

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni
Onkologické a radioterapeutické oddělení Fakultní nemocnice v Plzni

Prognostické a prediktivní faktory karcinomu prsu
Stanovení exprese mRNA vybraných genů v normální a nádorové
prsni tkáni a zhodnocení možnosti jejich využití u karcinomu prsu

Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer
The mRNA Expression of Selected Genes in Normal and Tumor
Breast Tissue Samples and Theirs Clinical Value in Breast Cancer

V rámci externí formy doktorandského studijního programu LF UK v Plzni
Vypracovala: MUDr. Lucie Šefrhansová
Školitel: Doc. MUDr. Jindřich Fínek, PhD.

V Plzni dne 5. 3. 2012

Abstrakt

Cíl: Hlavním cílem této práce bylo popsání a zhodnocení problematiky prognózy a predikce u karcinomu prsu. V rámci této práce byla provedena prospektivní studie. Cílem studie bylo stanovení exprese mRNA MMP-7, p53 a TIMP-1 v normální a nádorové tkáni prsu in vivo a určení klinicko-patologického a prognostického významu získaných výsledků.

Prognóza a predikce: Mezi základní prognostické faktory karcinomu prsu patří velikost nádoru, postižení mízních uzlin, přítomnost vzdálených metastáz, stupeň diferenciacie nádoru, perivaskulární invaze, mitotická aktivita nádoru, stav exprese hormonálních receptorů a receptoru HER2. Mezi nezávislé prognostické faktory byl v roce 2005 zařazen věk do/nad 35 let. Z nových markerů je schváleno možné použití uPA/PAI ve vztahu k prognóze u nemocných s karcinomem prsu bez postižení mízních uzlin. Hlavními prediktivními faktory léčby karcinomu prsu je stav hormonálních receptorů a exprese HER-2. U nově diagnostikovaných pacientek s estrogenpozitivním karcinomem prsu, bez postižení mízních uzlin může být použita Oncotype DX analýza k predikci rizika návratnosti nemoci při léčbě tamoxifenem.

Pacienti a metody: 74 nemocným byl odebrán vzorek nádorové tkáně v průběhu primárního resekčního výkonu pro nádorové onemocnění prsu. 24 kontrolních vzorků zdravé prsní tkáně bylo odebráno klientkám v průběhu estetických zákroků. Vzorky zdravé i nádorové tkáně byly zmrazeny do dalšího zpracování. Stanovení exprese mRNA p53, TIMP-1 a MMP-7 ze všech vzorků bylo provedeno pomocí RT-PCR. Histopatologické vyšetření obsahovalo určení histologického typu nádoru, patologické určení rozsahu nádoru dle UICC, určení exprese hormonálních receptorů a určení mitotické aktivity. Nemocné byly léčeny dle doporučení ČOS a následně kontrolovány na našem pracovišti do své smrti či data poslední kontroly. Statistická analýza byla provedena za použití běžných statistických metod.

Výsledky: Expres p53, MMP-7 i TIMP-1 mRNA byla významně vyšší v nádorové tkáni prsu oproti zdravé prsní tkáni ($p < 0.001$). Expres těchto genů byla významně vyšší při srovnání exprese ve vzorcích prsu odebraných pacientkám s postižením (N+) i bez postižení mízních uzlin (N0) oproti expresi ve zdravé prsní tkáni ($p < 0.001$). Expres MMP-7 byla významně vyšší u nádorů neexprimujících estrogenové receptory ($p = 0.017$). Pětileté přežití nemocných s expresí MMP-7 mRNA nad medián bylo významně horší než přežití nemocných s hodnotou této exprese pod medián ($p = 0.017$). Zjistili jsme, že čím nižší je diferenciacie nádorové tkáně, tím nižší je expres mRNA p53 a tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,042$). Medián exprese p53 mRNA byl statisticky významně vyšší u nemocných s nádorem G1 oproti nemocným s nádorem G2 ($p = 0,032$).

Expres TIMP-1 mRNA nekorelovala s žádným klinickopatologickým parametrem ani délkou bezpříznakového období. Expres mRNA p53, TIMP-1 a MMP-7 nebyla významně rozdílná u nemocných, kteří zprogredovali do pěti let od primární operace oproti nemocným zůstávajícím v remisi.

Závěr: Zvýšená expres MMP-7 mRNA v nádorové prsní tkáni je spojena s kratším bezpříznakovým obdobím. Zjistili jsme, že expres MMP-7 mRNA je spojena s horším fenotypem nádoru (ER-). Expres mRNA MMP-7 je nepříznivým prognostickým faktorem nemocných s časným karcinomem prsu. Nepodařilo se nám zjistit prognostickou hodnotu exprese mRNA p53, TIMP-1 u karcinomu prsu.

Abstract

Background: The aim of this work was to describe and to evaluate possibilities of prognosis and prediction in breast cancer. Within the framework of this study-work we carry out a prospective clinical study. The aim of this prospective study was to detect mRNA MMP-7, p53 and TIMP-1 expression in normal and tumor breast tissue samples and to determine the clinical and prognostic significance of our results.

Prognosis and prediction: The tumor size, lymph node status, presence of distant metastasis, differentiation of the tumor, perivascular invasion, mitotic activity, expression of ER, PR and HER2 receptors are the basic prognostic factors in breast cancer. Age under/above 35 years was included among independent prognostic breast cancer factors in 2005. It is approved to use uPA/PAI to assess prognosis in node negative breast cancer patients. The hormone receptor status and HER-2 receptor status are the only two predictive markers associated with the target therapy. OncotypeDX analysis could be use to predict the disease recurrence interval of patients with estrogen positive and node negative breast cancer.

Patients and methods: 74 samples of breast cancer tissue were taken away from inpatients undergoing primary surgeries for breast cancer. 24 samples of normal breast tissue were taken away from inpatients undergoing plastic surgeries. Samples were verified and deep frozen till the mRNA expression was assessed by RT-PCR. Histopatological examinations include the assessment of final tumor histotype, grade of differentiation, hormonal receptor status and mitotic index. After surgery patients were treated according to the Czech Society of Oncology Recommendations and examined till death or till the first end of the study. Routine statistical methods were used for the statistical analysis.

Results: The expressions of p53, MMP-7 and TIMP-1 mRNA were statistically significantly higher in tumor tissue samples ($p < 0.001$) compared with normal breast tissue samples. The expression of all three markers was significantly higher in samples from patients with node negative (N0) and also with node positive (N+) breast cancer compared to normal breast tissue samples ($p < 0.001$). The expression of MMP-7 mRNA was significantly higher in estrogen negative samples ($p = 0.017$). Patients with high mRNA expression of MMP-7 (above median) had shorter disease free interval ($p = 0.017$). The expression of p53 mRNA significantly correlated with tumor grade. The lower the rate of cell differentiation is the lower the median of gene expression is. Patients with grade 1 have higher median expression of p53 than patients with grade 2 ($p = 0,032$). The expression of TIMP-1 did not correlate with any clinical and pathological features and the disease free interval. Gene expression values according to occurrence of progression in patient in 5 years after operation were not statistically significant.

Conclusion: Higher expression of MMP-7 mRNA in breast tumor tissue sample is associated with shorter disease free interval. We confirmed that the expression of MMP-7 is higher in estrogen negative breast cancer samples compared. The expression of MMP-7 mRNA is negative prognostic factor in early breast cancer. We didn't document the prognostic role of expression of TIMP-1 and p53 mRNA in breast cancer.

Předmluva

Tato práce vznikla na základě spolupráce Oddělení nukleární medicíny Fakultní nemocnice v Plzni, Oddělení klinické onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Plzni, Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni, Oddělení plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni a Šiklova patologicko-anatomického ústavu Fakultní nemocnice v Plzni a pod odborným vedením školitele Doc. MUDr. Jindřicha Fínka, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a veškeré převzaté údaje jsem řádně citovala. Dále prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

MUDr. Lucie Šefrhansová

Obsah

PŘEDMLUVA.....	4
SEZNAM POUŽÍVANÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	8
ÚVOD	11
CÍL PRÁCE	12
POPIS SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	13
1 EPIDEMIOLOGIE KARCINOMU PRSU	13
2 ANATOMIE A HISTOLOGIE PRSU	14
2.1 ANATOMIE.....	14
2.2 HISTOLOGIE	14
3 RIZIKOVÉ FAKTORY	16
3.1 GENETICKÉ ABNORMALITY	17
3.1.1 Výskyt karcinomu prsu v rodině.....	17
4 HODNOCENÍ KARCINOMU PRSU DLE UICC INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER 2004 - TNM KLASIFIKACE (29)	21
4.1 KLINICKÉ HODNOCENÍ KARCINOMU PRSU DLE UICC INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER 2004/21	
4.1.1 Anatomické sublokalizace dělení nádorů prsu	21
4.1.2 Primární nádor (T):	21
4.1.3 Regionální mízní uzliny (N):	22
4.1.4 Vzdálené metastázy (M):	22
4.1.5 Rozdělení do stadií	23
4.2 PATOLOGICKÉ HODNOCENÍ KARCINOMU PRSU DLE UICC INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER 2004 (29)	23
4.2.1 Primární nádor (pT)	23
4.2.2 Regionální mízní uzliny (pN)	23
4.2.3 Vzdálené metastázy (pM)	24
4.2.4 Reziduální nádor (R).....	24
5 PATOLOGICKÁ KLASIFIKACE KARCINOMŮ PRSU DLE WHO	25
5.1 INVAZIVNÍ KARCINOM PRSU	25
5.1.1 Invazivní duktální karcinom prsu NOS (Not otherwise specified)	25
5.1.2 Invazivní lobulární karcinom.....	25
5.1.3 Tubulární karcinom	25
5.1.4 Invazivní kribriformní karcinom.....	26
5.1.5 Medulární karcinom	26
5.1.6 Mucin produkující karcinomy	26
5.1.7 Neuroendokrinní karcinomy	26
5.1.8 Invazivní papilární karcinom	26
5.1.9 Invazivní mikropapilární karcinom	26
5.1.10 Apokrinní karcinom.....	26
5.1.11 Metaplastický karcinom.....	26
5.1.12 Karcinom bohatý na lipidy	27

5.1.13	<i>Sekretorický karcinom</i>	27
5.1.14	<i>Onkocytický karcinom</i>	27
5.1.15	<i>Adenoidně cystický karcinom ACC</i>	27
5.1.16	<i>Acinocelulární - Acinický karcinom ACCA</i>	27
5.1.17	<i>Na glykogen bohatý světlobuněčný karcinom</i>	27
5.1.18	<i>Sebaceózní karcinom</i>	27
5.1.19	<i>Inflamatorní karcinom</i>	27
5.1.20	<i>Bilaterální karcinom prsu</i>	27
5.2	PREKURZOROVÉ LÉZE	27
5.2.1	<i>Intraduktální proliferativní léze</i>	28
5.2.2	<i>Duktální karcinom in situ (DCIS)</i>	28
5.2.3	<i>Lobulární karcinom in situ (LCIS)</i>	28
5.2.4	<i>Mikroinvazivní karcinom</i>	28
5.3	BENIGNÍ EPITELIÁLNÍ LÉZE – ADENÓZA, ADENOM.....	28
5.4	MYOEPITELIÁLNÍ LÉZE	28
5.5	MEZENCHYMÁLNÍ NÁDORY	28
5.5.1	<i>Angiosarkom</i>	28
5.5.2	<i>Liposarkom</i>	29
5.5.3	<i>Osteosarkom</i>	29
5.6	FIBROEPITELIÁLNÍ NÁDORY	29
5.6.1	<i>Fibroadenom</i>	29
5.6.2	<i>Fyloidní tumor</i>	29
5.7	TUMORY PRSNÍ BRADAVKY	29
5.7.1	<i>Pagetův karcinom</i>	29
5.8	MALIGNÍ LYMFOM A METASTATICKÉ NÁDORY.....	29
5.9	NÁDORY MUŽSKÉHO PRSU	29
5.9.1	<i>Gynekomastie</i>	30
5.9.2	<i>Karcinom mužského prsu</i>	30
6	HISTOPATOLOGICKÝ GRADING (STUPEŇ DIFERENCIACE NÁDOROVÝCH BUNĚK)	31
7	MOLEKULÁRNÍ KLASIFIKACE NÁDORŮ PRSU NA ZÁKLADĚ GENOVÉHO EXPRESNÍHO MODELU	32
8	DIAGNOSTIKA	33
8.1	PRIMÁRNÍ DIAGNOSTIKA.....	33
8.2	DIAGNOSTIKA V PRŮBĚHU FOLLOW UP A DIAGNOSTIKA LOKÁLNÍCH RECIDIV	35
9	LÉČBA	37
9.1	CHIRURGICKÁ LÉČBA	37
9.2	ONKOLOGICKÁ LÉČBA	37
9.2.1	<i>Radioterapie</i>	38
9.2.2	<i>Hormonální léčba</i>	39
9.2.3	<i>Chemoterapie</i>	40
9.2.4	<i>Biologická léčba</i>	40
10	HODNOCENÍ ODPOVĚDI NA LÉČBU	42
11	PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY	43
11.1	VELIKOST NÁDORU.....	46
11.2	POSTIŽENÍ UZLIN	46
11.3	HISTOLOGICKÝ TYP	47
11.4	HISTOPATOLOGICKÝ GRADING (STUPEŇ DIFERENCIACE NÁDOROVÝCH BUNĚK).....	47

11.5	VĚK.....	47
11.6	PERIVASKULÁRNÍ INVAZE.....	47
11.7	NÁDOROVÉ MARKERY	48
11.7.1	<i>Estrogenové receptory (ER) a progesteronové receptory (PR)</i>	49
11.7.2	<i>HER-2, NEU</i>	51
11.7.3	<i>uPA Urokinázový aktivátor plasminogenu 1 (Urokinase Plasminogen Activator)</i> <i>PAI-1 Inhibitor plasminogen aktivátoru 1 (Plasminogen Activator Inhibitor</i>	53
11.7.4	<i>Genový expresní model – budoucnost OncotypeDX, MammaPrint</i>	54
11.7.5	<i>CEA Karcinoembryonální antigen CEA</i>	55
11.7.6	<i>CA 15-3</i>	55
11.7.7	<i>CA 27.29 MAM-6</i>	56
11.7.8	<i>CTC Cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumor Cells)</i>	56
11.7.9	<i>Markery proliferační aktivity</i>	57
11.7.10	<i>Katepsin D</i>	58
11.7.11	<i>Mikrometastázy kostní dřeně</i>	58
11.7.12	<i>P53 (Protein 53), TP53</i>	58
11.7.13	<i>Matrixmetaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory</i>	60
ŘEŠENÍ STUDIE		66
1	CÍL	66
	PROČ MMP-7?.....	66
	PROČ TIMP-1?.....	67
	PROČ P53?.....	68
2	METODIKA ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ A SLEDOVÁNÍ NEMOCNÝCH	70
2.1	ODBĚR VZORKŮ	70
2.2	STANOVENÍ EXPRESE JEDNOTLIVÝCH GENŮ POMOCÍ RT-PCR ZE VZORKŮ PRSNÍ TKÁNĚ.....	70
2.3	METODIKA SLEDOVÁNÍ NEMOCNÝCH	71
3	STATISTICKÁ ANALÝZA	72
4	VÝSLEDKY.....	73
4.1	KLINICKO PATOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA SOUBORU.....	73
4.2	ROZDÍL GENOVÉ EXPRESE MEZI NÁDOROVOU A ZDRAVOU TKÁNÍ.....	76
4.3	GENOVÁ EXPRESE VE VZTAHU KE KLINICKOPATOLOGICKÝM PARAMETRŮM	78
4.4	GENOVÁ EXPRESE VE VZTAHU K VYBRANÝM SKUPINÁM NEMOCNÝCH.....	84
4.5	POROVNÁNÍ MÍRY GENOVÉ EXPRESE PODLE VZNIKU PROGRESE DO PĚTI LET OD PRIMÁRNÍ OPERACE	88
4.6	ANALÝZA DÉLKY BEZPŘÍZNAKOVÉHO OBDOBÍ - DISEASE FREE SURVIVAL (DFS)	89
5	ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	100
5.1	MMP-7.....	100
5.2	TIMP-1.....	100
5.3	P53	100
6	DISKUZE	102
7	ZÁVĚR	105
8	SEZNAM LITERATURY.....	106
PODĚKOVÁNÍ.....		115

Seznam používaných symbolů a zkratek

ACC	adenoidně cystický karcinom
ACCA	acinocelulární acinický karcinom
ASCO	American Society of Clinical Oncology, Americká onkologická společnost
ATAC	Anastrozol versus TAmoxifen versus Combination of the two
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
Bcl-2	B-cell CLL/Lymphoma-2, označení genu
BRCA1	Breast Cancer Antigen 1
BRCA2	Breast Cancer Antigen 2
CA	Carcinom Antigen, nádorový antigen
cDNA	complementary DNA, komplementární DNA
CEA	Carcinoembryonic Antigen, Karcinoembryonální antigen
CMF	cyklofosamid, metotrexat, fluorouracil
CR	Complete Remission, kompletní remise
CR	kompletní remise
CT	Computer Tomography, počítačová tomografie
CTC	Circulating Tumor Cells, cirkulující nádorové buňky
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČOS	Česká onkologická společnost
Da	Dalton
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ, duktální karcinom in situ
DFI	Disease Free Interval
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor, receptor endoteliálního růstového receptoru
EGTM	European Group on Tumor Markers
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Enzymatická imunoabsorpční analýza
EMPRIN	extracelulární matrix metaloproteinázový induktor
EPA	Erythroid Potentiating Activity
ER	estrogenový receptor
ERBB2	V-ERB-B2 avian ERYthroBlastic leukemia viral oncogene Homolog 2
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
FNA	Fine Needle Aspiration
FSH	folikulostimulační hormon
G	grade
GAPDH	glyceraldehyd -3-fosfát dehydrogenáza
Gy	Grey
HB-EGF	Heparin Binding Epidermal Growth Factor
HCI	Collagenase Inhibitor, Human , lidský kolagenázový inhibitor
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2
HT	hormonální terapie
CHEK2	Chekpoin homolog

CHT	chemoterapie
IGFBP-5	Insulin Growth like Factor Binding Protein 5
IHC	imunohistochemické stanovení
LCIS	Lobular Carcinoma in Situ, lobulární karcinom in situ
LFS	Li Fraumeni syndrom
LH-RH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone, luteotropní hormon
M	metastatické postižení
MAM	mammaglobin
MAT	matrilysin
MDM2	Murine Double Minute 2
MED	medián
MINDACT	MIcroarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy, studie
MMP	matrixmetaloproteináza
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA
MT-MMP	transmembránová metaloproteináz
MZ ČR	Ministerstvo zahraničí České republiky
N	uzlinové postižení
NBRST	Neoadjuvant Breast Registry Symphony Trial
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OS	Overall Survival
P53	protein 53
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor, Inhibitor plasminogen aktivátoru 1
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD	progrese
PFI	Progression Free Interval
PR	progesteronový receptor
PUMP-1	PUtative MetaloProteinase 1
PVI	perivaskulární invaze
RB	retinoblastom
RE	responzivní element
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RNA	ribonukleová kyselina
RS	Recurrence Score
RT PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SD	stabilizace onemocnění
SERD	selektivní downregulátor estrogenového receptoru
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator, selektivní modulátor estrogenového receptoru
SWOG	SouthWest Oncology Group
T	velikost nádoru
TBC	tuberkulóza
TGF	Tumor Growth Factor
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TNF α	Tumor Necrosis Factor α , tumor nekrotizující faktor α
TP53	tumor protein 53, gen kódující protein p53
UICC	International Union Against Cancer

uPA	urokinase Plasminogen Activator, urokinásový aktivátor plasminogenu
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, vaskulární endoteliální faktor
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen ve světě i u nás. Algoritmus diagnostiky a léčby karcinomu prsu se v posledních letech dynamicky mění nezadržitelnou rychlostí, každoročně jsou inovovány postupy a doporučení odborných společností na základě nových a nových studií. Tento boom je dán rozvojem molekulárně diagnostických metod a poznáním molekulární podstaty nádorového růstu. Dochází k revizi základních poznatků o karcinomu prsu a do hry vstupuje jeho molekulární charakteristika. Základní parametry nádoru jako je velikost, postižení lymfatických uzlin nádorem a přítomnost vzdálených metastáz začínají nahrazovat molekulárně biologické faktory nádoru. Biologická léčba se stává standardem léčby karcinomu prsu. Do klinické praxe se dostávají mnohagenové analýzy a je jen otázkou času, kdy na jejich základě budeme rozhodovat o další léčbě nemocných s karcinomem prsu.

O nalezení vhodných prognostických faktorů, které by byly schopné lépe specifikovat povahu nádoru a vývoj nemoci, se snaží mnoho vědeckých týmů. Množství studií zabývajících se tímto tématem roste geometrickou řadou od roku dokončení sekvence genomu. Dalším úsilím vědců je nalezení vhodných prediktivních faktorů v klinické praxi s možností léčby šité tzv. na míru. Při nalezení vhodného prediktora léčebné odpovědi by nedocházelo k podávání velice náročné léčby nemocným, které by z ní neprofitovali a naopak.

Snahou této práce je provedení shrnutí klinicky použitelných výsledků studií zabývajících se prognózou a predikcí u karcinomu prsu a upozornit na další možné a slibné markery tohoto onemocnění. Tato práce by mohla pomoci lékařům, kteří přicházejí do kontaktu s nemocnými s karcinomem prsu zorientovat se v problematice tohoto onemocnění a seznámit se s možnostmi stanovení prognózy a predikce u karcinomu prsu.

Na závěr je ale nutné podotknout, že s mírou možností a přibývajících poznatků dochází k odkrytí neznámých skutečností, které jsou mnohdy velice překvapivé a bortí výsledky vědeckých prací v minulosti. Neměli bychom se ale ukvapovat v závěrech a vždy se snažit o interpretaci výsledků minulých i současných. Jen tak dojdeme k lepšímu poznání řešeného problému.

Cíl práce

Základním cílem této práce je popsání problematiky prognózy a predikce u karcinomu prsu a zhodnocení možnosti použití jednotlivých ukazatelů v klinické praxi.

Dále byla v rámci této práce provedena prospektivní studie, jejímiž hlavními cíli bylo kvantitativní stanovení exprese mRNA u vybraných genů – pro protein 53 (p53), matrixmetaloproteinázu 7 (MMP-7), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 – tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) pomocí kvantitativní polymerázové reakce - Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ze vzorků duktálního invazivního karcinomu a ze vzorků zdravé tkáně prsu. Dalšími cíli bylo zhodnocení exprese mRNA těchto genů ve vztahu ke klinicko - patologické charakteristice souboru, prospektivní sledování těchto nemocných a zhodnocení možnosti využití výsledků ve vztahu k prognóze nemocných s karcinomem prsu. Posledním z cílů bylo provedení analýzy přežití.

Popis současného stavu problematiky

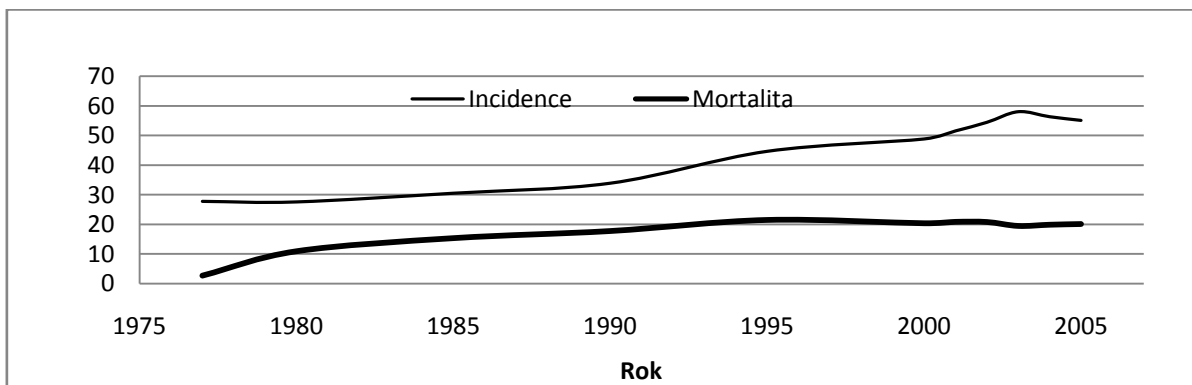
1 Epidemiologie karcinomu prsu

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen ve světě i u nás. Jeho incidence celosvětově stoupá. Nejvyšší výskyt je ve vyspělých zemích Evropy a Severní Ameriky. V zemích Evropské Unie onemocní v průběhu života každá desátá, v USA každá osmá žena. Celosvětově je nejvyšší úmrtnost na karcinom prsu v Dánsku, Irsku, Nizozemí, Izraeli a Velké Británii. Nejnižší je v asijských zemích a Africe.

V roce 2008 bylo v České republice diagnostikováno 67,68 případů karcinomu prsu na 100 000 žen, mortalita byla 15,98 na 100 000 žen. Oproti prudkému vzestupu počtu nově diagnostikovaných případů se mortalita zvyšuje jen mírně. Tento jev je vysvětlován časným záchytem karcinomu prsu po zavedení mamografického screeningu. Tento screening snižuje úmrtnost žen nad 50 let o třetinu. Zkrácený vývoj hrubé incidence karcinomu prsu a mortality na něj v České republice v posledních třiceti letech je uveden v tabulce 1 (1).

Tabulka 1 Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) v České republice

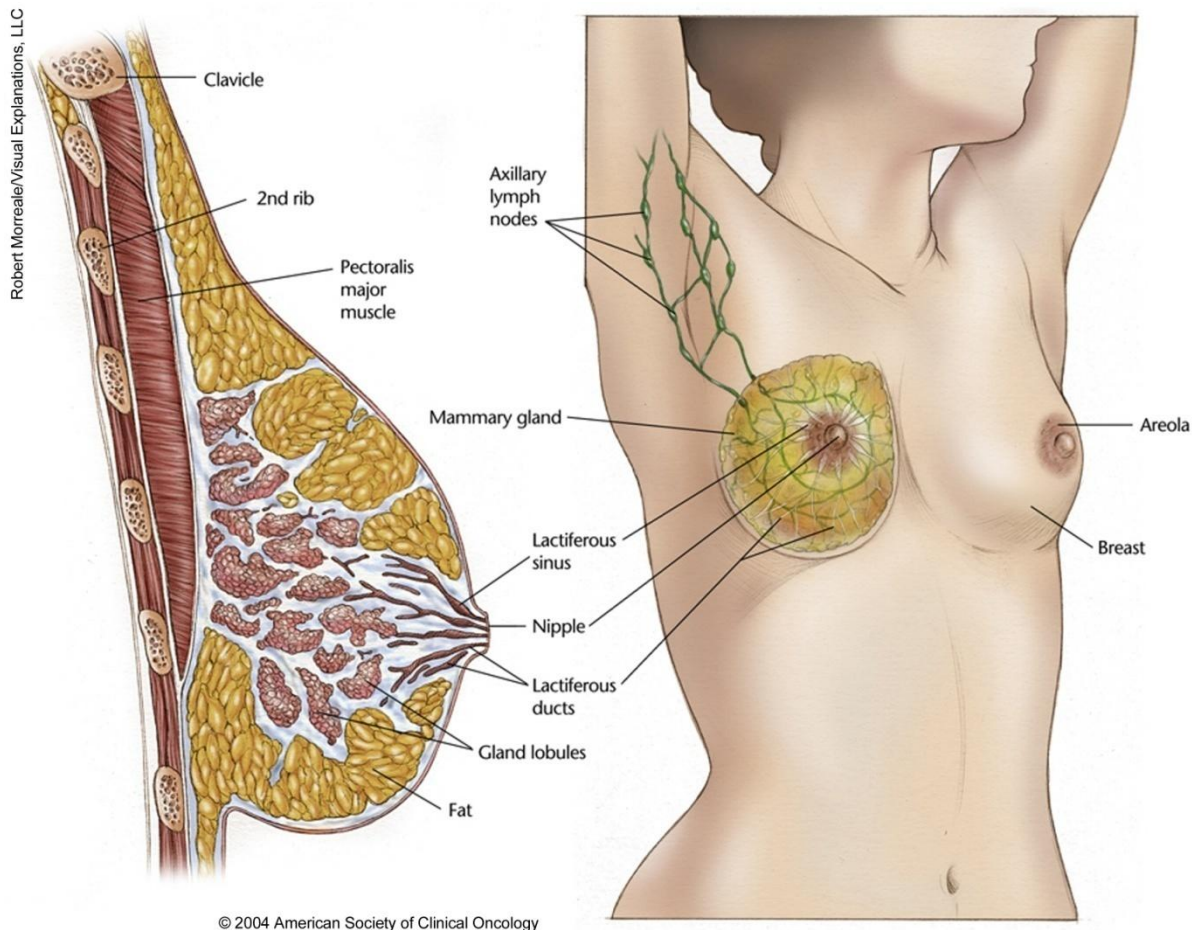
Rok	1977	1980	1985	1990	1995	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Incidence	27,79	27,6	30,53	33,92	44,66	48,83	51,54	54,44	58,02	56,33	55,09
Mortalita	2,65	10,87	15,29	17,69	21,43	20,31	20,79	20,73	19,41	19,82	20,05



Obrázek 1 Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) v České republice

2 Anatomie a histologie prsu

Pro lepší orientaci v problematice uvádím zjednodušený obrazový přehled základní anatomie mléčné žlázy dospělé ženy s krátkým komentářem a stručný histologický rozbor.



Obrázek 2 Anatomie mléčné žlázy dle ASCO

2.1 Anatomie

Prs je párovým orgánem, složeným z mléčné žlázy, vazivové a tukové tkáně. K přední stěně hrudníku je fixován povrchovou fascií. Vlastní mléčná žláza se skládá z 15 – 20 laloků (lobů), ty se dále větví na lalůčky (lobuli). Vývody z jednoho laloku se spojují v mlékovod (ductus lactiferi). Před vyústěním na bradavku (mamilla) tvoří mlékovod sinus, který slouží jako zásobárna mléka. Bradavka je uprostřed dvorce (areola mammae), se kterým tvoří mamiloareolární komplex (2).

2.2 Histologie

Histologická stavba mléčné žlázy závisí na pohlaví, věku a funkčním stavu. V období embryogeneze vzniká mléčná žláza jako párové ztlustění epidermis - mléčná lišta na přední straně trupu, ze které vyrůstá 15 - 20 epitelových čepů, které vyrůstají do přilehlého vaziva. Zbytek zaniká. Před pubertou se mléčné žlázy skládají ze sinus lactiferi a ductus lactiferi. Působením zvýšené produkce estrogenů v pubertě dochází k proliferaci a větvení ductus lactiferi. Charakteristickou funkční jednotkou dospělé ženy je pak terminální duk-

tulolobulární jednotka (3). Terminální duktulolobulární jednotka se skládá z lobulů a terminálních interlobulárních duktů viz (4).

Terminální interlobulární vývody jsou tvořeny jednovrstevným kubickým epitelem spočívajícím na nespojitě vrstvě myoepiteliálních buněk ležících na bazální membráně, mlékovody jsou dále vystlány vrstevnatým kubickým až cylindrickým epitelem. V průběhu těhotenství dochází k intenzivnímu růstu mléčné žlázy, který je způsobený proliferací alveolů – kulovité nakupeniny epitelových buněk, které produkují mléko. Ty po přerušení kojení degenerují a jsou odloučeny a odstraněny, myoepitelové buňky a bazální lamina přetrvávají. Po menopauze dochází k atrofii interlobulárního vaziva, sekrečních úseků žláz, ale i mlékovodů (5).

3 Rizikové faktory

Mezi rizikové faktory nádorů prsu patří velice různorodá skupina vnitřních i vnějších vlivů. Tyto faktory různými mechanismy zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu. Mezi hlavní rizikové faktory karcinomu prsu patří vlivy podílející se na hormonální estrogenní stimulaci prsní tkáně. V následující části jsou stručně popsány nejvýznamnější rizikové faktory karcinomu prsu (pohlaví, věk, nástup menarche a menopauzy, počet porodů, laktace, obezita, hormonální antikoncepce, vliv ionizačního záření, alkoholu a kouření). Detailněji se věnují genetickým abnormalitám, které dále souvisí s biologickou charakteristikou nádoru a s prognózou karcinomu prsu.

Riziko karcinomu prsu u mužů oproti ženám se pohybuje od 1:70 do 1:150 dle rasy a geografické polohy, v České republice je tento poměr 135:1. (6)

Karcinom prsu se nevyskytuje před nástupem puberty. Výskyt se výrazně zvyšuje po čtyřicátém roce věku. Žena ve věku padesáti let má riziko vývoje karcinomu prsu 7 – 10%, v šedesátém roce věku je to již 17%. Dle konsensu ze St. Gallen z roku 2005 byl zařazen věk do 35 let mezi nezávislé rizikové faktory. V této věkové skupině se vyskytuje okolo 2% zhoubných nádorů prsu, které mají tendenci k časně diseminaci, nepříznivou biologickou charakteristiku a horší prognózu.

Mnoho studií prokázalo, že ženy s časným nástupem menarche mají zvýšené riziko karcinomu prsu. Nástup pravidelného menstruačního cyklu pro dvanáctiletou dívku znamená dvojnásobné riziko vzniku karcinomu prsu oproti dívce s menarché po patnáctém roce života (7). Ženy s fyziologickým nástupem menopauzy po padesátém pátém roce věku mají dvojnásobné riziko vzniku karcinomu prsu oproti těm s dřívějším nástupem menopauzy. To potvrzuje výsledek studie, kde ženy, které podstoupily oboustrannou ovariální ablacii před čtyřicátým rokem života. Tyto ženy mají o 40 až 50% snížené riziko vzniku karcinomu prsu oproti ženám s nástupem fyziologické menopauzy v padesáti letech. (8)

Pozdní věk prvního porodu zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu. Dle studie Mac Mahoniho mají ženy, které rodily poprvé po třicátém roce věku dvojnásobné riziko vzniku karcinomu prsu oproti ženám, které rodily poprvé před osmnáctým rokem života. Ženy, které rodily, mají 1,4 krát nižší riziko vzniku karcinomu prsu oproti bezdětným (9).

Vliv časných potratů na vznik karcinomu prsu je diskutován a výsledky studií jsou různorodé.

V posledních letech nabývá na významu výskyt karcinomu prsu v těhotenství, který je 1-2 případy na 4000 těhotenství, což představuje 25 – 35 případů ročně v České republice. Rostoucí incidence je dána právě odkladem těhotenství na pozdější věk (10). Laktace je obecně považována za ochranný faktor vzniku karcinomu prsu. Problémem studií zabývajících se laktací je jejich hodnocení, rozdílný design a interpretace výsledků. Dále ve vyspělých zemích je trendem i přes doporučení WHO zkracování doby kojení.

Asi 10% žen má hyperdenzní mléčnou žlázu, která je spojena se čtyřikrát vyšším rizikem vzniku nádoru a denzita mléčné žlázy je tak druhým nejvýznamnějším rizikovým faktorem (11).

Dalším velice diskutovaným rizikovým faktorem je alkohol. Mechanismus účinku zůstává neobjasněn, uvažuje se o několika mechanismech působení alkoholu jako je změna sekrece endogenních estrogenů, porucha v metabolismu folátů, zvýšená permeabilita buněk a přímý efekt látek obsažených v alkoholických nápojích – nitrosaminy. Dalším mechanismem by mohl být vznik volných radikálů při odbourávání alkoholu přímo v prsní tkáni, kde byly nalezeny alkoholdehydrogenázy podobné jaterním (12). Longnecker ve své analýze

uvádí progresivně zvyšující se riziko vzniku karcinomu prsu od abstinence k ženě, která popíjí více jak 3 tvrdé alkoholické nápoje denně. Tato žena má riziko vzniku karcinomu prsu až o 40% vyšší (13). K podobnému výsledku se dostává většina studií zabývajících se tímto vztahem.

Jedním z endogenních faktorů zvýšeného rizika vzniku karcinomu prsu je nadváha. Se vzrůstající hmotností a BMI (Body Mass Index) u postmenopauzální ženy se úměrně zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu. Postmenopauzální žena s BMI nad horní kvartil má o 40% vyšší riziko oproti stejně staré postmenopauzální ženě s normálním BMI (14). Jako příčina je uváděna stimulace prsní tkáně endogenními estrogeny vznikajícími v tukové tkáni. U premenopauzálních žen toto potvrzeno nebylo.

Ženy mají k dispozici hormonální antikoncepci více jak půl století. Hodnocení rizik a benefitů užívání hormonální antikoncepce je samostatným tématem. Důležité je, že v epidemiologických studiích nebylo prokázáno zvýšení incidence karcinomu prsu u uživatelů hormonální antikoncepce. Tyto naopak potvrdily snížení incidence nádorů ovarií a endometria při užívání hormonální antikoncepce.

Z exogenních faktorů nesmí být opomenut vliv ionizačního záření. Bylo zjištěno, že ionizační záření na oblast hrudníku zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu. Riziko stoupá úměrně s dávkou. Zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu je udáváno u radiologů a natěračů pracujících s radiovými barvami. Zvýšené riziko mají také pacienti podstupující ozáření pro primární karcinom prsu, Hodgkinovu nemoc. Běžné diagnostické radiologické metody jako rentgen plic, mamografie riziko vzniku karcinomu prsu zvyšují minimálně, nad čtyřicet let věku téměř vůbec.

Vědci zabývající se vztahem kouření a zvýšeným rizikem karcinomu prsu se nevzdávají, i když tento vztah zůstává stále nejasný a je součástí mnohých diskuzí. V popředí zájmu je v poslední době vliv kouření na modifikaci jednotlivých genů a jejich mutací způsobujících karcinom prsu. Zajímavé budou i výsledky studií zabývajících se zastoupením genových mutací, způsobujících karcinom prsu u žen, jejichž matky v průběhu těhotenství kouřily oproti ženám matek nekuřáček.

3.1 Genetické abnormality

Nádorové bujení je mnohastupňový proces, jehož výsledkem je porucha buněčného cyklu a následný nekontrolovatelný růst. Všechny změny vedoucí k nádorové transformaci jsou způsobeny změnou genetické informace, která je popsána na různé úrovni genomu.

Změny v genomu karcinomu prsu lze rozdělit na dědičné, kam můžeme zařadit mutace genů s vysokou (BRCA1, BRCA2) či nízkou penetrací (ATM, CHEK2) a nedědičné, které vznikají v somatických buňkách v průběhu života nejčastěji vlivem prostředí (chromozomální přestavby, amplifikace HER2-neu, inaktivace tumorsupresorových genů jako TP53).

3.1.1 Výskyt karcinomu prsu v rodině

Pouze 5 až 10% všech karcinomů prsu u žen vzniká v důsledku genetické predispozice (15). 15% pacientek s karcinomem prsu má v anamnéze výskyt nádoru u příbuzného prvního či druhého stupně. Kumulativní životní riziko karcinomu prsu v závislosti na věku a příbuzenském vztahu ukazuje tabulka 2 (16). Dědičná forma onemocnění bývá diagnostikována v mladém věku, postižené mají vysoké riziko vzniku dalšího nádoru prsu či vaječníků.

U 52% žen je možné zjistit mutaci v genu BRCA 1 a u 32% v genu BRCA 2. U 16% pacientek se jedná o dědičný syndrom, způsobený mutacemi jiných genů (s nízkou penetrací), v literatuře také nazývaný familiární polygenní karcinom prsu (17).

Tabulka 2 Kumulativní riziko vzniku karcinomu prsu klientky s výskytem nádoru v rodině dle Elisabethy Clausové

Výskyt nádoru v rodině u	Věk postiženého příbuzného	Kumulativní životní riziko vzniku karcinomu prsu do věku 80 let (%)
1 příbuzný 1. Stupně	pod 50	13- 21
	nad 50	9 – 11
1 příbuzný 2. Stupně	pod 50	10 – 14
	nad 50	8 – 9
2 příbuzní 1. Stupně	pod 50	35 – 48
	nad 50	11 – 24
2 příbuzní 2. Stupně	pod 50	21 – 26
	nad 50	9 – 16

3.1.1.1 Nejčastější syndromy s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu

Níže uvádím shrnující tabulku 3 těchto syndromů s uvedením míry rizika vzniku karcinomu a krátké pojednání o každém z nich (8).

