80-247-0720-9

12. Boecker W. Preneoplasia of the breast. A new conceptual approach to proliferative breast disease. Mnichov: Elsevier Saunders, 2006, ISBN 100-7020-2892-4
13. C. Garcia Castro, M. Ravina, V. Castro, E.C. Salido. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Estrogen Receptor in Human Breast Carcinoma, Archives of Gynecology and Obstetrics, 2006 Jun:169-177.
14. Červinka V., Šťastný K, Šiller J., Havlíček K, Gatěk J., Vachtová M., Zedníková I, Naršanská A., Sůvová B., Třeška V., Kubala O., Pelikán A., Prokop J., Ostruzka P., Dostalík J., Hornychová I., Hovorková E., Ryška A., Hácová M., Rotrockel P., Vázan P., Velecký J., Hes O., Michal M., Horáček J., Burzla P., Čegan M., Tomanová R., Dvořáčková J., Záhora J. Can the axillary lymph node dissection be omitted in breast cancer ? Journal of Chinese Clinical Medicine. 2010; 5 (10): 565-570.
15. Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. J Cell Biochem. 2008 Nov 1;105(4):956-64.
16. Cody HS 3rd, Van Zee KJ. Point: sentinel lymph node biopsy is indicated for patients with DCIS. J Natl Compr Canc Netw. 2003 Apr;1(2):199-206.
17. Cody HS 3rd, Van Zee KJ. Predicting nonsentinel node metastases in sentinel node-positive breast cancer: what have we learned, can we do better, and do we need to? Ann Surg Oncol. 2008 Nov;15(11):2998-3002.
18. Cody HS 3rd. Clinical aspects of sentinel node biopsy. Breast Cancer Res. 2001;3(2):104-8.
19. Cody HS 3rd. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: indications, contraindications, and new directions. J Surg Oncol. 2007 May 1;95(6):440-2.
20. Cody HS 3rd. Sentinel lymph node biopsy for DCIS: are we approaching consensus? Ann Surg Oncol. 2007 Aug;14(8):2179-81.
21. Cody HS 3rd. Sentinel lymph node mapping in breast cancer. Breast Cancer. 1999;6(1):13-22.
22. Cody HS 3rd. SLN biopsy for large and/or multicentric breast cancers: should we worry? Eur J Surg Oncol. 2011 May;37(5):386-7.
23. Coufal O, Pavlík T, Fabian P, Bori R, Boross G, Sejben I, Maráz R, Koca J, Krejčí E, Horáková I, Foltinová V, Vrtelová P, Chrenko V, Eliza Tekle W, Rajtár M, Svébis M, Fait V,

Cserni G. Predicting non-sentinel lymph node status after positive sentinel biopsy in breast cancer: what model performs the best in a Czech population? *Pathol Oncol Res.* 2009 Dec;15(4):733-40.

24. Coufal O., Fait V. a kol. *Chirurgická léčba karcinomu prsu.* Grada Publishing, a.s., Praha 2011, ISBN 978-80-247-3641-9

25. Coufal O., Šporcrová I., Vrtělová P. Co pacientky potřebují vědět před operací mamárního karcinomu. *Klin Onkol.* 2011;24(5):343-7.

26. Čáprav I. et al. *Chirurgie orgánových metastáz.* Galén Karolinum, Praha 2008. s. 1-25, 47-133. ISBN 978-80-7262-493-5

27. de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Sep 6;92(17):1388-402.

28. Dixon JM. *Breast Surgery* 4th ed., Saunders Elsevier, United Kingdom 2009. ISBN 9780702030123

29. Doyle SL, Donohoe CL, Lysaght J, Reynolds JV. Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2011 Nov 3:1-9.

30. Dražan L. *Rekonstrukce prsu po mastektomii.* Grada Publishing, a.s., Praha 2006. s. 17-43. ISBN 80-247-1123-0

31. Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-8-9):685-696.

32. Eleni Petridou, Yannis Papadiamantis, Christos Markopoulos, Evangelos Spanos, Nick Dessypris, Dimitros Trichopoulos. Leptin and Insulin Growth Factor I in Relation to Breast Cancer. *Cancer Causes and Control*, 2000,11:383-388.

33. Ellenrieder V, Buck A, Gress TM. TGFbeta-regulated transcriptional mechanisms in cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002;31(1-3):61-9.

34. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):530-42.

35. Esteva FJ, Pusztai L. Optimizing outcomes in HER2-positive breast cancer: the molecular rationale. *Oncology (Williston Park).* 2005 Nov;19(13 Suppl 5):5-16.

36. Fait V, Coufal O, Gatěk J. Chirurgie karcinomu prsu v České republice. *Klin Onkol.* 2009;22(6):294-5.
37. Fait V, Chrenko V. Sentinel node biopsy in breast cancer: short time results show appropriate regional control. *Neoplasma.* 2007;54(3):256-61.
38. Fait V. Sentinelová biopsie a možnosti využití v současné onkochirurgii. *Klin Onkol.* 2008;21(1):5-19.
39. Fait V., Chrenko V., Schneiderová M., Sirotek L. Změny ve spektru operací prsu po zavedení mammárního screeningu. *Klin. Onkol.*, 2007, 20(1):38-41.
40. Fallowfield LJ, Fleissig A. The value of progression-free survival to patients with advanced-stage cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Oct 18;9(1):41-7.
41. Faneyte IF, Rutgers EJ, Zoetmulder FA. Chest wall resection in the treatment of locally recurrent breast carcinoma: indications and outcome for 44 patients. *Cancer.* 1997 Sep 1;80(5):886-91.
42. Finek J., Holubec L. Jr, Topocan O., Elgrova L., Skalova A., Pecen L. The Importance of Prognostic Factors in Premenopausal Woman with Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug; 27(4A): 1893-6.
43. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Oct 17;347(16):1233-41.
44. Fisher B, Anderson SJ. Local therapy and survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2007 Sep 6;357(10):1051.
45. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8):2672-85.
46. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med.* 2002 Aug 22;347(8):567-75.

47. Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, Johnson L, Newcombe RG, Dixon JM, Kissin M, Mansel RE. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Feb;95(3):279-93.
48. Fleissig A, Jenkins V, Catt S, Fallowfield L. Multidisciplinary teams in cancer care: are they effective in the UK? *Lancet Oncol.* 2006 Nov;7(11):935-43.
49. Frankenberry KA, Skinner H, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC. Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. *Int J Oncol.* 2006 Apr;28(4):985-93.
50. Galimi F, Brizzi MF, Comoglio PM. The hepatocyte growth factor and its receptor. *Stem Cells.* 1993 Jul;11 Suppl 2:22-30.
51. Gatěk J, Bakala J, Dudesek B, Duben J, Hnátek L, Dvorácková J. Biopsie sentinelové uzliny v chirurgické léčbě karcinomu prsu: prospektivní studie. *Ceska Gynekol.* 2003 Jan;68(1):6-10.
52. Gatek J, Duben J, Hnátek L, Bakala J, Dudesek B, Goldmanová B. Chirurgická léčba karcinomu prsu in situ. *Rozhl Chir.* 2004 Nov;83(11):597-603.
53. Gatek J, Dudesek B, Hnátek L, Vázan P, Cecháček M, Hradská K, Kotoc J, Musil T, Duben J. Lokální recidivy po konzervativních výkonech u časného karcinomu prsu. *Klin Onkol.* 2008;21(4):169-73.
54. Gatek J, Hnátek L, Dudesek B, Vázan P, Bakala J, Hradská K, Kotoc J, Musil T, Duben J. Biopsie sentinelové uzliny u karcinomu prsu v klinické praxi. *Rozhl Chir.* 2008 Apr;87(4):180-5.
55. Gatek J, Kotoc J, Kotocová K, Katrusák J, Vázan P, Duben J, Hnátek L, Dudesek B. Lokoregionální recidivy po konzervativních výkonech u časného karcinomu prsu. *Rozhl Chir.* 2010 Oct;89(10):604-11.
56. Ghasemi M, Emadian O, Naghshvar F, Bekhradnia A, Abediankenari S, Vahedi Larijani L, Moghimpour R. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and its correlation with tumor grade in breast ductal carcinoma. *Acta Med Iran.* 2011 Dec;49(12):776-9.
57. Giovannucci E. Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res.* 1999; 51 Suppl 3:34-41.

58. Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog.* 1999;10(4):303-60.
59. Gonzalez-Perez RR, Xu Y, Guo S, Watters A, Zhou W, Leibovich SJ. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signalling pathways and NFkappaB/HIF-1alpha activation. *Cell Signal.* 2010 Sep;22(9):1350-62.
60. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Taylor SK, Hood N. Insulin- and Obesity-Related Variables in Early-Stage Breast Cancer: Correlations and Time Course of Prognostic Associations. *J Clin Oncol.* 2011 Dec 12.
61. Grazia Arpino, Valerie J Bardou, Gary M Clark, and Richard M Elledge. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(3): R149–R156.
62. Grills IS, Kestin LL, Goldstein N, Mitchell C, Martinez A, Ingold J, Vicini FA. Risk factors for regional nodal failure after breast-conserving therapy: regional nodal irradiation reduces rate of axillary failure in patients with four or more positive lymph nodes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Jul 1;56(3):658-70.
63. Gu F, Schumacher FR, Canzian F, Allen NE, Albanes D, Berg CD, Berndt SI, Boeing H, Bueno-de-Mesquita HB, Buring JE, Chabbert-Buffet N, Chanock SJ, Clavel-Chapelon F, Dumeaux V, Gaziano JM, Giovannucci EL, Haiman CA, Hankinson SE, Hayes RB, Henderson BE, Hunter DJ, Hoover RN, Johansson M, Key TJ, Khaw KT, Kolonel LN, Laggiou P, Lee IM, LeMarchand L, Lund E, Ma J, Onland-Moret NC, Overvad K, Rodriguez L, Sacerdote C, Sánchez MJ, Stampfer MJ, Stattin P, Stram DO, Thomas G, Thun MJ, Tjønneland A, Trichopoulos D, Tumino R, Virtamo J, Weinstein SJ, Willett WC, Yeager M, Zhang SM, Kaaks R, Riboli E, Ziegler RG, Kraft P. Eighteen insulin-like growth factor pathway genes, circulating levels of IGF-I and its binding protein, and risk of prostate and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Nov;19(11):2877-87.
64. H.L.A. Hamida M.M. Farghalya H.I. Bakerb M.S. Al-Maneea. Carcinoma Originating from the Ectopic Mammary Gland of the Axilla. *Med Principles Pract* 2000;9:194–197.
65. Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJ, Salomon DS, Strizzi L. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15(2):191-9.

66. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jun 5;94(11):819-25.
67. Heywang-Köbrunner SH., Dershaw DD., Schreer I. Diagnostic breast imaging. Mammography, Sonography, Magnetic Resonance, Imaging and Interventional Procedures. 2nd ed., Stuttgart, New York: Thieme, 2001, ISBN 3-13-102892-0
68. Chen AM, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Thames HD, Outlaw ED, Strom EA, McNeese MD, Kuerer HM, Ross MI, Singletary SE, Ames FC, Feig BW, Sahin AA, Perkins GH, Babiera G, Hortobagyi GN, Buchholz TA. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2005 Feb 15;103(4):689-95.
69. Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2000 Apr;26(2):91-102.
70. Chourin S, Veyret C, Chevrier A, Loeb A, Gray C, Basuyau J. Routine use of serial plasmatic CA 15-3 determinations during the follow-up of patients treated for breast cancer. Evaluation as factor of early diagnosis of recurrence. *Ann Biol Clin (Paris).* 2008 Jul-Aug;66(4):385-92.
71. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep;25(3):435-57.
72. Jo Chien A, Rugo HS. Lapatinib: new directions in HER2 directed therapy for early stage breast cancer. *Cancer Treat Res.* 2009;151:197-215.
73. Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Sep;13(3):739-49.
74. Klener P. Význam angiogeneze u nádorových onemocnění a možnosti jejího ovlivnění. *Forum medicinae,* 1999,2:54-61.
75. Komoike Y, Akiyama F, Iino Y, Ikeda T, Akashi-Tanaka S, Ohsumi S, Kusama M, Sano M, Shin E, Suemasu K, Sonoo H, Taguchi T, Nishi T, Nishimura R, Haga S, Mise K, Kinoshita T, Murakami S, Yoshimoto M, Tsukuma H, Inaji H. Ipsilateral breast tumor recurrence (IBTR) after breast-conserving treatment for early breast cancer: risk factors and impact on distant metastases. *Cancer.* 2006 Jan 1;106(1):35-41.

76. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, Ashikaga T, Weaver DL, Mamounas EP, Jalovec LM, Frazier TG, Noyes RD, Robidoux A, Scarth HM, Wolmark N. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010 Oct;11(10):927-33.
77. Kretschmar M. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Transforming growth factor-beta/SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(2):107-15.
78. Kurebayashi J. Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer.* 2001;8(1):45-51.
79. Le XF, Mao W, Lu C, Thornton A, Heymach JV, Sood AK, Bast RC Jr. Specific blockade of VEGF and HER2 pathways results in greater growth inhibition of breast cancer xenografts that overexpress HER2. *Cell Cycle.* 2008 Dec;7(23):3747-58.
80. Leivonen SK, Kähäri VM. Transforming Growth Factor - beta Signaling in Breast Invasion and Metastasis. *Int J Cancer,* 2007,11:140-144.
81. Linehan DC, Hill AD, Akhurst T, Yeung H, Yeh SD, Tran KN, Borgen PI, Cody HS 3rd. Intradermal radiocolloid and intraparenchymal blue dye injection optimize sentinel node identification in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 1999 Jul-Aug;6(5):450-4.
82. Locatelli A, Lofgren KA, Daniel AR, Castro NE, Lange CA. Mechanisms of HGF/Met Signaling to Brk and Sam68 in Breast Cancer Progression. *Horm Cancer.* 2011 Nov 29.
83. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, Cochran AJ, Cody HS 3rd, Edge SB, Galper S, Hayman JA, Kim TY, Perkins CL, Podoloff DA, Sivasubramanian VH, Turner RR, Wahl R, Weaver DL, Wolff AC, Winer EP; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23(30):7703-20.
84. Lynn C. Hartmann, M.D., Thomas A. Sellers, Ph.D., Marlene H. Frost, Ph.D., Wilma L. Lingle, Ph.D., Amy C. Degnim, M.D., Karthik Ghosh, M.D., Robert A. Vierkant, M.A.S., Shaun D. Maloney, B.A., V. Shane Pankratz, Ph.D., David W. Hillman, M.S., Vera J. Suman, Ph.D., Jo Johnson, R.N., Cassann Blake, M.D., Thea Tlsty, Ph.D., Celine M. Vachon, Ph.D., L. Joseph Melton, III, M.D., and Daniel W. Visscher, M.D. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005;353:229-237.

85. Makris A, Powles TJ, Ashley SE, Chang J, Hickish T, Tidy VA, Nash AG, Ford HT. A reduction in the requirements for mastectomy in a randomized trial of neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast cancer. *Ann Oncol.* 1998 Nov;9(11):1179-84.
86. Maksan SM, Lehnert T, Bastert G, Herfarth C. Curative liver resection for metastatic breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2000 Apr;26(3):209-12.
87. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, Yiangou C, Horgan K, Bundred N, Monypenny I, England D, Sibbering M, Abdullah TI, Barr L, Chetty U, Sinnott DH, Fleissig A, Clarke D, Ell PJ. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2006 May 3;98(9):599-609. Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jun 21;98(12):876.
88. Martín A, Corte MD, Alvarez AM, Rodriguez JC, Andicoechea A, Bongera M, Junquera S, Pidal D, Allende T, Muñoz JL, Vizoso F. Prognostic value of pre-operative serum CA 15.3 levels in breast cancer. *Anticancer Res.* 2006 Sep-Oct;26(5B):3965-71.
89. Molina R, Auge JM, Farrus B, Zanón G, Pahisa J, Muñoz M, Torne A, Filella X, Escudero JM, Fernandez P, Velasco M. Prospective evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) in patients with primary locoregional breast cancer. *Clin Chem.* 2010 Jul;56(7):1148-57.
90. Nádorové markery a význam jejich stanovení, účelová publikace Immunotech, 1999.
91. Naik AM, Fey J, Gemignani M, Heerdt A, Montgomery L, Petrek J, Port E, Sacchini V, Scialfani L, VanZee K, Wagman R, Borgen PI, Cody HS 3rd. The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection: a follow-up study of 4008 procedures. *Ann Surg.* 2004 Sep;240(3):462-8.
92. Nakao A, Saito S, Inoue F, Notohara K, Tanaka N. Ectopic breast cancer: a case report and review of the Japanese literature. *Anticancer Res.* 1998 Sep-Oct;18(5B):3737-40.
93. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Dostupné na WWW: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf
94. Nicolini A, Tartarelli G, Carpi A, Metelli MR, Ferrari P, Anselmi L, Conte M, Berti P, Miccoli P. Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15.3 vs MCA and MCA-CA15.3 vs CEA-TPA-CA15.3 panel in the early detection of distant metastases. *BMC Cancer.* 2006 Nov 20;6:269.

95. Novotný J., Vítek P., Petruželka L. *Klinická a radiační onkologie pro praxi*. Triton, Praha 2005. s. 158-185. ISBN 80-7254-736-4
96. Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*. 1998 Nov 19;8(23):1243-52.
97. Pavlišta D a kol. *Neinvazivní karcinomy prsu*. Maxdorf Jesenius, Praha 2008. ISBN 978-80-7345-173-8
98. Piek E, Roberts AB. Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signaling pathways in tumorigenesis. *Adv Cancer Res*. 2001;83:1-54.
99. Planchard D, Soria JC, Michiels S, Grunewald D, Validire P, Caliandro R, Girard P, Le Chevalier T. Uncertain benefit from surgery in patients with lung metastases from breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Jan 1;100(1):28-35.
100. Prazakova M, Vrzalova J, Auge JM, Safranek J, Topolcan O, Fuchsova R, Spisakova M, Svobodova S, Holubec L Jr, Pesta M. The role of MonoTotal in the primary diagnosis, prognosis and follow-up of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Anticancer Res*. 2011 Sep;31(9):3107-12.
101. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology*. 2010 Sep;17(4):229-51.
102. Rastogi P. Targeting alternative pathways in HER2-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2010 Apr 30;24(5):415-6.
103. Ray A, Cleary MP. Obesity and breast cancer: A clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem*. 2011 Dec 8.
104. Renehan AG, Harvie M, Howell A. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and breast cancer risk: eight years on. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):273-8.
105. Rosen PP (Ed.) *Rosen's Breast Pathology*. 3rd ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2009, ISBN 100-7817-7137-4
106. Routiot T, Marchal C, Verhaeghe JL, Depardieu C, Netter E, Weber B, Carolus JM. Breast carcinoma located in ectopic breast tissue: a case report and review of the literature. *Oncol Rep*. 1998 Mar-Apr;5(2):413-7.
107. Sabel MS. *Essentials of breast surgery* 1st ed. Mosby Elsevier, Philadelphia 2009. ISBN 978-0-323-03758-7

