

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Postižení regionálních lymfatických uzlin u operabilního karcinomu prsu a mapování imunitní odpovědi organismu

### DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Jiří Chod

Školitel: as. MUDr. Pavel Strnad, CSc.

Školitel-konzultant: MUDr. Eva Zavadová, CSc.

Praha, 2008

**Postgraduální doktorské studium biomedicíny  
Při UK a AV ČR**

**Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta v Praze**

Obor experimentální chirurgie

Předseda oborové rady:  
Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Pracoviště:  
Gynekologicko – porodnická klinika,  
Univerzita Karlova v Praze, 2. LF a FN v Motole  
Přednosta: doc. MUDr. Lukáš Rob, CSc.

## Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2. Cíl práce</b>	<b>11</b>
<b>3. Přehled problematiky</b>	<b>12</b>
3.1. Chirurgická léčba karcinomu prsu	12
3.2. Význam postižení lymfatických uzlin	15
3.3. Komplikace chirurgické léčby karcinomu prsu	21
3.3.1. Časné komplikace	21
3.3.1.1. Krvácení	21
3.3.1.2. Serom	21
3.3.1.3. Hnisavé komplikace	22
3.3.2. Pozdní komplikace	22
3.3.2.1. Lymfedém	23
3.3.2.2. Fantom, fantomová bolest	27
3.3.2.3. Interkostobrachióální neuropatie	28
3.3.2.4. Syndrom zamrzlého ramene	28
3.4. TGF- $\beta$ a jeho význam u karcinomu prsu	31
3.4.1. Biologie TGF- $\beta$	31
3.4.2. Význam TGF- $\beta$ u karcinomu prsu	37
3.5. Změny buněčné imunity u karcinomu prsu	39
<b>4. Materiál a metodika</b>	<b>41</b>
4.1. Charakteristika sledovaného souboru žen	41
4.2. Metodika vyšetření hormonálních receptorů a růstových indexů	45
4.2.1. Tumorový marker CA 15-3	45
4.2.2. Tumorový marker CEA	46
4.2.3. Hormonální receptory	47
4.2.4. Protein c-erbB-2	49
4.2.5. Onkoprotein p53	50
4.2.6. Proliferační index Ki-67	50
4.3. Metodika vyšetření TGF- $\beta$ I	51
4.4. Metodika vyšetření buněčné imunity	53
4.5. Metodika statistického zpracování výsledků	53
<b>5. Výsledky</b>	<b>54</b>
5.1. Vyhodnocení histopatologických kritérií, tumorových markerů a růstových indexů	54
5.2. Vyhodnocení hladin TGF- $\beta$ 1	58
5.3. Výsledky vyšetření buněčné imunity	66
<b>6. Diskuze</b>	<b>68</b>
<b>7. Závěr</b>	<b>71</b>
<b>8. Seznam použité literatury</b>	<b>76</b>
<b>9. Seznam publikací, prezentací se vztahem k tématu</b>	<b>83</b>

## Seznam grafických příloh

Obr. 1: Anatomické zobrazení 3 skupin axilárních lymfatických uzlin.....	16
Obr. 2: Struktura TGF- $\beta$ 1.....	32
Obr. 3 Účinky TGF- $\beta$ .....	35
Obr. 4 Funkce TGF- $\beta$ 1.....	37
Obr. 5 Mechanismy protinádorové imunity.....	39
Obr. 6 Peroperační identifikace sentinelové uzliny gamasondou.....	73
Obr. 7 Peroperační identifikace sentinelové uzliny po aplikaci „blue dye“.....	73
Obr. 8 Exstirpovaná sentinelová uzlina s přívodními lymfatickými kanály.....	74
Obr. 9 Verifikace aktivity sentinelové uzliny gamasondou.....	74
Obr. 10 Metastáza karcinomu prsu v sentinelové uzlině.....	75
Obr. 11 Pooperační lymfedém levé horní končetiny.....	75
Tab. 1 Porovnání léčebných postupů s nebo bez odstranění axilárních lymfatických uzlin z hlediska celkového přežití.....	18
Tab. 2 Přehled metod použitých pro detekci spádové uzliny.....	19
Tab. 3 TNM klasifikace nádorů prsu.....	44
Tab. 4 Velikost tumoru (T, mm).....	55
Tab. 5 Postižení axilárních lymfatických uzlin (N).....	55
Tab. 6 Přítomnost vzdálených metastáz (M).....	55
Tab. 7 Zralost tumoru (G) rozsah operačního výkonu na prsu.....	55
Tab. 8 Rozsah operačního výkonu na prsu.....	56
Tab. 9 Věk (pre-, postmenopauza).....	56
Tab. 10 Další sledované znaky souboru.....	56
Tab. 11 Hladiny TGF- $\beta$ 1 – skupina rizikových faktorů.....	59
Tab. 12 Hladiny TGF- $\beta$ 1 – skupina SLN negativní.....	59
Tab. 13 Hladiny TGF- $\beta$ 1 – skupina SLN pozitivní.....	60
Tab. 14 Hladiny TGF- $\beta$ 1 – skupina zdravých kontrol.....	60
Tab. 15 Výsledky vyšetření buněčné imunity.....	67
Graf 1: Vývoj incidence karcinomu prsu (počet na 100 000 obyvatel).....	11
Graf 2: Vývoj mortality na karcinom prsu (počet na 100 000 obyvatel).....	12
Graf 3: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s ca prsu s pozitivní SLN – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry.....	61
Graf 4: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s ca prsu s pozitivní SLN – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry.....	61
Graf 5: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s ca prsu s negativní SLN – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry.....	62
Graf 6: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s karcinomem prsu s negativní SLN – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry.....	62
Graf 7: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s rizikovými faktory – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry.....	63
Graf 8: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s rizikovými faktory – medián a interkvartilní interval v dynamickém sledování – 3 odběry.....	63
Graf 9: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry.....	64
Graf 10: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry.....	64
Graf 11: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – srovnání hladin významnosti, průměr a směrodatná odchylka průměru.....	65
Graf 12: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – srovnání hladin významnosti, medián a mezikvartilová odchylka.....	65

## POUŽITÉ ZKRATKY

ADH atypická duktální hyperplasie  
AF1, AF2 Aktivání funkce estrogenového receptoru 1, 2  
ALND axilární lymfadenektomie  
BC prs zachovávající operace - segmentektomie  
bFGF basic fibroblast growth factor (bazický fibroblastový růstový faktor)  
CA 15-5 karcinom antigen 15-3  
CEA karcinoembryonální antigen  
c-erbB-2 onkogen/onkoprotein c-erbB-2  
Co-Smad společný mediátor signální dráhy TGF- $\beta$   
CV celkový objem končetiny  
ECT extracelulární tekutina  
DC dendritické buňky  
DNA deoxyribonukleová kyselina  
EDTA kyselina ethylendiaminotetraoctová  
EGF epidermal growth factor (epidermální růstový faktor)  
EGFR epidermal growth factor receptor  
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay (enzymatická imunoesej)  
EORTC European Organisation for Research and Treatment of Cancer  
ER estrogenové receptory  
FKBP12 cytoplazmatický protein (imunofilin), FK binding protein 12  
GS oblast doména v receptoru typu I pro TGF- $\beta$ 1 charakterizovaná sekvencí TTS GSGSG  
HEPES N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonová kyselina  
HLA-DR Hla-D-related antigen  
ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1  
ICT intracelulární tekutina  
Ig imunoglobulin  
IGF-1 inzulin-like growth factor (inzulinu podobný růstový faktor-1)  
IL interleukin  
IRI imunoregulační index  
Ki67 růstový index Ki67  
KRBS Komplexní regionální bolestivý syndrom  
LAP latency-associated peptid  
LFA-1 lymphocyte function-associated antigen-1  
LTBP latent TGF $\beta$ -binding protein  
LU lymfatické uzliny  
M mastektomie  
MF BIA multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza  
NGF nerve growth factor  
NK buňka natural killer (přirození zabijáci)  
p53 gen/protein p53  
PAI-1 inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1  
PET positron emission tomography  
PR progesteronové receptory  
PRA protilátky proti panelu  
RMM radikální modifikovaná mastektomie  
ROLL radioguided occult laesion localisation  
R-Smad receptory regulované proteiny Smad  
RT radioterapie  
S.D. standardní odchylka  
SLN sentinel lymph node  
SLNB biopsie sentinelové uzliny  
Smad protein signální dráhy TGF- $\beta$   
T $\beta$ R-I receptor typu I pro TGF- $\beta$ 1  
T $\beta$ R-II receptor typu II pro TGF- $\beta$ 1  
TCR receptor pro antigen na lymfocytech T  
TGF- $\beta$  transforming growth factor- $\beta$  (transformační růstový faktor- $\beta$ )  
TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 izomerní formy TGF- $\beta$   
TGF beta-1 – Transformační růstový faktor beta-1  
TNM - tumour node metastase klasifikace  
TSP-1 trombospodin 1  
VCAM-1 vascular cell adhesion molecule-1  
VEGF vascular endothelial growth factor  
VLA very late antigen

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma:

“Postižení regionálních lymfatických uzlin u operabilního  
karcinomu prsu a mapování imunitní odpovědi organismu”

vypracoval samostatně. Při práci jsem použil jen prameny,  
které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Praze, 17. června 2008



.....  
MUDr. Jiří Chod

## Poděkování

Rád bych vyslovil poděkování všem, kteří svými vědomostmi, ochotou a časem přispěli ke vzniku této práce.

Především děkuji as. MUDr. Pavlu Strnadovi, CSc. a MUDr. Evě Zavadové, CSc. za odborné vedení a cenné rady, doc. MUDr. Lukáši Robovi, CSc. za vytvoření příznivých podmínek k práci.

V poslední řadě velmi děkuji své manželce a celé své rodině za neutuchající podporu při studiích.

Autor

## 1. Úvod

První popis karcinomu prsu se dochoval z nálezů ve starém Egyptě z roku 1600 před Kristem. Avšak až do konce 19. století byl karcinom prsu stále chápán jako lokální onemocnění. Teprve od třicátých let 20. století se datují práce, které popírají teorii karcinomu prsu jako lokální nemoci a onemocnění začíná být považováno za systémové s převážně lymfogenní progresí. Teorii o vzniku nádoru z epitelových buněk prsu vyslovil až v roce 1940 Virchow. Tyto hypotézy potvrdilo mnoho srovnávacích i experimentálních studií v šedesátých letech 20. století.

Jedinou léčebnou modalitou byla v minulosti radikální chirurgická exstirpace tumoru a přilehlých tkání, která rostla až do tzv. „rozšířené radikální mastektomie“ dle Halsteda (1882). Méně radikální operaci, tzv. modifikovanou radikální mastektomii, která šetří velký prsní sval, provedl poprvé v roce 1948 Patey. Další vývoj ozařovacích technik a přístrojů umožnil zavedení tzv. prs šetřících (konzervativních) výkonů. Tyto konzervativní výkony prováděné za přesně definovaných podmínek mají stejné intervaly přežití jako modifikovaná nebo rozšířená radikální mastektomie (1,2,3).

Karcinom prsu je považován za hormonálně dependentní nádor od roku 1896, kdy byla prokázána regrese metastatického karcinomu prsu po oboustranné ovariectomii (kastraci) (4). V roce 1967 se objevily první zprávy o metodice stanovení obsahu estrogenových receptorů (ER) ve tkáni nádoru prsu



(5). Tento poznatek začal být později využíván k adjuvantní hormonální léčbě karcinomu prsu, když na začátku sedmdesátých let byl do léčebné praxe zaveden antiestrogenní přípravek tamoxifen. Jeho účinek na estrogenový receptor se skládá ze dvou aktivačních funkcí (AF1 a AF2). Tamoxifen inhibuje pouze aktivitu AF2, ale nemá vliv na aktivitu AF1. Toto je zřejmě příčinou, proč tamoxifen v některých tkáních působí jako antiestrogen a v jiných jako estrogen (6). Čisté antiestrogeny totiž inhibují obě aktivační funkce.

Karcinom prsu je způsoben změnou vlastností genetického materiálu somatických buněk, která má za následek deregulaci buněčného dělení a normálního vývoje tkáně. Růst invazivního nádoru je výsledkem mnoha genetických změn, mutací nebo ztrát (delecí) specifického genetického materiálu buňky. Předpokladem pro vývoj karcinomu prsu je aktivace a amplifikace specifických genových souborů – onkogenů, nadměrná a aberantní syntéza (overexprese) růstových faktorů a jejich receptorů se ztrátou kontrolních mechanismů (apoptóza). Významnou genetickou aberaci při vývoji karcinomu prsu představuje ztráta funkce antiproliferačních mechanismů – tumor supresorických genů.

Karcinom vzniká pravděpodobně z jedné buňky, která se adaptuje na lokální prostředí v procesu své klonální evoluce. Na rozdíl od normálních buněk získávají nádorové buňky růstovou výhodu, jejich růst se vymyká kontrole a ztrácejí své specializované vlastnosti. Dosud není zcela objasněno, proč se vysoká incidence karcinomu mléčné žlázy vyskytuje mezi savci jen u několika živočišných druhů (myš, krysa, křeček, pes a člověk).

Klasická teorie kancerogeneze předpokládá přítomnost hyperplastického procesu duktálního epitelu prsu, který je typicky polyklonální. Získáním určité mutace dochází z jednoho buněčného klonu k vývoji neoplazie, která je na začátku svého vývoje monoklonální. Jednou porušený genom buňky ztrácí svou stabilitu a výsledkem je další sekvence mutací v průběhu dělení buněk daného klonu. Většina poruch replikace DNA a mutací není slučitelná se životem buňky, která je mechanismem apoptózy eliminována. Některé buňky však mohou eliminaci uniknout (mechanismy apoptózy též stárnou), buňka přežívá s určitou řadou mutací, které je zapotřebí k získání invazivního a metastatického růstu. Již vyvinuté neoplazie jsou důsledkem dalších genetických defektů a mutací opět typicky polyklonální.

Karcinom prsu je v současné době považován za genetickou aberaci somatických buněk, kterou získávají mnohočetnými mutacemi v průběhu své klonální expanze a výsledkem je nekontrolovaný invazivní a metastatický růst. Přes pokroky v genetickém výzkumu, objevení onkogenů, tumor supresorických genů, hormonálních a růstových faktorů a jejich úlohy v řízení proliferace normální a nádorové tkáně zůstává příčina tohoto onemocnění nejasná. Stále je proto nutno hledat nové markery, které by pomohly zpřesnit diagnostiku karcinomu prsu již v časných stádiích, nejlépe formou screeningu. Optimalizaci léčebného režimu by mohla v budoucnu napomoci kombinace současné terapie s imunoterapií.

## 2. Cíl práce

Vyhledání nových prognostických a rizikových markerů u pacientek s operabilním karcinomem prsu a u pacientek se zvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění, zejména pak zmapování jejich imunitní odpovědi vyšetřením plasmatických hladin TGF-  $\beta$  1 a buněčné imunity.

Vyhodnocení korelace nalezených hodnot s rozsahem onemocnění a ostatními prognostickými markery (věk, velikost primárního tumoru, postižení sentinelové lymfatické uzliny, hladiny tumorových markerů CA 15-3 a CEA, pozitivita/negativita estrogenových a progesteronových receptorů, exprese c-erb-B2, exprese p53 a mitotického indexu Ki67).

### Pracovní hypotézy

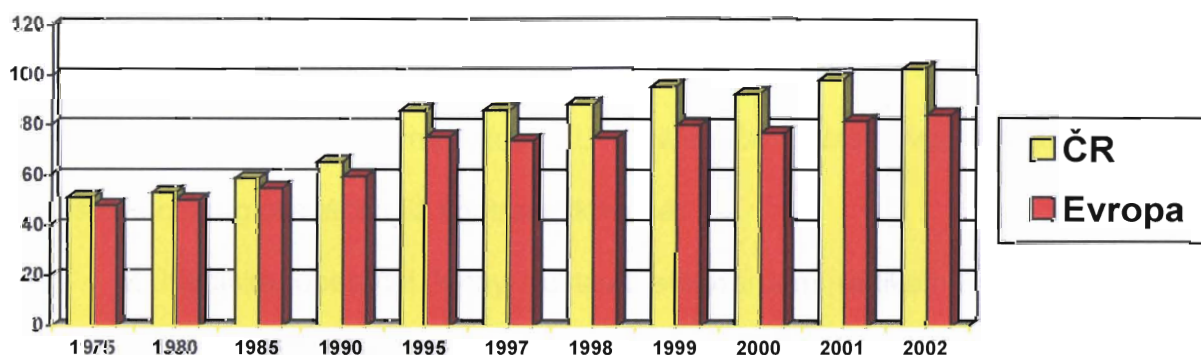
1. U pacientek s karcinomem prsu předpokládáme vyšší hladiny TGF-  $\beta$  1 v porovnání se zdravými kontrolami.
2. U pacientek s karcinomem prsu s pozitivní sentinelovou lymfatickou uzlinou předpokládáme vyšší hladiny TGF-  $\beta$  1 v porovnání s pacientkami s karcinomem prsu s negativní sentinelovou lymfatickou uzlinou.
3. Ve skupině pacientek s karcinomem prsu předpokládáme odchylky v procentuálním zastoupení v jednotlivých subpopulacích lymfocytů, snížení počtu a poruchy maturace dendritických buněk

### 3. Přehled problematiky

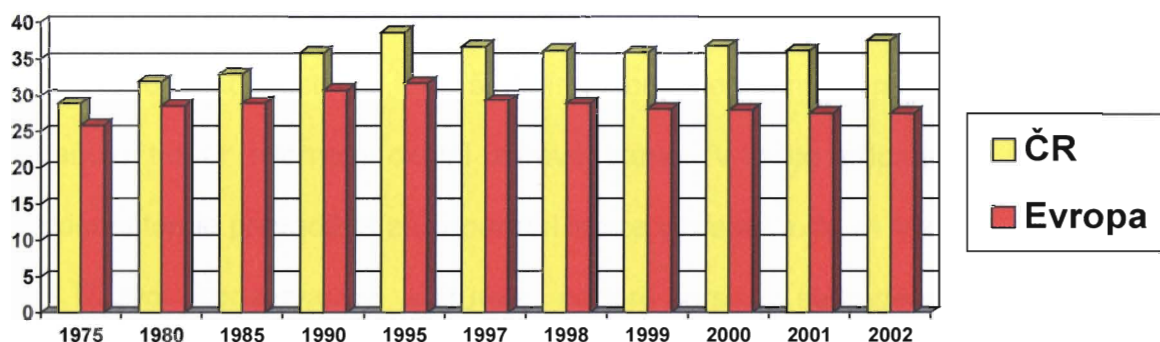
#### 3.1. Chirurgická léčba karcinomu prsu

Karcinom prsu je druhým nejčastějším maligním nádorem u žen a jeho incidence v rozvinutých zemích světa stále stoupá (7). Pod touto diagnózou se rozumí skupina maligních epiteliálních nádorů s invazivním růstem do okolní tkáně a tendencí k metastázování převážně lymfogenní cestou. Histologicky jsou to nejčastěji adenokarcinomy vycházející z terminální duktulo-lobulární jednotky prsní žlázy (8). Incidence onemocnění má rostoucí trend (Graf 1), nicméně mortalita je od roku 1995 prakticky stacionární (Graf 2). Vzhledem k tomu, že v České republice bylo v září roku 2002 zavedeno screeningové mamografické vyšetření u žen ve věku mezi 45 - 69 lety, je pravděpodobné, že bude stoupat záchyt karcinomu prsu v časných stádiích.

Graf 1: Vývoj incidence karcinomu prsu (počet na 100 000 obyvatel, ÚZIS 2004)



Graf 2: Vývoj mortality na karcinom prsu (počet na 100 000 obyvatel, ÚZIS 2004)



Chirurgická léčba je indikována jako primární u karcinomů prsu stadia I/II. Velikost nádoru nad 5 cm většinou nepředstavuje technickou inoperabilitu, avšak z hlediska prognózy nemoci je výhodnější zahájit léčbu chemoterapií. Rovněž u inflamatorního karcinomu je indikována primárně onkologická léčba. Na neoadjuvantní chemoterapii u primárně operabilních malých karcinomů prsu není zatím jednotný názor. Totéž platí pro koncept konzervativního, tj. prs šetřícího, výkonu po neoadjuvantní chemoterapii, která „zmenší“ původně velký nádor na velikost již vhodnou pro lumpektomii. U vzdálených (systémových) metastáz je většinou chirurgická léčba již kontraindikována.

Z hlediska operační léčby zůstává standardem radikální modifikovaná mastektomie (RMM), která představuje snesení prsu včetně pectorální fascie a axilárních lymfatických uzlin v rozsahu I. a II. etáže. Prostá mastektomie (mastectomia simplex), tj. odstranění prsu bez axilární lymfadenektomie, se

používá v některých případech rozsáhlého intraduktálního karcinomu nebo invazivního karcinomu, např. u starých žen s invazivním karcinomem, které mají klinicky negativní nález v axile a kontraindikaci chemoterapie.

Druhou možností je prs šetřící výkon, segmentektomie (BC), který odstraňuje tumor s lemlem okolní zdravé tkáně. V tomto případě je axilární lymfadenektomie prováděna ze separátní incize v přední axilární linii.

Rozvoj konzervativní chirurgie nádorů prsu v sedmdesátých letech minulého století nastal na základě výsledků klinických pokusů ve Spojených státech a Itálii, které prokázaly, že interval přežití po radikální mastektomii, modifikované radikální mastektomii a po konzervativním výkonu v prsu je shodný. V případě BC musí následovat adekvátní radioterapie prsu k profylaxi lokální recidivy, přičemž onkologická bezpečnost tohoto postupu byla prokázána několika významnými studii (9,10,11).

## 3.2. Význam postižení lymfatických uzlin

V současné době se zlepšuje diagnostika časných stádií karcinomu prsu a po zavedení mamografického screeningu v naší republice v roce 2002 pozorujeme další vzestup jejich incidence. Stoupá tedy množství pacientek s malými, primárně dobře operabilními tumory, které by prakticky neměly mít metastázy (12,13). Stav regionálních lymfatických uzlin je totiž jedním z vedoucích a nezávislých prognostických faktorů karcinomu prsu pro určení prognózy a strategie další léčby (14,15).

Průměrná frekvence desetiletého přežití při negativním nálezu nádoru v lymfatických uzlinách (LU) bez ohledu na velikost tumoru se pohybuje okolo 75%. Průměrné pěti a desetileté přežití při postižení jedné až tří LU je 62%, resp. 38% a při postižení čtyř a více LU klesá na 32%, resp. 13%. Vyskytuje-li se metastáza jen v jedné lymfatické uzlině je procento přežití o málo nižší než při negativním nálezu v LU. Je-li postižena jedna LU větší než 2 cm pak je prognóza podobná jako při postižení tří a více LU. Při negativě LU a velikosti nádoru pod 1 cm je frekvence desetiletého intervalu bez recidivy 91% a dvacetiletého intervalu bez recidivy 88%. Nádor velikosti 1–2 cm bez postižení LU má frekvenci desetiletého intervalu bez recidivy 83% a dvacetiletého intervalu bez recidivy 79%.

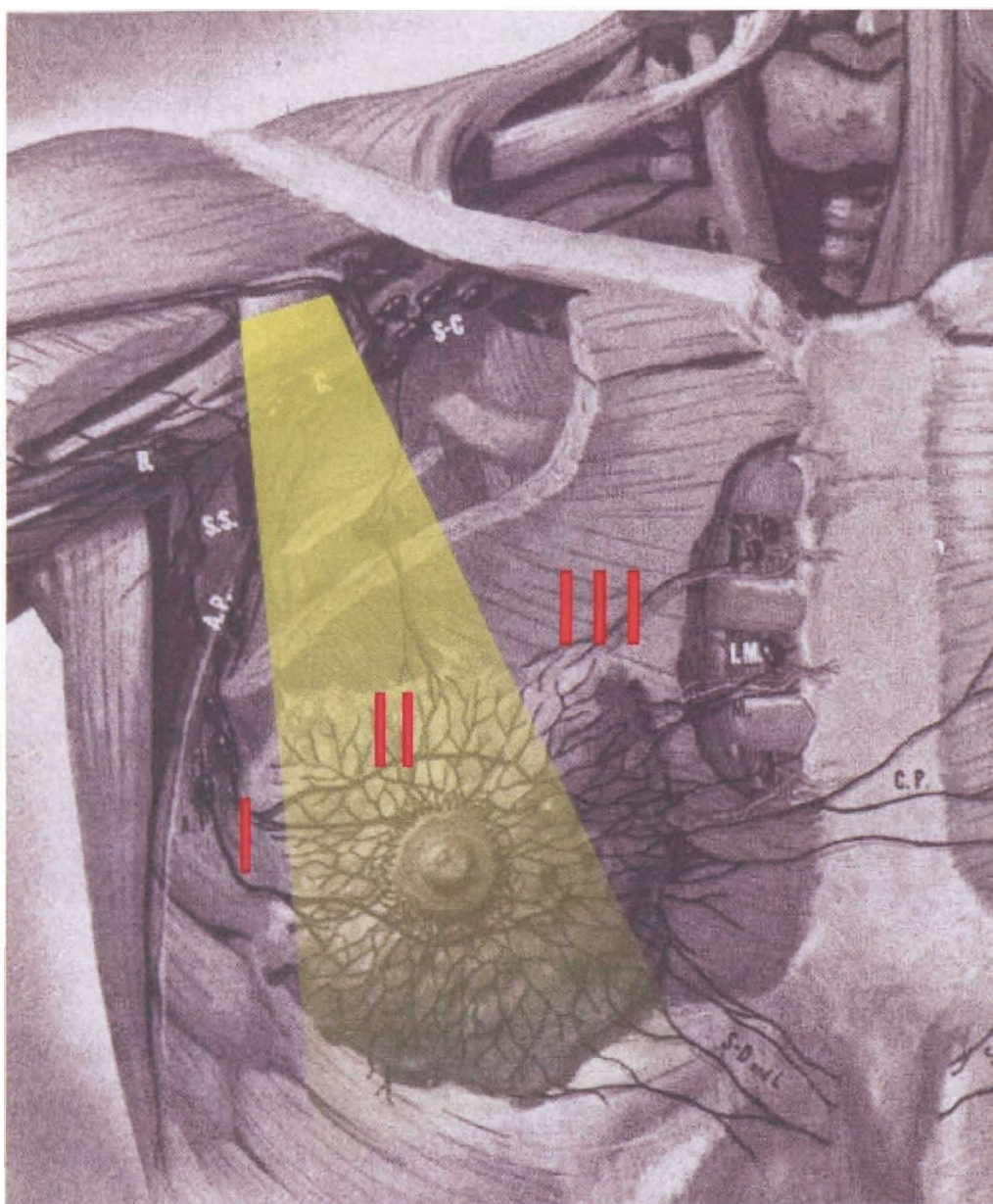
Axilární uzliny rozdělujeme do tří úrovní podle jejich umístění ve vztahu k musculus pectoralis minor (Obrázek 1).

Obr. 1: Anatomické zobrazení 3 skupin axilárních lymfatických uzlin

I. úroveň: uzliny laterálně od m. pectoralis minor

II. úroveň: uzliny za m. pectoralis minor

III. úroveň: uzliny mediálně od m. pectoralis minor





Nezbytnost odstranění regionálních lymfatických uzlin u karcinomu prsu byla prokázána několika studii. Podle postižení lymfatických uzlin zařazujeme onemocnění do stádia podle TNM klasifikace (Tabulka 3, str. 44).

Standardním výkonem u operabilního karcinomu prsu je axilární lymfadenektomie (ALND - axillary lymph node dissection) v I. a II. etáži s minimálním ziskem 10 lymfatických uzlin (LU) (16). Výkony ve třetí etáži byly již na základě klinických studií na většině pracovišť opuštěny. Bylo prokázáno, že odstranění a histologické vyšetření uzlin úrovně I, II dostačuje pro náležité zařazení do TNM stadia, kdy riziko výskytu metastázy, která by „přeskočila“ nižší úroveň je 1,3 - 10 % pro úroveň I, ale jen 0,2 - 0,4 % pro úroveň II (8). Odstranění vnitřních mamárních uzlin neovlivňuje celkové přežití pacientek, ani nemění strategii léčby, a proto k němu nepřistupujeme (17,18).

V případě postižení lymfatických uzlin metastázami (označujeme je jako pozitivní uzliny) je následně indikována chemoterapie (při nálezů aspoň jedné pozitivní uzliny) nebo chemoterapie a radioterapie axily (při nálezů 4 a více pozitivních lymfatických uzlin) (19).

Vliv vlastního odstranění lymfatických uzlin na celkové přežití pacientky nebyl prokázán (Tabulka 1, str. 18) (7,20,21).

Tab. 1: Porovnání jednotlivých léčebných postupů s nebo bez odstranění axilárních lymfatických uzlin z hlediska celkového přežití

metoda/autor	počet pac.	stádium TNM	doba sledování (roky)	léčebné modality	celkové přežití (%)	statistická signifikance
<b>mastektomie vs mastektomie+ALND/RT</b>						
Cleveland	184	I	5	M vs RMM	79 x 66	ne
Groote Schuur	95	I,II	25	RMM vs M	71 x 65	ne
NSABP B-04	1079	N0	25	RM vs M vs M+RT	25 x 26 x 19	ne
Cancer Res. Camp.	2243	I,II	18	M+RT vs M	72 x 69	ne
Manchester trial	714	I	10	M vs M+RT	55 x 62	ne
	308	II	10	RM vs M+RT	35 x 31	ne
<b>BC vs BC+ALND/RT</b>						
Yale	955	I,II	12	BC +/- ALND +/- RT		ne
Institute Curie	332	I,II	15	BC + RT	65	
Guys hospital	258	I,II	20	RM vs BC+RT		ano u T2
Edinburgh	498		12	RM vs M+RT	55 x 45	ano
Overgaard	1708			RM+RT vs RM	54 x 45	ano

RMM - radikální modifikovaná mastektomie

RT - radioterapie

M - mastektomie

ALND - axilární lymfadenektomie

BC - prs zachovávající operace - segmentektomie

Ve světě však stoupá počet pracovišť, která přijala a v praxi aplikuje nový moderní koncept v chirurgii axily - „patient friendly surgery“. Maximálního šetření zdravé tkáně a minimalizace pooperačních komplikací je dosaženo sofistikovanou detekcí a histologickým vyšetřením pouze tzv. sentinelové lymfatické uzliny (SLNB – sentinel lymph node biopsy) (22,23,24). Sentinelová uzlina je spádová uzlina, která je jako první postižena šířením nádorového procesu. Identifikaci sentinelové uzliny lze provést scintigraficky pomocí

radiokoloidu technecia ( $^{99m}\text{Tc}$ ) (Obr. 6, str. 74 a Obr. 9, str. 75) (25) nebo pomocí lymfotropní látky „blue dye“ (Obr. 7, str. 74) (26). Během operace je sentinelová uzlina (Obr. 8, str. 75) odeslána na peroperační histologické vyšetření. Pokud je tato uzlina při peroperačním vyšetření zmrazeného řezu („frozen section“) shledána negativní, tj. bez metastáz, chirurg nepokračuje v další disekci axily. V případě postižení uzliny (Obr. 10, str. 76) operace pokračuje odstraněním axilárních lymfatických uzlin úrovně I a II. Shoda správného zařazení do TNM stádia pomocí této metody byla prokázána několika studiemi (Tabulka 2) (27).

Tab. 2: Přehled metod použitých pro detekci spádové uzliny

metoda/ autor	rok	počet	úspěšnost detekce (%)	senzitivita vyšetření (%)	NPH (%)	falešná negativita (%)	PPH (%)	počet LU	počet poz. LU (%)
<b>BLUE DYE</b>									
Giuliano	1994	174	66	88	94	11,9	96	1,8	38
Nos	2003	324	86	89	95	11	96		
<b>SCINTIGRAFIE</b>									
Krag	1998	443	93	89	96	11,4	97		
Veronesi	1999	376	99	93	94	6,7	97	1,4	41
Mariani	2000	197	97	86	92	13,7	95		
<b>KOMBINOVANĚ</b>									
Morrow	1999	139	86	97			96	1,9	43
Veronesi	2003	257		91	95	8,8	97		
McMasters	2000	562	90	94	98	5,8	98		
Tafra	2001	529	87	87	95	13	96		

NPH - negativní prediktivní hodnota

PPH - pozitivní prediktivní hodnota

LU - lymfatické uzliny

Klasické definitivní histopatologické vyšetření disekovaných uzlin vychází z několika řezů obarvených hematoxylin-eosinem. Většina pacientek s negativitou regionálních lymfatických uzlin (tzn. bez nálezu šíření primárního tumoru) může být efektivně léčena kombinací konzervativního – pro zachovávajícího – chirurgického výkonu a radioterapie.

Avšak u 1-3% žen s negativitou SLNB dle tohoto standardního vyšetření dochází do 5 let k lokální recidivě (28,29,30).

Kritéria, z nichž v současnosti vycházejí indikace léčby, jsou velikost primárního tumoru, stav regionálních lymfatických uzlin, histologický typ nádoru, grade nádorových buněk, stav hormonálních receptorů. Podle těchto kritérií však dosud nelze zcela přesně stanovit prognózu onemocnění. Proto se v současné době stále hledají nové markery, které by co nejdříve objektivně pomohly určit úplný rozsah onemocnění, naplánovat adekvátní terapii a monitorovat úspěšnost její aplikace.

### **3.3. Komplikace chirurgické léčby karcinomu prsu**

Díky časnější diagnóze a účinnější terapii se v poslední době prodlužuje celkové přežití pacientek s tímto zhoubným onemocněním. To obrací zvýšenou pozornost na kvalitu života žen po operaci (31).

Komplikace chirurgické léčby karcinomu prsu lze dle časového kritéria vzniku rozdělit na časně a pozdní.

#### **3.3.1. Časné komplikace**

Mezi časně komplikace, které bezprostředně souvisí s technikou a rozsahem operace, hemostázou a dodržení aseptických kautel, lze zařadit pooperační krvácení, hematom a serom (lymfocysta) v operační ráně a hnisavé komplikace, a to buď primární či sekundární (32,33).

##### **3.3.1.1. Krvácení**

Rozvoj časně pooperačního krvácení závisí na pečlivé hemostáze v průběhu celého operačního výkonu a též na rozsahu operačního výkonu. Čím větší je radikalita operačního výkonu, tím je větší riziko vzniku krvácivé komplikace (34).

##### **3.3.1.2. Serom**

Bezprostředně po výkonu během prvních dnů a týdnů se rozvíjí lymfocysta – serom, zejména po radikálních operacích v disekované oblasti axily, který je přítomen u 100% pacientek. U části pacientek je nutno jej punktovat a odsávat, a to někdy i opakovaně, většinou však do jednoho měsíce po operaci spontánně odezní (35).

### **3.3.1.3. Hnisavé komplikace**

Hnisavé infekce v operační ráně vznikají primárně či sekundárně. Primárně vznikají tehdy, jestliže je rána infikována při operaci samé. Klinicky se tato komplikace projevuje klasickými příznaky zánětu obvykle 4. - 7. den po operaci s průběhem odpovídajícím stavu organismu a virulenci infekčního agens. Okolí sutury je erytematosní, infiltrované, bolestivé spontánně i palpačně, projevuje se celkově sub- až febriliemi. Jakmile dojde ke kolikvaci tkáně, vytvoří se absces s fluktuací. V tom případě je nutno purulentní obsah evakuovat, opakovaně provádět výplachy peroxidem vodíku a abscesovou kavitu drénovat.

Sekundárně vzniká hnisavý proces infekcí hematomu v operační ráně. Infekce je do hematomu zanesena při převazu či proniká per continuitatem z okolní tkáně. Klinické projevy, průběh a ošetření jsou totožné jako u abscesu vzniklého primárně (36).

Prevencí vzniku infekce operační rány je pečlivá hemostáza, přísné dodržení aseptických kautel, chráněné koagulum a drenáž operačního pole (37).

### **3.3.2. Pozdní komplikace**

Mezi pozdní komplikace chirurgické léčby karcinomu prsu řadíme lymfedém, fantom a fantomovou bolest, pooperační neuralgii charakteru interkostobrachiální neuropatie a poruchy hybnosti ramenního kloubu (KRBS - komplexní regionální bolestivý syndrom, syndrom tzv. „zamrzlého ramene“).

### 3.3.2.1. Lymfedém

Nejzávažnější pozdní komplikací po operaci pro zhoubný nádor prsu u žen podstupujících radikální operaci doprovázenou odstraněním axilárních lymfatických uzlin je lymfedém (Obrázek 11, str. 76).

Lymfedém představuje abnormální nahromadění tkáňového moku v intersticiu. Lymfedém byl poprvé jako pooperační komplikace popsán slavným chirurgem W. Halsteadem v roce 1921 (38). Problematika pooperačního otoku horní končetiny byla však donedávna relativně podceňována. Jeho diagnostika je obtížná pro pozvolný rozvoj lymfedému a problematická je někdy návaznost jednotlivých částí léčby pacientek. Většina z nich je totiž dispenzarizována na onkologických pracovištích a jen malá část na pracovišti, které provádělo vlastní operační výkon, a které by tak mohlo lépe sledovat dlouhodobé komplikace chirurgické léčby.

Etiologicky se na objemu vytvořené lymfy podílí několik faktorů, a to zejména hydrostatický tlak krve v kapilárách, onkotický tlak, celkový objem extracelulární tekutiny, dilatace arteriol a konstriktce venul, gravitační hydrostatický tlak, přítomnost extracelulárních osmoticky aktivních metabolitů, permeabilita kapilár.

Podle příčiny vedoucí k nahromadění ECT rozdělujeme lymfedém na primární, který je vrozený a je důsledkem poruchy vnitřního prostředí či regulačních mechanismů a sekundární, který vzniká působením zevních faktorů (39).

Etiologie sekundárního lymfedému je komplexní. Dosavadní teorie, podle které byl stupeň lymfedému přímo závislý na extracelulární koncentraci bílkoviny,

byla nahrazena teorií novou, kdy angličtí autoři dokázali analýzou aspirované extracelulární tekutiny, že naopak čím je nižší koncentrace bílkovin, tím závažnější je lymfedém (40). Pro rozvoj lymfedému je zásadní nejen mechanické přerušení lymfatických cév odstraněním lymfatických uzlin při operaci, ale i porucha inervace artérií a vén, což vede ke zvýšení místního hydrostatického tlaku a tím k hromadění intersticiální tekutiny (41). V oblasti po operaci se v důsledku reparačních změn množí počet kapilár (angiogeneze), čímž se zvětšuje filtrační plocha (42). Mezi další faktory, které přispívají ke vzniku lymfedému patří radioterapie axilárních uzlin, vznik pooperačního hematomu, poruchy hojení rány, prorůstání nádoru do axily a infekce horní končetiny. Ke zvýšenému výskytu přispívá přítomnost seromu v pooperační ráně (43). Velmi důležitým rizikovým faktorem je obezita, která zvyšuje riziko výskytu pooperačního lymfedému (44,45).

Městnáním lymfy se postupně snižuje transportní kapacita lymfatického systému, která způsobí dilataci cév a tím insuficienci chlopní v lymfatických cévách s následným poškozením endotelu. To vede ke zvýšené permeabilitě lymfatických kapilár. Následně dojde k ukládání fibrinu, hypertrofii kolagenních vláken a tím k nevratné sklerotizaci tkáně (41). Ke vzniku lymfedému může dojít nejen na končetině, ale rovněž v prsu nebo i v podkožní tkáni hrudní stěny (46).

Projevy postupně vznikajícího lymfedému jsou rozděleny do několika stádií (46). V prvním stádiu latentního lymfedému je přítomna zvýšená únavnost končetiny a neurčité bolesti, ve druhém stádiu reverzibilního lymfedému jsou symptomy obdobné spolu s diskrétním večerním prosáknutím končetiny. Ve



stádiu třetím dochází již k masivnímu ireverzibilnímu lymfedému s fibrotizací podkoží a omezením hybnosti a ve čtvrtém stádiu eledenfantiázy je omezení hybnosti úplné s monstrózním edémem.

Projevy lymfedému mohou být různorodé stejně tak jako jejich závažnost: pocit těžké ruky, dyskomfort v oblasti končetiny, bolestivost, edém, poruchy hybnosti, recidivující lymfangoitidy, zvýšené riziko vzniku lymfangiosarkomu (47). Neméně důležitý je také kosmetický efekt. Rozvinutý lymfedém totiž stigmatizuje, někdy až vyřazuje pacientku z běžného života.

Faktory, které ovlivňují výskyt lymfedému, jsou zejména typ operace (odstranění celého prsu nebo jen části), typ lymfadenektomie (kompletní axilární disekce v I. a II. etáži, odstranění sentinelové uzliny) a adjuvantní radioterapie (48). Vzhledem k faktu, že lymfedém může vzniknout v průběhu několika let od operace, je důležitým faktorem posouzení incidence rovněž doba sledování pacientek. Výskyt lymfedému se podle dostupné literatury pohybuje mezi 8 - 24 % (49). Většina lymfedémů nevzniká bezprostředně po operaci, ale s latencí měsíců až let po operaci (50,51,52,53).

Existuje několik možností jak zamezit vzniku, popřípadě rozvoji pooperačního lymfedému: změna indikace k lymfadenektomii (určení nerizikových pacientek, u kterých můžeme lymfadenektomii vynechat), rozsah provedené lymfadenektomie (redukce původně prováděné lymfadenektomie všech tří úrovní axilárních lymfatických uzlin na odstranění jen první a druhé úrovně axilárních uzlin, event. provedení detekce sentinelové uzliny) (54,55). Dále lze použít jinou metodu ke stanovení stádia zhoubného onemocnění, jako je

například ultrazvukové vyšetření nebo vyšetření pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) (56), změnit operační techniku (tupá/ostrá disekce tkáně, ponechání dostatku tkáně kolem velkých cév tak, aby nebyly porušeny nervové pleteně (57). Preventivní opatření zahrnují ochranu končetiny na operované straně před poraněním a přetěžováním a včasnou detekci lymfedému.

V současné době lze detekovat lymfedém prostým měřením obvodu končetiny, metodou výtlaku vody, tkáňovou tonometrií, radiojotopovou lymfoscintigrafií, pomocí MRI či MFBIA (mulifrekvenční bioelektrická impedanční analýza) (58).

Rozvinutý lymfedém bohužel nelze vyléčit, je ovšem možné zastavit jeho progresi rehabilitačními metodami, které shrnujeme pod název komplexní dekongestivní léčba. Ta zahrnuje elevaci končetiny, speciální lymfatické masáže, cvičení napomáhající venózní drenáži, plavání a externí komprese zahrnující bandážování a kompresní pumpy. Ve farmakoterapii lze užít benzopyrony, které stimulují proteolýzu, diuretika podporující odvodnění, antibiotika k potlačení infekcí. Pro léčbu pokročilých fixovaných lymfedémů je možné použít některou z chirurgických metod: redukční (liposukce), funkční (vytvoření lymfaticko-venózních anastomóz) (59) nebo provedení transplantace femorálních lymfatických uzlin pomocí mikrochirurgických technik (60). Několik prací se zabývalo sledováním účinků wobenzymu (61) a hesperidinu (62) a cvičení (63,64), nicméně s velmi protichůdnými výsledky.

### 3.3.2.2. Fantom, fantomová bolest

Fenomén fantomu, tj. přetrvávání pocitu a často i bolesti v již chybějícím orgánu či části těla nastupuje někdy ihned po odeznění narkózy, jindy se může objevit až po delší době – týdnech, měsících i létech. Všeobecně přijímanou hypotézou vzniku fantomu nebo fantomové bolesti je porucha tělesného schématu, tj. vědomé i podvědomé představy o vlastním těle a jeho součástech (65).

Bolestivý syndrom po mastektomii postihuje 20-30% operovaných žen. Bolesti mohou být ostré, bodavé, píchavé, svědivé, palčivé, mrazivé s propagací do axily (nervi intercostobrachiales), mediální části paže (n. cutaneus brachii medialis) či na přední plochu hrudníku. Fantomové fenomény se vyskytují u 15-50% mastektomovaných žen, z nichž u 60-70% se jedná o fantomové bolesti.