Tabulka 3

	Gen	Lokalizace	riziko vzniku karcinomu prsu	riziko vzniku ostatních nádorů – výčet
Hereditární karcinom prsu a vaječnicků	BRCA1	17q21	56 - 80% životní riziko	vaječníky, tlusté střevo, prostata
Hereditární karcinom prsu a vaječnicků	BRCA2	13q12-13	56 – 80% životní riziko	vaječníky, slinivka břišní, tlusté střevo, prostata, maligní melanom, žaludek, žlučník, žlučové cesty
Li-Fraumenův syndrom	p53	17p13.1	45% v 60 letech	měkké tkáně, mozek, maligní melanom
Cowdenův syndrom	PTEN	10q23	25 - 50% životní riziko	štítná žláza, endometrium
Ataxiateleangiectatica	ATM	11q22.3	nedefinováno	
Retinoblastom	Rb1	13q14	nedefinováno	

3.1.1.1.1 BRCA – 1 (Breast Cancer 1) a BRCA 2 (Breast Cancer 2)

Gen BRCA1 je tumorsupresorový gen kódující protein zasahující do regulace transkripce v procesech reparace DNA, remodelace chromatinu a regulace buněčného cyklu. Je lokalizován na chromozomu 17q12.21 v těsné blízkosti ERBB2 genu. Protein BRCA1 mimo jiné inhibuje estrogenový receptor alfa.

Gen BRCA2 je tumorsupresorový gen lokalizovaný na chromozomu třináct (lokus 13q12.13), kódující protein účastní se reparačních procesů DNA.

Nosičky mutace genu BRCA1 mají celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu až 85% a karcinomu ovaria až 40 - 60% (18). Mutace je přenášena autozomálně dominantně, to znamená 50% riziko přenosu mutace na další generaci. V cílové tkáni dochází poté k mutaci druhé alely, což má za následek rozvoj tumorogeneze. Do dnešního dne bylo popsáno okolo

2000 mutací tohoto genu. Ty se vyskytují v populaci s různou frekvencí a některé jsou charakteristické pro specifickou populaci. Příkladem je židovská populace Ashkenazi, kde se až ve 2 procentech vyskytují specifické zárodečné mutace v genu BRCA1 a to 185delAG a 5382insC (19). Z dalších populačně specifických mutací genu BRCA1 je možno uvést častý výskyt mutací 5382insC, C61G a 3819del5 ve střední a východní Evropě.

V České republice se odhaduje frekvence mutací genů BRCA 1 a BRCA2 na 1:500, kde nejčastěji se jedná o tři mutace, a to C61G (300T>G), 3819del5 a 5382insC (20).

Nádory prsu u pacientek s mutacemi BRCA1 jsou diagnostikovány v průměru deset až patnáct let dříve. Jedná se většinou o špatně diferencované duktální karcinomy, medulární či atypické, s vysokou mitotickou aktivitou, aneuploidií a negativitou estrogenových, progesteronových receptorů a pozitivitou HER-2. Je zjišťována vyšší frekvence mutací p53 a exprese bazálních cytokeratinů. U nositelek mutace genu BRCA2 tato charakteristika nebyla popsána (8).

U nás jsou ke genetickému vyšetření mutací genů BRCA1 a BRCA2 indikovány ženy po splnění následujících podmínek (21). Zdraví příbuzní jsou vyšetřeni až po průkazu mutace.

- vznik nádoru prsu před 35. rokem věku nebo nádoru vaječníků před 40. rokem života
- specifický histologický typ nádoru
- současné onemocnění karcinomem prsu a vaječníků
- oboustranný nádor prsu, první diagnostikován do 40. roku věku
- dva příbuzní prvního stupně s nádorem prsu nebo s nádorem vaječníků, jeden diagnostikovaný ve věku mladším 50 let
- při výskytu tři a více karcinomů prsu a vaječníků u příbuzných prvního a druhého stupně v jedné linii
-

Genetické poradenství, následná klinická péče a psychologická podpora pro ženy s mutací genů BRCA1 a 2 je v České republice koordinována prostřednictvím projektu Eva 35. U prokázaných nosiček mutací genů BRCA1 a BRCA2 je doporučeno zahájit klinické sledování již v 21 letech, do kterého spadá pravidelné vyšetření prsů sonograficky či magnetickou rezonancí, pravidelné gynekologické kontroly včetně vaginální sonografie, odběry nádorových markerů CEA, CA 15-3, CA 125. Dále sem můžeme zařadit provedení preventivní bilaterální adnexektomie a bilaterální mastektomie s následným rekonstrukčním výkonem. Odstranění vaječníků je zaručenou metodou prevence vzniku ovariálního karcinomu a zároveň snižuje riziko vzniku karcinomu prsu o padesát procent. Oboustranná mastektomie snižuje riziko vzniku karcinomu prsu až na 10%.

3.1.1.1.2 Li-Fraumeni syndrom (LFS)

Li-Fraumeni syndrom je autozomálně dominantní onemocnění se zvýšeným výskytem malignit v raném věku. Převládajícím typem malignit jsou sarkomy, nádory CNS, leukémie, adenokarcinom dřeně nadledvin a premenopauzální výskyt karcinomu prsu. Za klinický obraz je v 70% zodpovědná mutace genu TP53, lokus 17.p13.1, 9p21. Ústav biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy spravuje mezinárodní databázi zárodečných mutací v genu TP53 a provádí rozsáhlý výzkum u rizikových rodin s Li-Fraumenovým syndromem (22).

3.1.1.1.3 Cowdenův syndrom

Jedná se o autozomálně dominantní syndrom s incidencí 1:200 000, charakterizovaný výskytem mnohočetných hamartomů. Postižení jedinci mají zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu, štítné žlázy a endometria. Z dalších klinických příznaků do tohoto syndromu spadá makrocefalie a mentální nestabilita. V 80% je za toto onemocnění zodpovědná mutace tumor supresorového genu PTEN 10q23.31 (23).

3.1.1.1.4 Retinoblastom

Maligní onemocnění sítnice manifestující se u dětí do 5 let věku s incidencí 1:15000 až 1:20000. Vznik nádoru je zapříčiněn mutacemi v genu Rb1, lokalizace 13q14, který kóduje tumorsupresorový protein regulující buněčný cyklus. U šedesáti procent pacientů dochází k poškození obou alel až v somatické buňce (sporadická forma), u čtyřiceti procent je mutace předána již v zárodečné buňce (hereditární forma). Nosiči mutace genu Rb1 mají zvýšené riziko výskytu jiných nádorů, nejčastěji jsou citovány osteosarkom a melanom, někteří autoři uvádí i karcinom prsu (24).

3.1.1.1.5 Ataxia teleangiectatica – Syndrom Luis – Barové

Ataxia teleangiectatica je autozomálně recesivní vrozené multiorgánové onemocnění dětského věku charakterizované mozečkovou ataxií, teleangiektasiemi, imunodeficitem, zvýšenou náchylností k infekcím, radiosenzitivitou a častějším vznikem sekundárních malignit jako je karcinom prsu. Obraz onemocnění je zapříčiněn mutací genu ATM 11q23, který kóduje protein z fosfatidylinositol-3-kinázové rodiny. Protein hraje roli v regulaci buněčného cyklu, v udržování integrity genomu a v regulaci apoptózy. Riziko vzniku karcinomu prsu u nosičů této mutace je velice mírně zvýšené oproti normální populaci (25; 26).

Ve snaze o predikci míry rizika vzniku karcinomu prsu byly vytvořeny statistické modely kombinující významnost různých rizikových faktorů, které vznikly na základě sběru dat z celého světa například Gailův nebo Clausův model (27). Gailův model pro českou populaci žen nebyl vhodný, riziko spíše nadhodnocoval, proto byl vypracován v České Republice Pecnův model predikce rizika karcinomu prsu, založený na epidemiologické studii vlivu rizikových faktorů u více jak 14 000 žen. Do českého modelu jsou tyto rizikové faktory: věk, index hmotnosti, věk menarche, věk prvního porodu, počet příbuzných prvního stupně s karcinomem prsu (matka, sestra, dcera), počet biopsií prsu v minulosti, přítomnost atypické duktální hyperplazie v biopsii, počet příbuzných prvního a druhého stupně s jakoukoliv malignitou, zánět prsu v anamnéze, počet všech těhotenství (28). Tento model je volně k dispozici na www.koc.cz.

4 Hodnocení karcinomu prsu dle UICC International Union Against Cancer 2004 - TNM klasifikace (29)

Základem hodnocení rozsahu nádorového šíření je v primární i sekundární diagnostice TNM klasifikace. Pro potřeby této práce byla použita TNM klasifikace z roku 2002, vydaná v české verzi v roce 2004.

4.1 Klinické hodnocení karcinomu prsu dle UICC International Union Against Cancer 2004

Klasifikace se používá pouze pro karcinomy a týká se jak mužského, tak ženského prsu. V případě vícečetných současně se vyskytujících primárních nádorů v jednom prsu se pro klasifikaci použije nádor s nejvyšší kategorií T. Současně se vyskytující oboustranné nádory prsu jsou klasifikovány samostatně.

4.1.1 Anatomické sublokalizace dělení nádorů prsu

Anatomická sublokalizace by měla být uvedena, i když se na ni nebere při klasifikaci zřetel. Bradavka (C 50.0)

Centrální část (C 50.1)

Horní vnitřní kvadrant (C 50.2)

Dolní vnitřní kvadrant (C 50.3)

Horní zevní kvadrant (C 50.4)

Dolní zevní kvadrant (C 50.5)

Axilární výběžek (C 50.6)

4.1.2 Primární nádor (T):

TX primární nádor nelze posoudit

T0 bez známek primárního nádoru

Tis karcinom in situ

Tis (DCIS) duktální karcinom in situ

Tis (LCIS) lobulární karcinom in situ

Tis (Paget) Pagetova choroba bradavky bez nádoru

Pagetova choroba bradavky spojená s nádorem se klasifikuje podle velikosti nádoru

T1 nádor 2 cm nebo méně v největším rozměru

T1mic - mikroinvaze 0,1 cm nebo méně v největším rozměru – šíření nádorových buněk přes bazální membránu do okolních tkání. Jeli více ložisek mikroinvaze, použije se velikost největšího z nich. Součet se nepoužívá.

T1a od 0,1 cm do 0,5 cm v největším rozměru

T1b 0,5 - 1,0 cm v největším rozměru

T1c 1 cm - 2 cm v největším rozměru

T2 více než 2 cm a méně než 5 cm v největším rozměru

T3 více než 5 cm v největším rozměru

T4 nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením do stěny hrudní nebo pouze do kůže

T4a šíření na stěnu hrudní (žebra, interkostální svaly, mutulus stratus anterior)

T4b edém včetně peau d'orange nebo ulcerace kůže prsu nebo satelitní uzly v kůži téhož prsu

- T4c kritéria 4a a 4b dohromady
T4d inflamatorní karcinom

4.1.3 Regionální mízní uzliny (N):

- NX regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0 v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1 metastázy v pohyblivé stejnostranné axilární mízní uzlině (uzlinách)
N2 metastázy ve fixované stejnostranné axilární mízní uzlině/ách, nebo klinicky zřejmá stejnostranná vnitřní mamární uzlina/ny, bez klinicky evidentních metastáz v axilárních mízních uzlinách
N2a metastázy v axilárních mízních uzlinách, fixovaných navzájem nebo k jiným strukturám
N2b metastázy pouze v klinicky zřejmých vnitřních mamárních mízních uzlinách, bez klinicky evidentních metastáz v axilárních mízních uzlinách
N3 metastázy ve stejnostranných mízních infraklavikulárních uzlinách/ně s nebo bez postižení axilárních mízních uzlin, nebo klinicky zřejmé ve stejnostranné vnitřní mamární uzlině/nách s přítomností klinicky evidentních metastáz v axilárních mízních uzlinách, nebo metastázy ve stejnostranné supraklavikulární mízní uzlině/nách, s nebo bez postižení axilárních nebo vnitřních mamárních mízních uzlin
N3a metastázy v infraklavikulární mízní uzlině/nách
N3b metastázy ve vnitřních mamárních a axilárních uzlinách
N3c metastázy v supraklavikulární mízní uzlině/nách

Regionálními mízními uzlinami jsou:

Stejnostranné axilární uzliny

Interpektorální Rotterovy uzliny a uzliny podél vena axillaris a podél jejich přítoků, které mohou být rozděleny do následujících etáží:

- etáž (dolní axila): mízní uzliny laterálně od zevního okraje m.pectoralis minor
- etáž (střední axila): mízní uzliny mezi vnitřním a zevním okrajem m. pectoralis minor a mízní uzliny interpektorální (Rotterovy)
- etáž (vrchol axily): mízní uzliny mediálně od vnitřního okraje m.pectoralis minor, vyjma uzlin subklavikulárních nebo infaklavikulárních.

Infraklavikulární (stejnostranné)

Vnitřní mamární (stejnostranné)

Supraklavikulární (stejnostranné)

Všechny ostatní metastázy v mízních uzlinách se klasifikují jako vzdálené metastázy (M1), včetně mízních uzlin supraklavikulárních, krčních, nebo druhostranných vnitřních mamárních uzlin.

4.1.4 Vzdálené metastázy (M):

- MX nelze posoudit
M0 nejsou vzdálené metastázy
M1 vzdálené metastázy

4.1.5 Rozdělení do stadií

Stádium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1včetně T1 mic	N0	M0
Stadium IIA	T0	N1	M0
	T1včetně T1mic	N1	M0
Stadium IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Stadium IIIC	jakékoliv T	N3	M0
Stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

4.2 Patologické hodnocení karcinomu prsu dle UICC International Union Against Cancer 2004 (29)**4.2.1 Primární nádor (pT)**

Patologická klasifikace vyžaduje vyšetření primárního nádoru bez makroskopického nádoru v okrajích resekátu. Kategorie pT odpovídají kategoriím T (viz níže) Případ může být klasifikován, je-li nádor v okrajích resekátu pouze mikroskopicky.

4.2.2 Regionální mízní uzliny (pN)

Patologická klasifikace vyžaduje resekci a histologické vyšetření alespoň dolních axilárních uzlin. Taková resekce má standardně zahrnovat 6 a více mízních uzlin. Jsou-li mízní uzliny negativní, ale nebylo dosaženo standardně vyšetřovaného počtu, klasifikuje se jako pN0. Nově je možno použít vyšetření jedné nebo více sentinelových uzlin. Je-li klasifikace založena pouze na biopsii sentinelové uzliny bez následné direkce axilárních mízních uzlin, mělo by se použít označení pro sentinelovou mízní uzlinu (sn).

pNX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
pN0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
pN1mi	mikrometastázy (větší než 0,2 mm, ne však větší než 2 mm v největším rozměru)
pN1	metastázy v 1-3 stejnostranných axilárních mízních uzlinách a/nebo ve stejnostranných vnitřních mamárních mízních uzlinách s mikroskopickými metastázami detekovaným při direkci sentinelové mízní uzliny, avšak klinicky neprůkazné. (nezjištěné klinicky nebo zobrazovacími vyšetřovacími metodami, vyjma lymfografie)
pN1a	metastázy v 1-3 axilárních uzlinách, z nichž alespoň jedna je větší než 2 mm v největším rozměru
pN1b	vnitřní mamární mízní uzliny s mikrometastázami detekovanými při disekci sentinelové mízní uzliny, avšak klinicky neprůkazné

- pN1c metastázy v 1-3 mízních uzlinách, s mikrometastázami detekovanými při disekci sentinelové mízní uzliny, avšak klinicky neprůkazné
- pN2 metastázy ve 4–9 stejnostranných axilárních mízních uzlinách, nebo v klinicky zjevných (zjištěné klinicky, zobrazovacími metodami vyjma lymfografie nebo makroskopicky viditelná patologie) stejnostranných vnitřních mamárních mízních uzlinách, bez metastáz v axilárních mízních uzlinách
- pN2a metastázy v 4–9 axilárních mízních uzlinách, z nichž alespoň jedna je větší než 2 mm
- pN2b metastázy v klinicky zjevné vnitřní mamární mízní uzlině/ách, při nepřítomnosti metastáz v axilárních mízních uzlinách
- pN3 metastázy v 10 a více stejnostranných axilárních uzlinách, nebo podklíčkových mízních uzlinách nebo v klinicky zjevných stejnostranných vnitřních mamárních uzlinách s přítomností jedné či více pozitivních axilárních mízních uzlin, nebo metastázy ve více než 3 axilárních mízních uzlinách, s klinicky negativními, mikroskopickými metastázami ve vnitřních mamárních mízních uzlinách, nebo metastázy ve stejnostranných nadklíčkových mízních uzlinách
- pN3a metastázy v 10 a více axilárních mízních uzlinách (alespoň jedna je větší než 2 mm) nebo metastázy v podklíčkových mízních uzlinách
- pN3b metastázy v klinicky zjevné vnitřní mamární uzlině/ách s přítomností pozitivní axilární mízní uzliny, nebo metastázy ve více než 3 axilárních mízních uzlinách a mikrometastázy ve vnitřních mamárních uzlinách zjištěných disekcí sentinelové uzliny, avšak klinicky neprůkazné
- pN3c metastázy v nadklíčkové mízní uzlině/ách

4.2.3 Vzdálené metastázy (pM)

Kategorie pM odpovídají kategoriím M.

4.2.4 Reziduální nádor (R)

Tato klasifikace slouží k určení přítomnosti či nepřítomnosti reziduálního nádoru po primární léčbě.

- RX přítomnost reziduálního onemocnění nelze hodnotit
- R0 bez reziduálního nádoru
- R1 mikroskopický reziduální nádor
- R2 makroskopický reziduální nádor

5 Patologická klasifikace karcinomů prsu dle WHO

Patologické dělení a hodnocení benigních a maligních lézí prsu prochází dramatickými změnami ruku v ruce se zaváděním molekulárních diagnostických metod a se zvyšujícím se poznáním biologické povahy jednotlivých lézí. Ke klasifikaci nádorů prsu se používá klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) publikované v roce 2003.

Níže uvádím úplný seznam této klasifikace a popis nejčastějších lézí prsu společně s jejich charakteristikou. U nejčastějších karcinomů i benigních lézí je uveden vztah histologického typu a prognózy. Zpracováno podle pramenů odpovídajících citacím (30; 3; 31).

5.1 Invazivní karcinom prsu

5.1.1 Invazivní duktální karcinom prsu NOS (Not Otherwise Specified)

Invazivní duktální karcinom NOS představuje nejčastější variantu invazivního karcinomu prsu. Představuje 70% všech případů. Postihuje dospělé ženy v každém věku, s maximem incidence mezi padesátým a šedesátým rokem věku. Vyskytuje se ve všech kvadrantech, může být multicentrický i bilaterální. Metastazuje do kostí, gastrointestinálního traktu, mozku, orgánů vnitřního genitálu.

Jedná se o heterogenní skupinu blíže nespecifikovaných karcinomů, tvořící velice variabilní histologický obraz.

Mikroskopický obraz jej rozděluje na pět typů: smíšený, pleomorfní, s vícejadernými buňkami typu osteoklastů, s rysy choriokarcinomu a s melanotickými rysy (31). Od invazivního lobulárního karcinomu se liší expresí E-cadherinu zodpovědného za intercelulární soudružnost duktálních struktur (32). Naproti tomu analýzy genové exprese ukazují na minimální rozdíl mezi duktálním a lobulárním invazivním karcinomem. Blíže je dělení na základě genového expresního profilu popsáno v kapitole 7.

Prognóza duktálního karcinomu závisí na mnoha faktorech, kterými se zabývá hlavní část této práce. V případě popisovaných prognostických faktorů karcinomu prsu kromě histologického typu je myšlen duktální invazivní karcinom NOS. Více je uvedeno v kapitole 11.

5.1.2 Invazivní lobulární karcinom

Invazivní lobulární karcinom tvoří 5 až 10%, dle některých zdrojů i až 20% všech invazivních karcinomů. Invazivní lobulární karcinom tvoří nehmotné léze, klinicky se neprojevuje. Je charakterizovaný přítomností jednobuněčných nekohezivních pruhů nádorových buněk ve fibrózním stromatu často s elastózou (31). Diskoheze odpovídá absenci E-cadherinu (33). Dle mikroskopického nálezu bylo popsáno několik variant: klasická, solidní, alveolární, tubulolobulární a pleomorfní.

Vyskytuje se ve všech kvadrantech, může být multicentrický i bilaterální má méně často metastázy v uzlinách axily (3 – 10%) než invazivní duktální karcinom. Častěji metastazuje do kostí, gastrointestinálního traktu, orgánů vnitřního genitálu. Exprese hormonálních receptorů se pohybuje od 100% (klasická forma) do 10% (pleomorfní varianta).

Ve vztahu k prognóze jsou výsledky studií rozporuplné ve srovnání s duktálním invazivním karcinomem, což odpovídá podobnému genovému expresnímu profilu. Při srovnávání jednotlivých variant lobulárního karcinomu má nejhorší prognózu varianta pleomorfní.

5.1.3 Tubulární karcinom

Tubulární karcinom je charakteristický dobře diferencovanými buňkami uspořádanými do tubulárních struktur, které jsou vystlané typicky jednořadým epitelem s nízkou mitotickou aktivitou a malou polymorfií (31). WHO doporučuje jeho určení, pokud tubulární buňky

tvoří devadesát a více procent nádoru. Tvoří okolo 2% všech invazivních nádorů prsu, jejich počet se zvyšuje až na sedm procent u nádorů menších než jeden centimetr. Často doprovází low - grade duktální in situ nebo lobulární in situ karcinom. Je nutné jej odlišit od benigních lézí (34). Bývá malý, vyskytuje se u starších nemocných. Klinicky bývá němý. Při zobrazení mamografií tvoří charakteristické spikulární útvary, často s mikrokalcifikacemi. Do mízních uzlin metastazuje v 10%. Téměř vždy bývá estrogen a progesteron pozitivní, HER-2 a EGFR negativní.

Čistý tubulární karcinom má vynikající prognózu s přežitím nelišícím se od zdravých žen, návratnost nemoci po mastektomii či konzervativním výkonu je velice vzácná.

Prognóza smíšeného tumoru je horší oproti čistému tubulárnímu karcinomu.

5.1.4 Invazivní kribriformní karcinom

Tvoří okolo tří procent (0,8 až 3,5%) všech invazivních karcinomů. V 20% se vyskytuje multifokálně. Invazivní kribriformní karcinom je dobře diferencovanou formou invazivního duktálního karcinomu tvořený kribriformní síťovitou strukturou v desmoplastickém stromatu (31). Může obsahovat méně než 50% tubulárního karcinomu. Biologická povaha je podobná tubulárnímu invazivnímu karcinomu.

Klasický typ má výbornou prognózu s desetiletým přežitím od 90 do 100%.

5.1.5 Medulární karcinom

Tvoří okolo 5% všech nádorů prsu (1 až 7%). Klinicky bývá dobře ohraničený a měkký na pohmat, velikosti 2 až 3 cm. Mamograficky může být zaměněn za benigní lézi. Histologicky se jedná o nádor ze špatně diferencovaných buněk ve velkých shlucích, bez žlázových struktur, s nedostatkem stromatu s nápadnou lymfoplasmocytární složkou (31).

5.1.6 Mucin produkující karcinomy

Jedná se o skupinu karcinomů s dobrou prognózou. Vyskytují se nejčastěji po šedesátém roce věku. Histologicky jsou charakterizovány produkcí extracelulárního mucinu. Klinicky se jedná o dobře rozpoznatelné měkké želatinózní rezistence, které jsou mamograficky dobře vyšetřitelné.

Jedná se o nádory s velice dobrou prognózou, u kterých se desetileté přežití pohybuje mezi 80 až 100%.

5.1.7 Neuroendokrinní karcinomy

5.1.8 Invazivní papilární karcinom

Invazivní papilární karcinom je vzácný, tvoří jedno procento ze všech invazivních karcinomů. Diagnostikován bývá více u bělošek a v postmenopauze. Klinicky se projevuje stejně jako blíže nespecifikované nádory. Histologicky je charakterizovaný papilárními intraduktálními a intracystickými strukturami. Může metastazovat do mízních uzlin.

Prognóza je příznivá.

5.1.9 Invazivní mikropapilární karcinom

5.1.10 Apokrinní karcinom

Prognóza apokrinního karcinomu ve srovnání s duktálním blíže nespecifikovaným invazivním karcinomem se neliší.

5.1.11 Metaplastický karcinom

Metaplastický karcinom zahrnuje heterogenní skupinu nádorů, které jsou charakterizované směsí adenokarcinomu s oblastmi vřetenobuněčné, dlaždicové a/nebo mezenchymální

diferenciace. Metaplastický vřetenobuněčný karcinom se může vyskytovat v čisté formě bez příměsi adenokarcinomu.

Jedná se o nádory se špatnou prognózou a lokální agresivitou. Velikost nádoru v době incize je hlavním prediktorem přežití.

5.1.12 Karcinom bohatý na lipidy

Karcinom bohatý na lipidy je nádor histologicky definovaný přítomností cytoplazmatického tuku v 90% nádorových buněk. Vyskytuje se u mužů i žen, ve všech věkových kategoriích. Jeho velikost se pohybuje od 1 do 15cm, jako dobře palpovatelná léze. Prognóza nebyla spolehlivě určena vzhledem k vzácnosti nádoru.

5.1.13 Sekretorický karcinom

Sekretorický karcinom je velice vzácný (0,15%) s nízkou diferenciací buněk, tubulárním a mikrocystickými strukturami. Vyskytuje se u žen, dětí i mužů.

V dětství má dobrou prognózu, která se s věkem zhoršuje.

5.1.14 Onkocytický karcinom

Onkocytický karcinom je velice vzácný. Histologicky je definovaný onkocytární buňkou, která je vyplněna z 60% mitochondriemi.

5.1.15 Adenoidně cystický karcinom ACC

Adenoidně cystický karcinom tvoří 0,1% všech karcinomů prsu. Jedná se o nádor nízké agresivity.

5.1.16 Acinocelulární - Acinický karcinom ACCA

5.1.17 Na glykogen bohatý světlobuněčný karcinom

5.1.18 Sebaceózní karcinom

5.1.19 Inflamatorní karcinom

Inflamatorní karcinom tvoří 1 až 10% všech karcinomů prsu. Klinicky je charakterizovaný difúzním erytémem, edémem, pomerančovou kůží a induracemi.

Prognóza inflamatorního karcinomu je velice špatná. Pětileté přežití je po radikálním chirurgickém výkonu pod pět procent, systémová chemoterapie přežití zvyšuje z 25 na 50%.

5.1.20 Bilaterální karcinom prsu

Bilaterální karcinom prsu je definovaný synchronně vzniklým karcinomem prsu v průběhu dvou měsíců od diagnostiky primárního nádoru. U 0,5 až 1% žen léčených pro karcinom prsu se vyvine nádor v druhém prsu. Ženy s karcinomem prsu v anamnéze a s diagnostikovaným primárním karcinomem v mladém věku mají riziko vzniku kontralaterálního tumoru větší než ostatní ženy s karcinomem prsu.

Ženy s bilaterálním karcinomem prsu mají horší prognózu než ty s unilaterálním. Druhostranný karcinom prsu se vyskytuje v ranějším věku a bývá lobulární.

5.2 Prekurzorové léze

Mezi prekurzorové léze jsou zařazeny: lobulární neoplazie – lobulární karcinom in situ (LCIS), intraduktální proliferativní léze – duktální karcinom in situ (DCIS), mikroinvazivní karcinom a intraduktální papilární neoplazie.

5.2.1 Intraduktální proliferativní léze

Mezi intraduktální proliferativní léze patří obvyklá duktální hyperplasie, plochá epiteliální atypie, atypická duktální hyperplasie a duktální karcinom in situ.

5.2.2 Duktální karcinom in situ (DCIS)

Duktální karcinom in situ vzniká z epitelu ductů a nepřekračuje bazální membránu. Je schopen šířit se systémem prsních vývodů. Po zavedení mamografického skríninku vzrostla detekce DCIS z pěti až na třicet procent všech diagnostikovaných nádorů ženského prsu. Padesát procent všech nádorů diagnostikovaných mamograficky je DCIS. V čase progreduje do invazivního duktálního karcinomu.

5.2.3 Lobulární karcinom in situ (LCIS)

Lobulární karcinom in situ bývá diagnostikován z biopsií provedených z jiných příčin, klinicky bývá němý. Může tvořit mikrokalcifikace. Je lokalizován v terminální duktulolobulární jednotce a charakterizován monomorfními malými buňkami vyplňujícími aciny. U neléčených nemocných dojde k rozvoji invazivního karcinomu v průběhu dvaceti let ve 25-35%.

5.2.4 Mikroinvazivní karcinom

5.3 Benigní epiteliální léze – adenóza, adenom

Většina prsních adenóz není spojena s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu. U mikroglandulární adenózy je popisován maligní zvrát v jedné třetině případů a o apokrinní adenóze je uvažováno jako o prekanceróze.

Všechny adenomy mléčné žlázy jsou benigní, po excizi nerecidivují a nadochází k malignizaci.

5.4 Myoepiteliální léze

Jedná se o léze s převahou myoepiteliálních buněk. Do této skupiny patří myoepiteliální adenóza, adenomyoepiteliální adenóza, benigní myoepiteliom, maligní myoepiteliom, myoepiteliální karcinom, adenoidně cystický karcinom, pleomorfní adenom. Jedná se o nález každého věku dospělé ženy, kromě myoepiteliální adenózy. Klinicky se projevují jako palpovatelná léze, mamograficky dobře vyšetřitelná.

5.5 Mezenchymální nádory

Mezenchymální benigní i maligní nádory prsu jsou shodné s nádory vznikajícími z měkkých tkání. Do této kategorie patří hemangiom, angiomatóza, hemangiopericytom, pseudoangiomatózní stromální hyperplasie, myofibroblastom, fibromatóza, inflamatorní myofibroblastický tumor, lipom, tumor z granulárních buněk, schwanom, neurinom a sarkomy (angiosarkom, liposarkom, chondrosarkom, rabdomyosarkom, leiomyosarkom, alveolární-pleomorfní sarkom).

Z mezenchymálních nádorů mají nejhorší prognózu sarkomy.

5.5.1 Angiosarkom

Angiosarkom G1 má pravděpodobnost pětiletého přežití 91%, desetiletého 81%, angiosarkom G2 má pravděpodobnost pětiletého i desetiletého přežití 68%. Pravděpodobnost přežití u vysoce dediferencovaných angiosarkomů G3 je 31% ve dvou letech a 15% v pěti a deseti letech od stanovení diagnózy (30). Metastazuje vzdáleně do plic, kostí a jater, velice zřídka do axilárních lymfatických uzlin. Chemoterapie i radioterapie jsou bez efektu.

5.5.2 Liposarkom

Liposarkom je velice agresivní nádor, nemocné umírají do roka po stanovení diagnózy, návratnost nemoci je velice brzká. Metastazuje vzdáleně, do lymfatických uzlin zřídka.

5.5.3 Osteosarkom

Osteosarkom je nádor s pravděpodobností pětiletého přežití okolo 38%. Pravděpodobnost návratnosti po provedené excizi je 66%, po provedené mastektomii 11%. Metastazuje do plic. Většina nemocných při rozvoji vzdálených metastáz umírá do dvou let.

5.6 Fibroepiteliální nádory

5.6.1 Fibroadenom

Fibroadenom je nejčastějším (0,3 - 1% všech primárních nádorů prsu) benigním nádorem u žen, častěji se vyskytuje kolem třicátého roku života ženy. Klinicky se u mladých žen projevuje jako palpovatelná, opouzdřená, volně pohyblivá, dobře ohraničená léze, velikosti od 1 do 15 cm, nejčastěji 2 až 4 cm. U starších žen je diagnostikován mamograficky. Lokalizován bývá nejčastěji v horním zevním kvadrantu prsu, může být mnohočetný i oboustranný. Malignizuje vzácně. Mikroskopicky jej charakterizuje myxoidní celulární stroma s cystickými a žlázovými strukturami ohraničenými epitelem.

Přítomnost fibroadenomu je spojena s mírně vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu, které se zvyšuje s fibrocystickými změnami nebo s familiárním výskytem karcinomu prsu.

5.6.2 Fyloidní tumor

Fyloidní tumor, dříve označovaný jako cystosarcoma phyllodes, je rychle rostoucí smíšený nádor vznikající z intralobulárního stromatu. Vyskytuje se v jakémkoliv věku s maximem v šesté dekádě. Jedná se většinou o low grade nádory, která zřídka metastazují. High grade varianta je vzácná, agresivní s časnou lokální rekurencí a zakládáním vzdálených metastáz asi v 30%. Na základě histologické charakteristiky se dělí na fyloidní tumor benigní, maligní, borderline a periduktální stromální sarkom, low grade.

5.7 Tumory prsní bradavky

Mezi tumory prsní bradavky patří adenom, syringomatózní adenom a Pagetův karcinom.

5.7.1 Pagetův karcinom

Jedná se o sekundární změnu kůže bradavky vypadající jako ekzematické ložisko, často s krvavou sekrecí. Primárně jde o formu šíření duktálního karcinomu in situ nebo invazivního karcinomu. Prognóza se určuje podle primárního nádoru.

5.8 Maligní lymfom a metastatické nádory

Do prsu nejčastěji metastazují nádory střev, močového měchýře, prostaty, melanom, rhabdomyosarkom, nádory plic, ovárií, ledvin, štítné žlázy a maligní lymfom.

5.9 Nádory mužského prsu

Nádory mužského prsu jsou samostatnou jednotkou. Do této skupiny je zařazena gynecomastie a karcinom mužského typu.

5.9.1 Gynekomastie

Gynekomastie je nejčastější onemocnění mužského prsu. Fyziologicky se vyskytuje po narození chlapce, jako důsledek působení estrogenů od matky. V dospělosti vzniká sekundárně při patologickém hyperestronismu například u nemocných s jaterní cirhózou, s chronickým renálním selháváním. Dále vzniká jako vedlejší účinek některých léků jako jsou androgeny a antidepresiva.

5.9.2 Karcinom mužského prsu

Jedná se o velice vzácný nádor se vzrůstající incidencí, častěji se vyskytuje u černocho, indiánů a Japonců, mužů s Klinefelterovým syndromem, mužů s chronickou orchitidou. Nosiči mutace BRCA1 a BRCA2 mají vyšší riziko jeho vzniku. Nejčastěji se jedná o duktální invazivní karcinom či papilokarcinom, lobulární varianta je velice vzácná. Prognóza je stejná jako u karcinomu stejného typu u ženy.

6 Histopatologický grading (stupeň diferenciacie nádorových buněk)

Zlatým standardem gradingu karcinomu prsu je klasifikace Blooma a Richardsona z roku 1957 (35), její modifikace podle Elstona a Ellise z roku 1991 je označována jako tzv. Nottinghamská klasifikace (36) a doporučena UICC k určování gradingu. Tato klasifikace se opírá o tři základní kritéria: tvorba tubulů, počet mitóz a jaderné polymorfie. Dle těchto morfologických parametrů je vzorku nádoru prsu přiřazen určitý počet bodů, podle jehož celkového součtu dojde k určení stupně diferenciacie.

Tabulka 4 Nottinghamská klasifikace a její kritéria (36)

Kriterium	Popis	Počet bodů
	Velké množství tubulů více než 75%	1
Tvorba tubulů	Střední množství tubulů 10 – 75%	2
	Málo nebo žádné tubuly méně než 10%	3
Jaderná polymorfie	Malá a pravidelná jádra	1
	Středně velká a mírně polymorfní jádra	2
	Výrazně polymorfní jádra	3
Počet mitóz	0 – 3	1
	4 – 6	2
	Více jak 6	3
Grade		
Grade 1		3 – 5
Grade 2		6 – 7
Grade 3		8-9

7 Molekulární klasifikace nádorů prsu na základě genového expresního modelu

V roce 2000 Perou uveřejnil v časopise Nature článek: „Molekulární portréty nádorů prsu“, kde publikoval rozdíly v genové expresi (8 102 genů) mezi jednotlivými typy nádorů prsu, byl zahájen celosvětový výzkum k ověření těchto dat. Perou ukázal, že fenotypové rozdíly nádorů prsu korespondují s jejich odlišností i v genové expresi. Vybral podmnožinu 456 genů, jejichž exprese byla významně vyšší mezi různými typy nádorů, než mezi vzorky stejného typu nádoru a určil čtyři molekulární typy nádorů prsu: estrogen receptor pozitivní/luminální, basaloidní, ERBB2 pozitivní a normální. Luminální dále rozdělil na typ A a B (37). Toto bylo a je nadále ověřováno množstvím studií.

Původní rozdělení karcinomů prsu na základě genového expresního modelu do čtyř skupin ve vztahu k jeho vlastnostem můžeme popsat takto (38):

- s luminální diferenciací A: ER/PR+, HER-2-. Tyto nádory vykazují nízkou proliferativní aktivitu, nízký grade a téměř nerecidivují
- s luminální diferenciací B: ER/PR+, HER-2+ Nádory jsou hůře diferencované, mají vyšší proliferativní aktivitu a recidivují častěji
- HER2 neu pozitivní: ER-/PR-, HER-2+
- triplenegativní neboli basal-like: ER-/PR-, HER-2- Nádory jsou agresivní, s častým metastazováním predilekčně do plic, mozku a jater, častěji se vyskytují u nosiček BRCA1, v mladším věku, často s mutací TP53

Nutno podotknout, že v roce 2007 byl na základě dalších studií popsán pátý typ karcinomu prsu na základě genového expresního modelu a to claudin-low. Tento typ je triple negativní a navíc vykazuje nízkou expresi claudinu 3, 4, 7 a E-cadherinu. Nádor vykazuje vlastnosti kmenových buněk. Další informace jsou ověřovány. V klinické praxi je claudin-low nádor zahrnován do kategorie triplenegativních nádorů.

Výše uvedené dělení se již dostalo do klinické praxe v České republice a to doporučením pro systémovou léčbu karcinomu prsu ČOS pro rok 2012, která reflektovala doporučení ze St. Gallen z roku 2011 (39).

8 Diagnostika

8.1 Primární diagnostika

Základem primární diagnostiky prsu je podrobná anamnéza se zaměřením na výskyt nádorového onemocnění v rodině a ostatní rizikové faktory, které byly popsány výše.

Klinické vyšetření prsů provádí v rámci primární i sekundární prevence gynekolog. V průběhu vyšetření je nutné si všimnout změn prsu, nesymetričností, zarudnutí a pigmentových změn, vtahování kůže či rozšířených žilních pletení, sekrece. Nesmí být opomenuto vyšetření spádových lymfatických uzlin. Samovyšetřování prsu je dobrým doplňkovým vyšetřením, které předchází vzniku intervalových karcinomů. Provádí se vždy sedmý až desátý den menstruačního cyklu, v klidu před zrcadlem. Důležitá je pravidelnost provádění. Při zjištění jakékoliv klinické známky onemocnění je indikováno zobrazovací vyšetření. Klinické známky onemocnění prsu jsou: asymetrie ze zvětšeného objemu, vážnutí při souhybu, vtahování kůže, důlkování, pomerančová kůže, zarudnutí a oteplení kůže, rozšířené žilní pleteně, sekrece z bradavky či její vtahování, oploštění.

Mamografie je dominantní metodou v diagnostice nemocí prsu jako celku. Odlišena musí být mamografie diagnostická a screeningová. Výťažnost mamografie pro diagnózu zhoubných nádorů ve spojení s klinickým vyšetřením je až 90%. Jako jediná je schopna zachytit mikrokalciфикации.

Indikace k provedení diagnostické mamografie jsou: podezření na patologickou formaci u žen ve věku 30 až 35 let věku, ve stejném případě při nejednoznačnosti sonografického vyšetření, klinicky jasný karcinom prsu před zahájením léčby pro vyloučení multifokality a bilaterality procesu, před plastickou operací prsů, před zahájením a v průběhu hormonální léčby jednou za dva roky. Mamografii hodnotí radiodiagnostik, ke sjednocení závěrů se používá diagnostických schémat a to Tabárova typologie prsu a systém hodnocení BI-RADS.

