

POPULACE BUNĚK KARCINOMU PRSU.

**VYUŽITÍ PRO STANOVENÍ OPTIMÁLNÍHO
TERAPEUTICKÉHO POSTUPU.**

PREDIKTIVNÍ MODEL

MUDr. Dušan Kolařík

2016

Poděkování

Tato práce by nemohla vzniknout bez pomoci a podpory mnoha kolegů, přátel a kamarádů. Chtěl bych touto cestou poděkovat zejména těm, jejichž podíl na našem společném díle byl největší.

- Bc. Michaele Prudilové, dokumentátorce a datamanažerce, za pomoc při kompletaci údajů o pacientkách
- lékařům onkochirurgického oddělení Medicon Praha s.r.o. pod vedením primáře MUDr. Václava Pechy, za podporu projektu a poskytnutí cenných medicínských dat
- MUDr. Miroslavě Skovajsové, Ph.D., vedoucí radiodiagnostické jednotky Medicon Praha s.r.o., za cenné konzultace metodiky
- MUDr. Markétě Trnkové, ředitelce Biolabu Praha, s.r.o., za kompletaci histopatologických údajů a konzultace metodiky zpracování biologických vzorků
- Mgr. Haně Kolářové, Ph.D., statističce, za cenné konzultace metodiky matematického zpracování i extrémně precizní zpracování statistického souboru

Vám všem ještě jednou mnohokrát děkuji a těším se opět v budoucnu na další spolupráci.

Dušan Kolařík

OBSAH

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

ABSTRAKT – ČESKY

Východiska

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

Cíle práce

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

Pacienti a metody

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

Výsledky

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

Diskuse

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

Závěry

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

ABSTRACT – ENGLISH

Background

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

Aims of the study

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

Patients and methods

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

Results

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

Discussion

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

Conclusions

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

1 ÚVOD

1.1 KARCINOM PRSU

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným onemocněním u žen – tvoří 23% ze všech malignit ženské populace. Jeho incidence neustále stoupá a v roce 2013 přesáhla v České republice počet 130 případů na 100 tisíc žen, což řadí naši republiku k zemím s nejvyšší četností záchytu tohoto onemocnění. I přes stále vzrůstající incidenci jeví mortalita karcinomu prsu díky moderním diagnostickým a terapeutickým postupům mírně klesající trend (1).

Tradičním terapeutickým postupem bylo po celé 20. století snesení celého prsu a kompletní disekce axilárních lymfatických uzlin. Tato léčebná strategie byla vyvozována z Halstedova přesvědčení, že karcinom prsu je lokalizované onemocnění, které je možno zvládnout radikální (nebo superradikální) lokoregionální terapií (2;3). Operačnímu výkonu v axile byl přisuzován jak význam terapeutický (lokální kontrola onemocnění v podpažní jamce), tak stagingový (na základě správně stanoveného rozsahu onemocnění je možné stanovit adekvátní pooperační terapii).

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

Snaha o podobné omezení rozsahu zákroků je patrná také v axilární chirurgii. Opakovaně bylo prokázáno, že stav mízních uzlin v axile je nejdůležitějším izolovaným prognostickým faktorem jak pro přežívání bez známek onemocnění (DFS) tak pro celkové přežívání (OS) pacientek s karcinodem prsu (4;5). Obecně platí, že jediným doposud akceptovaným způsobem ověření stavu lymfatických uzlin je jejich **chirurgická exstirpace a následné mikroskopické vyšetření**. Tento způsob dosahuje nejvyšší úspěšnosti v záchytu časných stadií metastatického procesu v lymfatických uzlinách. Dosud naopak není k dispozici neoperační postup, který by s dostatečnou přesností umožnil hodnotit stav uzlin; radiodiagnostické metody (MRI, PET) mají limitace pro detekci uzlinového postižení o průměru menším než 1cm. Proto je zjištění stavu axilárních uzlin nedílnou součástí každého chirurgického zákroku prováděného pro histologicky verifikované zhoubné onemocnění prsu. Existuje několik způsobů, jak dosáhnout tohoto cíle:

- *kompletní axilární disekce* (axillary lymph node dissection – ALND) odstraňuje lymfatické uzliny v rozsahu I. a II. axilární etáže (tj. laterálně od mediálního okraje musculus pectoralis minor) až do úrovně axilární vény; jedná se o výkon zatížený významnou morbiditou, zřetelně vyšší, než samotný zákrok na prsu (viz také oddíl 1.3.2.2.)

- *axilární sampling* znamená odběr 4-5 izolovaných uzlin z I. etáže axily – axilární tuk a většina uzlin a lymfatických uzlin zůstávají neporušeny a proto se ve větší míře nevyskytují komplikace spojené s kompletní axilární disekcí (6); pacientky s nálezem metastáz nádoru v těchto odebraných uzlinách jsou kandidátkai pro doplnění kompletní axilární disekce, nebo pro iradiaci regionální lymfatické oblasti

- *biopsie sentinelové uzliny* (sentinel lymph node biopsy – SLNB) – pomocí radioizotopu nebo barviva se sleduje lymfatická cesta z prsu k mízním uzlinám a odebírá se první uzlina na této cestě; tento cílený postup má nižší četnost falešné negativity než sampling uzlin „naslepo“

- *úplně vynechání operačního zákroku v axile* – vysvětlení pro tento postup spočívá v tom, že jakýkoliv zákrok v axile zvyšuje morbiditu operace a že tento iatrogenní vliv nemusí být

vyvážen žádným ovlivněním způsobu adjuvantní terapie; zejména u starších žen s klinicky negativními uzlinami bývá zákrok v axile vypuštěn, protože adjuvantní chemoterapie se u těchto pacientek používá jen zřídka (7)

Argumentace pro a proti použití každého ze jmenovaných chirurgických přístupů je komplikovaná a jejich používání v klinické praxi se liší – podle typu léčené pacientky a podle zvyklostí pracoviště. Kompletní axilární disekce je v současné době rezervována většinou pouze pro případy, kdy se při biopsii sentinelové uzliny nebo axilárním samplingu zjistí metastatické postižení odebraných uzlin; doposud je ALND také jediný standardní postup v chirurgické terapii žen léčených neoadjuvantně (pomocí chemoterapie nebo hormonální terapie). Od samplingových metod je patrný odklon nejen v léčbě prsních malignit, ale také v celé onkologické chirurgii; důvodem je především nepříjemně vysoký vliv náhodnosti spojený s odběrem lymfatické tkáně naslepo, obvykle z oblastí, které jsou chirurgovi nejlépe přístupné (8;9). Biopsie sentinelové uzliny se v posledních letech stává široce akceptovaným standardem v axilární chirurgii v případě časného karcinomu prsu.

Cílem této práce je ověřit, zda použití neoperačních metod umožní s dostatečnou přesností předvídat postižení axilárních lymfatických uzlin. Nástrojem pro tuto predikci je matematický model sestavený na základě podrobné analýzy souboru údajů o pacientkách léčených pro zhoubná onemocnění prsu časných stadií. Tento model si klade za cíl použít známé vstupní údaje o pacientce a jejím nádoru, tj. prognostické a prediktivní faktory (získané pomocí konvenčních zobrazovacích metod a pomocí rozboru vzorku nádorové tkáně odebrané před zahájením terapie) a odhadnout riziko postižení axilárních uzlin. Tento odhad pak může umožnit přizpůsobení radikality zákroku v axile pro každou individuální pacientku.

1.2 PROGNOTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY

Prognostické faktory jsou definovány jako vlastnosti nádoru, které napomáhají odhadnout prognózu nádorového onemocnění prsu. Prediktivní faktory naopak umožňují předpovědět, jakým způsobem bude zhoubný nádor reagovat na konkrétní léčebnou modalitu. V současné době je při indikaci pooperační léčby kladen podstatně větší důraz na vlastnosti samotného nádoru, tedy jeho prognostické a prediktivní faktory, zatímco stav mízních uzlin se dostává spíše do role ukazatele pokročilosti nádorového onemocnění (viz doporučení ze St. Gallen 2005 (10), 2007 (11), 2009 (12)). To je podstatná změna v přístupu k léčbě prsních malignit ve srovnání s minulostí, kdy byl stav axilárních mízních uzlin jedním z nejdůležitějších kritérií, které rozhodovalo o tom, zda a jaká bude použita adjuvantní terapie (viz konsenzuální guideline pro adjuvantní systémovou léčbu ze St. Gallen 1998 (13), 2001 (14), 2003 (15)). Proto je v současnosti věnována taková pozornost studiu vlastností jednotlivých prognostických a prediktivních faktorů a jejich použití v klinické praxi.

1.2.1 HORMONÁLNÍ RECEPTORY (HR)

V normální tkáni prsu obsahují jak duktální, tak lobulární epitelové buňky estrogenové receptory (ER) i progesteronové receptory (PR) (16), i když jejich množství je obvykle malé až neměřitelné (17). Na rozdíl od toho u karcinomu prsu je množství ER výrazně vyšší a přímo **úměrné stupni diferenciaci** nádoru: je 90% u grade I, ale jen 50% u grade 3 (18); celkově je možno ER prokázat asi u 65% karcinomů (19) (obvykle udávané rozmezí je 50-80% (17;20)). Zastoupení HR zjištěné imunohistochemicky ve studii s více než 7000 ženami ukazuje tabulka 1 (21). Je důležité, že pouze asi 33% premenopauzálních karcinomů exprimuje ER, zatímco po menopauze má pozitivní ER výrazná většina karcinomů – kolem 80% (22).

Míra exprese hormonálních receptorů je však spojena i s dalšími charakteristikami buněčné populace nádorů prsu – zejména s histologickým typem tumoru (vyšší zastoupení u lobulárních karcinomů), přítomností vaskulární invaze (méně hormonálních receptorů je v případech prokázané invaze), ploeditou tumoru (méně HR u aneuploidních tumorů), nebo s podílem buněk v S-fázi – viz níže (méně HR u vysoké SPF) (23).

Tabulka 1

stav receptorů	podíl pozitivních nádorů
ER+ / PgR +	54,8%
ER+ / PgR -	19,8%
ER- / PgR +	3,2%
ER- / PgR -	22,1%

Možnosti stanovení HR

Nejpoužívanější metodou pro stanovení přítomnosti hormonálních receptorů je v současnosti imunohistochemie – detekce na základě značené protilátky proti receptorům. Semikvantitativně se hodnotí buď pouze **procento obarvených jader** bez ohledu na **intenzitu** jejich zbarvení, nebo se zohledňují obě tyto veličiny – tzv. **H-skóre** (3x procento silně pozitivních + 2x procento středně pozitivních + 1x procento slabě pozitivních) (24). Metodika je samozřejmě náročná na kvalitu laboratorního zpracování – zejména adekvátní fixaci a antigen-retrieval. Tyto požadavky platí o to více při hodnocení vzorků s minimálním množstvím materiálu, jako je tomu např. u jehlových biopsií. Také z tohoto důvodu je s ohledem na klinickou praxi (a zejména na indikaci adekvátní terapie) dobré uvědomit si, že existují výrazné mezilaboratorní rozdíly zejména při hodnocení vzorků s hraniční pozitivitou (jedna studie udává dokonce diskordanci výsledků až v 60% případů slabě pozitivních receptorů (25)). To může být jedním z vysvětlení „paradoxních“ odpovědí nádorů na hormonální léčbu v případě „negativních“ hormonálních receptorů.

Z hlediska časové úspory je výhodnější a v současné době na stále více místech využívána náhrada ručního odečtu imunohistochemických preparátů automatickou analýzou obrazu.

Prognostický význam stanovení HR

Hormonální receptory jsou jedním z obecně uznávaných prognostických markerů, u nichž byla prokázána spojitost s příznivějším vývojem onemocnění – delším intervalem přežívání bez návratu onemocnění (DFS). Multivariační analýza prokázala nezávislost tohoto faktoru na stavu lymfatických uzlin. Stav hormonálních receptorů je však považován za **slabší** prognostický faktor – nádory s pozitivními HR obecně vykazují alespoň v několika prvních letech po stanovení diagnózy pomalejší růst (v důsledku asociace s ostatními prognostickými ukazateli – viz výše), ale nikoliv nižší schopnost metastazování.

Prediktivní hodnota HR

Naopak prediktivní hodnota hormonálních receptorů pro odpověď na endokrinní léčbu je jasně vyjádřena. Odhad celkové reaktivity maligních nádorů prsu na hormonální terapii provedla skupina EBCTCG (26; 27) – viz tabulku 2.

Tabulka 2

stav receptorů	response rate
ER+ / PgR +	75%
ER+ / PgR -	27%
ER- / PgR +	46%
ER- / PgR -	11%

Množství ER pozitivních tumorů, které mají schopnost reagovat na hormonální léčbu je asi 50%-65% (28). Plných 25% ER+/PgR+ tumorů je však **primárně rezistentních** na hormonální terapii. Jedním z vysvětlení může být existence defektních receptorů, nebo abnormální interakce hormon-receptorového komplexu s DNA v jádře. Ověření funkčnosti receptorů je tedy problémem, který by měl být vyřešen v souvislosti s indikací hormonální terapie. Proto byla zkoumána role četných proteinů, které by mohly sloužit jako markery funkčních ER. Měly by to být takové látky, které jsou produkovány pouze prostřednictvím estrogenových receptorů – viz níže. Nabízejí se však i další mechanismy, které by mohly objasnit rezistenci na podávání hormonů: přítomnost *koregulátorů* receptorové aktivity, preference *jiných signálních cest* při regulaci proliferace (např. EGF receptory – viz níže), nebo *ztráta exprese* receptorů v průběhu terapie (nastává především u metastatických a rekurentních nádorů).

Situaci však dále komplikuje fakt, že také asi 11% karcinomů s negativními ER i PgR může reagovat na hormonální manipulaci; pravděpodobně se tedy při regulaci uplatňují i mimoreceptorové mechanismy.

Změny receptorů dané průběhem maligního onemocnění

S progresí onemocnění se projevuje tendence ke snižování množství hormonálních receptorů. Studie se 42 pacientkami s relapsem nádoru (první biopsie z primárního nádoru, opakovaná biopsie z metastázy nebo z lokální recidivy) prokázala statisticky významné snížení počtu pacientů s pozitivními HR (37% z ER-pozitivních se změnilo na ER-negativní a všechny ER-negativní zůstaly ER-negativní), ale bez významného poklesu průměrné koncentrace HR u jednotlivých pacientů (29).

1.2.1.1 Estrogenové receptory (ER)

Historicky starším typem receptorů je ER- α , teprve v devadesátých letech minulého století byl popsán i ER- β . Jejich tkáňová distribuce se částečně překrývá a je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem, který určuje různou reaktivitu tkání na endokrinní podněty. Průkaz ER v populaci nádorových buněk je příznivým prognostickým faktorem, který nejlépe predikuje odpověď tumoru na hormonální léčbu, a to bez ohledu na stadium onemocnění (30).

Standardně se pro imunohistochemické stanovení positivity estrogenových receptorů používá monoklonálních protilátek typu 1D5 (DAKO), které reagují pouze s ER- α . Prognostická role ER- β je stále nejasná, pravděpodobně je však značně menší, než je tomu u ER- α . Zajímavé výsledky však přineslo srovnání nádorové a nenádorové tkáně odebrané ve stejnou dobu z prsu obsahujícího karcinom: ER- α mRNA je vyšší v ER-pozitivní tkáni karcinomu, ale podobný rozdíl nebyl prokázán u ER-negativních tumorů; množství ER- β mRNA je ve tkáni ER-pozitivních tak i ER-negativních karcinomů nižší, než ve tkáni bez nádoru. Tato pozorování zdůrazňují význam ER- β v procesu kancerogeneze – ER- β mohou hrát roli supresora nádorového růstu v normální prsní tkáni (31).

Za hranici positivity ER je obvykle považována *biochemickou metodou* stanovená hladina **10 fmol na miligram** cytozolového proteinu – tato hodnota je považována za prognosticky nejvíce relevantní (32). Hodnotíme-li pozitivitu *imunohistochemicky*, pak je za hranici positivity obvykle považováno **>10%** obarvených buněčných jader bez ohledu na intenzitu obarvení.

1.2.1.2 Progesteronové receptory (PgR)

Také v případě progesteronových receptorů jsou popsány dva typy – PgR-A a PgR-B. Na rozdíl od estrogenových receptorů jsou však kódovány jediným genem a rozdíl je tvořen

použitím různých promoterů. V normální tkáni prsu je zastoupení těchto subtypů přibližně srovnatelné, nádorová transformace může tuto rovnováhu vychýlit oběma směry. Běžné imunohistochemické metody nerozlišují mezi stanovením těchto subtypů a proto je poměrně omezené množství informací o tom, jakou prognostickou hodnotu mají jednotlivé subtypy ani jak přesně reagují na protinádorovou léčbu (33).

Průkaz PgR v nádorové tkáni je také považován za pozitivní prognostický faktor. Jejich stanovení zpřesňuje odhad odpovědi na antiestrogenní terapii. Syntéza PgR je totiž regulována estrogenovými receptory a míra produkce PgR je přímo úměrná množství funkčních estrogenových receptorů. Bohužel však ani prediktivní hodnota progesteronových receptorů není zcela spolehlivá – asi jedna čtvrtina tumorů se chová v rozporu s tím, co naznačuje stav PgR (viz přehled (34)). Je také zajímavé, že malá část (<5%) ER-negativních tumorů vykazuje pozitivitu PgR (viz tabulku 1). Pro tento zdánlivý paradox se nabízí vysvětlení, že část PgR může být syntetizována nezávisle na stavu estrogenových receptorech. Bylo také prokázáno, že stav progesteronových receptorů má významnou prediktivní hodnotu pro odpověď na anti-progestinovou léčbu (35).

Celková pozitivita PgR v buňkách karcinomu prsu je také závislá na stupni diferenciaci tumoru (18).

Na rozdíl od ostatních proteinů, jejichž syntéza je závislá na estrogenech, je produkce PgR v buňkách karcinomu prsu **stimulována** tamoxifenem (36;37) – může to být v důsledku parciální estrogenní aktivity tamoxifenu (37).

Z prognostického hlediska se ukazuje nejvýhodnější stanovit hranici positivity PgR na hodnotu **25 fmol na miligram** cytozolového proteinu (32).

1.2.2 PROLIFERAČNÍ AKTIVITA

Všechny parametry uvedené v této části jsou obrazem míry proliferace tumoru, pravděpodobně však odrážejí různé charakteristiky proliferačního procesu. Zatímco průměrné hodnoty SPF a TLI (viz níže) vykazují obvykle obdobný trend změn v průběhu léčby, je konkordance těchto dvou parametrů pro individuální případy nízká (pouze kolem 40%) (38). Podle některých studií měly markery proliferace v univariační analýze hodnotu nezávislého *negativního* prognostického faktoru karcinomu prsu – např. Ki67 (39), TLI (40).

Tumory s vyšší proliferační aktivitou (Ki67, mitotický index) reagovaly lépe na léčbu chemoterapeutiky (41). V souladu s tím byl u většiny z těchto nádorů prokázán také vyšší apoptotický index (42). Naproti tomu však nebyla prokázána žádná korelace *bcl-2* (inhibitoru apoptózy – viz níže) s touto zvýšenou proliferací a jen slabá byla korelace se zvýšenou mírou apoptózy (42).

Aplikací neoadjuvantní chemoterapie se snižuje míra proliferace (42), pravděpodobně v důsledku predominantního účinku cytostatik na rychle proliferující klony. V těsném časovém sledu s tím se snižuje také intenzita apoptózy.

1.2.2.1 Četnost mitóz (*MAI = Mitotic Activity Index*)

Tento parametr nejlépe koreluje s histopatologickým gradingem (43) a je podle většiny zdrojů nejdůležitější charakteristikou pro určení gradingu (44). Pro zachování reprodukovatelnosti výsledků (jak MAI, tak i gradingu) je nutné sjednotit metodiky jak pro počítání mitóz, tak pro grading. Obvykle je doporučováno počítat mitózy při zvětšení 40x, tedy na ploše 1,6mm² v nejvíce proliferující oblasti tumoru (45). Další informace – viz níže (oddíl 1.2.5.1.).

Většina studií dokládá silnou nezávislou prognostickou hodnotu takto zjištěné mitotické aktivity (viz přehled (33)). Výsledek není ovlivněn délkou skladování před fixací, metodika

je reprodukovatelná a praktická. Je použitelná i pro vzorky z jehlových biopsií a proto může být dobrým nástrojem pro sledování intenzity odpovědi na protinádorovou terapii.

Odhad stupně proliferace pomocí MAI je samozřejmě zkreslen různou délkou mitotické fáze, která je značně variabilní zejména v aneuploidní frakci. Aby byla naše představa o míře proliferace přesnější, bylo by zapotřebí kromě růstové frakce (dané např. MAI) získat informace také o délce buněčného cyklu. To se daří zatím pouze experimentálně, např. hodnocením argyrofilního nucleolar organizer region (AgNOR) (46).

1.2.2.2 Imunohistochemické metody

Využívají vazby značených protilátek na antigeny specifické pro buněčný cyklus s vazbou na mitotickou fázi.

Ki67

Jde o sadu tzv. heat stress proteins, které se klasifikují podle molekulové hmotnosti (hsp27, hsp60, apod.). Jejich koncentrace jsou zvýšeny při některých „stresových“ situacích (zánět, vysoká teplota, léčba cytostatiky, atd.).

Prognostický význam stanovení Ki67 byl opakovaně dokladován, a to nejen v případech invazivních, ale také in situ karcinomů (47).

Index se signifikantně snižuje přibližně po 3 měsících po zahájení léčby (chemo- i hormonoterapie) (48). K tomuto snížení dochází pouze u tumorů reagujících na podanou léčbu (kompletní nebo parciální odpověď), z průměrných 8,0% před léčbou na průměrné 1,3% po léčbě (42). Změnu indexu Ki67 lze tedy považovat za signál dobré léčebné odpovědi (48). Předléčebná hodnota Ki67 je pak dobrým prediktorem klinické odpovědi.

K detekci Ki67 se využívá monoklonálních protilátek MIB-1. Hodnocení musí být provedeno při 40-násobném zvětšení na nejméně 1000 maligních buňkách – kvůli heterogenitě nádorové populace (42). Z důvodu této heterogenity je možno za biologicky významnou považovat změnu indexu nejméně o 50% (42).

Další metody

Proliferative Cells Nuclear Antigen (PCNA) neprokázal prognosticky relevantní informaci o proliferaci buněk prsního karcinomu a většinou se již nevyužívá. Naopak perspektivním faktorem je topoizomeraza II α .

1.2.2.3 Inkorporační metody

Tyto metody jsou založeny na aktivní inkorporaci nukleotidů se značenou pyrimidinovou bází do nově syntetizované DNA. Tento proces probíhá specificky v S-fázi a proto tyto metodiky určují frakci buněk v S-fázi. Takto získané výsledky jsou velmi přesné; metody však vyžadují manipulaci s radioaktivními látkami, jejich intravenózní aplikaci a následnou inkorporaci vitálními buňkami (nelze je tedy aplikovat na archivované vzorky). Proto je využitelnost těchto metod v praxi horší a většinou se opouštějí.

³H-thimidin labelling index (³HT-LI = TLI)

Tento ukazatel nejlépe odráží aktuální změny proliferační aktivity a je proto také dobrým markerem biologického downstagingu nádoru v důsledku podávané léčby (38). Podobně jako MAI však vytváří také TLI pouze omezenou představu o buněčné kinetice – neposkytuje např. informaci o délce buněčného cyklu ani o distribuci buněk v jednotlivých fázích cyklu (49). Za hraniční hodnotu k rozlišení pomalu a rychle proliferujících nádorů je obvykle považována hodnota TLI = 3% (38).

Vyjádření TLI se zdá být úzce spjato se stavem hormonálních receptorů (40). Je signifikantně vyšší u pre- a perimenopauzálních karcinomů (asi 4%), zatímco u postmenopauzálních je to jen 1,6%; obecně se TLI snižuje se vzrůstajícím věkem pacientek

(50). odnota TLI přímo odráží míru reakce nádoru na polychemoterapii (40). V souladu s očekáváním je TLI nezávislý na klinickém stádiu nádoru (40).

Klinický význam TLI byl potvrzen celou řadou klinických studií. Využití těchto poznatků v klinické praxi by mohlo přinést zavádění protokolů zohledňujících buněčnou kinetiku.

TLI má pro pacienty s karcinomem prsu *negativní* prognostický význam nezávislý na velikosti nádoru a hodnotách p53 a bcl-2. Pravděpodobnost metastazování karcinomu je 2x vyšší u žen s vysokým TLI; pro tyto pacientky je vhodné volit více razantní chemoterapii (40)

Prediktivní hodnota TLI není zcela jednoznačná. Bohužel neexistuje obecná souvislost mezi TLI a senzitivitou na chemoterapii; pro určité specifické typy nádorů lze však tuto závislost prokázat (40). Reaktivita ER-pozitivních tumorů na léčbu tamoxifenem je 2-3x pravděpodobnější u nádorů s nízkou proliferací (nezávisle na stavu progesteronových receptorů) (40).

Bromodeoxyuridin – BrdU

Prognostická hodnota inkorporace BrdU je srovnatelná s výsledky získanými stanovením Ki67 nebo počítáním MAI (51), je však podstatně náročnější na čas i náklady.

1.2.2.4 Průtoková cytometrie

Frakce S-fáze (S-phase fraction – SPF)

Tato hodnota je nejlepším indikátorem akumulace buněk v syntetické fázi buněčného cyklu (38). Hraniční hodnotou pro odlišení rychle proliferujících klonů je 4,5% (38). U diploidních tumorů je udáván medián SPF = 4,75%, u aneuploidních tumorů je medián 15,8% (52).

Je-li tento faktor využit izolovaně pro hodnocení kinetiky tumoru, je jeho výpovědní hodnota poměrně omezená. Neposkytuje totiž žádnou informaci o délce buněčného cyklu ani o jeho fázích (49). Přítomnost buněk “zabrzděných” v S-fázi tudíž snadno vede k nadhodnocení SPF. Řešení tohoto omezení nabízí například využití průtokové cytometrie – současné hodnocení DNA a jaderných proteinů nebo DNA a BrdU (49).

Další limitace metody vyplývá z toho, že průtoková cytometrie využívá homogenát tkáně a pracuje proto s průměrnými hodnotami SPF. Není schopna zohlednit anatomické souvislosti a tudíž ani heterogenitu tumoru, tedy jev, který je velmi častý u karcinomu prsu.

Distribuce buněk v buněčném cyklu

Průtoková cytometrie může stanovit podíl buněk nahromaděných v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Akumulace ve fázích G₂-M je pozorována jako výsledek léčby cytostatiky, zejména pak režimů obsahujících antracykliny (38).

1.2.3 PARAMETRY APOPTÓZY

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je závěrečnou společnou cestou cytotoxického efektu různých protinádorových preparátů s různými mechanismy účinku (53). Představuje *aktivní* formu buněčné „sebevraždy“ – vyžaduje energii dodávanou prostřednictvím štěpení ATP, dochází při ní k syntéze RNA a proteinů a kulminuje obvykle aktivací endogenních endonukleáz (čímž se degraduje zdroj genetického kódu nezbytného pro buněčnou homeostázu).

Regulace na jakékoliv úrovni tohoto procesu pak determinuje jeho výsledek. Může se jednat o regulaci na úrovni senzoru („práh jeho citlivosti“ určuje spuštění nebo nespouštění celého děje), signální cesty (translokace do jádra, vazba na receptor DNA) nebo přímo genové transkripce. A ovšem může být také zablokován inhibitory proteosyntézy, transkripce nebo endonukleáz (53). Charakteristiky těchto změn lze najít již poměrně dlouho předtím, než buňka ztratí svou životaschopnost. V tomto případě je ztráta integrity buněčné membrány

relativně pozdní událostí, a to na rozdíl od *nekrózy*, která je charakterizována časným zvýšením membránové permeability, zduřením buňky a nakonec její rupturou.

Buňky zasažené procesem apoptózy vykazují mnohé společné morfologické změny (sražení buněk, jejich separace od svého okolí, dezintegrace cytoplasmy, přítomnost apoptotických tělísek – tj. drobných fragmentů cytoplasmy, pyknóza jader, změny kondenzace chromatinu) a biochemické charakteristiky (zejména rozpad DNA na oligonukleotidové fragmenty (180-200 párů bází) jako následek působení endonukleáz). V normálních buňkách je štěpení DNA považováno za přechodný fenomén, který stimuluje genovou expresi (54) – v tomto případě je možné syntézu poly-ADP-ribózových komplexů chápat jako pokus o buněčnou reparaci a obnovení chromatinových struktur. V buňkách „odsouzených k smrti“ tento reparační mechanismus evidentně selhává (53).

Příčinou vzniku prsního karcinomu je maligní transformace kmenových buněk terminální duktolobulární jednotky (TDLU) (55). Při této transformaci hraje pravděpodobně důležitější úlohu selhání apoptózy nežli nadměrná proliferace těchto prekurzorů epiteliálních buněk.

Velmi důležitým (a možná nejdůležitějším) faktorem rezistence tumoru na léčbu je schopnost inhibice apoptózy. V tomto případě preoperační chemoterapie selektuje reziduální populaci buněk, jejíž vlastnosti se mohou velmi zásadně lišit od těch, které charakterizovaly původní nádor před zahájením léčby (42).

1.2.3.1 Apoptotický index (AI)

Způsob hodnocení AI

Nejspolehlivější metodou stanovení je světelná mikroskopie – hodnotí se morfologické změny buněk (viz výše); pro dosažení dobré reprodukovatelnosti je však nutno sjednotit pravidla hodnocení. To musí být prováděno při 40-násobném zvětšení nejméně u 3000 maligních buněk – je to z důvodu velmi nízké bazální úrovně AI v buňkách lidského prsního karcinomu a také pro eliminaci vlivu heterogenity buněčné populace (42). Napomoci může i imunohistochemie, zejména při použití enzymů zúčastněných na procesech apoptózy, tzv. kaspáz. Perspektivní metodou je i „in situ end-labelling assay“. Tato metoda zjišťuje index fragmentované DNA (56). Nevýhodou průtokové cytometrie použitelné v této souvislosti je opět ztráta morfologických souvislostí a nemožnost zohlednění heterogenity tumoru.

Prognostický význam AI

Apoptotický index pozitivně koreluje s histopatologickým gradingem tumoru a s mitotickou aktivitou (57). Společně s mírou proliferace (vyjádřenou pomocí MAI) je AI dalším nezávislým prognostickým faktorem, který umožňuje zpřesnit odhad vývoje maligního onemocnění. Vyšší AI je spojen s horší prognózou karcinomu (58).

Apoptotický index se zvyšuje na 2-3-násobek již 2 dny po zahájení chemoterapie (48). Elevace přetrvává 16 týdnů (48), pak se snižuje (společně s poklesem proliferační aktivity). Mechanismus tohoto poklesu je vysvětlován pouze spekulativně – může jít o následek selekce pomalu proliferujících klonů nebo snížení vaskulárního zásobení (a tudíž hypoxie reziduálního tumoru chránící proti buněčné smrti), případně o důsledek jiných molekulárních mechanismů, které jsou podrobněji diskutovány v literatuře (42). Po 3 měsících od zahájení terapie je pozorován podstatný pokles AI u těch pacientů, kde byla prokázána dobrá klinická odpověď na léčbu (48).

Existuje velmi úzká vazba mezi hodnotami AI a Ki67, a to jak před léčbou, tak v jejím průběhu (42). Inverzní souvislost mezi hodnotami AI a Bcl-2 (viz níže) v průběhu protinádorové léčby je slabší, avšak také statisticky významná (42). Tato závislost je dokonce zachována i u reziduálních buněk rezistentních na chemoterapii. To může signalizovat, že dokonce i v takové populaci fungují regulační mechanismy společné oběma pochodům – apoptóze i proliferaci – které určují poměr mezi těmito procesy (42).

1.2.3.2 Bcl-2 protein (název odvozen od B-buněk maligního lymfomu)

Jde o 26 kD protein kódovaný mitochondriální DNA (59). Overexprese byla původně popsána v souvislosti s translokací t(14,18), která juxtaponuje gen bcl-2 a lokus těžkých řetězců imunoglobulinů. Podíl prsních nádorů s pozitivitou bcl-2 je přibližně 65-80% (60-62).

Protein bcl-2 je většinou integrální součástí vnitřní mitochondriální membrány (α -forma); kotvená do membrány pomocí C-terminální hydrofobní signální sekvence (63). Může se však vyskytovat také v jiných subcelulárních kompartmentech – v endoplasmatickém retikulu nebo v jaderné membráně (64), nebo po delecii C-terminální signální sekvence v cytoplasmě (β -forma) (54; 63).

Bcl-2 je inhibitorem apoptózy. Může ochraňovat mnohé buňky před buněčnou smrtí navozenou protinádorovými preparáty. Mechanismus této inhibice není stále plně objasněn. Podílí se na něm regulace antioxidantní cesty (zabraňuje oxidativnímu poškození volnými radikály, jako např. peroxidací lipidů) (65; 66), nebo ovlivnění kompartmentalizace intracelulárních Ca^{++} iontů (67). Může změnit působení mnoha chemoterapeutik z cytotoxického na cytostatické. V experimentu umožňuje bcl-2 reiniciaci nádorového růstu po odstranění léčiva z buněčné kultury. Tedy alespoň pro některé maligní buňky s deregulovanou expresí bcl-2 právě tato může být hlavním mechanismem pro přežití in vivo a zahájení proliferace mezi jednotlivými cykly chemoterapie (59). Navíc může bcl-2 prostřednictvím zpomalení nebo eliminace procesu apoptózy umožnit buňkám dodatečné genetické alterace (mimo jiné i získání lékové rezistence), a tudíž i možnost přežít nebo dokonce proliferovat v přítomnosti antineoplastických látek (59). Z tohoto úhlu pohledu by bylo možné považovat buňky s přítomností aktivního genu pro bcl-2 za nepříznivý prognostický faktor. To je však paradoxně v rozporu s výsledky pozorovanými v klinických studiích (viz také níže).

V počáteční fázi odpovědi nádoru na léčbu dochází k poklesu bcl-2. Přibližně po 3 měsících se exprese bcl-2 opět zvyšuje, a to v inverzní závislosti na poklesu míry apoptózy (vyjádřené snížením apoptotického indexu – viz výše). Tato pozorování jsou konzistentní s hypotézou, podle níž se bcl-2 může podílet na vzniku chemorezistence prostřednictvím útlumu léky indukované apoptózy (42).