108. Samy N, Ragab HM, El Maksoud NA, Shaalan M. Prognostic significance of serum Her2/neu, BCL2, CA15-3 and CEA in breast cancer patients: a short follow-up. *Cancer Biomark.* 2010;6(2):63-72.
109. Sandri MT, Salvatici M, Botteri E, Passerini R, Zorzino L, Rotmensz N, Luini A, Mauro C, Bagnardi V, Cassatella MC, Bottari F, Casadio C, Colleoni M. Prognostic role of CA15.3 in 7942 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov 9.
110. Sanguinetti A, Ragusa M, Calzolari F, D'Ajello F, Fioriti L, Papini D, Sidoni A, Roila F, Avenia N. Invasive ductal carcinoma arising in ectopic breast tissue of the axilla. Case report and review of the literature. *G Chir.* 2010 Aug-Sep;31(8-9):383-6.
111. Selzner M, Morse MA, Vredenburgh JJ, Meyers WC, Clavien PA. Liver metastases from breast cancer: long-term survival after curative resection. *Surgery.* 2000 Apr;127(4):383-9.
112. Sierra JR, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2011 Nov;3(1 Suppl):21-35.
113. Skovajsová M. Mammodiagnostika: integrovaný přístup. Galén, Praha 2003, ISBN 80-7262-220-X
114. Sobin LH., Wittekind Ch. TNM klasifikace zhoubných novotvarů. 6. vyd., Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2004, ISBN 80-7280-391-3.
115. Strnad P, Rob L, Krízová H, Zuntová A, Chod J, Halaska M. Biopsie sentinelové lymfatické uzliny u karcinomu prsu v praxi. *Ceska Gynekol.* 2005 Jul;70(4):291-5.
116. Strnad P, Rob L, Skapa P, Stankusová H, Michalová K, Chod J. Klinický význam mikrometastáz karcinomu prsu v sentinelové uzlině. *Ceska Gynekol.* 2008 Dec;73(6):360-4.
117. Sun L. Tumor-suppressive and promoting function of transforming growth factor beta. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1925-35.
118. Šťastný K, Červinka V., Šiller V., Havlíček K., Gatěk J., Vachtová M., Zedníková I., Ňaršanská A., Sůvová B., Třeška V., Kubala O., Prokop J., Ostruszka P., Dostalík J., Hornychová H., Hovorková E., Ryška A., Hacová M., Rothrockel P., Vážan P., Velecký J., Hes O., Michal M., Horáček J., Buzrla P., Čegan M., Tomanová R., Dvořáčková J., Záhora J. Prediktivní faktory postižení nonsentinelových uzlin u karcinomu prsu - závěry české multicentrické studie sentinelových uzlin. *Rozhl. Chir.*, 2011, 90(6):348-351.

119. Šimša J a kol. Sentinelová uzlina. Maxdorf Jesenius, Praha 2010. s. 142-164. ISBN 978-80-7345-213-1
120. Tagliabue E, Balsari A, Campiglio M, Pupa SM. HER2 as a target for breast cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 May;10(5):711-24.
121. Topolcan, O., Polivková, V., Pesek, M., Svobodová, S., Holubec, L., Finek, J., Elgrová, L.: Our experience with MonoTotal – pilot study. *Anticancer Res* 2004; 24 : 2293-2298.
122. Touboul E, Buffat L, Belkacémi Y, Lefranc JP, Uzan S, Lhuillier P, Faivre C, Huart J, Lotz JP, Antoine M, Pène F, Blondon J, Izrael V, Laugier A, Schlienger M, Housset M. Local recurrences and distant metastases after breast-conserving surgery and radiation therapy for early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Jan 1;43(1):25-38.
123. Umemura S, Kurosumi M, Moriya T, Oyama T, Arihiro K, Yamashita H, Umekita Y, Komoike Y, Shimizu C, Fukushima H, Kajiwara H, Akiyama F. Immunohistochemical evaluation for hormone receptors in breast cancer: a practically useful evaluation system and handling protocol. *Breast Cancer.* 2006;13(3):232-5.
124. Vadgama JV, Wu Y, Datta G, Khan H, Chillar R. Plasma insulin-like growth factor-I and serum IGF-binding protein 3 can be associated with the progression of breast cancer, and predict the risk of recurrence and the probability of survival in African-American and Hispanic women. *Oncology.* 1999 Nov;57(4):330-40.
125. Valente SA, Levine GM, Silverstein MJ, Rayhanabad JA, Weng-Grumley JG, Ji L, Holmes DR, Sposto R, Sener SF. Accuracy of Predicting Axillary Lymph Node Positivity by Physical Examination, Mammography, Ultrasonography, and Magnetic Resonance Imaging. *Ann Surg Oncol.* 2012 Jan 7.
126. Velaiutham S, Taib NA, Ng KL, Yoong BK, Yip CH. Does the pre-operative value of serum CA15-3 correlate with survival in breast cancer? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008 Jul-Sep;9(3):445-8.
127. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Oct 17;347(16):1227-32.