TABÁROVA TYPOLOGIE PRSU

Typ I	vroubkovaná kontura žlázového tělesa, dobře zobrazená Cooperova ligamenta a rovnoměrně rozptýlené 1 – 2 mm velké nodulární denzity.
Typ II	kompletní involuce mléčné žlázy, převažující transparentní tuk. Bez modulárních stínů.
Typ III	parenchym zabírá méně než 25% objemu prsu, kombinace prominujících ductů a involuce.
Typ IV	v rozsahu celého prsu jsou nápadné nodulární a lineární stíny.
Typ V	homogenní denzní stín žlázy s hladkou konvexní konturou, fibróza.

SYSTÉM HODNOCENÍ BI-RADS.

Kategorie 0: potřeba dalšího vyšetření

Kategorie 1: normální nález bez potřeby dalšího vyšetření

Kategorie 2: benigní nález – jednoznačně benigní typ ložiska – benigní kalcifikace ve FA, dystrofické kalcifikace, olejová cysta, lipom

Kategorie 3: pravděpodobně benigní léze – doporučuje se mamografie, popřípadě doplňující snímky za 6 měsíců, sonografie dle uvážení diagnostika

Kategorie 4: podezřelý nález – podezřelá abnormita, doporučuje se core - cut biopsie

Kategorie 5: maligní charakter nálezu z mamografického i následného sonografického nálezu, doporučení vyšetření – biopsie – individuálně plánování operace či terapie

Mamografický screening je pravidelné vyšetřování prsů asymptomatických žen s cílem zachytit onemocnění v nejčasnějším stadiu. V České republice byl zahájen v roce 2002. Jeho pravidla jsou dána vyhláškou Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 372/2002 Sb., kterou se mění vyhláška MZ ČR č. 56/1997 Sb., kterou se stanoví obsah a časové rozmezí preventivních prohlídek, a doporučený standard, který byl uveřejněn ve Věstníku MZ ČR (částka 11/2002, aktualizovaná verze v částce 02/2007). Metodika sběru dat je průběžně aktualizována. V současné době se vyšetření provádí na specializovaných pracovištích určených Komisí pro screening nádorů prsu ministerstva zdravotnictví, Komisí odborníků pro mamární diagnostiku Radiologické společnosti ČLS JEP a Sdružením nestátních ambulantních radiologů. Je hrazeno z veřejného zdravotního pojištění. Toto preventivní vyšetření se provádí na doporučení praktického lékaře či gynekologa ve dvouletých intervalech od 45. do 69. roku věku ženy. Může být doporučeno psychiatrem pro těžkou kancerofobii. Vyšetření je také prováděno z důvodů vysokého rizika vzniku karcinomu prsu v následujících případech:

- výskyt alespoň jednoho případu karcinomu prsu u příbuzných v první linii
- prokázána mutace genů BRCA 1, BRCA 2
- na doporučení pracoviště nádorové genetiky na základě jiných specifických vyšetření

Mimo tato kritéria je vyšetření možné provádět u žen nad 40 let věku, jednou ročně s podmínkou finanční účasti klientky.

Sběr dat zajišťuje nezávislý institut biostatistiky a analýz Lékařské a Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity IBA (www.iba.muni.cz). Tento institut v roce 2007 uveřejnil oficiální výsledky, které potvrzují úspěšnost tohoto programu. Ve zkratce došlo v roce 2007 k nárůstu provedených vyšetření o 38%, počet diagnostikovaných karcinomů vzrostl o 59%, detekční míra se zvýšila ze 4,6 v roce 2006 na 5,3 nově diagnostikovaných případů na 1 000 vyšetření. 73% diagnostikovaných nádorů bylo ve stádiu Tis a T1. Celkem bylo v letech 2002 až 2007 provedeno 1 611 582 vyšetření a nádor prsu byl diagnostikován u 7385 žen (40). Se zavedením mamografického screeningu nabývá na významu mamografická stereotaxe, která slouží k přesnému určení lokalizace nehmátné léze prsu. Ložisko je možné označit pomocí barviva či drátěných vodičů. Stereotakticky je prováděna i aspirační biopsie k určení histologického nálezu.

Galaktoskopie (duktografie) je kontrastní modifikací mamografie. Používá se k odhalení intraduktálních nádorů a k jejich odlišení od benigních nádorů na duktech. Indikací k provedení je patologická sekrece z prsu, většinou jednostranná, bez souvislosti s kojením. Relativní kontraindikací je alergie na jodovou kontrastní látku. Absolutní kontraindikací je akutní mastitis. Tato metoda má velké množství falešně pozitivních výsledků. Obdobou je pneumocystografie, která se již téměř neprovádí. Sloužila k vyšetření cyst, kde kontrast zajišťoval insuflovaný vzduch.

Postavení sonografie prsu v algoritmu vyšetření je různé. Nejčastěji je užíváno k doplnění či zpřesnění mamografického nálezu, či jako metoda první volby při klinicky jasně hmatných lézích k určení jejich povahy či k odebrání vzorku. Je vhodným diagnostickým vyšetřením prsní žlázy mladých žen. Indikacemi k provedení sonografie jsou: podezření na patologii v prsu u žen mladších 30 let, těhotných, kojících, nejednoznačný mamografický

nález – denzní typ žlázy Tabár IV, V, rozdíl mezi klinickým a mamografickým vyšetřením, pokus o zpřesnění povahy léze zjištěné při mamografii, kontrolní vyšetření prsu v průběhu ozařování, chemoterapie a hormonální léčby, vyšetření jizvy po mastektomii či parciálním výkonu k vyloučení recidivy, vyšetření axilárních uzlin, asistované aspirace s následnou cytologií a biopsií.

Magnetická rezonance je metodou volby hlavně v diagnostice prsu u mladých žen. Jedná se o metodu doplňující, bez radiační zátěže, s vysokou senzitivitou zobrazení invazivního karcinomu (až 99%), ale nízkou specificitou 40 – 89% (41; 42). U mladých rizikových žen se stává pro svoji výtěžnost metodou volby. Vyšetření se provádí vleže na břicho. Předpokladem je udržení fixní polohy pacientkou po dobu trvání vyšetření. Vyšetření je nutné provádět ve druhém týdnu menstruačního cyklu, aby byly eliminovány nespecifické fyziologické spontánně enhancující léze, které vznikají nejčastěji v prvním a čtvrtém týdnu menstruačního cyklu u žen do 35 let věku. Kontraindikací vyšetření jsou kovové implantáty, kardiostimulátor, klaustrofobie, těhotenství a laktace. Hodnocení MR mamografie probíhá jako komplexní morfologicko - dynamická analýza. Nejčastěji je magnetická rezonance indikována z následujících důvodů: zhodnocení implantátů, odlišení jizvy od karcinomu při dodržení odstupu šesti měsíců od operace a 12 - 18 měsíců od radioterapie, vyšetření prsu u velmi rizikových mladých žen k odhalení novotvaru v raném stadiu, k upřesnění jeho lokalizace, multifokalita a vztahu k okolí, předoperační staging nádoru u konzervativních postupů, hledání primárního tumoru při průkazu metastatického karcinomu prsu při negativě sonografie a mamografie, časná detekce recidivy po parciálních výkonech (41). Výpočetní tomografie je přínosem při posuzování vztahu nádoru k hrudní stěně, ke zjištění infiltrace vnitřních mamárních a mediastinálních uzlin. Nedetekuje mikrokalcifikace. Pro poměrně vysokou radiační zátěž není vhodnou metodou pro diagnostiku časných stádií nádorů prsu ani pro screening.

K dalším rutinně prováděným vyšetřením v diagnostice karcinomu prsu k vyloučení metastatického postižení jsou rentgen hrudníku, sonografie jater a scintigrafie skeletu. Při podezření na metastatický proces ve vzácných lokalizacích jsou užívány běžně dostupné zobrazovací techniky daného orgánu.

Dále je prováděno standardní laboratorní vyšetření krve. Nádorové markery se v primární diagnostice karcinomu prsu nepoužívají. Více viz doporučení ASCO 2007 v kapitole 11.

Z invazivních metod je v primární diagnostice karcinomu prsu prováděná biopsie s cílem stanovit diagnózu. Provádí se biopsie tenkou jehlou (Fine Needle Aspiration - FNA), kdy pod sonografickou či CT kontrolou dojde k nasátí buněk do jehly. Výsledkem je cytologické vyšetření, které může potvrdit maligní známky onemocnění. Vyšetření s lepší vypovídací hodnotou je biopsie hrubou jehlou (core cut biopsie), kdy dochází k vytěžení válečku tkáně, která je dále histologicky vyšetřena. Z dalších bioptických metod je třeba zmínit vakuovou mamotomii a bioptickou excizi.

Na základě výše popsaných vyšetření je nemocná odeslána k následné léčbě viz kapitola 8.

8.2 Diagnostika v průběhu follow up a diagnostika lokálních recidiv

Diagnostika lokálních recidiv karcinomu prsu je problematická kvůli nutnosti rozlišení recidivy od pooperačních a postiradiačních změn. Používají se všechny diagnostické možnosti jako v případě primárního procesu včetně invazivních metod. Z recidivy by měla být podezřelá každá změna v odstupu jednoho roku po dokončení chirurgické léčby a radioterapie.

Po dokončené léčbě jsou nemocné s karcinomem prsu na našem pracovišti kontrolovány v prvních dvou letech od stanovení diagnózy po třech měsících, v dalších dvou letech třikrát ročně a pak po půl roce. V prvních dvou letech provádíme při každém vyšetření klinické vyšetření, základní hematologické a biochemické vyšetření, vyšetření onkogenních markerů, jednou ročně rentgen plic, mamografii a sonografické vyšetření včetně axil, nadklíčků a jater.

9 Léčba

Léčbu karcinomu prsu je možné rozdělit na lokální a systémovou. K lokální léčbě patří chirurgické odstranění nádoru s možnou následnou radioterapií. K systémové léčbě patří hormonální, chemoterapeutická a biologická léčba karcinomu prsu.

9.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba doznává v posledních desetiletích velkých změn. Radikální Halstetova operace byla nahrazena výkony méně mutilujícími. Studie nenalezly rozdíl v přežití a ve výskytu lokálních recidiv u nemocných po radikální mastektomii ve srovnání s modifikovanou mastektomií a proto je použití konzervativních technik stále častější. Rozvojem prochází i rekonstrukční výkony prováděné po částečných i radikálních výkonech na prsu ve spolupráci s plastickým chirurgem.

Primární chirurgická léčba je prováděna u nádorů do 5 cm a u stádií IIIa a nižších (43). U ostatních je léčba zahájena neoadjuvantní chemoterapií se snahou zmenšit velikost nádoru. Chirurgické výkony prováděné pro karcinom prsu můžeme rozdělit na diagnostické, konzervativní a radikální.

Cílem konzervativních výkonů v chirurgii je odstranění nádoru s dostatečným lemem zdravé tkáně. Snahou je co nejmenší poškození prsní tkáně a co nejlepší kosmetický výsledek. Nehmatné nebo špatně hmatné léze je nutné předoperačně lokalizovat pod zobrazovacím zařízením. Označení se provádí pomocí sonografie či mamografie viz kapitola 8. Kontraindikací konzervativních výkonů jsou multicentricita, mikrokalcifikace, velikost nádoru větší než 4 cm, uzlinové postižení N2 a vyšší, velká intraduktální komponenta, radioterapie v minulosti, těhotenství, fobie nemocné z recidivy, vaskulitidy a kolagenózy (sklerodermie, lupus erythematodes). Mezi konzervativní zákroky patří tumorektomie (lumpektomie, široká lokální excize), kvadrantektomie (segmentektomie), subkutánní mastektomie, disekce a exenterace axily a biopsie sentinelové uzliny (44). Prs šetřící výkony by měla následovat léčba ozářením na celý prs včetně dosycovací dávky na oblast lůžka tumoru, které by mělo být označeno klipy.

Mezi radikální výkony se řadí radikální mastektomie, modifikovaná radikální mastektomie a totální mastektomie.

Totální jednoduchá mastektomie, kdy je odstraněn celý prs včetně bradavky a fascie velkého prsního svalu, bez exenterace axily je prováděna u preventivních zákroků u nosiček mutací BRCA1/2 a je možno ji použít v případě difúzního duktálního karcinomu u starších nemocných bez postižení uzlin v axile. Modifikovaná radikální mastektomie – konzervativní radikální mastektomie je nadále zlatým standardem léčby, kdy je odstraněn celý prs, pectorální fascie a provedena exenterace axily. Halstetova radikální mastektomie, kdy je odstraněn celý prs včetně prsních svalů se již neprovádí (43).

9.2 Onkologická léčba

Onkologická léčba prošla v posledních letech velkými zvraty v důsledku boomeru molekulární diagnostiky, poznání procesu karcinogeneze na buněčné úrovni a rozvoji nových léčiv. Základními pilíři onkologické léčby je chemoterapie, radioterapie, hormonální terapie a biologická léčba.

Níže uvádím základní algoritmus léčby nemocných s karcinomem prsu dle doporučení České onkologické společnosti (ČOS) (45). Česká onkologická společnost respektuje doporučení ostatních světových onkologických společností a jednou ročně na základě nových

poznatků toto reviduje. Léčba karcinomu prsu je velice komplexní, lékař zohledňuje nejen stav nemocných, pokročilost nádoru, ale také molekulárně biologickou charakteristiku nádoru.

9.2.1 Radioterapie

Radioterapie je běžnou součástí léčby karcinomu prsu. Jejím cílem je lokoregionální kontrola onemocnění a to odstranění mikrometastáz v hrudní stěně či prsu a svodné lymfatické. Se zdokonalováním ozařovacích technik dochází ke snížení výskytu radioterapeutických komplikací a současně s přirůstajícím počtem prs zachovných operací je její indikace mnohem častější než dříve. Radioterapie je aplikována s radikálním či paliativním záměrem.

Indikací k provedení radikálního ozáření je stav po mastektomii u nádorů velikosti nad pět centimetrů, postižení více jak čtyř lymfatických uzlin, extrakapsulární šíření nádoru v lymfatické uzlině a nedostatečný lem zdravé tkáně v okolí nádoru (46). Ozařována je hrudní stěna na postižené straně (kůže, podkoží, mezižeberní prostory a viscerální pleura). Na tuto oblast je aplikována dávka 46 – 50 Gy, ve standardním frakcionačním režimu pětkrát v týdnu při jednotlivé dávce 2 Gy, nejčastěji technikou dvou tangenciálních polí, X zářením lineárního urychlovače (47). U nemocných, které podstoupily konzervativní výkon je pooperační ozáření indikováno vždy, i v případě ductálního karcinomu in situ. Ozařována je oblast celého prsu a stěny hrudní do 50 Gy. Lůžko tumoru je ozařováno u nemocných s nádorem velikosti T1 - 2, G2, u nemocných s rizikovými faktory či pozitivními nebo nedostatečnými okraji resekátu v různých dávkách dle rizika vzniku recidivy. Předpokladem je označení tohoto lůžka chirurgem. Brachyradioterapii lůžka nádoru po resekčním výkonu je možné provést jako alternativu výše popsaného ozáření. Dále je prováděno ozáření svodné lymfatické (axilární, supraklavikulární a infraklavikulární mízní uzliny) dávkou 46 – 50 Gy při postižení čtyř a více lymfatických uzlin, při extrakapsulárním šíření, při postižení uzlin apexu a v případě pozitivní sentinelové uzliny bez doplnění disekce axily.

Pooperační radioterapie by měla být zahájena čtyři týdny po operaci a neměla by být odkládána déle než tři měsíce po ní (47). Je možné ozáření po podání chemoterapie, naopak by tomu být nemělo pro vysoké riziko komplikací. Radikální ozáření je možné velice vzácně provést předoperačně v případě kontraindikované chemoterapie a hormonální terapie. U nemocných s inoperabilním nádorem, inflamatorním karcinomem či u nemocných, u kterých byla kontraindikována operace, je možné kurativně ozářit oblast celého prsu 50Gy a dále ozářit reziduální nádor dávkou do 24 Gy.

Paliativní radioterapií se rozumí ozáření vzdálených metastáz ve skeletu, plicích, mozku, játrech, kůži a dalších lokalizacích. Paliativní ozáření pokročilého karcinomu prsu a svodné lymfatické je také možné.

Mezi nejčastější komplikace radioterapie prsu patří zánětlivé kožní změny, změny pigmentace kůže, teleangiektázie, fibróza kůže a podkoží, postiradiační zánět plicního parenchymu, plicní fibróza, lymfedém horní končetiny, poškození brachiálního plexu a porucha potních žláz v ozářené oblasti. Udávána je i ischemická choroba srdeční po ozáření levé strany hrudníku nejčastěji s antracykliny v kombinaci.

Radioterapie snižuje množství lokoregionálních recidiv, ale také prodlužuje přežití nemocných. V dánské studii došlo k poklesu výskytu lokálních recidiv u premenopauzálních žen po mastektomii léčených chemoterapií režimem CMF a ozářením z 32% na 9%. Pravděpodobnost desetiletého přežití byla ve skupině s ozářením 54% oproti skupině léčené sa-

motnou chemoterapií (45%) (48). Metaanalýza Van de Steena udává snížení rizika smrti až o 20% u nemocných, které podstoupily radioterapii (49).

Ve studii NSABP B-06, která zahrnovala 1 137 nemocných po konzervativním výkonu, byl výskyt lokálních recidiv dvacet let po primárním výkonu 14,3% u nemocných které podstoupily ozáření oproti 39,2% ve skupině bez radioterapie. Rozdíl v přežití nebyl mezi těmito skupinami významný (50).

9.2.2 Hormonální léčba

Hormonální terapie je standardem léčby karcinomu prsu. Je podávána nemocným s pozitivitou hormonálních receptorů, které se stanovují nejčastěji imunohistochemicky viz kapitola 11.7.1. Stav hormonálních receptorů je nejdůležitějším prediktivním faktorem účinku hormonální léčby.

Je nutné odlišit hormonální léčbu u premenopauzální a postmenopauzální nemocné. Postmenopauza je definována věkem nad šedesát let či amenoreou trvající déle než dvanáct měsíců. Laboratorně ji prokazujeme pomocí stanovení hladin folikulostimulačního hormonu (FSH) a estradiolu. U premenopauzální nemocné jsou hlavním zdrojem estrogenů vaječníky, po navození menopauzy jsou to estrogény vzniklé aromatizací z androgenů v nadledvinkách, tukové tkáni, svalech a mozku (Buzdar 2001). Fyziologicky dochází k vazbě estradiolu na estrogenový receptor, tvorbě dimeru, který spouští signální kaskádu vedoucí k transkripci regulačních genů ovlivňujících proliferaci, invazi, angiogenezi a apoptózu.

Cílem hormonální terapie je blokáda vedoucí k inhibici účinku estrogenu na jeho receptoru. Tato blokáda je možná pomocí několika mechanismů.

První možností je zamezení tvorby estrogenů ovariální ablací, radiační kastrací, chirurgickou ovariektomií u premenopauzálních žen či použití inhibitorů aromatázy u postmenopauzálních žen. Inhibitory aromatázy blokují přeměnu androgenů na estrogény blokadou enzymu aromatázy. Inhibitory aromatázy dělíme do třech generací podle historického vývoje. Dnes jsou v praxi používány inhibitory aromatázy třetí generace, které mají nižší výskyt nežádoucích účinků. Inhibitory aromatázy třetí generace dělíme na steroidní s ireverzibilní vazbou na aromatázu (exemestan) a nesteroidní s reverzibilní aromatázovou vazbou (anastrozol, letrozol).

Dále je možné inhibovat účinek estrogenů aditivní hormonální léčbou. Ta byla používána před objevením tamoxifenu, spočívala v aplikaci vysokých dávek estrogenů, progesteronu, androgenů nebo kortikosteroidů.

Další možností je podávání léků, které se nazývají selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). Jejich funkcí je zamezení vazbě estrogenu na receptor. Do této skupiny patří raloxifen a tamoxifen.

Poslední možností je redukce či eliminace exprese estrogenového receptoru pomocí fulvestrantu, který je klasifikován jako selektivní down regulátor estrogenového receptoru (SERD).

Premenopauzální ženy jsou léčeny tamoxifenem samostatně po dobu pěti let nebo v kombinaci s ovariální supresí či ablací. Dále pokud dojde v této době k nastolení menopauzy, dokončí nemocná pětiletou léčbu tamoxifenem či je převedena na inhibitor aromatázy k dokončení pětileté adjuvantní hormonální léčby. Podání inhibitoru aromatázy po pětiletém podání tamoxifenu je možné v případě navozené menopauzy. Premenopauzální nemocná po pěti letech léčby tamoxifenem je dále bez další hormonální léčby. Postmenopauzální nemocné s nízkým rizikem (viz Doporučení St. Gallen 2007 kapitola 10) jsou

léčeny tamoxifenem po dobu pěti let, v případě jeho kontraindikací je možná terapie inhibitorem aromatázy samostatně po dobu pěti let. U nemocných se středním a vysokým rizikem by měla endokrinní léčba obsahovat inhibitor aromatázy samotný či je proveden přechod po dvou až třech letech užívání tamoxifenu. Doporučeno je i podávání inhibitoru aromatázy po prvních pěti letech podávání tamoxifenu v prodloužené adjuvancia.

Postmenopauzální nemocné s pokročilým karcinomem prsu, u kterých možno indikovat neoadjuvantní chemoterapii, mají hormonálně senzitivní nádor s nízkým gradem, nízkým ki67, mohou zahájit léčbu neoadjuvantně podáváním inhibitorů aromatázy po dobu šesti měsíců. U premenopauzálních nemocných s metastatickým onemocněním je nutná ovariální ablace pomocí LH-RH analog, chirurgická ablace či radiokastrace. Další léčba je shodná s postmenopauzální nemocnou. Doporučeno je podávání inhibitorů aromatáz třetí generace. V dalších liniích paliativní hormonální terapie je možné podání tamoxifenu, steroidního inhibitoru aromatáz, fulvestrantu či megestrol acetátu (39).

9.2.3 Chemoterapie

Chemoterapie je systémová léčba. Je podávána s adjuvantním i paliativním záměrem. U nemocných s postižením lymfatických uzlin bez vzdálených metastáz či u nádorů nad tři centimetry je podávána před samotným chirurgickým výkonem.

Neoadjuvantní léčba je systémová léčba podávaná nemocným před vlastním chirurgickým zákrokem s cílem zmenšit masu nádoru a umožnit tak konzervativní chirurgický zákrok a zároveň postihnout potenciální mikrometastázy v oběhu. U karcinomu prsu je tato léčba podávána nemocným s postižením regionálních mízních uzlin (N+) a velikostí nádoru větší než 3 cm. Nemocné, které po podání neoadjuvantní léčby dosáhnou patologické kompletní remise, mají 95% pětileté přežití bez nemoci, proto je patologická remise udávána jako příznivý prognostický faktor. Patologické kompletní remise dosahují více nemocné s estrogen-negativními nádory a to ve 20%. (51).

Nemocní s negativní expresí hormonálních receptorů, vysokým gradem a mitotickým indexem s lokálně pokročilým nádorem jsou indikovány k chemoterapeutické léčbě na bázi antracyklinů a taxanů, která by měla trvat 4 až 6 měsíců. Léčebná odpověď je hodnocena po 6 až 9 týdnech léčby. Podání antracyklinů v kombinaci s transtuzumabem je možné, ale až po zvážení kardiotoxického rizika.

Adjuvantní chemoterapie je podávána všem nemocným s invazivním duktálním karcinomem ve stadiu I, II, IIIA a IIIB s velikostí nádoru nad 1 cm. U velikosti do jednoho centimetru je její podání nutné zvážit na základě prognostických faktorů. Při lokálním onemocnění s postižením lymfatických uzlin podáváme chemoterapii vždy. Cytostatika jsou podávána v kombinaci (nejčastěji cyklofosamid, fluorouracil, metotrexat a antracykliny) v různých terapeutických režimech.

Úlohou paliativní terapie je prodloužení a zkvalitnění života nemocných s metastatickým onemocněním. Nemocné s metastatickým onemocněním jsou léčeny všemi modalitami onkologické léčby. Tato léčba zahrnuje nejen paliativní podání chemoterapeutik podle doporučených schémat, ale i léčbu vzdálených metastáz. K léčbě kostních osteolytických, osteoblastických i smíšených metastáz jsou podávány celkově bisfosfonáty. Před jejich podáním je nutné sanovat chrup pro možný výskyt osteonekrózy čelisti.

9.2.4 Biologická léčba

V léčbě karcinomu prsu jsou nyní běžně používány tři látky s biologickým účinkem, a to transtuzumab, lapatinib a bevacizumab. Bližší informace o transtuzumabu a lapatinibu jsou uvedeny v kapitole 11.7.2.

Bevacizumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti plazmatickému růstovému faktoru cévního endotelu A (Vascular endothelial growth factor – VEGF A). Blokáda VEGF způsobí normalizaci nádorového krevního řečiště, regresi nádorových cév a zábranu novotvorby cév (52). Bevacizumab je indikován k léčbě metastatického karcinomu prsu v kombinaci s paklitaxelem (39). Opatrnosti je třeba u nemocných s arteriální hypertenzí a u nemocných s ischemickou příhodou v anamnéze. Léčba je podávána naslepo, zatím není k dispozici marker výběru nemocných k léčbě bevacizumabem.

10 Hodnocení odpovědi na léčbu

První snaha o definici léčebné odpovědi byla definice ve studii Zubroda et al.: Léčba je považována za efektivní, dojde-li ke zmenšení celkové měřené masy nádoru za současné podmínky, že nedojde k progresi žádné z lézí a současně, že se neobjeví léze nová (53). Tato definice ale s přirůstajícím počtem studií nevyhovovala a v roce 1979 byl Světovou zdravotnickou organizací přijat návrh hodnocení léčebné odpovědi, který byl jako Kriteria WHO používán bezmála dvacet let (54). V roce 2000 byla publikována RECIST kritéria (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), která se stala novým standardem hodnocení léčebné odpovědi v onkologické léčbě (55). RECIST kritéria a to byla v roce 2009 revidována podle potřeb lékařů a jejich připomínek. Nová RECIST kritéria (56) umožňují lepší hodnocení měřitelných lézí pomocí zobrazovacích metod a to upuštěním od měření lézí ve dvou na sebe kolmých rozměrech. Nově se léze měří jen v jednom nejdelším rozměru. Tato kritéria byla ověřena množstvím studií, které porovnávaly WHO a RECIST kritéria.

Tabulka 5 RECIST kritéria (56)

Cílové léze	měřitelné léze, definovány jedním nejdelším průměrem ≥ 20 mm při použití konvenčních zobrazovacích technik (CT, RTG, MRI, PET) nebo ≥ 10 mm při použití spirálního CT	
Kompletní remise	CR	Vymizení všech cílových lézí
Parciální remise	PR	Minimálně 30% pokles součtu nejdelších průměrů (LD) ve srovnání s úvodním měřením
Progrese	PD	Minimální 20% nárůst nejdelších průměrů (LD) nebo objevení se 1 a více nových lézí
Stabilizace onemocnění	SD	Nesplnění kritérií pro CR, PR, PD
Necílové léze	všechny ostatní léze <20 mm při konvenčním zobrazení nebo <10 mm při použití spirálního CT, leptomeningeální nádory, ascites, pleurální/perikardiální výpotek, lymfangitis, zánětlivé karcinomy prsu a cystické léze	
Nekompletní remise/ stabilizace	Non-CR/SD	Přetrvání jedné nebo více necílových lézí a /nebo přetrvání hladin nádorových markerů nad normu.
Progrese	PD	Jednoznačná progrese existujících necílových lézí nebo objevení se jedné či více nových

Tabulka 6 Hodnocení léčebné odpovědi

Cílové léze	Necílové léze	Nové léze	Celková odpověď
CR	CR	Ne	CR
CR	ne CR/ SD	Ne	PR
PR	Ne PD	Ne	PR
SD	Ne PD	Ne	SD
SD	Jakákoliv odpověď	Ano nebo ne	PD
Jakákoliv odpověď		Ano nebo ne	PD
Jakákoliv odpověď		Ano	PD

11 Prognostické a prediktivní faktory

Prognóza je výpověď o budoucím stavu objektivní reality. Opírá se o vědecké poznatky a musí:

- vzniknout jako výsledek organizované činnosti
- obsahovat charakteristiku své spolehlivosti
- musí se vztahovat k určitému prognózovanému období
- musí vyjadřovat alternativnost možných budoucích stavů
- musí obsahovat podmínky, za kterých se má uskutečnit

Podle těchto podmínek je následně možné prognózu verifikovat (57).

V medicíně se určení prognózy používá ke stanovení pravděpodobnosti recidivy onemocnění, generalizace onemocnění, úmrtí či úplného uzdravení nemocného. Klinicky použitelný prognostický faktor by měl splňovat následující podmínky: jednoduché a dostupné stanovení, spolehlivost a prognosticky statistická významnost – nezávislý prognostický faktor, konečná informace musí přinášet prospěch pro nemocného.

Problémem určování prognózy je nejednotnost vědeckých postupů, definování základních parametrů, rozdílné metodiky a statistická vyhodnocování. Dále chybí velké multicentrické studie, které nejsou komerčně zajímavé. Těmto problémům se snaží čelit jednotlivé odborné společnosti vyhlášením přesných doporučení pracovních postupů, aby mohla být data více studií multicentricky zpracována a dospělo by se k očekávanému potvrzení a doporučení. Dále je nutné podotknout, že nejcennější informace jsou negativní výsledky, které nás nutí se zamyslet nad účelností a vazbami nastoleného problému.

V literatuře je uváděno více jak 800 faktorů, dávaných do souvislosti s prognózou karcinomu prsu. College of American Pathologists rozdělila v roce 1999 prognostické faktory karcinomu prsu do třech kategorií a to následovně (58).

U první kategorie byl prognostický význam prokázán a poznatky jsou klinicky využívány. Byly sem zařazeny TNM staging, stupeň diferenciacie nádoru, histologický typ nádoru, počet mitóz a exprese hormonálních receptorů

V druhé kategorii byl prognostický význam potvrzen v biologických i klinických studiích, ale je třeba toto ještě statisticky ověřit na velkých souborech. Tyto informace nejsou klinicky využívány. Zařazeny do této skupiny byly: HER-2, p53, lymfoangioinvasze, proliferací markery

Do poslední třetí kategorie byly zařazeny ostatní faktory, jejichž význam nebyl ještě dostatečně potvrzen. Uvedeny byly bcl-2, cathepsin D, TNF α , EGFR.

Toto dělení zůstává stejné, jen některé faktory je již v dnešní době možno zařadit do jiné skupiny. Součástí tohoto konsenzu bylo i doporučení, jak sjednotit hodnocení těchto parametrů. Důvodem byly rozdílné způsoby měření a stanovení jednotlivých parametrů ve studiích a další nemožnost jejich srovnání.

Z pohledu klinické praxe je uznáváno a přijato rozdělení prognostických faktorů dle konsenzu v St. Gallen z roku 2007 viz tabulka 7.

Tabulka 7 Prognostické faktory podle konsenzu ze St. Gallen 2007 (59)

Prognostický faktor	Nízké riziko	Střední riziko		Vysoké riziko	
N	N0 a všechna následující kritéria	N0 a alespoň jedno z následujících kritérií	N 1 – 3 a všechna následující kritéria	N1 – 3 a všechna následující kritéria	N≥4
pT	pT ≤ 2cm	pT > 2cm	-	-	-
Grade	G1	G2 – 3	-	-	-
ER, PR	ER+ a/nebo PR+	ER- a PR-	ER+ a /nebo PR+	ER- a PR-	-
HER-2	HER-2 -	HER-2+	HER-2 -	HER-2+	-
Věk	≥ 35 let	věk < 35 let	-	-	-
PVI	Bez	Malá	rozsáhlá		

Dle konsenzu ze St. Gallen z roku 2009 (60), bylo výše uvedené doporučení zahrnuto v doporučení při rozhodování o adjuvantní léčbě karcinomu prsu s prokázanou pozitivní expresí estrogenového a/nebo progesteronového receptoru a s negativní expresí HER-2 receptoru viz tabulka 8.

Tabulka 8 Doporučení léčby časného karcinomu prsu podle Konsenzu ze St. Gallen 2009

Klinicko-patologické znaky	Relativní indikace ke kombinaci chemoterapie a hormonoterapie		Relativní indikace pro samotnou HT
ER a PR	nízké ER a PR		vysoké ER a PR
Histologický grade	Grade3	Grade 2	Grade 1
Proliferace	Vysoká	střední	nízká
Uzliny	N pozitivní (≥ 4)	N pozitivní (1–3)	N negativní
PVI	přítomnost extenzivní PVI		nepřítomnost PVI
pT velikost	> 5 cm	2,1–5 cm	≤ 2 cm
Preference pacienta	použít veškerou dostupnou léčbu		odmítavý postoj k CHT
Gene signature	vysoké skóre	střední skóre	nízké skóre

Predikce je odhad budoucí skutečnosti opřený o vědeckou hypotézu nebo teorii. Predikce se potvrzuje nebo vyvrací zkušenosti, která ovšem často přichází až v okamžiku, kdy už nemají velkou cenu. Predikce tvoří základ exaktních věd. Na úspěšných predikcích jsou postaveny všechny technické konstrukce kolem nás, úspěšná léčiva, postupy a podobně (61). V medicíně prediktivní údaje slouží k odhadu úspěšnosti léčby a zvolení optimálního léčebného postupu. Nalezením vhodných prediktivních faktorů a jejich jednoduchá následná interpretace by byla velkým přínosem v klinické praxi při léčbě karcinomu prsu a vedla by k léčbě šité tzv. na míru. Nedošlo by k podávání velice náročné léčby nemocným, které by z ní neprofitovali a naopak. V praxi užívaným a jasně definovaným prediktivním faktorem je exprese hormonálních receptorů a exprese HER-2 receptoru. Velké úsilí k určení dobrého prediktivního faktoru v posledních letech a uplatnění individualizované terapie není úspěšné.

11.1 Velikost nádoru

Velikost nádoru je jedním z nejvýznamnějších prognostických faktorů karcinomu prsu. Některými autory je udávána na prvním místě, jiní ji řadí na místo druhé a jako silnější prognostický faktor udávají postižení mizních uzlin. Tyto dva nejsilnější faktory spolu úzce souvisí, protože s velikostí tumoru roste pravděpodobnost dalšího šíření do regionálních mizních uzlin a metastazování. Závislost velikosti tumoru na postižení uzlin je ve většině studií potvrzena, tato závislost ovšem není lineární. Naproti tomu Beenken svými výsledky popírá vliv velikosti tumoru jako nezávislého prediktora přežití a lokoregionální rekurence u žen s lokálně pokročilým karcinomem prsu, které podstoupily radikální či modifikovanou mastektomii s následnou standardizovanou léčbou. Ukazuje se, že vliv velikosti tumoru na další prognózu bude hrát největší roli do jednoho centimetru.

Pro nemocné bez postižení mizních uzlin zůstává velikost nádoru nejvýznamnějším prognostickým faktorem (62). Tyto mají riziko desetiletého přežití při velikosti tumoru do 1 cm 91% oproti 83% při velikosti 1 – 2 cm.

V následující tabulce 9 je uveden vztah mezi velikostí tumoru, přežitím a postižením lymfatických uzlin u 15 158 amerických žen (63).

Tabulka 9 Pravděpodobnost přežití podle velikosti nádoru

Velikost nádoru	Pětileté přežití	Desetileté přežití	Postižení lymfatických uzlin
T1 pod 1 cm	98,3%	94,9%	24,7%
T1 nad 1 cm	92,3%	73,9%	34,1%
T2:	-	43,7%	-
2,0 – 2,9 cm	90,6%	-	42,1%
3,0 – 3,9 cm	86,2%	-	50,1%
4,0 – 4,9 cm	84,6%	-	56,5%
T3	82,2%	20%	64,5%

Diskutovaným tématem jsou nádory o velikosti do jednoho centimetru včetně, bez postižení lymfatických uzlin a pozitivitou HER-2. Tyto jsou agresivnější a mají horší prognózu přežití než nádory stejné velikosti s negativitou HER-2. Proto ČOS doporučuje u pacientek do 0,5 cm, bez postižení uzlin a triplepozitivních pouze hormonální léčbu. Kdežto u pacientek s velikostí nádoru od 0,5 do 1cm, bez postižení uzlin a triplepozitivních doporučuje ČOS zvážit léčbu transtuzumabem.

11.2 Postižení uzlin

Metastatické postižení uzlin je nejsilnějším prognostickým faktorem přežití a lokální recidivy u nemocných s karcinomem prsu. Nemocné bez postižení lymfatických uzlin mají pravděpodobnost desetiletého přežití 75%, při jejich postižení je to jen 25 až 30% (64). S počtem postižených uzlin dochází k postupnému zhoršování prognózy. Nemocné s postiženou jednou uzlinou mají přežití blízké těm bez postižení, při postižení více jak čtyř uzlin je pětileté přežití těchto žen okolo 62%. Riziko lokální recidivy koreluje s počtem postižených uzlin, viz tabulka 10.

Tabulka 10 Lokální recidiva nádoru prsu po radikální mastektomii v závislosti na počtu postižených uzlin

Počet postižených uzlin	Lokální recidiva v %
0	11
1-2	21
3-4	36
5-6	49
7-8	47
9-10	47
11 – 12	40
13 – 15	52
16- 20	39
Více než 21	59

11.3 Histologický typ

Mezi histologické typy karcinomu prsu s dobrou prognózou patří tubulární invazivní karcinom, kribriformní invazivní karcinom, adenoidně cystický a mucinózní karcinom. Někdy k nim bývá zařazen tubulolobulární a papilární karcinom. Prognóza medulárního karcinomu je sporná. Podrobněji je vztah histologického typu a prognózy uveden v kapitole 5.1.

11.4 Histopatologický grading (stupeň diferenciacie nádorových buněk)

Stupeň diferenciacie nádorových buněk určený podle kritéria UICC (viz kapitola 4) je nezávislým prognostickým faktorem. Desetileté přežití nemocné s nádorem G1 je 85% oproti 45% u nemocných s nádorem G3 (64). Ve studii Hensona je desetileté přežití nemocné s nádorem G1 90% oproti 53% u nemocných s nádorem G3 (65).

11.5 Věk

Věk je výrazným prognostickým faktorem. V roce 2003 respektive 2005 byl na základě konsenzu ze St. Gallen zařazen věk do 35 let mezi nezávislé rizikové a prognostické faktory karcinomu prsu (66). V tomto věku se jedná většinou o nádory biologicky agresivní, s vysokou mitotickou aktivitou, vaskulární a lymfatickou invazí, s četnějším zastoupením negativní exprese hormonálních receptorů a špatnou prognózou. Od tohoto roku je věk nezastupitelným kritériem v rozdělení nemocných do rizikových prognostických skupin s následnou volbou adekvátní léčby. Více je uvedeno v úvodu této kapitoly.

11.6 Perivaskulární invaze

Invaze nádorových buněk v krevních a/nebo lymfatických cévách je popisována patologií u 22,8% karcinomů prsu (67). Přítomnost perivaskulární invaze významně zvyšuje riziko vzniku lokoregionální rekurence, je spojena s nižším celkovým přežitím i kratším intervalem do progresu. Koreluje s velikostí tumoru, diferenciací nádoru, typem, postižením uzlin, rozvojem vzdálených metastáz a špatnou prognózou. Jedná se o nezávislý prognostický faktor, který byl do managementu léčby karcinomu prsu zařazen v roce 2007. Jako příklad lze uvést studii Bettelheima a spol. V této studii byl zjištěn vznik lokální recidivy u nemocných po lokální excizi nádoru a s popsanou vaskulární invazí v 44% oproti 33% recidiv vzniklých u nemocných po lokální excizi nádoru bez vaskulární invaze. Tento rozdíl byl větší u nemocných, kteří podstoupily totální mastektomii (27% vs. 53%). Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl v délce bezpříznakového období i přežití (68).