Vysoké předléčebné hodnoty bcl-2 bývají pozorovány v konkordanci s příznivými prognostickými faktory (jako např. s průkazem hormonálních receptorů), nízké hladiny naopak s výskytem negativních prognostických faktorů (např. p53, HER-2, EGFR (61; 62)); žádná vazba nebyla prokázána s indexem Ki67 nebo přítomností TGF (61). Pozitivita bcl-2 je spojena s lepšími výsledky adjuvantní léčby (60); pokud jde o reakci na hormonální terapii, pak nejlepších odpovědí bylo dosaženo u nádorů se současnou pozitivitou bcl-2 a estrogenových receptorů (61). Je tedy velmi pravděpodobné, že na regulaci exprese bcl-2 v buňkách prsního karcinomu se podílí estrogení transkripční cesta – to jest estrogeny pravděpodobně stimulují nejen buněčnou proliferaci, ale také programovanou buněčnou smrt. Samotné estrogeny zvyšují výskyt bcl-2, podávání tamoxifenu jej naopak snižuje (19; 68). Estrogeny aktivovaná produkce bcl-2 je pravděpodobně jedním z hlavních důvodů, proč nádory s pozitivitou estrogenových receptorů hůře odpovídají na léčbu chemoterapeutiky; tento předpoklad byl potvrzen v experimentální studii – po podání čistého antiestrogenu ICI 164,384 se snížila exprese bcl-2; to vedlo u nádorové linie MCF-7 k nárůstu senzitivity vůči adriamycinu (19). Někteří autoři proklamují bcl-2 jako prediktivní faktor příznivé léčebné odpovědi (60; 61), existují dokonce studie potvrzující nezávislou prediktivní hodnotu tohoto parametru (60). Paradoxní kontroverze mezi očekávatelným zhoršením prognózy

tumoru díky inhibici apoptózy (viz výše) a prediktivní hodnotou dobrých výsledků léčby karcinomu prsu může signalizovat odlišný mechanismus účinku v různých tkáních (42).

Exprese bcl-2 je také negativně regulována tumor supresorickým proteinem p53 (viz níže). Také tento mechanismus se společně s účinkem estrogenů může spolupodílet na míře exprese bcl-2 i jeho aktivitě (19).

Možnosti detekce bcl-2

Podrobný popis metod stanovení proteinu bcl-2 je podán v literatuře (38). Hodnocení je nutno provádět při 40-násobném zvětšení, a to nejméně na 1000 maligních buněk (42) (vzhledem k heterogenitě buněčné populace). Za hraniční hodnotu pro pozitivitu bcl-2 je obvykle považováno jeho zastoupení v nejméně 5% buněk (38); hranicí mezi slabou a silnou pozitivitou je pak obvykle 30% (38). Zjištění vysoce pozitivní hodnoty bcl-2 bylo prokázáno jako pozitivní prognostický faktor u pacientek bez axilárního lymfatického postižení (N0) (69).

1.2.3.3 Další supresory apoptózy

Z dnes již široké řady apoptotických inhibitorů uvádíme alespoň ty, které jsou v literatuře zmiňovány nejčastěji – tedy *bcl-x_L* (= *bcl-x_{long}*) nebo *bag1*, nově také survivin. Jejich role v regulaci apoptózy je méně známá a u většiny nebyl prokázán bezprostřední přínos pro odhad prognózy tumoru ani ve smyslu prediktivním.

1.2.3.4 Bax protein

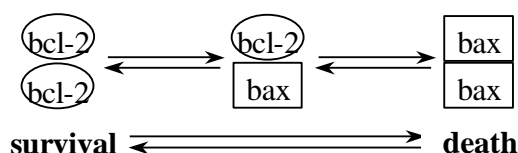
Tento pro-apoptotický faktor je 21 kD protein, s rozsáhlou homologií skladby aminokyselin s bcl-2. Obsahuje C-terminální hydrofobní segment kotvící (α -formu) bax k membráně podobným způsobem, jako je tomu u bcl-2. Tyto dva proteiny mohou tedy být zachyceny na stejné membráně, dokonce ve shodné orientaci (70).

V iniciální fázi protinádorové léčby zůstává obvykle zastoupení tohoto proteinu nezměněno. Jeho overexprese viditelně neovlivnila buněčné dělení ani viabilitu. Akceleruje pouze proces apoptózy, který je následkem „smrtného signálu“ (zejména deprivací růstových faktorů, jako např. interleukinů (70)).

In vivo tento protein preferenčně homodimerizuje (bax-bax), může však rovněž vytvářet heterodimery s bcl-2 – overexprimovaný bcl-2 „soutěží“ (kompetuje) o vazbu s proteinem bax. Poměr mezi těmito anti- a pro-apoptotickými faktory koreluje lépe s „ochotou“ buněk podléhat apoptóze nežli samotná hladina jednoho nebo druhého proteinu – viz také obr.1 (70). Ztráta exprese bax proteinu je spojena s méně příznivou odpovědí na chemoterapii.

Důležitá role v regulaci aktivity a lokalizace bax proteinu je přičítána variabilním způsobům splicingu mRNA pro bax protein (tento mechanismus je podobný jako u aktivity komplexu myc-max (71)).

Obr.1



1.2.3.5 Další induktory apoptózy

Bez dalšího komentáře uvádíme jen příklad dalších pro-apoptotických faktorů: *bcl-x_{short}*, *bad*, *bak*, *bik*.

1.2.4 BIOLOGICKÉ MARKERY

1.2.4.1 Protoonkogeny

Protoonkogeny, neboli buněčné onkogeny, se ve své původní podobě a v původní lokalizaci na chromozomech účastní regulace procesů proliferace a diferenciace buněk, tedy normálních fyziologických procesů. Produkty těchto regulačních genů jsou součástí tzv. buněčných signálních cest, které zprostředkují vliv ligandy (hormonu, růstového faktoru, apod.) na transkripci určité konkrétní části genomu a tudíž na produkci určitých proteinů. Za normálních okolností jsou proto-onkogeny pod přísnou buněčnou kontrolou. Maligní potenciál získává buňka teprve v případě aktivace protoonkogenu, tedy jeho přesunem do blízkosti účinného promotoru, který umožní opakovanou transkripci protoonkogenu.

c-erbB2 (HER-2/neu = Human EGF [Epidermal Growth Factor] Receptor 2/neuroglioblastoma)

Gen *c-erbB2* lokalizovaný na 17q chromozomu kóduje protein HER-2/neu, který je transmembránovým receptorem s extracelulární receptivní doménou pro růstový faktor. Intracelulární část tohoto receptoru má protein-kinázovou aktivitu tyrozinového typu. Ta katalyzuje fosforylaci *ras* proteinu, který (cestou kaskády tzv. MAPK, tj. mitogene-activated protein-kinases) umožňuje buňce opustit fázi G1-S a pokročit k buněčnému dělení. Tato kaskáda může hrát klíčovou roli v procesu maligní transformace. Navíc amplifikace HER-2/neu stimuluje produkci EGF (epidermal growth factor), který může dále potencovat proliferaci.

V normálních epitelálních buňkách je HER-2/neu přítomen v malém množství. Amplifikace *genu* je prokazatelná v 10-34% případů prsních karcinomů u člověka (72). Je obecně považována za relativně pozdní krok v procesu vývoje nádoru, k němuž dochází teprve poté, kdy nádor ztrácí tumor-supresorickou aktivitu (73). Overexprese *proteinu* se vyskytuje asi u 50% prsních karcinomů (74), jiné studie však nenacházely rozdíl mezi četností výskytu amplifikace a overexprese – obojí bylo kolem 20% (37).

Možnosti stanovení

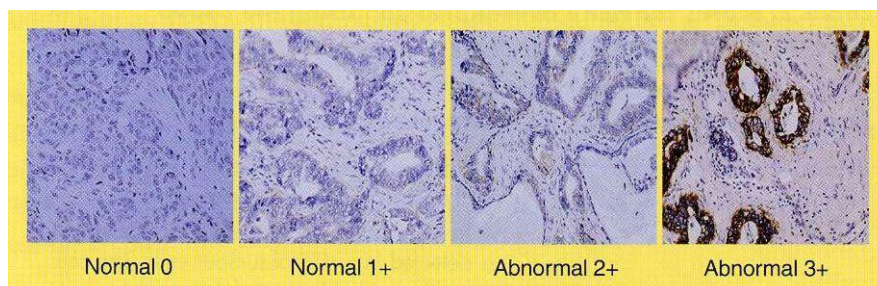
Při stanovení těchto parametrů se používají dva hlavní směry.

1. *Odhad nadměrné produkce konečného proteinového produktu genu HER-2/neu.* V současnosti se nejčastěji používá imunohistochemických metod, které mohou být aplikovány jak na zmrazené, tak na parafinové řezy. Výsledky jsou však ovlivněny celou řadou faktorů (jako např. technikou zpracování vzorků, dobou skladování, typem použitých protilátek, atp.) a proto není divu, že výsledky dosažené v různých studiích se poměrně významně liší. Řešením tohoto problému je standardizace metodik – v současné době je nejrozšířenější tzv. HercepTest od firmy DAKO, který je vyhodnocován semikvantitativně – viz obr.2.

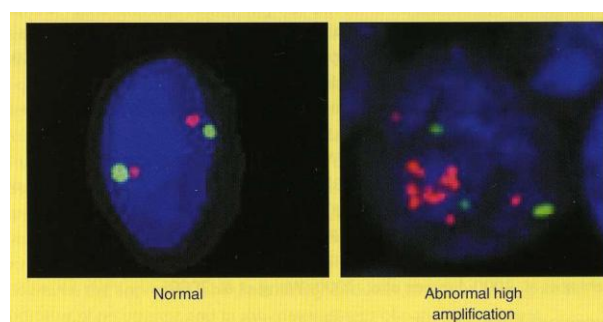
2. *Odhad výskytu samotného amplifikovaného genu.* Nejlepší metodou je FISH (fluorescent in-situ hybridisation) – viz obr.3. Je rychlejší a citlivější nežli blotting metody. Umožňuje zaměřit se přímo na nádorové buňky, bez rizika zkreslení buňkami okolní tkáně. Může být rovněž použita pro vzorky fixované ve formalinu. Umožňuje detekovat nejen DNA pro HER-2/neu, ale také mRNA a také finální proteinový produkt. Zpočátku pouze metoda FISH byla schválena americkou FDA (Food and Drug Agency) jako standardizovaná metodika. FISH má také vyšší prognostickou hodnotu nežli imunohistochemické stanovení (75). V evropských podmínkách je uznávána jako standard nejen tato metodika, ale i HercepTest – konkordance obou metod je 91% ($p < 0,001$), přičemž FISH je náročnější na čas a zkušenosti a tudíž je nákladnější (76).

Poměrně krátce používaným přístupem je také stanovení proteinového produktu genu HER-2/neu odpovídajícího extracelulární doméně, který může být uvolňován do krevního oběhu. Používá se metody ELISA.

Obr.2



Obr.3



Prognostická a prediktivní hodnota

Podle mnohých studií je HER-2/neu nezávislým prognostickým faktorem žen s karcinomem prsu s negativními lymfatickými uzlinami, a to i v multivariační analýze (77;78). Je spojen s horší prognózou vývoje onemocnění (79) – kratším přežíváním bez známek onemocnění (DFS) a celkovým přežíváním (OS) (80). Míra jeho zastoupení pozitivně koreluje se stupněm aneuploidity (81), s počtem postižených lymfatických uzlin (72), s gradíngem tumoru (72), mitotickou aktivitou (82;83) a negativitou hormonálních receptorů (83). Pro pacientky a postižením lymfatických uzlin nepanuje ohledně prognostické hodnoty HER-2/neu jasný konsensus.

Přítomnost HER-2/neu predikuje rezistenci vůči hormonální terapii. Experimentální transfekce těchto receptorů nádorovým buňkám zajistila jejich růst nezávislý na estrogenech a rezistenci na podání tamoxifenu (84). Receptory pro EGF pravděpodobně obecně umožňují obejít cestu estrogenní kontroly proliferace – viz níže. Pozitivita HER-2/neu koreluje s dobrou odpovědí na cytotoxickou terapii (79), a to zejména při použití režimů obsahujících antracykliny (79); naopak z použití režimu CMF profitují z léčby více pacientky bez přítomnosti HER-2/neu (85). Samozřejmě také přítomnost HER-2/neu predikuje profit z podávání Herceptinu® (rekombinantní lidské monoklonální protilátky proti HER-2/neu), zejména při podávání v kombinaci s cytostatiky.

C-myc

Tento protoonkogen se podílí na řízení buněčné proliferace, diferenciace a vzniku neoplazie. Pravděpodobně hraje důležitou roli v kontrolním místě buněčného cyklu, tedy v regulaci přechodu z fáze G0 do G1 (37).

V nízkých koncentracích je obsažen ve většině typů buněk. Jeho exprese v prsních malignitách je udávána v rozmezí 70-100%, amplifikace kolem 20% (avšak v metastatických buňkách prsního karcinomu více, až 33%) (37).

Amplifikace má významnou prognostickou hodnotu pro kratší celkové přežívání (OS) a přežívání bez onemocnění (DFS), a to zejména u tumorů s negativními lymfatickými uzlinami a pozitivními hormonálními receptory, tedy ve skupině, která je obecně považována za prognosticky příznivou (37)! Je dokladována také neobvykle silná asociace výskytu c-myc s amplifikací HER-2/neu – pouze asi 1% tumorů vykazuje současnou amplifikaci obou těchto genů (37). Gen HER-2/neu byl definován jako cílový gen pro negativní regulaci zajišťovanou c-myc (86).

V současnosti nejsou údaje o tom, že by c-myc mohl predikovat odpověď na systémovou terapii. Ale zdá se, že existuje obrácená závislost, nežli je tomu u HER-2/neu (37) – s amplifikací je spojena horší odpověď na chemoterapii a delší interval do progresu; nebyl prokázán rozdíl v celkovém přežívání.

Int-2

Tento gen obsahuje kód pro protein homologní s růstovým faktorem fibroblastů (FGF).

Amplifikace se vyskytuje asi ve 14% (87).

Existuje pouze málo dat o tom, že tato amplifikace by mohla být spojena s horší prognózou (88); ještě méně údajů posuzuje prediktivní hodnotu tohoto faktoru.

1.2.4.2 Tumor supresorické geny

Tyto geny jsou angažovány v regulaci buněčného cyklu, vývoje a diferenciace buněk, transdukce signálu a angiogenezi.

p53

Normální, tzv. „divoký“ (wild) typ tumor-supresorického genu slouží jako „strážce genomu“. Buňka je schopna reagovat na silné exogenní signály (např. radiace, tepelný šok, léky, hypoxie) mimo jiné také pomocí aktivace genu p53. Vznikne-li mutace DNA, p53 ji dokáže detekovat a snaží se zamezit replikaci chybné genetické informace a jejímu šíření do dalších generací. Dosahuje toho kombinací mnoha různých mechanismů (ve zjednodušené formě viz obr.4):

- exonukleázová aktivita – snaží se o přímou nápravu poškozené DNA (89)

- aktivace/inhibice transkripce – p53 selektivně ovlivňuje produkci proteinů v buňce, čímž modifikuje její funkce; vzniklé proteiny se pak podílejí na všech výsledných aktivitách (zástavě cyklu, reparaci DNA i regulaci apoptózy)

- indukce apoptózy

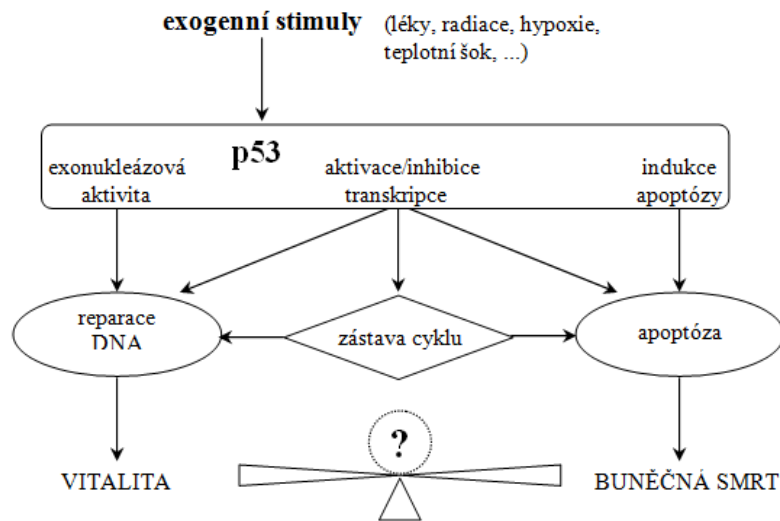
Podle konkrétního kontextu buňky pak může být výsledkem tohoto působení:

- reparace genetické informace

- zástava buněčného cyklu v „kontrolním bodě“ dává časový prostor pro uplatnění buď opravy nebo likvidace buňky; k zástavě cyklu může docházet ve fázi G1 (dvěma různými mechanismy, z nichž pouze jeden je závislý na proteinu p21^{WAF1}, tj. proteinu kódovaném genem p53, také označovaném jako p21^{CIF1} – viz obr.5), nebo ve fázi G2 (dalšími odlišnými mechanismy) (90)

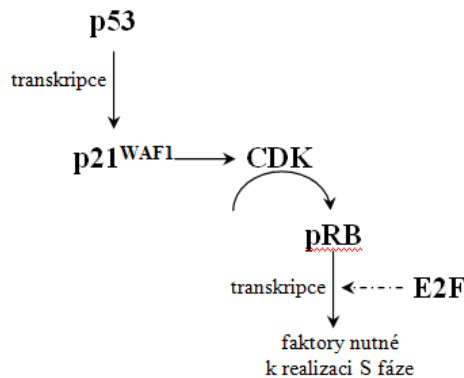
- programovaná buněčná smrt – na její regulaci se p53 podílí jednak prostřednictvím regulace produkce proteinů (bax, bcl-2, bcl-x – viz výše (91)) jednak mechanismem nezávislým na transkripci

Obr.4



Konečným důsledkem působení p53 je tedy buď reparační genetické informace (a taková zdravá buňka pak může být „propuštěna“ směrem k replikaci), nebo programovaná buněčná smrt buňky (apoptotická likvidace). O tom, který z těchto směrů převáží, rozhoduje jednak intenzita zevního stimulu, jednak stav buňky (množství p53, efektivita mechanismů reparujících DNA, apod.). Mutace genu p53 a/nebo overexprese bcl-2 dovoluje uskutečnění S-fáze a tím posun mutace do dalších generací (tzv. fixace mutace).

Obr.5



Detekce p53

V normálních buňkách se nachází pouze malé množství p53 divokého typu, protože jeho poločas je krátký (15-20 minut). Proto jej v minulosti nebylo možno detekovat imunohistochemickými metodami. Mutovaný p53 je více odolný vůči degradaci, proto se hromadí v buňkách a může být stanoven. Původně se mělo zato, že lze stanovovat pouze mutovaný p53. V současnosti je jasné, že můžeme prokázat i divoký typ p53, avšak dosud nebyla uspokojivě vyřešena otázka prognostického přínosu stanovení tohoto nemutovaného typu p53 (92).

Detekční metody mohou být zaměřeny na průkaz genu p53 (blotting metody, FISH, PCR), na jeho mRNA, nebo přímo proteinový produkt. Nejvíce studií pracuje právě se stanovením finálního proteinu – nejčastěji imunohistochemicky (38).

Za hranici positivity tohoto faktoru je považováno zastoupení alespoň v 5% buněk (38). Aplikace takového rozdělení tumorů na p53-pozitivní a p53-negativní se ukázalo jako cenná prognostická informace u pacientek s negativními lymfatickými uzlinami (93).

Prognostická a prediktivní hodnota

Overexprese p53 je stanovována u 30-40% lidských karcinomů prsu (94) a obecně je vnímána jako negativní prognostický faktor – interpretuje se jako nahromadění mutovaného, tedy nefunkčního, proteinu p53, což by mělo signalizovat oslabení „ochrany genomu“. Bývá spojena s vysokou SPF (S-phase fraction – viz výše), nízkou diferenciací, expresí HER-2/neu, amplifikací c-myc a expresí receptorů pro EGF (37).

Údaje o prediktivní hodnotě p53 jsou kontroverzní. Obecně je ztráta funkce p53 vnímána jako ztráta schopnosti apoptózy, a tudíž relativní rezistence na systémovou léčbu (což je důležité zejména pro indikaci neoadjuvantní terapie) (95). Avšak jak je uvedeno výše, mechanismus účinku p53 je příliš komplexní na to, aby stanovení jediného proteinu (p53) mohlo bezvýhradně predikovat míru odpovědi na léčbu (96). Klinickým potřebám vyhovuje lépe stanovení poměru bcl-2/bax v korelaci s p53.

RB (retinoblastoma)

Ztráta heterozygoty, která může vést k inaktivaci některých genů a nekontrolovatelnému růstu nádoru, se vyskytuje u tohoto genu ve 25% případů a koreluje s vysokou SPF, aneuploidií DNA a inverzně s amplifikací c-erbB2 (97).

1.2.4.3 Růstové faktory a jejich receptory

Hlavní význam růstových faktorů spočívá v lokální kontrole růstu buněk, zejména prostřednictvím autokrinních a parakrinních mechanismů.

EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor)

Jeho pozitivitu vykazuje asi 45% prsních karcinomů (mezi výsledky studií je však výrazný rozdíl 14-91%) (98).

Téměř všechny studie potvrdily asociaci tohoto negativního prognostického faktoru s negativitou hormonálních receptorů, s nízkým stupněm diferenciacie nádoru, aneuploidií a vysokým Ki67 (viz výše). Naopak nebyla prokázána souvislost s množstvím progesteronových receptorů, se stavem lymfatických uzlin, ani s menopauzálním stavem. Prediktivní hodnota nebyla dosud stanovena (99).

Výskyt těchto receptorů sehrává velmi pravděpodobně důležitou kauzální roli v procesu vývoje hormonálně nezávislého nebo rezistentního tumoru (37). Experimentální studie proklamují, že estrogen-dependentní cesta regulace proliferace může být nahrazena endogenním EGF u buněk, které nesou receptory pro tuto látku, a to i v případě, že jsou v buňce přítomné a funkční estrogenové receptory. Navíc dlouhotrvající léčba 4-hydroxytamoxifenem prokazatelně snižuje zastoupení estrogenových receptorů (100). Přítomnost EGF-R tedy může snadněji vést k selhání endokrinní terapie. Zjištění přítomnosti receptorů pro EGF tak může napomáhat při selekci vhodné protinádorové léčby – reaktivita na podání inhibitorů aromatáz je u buněk s pozitivními EGF-R významně vyšší, než na podání tamoxifenu (101). Z tohoto úhlu pohledu navíc nemusí mít podání hormonální substituce ženám s odléčeným karcinomem prsu tak fatální důsledky na prognózu vývoje onemocnění, jaké byly prezentovány v tradiční literatuře 90.let minulého století.

Samotný EGF in vitro down-reguluje nejen přítomnost estrogenových receptorů, ale i estrogeny stimulovaný výskyt progesteronových receptorů.

IGF-R (Insulin-like Growth Factor Receptor)

IGF je silným mitogenem buněk karcinomu prsu.

Receptory pro IGF-1 jsou přítomny v 67-93% buněk. Byla prokázána korelace jejich výskytu s pozitivitou hormonálních receptorů a s věkem (35).

Dosud nebyl stanoven prognostický význam stanovení IGF-1-R. Málo je také známo o možné predikci odpovědi na systémovou léčbu.

Byla však nalezena inverzní souvislost mezi IGF-1-like aktivitou a úrovní hormonálních receptorů. Stupeň suprese IGF-1 koreloval s odpovědí tumoru na tamoxifen. Proto bude snad v budoucnu možné použít nedostatečnou supresi IGF-1 jako prediktora špatné odpovědi na tamoxifen.

SS-R (102)

Je přítomen ve 36-46% primárních prsních karcinomů (102).

Jeho výskyt pozitivně koreluje s úrovní hormonálních receptorů, negativně s EGF-R (102).

Byla také stanovena pozitivní prognostická hodnota pro pětileté přežívání bez relapsu onemocnění.

Analoga somatostatinu mohou mít inhibiční vliv na růst tumoru, a to buď *přímý* prostřednictvím receptorů pro somatostatin, nebo *nepřímý*, zprostředkovaný snížením sekrece IGF-1. Tento příznivý účinek se přirozeně může projevit pouze u tumorů s pozitivními receptory pro somatostatin.

1.2.4.4 Molekuly adheze a tkáňové biodegradace

Potenciál metastazovat je dán schopností buňky vyvázat se ze vztahu vlastního prostředí, migrovat a překonávat anatomické bariéry (bazální membrány, hranice vaskulárních prostor, ..). Změny týkající se těchto látek tedy predikují maligní vlastnosti karcinomu.

Cadheriny

V literatuře nejvíce citovaný cadherin E je inhibítozem invazivity nádoru. Jeho absence je velmi často spojena s lobulárním typem prsního karcinomu. Je-li ztráta E-cadherinu nalezena u duktálního karcinomu, pak je to obvykle ve spojení s nízkou diferenciací tumoru a přítomností metastáz v lymfatických uzlinách (103).

Matrixové metalloproteinázy (MMP)

Tyto enzymy se podílejí na biodegradaci nejen různých složek pojivových tkání (kolagenázy, gelatinázy, atd.), ale i různých regulačních faktorů (např. tumor necrosis factor – TNF- β , vazebného proteinu pro insulin-like growth factor – IGF-BP, atd.). Ovlivňují tedy proces progresu tumoru na více úrovních. Aktivita těchto molekul se také mnohdy překrývá, nedostatek jednoho faktoru může být nahrazen jiným. Proto je obtížné hovořit o prognostickém významu jednotlivých konkrétních substancí.

Prognostický význam jednotlivých látek byl nalezen pouze v izolovaných studiích – např. MMP-2 je negativním prognostickým faktorem pro celkové přežívání u postmenopauzálních žen s pozitivními lymfatickými uzlinami (104).

1.2.4.5 Regulátory buněčného cyklu

Ke změnám těchto parametrů dochází mnohem časněji, nežli se změni např. Ki67. Mohou tedy dříve předpovědět posuny v procesech proliferace a apoptózy. Děje, na kterých se tyto látky v menší nebo větší míře účastní, jsou však velmi komplexní, mnohé faktory vstupují do regulace na více místech a funkce jednotlivých látek může být nahrazena jinými. Tyto procesy nejsou detailně prostudovány a proto je využitelnost jejich stanovení v praxi poměrně omezená a studium jejich významu spíše přispívá obecnému porozumění procesu vývoje nádoru, nežli prognostickým či prediktivním účelům.

Cyklin D1

Jedná se o protein specifický pro G1 fázi, který stimuluje aktivitu cyklin dependentních kináz – CDK. Ve vzestupném množství se vyskytuje v procesu duktální (ale ne lobulární) kancerogeneze – od atypické duktální hyperplazie, přes duktální carcinoma in situ až k invazivnímu duktálnímu karcinomu (zde se nachází asi v 50% případů) (105). Obecně je spojován s agresivnějším chováním tumoru a horší prognózou (106).

Estradiol a xenoestrogeny zvyšují (dokonce v malých dávkách) syntézu cyklinu D1 (a tím také aktivitu CDK) (55). Výrazná redukce cyklinu D1 nastává při deprivaci estradiolu (48).

Overexprese cyklinu D1 je schopna blokovat inhibiční účinek antiestrogenů dokonce i u ER-pozitivních prsních karcinomů. Tato overexprese nabízí jedno z možných vysvětlení rezistence na antiestrogeny – často totiž bývá pozorována u tamoxifen-rezistentních prsních karcinomů (107).

Změny tohoto faktoru nastávají již po prvním dnu léčby.

p27^{Kip1}

Komplex cyklin-dependentních kináz (CDK) fosforyluje protein retinoblastomu RB (který je produktem transkripce genu RB1). Takto vzniklý fosfoprotein je nezbytný pro přestup buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu (viz také obr.5). Komplex CDK může být aktivován mitogeny, růstovými faktory a steroidními hormony.

p27^{Kip1} je inhibítozem CDK. Podobně jako u jiných inhibitorů CDK, je i zvýšení exprese p27^{Kip1} znakem vysoké proliferace a horší prognózy vývoje onemocnění.

Jeho množství významně narůstá po prvním dnu léčby, maxima dosahuje po 3 dnech.

1.2.4.6 Estrogen-dependentní proteiny

Jak již bylo uvedeno výše, mělo by se jednat o takové látky, které jsou produkovány pouze prostřednictvím estrogenových receptorů. Tuto podmínku však beze zbytku nesplňuje žádný z dosud navržených kandidátů. I přes tuto výhradu se následující látky používají alespoň k přibližnému odhadu funkčnosti estrogenových receptorů:

- progesteronové receptory (108) – viz výše
- protein pS2
- cathepsin D
- aktivátory plasminogenu
- estrogen-regulated mRNA
- bcl-2 (19) – viz výše; je exprimován u 80% ER-pozitivních tumorů ale jen u 30% ER-negativních tumorů (62); v některých studiích byl dokonce určen jako přesnější prediktor odpovědi na hormonální léčbu, než samotný stav estrogenových receptorů (61)

pS2

Jde o malý protein (60 aminokyselin, 7 kD) bohatý na cysteinové aminokyseliny s dosud neznámou funkcí.

Je signifikantně snížen v aneuploidní populaci (81).

Zdá se, že produkce tohoto proteinu podléhá přímé kontrole estrogenů a může sloužit jako signál funkčnosti estrogenových receptorů. Proto může mít význam pro predikci odpovědi na endokrinní terapii, dokonce může upřesňovat predikci u pacientek s pozitivitou estrogenových i progesteronových receptorů (37). Zároveň však platí, že progresse nádoru směrem k růstu nezávislému na estrogenech je provázána supresí exprese mRNA pro pS2 po podání estradiolu (namísto očekávané stimulace) (109). Dodnes však není jasné, zdali (a případně jaká) existuje souvislost mezi regulací pS2 a regulací růstu estrogeny (37).

Prognostický význam pS2 není podáván jednotlivými autory shodně. Obvykle je považován za faktor s pozitivním prognostickým významem, nebo bez prognostického významu

Cathepsin D

Jde o 52kD lysozomální protein (110), jehož produkce je významně zvýšena po stimulaci estrogeny (111). Tento protein má mitogenní a proteolytickou aktivitu – může usnadňovat dekompozici bazální membrány a tím potencovat tvorbu metastáz. V některých studiích bývá označován za marker metastazování. Je signifikantně zvýšen v aneuploidní populaci (81).

Prognostická hodnota je diskutabilní a podle některých zdrojů zcela žádná (37). V přehledu (112) je tento faktor spojován se špatnou prognózou. Např. ve studii (110) je vysoká hodnota cathepsinu D u pacientek s negativními lymfatickými uzlinami spojena s kratším DFS i OS, zejména v podskupině žen s aneuploidním tumorem.

Aktivátory plasminogenu (PA)

Jednořetězcové formy těchto molekul jsou neaktivními proenzymy vázanými na membrány buněk prsního karcinomu. K jejich aktivaci dochází dimerizací. Enzymy pak degradují buněčné membrány a jsou spojovány s invazí tumoru a jeho metastazováním.

Expres tkáňového typu PA (*t-PA*) je (na rozdíl od *u-PA* – viz níže) in vitro pravděpodobně regulována prostřednictvím estrogenových a/nebo progesteronových receptorů (113). Je vyšší u ER-pozitivních tumorů a koreluje se stupněm diferenciacie tumoru (114). Pravděpodobně je spojena s lepší prognózou.

Urokinázový typ PA (*u-PA*) je signifikantně vyšší u tumorů s negativními estrogenovými i progesteronovými receptory a zdá se být spojen s kratším DFS a OS (114). *u-PA* negativně koreluje s koncentrací *t-PA* (114).

Prediktivní hodnota PA není jasná. Pravděpodobně však lze očekávat u výrazné přítomnosti *u-PA* horší odpověď na hormonální terapii.

1.2.5 BUNĚČNÁ MORFOLOGIE

V následujícím odstavci jsou uvedeny znaky tumoru, které nepochybně mají více nebo méně jasně definovanou hodnotu pro odhad prognózy maligního onemocnění. Jejich prediktivní význam je pouze zprostředkovaný.

Význam hodnocení změn těchto charakteristik (zejména gradingu buněk) následkem léčby je pochybný nebo žádný. Degenerativní změny jsou většinou přechodné, vázané na aplikaci cytotoxických látek (41). Tento názor je podporován pozorováním, že rekurentní tumory mají cytologické znaky podobné primárnímu tumoru a nikoliv stavu, v jakém se nacházely po medikamentózní terapii.

1.2.5.1 Histopatologický grading

Jde pravděpodobně o nejdůležitější prognostický marker s nezávislou hodnotou pro celkové přežití (OS) i přežívání bez recidivy (DFS). Ženy s primárně operabilním nádory prsu grade 1 přežívají 10 let v 85%, s tumory grade 3 jen ve 45%.

Metody hodnocení

V současné době je nejvyšší reprodukovatelnosti výsledků dosaženo aplikací kritérií WHO, která korespondují s tzv. Nottinghamskou klasifikací gradingu. Hodnotí se 3 morfologické parametry nádoru - viz tabulka 3:

- glandulární diferenciacie – hodnotí se jako procento objemu tumoru, ve kterém je zřetelná tvorba acinů se zřetelným lumen (tj. tubulů)
- jaderná velikost / pleomorfismus – hodnoceno při velkém zvětšení na místě s nejvyšším pleomorfismem
- počet mitóz – hodnotí se jako počet mitóz na 10 HPF (high power field = zvětšení 40x, plocha 1 pole = 1,59mm²) na místě s nejvyšší mitotickou aktivitou

Výsledný grading je určen součtem hodnot (skóre) získaných pro jednotlivé položky – součet 3-5 pak určuje grading 1, součet 6-7 grading 2 a součet 8-9 grading 3 (45).

Metodika je velmi náročná na techniku zpracování (důležitá je zejména kvalitní fixace) a z hlediska reprodukovatelnosti také na pečlivost odečítání.

