

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



MUDr. Michaela Čabiňaková

**Detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni a periferní krvi u pacientek
s karcinomem prsu**

**Detection of minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood in patients
with breast cancer**

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. března 2015

Michaela Čabiňaková

Podpis

Identifikační záznam:

ČABIŇAKOVÁ, Michaela. Detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni a periferní krvi u pacientek s karcinomem prsu. [Detection of minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood in patients with breast cancer]. Praha, 2015.

83 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Onkologická klinika. Školitel doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Poděkování

Tato dizertační práce vznikla pod vedením mé školitelky doc. MUDr. Petry Tesařové, CSc. Je mou milou povinností ji tímto poděkovat za trpělivost a předání cenných zkušeností pro vznik této práce a při přípravě publikací.

Prim. MUDr. Karin Malíčkové jsem vděčná za odbornou pomoc s laboratorní částí práce, za pomoc při zpracování odborných textů a za statistické vyhodnocení laboratorních a klinických dat. Spolupracovníkům z laboratoře Klinické imunologie a alergologie z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, jmenovitě RNDr. Ivaně Janátkové, Mgr. Veronice Mikulové a Ing. Markétě Jančíkové za odborné rady a pomoc v laboratorní práci.

Také bych ráda poděkovala prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., MBA za rady a odborné vedení při řešení daného tématu.

Dále děkuji doc. prim. MUDr. Davidovi Pavlišťovi, Ph.D. a as. MUDr. Miloslavu Janouškovi za podílení se na vytvoření multidisciplinárního týmu pro diagnostiku a terapii karcinomu prsu a za pomoc při získávání vzorků.

Přednostovi Onkologické kliniky VFN a 1. LF UK v Praze prof. MUDr. Luboši Petruželkovi, CSc. děkuji za pracovní zázemí vstřícné k postgraduálnímu studiu.

Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Onkologické kliniky VFN a 1. LF, kteří mi předávali své cenné zkušenosti v oblasti klinické i výzkumné. MUDr. Zdeňce Pechačové děkuji za inspiraci a podnětné návrhy při psaní dizertační práce.

V neposlední řadě děkuji mé rodině za trpělivost a podporu při zpracování projektu a psaní rukopisu.

Tato práce vznikla za podpory grantového projektu GA UK č. 59410, PRVOUK-P-27/LF1/1, RVO-VFN 64165/2012 a SVV 266 515.

ABSTRAKT

Úvod: Výskyt diseminovaných nádorových buněk (DTCs) a cirkulujících nádorových buněk (CTCs) je spojen se špatnou prognózou a zvýšeným výskytem úmrtí v důsledku onemocnění u pacientek s nemetastatickým karcinomem prsu. Cílem dizertační práce bylo stanovit DTCs v kostní dřeni a CTCs v periferní krvi u pacientek s primárním karcinomem prsu, zhodnotit korelaci výskytu DTCs/CTCs s přítomností dalších prognostických markerů a monitorovat výskyt DTCs/CTCs v průběhu léčby.

Metody: Do studie bylo zařazeno 50 pacientek s primárním karcinomem prsu. K analýze CTCs z periferní krve byla použita imunomagnetická separace a k jejich detekci byl použit diagnostický kit AdnaTest Breast Cancer™ (AdnaGen GmbH, Langenhagen, Německo).

Detekce DTCs v kostní dřeni probíhala pomocí imunocytochemické analýzy s pomocí pancytokeratin protilátky konjugované s FITC (monoklonální anti-cytokeratin protilátka F3418, Sigma Aldrich, USA).

Výsledky: DTCs jsme stanovili u 30% (15/50) a CTCs u 22% (11/50) pacientek. Studie potvrdila, že DTC pozitivita signifikantně korelovala s velikostí primárního nádoru (p-hodnota 0,011) a infiltrací lymfatických uzlin (p-hodnota 0,002). CTC pozitivita nekorelovala ani s velikostí nádoru či infiltrací axilárních uzlin. DTCs byly převážně detekovány u pacientek ER/PR negativních a HER-2 pozitivních. CTC pozitivita byla zastoupena u pacientek stejnoměrně, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů, jako je ER, PR a HER-2 pozitivita. V naší studii jsme neprokázali vztah mezi přítomností CTCs a DTCs ($r = -0,097$, $p = 0,054$). Analýzu DTCs/CTCs jsme použili k monitoraci efektu terapie u 29 pacientek indikovaných k neoadjuvantní chemoterapii (NACT). Nejistili jsme žádnou signifikantní korelaci mezi výskytem DTCs/CTCs a odpovědí na primární NACT. V naší studii dosáhlo 31% (9/29) pacientek patologické kompletní remise (pCR) a neprokázali jsme u nich korelaci pCR s výskytem DTCs po NACT.

Závěr: Analýza DTCs/CTCs u časného karcinomu prsu by mohla posloužit jako další prognostická informace pro klinickou praxi, to dokazují i naše výsledky. Výzkum v uvedené oblasti má nejenom prognostický význam, ale i obrovský potenciál při individualizaci terapie u žen s karcinomem prsu.

Klíčová slova: karcinom prsu; diseminované nádorové buňky; cirkulující nádorové buňky; sternální punkce; prognostické/prediktivní faktory; efekt terapie

ABSTRACT

Introduction: Simultaneous detection of disseminated tumor cells (DTCs) and circulating tumor cells (CTCs) was shown to be associated with an especially poor prognosis and increased incidence of disease-related deaths in non-metastatic breast cancer patients. We analyzed the occurrence of DTCs in bone marrow and CTCs in peripheral blood in patients with primary breast cancer, we evaluated the correlation of their presence with other prognostic markers and we investigated the changes in DTCs/CTCs number at different time points during treatment.

Materials and methods: Blood of 50 patients with primary breast cancer were used for immunomagnetic separation and detection of circulating tumor cells using the commercial available system the AdnaTest Breast Cancer™ (AdnaGen GmbH, Langenhagen, Germany). Bone marrow aspirates from 50 patients were analyzed for DTCs by immunocytochemistry using the pancytokeratin antibody conjugated with FITC (Monoclonal Anti-Cytokeratin antibody F3418, Sigma Aldrich, USA).

Results: DTCs were identified in 30% (15/50) and CTCs in 22% (11/50) of patients. We found that DTC positivity could point to a significantly high risk of larger primary tumor size (p- value 0.011) and significantly higher risk of lymph node involvement (p- value 0.002). For CTC positivity, no such relationship was proven. DTCs have shown significantly higher prevalence in ER/PR-negative females and in HER-2-positive cases. CTCs were equally prevalent in patients with the presence and absence of standard prognostic and predictive markers such as ER, PR and HER-2. We found no correlation between CTCs and DTCs findings ($r = -0.097$, $p = 0.504$). We used DTCs/CTCs analysis for therapy monitoring in a small group of 29 patients, who underwent neoadjuvant chemotherapy (NACT). We find out no significant correlation between DTCs/CTCs detection and the primary tumor response to NACT. A pathologic complete response (pCR) was achieved by 31% (9/29) of the patients in our study, however, no association was observed between pCR and the detection of DTCs after NACT.

Conclusion: These results support the use of DTCs/CTCs analysis in early breast cancer to generate clinically useful prognostic information. The study of these cells apart from the impact on refining prognosis, has the exciting potential of individualising treatment for women with breast cancer.

Keywords: breast cancer; disseminated tumor cells; circulating tumor cells; bone marrow aspiration; prognostic/predictive markers; therapy monitoring

Obsah

1	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	3
1.1	EPIDEMIOLOGIE.....	3
1.2	ETIOLOGIE A PATOGENEZE KARCINOMU PRSU	5
1.3	PATOLOGIE A BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ.....	8
1.4	KLINICKÉ PŘÍZNAKY.....	9
1.5	DIAGNOSTIKA A STANOVENÍ KLINICKÉHO STADIA NEMOCI (STAGING)	9
1.5.1	<i>Diagnostika</i>	9
1.5.2	<i>Stanovení klinického stadia nemoci (staging)</i>	12
1.6	PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY	13
1.7	TERAPIE	16
1.7.1	<i>Chirurgická léčba.....</i>	16
1.7.2	<i>Radioterapie.....</i>	17
1.7.3	<i>Hormonoterapie.....</i>	18
1.7.4	<i>Chemoterapie.....</i>	20
1.7.5	<i>Cílená biologická léčba.....</i>	22
1.7.6	<i>Kombinace léčebných modalit.....</i>	23
1.8	PREVENCE, SCREENING.....	23
1.9	METASTAZOVÁNÍ.....	25
1.9.1	<i>Metastatická kaskáda</i>	26
1.9.2	<i>Epiteliálně – mezenchymální tranzice (EMT).....</i>	29
1.9.3	<i>Nádorové kmenové buňky.....</i>	30
1.10	DISEMINOVANÉ A CÍRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY.....	31
1.10.1	<i>Definice, molekulární a funkční charakteristika DTC/CTC</i>	32
1.10.2	<i>Morfologické vlastnosti DTC/CTC</i>	33
1.11	METODY STANOVENÍ DTC/CTC	34
1.11.1	<i>Metodické přístupy k obohacení DTC/CTC.....</i>	34
1.11.2	<i>Cytometrické/imunologické metody detekce DTC/CTC</i>	35
1.11.3	<i>Molekulární metody detekce DTC/CTC</i>	37
1.11.4	<i>Charakterizace DTC/CTC.....</i>	38
2	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	40
2.1	PRACOVNÍ HYPOTÉZA.....	40
2.2	CÍLE PRÁCE	40
3	MATERIÁL A METODIKA.....	42
3.1	SUBJEKTY HODNOCENÍ	42
3.2	ODBĚR VZORKU KOSTNÍ DŘENĚ	44
3.3	ODBĚR VZORKU PERIFERNÍ KRVE.....	44
3.4	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI DISEMINOVANÝCH NÁDOROVÝCH BUŇEK	44
3.4.1	<i>Zpracování vzorků kostní dřeně a izolace diseminovaných nádorových buněk.....</i>	44
3.4.2	<i>Imunocytochemická detekce diseminovaných nádorových buněk.....</i>	45
3.5	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI CÍRKULUJÍCÍCH NÁDOROVÝCH BUŇEK	45
3.5.1	<i>Zpracování vzorků periferní krve a izolace cirkulujících nádorových buněk</i>	45
3.5.2	<i>Detekce cirkulujících nádorových buněk.....</i>	46
3.6	STATISTICKÁ ANALÝZA	46
4	VÝSLEDKY.....	48
4.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTEK	48
4.2	KORELACE VÝSKYTU CTC/DTC V SOUVISLOSTI S TNM KLASIFIKACÍ	48
4.3	KORELACE VÝSKYTU CTC/DTC V SOUVISLOSTI S EXPRESÍ HORMONÁLNÍCH RECEPTORŮ A HER-2	49
4.4	VZTAH MEZI PŘÍTOMNOSTÍ CTC V PERIFERNÍ KRVI A DTC V KOSTNÍ DŘENI	51
4.5	MONITOROVÁNÍ VÝSKYTU DTC/CTC V PRŮBĚHU TERAPIE	52
4.5.1	<i>CTC v průběhu terapie</i>	52
4.5.2	<i>DTC v průběhu terapie.....</i>	52
4.6	MONITOROVÁNÍ VÝSKYTU DTC/CTC V PRŮBĚHU LÉČBY U PACIENTEK S NEOADJUVANTNÍ A ADJUVANTNÍ TERAPIÍ	53