11.7 Nádorové markery

Nádorové markery jsou látky produkované maligními buňkami (s nádorem asociované) nebo organismem jako odpověď na nádorové bujení (nádorem indukované). Dále je možné je rozdělit na markery humorální (přítomné v tělních tekutinách) či na markery buněčné (přítomné ve tkáni nádoru). Detailnější dělení je popsáno v tabulce 11.

Tabulka 11 Rozdělení nádorových markerů

Humorální	
Enzymy	Thimidinkináza
Imunoglobuliny	Paraproteiny
Hormony	Kalcitonin, prolaktin
Fragmenty komplexních glykoproteinů	CA 15-3
Fragmenty cytokeratinů	Tkáňový polypeptidický antigen Tkáňový polypeptidický specifický antigen
Onkofetální antigeny	Karcinoembryonální antigen CEA Lidský choriový gonadotropin HCG Alfa – 1 – fetoprotein
Celulární	
Molekuly receptorové povahy	Estrogenový receptor ER Progesteronový receptor PR HER 2/neu
Cirkulující buněčné elementy	Cirkulující nádorové buňky Cirkulující endotelové buňky
Matrix metaloproteázy	

V roce 2007 bylo přijato Americkou onkologickou společností doporučení použití nádorových markerů u karcinomu prsu. Jednalo se o aktualizaci z roku 2000. Shrnutí tohoto doporučení uvádí tabulka 12. Do konce roku 2011 nebylo toto doporučení revidováno (69).

Tabulka 12 Doporučení ASCO 2007 (69)

Marker	Doporučení ASCO 2007
DOPORUČENO	
Estrogenové a progesteronové receptory	Estrogenové a progesteronové receptory by měly být stanoveny u každého primárního invazivního karcinomu prsu. Dále je možné stanovení z metastatických lézí, pokud by výsledek ovlivnil plánovanou léčbu.
	Estrogenové i progesteronové receptory by měly být stanoveny u pre- i postmenopauzálních žen, aby bylo možné identifikovat pacientky, které budou nejlépe profitovat z endokrinní terapie.
	U pacientek s DCIS není doporučeno běžné stanovení estrogenových a progesteronových receptorů pro nedostatek dat.
HER-2	HER-2 exprese a/nebo amplifikace by měla být stanovena u každého primárního invazivního karcinomu prsu, buď v době stanovení diagnózy nebo v době rekurence jako vodítko volby léčby trastuzumabem.
Senzitivita k anti HER-2 léčbě	Vysoké hladiny HER-2 exprese či amplifikace by měly být použity k identifikaci nemocných, pro které je užití trastuzumabu výhodou.
Přínos HER-2 jako prediktora léčebné odpovědi	Je navrženo použít antracykliny v léčbě HER-2 pozitivního karcinomu prsu – HER2 3+, FISH>2,0 za předpokladu, že nejsou přítomny její kontraindikace.
uPA a PAI	uPA/PAI-1 měřené pomocí enzymatické imunoabsorpční analýzy (ELISA) ze vzorku 300 mg zmrazené tkáně karcinomu prsu lze použít ke stanovení prognózy u pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem prsu s negativním postižením uzlin.

	Nízké hladiny obou markerů jsou spojovány s nízkým rizikem návratnosti nemoci, zvláště u hormonálně pozitivních pacientek, které jsou léčeny hormonální terapií a přidání chemoterapie pro ně znamená minimální benefit. U pacientek s vysokými hladinami obou markerů znamená přidání CMF adjuvantní chemoterapie značný benefit oproti observaci.
Multiparametrová analýza genové exprese karcinomu prsu	U nově diagnostikovaných pacientek s estrogenpozitivním karcinomem prsu, bez postižení mízních uzlin může být použita Oncotype DX analýza k predikci rizika návratnosti nemoci při léčbě tamoxifenem.
	Užití ostatních analýz jako MammaPrint, Rotterdam Signature, Breast Cancer Gene Expression Ratio jsou předmětem výzkumu.
CA 15-3 a CA 27.9	Tyto markery jsou doporučeny k monitoraci pacientů s metastatickým onemocněním v průběhu terapie. Mají být použita ve spojení s běžnými diagnostickými metodami. Jejich samotné užití jako markeru odpovědi na léčbu se nedoporučuje. Zvýšení CA 15-3 a CA 27.29 může být použito jako indikátor selhání terapie u špatně měřitelného onemocnění. Je třeba být obezřetný při interpretaci zvyšujících se hladin těchto markerů v prvních 4-6 týdnech léčby.
CEA	Doporučeno k monitoraci pacientů s metastatickým onemocněním v průběhu terapie. Má být použito ve spojení s běžnými diagnostickými metodami. Samotné užití CEA jako markeru odpovědi na léčbu se nedoporučuje. Zvýšení CEA může být použito jako indikátor selhání terapie u špatně měřitelného onemocnění. Je třeba být obezřetný při interpretaci zvyšujících se hladin CEA v prvních 4-6 týdnech léčby, protože může dojít k falešnému časnému nárůstu hladin.
NEDOPORUČENO	
HER-2	Použití HER-2 k definici prognózy u časného karcinomu prsu není doporučeno Komise nedoporučuje použití HER-2 jako ukazatel pro adjuvantní léčbu taxany.
CEA, CA 15-3 a CA 27.29	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné doporučit tyto markery k určení diagnózy, skríninku nebo monitorování návratnosti nemoci.
Markery proliferace	Stávající data nestačí k doporučení měření Ki-67, cyclinu D, cyclinu E, p27, p21, thymidinkinázy, topoisomerázy II a dalších markerů proliferace
Cathepsin D	Stávající data nestačí k doporučení měření cathepsinu D při léčbě karcinomu prsu
Cyclin E	Stávající data nestačí k doporučení měření celého cyklinu E nebo jeho fragmentů při léčbě karcinomu prsu
Proteomická analýza	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné doporučit použití proteomické analýzy při léčbě pacientek s karcinomem prsu.
P53	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné doporučit použití p53 jako markeru při léčbě pacientek s karcinomem prsu.
Mikrometastázy v kostní dřeni jako marker karcinomu prsu	Stávající údaje nestačí k tomu, aby bylo možné použít hodnocení mikrometastáz v kostní dřeni jako markeru při léčbě pacientek s karcinomem prsu.
Cirkulující nádorové buňky (CTC) jako marker karcinomu prsu	Testování CTC by nemělo být použito při diagnóze karcinomu prsu nebo k ovlivnění léčebných rozhodnutí.

11.7.1 Estrogenové receptory (ER) a progesteronové receptory (PR)

Vyšetření stavu exprese hormonálních receptorů musí být provedeno u každého primárně diagnostikovaného invazivního karcinomu prsu, aby bylo možné zahájit případnou hormonální terapii. Pozitivita estrogenového a/nebo progesteronových receptorů je nejdůležitějším prognostickým faktorem i prediktorem účinku hormonální terapie. Více o hormonální terapii je uvedeno v 9.2.2.

Estrogenové i progesteronové receptory jsou lokalizovány v jádře. Po navázání jejich ligandu (estrogeny, gestageny) dojde k homo či heterodimerizaci receptoru, vstupu do jádra a spuštění transkripce cílových genů zodpovědných za buněčné dělení, inhibici apoptózy, angiogenezi a degradaci extracelulární matrix (70).

Do dnešního dne byly objeveny dva typy estrogenového receptoru, alfa a beta. Oba dva receptory jsou exprimovány v různých tkáních, mají odlišnou afinitu k selektivním modulatorům estrogenových receptorů a podléhají odlišné regulační kontrole.

Gen pro estrogenový receptor alfa leží na 14. chromozomu (14q24.3), jeho produktem je bílkovina o molekulové hmotnosti 66,2 kDa. Estrogenový receptor alfa byl popsán ve zdravé tkáni prsu, endometriu, vejcovodu, pochvě, vulvě, placentě, prostatě, močovém měchýři, žlučníku, mozečku, nadledvinkách, srdci, játrech, plicích, nosohltanu, slinivce břišní a hladké svalovině. Exprimují jej nádory prsu, děložního hrdla, vaječnicků, endometria, jater, plic, střev, slinivky břišní, žaludku, ledvin, kůže, štítné žlázy a prostaty.

Gen pro estrogenový receptor beta leží na 6. chromozomu (6q 25.1), samotný receptor má molekulovou hmotnost 59,2 kDa a je exprimován v gastrointestinálním traktu, ledvinách, prostatě, vaječnicích, mléčné žláze, slezině, varlatech, kostech a kostní dřeni, plicích a hypofýze. ER β je popisován v nádorové tkáni prsu, kde jeho exprese koreluje s expresí ER α (71). Dále bylo zjištěno, že wild-type varianta BRCA-1 proteinu inhibuje ER α asociované transkripční pochody v buňce a při mutaci BRCA-1 tak dochází k deregulaci buněčného růstu (71).

Estrogeny se fyziologicky podílejí na utváření skeletu, ovlivňují stav kůže. Estrogeny stimuluje růst prsů ukládáním tuku v prsní žláze, navozují proliferační fázi menstruačního cyklu, jsou schopné zvyšovat citlivost vaječnicků na hormony adenohipofýzy a zvyšují počet receptorů pro progesteron. Ovlivňují vodní hospodářství, srážlivost a metabolismus cholesterolu (72).

Progesteronový receptor je kódován genem ležícím na 11. chromozomu (11q22-q23), samotný receptor je bílkovina o molekulové hmotnosti 98981 Da, vyskytující se fyziologicky ve všech lokalizacích jako estrogenové receptory. Jeho exprese byla popsána u nádorů gastrointestinálního traktu, štítné žlázy, gliomů, lymfomů, nádorů plic, hlavy a krku, děložního hrdla, endometria a prsu.

Fyziologickou funkcí progesteronu je společně s estrogeny příprava endometria pro nidaci oplodněného vajíčka a udržení těhotenství snížením kontraktility děložní svaloviny, dále podpora rozvoje lobuloalveolárního systému mléčné žlázy u těhotné ženy. Fyziologickou funkcí estrogenů je trofický, růstový a diferenciací vliv na růst vnějších i vnitřních pohlavních orgánů v pubertě, ukládání tuků na predilekčních místech u ženy.

Estrogenové i progesteronové receptory je možné stanovovat imunohistochemicky, pomocí ELISA či ligand saturační analýzou. Rozlišení alfa či beta varianty není při hodnocení zatím nijak zohledňováno. Podle doporučení ASCO i ČOS mají být hormonální receptory vyšetřeny u každého primárního nádoru karcinomu prsu a mohou být vyšetřeny i z metastatických lézí, pokud výsledek ovlivní následnou terapii (45; 69).

Stav hormonálních receptorů v nádorové tkáni prsu je nejvýznamnějším prognostickým i prediktivním faktorem. 75% karcinomů prsu je estrogen pozitivních a z těchto nádorů je 65% současně progesteron pozitivních. Pozitivita progesteronových receptorů při negativě estrogenových se vyskytuje v 5% (8). Stav estrogenových receptorů určuje bezpřízna-

kové období i čas do progresu. Nemocní s karcinomem estrogen pozitivním a/nebo progesteron pozitivním karcinomem prsu mají nižší riziko úmrtí oproti nemocným estrogen a/nebo progesteron negativním (73).

Estrogen a progesteron negativní nádory jsou klinicky agresivnější, jedná se o nádory málo diferencované, s vysokou mitotickou aktivitou, častější návratností a kratším přežitím. Hormonálně negativní nádory se vyskytují častěji u premenopauzálních žen.

Nejdůležitější úloha stanovení pozitivivity receptorů v klinické praxi je jejich prediktivní hodnota ve vztahu k endokrinní léčbě, o které je více v kapitole 9.2.2. Šedesát procent estrogen pozitivních nemocných odpoví na hormonální léčbu. Při pozitivitě estrogenových i progesteronových receptorů se tato odpověď zvýší na 70 - 75% (74).

11.7.2 HER-2, NEU

TKR Buněčný povrchový receptor tyrosinkinázového typu (Tyrosine Kinase-type cell surface Receptor)

ERBB2 Onkogen ERBB2 (V-ERB-B2 avian ERythroBlastic leukemia viral oncogene Homolog 2)

NGL Onkogen NGL (Neuroblastoma or GLioma derived)

Stanovení exprese HER-2 receptoru se stalo již součástí vyšetřovacího protokolu u karcinomu prsu, stejně tak podání jeho inhibitoru transtuzumabu ve všech liniích léčby karcinomu prsu. Z dalších biologických léčiv působících prostřednictvím nejen HER-2 receptoru jsou lapatinib, neratinib a konjugát transtuzumab entamsine (75).

Gen pro HER-2 receptor s několika označeními je lokalizován na chromozomu 17q21. HER-2 receptor patří do rodiny tyrosinkinázových receptorů pro epidermální růstové faktory. Rodina HER či Erb receptorů (Human Epidermal Growth Factor Receptor či Erythroblastosis) zahrnuje 4 homologní receptory (HER-1(EGFR, ERBB-1), HER-2/neu (ERBB-2), HER-3(ERBB-3), HER-4 (ERBB-4) pro tyrozin kinázu, kdy po vazbě ligandu dochází k ovlivnění transkripčních pochodů v buňce. Po navázání ligandu na extracelulární část receptoru dochází k dimerizaci receptorů a tvorbě heterodimerů či homodimerů, následné fosforylaci obou jednotek a iniciaci signální kaskády, jejímž výsledkem je stimulace proliferčních a antiapoptotických dějů cestou PI3-K, Akt a STAT nebo cestou Ras/Raf MAPK. Spouštěcím mechanismem může být i receptorová dimerizace bez navázání ligandu. Receptor HER-2 má klíčovou úlohu pro signální přenos v buňkách karcinomu prsu. Zvýšeně je exprimován u 20 – 30% invazivních karcinomů prsu (76). Výsledky studie MAGISTER, která probíhá v České republice, ukazují, že zvýšená exprese HER-2 je u 12,5% nádorů prsu.

Stanovení exprese HER-2 dle doporučení ČLS JEP musí být provedeno u všech nemocných s nově diagnostikovaným karcinomem prsu imunohistochemicky v referenční laboratoři. Jako pozitivní se hodnotí imunochemické hodnocení 3+ a u fluorescenční in situ hybridizace je to více než šest HER-2 genových kopií na jádro, nebo poměr FISH větší než 2,2. Za negativní jsou považovány vzorky IHC 0 a 1+, či FISH méně jak čtyři genové kopie na jádro nebo FISH poměr menší než 1,8. Vzorky v zóně IHC 2+ či výsledek hybridizace čtyři až šest genových kopií na jádro či FISH poměr v rozmezí od 1,8 do 2,2 je doporučeno vyšetření opakovat.

Stav HER-2 u nemocných s karcinomem prsu je zkoumán z několika pohledů prognózy a predikce a to:

- Ve vztahu k prognóze u nepředléčených nemocných: pozitivita HER-2 je spojena s horší prognózou u nepředléčených nemocných. Stejně tak amplifikace HER-2 je spojena s horší prognózou i u nemocných bez postižení mízních uzlin.
- Jako prediktor rezistence k hormonální terapii: spojení HER-2 dráhy a ER – Estrogeny snižují expresi HER-2 v buňkách karcinomu prsu, na druhé straně overexprese HER-2 indukuje estrogen nezávislý růst buněk s rezistencí na tamoxifen in vitro a na zvířecích modelech. Tyto výsledky korelují s inverzní expresí ER a PR při overexpresi HER-2. Ellis ve své studii na 324 nemocných s karcinomem prsu a expresí HER-2 a/nebo EGFR ukazuje lepší léčebnou odpověď na neadjuvantní podání letrozolu ve srovnání s tamoxifenem (77). Na druhé straně, studie ATAC (Anastrozol versus Tamoxifen versus Combination of the two) toto nepotvrdila.
- Jako prediktor rezistence k cyklofosfamidu, fluorouracilu a methotrexatu
- Jako prediktor dobré léčebné odpovědi při použití antracyklinů a paklitaxelu
- Zvýšená exprese predikuje léčebnou odpověď na transtuzumab a lapatinib

Z dostupných poznatků bylo však použití zvýšené exprese/amplifikace HER-2 doporučeno ASCO zatím jen pro predikci účinku transtuzumabu. Komise připouští též možnost použití stanovení HER-2 při léčbě lapatinibem v budoucnosti.

11.7.2.1 Transtuzumab

Transtuzumab je rekombinantní humanizovaná IgG1 protilátka proti receptoru ER-BB2/HER2-neu. Tato protilátka brání tvorbě dimerů s ostatními receptory rodiny EGFR. Tím dochází k inhibici angiogeneze regulované HER-2, inhibici proliferace blokadou signálních drah, zabránění vzniku zkrácené a aktivní formy p95HER2 a k aktivaci na protilátkách závislé buněčné cytotoxicitě. Prospektivní randomizované studie ukazují, že přidání transtuzumabu ke standardní léčbě u metastazujícího karcinomu prsu zlepšuje odpověď na chemoterapii, čas do progresu i celkové přežití. Nemocní bez HER-2 positivity z léčby transtuzumabem neprofitují (78). Studie fáze II prokazují, že samotný transtuzumab indukuje léčebnou odpověď v 15 - 25% (79).

Transtuzumab je indikován v léčbě nemocných s HER-2 pozitivním karcinomem prsu ve všech jeho stádiích, do léčebného režimu by měl být zařazen co nejdříve a s jeho léčbou je možné pokračovat i po selhání účinku chemoterapie. Kontroverzní je jeho podání u HER-2 pozitivních nádorů menších než 1 cm, kdy tyto nemocné mají významně horší prognózu oproti HER-2 negativním nemocným se stejně velkým nádorem. ČOS proto doporučuje vždy individuálně zvážit toto riziko u nemocných s nádory o velikosti 5 až 10 mm.

Transtuzumab je kardiotoxický a před jeho podáním je nutné vyšetření ejekční frakce levé komory a toto vyšetření opakovat každé 3 až 4 měsíce do půl roku od ukončení léčby.

11.7.2.2 Konjugát transtuzumabu s DM1 – TDM1

TDM1 je konjugát mikrotubulárního cytostatika DM1 a transtuzumabu. Jedná se o slibné cytostatikum, působící díky transtuzumabu pouze v HER-2 pozitivních buňkách. Studie fáze I a II ukazují slibné výsledky. Ve studii fáze II TDM4450 došlo k prodloužení mediánu do progresu z 9,2 měsíců při léčbě metastatického karcinomu prsu transtuzumabem v kombinaci s docetaxelem na 14,2 měsíce při léčbě metastatického karcinomu prsu transtuzumabem emtansine. Při léčbě TDM1 také došlo k redukci nežádoucích účinků. Na

zhodnocení prognózy přežití a vyhodnocení studií fáze III si budeme muset ještě chvíli počkat.

11.7.2.3 Lapatinib

Lapatinib je orální inhibitor tyrosinkináz s duálním účinkem proti EGFR, HER-2.

Je indikován v kombinaci s kapecitabinem k léčbě pacientů s pokročilým nebo metastazujícím karcinomem prsu, jejichž nádory ve zvýšené míře exprimují HER-2 a u kterých došlo k progresi onemocnění po předchozí léčbě, která musí zahrnovat antracykliny a taxany a dále léčbu trastuzumabem pro metastazující onemocnění. Dále je indikován v kombinaci s inhibitorem aromatázy k léčbě žen po menopauze s metastazujícím karcinomem prsu s pozitivními hormonálními receptory, u kterých se neuvažuje o chemoterapii.

11.7.2.4 Neratinib

Neratinib je orální reverzibilní multikinázový inhibitor antigenů EGFR, HER-2 a HER-4. Slibné výsledky první multicentrické studie publikované v roce 2008, daly podnět k uspořádání studií fáze II a III, jejichž výsledky by měly mít k dispozici v dubnu 2012.

11.7.3 uPA Urokinázový aktivátor plasminogenu 1 (Urokinase Plasminogen Activator)

PAI-1 Inhibitor plasminogen aktivátoru 1 (Plasminogen Activator Inhibitor

uPA kóduje gen lokalizovaný na 10. chromozomu. (10q22.2.) uPA je serinová proteáza o velikosti 45 kD, která přeměňuje plasminogen na aktivní plasmin a tím rozpouští komponenty extracelulární matrix jako je laminin, fibronectin a fibrin. Plasmin degraduje extracelulární matrix také nepřímo prostřednictvím metaloproteináz (MMP-3, -9, -12 a -13) (80). uPA je inhibován prostřednictvím PAI-1, PAI-2 a maspinu (81). PAI-1 je považován za hlavního inhibitora uPA. Kromě tvorby komplexů s uPA má PAI-1 schopnost prostřednictvím vazby na fibronectin ovlivňovat buněčnou adhezi a migraci buněk (82).

Oba dva proteiny se podílejí na nádorové invazivitě a metastazování. Zde byla opět revidována původní myšlenka, že tento systém degraduje extracelulární matrix a bazální membránu a tím umožňuje metastazování a to následujícím způsobem. UPA je schopný stimulovat angiogenezi, migraci buněk a jejich adhezi, inhibuje apoptózu. O PAI-1 se uvažovalo jako o proteinu, který je schopen inhibovat invazi a metastazování. Ale stejně jako je tomu u TIMP-1 v kaskádě metaloproteináz, je i funkce tohoto inhibitoru komplexnější. PAI-1 moduluje buněčnou adhezi, stimuluje buněčnou proliferaci a angiogenezi (83).

Ke stanovení míry exprese těchto proteinů v tkáni je doporučeno stanovení pomocí ELISA z 300mg čerstvé nebo zmražené tkáně. Tato metoda je dostatečně robustní a umožnila provedení studií velkých studií, jejichž výsledky vedly až k doporučení těchto dvou markerů ASCO ke stanovení prognózy u nemocných s karcinomem prsu bez postižení lymfatických uzlin. Nízké hladiny těchto markerů u výše definovaných nemocných jsou spojeny s velice nízkým rizikem návratnosti nemoci a chemoterapie jim nepřináší větší benefit, na druhou stranu, nemocné s vysokými hladinami obou těchto markerů mají benefit z chemoterapie CMF oproti nemocným bez ní.

První randomizovaná prospektivní studie, která rozdělila nemocné s karcinomem prsu bez postižení mízních uzlin na základě hladin uPA/PAI-1 byla publikována v roce 2001. Nemocné, jejichž nádor vykazoval nízké hladiny uPA/PAI, nebyly léčeny chemoterapií. Nemocné, jejichž nádor vykazoval vysoké hladiny markerů, byly dále náhodně rozděleny do dvou ramen s a bez adjuvantní chemoterapie. Skupina s nízkými hladinami uPA/PAI-1 měla tříleté riziko návratnosti nemoci 6,7%, skupina s vysokými hladinami uPA/PAI-1 bez

chemoterapie měla toto riziko dvojnásobné. V poslední skupině bylo toto riziko téměř poloviční oproti skupině bez chemoterapie (83).

11.7.4 Genový expresní model – budoucnost OncotypeDX, MammaPrint

Zda pomocí genového expresního modelu nádoru bude lékař rozhodovat o léčbě nemocných nejen s karcinomem prsu je zatím nejasné. Výsledky studií jsou ale velice povzbudivé, přihlédneme-li k tomu, že tyto mnohagenové analýzy jsou schopny postihnout biologickou povahu nádoru mnohem lépe než doposud všechny známé prognostické a prediktivní faktory. Toto rozhodnutí bude otázkou času, ale také i peněz.

U karcinomu prsu jsou zatím nejlépe ověřeny dva testy, a to OncotypeDX a MammaPrint.

11.7.4.1 Oncotype DX

Oncotype DX je RT-PCR analýza, která měří expresi 21 genů (16 s nádorem asociovaných a pět kontrolních). Expres vybraných genů je definována matematickým algoritmem, který stanoví Recurrence Score (RS) a na jeho základě jsou vybráni pacienti s nízkým (RS < 18), středním a vysokým rizikem (RS > 31) návratnosti nemoci.

Tato analýza byla vyvinuta pro nemocné s estrogenpozitivním, časným karcinomem prsu, aby umožnila vybrat nemocné, které by profitovaly z přidání chemoterapie k hormonální léčbě. Retrospektivní analýza vzorků nádorů prsu pacientů ze studie NSABP B-20 potvrdila, že nemocní s vysokým RS mají větší benefit z přidání chemoterapie CMF oproti nemocným se středním a nízkým rizikem. Dále bylo toto tvrzení ověřeno na vzorcích nemocných ze studie NSABP B-14, kde nemocní s nízkým RS měli riziko vzniku distálních metastáz 6,8% oproti nemocným s vysokým RS, kde toto riziko bylo 30,5%. Studie udává test jako nezávislý prognostický faktor návratnosti onemocnění a přežití. Studie Kaiser Permanente potvrdila, že Oncotype DX pomáhá predikovat pravděpodobnost desetiletého přežití u žen s karcinomem prsu. V poslední velké studii SWOG 8814 provedené na vzorcích nádorové tkáně u postmenopauzálních nemocných s hormonálně pozitivním karcinomem prsu a postižením lymfatických uzlin bylo potvrzena prognostická hodnota testu i u těchto nemocných. Pravděpodobnost desetiletého období bez nemoci bylo 60% u nemocných s nízkým RS, 49% se středním RS a 43% u nemocných s vysokým RS v rameni nemocných léčených pouze tamoxifenem. Všechna tato data čekají na další ověření ve studii Oncotype DX TAILORx TRIAL. Výsledky této studie budou uveřejněny v roce 2014.

11.7.4.2 MammaPrint

MammaPrint měří expresi 70 genů podílejících se na regulaci proliferace, metastazování, angiogenezi. Tento test byl navržen pomocí validačních studií tak, aby dokázal odlišit nemocné s vysokým rizikem vzniku metastáz v prvních pěti letech od diagnózy. Výsledkem testu je rozdělení nemocných do dvou skupin – s vysokým a nízkým rizikem vzniku metastáz. Nemocné s výsledkem vysokého rizika mají 29% šanci, že dojde k návratu nemoci do deseti let bez adjuvantní léčby. Nemocné s výsledkem nízkého rizika mají 10% šanci návratnosti nemoci do deseti let. Velké multicentrické studie k ověření prognostické hodnoty testu, prediktivní hodnoty ve vztahu k chemoterapeutickým režimům, hormonální léčbě právě probíhají (MINDACT). Dále jsou zkoumány možnosti predikce odpovědi na neo-adjuvantní terapii ve spojení s dalšími testy (MINT, NBRST).

11.7.5 CEA Karcinoembryonální antigen CEA

Karcinoembryonální antigen je glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 - 200 kDa. Vyskytuje se v buněčné cytoplazmě plodu v prvním trimestru, později je součástí buněčných membrán. U dospělých je produkován epiteliálními buňkami bronchů, trávicího ústrojí a prsní žlázy. V různých koncentracích jej lze prokázat v ascitu, mozkomíšním moku a krvi. Obvyklá hodnota cut off je 5ug/l. Biologický poločas je 2 až 16 dnů dle obsahu kyseliny sialové.

Zvýšená hladina CEA je u kuřáků, alkoholiků a chronických bronchitiků. Dále ji zvyšují chronická jaterní onemocnění, nespecifické střevní záněty, onemocnění slinivky břišní, žlučníku a autoimunitní onemocnění.

Dle doporučení České společnosti klinické biochemie, České onkologické společnosti a České společnosti nukleární medicíny České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně k využití nádorových markerů v klinické praxi (dále jen Doporučení ČLS JEP) jej nelze užít ke stanovení diagnózy a screeningu karcinomu prsu. Jeho hlavní úlohou je monitoring průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu. Rutinně je používán k monitorování léčby pro kolorektální karcinom a karcinom prsu v kombinaci s dalšími markery. Hodnoty vyšší než 10 ug/l znamenají obvykle progresi maligního procesu. Koncentrace vyšší než 50 ug/l svědčí s vysokou pravděpodobností o jaterních nebo kostních metastázách (84).

Předoperační hodnoty CEA nad 40 ug/l jsou charakteristické pro kratší bezpříznakové přežití nemocných s karcinomem mléčné žlázy. Pokles hladiny CEA po operaci o více jak 33% předoperační hodnoty je spojen s časným relapsem nemoci a horším přežitím (85).

11.7.6 CA 15-3

Je onkofetální nádorový marker mucin-glykoproteinové povahy s molekulovou hmotností 300 -450 kDa. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách bronchů a jater, u dospělých je povrchovým antigenem epitelových buněk ve vývodech mléčné žlázy, slinných žlázách a braších. Obvyklá hodnota cut off je kolem 35kU/l. Biologický poločas je 7 dní.

Jeho hladinu v séru zvyšují benigní onemocnění prsu a trávicího traktu, onemocnění plic, jaterní onemocnění, renální insuficience, TBC a HIV. Fyziologicky je zvýšen v těhotenství.

Dle Doporučení ČLS JEP jej nelze užít ke stanovení diagnózy a screeningu karcinomu prsu. Stejně je doporučení Americké společnosti klinické onkologie (American Society of Clinical Oncology - ASCO) i Evropské společnosti pro nádorové markery (European Group on Tumor Markers – EGTM). Důvodem je nízká senzitivita a orgánová specifita u časných stadií karcinomu prsu (při 90% specificitě je senzitivita 20 – 40%). Senzitivita se zvyšuje s pokročilostí onemocnění, kde zvýšenou hodnotu CA15-3 má 50 - 70% nemocných s metastatickým postižením. Hlavní úlohou CA15-3 je monitorace nemocných s karcinomem prsu ve spojení s běžnými diagnostickými metodami. Samotné užití jako markeru odpovědi na léčbu se nedoporučuje. Zvýšení CA15-3 může být použito jako indikátor selhání terapie u špatně měřitelného onemocnění a je třeba být obezřetný při interpretaci výsledků v prvních 4-6 týdnech léčby (69).

Hladina CA15-3 v séru koreluje před operací s velikostí tumoru. Některé studie potvrdily zkrácený DFS a OS u nemocných se zvýšenými hladinami CA15-3 a CEA. Dále bylo potvrzeno, že zvýšené předoperační hodnoty CA15-3 a CEA jsou nezávislým prognostickým faktorem. Některé studie udávají zvýšené hladiny CA15-3 jako prediktora špatné léčebné odpovědi. ASCO potvrzuje prognostickou hodnotu tohoto markeru, udává však, že jeho role je zatím nejasná a nedoporučuje jej zatím používat k tomuto účelu.

Dle EGTM senzitivita relapsu CA15-3 v kombinaci s CEA dosahuje 60 - 90%. Odběr je doporučeno provádět před každým chemoterapeutickým cyklem, u nemocných léčených hormonální terapií nejméně jednou za 3 měsíce. Zvýšení koncentrace v séru o 25% potvrzené dalším odběrem v odstupu jednoho měsíce je považováno za signifikantní. Stejně tak pokles o 50% potvrzený následným odběrem je známkou léčebné odpovědi (86).

Naproti tomuto tvrzení stojí ASCO (69), které nedoporučuje stanovovat CA15-3 k detekci relapsu onemocnění i přesto, že studie potvrzují, že zvýšení CA15-3 může predikovat relapsu onemocnění o 5 - 6 měsíců dříve než běžné vyšetřovací metody a klinické příznaky. Důvodem je absence prospektivních klinických studií, které by potvrzovaly, že léčba na základě nádorových markerů má klinický benefit.

11.7.7 CA 27.29 MAM-6

Je glykoprotein o molekulové hmotnosti větší než 400kDa. Fyziologicky je CA 27.29 produkován epitelovými buňkami alveolů a ductů. Byl popsán u nádorů plic, prsu, slinivky břišní. Jeho zvýšená hodnota byla naměřena u nemocných s renální insuficiencí, cirhózou, hepatitidou a v třetím trimestru těhotenství. Normální hodnota je 38 – 40 U/ml.

Americká onkologická společnost doporučuje CA 27.29 k monitoraci pacientů s metastatickým onemocněním v průběhu terapie. Toto měření má být použito ve spojení s běžnými diagnostickými metodami. Samotné užití CA 27.29 jako markeru odpovědi na léčbu se nedoporučuje. Zvýšení CA 27.29 může být použito jako indikátor selhání terapie u špatně měřitelného onemocnění. Je třeba být obezřetný při interpretaci zvyšujících se hladin tohoto markeru v prvních 4 - 6 týdnech léčby (69).

Zvýšená hladina MAM-6 je popsána u nemocných s nádory prsu různého histologického obrazu. Hladina v séru se zvyšuje s pokročilostí nemoci. Hladina MAM-6 koreluje s klinickým stadiem nádoru prsu a to až v 93%. Jako progrese je definováno zvýšení hladiny tohoto markeru o 25% (80).

11.7.8 CTC Cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumor Cells)

Cirkulující nádorové buňky jsou buňky přítomné v krvi, které vykazují antigenní nebo genetickou charakteristiku specifického nádoru. Nalézáme je v periferní krvi nemocných s metastatickým, ale i s lokalizovaným onemocněním. V popředí zájmu je toto stanovení ke zlepšení managementu léčby epitelálních nádorů.

Cirkulující nádorové buňky jsou detekovány pomocí cytometrických metod a metod založených na analýze nukleových kyselin. Nejčastěji jsou cirkulující nádorové buňky vybrány z krve pozitivní selekcí pomocí imunomagnetických kuliček, které jsou specifické pro určitý antigen. Po této selekci jsou izolované buňky dále imunocytochemicky vyšetřeny či je provedena jejich genová expresní analýza. Obdobou je odstranění leukocytů z krve a následné imunocytochemické či genetické vyšetření. Ke klinickému použití u karcinomu prsu byl schválen kit CellSearch. Ten je možno použít k detekci cirkulujících nádorových buněk u nemocných s metastatickým onemocněním, ale tyto výsledky by neměly být použity k rozhodování o způsobu léčby.

Bylo publikováno více jak čtyři stovky studií, které se zabývali možností využití detekce cirkulujících nádorových buněk v managementu léčby karcinomu prsu. Hlavním cílem těchto studií je zjištění prognostické hodnoty CTC u nemocných s lokalizovaným a metastatickým onemocněním, dále možnost využití detekce CTC při terapeutickém rozhodování a při monitoringu účinnosti léčby.

Podle Weigelta mají CTC pozitivní nemocní s metastatickým onemocněním kratší interval bez progrese i celkové přežití ve dvou letech (17% vs. 36%) oproti CTC negativním nemoc-

ným (88). Cristofanilli zase uvádí horší prognózu u nemocných s více než pěti CTC oproti nemocným bez CTC před léčbou pro metastatické onemocnění. Dále také uvádí, že přítomnost více jak pěti CTC po prvním cyklu chemoterapie nebo hormonální terapie predikuje nulovou odpověď na léčbu (89; 90). Hayes udává, že přítomnost více jak pěti CTC kdykoliv v průběhu terapie indikuje selhání léčby (91). Na základě těchto studií byla zahájena prospektivní studie (SWOG protokol SO500), ve které nemocné s metastatickým karcinomem prsu a se zvýšenými CTC po prvním cyklu chemoterapie budou buď pokračovat ve stávající chemoterapii do klinických známek progresu, nebo budou převedeny na jinou chemoterapii opět do klinických známek progresu.

Použití výsledků detekce cirkulujících nádorových buněk v praxi se nejspíše nestane standardem, ale na tento závěr je třeba si počkat do provedení prospektivních studií s jednotným laboratorním a dostatečně validním stanovením.

11.7.9 Markery proliferační aktivity

Mezi markery proliferace aktivity patří mitotický index, Ki67 index, stanovení cyklinu D, E, p21, p27, thymidinkinázy, topoisomerázy II α . Použití těchto markerů k určení prognózy nemocných s karcinomem prsu nebylo zatím ASCO doporučeno.

Mitotický index je definovaný zastoupením buněk v mitóze ze všech buněk. Stanovení se provádí ze stanovené oblasti nádoru. Patolog hodnotí počet mitóz v deseti mikroskopických polích při zvětšení 40x z rutinních řezů nádoru barvených hematoxylinem a eozinem. Zastoupení buněk v mitóze je udáváno nejčastěji v procentech.

Ki67 je jaderný protein přítomný ve všech fázích buněčného cyklu (G1, S, G2, M), u buněk v G0 fázi není detekovatelný. Jedná se o marker proliferační aktivity buněk. Ki67 je možné stanovit imunohistochemicky pomocí protilátky MIB1. Poměrové zastoupení buněk vykazujících MIB1 pozitivitu k celkovému počtu hodnocených buněk se nazývá KI-67 index. Bývá vyjadřován v procentech.

Vysoká mitotická aktivita nádoru je obecně spojena s horší prognózou nemocného. Je spojena s kratším přežitím i kratším obdobím do progresu. V metaanalýze, zahrnující 12 155 nemocných s časným karcinomem prsu, bylo riziko relapsu 1,93 krát větší u nemocných, jejichž nádor vykazoval vysokou mitotickou aktivitu oproti nemocným s nádorem s nízkou mitotickou aktivitou. Ve studii Veronese a spol. byla u nemocných s nádorem prsu, který vykazoval vysokou mitotickou aktivitu, vyšší statisticky významná čtyřletá pravděpodobnost relapsu onemocnění (55,3% vs. 79,1%) i smrti (71% vs 95,6%) oproti nemocným s nádorem s nízkou mitotickou aktivitou.

Po rozdělení nádorů podle na základě genového expresního modelu došlo k publikování studií zabývajících se vztahem klasických prognostických markerů a molekulárně biologického typu nádoru. Na jejich základě bylo rozhodnuto a doporučeno ČOS, že pomocí markerů jako je exprese ER, PR, HER-2 a hodnota mitotického indexu, popř. indexu Ki67, je možné rozlišit tyto subtypy a to následovně (39).

Luminální typ A	- ER+ a/nebo PR+, HER-2-, G menší než 3, nízký index Ki67
Luminální typ B	- ER+ a /nebo PR+, HER-2-, G větší než 1, vysoký index Ki67
Luminální typ B (HER-2+)	- ER+ a /nebo PR+, HER-2+
Her-2 pozitivní (neluminální)	- ER,PR negativní, Her-2+
Triple negativní	- ER,PR, HER-2 negativní

Ve studii Chaenga a spol., kde byla zkoumána možnost použití Ki67 indexu k rozlišení lumenálního typu B karcinomu prsu, jako nejlepší cut off hodnotu našli hodnotu Ki67 indexu 13,25% (72% senzitivita, 77% specificita) (92).

11.7.10 Katepsin D

Je protein u člověka kódovaný CTSD genem, který leží na 11. chromozomu (11p15.5). Mutace tohoto genu byly popsány v patogenezi karcinomu prsu a u Alzheimerovy nemoci.

Katepsin D je lysosomální protéza z rodiny peptidáz A1 podílející se na proteolytické degradaci, buněčné invazi a apoptóze. Na zvířecích modelech jeho deficit způsobuje neurodegenerativní onemocnění. Role u karcinomu prsu je zkoumána již od roku 1978, ale výsledky studií nejsou zatím přesvědčivé a katepsin D zatím nebyl uznán jako prognostický či prediktivní marker u karcinomu prsu. Jeho vyšší exprese v nádorech prsu bude nejspíše souviset s nově popsanou úlohou v tukové tkáni prsu (92). Vezmeme-li v úvahu, že nádory prsu vznikají nejvíce ze žlázové části prsu, budou výsledky ve vztahu k prognóze u karcinomu prsu spíše falešně pozitivní a bude třeba se zaměřit na výzkum biologické funkce této protézy.

11.7.11 Mikrometastázy kostní dřene

Detekce mikrometastáz se nejčastěji provádí z aspirátu kostní dřene stanovením epiteliálních buněk imunohistochemicky, průtokovou cytometrií, pomocí PCR a RT PCR. Studie zabývající se tímto tématem mají vysoké procento falešně pozitivních výsledků. U 1 - 2% populace jsou detekovány epiteliální buňky v kostní dřeni všemi popsanými metodami. Dále pouze u 30 – 50% nemocných s mikrometastázami karcinomu prsu v kostní dřeni se vyvine klinicky jasný karcinom prsu v průběhu pěti až deseti let. Tyto výsledky nutí k zamyšlení, jaké buňky karcinomu prsu jsou schopné metastazování a jaké vlastnosti jsou nutné k založení metastatického ložiska. Je jasné, že ne všechny buňky karcinomu prsu v oběhu mají tento potenciál. Prognostická hodnota přítomnosti mikrometastáz karcinomu prsu v kostní dřeni jako markeru horšího přežití a vyššího rizika návratnosti nemoci je diskutabilní pro malé soubory nemocných a statistické hodnocení jednotlivých studií.