Tabulka 3

skóre	1	2	3
formace tubulů	>75%	10-75%	<10%
pleomorfismus / velikost jader	malý	střední	velký
počet mitóz / 10 HPF	≤5	6-10	≥11

1.2.5.2 Typ tumoru

Tradiční histologická klasifikace nádorů prsu na dva hlavní typy (duktální a lobulární) vychází z hodnocení dvojrozměrných preparátů. S postupujícím výzkumem na trojrozměrných preparátech se ukázalo, že toto dělení je spíše umělé a postrádá patogenetický podklad. V současné době je toto dělení proto používáno spíše z historických důvodů. Histologický typ tumoru tedy poskytuje určitou dodatečnou informaci o povaze nádoru, avšak jeho chování, prognóza a odpověď na terapii jsou dány spíše jeho ostatními charakteristikami, především stupněm jeho diferenciací (gradingem).

Specifické histologické typy nádorů (mucinózní, tubulární, kribriformní) vykazují velmi nízký stupeň dediferenciací (v převážné většině jsou grade 1) a proto jejich nositelky dosahují nejdelších intervalů DFS i OS. Lobulární karcinom má obvykle grade 2, čemuž odpovídá zejména kratší průměrná doba celkového přežívání ve srovnání s předchozími typy. Avšak dosahuje-li lobulární karcinom nižšího nebo naopak vyššího stupně dediferenciací, nežli by korespondovalo s jeho obvyklým gradingem, odráží se to také na délce celkového přežívání. Proto je nutné určovat grade u všech tumorů včetně lobulárních, i když to není standardem ve všech laboratořích. S nejhorší prognózou je spojen typ karcinomu duktální (nebo smíšený dukto-lobulární). Také u něj však existují subtypy, které jsou častěji spojeny s výrazně horší prognózou.

1.2.5.3 Angioinvaze

Schopnost šíření tumoru do vaskulárních prostor úzce souvisí s přítomností a koncentrací látek ovlivňujících buněčnou adhezi, migraci a proteolýzu (viz výše). Buňky neležené uvnitř cév jsou tedy znakem potenciální diseminace nádoru. V některých studiích byl dokladován význam tohoto nálezu jako ukazatele prognózy srovnatelné hodnoty jako stav lymfatických uzlin (115). Jiní autoři jej však spíše pokládají za prediktora lokální recidivy tumoru po prs zachovném chirurgickém zákroku (116).

Možnosti hodnocení

Obvykle není spolehlivě možné rozlišit mezi krevními a lymfatickými prostory pro šíření nádoru. K tomu, aby bylo možno spolehlivě definovat intravaskulární prostor, je zapotřebí imunohistochemicky definovat endoteliální elementy lemující cévy. K tomu se využívá např. protilátek anti-CD31 (33).

1.2.5.4 Intraduktální propagace tumoru

Tento znak bývá také označován jako „extenzivní intraduktální komponenta“ (EIC). Je přítomen přibližně u 15-30% invazivních karcinomů prsu. Je dobře definovaným rizikovým faktorem pro vznik lokální recidivy po prs zachovném výkonu. Předpokládá se totiž, že intraduktální šíření může přesahovat okraje chirurgického řezu, i když toto šíření nebylo

patologem popsáno (falešně negativní okraje). Pokud je však prokazatelně odstraněna veškerá tkáň prsu s intraduktální propagací (skutečně negativní okraje), ztrácí EIC svou prognostickou hodnotu pro lokální rekurenci (117).

1.2.6 VELIKOST PRIMÁRNÍHO NÁDORU

Četné studie potvrdily přímou korelaci mezi velikostí primárního tumoru a incidencí axilárních metastáz (118–120). Velikost nádoru, grading a stav lymfatických uzlin jsou také jedinými vlastnostmi nádoru prsu, jejichž nezávislá prognostická hodnota byla prokázána v multivariační analýze (někdy je v této skupině uváděn také stav receptorů HER-2/neu).

Pro účely klinického stagingu je dostatečné udávat největší (tedy jediný) rozměr tumoru. Na základě tohoto rozměru je pak například také hodnocena klinická odpověď na neoadjuvantní léčbu. Tento způsob hodnocení však nemusí být zcela adekvátní, nemusí odpovídat skutečné klinické situaci. Tumor je trojrozměrný útvar, a proto je pro jeho popis vhodnější stanovit přibližný **objem**. Tomuto objemu lépe odpovídá množství buněk obsažených v nádoru.

Dá se usuzovat, že pravděpodobnost lymfatického metastazování bude přímo úměrná počtu nádorových buněk. V tom případě by měla existovat jakási „kritická velikost nádoru“, při níž daný konkrétní nádor začne mít prokazatelné metastázy. Samozřejmě by se tato „kritická velikost“ lišila podle konkrétních vlastností daného nádoru. Tato hypotéza „kritické velikosti“ by však mohla platit pouze v případě, že by nádorová populace byla homogenní a byla tvořena buňkami jednoho klonu. Klinicky zjistitelné zhoubné nádory jsou však typicky polyklonálním procesem, přičemž vlastnosti jednotlivých klonů se mohou významně lišit. V metastazujícím nádoru lze proto předpokládat existenci určitého klonu (nebo klonů) buněk, které budou mít u většiny nádorů určité společné charakteristiky. Naneštěstí v současné době nejsme schopni definovat takové nádorové charakteristiky, které by umožnily spolehlivě identifikovat buňky s vysokým stupněm pravděpodobnosti tvorby metastáz. Také tento problém stojí v popředí současného výzkumu maligních onemocnění.

Samotná velikost nádoru tedy nemusí být pro prognózu onemocnění rozhodující. V klinické praxi si jí však využívá jako zástupného znaku („surrogate marker“), který určuje pravděpodobnost existence „metastazujícího klonu“ v nádoru. Pravděpodobnost přítomnosti takového klonu je tím vyšší, čím větší množství buněk nádor obsahuje – to proto, že riziko vzniku takového „metastazujícího klonu“ genovou mutací je přímo úměrné počtu buněčných dělení. Proto i v současné zůstává velikost primárního nádoru (udaná jeho nejdelším rozměrem) jednou z nejdůležitějších vlastností maligního onemocnění, která napomáhá klinickému odhadu prognózy onemocnění.

1.3 BIOPSIE SENTINELOVÉ UZLINY

Sentinelová uzlina je definována jako první mízní uzlina (nebo skupina uzlin), která se nachází na lymfatické cestě směrem od tumoru, preferenčně přijímá lymfatickou drenáž z primárního tumoru a je tudíž prvním místem lymfatického šíření nádoru. Opakovaně bylo prokázáno, že pro hodnocení stavu lymfatických uzlin je biopsie sentinelové uzliny u žen s časným karcinomem prsu velmi senzitivní a přesnou technikou (121; 122).

1.3.1 HISTORICKÝ ÚVOD

Základní myšlenka a koncept teorie sentinelové uzliny byly předneseny na světových kongresech již v letech 1959 a 1976, zpracování v časopisech následovalo vždy s ročním odstupem (123; 124). Bohužel však poznatky získané z těchto prací neumožňovaly bezprostřední klinické využití. Teprve v roce 1990 prezentoval Morton svou studii s lymfatickým mapováním u časných stadií melanomu. Publikace, která následovala o dva

roky později, znamenala skutečný zlom v managementu časných stadií tumorů s lymfatickým metastazováním (125).

I přesto, že přijetí základní teze sentinelové uzliny bylo ze strany velkých onkologických společností poměrně opatrné, umožnilo zahájení klinického výzkumu v této oblasti. V první polovině 90. let minulého století se proto objevily práce využívající této techniky pro různá maligní onemocnění: maligní melanom, kolorektální karcinom, karcinom penisu, karcinom prsu. Používalo se jak značení lymfotropním barvivem, tak i látkami značenými radioaktivním izotopem technecia, který byl intraoperačně detekován pomocí scintilační sondy (126). Výsledky na sebe nenechaly dlouho čekat – byly uniformně velmi příznivé a prokázaly, že šíření nádorových buněk z primárního zdroje nádoru do regionálních lymfatických uzlin je pravidelné a předvídatelné – buňky se přívodnými lymfatickými cévami postupně šíří do primární drénující mízní uzliny a tato uzlina filtruje přitékající lymfu a účinně zachycuje nádorové buňky.

Pilotní práce využívající techniku biopsie sentinelové uzliny u časného karcinomu prsu byly zahájeny prakticky ihned po Mortonově publikaci. Krag prokázal, že izolovaná biopsie sentinelové uzliny je proveditelná a že pravděpodobně správně predikuje stav ostatních axilárních uzlin (127). Ke stejným závěrům dospěl na základě své studie i Giuliano, který zdůrazňoval nutnost správného zvládnutí techniky k dosažení spolehlivých výsledků (learning curve); tato práce de facto legalizovala použití SLNB u časného karcinomu prsu (128). K dalšímu propracování techniky SLNB pak vedly precizně designované studie italské skupiny pod vedením Umberta Veronesiho. Jejich práce publikovaná v roce 1997 užívala sérový albumin značený ⁹⁹Tc – ze 163 žen byla detekce úspěšná ve 160 případech a u 97,5% z těchto žen stav sentinelové uzliny správně predikoval nádorové postižení axilárních mízních uzlin (129). Těmito přesvědčivými výsledky se otevřela cesta k mnoha randomizovaným klinickým studiím, jejichž výsledky dodnes užíváme v naší klinické praxi. Nezanedbatelným přínosem pro užívání techniky sentinelové biopsie u žen s karcinomem prsu měly také práce českých autorů (130–132).

1.3.2 PROČ JE HLEDÁNA ALTERNATIVA AXILÁRNÍ DISEKCE

1.3.2.1 Význam axilární disekce

Terapeutický význam

Disekce axilárních uzlin má u žen s karcinomem prsu kontroverzní léčebný účinek. Již Fisher uváděl, že se jedná pouze o diagnostický výkon bez léčebného významu (133). Postižení regionálních mízních uzlin tedy uváděl pouze jako marker potenciální nádorové diseminace, nežli jako samotný zdroj diseminace (134). Na druhou stranu se však objevily práce, které dokládají vliv adjuvantní radioterapie axily na zlepšení přežívání pacientek (135; 136). Metaanalýza studií hodnotících význam axilární disekce také dokladovala léčebný přínos pro celkové přežívání (137).

Většina autorů se v současnosti přiklání k názoru, že se u žen s klinicky negativním uzlinami jedná pouze o diagnostickou (stagingovou) proceduru **bez jakéhokoliv terapeutického významu** (5). Tyto závěry podporuje i rozsáhlá randomizovaná prospektivní studie NSABP B-32, v níž byla všem ženám v kontrolní skupině provedena SLNB i kompletní axilární disekce, zatímco v experimentální skupině byla axilární disekce doplněna pouze u podskupiny žen s nádorově postiženou sentinelovou uzlinou – DFS a OS i četnost lokálních recidiv (medián 95 měsíců) bylo v obou skupinách srovnatelné, kontrolní skupina však byla zatížena výraznější pooperační morbiditou (121; 138).

Vlivem kompletní axilární disekce na celkové přežívání žen s karcinomem prsu se zabývala studie ACOSOG Z0011. Ta randomizovala 891 žen klinického stadia T1-2 N0 M0 s provedenou tumorektomií a alespoň jednou pozitivní sentinelovou uzlinou (verifikovanou

bez užití imunohistochemických metod) do dvou skupin: bez další operace v axile a s doplněním axilární disekce; ženám v obou skupinách byla provedena pouze iradiace prsu a aplikována adekvátní systémová léčba, naopak neproběhla žádná iradiace axily. V obou skupinách bylo srovnatelné jak celkové přežívání (medián 6,3 let), tak i četnost lokoregionálních recidiv (139–141).

Stagingový význam

Stav regionálních mízních uzlin je nejvýznamnějším izolovaným prediktivním faktorem pro celkové přežívání pacientů karcinomu prsu (4; 5).

Stagingový význam axilární disekce je však také některými autory zpochybňován. Adjuvantní terapie je u žen s karcinomem prsu stále více určována podle vlastností primárního nádoru a význam postižení axilárních uzlin tak může ustoupit do pozadí (142).

1.3.2.2 Morbidita axilární disekce

Kompletní disekce axilárních uzlin je zatížena nezanedbatelnými riziky – jejich četnost se obvykle udává v rozmezí 20-30% (143). Nejčastější jsou infekce, otok prsu, vznik séromů, riziko poškození nervové cévních struktur a krevní ztráty při operaci, potíže s hojením rány, závažná může být také ztuhlost ramenního kloubu („frozen shoulder“). Za nejzávažnější komplikaci (obvykle ireverzibilního charakteru) je považován otok horní končetiny, tzv. lymfedém – riziko jeho vzniku je udáváno v rozmezí 10-15% (144). Je důležité připomenout, že všechny tyto potíže nejsou vyváženy žádným terapeutickým přínosem u žen s negativními axilárními uzlinami.

Studie srovnávající **pooperační morbiditu** u žen po SLNB a po ALND definovaly axilární disekci jako faktor odpovědný za vyšší četnost potíží u žen s radikálnějším zákrokem: bolest (RR=3,2), lymfatický otok (RR=5), necitlivost (RR=7,7), pocit brnění (RR=3,7), snížení síly horní končetiny a ruky (RR=7,1), snížení rozsahu pohybů horní končetiny (RR=3,6), snížená využitelnost horní končetiny (RR=2,9). Samotná iradiace axily není spojena se zřetelnou morbiditou. Pokud se však přidává iradiace axily k radikálnímu operačnímu zákroku v axile, pak se dále 2-4x zvyšuje riziko vzniku lymfedému a 2-6x zvyšuje riziko snížení využitelnosti horní končetiny (145).

1.3.2.3 Alternativa – biopsie sentinelové uzliny

SLNB umožní odlišit skupinu žen, které nebudou profitovat z axilární disekce od těch, u nichž je kompletní axilární disekce indikována – ať už z důvodu stagingu onemocnění, nebo pro dosažení lokoregionální kontroly nádorového procesu. Přibližně v polovině případů (30-66% (122)) je SLN jedinou postiženou uzlinou v axile – v tomto případě může být SLNB považována také za „terapeutický“ zákrok. Z analýzy přežívání pacientek po biopsii sentinelové uzliny také mnozí autoři vyvozují, že SLNB bez současně provedené axilární disekce poskytuje uspokojivou regionální kontrolu maligního onemocnění (131).

Výhodami biopsie sentinelové uzliny je tedy nižší morbidita výkonu, ale také nižší časová a ekonomická náročnost ve srovnání s disekcí axilárních uzlin. Biopsie sentinelové uzliny je v současnosti *široce akceptovanou technikou stagingu a managementu časných stadií karcinomu prsu* (146).

1.3.3 TECHNIKA

1.3.3.1 Značení

Značení sentinelových uzlin se provádí aplikací detekční látky (tzv. traceru) do předem definovaných oblastí prsu. Různá pracoviště preferovala ve svých studiích různé **lokalizace pro aplikaci traceru**. Zpočátku byla používána hluboká peritumorální aplikace na 4 místech v okolí tumoru – obvykle v množství 4-8ml. Bylo však prokázáno, že obdobných výsledků se

srovnatelným počtem falešně negativních uzlin lze dosáhnout aplikací látky subdermálně nebo intradermálně nad oblast ložiska primárního tumoru, subareolárně do kvadrantu v němž se nachází primární tumor (nebo dokonce do subareolárního lymfatického plexu nezávisle na lokalizaci primárního tumoru) (147). Lze tedy vyvozovat, že prsní tkáň a nad ní ležící kůže je drénována do stejných axilárních mízních uzlin. Pro povrchovou aplikaci dostačuje jediná injekce traceru do oblasti nad tumorem (nebo mírně směrem k axile v případě jizvy po předchozí biopsii). Množství podávané látky je tak zřetelně menší, což usnadňuje lokalizaci sentinelových uzlin díky snížení interference aktivity „horké“ uzliny s místem aplikace látky (to je důležité zejména u tumorů uložených v blízkosti axilárního výběžku prsu).

Pro značení se nejčastěji využívají dvě **detekční látky**. *Modré barvivo* (methylenová modř, patentní modř, 1% isosulfan) – obvykle se aplikuje 2-5ml zředěného barviva do subareolární oblasti a to několik minut před zahájením operačního zákroku. Dále se užívá *koloid označený radioaktivním izotopem technecia ^{99}Tc* – podává se buď v den operace (několik hodin před operací), nebo ve dvoudenním protokolu (přibližně 24 hodin před operací); obvyklá podávaná dávka 0,1ml obsahuje aktivitu kolem 80 MBq. Většina studií prokazuje významně nižší četnost úspěšné identifikace sentinelové uzliny při použití samotného barviva ve srovnání s užitím radiokoloidu (129; 148–151). Někteří autoři doporučují *používat současně obě detekční metody* – při této kombinaci se dosahuje vyšší četnosti detekce sentinelové uzliny a je nižší riziko její falešné negativity (122; 152–154). Modré barvivo totiž obsahuje menší částice, než radiokoloid a proto má větší pravděpodobnost prostupu lymfatickými cévami (155). Podíl sentinelových uzlin, které jsou při použití obou metod identifikovány pouze na základě jejich zbarvení (a nikoliv radioaktivity) je však u zkušeného týmu pouze 2-3% (156).

1.3.3.2 Detekce

Jedinou možností detekce modrého barviva je zrakový vjem (speciální sondy užívající posunu ve spektru laserového záření k detekci zbarvené sentinelové uzliny jsou sice komerčně dostupné, avšak v praxi se využívají pouze výjimečně). Za sentinelovou je označena taková uzlina, která je zbarvena modrým barvivem, nebo která má patrnou zbarvenou aferentní lymfatickou cévu. Nevýhodou tohoto postupu je nutnost přímé vizualizace obarveného přívodního lymfatika a/nebo obarvené uzliny. Nachází-li se tyto struktury v hloubce axily, může být detekce obtížnější.

Detekce radiokoloidu se provádí pomocí ručního detektoru gamaaktivity. Zřetelnou výhodou tohoto postupu je možnost identifikovat cílové struktury transdermálně a vyhledat tak nejvýhodnější přístup k jejich disekci. Z tohoto důvodu je má tato metoda nejen vyšší vyhlídky na záchyt uzlin, ale umožňuje také mnohem šetrnější způsob disekce.

Některá pracoviště provádějí standardně předoperační lymfoscintigrafii. Její přínos spočívá především v odhalení vícečetných sentinelových uzlin (které by mohly být při operaci přehlédnuty). Není-li předoperační scintigrafie schopna detekovat žádnou sentinelovou uzlinu, predikuje tím zvýšené riziko neúspěšného pátrání po radioaktivní (tzv. „horké“) uzlině také v průběhu operace; v těchto případech se proto doporučuje použít předoperačně také značení pomocí barviva (viz výše). Na druhou stranu je však třeba podotknout, že detektor užívaný při operaci je výrazně citlivější než scintilační kamera a často umožňuje nelézt i takové „horké“ uzliny, které se nezobrazily na lymfoscintigrafii. Význam lymfoscintigrafie pro identifikaci neaxilárních sentinelových uzlin je spíše teoretický – aktivita těchto uzlin standardně neindikuje nutnost disekce v neaxilárních oblastech (podél arteria mammaria interna, infra- a supraklavikulárně – viz také níže). Nachází-li se však „horká“ uzlina infraklavikulárně a v dosahu operačního pole, je třeba zvažovat její exstirpaci (jedná se vlastně o uzlinu III. axilární etáže a případné postižení takové uzliny může mít význam u relapsů onemocnění).

1.3.3.3 Peroperační hodnocení sentinelových uzlin

Cílem peroperačního zpracování exstirpovaných uzlin je zjistit jejich stav již v průběhu operace a tak v případě jejich metastatického postižení indikovat axilární disekci v jedné operační době (a tím předejít nutnosti další operace a narkózy).

Tradičně se využívá metoda **zmrazeného řezu** uzlin, z nichž každá se prokrojí na 1-2 místech v rovině kolmé na jejich dlouhou osu. Zpracování trvá 20-30 minut. Senzitivita záchytu existující metastázy touto metodou je kolem 75% (157). Tento ne zcela uspokojivý výsledek se dá výrazně zlepšit použitím rychlých imunohistochemických reakcí a sériových řezů uzlin. Jedná se však o metody časově velmi náročné a tím i nákladné. Výsledek není k dispozici v potřebném časovém intervalu, může tak dojít k prodloužení operace a benefit pro pacientku je tak zřetelně kompromitován.

Alternativou je metoda **imprinting cytologie** – v rozsáhlé metaanalýze byla prokázána senzitivita 63% (pro makrometastázy 81%, pro mikrometastázy 22%) (157), modifikací metodiky je však v některých pracích referována senzitivita pro záchyt makrometastázy blízká se 100% (158).

Experimentálně se v současnosti používají **molekulárně genetické metody**, které jsou založeny na vyšetření homogenátu tkáně celé mízní uzliny a překonávají tak handicap „sampling erroru“ vznikajícího při vyšetření selektivních řezů; k provedení testu navíc není zapotřebí přítomnosti patologa. Reverzní transkripce a amplifikace genetického materiálu nefixovaného vzorku pomocí RT-PCR umožní během 30 minut detekovat metastázy se srovnatelnou přesností, jakou vykazují sériové řezy s hustotou 1,5-2mm (GeneSearch BLN Assay má senzitivitu 87% a specificitu 94% (159)). Nevýhodou je však extrémní náročnost na techniku zpracování a nekonzistentní výsledky purifikace a extrakce RNA (158). Zjednodušení a zpřesnění metodiky přináší tzv. OSNA – one-step nucleic acid amplification. Je založena na amplifikaci mRNA pro cytokeratin CK19, což je cytoskeletální protein přítomný prakticky u všech karcinomů prsu (160). Zpracování je automatizované, probíhá přímo na operačním sále a trvá asi 30 nebo 40 minut (pro 1 nebo 2 sentinelové uzliny). OSNA vykazuje vysokou konkordanci s výsledky pooperačního definitivního histologického zpracování – 96,8% (senzitivita 95,3%, specificita 97,1%) (161).

1.3.3.4 Histopatologické zpracování

Standardní zpracování lymfatické uzliny znamená její fixaci a zalití do parafinového bločku, následně prokrájení v řezech kolmých na dlouhou osu uzliny v intervalu 3mm a hodnocení po obarvení hematoxylinem a eosinem. Pro hodnocení sentinelové uzliny je však třeba respektovat přísnější pravidla. Studie srovnávající standardní hodnocení sentinelových uzlin s hodnocením doplněným o imunohistochemické vyšetření v několika tzv. sériových řezech prokázala významný rozdíl v četnosti zachycených metastáz – v první skupině 28%, ve druhé skupině 42% (162). Podrobnější cílené vyšetření jedné sentinelové uzliny (nebo několika málo sentinelových uzlin) tak významným způsobem zpřesňuje staging karcinomu prsu.

Sériové prokrájení sentinelové uzliny používá větší množství řezů prováděných kolmo na dlouhou osu uzliny. Je-li uzlinová metastáza (makrometastáza) definována jako shluk nádorových buněk o průměru ≥ 2 mm, pak jsou pro jejich spolehlivou identifikaci zapotřebí řezy s hustotou méně než 2mm. Jsou-li jednotlivé sériové řezy od sebe vzdáleny 200 mikrometrů a je-li použito imunohistochemických metod (viz níže), pak jsou identifikovány okultní metastázy u 25% žen se sentinelovou uzlinou označenou jako negativní při standardním hodnocení s hematoxylinem-eosinem (163;164). Hustota řezů musí tedy být kompromisem mezi pracností zpracování a „klinicky přijatelným“ rizikem nezachycení

mikrometastázy (tzv. sampling errorem). V současnosti se na většině pracovišť užívá sériových řezů s intervalem 200 mikrometrů pouze pro výzkumné účely.

Imunohistochemické zpracování užívá barvení na přítomnost cytokeratinu, který umožní odlišení epiteliálních elementů od lymfatické tkáně uzliny. Používá se protilátek proti cytokeratinu AE1/AE3 (DAKO) a/nebo cytokeratinu CK19 (DAKO).

U žen s časným stadiem prsního karcinomu a klinicky nehmotnými uzlinami bylo prokázáno, že pokud pomocí sériových řezů a imunohistochemie nejsou prokázány v sentinelové uzlině nádorové buňky, pak je riziko postižení nesentinelové uzliny ve stejnostranné axile menší než 1% (165).

Pro další zpřesnění detekce nádorových buněk a snížení rizika přehlédnutí metastáz v sentinelových uzlinách bylo navrženo několik dalších postupů: molekulárně genetické metody užívají zpracování homogenátu tkáně a aplikují metodu reverse-transcriptase PCR (159), multiparametrická průtoková cytometrie (166) nebo přístrojově asistované hodnocení vzorků (46).

1.3.3.5 Management žen s pozitivitou sentinelové uzliny

Je-li při vyšetření sentinelových uzlin prokázáno metastatické uzlinové postižení, doporučuje se tradičně dokončení standardní axilární disekce. Přínos takového postupu však není jednoznačný. Je známo, že u žen s pozitivitou sentinelové uzliny je (při doplnění kompletní axilární disekce) pouze ve **35-50% případů** prokázáno metastatické postižení alespoň jedné další nesentinelové uzliny (167–171). Ženy s nepostiženými nesentinelovými uzlinami jednoznačně nebudou profitovat z dalšího operačního zákroku v axile.

Dobré výsledky několika menších studií podporují myšlenku, že je bezpečné neprovádět kompletní axilární disekci u žen s nízkoobjemovými sentinelovými metastázami (do maximálního průměru 2mm) (172–175). Také prognóza pacientek, které z jakýchkoliv důvodů neabsolvovaly dokončení axilární disekce v případě positivity sentinelové uzliny nebyla zřetelně odlišná od těch, u nichž byla axilární disekce provedena (172–176).

Bylo proto vytvořeno několik prediktivních modelů, které odhadují riziko postižení nesentinelových uzlin v případě positivity SLN (177–179). Použitím kombinace různých nomogramů byla identifikována „nízce riziková“ skupina žen, u nichž nebyla provedena axilární disekce – pouze u 2% těchto žen došlo v intervalu 2 let k recidivě onemocnění v axile, navíc u poloviny z nich byly v době diagnózy recidivy přítomny také jiné projevy onemocnění (lokální nebo vzdálené). Autoři vyvozují, že u nízce rizikových žen je smysluplné vynechat axilární disekci (180). V nedávné době byly také publikovány výsledky již zmíněné studie ACOSOG Z0011. Autoři na základě výsledků vyslovují přesvědčení, že navzdory riziku reziduálního postižení axilárních uzlin může být samotná SLNB (bez kompletní axilární disekce) adekvátním postupem u žen s nádorem stadia T1-2, s klinicky negativními axilárními uzlinami a s histologicky verifikovaným postižením 1-2 sentinelových uzlin, pokud je konzervativní zákrok na prsu doplněn iradiací prsu a adekvátní adjuvantní systémovou terapií (139). Takový postup není dosud možné považovat za standardní, i když je na již na mnoha pracovištích využíván. Lze tedy uzavřít, že pro ženy s metastatickým postižením sentinelových uzlin neexistuje v současné době jednoznačný konsenzus.

1.3.3.6 Výskyt mnohočetných sentinelových uzlin

Ve spádových oblastech (axila, periklavikulární oblast, oblast arteria mammaria interna) se může vyskytovat i více než jedna sentinelová uzlina. Tato situace nastává přibližně u dvou třetin pacientek a počet takto získaných uzlin se pohybuje v rozmezí 2-9 uzlin (181; 182). Většina relevantních studií zabývajících se SLNB udává průměrný počet sentinelových uzlin

získaných u jedné pacientky v rozmezí 1,5-2,1 (183). Více sentinelových uzlin bylo nalezeno v případě, že operace proběhla za méně než 12 hodin po aplikaci radionuklidu a tam, kde předoperační lymfoscintigrafie zobrazila více než jednu aktivní uzlinu; vícečetné sentinelové uzliny jsou častěji přítomny také u žen mladších než 50 let, s nižším BMI a při nádoru lokalizovaném v zevní polovině prsu (181).

Důležitá je také skutečnost, že četnost falešně negativních sentinelové uzliny klesá nepřímě úměrně s počtem získaných uzlin (182; 184) – je kolem 10% v případě 1 získané sentinelové uzliny, ale jen 1% při zisku 3 a více uzlin (181). Na druhé straně je však třeba poznamenat, že u žen s metastatickým postižením uzlin byly v 99,6% prokázány nádorové buňky v prvních čtyřech získaných sentinelových uzlinách; autoři proto vyvozují, že se zdá zbytečné odstraňovat více než 4 sentinelové uzliny (181).

1.3.3.7 Význam mikrometastáz v sentinelových uzlinách

Mikrometastáza je definována jako shluk nádorových buněk o průměru 0,2-2mm nebo čítající >200 buněk. Metodika pro detekci mikrometastáz se významně liší na jednotlivých pracovištích. Obvykle se užívá detekce na základě imunohistochemického stanovení cytokeratinu v sériových řezech sentinelové uzliny (viz také výše). Jestliže se použijí tyto metody u sentinelových uzlinách označených při standardním zpracování jako „negativní“, bývá přibližně **u 10-25% žen nutno upstagovat** onemocnění (z pN0 na pN1mi) v důsledku nálezu mikrometastáz (164; 185; 186).

Klinická významnost jakékoliv uzlinové metastázy a také riziko postižení dalších (nesentinelových) uzlin je přímo úměrné velikosti metastázy v sentinelové uzlině (187; 188). Lze předpokládat, že u žen s prokázanou mikrometastázou v SLN bude riziko postižení nesentinelových uzlin v rozmezí 10% (to je četnost postižení nesentinelových uzlin při negativitě SLN – viz také odd.1.3.4.) a 35-50% (což je riziko postižení nesentinelové uzliny při pozitivní sentinelové uzlině – viz také výše). Většina přehledových prací uvádí riziko postižení nesentinelových uzlin v přítomnosti mikrometastázy v SLN v rozmezí **15-20%** (189-191).

Management těchto žen je předmětem významné individualizace na základě charakteristik nádoru a specifík pacientky. Donedávna spíše převažovaly argumenty zdůrazňující rizikovitost ponechání těchto žen bez další terapie, a to na základě zkrácení jejich DFS a/nebo OS; proto se v rutinní praxi obvykle těmto pacientkám doporučuje doplnění axilární disekce nebo iradiace axily (191). Již citovaná data z randomizované studie ACOSOG-Z0010 jsou však významným argumentem pro přehodnocení tohoto postupu (140; 141).

Podobně nejednoznačně je definován význam tzv. **izolovaných nádorových buněk** (ITC), tedy nádorových shluků o průměru <0,2mm nebo čítajících ≤200 buněk. Studie na ženách s detekovanými ITC v sentinelové uzlině prokazují přítomnost metastáz v nesentinelových uzlinách s četností **kolem 10%** (189; 190). Tyto ženy jsou podle FIGO označovány jako pN0(i+) a v současné době se k nim obvykle přistupuje jako k pacientkám, u nichž nebyly v sentinelové uzlině nalezeny žádné metastázy, tedy pN0.

1.3.3.8 Význam sentinelových uzlin v oblasti arteria mammaria interna

Hlavní spádovou oblastí lymfatického systému prsu je axilární seskupení mízních uzlin. Určitá část lymfatické drenáže však směřuje také do jiných lokalit, nejčastěji do mízních uzlin podél arteria mammaria interna, ale také do infra- a supraklavikulárních uzlin. Bylo prokázáno, že v 8% jsou sentinelové uzliny v mimoaxilárních oblastech, avšak pouze 3% pozitivních sentinelových uzlin se nacházelo v neaxilárních oblastech (148).

Je-li tracer (patentní modř nebo radiokoloid) aplikován povrchově (subdermálně, intradermálně nebo subareolárně), jen zřídka se dostává do mamárních uzlin. Při hluboké

aplikaci traceru peritumorálně nebo intratumorálně byla u 22% nádorů (nezávisle na jejich lokalizaci v prsu) prokazatelná drenáž do vnitřních mamárních uzlin. Asi u 2,5% zúčastněných žen byly v mamárních uzlinách detekovány metastázy, avšak přibližně pouze u 1% ze všech tumorů byly vnitřní mamární uzliny postiženy izolovaně (tj. bez metastáz v axilárních uzlinách) (192). Pouze u velmi malé části pacientek může tedy disekce vnitřních mamárních uzlin ovlivňovat indikaci systémové adjuvantní terapie.

Bylo prokázáno, že disekce těchto uzlin nemá žádný význam pro celkové přežívání pacientek (193). Tento výkon je navíc zatížen nezanedbatelnou morbiditou (krvácení, pneumotorax), a proto je obvykle považován pouze za experimentální a nikoliv standardní postup managementu prsního karcinomu (181).

Vliv iradiace lymfatického řetězce podél arteria mammaria interna na prognózu žen s prokázanými metastázami v těchto uzlinách hodnotí studie EORTC 22922 – z posledních publikovaných výsledků vyplývá, že po průměrně 3 letech sledování je významně vyšší plicní toxicita u ozářených pacientek, neliší se četnost kardiálních komplikací, není ovlivněn celkový výkonnostní stav (194).

1.3.4 KLINICKÉ VYUŽITÍ

Jedním z hlavních ukazatelů kvality při použití techniky biopsie sentinelové uzliny je *četnost její detekce a exstirpace*. Ta se pohybuje v dobře provedených studiích u onemocnění stadia T1 a T2 v rozmezí 80-100%, u adekvátně vybraných pacientek týchž stadií pak v 95-100% případů. Dalším kritickým faktorem pro využití techniky biopsie sentinelové uzliny je výskyt její *falešné negativity*. Jedná se o případy, kdy jsou nalezeny metastázy v nesentinelových uzlinách přesto, že v sentinelové uzlině (nebo uzlinách) žádné nádorové buňky prokázány nebyly. Četnost falešné negativity se u časného karcinomu prsu pohybuje v různých studiích v rozmezí 5-10% (190).

Obvykle platí, že lepších výsledků dosahovala izolovaná pracoviště s dokonalou znalostí metodiky a s operační i laboratorní erudicí; výsledky multicentrických studií jsou poněkud méně jednoznačné. Výsledky první velké multicentrické validační studie byly publikovány v roce 1998 – četnost detekce byla 91% a falešná negativita 11,4% (148). V jedné z nejlépe designovaných studií NSABP B-32 zahrnující 5611 pacientek byla četnost detekce a exstirpace sentinelové uzliny 97,2%, falešná negativita pak 9,8% (121). Podobné výsledky byly potvrzeny také v metaanalýzách provedených studií, např. Kim shrnul hodnocení 8059 pacientek a vypočítal četnost detekce 96% a falešnou negativitu 7,3% (122). Na základě uvedených dat doporučilo ASCO užití techniky SLNB pro klinickou praxi (146). Podobné stanovisko vydala i konsenzuální konference pro doporučení SLN: SLNB může nahradit provádění standardní axilární disekce tehdy, dokumentuje-li konkrétní pracoviště (nebo chirurg) četnost detekce >90% a falešnou negativitu <5% (195).