4.7	DTC/CTC U PREMENOPAUZÁLNÍCH A POSTMENOPAUZÁLNÍCH PACIENTEK	55
5	DISKUSE	56
6	ZÁVĚRY	61
	SEZNAM ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK	68
	SEZNAM LITERATURY	69
	SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	82
	SEZNAM PŘÍLOH.....	83

1 Úvod do problematiky

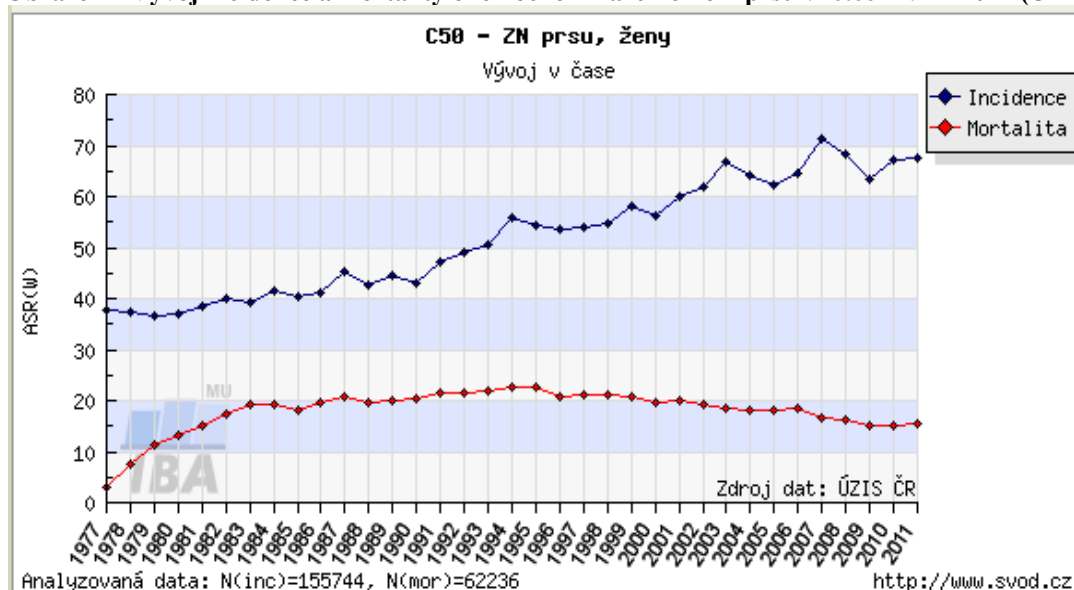
1.1 Epidemiologie

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním žen v České republice (ČR), což potvrzují i nejnovější epidemiologická data Národního onkologického registru (NOR). Česká republika nestojí v počtu nemocných s karcinomem prsu na předních místech světových statistik incidence, jako tomu je např. u zhoubných nádorů (ZN) kolorekta a ledvin - ČR obsazuje v incidenci karcinomu prsu u žen 26. místo ve světě a 17. místo v Evropě. V roce 2010 bylo zjištěno 6 498 případů (oproti předchozímu roku nárůst o 8,8%), což v přepočtu na 100 tisíc žen představovalo 121,3 případů a zároveň téměř 18,2% ze všech hlášených ZN a novotvarů in situ u žen.

Incidence, tedy počet nově hlášených případů na 100.000 obyvatel za rok, má stoupající tendenci (obr. 1), [1].

Mortalita, tedy počet úmrtí v důsledku zhoubného nádoru prsu na 100.000 obyvatel za rok, v poslední době mírně klesá (obr. 1), což znamená, že díky pravidelnému vyšetřování žen a lepším léčebným možnostem umírá méně žen, které onemocněly zhoubným nádorem prsu.

Obrázek 1 Vývoj incidence a mortality onemocnění karcinomem prsu v letech 1977-2011 (ÚZIS ČR)

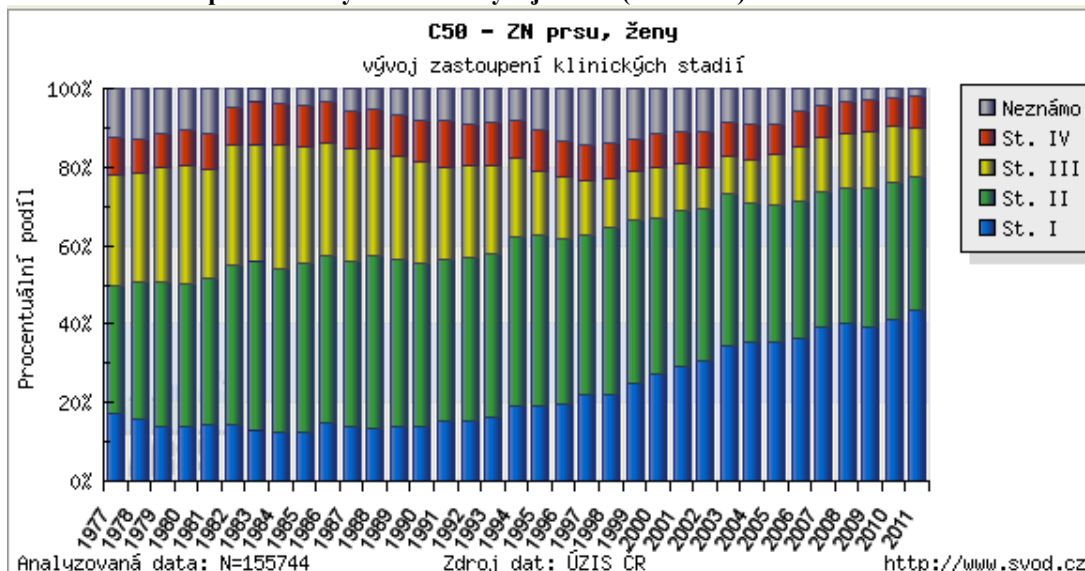


Přestože je léčba karcinomu prsu, zvláště v raných stádiích, velmi úspěšná, zůstává ZN prsu i nadále nejčastější onkologickou příčinou smrti u žen. V roce 2010 zemřelo na ZN prsu 1 655 žen, tj. o 48 žen více než před rokem [1].

Zhoubný novotvar prsu často postihuje ženy v produktivním věku, téměř 43% pacientek je mladších než 60 let. Z pohledu absolutních čísel výskytu onemocnění je nejvyšší nárůst zřejmý mezi věkovými kategoriemi 40-44 let a 45-50 let věku. Zde dochází k nárůstu z přibližně 70 případů na 100 000 žijících žen na 140-150 nových případů.

Příznivou charakteristikou epidemiologie nádorů prsu v ČR je dlouhodobě rostoucí podíl nově diagnostikovaných málo pokročilých klinických stádií. Z grafu na obrázku 2 vyplývá, že v ČR je více než 39% nových ZN prsu diagnostikováno v klinickém stádiu I a dalších 34% v klinickém stádiu II [1].

Obrázek 2 Zastoupení klinických stadií – vývoj v čase (ÚZIS ČR)



To výrazně zlepšuje dosažitelné výsledky léčby a vede též ke snížení souvisejících nákladů [1]. Tento příznivý vývoj je nepochybně důsledkem rostoucího vlivu Národního programu screeningu karcinomu prsu. Při více než 50% pokrytí cílové populace žen zachytí tento program více než 30% všech nově diagnostikovaných ZN prsu. V rámci screeningového programu je ročně vyšetřeno téměř 470 000 žen a odhaleno více než 2 000 nádorů, z toho téměř 80% v kategorii T0-T1.