11.7.12 P53 (Protein 53), TP53

Protein 53 je kódován genem TP53, lokalizovaným na krátkém raménku 17. chromozomu (17p13.1). Celková délka genu je 20 000 bp. Jedná se o první objevený tumorsupresorový gen z roku 1979, jehož produktem je protein složený z 393 aminokyselin. V dnešní době je známo již 30 500 mutací tohoto genu, které jsou popisovány ve vztahu s nádorovým bujením (93). Porucha regulační funkce p53 byla popsána u mnoha nádorů. Jedná se o jednu z nejvýznamnějších molekul regulace buněčného cyklu.

Struktura genu TP53 je tvořena čtyřmi hlavními funkčními doménami: transkripčně aktivní doména (N-konec, kde dochází k vazbě transkripčních faktorů TAFs, p63) a oblast bohatá na prolin (tato oblast se uplatňuje při indukci apoptózy), DNA vazebná doména (v tomto místě vzniká 80 – 90% všech mutací, které vedou k poruše vazby p53 na DNA a tím k možnosti nádorového růstu buňky), oligomerizační doména (C-konec) a regulační doména (C konec).

Alternativní sestřih standardního wild type genu byl poprvé popsán v roce 1987 Matlashewskim (94). V současné době je známo nejméně 8 isoform p53.

Důležitou roli v karcinogenezi hrají mutace v genu TP53. 80 až 90% těchto mutací bylo nalezeno v DNA vazebné doméně. Mutace v této oblasti zabraňují vazbě p53 na DNA a znemožňují následnou regulaci transkripce cílových genů. Mutace p53 byly popsány

téměř u všech typů nádorů. Mutaci TP53 vykazuje 20 – 35% nádorů karcinomu prsu. (Lacroix). Buňky s mutovaným TP53 vykazují změny fenotypu jako je zvýšený nádorový potenciál, růst, aktivace proangiogenních faktorů, větší odolnost vůči radioterapii a chemoterapii. Vrozená mutace je ze 70% zodpovědná za rozvoj autozomálně dominantního Li - Fraumeniho syndromu (více viz kapitola 3.1.1.1.). BRCA nádory jsou spojovány s větším výskytem mutací TP53 oproti sporadickému výskytu (95). U nádorů BRCA-1 se dále uvažuje o interakci mezi p53 a BRCA-1 genem (96).

Rozdělíme-li nádory prsu na základě genového expresního modelu, vyskytují se mutace TP53 častěji u bazaloidního (82%) a HER-2 typu (71%) oproti lumenálnímu (31%) (96). V metaanalýze zahrnující 3 500 nemocných s karcinomem prsu je potvrzeno horší přežití a kratší období bez známek nemoci nemocných s mutacemi TP53. Riziko úmrtí v této studii bylo dvakrát větší u nemocných s jakkoliv pokrčilým karcinomem prsu, u nemocných s postižením uzlin toto riziko vzrostlo na 2,6. Nemocné bez postižení mízních uzlin a s prokázanou mutací p53 měli riziko úmrtí 1,7 krát větší. Na základě studií zabývajících se mutacemi TP53 byla rozpoutána debata, zda všechny mutace p53 jsou spojeny s horším přežitím. Ve své práci Borresen vysvětluje, že nikoliv.

Vztah přítomnosti mutovaného TP53 v nádorové tkáni a odpovědi na léčbu je předmětem studií od jeho objevení. Výsledky studií ukazují, že nemocné s TP53 mutovaným karcinomem prsu jsou rezistentnější k léčbě fluorouracilem, docetaxelem, mitomycinem C, epirubicinem, cyklofosfamidem a časněji relabují. Tyto studie jsou však na malých vzorcích nemocných, s nekonzistentním složením nemocných a v různých režimech podání (neoadjuvantní, adjuvantní). Pro ověření těchto skutečností by bylo třeba velkých multicentrických randomizovaných studií, s jasně definovanými vstupními podmínkami.

Protein 53 má velice významnou úlohu ve vývoji buňky a její odpovědi na stres. Protein 53 je pomyslnou křižovatkou sítě signálních drah důležitých pro regulaci buněčného růstu a apoptózy. Aktivuje se působením stresových faktorů jako je ionizační záření, hypoxie, chemoterapeutika a další (97). Jedná se o jaderný transkripční faktor kontrolující přechod G1/S a G2/M fází buněčného cyklu. Podílí se na opravě DNA, indukci stárnutí, apoptóze, autofagocytóze a hraje roli v angiogenezi.

Protein 53 je v normální buňce v malém množství a jeho biologický poločas rozpadu je přibližně dvacet minut. V buňce protein 53 stimuluje tvorbu Murine Double Minute 2 (MDM2) proteinu, který má funkci přirozené zpětné vazby. Navázáním MDM2 na p53 dojde ke stimulaci transkripce genu MDM2 v mRNA a následnou translaci. Protein MDM2 pak zahájí ubikvitinaci p53 a jeho následnou degradaci v buňce, která vede k snížení transkripce MDM2 genu (98). Takovýchto regulačních mechanismů negativní či pozitivní zpětné vazby bylo do dnešního dne identifikováno deset. Šest ze zpětnovazebných drah působí přes MDM2. P53 může být aktivován nejen poškozenou DNA, ale právě i vyřazením MDM2 z funkce.

Působením stresových signálů dochází k množství postranlačních modifikací p53 – fosforylace, acetylace, metylace, ubikvitinace nebo sumylace a následně stabilizaci p53 v buňce. Tyto modifikace dále vedou k hromadění p53 v buňce zvýšením poločasu rozpadu proteinu až na několik hodin a umožňují vazbu p53 ke specifické sekvenci DNA - p53 responzivní element (RE), který se nachází u cílových genů odpovídajících za navození zástavy buněčného cyklu, apoptózy či stárnutí. Cílové geny p53 můžeme rozdělit do 4 kategorií: Inhibující buněčný cyklus (cyklin dependentní protein P21^{WAF1/CIP1} jehož indukce

vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi, protei 14-3-3omega, který prostřednictvím cyklinu B1/CDK1 inhibuje přechod z G2 fáze k mitóze), apoptotické (Bax, NOXY, TNF, Fas), stabilizační (P53R2 – podjednotka ribonukleotid reduktázy) a podílející se na inhibici novotvorby cév a metastazování (Maspin KAI-1) (99).

Nádory prsu s vysokým množstvím proteinu 53 jsou častěji estrogen a progesteron negativní, dediferencované, aneuploidní a jsou spojovány s horším přežitím. Vysoké hladiny p53 jsou též popisovány u HER-2 pozitivních nádorů (101; 102).

Aberantní funkce p53 je spojována s výskytem nádorového onemocnění. K tomuto dochází poruchou v jakékoliv části fyziologické kaskády p53. Budeme-li znát přesně chybný stav dráhy p53, díky kterému dochází k nádorovému růstu, budeme moci vhodně zacílit účinnou terapii. Vzhledem ke složitosti dráhy p53 a množství popsanych mutací to není úloha jistě jednoduchá. První terapeutické možnosti jsou však vyvíjeny. Zkoušeny jsou: vnesení funkčního TP53 do buňky pomocí virových nosičů, blokování vazeb s inhibičními proteiny, aktivace mutovaného p53 pomocí protilátek a peptidů obnovující původní funkci p53, indukce p53 nezávislé apoptózy. Na klinickou aplikaci těchto přístupů bude nutné si opět počkat.

11.7.13 Matrixmetaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory

Matrixové metaloproteinázy, označované též matrixiny, jsou zinek i vápník dependentní endopeptidázy, jejichž hlavní úlohou je štěpení extracelulární hmoty. V popředí zájmu jsou již od roku 1962, kdy Jerome Gross a Charles M. Lapiere objevili enzym degradující trojvláknový kolagen při metamorfóze ocasu pulce (MMP-1) (100). V roce 1968 byl tento enzym izolován v neaktivní formě v lidské kůži. Množství metaloproteináz přibývalo a s dokončením sekvence genomu bylo stanoveno 24 různých genů, kódujících všechny metaloproteinázy v lidském těle.

Matrixiny se fyziologicky podílejí na embryonální modelaci, přestavbě a obnově tkání, angiogenezi a hojení ran. Uplatňují se i v mnoha patologických procesech jako jsou zánětlivá a nádorová onemocnění. Ve zdravé tkáni je nízká produkce metaloproteináz, při patologických procesech se jejich exprese prudce zvyšuje (101). Většina metaloproteináz je v buňce syntetizována (kromě membránových MT-MMP) v podobě proenzymu. Tato neaktivní forma je dále secernována z buňky do extracelulární matrix a zde v případě potřeby aktivována. Metaloproteinázy vznikají hlavně ve stromálních buňkách (fibroblasty) hostitele, jako odpověď na přítomnost nádorových buněk (102; 103; 104). Tato odpověď je zprostředkována induktory (například EMPRIN – extracelulární matrix metaloproteinázový induktor, VEGF – vaskulární růstový endoteliální faktor, vascular endothelial growth factor), které produkuje samotná nádorová tkáň (105). Vyjíměčně produkují MMPs samotné nádorové buňky (106; 107).

Matrixiny byly děleny podle své substrátové aktivity in vitro do šesti tříd: kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13), želatinázy (MMP-2, MMP-9), stromyelysiny (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilysiny (MMP-7, MMP-26), elastázy (MMP-12), metaloproteinázy membránového typu (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) a jiné (MMP-19, MMP-20, MMP-27, MMP-28). V současné době je spíše využíváno dělení založené především na strukturální analýze těchto enzymů. K jejich označení se používají čísla, MMP-1 až 28, ne všechna čísla jsou však využívána, a jsou děleny do osmi tříd. Toto dělení je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13 Dělení metaloproteináz

MMP	Název proteinázy	Strukturální třída	kDa	Chromozóm	Štěpené substráty
MMP-1	Kolagenáza - 1, intersticiální kolagenóza, tkáňová kolagenáza	Jednoduchá hemopoexinová doména	43	11q22-q23	Kolageny (I, II, III, VIII a X); želatina; agrekan; L-selektin; IL-1, proteoglykany; entaktin; ovostatin; MMP-2; MMP-9
MMP-2	Želatináza A	Želatináza	66	16q13	Kolageny (I, IV, V, VII, X, XI a XIV); želatina; elastin; fibronektin; agrekan; MBP; osteonektin; laminin-1; MMP-1; MMP-9; MMP-13
	Želatináza typ IV				
	kolagenáza				
MMP-3	Stromelysin-1	Jednoduchá hemopoexinová doména	46	11q23	Kolageny (III, IV, V, a IX); želatina; agrekan; perlekan; dekorin; laminin; elastin; kasein; osteonektin; ovostatin; antaktin; plasminogen; MBP; IL-1; MMP-2/TIMP-2; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-13
	Proteoglykanáza				
MMP-7	PUMP1	Velmi malá doména	20	11q21-q22	Kolageny (IV a X); želatina; agrekan; dekorin; fibronektin; laminin; entaktin; elastin; kasein; transferin; plasminogen; MBP; integrin; MMP-1; MMP-2; MMP-9; MMP-9/TIMP-1
	Matrilysin				
MMP-8	Neutrofilová kolagenáza	Jednoduchá hemopexinová doména	58	11q21-q22	Kolageny (I, II, III, V, VII, VIII a X); želatina; agrekan; fibronektin
MMP-9	Želatináza B	Želatináza	92	20q11.2 - q13.1	Kolageny (IV, V, VII, X a XIV); želatina; entaktin; agrekan; elastin; fibronektin; osteonektin; plasminogen; MBP; IL-1b
MMP-10	Stromelysin-2	Jednoduchá hemopoexinová doména	46	11q 22.3 - q23	Kolageny (III-V); želatina; kasein; agrekan; elastin; MMP-1; MMP-8
	Transin-2				
MMP-11	Stromelysin-3	Furinem aktivovaná sekrece	44	22q11.2	Neznámý (kasein)
MMP-12	Makrofágová metaloelastáza	Jednoduchá hemopoexinová doména	45	11q22.2 - q22.3	Kolagen IV; želatina; elastin; kasein; fibronektin; vitronektin; laminin; entaktin; MBP; fibrinogen; fibrin; plasminogen
MMP-13	Kolagenáza-3	Jednoduchá hemopoexinová doména	55	11q22.3	Kolageny (I, II, III, IV, IX, X a XIV); želatina; plasminogen; agrekan; perlekan; fibronektin; osteonektin; MMP-9
MMP-14	MT1-MMP	Transmembránová doména	54	14q11-q12	Kolageny (I-III); želatina; kasein; fibronektin; laminin; vitronektin; entaktin; proteoglykany; MMP-2; MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Transmembránová doména	61	16q12.2-q21	Fibronektin; entaktin; laminin; perlekan;

					MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Transmembránová doména	55	8q21	Kolagen III; želatina; kasein; fibronektin; MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	GPI- kotva	54	12q24	Neznámý
MMP-18	Kolagenáza-4	Jednoduchá hemopoexinová doména		neznámý	Kolageny (I, II, III, VIII a X); želatina; agrekan
MMP-19	RASI-1	Jednoduchá hemopoexinová doména		12q14	Želatina; agrekan; fibronektin
MMP-20	Enamelysin	Jednoduchá hemopoexinová doména		neznámý	Amelogrenein; agrekan
MMP-21*		Vitronektinu podobný insert		1p36.3	Neznámý
MMP-22*		Jednoduchá hemopoexinová doména		1p36.3	Neznámý
MMP-23*	CA – MMP, Femalysin MIFR, MMP-21/MMP-22	Transmembránová typ II		neznámý	Neznámý
MMP-24	MT5-MMP	Transmembránová doména		20q11.2	Neznámý
MMP-25	Leukolysin/MT6-MMP	GPI-kotva		16p/3.3	Pro-želatináza A; fibrin; fibronektin; kolagen IV; želatina
MMP-26	Endometáza matrilysin-2	Velmi malá doména		neznámý	Želatin; fibrinogen; fibronektin; vitronektin
MMP-28	Epilysin	Furinem aktivovaná sekrece		17q11.2	Kasein

Rodina matrixmetaloproteináz má společnou strukturu a vyznačuje se shodností sekvence aminokyselin v 40%. Strukturu neaktivní formy proteinu můžeme rozdělit na tři části: N-terminální propeptid, katalytická doména a C-terminální část molekuly. C-terminální doména je podobná sérovému hemopexinu, poskytuje velký povrch pro interakci s dalšími substráty a je vazebným místem pro tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMPs – Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Hemopexinová doména chybí u MMP-7 a MMP-26.

Původní představu, že hlavní funkcí metaloproteináz je degradace komponent extracelulární matrix a bazální membrány je nutno rozšířit. Po objevu nových substrátů matrixmetaloproteináz (receptory růstových faktorů, angiogenní faktory, cytokiny, apoptotické ligandy), které nejsou součástí bazální membrány a extracelulární matrix, je jasné, že funkce MMPs je velice komplexní (108; 109).

Jejich úloha v procesu embryogeneze byla již zmiňována. Vysoká exprese matrixinů je popisována v průběhu menstruačního cyklu, ovulaci, dále při involuci prostaty, dělohy i prsní tkáně (110; 111). Metaloproteinázy se uplatňují při hojení zlomenin, reepitelizaci kůže. Jejich úloha v angiogenezi byla již potvrzena (112; 113).

V procesu karcinogeneze se uplatňují ve všech jejích stádiích. Metaloproteinázy se podílejí na modulaci nádorového růstu aktivací růstových faktorů, ovlivněním apoptózy, zasahují do gradientu chemokinů při imunitní odpovědi hostitele, či uvolňují angiogenní faktory. Folgueras ve své práci upozorňuje na duální funkci metaloproteináz v průběhu karcinoge-

neze (114). Shrnutí duálního účinku metaloproteináz v karcinogenezi podle Fuelgerase uvádí tabulka 14.

Tabulka 14 Duální funkce metaloproteináz podle Fuelgerase

	Aktivace prostřednictvím		Inhibice prostřednictvím	
Růst	MMP-3,-7	HB-EGF	MMP-2,-3 MMP-7,-9	TGF- β
	MMP-1,-2,-3 MMP-8,-11,-26	IGF	MMP-2	FGF-R1
	MMP-1,-3	bFGF		
Přežití buněk	MMP-7	FasL		
Novotvorba cév	MMP-3,-7	HB-EGF	MMP-2,-3 MMP-7,-9,-12	Angiostatin
	MMP-1,-3	bFGF	MMP-3,-7,-9 MMP-12,-13,-20	Endostatin
	MMP-9	VEGF	MMP-9	Tumstatin
	MMP-2,-3 MMP-7,-9	TGF- β		
Invazivita	MMP-2,-3 MMP-7,-9	TGF- β	MMP-11	
	MMP-14	CD44		
	MMP-2,-14	Laminin-5		
	MMP-3,-7	E-Cadherin		
	MMP-14,-15	tTransglut.		
	MMP-2,-9,-14 MMP-16,-24	KiSS		
Imunitní funkce	MMP-9	IL-2R α	MMP-8	LIX
	MMP-2,-3 MMP-7,-9	TGF- β	MMP-9	IL-8
	MMP-2	MCP-3		

Aktivita metaloproteináz v tkáni je regulována na úrovni transkripce, aktivace zymogenů a endogenní inhibice.

Genovou expresi metaloproteináz pozitivně ovlivňuje řada růstových faktorů jako VEGF, TNF- α , IL-1. Naproti tomu například steroidní hormony, retinoly, TGF- β tuto expresi potlačují.

Neaktivní forma metaloproteinázy je udržována v latentním stavu pomocí N-terminálního propeptidu, který obsahuje cystein, jehož postranní řetězce tvoří vazbu se zinkem enzymu. Tato vazba tak brání navázání a štepení substrátu. K aktivaci enzymu dochází odštěpením propeptidu in vivo působením proteáz (jiná metaloproteináza, elastáza, chymáza) proteolytických kaskád v extracelulární matrix. Intracelulárně byla popsána aktivace metaloproteináz 11, 21, 28, 23 prostřednictvím furinu či furinu podobných konvertáz.

Endogenní inhibice metaloproteináz je zprostředkována nespecificky prostřednictvím například α 2-makroglobulinu či trombospondinu-2. Nejlépe zatím popsanými endogenními inhibitory metaloproteináz jsou tkáňové inhibitory metaloproteináz 1, 2, 3 a 4 (115). TIMPs tvoří s metaloproteinázami nekovalentní binární komplexy a blokují vazebná místa pro substráty. Tyto inhibitory jsou schopny inhibovat všechny známé metaloproteinázy. TIMP-1,-2,-4 jsou volně secernovány do intersticia, zatímco TIMP-3 je pevně zakotven v extracelulární matrix.

Nadprodukce TIMP brzdí růst tumorových buněk. Pokles jejich koncentrace vede ke zvýšení kolagenolytické aktivity a zlepšení migrace nádorových buněk. Některé studie ale prokazují zvýšenou expresi TIMP u pokročilých tumorů i jejich stimulační efekt na růst nádoru. Seznam specifických inhibitorů metaloproteináz uvádí tabulka 15.

Tabulka 15 Specifické inhibitory metaloproteináz

Název	Inhibice MMP	kDa	Lokalizace
TIMP-1	Všechny kromě MMP-14	28,5	difuzibilní v intersticiu
TIMP-2	Všechny	21	difuzibilní v intersticiu
TIMP-3	MMP-1,-2,-3,-9,-13	21	vázaná v extracelulární matrix
TIMP-4	MMP-1,-2,-3,-7,-9	22	difuzibilní v intersticiu

Dále se detailněji věnuji matrilysinu a TIMP-1, protože stanovení jejich exprese bylo předmětem klinické studie.

11.7.13.1 MMP-7 Matrilysin, PUMP-1 PUTATIVE METALLOPROTEINASE 1

Gen PUMP-1 byl poprvé popsán v roce 1988 Mullerem a spol. ve studii zabývající se kolagenázami a jejich produkcí u nádorů v lidském těle (115). Později, v roce 1991, byl nazván metaloproteinázou 7 či matrilysinem. Gen PUMP-1 je lokalizován na dlouhém raménku 11. chromozomu (lokus 11q21-q22), skládá se z 1 144 bp a jeho produktem je protein o velikosti 267 aminokyselin a molekulové hmotnosti 20 kDa.

Svoji strukturou se liší od ostatních MMPs absencí hemopexinové domény a společně s MMP-26 tvoří samostatnou podskupinu metaloproteináz (116).

Zymogenní forma enzymu je aktivována prostřednictvím trypsinu, plazminu, leukocytární elastázy. Matrilysin má širokou substrátovou aktivitu, katalyzuje kolagen IV, laminin, fibronectin, proteoglykan, elastin. Jeho substráty jiné než komponenty extracelulární matrix a bazální membrány jsou transferin, plasminogen, entactin, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-8, proMMP-9, pro α -1 proteináza inhibitor, decorin, endostatin, Fas ligand, α -2 makroglobulin, pro TNF- α , syndecan, E-cadherin, pro- α -defensin, β 4-integrin, TFPI-1, všechny podtřídy IgG, Insulin Growth like Factor Binding protein 5 (IGFBP1-5), heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF). Výčet zdaleka není konečný a každým dnem přibývají studie zabývající se tímto enzymem.

Jak je ale zřejmé, jedná se o molekulu, která se účastní celé řady fyziologických i patologických procesů v těle. MMP-7 se účastní nejen degradace extracelulární matrix a bazální membrány, ale účastní se procesů jako je zánět, přestavba a novotvorba tkání. Konstitutivně je produkována žlázovými epiteliálními buňkami v mléčné žláze, štítné žláze, slinivce břišní, v játrech, prostatě a peribronchiálních žlázkách. V procesu karcinogeneze se účastní všech jejích stadií a to degradace extracelulární matrix, bazální membrány, angiogeneze, proliferace i invaze buněk. MMP-7 je secernována nejen stromálními buňkami, ale hlavně samotnými nádorovými buňkami. Její zvýšená exprese byla popsána u mnoha typů nádorů jako jsou nádory plic, kůže, prsu, prostaty, tlustého střeva, slinivky břišní a nádory hlavy a krku. Zvýšená exprese MMP-7 koreluje se špatným agresivním fenotypem buněk nádoru a horší prognózou.

**11.7.13.2 TIMP-1 Tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1)
EPA Erythroid Potentiating Activity
HCI Collagenase Inhibitor, Human**

V roce 1985 Gasson a spol. objevili glykoprotein stimulující erythropoézu, který byl nazván Erythroid Potentiating Activity – EPA (117). Ve stejném roce Docherty zjistil, že sekvence tohoto proteinu je stejná jako sekvence TIMP-1 (118). A o rok později Carmichael popsal strukturu lidského inhibitoru kolagenáz (HCI), která byla identická s TIMP-1 (119). Ve stejný rok byl gen lokalizován na X chromozomu (X p11. 4 - p11. 1) (118).

TIMP-1 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 28,5 kDa, který tvoří stochiometrické komplexy v poměru 1:1 s metaloproteinázami.

Funkce TIMP-1 je komplexnější než jen inhibice metaloproteináz. TIMP-1 se podílí na stimulaci proliferace buněk, inhibici apoptózy a angiogenezi (120). Všechny tyto funkce jsou ale kontroverzní a dosud není jasný přesný mechanismus účinku TIMP-1 kromě inhibice metaloproteináz, ani ucelená a sjednocená fyziologická funkce tohoto inhibitoru.

Vysoké hladiny exprese TIMP-1 byly popsány u nádorů mozku, prsu a plic.

Bylo prokázáno, že exprese TIMP-1 je signifikantně vyšší v nádorové tkáni prsu oproti nenádorové tkáni prsu (121). TIMP-1 je produkována stromálními buňkami spíše než nádorovými buňkami samotnými (122). Zvýšená exprese TIMP-1 mRNA je spojena s horší prognózou nemocných s karcinomem prsu.

Řešení studie

1 Cíl

Základním cílem této práce je popsání problematiky prognózy a predikce u karcinomu prsu. Dále byla v rámci této práce provedena prospektivní studie, jejímiž hlavními cíli bylo kvantitativní stanovení exprese mRNA vybraných genů – pro protein 53 (p53), matrixmetaloproteinázu 7 (MMP-7), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 – tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) pomocí kvantitativní polymerázové reakce - Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ze vzorků duktálního invazivního karcinomu a ze vzorků zdravé tkáně prsu. Dále zhodnocení exprese mRNA těchto genů ve vztahu ke klinicko patologické charakteristice souboru, prospektivní sledování těchto nemocných a zhodnocení možnosti využití výsledků ve vztahu k prognóze nemocných s karcinomem prsu.

1.1 Proč MMP-7?

Z dostupných poznatků jsme chtěli na vzorcích zdravé a nádorové prsní tkáně in vivo ověřit expresi mRNA matrilysinu pomocí RT-PCR a podle slibných výsledků u kolorektálního karcinomu toto promítnout do výzkumu karcinomu prsu.

Navrhli jsme studii ve spolupráci s pracovišti Fakultní nemocnice v Plzni: Oddělení radioiminoanalýzy, Chirurgickou klinikou, Oddělením plastické chirurgie, Šiklovo anatomicko - patologickým ústavem a Onkologickým a radioterapeutickým oddělením.

Předpokládali jsme, že exprese matrilysinu ve zdravé tkáni prsu bude minimální a s invazivitou či stadiem nádoru se její exprese bude zvětšovat. Chtěli jsme ověřit, zda výši exprese mRNA možno použít jako prognostický faktor a zda jeho výše bude korelovat se základní charakteristikou souboru: TNM klasifikace, MIB aktivita, exprese hormonálních receptorů. Dalším z bodů výzkumu byl vztah mezi mírou exprese mRNA matrilysinu v nádorové prsní tkáni a délkou bezpříznakového období (Disease Free Interval – DFI) a vztah mezi mírou exprese mRNA matrilysinu v nádorové prsní tkáni a celkovým přežitím (Overall Survival – OS).

Naše studie vycházela s poznatků současné vědy a to z následujících předpokladů:

- Matrilysin je metaloproteináza podílející se na degradaci extracelulární matrix při procesech remodelace tkání - degraduje fibronectin, želatiny I, III, IV a V, kolagen typ IV, laminin, entactin, elastin, agrecan (123).
- Matrilysin je schopný aktivovat latentní zymogenní formy metaloproteináz – želatináza A, B a intersticiální kolagenáza (124).
- Matrilysin se účastní proteolytických procesů prostřednictvím dalších molekul jako je TNF β , urokinázový aktivátor plazminogenu.
- Na základě práce Baragi a spol. byla vyslovena hypotéza, že matrilysin je rezistentnější k inhibici oproti ostatním metaloproteinázám (125).
- Matrilysin je exprimován v nádorové tkáni adenomů, adenokarcinomů a karcinomů prsu, střeva, prostaty, žaludku, plic, kůže a horních cest dýchacích (123).
- Jeho transkripty byly detekovány ve střevě, ledvinách, svalech, kůži, laktační l involující mléčné žláze u myši pomocí RT-PCR (126).

- Matrilysin je syntetizován buňkami žlazového epitelu, což vede k hypotéze, že udržuje správnou funkci žlázy udržením volného lumen vývodu
- MMP-7 mRNA byla popsána u adenomů, což vede k předpokladu, že se účastní časně nádorové progresi.
- Studie na buněčných liniích ukazují, že po inzerci MAT cDNA mají tyto buňky vyšší invazivitu.
- Zvýšená exprese MAT mRNA koreluje s nádorovou progresí – schopnost buněk extravazace a degradace bazální membrány a tím umožňuje metastazování.
- U karcinomů střev byla potvrzena korelace mezi expresí mRNA a stadiem onemocnění (127).
- Masaki a spol. potvrdil multivariační analýzou, že MAT exprese je nezávislým prognostickým faktorem kolorektálního karcinomu a její výše koreluje s klinickopatologickou charakteristikou (128).

1.2 Proč TIMP-1?

V naší studii bylo snahou ověřit míru exprese TIMP-1 mRNA v normální a nádorové tkáni prsu. Dále prostřednictvím prospektivní studie korelovat výši exprese TIMP-1 mRNA s užívanými prognostickými faktory jako je velikost nádoru, postižení uzlin, přítomnost vzdálených metastáz, mitotická aktivita a exprese hormonálních receptorů. Stejně tak ověřit, zda zvýšená exprese TIMP-1 mRNA v nádorové tkáni prsu je nezávislým prognostickým faktorem přežití či bezpříznakového období. Při znalosti výše uvedených tvrzení jsme předpokládali, že výsledek nemusí korelovat s výsledky ostatních studií a že funkce TIMP-1 je v procesu karcinogeneze velice komplexní. Dále bylo naším cílem stanovení této exprese pomocí RT-PCR, která nebyla při hodnocení exprese TIMP-1 v nádorové tkáni prsu dosud použita.

Vycházeli jsme z následujících poznatků:

- TIMP-1 je inhibítozem metaloproteináz, v té době nejdéle zkoumaným.
- TIMP-1 stimuluje proliferaci buněk a tato stimulace je nezávislá na inhibici metaloproteináz. Jelikož vazebná místa specifická pro TIMP-1 byla identifikována na povrchu keratocytů, prekursorů erythropoézy a buněčných liniích karcinomu prsu, je možná přímá stimulace buněčného růstu prostřednictvím neznámého mechanismu – receptor, kaskáda.
- Hlavní funkcí TIMP-1 je inhibice metaloproteináz, je ovšem zřejmé, že tato funkce nebude jediná.
- TIMP-1 stimuluje buněčný růst nezávisle na inhibici metaloproteináz (120).
- TIMP-1 inhibuje apoptózu nejen prostřednictvím inhibice metaloproteináz, ale i prostřednictvím inhibice signálních proapoptotických drah.
- TIMP-1 se uplatňuje v procesu angiogeneze. Funkce TIMP-1 v procesu angiogeneze je duální. TIMP-1 působí proti angiogenezi opět inhibicí metaloproteináz, které jsou zodpovědné za degradaci bazální membrány, extracelulární matrix a následnou tvorbu kapilár.
- Inhibicí metaloproteináz aktivujících přeměnu plasminogenu na angiostatin a aktivujících endostatin má TIMP-1 angiogenní účinek. Nádorové buňky karcinomu prsu u kryš exprimující TIMP-1 rostly více a tumor byl více vaskularizovaný (129).

- Fernandez ve své práci popisuje redukci migrace endoteliálních buněk aorty přes želatinem potaženou membránu působením TIMP-1, oproti nepotažené. Předpokládáme, že funkcí TIMP-1 bude udržení intaktního lumen cévy a v případě porušení bazální membrány dojde k angiogennímu switchi a nastartování procesu neoangiogeneze.
- Vysoká exprese TIMP-1 mRNA stejně tak jako přítomnost proteinu TIMP-1 byla popsána u karcinomů prsu, plic, střev a tato exprese byla spojována s horším přežitím nemocných.
- Exprese TIMP-1 je zvýšena v nádorové tkáni prsu oproti benigním lézím a normální prsní tkáni (121; 130).
- Protein TIMP-1 se vyskytuje predominantně ve fibroblastech a cévní stěně, velice zřídka v nádorové buňce (122).
- Zvýšená exprese TIMP-1 by mohla být dalším prognostickým faktorem u karcinomu prsu (131; 132).
- Vysoká hladina TIMP-1 v nádorové tkáni prsu je spojena s horším přežitím, kratším bezpříznakovým obdobím. (131; 132).
- Vysoká hladina TIMP-1 korelovala významně s postižením uzlin a rozvojem vzdálených metastáz (131)
- Stanovení exprese mRNA TIMP-1 v nádorové tkáni prsu nebylo stanoveno a nebylo hodnoceno pomocí RT-PCR.

1.3 Proč p53?

Podle dostupných poznatků jsme chtěli ověřit prognostickou hodnotu exprese p53 u nemocných s karcinomem prsu. Dále jsme chtěli zjistit, zda míra exprese koreluje s klasickými klinicko-patologickými parametry pro rozporuplnost studií zabývajících se tímto tématem. Předpokládali jsme, že zvýšená exprese p53 v nádorové tkáni prsu by mohla být dobrým markerem odlišení rizikových nemocných v časném stadiu karcinomu prsu, kde je třeba zvažovat podání adjuvantní onkologické léčby podle všech dostupných údajů o nemocném i podle biologické charakteristiky samotného nádoru. Dalším cílem této studie byl vztah míry exprese mRNA p53 a přežití, popřípadě délkou bezpříznakového období. Exprese p53 byla stanovována převážně imunohistochemicky, pomocí RT PCR toto provedeno u karcinomu prsu nebylo. Dále díky spolupráci s Oddělením plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni se nám naskytla možnost zjistit, jaká je míra exprese mRNA p53 ve zdravé tkáni.

Vycházeli jsme z následujících poznatků:

- P53 je základní regulační molekulou buněčného cyklu.
- P53 se podílí na angiogenezi – inhibuje produkci proangiogenních faktorů, zvyšuje produkci endogenních inhibitorů angiogeneze a tím dokáže vypnout angiogenní potenciál nádorových buněk.
- Exprese p53 v nádorové tkáni prsu stanovená imunohistochemicky je spojena s vyšším rizikem vzniku lokální recidivy u nemocných s karcinomem prsu (133).
- Exprese p53 v nádorové prsní tkáni je spojena s horší prognózou nemocných.
- Exprese p53 je vyšší u dediferencovaných nádorů prsu (134).
- Exprese p53 stanovená imunohistochemicky v nádorové tkáni prsu je spojena s kratším bezpříznakovým obdobím a kratším přežitím nemocných (134).

- Vysoká exprese p53 v nádorové tkáni prsu by mohla být negativním prognostickým faktorem u nemocných s nádorem prsu bez postižení mízních uzlin (135).

2 Metodika zpracování vzorků a sledování nemocných

2.1 Odběr vzorků

Celkem 74 vzorků karcinomu prsu bylo odebráno v průběhu primárního resekcčního výkonu ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice v Plzni v letech 1998 – 2000. Vzorky byly patologem histologicky verifikovány a zmrazeny na -70°C . Takto byly uchovány k dalšímu zpracování v naší laboratoři. Dále byly odebrány vzorky ke standardnímu patologickému vyšetření a ke stanovení rozsahu nádoru dle pTNM, k určení stupně diferenciace nádoru, k vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů a ke stanovení mitotického indexu.

Kontrolní vzorky byly odebrány ve spolupráci s Oddělením plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni v průběhu estetických zákroků ze zdravé prsní tkáně. Po zmrazení na -70°C byly uchovány k dalšímu zpracování v naší laboratoři. Údaje o klientkách nebyly dále z etických důvodů zpracovávány. Všechny daly s anonymním odběrem informovaný souhlas.

2.2 Stanovení exprese jednotlivých genů pomocí RT-PCR ze vzorků prsní tkáně

Nejprve jsme provedli izolaci RNA z tkáňových vzorků karcinomu prsu a to následovně.

Ze 100 mg vzorku tkáně karcinomu prsu jsme izolovali celkovou RNA.

Homogenizaci jsme provedli ve zkumavkách se speciálními kuličkami přístrojem Fastprep (Thermosavant, USA) a kitem FastRNA Pro Green Kit (Q BIOgene, USA).

3 μg izolované celkové RNA jsme použili do reverzní transkripce. Reverzní transkripci jsme provedli pomocí enzymu Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA). Jako primer pro reverzní transkripci jsme použili oligo d(T)21.

Primery pro GAPDH, MMP-7, TIMP-1 a GAPDH jsme navrhli tak, aby překračovaly minimálně jeden intron. Použili jsme následující sekvence primerů:

GAPDH: forward primer, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3';
reverse primer, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3',
MMP-7: forward primer, 5'-GTATGGGACATTCCTCTGATCC-3';
reverse primer, 5'-CCAATGAATGAATGAATGGATG-3',
TIMP-1: forward primer, 5' - ATGCACATCACCTCTGTGA - 3';
reverse primer, 5'-CTCTGTGACCCAGTCCATCC-3'
P53: forwarded primer 5'- GGATGGAGAATATTTACCCCTCAG - 3' ;
reverse primer 5'-GGAACAAGAAGTGGAGAATGTCAGT-3'

Fragmenty získané PCR jsme vložili do vektoru pGEM (Promega Corporation, USA), klonovali a sekvenovali. Klonované fragmenty GAPDH, MMP-7, TIMP-1 a p53 jsme použili jako standardy o známém počtu molekul. 1 μl cDNA každého vzorku jsme použili pro RT-PCR na přístroji Rotorgene (Corbet Research, Australia). Pro stanovení amplifikace DNA jsme použili barvu SYBR Green I. Specifitu reakce jsme ověřili pomocí teplotní křivky tání a elektroforézy. Stanovení jsme provedli jako absolutní (počet molekul cDNA) a jako standardy jsme použili klonované fragmenty cDNA. Výsledky jsou uváděny jako:

- Absolutní hodnoty - kvantifikace byla provedena absolutně, za použití klonovaných fragmentů o známé koncentraci jako standard (počet kopií molekul/ 3 µg RNA).
- Normalizované hodnoty - jako poměr sledovaného genu a GAPDH (TIMP-1/GAPDH).

2.3 Metodika sledování nemocných

74 nemocných, od kterých byl odebrán vzorek nádorové tkáně v průběhu primárního resekčního výkonu pro nádorové onemocnění prsu, bylo následně léčeno podle doporučení ČOS ČLS JEP a následně dispenzarizováno či pouze dispenzarizováno na Onkologickém oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. Určení primárního klinicko-patologického obrazu bylo provedeno dle UICC viz kapitola 4. V průběhu léčby a dispenzarizace byl zdravotní stav pro potřeby studie hodnocen podle RECIST kritérií viz kapitola 9. 3. Nemocné byly sledovány do své smrti či do datumu poslední kontroly (1. 3. 2009).

3 Statistická analýza¹

Expresí jednotlivých genů ve zdravé a nádorové tkáni byla popsána pomocí deskriptivních statistických parametrů, jako je minimum, maximum, medián, průměr.

Klinicko-patologická charakteristika byla shrnuta pomocí tabulek četnosti. Rozdíl mezi expresí genů v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni a rozdíl genové exprese genů podle rozvoje progresu do pěti let od primární operace byla hodnocena pomocí neparametrického Mann-Whitneova testu. Neparametrický Mann-Whitneův test a Kruskal-Wallis test (ANOVA) byly použity k hodnocení vztahu mezi genovou expresí a klinickopatologickými parametry. Analýza přežití byla hodnocena pomocí Kaplan-Meierovy analýzy. Rozdíl v přežití byl stanoven pomocí log-rank testu. Grafické zpracování bylo provedeno pomocí programu STATISTICA pro Windows 8.0.

¹ Application of breast cancer risk prediction models in clinical practice
Susan M. Domchek, Andrea Eisen, Kathleen Calzone, Jill Stopfer, Anne Blackwood, Barbara L. Weber *Journal of Clinical Oncology*. Volume 21, Issue 4, p. 593-601, February, 2003.

Breast cancer risk assessment models: applicability to African-American women
Melissa L. Bondy, Ph.D., Lisa A. Newman, M. D *Cancer*. Volume 97, Issue S1, p. 236-245, December 2002.

Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals

Thomas S. Frank, Amie M. Deffenbaugh, Julia E. Reid, Mark Hulick, Brian E. Ward, Beth Lingenfelter, Kathi L. Gumpfer, Thomas Scholl, Sean V. Tavtigian, Dmitry R. Pruss, Gregory C. Critchfield. *Journal of Clinical Oncology*. Volume 20, Issue 6: p. 1480-1490, March 2002.

Limitations of the Gail Model in the specialized breast cancer risk assessment clinic
David M. Euhus, MD, A. Marilyn Leitch, MD, James F. Huth, MD, and George N. Peters, MD. *The Breast Journal*. Volume 8 Issue 1: p 23, January/February 2002.