Fantomová bolest po mastektomii bývá, obdobně jako bolest pahýlová, způsobená lokálními změnami periferní inervace, např. jizvením, zejména po radikálních zákrocích v axile (66). Vysvětlení menší četnosti fantomové symptomatologie po mastektomii vyplývá z menší somatotopické kortikální reprezentace prsů a chybění kinestetické signalizace (67).

Terapie fantomové bolesti je obecně velmi svízelná. Prvním krokem je možnost prevence, léčba bolesti ještě před rozhodnutím o chirurgickém zákroku. V léčbě farmakologické lze volit mezi nesteroidními antirevmatiky (dobrý efekt je popisován až u 74% amputovaných), kromě symptomatické léčby analgetiky a tricyklickými antidepresivy je běžně užívaná terapie antiepileptiky carbamazepinem a gabapentinem. Nechybí též údaje o hypnoterapii a

psychoterapii, kognitivně – behaviorální terapii. Snížení bolesti lze dosáhnout též stimulací centrálních mozkových struktur, nejúspěšnější byla stimulace ventro-kaudálního jádra talamu (80-ti% snížení bolesti u 60% pacientů). Budoucnost představuje neurofyziologický a neurochemický výzkum podkladu všech těchto změn.

### **3.3.2.3. Interkostobrachiální neuropatie**

Poranění nervu během operace má často za následek persistující bolest a tato porucha se nazývá interkostobrachiální neuropatie či pooperační neuralgie, je reprezentantem neuropatické bolesti.

Interkostobrachiální neuropatie nejčastěji vzniká po operacích v oblasti horního hrudníku, např. po mastektomii, thorakotomii a sternotomii. Při radikální modifikované mastektomii s axilární lymfadenektomií v I. a II. etáži jsou často resekovány senzitivní nervy interkostobrachiální, které disekovanou tkání procházejí. To je poté příčinou parestezií nebo anestezie především mediální plochy paže. Prevalence tohoto typu bolesti kolísá od 70-80% v období 1-3 měsíců po operaci a 41-61% v období za 1 rok. Prevalence postmastektomické bolesti se udává vesměs mezi 20-30% v období až 3 roky po operaci (68). Začátek bolesti nemusí být vždy zcela bezprostředně v pooperačním období, ale často je popisován nástup bolesti a její progresse až v průběhu prvního měsíce.

### **3.3.2.4. Syndrom zamrzlého ramene**

Poruchu hybnosti ramenního kloubu (freezing shoulder syndrom, impigement syndrom) po radikální operaci pro karcinom prsu řadíme ke

komplexnímu regionálnímu bolestivému syndromu (KRBS) II. typu, který byl dříve označován jako kauzalgie. Jedná se o syndrom, který se objevuje po poranění nervu. Je přítomna spontánní bolest nebo alodynies/hyperalgie, která nemusí být ohraničena jen na oblast postiženého nervu. V průběhu onemocnění jsou nebo byly zaznamenány edematózní změny, poruchy prokrvení nebo potivosti kůže v bolestivé oblasti.

V klinické symptomatologii dominuje porucha senzorká – bolest je základním symptomem. Zpočátku bývá bolest omezena na postiženou končetinu, může se však i šířit. Při postižení nervu je typický pocit pálení, intenzita je variabilní, často však brání v aktivitě, protože se zhoršuje pohybem (69).

Porucha vazomotorická se projevuje mramorováním kůže, případně jejím zarudnutím, cyanózou, typické jsou změny kožní teploty.

Porucha trofická se běžně vyskytuje až v pozdějších stádiích, řádově po týdnech až měsících po primárním postižení. Tyto změny mohou postihnout kůži (glossy skin), podkoží, ale i svaly, klouby a kosti.

Porucha motorická je nejčastější. Patří k ní svalová slabost, třes, dystonie a další. Oslabení svalové síly nalézáme téměř u všech pacientek. Z klinického hlediska je významné, že rozsah hybnosti a svalová síla jsou omezeny především bolestí.

Základem léčby je farmakoterapie doplňovaná fyzikální terapií a léčebnou rehabilitací podle intenzity bolesti a vývoje klinického obrazu. Lékovou kombinací

je možno nejlépe dosáhnout utišení bolesti, **obnovení** nočního spánku, úpravy mikrocirkulace i vegetativních změn (70).

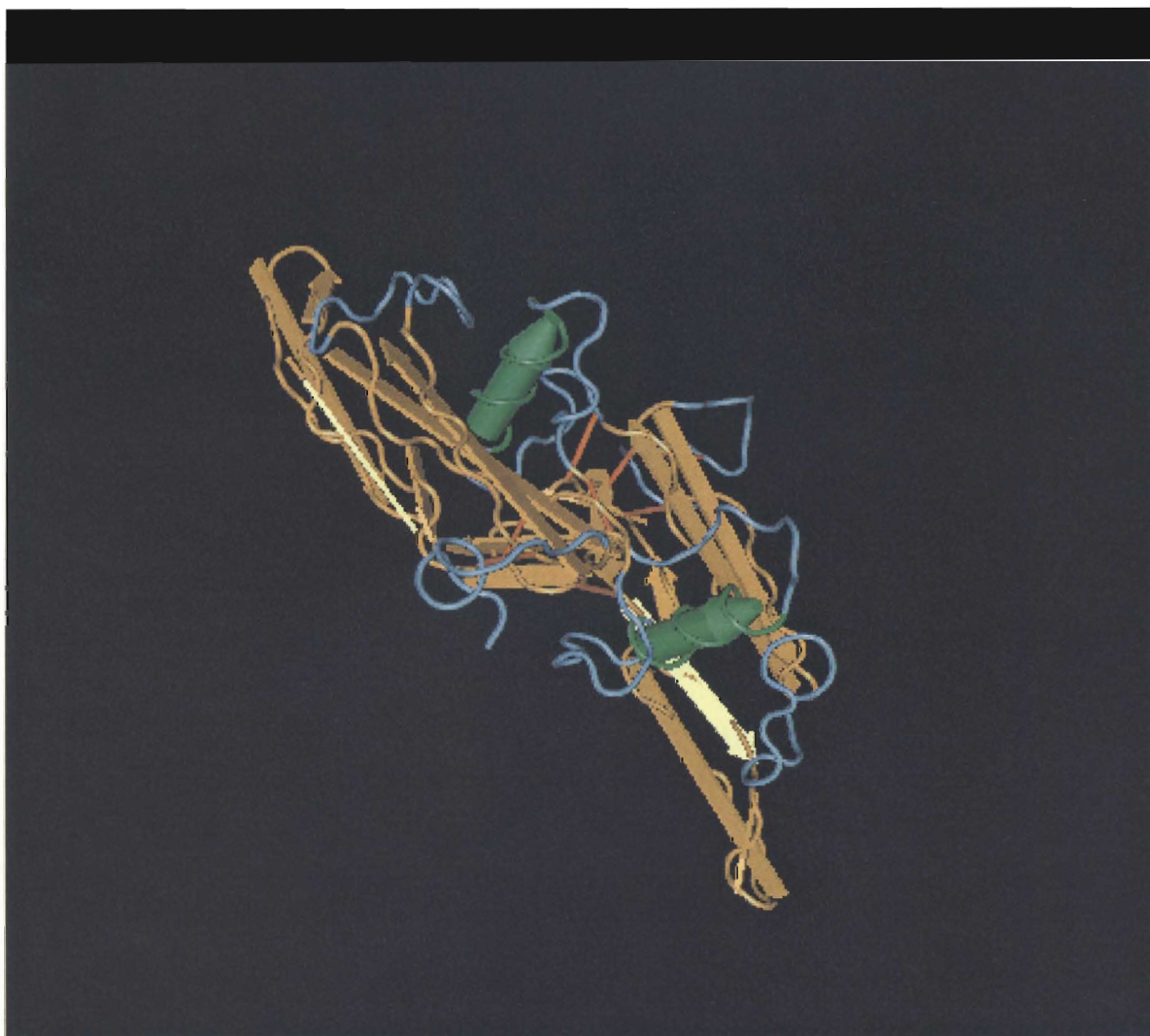
## 3.4. TGF- $\beta$ a jeho význam u karcinomu prsu

### 3.4.1. Biologie TGF- $\beta$

Transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) je členem rodiny růstových a diferenciačních faktorů, které regulují řadu biologických procesů, například buněčný růst a diferenciaci, indukují fibrózu zvýšenou tvorbou složek extracelulární matrix (kolagen IV. typu, laminin, fibronectin) a apoptózu. U člověka bylo dodnes popsáno přes 50 cytokinů rodiny TGF- $\beta$ . Vedle izoform TGF- $\beta$  jsou dalšími ligandami z této rodiny aktiviny, inhibiny, kostní morfogenetické proteiny, růstové a diferenciační faktory (71). Společným rysem aktivních cytokinů rodiny TGF- $\beta$  je forma dimeru (Obrázek 2, str. 32), obdobně jako je tomu u níže popsaných receptorů typu I a II pro tyto cytokiny.

TGF- $\beta$  existuje v pěti izomerních formách, z toho u savců se vyskytují tři izomerní formy TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3). Je syntetizován mnoha typy buněk, jako jsou krevní destičky, makrofágy, lymfocyty, ale i buňkami orgánů, např. buňkami prsní žlázy. Nejvíce zastoupenou izoformou u většiny buněk a tkání je TGF- $\beta$ 1. Izoformy TGF- $\beta$  mají asi 70% vzájemnou homologii a váží se ke stejným receptorům, což dokazuje jejich konzervativní strukturu. Všechny jsou syntetizovány jako prekursory a secernovány ve formě latentního komplexu (molekulová hmotnost 110 kDa). Latentní forma se skládá z homodimeru polypeptidu TGF- $\beta$  (25 kDa), který je nekovalentně svázan do komplexu s glykoproteinem LAP (latency-associated peptid). Tento komplex je neaktivní a není rozeznáván betaglykanem ani dalšími receptory (72).

Obr. 2: Struktura TGF- $\beta$ 1





Ve většině buněk je LAP ještě kovalentně vázán s dalším glykoproteinem LTBP (latent TGF $\beta$ -binding protein). LTBP je důležitý k účinné sekreci a správnému skladování TGF- $\beta$  v extracelulární matrix, k jeho latenci vztah nemá. Ta závisí na přítomnosti LAP. Uvolnění biologicky aktivního dimeru TGF- $\beta$  ze secernované latentní formy TGF- $\beta$  předchází vazbě na povrchové buněčné receptory. K aktivaci TGF- $\beta$  musí být LAP z komplexu proteolyticky odštěpen (72). Fyziologická aktivace latentního TGF- $\beta$  je komplikovaný a zatím jen částečně prozkoumaný proces. Faktory ovlivňující uvolnění TGF- $\beta$  z komplexu mohou být změny pH, změny iontové síly nebo účast proteinu trombospondinu 1 (TSP-1). TSP-1 je velký homotrimerní protein secernovaný mnoha typy buněk, který aktivuje TGF- $\beta$ 1 v pokusech in vitro a částečně i in vivo. Dvě serinové proteázy, plasmin a kathepsin D a adhezivní molekula ze skupiny integrinů  $\alpha\beta$ 6 také aktivují latentní TGF- $\beta$ . Naopak již aktivovaný TGF- $\beta$  může být inhibován lokálními faktory (decorin), které mohou TGF- $\beta$  vázat (72).

Po uvolnění se TGF- $\beta$  váže na receptor RII na povrchu cílové buňky. Receptory pro přenos signálu cytokinů rodiny TGF- $\beta$  jsou transmembránové glykoproteiny na povrchu buněk. Jedná se o kinázy fosforylující serin a treonin. Receptory typu II fosforylují receptory typu I v GS oblasti (doména obsahující sekvenci TTSGSGSG) po aktivaci ligandou, která indukuje tvorbu heteromerního komplexu receptoru typu I a II. Přisun ligandy k receptorům je řízen několika proteiny (betaglykan, endoglin), které jsou také označovány jako typ III receptoru pro TGF- $\beta$ . Betaglykan je v membráně zakotvený proteoglykan, který zvyšuje lokální koncentraci ligandy, a tím její vazbu k receptorům. Toto má význam

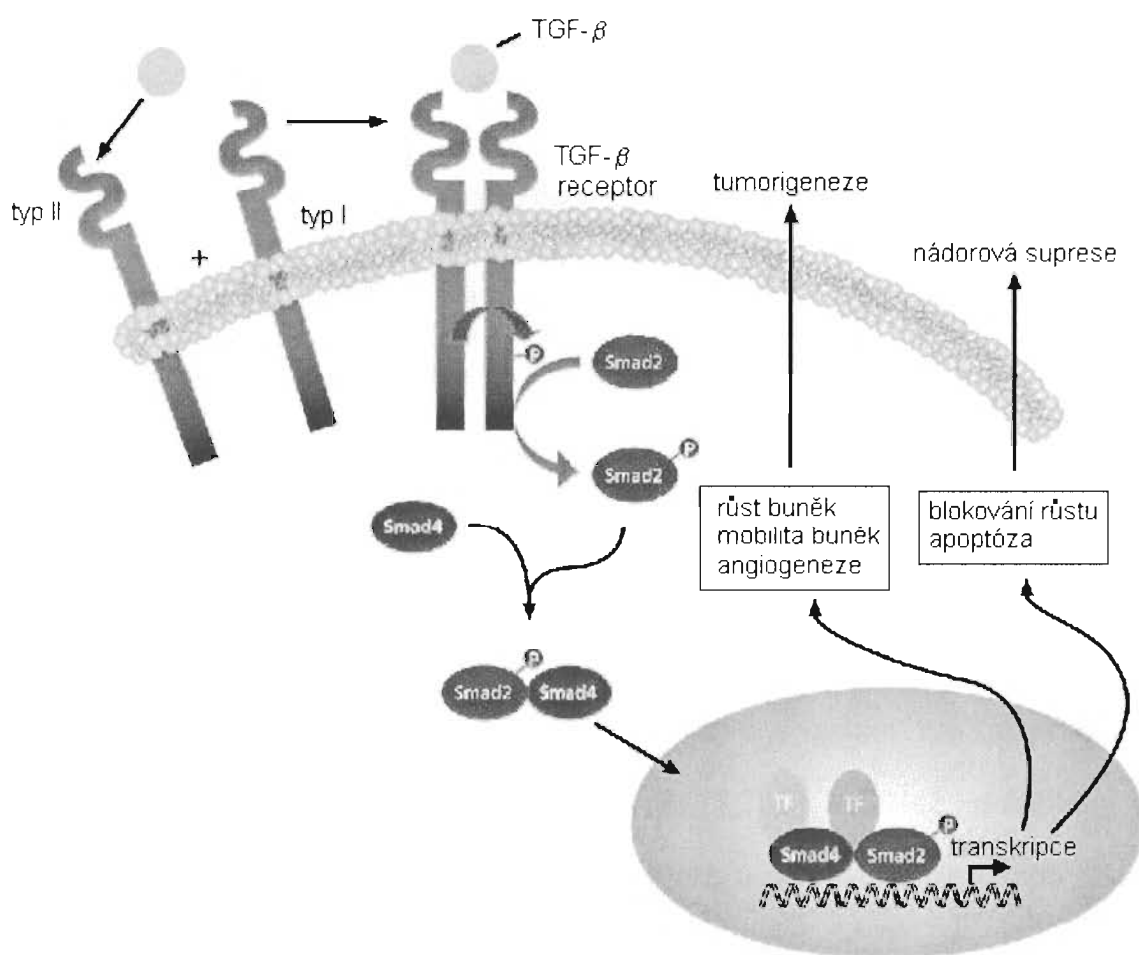
především pro TGF- $\beta$ 2, který má nízkou afinitu vazby k receptorům na rozdíl od TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3. Transmembránový protein endoglin je exprimován převážně na buňkách endotelu a váže TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3, neváže TGF- $\beta$ 2 (72).

Při signalizaci TGF- $\beta$  je nutná spolupráce receptorů. Bylo pozorováno, že receptor typu I není schopen vázat ligandu v nepřítomnosti receptoru typu II, a typ II, který je schopen sám vázat ligandu, nemůže signalizovat bez typu I. Interakce receptorů vede k fosforylaci receptoru typu I. Byly popsány negativní regulátory receptoru v přenosu signálu. Jedná se například o cytoplazmatický protein (imunofilin) FKBP12. V nepřítomnosti ligandy se FKBP12 váže na GS doménu v receptoru typu I (T $\beta$ R-I), a tím blokuje fosforylaci aktivačních míst pomocí receptoru typu II (T $\beta$ R-II). Komplex receptor-liganda a transfosforylace pomocí T $\beta$ R-II vede k uvolnění FKBP12 z T $\beta$ R-I s možností aktivace receptoru (72).

Fosforylací aktivované receptory typu I (dříve označované ALK, „activin receptor-like kinase“) fosforylují proteiny Smad řízené receptory (R-Smad). R-Smad 2 a 3 přenášejí signál od TGF- $\beta$  a váží společný mediátor (Co-Smad), kterým je protein Smad 4. Fosforylované R-Smad tvoří heteromerní komplex s Co-Smad. Vzniklý komplex se přemístí do jádra a zde reguluje transkripci cílových genů po přímé vazbě k DNA nebo po interakci s jinými proteiny vázajícími se k DNA, transkripčními faktory, koaktivátory nebo korepresory transkripce (73). Smad tak představují celou skupinu molekul podílejících se na nitrobuněčném přenosu signálu z receptoru přímo do buněčného jádra, kde pak

stimulují expresi genů odpovědných za příslušnou funkci, kterou může být jak stimulace, tak i inhibice růstu (73) (Obrázek 3):

Obr. 3: Účinky TGF- $\beta$

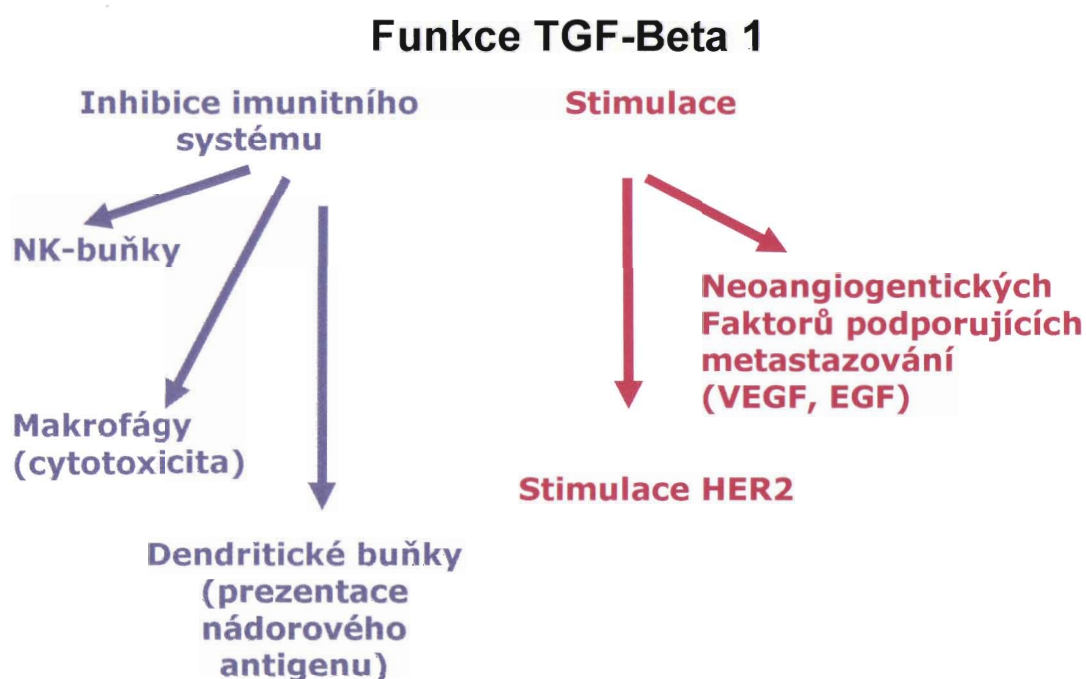


TGF- $\beta$  tak ovlivňuje proliferaci a diferenciaci různých typů buněk v těle a může tedy sloužit jako růstový aktivátor i růstový inhibitor (74,75). Tento potentní cytokin ovlivňuje diferenciaci buněk, tvorbu kostí, angiogenezu, hematopoezu, progresi buněčného cyklu, buněčnou migraci a produkci extracelulární matrix. S produkcí extracelulární matrix souvisí i jeho profibrogenní účinek, který je zajišťován následujícími mechanismy: stimulací syntézy většiny molekul, které vytvářejí extracelulární matrix (fibronektin, kolagen, proteoglykany), blokádou degradace matrix (moduluje expresi tkáňových metaloproteináz a tkáňových inhibitorů proteolytických enzymů), expresí integrinových molekul a tím regulací adheze buněk a autoindukcí vlastní produkce TGF- $\beta$ . Výsledkem těchto mechanismů je pak depozice extracelulární matrix. TGF- $\beta$  působí jako chemoatraktant pro fibroblasty a stimuluje rovněž replikaci nezralých fibroblastů. Má tedy úlohu jak ve vývoji tkání a hojení ran, tak v patogenezi nadprodukce vaziva, kdy působí proskleroticky. V imunitním systému má TGF- $\beta$  roli především imunosupresivní. Inhibuje proliferaci T i B lymfocytů i NK buněk, vývoj cytotoxických makrofágů, potlačuje produkci imunoglobulinů a moduluje produkci některých cytokinů. Tím, že působí jako chemoatraktant pro makrofágy a neutrofile, má i účinek prozánětlivý (76,77,78). Má též důležitou roli v neuroprotektivních procesech: stimuluje syntézu nervového růstového faktoru (nerve growth factor - NGF) v buněčné kultuře astrocytů in vitro a zabraňuje degradaci a buněčné smrti izolovaných neuronů v buněčné kultuře.

### 3.4.2. Význam TGF- $\beta$ u karcinomu prsu

Funkce TGF- $\beta$ 1 jsou spojeny jak s normálním vývojem mléčné žlázy, tak i s její kancerogenezí. TGF- $\beta$ 1 za fyziologických podmínek in vivo reguluje normální vývoj duktálního stromu a alveolárních struktur mléčné žlázy. TGF- $\beta$ 1 zřejmě též reguluje masivní buněčnou smrt a restrukturalizaci mléčné žlázy v průběhu její postlaktanční involuce.

Obr. 4: Funkce TGF- $\beta$ 1



Kromě těchto fyziologických funkcí existuje mnoho dokladů o tom, že TGF- $\beta$ 1 se významně podílí též na některých aspektech iniciace a progresu karcinomu prsu.

Dle současných poznatků TGF- $\beta$ 1 zabraňuje proliferaci

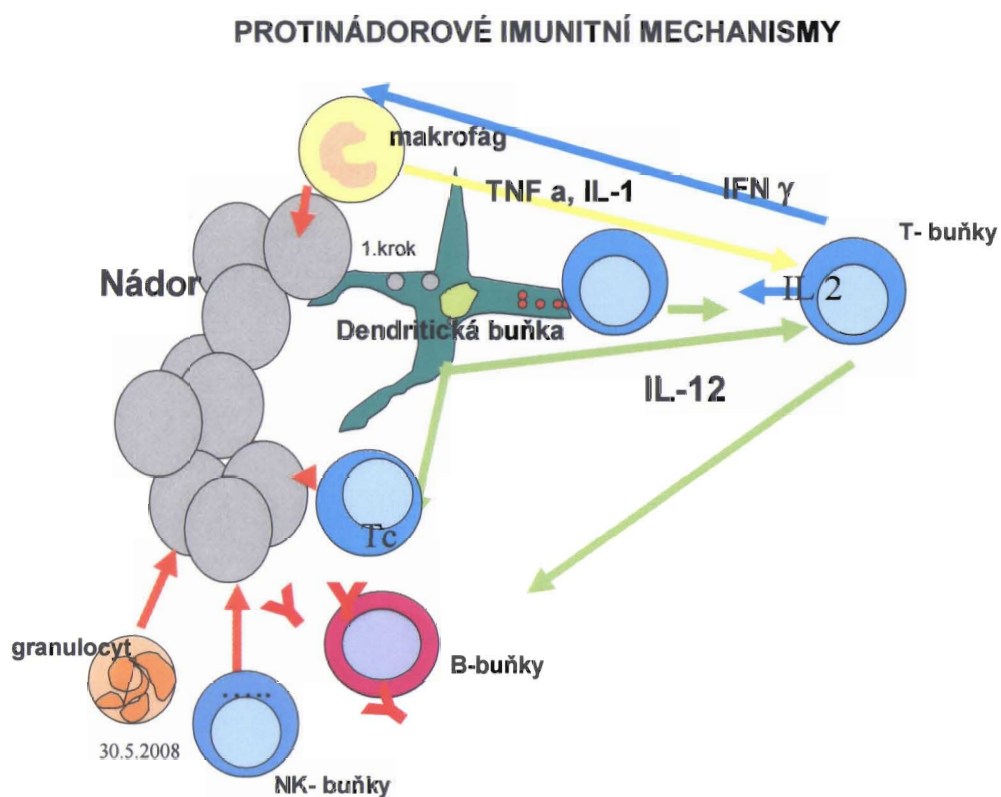
tumorových buněk, protože TGF- $\beta$ 1 je *in vitro* velmi účinným inhibítozem růstu pro téměř všechny epiteliální buňky. TGF- $\beta$ 1 je schopen též indukovat apoptózu, podporovat stárnutí a negativně regulovat angiogenezu, tedy procesy spojené se supresí tumoru. Ovšem některé buněčné klony získané z invazivních karcinomů prsů jsou rezistentní k antiproliferativním efektům TGF- $\beta$ 1 *in vitro* a nedávají léčebnou odpověď na podávání TGF- $\beta$ 1. Navíc po ztrátě sensitivity k TGF- $\beta$ 1 může autokrinní produkce buněk tumoru podporovat tumorigenezu (79,80,81,82,83,84). To je známo u pokročilých stadií karcinomů, u nichž je častější nález vysokých hladin TGF- $\beta$ 1. Ty jsou spojeny s vyšší invazivitou a rychlejší progresí nemoci, například u maligního melanomu či karcinomu ovaria, prostaty a tlustého střeva (85,86,87,88,89,90). Vysoké hladiny tedy zřejmě zvýhodňují růst tumorových buněk, mají proonkogenní efekt. Jejich přímým účinkem je stimulace motility a invazivity, nepřímo napomáhají progresi tumoru podporou vaskularizace a bloádou mechanismů imunitního dozoru (blokáda T<sub>H</sub> lymfocytů a NK buněk) (91,92,93,94,95).

V řadě studií byl zkoumán prognostický význam hladin TGF- $\beta$ 1 u karcinomu prsu (96,97,98). Ve většině těchto studií byly produkováné hladiny TGF- $\beta$ 1 vyšetřovány pomocí imuno-histochemické eseje Northern-blot analýzou. Přestože některé studie prokázaly, že vyšší hladiny TGF- $\beta$ 1 byly spojeny s větší agresivitou chování tumoru a horším přežitím nemocných, jiní autoři naopak nenašli korelaci mezi progresí nemoci a poruchou imunity indukovanou TGF- $\beta$ 1.

### 3.5. Změny buněčné imunity u karcinomu prsu

Buněčná imunita hraje důležitou úlohu v obraně proti nádorům. Pokud je abnormalita nádorových buněk imunitním systémem rozpoznána, mohou se na boji proti nim podílet v zásadě všechny hlavní imunitní mechanismy, nespecifické (neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK-buňky) i specifické (B, T lymfocyty, dendritické buňky).

Obr. 5: Mechanismy protinádorové imunity



Porucha adekvátní a účinné prezentace nádorových antigenů je zřejmě hlavní příčinou selhávání imunitní obrany proti nádorům. Podle současných názorů může totiž imunitní reakce proti nádorové buňce vzniknout jen tehdy, jsou-li nádorové antigeny prezentovány T-lymfocytům (99,100,101). Tuto funkci antigen prezentujících buněk mají dendritické buňky, které exprimují na svém povrchu maturační marker CD 83. Nemají-li tento maturační marker, nejsou schopny antigen efektivně prezentovat a následně aktivovat T-buňky. Ty jsou schopny po úspěšné antigen prezentaci nádorovou buňku efektivně usmrtit. Tuto cytotoxickou aktivitu mají především CD 8 lymfocyty (102,103,104).

Je však známo několik mechanismů, jimiž se nádorové buňky mohou vyhnout nádorové imunitě. Mezi nejdůležitější patří například produkce faktorů inaktivujících T - lymfocyty (solubilní formy nádorových antigenů odvržené s povrchu, cytokiny s inhibičním účinkem - TGF- $\beta$ , IL-10) či faktorů přímo inhibujících funkce nebo životnost dendritických buněk (105).



## **4. Materiál a metodika**

### **4.1. Charakteristika sledovaného souboru žen**

V rámci výzkumu bylo vyšetřeno celkem 132 pacientek léčených v letech 2003-2006 na Gynekologicko-porodnické klinice 2. LF UK v Praze. Jednalo se o pacientky splňující následující kriteria:

1. rizikové faktory ca prsu (pozitivní rodinná anamnéza, hormonální substituční terapie, atypická hyperplázie, nezhoubné tumory prsu, významná fibrózní mastopatie)
2. operabilní karcinom prsu:
  - velikost primárního tumoru byla menší nebo rovna 10 mm v průměru (T1a,b dle klasifikace TNM) s negativními regionálními lymfatickými uzlinami (N0)
  - velikost primárního tumoru byla menší nebo rovna 10 mm v průměru (T1a,b) s pozitivními regionálními lymfatickými uzlinami (N1,2)
  - velikost primárního tumoru byla větší 10 mm a menší než 5 cm v průměru (T1c, T2 dle klasifikace TNM) s negativními regionálními LU (N0)
  - velikost primárního tumoru byla větší 10 mm a menší než 5 cm v průměru (T1c, T2 dle klasifikace TNM) s pozitivními regionálními LU (N1,2)

Vylučovací kriteria:

1. velikost primárního tumoru rovna 5 cm nebo větší
2. absolvování neoadjuvantní léčby (radioterapie či chemoterapie) pro

karcinom prsu

U všech pacientek bylo provedeno standardní vyšetření, tzn. odběr rodinné a osobní a gynekologické anamnézy, klinické palpační vyšetření, mamografie či sonografie prsů, při diagnóze karcinomu prsu též stanovení plasmatických hladin tumorových markerů CA 15-3 a CEA. Pacientky s rizikovými faktory byly pečlivě klinicky monitorovány ve zkrácených intervalech 3-6 měsíců.

U nálezů suspektních z malignity byla verifikace charakteru tumoru provedena buďto již před operací histopatologickým vyšetřením materiálu odebraného core-cut biopsií či při otevřené biopsii prsu peroperačním vyšetřením odebraného biologického materiálu zmrazeným řezem (frozen section).

Při nálezů malignity byla vždy provedena adekvátní operace - segmentektomie či modifikovaná radikální mastektomie. Mezi pacientkami s operabilním karcinomem prsu byla věnována velká pozornost zejména malým karcinomům do velikosti 1 cm, které jsou primárně dobře konzervativně operabilní a mají velmi nízkou frekvenci postižení regionálních lymfatických uzlin (LU) (106). Při exstirpaci nehmatných lézí byla využita metoda hook-wire (léze je pod sonografickou kontrolou označena zavedením ocelového vodiče) či technika ROLL (radioguided occult lesion localisation) (107,108). Při této metodě je nehmatná léze 18 - 20 hodin před operací označena radioaktivním izotopem technecia ( $^{99m}\text{Tc}$  Senti-scint, MEDI-Radiopharma Ltd., H) a následně exstirpována za navigace scintilační sondou (Neoprobe 2000, Johnson & Johnson, USA) při minimálním poškození zdravé tkáně. Současně byla u všech pacientek provedena v různém rozsahu exenterace axilárních lymfatických uzlin.

V případech, kde nebylo primárně podezření na postižení axilárních uzlin, byla při dodržení konceptu maximálního šetření zdravé tkáně nejprve provedena detekce sentinelové lymfatické uzliny, nejčastěji za navigace scintilační sondou, případně po užití lymfotropního barviva (Bleu Patenté V, Guerbet, F). Sentinelová uzlina byla též peroperačně vyšetřena (frozen section) a při jejím postižení maligním procesem byla připojena kompletní disekce axilárních lymfatických uzlin v I. a II. etáži. Exstirpované sentinelové lymfatické uzliny byly následně vyšetřeny patologem jak standardním postupem po obarvení hematoxylinem-eosinem v parafínovém bloku, tak výběrově též na přítomnost mikrometastáz.

Histopatologické vyšetření tumorů a lymfatických uzlin bylo hodnoceno dle TNM klasifikace pro karcinom prsu platné v roce 2004 (Tabulka 3, str. 44). Stupeň malignity tumoru byl klasifikován dle gradingového systému Elstona a Ellise (109), rozdělujícího tumory na grade I (dobře diferencovaný), grade II (středně diferencovaný) a grade III (špatně diferencovaný).

Tab. 3: TNM klasifikace nádorů prsu (platná v době výzkumu)

**T- Primární nádor**

TX	Primární nádor nelze posoudit
T0	Žádné známky primárního nádoru
Tis	Karcinom in situ, Pagetova choroba bradavky bez prokazatelného tumoru
T1	Nádor 2 cm nebo méně v největším průměru
T1mic	S mikroinvazí 0,1 cm nebo méně v největším průměru
T1a	Větší než 0,1 cm, ale ne více než 0,5 cm v největším průměru
T1b	Větší než 0,5 cm, ale ne více než 1,0 cm v největším průměru
T1c	Větší než 1,0 cm, ale ne více než 2,0 cm v největším průměru
T2	Nádor větší než 2,0 cm, ale ne více než 5,0 cm v největším průměru
T3	Nádor větší než 5,0 cm v největším průměru
T4	Nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením na stěnu hrudní nebo kůže
T4a	Šíření na hrudní stěnu
T4b	Edém (včetně peau d'orange), ulcerace kůže prsu nebo satelitní kožní metastázy
T4c	Jak 4a tak 4b dohromady
T4d	Zánětlivý (inflamatorní) karcinom

**N - Regionální mízní uzliny**

NX	Regionální mízní uzliny nelze posoudit (např. již byly dříve odstraněny)
N0	Žádné metastázy v regionálních mízních uzlinách
N1	Metastázy v pohyblivých stejnostranných mízních uzlinách
N2	Metastázy ve stejnostranných mízních uzlinách, které jsou fixované k sobě navzájem nebo k okolním strukturám
N3	Metastázy ve stejnostranných mízních uzlinách podél arteria mammaria interna

**M - Vzdálené metastázy**

MX	Přítomnost vzdálených metastáz nelze posoudit
M0	Nejsou vzdálené metastázy
M1	Vzdálené metastázy

## **4.2. Metodika vyšetření hormonálních receptorů a růstových indexů**

### **4.2.1. Tumorový marker CA 15-3**

CA 15-3 je marker diferenciačního typu definovaný na podkladě dvou monoklonálních protilátek. Je to glykoprotein, který je produkován především karcinomy mammy, ev. dalšími adenokarcinomy. Patří k základním markerům pro sledování vývoje onemocnění pacientek s karcinomem prsu od r.1985. Stanovení CA 15-3 detekuje vysoce glykosylovanou transmembránovou molekulu polymorfni epiteliální mucin (PEM), nazývaný rovněž MUC1, kódovaný genem Muc1 (1q21 chromosom). Extracelulární doména tohoto proteinu o molekulové hmotnosti asi 300 – 450 kDa je tvořena O-glykosylovanými opakovanými sekvencemi 20 aminokyselin. Je známa struktura jeho molekuly, kdy každá opakovaná jednotka tvoří úsek vysoce imunogenní sekvence aminokyselin (prolin, asparagin, threonin, arginin).

Úloha CA 15-3 dosud není vyjasněna. Pravděpodobně se účastní vazby na adhezivní molekuly typu ICAM-1 (intercelulární adhezivní molekula-1). Tato vazba může být zodpovědná za usnadnění metastazování nádoru nebo za potlačení protinádorové odpovědi aktivovaných lymfocytů.

Vyšetření CA 15-3 v séru patří k základní technice pro monitorování nemocných s karcinomem prsu (110). Výše jeho hladin umožňuje sledovat a matematicky hodnotit dynamiku změn jeho koncentrací pro odhad vývoje onemocnění, které často předchází diagnostické zobrazovací metody. Jeho koncentrace obvykle koreluje s hmotou nádoru. Nekolísá během ovulačního

cyklu. Diskriminační hranice zdravých žen je 30 kU/l, maligní proces v prsu zvyšuje výrazně jeho sérovou hladinu. U nemocných s ca mammae s parciální remisí je možno pozorovat i přetrvávající vyšší hodnoty.

Metody stanovení lze rozdělit do dvou kategorií podle užitých monoklonálních protilátek. Soupravy se dvěma protilátkami mají první z nich proti peptidu, druhá protilátka je namířena proti determinantě na sacharidové části molekuly (původní RIA firmy Centrocór, protilátky 115 D8, DF3). Při stanovení s jedním typem záchytné i značené protilátky je detekován epitop na peptidové složce molekuly (B27.29). Protilátky DF3 a B27.29 jsou namířeny proti stejnému epitopu.

Vyšetření hladin tumorového markeru CA 15-3 bylo prováděno turbidimetricky (radioligand binding), v souladu s doporučením EORTC.

#### **4.2.2. Tumorový marker CEA**

CEA, popsáný r. 1965, je onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů s pravděpodobnou rolí v procesu buněčné adheze. CEA patří do imunoglobulinové supergenové rodiny, která sestává z 29 genů umístěných na chromozomu 19, z nichž 18 je aktivně transkribováno. Produkty jsou jak komplexní molekuly vyskytující se na buněčné membráně, tak i extracelulární molekuly s velice rozdílnými funkcemi. Exprese těchto molekul na povrchu nádorových buněk, která může vést k narušení nádorové struktury, pak může usnadňovat jejich migraci a motilitu, tj. tvorbu metastáz. CEA se vyskytuje především u adenokarcinomů.

Pro karcinom mléčné žlázy je CEA **markerem** druhé volby (po CA 15-3) (111). Většina méně agresivních nádorů **tento** protein produkuje. Invazivní duktální karcinomy, které spolu s invazivními lobulárními karcinomy představují hlavní podíl mammárních nádorů, však nevykazují jeho expresi u více než 40 % nemocných.

V séru dospělých zdravých osob se jeho hladina obvykle pohybuje pod koncentrací 5 ug/l (v závislosti na typu diagnostické soupravy). Výrazné zvýšení (až do 10 ug/l) je možno pozorovat u kuřáků (v závislosti na počtu vykouřených cigaret), ev. u alkoholiků. V průběhu maligního procesu je produkován CEA nádorovou tkání, jeho hladiny se výrazně zvyšují především ve vztahu k celkové hmotě nádoru. Imunochemická stanovení využívají jako kalibrátor WHO standard č. 73/601.

### **4.2.3. Hormonální receptory**

Stav hormonálních receptorů, zejména estrogenového, ukazuje závislost dané tkáně, resp. buňky, na hormonálním prostředí. V normální tkáni prsu jen poměrně malé procento buněk (cca 20-30%) vykazuje pozitivitu hormonálních receptorů. V průběhu kancerogeneze získávají některé typy vývojových stadií karcinomu (atypická duktální hyperplasie- ADH a karcinom in situ – CIS) vysoké hodnoty exprese estrogenových receptorů, které permanentní aktivací buněčného růstu mohou přispívat k další progresi tumoru. S pokračující dediferenciací tumorových buněk a rozvojem invazivity však vzniká řada různých více či méně funkčních mutací - variant estrogenového receptoru. Obecným

důsledkem těchto mutací je neschopnost ER vázat estrogen, což vede opět ke ztrátě hormonální senzitivity nádoru. Tento stav se tedy při analýze hladin ER projeví jako estrogen-receptor-negativní (112). Izolovaná pozitivita hormonálních receptorů není specifickým markerem kancerogeneze, ale napomáhá určení biologické aktivity tkáně a její senzitivity na hormonální vlivy. Ztráta receptorového obsahu buňky epitelu prsní žlázy či jeho mutace je jednou z příčin ztráty diferenciací buňky a hormonálního podílu řízení jejího dělení (113,114,115,116).

Tvorba progesteronového receptoru (PR) je indukována estrogény, které zvyšují koncentraci progesteronového receptoru ve tkáni, a zvyšují tak tkáňovou odpověď na účinky progesteronu. Přítomnost PR znamená tedy funkční stav estrogenového receptoru a je ukazatelem stavu estrogenové signální transdukce (117). Avšak účinky progesteronu, progesteronových receptorů ve tkáni prsu a jejich vztah ke kancerogenezi nejsou dosud zcela objasněny.

Vyšetření koncentrace hormonálních receptorů, estrogenového (ER) a progesteronového (PR) bylo provedeno v řezech z parafinových vzorků tkáně imunohistochemicky pomocí monoklonálních protilátek, kitem ER/PR firmy Immunotech. Aktivita (exprese receptorů) byla udávána jako procento buněk vykazujících pozitivitu reakce mezi protilátkou a antigenem.



#### 4.2.4. Protein c-erbB-2

C-erbB-2 onkoprotein (též ERB-2 či HER2/neu) je produktem onkogenu c-erbB2 nebo-li HER2/neu, který byl lokalizován na 17. chromozómu v oblasti 17q21. Jeho amplifikace (tvorba mnohočetných kopií genu) se vyskytuje v cca 30% všech vyšetřovaných vzorcích lidských karcinomů prsu a jeho nadprodukce (overexprese) v cca 40% případů. Až 70% intraduktálních komedonových karcinomů vykazuje expresi proteinu c-erbB-2, což předpokládá úlohu tohoto genu v etiologii vzniku duktálního nádorového histotypu. In vitro a v pokusech na zvířatech byla prokázána ústřední role onkoproteinu c-erbB-2 v procesu transformace kancerogeneze (118,119,120,121,122). C-erbB-2 vykazuje totiž strukturální homologii s receptorem epidermálního růstového faktoru (EGFR). Amplifikace HER2/neu stimuluje v nádorových buňkách produkci epidermálního růstového faktoru – EGF (epidermal growth factor), který vazbou na svůj receptor dále zvyšuje proliferaci buněčné populace. EGFR je glykoprotein, jehož overexprese je spojena s rezistencí na hormonální léčbu a s horší prognózou. Množství EGFR na membránách buněk karcinomu prsu inverzně koreluje s koncentrací estrogenového receptoru a bývá spojeno s hormonální necitlivostí nádoru (123).

Aktivita C-erbB-2 onkoproteinu byla stanovena v parafinových řezech pomocí imunizovaného králičího c-erbB2 onkoproteinu a hodnocena pomocí kitu Hercep Test firmy DAKO (Specification Sheet A 0485).

#### **4.2.5. Onkoprotein p53**

Tento protein s antiproliferační aktivitou je produktem genu p53, který se nachází na krátkém raménku chromozomu 17 v pozici 17p13.1. Gen p53 monitoruje integritu genomu. Za normálních okolností buňka s genotoxickým poškozením setrvává v G1 fázi cyklu, dokud nedojde k opravě DNA či k apoptóze. Právě tento proces je řízen aktivitou genu p53 a jeho produktem, proteinem p53. Gen p53 chrání buňku před vstupem do S fáze, dokud není poškození DNA opraveno (124,125). Při mutacích genu p53 může buňka uniknout apoptóze a dochází tak k fixaci mutace v dceřiné buňce. Přibližně 30% karcinomů prsu vykazuje mutace p53, které souvisí s jejich agresivitou (ztráta exprese ER). Normální buňky prsu produkují protein p53 v imunohistochemicky nedetekovatelných množstvích. Pouze proteiny mutované, které mají delší poločas, lze detekovat.

Ke stanovení proteinu p53 byla použity tkáňové řezy fixované formalínem a zalité parafínem. Byla použita myší monoklonální protilátka proti lidskému p53 proteinu firmy DAKO (DAKO Specification Sheet, M 7001).