1.2 Etiologie a patogeneze karcinomu prsu

Karcinom prsu se vyskytuje ve dvou patogeneticky rozdílných formách – onemocnění sporadické nebo dědičně podmíněné. U většiny žen se karcinom prsu vyvíjí ve formě sporadického onemocnění, které vzniká v důsledku akumulace somatických mutací v buňkách prsní žlázy. Nádorová transformace mamárních epitelii je způsobena deregulací kritických signálně-transdukčních cest (buněčného dělení, apoptózy a reparace genomové DNA) na podkladě aktivace protoonkogenů a inaktivace tumor supresorových genů, což je vyvoláno genetickými inzulty doprovázenými epigenetickými změnami. Výsledkem těchto selhání je vznik maligně transformované buňky *in situ*, která může na základě genomové nestability způsobené poruchami DNA reparačních pochodů vytvářet řadu geneticky nestabilních dceřiných buněk tolerujících genomové defekty postihující další regulační mechanismy [2].

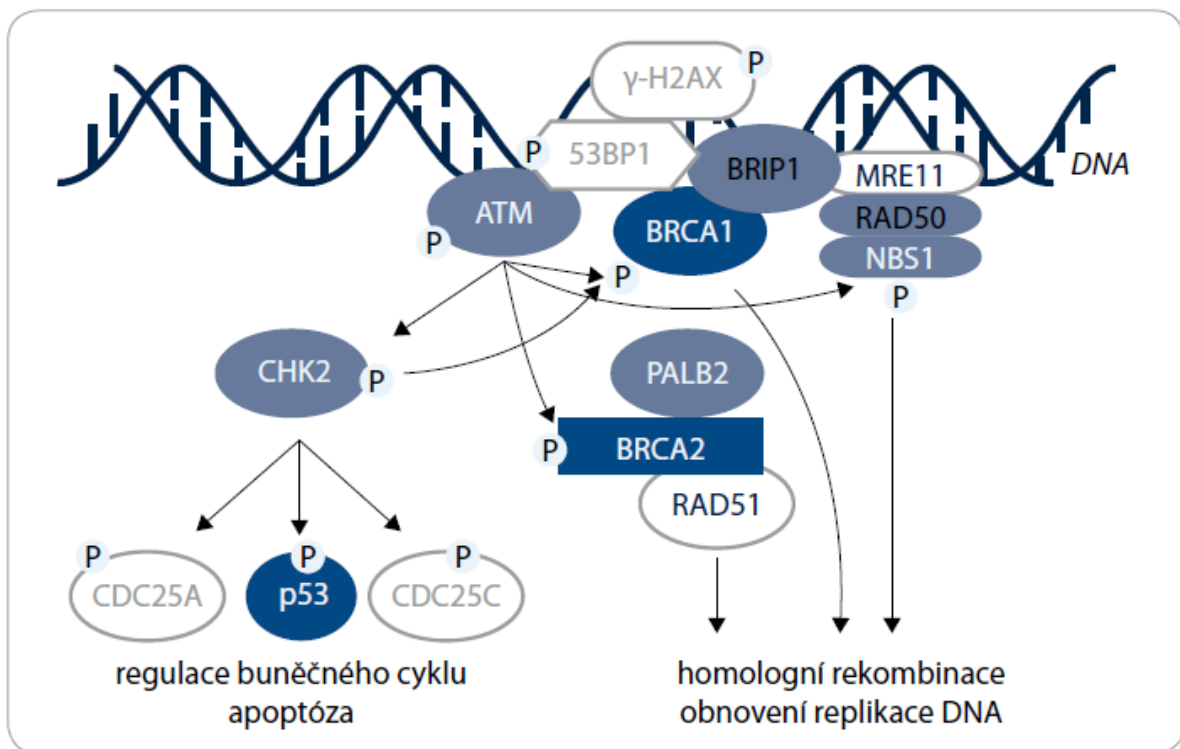
Dědičně podmíněné formy karcinomu prsu tvoří 5–10 % mamárních tumorů a u pacientů s touto formou onemocnění lze nalézt některé z patogenních mutací v některém z predispozičních genů kódujících protein zúčastněný v (pravděpodobně tkáňově specifickém) procesu nádorové supresivity. U nosiček těchto mutací tak při vzniku tumoru dochází k obdobnému vývoji nádorové transformace jako v případě nádorů sporadických, vznik těchto změn je však výrazně pravděpodobnější. U nosiček těchto mutací je proto riziko vzniku karcinomu prsu oproti populačnímu riziku významně zvýšeno, k onemocnění dochází v nižším věku, postižení je často bilaterální, a kromě samotného karcinomu prsu jsou nosiči onemocnění ohroženi i zvýšeným rizikem vzniku nádorů v dalších lokalizacích. Do současné doby bylo charakterizováno několik predispozičních genů, jejichž patogenní alterace významně zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu (BRCA1 a BRCA2, TP53, PTEN, LKB1/STK11), [3].

Další geny ovlivňující riziko vzniku karcinomu prsu se vyskytují v podstatně menší míře (geny s nízkou a střední penetrancí), avšak skupina těchto genů je pestrá a stále se rozrůstá - ATM, CHEK2, NBS1 (NBN), PALB2, TGFβ1, CASP-8 a další. Velmi nápadný je blízký vztah genů podílejících se na vzniku hereditárních forem karcinomu prsu k pochodům přímo zprostředkujícím nebo regulujícím kontrolní body (checkpoints) buněčného cyklu a reparaci genomové DNA (obr. 3), [4].

Na obrázku 3 lze vidět schematické znázornění hlavních proteinů podílejících se na reparaci dvouřetězcových zlomů v DNA pomocí homologní rekombinace. Řada genů

kódujících proteiny reparace dvouřetězcových zlomů DNA vykazuje přímý vliv na patogenezi hereditárních i sporadických forem karcinomu prsu, počínaje senzorkými proteiny (ATM) a proteiny MRN komplexu (MRE11, RAD50, NBS1 (NBN)), přenašeči signálu (CHK2) i výkonnými molekulami regulujícími vlastní reparační pochody (BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51), kontrolní body buněčného cyklu (CDC25A a C) nebo aktivaci apoptózy (p53). Proteiny kódované hlavními predispozičními geny jsou znázorněny tmavomodře (■), proteiny kódované geny se středním rizikem světlemodře (□). Geny analyzované jako hereditární nádorové predispoziční faktory v populaci pacientů v ČR jsou vyznačeny bílým písmem.

Obrázek 3 Schema proteinů podílejících se na reparaci dvouřetězcových zlomů v DNA



Zdroj: Klinická Onkologie, Hereditární nádorová onemocnění III, ročník 25, 2012.

Jak již bylo řečeno, predispoziční geny modifikují riziko vzniku karcinomu prsu (a dalších nádorů) nestejně. Zatímco u některých vysoce penetrantních genů (BRCA1/2) je nosičství patogenních alterací spojené s rizikem vysokým, u jiných je zvýšení rizika pouze střední či malé (viz obrázek 4 níže) a lze předpokládat, že některé z variant riziko vzniku nádorů snižují jejich význam je tak projektivní. [2].

Obrázek 4 Relativní riziko (RR) vzniku karcinomu prsu u nosičů mutací v jedné z alel uvedených genů

Penetrance	Gen	MAF	RR/alelu	Fam. riziko (%)
vysoká	<i>BRCA1</i>	1/1 500	20	10
	<i>BRCA2</i>	1/1 500	12	10
	<i>PTEN</i>	1/25 000	10	1,0
	<i>TP53</i>	1/5 000	50	1,0
střední	<i>ATM</i>	0,3%	2,3	0,7
	<i>PALB2</i>	0,1%	2,3	0,2
	<i>CHEK2</i>	0,5%	2,2	1,0
	<i>BRIP1</i>	0,1%	2,1	0,1
malá	<i>FGFR2</i>	38%	1,26	2,0
	<i>TNRC9</i>	25%	1,2	1,0
	<i>MAP3K1</i>	28%	1,13	0,5
	<i>LSP1</i>	30%	1,07	0,2
	<i>CASP8</i>	13%	0,89	0,2

MAF – Minor Allele Frequency (frekvence recesivní alely)

Zdroj: *Klinická Onkologie, Hereditární nádorová onemocnění III, ročník 25, 2012.*

Dále je možný familiární výskyt karcinomu bez průkazu mutace genů *BRCA1*, *BRCA2* a genu *p53*. Rizikovým faktorem je výskyt karcinomu prsu v osobní či rodinné anamnéze (matka, sestra, babička), zejména v případě výskytu nádoru premenopauzálně, a to i bez průkazu výše uvedených genů.

Existuje řada faktorů, které jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu u žen. Patří sem faktory genetické, hormonální, nutriční a faktory zevního prostředí. Kromě již zmíněných genetických abnormalit patří mezi rizikové faktory i délka expozice estrogenům, tj. časná menarche, pozdní menopauza, první gravidita po 30. roce života, krátká laktace, dlouhé užívání estrogenů (v rámci substituční léčby), nuliparita. Orální kontraceptiva se dnes za rizikový faktor nepovažují. Největším rizikem je jednoduše být ženou. Muži mohou také onemocnět zhoubným nádorem prsu. Karcinom prsu u mužů tvoří 0,2 procenta všech nádorových onemocnění mužů. Riziko vzniku zhoubného nádoru prsu narůstá se zvyšujícím se věkem. Nejčastější výskyt je mezi 50. a 60. rokem života. Z dalších rizikových faktorů lze uvést jiná onemocnění prsu, zejména duktální hyperplazii, atypickou duktální hyperplazii a atypickou lobulární hyperplazii, duktální karcinom *in situ* a lobulární karcinom *in situ*. Významným rizikem je ionizující záření zvláště před 40. rokem života, např. ozařování pro Hodgkinovou chorobu. Obezita, zejména v postmenopauze, zvýšený příjem tuků a nedostatek fyzické aktivity se rovněž považují za rizikové faktory. Nadměrná tuková zásoba je spojena s vyšší plazmatickou koncentrací estrogenů, neboť ty vznikají mimo jiné i v tukové tkáni konverzí z androgenních prekurzorů.