128. Veronesi U, Marubini E, Del Vecchio M, Manzari A, Andreola S, Greco M, Luini A, Merson M, Saccozzi R, Rilke F, et al. Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments: partly independent events. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jan 4;87(1):19-27.
129. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, Robertson C, Sacchini V, Veronesi P, Orvieto E, De Cicco C, Intra M, Tosi G, Scarpa D. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Feb 17;91(4):368-73.
130. Vrtělová P., Coufal O., Fait V., Chrenko V. Přesnost předoperačního stanovení velikosti invazivního mamárního karcinomu ultrasonografií a mamografií. *Rozhl Chir.* 2010; 89(10):599-603.
131. Weidner KM, Hartmann G, Naldini L, Comoglio PM, Sachs M, Fonatsch C, Rieder H, Birchmeier W. Molecular characteristics of HGF-SF and its role in cell motility and invasion. *EXS.* 1993;65:311-28.
132. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol.* 1993 Apr;121(1):145-54.
133. Willner J, Kiricuta IC, Kölbl O. Locoregional recurrence of breast cancer following mastectomy: always a fatal event? Results of univariate and multivariate analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Mar 1;37(4):853-63.
134. Wojcik, E., Tarapacz, J., Sobolewska, K., Kulpa, J.: Evaluation of diagnostic utility of MonoTotal in lung cancer patients. *J Lab Diagnostics* 2009; 45: 75-80.
135. Yerra L, Karnad AB, Votaw ML. Primary breast cancer in aberrant breast tissue in the axilla. *South Med J.* 1997 Jun;90(6):661-2.
136. SVOD. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Dostupné na WWW: <http://www.svod.cz>
137. Galimberti V, Botteri E, Chifu C, Gentilini O, Luini A, Intra M, Baratella P, Sargenti M, Zurrada S, Veronesi P, Rotmensz N, Viale G, Sonzogni A, Colleoni M, Veronesi U. Can we avoid axillary dissection in the micrometastatic sentinel node in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat.* 2012Feb;131(3):819-25.

138. Pepels MJ, de Boer M, Bult P, van Dijck JA, van Deurzen CH, Menke-Pluymers MB, van Diest PJ, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Regional recurrence in breast cancer patients with sentinel node micrometastases and isolated tumor cells. *Ann Surg.* 2012 Jan;255(1):116-21.
139. Bolondi M, Farinetti A. Axillary lymph node dissection in patients with micrometastasis in sentinel lymph node: new predilections. *Minerva Chir.* 2011 Oct;66(5):385-395.
140. Neri A, Megha T, Bettarini F, Tacchini D, Mastrogiulio MG, Marrelli D, Pinto E, Tosi P. Is tissue inhibitor of metalloproteinase-1 a new prognosticator for breast cancer? An analysis of 266 cases. *Hum Pathol.* 2012 Mar 5.
141. Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Brüner N, Foekens JA. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2289-98.
142. Zoras O, Ziogas D, Roukos DH. Omitting axilla lymphadenectomy even by positive sentinel lymph node: a change in breast cancer treatment practice. *Womens Health (Lond Engl).* 2011 Jul;7(4):417-8.
143. Yi M, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Mittendorf EA, Kuerer HM, Hwang RF, Bedrosian I, Rourke L, Hunt KK. Trends in and outcomes from sentinel lymph node biopsy (SLNB) alone vs. SLNB with axillary lymph node dissection for node-positive breast cancer patients: experience from the SEER database. *Ann Surg Oncol.* 2010 Oct;17 Suppl 3:343-51.
144. Meretoja TJ, Vironen JH, Heikkilä PS, Leidenius MH. Outcome of selected breast cancer patients with micrometastasis or isolated tumor cells in sentinel node biopsy and no completion axillary lymph node dissection. *J Surg Oncol.* 2010 Sep 1;102(3):215-9.
145. Onkogenní markery. Indikace a interpretace. In vitro diagnostika, 2008, č. 10, s. 13-17
146. Shojaei F, Simmons BH, Lee JH, Lappin PB, Christensen JG. HGF/c-Met pathway is one of the mediators of sunitinib-induced tumor cell type-dependent metastasis. *Cancer Lett.* 2012 Jan 21.
147. Jacobs ET, Martínez ME, Alberts DS, Ashbeck EL, Gapstur SM, Lance P, Thompson PA. Plasma insulin-like growth factor I is inversely associated with colorectal adenoma recurrence: a novel hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Feb;17(2):300-5.
148. Klener P. *Klinická onkologie*. Galén, Praha 2002, s. 11-70, 495-515, ISBN 80-7262-151-3.

149. Vyzula R. Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění – 14. vydání, Masarykův onkologický ústav, Brno 2011, s. 11-27, ISBN 978-80-904989-0-7.
150. Teppala S, Shankar A. Association between serum IGF-1 and diabetes among U.S.adults. *Diabetes Care*. 2010 Oct;33(10):2257-9.
151. Emily J. Gallagher, MBBCh, MRCPI, Yvonne Fierz, MD, Rosalyn D. Ferguson, PhD, and Derek LeRoith, MD, PhD. The Pathway From Diabetes and Obesity to Cancer: Insulin and IGF-1 Signaling. *Endocrine Practice*. 2010;16(5):864-873.
152. Masur K, Thévenod F, Zänker KS (eds): Diabetes and Cancer. Epidemiological Evidence and Molecular Links. *Front Diabetes*. Basel, Karger, 2008 (19): 97–113.
153. Franky Dhaval Shah, Shilin Nandubhai Shukla, Pankaj Manubhai Shah, Patel HR,Prabhudas Shankerbhai Patel. Significance of alterations in plasma lipid profile levels in breast cancer. *Integr Cancer Ther*. 2008 Mar;7(1):33-41.
154. Owiredu WK, Donkor S, Addai BW, Amidu N. Serum lipid profile of breast cancer patients. *Pak J Biol Sci*. 2009 Feb 15;12(4):332-8.
155. Pinder SE, Ellis IO, Elston CW. Prognostic factors in primary breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1995 November; 48(11): 981–983.
156. Kuijt GP, Voogd AC, van de Poll-Franse LV, Scheijmans LJ, van Beek MW, Roumen RM. The prognostic significance of axillary lymph-node micrometastases in breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol*. 2005 Jun;31(5):500-5.
157. Maaike de Boer, M.D., Carolien H.M. van Deurzen, M.D., Jos A.A.M. van Dijck, Ph.D., George F. Borm, Ph.D., Paul J. van Diest, M.D., Ph.D., Eddy M.M. Adang, Ph.D., Johan W.R. Nortier, M.D., Ph.D., Emiel J.T. Rutgers, M.D., Ph.D., Caroline Seynaeve, M.D., Ph.D., Marian B.E. Menke-Pluymers, M.D., Ph.D., Peter Bult, M.D., Ph.D., and Vivianne C.G. Tjan-Heijnen, M.D., Ph.D. Micrometastases or Isolated Tumor Cells and the Outcome of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361:653-663.
158. Maaskant-Braat AJ, van de Poll-Franse LV, Voogd AC, Coebergh JW, Roumen RM, Nolthenius-Puylaert MC, Nieuwenhuijzen GA. Sentinel node micrometastases in breast cancer do not affect prognosis: a population-based study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 May;127(1):195-203.