Understanding mathematical models for breast cancer risk assessment and counseling
David M. Euhus, MD. *The Breast Journal*. Volume 7, Issue 4: p. 224, July 2001.
(A literature review)

The effectiveness of the Gail Model in estimating risk for development of breast cancer in women under 40 years of age
Gasan Mackarem, MD, Constance A. Roche, MSN, RN, CS, and Kevin S. Hughes, MD. *The Breast Journal*. Volume 7, Issue 1: p. 34-39, January 2001.

4 Výsledky

4.1 Klinicko patologická charakteristika souboru

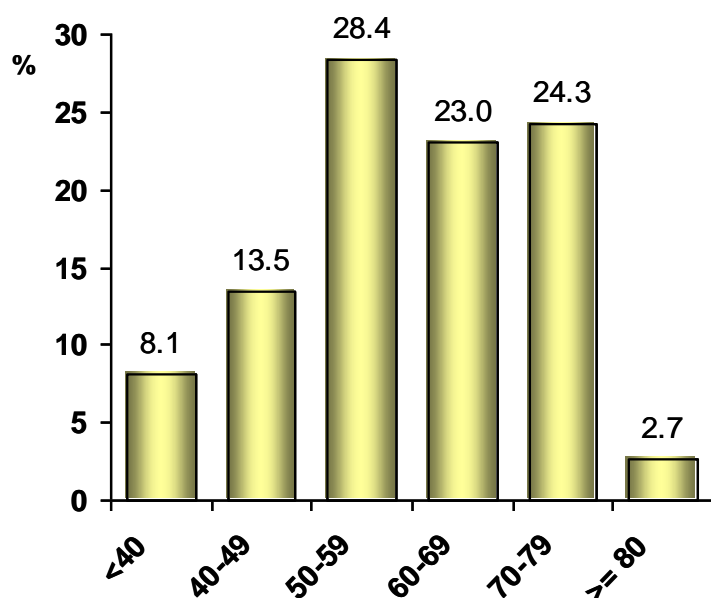
Soubor tvoří 74 pacientek po operaci pro invazivní karcinom prsu. V době operace byl jejich věk 31 – 85 let, medián (MED) 65 let. V době poslední kontroly k 1. 3. 2009 dvacet nemocných zemřelo a u pěti se zdravotní stav nepodařilo zjistit.

U 51,4% nemocných bylo dosaženo kompletní remise, 8,1% dosáhlo parciální remise a 37,8% bylo v progresi. Medián přežití byl 4 roky. Vývojovou charakteristiku souboru uvádí tabulka 16.

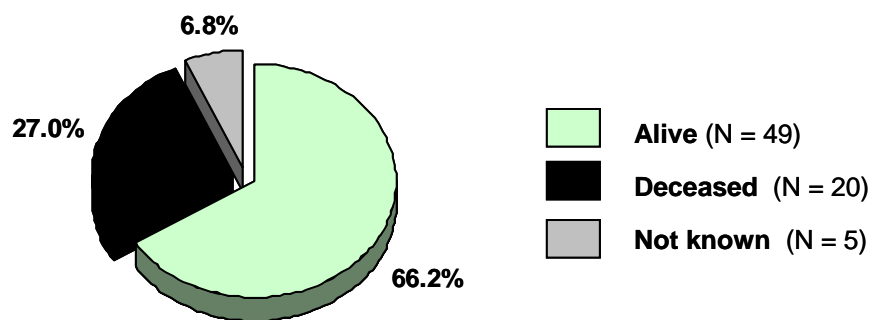
Tabulka 16 Charakteristika souboru nemocných

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum
Věk v době operace	74	59.6	60.0	31.0	85.0
Disease free interval*	25	4.3	4.0	0.1	9.1
Přežití*	20	4.0	4.0	0.4	7.7

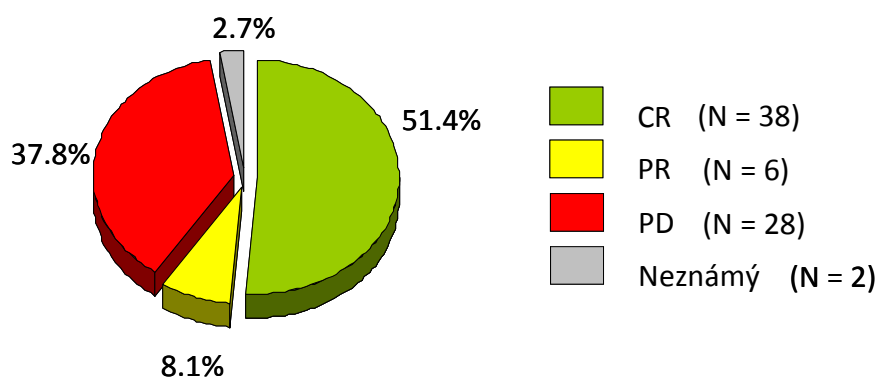
Nemůže být považováno jako řádná analýza přežití, tabulka popisuje pouze zemřelé či nemocné v progresi



Obrázek 3 Věkové rozložení souboru v době primární operace



Obrázek 4 Stav souboru nemocných v době poslední kontroly



Obrázek 5 Rozložení přeživších nemocných v době poslední kontroly

Tabulka 17 Klinicko-patologická charakteristika souboru

		N	%
T	Tis	1	1.4
	1	33	44.6
	2	34	45.9
	3	1	1.4
	4	5	6.8
N	0	41	55.4
	1	27	36.5
	2	1	1.4
	Missing	5	6.8
M	0	62	83.8
	1	2	2.7
	X	10	13.5
Stage	0	1	1.4
	1	17	23.0
	2A	21	28.4
	2B	12	16.2
	3A	3	4.1
	3B	5	6.8
	4	2	2.7
	Missing	13	17.6
Grading	1	3	4.1
	2	36	48.6
	3	22	29.7
	Missing	13	17.6
MIB	1	38	51.4
	2	25	33.8
	Missing	11	14.9
ER	ER-	12	16.2
	ER+	33	44.6
	Missing	29	39.2
PR	PR-	28	37.8
	PR+	23	31.1
	Missing	23	31.1
ER , PR	ER-PR-	11	14.9
	ER-PR+	1	1.4
	ER+PR-	11	14.9
	ER+PR+	22	29.7
	Missing	29	39.2

4.2 Rozdíl genové exprese mezi nádorovou a zdravou tkání

Expresie mRNA všech genů v nádorové tkáni je signifikantně vyšší oproti expresi stejného genu ve tkáni zdravé ($p < 0,001$). Také bylo zjištěno, že exprese všech genů stanovených ze vzorků nádorové tkáně nemocných s uzlinovým postižením je signifikantně vyšší než genová exprese mRNA stanovená ze vzorků nádorové tkáně odebrané nemocným bez uzlinového postižení ($p < 0,001$). Je nutné podotknout, že statistické hodnocení rozdílu exprese mRNA jednotlivých genů mezi zdravou a nádorovou tkáni je obtížné pro velký počet nulových expresí ve zdravé tkáni.

Tabulka 18 znázorňuje rozdíl exprese mRNA vybraných genů mezi nádorovou a zdravou tkáni. Tabulka 19 ukazuje rozdíl exprese mRNA vybraných genů v nádorové tkáni, odebrané nemocným s postižením uzlin v době operace oproti expresi mRNA stejného genu ve zdravé tkáni. Tabulka 20 je výsledkem porovnání exprese mRNA genů v nádorové tkáni nemocných bez uzlinového postižení s expresí mRNA stejného genu ve zdravé tkáni.

Tabulka 18 Srovnání genové exprese mezi zdravou a nádorovou tkání prsu

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
TIMP-1	DIC	74	677681.7	155707.5	0.0	9038545.5	< 0.001*
	Normal	27	0.8	0.0	0.0	5.0	
TIMP-1/GAPDH	DIC	74	7.5	1.0	0.0	118.0	< 0.001*
	Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.0	
p53	DIC	74	425.7	7.5	0.0	7837.0	< 0.001*
	Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.0	
p53/GAPDH	DIC	74	0.004	0.000	0.000	0.129	< 0.001*
	Normal	27	0.000	0.000	0.000	0.000	
MMP-7	DIC	74	1043373.2	4287.5	0.0	65502371.5	< 0.001*
	Normal	27	104.3	0.0	0.0	2340.0	
MMP-7/GAPDH	DIC	74	16.0	0.1	0.0	847.1	< 0.001*
	Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.3	

* Statisticky významný výsledek DIC – duktální invazivní karcinom, Normal – zdravá prsní tkáň

Tabulka 19 Srovnání genové exprese mezi zdravou tkání prsu a tkání odebranou pacientkám s pozitivními uzlinami (N+)

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
TIMP-1						
N+	28	926928.6	137180.0	0.0	9038545.5	< 0.001*
Normal	27	0.8	0.0	0.0	5.0	
TIMP-1/GAPDH						
N+	28	12.6	1.8	0.0	118.0	< 0.001*
Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.0	
p53						
N+	28	501.1	3.5	0.0	7837.0	0.001*
Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.0	
p53/GAPDH						
N+	28	0.007	0.000	0.000	0.129	0.001*
Normal	27	0.000	0.000	0.000	0.000	
MMP-7						
N+	28	19951.1	4766.5	0.0	291415.0	< 0.001*
Normal	27	104.3	0.0	0.0	2340.0	
MMP-7/GAPDH						
N+	28	0.4	0.1	0.0	4.4	< 0.001*
Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.3	

* Statisticky významný výsledek

Tabulka 20 Srovnání genové exprese mezi zdravou tkání prsu a nádorovou tkání odebranou pacientkám bez postižení mizních uzlin (N0)

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
TIMP-1						
N0	41	493410.7	163140.0	0.0	3418958.5	< 0.001*
Normal	27	0.8	0.0	0.0	5.0	
TIMP-1/GAPDH						
N0	41	4.0	0.7	0.0	26.2	< 0.001*
Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.0	
p53						
N0	41	329.3	17.5	0.0	4766.5	< 0.001*
Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.0	
p53/GAPDH						
N0	41	0.003	0.000	0.000	0.038	< 0.001*
Normal	27	0.000	0.000	0.000	0.000	
MMP-7						
N0	41	271389.7	3960.5	0.0	5911069.0	< 0.001*
Normal	27	104.3	0.0	0.0	2340.0	
MMP-7/GAPDH						
N0	41	7.9	0.1	0.0	144.5	< 0.001*
Normal	27	0.0	0.0	0.0	0.3	

* Statisticky významný výsledek

4.3 Genová exprese ve vztahu ke klinicko-patologickým parametrům

Tabulky 21 až 26 ukazují srovnání exprese mRNA p53, TIMP-1 a MMP-7 v nádorové tkáni nemocných, kteří byli rozděleni do skupin podle základní klinicko patologické charakteristiky.

Z těchto výsledků je nejdůležitější statisticky významná exprese p53 s ohledem na stupeň diferenciaci nádoru. Čím nižší je diferenciaci buněk nádoru, tím nižší je median genové exprese mRNA p53 viz obrázek 6 a 7. Expresí MMP-7 mRNA je statisticky významná ve vztahu s pozitivitou estrogenových receptorů. Medián genové exprese mRNA MMP-7 je statisticky významně vyšší u pacientek s ER negativním nádorem viz obrázek 8.

Tabulka 21 Expresí TIMP-1 ve vztahu k základním parametrům souboru

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
T	1	33	577298.0	176651.0	0.0	3418958.5	0.916
	2	34	785680.4	155707.5	0.0	9038545.5	
	3+4	6	725348.1	600554.3	3735.5	1658694.3	
N	NO	41	493410.7	163140.0	0.0	3418958.5	0.739
	N+	28	926928.6	137180.0	0.0	9038545.5	
M	0	62	764691.3	169895.5	0.0	9038545.5	0.135
	1	2	15133.0	15133.0	0.0	30266.0	
	X	10	270731.7	162146.5	0.0	1118131.0	
Stage	1	17	540232.6	140432.0	3.5	3418958.5	0.895
	2	33	819748.0	163140.0	0.0	9038545.5	
	3+4	10	774281.8	405676.8	0.0	2673508.5	
G	1	3	1236650.7	256345.0	6300.5	3447306.5	0.449
	2	36	635382.1	180050.5	0.0	3418958.5	
	3	22	779767.6	106072.4	0.0	9038545.5	
MIB	1	38	762219.6	133882.0	0.0	9038545.5	0.611
	2	25	613088.9	215320.0	0.0	3418958.5	
ER	ER-	12	677558.7	522086.0	3735.5	2251453.0	0.279
	ER+	33	731780.9	125539.0	0.0	9038545.5	
PR	PR-	28	435124.1	169895.5	0.0	1658694.3	0.757
	PR+	23	1035038.4	127332.0	0.0	9038545.5	
Total		74	677681.7	155707.5	0.0	9038545.5	

Tabulka 22 Exprese TIMP-1/GAPDH ve vztahu k základním parametrům souboru

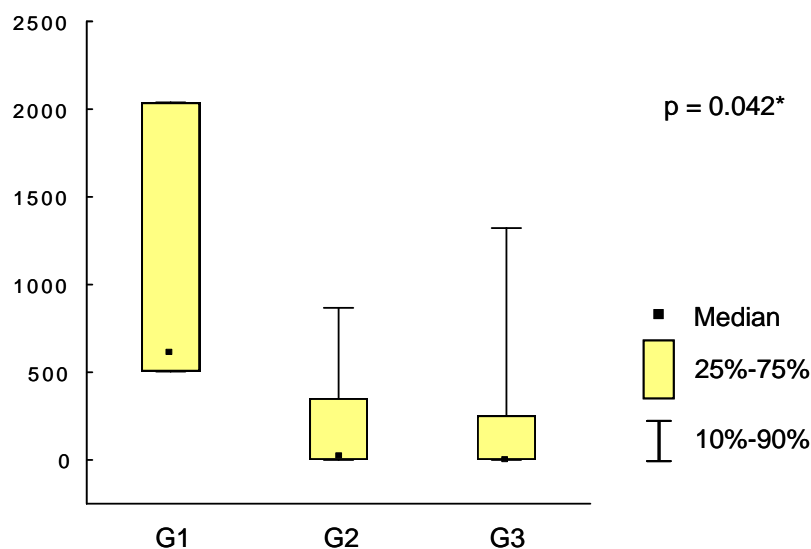
		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
T	1	33	7.4	1.5	0.0	101.1	0.803
	2	34	8.3	1.2	0.0	118.0	
	3+4	6	4.5	0.4	0.0	23.9	
N	N0	41	4.0	0.7	0.0	26.2	0.440
	N+	28	12.6	1.8	0.0	118.0	
M	0	62	8.7	1.6	0.0	118.0	0.016*
	1	2	0.0	0.0	0.0	0.0	
	X	10	1.3	0.3	0.0	8.7	
Stage	1	17	3.6	1.5	0.0	15.6	0.255
	2	33	12.5	2.4	0.0	118.0	
	3+4	10	3.3	0.4	0.0	23.9	
G	1	3	14.2	1.9	0.0	40.8	0.903
	2	36	8.1	0.7	0.0	101.1	
	3	22	8.7	1.5	0.0	118.0	
MIB	1	38	9.2	0.5	0.0	118.0	0.285
	2	25	6.2	2.0	0.0	32.8	
ER	ER-	12	4.8	0.6	0.0	23.9	0.771
	ER+	33	7.9	0.6	0.0	118.0	
PR	PR-	28	4.1	0.5	0.0	26.6	0.160
	PR+	23	10.1	2.2	0.0	118.0	
Total		74	7.5	1.0	0.0	118.0	

* Statisticky významný výsledek

Tabulka 23 Expres p53 ve vztahu k základním parametrům souboru

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
T	1	33	402.7	0.0	0.0	4766.5	0.783
	2	34	301.4	16.8	0.0	2039.0	
	3+4	6	1309.7	3.5	0.0	7837.0	
N	N0	41	329.3	17.5	0.0	4766.5	0.649
	N+	28	501.1	3.5	0.0	7837.0	
M	0	62	398.5	7.5	0.0	7837.0	0.315
	1	2	0.0	0.0	0.0	0.0	
	X	10	679.8	23.5	0.0	4766.5	
Stage	1	17	236.0	0.0	0.0	2392.5	0.306
	2	33	250.2	17.5	0.0	2039.0	
	3+4	10	922.6	0.0	0.0	7837.0	
G	1	3	1052.3	614.0	503.8	2039.0	0.042*
	2	36	373.3	17.8	0.0	4766.5	
	3	22	606.6	0.0	0.0	7837.0	
MIB	1	38	195.5	12.0	0.0	2039.0	0.722
	2	25	812.1	7.0	0.0	7837.0	
ER	ER-	12	282.8	22.5	0.0	2304.0	0.172
	ER+	33	234.9	0.0	0.0	2392.5	
PR	PR-	28	336.7	0.0	0.0	7837.0	0.903
	PR+	23	416.7	0.0	0.0	2392.5	
Total		74	425.7	7.5	0.0	7837.0	

* Statisticky významný výsledek

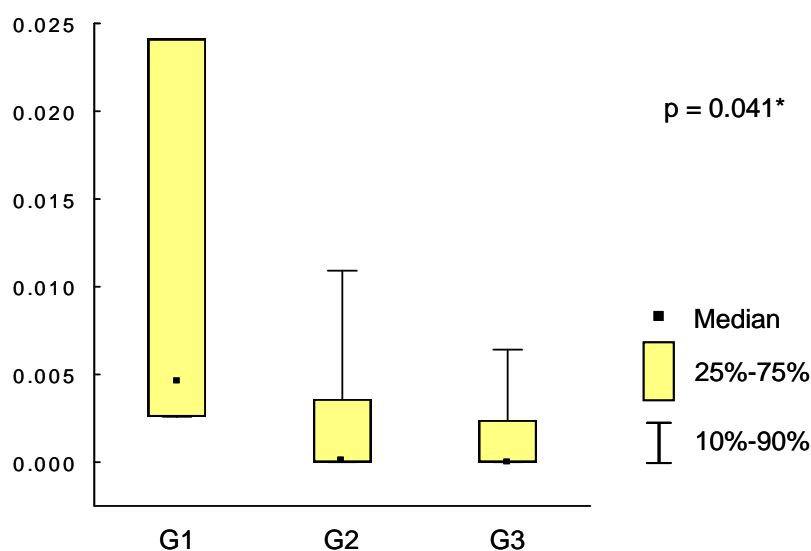


Obrázek 6 Box-plot exprese mRNA p53 v závislosti na diferenciaci nádoru

Tabulka 24 Expres p53/GAPDH ve vztahu k základním parametrům souboru

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
T	1	33	0.002	0.000	0.000	0.017	0.759
	2	34	0.004	0.000	0.000	0.038	
	3+4	6	0.022	0.000	0.000	0.129	
N	N0	41	0.003	0.000	0.000	0.038	0.851
	N+	28	0.007	0.000	0.000	0.129	
M	0	62	0.005	0.000	0.000	0.129	0.348
	1	2	0.000	0.000	0.000	0.000	
	X	10	0.003	0.000	0.000	0.017	
Stage	1	17	0.002	0.000	0.000	0.016	0.209
	2	33	0.004	0.000	0.000	0.038	
	3+4	10	0.013	0.000	0.000	0.129	
G	1	3	0.010	0.005	0.003	0.024	0.041*
	2	36	0.004	0.000	0.000	0.038	
	3	22	0.008	0.000	0.000	0.129	
MIB	1	38	0.003	0.000	0.000	0.038	0.712
	2	25	0.008	0.000	0.000	0.129	
ER	ER-	12	0.002	0.000	0.000	0.006	0.189
	ER+	33	0.002	0.000	0.000	0.024	
PR	PR-	28	0.005	0.000	0.000	0.129	0.786
	PR+	23	0.003	0.000	0.000	0.024	
Total		74	0.004	0.000	0.000	0.129	

* Statisticky významný výsledek.

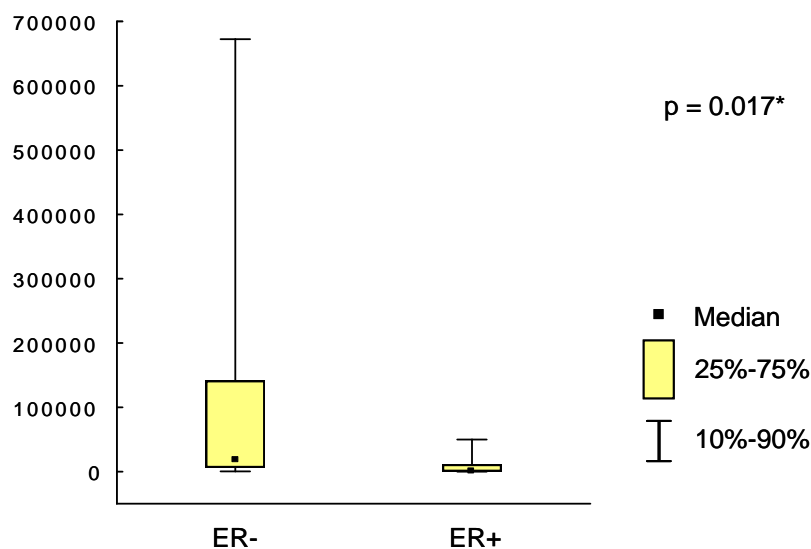


Obrázek 7 Box-plot ukazující expresi p53/GAPDH v závislosti na stupni diferenciace nádoru

Tabulka 25 Expres mRNA MMP-7 ve vztahu k základním parametrům souboru

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
T	1	33	2209147.3	11657.3	0.0	65502371.5	0.168
	2	34	115072.4	3374.6	0.0	3111811.5	
	3+4	6	65881.8	26791.6	0.0	291415.0	
N	N0	41	271389.7	3960.5	0.0	5911069.0	0.207
	N+	28	19951.1	4766.5	0.0	291415.0	
M	0	62	1227691.5	3855.5	0.0	65502371.5	0.209
	1	2	298.8	298.8	0.0	597.5	
	X	10	109214.7	12835.2	0.0	672681.5	
Stage	1	17	364936.4	11657.3	0.0	5911069.0	0.447
	2	33	120390.4	2263.5	0.0	3111811.5	
	3+4	10	42262.7	10697.3	0.0	291415.0	
G	1	3	126461.4	71852.8	7386.0	300145.5	0.132
	2	36	280406.4	6822.3	0.0	5911069.0	
	3	22	3017116.2	1621.8	0.0	65502371.5	
MIB	1	38	28605.8	3523.6	0.0	300145.5	0.210
	2	25	3026690.8	13254.5	0.0	65502371.5	
ER	ER-	12	5546584.6	18343.3	0.0	65502371.5	0.017*
	ER+	33	198082.5	980.0	0.0	5911069.0	
PR	PR-	28	174415.3	12237.3	0.0	3111811.5	0.271
	PR+	23	3115549.0	1352.0	0.0	65502371.5	
Total		74	1043373.2	4287.5	0.0	65502371.5	

* Statisticky významný výsledek.

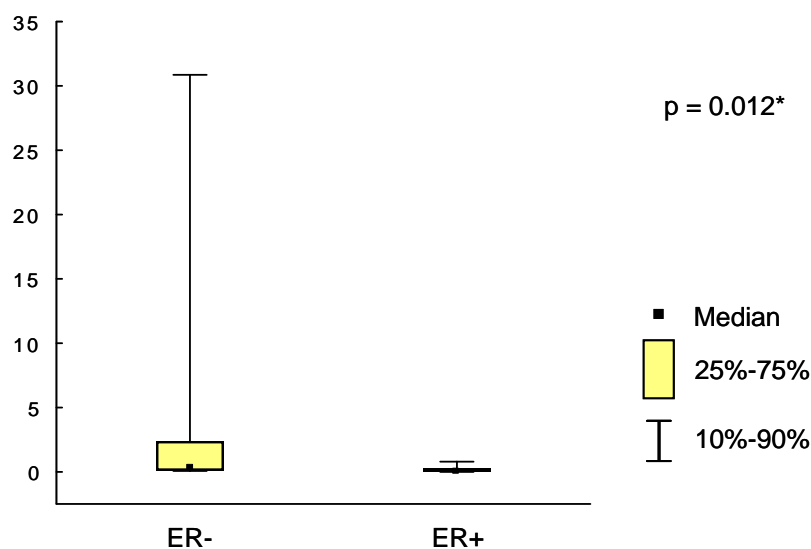


Obrázek 8 Box-plot exprese mRNA MMP-7 v závislosti na stavu estrogenového recepturu.

Tabulka 26 Expresse MMP-7/GAPDH ve vztahu k základním parametrům souboru

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
T	1	33	30.2	0.2	0.0	847.1	0.146
	2	34	5.3	0.1	0.0	144.5	
	3+4	6	0.9	0.5	0.0	3.2	
N	N0	41	7.9	0.1	0.0	144.5	0.433
	N+	28	0.4	0.1	0.0	4.4	
M	0	62	19.0	0.1	0.0	847.1	0.311
	1	2	0.0	0.0	0.0	0.0	
	X	10	0.7	0.1	0.0	3.8	
Stage	1	17	8.1	0.2	0.0	132.8	0.824
	2	33	5.6	0.1	0.0	144.5	
	3+4	10	0.6	0.1	0.0	3.2	
G	1	3	1.1	0.5	0.2	2.7	0.349
	2	36	8.9	0.1	0.0	144.5	
	3	22	39.1	0.1	0.0	847.1	
MIB	1	38	0.4	0.1	0.0	4.4	0.055
	2	25	46.6	0.2	0.0	847.1	
ER	ER-	12	73.7	0.3	0.0	847.1	0.012*
	ER+	33	4.2	0.0	0.0	132.8	
PR	PR-	28	6.8	0.1	0.0	144.5	0.333
	PR+	23	42.8	0.0	0.0	847.1	
Total		74	16.0	0.1	0.0	847.1	

*Statisticky významný výsledek



Obrázek 9 Expresse mRNA MMP-7/GAPDH v závislosti na expresi ER

4.4 Genová exprese ve vztahu k vybraným skupinám nemocných

Porovnávali jsme expresi jednotlivých genů mezi skupinami nemocných rozdělených do charakteristických skupin. Porovnávali jsme expresi mRNA p53, MMP-7 a TIMP-1 ve skupinách:

- Klinického stadia I oproti nemocným klinického stadia II
- Nemocné bez postižení mizních uzlin oproti nemocným s postiženými lokoregionálními uzlinami
- Nemocné ER+PR+ oproti ER-PR-
- Nemocné s nádory dobře diferencovanými G1 oproti nemocným s nádory středně G2 a špatně diferencovanými G3

Tabulky 27 až 32 ukazují míru exprese v jednotlivých skupinách. Statisticky významný výsledek byl nalezen pouze u exprese mRNA pro p53 ($p = 0,032$), kdy median exprese mRNA p53 byl vyšší u nemocných s nádorem G1 oproti nemocným s nádorem G2. Tento výsledek je ovlivněn nedostatečným počtem nemocných ve skupině a nemůže být považován za spolehlivý. Grafické znázornění je na obrázku 10.

Tabulka 27 Expresse mRNA TIMP-1 ve vztahu k vybraným skupinám nemocných

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
Stage						
1	17	540232.6	140432.0	3.5	3418958.5	0.641
2	33	819748.0	163140.0	0.0	9038545.5	
N and M						
NOM0	34	530878.3	151786.0	0.0	3418958.5	0.325
N+M0	25	1037228.6	176651.0	0.0	9038545.5	
ER and PR						
ER+PR+	22	979746.8	126435.5	0.0	9038545.5	0.749
ER-PR-	11	534477.4	470955.0	3735.5	1658694.3	
Grading I						
2	36	635382.1	180050.5	0.0	3418958.5	0.222
3	22	779767.6	106072.4	0.0	9038545.5	
Grading II						
1	3	1236650.7	256345.0	6300.5	3447306.5	0.709
2	36	635382.1	180050.5	0.0	3418958.5	

Tabulka 28 Hodnoty exprese mRNA TIMP-1/GAPDH ve vztahu k vybraným skupinám

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
Stage						
1	17	3.6	1.5	0.0	15.6	0.417
2	33	12.5	2.4	0.0	118.0	
N and M						
NOMO	34	4.5	1.1	0.0	26.2	0.333
N+M0	25	14.1	2.3	0.0	118.0	
ER and PR						
ER+PR+	22	10.3	1.8	0.0	118.0	0.611
ER-PR-	11	4.7	0.6	0.0	23.9	
Grading I						
2	36	8.1	0.7	0.0	101.1	0.769
3	22	8.7	1.5	0.0	118.0	
Grading II						
1	3	14.2	1.9	0.0	40.8	0.709
2	36	8.1	0.7	0.0	101.1	

Tabulka 29 Exprese mRNA p53 ve vztahu k jednotlivým skupinám

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
Stage						
1	17	236.0	0.0	0.0	2392.5	0.199
2	33	250.2	17.5	0.0	2039.0	
N and M						
NOMO	34	222.6	8.8	0.0	2392.5	0.814
N+M0	25	561.2	7.0	0.0	7837.0	
ER and PR						
ER+PR+	22	330.9	0.0	0.0	2392.5	0.510
ER-PR-	11	99.0	14.0	0.0	445.0	
Grading I						
2	36	373.3	17.8	0.0	4766.5	0.216
3	22	606.6	0.0	0.0	7837.0	
Grading II						
1	3	1052.3	614.0	503.8	2039.0	0.032*
2	36	373.3	17.8	0.0	4766.5	

* Statisticky významný výsledek

Tabulka 30 Hodnoty exprese mRNA p53/GAPDH ve vztahu k vybraným skupinám

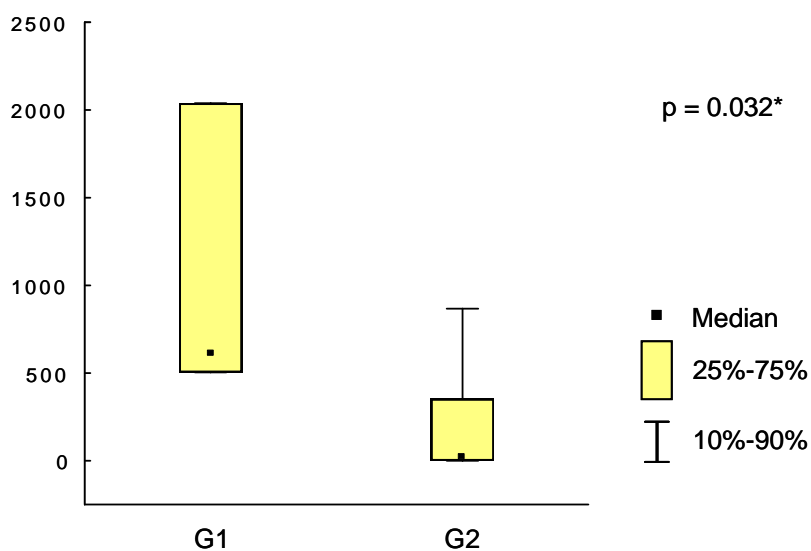
		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
Stage							
	1	17	0.002	0.000	0.000	0.016	0.115
	2	33	0.004	0.000	0.000	0.038	
N and M							
	NOM0	34	0.003	0.000	0.000	0.038	0.653
	N+M0	25	0.008	0.000	0.000	0.129	
ER and PR							
	ER+PR+	22	0.002	0.000	0.000	0.024	0.560
	ER-PR-	11	0.001	0.000	0.000	0.004	
Grading I							
	2	36	0.004	0.000	0.000	0.038	0.131
	3	22	0.008	0.000	0.000	0.129	
Grading II							
	1	3	0.010	0.005	0.003	0.024	0.069
	2	36	0.004	0.000	0.000	0.038	

Tabulka 31 Tabulka 19 Exprese mRNA MMP-7 ve vztahu k vybraným skupinám

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
Stage							
	1	17	364936.4	11657.3	0.0	5911069.0	0.214
	2	33	120390.4	2263.5	0.0	3111811.5	
N and M							
	NOM0	34	295304.8	3082.6	0.0	5911069.0	0.958
	N+M0	25	22338.7	7109.0	0.0	291415.0	
ER and PR							
	ER+PR+	22	279784.3	1166.0	0.0	5911069.0	0.058
	ER-PR-	11	96058.5	13662.5	0.0	672681.5	
Grading I							
	2	36	280406.4	6822.3	0.0	5911069.0	0.216
	3	22	3017116.2	1621.8	0.0	65502371.5	
Grading II							
	1	3	126461.4	71852.8	7386.0	300145.5	0.155
	2	36	280406.4	6822.3	0.0	5911069.0	

Tabulka 32 Expres mRNA MMP-7/GAPDH ve vztahu k vybraným skupinám

	N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
Stage						
1	17	8.1	0.2	0.0	132.8	0.516
2	33	5.6	0.1	0.0	144.5	
N and M						
NOM0	34	9.3	0.1	0.0	144.5	0.921
N+M0	25	0.5	0.1	0.0	4.4	
ER and PR						
ER+PR+	22	6.2	0.0	0.0	132.8	0.058
ER-PR-	11	3.4	0.3	0.0	30.9	
Grading I						
2	36	8.9	0.1	0.0	144.5	0.781
3	22	39.1	0.1	0.0	847.1	
Grading II						
1	3	1.1	0.5	0.2	2.7	0.112
2	36	8.9	0.1	0.0	144.5	

**Obrázek 10** Expres mRNA p53 podle stupně diferenciace nádoru

4.5 Porovnání míry genové exprese podle vzniku progresse do pěti let od primární operace

Tabulka 33 ukazuje vztah genové exprese mRNA jednotlivých genů podle vzniku progresse v pěti letech od primární operace.

Progresi jsme definovali podle RECIST kritérií viz kapitola 9.

Ani u jednoho z genů se nepodařilo zjistit statisticky významný rozdíl mezi skupinami nemocných, u kterých došlo k progresi onemocnění v prvních pěti letech od operace oproti nemocným, kteří zůstali v remisi. Do analýzy vstoupilo 59 nemocných, u dvou nemocných se stav v době poslední kontroly nepodařilo zjistit, 8 nemocných nebylo v remisi a pět nemocných v kompletní remisi bylo sledováno kratší dobu než pět let.

Tabulka 33 Expresse mRNA vybraných genů podle rozvoje progresse do pěti let od operace

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	p-value
TIMP-1	Progression	16	1400228.9	472702.1	3735.5	9038545.5	0.141
	Remission	43	533547.3	176651.0	0.0	3447306.5	
TIMP-1/GAPDH	Progression	16	18.0	2.0	0.0	118.0	0.348
	Remission	43	5.6	1.1	0.0	40.8	
p53	Progression	16	255.4	20.5	0.0	2392.5	0.729
	Remission	43	238.3	8.0	0.0	2039.0	
p53/GAPDH	Progression	16	0.002	0.000	0.000	0.011	0.606
	Remission	43	0.003	0.000	0.000	0.038	
MMP-7	Progression	16	455793.8	12455.9	0.0	5911069.0	0.093
	Remission	43	99637.2	3296.8	0.0	3111811.5	
MMP-7/GAPDH	Progression	16	11.0	0.4	0.0	132.8	0.097
	Remission	43	3.7	0.1	0.0	144.5	

4.6 Analýza délky bezpříznakového období - Disease free survival (DFS)

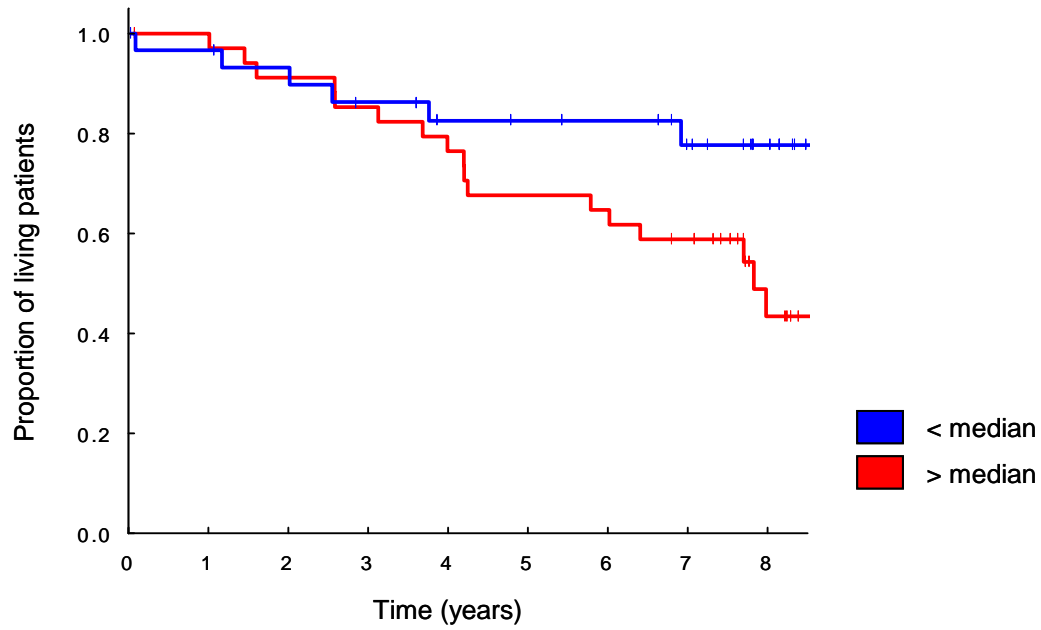
Vztah mezi délkou bezpříznakového období a mírou exprese mRNA vybraných genů ukazuje tabulka 34 a obrázky 11-16. Nemocní byli rozděleni do dvou skupin podle mediánu exprese daného genu v nádorové tkáni.

Bezpříznakové období bylo statisticky významně delší u nemocných s expresí mRNA MMP-7 pod median ($p = 0.017$), u ostatních genů nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami. Nicméně z výsledků vyplývá, že pacienti s nižší genovou expresí mRNA TIMP-1 a p53 mají lepší pětileté přežití, které v době hodnocení není statisticky významné nejspíše pro nedostatečný počet nemocných a relativně krátkou dobu sledování u karcinomu prsu.