#### **4.2.6. Proliferační index Ki-67**

Ki-67 antigen je jaderný protein, který je přítomen v průběhu všech aktivních fází buněčného cyklu (G1, S, G2 a M fáze). Opustí-li buňka buněčný cyklus (G0 fáze) či v průběhu procesů opravy DNA je Ki-67 antigen rychle degradován a není detekovatelný (126).

Ve tkáňových řezech fixovaných formalínem a zalitých parafínem byla detekována proliferační aktivita duktálního epitelu pomocí myší monoklonální protilátky proti lidskému Ki-67 antigenu získaného z klonu MIB-1 firmy DAKO. Úroveň proliferace byla hodnocena jako procento buněk vykazujících pozitivitu reakce protilátky proti antigenu – exprese Ki-67 (DAKO Specification Sheet, M 7240).

### 4.3. Metodika vyšetření TGF- $\beta$ 1

Ke stanovení plazmatické hladiny TGF- $\beta$  1 byla použita následující metodika. Periferní žilní krev byla od pacientek odebírána standardní metodou v objemu 2-4 ml do zkumavek s antikoagulační látkou EDTA a následně centrifugována po 10 minut při 3000 ot/min. Další dva odběry byly provedeny s odstupem 3 a 6 měsíců od operace. Získaná izolovaná plazma byla skladována při  $-70^{\circ}\text{C}$  do doby provedení vlastní eseje. Pro srovnání hladin bylo odebráno 27 zdravých kontrol.

Plazmatické hladiny TGF- $\beta$ 1 byly stanovovány pomocí enzymoimunochemické metody ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Vzorky musely být nejprve acidifikovány, aby došlo k aktivaci přítomného TGF- $\beta$ 1 (původně v inaktivní formě s nutností konformace proteinu - odštěpení LAP „latency associated peptid“). Toto bylo provedeno přidáním 0,1 ml 2,5 N kyseliny octové s 10 M ureou k 0,1 ml vzorku. Po důkladném promíchání a 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byly vzorky neutralizovány pomocí 2,7 N NaOH s 1 M HEPES (pH 7,2-7,6). Vzorky tak byly připraveny ke stanovení celkového TGF-

$\beta 1$  (aktivní + latentní formy). Do 15 minut následovala vlastní esej založená na principu „sandwichové“ techniky ELISA. K měření TGF- $\beta 1$  byla použita firemní souprava pro kvantitativní stanovení koncentrací aktivovaného lidského TGF- $\beta 1$  od firmy R&D Systems, Abingdon, United Kingdom.

U této techniky je použita plastová destička, která je potažena TGF- $\beta 1$  rozpustným receptorem typu II, který váže imunoreaktivní TGF- $\beta 1$  (tj. TGF- $\beta 1$  po aktivaci). Do jamek na destičce se pipetuje 200 $\mu$ l standardů a aktivovaných vzorků a jestliže je přítomen TGF- $\beta 1$ , tento se naváže na receptor v průběhu 3 hodinové inkubace. Po trojnásobném promytí se přidá do každé jamky 200  $\mu$ l enzymaticky značené monoklonální protilátky specifické pro TGF- $\beta 1$  (konjugát), která se během 1,5 hodinové inkubace naváže na TGF- $\beta 1$ , které se navázalo v průběhu první inkubace.

Následuje opět trojnásobné promytí jamek, poté se do každé jamky přidá 200 $\mu$ l substrátu. Během 20 minutové inkubace se objeví zbarvení úměrné množství TGF- $\beta 1$  navázaného na začátku. Reakce se zastaví přidáním 50  $\mu$ l stop solution do každé jamky a do 30 minut se změří barevná intenzita. Standardní křivka pro TGF- $\beta 1$  byla vytvořena pomocí standardů rekombinantního lidského TGF- $\beta 1$  proteinu 2000, 1000, 500, 250, 62,5 a 31,25 pg/ml. Detekční limit metody je 7 pg/ml.

#### 4.4. Metodika vyšetření buněčné imunity

Složky buněčné imunity byly u pacientů vyšetřeny z nesrážlivé krve pomocí průtokové cytometrie s použitím FITC a PE značených monoklonálních protilátek. Byly vyšetřeny povrchové markery CD3, T-lymfocyty, CD 16/56, NK buňky, poměr CD4/CD8 HLA-DR s použitím příslušných isotypových kontrol.. Funkční dendritické buňky byly identifikovány pomocí průtokové cytometrie jako buňky, které neexprimují znaky T buněk, B buněk, monocytů, granulocytů a NK buněk. To znamená, že dendritické buňky byly CD3-, CD19-, CD20-, CD14-, CD11b-, CD16-, CD56- negativní, ale zároveň exprimující HLA-DR. U dendritických buněk byla dále analyzována koexprese třetího znaku CD 83. Měření bylo provedeno na cytometru FACSCALIBUR od firmy Becton Dickinson.

#### 4.5. Metodika statistického zpracování výsledků

Statistické srovnání hladin TGF- $\beta$ 1 (pg/ml) jednotlivých skupin pacientek bylo provedeno pomocí dvouvýběrového neparametrického Mann-Whitney U-testu. Ve skupině pacientek s karcinomem jsme se soustředili zejména na rozdělení podle positivity či negativity sentinelové uzliny, hladiny TGF- $\beta$ 1 jsme srovnávali se skupinou s rizikovými faktory a též se skupinou zdravých kontrol.

Rozdíly hladin u jednotlivých pacientek byly hodnoceny pomocí Wilcoxonova párového testu.

## 5. Výsledky

### 5.1. Vyhodnocení histopatologických kritérií, tumorových markerů a růstových indexů

Do zkoumaného souboru bylo zařazeno celkem 132 pacientek. Z nich bylo 106 s karcinomem, a to 90 s duktálním, 13 s lobulárním, a u tří pacientek byly zachyceny méně časté histologické typy – 1x smíšený duktolobulární, 1x papilární a 1x kribriformní karcinom. 26 pacientek bylo s rizikovými faktory, benigními tumory (fibroadenom, hamartom, phyllodes tumor) či fibrózní mastopatií.

Postižení sentinelové lymfatické uzliny u pacientek s karcinomem prsu bylo prokázáno u 30 z nich. Z toho 4 pacientky lze klasifikovat dle velikosti tumoru jako T1a, 2 jako T1b (do 10mm), 24 pacientek mělo tumor odpovídající T1c či T2 (větší než 10 mm a menší než 50mm). V této skupině byla provedena konzervativní operace prsu (exstirpace tumoru či segmentektomie ) v 10 případech.

Pacientek s karcinomem, u nichž byla provedena identifikace a disekce sentinelové lymfatické uzliny s negativním histologickým nálezem, bylo 76. Z nich 36 mělo tumor T1a,b a 40 tumor T1c a T2. V této skupině byla provedena konzervativní operace prsu ve 47 případech.

Pozitivita estrogenových receptorů byla u pacientek s karcinomem prsu prokázána v 77%, v 55% pozitivita progesteronových receptorů. U 8% pacientek bylo pozitivní vyšetření proteinu c-erbB-2. Tumorový marker CA 15-3 byl pozitivní v 15%, CEA v 3%, Ki-67 v 19 %, exprese p53 v 19%.

Rozdělení pacientek dle sledovaných znaků souboru (TNM klasifikace, grade, radikalita operace, věk, CA 15-3, CEA, ER, PR) je v tabulkách č. 4-10:

Tab. 4: Velikost tumoru (T, mm)

Skupina	T				Celkem
	1a	1b	1c	2	
SLN negat.	16	20	29	11	76
SLN pozit.	4	2	14	10	30
<b>Celkem</b>	20	22	43	21	106

Tab. 5: Postižení axilárních lymfatických uzlin (N)

Skupina	N			Celkem
	0	1	2	
SLN negat.	71	4	1	76
SLN pozit.	0	29	1	30
<b>Celkem</b>	71	33	2	106

Tab. 6: Přítomnost vzdálených metastáz (M)

Skupina	M			Celkem
	0	1	X	
SLN negat.	64	1	11	76
SLN pozit.	22	0	8	30
<b>Celkem</b>	86	1	19	106

Tab. 7: Zralost tumoru (G)

Skupina	Grade			Celkem
	1	2	3	
SLN negat.	23	39	14	76
SLN pozit.	7	14	9	30
Celkem	30	53	23	106

Tab. 8: Rozsah operačního výkonu na prsu

Skupina	Konzervativní	Radikální	Celkem
SLN negat.	47	39	76
SLN pozit.	10	20	30
Celkem	57	59	106

Tab. 9: Věk (pre-, postmenopausa)

Skupina	Premenopausa	Postmenopausa	Celkem
Rizik. faktory	16	10	26
SLN negat.	18	58	76
SLN pozit.	5	25	30
Celkem	39	93	132



Tab. 10: Další sledované znaky souboru

	proměnná	min	max	průměr	směr. odchylka	medián
<b>Premenopausa</b>						
<b>Rizik. faktory</b>	Věk (roky)	22	49	36.2	9	33
<b>SLN negativní</b>	Věk (roky)	30	49	40.7	5,8	41
	CA 15-3 (kU/l)	0	34.7	19	9,8	21,3
	CEA (ug/l)	0	9,74	1,1	1,3	0.6
	LU pozit.	0	0	0	0	0
	Počet LU	0	11	3,8	3,4	2
	ER (% pozit.)	0	90	44	45.1	40
	PR (% pozit.)	0	90	65	43.6	85
<b>SLN pozitivní</b>	Věk (roky)	38	49	45	4,4	46
	CA 15-3 (kU/l)	0	61.8	25,9	32.5	37,7
	CEA (ug/l)	0	0.5	0.2	0.3	0
	LU pozit.	1	6	2,4	2,1	2
	Počet LU	2	12	7,2	4,4	9
	ER (% pozit.)	0	80	33.3	41.6	20
	PR (% pozit.)	0	90	45	63.6	45
<b>Postmenopausa</b>						
<b>Rizik. faktory</b>	Věk (roky)	51	61	55.6	3,6	55.5
<b>SLN negativní</b>	Věk (roky)	51	82	61.9	8,6	59
	CA 15-3 (kU/l)	0	67.4	18	12,8	17,5
	CEA (ug/l)	0	97	4,1	15,7	0.7
	LU pozit.	0	5	0.2	0.9	0
	Počet LU	0	22	4	3,9	3
	ER (% pozit.)	0	100	67.3	35.2	80
	PR (% pozit.)	0	100	48.5	40.1	60
<b>SLN pozitivní</b>	věk	50	75	59.4	7,5	59
	CA 15-3	0	47.5	19,6	13	17,3
	CEA	0	3,1	1,2	0.9	1,1
	LU pozit.	1	25	2,9	5	1
	Počet LU	1	25	12,7	7,1	13
	ER	0	100	40.9	37,7	40
	PR	0	90	31.6	31,1	30

## 5.2. Vyhodnocení hladin TGF- $\beta$ 1

Hladiny TGF- $\beta$ 1 byly signifikantně vyšší u pacientek s karcinomem prsu, a to jak s pozitivní (medián 15403 pg/ml,  $p < 0.001$ ), tak i s negativní sentinelovou uzlinou (medián 13511 pg/ml,  $p < 0.001$ ) než u zdravých kontrol (medián 3983 pg/ml).

Hladiny TGF- $\beta$ 1 byly signifikantně vyšší u pacientek s karcinomem prsu než u pacientek s rizikovými faktory (medián 9610 pg/ml). Tento rozdíl byl vyšší u pacientek s pozitivní sentinelovou uzlinou (medián 15403 pg/ml,  $p < 0.001$ ) než u pacientek s negativní (medián 13511 pg/ml,  $p < 0.05$ ) sentinelovou uzlinou.

U pacientek s postižením sentinelové uzliny byla hladina TGF- $\beta$ 1 signifikantně vyšší než u pacientek s negativní sentinelovou uzlinou (medián 13511 pg/ml,  $p < 0,05$ ). Byl pozorován rozdíl v hladinách TGF- $\beta$ 1 v průběhu sledování, ale tento rozdíl nebyl signifikantní u jednotlivých pacientek (dle Wilcoxonova párového testu).

Nebyl nalezen rozdíl mezi skupinami v žádném jiném hodnoceném znaku (velikost tumoru, grade, metastázy, rozsah operace, věk, CA 15-3, CEA, ER, PR, proteinc-erbB-2, onkoprotein p53, proliferační index Ki67).

U žádné z pacientek jsme vzhledem ke krátké době sledování nebyli schopni hodnotit korelaci s dobou přežití.

Výsledky a statistické zhodnocení hladin TGF- $\beta$ 1 ve sledovaných skupinách jsou uvedeny v tabulkách č. 11-14 a grafech č. 3-12:

Tab. 11.: Rizikové faktory (n= 26)

Odběr	I	II	III
Minimum	4401	3335	2878
25% percentil	4984	5120	4288
Medián	9610	9491	6691
75% percentil	13371	11147	12685
Maximum	16881	13043	21940
Mezikvartilová odchylka	4194	3014	4199
Průměr	9593	8513	9018
Směrodatná odchylka	4290	3402	6763
Směrodatná odchylka průměru	1357	1134	2391
Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	6524	5899	3364
Horní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	12662	11128	14673

Tab. 12: SLN negativní (n= 76)

Odběr	I	II	III
Minimum	1351	2798	3500
25% percentil	9445	9007	6278
Medián	13511	15526	9691
75% percentil	16500	24401	18690
Maximum	42171	112081	70437
Mezikvartilová odchylka	3528	7697	6206
Průměr	14432	20670	17264
Směrodatná odchylka	8406	20394	18607
Směrodatná odchylka průměru	1201	3550	2942
Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	12018	13439	11313
Horní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	16847	27902	23215

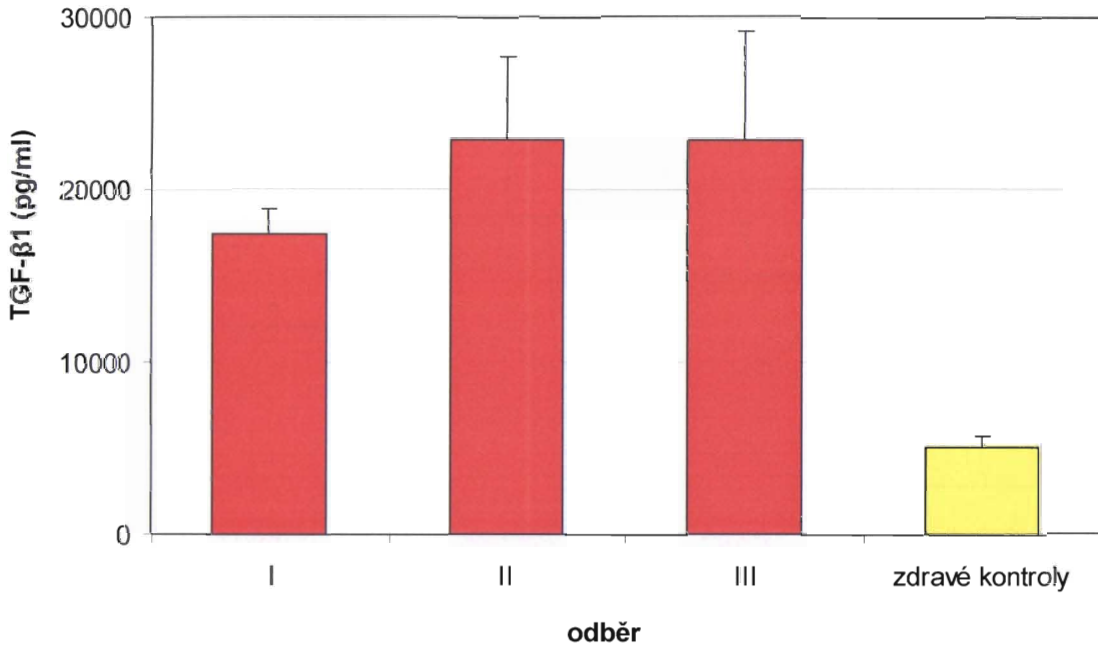
Tab. 13: SLN pozitivní (n= 30)

Odběr	I	II	III
Minimum	8540	5611	5949
25% percentil	13569	10166	8515
Medián	15403	15912	14531
75% percentil	19504	36724	30426
Maximum	33708	70731	77379
Mezikvartilová odchylka	2968	13279	10956
Průměr	17438	22904	22876
Směrodatná odchylka	6593	18636	21877
Směrodatná odchylka průměru	1474	4812	6315
Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	14352	12584	8976
Horní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	20523	33225	36776

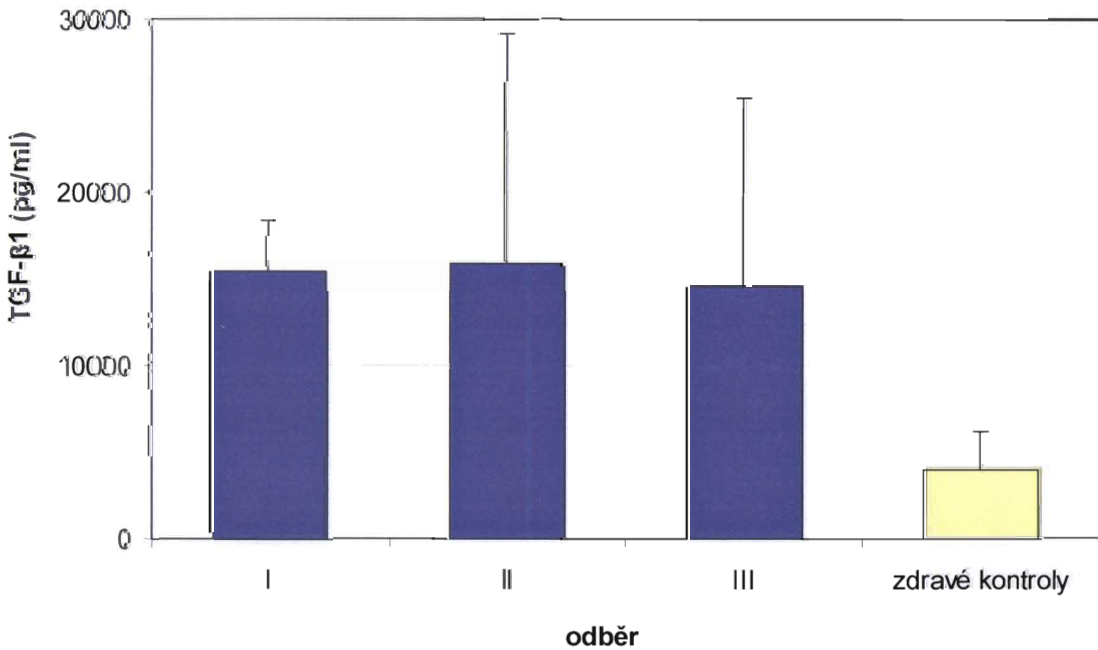
Tab. 14: Zdravé kontroly (n=27)

Minimum	1230
25% percentil	2460
Medián	3938
75% percentil	6958
Maximum	12410
Mezikvartilová odchylka	2249
Průměr	5123
Směrodatná odchylka	3265
Směrodatná odchylka průměru	628
Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	3832
Horní mez 95% intervalu spolehlivosti průměru	6414

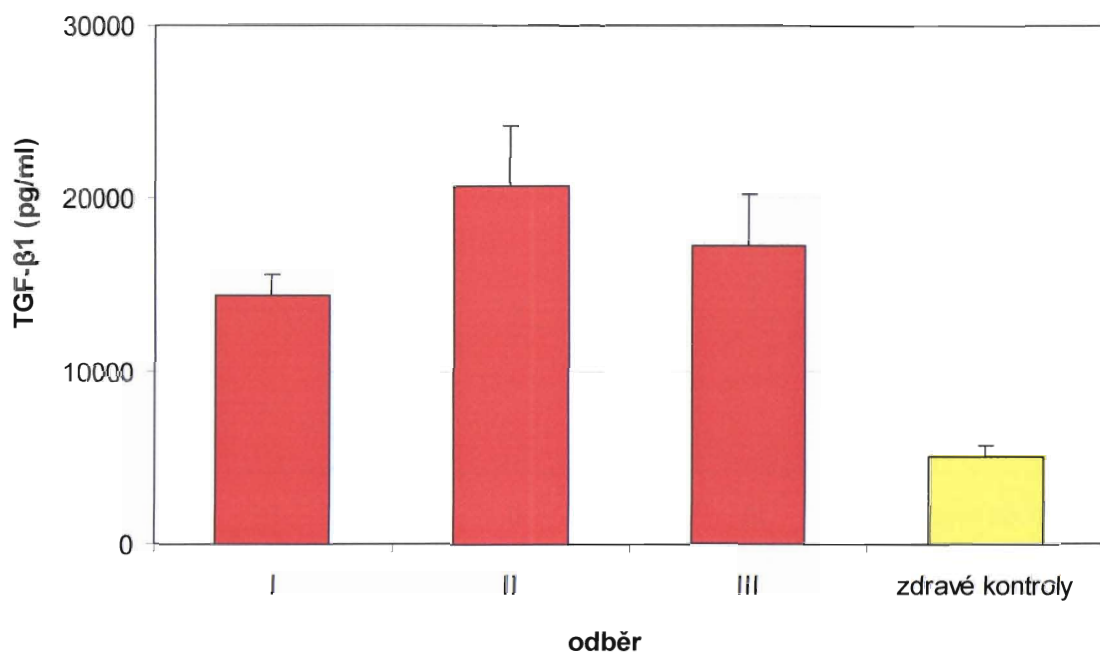
Graf 3: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s karcinomem prsu s pozitivní sentinelovou uzlinou – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry



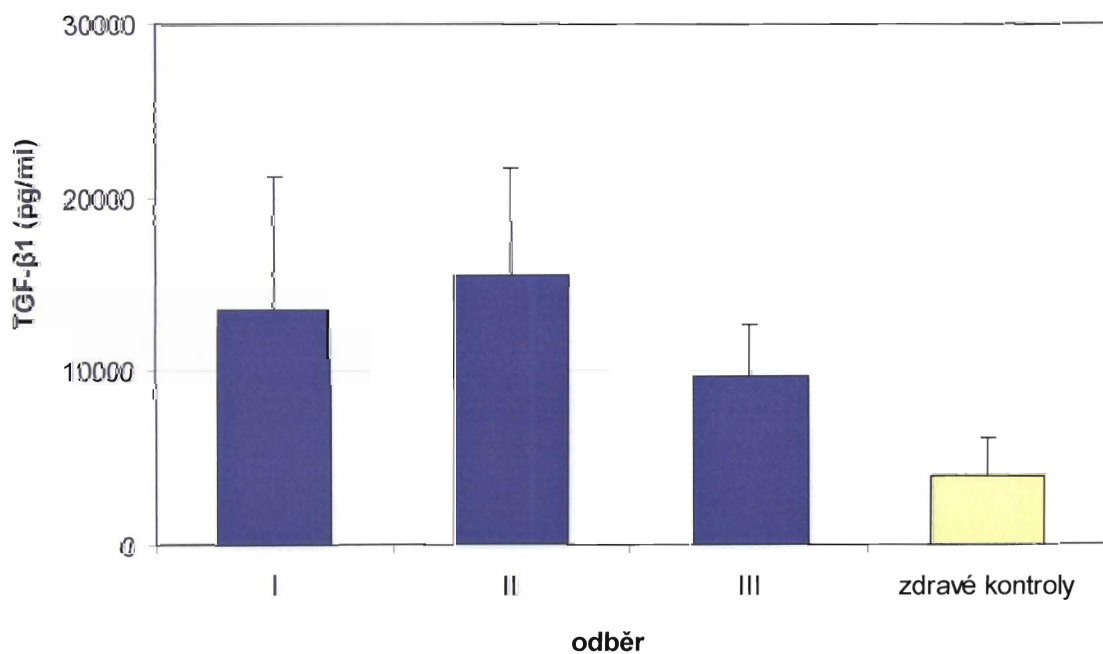
Graf 4: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s karcinomem prsu s pozitivní sentinelovou uzlinou – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry



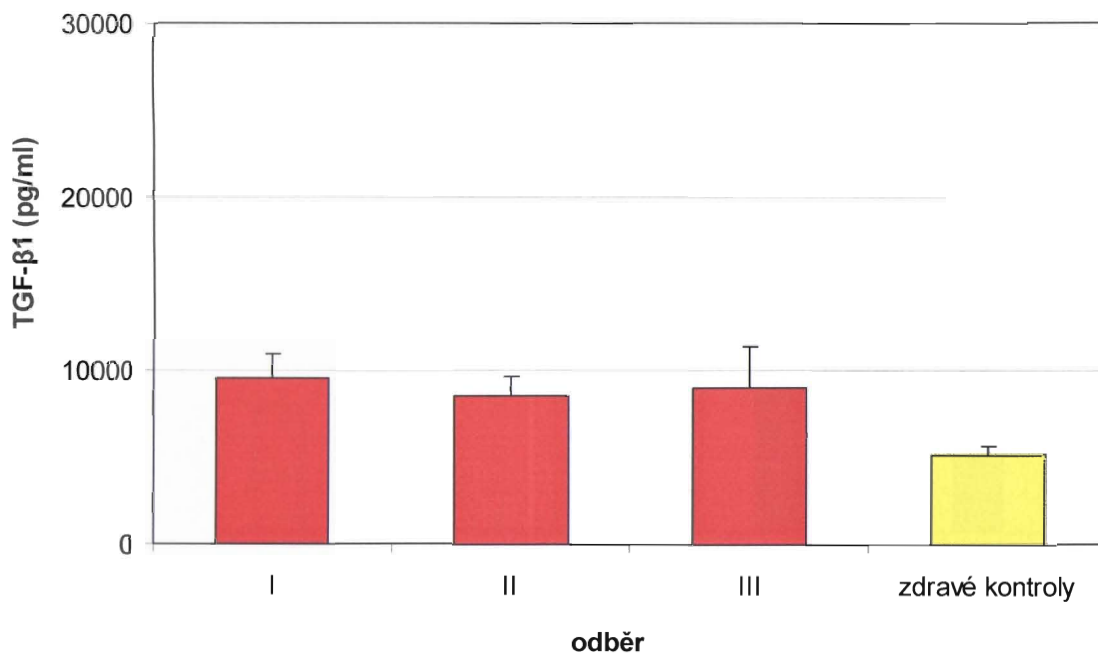
Graf 5: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s karcinomem prsu s negativní sentinelovou uzlinou – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry



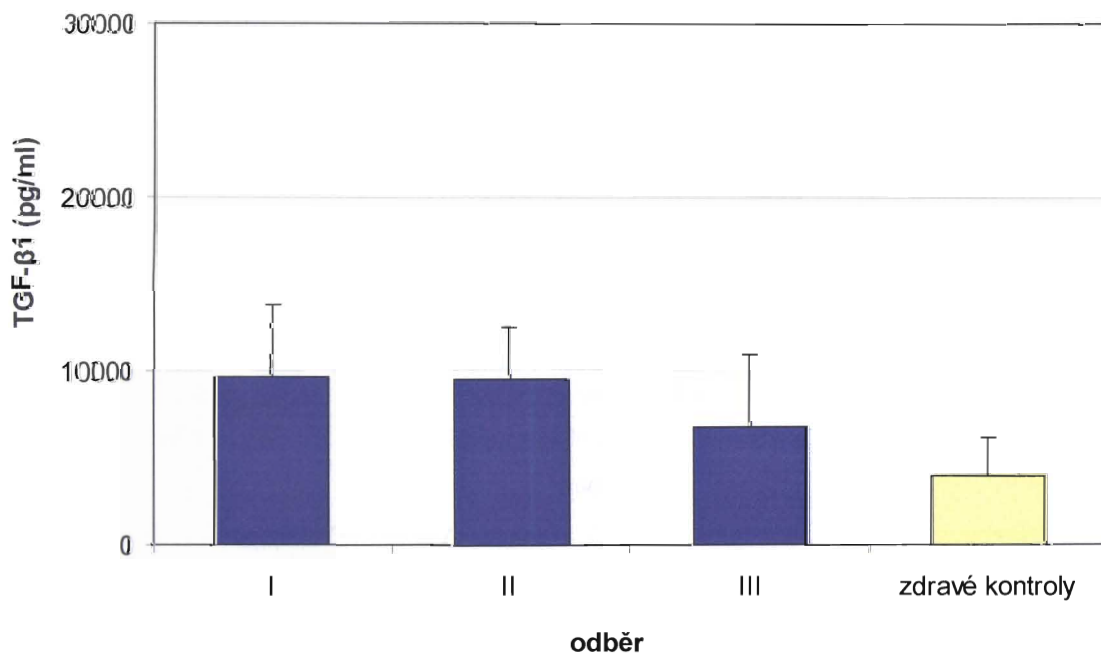
Graf 6: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s karcinomem prsu s negativní sentinelovou uzlinou – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry



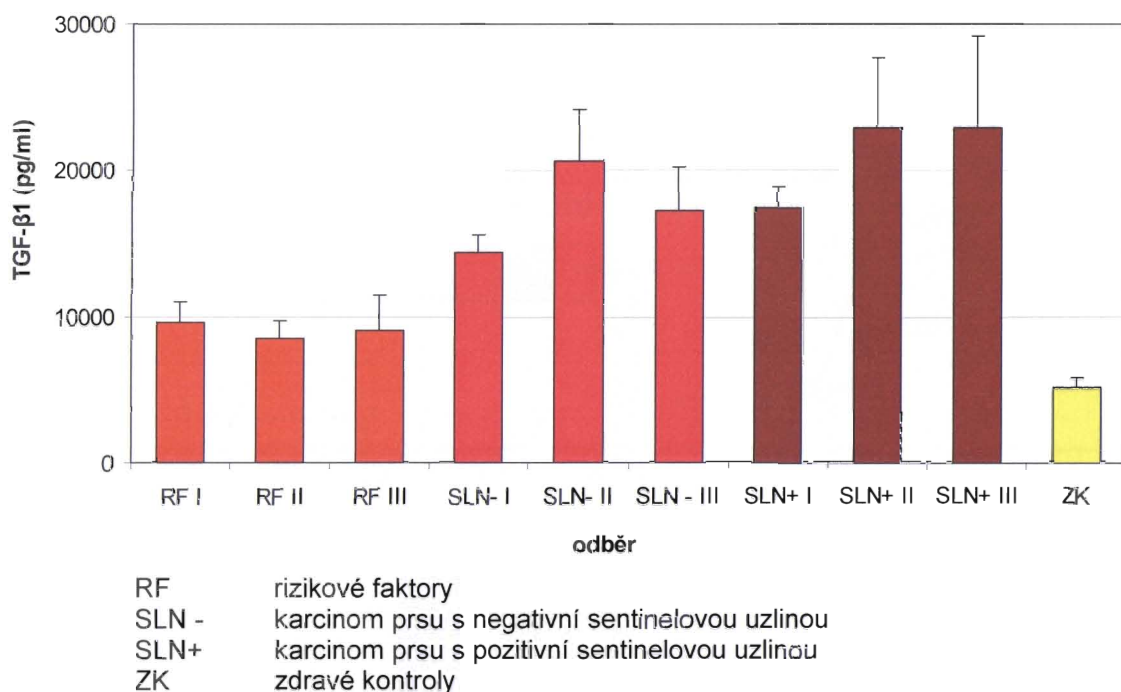
Graf 7: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s rizikovými faktory – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry



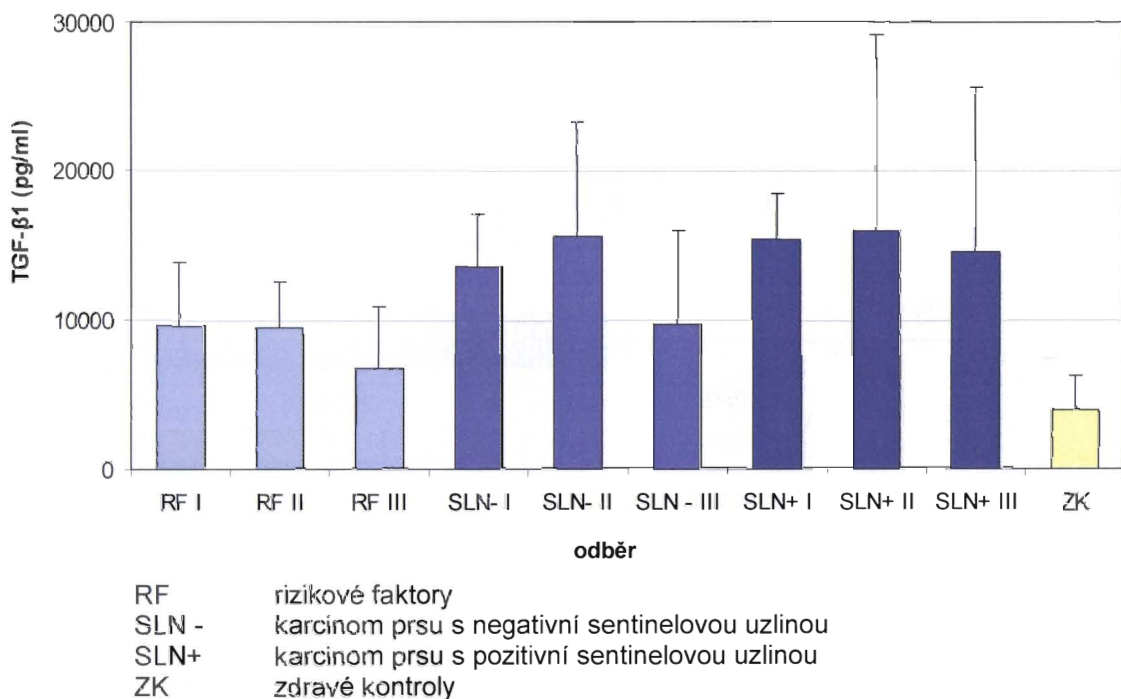
Graf 8: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek s rizikovými faktory – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry



Graf 9: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – průměr a směrodatná odchylka průměru v dynamickém sledování – 3 odběry

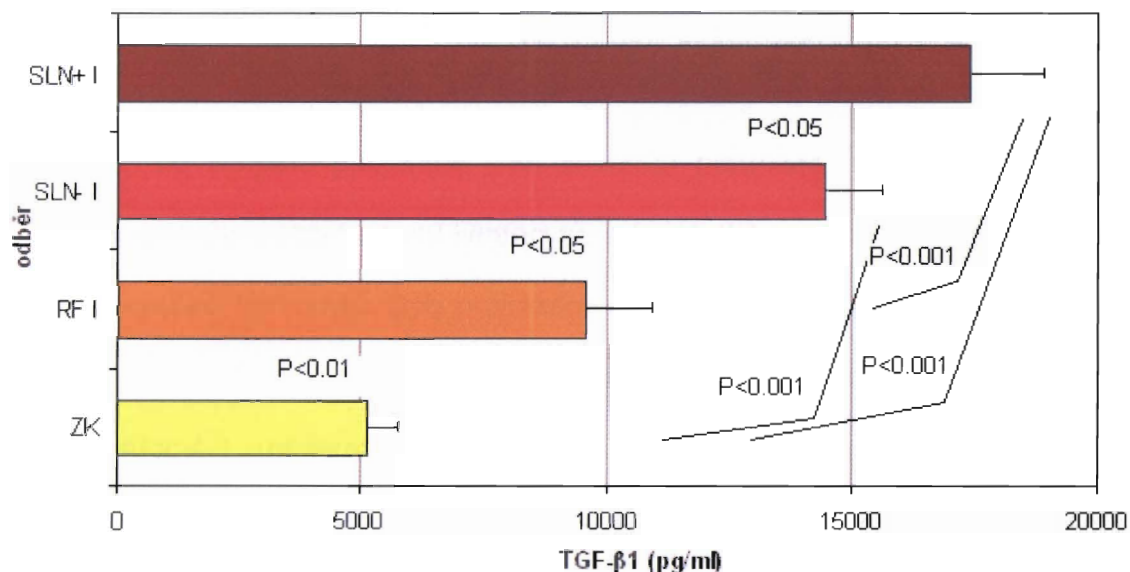


Graf 10: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – medián a mezikvartilová odchylka v dynamickém sledování – 3 odběry



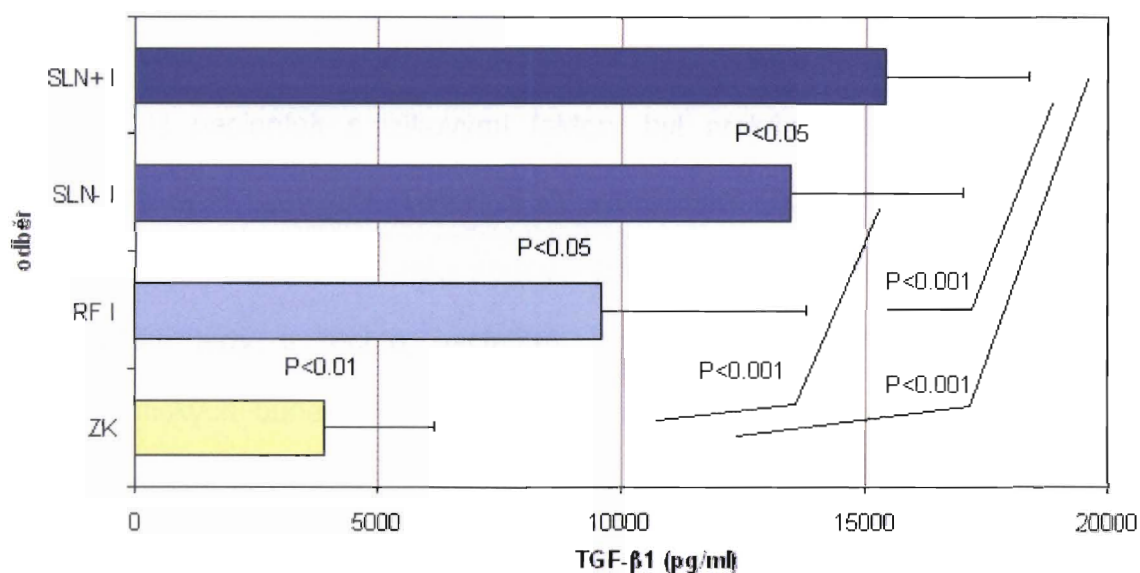


Graf 11: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – srovnání hladin významnosti, průměr a směrodatná odchylka průměru



- RF I rizikové faktory, I. odběr
- SLN - I karcinom prsu s negativní sentinelovou uzlinou, I. odběr
- SLN+I karcinom prsu s pozitivní sentinelovou uzlinou, I. odběr
- ZK zdravé kontroly

Graf 12: TGF- $\beta$ 1 v plazmě pacientek všech sledovaných skupin – srovnání hladin významnosti, medián a mezikvartilová odchylka



- RF I rizikové faktory, I. odběr
- SLN - I karcinom prsu s negativní sentinelovou uzlinou, I. odběr
- SLN+I karcinom prsu s pozitivní sentinelovou uzlinou, I. odběr
- ZK zdravé kontroly

### 5.3. Výsledky vyšetření buněčné imunity

Ve skupině pacientek s karcinomem prsu nebyly prokázány odchylky v procentuálním zastoupení lymfocytů, a to jak CD 3 populace, tak i CD4 a CD 8 subpopulací lymfocytů. Byly prokázány odchylky v absolutním počtu T lymfocytů - snížení se týkalo jak populace CD3, tak i subpopulací CD4 a CD8 (cytotoxické T lymfocyty), přičemž poměr CD4/CD8, tzv. imunoregulační index (IRI) byl u těchto pacientek lehce zvýšen. Nebyly prokázány žádné odchylky, a to jak v procentuálním, tak v absolutním počtu B lymfocytů (CD19) ani v buňkách exprimujících HLA-DR. Zastoupení dendritických buněk však bylo nižší a tyto buňky exprimovaly CD 83 maturační marker v minimální míře. Nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi pacientkami s pozitivní a negativní uzlinou, pacientky s negativní uzlinou měly oproti pacientkám s pozitivní uzlinou lehce vyšší absolutní počet CD4 a vyšší imunoregulační index, tento rozdíl však nebyl signifikantní.

U pacientek s rizikovými faktory byl prokázán hraniční pokles CD 8 subpopulace lymfocytů, procentuální zastoupení CD4 subpopulace se naopak pohybovala na horní hranici normy - poměr CD4/CD8 (imunoregulační index - IRI) byl tedy u těchto pacientek zvýšen. Procentuální zastoupení zralých dendritických buněk bylo vyšší než u pacientek s karcinomem, ale stále pod hranicí normy.