159. Gloyeske NC, Goreal W, O'Neil M, Connor C, Tawfik OW, Fan F. Outcomes of Breast Cancer Patients with Micrometastases and Isolated Tumor Cells in Sentinel Lymph Nodes. *In Vivo* Nov-Dec 2011;25(6):997-1001.
160. Ozao-Choy J, Giuliano AE. Prognostic significance of micrometastasis and isolated tumor cells in the sentinel lymph node. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 May;127(1):205-6.
161. Patrick L, Fitzgibbons, MD; David L. Page, MD; Donald Weaver, MD; Ann D. Thor, MD; D. Craig Allred, MD; Gary M. Clark, MD; Stephen G. Ruby, MD; Frances O'Malley, MD; Jean F. Simpson, MD; James L. Connolly, MD; Daniel F. Hayes, MD; Stephen B. Edge, MD; Allen Lichter, MD; Stuart J. Schnitt, MD. Prognostic Factors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7): 966-978.
162. Marchbanks PA, Curtis KM, Mandel MG, Wilson HG, Jeng G, Folger SG, McDonald JA, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Wingo PA, Simon MS, Norman SA, Strom BL, Ursin G, Weiss LK, Burkman RT, Spirtas R. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. *Contraception.* 2011 Sep 28.
163. E B, D B, W B, K M, S R, C L. Relationship Between Use of Different Oral Contraceptive Formulations and Breast Cancer Risk Among Young Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Feb 15.
164. Imkampe AK, Bates T. Correlation of age at oral contraceptive pill start with age at breast cancer diagnosis. *Breast J.* 2012 Jan-Feb;18(1):35-40.
165. White E, Malone KE, Weiss NS, Daling JR. Breast cancer among young U.S. women in relation to oral contraceptive use. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Apr6;86(7):505-14.
166. Ursin G, Ross RK, Sullivan-Halley J, Hanisch R, Henderson B, Bernstein L. Use of oral contraceptives and risk of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 Jul;50(2):175-84.
167. Hurst NJ Jr, Najy AJ, Ustach CV, Movilla L, Kim HR. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression. *Biochem J.* 2012 Feb 1;441(3):909-18.
168. Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Malspeis S, Spiegelman D, Chen W, Stampfer MJ, Willett WC. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Oct;19(10):2496-502.

169. Poli A, Marangoni F, Visioli F. Alcohol consumption and breast cancer risk. *JAMA*. 2012 Feb 15;307(7):666.
170. Nishioka T, Kim HS, Luo LY, Huang Y, Guo J, Yan Chen C. Sensitization of epithelial growth factor receptors by nicotine exposure to promote breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res*. 2011 Nov 15;13(6):R113.
171. D.M.F. Pons-Anicet, B.P. Krebs, R. Mira & M. Namer. Value of CA 15:3 in the follow-up of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* (1987), 55, 567-569.
172. Klener P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Grada Publishing, Praha 2010, s. 77-131. ISBN 978-80-247-2808-7
173. Johnston Stephen R. D. Role signální dráhy mTOR u karcinomu prsu rezistentního na endokrinní léčbu – příležitost pro nové strategie kombinované léčby. Dostupné na WWW: http://www.linkos.cz/asco/chapter/role-signalni-drahy-mtor-u-karcinomu-prsu-rezistentniho-na-endokrinni-lecby-prilezitost-pro-nove-strategie-kombinovane-lecby/#cely_text_clanku
174. Anders CK, Winer EP, Ford JM, Dent R, Silver DP, Sledge GW, Carey LA. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: "targeted" therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Oct 1;16(19):4702-10.
175. Hiller DJ, Chu QD. Current Status of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors as Novel Therapeutic Agents for Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*. 2012;2012:829315.
176. Park Y, Moriyama A, Kitahara T, Yoshida Y, Urita T, Kato R. Triple-negative breast cancer and Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Jan 19.
177. Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, Hillen HF. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998 Aug;78(4):460-5.
178. Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjänen K. The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(11):687-92.
179. Nakagomi H, Miyake T, Hada M, Hagiwara J, Furuya K, Muto S, Koshizuka K, Takano K, Kato R, Imamura K, Oyama T, Tada Y. Prognostic and Therapeutic Implications of the MIB-1 Labeling Index in Breast Cancer. *Breast Cancer*. 1998 Jul 25;5(3):255-259.

180. Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'hern R, Makris A, Gregory RK, Chang J, Dowsett M. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Nov;82(2):113-23.
181. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):174-83.
182. Mohsenifar J, Almassi-Aghdam M, Mohammad-Taheri Z, Zare K, Jafari B, Atri M, Mortazavi SH, Azadeh P, Bagherzadeh M, Azargashb E, Rahimi F. Prognostic values of proliferative markers Ki-67 and repp86 in breast cancer. *Arch Iran Med.* 2007 Jan;10(1):27-31.
183. Bade LK, Goldberg JE, Dehut HA, Hall MK, Schwertfeger KL. Mammary tumorigenesis induced by fibroblast growth factor receptor 1 requires activation of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci.* 2011 Sep 15;124(Pt18):3106-17.
184. McBryan J, Howlin J, Napoletano S, Martin F. Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008 Jun;13(2):159-69.
185. Humphreys RC, Hennighausen L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene.* 2000 Feb 21;19(8):1085-91.
186. Zhoubné nádory v roce 2009. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Praha, 2012. Dostupné na WWW: <<http://www.uzis.cz>>

19. Publikační a prezentační činnost autora

Publikace: 9

Publikace s impact faktorem: 3

1. Kucera R., Cerna M., Narsanska A., Svobodova S., Strakova M., Vrzalova J., Fuchsova R., Treskova I., Kydlicek T., Treska V., Pecen L., Topolcan O., Pazdiora P. Growth Factors and Breast Tumors, Comparison of Selected Growth Factors with Traditional Tumor Markers. Anticancer Res. 2011 Dec;31(12):4653-6

IF 1,656

2. Pesta M, Topolcan O, Holubec L Jr, Rupert K, Cerna M, Holubec LS, Treska V, Finek J, Cerny R. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. Anticancer Res. 2007 Jul-Aug;27(4A):1863-7.