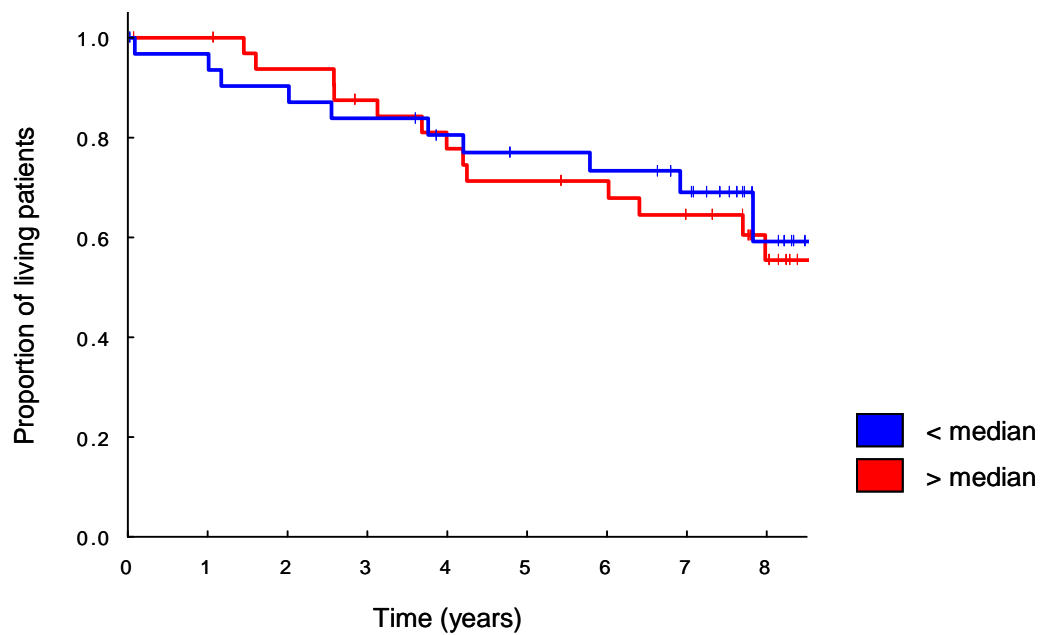
Tabulka 34 DFS podle mediánu genové exprese

	N	5 year survival (%; 95% IS)	p-value
TIMP-1			
< median	31	82.6 (75.4; 89.7)	0.117
> median	35	67.6 (59.6; 75.7)	
TIMP-1/GAPDH			
< median	32	77.0 (69.4; 84.7)	0.764
> median	34	71.3 (63.2; 79.4)	
p53			
< median	32	77.0 (69.4; 84.7)	0.669
> median	34	71.9 (64.0; 79.9)	
p53/GAPDH			
< median	32	77.0 (69.4; 84.7)	0.669
> median	34	71.9 (64.0; 79.9)	
MMP-7			
< median	33	87.4 (81.5; 93.3)	0.017*
> median	33	60.7 (51.8; 69.5)	
MMP-7/GAPDH			
< median	32	79.9 (72.5; 87.2)	0.152
> median	34	69.2 (61.1; 77.3)	

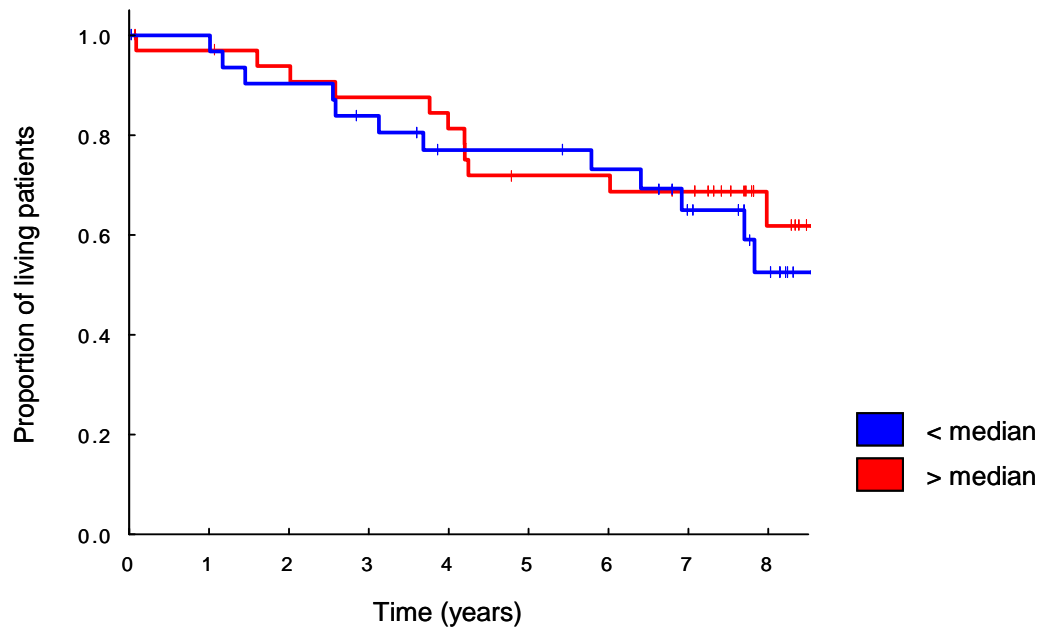
* Statisticky významný výsledek.



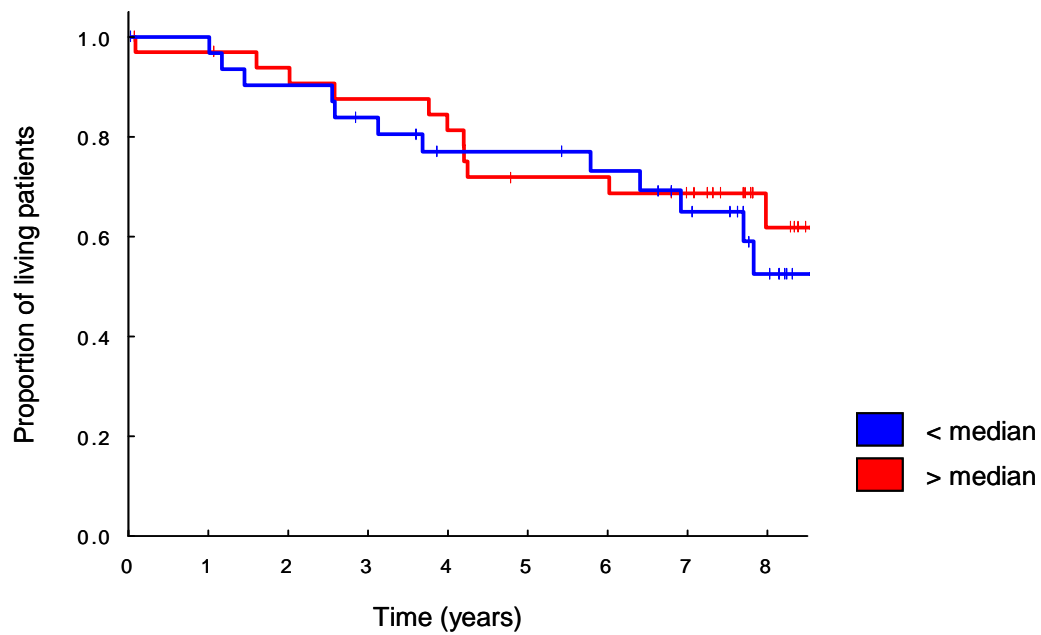
Obrázek 11 DFS podle exprese mRNA TIMP1 (podle medianu)



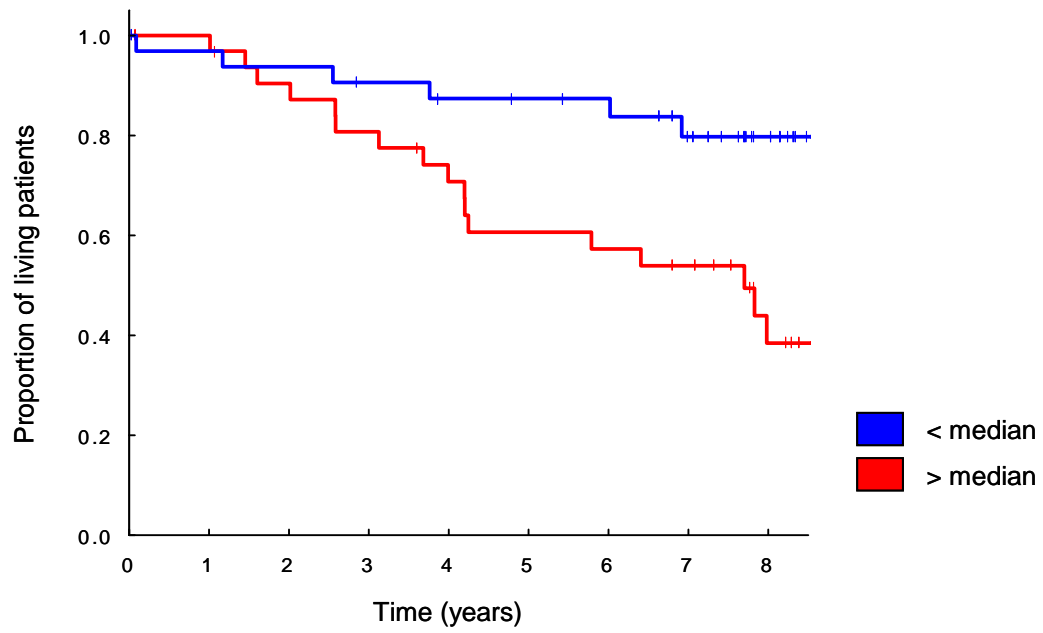
Obrázek 12 DFS podle exprese mRNA TIMP1/GAPDH (podle medianu)



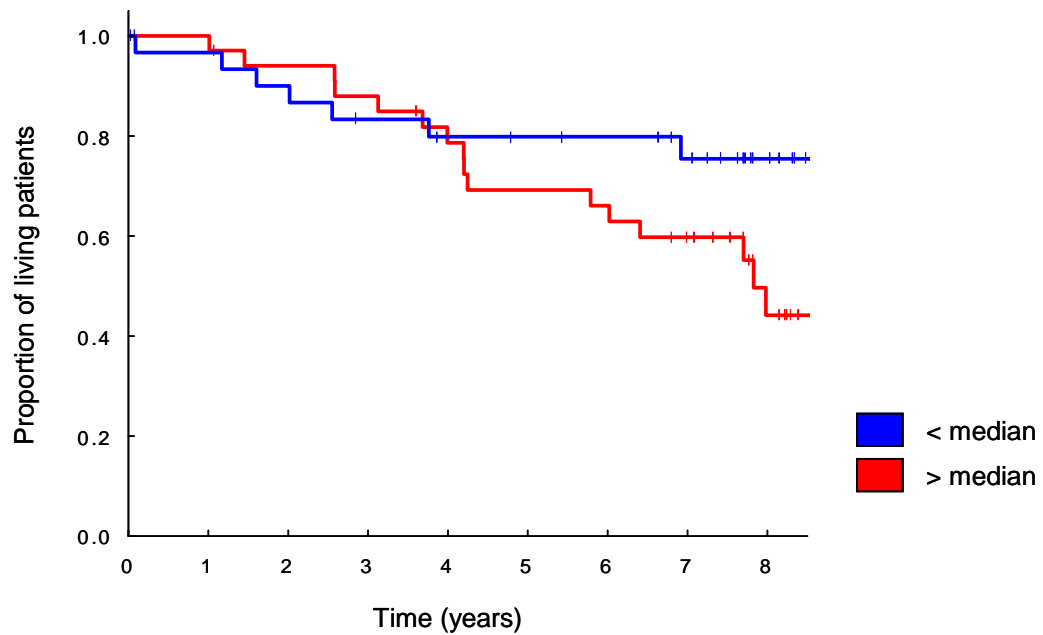
Obrázek 13 DFS exprese mRNA p53 (podle mediánu)



Obrázek 14 DFS podle p53/GAPDH (podle mediánu)



Obrázek 15 DFS exprese mRNA MMP-7 (podle medianu)



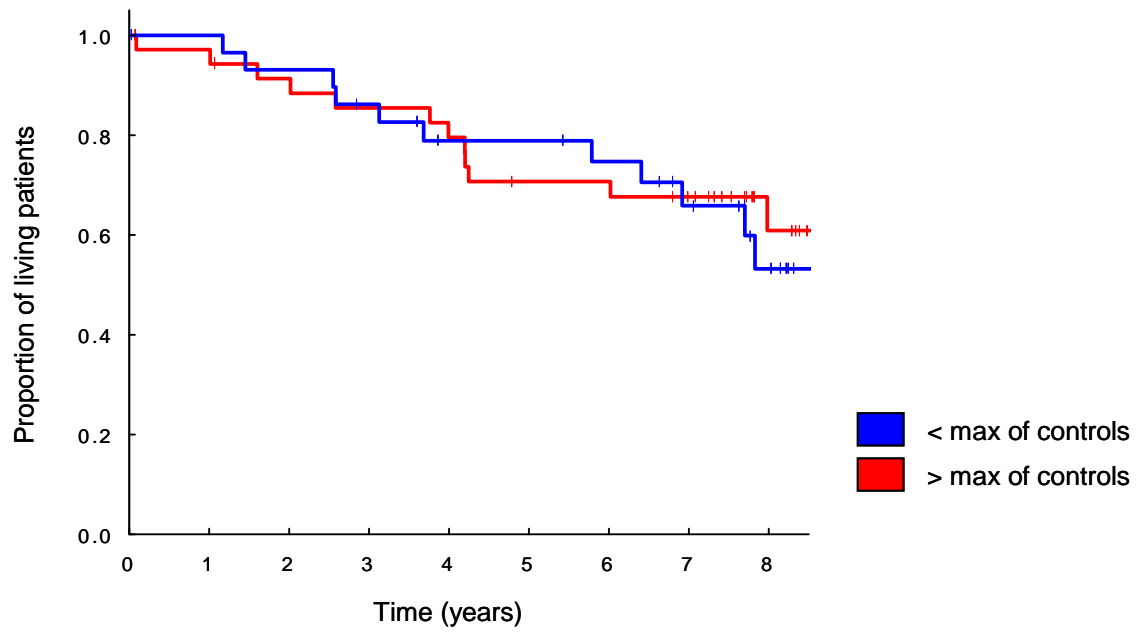
Obrázek 16 DFS exprese MMP-7/GAPDH (podle mediánu)

Tabulka 35 a obrázky 17 až 20 ukazují rozdíl v přežití a délce bezpříznakového období mezi nemocnými, které jsme rozdělili podle maxima genové exprese mRNA jednotlivých genů změřeného ve zdravé tkáni. Porovnání délky bezpříznakového období u nemocných s expresí mRNA TIMP-1, TIMP-1/GAPDH vyšší než maximum této exprese ve zdravé tkáni nemohlo být spočteno pro nízký počet nemocných v daných skupinách.

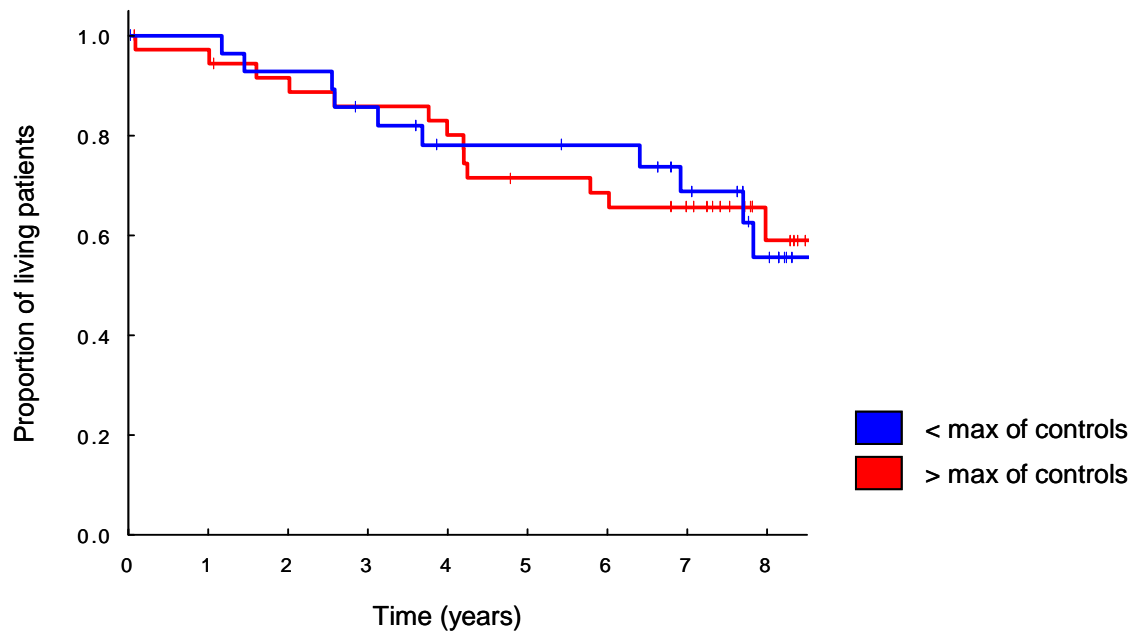
Ze statistického hodnocení vyplývá, že nemocní s nižší expresí (pod maximum naměřené ve zdravé tkáni) mRNA všech vybraných genů mají delší pětileté přežití. Rozdíl není zatím signifikantní pro malý počet nemocných ve skupinách, ale také pro relativně krátkou dobu sledování u karcinomu prsu.

Tabulka 35 Vztah DFS a genové exprese mRNA p53, MMP-7 v nádorové tkáni (rozdělení podle maximální naměřené hodnoty exprese ve zdravé tkáni)

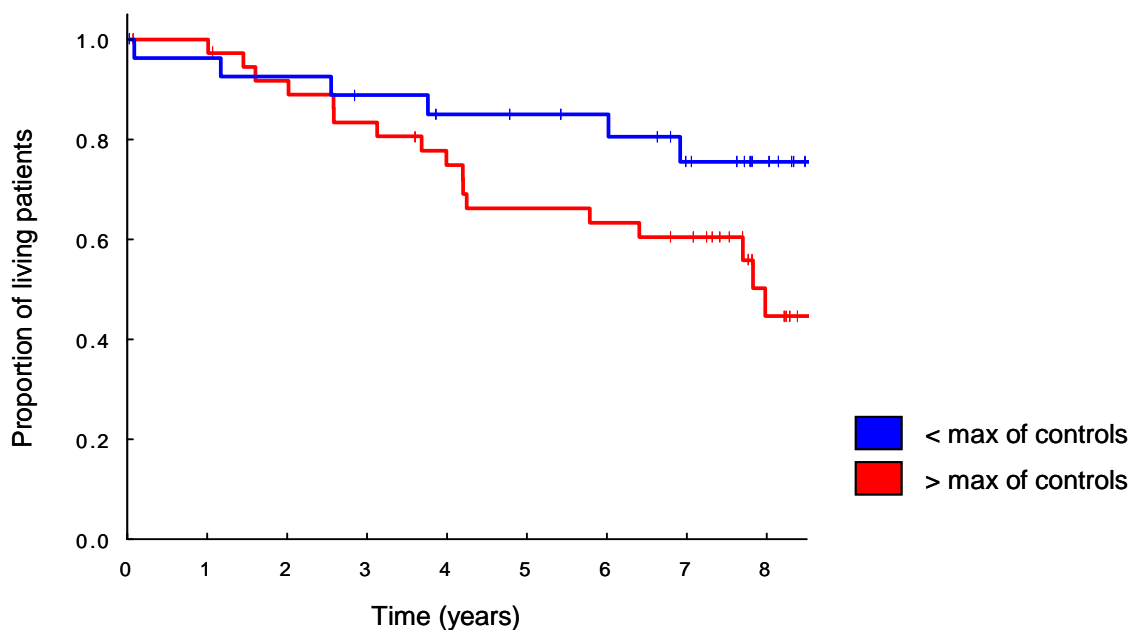
	N	5 year survival (%; 95% IS)	p-value
p53			
< maximum	30	78.9 (71.2; 86.5)	0.846
> maximum	36	70.7 (62.9; 78.5)	
p53/GAPDH			
< maximum	29	78.1 (70.2; 86.0)	0.930
> maximum	37	71.5 (63.9; 79.2)	
MMP-7			
< maximum	28	85.0 (78.1; 91.9)	0.128
> maximum	38	66.2 (58.3; 74.2)	
MMP-7/GAPDH			
< maximum	47	81.8 (76.0; 87.6)	0.051
> maximum	19	55.7 (44.0; 67.4)	



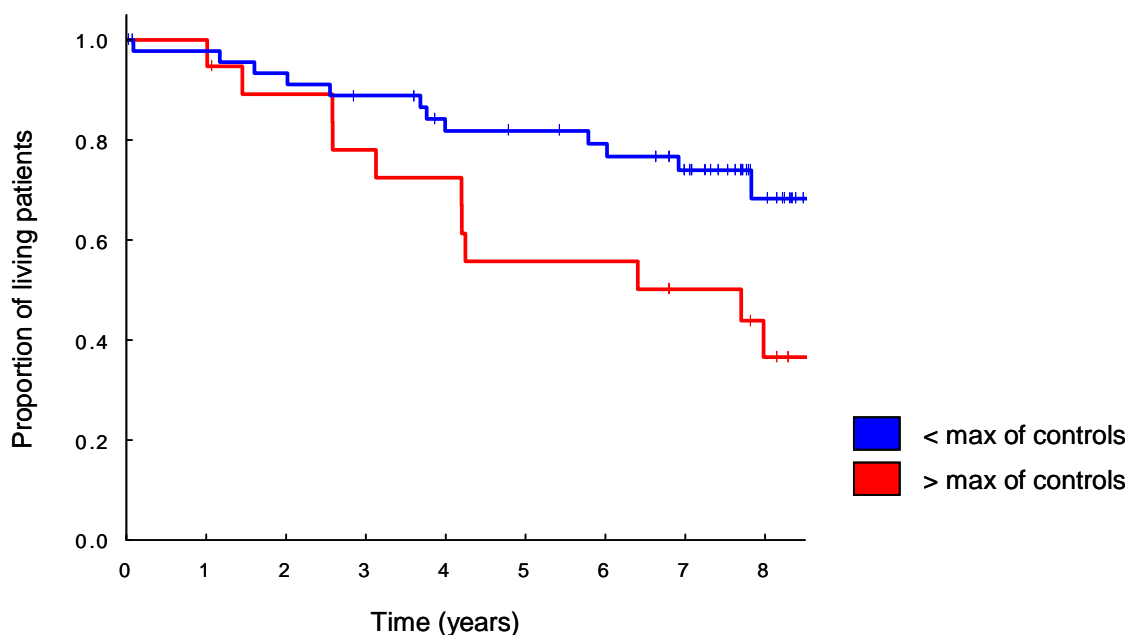
Obrázek 17 DFS v závislosti na expresi mRNA p53 (podle maxima ve zdravé tkáni)



Obrázek 18 DFS ve vztahu k expresi MMP7/GAPDH podle maxima



Obrázek 19 DFS v závislosti na expresi mRNA p53/GAPDH (podle maxima ve zdravé tkáni)



Obrázek 20 DFS v závislosti na expresi mRNA MMP7/GAPDH (podle maxima ve zdravé tkáni)

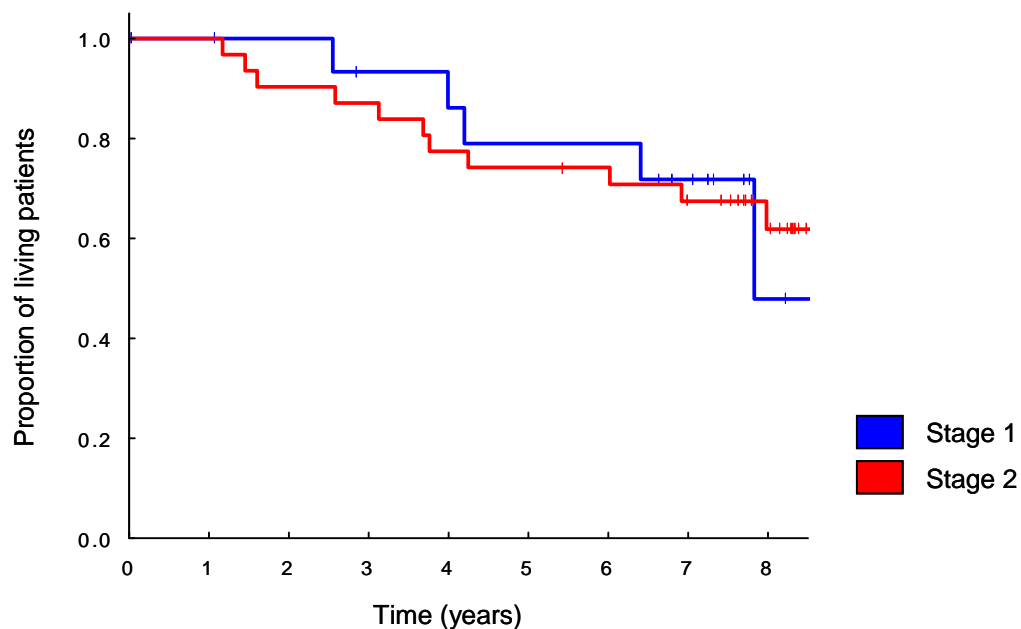
Tabulka 36 a grafy na obrázku 21 až 27 ukazují vztah mezi délkou bezpříznakového období a základní klinicko-patologickou charakteristikou souboru. Srovnání bylo provedeno za účelem srovnání vlivu základních prognostických faktorů v našem souboru.

Statisticky významný rozdíl v délce bezpříznakového období byl nalezen mezi nemocnými s ER+ a ER-. Nemocné s negativitou estrogenových receptorů byly bez známek nemoci 46,7 měsíce oproti 76,8 měsíce u nemocných s pozitivitou estrogenových receptorů. Ostatní srovnání bylo nesignifikantní.

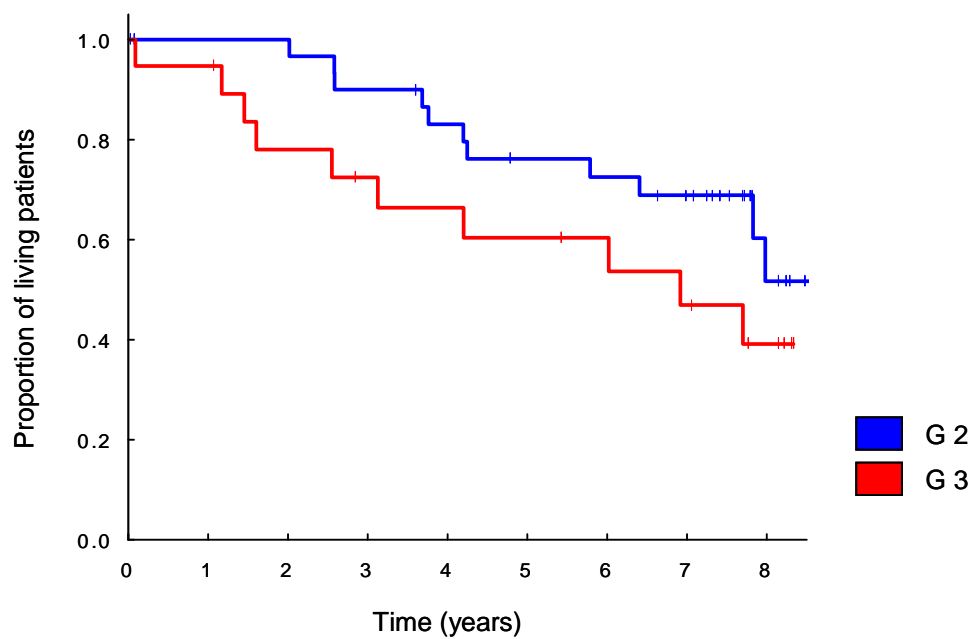
Tabulka 36 DFS ve vztahu ke klinicko-patologické charakteristice souboru

		N	5 year survival (%; 95% IS)	p-value
Stage	1	17	79.0 (68.2; 89.8)	0.873
	2	31	74.2 (66.3; 82.1)	
G	2	32	76.2 (68.3; 84.0)	0.151
	3	19	60.4 (48.7; 72.1)	
T	1	31	74.3 (65.9; 82.7)	0.741
	2	29	79.0 (71.4; 86.6)	
N	N0	40	85.5 (79.5; 91.5)	0.070
	N+	22	54.5 (43.9; 65.2)	
MIB	1	36	80.5 (73.8; 87.1)	0.059
	2	21	58.7 (47.4; 69.9)	
ER	ER-	10	46.7 (30.1; 63.2)	0.038*
	ER+	31	76.8 (69.1; 84.5)	
PR	PR-	23	68.3 (58.3; 78.2)	0.511
	PR+	22	72.0 (62.2; 81.7)	

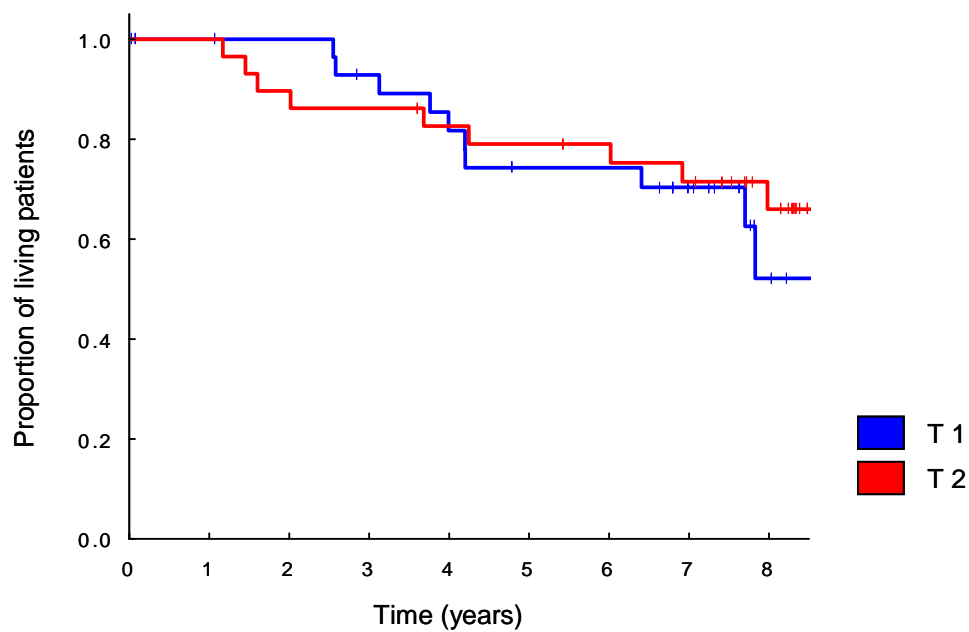
* Statisticky významný výsledek



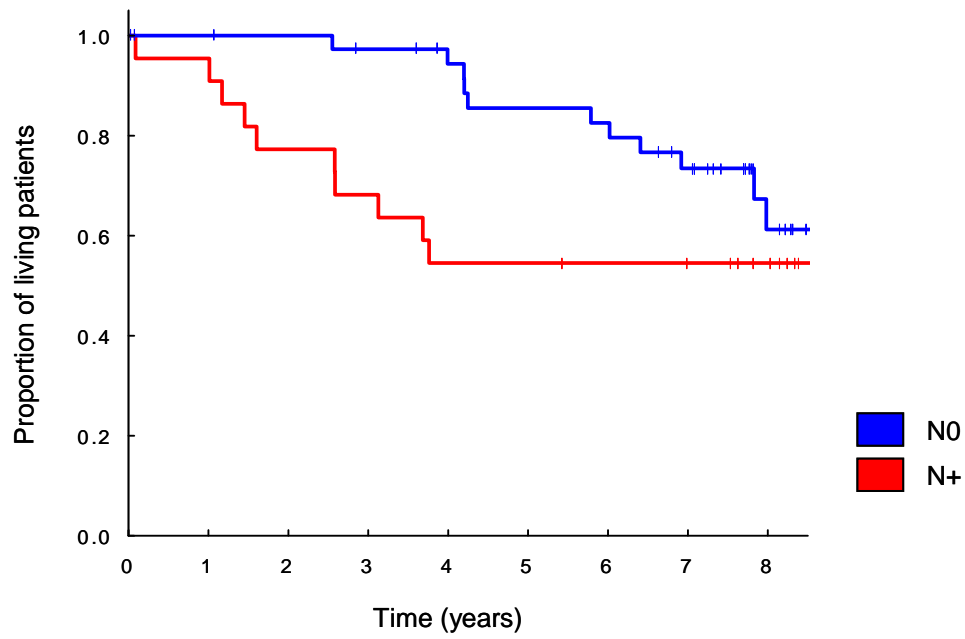
Obrázek 21 DFS ve vztahu ke stadiu nemoci



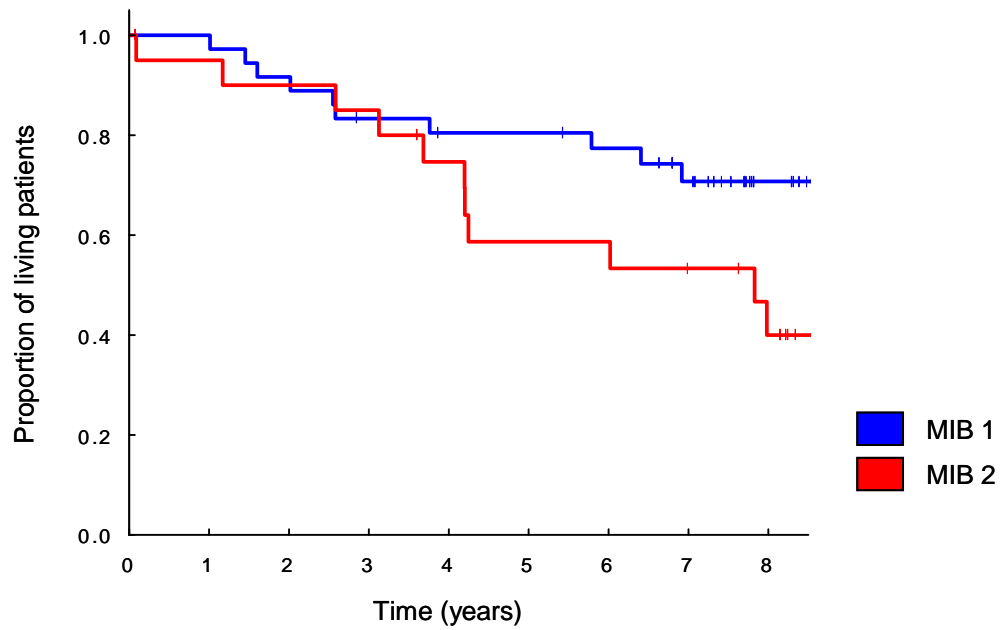
Obrázek 22 DFS ve vztahu k diferenciaci nádoru



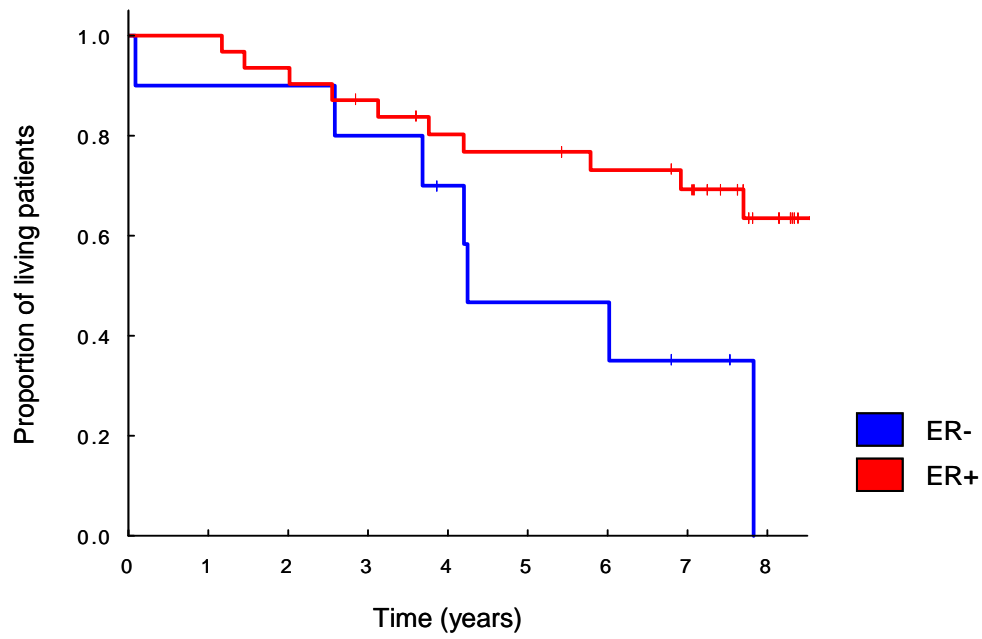
Obrázek 23 DFS ve vztahu k velikosti nádoru



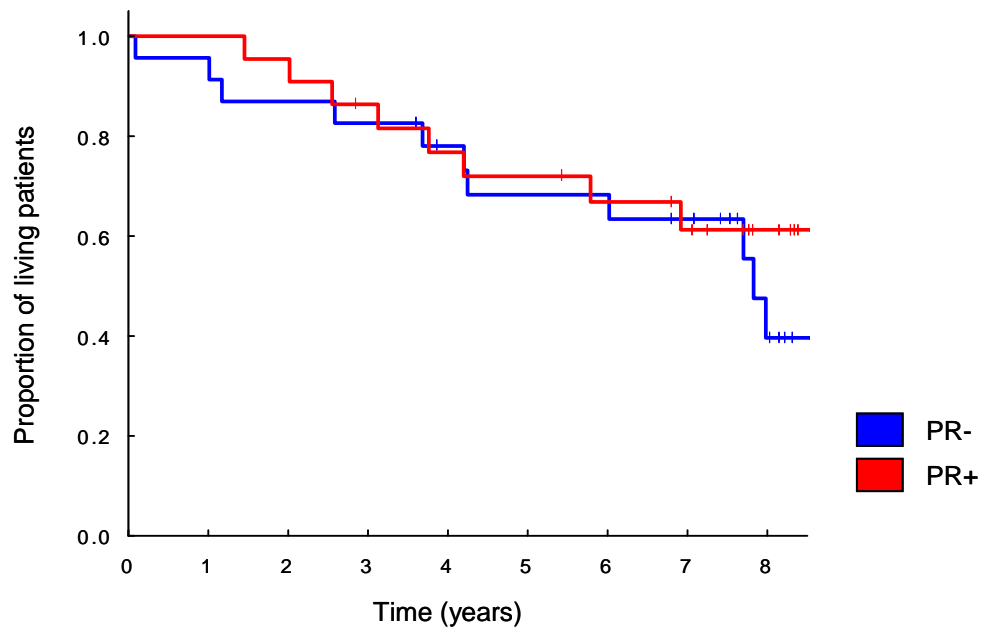
Obrázek 24 DFS ve vztahu k postižení uzlin



Obrázek 25 DFS ve vztahu k mitotické aktivitě nádoru



Obrázek 26 DFS ve vztahu k expresi estrogenového receptoru



Obrázek 27 DFS ve vztahu k expresi progesteronového receptoru

5 Zhodnocení výsledků

5.1 MMP-7

Potvrdili jsme, že exprese mRNA MMP-7 je statisticky významně vyšší v nádorové tkáni karcinomu prsu (duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni ($p < 0,001$). Tato exprese se ve zdravé tkáni blíží nule.

Expresí mRNA MMP-7 je vyšší u vzorků odebraných nemocným s postižením mízních (N+) i bez postižení mízních uzlin (N0) oproti vzorkům ze zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$). Expresí mRNA MMP-7 vzorků odebraných nemocným s postižením mízních uzlin oproti vzorkům nemocných bez postižení mízních uzlin bylo nesignifikantní ($p = 0,2$ resp. $0,43$).

Expresí mRNA MMP-7 byla statisticky významně vyšší u pacientek s negativními estrogenovými receptory ($p = 0,017$, resp. $p = 0,012$).

Expresí mRNA MMP-7 nebyla signifikantně vyšší u nemocných s progresí onemocnění do pěti let od operace.

Bezpríznakové období bylo statisticky významně delší u nemocných, jejichž vzorek vykazoval expresi mRNA MMP-7 pod median ($p = 0,05$).

5.2 TIMP-1

Potvrdili jsme statisticky významně vyšší expresi mRNA TIMP-1 v nádorové tkáni prsu (duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni. ($p < 0,001$). Potvrdili jsme, že exprese mRNA TIMP-1 ve zdravé prsní tkáni se blíží nule.

Prokázali jsme, že exprese mRNA TIMP-1 je signifikantně vyšší ve vzorcích ductálního invazivního karcinomu u nemocných bez postižení mízních uzlin (N0) oproti vzorkům zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$).

Rozdíl exprese mRNA TIMP-1 stanovené ze vzorků nádorové tkáně nemocných s pozitivními lymfatickými uzlinami (N+) oproti vzorkům nádorové tkáně nemocných bez postižení mízních uzlin (N-) není statisticky významný ($p = 0,7$ resp. $0,4$).

Nepodařilo se nám prokázat prognostický význam tohoto markeru.

5.3 P53

Zjistili jsme, že exprese mRNA p53 je statisticky významně vyšší v nádorové prsní tkáni (duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni ($p < 0,001$). Tato exprese byla ve zdravé tkáni nulová.

Zjistili jsme, že exprese mRNA p53 stanovená ze vzorků nádorové tkáně nemocných bez postižení mízních uzlin (N0) je statisticky významně vyšší oproti naměřené expresi mRNA p53 ze vzorků zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$).

Expresí mRNA p53 stanovená ze vzorků nádorů prsu nemocných bez postižení uzlin (N0) nebyla statisticky významně rozdílná oproti expresi mRNA p53 stanovené ze vzorků nemocných s postižením mízních uzlin (N+). Z rozložení souboru je ale možné usuzovat, že při vyšším počtu nemocných v souboru by mohl být tento rozdíl statisticky významný.

Míra exprese mRNA p53 stanovená ze vzorků nádorové tkáně prsu nekorelovala s klinicko-patologickými parametry souboru jako je velikost nádoru, postižení mízních uzlin, mitotická aktivita, stav hormonálních receptorů.