Výsledky vyšetření buněčné imunity u pacientek s rizikovými faktory a s karcinomem prsu jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tab. 15: Výsledky vyšetření buněčné imunity

<b>Karcinom prsu</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nk abs.p.	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7-1,3 10 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40-0,9 x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	6--30%	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	1--3	2--15	1-1,5
Minimum	42	0,52	4	0,04	22	0,22	13	0,23	4,2	0,04	7,4	0,08	0,01	0	0,5
25% Percentil	63,5	0,685	6	0,09	32	0,37	24,5	0,3	7,1	0,105	12,5	0,13	0,04	0,01	1
Median	69,5	0,84	8	0,105	38	0,49	27,5	0,365	11	0,155	18	0,26	0,685	0,02	1,5
75% Percentil	77	1,00	12	0,145	48,5	0,645	34	0,46	17	0,195	22	0,38	4,215	0,05	1,95
Maximum	83,7	1,82	25	0,3	55	1,17	51	0,77	28	0,4	38	0,57	6,69	0,07	4,2
Průměr	68,74	0,9285	9,6	0,1195	39,21	0,543	28,89	0,387	12,77	0,1725	18,69	0,2755	2,059	0,02824	1,647
Std. Odchylka	9,768	0,3208	5,022	0,05934	9,53	0,257	9,411	0,1292	6,173	0,1002	7,561	0,1532	2,507	0,02186	0,9534
Std. Chyba	2,184	0,07173	1,152	0,01327	2,08	0,05746	2,104	0,02888	1,38	0,02241	1,65	0,04619	0,5909	0,005302	0,2312
<b>SLN pozit.</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nkabs	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7-1,3 10 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40-0,9 x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	6--30%	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	1--3	2--15	1-1,5
Minimum	70	0,68	5	0,04	26,5	0,25	26	0,24	7	0,1	7,4	0,11	0,01	0,01	0,5
25% Percentil	73,5	0,685	8,5	0,075	29,25	0,295	28,5	0,265	9	0,105	9,2	0,12	0,04	0,015	0,7
Median	77,5	0,77	13,5	0,11	38	0,4	35,5	0,36	11,5	0,13	11	0,135	1	0,035	1
75% Percentil	80,85	1,1	20	0,235	47,5	0,55	45,5	0,57	15,5	0,19	16,5	0,145	5,11	0,05	1,65
Maximum	83,7	1,26	25	0,3	50	0,6	51	0,77	19	0,21	21	0,15	6,69	0,05	1,7
Průměr	77,18	0,868	14,25	0,146	38,3	0,418	37	0,406	12,25	0,144	12,48	0,1267	2,26	0,0325	1,14
Std. Odchylka	5,62	0,2426	8,302	0,09762	9,497	0,1365	10,98	0,2103	4,992	0,04561	5,075	0,01528	2,858	0,02062	0,503
Std. Chyba	2,81	0,1085	4,151	0,04366	4,247	0,06102	5,492	0,09405	2,496	0,0204	2,269	0,008819	1,278	0,01031	0,2249
<b>SLN negat.</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nkabs	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7-1,3 10 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40-0,9 x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	6--30%	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	1--3	2--15	1-1,5
Minimum	42	0,52	4	0,06	22	0,22	13	0,23	4,2	0,04	9	0,08	0,01	0	0,7
25% Percentil	61,5	0,64	6	0,09	32,5	0,43	23	0,31	7,1	0,09	16	0,255	0,055	0,01	1,15
Median	67	0,86	8	0,1	38,5	0,49	26	0,38	11	0,16	20	0,345	0,63	0,02	1,6
75% Percentil	73	1,17	10	0,13	48,5	0,7	29,5	0,48	17,5	0,2	24	0,4	4,215	0,045	2,05
Maximum	79	1,82	14	0,2	55	1,17	43,7	0,55	28	0,4	38	0,57	6,51	0,07	4,2
Průměr	66,63	0,9487	8,36	0,1107	39,5	0,5847	26,86	0,3807	12,9	0,182	20,63	0,3313	1,982	0,02692	1,858
Std. Odchylka	9,528	0,348	3,135	0,04148	9,832	0,2772	8,13	0,09917	6,572	0,1125	7,247	0,1429	2,481	0,02287	1,032
Std. Chyba	2,382	0,08985	0,8095	0,01071	2,458	0,07158	2,033	0,02561	1,643	0,02904	1,812	0,05051	0,6882	0,006343	0,2978
<b>Rizikové faktory</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nkabs	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7-1,3 10 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40-0,9 x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	6--30%	0,10-0,4 x10 <sup>9</sup> /l	1--3	2--15	1-1,5
Minimum	67	1,1	6	0,06	37	0,67	13	0,25	4	0,07	18	0,36	0,6	0,01	1,1
25% Percentil	68	1,185	6,5	0,085	44	0,745	14,5	0,27	6	0,1	19	0,37	1,2	0,03	1,95
Median	69,5	1,32	7,5	0,125	53	0,93	17	0,315	8	0,18	22	0,38	2,35	0,525	3,2
75% Percentil	73	1,42	11	0,195	55	1,2	27,5	0,505	9,5	0,24	25	0,435	3,25	1,5	3,9
Maximum	76	1,47	14	0,25	55	1,36	37	0,67	11	0,25	26	0,49	3,6	2	4,2
Průměr	70,5	1,303	8,75	0,14	49,5	0,9725	21	0,3875	7,75	0,17	22	0,4025	2,225	0,765	2,925
Std. Odchylka	3,873	0,1578	3,594	0,08042	8,544	0,2997	10,86	0,1919	2,872	0,08485	3,651	0,05909	1,312	0,9419	1,345
Std. Chyba	1,936	0,07889	1,797	0,04021	4,272	0,1499	5,431	0,09595	1,436	0,04243	1,826	0,02955	0,6562	0,471	0,6725

Tab. 15: Výsledky vyšetření buněčné imunity (označení hodnot: modře nižší než norma, červeně vyšší než norma)

Karcinom prsu (LNpoz i SLN neg)	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nk abs.p.	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7- 1,3 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40- 0,9x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	6-30%	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	1-3	2-15	1-1,5
Minimum	42	0,52	4	0,04	22	0,22	13	0,23	4,2	0,04	7,4	0,08	0,01	0	0,5
25% Percentil	63,5	0,685	6	0,09	32	0,37	24,5	0,3	7,1	0,105	12,5	0,13	0,04	0,01	1
<b>Median</b>	69,5	<b>0,84</b>	8	0,105	38	<b>0,49</b>	27,5	<b>0,365</b>	11	0,155	18	0,26	<b>0,685</b>	<b>0,02</b>	<b>1,5</b>
75% Percentil	77	1,00	12	0,145	48,5	0,645	34	0,46	17	0,195	22	0,38	4,215	0,05	1,95
Maximum	83,7	1,82	25	0,3	55	1,17	51	0,77	28	0,4	38	0,57	6,69	0,07	4,2
<b>Průměr</b>	68,74	<b>0,9285</b>	9,6	0,1195	39,21	<b>0,543</b>	28,89	<b>0,387</b>	12,77	0,1725	18,69	0,2755	<b>2,059</b>	<b>0,02824</b>	<b>1,647</b>
Std. Odchylka	9,768	0,3208	5,022	0,05934	9,53	0,257	9,411	0,1292	6,173	0,1002	7,561	0,1532	2,507	0,02186	0,9534
Std. Chyba	2,184	0,07173	1,152	0,01327	2,08	0,05746	2,104	0,02888	1,38	0,02241	1,65	0,04619	0,5909	0,005302	0,2312
<b>SLN pozit.</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nkabs	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7- 1,3 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40- 0,9x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	6-30%	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	1-3	2-15	1-1,5
Minimum	70	0,68	5	0,04	26,5	0,25	26	0,24	7	0,1	7,4	0,11	0,01	0,01	0,5
25% Percentil	73,5	0,685	8,5	0,075	29,25	0,295	28,5	0,265	9	0,105	9,2	0,12	0,04	0,015	0,7
Median	77,5	<b>0,77</b>	13,5	0,11	38	<b>0,4</b>	35,5	<b>0,36</b>	11,5	0,13	11	0,135	1	<b>0,035</b>	1
75% Percentil	80,85	1,1	20	0,235	47,5	0,55	45,5	0,57	15,5	0,19	16,5	0,145	5,11	0,05	1,65
Maximum	83,7	1,26	25	0,3	50	0,6	51	0,77	19	0,21	21	0,15	6,69	0,05	1,7
<b>Průměr</b>	77,18	<b>0,868</b>	14,25	0,146	38,3	<b>0,418</b>	37	<b>0,406</b>	12,25	0,144	12,48	0,1267	2,26	<b>0,0325</b>	<b>1,14</b>
Std. Odchylka	5,62	0,2426	8,302	0,09762	9,497	0,1365	10,98	0,2103	4,992	0,04561	5,075	0,01528	2,858	0,02062	0,503
Std. Chyba	2,81	0,1085	4,151	0,04366	4,247	0,06102	5,492	0,09405	2,496	0,0204	2,269	0,008819	1,278	0,01031	0,2249
<b>SLN negat.</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nkabs	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7- 1,3 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40- 0,9x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	6-30%	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	1-3	2-15	1-1,5
Minimum	42	0,52	4	0,06	22	0,22	13	0,23	4,2	0,04	9	0,08	0,01	0	0,7
25% Percentil	61,5	0,64	6	0,09	32,5	0,43	23	0,31	7,1	0,09	16	0,255	0,055	0,01	1,15
Median	67	<b>0,86</b>	8	0,1	38,5	<b>0,49</b>	26	<b>0,38</b>	11	0,16	20	0,345	<b>0,63</b>	<b>0,02</b>	<b>1,6</b>
75% Percentil	73	1,17	10	0,13	48,5	0,7	29,5	0,48	17,5	0,2	24	0,4	4,215	0,045	2,05
Maximum	79	1,82	14	0,2	55	1,17	43,7	0,55	28	0,4	38	0,57	6,51	0,07	4,2
<b>Průměr</b>	66,63	<b>0,9487</b>	8,36	0,1107	39,5	<b>0,5847</b>	26,86	<b>0,3807</b>	12,9	0,182	20,63	0,3313	1,982	<b>0,02692</b>	<b>1,858</b>
Std. Odchylka	9,528	0,348	3,135	0,04148	9,832	0,2772	8,13	0,09917	6,572	0,1125	7,247	0,1429	2,481	0,02287	1,032
Std. Chyba	2,382	0,08985	0,8095	0,01071	2,458	0,07158	2,033	0,02561	1,643	0,02904	1,812	0,05051	0,6882	0,006343	0,2978
<b>Rizikové faktory</b>	CD3	CD3abs.p	HLADR	HLADR abs.p	CD4	CD4 abs.p	CD8	CD8 abs.p	CD19	CD19 abs.p	NK	Nkabs	DC	CD83	IRI
<b>Normální hodnoty</b>	(59-83%)	1,1-1,9 10 <sup>9</sup> /l	4-16%	0,05-0,4 10 <sup>9</sup> /l	(25-59%)	0,7- 1,3 <sup>9</sup> /l	(19-48%)	0,40- 0,9x10 <sup>9</sup> /l	(6-22%)	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	6-30%	0,10- 0,4x10 <sup>9</sup> /l	1-3	2-15	1-1,5
Minimum	67	1,1	6	0,06	37	0,67	13	0,25	4	0,07	18	0,36	0,6	0,01	1,1
25% Percentil	68	1,185	6,5	0,085	44	0,745	14,5	0,27	6	0,1	19	0,37	1,2	0,03	1,95
Median	69,5	1,32	7,5	0,125	53	0,93	17	<b>0,315</b>	8	0,18	22	0,38	2,35	<b>0,525</b>	<b>3,2</b>
75% Percentil	73	1,42	11	0,195	55	1,2	27,5	0,505	9,5	0,24	25	0,435	3,25	1,5	3,9
Maximum	76	1,47	14	0,25	55	1,36	37	0,67	11	0,25	26	0,49	3,6	2	4,2
<b>Průměr</b>	70,5	1,303	8,75	0,14	49,5	0,9725	21	0,3875	7,75	0,17	22	0,4025	2,225	<b>0,765</b>	<b>2,925</b>
Std. Odchylka	3,873	0,1578	3,594	0,08042	8,544	0,2997	10,86	0,1919	2,872	0,08485	3,651	0,05909	1,312	0,9419	1,345
Std. Chyba	1,936	0,07889	1,797	0,04021	4,272	0,1499	5,431	0,09595	1,436	0,04243	1,826	0,02955	0,6562	0,471	0,6725

## 6. Diskuze

Prokázali jsme zvýšenou hladinu TGF- $\beta$  1 pacientek s operabilním karcinomem prsu. Velmi významné je, že se jednalo převážně o pacientky v časném stádiu onemocnění. Přesto již v tomto stádiu bylo TGF- $\beta$  zvýšeno oproti skupině zdravých kontrol i skupině pacientek s rizikovými faktory vzniku karcinomu prsu.

Prokázali jsme, že hladiny TGF- $\beta$  1 byly významně zvýšeny již ve skupině pacientek s negativní sentinelovou uzlinou. K další elevaci hladin dochází při postižení sentinelové lymfatické uzliny nádorovým procesem. Z těchto poznatků vyplývá významnost TGF- $\beta$  1 v diagnostice, stagingu a prognóze karcinomu prsu (97,127).

Desruisseau a spol. prokázali zvýšenou hladinu TGF- $\beta$ 1 v cytozolu nádorových buněk u pacientek s karcinomem prsu. Naše měření prokazují výrazně vyšší hladiny TGF- $\beta$ 1 v krevní plazmě. Zdrojem TGF- $\beta$ 1 totiž nemusí být jen tumor, ale též buňky imunitního systému. Bylo prokázáno že subpopulace imunitních buněk, produkujících TGF- $\beta$ 1 (především makrofágů a T-reg) jsou u pacientů s nádorovými onemocněními výrazně vyšší než u zdravých osob (90,99). TGF- $\beta$ 1 je, jak již bylo zmíněno, imunosupresivním faktorem, který potlačuje protinádorovou aktivitu imunitních buněk (suprese „Natural Killer“ buněk, suprese makrofágů, suprese dendritických buněk a tím i antigen prezentace a T<sub>H</sub>1 odpovědi). TGF- $\beta$ 1 je též neoangiogenetickým faktorem působícím nejen přímo na cévy, ale i stimulujícím produkci ostatních

neoangiogenetických faktorů jako je VEGF (128). Těmito mechanismy interferuje TGF- $\beta$ 1 v časných stadiích progresu tumoru, kdy zřejmě favorizuje maligní buněčné klony v metastatickém šíření.

Prokázali jsme signifikantní rozdíl v hladinách TGF- $\beta$ 1 mezi pacientkami s pozitivní a negativní sentinelovou uzlinou. Tento poznatek může pomoci:

- zpřesnit diagnostiku a dispenzární péči, event. použít TGF- $\beta$ 1 ve screeningu
- při negativitě sentinelové lymfatické uzliny a současném zvýšení hladiny TGF- $\beta$ 1 doplnit adjuvantní systémovou léčbu
- zvolit adekvátní, tj. radikálnější, léčebný postup u pacientek s vysokými hladinami TGF- $\beta$ 1 - u skupiny s malými karcinomy a s pozitivní sentinelovou uzlinou elevace hladiny TGF- $\beta$ 1 podporuje rozšíření operačního výkonu a aplikaci adjuvantní systémové léčby
- optimalizovat léčebný proces kombinací současné terapie s imunoterapií

V současnosti je ve světě diskutována celá řada terapeutických strategií vedoucí k potlačení nadprodukce TGF- $\beta$ 1, např. monoklonálními protilátkami, či snížení produkce TGF- $\beta$ 1 intracelulárně na molekulární úrovni (aplikací DNA antisense proti TGF- $\beta$ 1) (129).

Výsledky vyšetření buněčné imunity koresponují s nálezem zvýšených hladin TGF- $\beta$ 1 u pacientek s karcinomem prsu. V naší studii jsme prokázali snížení absolutního počtu CD8, tedy cytotoxických lymfocytů. Tato subpopulace hraje významnou úlohu v eliminaci a cytolýze nádorových buněk.

Přestože nebyla prokázána změna v procentuálním zastoupení ani v absolutním počtu buněk exprimujících HLA DR, tedy buněk schopných prezentovat cizorodý antigen, např. nádorový, ostatním buňkám imunitního systému, populace „profesionálních antigen prezentujících“ - dendritických - buněk, je u pacientek s karcinomem prsu snížena. Patrná je zejména redukce tzv. zralých dendritických buněk, což znamená buněk exprimujících CD 83. Dendritické buňky, které neexprimují CD 83, nejsou schopny efektivně rozpoznat a prezentovat nádorový antigen ostatním buňkám imunitního systému (105), který není následně schopen nádorovou buňku eliminovat. Na eliminaci nádorové buňky se totiž podílí jak buňky nespecifické imunity (NK buňky, monocyty, makrofágy, granulocyty), pro jejichž aktivaci není nutná prezentace antigenu, tak buňky imunity specifické. Po úspěšné antigen prezentaci T-buňkám, především subpopulaci CD4, dochází k aktivaci cytotoxických lymfocytů, které jsou schopny efektivně nádorové buňky eliminovat. V naší práci jsme prokázali především změny v tzv. specifické imunitě, která vyžaduje právě efektivní funkci zralých dendritických buněk.

## 7. Závěr

Hladiny TGF- $\beta$ 1 byly signifikantně vyšší u pacientek s karcinomem prsu, a to jak s pozitivní, tak i s negativní sentinelovou uzlinou než u zdravých kontrol.

Hladiny TGF- $\beta$ 1 byly signifikantně vyšší u pacientek s karcinomem prsu než u pacientek s rizikovými faktory. Tento rozdíl byl vyšší u pacientek s pozitivní sentinelovou uzlinou než u pacientek s negativní sentinelovou uzlinou.

U pacientek s postižením sentinelové uzliny byla hladina TGF- $\beta$ 1 signifikantně vyšší než u pacientek s negativní sentinelovou uzlinou. Byl pozorován rozdíl v hladinách TGF- $\beta$ 1 v průběhu sledování, ale tento rozdíl nebyl signifikantní u jednotlivých pacientek.

TGF- $\beta$  1 je tedy markerem, který koreluje s výskytem rizikových faktorů, rozsahem onemocnění, zejména s postižením sentinelové uzliny. Zvýšené hladiny TGF- $\beta$  1 mohou velmi časně upozornit na vyšší riziko progresu a již před operací mohou pomoci určit rozsah onemocnění.

Nebyla nalezena žádná statisticky významná korelace s jiným zkoumaným znakem. U žádné z pacientek jsme vzhledem ke krátké době sledování nebyli schopni hodnotit korelaci s dobou přežití.

Standardním imunologickým vyšetřením nebyly prokázány žádné signifikantní odchylky v jak relativním v tak procentuálním zastoupení imunitních buněk.

Byla zde ovšem pozorována tendence k sníženým hodnotám v buněčné imunitě a to v celkovém počtu lymfocytů (CD3), nižších cytotoxických lymfocytů (CD8) i CD 4 pomocných T lymfocytů. Poměr CD4/CD8-



imunoregulační index (IRI) byl vyšší jak u pacientek s pozitivní tak i negativní sentinelovou uzlinou.

Nebyly pozorovány žádné změny jak v relativním tak percentuálním zastoupení B buněk (CD19) a NK buněk.

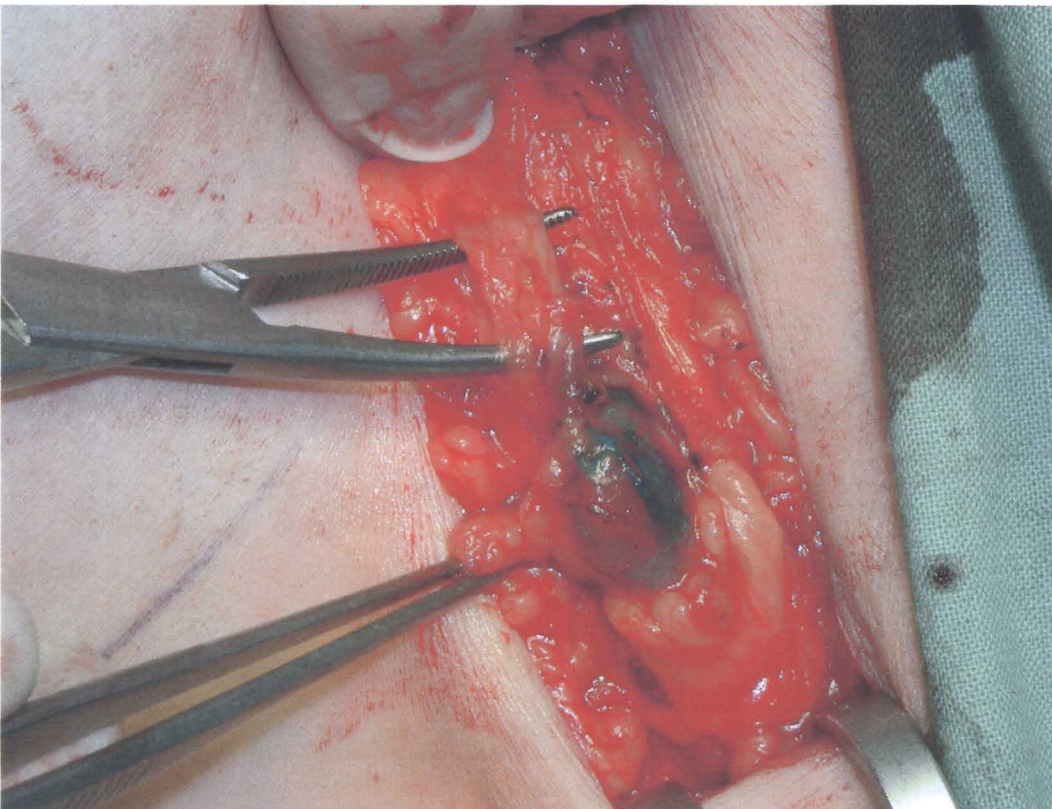
Detailní imunologická vyšetření prokázala minimální zastoupení zralých dendritických buněk (CD 83).

Závažným závěrem se ukazuje fakt, že je třeba se zabývat parametry více odhalujícími podstatu imunoregulačních dějů (např. vyšetření TGF, funkční testy imunitních buněk, produkce cytokinů). Změny na buněčné a molekulární úrovni v produkci cytokinů předchází logicky změny makroskopické, a proto nepřekvapuje, že TGF- $\beta$  1 je již zvýšen u pacientek s negativní sentinelovou uzlinou. Elevace TGF- $\beta$  1 se proto může stát indikátorem patologie již v době, kdy klinicky ještě nedochází k projevům diseminace. Bylo by proto vhodné, zaměřit se v dalším výzkumu především na skupinu pacientek s karcinomem prsu s negativní sentinelovou uzlinou a se zvýšenou hladinou TGF- $\beta$  1 z hlediska dispenzarizace a dalšího terapeutického postupu.

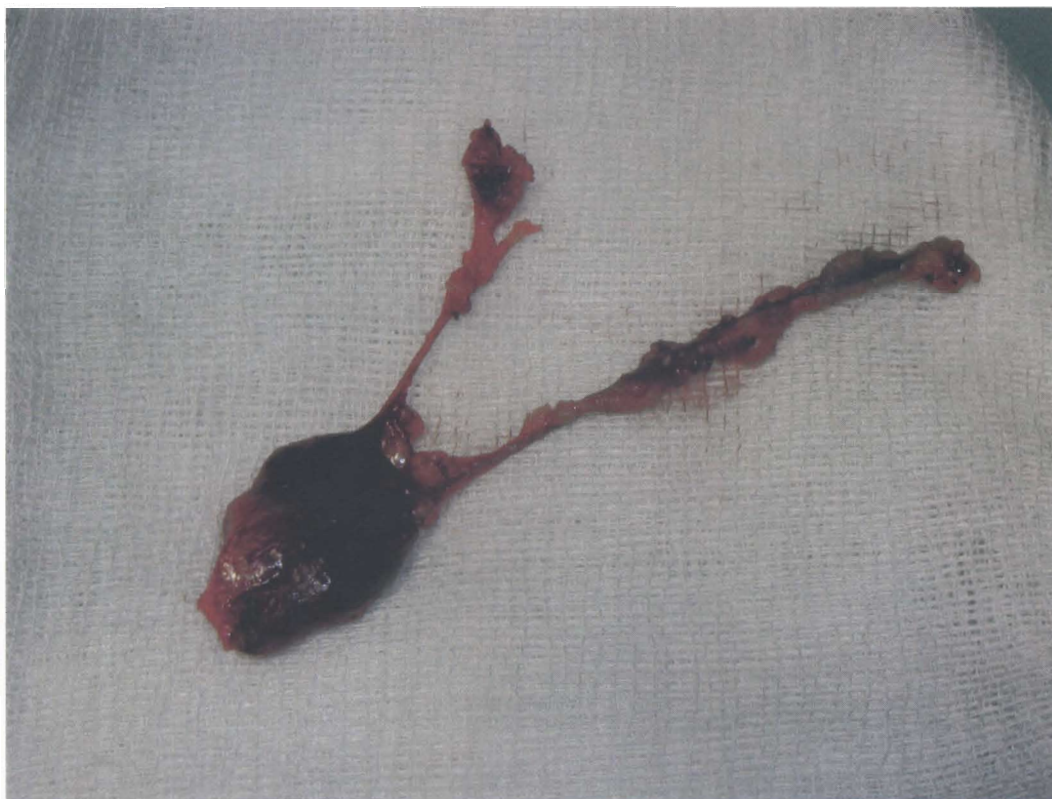
Obr. 6: Peroperační identifikace sentinelové uzliny gamasondou



Obr. 7: Peroperační identifikace sentinelové uzliny po aplikaci „blue dye“



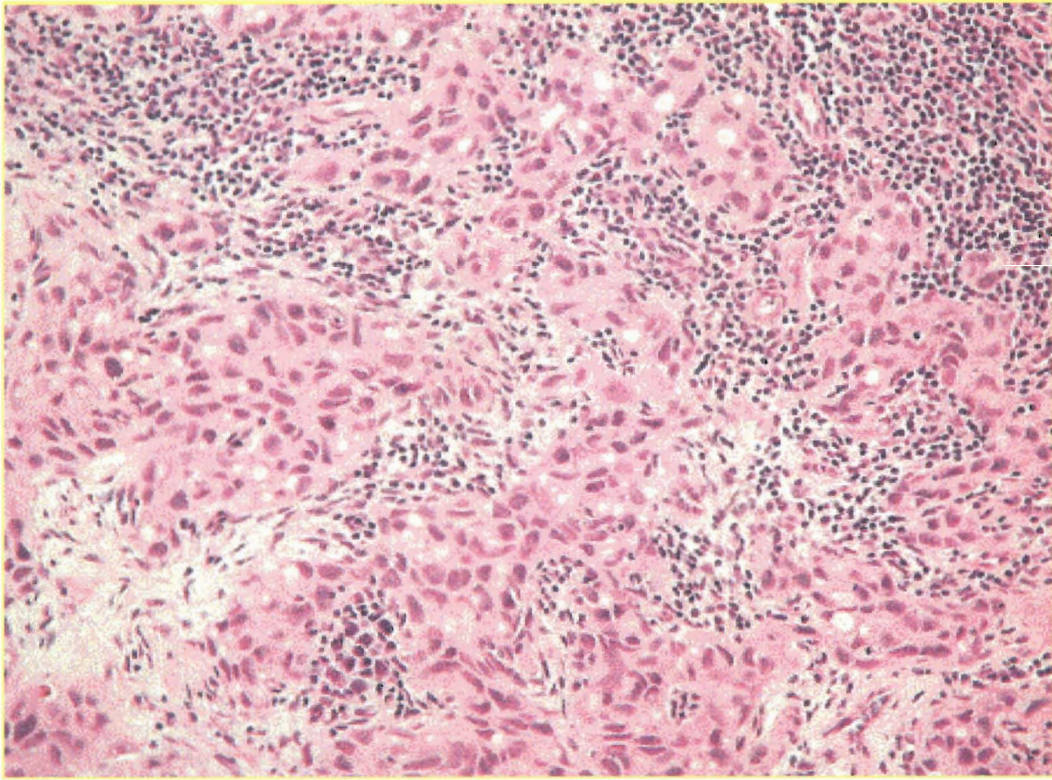
Obr. 8: Exstirpovaná sentinelová uzlina s přívodnými lymfatickými kanály



Obr. 9: Verifikace aktivity sentinelové uzliny gamasondou



Obr. 10: Metastáza karcinomu prsu v sentinelové uzlině



Obr. 11: Pooperační lymfedém levé horní končetiny



## 8. Seznam použité literatury

1. Fisher, B.: The revolution in breast cancer surgery: Science or anecdotalism? *World J. Surg.*, 1985, 9, 655-666.
2. Fisher, B.: Conservative surgery: The American experience. *Semin. Oncol.*, 1986. 13, 425-433.
3. Veronesi, U., Saccozzi, R., Del Vecchio, M., Banfi, A., Clemente, C., De Lena, M., Gallus, G., Greco, M., Luini, A., Marubini, E., Muscolino, G., Rilke, F., Salvadori, B., Zecchini, A., Zucali, T.: Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N. Engl. J. Med.*, 1981, 305, 6-11
4. Beatson, G.T.: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, ii, 1896, s. 101-107.
5. Jensen, E.V., DeSombre, E.R., Hurst, D.J., Kawashima, T., Jungblut, P.W.: Estrogen receptor interactions in target tissue. *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.*, 1967, 56, 547-569.
6. Berry, M., Metzger, D., Chambon, P.: Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell type and promotor-context dependent agonists activity of the antioestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.*, 1990, 9, 2811-2818.
7. Zdravotnická ročenka ÚZIS - 2004. 2005. Praha, ÚZIS.
8. Zuntová A. Histopatologie tumorů a proliferativních lézí prsu. *Mod Gyn Por* 2004; 13(3):366-397.
9. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16):1233-1241.
10. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16):1227-1232.
11. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of Radiotherapy and Surgery in Early Breast Cancer - An Overview of the Randomized Trials. *N Engl J Med* 1996;334(15):1003.
12. Gotzsche P. C., Olsen O. Is screening for Breast cancer with mamography justifiable? *Lancet*, 2000, 355:129-134
13. Gotzsche P. C., Olsen O Screening mammography re-evaluated, *Lancet*, 2000, 355: 752-753.
14. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Labor Med* 2000; 124(7):966-978.
15. Lednický L. Operace prsů. *Mod Gyn Por* 1999; 8(4):293-306.
16. Donegan, E.L.: Staging and primary treatment. In: Donegan, W.L., Spratt, J.S., (Eds.): *Cancer of the Breast*. W.B. Saunders Company, 1995, s. 375-342.
17. Cranenbroek S, van der Sangen MJ, Kuijt GP, Voogd AC. Diagnosis, treatment and prognosis of internal mammary lymph node recurrence in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89(3):271-275.
18. Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Valagussa P, Zucali R. The dissection of internal mammary nodes doesn't improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomized trial. *Eur J Cancer* 1999; 35(9):1320-1325.
19. Moore MP, Kinne DW. Axillary lymphadenectomy: a diagnostic and therapeutic procedure. *J Surg Oncol* 1997; 66(1):2-6.
20. Sobin KH, Wittekind C. *TNM klasifikace zhoubných nádorů*. 6 ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.
21. Moore MP, Kinne DW. Is axillary lymph node dissection necessary in the routine management of breast cancer? Yes. *I Adv Oncol* 1996;245-250.

22. Blanchard DK, Donohue JH, Reynolds C, Grant CS. Relapse and morbidity in patients undergoing sentinel lymph node biopsy alone or with axillary dissection for breast cancer. *Arch Surg* 2003; 138(5):482-487.
23. Purushotham AD, Upponi S, Klevesath MB, Bobrow L, Millar K, Myles JP et al. Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2005; 23(19):4312-4321.
24. Schijven MP, Vingerhoets AJJM, Rutten HJT, Nieuwenhuijzen GAP, Roumen RMH, van Bussel ME et al. Comparison of morbidity between axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29( 4):341-350.
25. Tafta L, Lannin DR, Swanson MS, Van Eyk JJ , Verbanac KM, Chua AN, Ng PC, Edwards MS, Halliday BE, Henry CA, Sommers LM, Carman CM, Molin MR, Yurko JE, Perry RR, Williams R. Multicenter trial of sentinel node biopsy for breast cancer using both technetium sulfur colloid and isosulfan blue dye. *Ann Surg.* 2001 Jan;233(1):51-9.
26. Harlow SP, Krag DN. Sentinel lymph node--why study it: implications of the B-32 study. *Semin Surg Oncol* 2001; 20(3):224-229.
27. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
28. Alban KS. Adjuvant chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-negative Breast cancer: a tale of three trials. *J NCI* 2004; 96(24):1801-1804.
29. van der Ploeg IM, Nieweg OE, van Rijk MC, Valdés Olmos RA, Kroon BB. Axillary recurrence after a tumour-negative sentinel node biopsy in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Eur J Surg Oncol.* 2008 Apr 10.
30. Kim HJ, Son BH, Park EW, Lim WS, Seo JY, Jang MA, Ku BK, Ahn SH. Breast Cancer Res Treat. 2008 Apr 4. Axillary recurrence after negative sentinel lymph node biopsy.
31. Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Valagussa P, Zucali R. The dissection of internal mammary nodes doesn't improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomized trial. *Eur J Cancer* 1999; 35(9):1320-1325.
32. Hoffmann J. Analysis of surgical and diagnostic quality at a specialist breast unit. *Breast.* 2006 Aug;15(4):490-7. Epub 2005 Dec 15.
33. Vitug AF, Newman LA. Complications in breast surgery. *Surg Clin North Am.* 2007 Apr; 87(2):431-51, x.
34. Bakker XR, Roumen RM, Bleeding after excision of breast lumps. *Eur J Surg.* 2002; 168(7):401-3
35. Galatius H, Okholm M, Hofmann J. Mastectomy using ultrasonic dissection: effect on seroma formation. *Breast.* 2003 Oct; 12(5):338-41
36. Vilar-Compte D, Alvarez de Iturbe I, Martin-Onraet A, Perez-Amador M, Sanchez-hernandez c, Volkow P. Surgical site infections in patients undergoing mastectomy. *Am J Infect Control.* 2008 Apr; 36(3):192-8
37. Felipe WA, Werneck GL, Santoro-Lopes G. Surgical site infections among women discharged with a drain in situ after breast cancer surgery. *World J Surg.* 2007 Dec; 31(12):2293-9
38. Halstead WS. The swelling of the arm after operations for cancer of the breast - elephantiasis chirurgica - its cause and prevention. *Bull John Hopkins Hosp* 1921; 32:309-313.
39. Campisi C, Boccardo F, Zilli A, et al. Lymphedema secondary to breast cancer treatment: possibility of diagnostic and therapeutic prevention. *Ann Ital Chir* 2002; 73(5):493-498.
40. Bates DO, Levick JR, Mortimer PS. Change in macromolecular composition of interstitial fluid from swollen arms after breast cancer treatment, and its implications. *Clin Sci* 1993; 85(6):737-746.
41. Mortimer PS. The pathophysiology of lymphoedema. *Cancer* 1998; 83(12):2798-2802.
42. Roberts CC, Stanton AWB, Pullen J, Bull RH, Levick JR, Mortimer PS. Skin microvascular architecture and perfusion studied in human postmastectomy oedema by intravital video-capillaroscopy. *Int J Microcirc* 1994; 14:327-334.
43. Tadych K, Donegan WL. Postmastectomy seromas and wound drainage. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 165:483-487.

44. Larson D, Weinstein M, Goldberg I, et al. Edema of the arm as a function of the extent of axillary surgery in patients with I-II carcinoma of the breast treated with primary radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Physic* 1986; 12:1575-1582.
45. Werner RS, McCormick B, Petrek JA, et al. Arm edema in conservatively managed breast cancer: obesity is a major predictive factor. *Radiology* 1991; 180:177-184.
46. Wald M. Sekundární lymfedém po onkochirurgické terapii. *Int Med Prax* 2002; 5:210-214.
47. Erickson VS, Pearson ML, Ganz PA, Adams J, Kahn KL. Arm Edema in Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(2):96-111.
48. Armer J, Fu MR, Wainstock JM, Zagar E, Jacobs LK. Lymphedema following breast cancer treatment, including sentinel lymph node biopsy. *Lymphol* 2004; 37(2):73-91.
49. Ferrandez JC, Serin D, Bouges S, et al. Frequency of lymphedema of the upper limb after treatment of breast cancer. Risk factors. Apropos of 683 cases. *Bull Cancer* 1996; 83:989-995.
50. Ivens D, Hoe AL, Podd TJ, et al. Assessment of morbidity from complete axillary dissection. *Br J Cancer* 1992; 66:136-138.
51. Lin PP, Allison DC, Wainstock J, Miller KD, Dooley WC, Friedman N. Impact of axillary lymph node dissection on the therapy of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1993; 11(8):1536-1544.
52. Paci E, Cariddi A, Barchelli A, Bianichi S, Cardona G, et al. Long-term sequelae of breast cancer surgery. *Tumori* 1996; 82:321-324.
53. Schunemann H, Willich N. Lymphodeme nach Mammakarzinom. Eine Studie über 5868 Falle. *Deutsch Med Wschr* 1997; 122:536-541.
54. Golshan M, Martin WJ, Dowlatshahi K. Sentinel lymph node biopsy lowers the rate of lymphoedema when compared with standard axillary lymph node dissection. *Am Surg* 2003; 69(3):209-211.
55. Morrow M. Axillary dissection: when and how radical. *Semin Surg Oncol* 1996; 12:321-327.
56. Greco M, Crippa F, Agresti R, et al. Axillary Lymph Node Staging in Breast Cancer by 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose PET: Clinical Evaluation and Alternative Management. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(8):630-635.
57. Leidenius M, Leivonen M, Vironen J, von Smitten K. The consequences of long-time arm morbidity in node-negative breast cancer patients with sentinel node biopsy or axillary clearance. *J Surg Oncol* 2005; 92(1):23-31.
58. Gerber LH. A review of measures of lymphedema. *Cancer* 1998; 83:2803-2804.
59. Petrek J, Lerner R. Lymphedema. In: Jay R. Harris, editor. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 1033-1040.
60. Becker C, Assouad J, Riquet M, Hidden G. Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 2006; 243(3):313-315.
61. Korpan MI, Fialka V. Wobenzyme and diuretic therapy in lymphedema after breast operation. *Wien Med Wochenschr* 1996; 146(4):67-72.
62. Pecking AP, Fevrier B, Wargon C, Pillion G. Efficacy of Daflon 500mg in the treatment of lymphedema (secondary to conventional therapy of breast cancer). *Angiology* 1997; 48(1):93-98.
63. McKenzie DC, Kalda AL. Effect of upper extremity exercise on secondary lymphoedema in breast cancer patients: a pilot study. *J Clin Oncol* 2003; 21(3):463-466.
64. Cornish BH, Bunce IH, Ward LC, Jones LC, Thomas BJ. Bioelectrical impedance for monitoring the efficacy of lymphoedema treatment programmes. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 38:169-176.
65. Berlucchi G, Aglioti S. The body in the brain: neural base of corporeal awareness. *Trend Neurosci* 1997; 20:560-564
66. Melzack R, Doderte TJ, Katz J, Vaccarino AL. Central neuroplasticity and pathological pain. *Ann N J Acad Sci* 2001; 933: 157-174
67. Schmidt HJ. Phantom nach Amputation-Übersicht, neue Erkenntnisse. *Praxis* 2000; 89: 87-94.
68. Eisenberg E. Post-surgical neuralgia. *Pain* 111; 2004: 3-7.

69. Jänig W, Baron R. Complex Regional Pain Syndrome Is a Disease of the Central Nervous System. *Clin Auton Res*, 2002, 12(3): 150-64.
70. Kozák J. Komplexní regionální bolestivý syndrom: - diagnostické a terapeutické aspekty. *Bolest* 2000; 2:70-76.
71. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91.
72. *The Cytokine Handbook*, 4th Edition, edited by Angus W. Thomson & Michael T. Lotze, 2003, London.
73. Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B. Going mad with smads. *N Engl J Med* 1999; 341: 1144-6.
74. Sporn MB The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Feb-Apr;17(1-2):3-7. Epub 2005 Nov 14.
75. Page DL, Dupont WD. Anatomic indicators (histologic and cytologic) of increased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28(2):157-166.
76. Bonig H., Banning U., Hannen M., Kim Y. M., Verheyen J., Korholz C. Mauz, Korholz D. Transforming growth factor-beta (1) suppresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal Of Immunology* 1999, 50 (6):612-618.
77. Bouchard C., Galinha A., Tartour E., Fridman W. H., Sautes C. A transforming growth factor beta-like immunosuppressive factor in immunoglobulin G-binding factor. *J Exp. Med* 182 (6):1717-1726, 1995.
78. Akhurst R. J. TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? *J Clin Invest.* 2002 Jun;109(12):1533-6.
79. Okragly A, Balwit JM, Haak-Frendscho M. Transforming growth factor beta-1 (TGF-beta-1): A biological paradox. *Promega notes magazine* 1994; 47:10-16.
80. Chouaib S., Patrel C. A., Chouaib F. M., Caignard A., Blay J. Y. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol.Today* 1997, 18 (10):493-497.
81. Derynck R., Akhurst R. J., Balmain, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 2001, 29:117-129.
82. Akhurst R. J., Derynck R TGF-beta signaling in cancer: a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001; 11:S44-S51.
83. Wakefield L.M., Roberts A.B. TGF- $\beta$  signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002; 12:22-29.
84. Arteaga C. L., Koli M. K., Digger T. C., Clarke R. Reversal of Tamoxifen Resistance of Human Breast Carcinomas In Vivo by Neutralizing Antibodies to Transforming Growth Factor- $\beta$  *Journal of the National Cancer Institute* 1999 January 6, Vol. 91, No. 1, 46-53.
85. Zavadova E., Loercher A., Verstovsek S., Verschraegen C. F., Micksche M., Freedman R. S. The role of macrophages in antitumor defense of patients with ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999 Feb;13(1):135-44.
86. McEarchern J. A., Kobie J. J., Mack V., Wu R. S., Meade-Tollin L., Arteaga C. L., Dumont N., Besselsen D., Seftor E., Hendrix M. J., Katsanis E., Akporiaye E. T. Invasion and metastasis of a mammary tumor involves TGF- $\beta$  signaling. *Int. J. Cancer*, 2001, 91: 76-82.
87. Hwu P., Freedman R. S. The immunotherapy of patients with ovarian cancer. *J Immunother.* 2002 May-Jun;25(3):189-201.
88. Melichar B., Freedman R. S. Immunology of the peritoneal cavity: relevance for host-tumor relation. *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Jan-Feb;12(1):3-17.
89. Nash M. A., Deavers M. T., Freedman R. S. The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* 2002 Jun;8(6):1754-60.
90. Curiel T. J., Coukos G., Zou L. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9.
91. Donovan D, Harmey JH, Toomey D, Osborne DH, Redmond HP, Bouchir-Hayes DJ. TGF-beta1 regulation of VEGF production by breast cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 1997 Dec;4(8):621-7.



92. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb;7(2):139-47.
93. Gorsch S. M., Memoli V. A., Stukel T. A., Gold L. I., Arrick B. A. Immunohistochemical staining for transforming growth factor  $\beta$  1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.*, 1992, 52: 6949-6952.
94. Foekens J. A., Romain S., Look M. P., Martin P. M., Klijn J. G. M. Thymidine kinase and thymidylate synthase in advanced breast cancer: response to tamoxifen and chemotherapy. *Cancer Res* 2001 Feb 15;61(4): 1421–5.
95. Nicolini A, Giardino R, Carpi A, Ferrari P, Anselmi L, Colosimo S, Conte M, Fini M, Giavaresi G, Berti P, Miccoli P. Metastatic breast cancer: an updating. *Biomed Pharmacother*. 2006 Nov;60(9):548-56. Epub 2006 Aug 28.
96. Decensi A., Torrisi R., Fontana V., Barreca A., Ponzani P., Pensa F., Parodi S., Costa A. FIRC Chemoprevention Unit, European Institute of Oncology, Milan, Italy. Correlation between plasma transforming growth factor-beta 1 and second primary breast cancer in a chemoprevention trial. *Eur J Cancer* 1998 Jun;34(7):999-1003.
97. Ghellal A., Li C., Hayes M., Byrne G., Bundred N., Kumar S. Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4413-8.
98. Ivanovic V., Demajo M., Krtolica K., Krajnovic M., Konstantinovic M., Baltic V., Prtenjak G., Stojiljkovic B., Breberina M., Neskovic-Konstantinovic Z., Nikolic-Vukosavljevic D., Dimitrijevic B. Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):191-3.
99. Zavadova E., Savary C. A., Templin S., Verschraegen C. F., Freedman R. S. Maturation of dendritic cells from ovarian cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001 Oct;48(4):289-96.
100. Janda E., et al. Ras and TGF beta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 2002, 156:299–313.
101. Lenzi R., Rosenblum M., Verschraegen C., Kudelka A. P., Kavanagh J. J., Hicks M. E., Lang E. A., Nash M.A., Levy L. B., Garcia M. E., Platsoucas C. D., Abbruzzese J. L., Freedman R. S. Phase I study of intraperitoneal recombinant human interleukin 12 in patients with Mullerian carcinoma, gastrointestinal primary malignancies, and mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2002 Dec;8(12):3686-95.
102. Iwamoto M., Shinohara H., Miyamoto A., Okuzawa M., Mabuchi H., Nohara T., Gon G., Toyoda M., Tanigawa N. Department of General and Gastroenterological Surgery, Osaka Medical College, Takatsuki, Osaka, Japan. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003 Mar 10;104(1):92-7.
103. Kobie J. J., Wu R. S., Kurt R. A., Lou S., Adelman M. K., Whitesell L. J., Ramanathapuram L. V., Arteaga C. L., Akporiaye E. T. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res.*, 2003, Apr 15;63(8):1860-4.
104. Luo Y., Zhou H., Krueger J., Kaplan C., Lee S. H., Dolman C., Markowitz D., Wu W., Liu C., Reisfeld R. A., Xiang R. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2132-2141.
105. Brown R. D., Pope B., Murray A., Esdale W., Sze D. M., Gibson J., Ho P. J., Hart D., Joshua D. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):2992-8.
106. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Labor Med* 2000; 124(7):966-978.
107. Paganelli G.,A. Luini A., Veronesi U. Radioguided occult lesion localization (ROLL) in breast cancer: maximizing efficacy, minimizing mutilation. *Annals of Oncology* 2002;13:1839-1840.