1.3 Patologie a biologické chování

Vzniku karcinomu prsu mohou předcházet premaligní změny - duktální hyperplazie, atypická duktální a lobulární hyperplazie. Z hyperplazií se vyvinou nejprve neinvazivní karcinomy, které se nazývají karcinomy „in situ“. Vyrůstají z maligně transformovaných epitelových buněk vývodů (duktální karcinom in situ, DCIS) a mohou vyrůstat i z epitelových buněk lalůček (lobulární karcinom in situ, LCIS), [5].

Zvláštní formou duktálního karcinomu in situ je Pagetův karcinom bradavky, u něhož nádorové buňky invadující do ductů pronikají do epidermis areoly.

Invazivní karcinomy se dále dělí na nejčastější duktální (84 %) a lobulární (15 %). Velmi agresivní formou karcinomu prsu je erysipeloidní (inflatorní) karcinom – patří mezi duktální karcinomy a je nediferencovaný. Infiltruje celý prs, který je zarudlý, bolestivý, s postižením kůže, která má vzhled pomerančové kůry (peau d'orange). Roste velmi rychle a velmi záhy zakládá metastázy v uzlinách podpaží i v dalších orgánech [6].

Pohled na karcinom prsu se za poslední desetiletí výrazně změnil. Na základě profilů genové exprese byly charakterizovány základní („intrinsic“) typy karcinomu prsu: luminální A, luminální B, HER-2 pozitivní a basal like a normální tkání prsu podobný typ (normal-like), což představuje taxonomické označení, jež je široce používané ve výzkumu karcinomu prsu. Podle nejnovějších poznatků je zřejmé, že karcinom prsu s pozitivními a negativními ER jsou dvě zcela odlišná onemocnění, která mají různé prekursor, cesty diseminace, klinické chování a odpověď na léčbu. Znamená to, že genetický profil ER pozitivního invazivního karcinomu s nízkým gradem bude zcela odlišný od ER negativního karcinomu prsu s vysokým gradem. Grading nádoru souvisí se stupněm genetické instability nádoru [7]. V roce 2012 byl popsán kompletní genový profil zatím nejrepresentativnějšího souboru karcinomu prsu [8]. Zajímavé je, že nejširší spektrum genových mutací bylo nalezeno právě u luminálních karcinomů s pozitivními ER.

Karcinomy prsu se kromě lokálního invazivního růstu šíří také lymfatickou nebo hematogenní cestou. Lymfatické metastázy jsou nejčastější v regionálních mízních uzlinách, především axilárních, nebo ve vnitřních mamárních (u nádorů z vnitřních kvadrantů). Postižení nadklíčkových a podklíčkových uzlin se již považuje za vzdálené metastázy. V době diagnózy lze zjistit uzlinové metastázy u 50-70% nemocných s negativním palpačním nálezem v axile. Hematogenní šíření do kostí, plic, pleury, jater, ovaria, kůže a mozku může nastat dokonce již u subklinického nádoru [9].

1.4 Klinické příznaky

Primární nádor může být zcela asymptomatický. Přesto si může každá žena odhalit toto onemocnění sama při pravidelném samovyšetřování prsu. Příznaky, které by měly ženu přivést k vyšetření u odborného lékaře, jsou: změna velikosti prsu, změna zbarvení kůže, vtažení kůže a změna kontury prsu, asymetrie prsů, vpáčení bradavky, sekrece z bradavky, hmatná bulka v prsu či podpaží. Mastodynie provází častěji benigní afekce, může však být přítomna u inflamatorního karcinomu [5].

Celkové příznaky nemoci vyplývají až z přítomnosti vzdálených metastáz. Jsou to bolesti v kostech, nechutenství, hubnutí, teploty, dušnost. Specifickým projevem mohou být paraneoplastické příznaky kožní (dermatomyozitida, acanthosis nigricans). Některé iniciální nálezy nejsou při vyšetření pohmatem zjistitelné, proto je nutné vedle fyzikálního vyšetření prsů, krčních, nadklíčkových a axilárních uzlin i preventivní vyšetření pomocí zobrazovacích metod – ultrazvuku a rentgenu (mamografie) [5].

1.5 Diagnostika a stanovení klinického stadia nemoci (staging)

1.5.1 Diagnostika

Základem vyšetřovacího algoritmu je klinické vyšetření. Jeho součástí musí být pečlivá rodinná i osobní anamnéza a celkové fyzikální vyšetření se zvláštní pozorností zaměřenou na oblast prsů a spádových lymfatických uzlin. Pohledem lze zjistit symetrii prsů, souhyby s dýcháním, pravidelnost areoly, stav bradavek a kůže prsu. Vyšetření má probíhat při vzpřímeném hrudníku i vleže. Následuje pohmat, kterým se vyšetří oba prsy ve všech kvadrantech. Pokud je hmatná rezistence, určí se její velikost, konzistence, pohyblivost proti spodině a kůži. Palpační vyšetření zahrnuje i vyšetření uzlin v podpaží, nadklíčku a na krku [5].

Součástí diagnostického procesu jsou zobrazovací metody. Mamografie má dominantní postavení mezi neinvazivními vyšetřovacími metodami. Jedná se o rentgenologické vyšetření prsní žlázy měkkým zářením. V mamografickém obraze se hodnotí stín žlázy, přímé či nepřímé známky patologického ložiska a uzliny v oblasti přední axilární řasy. Mamografie dokáže objevit i mikrokalcifikace, nejčasnější známky neinvazivního

nádoru. Největší výtěžnost a nezastupitelnost má mamografie u žen středního a vyššího věku, kdy je parenchym žlázy většiny žen (60-80%) již v involuci a obraz žlázy je dobře přehledný a hodnotitelný. Přínos mamografie je nízký u mladých žen nebo u žen s geneticky daným typem žlázy, který nepodléhá involuci ani ve vyšším věku. Její výtěžnost ve spojení s klinickým vyšetřením je až 90% [10].

Ultrasonografie prsu je doplňkovým vyšetřením po mamografii, má vysokou senzitivitu (95%), ale omezenou specificitu. Umožní rozlišení cystické nebo solidní složky patologického útvaru, pod ultrasonografickou kontrolou lze také provést cílené bioptické vyšetření [10].

Prsní žláza může být vyšetřována rovněž magnetickou rezonancí (k vyloučení multifokálního karcinomu), výpočetní tomografií (k posouzení změn v okolí maligního nádoru a jeho vztahu k pectorální fascii, nezbytná k vyloučení metastatického postižení) a pozitronovou emisní tomografií (k rozlišení útvarů nenádorového původu a k diagnostice metastáz ve vnitřních mamárních uzlinách), [5]. Přínos těchto metod se zatím vyhodnocuje, pro rutinní preventivní vyšetření prsní žlázy se však nehodí.

U žen s hereditární predispozicí karcinomu prsu je standardem vyšetření nukleární magnetickou rezonancí, jejíž senzitivita dosahuje 75-99 %. Magnetická rezonance (MR) poskytuje informaci morfológickou (nativní MR obraz) i funkční.

U metastatického onemocnění je nutno použít i další zobrazovací metody, jako je rtg snímek plic (k vyloučení plicních metastáz), USG břicha (k vyloučení jaterního postižení) a scintigrafii skeletu (k vyloučení kostních metastáz).

Pro zhodnocení stavu nemocné před pravděpodobnou terapií je nutné biochemické vyšetření, jehož součástí je stanovení nádorových markerů CEA (karcinomembryonální antigen) a CA 15-3, které jsou zvýšeny u karcinomu prsu především generalizovaného do dalších orgánů. Nicméně i pokročilé onemocnění může být zcela bez zvýšení uvedených markerů. Markery se opakovaně vyšetřují ke sledování průběhu léčby a po jejím ukončení k stanovení možné progrese onemocnění [5].

Základním předpokladem stanovení diagnózy je získání tkáně pro histopatologické vyšetření. Odběr tkáně se provádí buď stereotakticky pod kontrolou mamografu nebo častěji z volné ruky (free hand) pod kontrolou ultrasonografu [5]. Punkce tenkou jehlou (FNA) má význam spíše pro rozlišení cystického a solidního útvaru, ale histologické vyšetření je možné pouze samořeznou jehlou (core biopsy, tru cut), kdy se získá dostatečné množství nádorové tkáně k histologickému vyšetření.

Základní histopatologické vyšetření hodnotí velikost nádoru, kdy by měla být měřena jen invazivní část mikroskopicky. Musí být určen histologický typ nádoru, dále histologický grade – grade 1 dobře diferencovaný, grade 2 středně diferencovaný a grade 3 níže diferencovaný. Dále se hodnotí přítomnost invaze do lymfatických a krevních cév, kdy přítomnost invaze je nepříznivým prognostickým faktorem. Přítomnost perineurální propagace a nekróz v nádoru je pro pacienta také nepříznivá. Dále se hodnotí radikalita chirurgického výkonu z hlediska dostatečnosti lemu zdravé tkáně v okolí extirpovaného nádoru [5].

Pro stanovení další terapie je důležité imunohistochemické vyšetření, které je založené na stupni exprese hormonálních receptorů - estrogenových receptorů (ER) a progesteronových receptorů (PR). Pozitivní jsou nádory s více než 1% buněk s receptorem. Předpokladem hormonální dependence a případné odpovědi na cílenou hormonální terapii je zvýšená exprese těchto hormonálních receptorů (HR) v tumoru.