Zjistili jsme, že čím nižší je diferenciací nádorové tkáně, tím nižší je exprese p53 a tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,042$ resp. $0,041$). Statisticky významný výsledek byl zjištěn i při srovnávání nemocných s nádorem G1 proti G2. Median exprese mRNA p53 byl statisticky významně vyšší u nemocných s nádorem G1 oproti nemocným s nádorem G2 ($p = 0,032$). Tento výsledek je ovlivněn nedostatečným počtem nemocných ve skupině (3 vs. 36) a nemůže být považován za spolehlivý.

Expresí mRNA p53 stanovená ze vzorků nádoru nemocných, které zprogredovaly do pěti let od primárního výkonu nebyla statisticky významně vyšší.

Délka bezpříznakového období nebyla statisticky významně vyšší u nemocných, u kterých byla stanovená exprese mRNA p53 vyšší než median souboru. Statisticky významnou délku bezpříznakového období se nám nepodařilo zjistit ani u nemocných, které měly expresi mRNA p53 vyšší než naměřená maximální hodnota exprese mRNA p53 ve zdravé prsní tkáni.

6 Diskuze

Komplexní úlohou matrilysinu v nádorové tkáni se zabývalo mnoho studií. Od roku, kdy byly publikovány výsledky s marimastatem (inhibitorem MMP-7), zájem o matrilysin začal upadat a počet studií zabývajících se jeho funkcí se velice snížil. Matrilysin je popisován v nádorové tkáni adenomů, adenokarcinomů a karcinomů prsu, střeva, prostaty, žaludku, plic, kůže a horních cest dýchacích (123). Jeho klinická hodnota nebyla u karcinomu prsu zatím řádně popsána. Transkripty matrilysinu byly detekovány ve střevě, ledvinách, sva-lech, kůži, laktační i involující mléčné žláze u myši pomocí RT-PCR (126). V naší studii jsme chtěli ověřit klinicky jasné výsledky studií s matrilysinem u kolorektálního karcinomu, kde výše exprese MMP-7 koreluje s klinickým stadiem nemoci, přežitím i délkou bezpříznakového období. Míra exprese matrilysinu se také zvětšuje vzestupně od normální tkáně střeva přes adenom ke karcinomu.

Zjistili jsme, že exprese mRNA MMP-7 je statisticky významně vyšší v nádorové prsní tkáni (v duktálním invazivním karcinomu) oproti tkáni zdravé a že exprese mRNA MMP-7 stanovená pomocí RT-PCR se ve zdravé tkáni prsu blíží nule. Tento rozdíl je statisticky významný i při porovnání exprese mRNA MMP-7 ze vzorků nemocných bez postižení mízních uzlin s expresí MMP-7 mRNA zjištěné ze vzorků zdravé prsní tkáně. Tyto výsledky ukazují na roli matrilysinu v časně karcinogenezi nádoru. Tento výsledek podporuje i studie Fingletona z roku 2001, který udává, že exprese matrilysinu v časných stádiích karcinomu umožňuje buňkám uniknout imunitním mechanismům organismu. Tyto buňky jsou poté náchylné ke genetickým modifikacím a k nádorové transformaci. Dále jsme zjistili, že exprese matrilysinu byla statisticky významně vyšší ve vzorcích nemocných s negativitou estrogenových receptorů, to znamená u nádorů se špatným fenotypem a horší prognózou. Tento vztah u nádoru prsu nebyl zatím publikován. Zde můžeme na základě poznatku, že matrilysin je produkován samotnými nádorovými buňkami, vyslovit hypotézu, že matrilysin patří do aktivních drah časně karcinogeneze, které vedou k neotransformaci a získání agresivního fenotypu buňky (triplenegativní nádory). Role exprese mRNA MMP-7 u metastatického onemocnění nemohla být v naší studii stanovena. Do souboru nemocných vstoupily pouze dvě nemocné s metastatickým onemocněním. Exprese MMP-7 mRNA nekorelovala se stadiem nádoru. Nepodařilo se nám tedy prokázat, vzrůstající expresi mRNA MMP-7 se vzrůstajícím stadiem nemoci, jako je tomu u kolorektálního karcinomu. Naše výsledky spíše ukazují na nejvyšší expresi mRNA u časného karcinomu. S postižením uzlin, velikostí tumoru, vzrůstajícím gradem tato exprese spíše klesá, jak je vidět z dat v tabulkách 25 a 26. Vztah nebyl ale statisticky významný, nejspíše pro malé počty nemocných v souboru. Dále jsme potvrdili, že nemocné s expresí mRNA MMP-7 nad medián mají statisticky významně kratší bezpříznakové období oproti nemocným s expresí mRNA MMP-7 pod medián (60 měsíců vs. 87 měsíců). Na základě těchto poznatků a našich výsledků si myslíme, že matrilysin je špatným prognostickým faktorem časného karcinomu prsu a je třeba dalších studií, zabývajících se tímto vztahem u karcinomu prsu.

Naše studie srovnávající míru exprese TIMP-1 v nádorové a zdravé tkáni prsu potvrdila výsledky zároveň probíhajících studií (121; 130; 136), které udávají statisticky významně vyšší expresi TIMP-1 stanovenou imunohistochemicky na vzorcích duktálního invazivního karcinomu oproti vzorkům zdravé prsní tkáně. Brummer a spol. ve své studii z roku 1999 potvrzují zvýšenou expresi TIMP-1 mRNA transkriptů ve vzorcích nádorové tkáně oproti vzorkům in situ lézí a oproti normální zdravé tkáni prsu. Míra exprese byla hodnocena semikvantitativně. Tato zvýšená exprese byla nejvyšší ve stromálních buňkách, ne v buňkách nádorových. Nakopoulou a spol. tyto výsledky potvrzují ve studii z roku 2002, kde udávají nulovou expresi TIMP-1 ve zdravé prsní tkáni a měřitelnou expresi TIMP-1 u všech vzorků karcinomu prsu a to ve stromatu, nikoli v nádorových buňkách. Dále udávají horší přežití nemocných s vyšší expresí TIMP-1 ($p = 0,042$) (130). V naší studii jsme potvrdili statisticky významně vyšší expresi mRNA TIMP-1 stanovenou pomocí RT-PCR v nádorové tkáni prsu (u všech vzorků se jednalo o duktální invazivní karcinom) oproti zdravé prsní tkáni ($p < 0,001$). Tato exprese byla statisticky významná při srovnání vzorků nemocných bez postižení mízních uzlin se vzorky zdravé prsní tkáně ($p < 0,001$). Rozdíl exprese stanovené ze vzorků nádorové tkáně nemocných s pozitivními lymfatickými uzlinami (N+) oproti vzorkům nádorové tkáně nemocných bez postižení mízních uzlin (N-) jsme neprokázali ($p = 0,7$ resp. $0,4$). Z těchto výsledků usuzujeme na významnou roli TIMP-1 v časně karcinogenezi. V naší studii nebylo možné určit a porovnat expresi mRNA TIMP-1 u nemocných s pokročilým onemocněním (do studie vstoupila pouze jedna žena s prokázaným metastatickým onemocněním). Míra exprese TIMP-1 nekorelovala s žádným z klasických prognostických faktorů, ale ani s mírou postižení lymfatických uzlin. Tento závěr odpovídá závěrům studií Ree et al. 1997, Nakopoulou 2002, Schrohl et al. 2003. Prognostickou hodnotu tohoto markeru jsme bohužel nemohli stanovit vzhledem k charakteristice nemocných, kteří vstoupili do studie. Osmiletá doba sledování nemocných je pro nemocné s karcinomem prsu relativně krátká a pro vyhodnocení analýzy přežití v kratším čase je nutný větší počet nemocných v souboru. Nicméně z výsledků a grafu na obrázku 10 můžeme usuzovat, že pacienti s nižší genovou expresí mRNA TIMP-1 mají lepší pětileté přežití, které v době hodnocení není statisticky významné z výše uvedených důvodů. Předpokládáme, že i na našem vzorku nemocných by bylo potvrzeno horší přežití, kratší délka období do progresu u nemocných s vysokou expresí TIMP-1 jako ve studiích Ree et al. 1997, Schrohl et al. 2003, 2004, Nakopoulou 2002, Zheng-Sheng Wu 2008. Ani jedna z výše jmenovaných studií nepoužila ke stanovení míry exprese tohoto markeru RT-PCR. Nicméně jsme metodou RT-PCR dospěli k závěrům shodným se studii probíhajícími zároveň s naším výzkumem. Myslíme si, že role TIMP-1 v karcinogenezi je velice komplexní, uplatňující se hlavně v časných stádiích karcinogeneze a dále při metastazování (nebylo možno ověřit). Pro využití tohoto markeru jako prognostického faktoru u karcinomu prsu bude třeba najít metodiku, s možností rutinního denního měření v klinické praxi. Jako ideální by mohlo být stanovení TIMP-1 proteinu v séru a ověřit výsledky na velkém souboru nemocných s karcinomem prsu. Další otázkou je, zda pokračovat dále v tomto směru, či se spíše nezaměřit na biologickou úlohu TIMP-1 v procesu karcinogeneze. Myslíme si, že TIMP-1 vedle své konkurence s ostatními prognostickými markery nebude ideálním prognostickým faktorem karcinomu prsu.

Protein 53 je pomyslnou křižovatkou signálních drah a hlavním regulátorem buněčného cyklu. V případě stresu buňky dochází k aktivaci signálních drah, které vedou k reparaci DNA, apoptóze, zástavě buněčného cyklu či k aktivaci vzniku nových cév. Dá se říci, že protein p53 chrání buňky před poruchou a možným vznikem nádorového bujení. Při působení stresového signálu dochází k množství postranlačních modifikací a hromadění p53 v buňce. Z těchto poznatků vycházejí všechny studie, které stanovují protein p53 v nádorové tkáni prsu imunohistochemicky. Tyto studie předpokládají, že v případě mutace p53 dochází k hromadění vadného proteinu v buňkách. Tento údaj může být ale zkreslen hromaděním normálního proteinu při porušené zpětné vazbě a naopak. Také ne všechny mutace vedou ke vzniku stabilního proteinu. Výsledky studií lze shrnout tak, že nádory exprimující velké množství proteinu p53 jsou častěji estrogen a progesteron negativní, s vysokou proliferací, aneuploidií a jsou spojeny s horším přežitím nemocných. Vysoká hladina proteinu p53 v nádorové tkáni je častěji pozorována u nádorů exprimujících ERBB2 (101; 102). Studie, které stanovují množství mutací p53 v nádoru prsu sekvencově dospívají ke stejným závěrům. Ze studie Nornberga ale vyplývá, že korelace mezi expresí p53 stanovenou imunohistochemicky a mutacemi p53 zjišťované sekvenčně je nižší než 75% (137). V naší studii jsme stanovovali expresi mRNA pro p53 pomocí kvantitativní polymerázové reakce, to znamená, že jsme stanovovali transkript důležitý k syntéze proteinu v buňce a dospěli jsme k překvapivému výsledku. Expresie mRNA pro p53 byla nejvyšší u nádorů s dobrou diferenciací. Expresie p53 mRNA ve zdravé prsní tkáni byla nulová, nejvyšší byla u nemocných s nádorem G1. Zjistili jsme, že čím vyšší je stupeň diferenciace nádorové tkáně, tím nižší je expresie mRNA p53 a tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,042$ resp. $0,041$). Statisticky významný výsledek byl zjištěn i při srovnávání nemocných s nádorem G1 proti G2. Median expresie mRNA p53 byl statisticky významně vyšší u nemocných s nádorem G1 oproti nemocným s nádorem G2 ($p = 0,032$). Tento výsledek je ovlivněn nedostatečným počtem nemocných ve skupině (3 vs. 36) a nemůže být považován za spolehlivý. Předpokládáme, že jsme mohli poukázat na složitou a komplexní funkci regulace transkripce i translace proteinu p53. Uvažujeme, že jsme mohli zachytit iniciační nárůst transkripce p53 v raném stadiu karcinogeneze. V iniciaci karcinogeneze hraje hlavní úlohu stresový faktor, který aktivuje p53 a následné signální dráhy. Snahou této mnohočetné kaskády je zamezení vzniku patologických změn a procesů vedoucích k rozvoji nádoru. Tuto teorii podporuje i fakt, že většina dobře diferencovaných nádorů má nízké procento p53 alterací (Sorlie et al, 2001). Předpokládáme, že s následnou diferenciací buněk dochází k aktivaci jiných patologických drah, či produkci mutovaného proteinu a snížení fyziologické transkripce mRNA pro normální wtp53. Tento výsledek může také znamenat dlouhodobou vyšší pohotovostní připravenost buňky a náchylnost ke vzniku mutací. Tato teorie by vysvětlila i horší prognózu nemocných s mutacemi v TP53. Další možností dle Lacroix je, že neoplastická transformace je p53 nezávislá u dobře diferencovaných nádorů a závislá na p53 u nádorů basaloidního typu dle genového expresního profilu. Tato teorie vychází z výsledků prvních studií s použitím microarrays. Stejně jako je ASCO k otázce užití míry exprese mRNA či proteinu p53 jako špatného prognostického markeru karcinomu prsu opatrné, tak i my bychom doporučili toto rozhodnutí ponechat až do zveřejnění výsledků velkých studií, s jasně definovanou metodikou (což nebude vůbec jednoduché). Molekula p53 je známa již třicet let a pavouk signálních drah p53 se stále zvětšuje. Vzhledem ke složitosti těchto kaskád, kde každá je náchylná k dalším změnám bude nejspíše nutné hledat jiný prognostický marker nádorového růstu.

7 Závěr

Potvrdili jsme statisticky významně vyšší expresi mRNA MMP-7 v nádorové tkáni prsu.

Z výsledků je možné vyvodit, že pacientky s vyšší expresí MMP-7 mRNA mají kratší bezpříznakové období a pětileté přežití. Pětileté přežití bylo statisticky nevýznamné, nejspíše pro nedostatečný počet nemocných v souboru a dlouhé přežívání nemocných s karcinomem prsu. Je možné usuzovat, že při větších studiích by byl potvrzen trend ostatních retrospektivních studií a že MMP-7 by se mohla stát dalším prognostickým faktorem karcinomu prsu. Také můžeme usuzovat, že ke zvýšené expresi mRNA MMP-7 dochází již v časných stádiích karcinogeneze. Statisticky významně vyšší exprese mRNA MMP-7 byla v nádorové tkáni neexprimující estrogenové receptory, tzn. u nádorů s prognosticky nepříznivým fenotypem.

Expese mRNA matrilysinu je nepříznivým prognostickým faktorem nemocných s časným karcinomem prsu.

Potvrdili jsme statisticky významně vyšší expresi TIMP-1 v nádorové tkáni resp. u duktálního invazivního karcinomu prsu a to již v časných stádiích nemoci. Toto potvrzují výsledky ostatních studií, které udávají roli TIMP-1 v karcinogenezi karcinomu prsu.

Expese mRNA TIMP-1 nekorelovala signifikantně s ostatními prognostickými parametry jako je velikost nádoru, postižení mízních uzlin, hormonální status, stupeň diferenciacie nádoru. Expese mRNA TIMP-1 nebyla statisticky významně vyšší u nemocných, kteří zprogredovali v pěti letech od primární operace oproti skupině v remisi. Celkové přežití nemohlo být stanoveno.

Z dostupných dat nebylo možné potvrdit ani vyvrátit roli expese mRNA TIMP-1 jako nezávislého prognostického faktoru u nemocných s karcinomem prsu.

Myslíme si, že TIMP-1 vedle své konkurence s ostatními prognostickými markery nebude ideálním prognostickým faktorem karcinomu prsu.

Zjistili jsme, že expese mRNA p53 se ve zdravé prsní tkáni blíží nule. Potvrdili jsme statisticky významný rozdíl expese p53 mRNA v nádorové tkáni prsu, resp. u duktálního invazivního karcinomu oproti zdravé prsní tkáni. Expese p53 mRNA stanovená ze vzorků nemocných bez postižení mízních uzlin byla statisticky významně vyšší oproti expresi mRNA p53 stanovená ze vzorků zdravé prsní tkáně.

Rozporuplný je výsledek, kdy míra expese mRNA p53 je tím vyšší, čím je nižší stupeň diferenciacie nádoru. Tento výsledek popírá poznatky ostatních studií.

Prognostickou hodnotu expese mRNA p53 stanovené ze vzorků nádoru prsu v době primární operace se nám nepodařilo prokázat.

Z těchto výsledků usuzujeme, že ke zvýšené expresi mRNA p53 dochází v časně karcinogenezi, kdy není ještě porušena regulační schopnost buňky. Předpokládáme, že v s přibývajících dediferenciací buněk nádoru dochází k útlumu fyziologické funkce p53 a k moci se dostávají signální dráhy pozměněné v průběhu vzniku nádoru.

Znalost procesu expese p53 v nádorové tkáni by mohla být užitečná při rozhodování o léčbě nemocných v časných stádiích nemoci. K potvrzení bude potřebné provedení velkých randomizovaných studií.

8 Seznam literatury

1. **Dušek, Ladislav, et al.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. *www.svod.cz*. [Online] 2005. 1802 - 8861.
2. **Citterbart, Karel.** *Gynekologie*. Praha : Galén, 2001. stránky 9-10.
3. **Rosai, Juan.** *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 9.vydání. USA : Elsevier, 2004.
4. **Cotran, Ramzi S. et al.** *Robbins Pathology Basis of Disease*. 6. vydání. USA : Elsevier, 1998.
5. **Junqueira, Carlos L. et al.** *Základy histologie*. Praha : H and H, 1995.
6. *www.svod.cz. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*. [Online] <http://www.svod.cz>. ISSN 1802-8861.
7. **Titus - Ernstoff, L. et al.** Menstual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 7, 1998, stránky 783-789.
8. **Donegan, William L. and Spratt, John S.** *Cancer of the Breast*. 5.vydání. USA : Elsevier Science, 2002. stránka 1072.
9. **MacMahon, B., et al.** Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin WHO*. 43, 1970, stránky 209-221.
10. **Strnad, P.** *Nemoci prsu pro gynekology*. Praha : Grada Publishing, 2001. stránky 23-237.
11. **Tesařová, Petra.** Novinky ze symposia v San Antoniu věnovaného karcinomu prsu. *Remedia*. 2009, stránky 76-80.
12. **Triano, E A. et al.** Class I Alcohol Dehydrogenase Is Highly Expressed in Normal Human Mammary Epithelium but not in Invasive Breast Cancer: Implications for Breast Carcinogenesis. *Cancer Research*. 2003, 63, stránky 3092-3100.
13. **Longnecker, MP.** Risk of Breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. 87, 1995, stránky 923-929.
14. **Trentham - Dietz, A. et al.** Body size and risk of breast cancer. *American A of Epidemiology*. 1997, Vol. 145, stránky 1011-1019.
15. **Newman, B. et al.** Genetic heterogeneity and penetrance of the BRCA 1 and BRCA 2 genes in breast cancer families. 1988, Vol. 85, stránky 3044-3048.
16. **Claus, E. B. et al.** Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high risk families. *Cancer*. 1994, 73, stránky 643-651.
17. **Ford, D. et al.** Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of human genetics*. 1998, 62, stránky 676-689.
18. **Modungo, F.** Ovarian cancer and high risk women implications for prevention, screening and early detection. *Gynecologic Oncology*. 2003, 91, stránky 15-31.
19. **Szabo, C L a King, M C.** Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *American Journal of Human Genetic*. 1997, 60, stránky 1013-1020.
20. **Foretová, L. et al.** BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Human Mutation*. 2004, strana 23.
21. **Bartoňková, H. a Foretová, L.** Doporučené zásady péče o nemocné nádory prsu a vaječnicků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 a BRCA2. *Klinická onkologie*. 2003, 16, stránky 29-34.
22. *Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2.LF a FN Motol*. [Online] [Citace: 22. 2 2012.] <http://ublg.lfp.cuni.cz>.

23. OMIM. *Pubmed*. [Online] říjen 2009. <http://omim.org/entry/158350>.
24. **Hong, F. D. et al.** Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc.Nat.Academy of science*. 1989, 86, stránky 5502-5506.
25. **Swift, M. et al.** Breast and other cancers in families with ataxia-teleangiectasia. *National English Journal of Medicine*. 1987, 316, stránky 1289-1294.
26. **Janin, M. et al.** Breast cancer risk in ataxia teleangiectasia heterozygotes: haplotype study in French AT families. *British Journal of Cancer*. 1999, 80, stránky 1042-1045.
27. **Gail, M.H. et al.** Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of National Cancer Institute*. 1989, 81(24), stránky 1879 - 86.
28. **Strnad, Petr.** [Online] <http://www.senologie.cz/odborne>.
29. **Sobin, L. H. a Wittekind, Ch.** *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*. 6. vydání. Praha : Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2004. stránky 111-121.
30. **Tavassoli, Fattaneh, A. a Devilee, Peter.** *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon : IARC Press, 2003.
31. Nádory prsu. [Online] Biopstická laboratoř s.r.o, 10 2009. <http://www.mamma.cz>.
32. **Berx, G. et al.** E-cadherin is inactivated in a majority of human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996, 13(9), stránky 1919-1925.
33. **Kanai, Y.** Point mutation of E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn Journal Cancer Research*. 1994, 85(10), stránky 1035-39.
34. **McDivitt, R. et al.** Tubular carcinoma of the breast. Clinical and pathological observations concerning 135 cases. *American Journal of Surgical Pathology*. 1982, 6, str. 401.
35. **Bloom, H.J. a Richardson, W.W.** Histologic grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*. 1957, 11, stránky 359-377.
36. **Elston, C.W. a Ellis, I.O.** Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow up. *Histopathology*. 1991, 19, stránky 403 - 410.
37. **Perou, C.M.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000, 406, stránky 747-752.
38. **Ryška, Aleš.** Vybrané novinky v diagnostice a klasifikaci invazivního karcinomu prsu. *mojemedicina.cz*. [Online] 22. 3 2010. [Citace: 1. březen 2012.] <http://mojemedicina.cz/zhoubne-nadory-prsu>.
39. **Vyzula, Rostislav.** Zásady cytostatické léčby maligních onemocnění. 2012, strana 13.
40. *Medical Tribune*, 3. březen 2009, strana A5. 9.
41. **Schneiderová, M, et al.** Magnetická rezonance prsu - první zkušenosti. *Klinická onkologie*. 2006, 19(3), stránky 194-197.
42. **Leach, M. O.** Screening in women at genetic risk of breast cancer: Results of the UK multicentre study of magnetic resonance imaging (MRI) and X-ray mammography (XRM). *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2005, 23, Part I of II (June 1 číslo abstraktu 520)
43. **Třeška, V.** *Propedeutika vybraných klinických oborů*. Praha : Grada Publishing, 2003.

44. **Chrenko, V. a Fait, V.** Taktika chirurgického řešení časného karcinomu prsu. 2006, stránky 18-27.
45. **Vyzula, Rostislav.** *Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění.* Brno : Masarykův onkologický ústav, 2011.
46. **Šlampa, Pavel a kol.** *Radiační onkologie v praxi.* Brno : Masarykův onkologický ústav, Oddělení radiační onkologie, 2004.
47. **Kubecová, M.** Radioterapie karcinomu prsu. *www.onkologiecs.cz.* 2009, 3(1), stránky 28-31.
48. **Overgard, M., Hansen, P. S. a Overgard, J.** Postoperative radiotherapy in high risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. *National England Journal of Medicine.* 1997, 337, stránky 949-955.
49. **Van de Steene, J. a Soete, G.** Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival:the missing link. *Radiother Oncology.* 2000, 55, strana 263.
50. **Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J. et al.** Twenty year follow up a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer.Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *National England Journal of Medicine.* 2002, 347, strana 1233.
51. **Carey, L. A. et al.** American Joint Comittee on Cancer tumor node metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *Journal of National Cancer Institute.* 2005, 97, stránky 1137-1142.
52. Avastin (bevacizumab). *moje medicína.cz.* [Online] [Citace: 1. březem 2012.] <http://www.mojemedicina.cz/leciva/avastin-bevacizumab/>.
53. **Zubrod, C. G. et al.** Appraisal of methods for study of chemotherapy of cancer in man:comparative therapeutic trial of nitrogen mustard and thiophosphoamide. *J Chronic Dis.* 1960, 11, stránky 7-23.
54. *WHO handbook for reporting results of cencer treatment.* Geneva (Switzerland) : World Health Organization Offset Publication, 1979. 48.
55. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000, 92 (3), stránky 205-216.
56. **Eisenhauer, E. A., et al.** New response evaluation criteria in solid tumours:Revised RECIST guideline. *European Journal of Cancer.* 2009, 45, stránky 228 - 247.
57. Wikipedie. [Online] [Citace: 3. březem 2009.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Prognóza>.
58. **Fitzgibons, R. E.** Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Patol Lab Med.* 2000, 124, stránky 966 - 978.
59. **Goldhirsch, A. et al.** Meeting Highlights: International Expert Consensus on The Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Annals of Oncology.* 2005, 16, stránky 1569-1583.
60. **Goldhirsch, A. et al.** Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology.* 2009, 20(8), stránky 1319-1329.
61. Wikipedie. [Online] [Citace: 1. březem 2009.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/predikce>.
62. **Joensuu, H. et al.** DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer.* 1990, 66, stránky 331-340.
63. **Strnad, A.** Senologie. [Online] [Citace: 10. říjen 2009.] <http://www.senologie.cz/cinnost/atestace-01.html>.

64. **Walker, Rosemary.** *Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer*. 1. vydání. London : Informa Healthcare, 2008.
65. **Henson, D. E., Ries, I. a Freedman, L. S.** Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. *Cancer*. 1991, 6, stránky 2142 - 2149.
66. **Goldhirsch, A. et al.** Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, Sv. 21, 17, stránky 3357-3365.
67. **Pinder, S., Ellis, I., Galea, M., O'Rourke, S., Blamey, R. and Elston, C.** Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow up. *Histopathology*. 1994, 24, stránky 41-47.
68. **Bettelheim, R. et al.** Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1984, 50, stránky 771-778.
69. **Mennel, Robert et al.** American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, 25, stránky 5287-5312.
70. **Tesařová, Petra.** Inhibitory aromatázy a jejich místo v adjuvantní léčbě karcinomu prsu. *Remedia*. 2008, 18(3), stránky 212-222.
71. **Bozkurt K.K., Kapucuoglu N.** Investigation of immunohistochemical ER α , ER β and ER β cx expressions in normal and neoplastic breast tissues. *Pathol Res Pract*. 13. February 2012, epub ahead of print.
72. **Trojan, Stanislav a Langmeier, Miloš.** *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Praha : Grada, 2003. str. 772.
73. **Fisher, B. a Redmond, C.** Relative Worth of estrogen or progesterone receptor pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from NSABP protocol B-06. *Journal of Clinical Oncology*. 1988, 6, stránky 1076-1087.
74. **Donegan, W. L.** Prognostic factors Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer supplement*. 1992, 70, strana 6.
75. **Petruželka, L.** Biologická léčba karcinomu prsu. *Onkologie*. 2009, 3(1), stránky 19-26.
76. **Slamon, D. J. et al.** Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*. 1987, 235, stránky 177-182.
77. **Ellis I. et al.** Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1 and/or ErbB-2 positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer. Evidence from a phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2001, 19, stránky 3808-3816.
78. **Vogel, C. L., Cobleigh, M. A. a Tripathy, D. et al.** Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2002, 20, stránky 719-726.
79. **Baselga, J., Tripathy, D. a Mendelson, J. et al.** Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1996, 14, stránky 737-744.
80. **Andreasen, P. A. a Kjoller, L.** The urokinase -type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Internal Journal of Cancer*. 1997, 72, stránky 1-22.

81. **Bilran, H. a Sheng, S. et al.** Pleiotropic inhibition of pericellular urokinase type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspi. *Cancer Research*. 2001, 15, stránky 8676-8682.
82. **Loskutoff, D. J. a Curriden, S. A.** Regulation of cell adhesion by PAI. *APMIS*. 1999, 107, stránky 54-61.
83. **Duffy, I. et al.** Urokinase PLasminogen ACTivator and Its Inhibitor. PAI-1, as prognostic Markers in Breast Cancer: From Pilot to Level 1 Evidence studies. *Clinical Chemistry*. 2002, 48 (8), stránky 1194-1197.
84. **Zíma, Josef, Vorlíček, Jiří a Topolčan, Ondřej.** Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP) a České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně k využití nádorových markerů v klinické p. *CSKB Tumorové markery*. [Online] 9.. září 2008. [Citace: 15.. leden 2009.] <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--tumorove-markery>.
85. **Ebeling, F. G.** Breast Cancer:CEA, CA 15-3 and prognosis. *British Journal of Cancer*. 2002, 86(8), stránky 1217-1222.
86. **Molina, R., Barak, V. a van Dalen, A.** Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers Recommendations. *Tumor Biology*. 26, stránky 281 - 293.
87. **Weigelt, B., Bosma, A. J. a Hart, A. A.** Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *British Journal of Cancer*. 2003, 88, stránky 1091-1094.
88. **Cristofanilli, M.** Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, 23, stránky 1420-1430.
89. **Cristofanilli, M., Budd, G. T. a Ellis, M. J.** Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004, 351, stránky 781-791.
90. **Hayes, D. F. et al.** Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression –free and overall survival. *Clinical Cancer Research*. 2006, 12, stránky 4218-4224.
91. **Cheang, M. C. U., et al.** Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *Journal of National Cancer Institut*. 2009, 101, stránky 736-750.
92. **Masson, O.** Cathepsin–D, a key role protease in breast cancer, is upregulated in obese mouse and human adipose tissue, and controlc adiposogenesis. *www.plosone.org*. 2001, 6(2), str. e16452.
93. TP53. [Online] [Citace: 5.. listopad 2011.] <http://p53.free.fr>.
94. **Matlashewski, G. et al.** Alternative splicing of human p53 transcripts. *OncogeneRes. Oncogene Research*. 1987, 1, stránky 77-85.
95. Børresen-Dale, A.L. TP53 and breast cancer. *Human mutations*. 2003, 21(3), stránky 292-300.
96. **Hohenstein, P. a Giles, R. H.** BRCA1: a scaffold for p53response? *Trends in Genetics*. 2003, 19, stránky 489-494.
97. **Sørliie T., Perou C.M., Tibshirani R., et al.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(19), stránky 10869-74.
98. **Vogelstein, B. et al.** Surfing p53 network. *Nature*. 2000, 408, stránky 307-310.

99. Carr, A. M. Cell Cycle: Piecing together the p53 puzzle. *Science*. 2000, 287, stránky 1765-1766.
100. El-Deiry, W. S. et al. Regulation of p53 downstream genes. *Seminars Cancer Biology*. 1997, 8, stránky 345-357.
101. Feki, A. a Irminger-Finger, I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 2004, 52, stránky 103-116.
102. Yamashita H., Nishio M., Toyama T. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2004, 6, stránky R24-R30.
103. Gross, J. a Lapiere, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962, 48, stránky 1014-1022.
104. Polette, M- a Birembaut, P. Matrix metalloproteinases in breast cancer. *Breast Cancer Journal*. 1996, 2(3), stránky 209-220.
105. Anderson, I. C. et al. Inhibition of the metastatic spread and growth of the Lewis lung carcinoma in a murine model by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor combined with cytostatic agents. *Cancer Research*. 1996, 56, stránky 715-718.
106. Nomura, H. et al. Expression of membrane – type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Research*. 1995, 55, stránky 3263-3266.
107. Soini, Y., Paakko, P. a Autio - Harmeinen, H. Genes of laminin B1 chain, alfa1 (IV) chain of type-IV collagen, and 72-Kd type type-IV collagenase are mainly expressed by the stromal cells of lung carcinomas. *American Journal of Pathology*. 1993, 142, stránky 1622 - 1630.
108. Caudroy T., Polette M., Tournier J. M., Burlet H., Toole B., Zucker S., Birembaut P. .: Expression of the Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) and the Matrix Metaloproteinase-2 in Bronchopulmonary and Breast Lesions. *J Histochem Cytochem*. 1999, 47, stránky 1575-1580.
109. Hoekstra, R., Eskens, F. A. L. a Verweil, J. Matrix metaloproteinase inhibitors: Current developments and future perspective. *Oncologist*. 2001, 6, stránky 415-427.
110. Chang, C. a Werb, Z. The many faces of metaloproteinases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends of Cell Biology*. 2001, 11, stránky 37-43.
111. Egeblad, M. a Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev. Cancer*. 2002, stránky 161-174.
112. Hojilla, C. V., Mohammed, F. F. a Khokha, R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *British Journal of Cancer*. 2003, 89, stránky 1817-1822.
113. Curry, T. E. a Osteen, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation,. *Endocrinology Review*. 2003, 24, stránky 428-465.
114. Hulboy, D. L., Rudolph, L. A. a Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reprod*. 1997, 3, stránky 27-45.
115. Brooks, P. C., Clark, R. A. a Cheresch, D. A. Requirement of vascular integrin $\alpha\beta 3$ for angiogenesis. *Science*. 1994, 264, stránky 561-571.
116. Kim, Y., Jang, J.W., Lee, O.H., Yeon, J., Choi, E.Y., Kim, K.W., Lee, S.T., Kwon Y.G.: Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and

catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Research*. 2000, 60, stránky 5410-5413.

117. **Folgueras, A.R., Alberto, M.P., Sánchez, L.M., López-Otín, C.** Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. Journal Dev. Biol.* 2004, 48, stránky 411-424.

118. **Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M.-C., Millon-Collard, R., Abecassis, J., Breathnach, R.** The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem Journal*. 1988, 253, stránky 187-192.

119. **Gaire, M. et al.** Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. 1994.

120. **Gasson, J. C., Golde, D. W., Kaufman, S. E., Westbrook, C. A. et al.** Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985, 315, stránky 768-771.

121. **Huebner, K., Isobe, M., Gasson, J. C., Golde, D. W., Croce, C. M.** . Localization of the gene encoding human erythroid-potentiating activity to chromosome region Xp11.1-Xp11.4. . *Am J of Human Genetic*. 1986, 38, stránky 819-826.

122. **Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R. C., Anderson, D. C. et al.** Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc.Nat.Acad. Science*. 1986, 83, stránky 2407-2411.

123. **Wurtz, S. Q., et al.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005, 12(2), stránky 215-227.

124. **Yoshiji, H., et al.** Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Research*. 1996, 56(9), stránky 2013-2016.

125. **Clavel, C., et al.** 1 Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bulletin of Cancer*. 1992, 79(3), stránky 261-270.

126. **Wilson, Carole L. a Matrisian, Lynn M.** *Matrilysin: An Epithelial Matrix Metalloproteinasa with potentially Novel Functions.*. 2, Elsevier Science Ltd., 1996, Int. J. Biochem Cell Biol., 28, stránky 123-136.

127. **Barnett, J. et al.** Production, purification, and characterization of human matrilysin (PUMP) from recombinant Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif*. 1994, 5, stránky 27-36.

128. **Baragi, V.M. et al.** : Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally comprom. 1994, 269, stránky 12692-12697.

129. **Wilson, C. et al.** *The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse.* 1. July 1995, Molecular Biology of the Cell, Sv. 6, stránky 851-869.

130. **Adachi, Y., Yamamoto, H. a Itoh, F.** Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut*. 1999, 45, stránky 252-258.

131. **Masaki, T., et al.** Matrilysin (MMP-7) is a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *British Journal of Cancer*. 2001, 84(10), stránky 1317-

1321

132. **Yoshiji, H., Harris, S. R. a Raso, E.** Mammary carcinoma cell-over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer*. 1998, 75, stránky 81-87.
133. **Brummer, O., Athar, S., Riethdorf, L., Löning, T. and Herbst, H.** Matrix-metalloproteinases 1,2 and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridisation study. *Virchows Archiv*. 1999, 435, stránky 566-573.
134. **Ree, A.H., Flørenes, V.A., et al.** High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-1) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clinical Cancer Research*. 3, stránky 1623-1628.
135. **McCarthy, K., et al.** High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. 1999, 84, stránky 44-48.
136. **Linjawi, A., Kontogianna M., Halwani F., Edwardes M., Meterissian S.** Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *Journal of American Surg*. 2004, 198(1), stránky 83-90.
137. **Friedrichs, K., Gluba, S., Eidtmann, H., Jonat, W.** Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer*. 1993, 72(12), stránky 3641-3647.
138. **Craig, D. A., et al.** Association of p53 Protein Expression With Tumor Cell Proliferation Rate and Clinical Outcome in Node Negative Breast Cancer. *J National Cancer Institute*. 1993, 85(3), stránky 200-206.
139. **Nakopoulou, L., Giannopoulou, I. et al.** Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *Journal of Pathology*. 2002, 197(3), stránky 307-313.
140. **Norberg, T., et al.** Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *International Journal of Cancer*. 1998, 79, stránky 376 - 383.
141. **Chrobák, L., a kolektiv** *Propedeutika vnitřního lékařství*. Praha : Grada Publishing, 1997.
142. **Fattaneh, A., Tavassoli, Devilee P.** *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. s.l. : World Health Organization, 2003.
143. **Tryggvadottir, Laufey, et al.** A Cohort Study of Breastfeeding and Breast Cancer. *American Journal of Epidemiology*. 2001.
144. **Butler, J.A., et al.** Estrogen receptor protein of breast cancer as a predictor of recurrence. *Cancer*. 1985, str. 55:1178.
145. **Ford, D., et al.** Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high risk families.
147. **Longnecker, M. P.** Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *Journal of National Cancer Institution*. 1995, 87, stránky 923-929.
148. **Gail, M.H., et al.** Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of National Cancer Institut*. 81(24), 1989, stránky 1879-86.
149. **Berx, G. et al.** E-cadherin is inactivated in a majority of human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996, 13(9), stránky 1919-1925.

150. **Whelan, T.J., Julian, J. and Wright, J.** Does locoregional radiation therapy improve survival in breast cancer? A metaanalysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2000, 18, stránka 1220.
151. **Fan, S., Wang, J.-A., Yuan, R., Ma, Y., et al.** BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling transfected cells. *Science*. 1999, 284, stránky 1354-1356.
152. **Harris, L. a Fritsche, H.** ASCO 2007 Update of recommendation for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, Sv. 25, 33, stránky 5287-5312.
153. **Petruželka, L.** Cílená molekulární léčba karcinomu prsu. *Referátový výběr z onkologie. speciál*, 2006, 1/06, stránky 33 - 37.
154. **Hilkens, J., Kroezen, J. M. a Bonfrer, G.** MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Research*. 1986, 46, stránky 2582-2587.
155. **Polette, M., Gilbert N., Stas I. et al.** Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridisation study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch*. 1994, 426, stránky 641-645.
156. **Freije, J .M., Balbin, M., Pendas, A.M., et al.** Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Biol*. 2003, 532, stránky 91-107.
157. **Mitsiades, N., Yu, W.H., Poulaki, V., Tsokos, M., Stamenkovic I.:** Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligands protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Research*. 2001, 61, stránky 577-581.
158. **Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J.** Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985, 318, stránky 66-69.

Poděkování

Závěrem této práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mne provázeli v průběhu pregraduálního a postgraduálního studia na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Plzni a umožnili, aby mohla vzniknout tato práce.

Na prvním místě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi, CSc., který mne vedl již v průběhu studia na lékařské fakultě a umožnil, že jsem mohla okusit práci v molekulárně-genetické laboratoři. Svými radami a vedením přispěl k mému dalšímu postgraduálnímu rozvoji.

Velké poděkování patří Doc. MUDr. Jindřichu Fínkovi, PhD., mému školiteli, za jeho trpělivost, podporu a odborné vedení v průběhu celého doktorandského studia.

Dále děkuji svým spolupracovníkům Doc. MUDr. Luboši Holubcovi, PhD., Mgr. Martinu Peštovi, PhD. za spolupráci a MUDr. Mirce Benišové za pomoc při vzniku této práce.

V neposlední řadě děkuji Ing. Petru Flachsovi za tiskovou korekturu celé práce.

Poslední poděkování patří mé rodině, bez které by nebylo možné doktorandské studium realizovat.

Děkuji.
MUDr. Lucie Šefrhansová