108. Strnad P., Rob L., Halaska M.G., Chođ J., Zuntova A., Moravcova Z. Radioguided occult lesion localisation in combination with detection of the sentinel lymph node in non-palpable breast cancer tumours. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27(3):236-8.
109. Elston C. W., Ellis I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer; experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19: 403-410.
110. Duffy MJ. Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value? *Clin Chem* 2006; 52(3):345-351.
111. Delarue JC, Mouriesse H, Dubois F, Friedman S, May-Levin F. Markers in breast cancer: does CEA add to the detection by CA 15.3? *Breast Cancer Res Treat.* 1988 Jul;11(3):273-6.
112. Strnad P, Daneš J. *Nemoci prsu pro gynekology.* Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001.
113. McCarty K. S., Jr., Miller L. S., Cox E. B., Konrath J., McCarty K. S., Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985; 109: 716-721.
114. Duffy MJ. Estrogen receptors: role in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43(4):325-47.
115. Knabbe C., Zugmaier G., Schmahl M., Dietel M., Lippman M. E., Dickson R. B. Induction of transforming growth factor  $\beta$  by the antiestrogens droloxifene, tamoxifen, and toremifene in MCF-7 cells. *Am J Clin. Oncol.* 1991; 14: 15-20.
116. Robertson J. F. R., Ellis I. O., Elston C. V., Blamey R. W. Mastectomy or tamoxifen as initial therapy for operable breast cancer in elderly patients: 5-years follow-up. *Eur. J. Cancer* 1992; 28: 908-910.
117. Horwitz, K.B., Yoseki, Y., McGuire, W.L.: Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogens. *Endocrinol.* 1978; 103, 19781742-1751.
118. Carney, W.P.: *The Emerging Role of the circulating Her-2/neu oncoprotein in Cancer Diagnostics,* World Markets Research Center, London, 2001.
119. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Apr;3(4):379-98. Epub 2004 Feb 3.
120. Wilson CA, Cajulis EE, Green JL, Olsen TM, Chung YA, Damore MA, Dering J, Calzone FJ, Slamon DJ. HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor-beta responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1058-79. Epub 2005 Nov 8.
121. Todorovic-Rakovic N. TGF-beta 1 could be a missing link in the interplay between ER and HER-2 in Breast cancer. *Med Hypotheses* 2005;65(3):546-51.
122. Wang S. E., Shin I., Wu F. Y. et al. HER2/Neu (ErbB2) Signaling to Rac1-Pak1 Is Temporally and Spatially Modulated by Transforming Growth Factor {beta}. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9591-600.
123. Dickson, R.B., Huff, K.K., Spencer, E.M., Lippman, M.E.: Induction of epidermal growth factor – related peptides by 17 b-estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology*, 118, 1986, s. 138-142.
124. Oliviera AM, Ross JS, Fletcher JA. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:16-28.
125. O'Malley FP, Vnencak-Jones CL, Dupont WD, Parl F, Manning S, Page DL. p53 mutations are confined to the comedo type ductal carcinoma in situ of the breast. Immunohistochemical and sequencing data. *Lab Invest.* 1994 Jul;71(1):67-72.
126. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, Lee CH, Li KB. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol.* 2005 Mar;18(3):374-81.

127. Desruisseau S., Palmari J., Giusti C. et al. Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *Br J Cancer*. 2006 Jan 30;94(2):239-46.
128. Bostrom K., Zebboudj A. F., Yao Y., Lin T. S., Torres A. Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004 Dec 17;279(51):52904-13.
129. Biswas S., Criswell T. L., Wang S.E. et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling in human cancer: targeting a tumor suppressor network as a therapeutic strategy. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4142-6.

## 9. Seznam publikací, prezentací se vztahem k tématu

1. **Chod J.**, Závadová E., Halaška M., Strnad P., Fučíková T. and Rob L.  
Preoperative transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) plasma level in operable breast cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2008, v tisku (IF 0,591)
2. Strnad,P., Rob,L., Halaska,M.G., **Chod,J.**, Zuntova,A., Moravcova,Z.  
Radioguided occult lesion localisation in combination with detection of the sentinel lymph node in non-palpable breast cancer tumours. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2006;27(3):236-8 (IF 0,591)
3. Halaska MJ, Pentheroudakis G, Strnad P, Stankusova H, **Chod J**, Robova H, Petruzelka L, Rob L, Pavlidis N. Presentation, management and outcome of 32 patients with pregnancy-associated breast cancer.: A matched controlled study. *The Breast J*, 2008, v tisku (IF 1,677)
4. **Chod J.**, Závadová E., Halaška M., Strnad P., Rob L., Fučíková T.  
Transformační růstový faktor - beta 1 jako marker u pacientek s operabilním karcinomem prsu  
*Česká gynekologie*, 2007, 72(2):112-5, ISSN 1210 – 7832.
5. Halaška M., Strnad P., Chod J., Malá I., Nováčková M., Stankušová H., Kolařík D., Feldmár P.  
Detekce pooperačního lymfedému u pacientek s karcinomem prsu. *Česká gynekologie*, 2007, 72(4):298-304, ISSN 1210 – 7832.
6. Halaska,M.G., Komarek,V., Bunc,V., Mala,I., **Chod,G.**, Strnad,P., Novotny,J., Stankusova,H., Kolarik,D., Maresova,D. A method for detection of postoperative lymphoedema after operation for breast cancer: Multifrequency Bioelectrical Impedance Analysis. *J Applied Biomedicine*, 2006, 4, 179-185, ISSN 1214-021X.
7. Strnad,P., Rob,L., Křížová,H., Zuntová,A., **Chod,J.**, Halaška,M. Biopsie sentinelové lymfatické uzliny u karcinomu prsu v praxi. *Čes Gynek*, 70 (4), 2005, 291-295, ISSN 1210 – 7832.

### Abstrakta – zahraniční k tématu disertace

**Chod J.Jr.**, Zavadova,E., Halaska,M. Jr., Strnad, P., Rob,L., Fucikova,T.: Increased TGF-beta 1 plasma level correlates with positive sentinel lymph node in patients with operable breast cancer. *Clinical Cancer Research*, December, Suppl., 2005, ISSN 1078-0432 (IF 5.6)

**Chod J.**, Zavadova E., Halaska M., Strnad P., Rob L., Fucikova T. Preoperative assesement of TGF-beta 1 plasma level in correlation of positivity of sentinel lymph node in patients with operable breast cancer. 13th Congress of the European Society of Surgical Oncology Venice, I, 30 November – 2 December 2006  
*European J Surg Oncol*, Volume 32, Suppl. 1, November 2006, ISSN 0748-7983 (IF 1,5)

# European journal of gynaecological oncology

An International Journal

www.irog.net

March 1, 2008

J. CHOD MD

CZECH REP.

REF. EJGO 1435/28 "PREOPERATIVE TRANSFORMING GROWTH FACTOR - BETA 1 (TGF-BETA 1) PLASMA LEVELS IN OPERABLE BREAST CANCER PATIENTS"

Dear Dr CHOD,

We are pleased to inform you that your paper, reviewed by the editor-in chief and his peer referees, **has been accepted for publication.**

We apologize for being obliged to request a contribution from authors for editing, printing costs, black and white figures, tables plus postage. Every year the printing costs increase and the journal does not have any commercial advertising.

A reduction is not possible because this is the price requested by the printer.

For your work the minimal requested contribution is \$1100 US plus \$120 US for postage (TOTAL \$1220 US). If you would like to receive reprints please add the cost indicated on the enclosed form.

IF YOU AGREE WITH OUR REQUEST, PLEASE COMPLETE AND FORWARD THE ENCLOSED FORM WITH YOUR PAYMENT as soon as possible for prompt publication in one of the next issues of our journal. Only after you have replied and the requested contribution is received will you receive the proofs, already corrected by a mother-tongue editorial expert.

If we do not receive any answer within one month of this communication, your work will be put out of the printing sequence and the publication will be delayed.

Thank you very much for your contribution to the scientific aims of our journal.

Best regards,

THE PUBLISHER  
Printing Department

Editor-in-Chief  
ANNIS  
Montréal (CND)  
BOSZE  
Budapest (H)  
Associate Editor  
MARCHETTI  
Montréal (CND)  
Assistant Editor  
WILSON  
San Diego - CA (U.S.A.)  
Editorial Board  
H. Allen, London (CND)  
H. Anteby, Jerusalem (IL)  
A. Audet-Lapointe, Montréal (CND)  
A. Ayhan, Ankara (T)  
A. Balat, Graziantep (T)  
E. Barber, New York (U.S.A.)  
A. Basta, Krakow (PL)  
E. C. Bender, Dusseldorf (G)  
L. Benedetti Panici, Rome (Italy)  
L. Charkviani, Tbilisi (Georgia)  
E. De Oliveira, Coimbra (P)  
D. Dexeus Jr., Barcellona (E)  
E. Di Paola, Buenos Aires (R.A.)  
E. Di Re, Milan (I)  
E. Di Saia, Orange (USA)  
E. Fuller Jr., Boston (U.S.A.)  
E. Geisler, Indianapolis (USA)  
G. Gerbault, Villejuif (F)  
G. Gorins, Paris (F)  
P. M. Heintz, Utrecht (NL)  
I. Ioannidou-Mouzaka, Athens (GR)  
A. Jordan, Birmingham, England (UK)  
I. Karseladze, Moscow (Russia)  
K. Klustersky, Bruxelles (B)  
E. Kubista, Wien (A)  
P. Kudelka, Houston (USA)  
T. Maggino, Padua (I)  
M. Markowska, Poznan (PL)  
E. Marth, Innsbruck (Austria)  
E. A. G. Massuger, Nijmegen (NL)  
Menczer, Savyon (IL)  
Monsonogo, Paris (F)  
E. Pinotti, São Paulo (BR)  
M. Piver, Buffalo (USA)  
R. Rakar, Ljubljana (SLO)  
S. S. Raju, London (GB)  
H. Shepherd, London (GB)  
S. Stelmachow, Warsaw (PL)  
Ungár, Budapest (H)  
B. Vermorken, Edegem (Belgium)  
E. Virtej, Bucharest (ROM)  
H. Wang, Taipei (Taiwan)  
A. Winter, Graz (A)  
Y. Yokoyama, Hiroasaki (Japan)

I.R.O.G. CANADA Inc.

400 Côte St-Luc - Apt # 212 - MONTRÉAL, Qué. H3W 2H3 (Canada)  
Tel: (514) 489-3242 - Fax: (514) 485-4513 - E-mail: canlux@qcaira.com

Editorial office

Galleria Storione, 2/A - 35123 PADOVA (Italy)  
Tel: (39)-049 8756900 - Fax: (39)-049 8752018

## **Preoperative transforming growth factor - beta 1 (TGF-beta 1) plasma levels in operable breast cancer patients**

**Jiri Chod 1, M. D., Eva Zavadova 2, M. D., Ph.D., Michael J. Halaska 1, M. D., Ph.D., Pavel Strnad 1, M. D., Ph.D., Terezie Fucikova 2, M. D., Ph.D., Lukas Rob 1, M. D., Ph.D.**

1OB/GYN Dept., 2<sup>nd</sup> Medical Faculty, Charles University, Prague, CZ,

2 Institute of Immunology and Microbiology, 1<sup>st</sup> Medical Faculty, Charles University, Prague, CZ

Czech Ministry of Health, IGA No. NR 8874-3 has supported this work

### **Summary**

**Objectives:** The aim of this project was to search for new risk prognostic markers in the early stage of breast cancer. We tested the preoperative plasma transforming growth factor - beta 1 (TGF- beta 1) levels in patients with operable breast cancer. Correlation with traditional prognostic markers and with positivity/negativity sentinel lymph node was evaluated.

**Materials and methods:** Between 2003 and 2005, 36 patients with operable breast cancer (T1-2, N0-1, M0) with positive or negative sentinel lymph node were evaluated for their plasma TGF-beta 1. 27 healthy individuals (9 premenopausal and 18 postmenopausal) served as controls. The patients were evaluated for the traditional prognostic markers including tumor characteristics, positivity and negativity of sentinel lymph node, TNM, tumor grade, expression of tumor markers CA 15-3 and CEA, hormonal status (pre- or postmenopausal patients, estrogen and progesteron receptor expression), ERB and p53

expression. Predictive value of TGF-beta 1 level and correlation with either of the assessed parameters was tested by one way ANOVA analysis.

**Results:** Measurements of preoperative plasma TGF-beta 1 levels in patients with operable breast cancer showed significantly higher as compared with healthy individuals (median 15293 and 3983 pg/ml  $p < 0.0001$ ). TGF-beta 1 level in plasma of patients with positive sentinel lymph node was significantly higher than in patients with negative sentinel lymph nodes (high versus low, median 18,9 and 14,5 ng/ml, respectively,  $p = 0,05$ ).

**Conclusion:** The determination of TGF-beta 1 status might help to identify a high-risk population early in tumor progression, for which a more appropriate therapy should be established. In the node-negative population, the up regulation of TGF-beta 1 might constitute an early event that promotes further progression of breast tumors.

**Key words:** Operable breast cancer, Transforming growth factor - beta 1 (TGF- beta1),

Preoperative assessment, Sentinel lymph node, Risk factor, Prognostic marker

## **Introduction:**

Breast cancer is the most frequent cancer of women patients and its incidence in developed countries of the world still increases. Most patients in early stage of disease (with negative regional lymph node, without signs of primary tumor metastasis) can be effectively treated with surgery and local radiotherapy. Patients with the positive axillary lymph nodes are indicated for adjuvant chemotherapy. Besides involvement of local lymph nodes, other parameters, such as the size of prime tumor, histology of the tumor, grade of tumor cells, hormone receptor and Her2/neu status help to choose appropriate therapy. Unfortunately, those criteria are not sufficient. Although the lymph node status is one of the best prognostic factors in breast cancer, it is not sufficiently accurate to predict the clinical course of the disease. Indeed, 20-30% of node negative breast cancer patients will experience disease recurrence and metastatic dissemination [1].

This is the reason of searching for new markers, which could, as soon and as objective as possible, to determine the exact situation of breast cancer patients and consequently to plan adequate therapy and to monitor therapy response. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) is thought to be implicated in breast cancer progression. TGF-beta is a pleiotropic growth factor, which affects many different cell functions such as proliferation and extracellular matrix synthesis. TGF-beta can stimulate tumor angiogenesis, alter the stromal environment and cause local and systemic immunosuppression, all of which contribute to tumor progression and metastatic dissemination [2 - 5].

This study was conducted to further analyse the role of TGF-beta 1 in breast cancer and to evaluate its significance as a prognostic marker in early stages of breast cancer. The aim was to compare preoperative plasma TGF-beta 1 levels in early breast cancer patients and to compare them with that of healthy individuals and with the patients with advanced stage of disease (positive sentinel lymph node).



The association between preoperative plasma level of TGF-beta 1 and traditional prognostic markers (lymph node status, TNM classification, tumor grade, hormonal status, expression of tumor markers CA 15-3, CEA) was studied for all patients by two way ANOVA analysis.

Those investigations should help to find marker which will allow to precis the diagnosis in early stages of disease and to help adjust the agressivity of standard therapy.

### **Materials and methods**

This study involved 36 patients diagnosed and treated in OB/GYN Dept., 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ, between early 2003 and late 2005. Patients were selected according to the following criteria:

(1) primary unilateral breast tumour; (2) no evidence of metastatic disease or any other malignancy at the time of diagnosis; (3) cT1,T2, N0/N1 status according to UICC criteria; (4) surgery as the first treatment - operable breast cancer study entrance criteria:

size of prime tumor less than 1cm with negative lymph node (T1a,b, N0)

size of prime tumor less than 1 cm with positive lymph node (T1a,b, N1)

size of prime tumor more than 1cm and less than 5 cm with negative lymph node (T1c,T2, N0)

size of prime tumor more than 1cm and less than 5 cm with positive lymph node (T1c, T2, N1)

The diagnosis of breast cancer was done by core-cut or open biopsy. All patients included into research study were routinely examined prior to operation, including palpation, mammography and/or breast sonography. In patients showed to be breast cancer positive tumor markers CEA and CA 15-3 (normal values till 32,4 for CA 15-3 and 2,5 for CEA), chest X-ray, liver sonography and skeleton scintigraphy was done. Data on age,

primary tumor stage, TNM staging (according to the Union Internationale Contre le Cancer) and immunohistochemistry (determination of hormone receptors, mitotic tumor index) were reviewed and recorded. Grade was established according to the Nottingham Grading System. Estrogen and progesterone receptor positivity was tested by monoclonal antibody kits ER/PR (Immunotech Company, USA). Her2/neu was tested by Hercep Test (DAKO Company, United Kingdom), Her2/neu 3+ were considered positive.

Venous blood samples were collected before the surgery. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -70 degrees of Celsius until assayed. TGF-beta 1 plasma level was determined by modified ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) using monoclonal anti TGF-beta 1 antibodies from R&D Systems®.

In all patients a detection of sentinel lymph node was performed. Most of the patients (26) underwent technetium guided detection after 18-20 hours after subareolar injection of technetium radiocolloid 99mTc Senti-scit, Radiob, H). 7 patients underwent blue dye peroperative guided detection (Bleu Patent© V, Guerbet, F), in 3 cases detection was performed by combinations of both methods [6]. Sentinel lymph node was examined by frozen section, in case of a positive finding of malignant cells, axillary lymph node dissection of level I, II was performed. All lymph nodes including SLN were routinely examined by hematoxylin-eosin in parafin embedded blocks.

27 healthy individuals (32 – 74 years, median age of 52, 9 premenopausal and 18 postmenopausal) served as controls.

Patients not included into the study: size of prime tumor more than 5 cm patients with neoadjuvant therapy (hormonal, radio- or chemotherapy). The study was approved by ethical board and patients signed informed consent regarding blood drawing and results presentation.

## Statistics

The association between preoperative plasma level of TGF-beta 1 and traditional prognostic markers (lymph node status, TNM classification, tumor grade, hormonal status, expression of tumor markers CA 15-3, CEA, Ki 67) was studied for all patients by two way ANOVA analysis. Statistical analysis was performed by using Mann-Whitney U-test. Data were presented as mean +/- SEM or as percentage. P-value of < 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

### *Clinical and pathological characteristics (Table 1)*

The patients were 38-78 years old at diagnosis, with a median age of 56 years. In total, 33,3 % of patients were premenopausal. A total of 12 patients presented a tumour size less than 1 cm; 72,2% of patients were node-negative, 25,0% presented one to three axillary invaded nodes and 2,8% had more than three invaded nodes. Ductal carcinomas were diagnosed in 77,8% of patients and invasive lobular carcinomas in 22,2% of patients.

The primary treatment was segmentectomy (69,4%) or modified radical mastectomy (30,6%) with axillary dissection. 26 patients underwent technetium guided detection of SLN, 7 patients underwent blue dye peroperative guided detection, in 3 cases detection was performed by combinations of both methods. The patients did not have any other therapy at the time of study entrance.

### *Biological characteristics of the breast cancer patients*

A wide inter-patient variability in the levels of biological factors in breast cancer samples could be observed.

31 out of 36 patients (86,1 %) showed ER positivity, 75,0% (27 / 36) were PR positive, 3 out of 35 were Her2/neu positive (8,3%). 3 patients showed triple negativity for all three markers. 15 out of 34 patients (44,1%) showed p53 positivity, 8 of those 15 showed p53 positivity less than 10 %. Only 3 patients showed CA 15-3 positivity and 2 for CEA.

From the total of 36 eligible patients, 26 (72,2%) showed negativity of the sentinel lymph node, whereas 10 were sentinel lymph node positive. There was no correlation between above mentioned markers expression and sentinel lymph node positivity.

### *TGF-beta 1 levels (Table 2, Figure 1)*

TGF-beta 1 level in plasma of cancer patients was significantly higher as compared with healthy individuals (median 15293 and 3983 pg/ml  $p < 0.0001$ ). TGF-beta 1 level in plasma of patients with positive sentinel lymph node was significantly higher than that in patients with negative sentinel lymph node (high versus low, median 14,5 and 18,9 ng/ml, respectively,  $p = 0,05$ ). There was no difference between pre- and postmenopausal patients.

**Table 1** Patients characteristics

Feature	Category	No. of patients	Percentage
Total population		36	
Age (years)	≤ 50	8	22,2
	> 50	28	77,8
Hormonal status	Premenopausal	12	33,3
	Postmenopausal	24	66,7
Tumor size	T1	7	19,4
	T2	29	80,6
Histology	Ductal	32	88,9
	Lobular	4	11,1
Grade	I	11	30,6
	II	17	47,2
	III	8	22,2
Receptor status	ER- PR-	5	13,9
	ER- PR+	0	0
	ER+ PR-	9	25
	ER+ PR+	22	61,1
Breast surgery	Segmentectomy	25	69,4
	Mastectomy	11	30,6
SLN status	Negative	26	72,2
	Positive	10	27,8

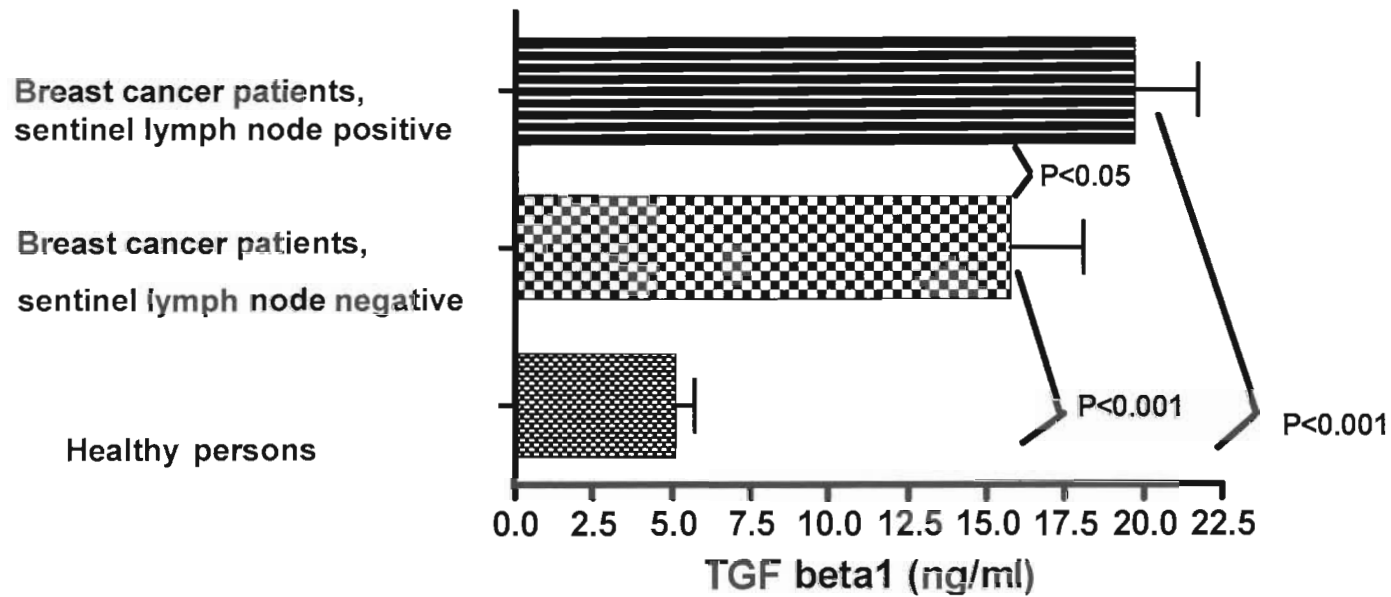
**Table 2** TGF-beta 1 levels in selected group of patients

Category	Range	Mean (CI)*	Q25	Q50	Q75
SLN positive	13,45 - 33,71	19,75	13,81	18,97	24,1
SLN negative	1,124 - 47,67	15,72	5,992	14,5	21
Healthy controls	1,095 - 12,41	5,086	2,46	3,938	6,96

\*95% confidence interval, CI

Figure 1

**Comparison: TGF beta 1 in plasma of healthy persons and operable breast cancer patients with negative or positive sentinel lymph node**



## Discussion

High levels of TGF-beta are recently discussed topic in the correlation to patient therapy response, stage of the disease and bad prognosis. Recent evidence continues to support a central role for TGF-beta in tumor maintenance and progression.

There is evidence that TGF-beta acts as a suppressor of tumor initiation but also as a promoter of tumor progression, when the antiproliferative effect of the TGF-beta signalling pathway has been overridden by other oncogenic mutations. In addition, there is increasing evidence that after malignant cells lose their sensitivity to TGF-beta 1

- mediated growth inhibition, autocrine TGF-beta signalling may promote tumorigenesis. TGF-beta was shown to be produced by tumor cells and mainly by macrophages and T-regulatory cells of cancer patients.

TGF-beta is a pleiotropic cytokine with powerful immunosuppressive functions. Recent investigations have highlighted the role of TGF-beta in suppression of T-cell mediated anti-tumor immunity as well as cytotoxicity of NK immune cells and dendritic cells (DC) [7-9].

Immune response of cancer patient is often insufficient, supporting immunosuppression and tumor growth [10-15]. Transforming growth factor-beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines [16]. Targeting tumor-associated macrophages and T-regulatory cells producing TGF-beta seems to be a novel strategy against breast cancer.

Whereas TGF-beta 1 seems to be confirmed as a bad prognostic marker in a number of human tumours such as ovarian [17], colorectal, gastric [18], and prostatic [19] cancers, glioma [20] and in the metastatic breast cancer [21]. The impact of TGF-beta 1 on the progression of breast cancer remains uncertain. Desruisseau et al. [1] described increased

TGF-beta 1 protein level in breast cancer tissue samples and correlated with a shorter disease free survival. This suggests that secreting higher levels of TGF-beta 1 may provide an advantage to tumour cells. The hormonal influence on activation of the TGF-beta system adds an additional layer of complexity.

Ivanovic et al. [21] showed that elevated plasma TGF-beta 1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. In our study, we focused on patients with early stages of disease.

We proved for the first time that TGF-beta 1 levels are elevated already in early stages of the disease in patients with operable breast cancer. Moreover, TGF-beta 1 in plasma of patients with positive sentinel lymph node was significantly higher as compared to patients with negative sentinel node. The fact that high level of TGF-beta 1 was observed in node-negative population strongly suggests that TGF-beta 1 interferes at early stages of tumour progression, probably by making cell environment favorable for metastatic spread. Thus, in the node-negative population, the upregulation of TGF-beta 1 group might constitute an early event that promotes further progression of breast tumours.

Whereas numerous predictive factors have been characterised thus far, early prognostic markers that interfere at the beginning of tumour progression are scarce. High TGF-beta 1 level observed in node-negative breast cancer patients suggests that the determination of TGF-beta 1 status might help to identify a high-risk population early in tumour progression, for which a more appropriate therapy should be established. In this context, it appears fundamental to confirm the prognostic value of TGF-beta 1 in a large cohort of node-negative patients.



## References

- [1.] Desruisseau S, Palmari J, Giusti C, Romain S, Martin PM, Berthois Y: "Determination of TGF-beta 1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival". *Br. J. Cancer.* 2006, 94, 239.
- [2.] Akhurst RJ, Derynck R: "TGF-beta signaling in cancer: a double-edged sword". *Trends Cell Biol.* 2001,11,44
- [3.] Bostrom K, Zebboudj AF, Yao Y, Lin TS, Torres A: "Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells". *J Biol Chem.* 2004, 17, 52904
- [4.] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A: "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression". *Nat. Genet.* 2001, 29, 117
- [5.] Wakefield LM, Roberts AB: "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis". *Curr. Opin. Genet.* 2002, 12, 22
- [6.] Strnad P, Rob L, Halaska MG, Chod J, Zuntova A, Moravcova Z: "Radioguided occult lesion localisation in combination with detection of the sentinel lymph node in non-palpable breast cancer tumours". *Eur J Gynaecol Oncol.* 2006, 27, 236
- [7.] Ghellal A, Li C, Hayes M, Byrne G, Bundred N, Kumar S: "Prognostic significance of TGF-beta 1 and TGF-beta 3 in human breast carcinoma". *Anticancer Res,* 2000, 20, 4413
- [8.] Zavadova E, Loercher A, Verstovsek S, Verschraegen CF, Micksche M, Freedman RS: "The role of macrophages in antitumor defense of patients with ovarian cancer". *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999, 13, 135
- [9.] Chouaib S, Paturel C, Chouaib F, Mami A, Caignard, Blay JY: "The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction". *Immunol.Today* 1997, 18, 493

- [10.] Bonig H, Banning U, Hannen M, Kim ZM, Verheyen J, Korholz C, Korholz D: „Transforming growth factor-beta (1) suppresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes”. *Scandinavian Journal Of Immunology* 1999, 50, 612
- [11.] Bouchard C, Galinha A, Tartour E, Fridman W H and Sautes C: “A transforming growth factor beta-like immunosuppressive factor in immunoglobulin G-binding factor”. *J Exp. Med* 1995, 182, 1717
- [12.] Zavadova E, Savary CA, Templin S, Verschraegen CF, Freedman RS: “Maturation of dendritic cells from ovarian cancer patients”. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001, 48, 289
- [13.] Hwu P, Freedman RS: “The immunotherapy of patients with ovarian cancer”. *J Immunother.* 2002, 25, 189
- [14.] Lenzi R, Rosenblum M, Verschraegen C, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Hicks ME, Lang EA, Nash MA, Levy LB, Garcia ME, Platsoucas CD, Abbruzzese JL, Freedman RS: “Phase I study of intraperitoneal recombinant human interleukin 12 in patients with Mullerian carcinoma, gastrointestinal primary malignancies, and mesothelioma”. *Clin Cancer Res.* 2002, 8, 3686
- [15.] Melichar B, Freedman RS: “Immunology of the peritoneal cavity: relevance for host-tumor relation”. *Int J Gynecol Cancer.* 2002, 12, 3
- [16.] Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ramanathapuram LV, Arteaga CL, Akporiaye ET: “Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res.* 2003, 63, 1860
- [17.] Santin AD, Bellone S, Ravaggi A, Roman J, Smith CV, Pecorelli S, Cannon MJ, Parham GP: “Increased levels of interleukin-10 and transforming growth factor-beta in the plasma and ascitic fluid of patients with advanced ovarian cancer”. *BJOG.* 2001, 108, 804

- [18.] Coban S, Yüksel O, Koçkar MC, Köklü S, Basar O, Tutkak H, Ormeci N: "The significance of serum transforming growth factor beta 1 in detecting of gastric and colon cancers". *Hepatogastroenterology*. 2007, 54, 1472
- [19.] Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, Andrews B, Zhu K, Wheeler TM, Slawin KM: "Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression". *Clin Cancer Res*. 2004,10,1992
- [20.] Schneider T, Sailer M, Ansorge S, Firsching R, Reinhold D: „Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma". *J Neurooncol* 2006, 79, 61
- [21.] Ivanović V, Demajo M, Krtolica K, Krajnović M, Konstantinović M, Baltić V, Prtenjak G, Stojiljković B, Breberina M, Nesković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D, Dimitrijević B: "Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients". *Clin Chim Acta*. 2006, 371,191

# Radioguided occult lesion localisation in combination with detection of the sentinel lymph node in non-palpable breast cancer tumours

P. Strnad<sup>1</sup>, M.D., Ph.D.; L. Rob<sup>1</sup>, M.D., Ph.D.; M.G. Halaska<sup>1</sup>, M.D.; J. Chod<sup>1</sup>, M.D.;  
A. Zuntova<sup>2</sup>, M.D.; Z. Moravcova<sup>3</sup>, M.D.

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, <sup>2</sup>Department of Pathology, <sup>3</sup>Department of Radiodiagnosics  
2<sup>nd</sup> Medical Faculty, Charles University, Prague (Czech Republic)

## Summary

**Purpose of the investigation:** The aim of study was to determine the efficacy of radioguided occult lesion localisation (ROLL) for non-palpable invasive breast cancer combined with sentinel lymph node biopsy (SLNB) and to compare the amount of tissue excised by radioguided navigation versus the hook-wire technique.

**Methods:** We injected 45 MBq of radiolabelled technetium intratumourally and 15 MBq subdermally 18 hours before surgery in 21 women with bioptically verified non-palpable breast cancer. We identified by gamma probe non-palpable tumours, which were excised, followed by identification and excision of the sentinel lymph node. We compared our results with a group of 12 women with non-palpable lesions marked by hook-wire localisation.

**Results:** ROLL combined with SLNB was successful in 100%; volume of excised tissue was smaller in the hook-wire group but expressed higher variability in volume than in the ROLL group although the difference was not statistically significant.

**Conclusion:** The method of ROLL combined with SLNB is technically possible and safe, resulting in minimisation of the surgical intervention and a decrease in postoperative morbidity. ROLL was more precise than the hook-wire procedure even though the amount of tissue excised was the same in both groups.

**Key words:** Radioguided occult lesion localisation; Sentinel lymph node biopsy; Breast cancer; Surgery.

## Introduction

Experience with radioguided navigation involving dissection of the sentinel lymph node led to a new protocol in the detection and excision of non-palpable or small breast cancer tumours [1-3]. The introduction of mammographic screening resulted in an increase in the number of small and non-palpable breast tumours. This group of tumours has a low rate of lymph node metastasis and can profit most from the sentinel lymph node detection procedure. The frequency of sentinel lymph node involvement in our department is given in Table 1. The fact that 10% of tumours of a size smaller than 10 mm exhibited lymph node involvement confirms the need for lymph node staging.

The aims of this study were twofold: to determine the efficacy of radioguided occult lesion localisation (ROLL) in breast cancer in combination with the detection of the sentinel lymph node and to compare the amount of tissue excised by radioguided navigation versus the hook-wire technique.

## Materials and Methods

ROLL with sentinel lymph node biopsy (SLNB) was performed in 21 patients with bioptically verified non-palpable breast cancer between the years 2003 and 2005. We injected 0.2-0.5 ml MBq of radiocolloid (<sup>99m</sup>Tc Senti-scit, Fodor Jozsef NCPH, Fed. J. Curie, NRI, Radiob, Budapest) intratumourally and 0.1-0.2 ml subdermally to the quadrant of the tumour under sonographic guidance. Lymphoscintigraphy was performed three hours after the application. The next day, approximately 18-20 hours after the application, a lesion was identified during the surgical procedure using a hand-held gamma probe. A small incision was made above the tumour, followed by surgical excision with a healthy margin that expressed much lower radioactivity. The tissue sample was oriented and sent for routine histopathologic examination. From a separate incision in the frontal axillary line the sentinel lymph node was identified using the gamma probe. The lymph node was then sent for frozen-section histopathologic examination using a two-section technique. In case of a negative result from the frozen section total axillary lymphadenectomy was abandoned.

Histopathologic examination: the sentinel lymph node was cut into two halves in the greatest diameter, snap-frozen in liquid nitrogen and sectioned for peroperative histopathologic examination. The rest of the tissue was then defrozed, and together with the other half, fixed in 10% purified formol for 24 hours and finally fixed in paraffin. The paraffin embedded sections were stained with hematoxylin-eosin. Next, 0.2 mm serial sectioning of the paraffin block was performed, followed by immunohistochemical examination: polyclonal antibodies cytokeratine large spectrum (Immunotech), anti-human cytokeratine AE1/AE3 (Dako), monoclonal antibodies anti-human cytokera-

The work was supported by a grant from the Ministry of Health IGA MZ CR NH 7670-3.

Revised manuscript accepted for publication January 5, 2006

Table 1. — Frequency of sentinel lymph node involvement as a function of tumour size.

Tumour size cm	Cases		Involved SLN	
	number	%	number	%
≤ 1	61	36	6	12
1 - 2	63	37	20	42
≥ 2	45	27	22	46
Total	169	100	48	100

tine - clone MNF 116 (Dako) and monoclonal antibodies anti-human epithelial membrane antigen (EMA) (Dako). The reactions were visualized by diaminobenzidine - DAB (Fluka).

We compared our results with the group of 12 women with non-palpable lesions that were localised using the hook-wire technique. Hook-wire localization was performed on the day of surgery using stereotactic mammographic guidance (wire placed into the centre of the lesion). After excision of the non-palpable lesion, a specimen mammography was performed, followed by regular histopathologic examination.

All histologic samples were measured in three directions (A,B,C) and the volume was calculated for both samples using the ellipsoid formula  $(\pi/6)*A*B*C$ . The F test was used to test equal population variances. The two-sample t-test (for equal variances according to the result of the F test) was applied to compare mean volumes of the ellipsoids. The normality of the ellipsoid volumes can be assumed based on the Kolmogorov-Smirnov test.

## Results

The patients' average age was 60 years (range 44-78 years). In the ROLL group of 21 patients a conservative procedure was performed in 16 (76%) patients and mastectomy in five (24%). In the hook-wire group of 12 patients a conservative procedure was performed in ten (83%) patients and mastectomy in two (17%). The indications for mastectomy were the multifocality of breast cancer or the excessive intraductal component of the cancer.

Tumour-free margins were achieved in all cases greater than 3 mm in both groups. The sentinel lymph node was identified in all 21 (100%) patients in the ROLL group, expressing macrometastasis (tumour greater than 2 mm) in two of these patients (9.5%). Axillary lymph node dissection was performed in two (9.5%) patients in the ROLL group. The indication for axillary lymph node dissection was frozen section positive lymph nodes in all patients. After regular histopathologic examination using serial sectioning micrometastasis (metastasis smaller than 2 mm) in originally frozen section negative lymph nodes, metastasis was revealed in one patient (4.7%) in the group with the ROLL procedure.

The histopathologic findings revealed ductal invasive carcinoma in 13 (62%) patients in the ROLL group and in all 12 (100%) patients in the hook-wire group. Furthermore, in the ROLL group lobular invasive carcinoma was found in five (24%) patients and ductolobular carcinoma in three (14%) patients.

The descriptive characteristics according to the volume of tissue excised for the two procedures (i.e. ROLL and

hook-wire) are presented in Table 2. Although the patients in the hook-wire group expressed higher variability in volume than the patients in the ROLL group, the difference did not reach statistical significance ( $p = 0.1$ ). The average volume was found to be higher in the patients in the ROLL group but again the difference was not statistically significant ( $p = 0.86$ ). Confidence limits for the mean volumes are depicted in Figure 1. In the figure the higher variability and greater number of observations in the hook-wire procedure correspond to the lower occurrence of the estimated mean and wider confidence interval for this procedure.

Table 2. — Descriptive statistics for ellipsoid volumes.

Procedure	n	Mean mm <sup>3</sup>	SD mm <sup>3</sup>	Lower limit mm <sup>3</sup>	Upper limit mm <sup>3</sup>
Hook-wire	12	18,990	15,935	8,865	29,114
ROLL	21	19,813	10,446	15,058	24,568

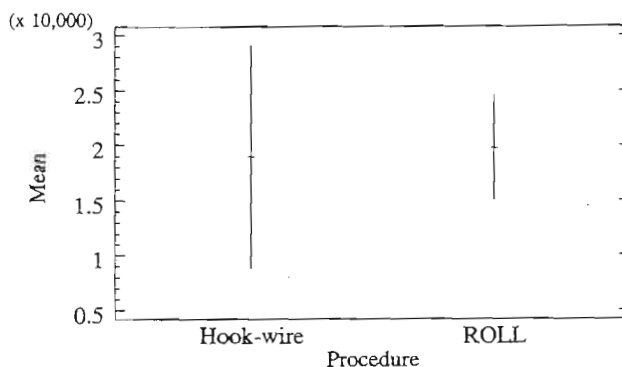


Figure 1. — 95% confidence limits for the mean volume of the ellipsoid.

## Discussion

In comparing both procedures of non-palpable lesions we found ROLL to be more precise than the hook-wire procedure in preventing abundant tissue loss. The tumour was always excised completely. In accordance with Audisio *et al.* [4], Patel *et al.* [5] and Ronka *et al.* [6], the tumour-free margins were always achieved with the ROLL procedure as was the case with the hook-wire method.

The main advantage of the ROLL method is the combination of the detection of a non-palpable lesion and the sentinel lymph node in one procedure [7]. In our original set of 169 patients with SLNB followed by complete axillary dissection agreement between the negative results of SLN and the rest of the axillary lymph nodes was 100% [8]. In addition, the method of frozen section proved sufficient in estimating lymph node status. Consistent with other authors we found a one-third reduction in surgery time as well as smaller tissue loss and thus a better cosmetic result [9]. According to the literature the length of hospitalisation stay is shorter and morbidity is reduced [10].

The method of ROLL combined with SLNB is easy, more precise and more effective than other methods. The main disadvantages are the cost of the procedure and the necessity to co-ordinate several departments. The hook-wire procedure; on the other hand, presents a high number of failures in that the top of the wire may fail to be placed in the centre of the lesion or it may be dislocated during the transportation of the patient. In these cases greater volume is needed to excise the tissue.

### Conclusion

ROLL of non-palpable tumours is a simple, fast and tissue-sparing procedure. It is more precise than the hook-wire procedure. The method of ROLL combined with SLNB as described in the article proves to be technically possible and safe. ROLL combined with SLNB provides better results in terms of destruction of the tissue and amount of tissue excised. A negative result of the sentinel lymph node enables us to leave out lymphadenectomy, leading to minimalization of the surgical intervention, a reduction in postoperative morbidity and better cosmetic results.

### Acknowledgement

H. Krizova, Department of Nuclear Medicine, 2<sup>nd</sup> Medical Faculty, Charles University, Prague.

### References

- [1] DeCicco C., Pizzamiglio M., Trifiro G., Luini A., Ferrari M., Prisco G. *et al.*: "Radio-guided occult lesion localization (ROLL) and surgical biopsy in breast cancer". *Tech. Aspects J. Nucl. Med.*, 2002, 46, 145.
- [2] Feggi L., Basaglia E., Corcione S., Querzoli P., Soliani G., Ascaneli S. *et al.*: "An original approach in the diagnosis of early breast cancer: use of the same radiopharmaceutical for both non-palpable lesions and sentinel node localization". *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001, 28, 1589.
- [3] Krizova H., Wald M., Strnad P., Hermanska J., Zimak J., Zuntova A. *et al.*: "Detection of the sentinel node in breast carcinoma using method of a single subcutaneous injection of radiopharmaceutical". *Neoplasma*, 2004, 51, 44.
- [4] Audisio R.A., Nadeem R., Harris O., Desmond S., Thind R., Chagla L.S.: "Radioguided occult lesion localization (ROLL) is available in the UK for impalpable breast lesions". *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 2005, 87, 92.
- [5] Patel A., Pain S.J., Britton P., Sinnatamby R., Warren R., Bobrow L. *et al.*: "Radio guided occult lesion localization (ROLL) and sentinel node biopsy for impalpable invasive breast cancer". *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2004, 30, 918.
- [6] Ronka R., Krogerus L., Leppanen E., von Smitten K., Leidenius M.: "Radio-guided occult lesion localization in patients undergoing breast-conserving surgery and sentinel node biopsy". *Am. J. Surg.*, 2004, 184, 491.
- [7] Barros A., Cardoso M.A., Sheng P.Y., Costa P.A., Pelizon C.: "Radio-guided localization of non-palpable breast lesions and simultaneous sentinel lymph node mapping". *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002, 29, 1561.
- [8] Strnad P., Rob L., Krizova H., Zuntova A., Chod J., Halaska M.: "Sentinel lymphatic node biopsy for breast cancer in practise". *Ces. Gynek.*, 2005, 70, 291.
- [9] Luini A., Zurrada S., Paganelli G., Galimberti V., Sacchini V., Monti S. *et al.*: "Comparison of radioguided excision with wire localization of occult breast lesions". *Br. J. Surg.*, 1999, 86, 522.
- [10] Grislier B., Cachin F., Dalle C., Gimbergues P., Leboudec G., Feillel V. *et al.*: "Radio-guided occult lesion localization: A new method to remove occult breast lesions". *Med. Nucl.*, 2004, 28, 25.

Address reprint requests to:  
 P. STRNAD, M.D., Ph.D.  
 Ob/Gyn. 2<sup>nd</sup> Medical Faculty  
 Charles University, Prague  
 V Uvalu 84  
 15000 Praha 5 (Czech Republic)

**Od:** <karen.earick@jax.ufl.edu>  
**Komu:** <mhalaska@centrum.cz>  
**Předmět:** The Breast Journal - Manuscript TBJ-00129-2008.R1  
**Datum:** 30.05.2008 20:15  
**Důležitost:** 0  
**Velikost:** 1900

---

Re: Presentation, management and outcome of 32 patients with pregnancy-associated breast cancer: A matched controlled study. TBJ-00129-2008.R1 Dear Dr. Halaska: Thank you for submitting your revised manuscript to The Breast Journal. I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in a future issue of the The Breast Journal. For publication I will need a copy of the manuscript on CD in word format, and please include all figures, if this applies, and if you want the figures in black/white at no charge or color at \$800/page. Also, please be sure that a copyright agreement form has been submitted. Thank you, and please mail to the address below. I invite you to consider us again when submitting your work for publication. Thank you, Shahla Masood, MD Editor-in-Chief The Breast Journal 655 W. 8th St. Jacksonville, FL 32209



**Presentation, management and outcome of 32 patients with pregnancy-associated breast cancer: A matched controlled study.**

Journal:	<i>The Breast Journal</i>
Manuscript ID:	TBJ-00129-2008.R1
Manuscript Type:	Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Halaska, Michael; 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, Dept. of Obstetrics and Gynecology Pentheroudakis, George; Ioannina University Hospital, Dept. of Medical Oncology Strnad, Pavel; 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, Dept. of Obstetrics and Gynecology Stankusova, Hana; Faculty Hospital Motol, Dept. of Radiation and Oncology Chod, Jiri; 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, Dept. of Obstetrics and Gynecology Robova, Helena; 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, Dept. of Obstetrics and Gynecology Petruzelka, Lubos; 1st Medical Faculty, Charles University in Prague, Dept. of Oncology Rob, Lukas; 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, Dept. of Obstetrics and Gynecology Pavlidis, Nicholas; Ioannina University Hospital, Dept. of Medical Oncology
Key Words:	breast cancer, pregnancy-associated, prognosis, pregnancy, outcome



**Title:**

Presentation, management and outcome of 32 patients with pregnancy-associated breast cancer: A matched controlled study.