Při vyšetření proliferační aktivity nádorových buněk se standardně používá imunohistochemické vyšetření s monoklonální protilátkou specifickou pro marker MIB1 (Ki-67 proteinu), který je základním ukazatelem proliferační aktivity buněk. Antigen Ki-67 je nukleární protein a je exprimován ve všech proliferujících buňkách během pozdní fáze G1 a fází S, M a G2 buněčného cyklu. Buňky ve fázi G0 (u nichž cyklus neprobíhá) konzistentně antigen Ki-67 postrádají, nestimulované nenádorové lidské buňky antigen Ki-67 též neexprimují. Ki-67 pozitivní frakce buněk je označována jako růstová frakce a je udávána jako základní ukazatel proliferační aktivity buněk [9].

Z onkoproteinů se stanovuje jednak p53, jednak s ohledem na biologickou léčbu HER-2/neu. Protein p53 je transkripční faktor zabráňující vzniku nádorů. Protein p53 reguluje expresi většího množství genů, které kontrolují růst buněk, apoptózu, opravu DNA, stárnutí buněčných populací a také angiogenezi.

Receptorový protein HER-2 je produktem genu HER-2/neu, který se nachází na dlouhém raménku chromozomu 17 v oblasti q11.2q12. HER-2 patří do široké rodiny HER, homologů EGFR (epidermal growth factor receptor), a má význam pro buněčný růst a transdukcii signálu v buňce. Za normálních podmínek je zastoupení těchto receptorů v jedné buňce prsní žlázy okolo 20 000 kopií. Při overexpresi může počet receptorů HER-2 vzrůst až na několik milionů, což je ve většině případů přímý důsledek amplifikace genu HER-2/neu. Overexpresi těchto receptorů obvykle detekujeme pomocí imunohistochemie. U nádorů s hraniční či nejednoznačnou pozitivitou se používá dále metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace), která stanoví zvýšený počet kopií (amplifikace) genu HER-2/neu a ve většině

případů koreluje se zvýšenou expresí proteinu. Stav receptorů HER-2 a hormonálních receptorů nádorových buněk je základním parametrem pravděpodobné úspěšnosti biologické anti-HER-2 léčby [11].

Pro stanovení stadia onemocnění, tedy míry pokročilosti onemocnění, je nutno stanovit množství nádorově infiltrovaných uzlin z celkového počtu odebraných a vyšetřených uzlin. V současné době je pozornost směřována i k vyšetření sentinelových uzlin. Extirpace sentinelové uzliny je založena na předpokladu, že nádorové buňky se šíří lymfatickou cestou z primárního nádoru do spádové uzliny v příslušném regionu, kde se s vysokou pravděpodobností zachytí právě v této sentinelové uzlině. Pokud je tedy tato infiltrována nádorovými buňkami, je míra rizika postižení ostatních uzlin v regionální oblasti vysoká [5].

1.5.2 Stanovení klinického stadia nemoci (staging)

Stanovení klinického stadia nemoci (staging) má zásadní význam pro volbu léčebných prostředků.

Ke stanovení stagingu u karcinomu prsu používáme klasifikaci TNM a vyšetřujeme:

- **Kategorie T (primární nádor):** klinické vyšetření a zobrazovací vyšetřovací metody, např. mamografie.
- **Kategorie N (regionální mízní uzliny):** klinické vyšetření a zobrazovací vyšetřovací metody.
- **Kategorie M (vzdálené metastázy):** klinické vyšetření a zobrazovací vyšetřovací metody.

Pooperačně se stanovuje tzv. pooperační patologická klasifikace neboli pTNM.

Klinická stadia jsou uvedena v tbl. 1.

Tabulka 1 Klinická stádia dle AJCC classification of breast cancer, AJCC 2010

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1 ^a	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1 ^a	N1mi	M0
IIA	T0	N1 ^b	M0
	T1 ^a	N1 ^b	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1 ^a	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	jakékoliv T	N3	M0
IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

^aT1 včetně T1mi.

^bT0 a T1 nádory s uzlinovými mikrometastázami řadíme do stadia IB.

1.6 Prognostické a prediktivní faktory

Pro volbu správné léčebné strategie je nutné zhodnotit prognostické a prediktivní faktory a je možné i vyslovit prognostický odhad, který umožní předpovědět délku a kvalitu života nemocné. Prognostickými faktory jsou charakteristiky nádoru, které určují, jak velké riziko onemocnění představuje pro délku života nemocné i dobu do progresu onemocnění [5], (tabulka 2).

Tabulka 2 Prognostické dělení rizikových pacientek pro doporučení adjuvantní léčby ze St. Galenu.

Prognostický faktor	Nízké riziko (všechna kritéria musí být splněna)	Střední riziko (všechna kritéria musí být splněna)	Vysoké riziko (jen jedno kritérium musí být splněno)
Infiltrace regionálních uzlin	negativní	Negativní	negativní pozitivní
Velikost nádoru	T1 do 1 cm	T 1-2 cm	T nad 2 cm
Grading	G1	G1-G2	G2-G3
Hormonální receptory	ER + a (nebo) PR +	ER + a (nebo) PR +	ER- a PR-
Věk	35 let a více	35 let a více	do 35 let

Zdroj: Zdeněk Adam, Jiří Vorlíček, Jiří Vaníček a kolektiv. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob 2004.

Tradičními prognostickými markery, které hodnotí patolog, jsou velikost tumoru, přítomnost nebo absence metastáz v axilárních uzlinách a histologický grade. Proliferační aktivita populace karcinomových buněk je dalším nezávislým prognostickým faktorem (tabulka 3). Přítomnost minimální reziduální choroby v kostní dřeni je známkou časně diseminace nádoru a špatné prognózy. Objevují se další nové nádorové markery, které mají podle předběžných studií potenciální prognostickou hodnotu, ale zatím nebyly do rutinní diagnostiky zahrnuty. Jde např. o detekci cyklinu D1, cathepsinu D, aktivátorů plasminogenu, angiogenních faktorů a dalších molekul.

Tabulka 3 Základní prognostické a prediktivní faktory využívané při léčebných rozhodnutích u karcinomu prsu

Adjuvantní léčba	Neoadjuvantní a paliativní léčba
Přítomnost hormonálních receptorů v nádoru	Přítomnost hormonálních receptorů v nádoru
Věk	Věk
Klinické stadium nemoci	Výkonnostní stav nemocné
Postižení axilárních uzlin	Rozsah onemocnění
Expresse onkogenu HER-2	Expresse onkogenu HER-2
Velikost primárního nádoru	Rychlost progresse onemocnění
Histologický typ nádoru	
Nádorový grade	
Přítomnost lymfangioinvaze	
Molekulárně-genetický profil nádoru	

Zdroj: Jan Novotný, Pavel Vítek a kolektiv. Onkologie v klinické praxi 2012.

K posuzování prognostických faktorů byly navrženy různé systémy. Jedním z nich je Nottinghamský prognostický index (tabulka 4).

Současně je třeba provést predikci klinické účinnosti léčby. Prognostické faktory se v některých případech kryjí s prediktivními, ale zdaleka nejsou totožné.

Prediktivní faktory určují pravděpodobnost léčebné odpovědi. Např. přítomnost hormonálních receptorů určuje možnost hormonální léčby. Nádory s negativními receptory neodpovídají na hormonální léčbu a mají zpravidla vyšší proliferační aktivitu. Z molekulárně-biologických prognosticko-prediktivních faktorů se stanovuje zvýšená exprese transmembránového protoonkogenu, označovaného jako HER-2. Zvýšená exprese je prokazatelná u 14% invazivních karcinomů prsu a hraje důležitou roli v nádorové transformaci, proliferaci a procesu metastazování. Je spojena se signifikantně horší prognózou a v řadě studií byla prokázána korelace s dalšími nepříznivými prognostickými faktory, jako je přítomnost nádorově postižených axilárních uzlin, ER negativita, vyšší histologický grading, mutace p53 – supresorického genu aj. Jeho stanovení má též prediktivní význam, a to před cílenou anti-HER-2 léčbou [10].

Tabulka 4 Nottinghamský prognostický index

Parametr	Bodové hodnocení
Postižení mýzních uzlin	
není	0
1-3	1
>3	2
Nádorový grade	
1	1
2	2
3	3
Velikost nádoru	0,2x velikost nádoru v cm
Interpretace	Interpretace
< 3,4	Benefit chemoterapie se nepředpokládá
3,4 - 5,4	Možný benefit chemoterapie-zvážit její podání
> 5,4	Chemoterapie má prokázaný prospěch
Skóre	5 leté přežívání
≤ 2,4	93%
> 2,4 - ≤ 5,4	85%
> 3,4 - ≤ 5,4	70%
> 5,4	50%

Zdroj: Jan Novotný, Pavel Vítek a kolektiv. Onkologie v klinické praxi 2012.

1.7 Terapie

Pro určení správného algoritmu léčby je nezbytné přesné stanovení diagnózy a rozsahu onemocnění.

Podle rozsahu onemocnění lze karcinomy prsu rozdělit na čtyři základní prognosticky odlišné skupiny:

- čisté neinvazivní nádory, tj. DCIS a LCIS (st. 0).
- operabilní stadia – lokoregionálně invazivní karcinomy (st. I, II a některá III.A).
- inoperabilní – lokoregionálně invazivní (IIIB a některá st. IIIA).
- metastazující či recidivující onemocnění (st. IV).

Podle současných doporučení je možno pacientky s karcinomem prsu rozdělit do 4 prognosticky rozdílných skupin: Luminal A (ER a/nebo PR pozitivní, HER-2 negativní, nízké Ki-67, grade musí být <3), Luminal B – HER-2 negativní (ER a/nebo PR pozitivní, HER-2 negativní, vysoké Ki-67, grade musí být >1), Luminal B – HER-2 pozitivní (ER a/nebo PR pozitivní, HER-2 pozitivní, jakékoliv Ki-67), triple negativní (ER i PR negativní, HER-2 negativní) a HER-2 – neluminální (ER i PR negativní, HER-2 pozitivní), [12].