1.3.4.1 SLNB u karcinomu in situ

Biopsii sentinelové uzliny má smysl provádět i u karcinomů in situ zjištěných core-cut biopsií. Tyto nálezy jsou rizikové z důvodu možné přítomnosti jednoho nebo několika fokusů invaze, které může biopsie minout.

Přibližně u 5-15% pacientek s biopticky prokázaným DCIS je zjištěno metastatické postižení sentinelové uzliny. Přibližně 10-20% pacientek s biopticky prokázaným DCIS je při definitivním zpracování preparátu přítomen jeden nebo více invazivních fokusů (5; 196). Je však zajímavé, že ve skupině žen s iniciální diagnózou DCIS a s pozitivitou sentinelové uzliny je pouze v 45% prokázána přítomnost invazivní komponenty (196).

Riziko postižení sentinelové uzliny je vyšší u objemnějších tumorů a také u nádorů s nižší diferenciací buněk (grade 3). Je proto doporučováno, aby biopsie sentinelové uzliny byla

selektivně zvažována u žen s biopticky zjištěným duktálním karcinomem in situ (196) – zejména při nálezů objemného ložiska, nízké diferenciaci buněk a u žen, u nichž je z důvodu rozsáhlé léze indikována mastektomie (5).

Je samozřejmé, že pokud je u biopticky ověřeného DCIS zachycen při definitivním histologickém zpracování vzorku invazivní fokus a/nebo pozitivní sentinelové uzlina, je třeba nádor upstagovat a postupovat v souladu s doporučením pro konkrétní stadium invazivního karcinomu.

1.3.4.2 SLNB u lokálně pokročilého nádoru

Ve studiích, které používaly techniku sentinelové uzliny u žen s lokálně pokročilým karcinomem, byla opakovaně prokázána četnost detekce sentinelových uzlin u 70-100% případů, obvykle se pak u vybraných případů podaří nalézt a exstirpovat sentinelovou uzlinu v 90-100% případů (165; 197–199). Technika biopsie sentinelové uzliny je tedy i u této skupiny žen považována za **spolehlivou náhradu** za standardní axilární disekci.

Opakovaně však byla potvrzena přímá korelace mezi velikostí primárního tumoru a incidencí axilárních metastáz (118–120). Se zvětšujícím se průměrem tumoru tedy klesá počet žen, u nichž lze očekávat negativní sentinelovou uzlinu a u nichž tedy bude možno vyhnout se axilární disekci. U těchto žen je často indikována předoperační systémová terapie v důsledku velikosti a/nebo vlastností primárního tumoru. Znalost předoperačního stavu mízních uzlin tak příliš neovlivňuje terapeutický postup (a z klinického hlediska tedy nemá velký význam). Skutečný klinický význam pak má až disekce sentinelových uzlin po ukončení neoadjuvantní systémové terapie. Téma biopsie sentinelové uzliny u žen léčených neoadjuvantní terapií přesahuje rámec tohoto sdělení a pro další informace odkazujeme na literární zdroje (např. (183)).

Použití techniky disekce sentinelové uzliny není kontraindikováno ani u žen s multifokálním nádorovým postižením (ačkoliv evidence-based údaje týkající se těchto případů jsou sporadické) (5).

1.3.4.3 SLNB u žen s klinicky zjištěným postižením mízních uzlin

Obvykle se uvádí, že sentinelová biopsie je považována za adekvátní management žen s časným karcinomem prsu a klinicky negativními lymfatickými uzlinami. Naopak ženy, u nichž je (na základě klinického vyšetření nebo zobrazovacích metod) vyslovena suspekce na nádorovou infiltraci uzlin, jsou standardně indikovány k axilární disekci. Tento výkon je některými autory považován za potenciálně terapeutický – zejména je-li akceptována představa, že uzlinové postižení je podmínkou vzdáleného metastazování nádoru, a že tudíž odstranění postižených uzlin může předejít systémové diseminaci onemocnění

Ve studiích zabývajících se ověřením funkčnosti techniky sentinelové biopsie patřil obvykle klinický nález suspektních uzlin k vylučovacím kritériím. Proto jsou možnosti použitelnosti SLNB u těchto žen méně prověřeny. Na druhou stranu je třeba poznamenat, že u 25-30% žen s klinickým nálezem suspektních nebo „postižených“ uzlin nepotvrzuje podrobné histopatologické vyšetření přítomnost uzlinových metastáz (200–202). Proto některá pracoviště považují biopsii sentinelových uzlin za přijatelnou techniku i u žen s klinicky vysloveným podezřením na postižení mízních uzlin. Vždy však platí, že všechny hmatné nebo suspektní uzliny musí být odstraněny, a to bez ohledu na to, zda v nich dochází k vychytávání traceru (barviva nebo radiokoloidu). Někteří autoři také doporučují, aby ženy s klinicky suspektními uzlinami absolvovaly jejich biopsii (tenkou jehlou nebo core-cut) a v případě nálezů nádorových buněk v uzlinách byla indikována standardní axilární disekce.

1.3.4.4 SLNB u pacientek po předchozí operaci

Studie 543 žen s karcinomem prsu a s anamnestickým údajem otevřené biopsie prsu prokázala 99% četnost identifikace sentinelové uzliny u těchto pacientek. Autoři tedy vyvozují, že předchozí otevřená biopsie prsu nebo parciální resekce prsu nejsou kontraindikací použití techniky biopsie sentinelové uzliny (203).

Ve studii 79 žen s anamnézou předchozího operačního zákroku v axile, u nichž došlo k recidivě maligního onemocnění ve stejnostranném prsu, byli autoři schopni detekovat sentinelovou uzlinu u všech zmíněných pacientek (204). Výrazně častěji jsou však nalézány sentinelové uzliny v neaxilárních oblastech (205).

V obou případech však autoři doporučují provést předoperační lymfoscintigrafii; nedojde-li k zobrazení sentinelové uzliny, je indikována axilární disekce, v ostatních případech lze ženám nabídnout biopsii sentinelové uzliny.

2 PACIENTI A METODIKA

2.1 SOUBOR PACIENTŮ

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

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

2.2 CÍLE PRÁCE

Tato práce detailně zkoumá význam prognostických a prediktivních charakteristik nádoru prsu na základě analýzy výše představeného souboru pacientek. Vyhodnocení tohoto významu se pak snaží využít pro stanovení nejvýhodnějšího terapeutického postupu při primární chirurgické léčbě tohoto onemocnění.

Hlavním cílem je pokusit se pomocí prediktivního modelu určit míru nutné radikality operačního zákroku v podpažní jamce, a to na základě vypočítaného rizika postižení lymfatických uzlin. V optimálním případě pak nalézt takovou skupinu žen, u níž by vynechání operace v axile (ať už standardní disekce nebo sentinelové biopsie) nezhoršilo léčebné výsledky ani prognózu onemocnění.

Vedlejším cílem práce je shromáždit soubor poznatků, které by pomohly optimalizovat operační zákroky na samotné prsní žláze – jedná se zejména o následující oblasti:

- rozhodování mezi provedením mastektomie nebo prs-záchovného výkonu
- v případě konzervativního výkonu na prsu stanovení míry radikality excize v rámci zachování okrajů bez dosahu nádorových změn (tumor-free margins)
- rozsah operačního výkonu na prsu při nálezů neinvazivních (in situ) karcinomů
- rozsah operačního výkonu na prsu při nálezů multifokálních nádorů
- rozsah operace u žen se suspektním nebo pozitivním předoperačním nálezem na mízních uzlinách

2.3 METODIKA

Podezření na diagnózu karcinomu prsu bylo u žen z našeho souboru vysloveno na základě klinického vyšetření a zobrazovacích metod (mamografie, ultrasonografie, magnetická rezonance). Pokud tomu nebránily jasné kontraindikace, byla diagnóza následně bioticky

verifikována, nejčastěji pomocí biopsie tlustou jehlou; obvykle současně s touto biopsií bylo provedeno také označení okrajů tumoru. Pacientky dále absolvovaly předepsaná stagingová vyšetření k vyloučení přítomnosti vzdálených projevů onemocnění a také interní předoperační vyšetření. Všechny pacientky měly tedy před zahájením léčby stanoven přesný klinický staging onemocnění podle současně platného systému TNM (206).

Tato část se zabývá způsoby hodnocení jednotlivých prognostických a prediktivních faktorů v našem souboru.

2.3.1 HODNOCENÍ TUMORU MAMOGRAFICKY

Mamografie je mimo jiné v České republice používána od roku 2003 pro organizovaný screening karcinomu prsu. Pro tento účel je tato zobrazovací metoda výhodná z důvodu možnosti identifikace minimálních ložisek v prsu a také detekce mikrokalcifikací. Její určitou klinickou nevýhodou je nutnost adekvátní komprese prsu, která je pro kvalitu snímků a také kvalitní hodnocení nezbytná – tato komprese může být zdrojem dyskomfortu nebo dokonce bolestivosti pro vyšetřovanou ženu. Pro účely mamografie se využívá měkkého rentgenové záření, navíc s odstíněním nezobrazovaných částí těla – radiační zátěž při vyšetření je tedy minimální a radiodiagnostiky není považována za klinicky významnou.

Standardně se snímkuje ve dvou projekcích pro každý prs – kraniokaudální (CC) a šikmé mediolaterální (207). Při diagnostických pochybnostech je možné k těmto projekcím zhotovit ještě doplňující vyšetření (nejčastěji cílené zvětšené snímky), nebo se indikuje vyšetření jinou zobrazovací metodou (ultrasonografie, magnetická rezonance). Mamografie je obvykle považována za obligatorní metodu zobrazení před zahájením jakékoliv léčby karcinomu prsu – mimo jiné také proto, že umožňuje operátorovi vytvořit si dobrou topografickou představu o velikosti a lokalizaci léze (hloubce uložení, poloze vzhledem k jednotlivým kvadrantům prsu, apod.).

2.3.2 HODNOCENÍ TUMORU A UZLIN POMOCÍ ULTRAZVUKU

2.3.2.1 *Hodnocení rozměru primárního tumoru*

Ultrasonografie je pro hodnocení rozsahu tumoru přesnější, než mamografický rentgenový snímek – samozřejmě za předpokladu, že je taková léze ultrazvukově zobrazitelná. Proto také byla u převážné většiny žen v našem souboru k dispozici ultrazvuková měření ve třech na sebe kolmých rozměrech.

Pacientka není vystavena žádné radiační zátěži, vyšetření se provádí nejčastěji vleže bez potřeby komprese. Měření je proto možno v případě potřeby provádět opakovaně – toho se využívá například pro monitorování míry odpovědi nádoru u patientek léčených neoadjuvantní terapií.

Ultrazvukové zobrazení umožňuje navíc na nekomprimovaném prsu (imitujícím situaci na operačním stole) označit okraje tumoru, resp. hranice pro “bezpečnou” resekci tumoru – viz také níže.

2.3.2.2 *Hodnocení stavu axilárních lymfatických uzlin*

Podpažní jamka je jako nejdůležitější spádová lymfatická oblast karcinomu prsu velmi dobře přístupná ultrazvukovému vyšetření. Mízní uzliny jsou lokalizovány poměrně povrchově, tedy ve značné blízkosti vyšetřovací sondy.

Normální lymfatická uzlina má echogenní dřev i hilus, struktura je homogenní, poměr dlouhé a krátké osy je větší než 2. Uzlina změněná reaktivně (např. zánětem) může být zvětšená, ztrácí echogenitu hilu a obvykle má zřetelné cévní zásobení v hilu. Nádorově infiltrovaná uzlina může být také zvětšená, má poměr os < 2 („zakulacuje se“), ztrácí echogenitu hilu i dřev, struktura je nehomogenní, cévní zásobení je centrálně i v pouzdře, případně může být také patrné prorůstání skrz pouzdro uzliny.

2.3.3 OSTATNÍ ZOBRAZOVACÍ METODY

Podle některých literárních referencí existují důkazy o tom, že objem tumoru hodnocený pomocí magnetické rezonance nejlépe koreluje s odpovědí nádoru na léčbu. Paušálnímu použití této metody brání kromě vyšší ceny také horší dostupnost vyšetření. V našem souboru jsme indikovali vyšetření pouze selektivně – obvykle při špatné zobrazitelnosti a měřitelnosti rozsahu léze předchozími metodami a při podezření na multifokalitu.

Samozřejmostí vyšetřovacího procesu je doplnění stagingových vyšetření k vyloučení vzdálených metastáz – předozadního rentgenového snímku hrudníku, ultrasonografie břišní dutiny a scintigrafie skeletu.

Další zobrazovací byly využívány pouze výjimečně – například CT k odhadu vztahu tumoru k hrudní stěně nebo ke kůži.

2.3.4 BIOPTICKÁ VERIFIKACE

Téměř u všech pacientek (s výjimkou čtyř v celém souboru) byla diagnóza karcinomu prsu verifikována biopticky již před zahájením léčby. Pro převážnou většinu těchto ověření byla v souladu s rutinní praxí současné doby použita biopsie tlustou jehlou – tzv. **core-cut biopsie**. Provádí se pomocí duté jehly o průměru 14G po lokální infiltrační anestézii 1% Mesocianem. Vnitřní dutina jehly pojme váleček tkáně o průměru 1,8mm a délky kolem 20mm. Histopatologické zpracování takto velkého vzorku umožňuje získat kompletní informaci o nádoru včetně jeho histologického typu, imunohistochemických vyšetření a také hodnocení mikroanatomických poměrů (invazivita, invaze lymfovaskulárních prostor, atd.). Obvykle se odebírá několik válečků tkáně (v počtu 4-8) z různých míst patologického ložiska – aby se předešlo získání pouze zdravé tkáně z okolí tumoru (falešně negativní odběr), nekrotického (nediagnostického) materiálu (často se nachází v centru ložiska) a také aby se snížilo riziko „sampling error“ (tj. nesprávného stanovení vlastností nádoru, které mohou být v jednom vzorku odlišné od většiny ostatní tkáně tumoru). K biopsii se užívá tzv. bioptického děla, nejčastěji z volné ruky za navigace ultrazvukem (je-li tímto způsobem ložisko zobrazitelné) nebo stereotakticky (pomocí trojrozměrného zaměřovacího zařízení spojeného s mamografickým rentgenovým přístrojem).

Alternativním způsobem odběru materiálu je tzv. **vakuová aspirační biopsie**. Tato metoda využívá k získání bioptických vzorků podtlakové kanyly. Množství odebrané tkáně může být značně rozsáhlejší než u core-cut biopsie a do budoucna je snad možné uvažovat o této metodě nejen jako o diagnostické, ale také o jejím terapeutickém využití (kompletní odstranění menších lézí, zejména in situ nádorů).

Spíše výjimečně se k získání materiálu k histologickému vyšetření využilo jiných metod. **Otevřená biopsie** je rozsáhlejším výkonem vyžadujícím obvykle celkovou narkózu a nemá ve srovnání s výše popsanými metodami žádnou výhodu. **Biopsie tenkou jehlou** (tzv. fine-needle aspiration – FNA) je sice ve srovnání s core-cut biopsií šetrnější k pacientce, neposkytuje však úplnou informaci o tumoru (vzhledem k tomu, že buňky jsou odděleny od okolního prostředí, nelze se především vyjádřit o invazivitě tumoru). Některá pracoviště však využívají biopsie tenkou jehlou k ověření stavu regionálních mízních uzlin v případě podezření na jejich postižení vyslovené na základě zobrazovacích metod nebo klinického vyšetření.

2.3.5 OZNAČENÍ LOKALIZACE PRIMÁRNÍHO TUMORU

V minulosti bylo standardním chirurgickým řešením odstranění celého prsu (ablace, mastektomie), v současnosti je však jednoznačně preferován konzervativní zákrok na prsu („prs zachovný výkon“) všude tam, kde není takový postup kontraindikován. Tento nesporný benefit pro pacientky je však spojen se specifickými riziky, především však s rizikem

ponechání části nádoru in situ a také s rizikem vzniku recidivy v ponechaném prsu. V průběhu operace je proto třeba věnovat zvláštní pozornost resekci adekvátní části prsní tkáně s tumorem; neméně důležité je také pečlivé histologické zpracování operačního resekatu (viz níže).

Je-li tumor hmatný (jeho poloha a velikost může být hodnocena palpačně), má operátor poměrně malé riziko „minutí“ tumoru, tedy exstirpace pouze zdravé tkáně bez tumoru. Jedná-li se však o nehmátnou lézi, je toto riziko podstatně větší a zcela jistě je klinicky nezanedbatelné, zejména pak v objemnějších prsech. V literatuře bylo proto popsáno několik způsobů, jak zajistit, aby byla z prsu exstirpována adekvátní tkáň s tumorem. Používá se kožního značení projekce tumoru (např. fixem na kůži), zavedení rentgenově kontrastního vodiče do centra léze, radiačně navigovaných metod, prostorové modelace prsu a tumoru na základě dat z magnetické rezonance, a jistě i další metody. Žádný z těchto postupů však nebyl dostatečně standardizován.

V našem souboru jsme paušálně používali jednoho ze dvou způsobů značení ložiska:

1/ pokud byla léze zobrazitelná pomocí ultrazvuku, aplikovala se malá množství tuše do žlázoové tkáně prsu ve vzdálenosti 10 milimetrů od viditelného okraje ložiska, značení se provádělo ze 2-4 míst (podle lokalizace tumoru); tuš se chová ve tkáni přijatelně stabilně, nedochází k jejímu rozptýlení a do doby operace není resorbována imunitními mechanismy – značení je proto možné bezpečně provést několik dnů až týdnů před plánovanou operací

2/ u léze nezobrazitelné pomocí ultrazvuku bylo nutno spolehnout se na mamografické zobrazení – pacientka musela znova podstoupit kompresi prsu, při které byl stereotakticky (s použitím trojrozměrného zaměřovacího zařízení) zaveden vodič s fixační kotvičkou do centra patologického ložiska; toto značení je samozřejmě nutné provést maximálně několik hodin před operací (aby nedošlo k dislokaci lokalizačního vodiče) a klade proto vyšší nároky na dostupnost komplementu a logistiku celého operačního postupu; součástí této metodiky bylo také provedení mamografického snímku resekatu – v případě zjištění blízkosti patologické léze k některému z okrajů chirurgické exstirpace pak bylo možno v jedné operační době provést dodatečnou resekci podezřelého okraje

2.3.6 OPERACE

Převážná většina operačních zákroků byla provedena ve třech různých fakultních nemocnicích v Praze, pouze malá část mimo tyto fakultní nemocnice. Počty a podíl operací v jednotlivých institucích ukazuje tabulka 4.

Tabulka 4

místo provedení operace	počet	%
Ústřední vojenská nemocnice, Střešovice, Praha	206	33,4
Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha	217	35,2
Ústavu pro péči o matku a dítě, Podolí, Praha	166	26,9
ostatní	28	4,5

2.3.6.1 Operace na prsu

V úvahu přicházejí dva základní zákroky na prsu – tumorektomie (prs zachovný výkon) a mastektomie. Při jejich volbě jsme měli na paměti výsledky studie NSABP B-06, jejíž vícečetné reanalýzy opakovaně prokázaly stejný léčebný výsledek u tumorektomií s následnou iradiací prsu jako u mastektomií (208). Ženám proto byla nabídnuta možnost parciálního zákroku na prsu ve všech případech, kdy jsme nenalezli jasnou kontraindikaci takového postupu (např. přítomnost inflamatorního karcinomu). Za relativní kontraindikaci parciálního výkonu jsme považovali zřetelný nepoměr mezi velikostí prsu a nádoru s rizikem

nepříjemného kosmetického výsledku, více nádorových ložisek, difúzní výskyt suspektních mikrokalcifikací, předchozí iradiaci prsu, popřípadě recidivu v ozářeném prsu (z důvodu vyčerpané možnosti adjuvantní radioterapie). Konečná volba typu zákroku na prsu záležela samozřejmě na rozhodnutí samotné pacientky deklarovaném v jejím podepsaném informovaném souhlasu s operací.

Modifikovaná radikální mastektomie má za cíl odstranit veškerou tkáň prsu až na fascii musculus pectoralis major. I když v praxi toto odstranění není obvykle kompletní, nepřidává se k tomuto výkonu rutinně iradiace hrudní stěny; adjuvantní iradiace se indikuje pouze selektivně – zejména v případě blízkosti tumoru k resekcčnímu okraji nebo při zasahování do některého okraje, při metastatickém postižení více než tří axilárních lymfatických uzlin, atd.

Cílem **tumorektomie** je odstranit celý nádor (nebo nádory) s lemem zdravé (nepostižené) tkáně širě 10 milimetrů; snahou operátora je také ponechat co největší část intaktní prsní tkáně in situ – k zajištění co nejlepšího kosmetického výsledku operace. Podmínkou toho, aby byly léčebné výsledky srovnatelné jako u mastektomie, je histopatologicky potvrzená absence dosahu tumoru do okraje chirurgického řezu a také následná iradiace prsu. Dosahuje-li invazivní nádor nebo DCIS do resekcčního okraje, je indikována reexcize ložiska, případně mastektomie (toto pravidlo neplatí pro LCIS); naopak reexcize **není** podle aktuálních konsenzuálních doporučení ze St.Gallen indikována v případě, že invazivní nádor nebo DCIS nedosahuje k obarvenému resekcčnímu okraji (bez ohledu na šíři nepostiženého okraje) (12).

Podíl konzervativních zákroků na prsu se v poslední době významně zvýšil – jednak díky časnějšímu záchytu onemocnění ve screeningových programech, jednak díky využití neoadjuvantní terapie. V současnosti by podíl mastektomií na pracovišti neměl přesahovat 30-40% ze všech operovaných prsních malignit.

2.3.6.2 Operace na axilárních lymfatických uzlinách

Standardním operačním výkonem v podpažní jamce byla u žen s časným karcinomem prsu **biopsie sentinelové uzliny**. Tuto techniku jsme na našich pracovištích začali využívat v roce 2001. V úvodní fázi jsme korelovali úspěšnost tohoto postupu s tehdy standardně prováděnou axilární disekcí – četnost detekce sentinelových uzlin dosáhla v našem souboru pacientek s časným karcinomem prsu 98,1%, falešná negativita pak 2,4% (nepublikovaná data).

Na základě našich zkušeností jsme v převážné většině případů prováděli označení sentinelových uzlin pouze pomocí radioizotopu ⁹⁹Tc. V rozmezí 20-26 hodin před operací jsme podkožně (do oblasti nad tumorem) aplikovali 0,1ml radiokoloidu, který obsahoval partikule průměru 600 nanometrů s celkovou aktivitou kolem 80 MBq (obvykle v rozmezí 60-100 MBq). Po 30 minutách byla provedena lymfoscintigrafie a označena kožní projekce sentinelové uzliny. Jestliže se na prsu prováděl konzervativní výkon (tumorektomie), použila se k identifikaci sentinelové uzliny separátní incize; při mastektomii byly axilární uzliny exstirpovány ze stejné incize, z níž byl operován prs. K měření gamaaktivity nad uzlinami se při operaci užívala sterilní přenosná scintilační sonda. Jako „sentinelová uzlina“ byla označena každá uzlina, která vykazovala alespoň 10% aktivity nejvíce aktivní uzliny v axile.

Lymfotropní barvivo (methylenová modř) byla použita pouze zřídka – zejména v případech, kdy se na předoperačním lymfoscintigramu nezobrazila žádná sentinelová uzlina a kdy ani těsně před operací nebyla nalezena žádná aktivita nad axilární oblastí. Za „sentinelovou uzlinu“ se označila taková uzlina, která se zbarvila modrým barvivem, nebo která měla patrnou zbarvenou aferentní lymfatickou cévu.

Ve výrazné většině případů byla sentinelová uzlina ponechána k možnosti pečlivého „definitivního“ histopatologického vyšetření. Peroperační vyšetření těchto uzlin technikou zmrazeného řezu bylo využíváno pouze selektivně – nejčastěji tehdy, byla-li některá z těchto

uzlin makroskopicky suspektní z metastatického postižení (výrazně zvětšená, tuhá, zakulacená, se známkami transkapsulárního šíření, apod.). Při peroperačním potvrzení pozitivivity sentinelové uzliny byla v jedné operační době doplněna disekce uzlin v úrovni I.a II. axilární etáže. Dokončení standardní axilární disekce bylo však v některých případech provedeno také v případě pouhé suspekce na postižení některé z uzlin, tj. aniž by byla peroperačně kterákoliv uzlina vyšetřena – takový postup závisel pouze na klinickém úsudku a rozhodnutí chirurga.

Méně obvyklým postupem byla **primární disekce axilárních uzlin** bez užití sentinelové biopsie. Tento postup byl nejčastěji použit při operacích mimo uvedená tři univerzitní pracoviště (viz tabulku 4 – mnohdy nebyla v těchto zařízeních k dispozici scintilační sonda), ale také v případech, kdy bylo na základě klinického vyšetření (palpace + ultrasonografie) vysloveno podezření na metastatické postižení uzlin. Ve všech ostatních případech byla kompletní axilární disekce provedena až ve druhé době – při pozitivitě jedné nebo více sentinelových uzlin zjištěné při „definitivním“ histologickém zpracování preparátu.

Počty a podíl jednotlivých operačních zákroků na prsu a v axile ukazuje tabulka 5.

Tabulka 5

operace na prsu	počet	%
prs zachovný výkon – tumorektomie	531	86,1
modifikovaná radikální mastektomie	86	13,9
operace na axilárních lymfatických uzlinách		
samotná biopsie sentinelové uzliny	518	83,9
biopsie sentinelové uzliny a v jedné době kompletní axilární disekce	45	7,3
biopsie sentinelové uzliny, ve druhé době dokončení axilární disekce	19	3,1
primární kompletní disekce axilárních uzlin	35	5,7

2.3.7 HISTOPATOLOGICKÉ HODNOCENÍ NÁDORU A LYMFATICKÝCH UZLIN

Technika zpracování a hodnocení vzorků z prsu i z uzlin respektují doporučení manuálu AJCC 2002 (209). Srovnatelné postupy jsou používány u všech preparátů žen s karcinomem prsu. Velmi výhodná byla možnost hodnotit převážnou většinu materiálu v jediné histopatologické laboratoři – v Biolabu Praha s.r.o. Také tímto postupem je možné garantovat vysoký stupeň standardizace zpracování.

Z bioptického vzorku se vyšetřoval histologický typ nádoru, jeho grading, podíl buněk exprimujících estrogenové a progesteronové receptory, přítomnost HER-2/neu a proliferační aktivita. Při definitivním histologickém zpracování **operačního resektátu** se navíc hodnotila velikost ložiska a jeho multifokalita (tyto dvě vlastnosti se předoperačně určovaly pomocí zobrazovacích metod) a také přítomnost lymfovaskulární invaze. Z hlediska statistického zpracování je proto zapotřebí **důsledně rozlišovat** mezi dvěma typy histologického vyšetření: **vyšetření bioptického vzorku** („předoperační histologie“, „bioptická diagnóza“) a **vyšetření operačního resektátu** („pooperační histologie“, „definitivní histologie“, „definitivní diagnóza“).

2.3.7.1 Hodnocení primárního nádoru

Před zahájením zpracování operačního resektátu prsu byly pigmentem obarveny resekcční okraje – v případě tumorektomie všechny okraje, v případě mastektomie pak pektorální okraj preparace. Resekát byl zpracován podle standardního protokolu, což zajistilo dobrou prostorovou orientaci a umožnilo vyjádřit se ke vzdálenosti okrajů tumoru od okraje exstirpátu, případně k dosahu léze k okraji. Tato zjištění pomohla předcházet situacím

s nekompletním odstraněním patologického ložiska (v případě dosahu léze k okrajům chirurgické exstirpace byla indikována doresekce lůžka tumoru přiléhající k příslušnému pozitivnímu okraji).

Velikost nádoru

Velikosti patologického ložiska se měří na fixovaném operačním resekátu ve třech na sebe kolmých rozměrech. Makroskopicky zjištěné rozměry se pak korigují podle mikroskopického rozsahu léze – směrodatné je právě mikroskopické měření ložiska. Pro prognózu a také pro stanovení nutnosti pooperační léčby je rozhodující pouze velikost **invazivní složky** nádoru, nikoliv jeho neinvazivní komponenty. Samozřejmě však v hodnocení preparátu nesmí chybět popis přítomnosti a rozsahu této neinvazivní složky (to je důležité zejména s ohledem na riziko lokálních recidiv nádoru).

Invazivita nádoru

Nádor je označený jako „invazivní“ tehdy, je-li nalezeno šíření maligních buněk skrz bazální membránu. Pokud naopak takové šíření není prokázáno a buňky zůstávají pouze v epitelovém prostoru ohraničeném neporušenou bazální membránou, nádor se označí jako „carcinoma in situ“.

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

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

Invazivitu nádorů popisuje tabulka 6.

Tabulka 6

typ nádoru – biopsie	počet	%	typ nádoru – definitivní histologie	počet	%
invazivní karcinom	466	75,5	invazivní karcinom	488	79,1
carcinoma in situ	145	23,5	carcinoma in situ	122	19,8
benigní	3	0,5	žádné známky nádoru	7	1,1
nebyl k dispozici	3	0,5			

Lokalizace nádoru

Umístění nádoru v konkrétním prsním kvadrantu může rozhodovat o směru jeho preferenční lymfatické diseminace – buď do axilárních uzlin, nebo do uzlin podél arteria mammae interna, nebo do obou těchto spádových oblastí. Kvůli možnosti smysluplného statistického zpracování jsme rozlišovali laterální typ nádoru (lokalizovaný v některém z laterálních kvadrantů, nebo v axilárním výběžku prsu, nebo i v centrální části prsu) a mediální typ (lokalizovaný v některém z mediálních kvadrantů). Počet a podíl jednotlivých uložení nádorů ukazuje tabulka 7.

Tabulka 7

lokalizace nádoru	počet	%
laterální	446	72,3
mediální	135	21,9
neurčeno	36	5,8

Multifokalita nádoru

V literatuře bývá někdy rozlišována *multifokalita* (přítomnost více ložisek ve stejném kvadrantu prsu) a *multicentricita* (přítomnost více ložisek ve více než jednom kvadrantu). Existence více než jednoho ložiska nádoru může velmi významně ovlivňovat prognózu maligního prsního onemocnění – při ponechání nepoznaných ložisek in situ se výrazně zvyšuje riziko recidivy onemocnění ale také tvorby vzdálených metastáz. Malá ložiska nádoru nemusí být patrná na zobrazovacích vyšetřeních, naopak některá ložiska suspektního vzhledu nemusí v definitivním histologickém zpracování odpovídat nádorovým fokusům.

Počet a podíl vícečetných nádorů ukazuje tabulka 8.

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

Tabulka 8

počet fokusů nádoru	počet	%
jediné ložisko	524	84,9
dvě ložiska	40	6,5
tři a více ložisek	53	8,6

Histologický typ nádoru

Histologický typ tumoru musel být jednoznačně charakterizován jednou z morfologických kategorií definovaných WHO klasifikací (210). V případě koexistence více morfologických typů u jedné pacientky se kategorie určila podle prognosticky závažnějšího typu.

Kromě dvou nejobvyklejších histologických typů nádoru (duktální a lobulární) se v některých pracích vyděluje ještě skupina tzv. „příznivých histologických typů“. Do této skupiny patří zejména tubulárně uspořádaný karcinom a mucinózní karcinom. Zůstává však otázkou (ne zcela jednoznačně zodpovězenou), jestli je lepší prognóza těchto typů dána tím, že jsou vždy dobře diferencované (grade 1), nebo samotnou morfologií nádoru.

Počty a podíl jednotlivých histologických typů nádoru ukazuje tabulka 9.

Tabulka 9

histologický typ	počet	%
duktální	511	82,8
lobulární	43	7,0
příznivé typy (tubulární, mucinózní)	27	4,4
ostatní typy	36	5,8

Histopatologický grading

Pro hodnocení histopatologického gradingu byla použita Nottinghamská klasifikace a technika popsána výše (viz také tabulku 3).

Počty a podíl pacientek s jednotlivých stupni diferenciací (gradingu) ukazuje tabulka 10.

Tabulka 10

histopatologický grading	počet	%
1	189	30,6
2	272	44,1
3	156	25,3

Hormonální receptory

Přítomnost steroidních receptorů byla stanovována imunohistochemicky, značením monoklonálními protilátkami proti receptorovým molekulám – pro estrogenové receptory Labvision SP1, pro progesteronové receptory DAKO PgR636. Zjištěný procentní podíl pozitivních reakcí v buněčném jádře byl použit jako spojitá veličina, tedy bez stanovování jakýchkoliv oddělených skupin nebo kategorií.

HER-2/neu

Metodika detekce tohoto membránového receptoru se v ČR řídí doporučením, které vzešlo z pracovního setkání fóra onkologů a zástupců zdravotních pojišťoven v Brně 23.4.2004.

Rutinně byl stanovován **proteinový produkt** genu c-erbB2, tedy transmembránový receptor HER-2/neu. Používalo se protilátek SP3 firmy NeoMarkers a výsledek se hodnotil semikvantitativně, stejně jako u HercepTestu – viz tabulku 11.

V případě pozitivního skóre 2+ a 3+ jsme s ohledem na možnost léčby pacientky Herceptinem prováděli standardizovaný HercepTest (DAKO), případně in-situ hybridizační stanovení **amplifikace samotného genu** c-erbB2 (FISH – fluorescent in situ hybridisation, CISH – chromogenic in situ hybridisation).

Pro účely prediktivního modelu jsme rozdělili pacientky na skupinu s „negativním“ HER-2/neu (to jsou ženy, jejichž skóre bylo 0 nebo 1+) a skupinu s „pozitivním“ HER-2/neu (skóre 2+ a 3+) – zdůvodnění je uvedeno v interpretaci výsledků – odd.3.1.

Tabulka 11

skóre	overexprese	odhad barvení
0	negativní	žádné barvení nebo membrány obarveny u <10% buněk
1+	negativní	slabě a částečně obarvené membrány u >10% buněk
2+	slabě pozitivní	slabě až středně kompletně obarvené membrány u >10% buněk
3+	silně pozitivní	silně kompletně obarvené membrány u >10% buněk

Proliferační aktivita

K určení proliferační aktivity se užívalo stanovení jaderného heat-stress proteinu Ki67, který je specificky vázán na G1-M fázi buněčného cyklu. K jeho detekci sloužily monoklonální protilátky MIB-1 (Labvision SP6). Hodnocení bylo provedeno při 40-násobném zvětšení na přibližně 100 maligních buňkách, a to v místě největší positivity zbarvení. Výsledné procento pozitivních buněčných jader bylo pro účely prediktivního modelu použito jako spojitá veličina.