**Authors:**

Michael J. Halaska, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

George Pentheroudakis, M.D.<sup>2</sup>

Pavel Strnad, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

Hana Stankusova, M.D., Ph.D.<sup>3</sup>

Jiri Chod, M.D.<sup>1</sup>

Helena Robova, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

Lubos Petruzelka, Prof., M.D., Ph.D.<sup>4</sup>

Lukas Rob, Ass. Prof., M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

Nicholas Pavlidis, Prof., M.D., Ph.D.<sup>2</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Dept. of Obstetrics and Gynecology, 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Dept. of Medical Oncology, Ioannina University Hospital, Ioannina, Greece

<sup>3</sup> Dept. of Radiation and Oncology, FN Motol, Czech Republic

<sup>4</sup> Dept. of Oncology, 1st Medical Faculty, Charles University in Prague, Czech Republic

**Corresponding address:**

Michael J. Halaska, M.D., Ph.D.

Dept. of Obstetrics and Gynecology of the 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague

V Uvalu 84, 150 00, Praha 5, Czech Republic

tel. +42 022443 4201, fax. +42 022443 4220

e-mail: mhalaska@centrum.cz

**Running title:**

Patients with pregnancy-associated breast cancer.

**Key words:**

breast cancer; chemotherapy; outcome; pregnancy; pregnancy-associated breast cancer;  
prognosis

**Abstract**

Pregnancy-associated breast cancer (PABC) is a rare and challenging problem. We sought to describe epidemiology, management and outcome of women in whom breast cancer was diagnosed during pregnancy or within one year after delivery.

Thirty-two women with PABC were referred to two European Union oncology centers between 1995 and 2007, 16 during pregnancy and 16 within one year after delivery. Data concerning diagnosis, management, delivery and fetal and maternal outcome were recorded. A group of 32 patients (matched controls) presenting with non-pregnancy-associated breast cancer (non-PABC) was matched for age at diagnosis, tumor size and stage to each PABC patient. Differences in outcome between the PABC and non-PABC groups were then assessed.

Histological features were similar in both groups, except that estrogen receptor-negative tumors were more common in the PABC group. Three patients received chemotherapy and two others underwent surgery during pregnancy, with no excess toxicity or severe maternal/fetal adverse effects. All children in the PABC group were healthy, except for one exposed to epirubicin in utero and born with rectal atresia. Overall survival was similar in PABC and non-PABC patients ( $p=0.449$ ). The subgroup of patients with breast cancer diagnosed within one year after delivery showed a shorter time to relapse (TTR) than controls or patients with gestational cancer ( $p=0.0178$ ).

PABC is a special situation, necessitating individualized, multidisciplinary management. Prognosis is similar for women with non-gestational cancer matched for age and stage though poorer outcome post-partum should be further investigated.

## Introduction

Pregnancy-associated breast cancer (PABC) is a clinical entity that represents a challenge for physician and patient alike. Because women are postponing childbearing to a later reproductive age, the number of patients with the diagnosis of breast carcinoma during or within 12 months from completion of pregnancy is increasing. The average age of patients with breast carcinoma in pregnancy is between 35 and 38 years (1). With an incidence of 1 to 3 cases per 10 000 pregnancies, it is the second most frequent malignancy occurring during gestation after cervical cancer (2). However, the impact of pregnancy and lactation on tumor biology on the management and prognosis of patients with breast cancer remains unclear (3). Most investigators define PABC as breast cancer occurring during gestation, lactation or within one year from delivery (4). In keeping with this convention and providing comparable data we used this definition and presented epidemiology, management and outcome data on 32 patients with PABC diagnosed in two oncologic centers of the European Union treated in the past 12 years.

## Materials and Methods

From 1995 to 2007, 32 patients with PABC (group A) from two medical centers (10 from the Ioannina University Hospital, Ioannina, Greece and 22 from the University Hospital Motol, Prague, Czech Republic) were included in this retrospective study. Of these 32 patients, 16 were diagnosed during pregnancy (group B) and 16 were diagnosed within one year after delivery (group C). We examined patient case sheets and recorded the following data: patient demographic characteristics, stage of pregnancy at the time of diagnosis, histological characteristics of the tumor, management, delivery data and data on neonatal and maternal outcome.

A grade scoring system was established according to the Nottingham grading system. Tumor estrogen and progesterone receptor status were tested immunohistochemically by means of the mouse monoclonal anti-Human ER/PR antibodies (DAKO, Denmark). Hormone receptor status was considered positive when 10% or more of tumor cells exhibited staining. Her2/neu protein expression was tested with the HercepTest Kit (DAKO, Denmark). Her2/neu 3+ was considered positive; in case of equivocal results (i.e. 2+) gene amplification was sought by means of fluorescent in situ hybridization (FISH).

Each patient with PABC was matched to a patient presenting with non-pregnancy-associated breast cancer (non-PABC) according to age at diagnosis, tumor size, axillary lymph node status and presence or absence of metastatic deposits (matched controls, group D). The patient match was tested by comparing median values for age and tumor size using the Wilcoxon test. Differences in groups A and D concerning histopathological features (such as grade, ER/PR status and Her2/neu status) were tested with the  $\chi^2$  test of independence. Survival analysis was performed for time to relapse (TTR) and overall survival (OS) time, and survival curves were constructed according to the Kaplan-Meier product-limit method and compared by the log-rank test.

## Results

Patient characteristics and tumor histological parameters are presented in Table 1. The median age at diagnosis was 33.7 years (range 25.9-41.6), average gravidity 2.4 years and parity 1.8 years. The most frequent histological type of malignancy was ductal carcinoma, which occurred in 97% of the PABC patients. The mean size of the primary tumor at diagnosis was 33.9 mm (range 6-100), grade 2.4. Estrogen receptor expression was observed in 36.7% of the gestational tumors and progesterone receptor in 36.7%. Her2/neu protein

overexpression or gene amplification was noted in 33.3% of the cases and involved axillary lymph nodes in 65.5% in the PABC group.

Table 2 summarizes the management data in breast cancer patients diagnosed during pregnancy. Gestational age was the most important factor in determining the selected treatment procedure. Three patients received chemotherapy (single-agent epirubicin in two patients and FEC in one patient), all during the second and third trimesters of pregnancy. After completion of pregnancy, all patients subsequently received full-dose combination chemotherapy, including alkylators, anthracyclines and taxanes. Two pregnant women underwent surgical resection of their tumor (one a breast-conserving procedure and the other a modified radical mastectomy) with axillary lymph node clearance during the second and third trimesters of pregnancy. The remaining 13 patients underwent surgical extirpation of their tumor (mastectomy in seven and breast-conserving surgery in six) after delivery, with the exception of three patients who harbored metastatic disease. Breast or chest wall external beam radiotherapy was implemented in six patients after delivery and following termination of lactation. Chemotherapy administered in our three pregnant patients was well-tolerated, with no excess of severe hematologic or non-hematologic toxicities encountered, despite administration of standard doses of cytotoxic drugs. No adverse sequelae were observed in either mother or fetus from the anesthesia or surgical procedures performed in our two pregnant patients.

Table 3 presents management data in patients with breast carcinoma diagnosed within a one-year period after delivery. Management of the malignant disease was significantly more straightforward in these women 3-52 weeks after delivery, as cessation of lactation was the only precaution required regarding potential impact on the offspring. With the exception of one woman lost to follow-up, all patients were managed with surgical extirpation of the

primary tumor. Administration of combination chemotherapy and external beam radiotherapy was performed in seven cases.

Information on type of delivery and neonatal and maternal outcome are summarized in Table 4. Eighteen of 32 patients were tested for BRCA mutation. Of eight patients with available test results, six (75%) were positive for germline mutations. Abortions occurred in 4/32 women, with three in group B (cancer during pregnancy). Spontaneous birth occurred in 19 patients, whereas in seven patients a healthy infant was delivered by means of a scheduled caesarean section. The median newborn weight was about 3 kg (range 1890-4870 g); their health being normal in 23 of 25 deliveries of available data. One baby presented transient jaundice and one rectal atresia; the one with the atresia was born to a mother who received single-agent epirubicin starting on the 23rd gestational week. Twelve of 32 women had malignant relapse and 10 died at a median follow-up of 142 months. Three relapses occurred in group B and nine in group C, where the number of deaths was 2 and 8 in groups B and C, respectively.

Groups A (32 women with PABC) and D (matched controls) were found to be well matched for age, stage, tumor size, grade, progesterone receptor and HER2 status though estrogen receptor-negative tumors were more frequent in women with PABC. Twelve malignant relapses and nine deaths occurred in group D. Median follow-up times for groups A and D were 142.5 and 214.8 weeks, respectively. No statistically significant difference in TTR was found between groups A and D ( $p=0.143$ , Figure 1). The median TTR in group A was 165, whereas in group D the median was not reached. When group A was divided into group B (breast cancer during pregnancy) and group C (breast cancer within one year after delivery), a statistically significant worse prognosis was noted in group C (median TTR not reached) but not in group B (median TTR 51.5) ( $p=0.0178$ , Figure 1). No statistically significant differences, however, were observed in OS between groups A (median OS 309)

and D (median OS 449) ( $p=0.449$ , Figure 2) or among groups B (median OS not reached), C (median OS 258) and D (median OS 449) ( $p=0.468$ ).

## Discussion

There is a minor shift towards a lower incidence of breast cancer in the group of women aged below 40 years recorded between the years 1985 and 2003 in the Czech Republic. In 1985, there were 6.7% of all patients with breast cancer under 40 years, whereas in 2003 the figure was 3.4% of all patients (5). On the other hand, the average age of primiparous women has shifted dramatically towards older age. In 1985, the average age of primiparous and multiparous women was 22.3 and 24.6 years, respectively; the same parameters in 2003 were 25.9 and 28.1 years. This means that as childbearing is delayed until older age, in which breast cancer incidence is markedly higher, the risk of breast carcinoma associated with pregnancy is expected to increase.

According to the literature, there is a comparable representation of the histological types of breast carcinoma in pregnant and non-pregnant women (6-8), whereas positive regional lymph nodes were found more often in pregnant women (59- 83%) than in non-pregnant women (38-54%) (9). In our PABC patient group 65.5% harbored node-positive tumors, a figure lying in the high end of reported incidence of axillary involvement in breast cancer series. Some published studies have reported a higher frequency of estrogen-negative tumors. Bonnier et al., for instance, reported that 42% of gestational tumors were estrogen receptor-negative as compared with 21% in their control group. Other studies, which have focused on tumor expression of Her2/neu protein, reported that the number of positive Her2/neu tumors in pregnancy was greater (58%) when compared with a control group (10 - 25%) (10). Our data seem to confirm the high incidence of estrogen receptor-negative tumors (59%), which is probably a biological characteristic of breast cancer affecting most young



women rather than pregnant women per se. On the contrary, we observed Her2/neu overexpression in less than a third of our pregnant women, a finding consistent with quoted incidences in non-PABC populations.

Because treatment is strictly individual, the essential part of the treatment strategy in every case of gestational cancer should be based on a good communication with the patient and family. Co-operation of oncosurgeons, oncologists, radiotherapists, pathologists and perinatologists is a key issue for successful, individualized patient management. To our knowledge, there is no evidence indicating better outcome through the termination of pregnancy (11). Radical modified mastectomy with axillary lymphadenectomy is favored because of the associated possibility to omit radiotherapy during pregnancy. Despite a propensity for greater tumor size at diagnosis, probably because of diagnostic delays, breast-conserving surgery can be performed when indication criteria are fulfilled (12). There are varying opinions on the use of sentinel lymph node biopsy (SLNB) with  $^{99m}\text{Tc}$ . Kaufmann et al. do not recommend the usage of radioisotope because of unknown teratogenic effects (13), whereas Gentilini et al. propose that the maximal radiation dose of 0.00043 Gy associated with the procedure is well below the threshold teratogenic dose (14). SLNB with blue dye can avoid the risks of radiation.

Chemotherapy used in the first trimester is associated with an increased risk of miscarriage or congenital malformation of the fetus. However, during the second and third trimesters, relatively low risks for the fetus were reported (15;16). Berry et al.'s prospective study, which used a standard protocol of chemotherapy in 24 pregnant patients after the first trimester (FAC: fluorouracil 1000 mg/m<sup>2</sup>, doxorubicin 50 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>), found only three cases of preterm delivery (15). Another prospective patient cohort study included 57 women treated with FAC regimen. One child had Down's syndrome and two had congenital abnormalities (club foot, congenital bilateral ureteral reflux) (17). A

retrospective study described similar results in 28 patients treated with chemotherapy in the period after the first trimester of pregnancy (18), whereas a study with 40 patients treated with anthracyclines or cyclophosphamide after the first trimester reported no neonatal or maternal complications (19). Thus far, not enough evidence has been accumulated on taxane use in pregnancy though fetal toxicity has been noted in animal models. Nevertheless, there were no complications observed in individual human cases, with the sole exception of transitory anhydramnios (20;21). When cytostatics are used during pregnancy, it is important to plan delivery two to three weeks after the last cycle of chemotherapy in order to avoid maternal and fetal myelosuppression. A relation of rectal atresia (which occurred in one child in our series) to exposure to epirubicin, a highly lipophilic compound, during the 2nd trimester of pregnancy is highly improbable. Longer follow-ups of children exposed to chemotherapy in utero are needed to determine late effects on normal tissues. Breastfeeding is contraindicated during chemotherapy because most cytostatics are released into the milk, a fact confirmed in a recent international meeting of experts outlining therapeutic guidelines (22).

As summarized in Table 5, a majority of the authors found no difference between patients with PABC and patients with non-gestational breast cancer matched for stage and age (23-31). Accordingly, an unfavorable prognosis has been attributed to late diagnosis rather than distinct tumor biological behavior. Few studies have specifically compared subgroups of PABC patients (e.g., those with breast cancer during pregnancy and those with breast cancer diagnosed within one year after delivery). Comparing OS in patients with breast cancer during pregnancy, lactating women with breast cancer and matched controls, Lethaby et al. found a worse prognosis in patients with cancer diagnosed during lactation (27). In our series a trend toward a worse prognosis for patients diagnosed with breast cancer within one year after the delivery was noted, though this did not translate into an OS difference, probably because of the small sample size. This finding, if confirmed in subsequent work in a larger series, could

reflect persistence of diagnostic delays, distinct tumor biology, host immune dysfunction or an aberrant hormonal milieu. Data registration is needed to expand clinical experience on which basic research could be based and lead to a better understanding of tumor and host biology in gestational cancer.

### **Acknowledgments**

The work was supported by a grant from the Ministry of Health of the Czech Republic, IGA MZ NR 9455-3. Thanks for the co-operation of DTC, Prague.

Preprint

## References

1. Jacobs IA, Chang CJ, Salti GI. Coexistence of pregnancy and cancer. *Am Surg* 2004;70(11):1025-9.
2. Pentheroudakis G, Pavlidis N. Cancer and pregnancy: Poena magna, not anymore. *Eur J Cancer* 2006;42:126-40.
3. Molckovsky A, Madarnas Y. Breast cancer in pregnancy: a literature review. *Breast Cancer Res Treat* 2007 May 26;108(3):333-8.
4. Barthelmes L, Davidson LA, Gaffney CH, Gateley CA. Pregnancy and breast cancer. *BMJ* 2005;330:1375-7.
5. Statistical yearbook of the Czech Republic UZIS - 2002. Praha: ÚZIS; 2003.
6. Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne C. Diseases of the breast. 3rd Edition ed. Philadelphia: Lippicott Williams and Wilkins; 2004.
7. Kroman N, Jensen MB, Melbye M, Wohlfahrt J, Mouridsen HT. Should women be advised against pregnancy after breast-cancer treatment? *Lancet* 1997;350:319-22.
8. Pavlidis NA, Pentheroudakis G. The pregnant mother with breast cancer: Diagnostic and therapeutic management. *Cancer Treat Rev* 2005;31(6):439-47.
9. Woo JC, Yu T, Hurd TC. Breast Cancer in Pregnancy. *Arch Surg* 2003;138:91-8.
10. Elledge R, Ciocca D, Langone G, McGuire W. Estrogen receptor, progesterone receptor and HER-2/neu protien in breast cancer from pregnant patients. *Cancer* 1993;71:2499-506.
11. Nugent P, OConnel TX. Breast cancer and pregnancy. *Arch Surg* 2000;150(11):1221-5.
12. Kahlert S, Bauerfeind I, Strauss A, Untch M. Behandlung des Mammakarzinoms in der Schwangerschaft-Erfahrungen aus der Universitätsfrauenklinik Grosshadern und Internationale Datenlage. *Zentralbl Gynakol* 2004;126:159-66.
13. Kaufmann M, Loibl S, von Minckwitz G. Breast cancer during pregnancy. *Eur J Cancer* 2004;2:22-3.
14. Gentilini O, Cremonesi M, Trifiro G, et al. Safety of sentinel node biopsy in pregnant patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2004;15:1348-51.
15. Berry DL, Theriault RL, Holmes FA ea. Management of breast cancer during pregnancy using standardized protocol. *J Clin Oncol* 1997;17(3):855-61.
16. Giacalone PL, Laffargue F, Benos P. Chemotherapy for breast carcinoma during pregnancy: A French national survey. *Cancer* 1999;86(11):2266-71.
17. Hahn KM, Johnson PH, Gordon N, Kuerer H, Middleton L, Ramirez M, et al. Treatment of pregnant breast cancer patients and outcomes of children exposed to chemotherapy in utero. *Cancer* 2006 Sep 15;107(6):1219-26.

18. Ring AE, Smith IE, Jones A, Shannon C, Galani E, Ellis PA. Chemotherapy for breast cancer during pregnancy: An 18-year experience from Five London Teaching Hospital. *J Clin Oncol* 2005;23(18):4192-6.
19. Kerr JR. Neonatal effects of breast cancer chemotherapy administered during pregnancy. *Pharmacotherapy* 2005;25(3):438-41.
20. Gonzalez-Angulo A, Walters R, Carpenter RJ, Ross M, Perkins G, Gwyn K, et al. Paclitaxel chemotherapy in a pregnancy patient with bilateral breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004;5(4):317-9.
21. Sekar R, Stone PR. Trastuzumab use for metastatic breast cancer in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007;110(2):507-10.
22. Loibl S, von Minckwitz G, Gwyn K, Ellis P, Blohmer JU, Keller M, et al. Breast carcinoma during pregnancy. *Cancer* 2006;106(2):237-46.
23. Bonnier P, Romain S, Dilhuydy JM, Bonichon F, Julien JP, Charpin C, et al. Influence of pregnancy on the outcome of breast cancer: a case-control study. Societe Francaise de Senologie et de Pathologie Mammaire Study Group. *Int J Cancer* 1997 Sep 4;72(5):720-7.
24. Chang YT, Loong CC, Wang HC, Jwo SC, Lui WY. Breast cancer and pregnancy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1994 Oct;54(4):223-9.
25. Ibrahim EM, Ezzat AA, Baloush A, Hussain ZH, Mohammed GH. Pregnancy-associated breast cancer: a case-control study in a young population with a high-fertility rate. *Med Oncol* 2000 Nov;17(4):293-300.
26. Ishida T, Yokoe T, Kasumi F, Sakamoto G, Makita M, Tominaga T, et al. Clinicopathologic characteristics and prognosis of breast cancer patients associated with pregnancy and lactation: analysis of case-control study in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1992 Nov;83(11):1143-9.
27. Lethaby AE, O'Neill MA, Mason BH, Holdaway IM, Harvey VJ. Overall survival from breast cancer in women pregnant or lactating at or after diagnosis. Auckland Breast Cancer Study Group. *Int J Cancer* 1996 Sep 17;67(6):751-5.
28. Nugent P, O'Connell TX. Breast cancer and pregnancy. *Arch Surg* 1985 Nov;120(11):1221-4.
29. Petrek JA, Dukoff R, Rogatko A. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer. *Cancer* 1991 Feb 15;67(4):869-72.
30. Zemlickis D, Lishner M, Degendorfer P, Panzarella T, Sutcliffe SB, Koren G. Fetal outcome after in utero exposure to cancer chemotherapy. *Arch Intern Med* 1992 Mar;152(3):573-6.
31. Zhang J, Liu G, Wu J, Lu JS, Shen KW, Han QX, et al. Pregnancy-associated breast cancer: a case control and long-term follow-up study in China. *J Exp Clin Cancer Res* 2003 Mar;22(1):23-7.

**Table 1: Characteristics of group A (patients with PABC) and group D (non-PABC patients)**

		PABC	non-PABC	p-value
Number of patients		32	32	
Age	median	33.7	33.6	NS
Localization	right	16	19	NS
	left	16	13	
Histology	ductal	31	31	NS
	lobular	0	1	
	ductolobular	1	0	
Size	< 2 cm	6	11	NS
	> 2 cm	26	21	
Grade	I	2	3	NS
	II	15	14	
	III	15	15	
ER	positive	11	20	0.03
	negative	19	11	
PR	positive	11	17	NS
	negative	19	14	
HER2/neu	positive	10	11	NS
	negative	20	20	
Lymph node status	positive	18	21	NS
	negative	11	11	
Metastatic disease	positive	6	6	NS
	negative	26	26	

PABC – pregnancy-associated breast cancer

non-PABC – non-pregnancy-associated breast cancer

ER – estrogen receptor

PR – progesterone receptor

HER/2 – Her2/neu

**Table 2: Management of patients with breast cancer diagnosed during pregnancy (group B)**

ID	WP	Therapy				Regiment description	Surgery
		Surgery	Chemotherapy	Radiotherapy	Hormonal therapy		
1	33	yes	yes			AC x 4, T x 3	RMM/ALND
2	16	yes (18)	yes (23)	yes		E x 4, T x 4	BC/ALND
3	34		yes			FEC x 3	not done
4	25	yes	yes (33)			E x 2, T x 4, Tr x 35	BC/ALND
5	37	yes	yes	yes		FAC x 4, D x 2, Tr x 60	RMM/ALND
6	16	yes	yes		yes	FAC x 4, D x 3	BC/SLNB
7	18	yes	yes			AT x 3, AT x 2	BC/SLNB
8	22	yes (23)	yes	yes	yes	AC x 4, T x 4	RMM/ALND
9	36	yes	yes			AC x 3	BC/ALND
10	24	yes	yes (24)			FEC x 3	RMM/ALND
11	11	yes	yes	yes		E x 3, CMF x 3, wT x 9	RMM/ALND
12	12	yes	yes	yes	yes	EC x 4	BC/ALND
13	33	yes	yes	yes		E x 3, T x 3, CMF x 3	RMM/ALND
14	28	yes	yes			EC x 4, T x 4	RMM/ALND
15	22	yes	yes			VTr, Cp/Tr, CB/G/Tr	BC/not done
16	20	yes	yes			E x 6, T, Vt x 3	M/not done

WP – week of pregnancy of the diagnosis, CHT – chemotherapy, RT – radiotherapy, RMM – radical modified mastectomy, BC – breast-conserving surgery, M – mastectomy, ALND – axillary lymph node dissection, SLNB – sentinel lymph node biopsy

A – doxorubicin, E – epirubicin, C – cyclophosphamide, CP – capecitabine, CB – carboplatin, D – docetaxel, F – 5-fluorouracil, G – gemcitabine, M – methotrexate, P – cisplatin, T – paclitaxel, wT – weekly paclitaxel, V – vinorelbine, Tr – trastuzumab

**Table 3: Management of patients with breast cancer diagnosed within one year after delivery (group C)**

ID	WAD	Therapy				Regiment description	Surgery
		Surgery	Chemotherapy	Radiotherapy	Hormonal therapy		
17	19	yes	yes			CMF x 6	RMM/ALND
18	5	yes	yes	yes		PA x 1, AC x 3	RMM/ALND
19	14	yes	yes	yes		AT x 1, AC x 2, AC x 3	RMM/ALND
20	3					lost to follow-up	
21	36	yes	yes	yes		FAC x 4, T x 1, D x 2, AV x 3	RMM/ALND
22	12	yes	yes	yes	yes	AC x 4, T x 4, D x 6	RMM/ALND
23	8	yes	yes	yes		AC x 4, T x 4	RMM/SLNB,ALND
24	34	yes	yes	yes		AC x 4, T x 10, VG x 4	BC/SLNB,ALND
25	32	yes	yes			AC x 3, AT x 2, T x 1	RMM/ALND
26	52	yes	yes	yes	yes	AT x 3, TAC x 3	RMM/ALND
27	16	yes	yes	yes		AT x 3	BC/ALND
28	42	yes	yes			FAC x 6	RMM/ALND
29	20	yes	yes	yes	yes	E x 3, T x 3, CMF x 3	RMM/ALND
30	32	yes	yes			FEC x 6	RMM/ALND
31	8	yes	yes			CMF x 6	RMM/ALND
32	12		yes			ET x 6	biopsy

WP – week of pregnancy of the diagnosis, CHT – chemotherapy, RT – radiotherapy, RMM – radical modified mastectomy, BC – breast-conserving surgery, M – mastectomy, ALND – axillary lymph node dissection, SLNB – sentinel lymph node biopsy

A – doxorubicin, E – epirubicin, C – cyclophosphamide, CP - capecitabine, CB - carboplatin, D – docetaxel, F – 5-fluorouracil, G - gemcitabine, M – methotrexate, P - cisplatin, T – paclitaxel, wT – weekly paclitaxel, V – vinorelbine, Tr – trastuzumab



Table 4: Outcome of the patients and newborns

	ID	Delivery/abortion (gestational age)	Birth weight (g)	Newborn outcome	Mother outcome (weeks)	BRCA testing
Group B	1	caesarean section (33)	1890	normal	alive	negative
	2	caesarean section (35)	2540	rectal atresia	alive	sent
	3	caesarean section (36)	2775	BRCA 1	dead (17)	BRCA 1
	4	spontaneous (39)	3740	normal	alive	BRCA 1
	5	spontaneous (40)	3090	normal	relapse (22)	sent
	6	abortion (18)	NA	NA	alive	sent
	7	abortion (20)	NA	NA	alive	sent
	8	abortion (24)	NA	NA	alive	sent
	9	spontaneous (36)	2840	jaundice	alive	sent
	10	ongoing	ongoing	ongoing	alive	sent
	11	spontaneous (11)	NA	NA	alive	not checked
	12	abortion (12)	NA	NA	alive	not checked
	13	spontaneous (36)	3150	normal	alive	not checked
	14	spontaneous (36)	2500	normal	alive	not checked
	15	caesarean section (39)	3300	normal	alive	not checked
	16	spontaneous	not available	normal	dead (126)	not checked
Group C	17	spontaneous	3600	normal	relapse (435)	BRCA 1
	18	caesarean section	not available	normal	dead (62)	not checked
	19	spontaneous	not available	normal	dead (258)	negative
	20	spontaneous	not available	normal	dead (14)	not checked
	21	spontaneous	3360	normal	dead (55)	BRCA 1
	22	spontaneous	3130	normal	relapse (162)	BRCA 1
	23	caesarean section	2280	normal	alive	not checked
	24	spontaneous	not available	normal	dead (241)	sent
	25	spontaneous	3500	normal	alive	not checked
	26	spontaneous	3380	normal	alive	BRCA 2
	27	spontaneous abortion	NA	NA	alive	sent
	28	spontaneous	4870	normal	alive	sent
	29	spontaneous	3800	normal	dead (133)	not checked
	30	caesarean section	not available	normal	dead (309)	not checked
	31	spontaneous	3700	normal	alive	not checked
	32	spontaneous	3500	normal	dead (171)	not checked

NA - not applicable

**Table 5: Literature review of case-control series of patients with PABC.**

Author	Years	PABC	Cancer during pregnancy	Cancer after delivery	Matched patients	Outcome
Petrek, 1991	1960-1980	56	56		166	No survival difference
Zemlickis, 1992	1958-1987	118	118		269	No survival difference
Ishida, 1992	1970-1988	192	72	120	192	Worse prognosis in PA group
Chang, 1994	1979-1988	21			199	No survival difference
Nugent, 1995	1970-1980	19	19		157	No survival difference
Lethaby, 1996	1976-1985	20	10	10	362	Worse survival when diagnosed during lactation, no difference in pregnant patients
Bonnier, 1997	1960-1993	154	92	62	308	Worse prognosis in PA group
Ibrahim, 2000	1992-1996	72	72		216	No survival difference
Zhang, 2003	1957-1990	88			176	No survival difference
Halaska, 2008	1995-2007	32	16	16	32	No survival difference

PABC – pregnancy-associated breast cancer

**Figure 1: Time-to-relapse curves in group A (patients with PABC), group B (patients with breast cancer during pregnancy), group C (patients with breast cancer within one year from delivery) and group D (controls with non-PABC).**

**Figure 2: Overall survival curves for groups A (patients with PABC) and D (controls with non-PABC).**

## LITERATURA

1. Fučíková, Z., Kužel, D., Cibula, D., et al. Komplikace v gynekologické endoskopii - retrospektivní klinická studie. Čes. Gynek., 1999, 64, Suppl 2, s. 54-57.
2. Holub, Z., Jabor, A., Šprongl, L., et al. Klinické výsledky, zánětlivá reakce a tkáňové poškození při totální laparoskopické hysterektomii – srovnání s laparoskopicky asistovanou vaginální hysterektomií. Čes. Gynek., 2002, 67, 6, s. 315-320.
3. Holub, Z., Voráček, J., Roth, J., et al. Perioperační krvácení v souvislosti s laparoskopickou hysterektomií: retrospektivní studie. Čes. Gynek., 1999, 64, 3, s. 143-146.
4. Hulka, JF., Levy, BS., Parker, WH., et al. Laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy: American Association of Gynecologic Laparoscopists' 1995 membership survey. J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc., 1997, 4, 2, s. 167-171.
5. Kužel, D., Fučíková, Z., Cibula, D., et al. Rational laparoscopic intervention in laparoscopically-assisted vaginal hysterectomy (LAVH): prospective study. Čes. Gynek., 1999, 64, 2, s. 96-99.
6. Leng, J., Lang, J., Huang, R., et al. Complications in laparoscopic gynecologic surgery. Chin. Med. Sci. J., 2000, 15, 4, s. 222-226.
7. Levy, BS., Hulka, JF., Peterson, HB., et al. Operative laparoscopy: American Association of Gynecologic Laparoscopists, 1993 membership survey. J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc., 1994, 1, 4, s. 301-305.
8. Lumsden, MA., Twaddle, S., Hawthorn, R., et al. A randomised comparison and economic evaluation of laparoscopic-assisted hysterectomy and abdominal hysterectomy. BJOG., 2000, 107, 11, s. 1386-1391.
9. Novotný, Z., Rojíková, V. Complications of laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy, a 1996 survey of the Czech Republic. J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc., 1999, 6, 4, s. 459-462.
10. O'Hanlan, KA., Lopez, L., Dibble, SL., et al. Total laparoscopic hysterectomy: body mass index and outcomes. Obstet. Gynecol., 2003, 102, 6, s. 1384-1392.
11. Shen, CC., Wu, MP., Kung, FT., et al. Major complications associated with laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy: ten-year experience. J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc., 2003, 10, 2, s. 147-153.
12. Shen, CC., Hsu, TY., Huang, FJ., et al. Laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy in women of all weights and the effects of weight on complications. J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc., 2002, 9, 4, s. 468-473.
13. Visco, AG., Barber, MD., Myers, ER. Early physician experience with laparoscopically assisted vaginal hysterectomy and rates of surgical complications and conversion to laparotomy. Am. J. Obstet. Gynecol., 2002, 187, 4, s. 1008-1012.

Prim. MUDr. Zdeněk Novotný, CSc.  
Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN  
Čapkovo náměstí 1  
312 13 Plzeň

## Transformační růstový faktor - beta 1 jako marker u pacientek s operabilním karcinomem prsu

Čes. Gynek.  
72, 2007, č. 2  
s. 112-115

### Transforming Growth Factor - beta 1 as a Marker in Patients with Operable Breast Cancer

Chod J.<sup>1</sup>, Závadová E.<sup>2</sup>, Halaška M.<sup>1</sup>, Strnad P.<sup>1</sup>, Rob L.<sup>1</sup>, Fučíková T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK, Praha, přednosta doc. MUDr. L. Rob, CSc.

<sup>2</sup>Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN, Praha, přednosta doc. MUDr. I. Šterzl, CSc.

#### Structured Abstract

**Objective and design of study:** Determination of TGF-beta 1 levels in plasma of patients with operable breast cancer. The correlation of TGF levels with the stage of disease and other prognostic markers. Prospective study.

**Methods:** There were 36 patients fulfilling the entrance criteria included in the study. The blood samples were taken to set the plasma levels of TGF-beta before the operation, with no adjuvant therapy.

27 age matched healthy volunteers served as controls. The study was approved by ethical board and patients signed informed consent regarding blood sampling and results presentation. Differences between groups were determined using the Mann-Whitney U-test.

**Results:** We proved that TGF-beta 1 levels are elevated in patients with operable breast cancer. Moreover, TGF-beta in plasma of patients with positive sentinel lymph node was significantly higher as compared to patients with negative sentinel node. Most important is the fact that patients involved in our study were in very early stages of disease.

**Conclusion:** TGF-beta 1 is marker correlating with breast cancer disease risk factors, especially with positive sentinel lymph node. We conclude that TGF is one of the early markers which may help define the risk of disease progression already before the operation.

**Key words:** breast cancer, risk factors, regional lymph nodes, prognostic markers, TGF-beta

#### Strukturovaný souhrn

**Cíl studie:** Stanovení plazmatických hladin TGF-beta u pacientek s operabilním karcinomem prsu. Byla zkoumána korelace nalezených hodnot s rozsahem onemocnění a ostatními prognostickými markery. Prospektivní studie.

**Metodika:** V rámci studie bylo vyšetřeno 36 pacientek s operabilním karcinomem prsu splňujících vstupní kritéria studie. Ke stanovení plazmatických hladin TGF byly provedeny krevní odběry těsně před operací, v této době pacientky neměly žádnou další terapii.

Celkem 27 zdravých kontrol odpovídajících věkem i pohlavím sloužilo jako kontroly pro stanovení koncentrace TGF. Studie byly schválena etickou komisí a pacientky podepsaly informovaný souhlas týkající se odběrů krve a prezentace výsledků.

Získaná data byla statisticky zhodnocena pomocí Mannova-Whitneyova U-testu.

**Výsledky:** Prokázali jsme zvýšenou hladinu TGF-beta 1 u pacientek s operabilním karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám. Prokázali jsme navíc signifikantní rozdíl v hodnotách TGF mezi pacientkami s pozitivní a negativní sentinelovou uzlinou. Významné je, že v naší studii se jednalo převážně o pacientky v časném stadiu onemocnění.

**Závěr:** TGF-beta je markerem, který koreluje s výskytem rizikových faktorů, zejména s pozitivitou lymfatických uzlin. TGF je tedy jedním z časných markerů, které mohou upozornit na vyšší riziko progresu a již před operací mohou pomoci určit rozsah onemocnění.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, rizikové faktory, regionální lymfatické uzliny, prognostické markery, TGF-beta

## ÚVOD

Karcinom prsu je jedním z nejčastějších maligních onemocnění u žen a jeho incidence v rozvinutých zemích světa stále stoupá. Většina pacientek s negativitou regionálních lymfatických uzlin (tzn. bez nálezu šíření primárního tumoru) může být efektivně léčena chirurgicky a radioterapií. Při postižení axilárních uzlin jsou indikovány k adjuvantní chemoterapii. Kritéria, z nichž vycházejí indikace léčby, jsou velikost primárního tumoru, stav regionálních lymfatických uzlin, histologický typ nádoru, grade nádorových buněk, stav hormonálních receptorů. Podle těchto kritérií však dosud nelze zcela přesně stanovit prognózu onemocnění. Proto se v současné době stále hledají nové markery, které by co nejdříve objektivně pomohly určit úplný rozsah onemocnění, naplánovat adekvátní terapii a monitorovat úspěšnost její aplikace. Detekce a histologické vyšetření sentinelové lymfatické uzliny (SLU - uzlina, která je jako první postižena šířením nádorového procesu) je z hlediska stanovení prognózy onemocnění jedním z nejdůležitějších kritérií. Až u 30 % žen s negativitou SLU (standardní vyšetření po barvení hematoxylin-eozinem v parafínovém bloku) však dochází do 5 let k lokální recidivě. U pacientek s karcinomem prsu se špatnou prognózou je častým nálezem defekt v imunitní odpovědi. Transformační růstový faktor - beta 1 (transforming growth factor - beta 1, TGF-beta 1) je vysoce imunopresivním faktorem [3, 10], který potlačuje přirozenou imunitu vůči nádorům a uvažuje se o něm jako o možném prognostickém markeru progresu onemocnění [6]. Má rovněž neoangiogenetický potenciál [2]. Někteří autoři popisují korelaci hladin TGF-beta v cytosolu nádorových buněk s přežíváním a korelací s dalšími prognostickými markery (především korelace s pozitivní sentinelovou uzlinou).

Naším cílem bylo vyšetřování plazmatických koncentrací TGF-beta u pacientek s operabilním karcinomem prsu. Byla zkoumána korelace nalezených hodnot s roz-

sahem onemocnění a ostatními prognostickými markery (postižená sentinelová lymfatická uzlina, tumorové markery CA 15-3 a CEA, exprese p53, pozitivita estrogenových a progesteronových receptorů, exprese HER a mitotického indexu Ki67).

## SOUBOR PACIENTEK

Bylo vyšetřeno 36 pacientek léčených v letech 2003 až 2006 na Gynekologicko-porodnické klinice 2. LF UK v Praze, s operabilním karcinomem prsu, které splňovaly následující kritéria:

- \* velikost primárního tumoru byla menší nebo rovna 10 mm v průměru (T1a,b podle klasifikace TNM) s pozitivními a s negativními regionálními LU,
- \* velikost primárního tumoru byla větší než 10 mm a menší než 5 cm v průměru (T1c, T2 podle klasifikace TNM) s pozitivními a s negativními regionálními LU.

Vylučovací kritéria:

- \* velikost primárního tumoru rovna 5 cm nebo větší,
- \* absolvování neoadjuvantní léčby (radio- či chemoterapie) pro Ca prsu.

## METODIKA

U všech pacientek bylo provedeno základní vyšetření při diagnóze karcinomu prsu, tzn. palpační vyšetření, mamografie či sonografie prsů, stanovení plazmatických hladin tumorových markerů CA 15-3 a CEA.

Při exstirpaci nehmavných lézí byla využita metoda hook-wire (léze je pod sonografickou kontrolou označena zavedením ocelového vodiče) či technika ROLL (radioguided occult lesion localisation) [7]. Při této metodě je nehmavná léze 18 až 20 hodin před operací

označena radioaktivním izotopem technecia ( $^{99m}\text{Tc}$  Senti-scint, MEDI-Radiopharma Ltd., H) a následně exstirpována za navigace scintilační sondou (Neoprobe 2000, Johnson & Johnson, USA) při minimálním poškození zdravé tkáně. Verifikace maligního tumoru byla provedena buďto již před operací vyšetřením materiálu odebraného core-cut biopsií či vyšetřením biologického materiálu zmrazeným řezem (frozen section) při otevřené biopsii. Vždy byla provedena adekvátní operace - segmentektomie či modifikovaná radikální mastektomie.

Současně byla u všech pacientek provedena detekce sentinelové lymfatické uzliny, nejčastěji též za navigace scintilační sondou či po užití lymfotropního barviva (Bleu Patenté V, Guerbet, F). SLU byla též peroperačně vyšetřena (frozen section) a při jejím postižení byla připojena disekce axilárních lymfatických uzlin v I. a II. etáži. Exstirpované sentinelové lymfatické uzliny byly následně vyšetřeny patologem jak standardním postupem po obarvení hematoxylinem-eozinem v parafínovém bloku, tak též extenzivně na přítomnost mikrometastáz.

Nesrážlivá krev, která byla pacientkám odebrána těsně před operací, byla centrifugována po 10 minut při 3000 ot/min. Získaná plazma byla uložena při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do stanovení hladiny cytokinů.

Hladiny TGF-beta v plazmě byly vyšetřeny modifikovanou metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) s použitím lidských monoklonálních protilátek proti TGF-beta 1 od firmy R&D Systems podle instrukcí výrobce. Pro srovnání hladin TGF-beta 1 bylo vyšetřeno 27 zdravých kontrol odpovídajících věkem.

Estrogenové (ER) a progesteronové receptory (PR), exprese p53, HER, a Ki67 byly stanoveny pomocí imunohistochemie, CA 15-3, CEA turbidimetricky. Patologem byly stanoveny imunohistochemické parametry tumoru (hormonální receptory a mitotické indexy).

Statistické srovnání hladin TGF-beta (pg/ml) u skupin pacientek s rozdílnou velikostí primárního tumoru podle TNM klasifikace a u skupin s pozitivní a s negativní sentinelovou uzlinou byly statisticky hodnoceny pomocí Manova-Whitneyho U-testu na 95% hladině významnosti.

## VÝSLEDKY

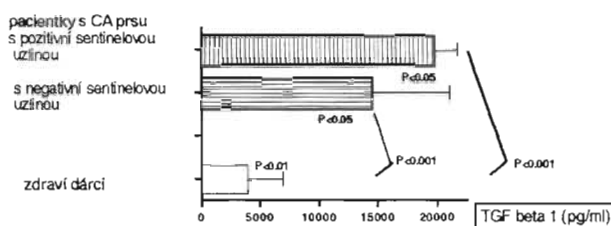
### Charakteristika pacientek

Postižení sentinelové uzliny bylo prokázáno u 9 z celkového počtu 36 pacientek. U 25 pacientek se jednalo o tumor menší než 20 mm, z těchto 25 mělo 14 pacientek tumor menší než 10 mm. Pozitivita ER byla prokázána u 94 % pacientek, u 75 % pozitivita PR, u 75 % pozitivita HER. CA 15-3 byl pozitivní v 8 %, CEA v 5 %, Ki-67 v 19 %, exprese p53 v 19 %.

### TGF-beta 1

Výsledky ukazuje obrázek 1.

Hladiny TGF-beta byly signifikantně vyšší u pacien-



**Obr. 1.** TGF-beta 1 v plazmě zdravých jedinců a u pacientek s operabilním karcinomem prsu s pozitivní nebo negativní sentinelovou uzlinou

V naší studii se jednalo převážně o pacientky v časném stadiu onemocnění, TGF-beta bylo stanoveno před operací, v této době neměly pacientky žádnou neoadjuvantní terapii.

tek s karcinomem prsu než u zdravých kontrol (medián 15 293 a 3983 pg/ml  $p < 0,0001$ ). U pacientek s postižením sentinelové uzliny byla hladina TGF-beta signifikantně vyšší než u pacientek s negativní sentinelovou uzlinou (medián 14,5 a 18,9 ng/ml,  $p = 0,05$ ). Nebyla nalezena korelace s žádným jiným výše uvedeným markerem.

## DISKUSE

Prokázali jsme zvýšenou hladinu TGF-beta 1 pacientek s operabilním karcinomem prsu. Velmi významné je, že v naší studii se jednalo převážně o pacientky v časném stadiu onemocnění. Přesto již v tomto stadiu bylo TGF-beta zvýšeno oproti zdravým kontrolám.