Základními rozhodovacími kritérii pro volbu léčebné strategie jsou: stav hormonálních receptorů, status HER-2, předchozí léčba a její toxicita, délka období bez projevů onemocnění (disease-free survival – DFS), rozsah metastatického postižení (daný velikostí, počtem i lokalizací metastáz), biologický věk pacientky, výkonnostní stav (performance status – PS), přítomnost komorbidit, vztah k menopauze, psychosociální faktory a v neposlední řadě i postoj pacientky k léčbě. K léčebným modalitám, které mají svoji roli v léčbě karcinomu prsu, patří léčba chirurgická, radioterapie, hormonoterapie, chemoterapie a cílená léčba. Mezioborová spolupráce představuje základní podmínku pro kvalitu a optimalizaci péče o nemocné. Klíčovými odborníky jsou chirurg, onkolog, radiační onkolog, radiolog, patolog a další specialisté.

1.7.1 Chirurgická léčba

Operační odstranění nádoru je nejstarším léčebným přístupem a v minulosti bylo jedinou léčebnou možností. Modifikovaná radikální mastektomie zahrnuje různé chirurgické

postupy mající za cíl kompletně odstranit prs a pektorální fascii. Kombinace chirurgické léčby s dalšími metodami umožnily postupně odklon od radikality výkonu zavedením operací šetřících prs (tzv. záchovné operace). K nim patří kvadrantektomie (segmentální mastektomie), tj. vynětí příslušného kvadrantu prsu s nádorem nebo lumpektomie (tumorektomie), což je pouhá exstirpace nádoru s nejméně centimetrovým lemem nepostižené tkáně [9]. Těsné nebo pozitivní okraje jsou spojeny s až 8 násobným zvýšením rizika recidivy [13]. Proto je vhodné vyžadovat dostatečné resekční okraje a reoperovat všechny pacientky s pozitivním okrajem řezu a multicentrickým karcinomem. Prs zachovávající výkony doplněné standardně adjuvantní radioterapií jsou u lokalizovaných stadií rovnocenné radikálním ablačním výkonům, a proto jsou v těchto indikacích užívány stále častěji.

Na stále větším počtu pracovišť je zaváděna operativa s využitím peroperační detekce a histologického vyšetření sentinelové uzliny. V případě, že sentinelová mízní uzlina (uzliny) není postižena, exenterace axily se neprovádí, neboť pravděpodobnost postižení axilárních uzlin se pohybuje kolem 1%. V případě pozitivního nálezu však klasifikujeme onemocnění minimálně jako N1 a dokončujeme exenteraci axily – především ze stagingových důvodů, abychom mohli adekvátně rozhodnout o pooperační onkologické léčbě. Exenteraci axily s nálezem 10 a méně vyšetřených uzlin je nutné považovat za neadekvátní [14].

K bezprostřední rekonstrukci prsu lze přistoupit po mastektomii provedené z důvodu karcinomu in situ. U ostatních pacientek je doporučeno odložit rekonstrukční výkon o 6-24 měsíců po poslední chemoterapii nebo radioterapii. Důvodem k tomuto rozhodnutí je neakceptovatelně vysoké riziko komplikací radioterapie po rekonstrukčním výkonu s autologním i heterologním implantátem (dostavují se u 16, resp. 41% ozařovaných žen) [15]. U žen s pozitivitou BRCA1 a BRCA2 je indikovaná profylaktická bilaterální mastektomie a ovarektomie [16].

1.7.2 Radioterapie

Radioterapie má v léčbě karcinomu prsu své pevné místo přes určitá omezení. Ta jsou daná jednak lokoregionálním účinkem záření, jednak poněkud omezenou radiosenzitivitou karcinomu prsu. Radioterapie je zařazována ke komplexní léčbě jako pooperační, předoperační (např. u inoperabilních tumorů), paliativní (ozařování metastáz, např. do kostí, centrálního nervového systému, při léčbě relapsů).

Radioterapie s kurativním záměrem je tedy možná pouze u nádorů ohraničených, a to ve formě adjuvantní teleradioterapie z vysokoenergetických zdrojů záření (lineární urychlovače, izotopové ozařovače), [9]. Z metaanalýzy EBCTCG z roku 2012 vyplývá, že

provedení radioterapie po prs šetřícím výkonu snižuje riziko recidivy nádoru prsu v absolutních hodnotách o 15,7%, čemuž odpovídá relativní snížení počtu recidiv o 48%. Díky radioterapii přežívá 15 let po léčbě o 3% více žen [17].

Záření se zpravidla zahajuje po skončení adjuvantní chemoterapie, tj. přibližně do 6 měsíců. Tam, kde nelze použít systémovou léčbu, se ozařuje ihned po zhojení operační rány. Prs se ozařuje ze dvou protilehlých polí dávkou 50 Gy v pěti týdnech. Poté je možné dosycení (boost) na oblast nádorového lůžka do celkové dávky 60 až 65 Gy [9].

Významem dosycení (boostu) se zabývala studie EORTC 10882. Pacientky byly randomizovány do skupin bez dosycení a se zařazením dosycení 16 Gy. Jednalo se o pacientky po kompletní excizi tumoru s dostatečnými okraji. Ve skupině bez dodatečného ozáření se vyskytlo 7,3% lokálních recidiv, ve skupině s boostem 4,3% (statisticky signifikantní). Prospěch z doplňkového ozáření byl významnější u mladších pacientek [18].

Boost je dále indikován u pacientek s vyšším rizikem lokální recidivy (lymfangioinvaze, těsné okraje, postižení uzlin). Radioterapie po mastektomii je indikována pro pacientky s tumory většími než 5 cm, s těsnými okraji a uzlinovým postižením. Radioterapie na oblast svodné lymfatické oblasti (ipsilaterální axila a nadklíček) by měla být standardem u pacientek po neadekvátní exenteraci axily (vyšetřeno ≤ 10 lymfatických uzlin), u pacientek s extrakapsulárním šířením nádoru mimo uzlinu a u všech pacientek s uzlinovým postižením.

1.7.3 Hormonoterapie

Je metodou, která je též aplikovaná jako systémová léčba v neodjuvanci, adjuvanci a paliaci. Základním předpokladem indikace je přítomnost hormonálních receptorů v nádorových buňkách ve vyšetřované nádorové tkáni. Snížení produkce estrogenů nebo blokády přenosu estrogeny zprostředkovaného signálu je možné dosáhnout různými mechanismy:

- **Ablativní** – ovlivnění ovárií, která produkují hormony, tedy jejich odstranění či vyřazení z funkce. Ovariectomie, tj. chirurgická kastrace, se používá nejdéle. Stále častěji je však nahrazována dalšími možnostmi. Radiační kastrace je indikována v případě, kdy chirurgická není možná. Nevýhodou je opožděný nástup – za 2 až 3 měsíce po radioterapii na oblast ovárií. Medikamentózní ovariectomie analogy gonadoliberinů (LHRH analoga – goserelin, buserelin, leuprolid, triptorelin) vykazuje

odpovědi u metastatického karcinomu prsu ve 32–50 %. Výhodou je reverzibilita účinku. Nejčastěji je u nás používán goserelin (Zoladex).

- **Kompetitivní** – kompetice o vazebné místo na estrogenní receptory buňky (ER). Antiestrogeny jsou nejdůležitějšími hormonálními léky. Z nich nejčastěji používaný je tamoxifen. Má antiestrogenní účinky, ale má i tytéž účinky jako estrogenní agonista. Blokádou estradiolového receptoru znemožňuje intracelulární vazbu estrogenů, blokuje se proliferace a růst. Buňky jsou blokovány v časném období G1 fáze. U žen v premenopauze je vhodný po vyřazení ovarií. U žen v postmenopauze se používá jako primární hormonální léčba a je účinný především u pacientek s pozitivními estrogenními receptory.
- **Inhibiční** – blokáda biosyntézy estrogenů. Uplatňují se látky, které blokují tvorbu estrogenu v periferních tkáních a nadledvinách u pacientek s vyřazenou ovariální tvorbou. Inhibitory aromatáz - blokují aromatázu, která konvertuje steroidy na estron a estradiol v nadledvinách a částečně i v periférii, výsledkem je deplece estrogenů. U neselektivních aromatázových inhibitorů dochází k vyřazení tvorby ostatních steroidů, a tím ke vzniku vedlejších účinků. Proto byly vyvinuty nové selektivní inhibitory aromatáz. Existují nesteroidní inhibitory aromatázy- anastrozol, letrozol a steroidní – inaktivátory aromatázy: exemestan, formestan.
- **Aditivní** – podávání farmakologických dávek gestagenů. Nejčastěji se používají deriváty progesteronu, jako je medroxyprogesteronacetát (Depo-Provera) a megestrolacetát (Megace). Pravděpodobně působí mechanismem zpětné vazby blokádu předního laloku hypofýzy s poklesem produkce gonadotropinů (FSH, LH) a také ACTH. Bylo zjištěno, že nízké dávky megestrolacetátu působí přímo cytotoxicky. Megestrolacetát má navíc výrazný účinek anabolický a uplatňuje se v léčbě anorexie a kachexie.

Hormonální léčba je jednoznačně indikována jako součást adjuvantní léčby u premenopauzálních i postmenopauzálních pacientek s pozitivními receptory. Adjuvantní léčba se podává dlouhodobě. U žen před menopauzou je indikována ablativní hormonální léčba (ovariektomie, LHRH analoga, LHRH antagonisté), v případě pozitivních hormonálních receptorů je vhodná, kromě chemoterapie, též adjuvantní léčba antiestrogeny (SERM/antiestrogeny – tamoxifen). U žen po menopauze se nejčastěji v adjuvantní

hormonální terapii podává kompetitivní léčba. Z přípravků SERM je nejrozšířenější tamoxifen. Další možností je inhibiční léčba, která může být použita i jako léčba první volby.