Přítomnost lymfatické a/nebo vaskulární invaze

K hodnocení angioinvaze jsme podle metodických doporučení používali oblasti prsní tkáně z periferie nádorového ložiska. Intravaskulární prostory byly značeny protilátkami CD34 a D2-40, které značí endotel lymfatických cév. Vizualizace umožňuje hodnotit přítomnost nádorových elementů v lumen cév.

Přítomnost lymfovaskulární invaze bylo možné spolehlivě stanovit pouze z definitivního operačního preparátu. U bioptického vzorku je toto hodnocení obtížné nebo nemožné – zejména z toho důvodu, že se biopsie nejčastěji odebírá z centra suspektního ložiska, což je v rozporu s metodikou pro stanovení lymfovaskulární invaze. Proto jsme v databázi sledovaných pacientek zaznamenávali pouze lymfatickou a/nebo vaskulární invazi zjištěnou na základě vyšetření pooperačního resektátu.

2.3.7.2 Hodnocení axilárních lymfatických uzlin

Všechny získané lymfatické uzliny byly po zafixování ve formalinu zality do parafinových bločků. Nesentinelové uzliny byly poté krájeny v rovině kolmé na dlouhou osu uzliny, jednotlivé řezy byly od sebe vzdáleny 2 milimetry. Preparáty byly následně obarveny hematoxylinem a eosinem. Imunohistochemické vyšetření se u těchto nesentinelových uzlin používalo pouze výjimečně – při nálezu podezřelých ale nikoliv jasně maligních shluků buněk.

Sentinelové uzliny byly krájeny obdobným způsobem, avšak v každém bločku byly provedeny 4 sériové řezy ve vzdálenostech 10 mikrometrů. Tři z nich byly hodnoceny v barvení hematoxylinem a eosinem, čtvrtý pak po obarvení cytokeratinem užívaným k detekci maligních elementů – pomocí protilátek proti cytokeratinu AE1/AE3 (DAKO) a/nebo proti cytokeratinu CK19 (DAKO).

Metastatická ložiska s maximálním rozměrem 0,2-2mm byla označena jako „mikrometastázy“, pro shluky metastatických buněk menší než 0,2mm se užívá termín „izolované nádorové buňky“ („isolated tumor cells“) – bez ohledu na to, jestli byly nalezeny při barvení hematoxylinem a eosinem nebo cytokeratinem (pro účely stagingu se pak označují jako pN0(i+)).

2.3.8 SOUBOR PARAMETRŮ NAVRŽENÝCH K HODNOCENÍ PROGNÓZY KARCINOMU PRSU

Obecně platí, že možnosti odhadu prognózy karcinomu prsu jsou tím větší, čím více jeho validních markerů je možno hodnotit. Limitující je však cena takových vyšetření. Soubor vlastností navržených k testování v tomto projektu je tedy kompromisem vzniklým srovnáním přínosu daných parametrů s cenou jejich stanovení. Seznam hodnocených parametrů (včetně označení odpovídajících proměnných ve statistickém softwaru) uvádí tabulka 12.

Tabulka 12

vlastnost nádoru nebo pacientky	označení
věk pacientky	vek
body mass index (BMI = hmotnost / výška ²)	BMI
místo provedení operace	místo
velikost nádoru, tj. jeho nejdelší rozměr	max.rozmer
lokalizace nádoru	umistení
multifokalita nádoru	multifokalita
histologický typ nádoru	histologie
histopatologický grading	grade
podíl buněk exprimujících estrogenové receptory	ER
podíl buněk exprimujících progesteronové receptory	PR
přítomnost receptorů HER-2/neu	c-erbB2
proliferační aktivita	KI67
přítomnost lymfatické a/nebo vaskulární invaze	LVSI

2.4 STATISTICKÉ HODNOCENÍ

2.4.1 PREDIKTIVNÍ MODEL Y

Základní stavební kameny pro konstrukci prediktivních modelů je nutno získat pečlivou analýzou jednotlivých vstupních proměnných, v našem případě pak vlastností karcinomu prsu a dané pacientky (viz také oddíl 1.2.). Následně je možné zkoumat vztah těchto

prognostických faktorů (tzv. *nezávisle proměnných* – viz níže) k chování tzv. *závisle proměnné* (viz také níže), v tomto případě k riziku postižení axilárních lymfatických uzlin. Nepřímo tak lze posuzovat vliv konkrétní kompozice jednotlivých vlastností nádoru na jeho schopnost metastazovat do spádových mízních uzlin a tím také přispět k odhadu celkové prognózy maligního onemocnění a posoudit nutnost provedení exstirpace axilárních lymfatických uzlin.

2.4.1.1 Regresní analýza

Regresní analýza je jedním ze základních nástrojů při sestavování prediktivních modelů. Patří k nejvýznamnějším metodám matematické statistiky a zabývá se zkoumáním souvislosti mezi náhodnými veličinami. Účelem těchto metod je odhad hodnoty jisté náhodné veličiny (tzv. *závisle proměnné*, *vysvětlované proměnné* anebo *cílové proměnné*) na základě znalosti jiných veličin (*nezávisle proměnných* anebo *vysvětlujících proměnných*).

Pokud je závisle proměnná spojitého typu vysvětlena jednou veličinou, hovoří se o *jednoduché lineární regresi*, pokud je vysvětlena lineární kombinací více proměnných, hovoří se o *mnohonásobné lineární regresi*. Jestliže však vysvětlovaná proměnná není spojitá, pak se použije *logistická regrese* (211).

Logistická regrese se od lineární regrese liší v tom, že predikuje pravděpodobnost, zda se daná událost stala či nestala. V případě dichotomické (binární) závislé veličiny, která nabývá pouze dvou možných hodnot (např. výskyt onemocnění versus jeho absence), se hovoří o **binomické logistické regresi**. V případě ordinální závisle proměnné se jedná o **ordinální logistickou regresi** a v případě nominální závisle proměnné, která má více než dvě hodnoty, se jedná o **multinomickou logistickou regresi** (212). Vysvětlující proměnné mohou být ve všech případech (u lineární i u logistické regrese) jak kategorizované tak i spojitě (213).

2.4.1.2 Konstrukce modelů

Cílem regresní analýzy je nalézt co nejlepší, nejúspornější a současně věcně smysluplný model, který popíše vztah mezi závisle proměnnou (vysvětlovanou, predikovanou proměnnou) a skupinou nezávisle proměnných (vysvětlujících, predikujících proměnných) (213).

Laicky lze říci, že pojem „model“ označuje matematickou rovnici, která umožňuje, aby jedna tzv. závisle proměnná byla předpovězena jinými tzv. nezávisle proměnnými (214). Tuto regresní rovnici lze zapsat ve tvaru:

$$y = \alpha + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \beta_3 * x_3 + \dots + \beta_k * x_k \quad (1)$$

kde y je hodnota závisle proměnné, kterou se snažíme vypočítat,
 $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$ jsou hodnoty sledovaných vstupních proměnných,
 $\alpha, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_k$ jsou tzv. regresní koeficienty, které se dopočítají pomocí statistických metod,
 k je počet hodnocených vstupních proměnných.

Hodnota y , která je na levé straně rovnice, se nazývá *logit*. Jedná se o přirozený logaritmus tzv. *šance*, která je dána poměrem pravděpodobnosti, že se daný jev stane a pravděpodobnosti, že se tento jev nestane. Jevem bude v našem případě metastatické postižení axilárních uzlin.

$$y = \ln(\text{šance}), \text{ přičemž } \text{šance} = \frac{\text{pravděpodobnost, že se jev stane}}{\text{pravděpodobnost, že se jev nestane}} \quad (2)$$

Aby se zjistila hledaná pravděpodobnost s jakou nastane sledovaný jev, je třeba nejdříve vypočítanou hodnotu y odlogaritmovat. Tím se získá hodnota *šance* a z ní lze teprve vypočítat hledanou pravděpodobnost. Na tomto místě je třeba upozornit, že nelze zaměňovat pojmy *šance* a *pravděpodobnost*. Protože je součet pravděpodobnosti, že se jev stane a pravděpodobnosti, že se jev nestane, roven 1, lze z předchozí rovnice vyvodit vztah pro výpočet pravděpodobnosti:

$$\text{pravděpodobnost, že se jev stane} = \frac{\text{šance}}{(1 + \text{šance})} \quad (3)$$

Zkonstruovat prediktivní model znamená sestavit regresní rovnici (1). K tomu jsou zapotřebí hodnoty vstupních proměnných (tj. v našem případě vlastnosti nádoru a pacientky). Odhad hodnoty regresních koeficientů se provádí tzv. **metodou maximální věrohodnosti**. Následně je třeba otestovat významnost těchto koeficientů (např. pomocí Waldovy statistiky), to znamená otestovat, zda je daný koeficient nenulový a určit vhodnost nezávisle proměnných a jejich signifikanci.

Pro sestavení regresní rovnice jsme použili metodu „**enter**“, při které jsou do výpočtu vloženy všechny proměnné najednou a na rozdíl od metody stepwise (viz dále) zůstávají všechny součástí modelu. Tato metoda ukazuje, jak velký vliv má každá z nezávisle proměnných na závisle proměnnou při kontrole vlivu působení ostatních nezávisle proměnných. Alternativou je použití metody „**stepwise analysis**“, při které jsou proměnné vkládány do výpočtu regrese postupně podle předem zadaných kritérií. Tato metoda má dvě varianty – *forvard (metoda dopředná)*, která v prvním kroku vypočítá model pouze s konstantou α a pak hledá první proměnnou, která nejlépe predikuje závisle proměnnou. Když ji najde a zjistí, že je statisticky signifikantní, vloží ji do modelu a hledá další. Opakem tohoto postupu je varianta *backward (metoda zpětná)*, při které jsou v prvním kroku do modelu vloženy všechny nezávisle proměnné a algoritmus výpočtu pak postupně eliminuje všechny proměnné, které nejsou statisticky signifikantní. Na rozdíl od metody enter ponechává metoda *stepwise* v modelu pouze ty proměnné, které jsou statisticky signifikantní. Její použití by tedy bylo vhodné tehdy, pokud by naším cílem bylo maximalizovat predikci s co nejmenším počtem relevantních proměnných. Pokud však jde o dosažení co nejlepší prediktivity bez ohledu na počet zařazených proměnných, je výhodnější použít metodu enter (v našem souboru se výhodnost tohoto postupu ukazuje při srovnání modelů A a B – viz dále).

Po získání finálního modelu je třeba otestovat jeho kvalitu. K tomuto účelu je k dispozici celá řada statistik, např. statistika $-2LL$ ($-2 \log$ likelihood), test dobré shody regresního modelu s daty podle Hosmera a Lemeshowa, nebo hodnoty koeficientu R^2 Coxové a Snella či R^2 Nagelkerka. K ověření kvality modelu slouží také **klasifikační tabulka** – ta nabízí přímé srovnání mezi hodnotou predikovanou modelem a skutečnou hodnotou. Vypovídá tak o úspěšnosti predikce a slouží k výpočtu senzitivity a specificity modelu, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty, falešné negativy, atd. Jiným způsobem ověření prediktivní schopnosti modelu je také rozdělení celého souboru na tzv. *trénovací podsoubor*, na jehož základě se vytvoří regresní model a *testovací podsoubor*, který slouží pro prověření kvality modelu na datech se známým výsledkem cílové proměnné. Správnost navrženého logistického modelu lze dále posoudit pomocí tzv. **křivky ROC** (Receiver Operating Characteristic), respektive plochy pod touto křivkou AUC (215; 216).

Pro usnadnění praktického využití modelu v klinické praxi je možné sestavit **nomogramy**. Mohou existovat buď v grafické podobě nebo ve formě počítačové aplikace. Dosazením hodnot konkrétní pacientky do nomogramu lze získat rychlý odhad závisle proměnné, tj.

v našem případě pravděpodobnosti postižení axilárních uzlin pro tuto pacientku a její zhoubné onemocnění prsu.

2.4.2 ZPRACOVÁNÍ DAT

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

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

Všechny tabulky a grafy v oddílu 3 jsou přímým výstupem ze statistického softwaru a proto jsou v zájmu zachování autenticity uvedeny bez jakýchkoliv dalších úprav (např. názvy proměnných a jejich hodnoty jsou uvedeny bez háčeků a čárek).

3 VÝSLEDKY

Na rozdíl od ostatních částí této práce tento oddíl vznikl v úzké spolupráci se statistikem a popisuje postup zpracování datového souboru získaného z lékařské dokumentace jednotlivých pacientek.

Postup přípravy datového souboru k analýze a následné sestavení regresního modelu se všemi nezbytnými náležitostmi jsou velmi složité procesy, které se lékaři neškolenému ve statistice mohou zdát obtížně pochopitelné. Mnohdy tedy dochází k tomu, že lékař specializovaný ve svém oboru pouze převezme údaje dodané statistikem bez toho, že by se jakkoliv snažil porozumět procesu jejich získání. Nevýhodou tohoto přístupu je to, že se mnohdy nepodaří odhalit úskalí diskrepancí mezi statistickým modelem a reálnou klinickou situací, které mohou někdy výrazným způsobem diskreditovat výsledky celé práce. Z toho důvodu jsem se snažil pracovat jiným způsobem a porozumět celému procesu přípravy souboru i tvorby modelu. Musel jsem proto načerpat mnohé základní znalosti ze statistické literatury a dále pak opakovaně konzultovat se statistikem, abych byl schopen čistě statistické postupy správně interpretovat pro klinickou praxi. Svými poznatky jsem se pak snažil doplnit a komentovat původní statistické zpracování tak, aby bylo pochopitelné pro lékaře, který nemá specializované vzdělání v oboru statistiky.

V odborných lékařských zdrojích obvykle není žádný takový komentář přítomen. Domnívám se však, že mnohdy by relativně krátký vysvětlující text pomohl lékařům porozumět statistickým postupům s mohl by tak zvýšit nejen atraktivitu odborných lékařských článků, ale také přispět k tomu, aby byly tyto metody častěji používány pro vědecké účely.

Definice vlastností a modelů

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

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

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

Hlavním cílem celé práce je pak sestavení regresního modelu, který by využíval předoperačních vlastností nádoru a **umožňoval tak predikci axilárního uzlinového postižení již v době před operací – tzv. předoperační prediktivní model**. Při jeho konstrukci jsme použili stejné proměnné jako v pooperačním modelu s výjimkou těch, u nichž

se statisticky významně lišily hodnoty předoperační a pooperační (tedy ty, které nebyly „věrohodně“ stanoveny při předoperačním vyšetření), a také těch které nebyly při předoperačním vyšetření k dispozici.

Pro oba modely byla sestavena křivka ROC (Receiver Operating Characteristic), která umožňovala hodnotit věrohodnost predikce axilárního postižení pomocí logistického modelu (svou plochou pod křivkou – AUC).

3.1 ÚPRAVY DATOVÉHO SOUBORU PŘED ZAHÁJENÍM SESTAVOVÁNÍ REGRESNÍHO MODELU

Cílem statistického zpracování souboru dat je eliminovat nebo alespoň omezit vliv faktorů, které by mohly narušit kvalitu matematického modelu. Model se totiž vždy snaží přiřadit prediktivní hodnotu všem proměnným a jejich hodnotám, které zařadíme do regresní rovnice. Může proto dojít k situaci, kdy v zájmu respektování všech proměnných model přiřadí neadekvátně velký význam i takovým faktorům, kterým tento význam nepřísluší. Tím se může prediktivní hodnota modelu výrazně znehodnotit. Pro zachování významu „validních faktorů“ může proto být výhodnější provést některé **úpravy datového souboru**. Záleží výrazně na zkušenostech a úvaze statistika, jaké úpravy použije, které z proměnných do logistické rovnice zařadí a které naopak nezařadí. Popisu a zdůvodnění těchto úprav se věnuje následující oddíl.

3.1.1.1 Řešení vlivu převahy zastoupení některé skupiny

V hodnoceném souboru mohou být nerovnoměrně zastoupené jednotlivé skupiny. Model je proto nucen odrážet více vlastnosti a charakteristiky té skupiny, která je několikanásobně početnější. Řešením může být redukce zastoupení větší skupiny náhodným výběrem části skupiny.

Příkladem může být odhad rizika nesložení zkoušky u 1000 studentů, z nichž je pouze 10% dívek a ostatní jsou chlapci. Model se bude adaptovat na vlastnosti chlapců, bude mít významně lepší prediktivní hodnotu pro chlapce. Pokud náhodně vybereme ze skupiny chlapců 100 zástupců, máme naději na vytvoření modelu respektujícího také vlastnosti dívek (samozřejmě za cenu vyřazení části údajů z hodnocení).

V našem souboru bylo 498 žen s negativními axilárními uzlinami a 119 žen s metastaticky postiženými uzlinami. Proto bylo ze skupiny žen bez metastáz náhodně vybráno 24%, které byly použity pro veškeré další analýzy.

3.1.1.2 Řešení vlivu málo četných hodnot nezávisle proměnných

Při konstrukci modelu není výhodné, aby byl výskyt některých hodnot použitých nezávisle proměnných ve velmi malých četnostech. Nastávají totiž situace, kdy se některé hodnoty nezávislých proměnných vyskytují jen sporadicky. Minimální doporučená očekávaná četnost výskytu každé hodnoty nezávislé proměnné by měla být podle statistické literatury alespoň pět.

Pro omezení výskytu „málo zastoupených“ hodnot nezávislé proměnné je možné **sloučit** některé hodnoty (vlastnosti podobného biologického významu) a tím **vytvořit skupiny, které mají větší četnost**.

V našem souboru jsme takovým způsobem upravili údaje týkající se umístění nádoru. To bylo ve zdrojovém souboru označováno v souladu s MKN klasifikací nádorů (0 = mamila + areola, 1 = centrální část prsu, 2 = horní vnitřní kvadrant, 3 = dolní vnitřní kvadrant, 4 = horní zevní kvadrant, 5 = dolní zevní kvadrant, 6 = axilární výběžek, 8 = léze přesahující prs, 9 = neurčeno). Z hlediska rizika metastazování do lymfatických uzlin podél arteria mammaria interna jsou nejrizikovější nádory lokalizované do horního vnitřního a dolního vnitřního kvadrantu. Proto byly tyto nádory označeny jako „mediální skupina“, ostatní nádory pak jako

„laterální skupina“. Dalším příkladem je pozitivita HER-2/neu, pro jejíž matematické zpracování byly použity dvě hodnoty: „negativní“ (pro imunohistochemické hodnocení 0 a 1+) a „pozitivní“ (pro imunohistochemické hodnocení 2+ a 3+).

U některých proměnných však není možné snížit počet hodnot, kterých může proměnná nabývat, slučováním do skupin. Vlastnosti některých nádorů mohou být totiž zřetelně odlišné.

Příkladem může být odhad rizika nesplnění olympijského limitu ve skupině 100 atletů, z nichž je 95 bílé pleti a 5 je tmavé pleti. Pokud ve skupině tmavých sportovců dojde pouze k jediné události (tj. nesplnění limitu) a ve skupině bílých sportovců nesplnila limit polovina, není možné v podskupině tmavých adekvátně odhadovat prediktivitu. Aby nedošlo ke znehodnocení modelu pro většinu souboru (bílé sportovce), je výhodnější tmavou skupinu z hodnocení zcela vyřadit.

V našem souboru se podobná situace týkala žen s tzv. „příznivými“ a „ostatními“ histologickými typy nádorů (pro definici a popis viz výše – odd.2.2.7.1.). Tyto podskupiny představovaly pouze 4,4% a 5,8% celého souboru, axilární metastáza byla přítomna pouze u dvou žen první skupiny a čtyř žen druhé skupiny. Nízký počet události (tj. axilárních metastáz) by nutil model k výrazné změně chování, tím by mohlo dojít k jeho znehodnocení pro většinu subjektů s duktálními a lobulárními karcinomy. Proto bylo nutné tyto malé skupiny pacientek z konstrukce modelu **zcela vyřadit**. Podobně jsme také museli z hodnocení zcela vypustit existenci vzdálených metastáz, protože skupina se vzdálenými metastázami byla velmi málo početná (pouze 2 pacientky).

3.1.1.3 Řešení vlivu „odlehých pozorování“

Pokud se ve skupině hodnocených subjektů vyskytne výjimečná hodnota, která je ve zřetelném rozporu s hodnotami u ostatních subjektů, pak se tato neobvyklá hodnota označuje jako „odlehle pozorování“, neboli „outlier“. Zařazení takové mimořádné hodnoty do statistického hodnocení by výrazně ovlivnilo výsledky analýz. Proto je vhodné takovou hodnotu ze souboru **zcela vyřadit**.

Příkladem může být modelová situace, kdy počítáme mzdu u 100 lidí, z nichž 99 má plat v rozmezí 20-30 tisíc Kč, u jednoho je plat 8 milionů Kč. Pokud bychom vypočítali průměr ze všech hodnot, došli bychom k průměrné mzdě kolem 100 tisíc Kč na osobu. Tento odhad by pak byl vzdálen realitě pro každého jednotlivého člověka. Pokud však vyřadíme odlehle pozorování („outlier“), dojdeme k průměrné mzdě kolem 25 tisíc Kč na osobu, což je blízké realitě pro 99 lidí ze sta.

Podobně jsme v našich výpočtech postupovali ve skupině žen s karcinomem in situ (stanoveným jak z biopsie, tak z definitivní histologie). Přítomnost axilární metastázy u jediné ze 106 žen je nutno označit za „odlehle pozorování“, které je vhodné vyřadit z hodnocení. Pro ostatní ženy této skupiny pak v našem souboru platí pravidlo, že u karcinomu in situ se nevyskytují axilární metastázy.

3.2 SESTAVENÍ LOGISTICKÉHO REGRESNÍHO MODELU

3.2.1 PREDIKCE NA ZÁKLADĚ DAT ZÍSKANÝCH PO OPERACI („POOPERAČNÍ MODEL“)

Matematický model predikující zda pacientka bude nebo nebude mít axilární metastázy jsme tvořili pomocí logistické regrese na základě zjištěných hodnot následujících proměnných: histologie, umístění, místo, grade, LVSI, c-erbB2, multifokalita, max.rozmer, ER, PR, KI67, BMI, věk. Detailní popis všech proměnných a jejich hodnot je uveden v tabulce 13 na následující straně.

Tabulka 13

název proměnné	popis proměnné	označení hodnot proměnné	popis hodnot	typ proměnné	PO / def *
y	zda byly nebo nebyly metastázy	metastaze_ANO	metastázy byly přítomny	binomická	
		metastaze_NE	metastázy nebyly přítomny		
histologie	histologický typ nádoru	duktalni	duktální	kategorická	PO / def
		lobularni	lobulární		
umisteni	umístění nádoru vzhledem k jednotlivým kvadrantům	medialni	mediální	kategorická	PO / def
		lateralni	laterální		
místo	místo, kde byla pacientka operována	UVN	Ústřední vojenská nemocnice	kategorická	
		FNB	Fakultní nemocnice Bulovka		
		UPMD	Ústav pro péči o matku a dítě		
grade	histopatologický grading	1	grade 1	kategorická	PO / def
		2	grade 2		
		3	grade 3		
LVSI	invaze nádorových buněk do lymfatického/cévního systému	LVSI_poz	lymfovaskulární invaze přítomna	kategorická	def
		LVSI_neg	lymfovaskulární invaze nezjištěna		
c-erbB2	přítomnost receptorů HER-2/neu	neg_01	imunohistochemické skóre 0 nebo 1+	kategorická	PO / def
		poz_23	imunohistochemické skóre 2+ nebo 3+		
multifokalita	multifokalita nádoru	jedno_lozisko	nalezeno jediné nádorové ložisko	kategorická	PO / def
		vice_lozisek	nalezeno dvě a více ložisek		
ER	podíl buněk exprimujících estrogen. receptory		může nabývat hodnot 0-100%	spojitá	PO / def
PR	podíl buněk exprimujících progesteron. receptory		může nabývat hodnot 0-100%	spojitá	PO / def
KI67	proliferační aktivita vyjádřena indexem Ki67		může nabývat hodnot 0-100%	spojitá	PO / def
max.rozmer	velikost nádoru, tj. jeho nejdelší rozměr			spojitá	PO / def
BMI	body mass index			spojitá	
vek	věk pacientky v době diagnózy			spojitá	

* PO = hodnoty proměnných získaných před operací, def = hodnoty získané po operaci (definitivní)

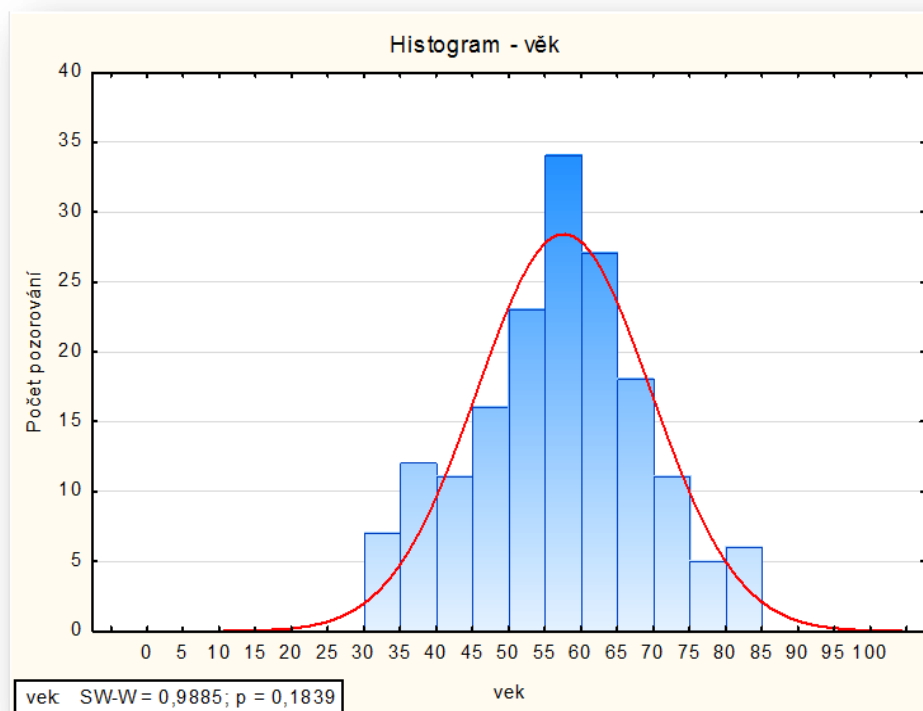
Popisná statistika pro dané proměnné, které jsou kategorické (tj. nabývají určitých předem definovaných hodnot) je uvedena v tabulce 14.

Tabulka 14

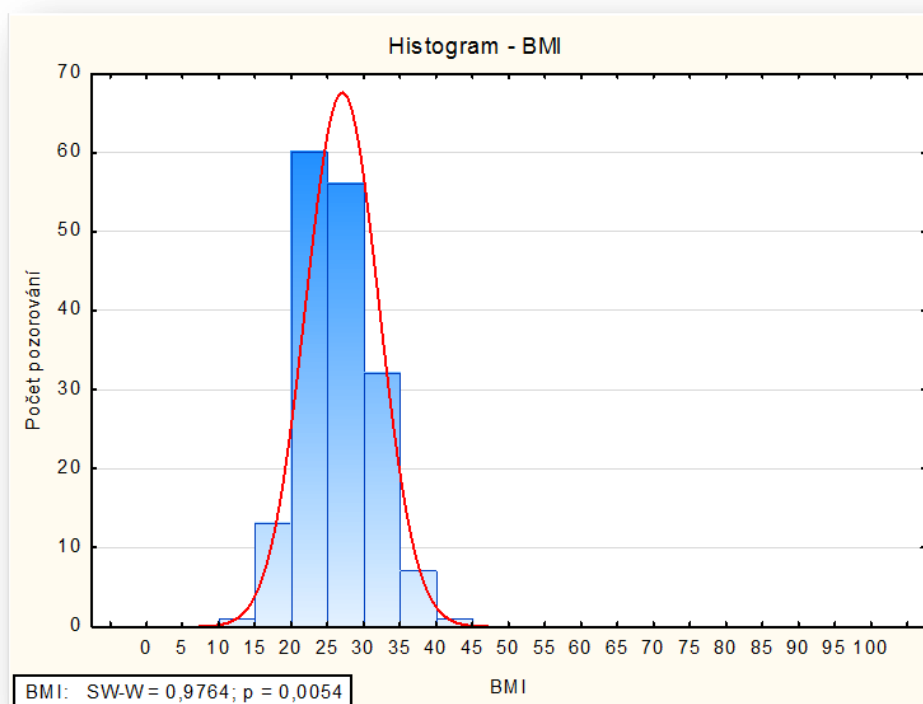
proměnná	hodnota	N	metastázy ANO	metastázy NE	metastázy ANO (26)	metastázy NE (26)
umístění	medialní	62	28	34	45%	55%
umístění	lateralní	108	52	56	48%	52%
histologie	duktální	154	71	83	46%	54%
histologie	lobulární	16	9	7	56%	44%
místo	FNB	63	32	31	51%	49%
místo	UPMD	47	18	29	38%	62%
místo	UVN	60	30	30	50%	50%
grade	1	47	18	29	38%	62%
grade	2	82	43	39	52%	48%
grade	3	41	19	22	46%	54%
LVSI	LVSI_neg	120	47	73	39%	61%
LVSI	LVSI_poz	50	33	17	66%	34%
c_erbB2	neg_01	133	64	69	48%	52%
c_erbB2	poz_23	37	16	21	43%	57%
multifokalita	jedno_lozisko	147	67	80	46%	54%
multifokalita	vice_lozisek	23	13	10	57%	43%
celkem		170	80	90	47%	53%

Rozložení hodnot spojitéch proměnných znázorňují histogramy na obr.6 – obr.11. Zde je uvedena i statistika Shapiro-Wilkova testu normality. S výjimkou věku je p-hodnota u všech proměnných < 0,05, proto zamítáme normální rozdělení dat u těchto proměnných.