TGF-beta 1 je markerem, který koreluje s výskytem rizikových faktorů, zejména s postižením sentinelové uzliny. Naše výsledky potvrzují výsledky dosud provedených studií, které prokázaly významnost TGF-beta v prognóze onemocnění [5, 6]. Desruisseau a spol. prokázali zvýšenou hladinu TGF-beta v cytosolu nádorových buněk u pacientek s karcinomem prsu. Naše měření prokazují mnohem vyšší hladiny TGF-beta 1 v plazmě. Zdrojem TGF-beta 1 však nemusí být jen nádor, ale i buňky imunitního systému. Bylo prokázáno, že subpopulace imunitních buněk, produkujících TGF-beta (především makrofágů a T reg) jsou u pacientů s nádorovými onemocněními výrazně vyšší než u zdravých osob [4, 10]. TGF-beta 1 je, jak již bylo zmíněno, imunosupresivním faktorem, který potlačuje protinádorovou aktivitu imunitních buněk (suprese „natural killer“ buněk, suprese makrofágů, suprese dendritických buněk, a tím i antigen prezentace a TH1 odpovědi). Bylo prokázáno, že TGF-beta 1 je i neoangiogenetickým faktorem působícím nejen přímo na cévy, ale i stimulujícím produkci ostatních neoangiogenetických faktorů, jako je VEGF [2].

Blokace neoangiogenetických faktorů pomocí monoklonálních protilátek proti VEGF (bevacizumab, Avastin) je již součástí terapie (v kombinaci s klasickou chemoterapií) u kolorektálního karcinomu. V USA byl již bevacizumab schválen i pro léčbu karcinomu prsu. Někteří autoři se domnívají, že nadprodukce TGF a exprese

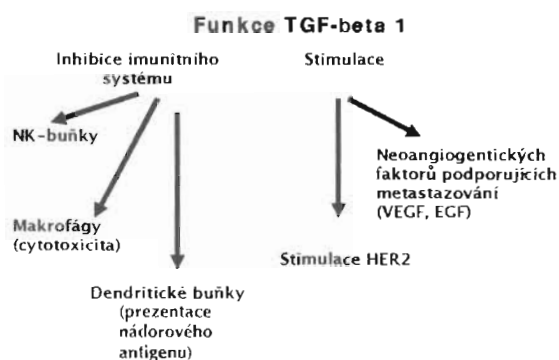
HER2 (at' již na nádorové buňce, či v solubilní formě) se významně vzájemně ovlivňují [8, 9].

Funkce TGF-beta 1 zachycuje obrázek 2.

Prokázali jsme signifikantní rozdíl v hladinách TGF-beta 1 mezi pacientkami s pozitivní a negativní sentinelovou uzlinou. TGF-beta 1 je tedy jedním z časných markerů, které mohou upozornit na patologii.

Tento poznatek umožní:

- - zpřesnit diagnostiku, dispenzární péči, provádět screening touto metodou a aplikovat kontrolovanou chemoprevenci u rizikových pacientek;
- - zvolit adekvátní léčebný postup, tj. agresivnější, u pacientek s vysokými hladinami TGF-beta. Velmi pří-



Obr. 2. Funkce TGF-beta v protinádorové imunitě

nosné bude srovnání hladin TGF-beta u skupiny s malými karcinomy a pozitivní sentinelovou uzlinou, kde pozitivita TGF-beta podpoří aplikaci systémové léčby chemo- či radioterapie;

- - při negativitě lymfatických uzlin získáváme další marker podporující návrh doplnění systémové léčby – chemoterapie;
- - u pacientek s pozitivní sentinelovou uzlinou získáváme další marker podporující radikalizaci operačního výkonu, např. provedení kompletní axilární lymfonodektomie;
- - v budoucnu kombinovat současnou terapii s imunoterapií. V současné době se ve světě diskutuje o mnoha terapeutických strategiích vedoucích k potlačení nadprodukce TGF-beta 1, např. monoklonálními protilátkami či snížením produkce TGF-beta 1 intracelulárně na molekulární úrovni (aplikací DNA antisense proti TGF-beta ) [1]. Tato léčba je zatím ve fázi klinických testů v USA a v západní Evropě.

## ZÁVĚR

TGF-beta 1 je markerem, který koreluje s výskytem rizikových faktorů, zejména s poškozením sentinelové uzliny. TGF-beta 1 je tedy jedním z časných markerů, které mohou upozornit na vyšší riziko progresu a již před operací pomoci určit rozsah onemocnění.

Projekt byl podpořen grantem MZ ČR č. NR 7951-3.

## LITERATURA

1. Biswas, S., Criswell, T.L., Wang, S.E., et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling in human cancer: targeting a tumor suppressor network as a therapeutic strategy. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 15, 12(14 Pt 1), p. 4142-4146.
2. Bostrom, K., Zebboudj, A.F., Yao, Y., et al. Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 51, p. 52 904-52 913.
3. Brown, R.D., Pope, B., Murray, A., et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*, 2001, 98, 10, p. 2992-2998.
4. Curjel, T.J., Coukos, G., Zou, L., et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.*, 2004, 10, 9, 942-949.
5. Desruisseau, S., Palmari, J., Giusti, C., et al. Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *Br. J. Cancer*, 2006, 94, 2, p. 239-246.
6. Ghellal, A., Li, C., Hayes, M., et al. Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res.*, 2000, 20, 6B, p. 4413-4418
7. Strnad, P., Rob, L., Halaska, M., et al. Radioguided occult lesion localisation in combination with detection of the sentinel lymphnode in non-palpable breast cancer tumours. *Eur. J. Gynaec. Oncol.*, ISSN : 0392-2936, XXVII, n. 3, 2006.
8. TGF-beta 1 could be a missing link in the interplay between ER and HER-2 in breast cancer. *Med. Hypotheses*, 2005, 65, 3, p. 546-551.
9. Wang, S.E., Shin, I., Wu, F.Y., et al. HER2/Neu (erbB2) signaling to rac1-pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor {beta}. *Cancer Res.*, 2006, 66, 19, 9591-9600.
10. Zavadova, E., Savary, C.A., Templin, S., et al. Maturation of dendritic cells from ovarian cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2001, 48, 4, p. 289-296.

MUDr. Jiří Chod  
Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK Praha  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5-Motol  
e-mail: jiri.chod@seznam.cz, jiri.chod@fumotol.cz

# Detekce pooperačního lymfedému u pacientek s karcinomem prsu

Čes. Gynek.  
72. 2007. č. 4  
s. 298-304

## Detection of postoperative lymphoedema in patients with breast cancer

Halaška M.<sup>1</sup>, Strnad P.<sup>1</sup>, Chod J.<sup>1</sup>, Malá I.<sup>1</sup>, Nováčková M.<sup>1</sup>, Stankušová H.<sup>2</sup>, Kolařík D.<sup>3</sup>, Feldmár P.<sup>1</sup>, Rob, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha.  
přednosta kliniky doc. MUDr. L. Rob, CSc.

<sup>2</sup>Vysoká škola ekonomická, Praha, vedoucí katedry doc. RNDr. L. Marek, CSc.

<sup>3</sup>Radioterapeuticko-onkologické oddělení FN Motol, Praha, primářka oddělení MUDr. J. Prausová, CSc.

<sup>3</sup>Gynekologicko-porodnická klinika I. LF UK a FN Bulovka, Praha.  
přednosta kliniky prof. MUDr. M. Halaška, DrSc.

### Abstract

**Objective:** Lymphoedema is a severe postoperative complication after treatment of many malignancies. It is a pathological accumulation of extracellular water (ECW). Early diagnostic tool is needed. Multifrequency bioimpedance analysis (MFBIA) is a method for detection of changes in ECW.

**Type of study:** Prospective study.

**Setting:** Dept. of Obstetrics and Gynaecology of the 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague.

**Methods:** We measured a control group of 72 women and a group of 74 patients undergoing a breast cancer surgery during 18 month after the surgery by MFBIA and circumference. Characteristics of the patients were recorded. The detection of lymphoedema was done using MFBIA, circumference measurement and upon the symptoms of the patients.

**Results:** The average age in the control and tested group was 40,1 and 58,9 years. The average size of the tumour, grade and positivity of oestrogen receptors was 15,1 mm, 2,04 and 43%. In 23 patients (21%) complete lymphadenectomy was performed, in 51 patients (79%) a detection of sentinel lymph node was performed. Lymphoedema was detected in 8 women (11%). In these patients MFBIA detected lymphoedema 9 month earlier in total than other methods.

**Conclusion:** MFBIA is a low-cost and precise method for the detection of early stage postoperative lymphoedema. We recommend to incorporate MFBIA into standard dispensatory plan of every patient combined with circumference measurement.

**Key words:** lymphoedema, MFBIA, breast cancer, detection

### Souhrn

**Cíl studie:** Lymfedém je závažnou pooperační komplikací u mnoha malignit. Jedná se o patologické nahromadění extracelulární tekutiny. Zvláště důležitá je u tohoto onemocnění časná diagnostika. V současné době existuje několik metod, které ale většinou měří jen celkový objem končetiny a ne objem extracelulární tekutiny (ECT). Multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza (MFBIA) je metoda, která dokáže přesně detekovat změny v ECT.

**Typ studie:** Prospektivní studie.

**Název a sídlo pracoviště:** Gynekologicko-porodnická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol, Praha.

**Metodika:** Změřili jsme kontrolní skupinu 72 žen a skupinu 74 pacientek podstupující operaci pro karcinom prsu pomocí MFBIA a pomocí měření obvodů končetiny před operací a v tříměsíčních intervalech po dobu 18 měsíců. Zaznamenali jsme charakteristiky týkající se pacientky, operace a nádoru. Detekce lymfedému byla stanovovaná pomocí MFBIA, měření obvodů končetin a podle symptomů pacientky.

**Výsledky:** Průměrný věk v kontrolní a testované skupině byl 40,1 a 58,9 let. Průměrná velikost nádoru, grade a pozitivita estrogenních receptorů byla 15,1 mm, 2,04 a 43 %. U 23 pacientek (21 %) byla provedena kompletní axilární lymfadenektomie, u 51 pacientek (79 %) byla provedena pouze detekce sentinelové uzliny. Lymfedém byl detekován u 8 žen (11 %). MFBIA detekovala u těchto pacientek lymfedém celkem o 9 měsíců dříve.

**Závěr:** MFBIA je levná a přesná metoda k detekci časných stadií pooperačního lymfedému. Doporučujeme ji zařadit do standardního plánu dispenzarizace pacientek spolu s klasickými metodami měření obvodu končetiny.

**Klíčová slova:** lymfedém, karcinom prsu, MFBIA, detekce



## ÚVOD

Karcinom prsu je druhým nejčastějším maligním nádorem u žen, který byl teprve v posledních letech na prvním místě v incidenci nahrazen zhoubnými nádory kůže [1]. V rámci adekvátní radikální operace tohoto zhoubného onemocnění je nezbytné provést odstranění regionálních lymfatických uzlin – lymfadenektomie [19, 20, 31]. Moderní koncept v léčbě představuje detekce sentinelové uzliny (SLNB) pomocí radiokoloidu  $^{99m}\text{Tc}$  (technecium) nebo pomocí lyfotropní látky „blue dye“ [12]. Sentinelová uzlina je spádová uzlina, která je první postižena při šíření nádorových buněk z nádoru. Shoda správného zařazení do TNM stadia pomocí této metody byla prokázána několika studiemi [13]. Díky časnější diagnóze a účinnější terapii se v poslední době prodlužuje celkové přežití pacientek s tímto zhoubným onemocněním. To obrací zvýšenou pozornost na kvalitu života žen po operaci [27].

Nejzávažnější komplikací po operaci pro zhoubný nádor prsu u žen podstupujících radikální operaci doprovázenou odstraněním lymfatických uzlin je lymfedém. Lymfedém představuje abnormální nahromadění tkáňového moku v intersticiu. Tkáňový mok vzniká filtrací krevní plazmy přes kapilární stěny nebo jako metabolický produkt buněk [28], většina je zpětně resorbována do kapilár a asi jen 2 l jsou odváděny lymfatickými cévami. Odstraněním lymfatických uzlin během operace se přerušuje lymfatický oběh, a tím se zvýší riziko vzniku lymfedému. Etiologie sekundárního lymfedému je komplexní. Dosavadní teorie, podle které byl stupeň lymfedému přímo závislý na extracelulární koncentraci bílkoviny, byla nahrazena teorií novou, kdy angličtí autoři dokázali analýzou aspirované extracelulární tekutiny (ECT), že naopak čím je nižší koncentrace bílkovin, tím závažnější je lymfedém [2]. Pro rozvoj lymfedému je zásadní nejen mechanické přerušování lymfatických cév odstraněním lymfatických uzlin při operaci, ale i porucha inervace arterií a věn, což vede ke zvýšení místního hydrostatického tlaku, a tím k hromadění intersticiální tekutiny [21]. Mezi další faktory, které přispívají ke vzniku lymfedému patří prorůstání nádoru do axily, přítomnost pooperačního hematomu, poruchy hojení rány, infekce horní končetiny a radioterapie axilárních uzlin, která vede k obliteraci lymfatických cév. Ke zvýšenému výskytu lymfedému přispívá přítomnost seromu (tekutina tvořící se z tukové tkáně) v pooperační ráně [24]. Velmi důležitým rizikovým faktorem je obezita, která zvyšuje riziko výskytu pooperačního lymfedému [15, 30]. Několik významných prací se věnovalo výskytu lymfedému, který se podle dostupné literatury pohybuje mezi 8–24 % [8].

V současné době je několik metod, které se používají k detekci lymfedému [9]. Pravděpodobně nejpoužívanější metodou je měření obvodu horní končetiny na predefinovaných místech [4] nebo v 10cm segmentech [5, 25]. Jinou metodou je měření objemu paže pomocí výtlačku vody, kdy je paže ponořena do odměrného válce, a tak odečten objem končetiny [14]. Třetí nejčastější metodou je tkáňová tonometrie [6]. Všechny tyto metody ovšem

měří celkový objem končetiny a jejich citlivost je tak omezena až na vyšší stupně lymfedému, kdy již dochází k objektivnímu zvětšování končetiny. Tomu již zpravidla předchází výše zmíněné symptomy popsané samotnou pacientkou a nejedná se tak o časně odhalení lymfedému. Lymfoscintigrafie užívající  $^{99m}\text{Tc}$  (technecium) je metodou, která pomáhá při popisu morfologie a funkčnosti lymfatického aparátu [26]. Novou metodou je multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza (MFBIA), která využívá ke stanovení ECT odpor, jenž klade končetina střídavému proudu o různých frekvencích. Vyšetření MFBIA je rychlé (1 minuta), nebolestivé, snadno reprodukovatelné, možné provést kdekoliv, s minimálními náklady [29]. Podrobnou metodiku jsme popsali již dříve [11].

## METODY

Byly vyšetřeny dvě skupiny žen. Kontrolní skupina se sestávala ze 72 zdravých žen, které byly vyšetřeny pomocí měření obvodů končetiny a MFBIA pro stanovení S.D. Tyto ženy byly z řad příbuzných a známých navštěvujících pacientky hospitalizované na Gynekologicko-porodnické klinice FN Motol. Druhá skupina je složena ze 74 pacientek s diagnózou karcinomu prsu stanovenou pomocí mamografie, ultrazvuku, biopsie, nebo definitivní histologie, které podstoupily operaci na Gynekologicko-porodnické klinice 2. LF UK a FN Motol. Vyšetřeny byly mezi srpnem 2004 a prosincem 2006. Měření jsme prováděli den před operací a v 3měsíčních intervalech po dobu 18 měsíců. Po podepsání informovaného souhlasu jsme zaznamenali údaje o jejich věku, hmotnosti, výšce, dominanci končetin a histopatologických parametrech nádoru. Pro stanovení diagnózy lymfedému jsme použili následující metody:

1. *MFBIAcont*: Z hodnot měření pro kontroly byla sestrojena 95procentní horní mez pro MFBIA podíl  $\text{nd/d R05100}$  ( $R_0$  extrapolována pomocí frekvencí 5, 50, 100 kHz) tzn. byla určena hodnota průměr  $\text{nd/d} + 1,6450 * \text{S.D.}$  tohoto podílu =  $1,002 + 1,645 * 0,0827 = 1,138$ . Při překročení této hodnoty podílem hodnot  $\text{no/o R05100}$  pro pacientku usuzujeme na lymfedém.

2. *MFBIApre*: k předoperační hodnotě poměru  $\text{no/o R05100}$  z frekvencí 5, 50, 100 kHz pro konkrétní pacientku přidáme hodnotu  $1,645 * \text{S.D.}$  MFBIA podílu pro  $\text{nd/d}$  (zjištěná z kontrolní skupiny) =  $1,645 * 0,0827 = 0,136$ . Standardní postup volby kvantilu 1,96 (resp. 2) dává hodnotu 0,162 (resp. 0,165). Při překročení takto určené meze podílem hodnot  $\text{no/o R05100}$  pro danou pacientku usuzujeme na lymfedém.

K měření jsme použili přístroj MFBIA Impmetr Papouch, Praha, Česká republika.

3. Na horní končetině jsme od *caput ulnae* nakreslili 5 značek v 10cm odstupech v celkové délce 40 cm, na kterých jsme změřili obvod pomocí krejčovského metru. Obvody jsme sečetli, rozdíl v  $O_{\text{celk}}$  operované - neoperované končetiny ( $C_i$ ) nad 5 cm je hodnocen jako přítomnost lymfedému.

4. Výpočet objemu končetiny na základě měření obvodů horní končetiny je standardizovaná metoda prověřená z hlediska reprodukovatelnosti vyšetření [4]. Pro výpočet objemu je horní končetina zjednodušena na 4 válce. Průměr vždy dvou sousedních obvodů je dosazen do odvozeného vzorce pro výpočet objemů válce. Rozdíl v objemu operované – neoperované končetiny ( $V_i$ ) nad 200 ml jsme hodnotili jako přítomnost lymfedému.

5. Při každé návštěvě byla žena dotázána na opakovanou přítomnost pocitu otoku končetiny. Při odpovědi „ano“ byla odpověď hodnocena jako přítomnost rozvoje lymfedému ( $P_s$ ).

Diagnóza lymfedému (*LYMF*) byla stanovena na základě positivity minimálně dvou vyšetření, které bylo potvrzeno následným kontrolním vyšetřením. Taková pacientka byla následně odeslána k léčbě lymfomasážemi. Data byla zadávána do webového databázového formuláře na [www.lymphoedema.eu](http://www.lymphoedema.eu).

## VÝSLEDKY

Charakteristiky obou skupin žen podle věku, hmotnosti a body mass indexu (BMI) jsou v tabulce (tab. 1). Ve skupině operovaných žen byly nádory s následujícími průměrnými hodnotami: grade 2,04, velikost 15,1 mm, pozitivita estrogenních receptorů 43 %, pozitivita progesteronových receptorů 25,1 %, ERB pozitivita 0,6.

lymfedém prsu, který se rozvinul po punkci hmatné léze, provedené 5 měsíců po primární operaci. Příklad průběhu výsledků měření u jedné z pacientek, u které byl diagnostikován lymfedém, následně zahájena terapie lymfomasážemi, je prezentován na obr. 2, 3. V 5 případech

Tab. 1. Biometrické charakteristiky vyšetřovaných skupin

	Počet	Minimum	Maximum	Průměr	S.D.
<b>Pacientky</b>					
Věk	74	35	79	58.9	10.8
Hmotnost	74	49	115	73.2	14
Výška	74	148	175	164.8	5.9
BMI	74	18.1	38	26.9	4.7
<b>Kontroly</b>					
Věk	72	22	75	40.1	14.3
Hmotnost	72	44	104	67.2	11.9
Výška	72	154	185	167.7	6.5
BMI	72	16.8	28.7	23.2	4.5

BMI – body mass index  
S.D. – standardní odchylka

Tab. 2. Zastoupení histologických typů nádorů

Operace	Histologie					celkem
	duktální karcinom	lobulární karcinom	duktolobulární karcinom	medulární karcinom	kribriformní karcinom	
SEG	33	2	4	0	0	39
RMM	25	7	1	1	1	35
celkem	58	9	5	1	1	74

SEG – prs zachovávající operace

RMM – radikální modifikovaná mastektomie

Počty pozitivních lymfatických uzlin v závislosti na typu operace (prs zachovávající operace, radikální modifikovaná mastektomie) jsou na obr. 1. Zastoupení histologických typů nádorů je zobrazeno v tabulce 2, rozložení podle dominance končetiny a operované strany je v tabulce 3. Celkem 23 pacientek (31 %) postoupilo kompletní ALND I,II, 51 pacientek (67 %) podstoupilo SLNB nebo sampling uzlin.

Na základě kontrolní skupiny byla stanovena horní mez pro detekci lymfedému:

$MFBI_{Acont} = 1,002 + 1,645 * 0,0827 = 1,138$   
 $MFBI_{Apre} = 1,645 * 0,0827 = 0,136$

Ze 74 pacientek byl lymfedém horní končetiny diagnostikován u 8 (11 %) pacientek. Z toho se lymfedém vyskytl u 5 (63 %) pacientek, které podstoupily ALND a u 3 (37 %) pacientek, které podstoupily SLNB. V 7 případech (87 %) byla nalezena metastáza nádoru aspoň v jedné z uzlin. U jedné pacientky byl diagnostikován

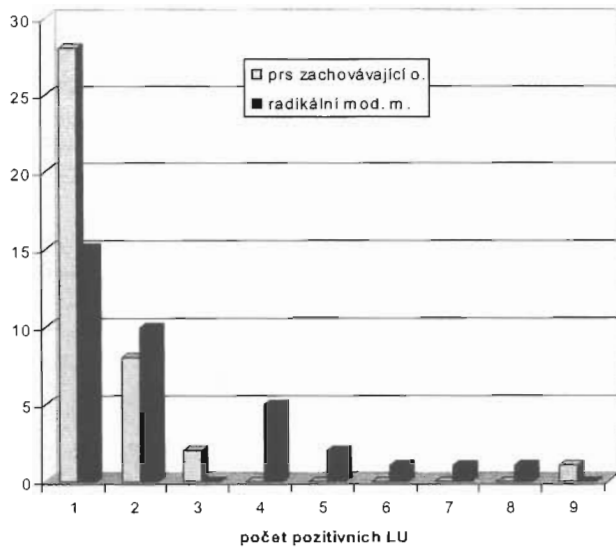
Tab. 3. Rozložení podle dominance končetiny a operované strany

Dominantní ruka	Lateralita operace		Celkem
	dx	sin	
dx	33	38	71
sin	1	2	3
celkem	34	40	74

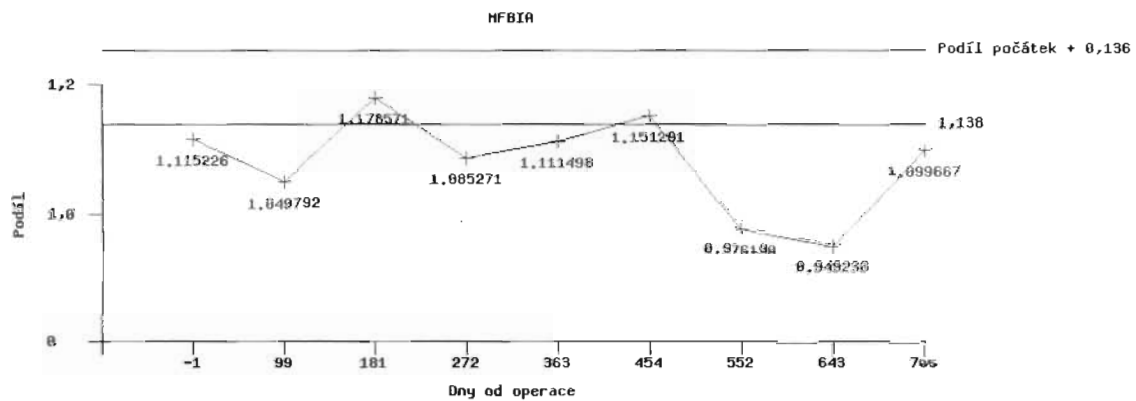
dx – pravá končetina

sin – levá končetina

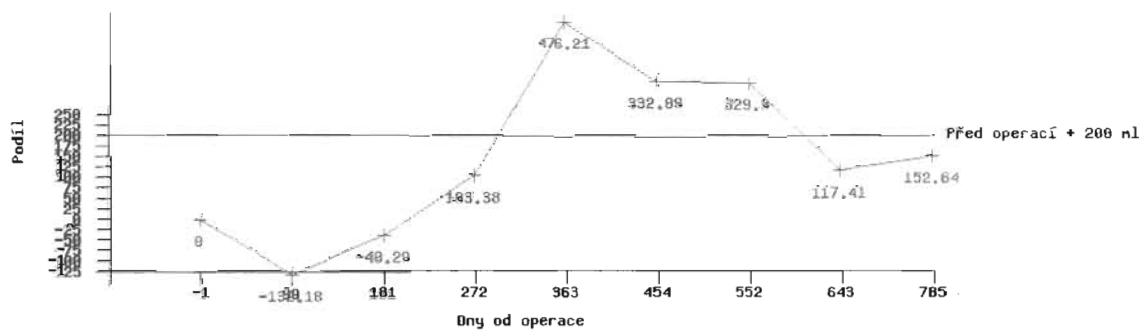
odhalilo vyšetření MFBIA nárůst ECT před ostatními metodami, ve 3 případech později. Po sečtení měsíců, o které MFBIA předešla nebo se opozdila oproti ostatním metodám, ušetřila MFBIA 9 měsíců života s lymfedémem u těchto 8 pacientek. Rozložení detekce lymfedému podle časového odstavu od operace je na dalším obrázku (obr. 4).



levostranná dominance, přírůstek váhy, svalová atrofie. Předkládaná práce má přispět ke zdokonalení detekčních metod pooperačního lymfedému. Kontrolní skupina představuje z hlediska věku, hmotnosti a výšky ženy mladší, s nižším BMI. Vzhledem k tomu, že ve všech vyhodnoceních je používán poměr jedné končetiny vůči opačné, je tento rozdíl eliminován. V 78 % byl nalezen duktální karcinom, což odpovídá běžnému zastoupení podle literárních zdrojů (70–85 %) [31]. Několik prací se zabývalo faktory, které mají vliv na měření impedance: cvičení [17], výživa, teplota těla, fáze menstruačního cyklu, těhotenství [18]. V našem souboru je většina pacientek v postmenopauze nebo má chemoterapii navozenou amenoreu. Těhotenství, hydratace, fáze cyklu ovlivňuje hlavně složení trupu, a jejich vliv na horní končetinu je tak minimální. Vliv ostatních faktorů lze zmírnit standardizací měření: měření v klidu, vleže, s horními končetinami v mírné addukci s dlaněmi položenými na podložce. Podle obr. 4 je vidět, že výskyt lymfedému má 2



Obr. 2. Pacientka s lymfedémem - MFBIa zobrazení



Obr. 3. Pacientka s lymfedémem - objemy

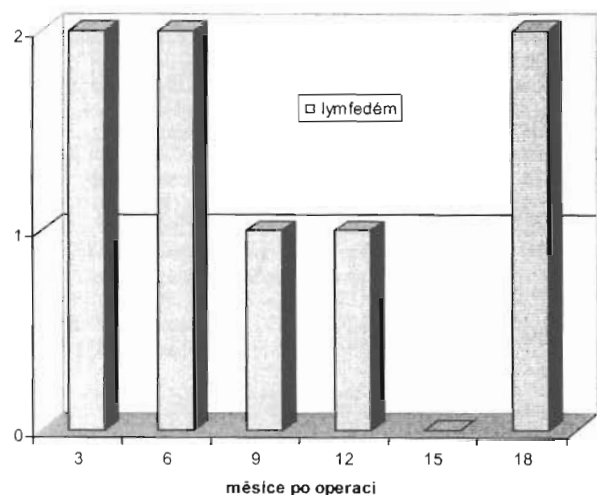
## DISKUSE

Pro zlepšení kvality života a zmírnění pooperačních komplikací je zapotřebí nalézt nenáročnou metodu, která by spolehlivě a snadno měřila objem jen extracelulární tekutiny, protože celkový objem končetiny může být ovlivněn i jinými okolnostmi, jako je pravostranná či

časová maxima - těsně po operaci a další kolem 18. měsíce. Sledování výskytu lymfedému by se mělo soustředit tedy na dobu těsně po operaci a dále pozdní výskyt kolem dvou let po operaci.

Rozsáhlá studie srovnávala morbiditu na souboru 1253 pacientek. Výskyt lymfedému, bolestivosti, tvorby seromu a infekce byly 34 %, 38 %, 24 %, 9 % ve skupině s ALND, zatímco ve skupině SLNB 6 %, 14 %, 7 %.

## LITERATURA



Obr. 4. Detekce lymfedému v závislosti na odstupu od operace

3 % [3]. Podobné výsledky potvrdily i jiné studie [10, 16, 22, 23]. Všechny tyto studie ovšem užívaly pro detekci lymfedému, tedy extracelulárního hromadění tekutiny, méně přesných metod - měření obvodu končetiny nebo hodnocení pacientkou. V našem souboru byl výskyt lymfedému v 11 %, což odpovídá faktu, že z celkového počtu sledovaných pacientek 50 (67 %) pacientek podstoupilo jen SLNB. Je důležité poznamenat, že pacientky byly velmi podrobně vyšetřovány a edukovány o rizicích a časných symptomech lymfedému, což rovněž ovlivňuje výskyt lymfedému. Z výsledků vyplývá, že pozitivita lymfatických uzlin je významným rizikovým faktorem.

Podle australské skupiny Cornishe a spol. má metoda MFBIA pro detekci pooperačního lymfedému 100% senzitivitu a 98% specifitu [7]. Tito autoři použili detekci lymfedému při MFBIA poměru  $nd/d R01100$  nad 3 S.D. získaného na základě kontrolní skupiny.

## ZÁVĚR

Multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza je snadno použitelná a levná metoda, která umožňuje přesnou detekci lymfedému u pacientek po operaci karcinomu prsu. Tyto výsledky lze aplikovat na výzkum pooperačních komplikací u dalších malignit, u kterých je indikováno odstranění spádových lymfatických uzlin, jako jsou například karcinom děložního hrdla a karcinom vulvy. MFBIA je vhodná pro časnou diagnostiku, nicméně měla by být používána v kombinaci s klasickými metodami měření obvodu končetin.

Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví IGA MZ NR 9455-3.

1. Zdravotnická ročenka ÚZIS - 2004. 2005. Praha, ÚZIS.
2. Bates, DO., Levick, JR., Mortimer, PS. Change in macromolecular composition of interstitial fluid from swollen arms after breast cancer treatment, and its implications. *Clin Sci*. 1993. 85. 6. p. 737-746.
3. Blanchard, DK., Donohue, JH., Reynolds, C., Grant, CS. Relapse and morbidity in patients undergoing sentinel lymph node biopsy alone or with axillary dissection for breast cancer. *Arch Surg*. 2003. 138. 5. p. 482-487.
4. Box, RC., Reul-Hirche, HM., Bullock-Saxton, JE. The intra- and inter-tester reliability of three measurement methods for early detection of lymphoedema after axillary dissection. *Eur J Lymph*. 1999. 27. p. 74-79.
5. Bunce, IH., Mirolo, BR., Hennessy, JM., et al. Post mastectomy lymphoedema treatment and measurement. *Med J Aust*. 1994. 161. p. 125-128.
6. Clodius L., Deak L., Piller NB. A new instrument for the evaluation of tissue tonicity in lymphoedema. *Lymphology*. 1976. 9. p. 1-5.
7. Cornish, BH., Chapman, C., Hirst, C., et al. Early diagnosis of lymphoedema using multiple frequency bioimpedance. *Lymphology*, 2001, 34, p. 2-11.
8. Ferrandez, JC., Serin, D., Bouges, S., et al. Frequency of lymphoedema of the upper limb after treatment of breast cancer. Risk factors. Apropos of 683 cases. *Bull Cancer*. 1996. 83. p. 989-995.
9. Gerber, LH. A review of measures of lymphoedema. *Cancer*. 1998. 83. p. 2803-2804.
10. Golshan, M., Martin, WJ., Dowlathahi, K. Sentinel lymph node biopsy lowers the rate of lymphoedema when compared with standard axillary lymph node dissection. *Am Surg*. 2003. 69. 3. p. 209-211.
11. Halaska, MG., Komarek, V., Bunc, V., et al. A method for detection of postoperative lymphoedema after operation for breast cancer: Multifrequency Bioelectrical Impedance Analysis. *J Applied Biomed*. 2006, 4, p. 105-111.
12. Harlow, SP., Krag, DN. Sentinel lymph node—why study it: implications of the B-32 study. *Semin Surg Oncol*. 2001. 20. 3. p. 224-229.
13. Harris, JR., Lippman, ME., Morrow, M., Osborne, CK. *Diseases of the breast*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
14. Kaulesar Sukal, DM., den Hoed, PT., Johannes, E.J., et al. Direct and indirect methods for the quantification of leg volume: comparison between water displacement volumetry, the dish model method and the frustum sign model, using correlation coefficient and the limits agreement. *J Biomed Eng*. 1993. 15. p. 477-480.
15. Larson, D., Weinstein, M., Goldberg, I., et al. Edema of the arm as a function of the extent of axillary surgery in patients with I-II carcinoma of the breast treated with primary radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1986. 12. p. 1575-1582.
16. Lednický, L. Operace prsu. *Mod Gyn Por*. 1999. 8. 4. s. 293-306.
17. McKenzie, DC., Kalda, AL. Effect of upper extremity exercise on secondary lymphoedema in breast cancer patients: a pilot study. *J Clin Oncol*. 2003. 21. 3. p. 463-466.
18. Mikes, DM., Cha, BA., Dym, CL., et al. Bioelectrical impedance analysis revisited. *Lymphology*. 1999. 32. p. 157-165.
19. Moore, MP., Kinne, DW. Is axillary lymph node dissection necessary in the routine management of breast cancer? Yes. *IA Adv Oncol*. 1996. p. 245-250.
20. Moore, MP., Kinne, DW. Axillary lymphadenectomy: a diagnostic and therapeutic procedure. *J Surg Oncol*. 1997. 66. 1. p. 2-6.
21. Mortimer, PS. The pathophysiology of lymphoedema. *Cancer*. 1998. 83. 12. p. 2798-2802.
22. Purushotham, AD., Upponi, S., Klevesath, MB., et al. Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2005. 23. 19. p. 4312-4321.
23. Schijven, MP., Vingerhoets, AJJM., Rutten, HJT., et al. Comparison of morbidity between axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol*. 2003. 29. 4. p. 341-350.

24. Tadych, K., Donegan, W.L. Postmastectomy seromas and wound drainage. *Surg Gynecol Obstet*, 1987, 165, p. 483-487.
25. Taylor, R., Jayasinghe, U.W., Koelmeyer, L., et al. Reliability and validity of arm volume measurements for assessment of lymphedema. *Physical Ther*, 2006, 86, 2, p. 205-214.
26. Ter, S.E., Alavi, A., Kim, C.K., Merli, G. Lymphoscintigraphy: a reliable test for the diagnosis of lymphedema. *Clin Nucl Med*, 1993, 18, p. 646-654.
27. Veronesi, U., Marubini, E., Mariani, L., et al. The dissection of internal mammary nodes doesn't improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomized trial. *Eur J Cancer*, 1999, 35, 9, p. 1320-1325.
28. Villavicencio, J.L., Hargens, A.R., Pikoulitz, E. Latest advances in edema. *Phlebology*, 1996, 12, p. 9-15.
29. Ward, L.C., Byrne, K., Rutter, K. Reliability of multiple frequency bioelectrical impedance analysis: An inter-machine comparison. *Am J Human Biol*, 1997, 9, p. 63-72.
30. Werner, R.S., McCormick, B., Petrek, J.A., et al. Arm edema in conservatively managed breast cancer: obesity is a major predictive factor. *Radiology*, 1991, 180, p. 177-184.
31. Zuntová, A. Histopatologie tumorů a proliferativních lézí prsu. *Mod Gyn Por*, 2004, 13, 3, s. 366-397.

MUDr. Michael Halaška, Ph.D.  
Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol  
V Úvalu 84  
150 00, Praha 5  
e-mail: mhalaska@centrum.cz

## Psychosomatické aspekty zhoubného nádoru těla děložního

Čes. Gynek.  
72. 2007, č. 4  
s. 304-308

### Psychosomatic Aspects of Malignant Tumours of Uterine Corpus

Hansmanová L.<sup>1</sup>, Obereignerů R.<sup>2</sup>, Šmahaj J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Porodnicko-gynekologická klinika FN, Olomouc, přednosta prof. MUDr. M. Kudela, CSc.

<sup>2</sup>Katedra psychologie, Filozofická fakulta, UP, Olomouc, vedoucí doc.PhDr. V. Řehan, CSc.

#### Abstract

**Objective:** Evaluation of selected scales of the Minnesota Multiphasis Personality Inventory-2 (MMPI-2) within the frame of psychosomatic aspects of gynecological oncology.

**Design:** Assessment of actual emotional state and its comparison with the general personality traits of patients before a surgery for gynecologic malignancy.

**Setting:** Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Medical Faculty PU, Olomouc.

**Methods:** The study group included 40 patients before the operation and histological confirmation of the diagnosis of oncological disease in whom the indicators of emotional status and personality structure was assessed. The standardized MMPI-2 was used for differentiation of clinical depression, anxiety and psychastenic traits. The ability of patients to participate in the study and adequately express themselves about their emotional status was examined to estimate the validity of administered data.

**Results:** Significantly higher scores in the selected scales of the standardized MMPI-2 were found in our study group compared to general population. The most marked differences were observed in anxiety and clinical manifestation of depressive symptoms.

**Conclusion:** Based on the configuration of the personality scales it is therefore possible to accept the research hypothesis that patients in this group are predisposed to anxiousness as a personality trait even before the final confirmation of their suspected oncological diagnosis.

**Key words:** malignant tumours of uterine corpus, psychosocial factors, MMPI-2

#### Souhrn

**Cíl studie:** Hodnocení vybraných škál Minnesotského osobnostního dotazníku v rámci psychosomatických aspektů gynekologické onkologie. Zjištění aktuálního emočního stavu a jeho porovnání s celkovou osobnostní strukturou pacientek před operací pro gynekologické onkologické onemocnění.

**Název a sídlo pracoviště:** Porodnicko-gynekologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc.

**Předmět a metoda studie:** Autoři se ve své studii věnují oblasti gynekologické onkologie, pacientkám před abdominální hysterektomií s oboustrannou adnexektomií a lymfadenektomií, se zaměřením na ukazatele emočního stavu a osobnostní struktury daných pacientek. Využit byl standardizovaný Minnesotský osobnostní inventář, který pro své výjimečné postavení mezi psychodiagnostickými metodami podává velmi přesný popis zkoumaných jevů. Autoři se zaměřují v oblasti emocí, především na odlišení klinické deprese, úzkosti a psychastenických rysů osobnosti. Dále zjišťují schopnost pacientek podílet se na studiu a schopnost adekvátně vypovídat o svém emočním stavu, zjišťují tak míru validity administrovaných dat.

## ORIGINAL ARTICLE

# A method for the detection of post-operative lymphoedema after operation for breast cancer: multifrequency bioelectrical impedance analysis

Michael J. Halaška<sup>1</sup>, Viktor Komárek<sup>2</sup>, Ivana Malá<sup>3</sup>, Jiří Chod<sup>1</sup>, Pavel Strnad<sup>1</sup>, Jan Novotný<sup>4</sup>, Hana Stankušová<sup>5</sup>, Dušan Kolařík<sup>6</sup>, Dana Marešová<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague

<sup>2</sup>Department of Biophysics and Informatics, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague

<sup>3</sup>University of Economics in Prague

<sup>4</sup>Department of Oncology, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague

<sup>5</sup>Department of Oncology, 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague

<sup>6</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague

<sup>7</sup>Department of Physiology, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague

Received 6<sup>th</sup> February 2006.

Revised 1<sup>st</sup> June 2006.

Published online 30<sup>th</sup> June 2006.

### Summary

Lymphoedema, a pathological accumulation of extracellular water (ECW), is a severe post-operative complication. Multifrequency bioimpedance analysis (MFBIA) is a method for the detection of changes in ECW. Our aim is to establish the methodology of MFBIA and to apply it on to group of patients undergoing breast cancer surgery.

We measured a control group of 60 women, another group of 5 women with pronounced lymphoedema and a group of 36 patients undergoing breast cancer surgery during a 9-month period after surgery using MFBIA and circumferential measurements for recording volume changes in the upper limb. Different linear extrapolations from 1, 5, 50, 100, 200 kHz were determined to find resistance at 0 Hz for each patient; ratios of  $R_0$  were evaluated for non-dominant/dominant and non-operated/operated limbs. Pearson's correlation coefficient was used to compare the correlation between the results and patient characteristics.

Extrapolation using 5, 50, 100 kHz had the lowest standard deviation. Within the patients with pronounced lymphoedema, bigger differences were found by MFBIA as compared with circumference measurements. A stronger correlation between limb volumes calculated from circumference measurements with weight and BMI as compared with MFBIA was found. Lymphoedema was found in 14 women in the tested group. The best association between patients' subjective symptoms was with the MFBIA measurement.

**Key words:** lymphoedema – post-operative complication – multifrequency bioelectrical impedance analysis – breast cancer

✉ Michael J. Halaška, Department of  
Obstetrics and Gynecology, 2nd Medical Faculty,  
V Úvalu 84, 150 00 Praha 5, Czech Republic

✉ mhalaska@centrum.cz

☎ +42 2 2443 4201

☎ +42 2 2443 4220

### INTRODUCTION

Lymphoedema is a severe post-operative complication after the treatment of numerous malignancies when lymphadenectomy is performed. Lymphoedema is due to the mechanical destruction of lymphatic vessels and to a failure of

the innervation of arteries and veins. Both of these factors tend to increase hydrostatic pressure and thus lead to the development of lymphoedema, i.e. – an accumulation of extracellular water (ECW) in the limbs. Several methods have been established to detect lymphoedema, including limb circumference measurement, tissue tonometry, water displacement volume measurement and lymphoscintigraphy. Most of these methods, however, measure only the total limb volume (TLV), are costly, or require sophisticated manipulation (Gerber 1998). Multifrequency bioelectrical impedance analysis (MFBLA) is a method that can precisely evaluate ECW (Cornish et al. 1993). It uses a measurement of the resistance of the tissue to electric current using different frequencies. The resistance is indirectly proportional to the TLV, which represents the ECW and intracellular water (ICW) together. The fluid is a conductor while the cell membrane is an insulating material. When the frequency is near zero, the cell membranes act as an insulator, where measured resistance corresponds to the resistance of the ECW. At higher frequencies ( $\geq 50$  kHz), the current passes through cell membranes, measuring the ECW and ICW. Because it is not possible to measure resistance at  $f=0$  Hz or infinite frequency, it is necessary to extrapolate these values (Cornish and Ward 1998). The ratio of the extrapolated  $R_0$  of a dominant and non-dominant limb is determined and the standard deviation of these values is used to construct a reference range for future patients (Cornish et al. 2001).

There are certain aspects of the methodology that are not clearly defined. Extrapolation could be carried out using 1, 5, 50, 100, 200 kHz or even higher frequencies. Results obtained at lower frequencies than 5 kHz exhibit the high skin impedance of contact electrodes (Cornish et al. 1993). It is not clear which frequencies should be used for the extrapolation. For the reference range, several models can be used: (a) the interval from the control group is applied to the tested women (Cornish et al. 1996), (b) the pre-operative value of a concrete patient  $+ 1.96 \times S.D_C$  (the standard deviation obtained from a control group) and (c) the pre-operative value of a concrete patient  $+ 1.96 \times S.D_P$  (the standard deviation obtained from pre-operative values of tested women) (Box et al. 2002). For the reference range, a range of  $\pm 2$  or  $3 S.D.$  is always applied, but we know that when lymphoedema is present, a rise in the ECW or TLV occurs. This means that only the reference range from a one-tailed confidence interval can be used.

The definition of the diagnosis of lymphoedema is heterogeneous: for instance, the difference in circumference at single circumferences more than 2 cm; the difference of the sums of circumferences of each limb over 5 cm; or the difference of volumes calculated from the

circumferences over 200 ml (Box et al. 2002; Cornish et al. 1996; Kissin et al. 1986).