IF 1,656

3. Treska V, Liska V, Skalicky T, Sutnar A, Treskova I, Narsanska A, Vachtova M. Non-colorectal liver metastases: surgical treatment options. Hepatogastroenterology. 2012 Jan-Feb;59(113):245-8.

IF 0,677

Publikace v recenzovaných časopisech: 6

4. Černá M, Ňaršanská A, Třeška V, Topolčan O. IGF1 a nádorové markery ve stádiích nádoru prsu. Rozhl. Chir., 2011, 90(12):684-690.
5. Šťastný K, Červinka V, Šiller V, Havlíček K, Gatěk J, Vachtová M, Zedníková I, Ňaršanská A, Sůvová B, Třeška V, Kubala O, Prokop J, Ostruzka P, Dostalík J, Hornychová H, Hovorková E, Ryška A, Hácová M, Rothrockel P, Vážan P, Velecký J, Hes O, Michal M, Horáček J, Buzrla P, Čegan M, Tomanová R, Dvořáčková J, Záhora J. Prediktivní faktory postižení nonsentinelových uzlin u karcinomu prsu - závěry české multicentrické studie sentinelových uzlin. Rozhl. Chir., 2011, 90(6):348-351.
6. Červinka V, Šťastný K, Šiller J, Havlíček K, Gatěk J, Vachtová M, Zedníková I, Ňaršanská A, Sůvová B, Třeška V, Kubala O, Pelikán A, Prokop J, Ostruzka P, Dostalík J, Hornychová I, Hovorková E, Ryška A, Hácová M, Rotrockel P, Vážan P, Velecký J, Hes O, Michal M, Horáček J, Buzrla P, Čegan M, Tomanová R, Dvořáčková J, Záhora J. Can the axillary lymph node dissection be omitted in breast cancer ? Journal of Chinese Clinical Medicine. 2010; 5 (10): 565-570.
7. Vachtová M, Třeška V, Sůvová B, Hes O, Ebelenderová D. Karcinom prsu u nemocné po transplantaci ledviny – kazuistika. Rozhl.Chir., 2009; 88(11): 687-690.
8. Třeška V, Liška V, Skalický T, Sutnar A, Šmíd D, Ňaršanská A, Vachtová M, Třešková I, Brůha J, Vyčítal O. Jaterní metastázy jiného než kolorektálního původu. Rozhl.Chir. 2010;89(3): 202-207.
9. Třeška V, Topolčan O, Vrzalová J, Šlauf F, Liška V, Skalický T, Sutnar A, Fichtl J, Ňaršanská A, Vachtová M. Mohou nádorové markery předpovídat výsledek embolizace větve portální žíly u nemocných s primárně inoperabilním nádorem jater? Rozhl. Chir, 2011;90(5): 285-289.

Přednášky: 8

1. 14. ročník Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 10.1.2009: **Léčba metastazujícího Ca mléčné žlázy**
2. Sekcama Bratislava, 25.4.2009: **Ca prsu u muže**
3. 4. kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu, Plzeň, 11.6.2009: **Moderní přístupy k léčbě metastazujícího Ca prsu**
4. 13. mammologické sympozium, Praha, 20.11.2009: **Ca prsu u nemocné po transplantaci ledviny – kazuistika**
5. Sekcama Bratislava, 6.5.2010: **Postižení non -sentinelových uzlin při nálezu makrometastáz, mikrometastáz a submikrometastáz v sentinelových uzlinách karcinomu prsu. Závěry české multicentrické studie sentinelových uzlin karcinomu prsu. Práce podpořena grantem IGA NS 10238-3/2009**
6. 14. mammologické sympozium Praha, 26.11.2010: **Problematika léčby karcinomu mléčné žlázy u žen do 35 let – zkušenosti našeho pracoviště v 5,5 letém období. Práce podpořena grantem IGA MZ NS 10238-3/2009**
7. 1. mamární den KOC v Plzni, 21.9.2011: **Mammologická problematika u mladých žen – retrospektivní zhodnocení souboru pacientek z Chirurgické kliniky FN v Plzni. Práce podpořena grantem IGA MZ NS 10238-3/2009**
8. 17. ročník Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 6.1.2012: **Recidivující phyllodes tumor u mladé ženy s atypickou lokalizací. Práce vznikla za podpory grantu IGA NS10238-3/2009**

Postery: 4

1. Valencie Španělsko - 16th world congress of the senologic international society, 20.10.2010: **Involvement of non-sentinel lymph nodes associated with the detection of breast cancer macrometastases, micrometastes and submicrometastases in sentinel nodes. Conclusions of the Czech multicentre study of sentinel nodes in breast cancer.** *Supported by IGA NS10238-3/2009 grant.*
2. Konference pro studenty pre- a postgraduálního studia Plzeň, 25.11.2010: **Výsledky léčby karcinomu mléčné žlázy u žen do 35 let v 5,5letém období.** *Práce podpořena grantem IGA NS 10238-3/2009.*
3. Lisabon, Portugalsko - ADVACED BREAST CANCER (3.-5. 11.2011), **Selected case reports of treatment of locally advanced breast cancer – sanative mastectomy.** *Supported by IGA NS10238-3/2009 grant.*
4. 15. mammologické symposium, Praha, 25.11.2011: **Management léčby duktálního karcinomu in situ mléčné žlázy, soubor nemocných léčených na Chirurgické klinice FN v Plzni v 5letém období.** *Práce podpořena grantem IGA MZ NS 10238-3/2009.*

20. Přílohy

20.1 Příloha 1 - Informovaný souhlas pacienta s klinickou studií

Informovaný souhlas pacienta

Jméno pacienta:

Identifikace pacienta:.....

Souhlasím se zařazením do klinické studie výzkumu nádorového onemocnění mléčné žlázy.