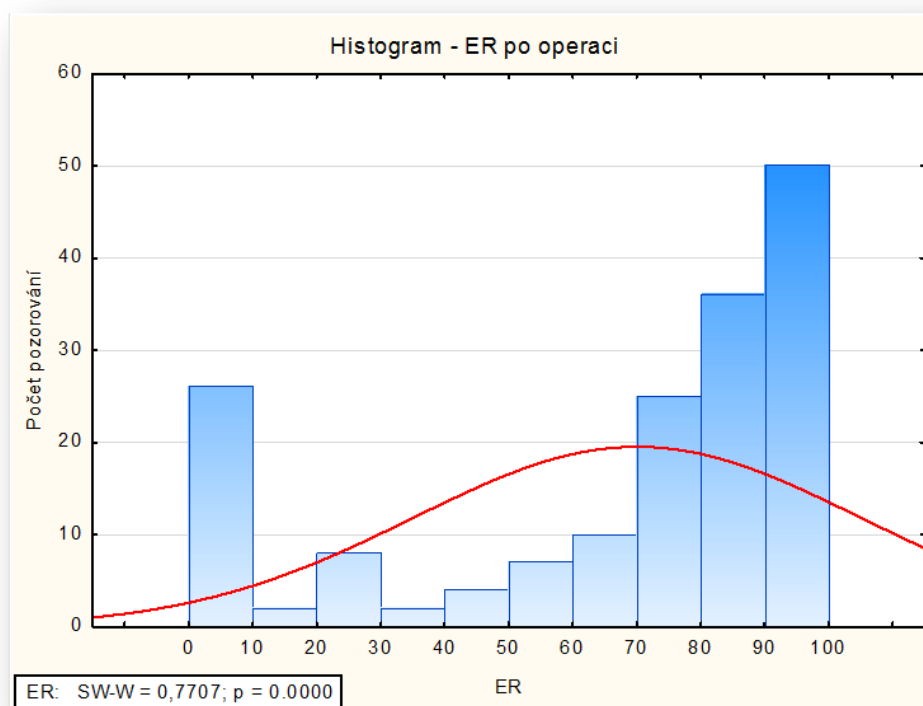
Obr.6



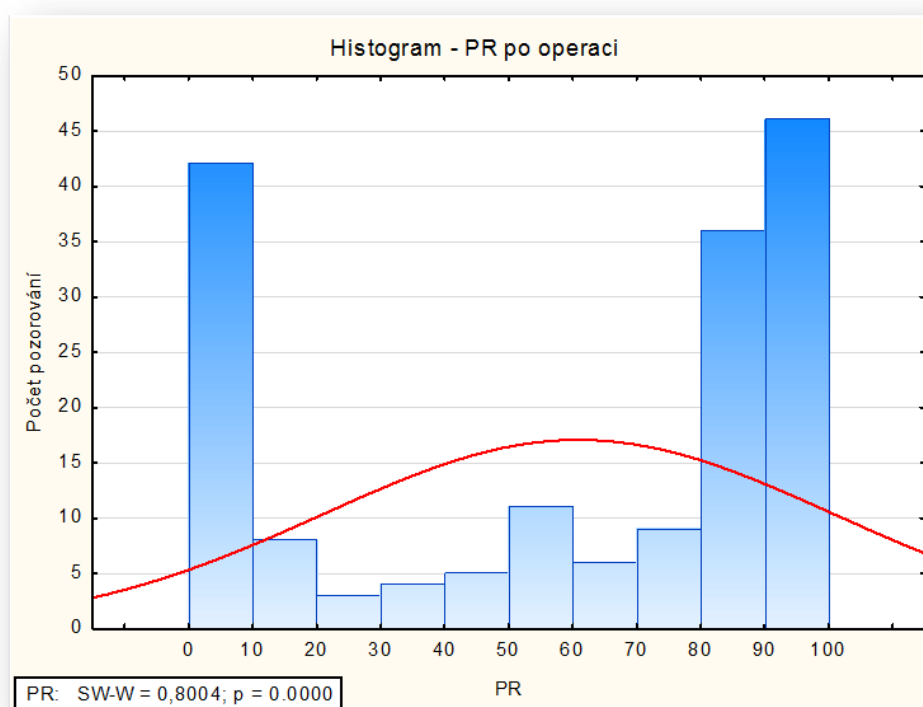
Obr.7



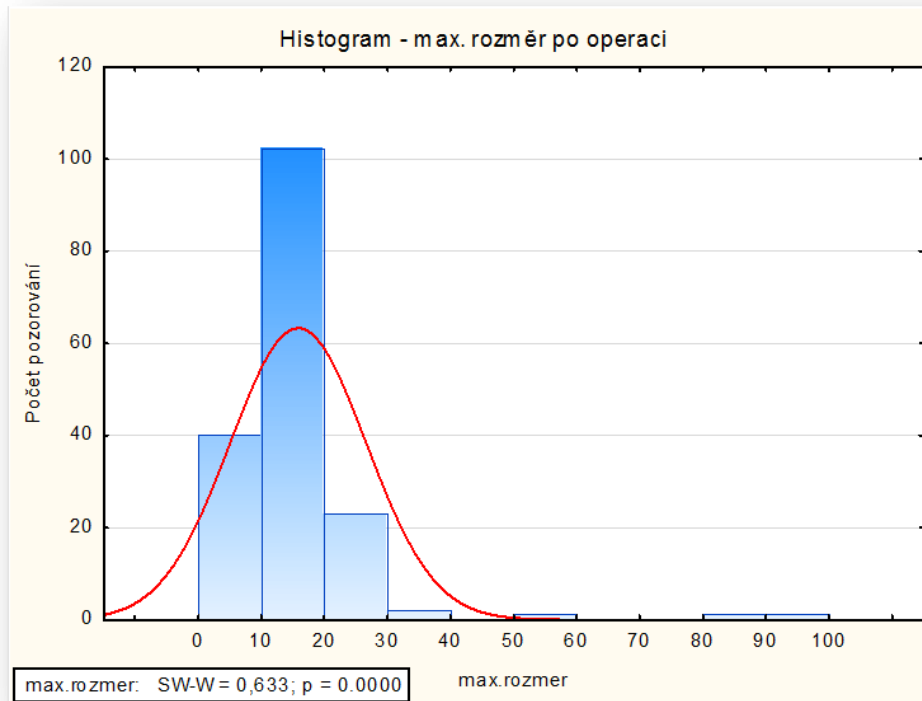
Obr.8



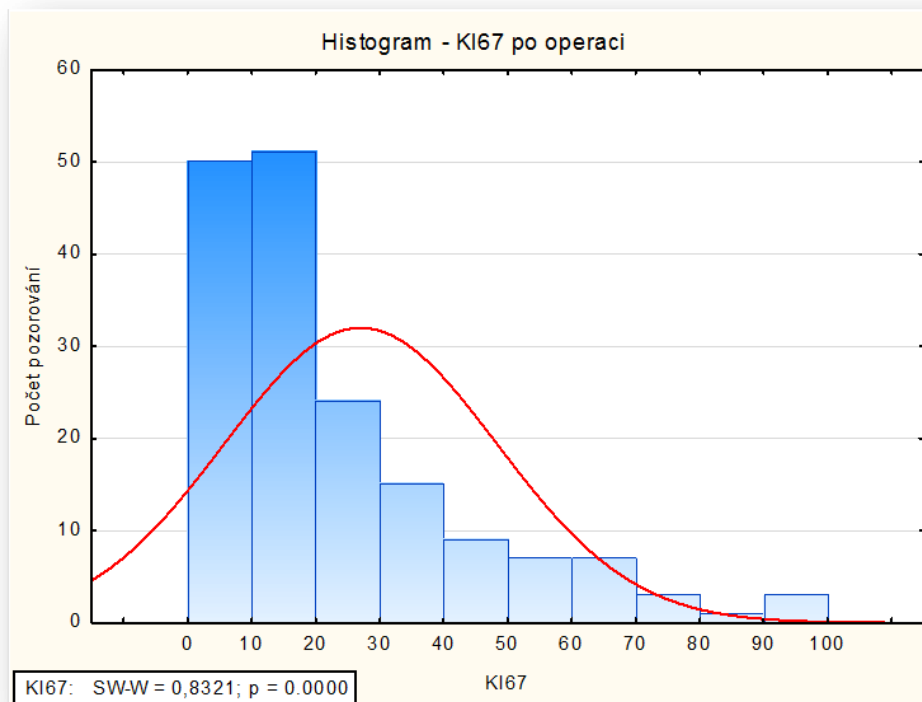
Obr.9



Obr.10



Obr.11



Pravděpodobnost byla modelována pro hodnotu závisle proměnné $y = \text{metastazy_ANO}$ (tedy že pacientka bude mít metastázy). Abychom zjistili, zda **data použitá pro logistickou regresi jsou v dobré shodě s regresním modelem**, použili jsme *testu dobré shody podle Hosmera a Lemeshowa*. Soubor je pro účely tohoto testu rozdělen podle určitého kritéria do deseti přibližně stejně velkých skupin a v každé z těchto skupin se zjišťuje skutečný a očekávaný počet případů, u kterých sledovaný jev (metastazy_ANO) nastal či nenastal. Jelikož se v souboru nevyskytují očekávané četnosti menší než 1 a většina z nich je větších než 5 (jak ukazuje tabulka 15), je v našem případě tento test použitelný.

Tabulka 15

	skup.1	skup.2	skup.3	skup.4	skup.5	skup.6	skup.7	skup.8	skup.9	skup.10	row tot
0: pozorov	16,0	13,0	15,0	9,0	7,0	11,0	7,0	6,0	4,0	2,0	90
očekáv	15,0	13,3	12,3	11,4	10,3	9,3	7,7	5,8	3,7	1,1	
1: pozorov	1,0	4,0	2,0	8,0	10,0	6,0	10,0	11,0	13,0	15,0	80
očekáv	2,0	3,7	4,7	5,6	6,7	7,7	9,3	11,2	13,3	15,9	
Vš. skup.	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	170

Výsledná hodnota testu Hosmer Lemeshow je 8.5855, **p-hodnota = 0,3784** > 0,05. Nezamítáme tedy nulovou hypotézu, která postuluje, že mezi pozorovanými a modelem predikovanými hodnotami není žádný rozdíl. Model lze proto považovat za přijatelný.

Dalším krokem jsou **odhady parametrů modelu**. Přehled odhadů parametrů pro jednotlivé proměnné je znázorněn v tabulce 16. Pro nalezený logistický regresní model jsou statisticky významné ty proměnné, které mají na základě Waldovy statistiky p-hodnotu < 0,05 (v tabulce 16 jsou zvýrazněny šedým podkladem a tučně). Jedná se o LVSI ($p = 0,04$), max.rozměr ($p = 0,00$) a PR ($p = 0,02$).

Tabulka 16

proměnná	kategorie	odhad	standard error	Waldova stat.	p
absolutní člen		-1,81986	1,436543	1,60487	0,205215
umístění	medialni	-0,20511	0,195683	1,09867	0,294559
histologie	duktalni	-0,11827	0,335648	0,12417	0,724560
místo	FNB	0,35692	0,254235	1,97095	0,160347
místo	UPMD	-0,39320	0,280689	1,96239	0,161258
grade	1	-0,33282	0,346349	0,92340	0,336585
grade	2	0,18409	0,251707	0,53487	0,464565
LVSI	LVSI_neg	-0,43953	0,218530	4,04538	0,044292
c_erbB2	neg_01	0,25554	0,242360	1,11173	0,291706
multifokalita	jedno_lozisko	-0,13512	0,295942	0,20845	0,647983
max.rozmer		0,15023	0,036776	16,68701	0,000044
ER		-0,00999	0,006698	2,22507	0,135787
PR		0,01308	0,005603	5,45455	0,019517
KI67		-0,00860	0,010954	0,61647	0,432361
BMI		-0,01183	0,039089	0,09155	0,762218
vek		0,00094	0,017132	0,00303	0,956108

Tabulka 17 ukazuje, která hodnota kategorické proměnné byla ve vytvořeném modelu brána jako referenční kategorie, ke které se vztahují ostatní kategorie dané proměnné.

Tabulka 17

proměnná	referenční kategorie
umístění	lateralní
histologie	lobulární
místo	UVN
grade	3
LVSI	LVSI_poz
c_erbB2	poz_23
multifokalita	vice_lozisek

Pooperační logistický regresní model (*model A*) má tedy tvar:

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

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

Pokud bychom proměnné s parametry u nichž se hypotéza jejich nulovosti nezamítla z modelu vynechali a pro zkonstruování modelu použili pouze statisticky významné proměnné ("LVSI", "max.rozmer" a "PR"), pak by odhadů parametrů pro jednotlivé proměnné byly odlišné (viz tabulku 18).

Tabulka 18

proměnná	kategorie	odhad	standard error	Waldova stat.	p
absolutní člen		-2,56737	0,618728	17,21776	0,000033
max.rozmer		0,14388	0,034624	17,26891	0,000032
PR		0,00854	0,004538	3,54275	0,059806
LVSI	LVSI_neg	-0,47784	0,194981	6,00595	0,014258

Logistický model (*model B*) by pak měl následující podobu (referenční kategorie zůstaly stejné jako v tabulce 17):

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

Výsledná hodnota Hosmer Lemeshow testové statistiky je pro tento model 3.3857, **p-hodnota = 0.9078** > 0,05. Ani v případě tohoto modelu se hypotéza nulového rozdílu mezi reálnými a predikovanými hodnotami závisle proměnné nezamítá a model je tedy přijatelný.

Porovnání predikčních schopností obou modelů ukazuje tabulka 19 (pro model A) a tabulka 20 (pro model B).

Tabulka 19

model A	předpovězená metastazy_ANO	předpovězená metastazy_NE
metastazy_ANO	49	31
metastazy_NE	18	72
Senzitivita	61%	
Falešná pozitivita	20%	
Specifická	80%	
Falešná negativita	39%	
Pozitivní prediktivní hodnota	73%	
Negativní prediktivní hodnota	70%	

Tabulka 20

model B	předpovězená metastazy_ANO	předpovězená metastazy_NE
metastazy_ANO	44	36
metastazy_NE	19	71
Senzitivita	55%	
Falešná pozitivita	21%	
Specifická	79%	
Falešná negativita	45%	
Pozitivní prediktivní hodnota	70%	
Negativní prediktivní hodnota	66%	

Ze srovnání tabulek 19 a 20 je patrné, že rozdíl mezi oběma modely je především v senzitivitě a falešné negativitě – v obou případech vykazuje **model A lepší prediktivní vlastnosti**.

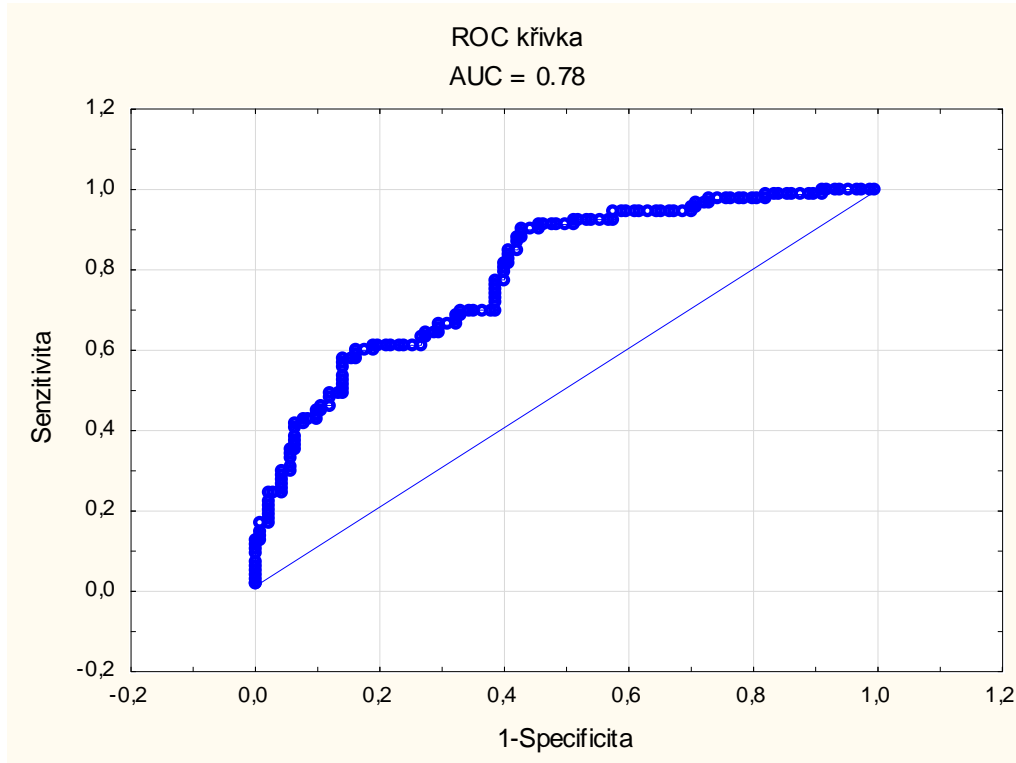
Jinou často používanou metodou hodnocení správnosti navrženého logistického modelu je **plocha pod křivkou ROC (Receiver Operating Characteristic Curve)**, neboli tzv. AUC (215). Kvalita predikce modelu je udána numerickou hodnotou plochy pod křivkou (120) – popis hodnocení predikce ukazuje tabulka 21.

Tabulka 21

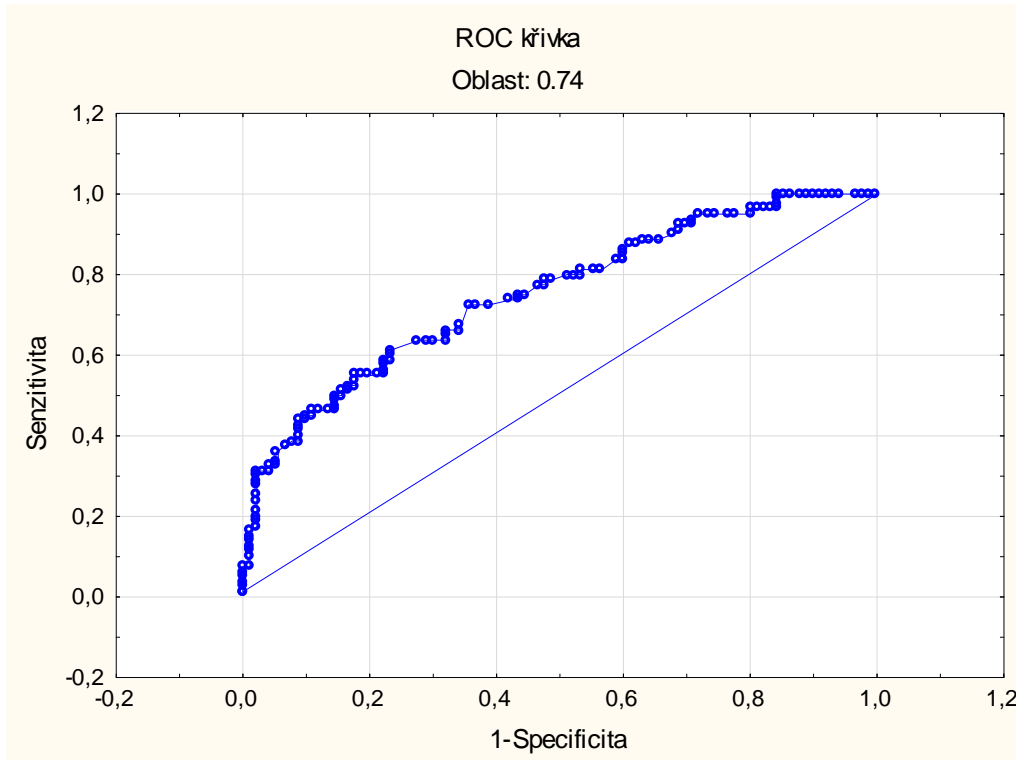
AUC hodnota	hodnocení predikční schopnosti modelu
0,9 – 1,0	výborná
0,8 – 0,9	velmi dobrá
0,7 – 0,8	dobrá
0,6 – 0,7	dostatečná
0,5 – 0,6	nedostatečná

Hodnota AUC pro model A je znázorněna na obr.12 a hodnota AUC pro model B na obr.13. Z obrázků je patrné, že **predikční schopnost modelu A je dobrá (AUC = 0,78)** a že je lepší než predikční schopnost modelu B (AUC = 0,74), která je však také hodnocena jako dobrá (viz tabulku 21).

Obr.12



Obr.13



Ze všech uvedených výsledků lze vyvodit závěr, že pokud bychom měli k dispozici uvedená data již před operací, dali bychom **pro odhad rizika postižení axilárních uzlin přednost modelu A**. Předikční schopnost tohoto modelu hodnocená na základě křivky ROC (AUC = 0,78) však napovídá, že takový model by byl **pro praxi použitelný pouze s výhradami**.

3.2.2 TVORBA „PŘEDOPERAČNÍHO MODELU“

3.2.2.1 Rozdílnost dat získaných před operací a po operaci

Následující tabulky 22-26 poskytují informace, u kolika pacientek byly hodnoty jednotlivých kategorických proměnných zjištěných před a po operaci shodné a u kolika se naopak pooperační hodnoty s hodnotami předoperačními neshodovaly.

Tabulka 22

UMÍSTĚNÍ	po operaci		celkem
	mediální	laterální	
před operací			
mediální	61	1	62
laterální	1	107	108
celkem	62	108	170

Tabulka 23

HISTOLOGIE	po operaci		celkem
	duktální	lobulární	
před operací			
duktální	149	3	152
lobulární	1	13	14
celkem	150	16	166

Tabulka 24

GRADING	po operaci			celkem
	1	2	3	
před operací				
1	45	15	2	62
2	2	60	16	78
3	0	7	23	30
celkem	47	82	41	170

Tabulka 25

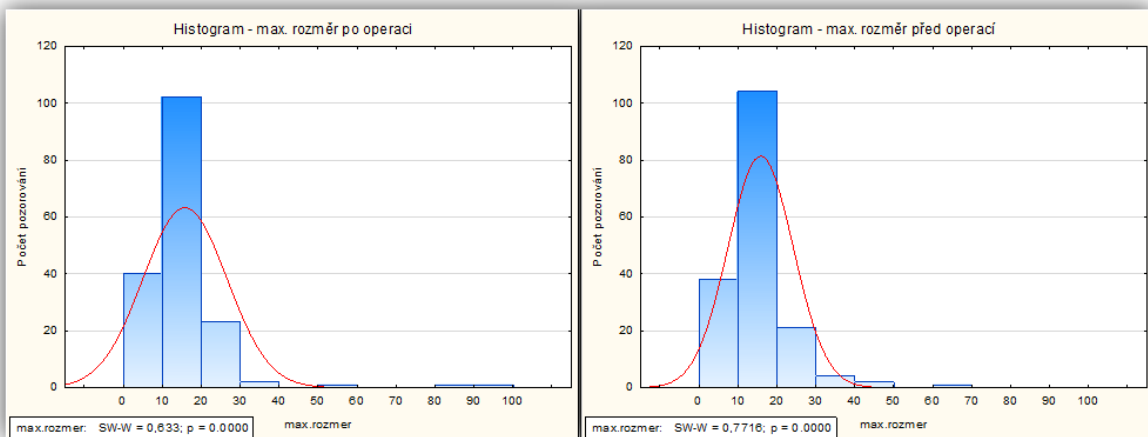
c-erbB2	po operaci		celkem
	neg_01	poz_23	
před operací			
neg_01	128	4	132
poz_23	5	33	38
celkem	133	37	170

Tabulka 26

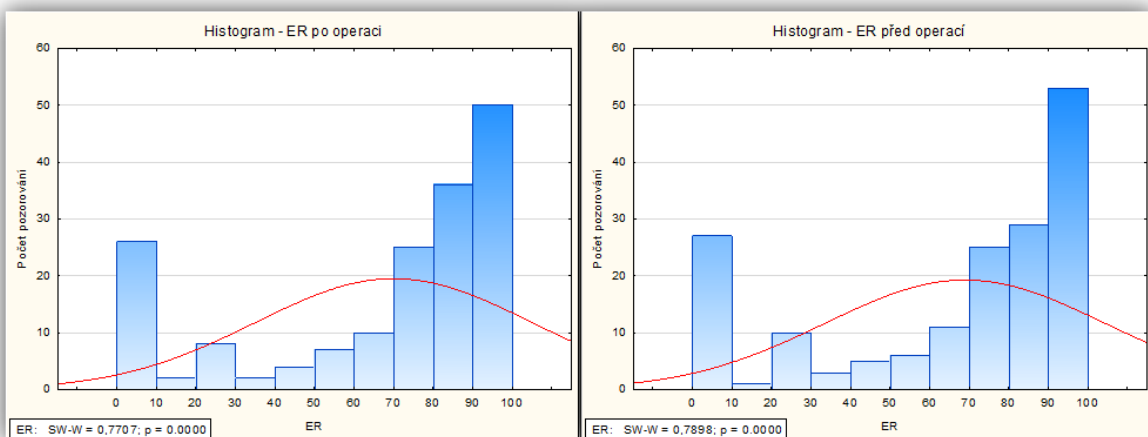
MULTIFOKALITA	po operaci		celkem
	jedno ložisko	více ložisek	
před operací			
jedno ložisko	138	10	148
více ložisek	9	13	22
celkem	147	23	170

Pro znázornění hodnot spojitych proměnných zjištěných před a po operaci jsou použity histogramy na obr. 14-17.

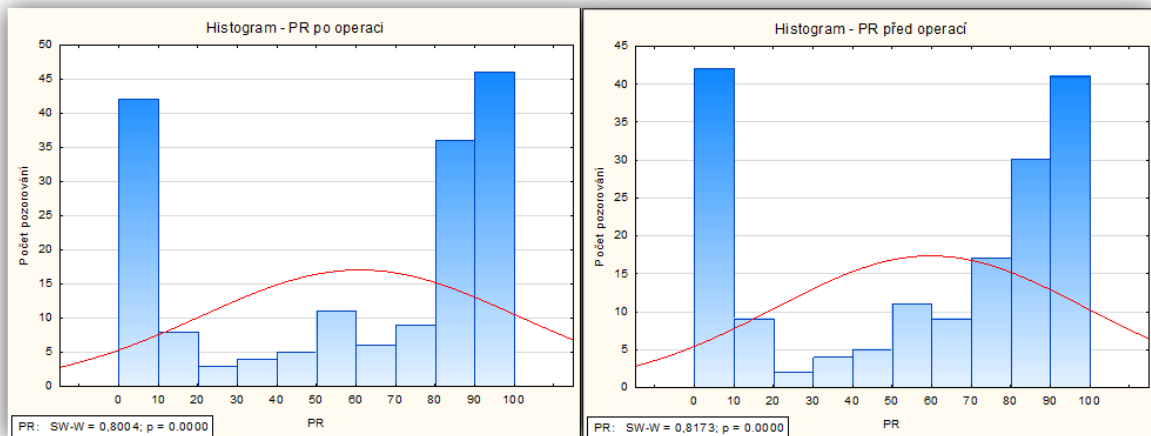
Obr.14



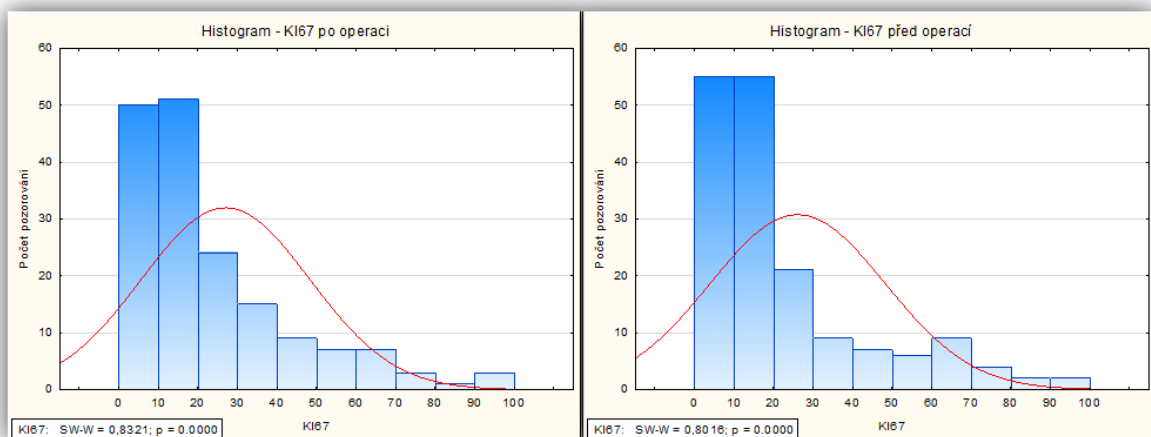
Obr.15



Obr.16



Obr.17



Pomocí statistických testů (McNemarův popř. Bowkerův test u kategoričkových proměnných, Wilcoxonův párový test popř. párový t-test u spojitých proměnných) bylo testováno, zda se hodnoty proměnných zjištěných před a po operaci významně liší či ne. Ze všech testovaných proměnných byl **statisticky signifikantní rozdíl pouze u gradingu** (kritická hodnota u Bowkerova testu = 15,46 > 7,82 kritická hodnota chí-kvadrátu o 3 stupních volnosti).

3.2.2.2 Korekce „pooperačního modelu“ na základě rozdílnosti dat získaných před operací a po operaci

U proměnné „grade“ byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami před operací a po operaci – proto musela být tato proměnná z modelu vyřazena. Proměnná „LVSI“ označující lymfovaskulární invazi musela být také vynechána, protože její hodnotu nebylo možné korektně zjistit před operací (viz také výše).

Logistický regresní model predikující zda pacientka bude či nebude mít metastázy (hodnota závisle proměnné $Y = \text{metastázy_ANO}$) musel proto být vytvořen na základě zjištěných hodnot pouze pro následující proměnné: umístění, histologie, místo, c-erbB2, multifokalita, max.rozmer, ER, PR, KI67, BMI, věk.

Také v tomto případě lze použít test dobré shody podle Hosmera a Lemeshowa k hodnocení toho, jak kvalitně získaný model prokládá data (tj. zda jsou data použítá pro

logistickou regresi jsou v dobré shodě s regresním modelem) – viz tabulku 27. Výsledná hodnota testu je rovna 9.4084, **p-hodnota = 0,3090** > 0,05. Nalezený model je tedy přijatelný, hypotézu nulového rozdílu mezi reálnými a modelem predikovanými hodnotami nezamítáme.

Tabulka 27

	skup.1	skup.2	skup.3	skup.4	skup.5	skup.6	skup.7	skup.8	skup.9	skup.10	row tot
0: pozorov	16,0	13,0	13,0	10,0	10,0	7,0	8,0	7,0	2,0	4,0	90
očekáv	14,8	12,9	11,9	11,1	10,3	9,1	7,7	6,5	4,4	1,4	
1: pozorov	1,0	4,0	4,0	7,0	7,0	10,0	9,0	10,0	15,0	13,0	80
očekává	2,2	4,1	5,1	5,9	6,7	7,9	9,3	10,5	12,6	15,6	
Vš. skup.	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	170

Odhady parametrů nalezeného modelu jsou uvedeny v tabulce 28 spolu s Waldovou statistikou a její p-hodnotou pro každý parametr. Statisticky významné proměnné jsou v tabulce zvýrazněny šedým podkladem a tučně – v tomto případě se tedy jedná pouze o max.rozmer (p = 0,00) a PR (p = 0,04).

Tabulka 28

proměnná	kategorie	odhad	standard error	Waldova stat.	p
absolutní člen		-2,23947	1,497148	2,23748	0,134700
umístění	medialni	-0,23233	0,189534	1,50253	0,220282
histologie	duktalni	0,06036	0,649621	0,00863	0,925971
místo	FNB	0,28742	0,247394	1,34979	0,245315
místo	UPMD	-0,42906	0,269019	2,54370	0,110735
c_erbB2	neg_01	0,20170	0,230646	0,76479	0,381835
multifokalita	jedno_lozisko	-0,26786	0,281334	0,90653	0,341036
max.rozmer		0,15942	0,035626	20,02420	0,000008
ER		-0,00975	0,006496	2,25259	0,133391
PR		0,01105	0,005280	4,37671	0,036433
KI67		-0,00223	0,008995	0,06146	0,804204
BMI		-0,01860	0,038295	0,23599	0,627120
vek		0,00457	0,016077	0,08078	0,776238

Tabulka 29 ukazuje, která hodnota kategorické proměnné byla ve vytvořeném modelu brána jako referenční kategorie, ke které se vztahují ostatní kategorie dané proměnné.

Tabulka 29

proměnná	referenční kategorie
umístění	lateralni
histologie	lobularni
místo	UVN
c_erbB2	poz_23
multifokalita	vice_lozisek

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

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

Statisticky významné proměnné se svými parametry jsou zvýrazněny tučně. U ostatních parametrů se hypotéza jejich nulovosti nezamítá (tj. jejich p-hodnota > 0,05).

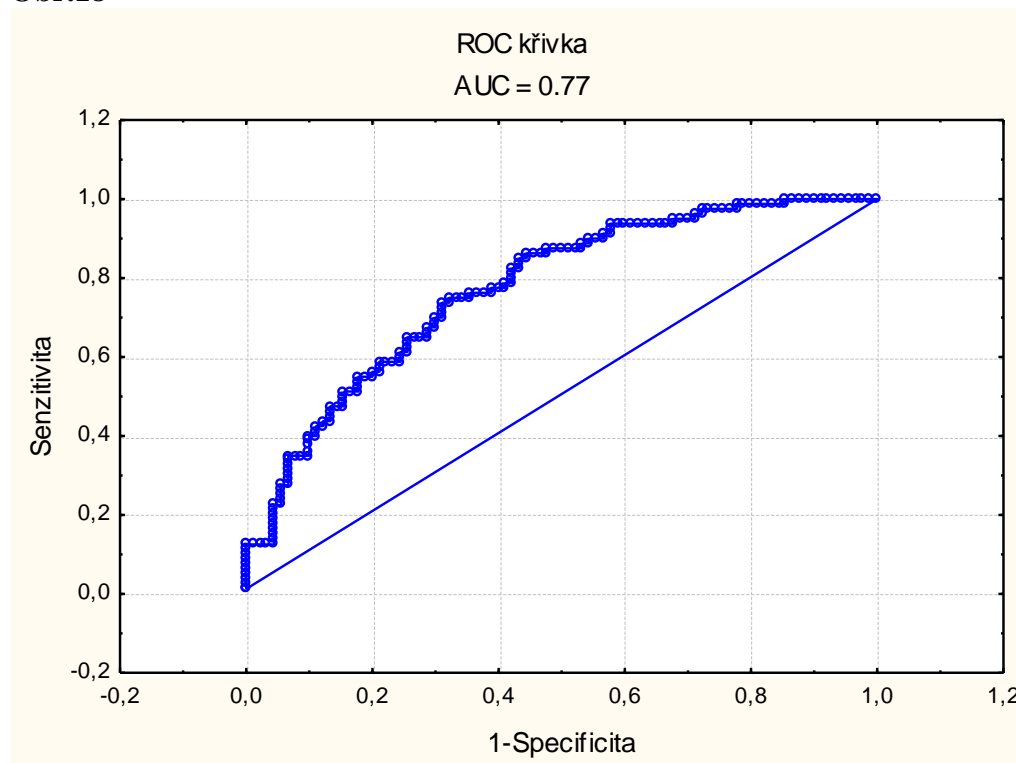
Predikčních schopností modelu C ukazuje tabulka 30.

Tabulka 30

model C	předpovězená metastazy_ANO	předpovězená metastazy_NE
metastazy_ANO	47	33
metastazy_NE	19	71
Senzitivita	59%	
Falešná pozitivita	21%	
Specifita	79%	
Falešná negativita	41%	
Pozitivní prediktivní hodnota	71%	
Negativní prediktivní hodnota	68%	

Křivku ROC pro model C znázorňuje obr.18. Z hodnoty AUC = 0,77 lze vyvozovat, že predikční schopnost modelu C je dobrá.

Obr.18



3.2.2.3 Aplikace „předoperačního modelu“ (modelu C) na data získaná před operací

K hodnocení kvality prokládání dat tímto modelem se také v tomto případě použije test dobré shody podle Hosmera a Lemeshowa – viz tabulku 31. Výsledná hodnota tohoto testu je rovna 22.868, **p-hodnota = 0,0035** < 0,05. Nalezený model C proto **není přijatelný pro data získaná před operací**, protože hypotézu nulového rozdílu mezi reálnými a modelem predikovanými hodnotami zamítáme.

Tabulka 31

	skup.1	skup.2	skup.3	skup.4	skup.5	skup.6	skup.7	skup.8	skup.9	skup.10	row tot
0: pozorov	14,0	11,0	11,0	10,0	12,0	5,0	7,0	7,0	7,0	6,0	90
očekáv	14,0	12,8	11,8	11,0	9,9	8,9	7,7	6,4	4,7	1,5	
1: pozorov	3,0	6,0	6,0	7,0	5,0	12,0	10,0	10,0	10,0	11,0	80
očekáv	3,0	4,2	5,2	6,0	7,1	8,1	9,3	10,6	12,3	15,5	
Vš. skup.	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	170

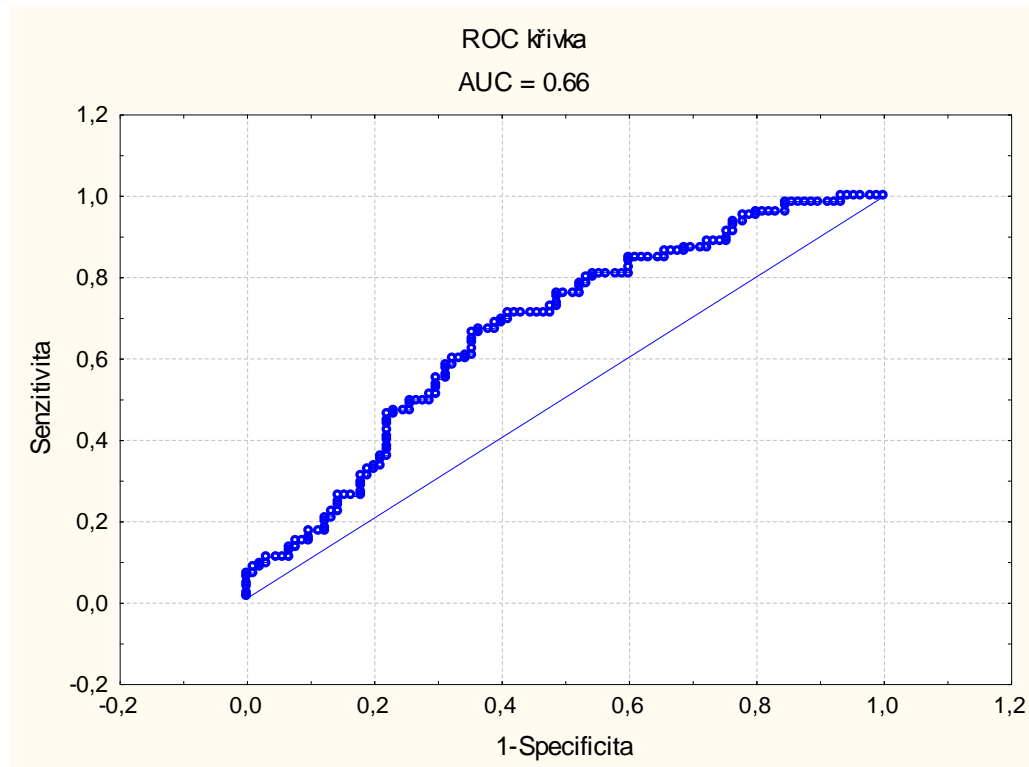
Predikční schopnost modelu C pro data získaná před operací ukazuje tabulka 32. Je patrné, že v tomto případě je senzitivita modelu C pouze 53%, tedy velmi nízká.