The goal of the present study was to evaluate different methodologies for the MFBLA examination of an upper limb in order to determine the reliability of MFBLA and to apply it to a group of patients undergoing breast cancer surgery.

## MATERIAL AND METHODS

Between August 2004 and February 2006, we evaluated three groups of women. Group A consisted of 60 healthy women (control group) whose limb volume was recorded by circumferential measurements and MFBLA 1-100 kHz. A subgroup (A1) of 7 women underwent, in addition to circumference measurements and MFBLA, an examination by water displacement in order to determine the correlation between circumference and water displacement. Another subgroup (group A2) of 20 women had an additional measurement using MFBLA at 200 kHz. These women were chosen from those who were visiting their relatives that were hospitalised in our department. Group B consisted of 5 women with pronounced lymphoedema. These women were measured to determine the correlation between circumferential measurements and MFBLA in the affected limbs. Group C was made up of 36 patients undergoing breast cancer surgery. These patients were examined in 3-month intervals over a period of 9 months post-surgery. Surgery of the breast was either radical modified mastectomy or segmentectomy. Two techniques of lymphadenectomy were performed: sentinel lymph node biopsy (SLNB) or axillary lymph node dissection (ALND). After the signing of an informed consent form, circumference measurements of the upper limbs and measurement by MFBLA were performed on both hands. Circumference measurements were made at 10 cm intervals (altogether 40 cm segments), starting from the wrist, followed by calculation of the upper limb volume. The shape of the upper limb was simplified to four cylinders: an average circumference between two measured circumferences was calculated, followed by calculation of the volume of the cylinder. Finally, by adding the volume of the four cylinders, the total volume of the limb was obtained. Examination by MFBLA (Impmeter, Papouch<sup>®</sup>, Prague, Czech Republic) was performed on both upper limbs. The patients were asked to lay supine with their arms slightly outstretched and palms down. Inductive electrodes were then placed 40 cm apart, measuring electrodes in distances of 5 centimetres from the inductive electrodes. Data concerning weight, height, age and limb dominance were collected.

Using Pearson's correlation coefficient, a correlation was observed between water displacement and volume calculated using circumference measurements. To find resistance at theoretical zero frequency we used linear extrapolation from frequencies 1, 5, 50, 100 kHz (R01100d, R01100nd); from 5, 50, 100 kHz (R05100d, R05100nd); from 1, 5, 50, 100, 200 kHz (R01200d, R01200nd); from 5, 50, 100, 200 kHz (R05200d, R05200nd) each for the dominant (d) and non-dominant limb (nd) and for the operated (o) and non-operated (no) limb in the tested group. Ratios of extrapolated resistances of both limbs were established: nd/d in controls as well as in patients (in order to determine the initial, pre-operative value) and no/o after surgery (for the detection of lymphoedema). Because of the indirect proportion of volume  $V$  and resistance  $R$ , it is important to take into account the fact that the ratio of the estimated volume from MFBLA ( $V_o/V_{no}$ ) is replaced by the ratio of the extrapolated resistance of  $R_{no}/R_o$ . The relationships between the measured data and the characteristics of the study group were determined using Pearson's correlation coefficient. The detection of lymphoedema in the group of patients who had undergone surgery was established by following five detection methods: (1) the difference of the sums of the circumferences ( $C_i$ ) of each limb over 5 cm, (2) the difference of the volumes calculated from the circumferences ( $V_i$ ) of each limb over 200 ml, (3) the ratio of MFBLA resistances no/o extrapolated from 5, 50 and 100 kHz outside of the range over 2 one-tailed interval calculated from the control group, added to the nd/d ratio calculated from the control group (MFBLAcont), (4) MFBLA ratio outside of the range over 2 one-tailed interval calculated from the control group added to the pre-operative ratio of the actual patient (MFBLApre), and (5) using the patient's symptoms (Ps). We choose to use only the 2 one-tailed interval to establish the range in the detection of lymphoedema, which entails higher sensitivity and lower specificity. In the case of a pathological finding we performed a control examination one week later. The patient was referred to the lymphatic massage sessions in case of subjective swelling of the arm confirmed by at least two methods. For the association between patient's symptoms and each of the methods, we used the association coefficient.

For statistical evaluation the SAS 9.1 Software<sup>®</sup> was used. The project was approved by the ethical committee of the 2<sup>nd</sup> Medical Faculty of the Charles University in Prague, Czech Republic.

## RESULTS

Group characteristics are summarised in Table 1. The correlation between water displacement and

volume, as calculated by circumferential measurements in group A1, was statistically significant: for the right limb the correlation was 0.9436 and for the left hand 0.9396.

Table 1. Characteristics of the two patient and control groups

Variable	Mean (min-max)	N	S.D.
<i>Group A</i> Control group			
Age	40.20 (22-75)	60	14.34
Weight	65.92 (44-100)	60	10.99
Height	167.77 (154-180)	60	6.26
BMI	23.48 (16.79-34.6)	60	4.09
<i>Group B</i> Patients with lymphoedema			
Age	63.30 (55-78)	5	7.25
Weight	68.80 (60-80)	5	8.07
Height	161.80 (146-170)	5	9.28
BMI	26.26 (23.62-28.15)	5	1.82
<i>Group C</i> Patients undergoing surgery			
Age	60.00 (37-76)	36	9.87
Weight	73.81 (51-115)	36	14.27
Height	164.39 (148-175)	36	6.17
BMI	27.29 (18.70-37.98)	36	4.88

BMI – body mass index  
N – number of patients  
S.D. – standard deviation

The results of the comparison between extrapolated ratios and the ratios of volume calculated from the circumferences in groups A and C are presented in Table 2. The best results – (i.e. the lowest S.D.) exhibit ratios derived from 5, 50 and 100 kHz of 0.0827, whereas the worst results were from 5, 50, 100 and 200 kHz of 0.1041. Based on the results of the control group, we further used 5, 50 and 100 kHz extrapolations. The results of patients with pronounced lymphoedema (group B) are given in Table 3. The correlation between the calculated data and the characteristics of the women in group A are shown in Table 4. As can be seen in this table, a stronger correlation was found between the volume, as calculated from circumferences, with weight and BMI as compared with the correlation between volumes, as calculated from MFBLA, with weight and BMI. From MFBLA extrapolations, the best results are obtained with frequencies 5, 50 and 100 kHz. A one-tailed confidence interval (1.138) was calculated rather than the two-tailed confidence interval (1.164) for the ratios. Lymphoedema was detected by at least one of the methods in 14 patients (39%), at least 2 of the methods in



8 patients (22%), at least 3 or 4 of the methods in 4 patients (11%) and all 5 methods in 2 patients (6%). In three patients (8%) subjective determination of lymphoedema was confirmed by at least two other methods. Table 5 presents the success of each method regarding the detection of lymphoedema. The association coefficients were 0.04 for the Ci

method, 0.00 for the Vi method, 0.26 for MFBIAPre and 0.41 for MFBIACont. In 43% of the cases lymphoedema was found in patients with SLNB (the mean number of lymph nodes was 3.3) and in 67% of the cases lymphoedema was detected in patients with ALND (the mean number of lymph nodes was 14.8).

Table 2. Comparison between extrapolated ratios and ratios of volume calculated from the circumferences for the controls and patients undergoing surgery

Variable	Minimum	Mean	Maximum	N	S.D.
<i>Group A: Control group</i>					
Vd/Vnd	0.9324	1.0372	1.2548	60	0.0644
Nd/d R01100	0.7873	1.0096	1.2199	60	0.0925
Nd/d R05100	0.8024	1.0002	1.2454	60	0.0827
Nd/d R01200	0.8670	0.9938	1.1938	20	0.0831
Nd/d R05200	0.8389	0.9963	1.2855	20	0.1041
<i>Group C: Patients undergoing surgery</i>					
Vd/Vnd	0.9314	1.0357	1.1478	36	0.0558
Nd/d R01100	0.7761	1.0159	1.1979	36	0.0846
Nd/d R05100	0.8130	1.0218	1.1823	36	0.0666
Vo/Vno	0.8713	0.9951	1.1363	36	0.0628
No/o R01100	0.8360	1.0195	1.2885	36	0.0877
No/o R05100	0.8458	0.9989	1.2300	36	0.0704

S.D. – standard deviation  
 N – number of patients  
 d – dominant limb  
 nd – non-dominant limb  
 o – operated limb  
 no – non-operated limb  
 V – volume calculated from circumference  
 R01100 – R<sub>0</sub> extrapolated from 1, 5, 50, 100 kHz  
 R05100 – R<sub>0</sub> extrapolated from 5, 50, 100 kHz  
 R01200 – R<sub>0</sub> extrapolated from 1, 5, 50, 100, 200 kHz  
 R05200 – R<sub>0</sub> extrapolated from 5, 50, 100, 200 kHz

Table 3: Patients with lymphoedema

Variable	Minimum	Mean	Maximum	N	S.D.
Vo/Vno	1.2206	1.3830	1.7334	5	0.2254
No/o R05100	1.2484	1.7334	3.0235	5	0.7292

S.D. – standard deviation  
 N – number of patients  
 o – operated limb  
 no – non-operated limb  
 V – volume calculated from circumference  
 R05100 – R<sub>0</sub> extrapolated from 5, 50, 100 kHz

Table 4: Correlation coefficient between calculated data and characteristics of the control patients (group A) and patients undergoing surgery (group C) (P values for the test of independence are in brackets).

	N	Weight (kg)	BMI
<i>Group A</i>			
	Control group		
Vd	60	0.8070 (<0.0001)	0.8470 (<0.0001)
Vnd	60	0.7629 (<0.0001)	0.8397 (<0.0001)
R05100d	60	0.3165 (0.0137)	0.2636 (0.0418)
R01100d	60	0.3364 (0.0086)	0.2797 (0.0304)
R01100nd	60	0.2211 (0.0896)	0.1906 (0.1450)
R05100nd	60	0.2197 (0.0915)	0.1651 (0.2073)
R01200d	20	0.0027 (0.9910)	0.0438 (0.8585)
R01200nd	20	-0.0140 (0.9546)	0.0332 (0.8926)
R05200d	20	-0.0281 (0.9091)	0.0004 (0.9984)
R05200nd	20	-0.0261 (0.9153)	0.0173 (0.9437)
<i>Group C: Patients undergoing surgery</i>			
Vd	36	0.8201 (<0.0001)	0.8092 (<0.0001)
Vnd	36	0.7764 (<0.0001)	0.7945 (<0.0001)
R05100d	36	0.4864 (0.0026)	0.4387 (0.0074)
R01100d	36	0.4374 (0.0076)	0.3772 (0.0233)
R01100nd	36	0.3641 (0.0290)	0.3194 (0.0575)
R05100n		0.5280 (0.0009)	0.4916 (0.0023)
	36		

BMI – body mass index

N – number of patients

d – dominant limb

nd – non-dominant limb

V – volume of the limb calculated from circumference

R01100 –  $R_0$  extrapolated from 1, 5, 50, 100 kHz

R05100 –  $R_0$  extrapolated from 5, 50, 100 kHz

R01200 –  $R_0$  extrapolated from 1, 5, 50, 100, 200 kHz

R05200 –  $R_0$  extrapolated from 5, 50, 100, 200 kHz

## DISCUSSION

The control group, in comparison with the study group, consists of younger women with lower BMI. Because we used a ratio of one limb to another for all relevant calculations, the differences are compensated.

The calculation of volume from circumferences is a very precise measurement as indicated by the fact that even with only 7 patients, the correlation was statistically significant.

The results of extrapolation from 1, 5, 50 and 100 kHz in the patient group were 273  $\Omega$  for the dominant limb and 276  $\Omega$  for the non-dominant limb. These findings are comparable with those of

Cornish who reported the following results:  $R_0$  for the dominant limb = 289  $\Omega$ ,  $R_0$  for the non-dominant limb = 299  $\Omega$  and the MFBLA ratio = 0.964 (S.D. = 0.034) (Cornish et al. 2001). In the present study the best results were found using only 5, 50 and 100 kHz. These results correspond with the finding that resistance at 1 kHz exhibits high skin impedance (Cornish et al. 1993).

The detection of lymphoedema in patients with pronounced lymphoedema was most obvious with the ratio obtained from the no/o limb derived from the MFBLA measurement, which shows that MFBLA is more sensitive to ECW changes.

Pearson's correlation coefficient revealed a stronger correlation between volume from

circumferences and weight and BMI than MFBIA measurements, indicating that the MFBIA measurement is less dependent on the characteristics of the patients.

The examination by MFBIA is fast (1–2 minutes), painless and can be achieved anywhere with minimal cost and easy reproducibility (Ward et al. 1997). Furthermore, the method has 100%

sensitivity and 98% specificity (Cornish et al. 2001). The possibility of detecting lymphoedema by comparing the results before and after surgery independently of the second limb is another advantage of the MFBIA method that other methods cannot offer (Cornish et al. 2002).

Table 5. Patients with detected lymphoedema

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Lymphadenectomy	S	A	S	S	S	A	S	A	A	S	A	A	A	A
Number of LN	5	13	3	3	5	11	1	21	25	3	16	16	10	7
Number of positive LN	1	0	0	0	1	0	0	5	3	3	1	1	3	1
Ci	1	1		1	1				1	1		1	1	1
Vi	1	1	1	1						1	1		1	
MFBIACont	1			1						1			1	
MFBIAPre				1	1	1	1	1		1			1	
Ps	1						1	1		1			1	1

S – SLNB

A – ALND

LN – lymph node

Ci – detected by circumference measurements

Vi – detected by volume calculated from circumference measurement

MFBIACont – detected by MFBIA based on control group

MFBIAPre detected by MFBIA based on pre-operative value

Ps – detected based on patient’s symptoms

The detection rate of lymphoedema in our study group depended on the particular method selected. MFBIACont was found to be the most precise method in that it showed the highest association with subjective symptoms. This finding is in agreement with those of other studies (Armer 2005). A notable finding in our study was the presence of lymphoedema in 43% of patients undergoing only SLNB, with significantly fewer lymph nodes being extirpated. These patients need to be followed up.

Several variables affect the impedance measurements, including exercise, skin temperature, hydration, time of the day, menstruation and pregnancy (Mikes et al. 1999). Most of the variables (hydration, menstruation and pregnancy) mainly influence the trunk of the body, i.e. influence on the limb is only minor. We tried to diminish the influence of the other variables by performing the measurement in a quiet room where the patient was lying comfortably. Further, we recorded the weight of each patient. Some authors tried to develop new equations used by MFBIA (Dittmar and Reber 2001, Hayes et al.

2005) to improve diagnostics. Based on our results, we recommend extrapolation from 5, 50 and 100 kHz, the use of a one-tailed interval for the detection of lymphoedema and detection by the MFBIA ratio based on the control group (MFBIACont). In conclusion, MFBIA is a sensitive and promising method that could be used to detect post-operative lymphoedema.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by a grant from the Ministry of Health of the Czech Republic, IGA MZ NR 8111-3.

REFERENCES

Armer J.: The problem of post-breast cancer lymphedema: impact and measurement issues. *Cancer Invest.* 23:76–83, 2005.

- Box R.C., Reul-Hirche H.M., Bullock-Saxton J.E. et al.: Physiotherapy after breast cancer surgery: results of a randomized controlled study to minimize lymphoedema. *Breast Cancer Res. Treat.* 75: 51–64, 2002.
- Cornish B.H., Thomas B.J., Ward L.C.: Improved prediction of extracellular and total body water using impedance loci generated by multiple frequency bioelectrical impedance analysis. *Phys. Med. Biol.* 38:337–346, 1993.
- Cornish B.H., Bunce I.H., Ward L.C. et al.: Bioelectrical impedance for monitoring the efficacy of lymphoedema treatment programmes. *Breast Cancer Res. Treat.* 38:169–176, 1996.
- Cornish B.H., Ward L.C.: Data analysis in multiple-frequency bioelectrical impedance analysis. *Physiol. Meas.* 19:275–283, 1998.
- Cornish B.H., Chapman C., Hirst C. et al.: Early diagnosis of lymphoedema using multiple frequency bioimpedance. *Lymphology* 34:2–11, 2001.
- Cornish B.H., Thomas B.J., Ward L.C. et al.: A new technique for the quantification of peripheral edema with application in both unilateral and bilateral cases. *Angiology* 53:41–47, 2002.
- Dittmar M., Reber H.: New equations for estimating body cell mass from bioimpedance parallel models in healthy older Germans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281:1005–1014, 2001.
- Gerber L.H.: A review of measures of lymphedema. *Cancer* 83:2803–2804, 1998.
- Hayes S., Cornish B., Newman B.: Comparison of methods to diagnose lymphoedema among breast cancer survivors: 6-month follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* 89:221–226, 2005.
- Kissin M.W., Querci della Rovere G., Easton D. et al.: Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer. *Br. J. Surg.* 73:580–584, 1986.
- Mikes D.M., Cha B.A., Dym C.L. et al.: Bioelectrical impedance analysis revisited. *Lymphology* 32:157–165, 1999.
- Ward L.C., Byrne K., Rutter K.: Reliability of multiple frequency bioelectrical impedance analysis: An inter-machine comparison. *Am. J. Hum. Biol.* 9:63–72, 1997.

# Biopsie sentinelové lymfatické uzliny u karcinomu prsu v praxi

Čes. Gynek.  
70, 2005, č. 4  
s. 291-295

## Sentinel Lymphatic Node Biopsy for Breast Cancer In Practice

Strnad P., Rob L., Křížová H., Zuntová A., Chod J., Halaška M.

Gynekologicko-porodnická klinika, Klinika nukleární medicíny a Ústav patologické anatomie 2. LF UK a FN Motol, přednosta doc. MUDr. L. Rob, CSc.

### Structured Abstract

**Objective:** This paper reviewed the feasibility and accuracy of sentinel lymph node status in women with breast cancer.

**Design:** Clinical retrospective study.

**Setting:** Dept. of Obstetrics and Gynecology, 2nd Medical School, Teaching Hospital Motol, Praha.

**Methods:** Our trial involved 169 patients with breast cancer in the T1 and T2 stage without suspicion for axillary lymph node involvement. Lymphatic mapping was performed by sub dermal or subareolar injection of  $99mTc$  labeled colloidal human albumin (Senti-Scint) in the dose of 15 MBq one day before surgery. During the operation lymphatic mapping with vital blue dye (patent blau) was performed. Then the hand-held  $\gamma$ -ray detector probe was used to locate the sentinel node. From a small axillary incision the blue-stained sentinel node was removed. Both methods of detection were compared, the sentinel lymph node has to be hot-radioactive and blue-stained. Complete axillary lymphadenectomy was then done. All removed lymph nodes were prepared for histopathological examination.

**Results:** Failures of sentinel lymph node detection were in 9 cases (5.3%) of the 169 patients. There was one case of false negative sentinel lymph node biopsy (0.6%). Most failures occurred during the learning phase of lymphatic mapping and were associated with excessive tumor involvement of axillary lymph nodes. Success of sentinel lymph node detection was in 160 cases (94.7%) and in our trial both methods of lymphatic mapping were equally effective. Tumor involvement of sentinel lymph nodes were in 43 patients (26.9%), in 19 (11.9%) of them, the sentinel nodes were the only metastasis nodes, whereas in the remaining 24 (15%) patients other axillary nodes were positive. The concordance between negative sentinel node and axillary lymph node status was in 117 (73.1%) cases.

**Conclusion:** The introduction of sentinel lymph node biopsy allows directed and accurate assessment of axillary involvement with minimal morbidity. Sentinel node accurately predicts the status of all axillary nodes in more than 94.7% of cases.

**Key words:** breast cancer, sentinel lymph node, lymphatic mapping

### Strukturovaný souhrn

**Cíl práce:** Určení prognostického významu stavu sentinelové uzliny v souboru žen s karcinomem prsu.

**Typ studie:** Klinická retrospektivní studie.

**Název a sídlo pracoviště:** Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol.

**Metodika:** Soubor tvořilo vybraných 169 žen s operabilním karcinomem prsu za období 2000-2003. Výběr se řídil velikostí nádoru a předpokladem negativity postižení uzlin. Sentinelová uzlina byla detekována lymfoscintigrafií radiokolloidem  $Tc-99m$  (Senti-Scint) a lymfotropním barvivem (Patent Blau). Po označení a disekci sentinelové uzliny byla provedena kompletní axilární disekce uzlin I. a II. etáže. Hodnocena byla efektivita obou metod při detekci sentinelové uzliny a vztah mezi jejím stavem a stavem ostatních uzlin.

**Výsledky:** Ze 169 případů lymfatického mapování došlo k selhání detekce sentinelové uzliny v 9 případech (5,3 %). Falešná negativita se vyskytla v našem souboru jednou (0,6 %). Při rozboru těchto neúspěchů bylo příčinou především výrazné postižení uzlin tumorem, které blokovalo funkci sentinelové uzliny a chyby v technice lymfatického mapování a disekce v „learning fázi“ studie. Ve 160 případech (94,7 %) byla detekce sentinelové uzliny úspěšná oběma metodami značení, efektivita obou typů detekce je shodná. Postižení sentinelové uzliny bylo přítomno ve 43 případech (26,9 %). Z toho se ve 24 případech (15 %) vyskytly metastázy v dalších uzlinách a v 19 případech (11,9 %) byla sentinelová uzlina postižena jako jediná. Ve 117 (73,1 %) případech, kde peroperačním vyšetřením sentinelové uzliny nebyly nalezeny metastázy, byl tento stav potvrzen vyšetřením „parafínovou“ metodou jak sentinelové, tak všech ostatních uzlin.

**Závěr:** Efektivita obou metodik detekce sentinelové uzliny v našem souboru byla shodná. Negativita sentinelové uzliny u karcinomu prsu spolehlivě predikovala stav všech ostatních lymfatických uzlin z hle-

diska přítomnosti makrometastáz. U nádorů do 2 cm v průměru při negativitě sentinelové uzliny již není zapotřebí kompletní disekce axilárních uzlin. Toto opatření významně snižuje frekvenci pooperačních komplikací a morbidit.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, sentinelová uzlina, lymfatické mapování

## ÚVOD

Stav regionálních lymfatických uzlin je jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů karcinomu prsu a významnou měrou rozhoduje o typu další systémové léčby. Pro adekvátní stanovení prognózy a léčby je zapotřebí disekce a histopatologického vyšetření minimálního počtu 10 lymfatických uzlin (LU) z I. a II. etáže. Výkony ve třetí etáži LU byly opuštěny z několika důvodů:

- Disekce LU ve všech etážích identifikuje postižené lymfatické uzliny v 99–100 %, avšak za cenu vysokého rizika pooperačních komplikací, především lymfedému [21, 22].

- Disekce LU I. a II. etáže je schopna identifikovat postižené lymfatické uzliny v 95–99 %.

- Lymfatické uzliny III. etáže tvoří méně než 20 % z celkového počtu uzlin a bývají postiženy nádorem u operabilních karcinomů prsu jen velmi zřídka [4, 5].

- Frekvence tzv. skákavých (skip) metastáz do uzlin III. etáže je velmi nízká, 1,6 % případů v práci Rosena [15, 16] a 1,3 % případů v práci Veronesiho [22].

- Rozsah axilární disekce souvisí s frekvencí regionálních recidiv karcinomu prsu, avšak nezlepšuje celkovou dobu přežití, jedná se jen o stagingový výkon [6]. V současné době při nálezů nádorové lymfadenopatie zahajujeme léčbu neoadjuvantní chemoterapií.

I když se opustila disekce lymfatických uzlin ve III. etáži, je tento výkon pro ženu stále potenciálně invalidizující. Až ve 25 % dochází k vývoji lymfedému, někdy jen skrytému, riziko otoku horní končetiny hrozí však stále. Dalšími pooperačními komplikacemi jsou poruchy hybnosti v ramenním kloubu a různé parestzie paže na operované straně.

V současné době se zavedením mamografického screeningu lze očekávat vzestup počtu detekovaných malých nádorů prsu do 1 cm. Tím poroste počet pacientek, u nichž lze s velkou pravděpodobností očekávat „negativitu“ regionálních lymfatických uzlin. Někteří autoři při velikosti primárního nádoru do 1 cm nepovažují již axilární disekci za opodstatněnou [1, 18]. Avšak

v případech karcinomů do 1 cm určité procento metastáz existuje a klinické i zobrazovací metody pro určení přítomnosti metastáz v axilárních uzlinách nejsou spolehlivé. Toto dilema by mohl vyřešit koncept disekce sentinelové uzliny, který spočívá v tom, že existuje jedna (několik) lymfatická uzlina, která jako první v regionálním lymfatickém systému drénuje příslušnou oblast (orgán) a do této uzliny se šíří nádorové buňky jako do první. Stav této uzliny predikuje stav všech dalších regionálních lymfatických uzlin. První výsledky a technika byly popsány v roce 1992 u melanomu [13]. U karcinomu prsu přinesl první zkušenosti s lymfatickým mapováním a detekcí sentinelové uzliny Giuliano a spolupracovníci. Zpočátku byla úspěšnost detekce 65 %, avšak s rostoucí zkušeností dosahovala 93–97 % [8, 9, 10]. Cílem práce je prezentace našich výsledků a zkušeností ze 169 případů lymfatického mapování u karcinomů prsu.

## SOUBOR PACIENTEK A METODIKA

Do souboru bylo zařazeno 169 žen s karcinomem prsu v operabilním stadiu nemoci do největší velikosti nádoru 35 mm. Nádory o větším průměru měly v našem souboru již vždy přítomny metastázy v lymfatických uzlinách. Právě případy, kde jsme správně neodhadli velikost nádoru nebo stav axily (výrazné postižení uzlin nádorem), byly z největší části příčinou selhání detekce sentinelové uzliny. Soubor byl rozdělen do tří skupin podle velikosti nádoru, viz tabulka 1. Průměrný věk žen byl 58,4 roku s intervalem mezi 33 až 82 lety. Kritériem pro zařazení do sledované skupiny byla především pravděpodobnost absence postižení regionálních uzlin tumorem a velikost nádoru. Vylučovacím kritériem byl lokálně pokročilý karcinom prsu a stavy po neoadjuvantní chemoterapii. Ženy s předchozím chirurgickým zásahem na prsu, který je podle literatury též kontraindikací lymfatického mapování, jsme do souboru zařadili a detekce sentinelové uzliny se zdařila. Mapování se zdařilo i u pacientky s Wichterleho prsními implantáty.

Tab. 1. Velikost nádorů ve sledované skupině žen a frekvence postižení lymfatických uzlin nádorem

Velikost tumoru	Počet případů	Frekvence postižení		Negativní nález	
Celá skupina	169	48	28,4 %	121	72,6 %
T1 ≤ 1 cm	61	6	9,8 %	55	90,2 %
T1 mezi 1–2 cm	63	20	31,7 %	43	68,3 %
T2 >2 cm a ≤ 3,5 cm	45	22	48,9 %	23	51,1 %

## METODIKA DETEKCE SENTINELOVÉ UZLINY

Technika lymfatického mapování a disekce sentinelové uzliny se průběžně vyvíjela a měnila, takže současný popis odpovídá aktuálnímu stavu. Používali jsme paralelní značení radiokoloidem a lymfotropním barvivem (patent blau), pouze prvních 25 mapování bylo provedeno jen s pomocí „patent blau“. Do této „učící se fáze“ spadá většina našich neúspěchů.

– Detekce pomocí aplikace radioaktivního koloidu – lymfoscintigrafií v tzv. dvoudenním protokolu.

Den před výkonem je aplikováno 15 MBg radiokoloidu značeného techneciem  $^{99m}\text{Tc}$  o velikosti partikulí 400–600 nm (Senti-Scint) čistě subdermálně nad tumorem. Peritumorózní aplikace byla opuštěna, subdermální podání dosahuje nejlepších výsledků v detekci sentinelové uzliny [11]. Poté ve 30minutových intervalech byla prováděna detekce sentinelové uzliny lymfoscintigrafií. V den operace byla pomocí gamasondy (C-track) identifikována radioaktivní sentinelová uzlina, která byla z malé incize cíleně disekována.

– Detekce pomocí lymfotropního barviva („patent blau“). Barvivo je aplikováno bezprostředně před výkonem. Aplikuje se do podkoží nad tumorem nebo do subareolárních lymfatických uzlin, anebo do podkožních lymfatických uzlin axilární stěny po segmentektomii. Výhodná je aplikace do několika oblastí. Poté následuje jemná masáž infiltrované oblasti přibližně 2 minuty. Z incize v přední axilární linii hledáme barevné aferentní lymfatické cévy, které nás další jemnou tupou a ostrou preparací dovedou ke zbarvené sentinelové uzlině.

Sentinelová uzlina byla odeslána k rychlému peroperačnímu vyšetření (zmrazovací metodou – FS). Poté byla provedena lege artis systematická disekce axily v I. a II. etáži uzlin. Výsledky rychlého a definitivního histopatologického zpracování sentinelové uzliny a všech získaných uzlin byly porovnány. Průměrný počet disekovaných uzlin byl 15,5 na jeden případ. Získány byly jedna až tři sentinelové uzliny, průměrně 1,2 na jeden případ. V případech, kde byly detekovány tři sentinelové uzliny, šlo již o výsledek definitivního histologického vyšetření, které identifikovalo několik drobných uzlin, které se skrývaly pod makroskopickým obrazem uzliny jediné. Po zpřesnění metodiky disekce a izolace sentinelové uzliny již většinou nalézáme opravdu jen jednu sentinelovou uzlinu. Ani v této uzlině není radioaktivita nebo barvivo distribuováno homogenně, jsou zde místa s přítomností radioaktivity a bez její přítomnosti. Stejně tomu tak je s barvivem. Z těchto důvodů je pravděpodobné, že sentinelová uzlina u karcinomu prsu je jen jedna.

### Radiační bezpečnost operace:

Radiační bezpečnost při disekci radiokoloidem označené uzliny byla sledována na základě nařízení SUJB. Dávka obdrženého záření pro chirurga byla nižší než 1 mikroSv. Pro personál operačních sálů není tedy zapo-

třebí hovořit o „radiační expozici“. Pro překročení bezpečnostních limitů by musel chirurg operovat více než 2000 hodin, sestra by musela asistovat déle než 30 000 hodin a patolog by musel pracovat více než 14 000 hodin s materiálem označeným radiokoloidem [20].

### Metodika histopatologického vyšetření

Sentinelová uzlina odeslaná k peroperačnímu vyšetření byla rozdělena na dvě poloviny tak, aby se při pokračování dostala do řezu v největším rozměru. Z poloviny uzliny zmrazené v tekutém dusíku byl odkrojen řez pro peroperační vyšetření.

Zmrazený bloček byl z uzliny po odkrojení řezů pro FS rozmražen a spolu s druhou polovinou uzliny fixován v 10% formolu a dále se všemi získanými uzlinami zpracován běžnou parafinovou metodou. Z parafinových bločků z každé uzliny byly připraveny obvykle tři řezy, které se barví hematoxylinem-eozinem. V uzlinách, kde nebyl nález zcela jasný a vzešlo podezření na metastázu, bylo provedeno další prokrojení uzliny, výjimečně imunohistochemické vyšetření protilátkami proti širokospektrému cytokeratinu Anti-Human Cytokeratin AE1/AE 3 (DAKO), nebo proti Cytokeratinu large spectrum (Immunotech).

## VÝSLEDKY

Ze 169 pokusů o detekci sentinelové uzliny došlo k selhání v 9 případech (5,3 %). Úspěšnost detekce byla tedy 94,7 %. Falešná negativita sentinelové uzliny (označená sentinelová uzlina byla bez metastáz a vedlejší nesentinelová uzlina obsahovala nádorové metastázy) byla zaznamenána jen v jednom případě (0,6 %). Při rozboru osmi neúspěchů v detekci sentinelové uzliny byla v pěti případech nalezena masivní infiltrace uzliny tumorem s přechodem přes pouzdro uzliny, ve dvou případech to byly chyby v metodice značení a disekce v „learning“ fázi a v jednom případě selhání nebylo možné vysvětlit, detekce sentinelové uzliny selhala oběma způsoby při negativním nálezu v axile.

Ve 160 případech bylo dosaženo shody v detekci sentinelové uzliny lymfoscintigrafií i barvením patentovou modří. Radioaktivní – horká uzlina byla vždy též obarvena. Ve 43 případech (26,9 %), kde peroperační „frozen section“ prokázala přítomnost metastázy, byla tato uzlina postižena jako jediná v 19 případech (11,9 %). Ve 24 případech (15,0 %) byly přítomny metastázy v ostatních uzlinách. Jejich počet se pohyboval od 2 do 23 postižených uzlin. Ve 117 případech (73,1 %), kde sentinelová uzlina neobsahovala nádorové buňky při peroperačním vyšetření metodou „frozen section“, byl tento stav potvrzen i vyšetřením v parafínu a ani ostatní disekované lymfatické uzliny neobsahovaly nádorové buňky. Tímto retrospektivním vyhodnocením byla nalezena korelace mezi stavem sentinelové uzliny a stavem všech ostatních lymfatických uzlin. Je tedy možno říci, že stav sentinelové uzliny spolehlivě predikuje stav

všech uzlin v axile z hlediska přítomnosti makrometastáz. V těch případech, kde frozen section neprokázalo makrometastázu, potom i ostatní lymfatické uzliny I. a II. etáže byly bez tumoru.

## DISKUSE

Pro úspěch detekce sentinelové uzliny je nutné dodržet základní výběrové kritérium, a to je velikost nádoru. Naše selhání detekce se vyskytla převážně v případech obezity a gigantomastie, kde až při operaci bylo nalezeno excesivní postižení uzlin. V tomto případě se do tumorem blokováne uzliny prostě radiokoloid nebo barvivo nedostane. Profitovat z metody detekce sentinelové uzliny budou především ženy s malými karcinomy do 1 cm, kde je očekáván negativní nález [2]. Je zajímavé, že pouze v jednom případě ze 160 úspěšných detekcí byla nalezena radioaktivita v oblasti vnitřních mamárních uzlin parasternálně. To poněkud odporuje zprávám, že až 25 % tumorů s mediální lokalizací je drénováno do těchto uzlin. Naše výsledky podporují (zatím) teorii o přednostní lymfatické drenáži prsu do axilárních uzlin [3].

Dalším důležitým faktorem pro úspěch detekce je rutina, mluví se o tzv. „learning curve“, po jejímž absolvování podstatně stoupá procento úspěšných detekcí. To platí pro chirurga i pro aplikaci radiokoloidu a metodiku lymfoscintigrafie, která je prováděna na klinice nukleární medicíny. **V našem souboru jsme prokázali shodnou efektivitu obou typů detekce, patentovou modř i radiokoloidem.** Ve všech případech byla označena stejná sentinelová lymfatická uzlina. I když jiní autoři preferují současné používání obou typů detekce sentinelové uzliny [7], další práce našly vyšší frekvenci detekce při použití radiokoloidu (97% úspěšnost) oproti 73% úspěšnosti při barvení patentovou modř [12]. Naše pracoviště preferuje v současné době **detekci sentinelové uzliny jen jednou metodou.** Jako vedoucí metodu detekce používáme značení radiokoloidem a jen v případě, že tento postup selže, používáme peroperační „dobarvení“ uzliny patentovou modř.

Vysoká korelace mezi stavem sentinelové uzliny a stavem všech uzlin v axile je potvrzením správnosti této koncepce a opravňuje nás spolu s jinými autory k tvrzení, že její stagingový význam je shodný s významem kompletní axilární disekce [3, 17, 19]. Toto tvrzení se týká detekce makrometastáz v uzlinách. Rutinní histopatologické vyšetření, tak jak je prováděno, není schopné detekovat mikrometastázy – depozita nádorových buněk v uzlině menších než 2 mm. Problematika mikrometastáz však není předmětem tohoto sdělení. V současné době je možné považovat metodiku detekce sentinelové uzliny za standard chirurgie axily u karcinomu prsu [3, 24]. V případech nádorů velikostí T1, do 2 cm, a negativní sentinelové uzliny je možné a bezpečné axilární disekci vynechat [14].

Na základě velmi dobrých výsledků s detekcí sentinelové uzliny již v současné době u karcinomu prsu do

velikosti 2 cm s negativitou sentinelové uzliny neprovádíme kompletní disekci uzlin. Tento postup zkracuje dobu operace i hospitalizace. Výrazně je redukována frekvence pooperační morbidity a komplikací, včetně lymfedému.

## ZÁVĚR

- Koncept disekce sentinelové uzliny je další minimalizací chirurgie u karcinomu prsu, která podstatně zlepšuje kvalitu života žen.
- Stav sentinelové uzliny predikuje s vysokou spolehlivostí stav ostatních regionálních lymfatických uzlin z hlediska hodnocení makrometastáz.
- Frekvence pooperačních komplikací je při disekci sentinelové uzliny výrazně redukována.
- V současné době je možné považovat tento koncept na vybraných pracovištích za standard chirurgického managementu axily.

**Práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR č. NH/7670-3.**

## LITERATURA

1. Cady, B. The need to reexamine axillary lymph node dissection in invasive breast cancer. *Cancer*, 1994, 73, p. 505–508.
2. Canavese, G., Gipponi, M., Catturich, A., et al. Technical issues and pathologic implications of sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer patients. *J. Surg. Oncol.* 2001, 77, 2, p. 81–87.
3. Cody, H. S., 3rd., Current surgical management of breast cancer. *Current surgical management of breast cancer. Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2002, 14, 1, p. 45–52.
4. Danforth, D. N., Findlay, P. A., McDonald, H. P. Complete axillary node dissection for stages I-II carcinoma of the breast. *J. Clin. Oncol.*, 1986, 4, p. 655–662.
5. Danforth, D. N. The role of axillary node dissection in the management of breast cancer. In DeVita, V.Z., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Eds. *Cancer: Principles and practice of oncology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Co, 1992, 6, p. 1–16.
6. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, p. 1444–1455.
7. Gipponi, M., Bassetti, C., Canavese, G., et al. Sentinel lymph node as a new marker for therapeutic planning in breast cancer patients. *J. Surg. Oncol.*, 2004, 85, 3, p. 102–111.
8. Giuliano, A. E., Kirgan, D. M., Guenther, J. M., Morton, D. L. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann. Surg.*, 1994, 220, p. 391–401.
9. Giuliano, A. E., Dale, P. S., Turner, R. R., et al. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann. Surg.*, 1995, 222, p. 394–401.
10. Giuliano, A. E., Jones, R. C., Brennan, M., Statman, R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1997, 15, p. 2345–2350.
11. Krížová, H., Wald, M., Strnad, P., et al. Detection of the sentinel node in breast carcinoma using method of a single subcutaneous injection of radiopharmaceutical. *Neoplasma*, 2004, 51, 1, p. 44–48.
12. Marrazzo, A., Taormina, P., Noto, A., et al. Localization of the sentinel lymph node in breast cancer: prospective comparison of vital staining and radioactive tracing methods. *Chir. Ital.*, 2004, 56, 5, p. 621–627.



13. Morton, D. L., Wen, D. R., Wong, J. H. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch. Sur.*, 1992, 127, p. 392–399.
14. Noguchi, M. Sentinel lymph node biopsy and breast cancer. *Br. J. Surg.*, 2004, 89, 1, p. 21–34.
15. Rosen, P. P., Saigo, P., Braun, D. W. Jr., et al. Occult axillary lymph node metastases from breast cancer with intramammary lymphatic tumor emboli. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1982, 6, 7, p. 639–641.
16. Rosen, P. R., Lesser, M. L., Kinne, D. W., Beattie, E. J. Discontinuous or skip metastases in breast cancer. *Ann. Surg.*, 1983, 197, p. 276–283.
17. Sabel, M. S., Zhang, P., Barnwell, J. M., et al. Accuracy of sentinel node biopsy in predicting nodal status in patients with breast carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 2001, 77, 4, p. 243–246.
18. Silverstein, M. J., Gierson, E. D., Waisman, J. R. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma: is it indicated? *Cancer*, 1994, 73, p. 664–667.
19. Schrenk, P., Shamiyeh, A., Wayand, W. Sentinel lymph-node biopsy compared to axillary lymph-node dissection for axillary staging in breast cancer patients. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2001, 27, 4, p. 378–382.
20. Stratmann, S. L., McCarty, T. M., Kuhn, J. A. Radiation safety with breast sentinel node biopsy. *Am. J. Surg.*, 1999, 178, 6, p. 454–456.
21. Veronesi, U., Salvadori, B., Luini, A. Breast conservation is a safe method in patients with small cancer of the breast. Long term-results of three randomized trials on 1993 patients. *Eur. J. Cancer*, 1995, 31A, s.1574–1582.
22. Veronesi U., Luini, A., Galimberti, V. Extent of metastatic axillary involvement in 1446 cases of breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 1990, 16, p. 127–133.
23. 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, s., 1864–1867.
24. Wilson, L. L., Giuliano, A. E. Sentinel lymph node mapping for primary breast cancer. *Curr. Oncol. Rep.*, 2005, 7, 1, p. 12–17.

MUDr. Pavel Strnad, CSc.  
Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5  
e-mail: pavelstrnad@lfmotol.cuni.cz

## Stanovení proteinu p16 u lézí děložního hrdla

### The Detection of p16 Protein in Uterine Cervix Lesions

Čes. Gynek.  
70, 2005, č. 4  
s. 295–298

Rotterová P.<sup>1</sup>, Nenutil R.<sup>1</sup>, Rotter L.<sup>2</sup>, Hanzelková Z.<sup>1</sup>, Dvořáková Z.<sup>1</sup>, Chovanec J.<sup>2</sup>, Kyclová J.<sup>1</sup>, Křen L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Patologicko-anatomický ústav FN Brno, přednosta prof. MUDr. K. Dvořák, DrSc.

<sup>2</sup>Gynekologicko-porodnická klinika FN Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

#### Structured Abstract

**Objective:** The detection of p16 in oncocytopathology and in the surgical pathology of the uterine cervix.

**Setting:** Department of Pathology and Department of Gynaecology and Obstetrics, University Hospital Brno.

**Methods:** An immunocytochemical and immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin embedded samples of the uterine cervix (included knips biopsies) and liquid based smears was performed. The bioptic database included 7 cases of CIN II–III, 5 cases of reactive epithelial changes and 3 cases of atrophic epithelium. 36 liquid based smears, 25 cases of CIN III and 11 cases of uterine cervix without a dysplastic lesion.

**Results:** Nuclear and cytoplasmatic p16 positivity was found in 22 cases of CIN III in liquid based smears. Diffuse and intensive p16 expression was in 5 cases of knips biopsies CIN III.

**Conclusion:** The detection of p16 seems to be a valuable tool in surgical pathology of the uterine cervix: possible evaluation of the surgical margins, differential diagnosis regarding reactive atypia, and it is also prospective in oncocytopathologic diagnosis regarding differential diagnosis of the ASCUS, or can be used in monitoring of the uterine cervix dysplasia.

**Key words:** uterine cervix dysplasia, HPV, pRb, p16, liquid based smears

#### Strukturovaný souhrn

**Cíl studie:** Stanovení proteinu p16 u lézí děložního hrdla v onkologické cytologii a biotické histologické diagnostice.

**Typ studie:** Prospektivní studie.

**Název a sídlo pracoviště:** Patologicko-anatomický ústav, FN Brno, Gynekologicko-porodnická klinika, FN Brno.

**Metodika:** Vyšetřili jsme 36 cytologických vzorků odebraných do tekutého média se směsí alkoholu (liquid based smears), z toho 25 bioticky ověřených CIN III a 11 z děložního hrdla bez jakékoli léze, 15 biopsií z děložního hrdla, z toho 7 CIN II–III, 5 reaktivní změny epitelu a 3 atrofický epitel. Expres p16 byla sledována imunocytochemicky a imunohistochemicky (protilátka Novocastra – NCL-P16-432).

**Výsledky:** Membránová a jaderná pozitivita p16 byla prokázána v dysplastických buňkách v 22 liquid based smears z CIN III. Hodnocení 3 vzorků liquid based smears bylo nekonkluzivní. Difúzní a kompletní exprese p16 v 5 případech biopsií z CIN II–III.