Hormonální léčba metastatické nemoci je indikovaná v přítomnosti oligosymptomatického, pomalu progredujícího onemocnění.

1.7.4 Chemoterapie

Karcinom prsu je systémovým onemocněním, a proto je dominantní léčebnou metodou tohoto onemocnění systémová léčba, kterou je chemoterapie. Karcinom prsu je citlivý k relativně široké škále cytostatik s různými mechanismy účinku (tabulka 5).

Tabulka 5 Cytostatika účinná u karcinomu prsu a odpověď na jejich podání v monoterapii

Odpověď		
více než 50%	20-40%	do 20%
docetaxel	cisplatina	aktinomycin D
doxorubicin	cyklofosfamid	dakarbazin
epirubicin	fluorouracil	etopozid
paklitaxel	ifosfamid	gemcitabin
vinorelbin	karboplatina	
methotrexát	kapecitabin	
mitomycin C		
mitoxantron		
kapecitabin		
vinblastin		
vinkristin		

Zdroj: Klener P. Klinická onkologie 2002.

V zásadě existují tři indikační skupiny chemoterapie u karcinomu prsu: adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní.

Adjuvantní chemoterapie je léčba po předchozí chirurgické léčbě. Jejím cílem je likvidace tzv. zbytkové nemoci. Dle závěrů ze St. Gallen 2013 se doporučuje u většiny pacientek s tumorem grade 3, vysokou hodnotou Ki-67, nízkou expresí hormonálních receptorů, HER-2 pozitivitou, u triple negativních nádorů, u vysokého recurrence score podle Oncotype DX a u více než 3 postižených axilárních uzlin. Větší benefit je prokázán u nádoru s negativitou ER (tabulka 6), [19].

Nejčastěji používanými režimy jsou režimy založené na antracyklinech a taxanech, u selektovaných pacientek lze použít i režim CMF. U pacientek se středním rizikem relapsu, bez postižení axilárních uzlin a negativitou HER-2 a pozitivitou hormonálních receptorů, u kterých není indikace adjuvantní chemoterapie jednoznačná, může být přínosné došetření biologické charakteristiky nádoru pomocí Oncotype DX (ASCO guidelines, ESMO guidelines, doporučení NICE), [19].

Tabulka 6 Systémová léčba podle subtypů (podle závěrů St. Gallen 2013)

Subtyp	Léčba	Poznámky
"Luminal A"	samotná HT	CHT zvážit 4 uzliny a více, T3, G3
"Luminal B (HER2 negativní)"	HT ± CHT u většiny pacientek	zvážit podle positivity receptorů a rizika relapsu
"Luminal B (HER2 pozitivní)"	CHT + anti-HER2 + HT	vynechání CHT se nedoporučuje
"HER2 pozitivní (non luminal)"	CHT + anti-HER2	pacientky pT1aN0 mohou být pouze sledované
"Triple negativní (ductal)"	CHT	adenoidně cystický karcinom N0 může být pouze sledován

HT - hormonální terapie

CHT - chemoterapie

Zdroj: Rostislav Vyzula a kol. *Modrá kniha České onkologické společnosti 2014.*

Neoadjuvantní chemoterapie je vhodná u pacientek, u kterých lze očekávat odpověď na chemoterapii (nádory s nízkými nebo negativními estrogenovými a progesteronovými receptory, s vysokým gradem, karcinomy s vysokým Ki-67) [19]. Je aplikována u žen s pokročilým, ale technicky operabilním primárním nádorem s případným limitovaným postižením regionálních uzlin nebo u žen s velkým primárním nádorem omezené operability (primární chemoterapie). V době, kdy se k tomuto typu léčby přistupuje, je nemocná bez jakýchkoliv známek diseminace choroby. Neoadjuvantní chemoterapií se sleduje zmenšení primárního nádoru, případně i uzlin („downstaging“), zlepšení operability a umožnění záchranných operací. Neoadjuvance si dále klade za cíl podobně jako adjuvantní chemoterapie zničení předpokládaných skrytých a objektivně nezjistitelných mikrometastáz. Chemoterapie by měla být založena na bázi antracyklinů a taxanů. U pacientek s triple negativním karcinomem prsu, hlavně u pacientek s mutací BRCA1, lze zvážit režim založený na bázi platiny [19].

Paliativní chemoterapie je hlavní léčebnou metodou diseminovaného onemocnění. V současné době je upřednostňována monoterapie před kombinací cytostatik. Kombinace cytostatik je spojena s vyšší léčebnou odpovědí, s delší dobou do progresu onemocnění, ale s vyšším výskytem nežádoucích účinků. Nemá vliv na celkové přežívání pacientek. Kombinaci cytostatik je opodstatněné indikovat v situaci, kdy je potřeba rychle zredukovat rozsah onemocnění v důsledku výrazných klinických symptomů, popř. velmi rychlé progresi onemocnění [19].

Metastatický karcinom prsu je inkurabilní onemocnění. Lékař musí zvážit přínos léčby ve srovnání s jejími nežádoucími účinky. Účinek léčby se hodnotí po 3–4 cyklech chemoterapie. Nutno vždy zvážit, zda onemocnění bylo doposud chemosenzitivní (tzn. prokazatelná efektivita po 3–4 cyklech) či ne [19].

1.7.5 Cílená biologická léčba

V posledních letech bylo identifikováno velké množství molekul, jejichž cílené ovlivnění může představovat nový způsob léčby – jedná se o cílenou léčbu, tzv. biologickou terapii, která se od klasické chemoterapie odlišuje mechanismem účinku a toxickým profilem. Biologickou léčbou může být ovlivněno nejen chování nádorových buněk, ale může zasáhnout i nádorové mikroprostředí, jež je stěžejní pro buněčnou proliferaci, přežívání a metastazování.

Herceptin (trastuzumab, protilátka proti HER-2 receptoru) byl první schválenou cílenou monoklonální protilátkou pro léčbu solidních nádorů. HER-2 je receptorem z rodiny EGFR. U 20–30 % karcinomů je gen pro tento receptor amplifikován, což vyvolává zvýšenou expresi membránového proteinu. Tento stav je provázen kratším přežitím, časnými relapsy a zvýšeným počtem infiltrovaných lymfatických uzlinu karcinomu prsu. Jednoznačně zvýšená exprese HER-2 představuje horší prognostický faktor. Bývá často provázena vyšším histologickým gradem a nepřítomností hormonálních receptorů. V současné době je Herceptin indikován pro léčbu karcinomu prsu v neoadjuvanci, adjuvanci i paliaci. Podmínkou je vysoká exprese HER-2 receptoru [5].

Tyverb (Lapatinib), je malá molekula působící jako intracelulární duální inhibitor ErbB1 a ErbB2, je schválen pro léčbu pokročilých karcinomů prsu po selhání terapie trastuzumabem.

Perjeta (Pertuzumab) je monoklonální protilátka, která se váže na subdoménu II HER-2 extracelulární domény a zabraňuje HER-2 homo- nebo heterodimerizaci s jinými receptoty HER-2 rodiny, a tak zabraňuje procesu signální transdukce. Dosavadní studie potvrdily

synergické působení trastuzumabu a pertuzumabu, které může zabránit rezistenci k trastuzumabu [20,21].

Další molekulou pro terapii karcinomu prsu je bevacizumab (Avastin), monoklonální protilátka inhibující VEGF (vascular endothelial growth factor), která působí antiangiogenně. Nádorové ložisko si tvoří vlastní cévy, a pokud se podaří tento proces zastavit, nádor není schopen dále růst, protože má nedostatek kyslíku a živin. Biologická léčba otvírá slibné možnosti protinádorové terapie se specifitějším mechanismem účinku a s nižší toxicitou ve srovnání s cytostatickou léčbou.

1.7.6 Kombinace léčebných modalit

Všechny jmenované léčebné přístupy – chirurgický, radioterapie, chemoterapie, hormonoterapie, biologická terapie – jsou vzájemně kombinovány a postupně vyčerpávány podle míry pokročilosti a rizikovosti onemocnění u každé nemocné. Správné využívání všech léčebných modalit a jejich správná sekvence opět vyplývá z výsledků multicentrických klinických studií. Česká onkologická společnost vydává každoročně standardy léčebného postupu u maligních onemocnění, a tedy i u karcinomu prsu, navazující na světový a evropský standardní postup. Poslední vydání ze září 2014 obsahuje aktuální postupy léčby, které vycházejí z klinického stadia onemocnění a zhodnocení prediktivních i prognostických faktorů karcinomu prsu.

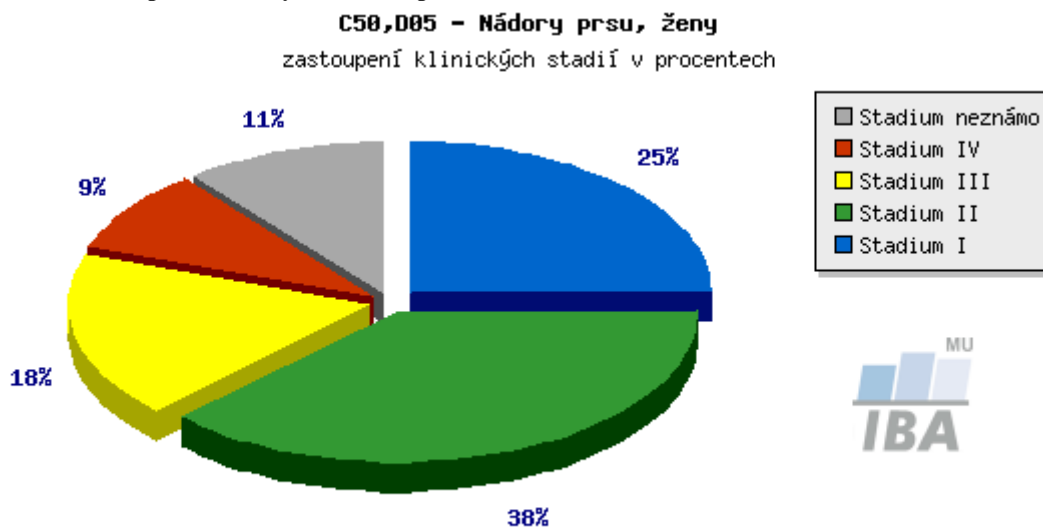
1.8 Prevence, screening

ČR patří mezi státy nejvíce zatížené onkologickými onemocněními, ročně je v naší zemi nově diagnostikováno více než 77 000 onkologických onemocnění a téměř 28 000 pacientů na tato onemocnění umírá. Počty nemocných stále rostou, mimo jiné také v důsledku stárnutí české populace [1].