Tabulka 32

model C	předpovězená metastazy_ANO	předpovězená metastazy_NE
metastazy_ANO	42	38
metastazy_NE	27	63
Senzitivita	53%	
Falešná pozitivita	30%	
Specificita	70%	
Falešná negativita	48%	
Pozitivní prediktivní hodnota	61%	
Negativní prediktivní hodnota	62%	

Křivku ROC pro model C užívající data získaná před operací znázorňuje obr.19. Podle hodnoty AUC = 0,66 je **predikční schopnost hodnocena jako dostatečná**.

Obr.19



Údaje získané před operací a po operaci nevykazují statisticky významný rozdíl. Nicméně model, který je vytvořen na základě dat získaných po operaci **nelze aplikovat na data získaná před operací**. V tomto případě **není predikční schopnost modelu dobrá** (je hodnocena jako dostatečná) a navíc **senzitivita modelu je velmi malá** – pouze 53%.

4 DISKUZE

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

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

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

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

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

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

4.1 MATEMATICKÝ MODEL A JEHO VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

4.1.1 MATEMATICKÉ MODELOVÁNÍ PRO AXILÁRNÍ LYMFATICKÉ POSTIŽENÍ U KARCINOMU PRSU

Stav axilárních lymfatických uzlin u pacientek s karcinome prsu byl v multivariačních analýzách opakovaně definován jako jeden z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů pro přežívání bez známek onemocnění (DFS) i pro celkové přežívání (OS) (4;5). Otázka, zda je možné předpovědět stav mízních uzlin bez toho, že by musela být provedena jejich exstirpace, je poměrně stará. Důvodem stanovení takové otázky je snaha o omezení radikality chirurgických zákroků v podpažní jamce. Téměř až do konce 20. století byla jediným lege artis akceptovaným výkonem v axilární chirurgii kompletní disekce v rozsahu I. a II. axilární etáže. Tento zákrok byl zatížen nezanedbatelným množstvím komplikací jak pooperačních, tak zejména pozdních. Navíc bylo již tehdy známo, že velká část žen nebude mít metastaticky postiženu žádnou axilární uzlinu a že tedy veškerá operační rizika nebudou vyvážena žádným terapeutickým přínosem. Objevila se proto zcela legitimní snaha rozlišit od sebe skupinu žen s přítomností uzlinových metastáz od skupiny s intaktními uzlinami.

Zobrazovací metody (včetně ultrazvuku, CT a MRI) neměly dostatečnou senzitivitu pro zachycení nízkoobjemového metastatického postižení uzlin. Jedinou schůdnou nechirurgickou cestou stanovení rizika přítomnosti axilárních metastáz se tedy jevil odhad na základě vlastností primárního tumoru. Cílem bylo nalézt skupinu žen s tak nízkým rizikem lymfatického postižení, které by dovolilo neprovádět axilární disekci.

Stěžejní práce na toto téma byla publikována již na počátku devadesátých let minulého století, a to na základě retrospektivní analýzy údajů téměř 12.000 pacientek z databáze **National Breast Cancer Tissue Resorce** (217). Podmínkou zařazení byl primární nádor o velikosti maximálně 5cm a nejméně 15 histologicky vyšetřených axilárních uzlin. Pro sestavení modelu byla použita „stepwise“ multivariační regresní analýza. Pro odhad přítomnosti alespoň jedné postižené axilární uzliny byly statisticky významnými vlastnostmi velikost primárního tumoru, podíl S-fáze (SPF), věk pacientky a zastoupení progesteronových receptorů. Autoři konstatují, že ačkoliv bylo v *testovacím souboru* dosaženo dobré shody mezi skutečnými hodnotami a hodnotami předpovězenými modelem, nepodařilo se predikovat, zda má konkrétní pacient >95% pravděpodobnost pozitivních nebo negativních uzlin. Uzavírají proto, že model nemůže nahradit prognostickou informaci získanou disekcí uzlin a jejich histopatologickým vyšetřením.

Ověření spolehlivosti sentinelové biopsie a její zavedení do klinické praxe vedlo k výraznému omezení radikality axilární chirurgie. Bylo prokázáno, že ženám s negativními sentinelovými uzlinami je bezpečné neprovádět kompletní axilární disekci (138). Dokončení axilární disekce se proto doporučovalo pouze pacientkám s jednou nebo více postiženými sentinelovými uzlinami. Poměrně brzy se však ukázalo, že i tento postup je často nepřiměřeně radikální. Pouze u 35-50% žen s postiženými sentinelovými uzlinami bylo totiž prokázáno postižení alespoň jedné další (nesentinelové) uzliny (167–171). U většiny žen s pozitivní sentinelovou uzlinou je tedy doplnění axilární disekce možno považovat za nepatřičný „overtreatment“. Snaha o další omezení radikality chirurgických výkonů v axile se proto začalo ubírat tímto směrem a to otevřelo další prostor pro uplatnění prediktivních modelů. Tyto modely se snažily predikovat pravděpodobnost postižení nesentinelových uzlin tehdy, je-li histologicky verifikována přítomnost metastáz v jedné nebo více sentinelových uzlinách. Cílem je opět nalézt skupinu žen, u nichž je riziko postižení nesentinelových uzlin tak nízké, že umožní neprovádět dodatečnou axilární disekci bez toho, že by byla negativně ovlivněna prognóza těchto pacientek. Tyto práce jsou důležité zejména z hlediska metodiky, která odpovídá moderním požadavkům na statistické zpracování údajů onkologických pacientek.

Dosud nejvíce citovaný a pro predikci postižení nesentinelových uzlin nejvíce používaný je model z **Memorial Sloan-Kettering Cancer Center** publikovaný v roce 2003 (179). Je založen na prospektivně získaných datech 1075 pacientek s invazivním karcinomem, z nichž přibližně 2/3 tvořily *trénovací* podsoubor a 1/3 *testovací* podsoubor. Statisticky významné vlastnosti se týkaly získaných sentinelových uzlin (počet postižených SLN, počet negativních SLN, metoda detekce uzlinové metastázy – přibližně odrážející velikost metastázy) a také primárního nádoru (velikost nádoru v definitivní histologii a lymfovaskulární invaze). Do modelu však byly zahrnuty i další vlastnosti – multifokalita (hraničně statisticky významná), nukleární grading, typ tumoru a stav estrogenových receptorů (tyto vlastnosti byly statisticky nevýznamné). Schopnost modelu predikovat axilární metastázy vyjádřená plochou pod křivkou ROC = 0,76 hodnotí autoři jako „imperfect“. Na základě výsledků analýzy byl zpracován také praktický nomogram, který usnadňuje predikci axilárních metastáz u konkrétních pacientek, i když autoři zdůrazňují, že výsledky predikce nemohou být žádným přímým terapeutickým doporučením (179). Další práce však uvádějí se, že odhad provedený pomocí tohoto modelu napomáhá „lépe než mínění expertů“ při rozhodování o možnostech snižování frekvence provádění axilární disekce (178). Přehled vlastností tohoto a několika dalších modelů uvádí tabulka 33 (177–179; 217; 218).

Tabulka 33

autor, místo, publik., cit.	počet pac.	statistická metoda	statisticky významné vlastnosti	hodnocení úspěšnosti
^{a)} Ravdin NBCTR 1994 (217)	11.964 retrosp.	stepwise MLR (s nebo bez interakcí 1. řádu)	velikost primárního tumoru podíl S-fáze (SPF) věk pacientky zastoupení progesteronových receptorů	nepodařilo se predikovat, zda má konkrétní pacient >95% pravděpodobnost pozitivních nebo negativních uzlin – „nemůže nahradit informaci získanou disekcí uzlin“
^{b)} van Zee MSKCC 2003 (179)	1.075 prosp.	MLR ROC nomogram	definitivní velikost nádoru LVSI počet postižených SLN počet negativních SLN metoda detekce uzlinové metastázy	ROC = 0,76 model je „imperfect“, jeho výsledek nemůže být přímých terapeutickým doporučením
^{b)} Kohrt Stanford 2008 (178)	285 prosp.	MLR recursive partitioning ROC Classification and Regression Trees	definitivní velikost nádoru LVSI zastoupení ER velikost uzlinové metastázy	MLR poskytuje nejlepší prediktivní výsledky; ROC = 0,85 při užití velikosti, LVSI a stavu ER ROC = 0,83 při užití velikosti a LVSI (model MSKCC na stejném souboru ROC = 0,77)
^{b)} Coufal MOÚ Brno 2009 (177)	330 retrosp.	univariační odhad prediktivní schopnosti proměnných; MLR (stepwise – backward) ROC	definitivní velikost nádoru velikost uzlinové metastázy extranodální šíření podíl pozit. SLU ze všech získaných	ROC = 0,76 (kontrolní soubor jiné nemocnice: ROC = 0,74)
^{c)} Jeruss MDACC 2007 (218)	104 prosp.	univariační odhad prediktivní schopnosti proměnných; MLR (stepwise – backward) ROC monogram	definitivní velikost nádoru LVSI multicentricita metoda detekce uzlinové metastázy stav LU v době stanovení diagnózy	ROC = 0,76 (kontrolní soubor jiné nemocnice: ROC = 0,78)

^{a)} riziko postižení jakékoliv axilární LU; ^{b)} riziko postižení nesentinelových LU při pozitivní SLU; ^{c)} riziko postižení nesentinelových LU po NACT při pozitivní SLU stanovené v době diagnózy;

ER = estrogenové receptory; LU = lymfatická uzlina; LVSI = invaze lymfovaskulárních prostor; MLR = multivariační logistická regrese; NACT = neoadjuvantní chemoterapie; prosp.= prospektivně tvořená skupina; retrosp.= retrospektivně tvořená skupina; ROC = Receiver Operating Characteristic; SLU = sentinelová lymfatická uzlina

Logickým pokračováním v tvorbě prediktivních modelů je jejich aplikace pro pacientky léčené neoadjuvantní chemoterapií. Snaží se predikovat postižení nesentinelových uzlin u těch žen, u nichž byla v době stanovení diagnózy histologicky prokázána přítomnost metastatických buněk v sentinelové uzlině (218). Autoři z **M.D. Anderson Cancer Center** zjistili na poměrně malém prospektivním souboru 104 žen statistickou významnost u následujících faktorů: definitivní velikost nádoru, lymfovaskulární invaze, multicentricita, metoda detekce uzlinové metastázy (přibližně odrážející velikost metastázy) a klinický stav axilárních uzlin v době stanovení diagnózy. Plocha pod křivkou ROC byla 0,76; při ověření prediktivity modelu na souboru žen z jiné nemocnice byla ROC = 0,78.

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

4.1.2 APLIKACE VÝSLEDKŮ NAŠEHO MODELU

4.1.2.1 Modelování pomocí pooperačních údajů

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

Srovnáním dvou pooperačních modelů (modelu A a B) jsme zjistili lepší schopnost predikovat metastatické postižení axilárních uzlin u modelu A, který využívá hodnot všech získaných proměnných. Srovnání vlastností obou modelů ukazují tabulky 19 a 20, srovnání jejich prediktivních schopností pomocí ROC křivek pak obrázky 12 a 13. Z obou srovnání je patrné, že pro odhad rizika axilárního postižení je vhodnější využívat i ostatní proměnné (tedy ty, u nichž nebyla prokázána statistická významnost), které svým dílem také přispívají do predikce v nalezeném modelu. Ke stejnému závěru dospěl statistický tým při sestavování regresního modelu v MSKCC (179) a také v MOÚ Brno (177).

Pro sestavení modelů A a B jsme použili vlastnosti nádoru získané z pooperačních histologických preparátů, tedy podobné těm, s jakými pracovaly statistické modely uvedené v odd. 4.1.1. a tabulce 33. Nabízí se tedy alespoň krátké srovnání. Naše práce vycházela z analýzy podobného počtu pacientek, použila podobnou metodiku analýzy souboru a konstrukce modelu. Srovnatelné jsou získané statisticky významné vlastnosti nádoru, zejména pak velikost primárního nádoru a lymfovaskulární invaze. A také **úspěšnost predikce našeho modelu je plně srovnatelná se všemi dosud publikovanými prediktivními modely** týkajícími se karcinomu prsu a odhadu rizika postižení axilárních uzlin. Nejlépe je to patrné z grafické podoby porovnávající velikost plochy pod křivkou ROC, která je 0,78 pro model A a 0,74 pro model B (viz obr 12 a 13).

Z hlediska cíle stanoveného na začátku této práce je samozřejmě použitelnost tohoto modelu **pouze hypotetická**. Tyto údaje nemáme k dispozici v době stanovení diagnózy, tedy ve chvíli, kdy by náš prediktivní model měl vstoupit do plánování terapeutického postupu. Takový model jsme sestavovali proto, že pooperační údaje by měly být spolehlivé, tedy měly by odrážet skutečné vlastnosti nádoru věrněji, než údaje získané před operací. Funkčnost tohoto modelu měla tedy odpovědět na otázku, zdali je možné na základě skutečných vlastností nádoru stanovovaných soudobou diagnostikou predikovat axilární metastatické

postižení. **Odpověď bohužel není jednoznačná.** Falešná negativita 39% znamená, že model by nesprávně určil negativitu axilárních uzlin u 39% žen, jejichž uzliny jsou metastaticky postižené a které by proto nebyly adekvátně léčeny. Na druhé straně má tento náš model podobné prediktivní vlastnosti, jako široce používaný model MSKCC, který účinně napomáhá při rozhodování o možnostech snižování radikality axilární chirurgie (179).

4.1.2.2 Aplikace modelu na údaje získané před operací

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

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

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

4.2 POZNATKY O BIOLOGICKÉ POVAZE ZHOUBNÉHO ONEMOCNĚNÍ PRSU

4.2.1 VELIKOST NÁDORU

Měření velikosti patologického ložiska na fixovaném operačním resekátu je považováno za zlatý standard a jediný exaktně zjiřitelný komparátor pro velikost nádoru. Tento faktor pak mimo jiné určuje potřebu a rozsah pooperační léčby. Naproti tomu měření provedená pomocí zobrazovacích metod nebo klinického vyšetření mají význam pouze v době stanovení diagnózy – pro určení základního terapeutického schématu (rozhodnutí mezi operací a primární systémovou terapií, rozhodnutí o možnosti konzervativního zákroku na prsu, apod.).

Jak už bylo zmíněno výše, je měření objemu nádoru výhodnější, nežli stanovení pouze jediného, tj. nejdelšího, rozměru. U převážné většiny pacientek našeho souboru bylo k dispozici měření tumoru ve třech na sebe kolmých rozměrech. Databáze užívaná pro parametrický sběr dat však nedovolovala archivaci tohoto typu údajů (protože její algoritmus vychází z parametrů vyžadovaných klasifikací TNM). Proto jsme byli nuceni posuzovat velikost nádoru pouze na základě jeho nejdelšího rozměru.

Nejdelší rozměr invazivního ložiska zjištěný pomocí klinických (zejména zobrazovacích) metod nebyl statisticky významně odlišný od nejdelšího rozměru měřeného na histologických preparátech. Toto zjištění je v rozporu s výsledky některých publikovaných prací, které prokazují nedostatečnou korelaci předoperačního měření s definitivní velikostí nádorového ložiska. Absence statisticky významné odchylky je dobrou vizitkou radiodiagnostického oddělení a poskytuje také spolehlivý základ pro stanovení optimálního terapeutického postupu již v době stanovení diagnózy. Je však nutné upozornit na rozdíly v zobrazitelnosti a ve

výsledcích měření u invazivního karcinomu na jedné straně a karcinomu in situ na druhé straně.

Srovnání výsledků jednotlivých měření (zobrazovací metody versus histologie pro každý individuální případ) prokázalo u **invazivních nádorů** velmi dobrou shodu mezi těmito měřeními. Průměrná odchylka měření byla **6,2mm** (medián odchylky 3,0mm, rozmezí 0-87mm. Důvodem pro takto dobré výsledky může být obvykle dobrá zobrazitelnost invazivního ložiska, zejména pomocí ultrazvuku a magnetické rezonance. Buňky invazivního nádoru jsou výrazně odlišné od původních buněk prsní žlázy a vytvářejí obvykle kompaktní ložiska s akustickými a/nebo paramagnetickými vlastnostmi odlišnými od okolní nenádorové prsní tkáně.

Naopak v případě **neinvazivních karcinomů** je korelace předoperačního a pooperačního měření špatná. Průměrná odchylka měření byla **25,1mm** (medián odchylky 17,0mm, rozmezí 0-118mm); rozdíl mezi hodnotami naměřenými předoperačně a pooperačně je tedy významně větší, než u invazivního karcinomu. Ložiska jsou totiž mnohdy nehomogenní, mnohdy bývají disperzně rozptýlena mezi normální prsní tkání, mnohdy se nádorové buňky nacházejí pouze uvnitř duktů. Často je jedinou známkou neinvazivního karcinomu přítomnost mikrokalcifikací (zobrazitelných výlučně mamograficky); mikrokalcifikace jsou však často přítomny také u prekanceróz (zejména atypické duktální hyperplazie – ADH) a mamografické rozlišení mezi karcinomem in situ a ADH je velmi často nemožné. To vše vysvětluje značné rozdíly mezi předoperačními a pooperačními měřeními. Podobné důvody může mít také špatná korelace popisu multifokálních postižení – viz dále.

4.2.2 PROBLEMATIKA KARCINOMU IN SITU (CIS)

4.2.2.1 Zjištěné údaje týkající se žen s karcinomem in situ

Celkem bylo z důvodu předoperační diagnózy "carcinoma in situ" v našem souboru operováno 145 žen (viz také tabulku 34):

- u 106 z těchto 145 žen (73,1%) byla i v definitivní histologii potvrzena diagnóza karcinomu in situ (tj. nebyl nalezen invazivní fokus); pouze u jediné z těchto pacientek byla přítomna metastáza v axilární lymfatické uzlině (jednalo se o sentinelovou uzlinu)

- u 39 z těchto 145 žen (26,9%) byl při definitivním histologickém zpracování nalezen koexistující invazivní karcinom – bylo proto nutné provést upstaging onemocnění, při měření pak byla důležitá pouze velikost invazivní komponenty (naopak rozsah složky in situ nehrál roli); v této skupině se vyskytlo 5 pacientek s postiženými axilárními (sentinelovými a/nebo nesentinelovými) uzlinami (jedná se tedy o 3,5% z celkového počtu 145 žen s bioptickou diagnózou karcinomu in situ a 12,8% z těch žen, u nichž se diagnóza CIS změnila na invazivní karcinom)

Je také dobré doplnit, že ve 12 případech byl v bioptickém vzorku prokázán invazivní karcinom, avšak v definitivní histologii byl již přítomen pouze karcinom in situ. Důvodem může být nenalezení invazivního fokusu v definitivním preparátu, nebo skutečná absence takového fokusu (tedy jeho kompletní odstranění při biopsii, zejména pokud se prováděla vakuovou metodou – viz odd. 2.2.4.). Bohužel nemáme žádnou reálnou možnost ověřit, která z těchto možností je převažující. V každém takovém případě je však nádor samozřejmě nadále veden jako invazivní.

Tabulka 34

invazivita	biopsie (před operací)	definitivní histologie (po operaci)
in situ	145	106
invazivní	572	511

4.2.2.2 *In vazivita nádoru v logistickém regresním modelu*

In vazivita je bezpochyby nejdůležitější faktor, který predikuje metastazování do lymfatických uzlin. Neinvazivní nádor by ve své podstatě neměl mít kontakt s lymfatickými cévami (které se nachází až pod bazální membránou) a tudíž by neměl metastazovat; pokud je nalezeno metastatické uzlinové postižení, přičítá se to obvykle existenci nepoznané invazivní složky (viz také odd. 1.3.4.1.). Naší snahou proto bylo zařadit také invazivitu do prediktivního regresního modelu.

Náš způsob matematického zpracování dat využíval pro základní analýzu (model A) „nejvěrohodnějších“ údajů o nádoru. Pokud se jedná o invazivitu (tj. přítomnost invazivního karcinomu nebo jen karcinomu in situ), považovali jsme za in situ pouze takový nádor, u něhož nebyla nalezena invazivní komponenta ani v bioptickém ani v operačním vzorku. V této skupině 106 žen byla histologicky prokázána jediná metastáza do axilárních uzlin. Tento jediný případ bylo proto ze statistického hlediska třeba hodnotit jakou „outlier“ (v našem souboru se jednalo o jakousi výjimku z pravidla, že neinvazivní nádor nemetastazuje – viz také výše).

Z tohoto důvodu jsme byli nuceni **vyřadit invazivitu z logistického regresního modelu**. Důvodem je to, že v případě přítomnosti znaku „carcinoma in situ“ by na levé straně regresní rovnice vždy měla být hodnota „0“ (označující nepřítomnost metastáz), význam ostatních proměnných (vlastností nádoru) by pak nebylo možné hodnotit.

4.2.2.3 *Praktické důsledky týkající se žen s karcinomem in situ*

Pokud bychom měli v době stanovení diagnózy (pomocí hodnocení bioptického vzorku) jistotu, že se u konkrétní pacientky jedná o karcinom in situ, pak by v tomto případě bylo stěží obhajitelné provádění jakéhokoliv primárního chirurgického zákroku v axile (včetně biopsie sentinelové uzliny). Na jediný případ zachycené axilární metastázy by bylo nutno provést 105 „zbytečných“ operací. Tento postup by jistě nebyl efektivní z hlediska časového a ekonomického. Diskutabilní by byl také terapeutický přínos pro pacientky s nepoznanými axilárními metastázami, které by mohly na základě stanovení správné diagnózy profitovat z intenzivnější pooperační adjuvantní terapie. Tento benefit by se dal posoudit pouze za základě srovnání zlepšené prognózy u žen s nepoznanými metastázami na jedné straně a snížení kvality života u žen se zbytečně provedenou operací v axile na druhé straně. Takové údaje bohužel v našem souboru nejsou k dispozici.

Reálná situace je však odlišná. U 39 žen (téměř 27%) s bioptickou diagnózou karcinomu in situ bylo nutno na základě pooperační histologie onemocnění upstagovat na invazivní karcinom. Pokud bychom tedy neprováděli biopsii sentinelové uzliny u žádné z žen s iniciální diagnózou karcinomu in situ, vznikla by u více než jedné čtvrtiny z nich potřeba operace v axile ve druhé době. Toto nezanedbatelné riziko druhé operace by pravděpodobně bylo pro většinu patientek nepřijatelné. Naším standardním postupem je proto nabízet SLNB v jedné době s operací na prsu všem pacientkám s bioptickou diagnózou karcinomu in situ, které jsou grade 3, dále u CIS grade 2 větších rozměrů (>2cm) a také tehdy, je-li prováděna mastektomie (viz také doporučení výše). Některá pracoviště však postupují obráceně: při bioptické diagnóze karcinomu in situ standardně provádějí pouze operaci na prsu s tím, že se případná operace v axile indikuje až na základě definitivní histologie. Obě cesty lze považovat za postupy lege artis s tím, že volba jedné z nich záleží na svobodné vůli a rozhodnutí adekvátně poučené pacientky.

Není však pravděpodobně přípustné zcela vypustit operaci v axile u žen s iniciální diagnózou karcinomu in situ. V našem souboru mělo postiženu alespoň jednu axilární uzlinu 3,5% těchto žen, literární zdroje však udávají přítomnost axilárních metastáz až v 5-15% (5; 196).

Analýzou souboru 145 žen s bioptickou diagnózou karcinomu in situ jsme se snažili odpovědět na otázku, jestli se liší podskupina těch žen, u nichž byl v pooperační histologii přítomen invazivní karcinom od těch, kde invaze prokázána nebyla. Pokud bychom totiž byli schopni nelézt takové vlastnosti karcinomu in situ, které predikují pooperační upstaging, mohli bychom na základě těchto vlastností definovat podskupinu žen s karcinomem in situ, které budou profitovat z provedení biopsie sentinelové uzliny v jedné době s operací na prsu. Žádná ze sledovaných vlastností nádoru však nebyla ve skupině 39 žen (s pooperačně prokázaným invazivním fokusem) statisticky významně odlišná od skupiny 106 žen (bez pooperačně prokázaného invazivního fokusu). Nejsme proto schopni předvídat, která z žen s předoperační diagnózou karcinomu in situ má riziko současné přítomnosti invazivního karcinomu.

Pokud bychom se tedy dopustili určitého zjednodušení, dal by se na základě uvedených poznatků vyvodit jednoduchý závěr pro praxi. Předoperační diagnostika invazivního karcinomu je poměrně velmi spolehlivá (i z hlediska velikosti nádoru a multifokality). Naproti tomu předoperačně diagnostikovaný karcinom in situ může být velkou neznámou a pooperační histologie se může významně odlišovat od předoperačního nálezu – jak velikostí ložiska nebo stanovením gradingu, tak i přítomností koexistujícího invazivního fokusu.

4.2.3 MULTIFOKALITA NÁDORU

Existence více ložisek je důležitá zejména při plánování operace – k rozhodnutí mezi mastektomií a prs šetřícím výkonem. Nepoznaná a neexstirpovaná ložiska jsou samozřejmě možným zdrojem lokálních recidiv onemocnění. Existence těchto ložisek je pravděpodobným vysvětlením pro fakt, že iradiace prsu po prs šetřících výkonech redukuje výskyt lokálních recidiv onemocnění (eradikací nepoznaných satelitních nádorových ložisek).

Naše statistická analýza údajů týkajících se multifokality nezamítla nulovou hypotézu (tj. nedokázala vyvrátit, že mezi předoperačními a pooperačními hodnotami není žádný rozdíl). To však neznamená, že by mezi těmito dvěma pozorováními nemohl rozdíl existovat. Přímým srovnáním jednotlivých skupin je vidět, že určení přítomnosti jednoho nebo více ložisek pomocí zobrazovacích metod není příliš spolehlivé – viz tabulku 35.

Tabulka 35

počet fokusů nádoru po operaci		počet fokusů nádoru před operací							
	celkem	1 ložisko	%	2 ložiska	%	>2 ložiska	%	nestanov.	%
jediné ložisko	507	468	92,2	15	3,0	9	1,8	15	3,0
dvě ložiska	40	15	37,5	20	50	3	7,5	2	5
tři a více ložisek	53	39	73,5	3	5,7	11	20,8	0	0
nestanoveno	17	15	88,2	1	5,9	0	0	1	5,9

Předoperační zobrazovací metody popsaly existenci dvou ložisek nádoru u 39 žen (6,3%) a více než dvou ložisek u 23 žen (3,7%). Naproti tomu definitivní histologické zpracování prokázalo existenci dvou ložisek u 40 žen (6,5%) a více než dvou ložisek u 53 žen (8,6%). V definitivních histologiích bylo tedy zjištěno významně více vícečetných ložisek, než při předoperačním vyšetření (15,1% versus 10% z celého souboru 617 žen – viz tabulku 35). Důvodem jsou pravděpodobně malé rozměry přídatných ložisek, které nelze předoperačně zobrazit.

Na velkém počtu mnohočetných nádorů se ze značné části podílely neinvazivní karcinomy (19 z celkem 53 výskytů více než 2 ložisek, tj. 35,8%). Sedm z nich pak tvořila mnohočetná ložiska mikroskopických rozměrů (v histologických preparátech obvykle popisovaná jako „jen ojedinelé dukty s výskytem DCIS“).

Predikce vícečetných ložisek zcela selhává. U 53 mnohočetných nádorů z definitivní histologie (≥ 3 ložiska) bylo zobrazovacími metodami v 73,6% popsáno jediné ložisko nádoru; na rozdíl od toho dvoučetné ložisko bylo předoperačně správně predikováno v polovině případů. U zobrazovacích vyšetření žen s vícečetnými nádory byla přibližně v polovině případů udána „neměřitelná hodnota“ (jak ultrazvukově, tak mamograficky); jednalo se nejčastěji o mikrokalcifikace – uspořádané buď difúzně, nebo v několika nesouvisejících hnízdech.

Je zajímavé, že z 53 případů vícečetných ložisek (tj. ≥ 3 fokusy) bylo 13 žen, u nichž byla z biopsie stanovena diagnóza karcinomu in situ, kterou bylo nutno na základě definitivní histologie změnit na invazivní karcinom (upstaging – viz také výše). Nabízí se vysvětlení, že v případě víceložiskového onemocnění nebyla bioptována ložiska s prognosticky nejzávažnějším typem nádoru (a to i přesto, že se biopsie vždy snaží odebrat vzorky z míst nejsuspektnějšího vzhladu).

Také tato pozorování dokládají, že je-li z biopsie stanoven karcinom in situ, není odhad jeho skutečné charakteristiky zdaleka jednoznačný.

4.2.4 SUSPEKTNÍ NEBO POZITIVNÍ NÁLEZ NA MÍZNÍCH UZLINÁCH

Jako klinicky pozitivní nebo suspektní se označují takové uzliny, které jsou zvětšené a/nebo fixované při pohmatovém vstupním vyšetření, nebo mají změněné sonografické charakteristiky (jak se uvádí v odd. 2.3.2.2.).

Klinický stav axilárních uzlin je považován za velmi důležitý faktor, který silně predikuje skutečné metastatické postižení uzlin. Zjištění stavu uzlin je nedílnou součástí stagingu zhoubného onemocnění a slouží k rozhodování o způsobu jeho léčby (preferenci primární operace nebo naopak neoadjuvantní terapie, primární indikace SLNB nebo axilární disekce, atd.). Také většina studií demonstrovala význam klinického stavu axilárních uzlin – pro odhad rizika přítomnosti maligních buněk v uzlinách, rizika nemožnosti nalezení sentinelové uzliny, rizika falešné negativity sentinelové uzliny, rizika postižení nesentinelových uzlin, apod. Proto také mnohé prediktivní modely zařazují klinický stav uzlin mezi hodnocená kritéria.

Literární zdroje udávají, že ve skupině žen s klinickým nálezem suspektních nebo „postižených“ uzlin je skutečně histopatologicky potvrzena přítomnost uzlinových metastáz v 70-75% případů (200–202). K podobné četnosti jsme dospěli také v našem souboru – axilární metastázy byly přítomny u 73% z těch žen, u nichž bylo v předoperačním stagingu vysloveno podezření na jejich postižení.

Pro klinickou praxi vyplývá z těchto údajů důležitý závěr. Pokud je na základě klinických předoperačních vyšetření vysloveno podezření na postižení axilárních uzlin, je riziko jejich postižení tak vysoké, že si nemůžeme dovolit neověřit jejich stav biopticky (z důvodu rizika ponechání metastatického fokusu in situ). Ve všech těchto případech (bez ohledu na další faktory) je proto indikována lymfatická disekce – ať už v rozsahu sentinelové biopsie, nebo kompletní exenterace axily. Žádný prediktivní model by neměl zvrátit tento postup, který lze v současnosti jako jediný považovat za lege artis. Z tohoto pohledu nemá žádný smysl predikovat skutečné axilární postižení v případě, kdy jsou před operací nalezeny suspektní nebo pozitivní axilární uzliny. Proto jsme se rozhodli **toto kritérium do našeho matematického modelu nezařadit**.

Je však také třeba uvést, že klinicky pozitivní uzliny byly popsány pouze u 11 pacientek z celkového počtu 612 žen (u pěti žen chyběl v dokumentaci údaj o předoperačním stavu lymfatických uzlin) – viz tabulku 36. Vezmeme-li v úvahu, že histopatologie prokázala metastatické axilární postižení u 119 žen, nejeví se v souboru našich pacientek klinické vyšetření axilárních uzlin jako nejlepší diagnostický test. Pozitivní prediktivní hodnota ($8:11 = 73\%$) a negativní prediktivní hodnota ($490:601 = 82\%$) tohoto testu jsou hraniční, avšak falešná negativita ($111:119 = 93\%$) je zcela nepřijatelná.

Tabulka 36

histologický stav uzlin (po operaci)	klinický stav uzlin (před operací)		celkem
	pozitivní	negativní	
pozitivní	8	111	119
negativní	3	490	493
celkem	11	601	612

4.3 PROBLÉMY PREDIKCE AXILÁRNÍCH METASTÁZ A MOŽNOSTI JEJICH ŘEŠENÍ

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

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

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

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

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

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

Při zpracování našeho projektu jsme naráželi na některé metodologické problémy, které jsou zdrojem nepřesných a nevalidních údajů a tím znesnadňují sestavení prediktivního modelu a snižují možnost dosažení přesné predikce axilárního uzlinového postižení (219).

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

při biopsii může být zastižena minoritní část nádoru s odlišnými vlastnostmi, což je pak příčinou neshody se skutečnými „průměrnými“ vlastnostmi nádoru.

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

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

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

b/ Ani standardní vyšetření exstirpovaných sentinelových uzlin není stoprocentně spolehlivé (viz odd.1.3.3.4.). Již dříve bylo uvedeno, že podrobné a sofistikované vyšetření sentinelových uzlin (použití sériových řezů, imunohistochemie, případně molekulárně genetické metody) odhalí metastatické nádorové buňky u několika procent těch žen, jejichž sentinelové uzliny byly označeny jako negativní při použití standardních metod zpracování těchto uzlin (viz také odd.2.3.7.2.).

c/ Je také třeba připomenout, že část údajů o axilárních uzlinách byla získána u pacientek s provedenou biopsií sentinelové uzliny. U nich nebyly k dispozici pro histologické vyšetření další axilární uzliny. Je tedy nutné připustit možnost postižení nesentinelových uzlin v případech, které byly v našem souboru označeny jako „negativní“ (tj. bez zjištěných axilárních metastáz). Tato falešná negativita sentinelových uzlin bývá podle různých literárních zdrojů přítomna v 5-10% časných karcinomů prsu. Naše vlastní falešná negativita byla určena v době, kdy byla technika sentinelové biopsie zaváděna do naší klinické praxe a kdy se prováděla paralelně jak SLNB, tak následná standardní axilární disekce. Tehdy jsme prokázali, že je sentinelová uzlina falešně negativní ve 2,3% případů (nepublikovaná data).