Prohlašuji, že jsem byla svým ošetřujícím lékařem srozumitelně seznámena s protokolem studie a veškeré nejasnosti mi byly srozumitelně vysvětleny. Beru na vědomí, že léčebné metody, které jsou mě poskytovány, odpovídají zásadám správné klinické praxe, že jde o metody zavedené a obecně přijímané a že se nejedná o použití experimentálních metod ani experimentálních léků. Souhlasím s odběry krve za účelem laboratorního vyšetření a monitorování průběhu onemocnění. Souhlasím s použitím vyšetřovacích postupů podle protokolu studie. Z této studie mohu v jejím průběhu kdykoli odstoupit bez udání důvodu.

V Plzni dne : _____

.....

podpis pacienta

.....

podpis řešitele studie

20.2 Příloha 2 – Přehledný seznam obrázků

Obrázek 1 - Incidence a mortalita karcinomu prsu	- 18 -
Obrázek 2 – Rozložení karcinomu prsu dle věkových kategorií	- 18 -
Obrázek 3- Bezpříznakový interval pro všechny pacientky s maligním onemocněním	- 82 -
Obrázek 4 - Bezpříznakový interval podle stádia onemocnění (G1-G3)	- 82 -
Obrázek 5 - Celkové přežití pro všechny pacientky s maligním onemocněním	- 83 -
Obrázek 6 - Celkové přežití podle stádia onemocnění (G1-G3)	- 83 -
Obrázek 7- Bezpříznakový interval v podskupině G3 (stádium IIb+III)	- 87 -
Obrázek 8- DFI podle předoperační hodnoty MonoTotalu (medián 80)	- 89 -
Obrázek 9 - DFI podle předoperační hodnoty Leptinu (medián 30000)	- 89 -
Obrázek 10 - DFI podle předoperační hodnoty HGF (medián 3500)	- 90 -
Obrázek 11 - DFI podle předoperační hodnoty TK (cut off 8)	- 90 -
Obrázek 12 - DFI podle předoperační hodnoty TPA (cut off 80)	- 91 -
Obrázek 13 - DFI podle předoperační hodnoty CA 15-3 (cut off 24)	- 91 -
Obrázek 14 - DFI podle předoperační hodnoty CEA (cut off 3)	- 92 -
Obrázek 15 - DFI podle pooperační hodnoty MonoTotalu (medián 27)	- 93 -
Obrázek 16 - DFI podle pooperační hodnoty HGF (medián 4000)	- 94 -
Obrázek 17 - - DFI podle pooperační hodnoty VEGF (medián 300)	- 94 -
Obrázek 18 - DFI podle pooperační hodnoty TK (cut off 8)	- 95 -
Obrázek 19 - DFI podle pooperační hodnoty TPA (cut off 80)	- 95 -
Obrázek 20 - Celkové přežití v podskupině G3 (stádium IIb+III)	- 96 -
Obrázek 21 - OS podle předoperační hodnoty MonoTotalu (medián 80)	- 97 -
Obrázek 22 - OS podle předoperační hodnoty HGF (medián 3500)	- 98 -
Obrázek 23 - OS podle předoperační hodnoty EGF (medián 300)	- 98 -

Obrázek 24 - OS podle předoperační hodnoty TGF (medián 12)	- 99 -
Obrázek 25 - OS podle předoperační hodnoty VEFG (medián 200)	- 99 -
Obrázek 26 - OS podle předoperační hodnoty TK (cut off 8).....	- 100 -
Obrázek 27 - OS podle předoperační hodnoty TPA (cut off 80)	- 100 -
Obrázek 28 - OS podle předoperační hodnoty CA 15-3 (cut off 24).....	- 101 -
Obrázek 29 - OS podle pooperační hodnoty MonoTotalu (medián 27).....	- 102 -
Obrázek 30 - OS podle pooperační hodnoty HGF (medián 4000).....	- 103 -
Obrázek 31 - OS podle pooperační hodnoty VEGF (medián 300)	- 103 -
Obrázek 32 - OS podle pooperační hodnoty TK (cut off 8).....	- 104 -
Obrázek 33 - OS podle pooperační hodnoty TPA (cut off 80)	- 104 -

20.3 Příloha 3 – Přehledný seznam tabulek

Tabulka 1 - Přehled angiogenních faktorů	- 23 -
Tabulka 2 - Patologická TNM klasifikace	- 28 -
Tabulka 3 - Stádia nádorového onemocnění	- 29 -
Tabulka 4 - Rizikové skupiny pacientek s karcinomem prsu (St Gallen 2007).....	- 41 -
Tabulka 5 - Stupeň diferenciacce.....	- 46 -
Tabulka 6 - Přehled vybraných RF, jejich receptorů, funkcí a cílových buněk	- 62 -
Tabulka 7 - Přehledná tabulka struktury zkoumaného souboru	- 79 -
Tabulka 8 - Výsledky testování četností vlastností nádoru mezi skupinami	- 80 -
Tabulka 9 - Výsledky testování četností rizikových faktorů mezi skupinami	- 81 -
Tabulka 10 - DFI ve zkoumaném souboru.....	- 84 -
Tabulka 11 - OS ve zkoumaném souboru	- 85 -
Tabulka 12 - Výsledky testování RF a NM mezi skupinami	- 85 -
Tabulka 13 - Přehled událostí ve skupině nemocných s karcinomem mléčné žlázy.....	- 86 -
Tabulka 14- Hazard Ratio ve vztahu k DFI před operací.....	- 88 -
Tabulka 15- Hazard Ratio ve vztahu k DFI po operaci.....	- 92 -
Tabulka 16 - Hazard Ratio ve vztahu k OS před operací.....	- 97 -
Tabulka 17- Hazard Ratio ve vztahu k OS po operaci.....	- 101 -
Tabulka 18 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory ve skupině nemocných s maligním onemocněním	- 106 -
Tabulka 19 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory v podskupině G1	- 107 -
Tabulka 20 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory v podskupině G2	- 108 -
Tabulka 21 - Statisticky významné korelace RF a NM s anamnestickými rizikovými faktory v podskupině G3	- 108 -

Tabulka 22 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru ve skupině pacientek s maligním onemocněním	- 109 -
Tabulka 23 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru v podskupině G1	- 109 -
Tabulka 24 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru v podskupině G2	- 110 -
Tabulka 25 - Statisticky významné korelace RF a NM s nepříznivými prognostickými vlastnostmi nádoru v podskupině G3	- 110 -