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

V důsledku heterogenity patologické léze si proto lze jen **obtížně představit možnost zřetelného zlepšení předoperační diagnostiky** u následujících prognostických parametrů: invazivita (je diskutována v odd.4.2.2.), multifokalita (viz odd.4.2.3.), grade (nepřesnost jeho stanovení dokazuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami před operací a po operaci), hormonální receptory, HER-2/neu, proliferativní aktivita a v menší míře také histologický typ nádoru. Nemožnost validního předoperačního stanovení lymfovaskulární invaze je dána skutečností, že cílem biopsie je (zejména u menších nádorů) směřovat do centra ložiska; naopak metodika stanovení LVSI vyžaduje vyšetření lymfatických a vaskulárních prostor na periférii léze (viz také odd. 2.3.7.1.).

Určitých zlepšení lze snad dosáhnout v následujících oblastech.

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

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

c/ Pečlivé a metodicky správné provádění biopsie sentinelové uzliny. Především se doporučuje používat vždy duální metody značení sentinelových uzlin (radionuklidem i lymfotropním barvivem) – četnost detekce je v tomto případě signifikantně vyšší, než při použití pouze jedné z těchto metod (122; 152–154). Nelze se spokojit s jedinou exstirpovanou sentinelovou uzlinou. U značné části pacientek je nalezeno více sentinelových uzlin – ve většině publikovaných prací se průměrný počet exstirpovaných sentinelových uzlin pohyboval v rozmezí 1,5–2,1 na pacientku (183). Bylo prokázáno, že riziko falešné negativity sentinelové uzliny (tj. minutí lymfatické metastázy v sentinelové uzlině) se snižuje s každou další exstirpovanou sentinelovou uzlinou (182; 184). Snaha o exaktní exstirpaci sentinelových uzlin by tedy mohla znamenat omezení rizika ponechání nepoznané metastaticky postižené uzliny in situ.

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

e/ Omezení využití samplingu axilárních uzlin. Protože byl sampling axilárních uzlin jednou z používaných technik i v rámci našeho souboru, mohl být důvodem nesprávného určení skutečného stavu axilárních uzlin a tudíž zdrojem chybného zadání vstupních údajů do regresní rovnice. Výše uvedené výhrady týkající se falešné negativity při sentinelové biopsii se týkají ve zvýšené míře také axilárního samplingu. Tento výkon je bohužel velmi nestandardní svým rozsahem i kvalitou provedení. Jeho falešnou negativitu tedy není snadné definovat – bude se lišit podle operátora, zvyklostí pracoviště, pacientky, atd. Vzhledem k necílenosti náhodného odběru lze předpokládat falešnou negativitu vyšší, nežli u cílené sentinelové biopsie. Dalším problémem je pak histologické zpracování – standardní zpracování nesentinelových uzlin je ještě daleko méně přesné, nežli je tomu u sentinelových uzlin (viz odd.1.3.3.4.). Rutinně není možné všechny uzliny získané samplingem vyšetřit tak pečlivě, jako sentinelovou uzlinu; na druhé straně při samplingu neumíme určit, která ze získaných uzlin má největší riziko postižení. Riziko minutí metastázy při histologickém zpracování je proto zřetelně vyšší. Uvedené skutečnosti významným způsobem zpochybňují

legitimitu samplingu axilárních uzlin v chirurgické léčbě karcinomu prsu. Tento výkon by mohl být přípustný pouze v situacích, kdy není možné nalézt sentinelovou lymfatickou uzlinu (a to pomocí předoperačního značení radionuklidem ani peroperačního značení lymfotropním barvivem) a zároveň se domníváme, že standardní axilární disekce je nepřiměřeně radikálním výkonem pro daný typ nádoru. Mohlo by se jednat zejména o invazivní nádory malých rozměrů. Z vlastní praxe i z literárních zdrojů však víme, že riziko nenalezení sentinelové uzliny je v takových případech při použití správné techniky značení a detekce minimální (jistě nepřekračuje 1-2%). Existují tedy silné argumenty pro to, aby byl necílený axilární sampling zcela vyloučen z repertoáru axilární chirurgie.

4.3.1 APLIKACE MODELU NA VYBRANÉ PODSKUPINY PACIENTEK

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

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

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

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

5 SHRNUTÍ A ZÁVĚR

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

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

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

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

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

6 PŘÍLOHY A DODATKY

6.1 SEZNAM LITERATURY SE VZTAHEM K DISERTAČNÍ PRÁCI

6.1.1 PUBLIKACE S IMPACT FAKTOREM

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

6.1.2 PUBLIKACE BEZ IMPACT FAKTORU

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

6.2 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADH	atypická duktální hyperplazie
AI	apoptotický index
ALND	axillary lymph node dissection
AUC	area under curve
BMI	body mass index
CIS	carcinoma in situ
CDK	cyclin dependent kinases
CT	komputerová tomografie
DFS	disease-free survival
EGF	epidermal growth factor
EIC	extensive intraductal component
ER	estrogenové receptory
FDA	Food and Drug Agency
FGF	fibroblast growth factor
HR	hormonální receptory
HSP	heat stress proteins
IGF	insulin-like growth factor
IGF-R	insulin-like growth factor receptor
ITC	isolated tumor cells
LVSI	lymphovascular space invasion
MAI	mitotic activity index
MAPK	mitogene-activated protein-kinases
MDACC	M.D. Anderson Cancer Center
MMP	matrix metalloproteinases
MOÚ	Masarykův Onkologický Ústav
MRI	magnetic resonance imaging
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
NBCTR	National Breast Cancer Tissue Resource
OS	overall survival
PA	plasminogen activator
PCNA	proliferative cells nuclear antigen
PET	positron emission tomography
PgR	progesteronové receptory
ROC	Receiver Operating Characteristic
SLN	sentinel lymph node
SLNB	sentinel lymph node biopsy
SPF	S-phase fraction
TDLU	terminal ductolobular unit
TGF	tumor growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TLI	thymidin labelling index
t-PA	tissue type of plasminogen activator
u-PA	urokinase type of plasminogen activator
VNPI	van Nuys prognose index

6.3 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ÚZIS (Národní Onkologický Registr ČR). *Novotvary 2013 ČR*. Praha: Zdravotnická statistika, 2016.
2. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann.Surg.* 1894;20:497-555.
3. Haagensen CD. The surgical treatment of mammary carcinoma. Diseases of the breast (2 edition). Philadelphia: WB Saunders, 1971:669.
4. Beenken SW, Urist MM, Zhang Y et al. Axillary lymph node status, but not tumor size, predicts locoregional recurrence and overall survival after mastectomy for breast cancer. *Ann.Surg.* 2003;237:732-8.
5. Amersi F, Hansen NM. The benefits and limitations of sentinel lymph node biopsy. *Curr.Treat.Options Oncol.* 2006;7:141-51.
6. Craig PH, Silverstein MJ. Small invasive carcinomas: the role of axillary lymph node dissection. In: Bland KI, Copeland EN. The breast, comprehensive management of benign and malignant disease (2nd edition). Philadelphia: Saunders, 1998:1072-93.
7. Yancik R, Ries LG, Yates JW. Breast cancer in aging women. A population-based study of contrasts in stage, surgery, and survival. *Cancer* 1989;63:976-81.
8. Cibula D, Petruzelka L. *Onkogynekologie*. Prague: Grada Publishing, 2009.
9. Kolarik D, Halaska M, Feyereisl J. *Repetitorium gynekologie*. Prague: Maxdorf Jessenius, 2018.
10. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann.Oncol.* 2005;16:1569-83.
11. Cinieri S, Orlando L, Fedele P et al. Adjuvant strategies in breast cancer: new prospectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gallen International Expert Consensus Conference. *Ann.Oncol.* 2007;18 Suppl 6:vi63-vi65.
12. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann.Oncol* 2009;20:1319-29.
13. Proceedings of the International Symposium on Colorectal Cancer. St. Gallen, Switzerland, December 4, 1998. *Int.J.Surg.Investig.* 1999;1:245-70.
14. Pichelmayr O. St.Gallen 2001: Adjuvante Brustkrebstherapie. *Jatros* 2001;3:12.
15. Glen H, Jones RJ. 8th international conference: primary therapy of early breast cancer, St Gallen, Switzerland, March 12-15 2003. *Breast Cancer Res.* 2003;5:198-201.
16. Dahmouh L, Pike MC, Press MF. *Hormones and breast cell proliferation. Treatment of the postmenopausal woman*. New York: Raven Press, 1994.
17. Habel LA, Stanford JL. Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiol.Rev.* 1993;15:209-19.
18. Romain S, Laine BC, Martin PM, Magdelenat H. Steroid receptor distribution in 47,892 breast cancers. A collaborative study of 7 European laboratories. The EORTC Receptor Study Group. *Eur.J.Cancer* 1995;31A:411-7.
19. Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer res.* 1995;55:3902-7.
20. Disaia PJ. Hormone replacement therapy for breast cancer survivors: facts versus fears. *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)* 1995;7:241-5.
21. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast

- carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J.Clin.Pathol.* 2000;53:688-96.
22. Dew JE, Wren BG, Eden JA. Tamoxifen, hormone receptors and hormone replacement therapy in women previously treated for breast cancer: a cohort study. *Climacteric.* 2002;5:151-5.
 23. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E et al. High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* 2000;37:536-45.
 24. McCarty KS, Jr., Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS, Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1985;109:716-21.
 25. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J.Clin.Pathol.* 2000;53:125-30.
 26. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1992;339:1-15.
 27. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1992;339:71-85.
 28. Howell A, Harland RN, Barnes DM et al. Endocrine therapy for advanced carcinoma of the breast: relationship between the effect of tamoxifen upon concentrations of progesterone receptor and subsequent response to treatment. *Cancer res.* 1987;47:300-4.
 29. Nomura Y, Tashiro H, Shinozuka K. Changes of steroid hormone receptor content by chemotherapy and/or endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 1985;55:546-51.
 30. Nomura Y, Takatani O, Sugano H, Matsumoto K. Oestrogen and progesterone receptors and response to endocrine therapy in Japanese breast cancer. *J.Steroid Biochem.* 1980;13:565-6.
 31. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers. *Int.J.Cancer* 2000;88:733-6.
 32. Di FG, Coradini D, Cappelletti V et al. Hormone receptors and disease-free survival in breast cancer: impact of increasing threshold levels. *Anticancer Res.* 1990;10:1699-705.
 33. Walker RA. *Prognostic and predictive factors in breast cancer.* New York: Martin Dunitz, 2003.
 34. McGuire WL, Clark GM. The prognostic role of progesterone receptors in human breast cancer. *Semin.Oncol.* 1983;10:2-6.
 35. Klijn JG, Berns PM, Bontenbal M, Alexieva-Figusch J, Foekens JA. Clinical breast cancer, new developments in selection and endocrine treatment of patients. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1992;43:211-21.
 36. Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 1978;103:1742-51.

37. Klijn JG, Berns PM, Dorssers LCJ, et al. *Molecular markers of resistance to endocrine treatment of breast cancer. Drugs and hormonal resistance in breast cancer.* New York: Ellis Horwood, 1995.
38. Daidone MG, Silvestrini R, Luisi A et al. Changes in biological markers after primary chemotherapy for breast cancers. *Int.J.Cancer* 1995;61:301-5.
39. Sampson SA, Kreipe H, Gillett CE et al. KiS1--a novel monoclonal antibody which recognizes proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinoma. *J.Pathol.* 1992;168:179-85.
40. Amadori D, Silvestrini R. Prognostic and predictive value of thymidine labelling index in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;51:267-81.
41. Rasbridge SA, Gillett CE, Seymour AM et al. The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *Br.J.Cancer* 1994;70:335-41.
42. Ellis PA, Smith IE, Detre S et al. Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;48:107-16.
43. Genestie C, Zafrani B, Asselain B et al. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Res.* 1998;18:571-6.
44. Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 1994;73:2765-70.
45. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual (7 edition)* Springer, 2010.
46. Biesterfeld S, Farokhzad F, Kluppel D, Schneider S, Hufnagl P. Improvement of breast cancer prognostication using cell kinetic-based silver-stainable nucleolar organizer region quantification of the MIB-1 positive tumor cell compartment. *Virchows Arch.* 2001;438:478-84.
47. Imamura H, Haga S, Shimizu T, Watanabe O, Kajiwara T, Aiba M. Prognostic significance of MIB1-determined proliferative activities in intraductal components and invasive foci associated with invasive ductal breast carcinoma. *Br.J.Cancer* 1999;79:172-8.
48. Dowsett M, Archer C, Assersohn L et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* 1999;6:25-8.
49. Riccardi A, Danova M, Dionigi P et al. Cell kinetics in leukaemia and solid tumours studied with in vivo bromodeoxyuridine and flow cytometry. *Br.J.Cancer* 1989;59:898-903.
50. Silvestrini R, Benini E, Luisi A. Biology of breast cancer in elderly women. In: Figueira FA. *Mastology: Breast Disease* 1995:255.
51. Thor AD, Liu S, Moore DH, Edgerton SM. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:470-7.
52. Makris A, Allred DC, Powles TJ et al. Cytological evaluation of biological prognostic markers from primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res.Treat.* 1997;44:65-74.
53. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11:121-39.
54. Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991;3:1-7.
55. Strnad P, Danes P. *Nemoci prsu pro gynekology.* Prague: Grada Publishing s.r.o., 2001.

56. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J.Histochem.Cytochem.* 1993;41:7-12.
57. de Jong JS, van Diest PJ, van d, V, Baak JP. Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res.Treat.* 2001;66:201-8.
58. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br.J.Cancer* 2000;82:368-73.
59. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-7.
60. Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C et al. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 1995;1:189-98.
61. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO et al. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int.J.Cancer* 1994;59:619-28.
62. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br.J.Cancer* 1994;69:135-9.
63. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6.
64. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993;361:365-9.
65. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
66. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-7.
67. Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J.Biol.Chem.* 1993;268:6511-9.
68. Bhargava V, Kell DL, van de Rijn M, Warnke RA. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am.J.Pathol.* 1994;145:535-40.
69. Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P, Di FG, Mezzanotte G, Bonadonna G. Cell kinetics as a prognostic indicator in node-negative breast cancer. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 1989;25:1165-71.
70. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
71. Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN. Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature* 1992;359:426-9.
72. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
73. Nugent A, McDermott E, Duffy K, O'Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ. Enzyme-linked immunosorbent assay of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Clin.Chem.* 1992;38:1471-4.
74. Spandidos DA, Anderson ML. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J.Pathol.* 1989;157:1-10.

75. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod.Pathol.* 1998;11:155-68.
76. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1974-82.
77. Depowski PL, Brien TP, Sheehan CE, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Prognostic significance of p34cdc2 cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in breast cancer. *Am.J.Clin.Pathol.* 1999;112:459-69.
78. Press MF, Bernstein L, Thomas PA et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2894-904.
79. Muss HB, Thor AD, Berry DA et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1994;330:1260-6.
80. O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erb B-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum.Pathol.* 1996;27:955-63.
81. Leers MP, Nap M. Steroid receptor heterogeneity in relation to DNA index in breast cancer: a multiparameter flow cytometric approach on paraffin-embedded tumor samples. *Breast J.* 2001;7:249-59.
82. Barnes DM, Meyer JS, Gonzalez JG, Gullick WJ, Millis RR. Relationship between c-erbB-2 immunoreactivity and thymidine labelling index in breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res.Treat.* 1991;18:11-7.
83. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1990;114:160-3.
84. Benz CC, Scott GK, Sarup JC et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res.Treat.* 1992;24:85-95.
85. Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995;159:11-8.
86. Suen TC, Hung MC. c-myc reverses neu-induced transformed morphology by transcriptional repression. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:354-62.
87. Berns EM, Klijn JG, van Staveren IL, Portengen H, Noordegraaf E, Foekens JA. Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. *Eur.J.Cancer* 1992;28:697-700.
88. Borg A, Sigurdsson H, Clark GM et al. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *Br.J.Cancer* 1991;63:136-42.
89. Ford JM, Hanawalt PC. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:8876-80.
90. Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Miloloza A, Hengstschlager-Otttnad E. Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat.Res.* 1999;436:1-9.
91. Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990;250:1576-80.

92. Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, Varley JM. Expression of p53 protein in infiltrating and in-situ breast carcinomas. *J.Pathol.* 1991;165:203-11.
93. Silvestrini R, Benini E, Daidone MG et al. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J.Natl.Cancer Inst.* 1993;85:965-70.
94. Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast RC, Jr. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1994;170:246-52.
95. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:470-9.
96. Paradiso A, Rabinovich M, Vallejo C et al. p53 and PCNA expression in advanced colorectal cancer: response to chemotherapy and long-term prognosis. *Int.J.Cancer* 1996;69:437-41.
97. Borg A, Zhang QX, Alm P, Olsson H, Sellberg G. The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer res.* 1992;52:2991-4.
98. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr.Rev.* 1992;13:3-17.
99. Oehler MK, Rehn M, Kristen P, Sutterlin M, Caffier H. Correlation of the EGF-receptor with cell kinetic and classical prognostic factors in breast cancer. *Anticancer Res.* 1997;17:3137-40.
100. van AT, van Agthoven TL, Portengen H, Foekens JA, Dorssers LC. Ectopic expression of epidermal growth factor receptors induces hormone independence in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Cancer res.* 1992;52:5082-8.
101. Ellis MJ, Coop A, Singh B et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3808-16.
102. Reubi JC, Waser B, Foekens JA, Klijn JG, Lamberts SW, Laissue J. Somatostatin receptor incidence and distribution in breast cancer using receptor autoradiography: relationship to EGF receptors. *Int.J.Cancer* 1990;46:416-20.
103. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer res.* 1993;53:1696-701.
104. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.Treat.* 2001;65:55-61.
105. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv.Cancer Res.* 1996;68:67-108.
106. Cuny M, Kramar A, Courjal F et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer res.* 2000;60:1077-83.
107. Wilcken NR, Prall OW, Musgrove EA, Sutherland RL. Inducible overexpression of cyclin D1 in breast cancer cells reverses the growth-inhibitory effects of antiestrogens. *Clin.Cancer Res.* 1997;3:849-54.
108. Horwitz KB, McGuire WL. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* 1975;189:726-7.

109. Cho HS, NG PA, Katzenellenbogen BS. Differential regulation of gene expression by estrogen in estrogen growth-independent and -dependent MCF-7 human breast cancer cell sublines. *Mol.Endocrinol.* 1991;5:1323-30.
110. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1990;322:297-302.
111. Rochefort H, Capony F, Garcia M et al. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? *J.Cell Biochem.* 1987;35:17-29.
112. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur.J.Cancer* 1992;28A:1780-3.
113. Dickerman HW, Martinez HL, Seeger JI, Kumar SA. Estrogen regulation of human breast cancer cell line MCF-7 tissue plasminogen activator. *Endocrinology* 1989;125:492-500.
114. Janicke F, Schmitt M, Graeff H. Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin.Thromb.Hemost.* 1991;17:303-12.
115. Bettelheim R, Penman HG, Thornton-Jones H, Neville AM. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *Br.J.Cancer* 1984;50:771-7.
116. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994;24:41-7.
117. Fourquet A, Campana F, Zafrani B et al. Prognostic factors of breast recurrence in the conservative management of early breast cancer: a 25-year follow-up. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 1989;17:719-25.
118. Bedrosian I, Reynolds C, Mick R et al. Accuracy of sentinel lymph node biopsy in patients with large primary breast tumors. *Cancer* 2000;88:2540-5.
119. Ferno M. Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res.* 1998;18:2167-71.
120. Greco M, Agresti R, Cascinelli N et al. Breast cancer patients treated without axillary surgery: clinical implications and biologic analysis. *Ann.Surg.* 2000;232:1-7.
121. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol.* 2007;8:881-8.
122. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma - A metaanalysis. *Cancer* 2006;106:4-16.
123. Cabanas BR. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977;39:456-66.
124. Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer* 1960;13:77-8.
125. Morton DL, Wen DR, Wong JH et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch.Surg.* 1992;127:392-9.
126. Alex JC, Krag DN. Gamma-probe guided localization of lymph nodes. *Surg.Oncol.* 1993;2:137-43.
127. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg.Oncol.* 1993;2:335-9.
128. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann.Surg.* 1994;220:391-8.

129. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet* 1997;349:1864-7.
130. Chvalny P, Straka V, Donat R et al. [Significance of the sentinel lymph node biopsy in early breast carcinomas]. *Rozhl.Chir* 2010;89:395-401.
131. Fait V, Chrenko V. Sentinel node biopsy in breast cancer: short time results show appropriate regional control. *Neoplasma* 2007;54:256-61.
132. Gatek J, Hnatek L, Dudesek B et al. [Sentinel lymph node biopsy in the breast carcinoma in clinical practice]. *Rozhl.Chir* 2008;87:180-5.
133. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer res.* 1980;40:3863-74.
134. Fisher B, Osborne CK, Margolese R, Bloomer W. Surgical management of breast cancer. In: Holland JF, Frei EI, Bast RCJr, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine* (3 edition). Philadelphia: Lea and Febiger, 1993:1733-45.
135. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J et al. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N.Engl.J.Med.* 1997;337:949-55.
136. Overgaard M, Jensen MB, Overgaard J et al. Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial. *Lancet* 1999;353:1641-8.
137. Orr RK. The impact of prophylactic axillary node dissection on breast cancer survival--a Bayesian meta-analysis. *Ann.Surg.Oncol.* 1999;6:109-16.
138. Krag D. NSABP B-32: Sentinel node resection without axillary dissection effective for node-negative breast cancer. ASCO 2010 Annual Meeting. 7-6-2010.
139. Giuliano AE, McCall LM, Beitsch PD, et al. ACOSOG Z0011: a randomized trial of axillary node dissection in women with clinical T1-2 N0 M0 breast cancer who have a positive sentinel node. *J.Clin.Oncol.* 2010;28.
140. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann.Surg.* 2010;252:426-32.
141. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305:569-75.
142. Grube BJ, Giuliano AE. Observation of the breast cancer patient with a tumor-positive sentinel node: implications of the ACOSOG Z0011 trial. *Semin.Surg.Oncol.* 2001;20:230-7.
143. Ivens D, Hoe AL, Podd TJ, Hamilton CR, Taylor I, Royle GT. Assessment of morbidity from complete axillary dissection. *Br.J.Cancer* 1992;66:136-8.
144. Kissin MW, Querci della RG, Easton D, Westbury G. Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer. *Br.J.Surg.* 1986;73:580-4.
145. Schijven MP, Vingerhoets AJ, Rutten HJ, et al. Comparison of morbidity between axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29:341-50.
146. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703-20.
147. Povoski SP, Olsen JO, Young DC et al. Prospective randomized clinical trial comparing intradermal, intraparenchymal, and subareolar injection routes for sentinel lymph node mapping and biopsy in breast cancer. *Ann.Surg.Oncol.* 2006;13:1412-21.

148. Krag D, Weaver D, Ashikaga T et al. The sentinel node in breast cancer - A multicenter validation study. *New England Journal of Medicine* 1998;339:941-6.
149. Mamounas EP, Brown A, Anderson S et al. Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:2694-702.
150. Pijpers R, Meijer S, Hoekstra OS et al. Impact of lymphoscintigraphy on sentinel node identification with technetium-99m-colloidal albumin in breast cancer. *J.Nucl.Med.* 1997;38:366-8.
151. Xing Y, Foy M, Cox DD, Kuerer HM, Hunt KK, Cormier JN. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy after preoperative chemotherapy in patients with breast cancer. *Br.J.Surg.* 2006;93:539-46.
152. Cody HS, III. Clinical aspects of sentinel node biopsy. *Breast Cancer Res.* 2001;3:104-8.
153. Krag DN, Julian TB. Practice patterns of sentinel node biopsy at five comprehensive cancer centers. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:1498-9.
154. Salem A. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a comprehensive literature review. *J.Surg.Educ.* 2009;66:267-75.
155. Borgstein PJ. *The Sentinel Node Concept. Consequences of Lymphatic Tumour Spread in Melanoma and Breast Cancer.* Amsterdam: Ponsen & Looijen bv, Wageningen, 1999.
156. Derossis AM, Fey J, Yeung H et al. A trend analysis of the relative value of blue dye and isotope localization in 2,000 consecutive cases of sentinel node biopsy for breast cancer. *J.Am.Coll.Surg.* 2001;193:473-8.
157. Tew K, Irwig L, Matthews A, Crowe P, Macaskill P. Meta-analysis of sentinel node imprint cytology in breast cancer. *Br.J.Surg.* 2005;92:1068-80.
158. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2007;13:4807-16.
159. Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K et al. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am.J.Surg.* 2007;194:426-32.
160. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39.
161. Visser M, Jiwa M, Horstman A et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int.J.Cancer* 2008;122:2562-7.
162. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann.Surg.* 1995;222:394-9.
163. Dowlathshahi K, Fan M, Bloom KJ, Spitz DJ, Patel S, Snider HC, Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-6.
164. Dowlathshahi K, Fan M, Anderson JM, Bloom KJ. Occult metastases in sentinel nodes of 200 patients with operable breast cancer. *Ann.Surg Oncol* 2001;8:675-81.
165. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2345-50.
166. Leers MP, Schoffelen RH, Hoop JG et al. Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer. *J.Clin.Pathol.* 2002;55:359-66.

167. Abdessalam SF, Zervos EE, Prasad M et al. Predictors of positive axillary lymph nodes after sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am.J.Surg.* 2001;182:316-20.
168. Chu KU, Turner RR, Hansen NM, Brennan MB, Bilchik A, Giuliano AE. Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection? *Ann.Surg.* 1999;229:536-41.
169. Reynolds C, Mick R, Donohue JH et al. Sentinel lymph node biopsy with metastasis: can axillary dissection be avoided in some patients with breast cancer? *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1720-6.
170. Turner RR, Chu KU, Qi K et al. Pathologic features associated with nonsentinel lymph node metastases in patients with metastatic breast carcinoma in a sentinel lymph node. *Cancer* 2000;89:574-81.
171. Weiser MR, Montgomery LL, Tan LK et al. Lymphovascular invasion enhances the prediction of non-sentinel node metastases in breast cancer patients with positive sentinel nodes. *Ann.Surg.Oncol.* 2001;8:145-9.
172. Naik AM, Fey J, Gemignani M et al. The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection: a follow-up study of 4008 procedures. *Ann.Surg.* 2004;240:462-8.
173. Jeruss JS, Winchester DJ, Sener SF et al. Axillary recurrence after sentinel node biopsy. *Ann.Surg.Oncol.* 2005;12:34-40.
174. Guenther JM, Hansen NM, DiFronzo LA et al. Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. *Arch.Surg.* 2003;138:52-6.
175. Fant JS, Grant MD, Knox SM et al. Preliminary outcome analysis in patients with breast cancer and a positive sentinel lymph node who declined axillary dissection. *Ann.Surg.Oncol.* 2003;10:126-30.
176. Hwang RF, Gonzalez-Angulo AM, Yi M et al. Low locoregional failure rates in selected breast cancer patients with tumor-positive sentinel lymph nodes who do not undergo completion axillary dissection. *Cancer* 2007;110:723-30.
177. Coufal O, Pavlik T, Fabian P et al. Predicting non-sentinel lymph node status after positive sentinel biopsy in breast cancer: what model performs the best in a Czech population? *Pathol.Oncol.Res.* 2009;15:733-40.
178. Kohrt HE, Olshen RA, Bermas HR et al. New models and online calculator for predicting non-sentinel lymph node status in sentinel lymph node positive breast cancer patients. *BMC.Cancer* 2008;8:66.
179. Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann.Surg.Oncol.* 2003;10:1140-51.
180. Park J, Fey JV, Naik AM, Borgen PI, Van Zee KJ, Cody HS, III. A declining rate of completion axillary dissection in sentinel lymph node-positive breast cancer patients is associated with the use of a multivariate nomogram. *Ann.Surg.* 2007;245:462-8.
181. Goyal A, Newcombe RG, Mansel RE. Clinical relevance of multiple sentinel nodes in patients with breast cancer. *Br.J.Surg.* 2005;92:438-42.
182. Martin RC, Edwards MJ, Wong SL et al. Practical guidelines for optimal gamma probe detection of sentinel lymph nodes in breast cancer: results of a multi-institutional study. For the University of Louisville Breast Cancer Study Group. *Surgery* 2000;128:139-44.
183. Pecha V, Kolarik D, Kozevnikova R et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2011;117:4606-16.
184. Martin RC, Chagpar A, Scoggins CR et al. Clinicopathologic factors associated with false-negative sentinel lymph-node biopsy in breast cancer. *Ann.Surg.* 2005;241:1005-12.

185. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1999;354:896-900.
186. Rivera M, Merlin S, Hoda RS, Gopalan A, Hoda SA. Controversies in surgical pathology: minimal involvement of sentinel lymph node in breast carcinoma: prevailing concepts and challenging problems. *Int.J.Surg.Pathol.* 2004;12:301-6.
187. Chen SL, Hoehne FM, Giuliano AE. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis. *Ann.Surg.Oncol.* 2007;14:3378-84.
188. Goyal A, Douglas-Jones A, Newcombe RG, Mansel RE. Predictors of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Eur.J.Cancer* 2004;40:1731-7.
189. Cox CE, Kiluk JV, Riker AI et al. Significance of sentinel lymph node micrometastases in human breast cancer. *J.Am.Coll.Surg.* 2008;206:261-8.
190. Cserni G, Gregori D, Merletti F et al. Meta-analysis of non-sentinel node metastases associated with micrometastatic sentinel nodes in breast cancer. *Br.J.Surg.* 2004;91:1245-52.
191. Patani N, Mokbel K. The clinical significance of sentinel lymph node micrometastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 2009;114:393-402.
192. Estourgie SH, Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Rutgers EJ, Kroon BB. Should the hunt for internal mammary chain sentinel nodes begin? An evaluation of 150 breast cancer patients. *Ann.Surg.Oncol.* 2003;10:935-41.
193. Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Valagussa P, Zucali R. The dissection of internal mammary nodes does not improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomised trial. *Eur.J.Cancer* 1999;35:1320-5.
194. Matzinger O, Heimsoth I, Poortmans P et al. Toxicity at three years with and without irradiation of the internal mammary and medial supraclavicular lymph node chain in stage I to III breast cancer (EORTC trial 22922/10925). *Acta Oncol.* 2010;49:24-34.
195. Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast April 19 to 22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Hum.Pathol.* 2002;33:579-89.
196. Wilkie C, White L, Dupont E, Cantor A, Cox CE. An update of sentinel lymph node mapping in patients with ductal carcinoma in situ. *Am.J.Surg.* 2005;190:563-6.
197. Borgstein PJ, Meijer S, Pijpers RJ, van Diest PJ. Functional lymphatic anatomy for sentinel node biopsy in breast cancer: echoes from the past and the periareolar blue method. *Ann.Surg.* 2000;232:81-9.
198. Linehan DC, Hill AD, Akhurst T et al. Intradermal radiocolloid and intraparenchymal blue dye injection optimize sentinel node identification in breast cancer patients. *Ann.Surg.Oncol.* 1999;6:450-4.
199. Rahusen FD, Pijpers R, van Diest PJ, Bleichrodt RP, Torrenge H, Meijer S. The implementation of the sentinel node biopsy as a routine procedure for patients with breast cancer. *Surgery* 2000;128:6-12.
200. Cserni G. The impact of axillary lymphadenopathy on further treatment in breast cancer? A model for clinical staging. *Pathol.Oncol.Res.* 1998;4:301-3.
201. Specht MC, Fey JV, Borgen PI, Cody HS, III. Is the clinically positive axilla in breast cancer really a contraindication to sentinel lymph node biopsy? *J.Am.Coll.Surg.* 2005;200:10-4.
202. Goyal A, Mansel RE. Recent advances in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Curr.Opin.Oncol.* 2008;20:621-6.

203. Luini A, Galimberti V, Gatti G et al. The sentinel node biopsy after previous breast surgery: preliminary results on 543 patients treated at the European Institute of Oncology. *Breast Cancer Res.Treat.* 2005;89:159-63.
204. Intra M, Trifiro G, Viale G et al. Second biopsy of axillary sentinel lymph node for reappearing breast cancer after previous sentinel lymph node biopsy. *Ann.Surg.Oncol.* 2005;12:895-9.
205. Port ER, Garcia-Etienne CA, Park J, Fey J, Borgen PI, Cody HS, III. Reoperative sentinel lymph node biopsy: a new frontier in the management of ipsilateral breast tumor recurrence. *Ann.Surg.Oncol.* 2007;14:2209-14.
206. *UICC (International Union Against Cancer): TNM classification of malignant tumours* (7th edition) Willey-Blackwell, 2009.
207. Miltenburg DM, Miller C, Karamlou TB, Brunnicardi FC. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *J.Surg.Res.* 1999;84:138-42.
208. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1995;333:1456-61.
209. *AJCC Cancer Staging Manual* (6th edition). Philadelphia: Lippincott Raven, 2002.
210. *Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii. Česká verze.* (3.vydání edition). Praha: 2004.
211. Zvárová J, Malý M, et al. *Biomedicínská statistika III.* Prague: Nakladatelství Karolinum, 2003.
212. Meloun M, Militký J, Hill M. *Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech.* Prague: Academia, 2005.
213. Rehakova B. Nebojte se logistické regrese. *Sociol.casop.* 2000;36:475-92 .
214. GreenHalgh T. *Jak pracovat s vědeckou publikací* (1st edition). Prague: Grada publishing, 2003.
215. Kolarik D, Pecha V, Skovajsova M et al. Predicting axillary sentinel node status in patients with primary breast cancer. *Neoplasma* 2013;60:334-42.
216. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. ROCRC: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics.* 2005;21:3940-1.
217. Ravdin PM, De LM, Vendely T, Clark GM. Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. *J.Natl.Cancer Inst.* 1994;86:1771-5.
218. Jeruss JS, Newman LA, Ayers GD et al. Factors predicting additional disease in the axilla in patients with positive sentinel lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2008;112:2646-54.
219. Kolarik D, Pecha V, Skovajsova M et al. Breast cancer characteristics-comparison of preoperative and postoperative values. *Pathol.Res.Pract.* 2013;209:433-40.