U screeningu zhoubných nádorů prsu bylo studii prokázáno, že organizované programy v dlouhodobém měřítku snižují mortalitu na tato onemocnění, a to především díky nižšímu podílu pokročilých, těžko léčitelných stadií v době diagnózy. Z celkového počtu více než 6 000 hlášených nových karcinomů ročně se třetina zachytí ve screeningu.

V ČR je v současnosti 27% všech případů karcinomu prsu diagnostikováno ve stadiu III a IV (obrázek 5), [1].

Obrázek 5 Zastoupení klinických stadií v procentech



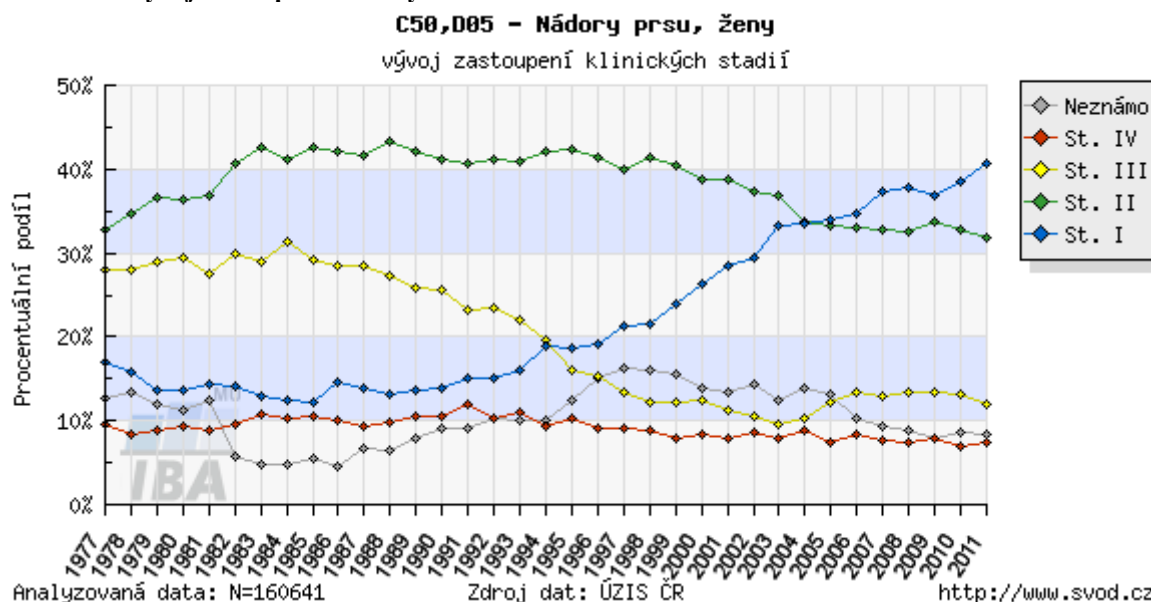
Analyzovaná data: N=160641

Zdroj dat: ÚZIS ČR

<http://www.svod.cz>

Situace se však poněkud zlepšuje a od poloviny 90. let se zvyšuje záchyt pacientek v I. klinickém stadiu na úkor III. klinického stadia, zastoupení II. a IV. klinického stadia se nemění (obrázek 6), [1]. Tuto pozitivní změnu lze přičíst včasné diagnostice a screeningu.

Obrázek 6 Vývoj zastoupení klinických stadií



Analyzovaná data: N=160641

Zdroj dat: ÚZIS ČR

<http://www.svod.cz>

Vzhledem k tomu, že primární prevence karcinomu prsu není prakticky možná, je třeba se zaměřit na prevenci sekundární, která směřuje k časnému záchytu a detekci rakoviny prsu a sledování rizikových skupin žen.

Detekce rakoviny v době, kdy je ještě kurabilní, skýtá příležitost začít efektivní léčbu ještě před rozvojem metastáz a tím dosáhnout snížení úmrtnosti. Nejjednodušší metodou včasného záchytu karcinomu prsu je samovyšetřování. Nejvhodnějším obdobím pro samovyšetřování je druhý nebo třetí den po skončení menstruace, kdy jsou prsy bez veškerého napětí. Vyšetření však nenahrazuje screening, nemůže odhalit nehmátné léze. Cílem screeningu je zachycení karcinomu prsu ve stadiu in situ, provádí se pomocí mamografie a vyžaduje dokonalou techniku i vycvičený tým odborníků. V populaci žen, které prošly screeninem, se snižuje riziko úmrtí o více než 40 %. Ženy ve věku od 45 let by měly mít pravidelně každé dva roky mamografické vyšetření, které hradí zdravotní pojišťovny.

1.9 Metastazování

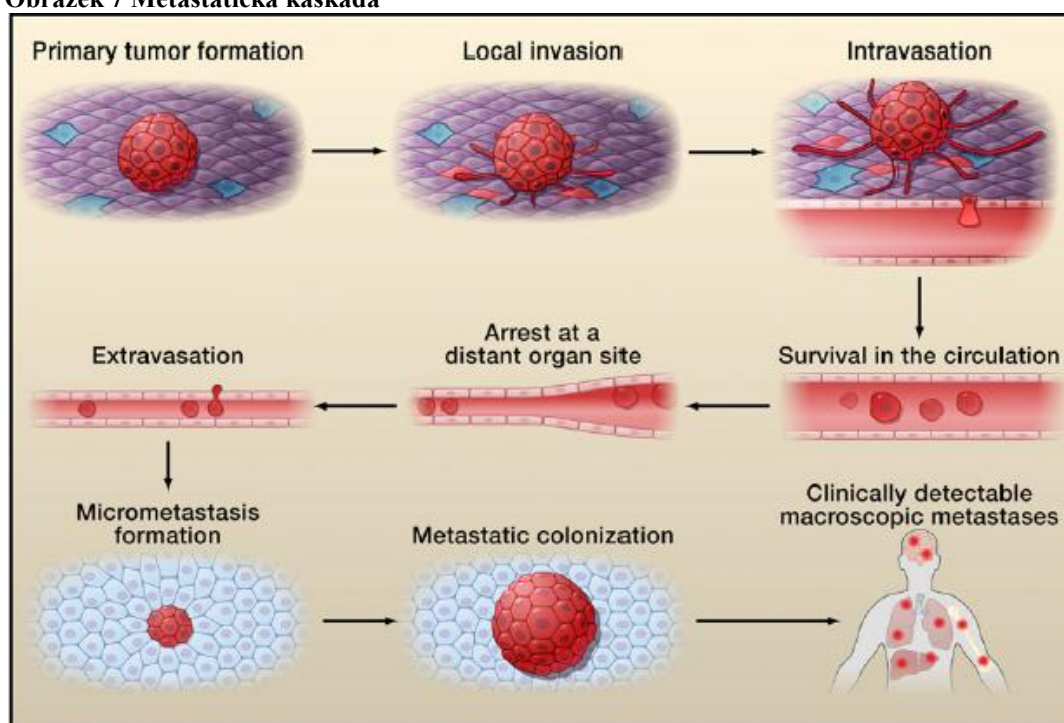
I přes zlepšení v oblasti diagnostiky, chirurgické léčby, lokální a systémové adjuvantní terapie, dochází k úmrtí významné části pacientů v důsledku pokročilého nádorového onemocnění, které je rezistentní na konvenční léčbu. Proces nádorového metastazování zůstává nadále ne zcela objasněný, i když výzkum v uvedené oblasti trvá přes 200 let. Nádorová diseminace je vícestupňový proces metastatické kaskády, kde výchozím krokem je invaze nádorových buněk do krevního či lymfatického oběhu. Jejich finální kolonizace závisí na interakci mezi mikroprostředím vzdálených orgánů a nádorovými buňkami. S individualizovaným způsobem metastazování souvisí i orgánová predilekce metastáz u některých typů nádorů obecně i u jednotlivých pacientů, což odpovídá více než 100 let známé Pagetově teorii „semene a půdy“. Domníval se, že v metastatickém postižení hrají cílové orgány jen nahodilou roli, že k němu dochází tehdy, jsou-li biologicky vhodné cirkulující nádorové buňky („seed“ neboli setba) zachyceny tkání, která je pro ně biologicky vhodným místem rozvoje („soil“ neboli půdou), kde buňky „zakoření“ a poté rostou.

Dalším důležitým milníkem v teorii metastazování byl objev Fidlera a jeho pracovní skupiny, která poukázala, že většina primárních nádorových buněk má nízký metastatický potenciál, a že během pozdější fáze vzniku nádorů se kapacita metastazování zvyšuje prostřednictvím somatických mutací. V období 1970 – 1980 Fidler se svojí pracovní skupinou dále prokázal, že některé nádorové buňky mají selektivní predispozici k zakládání metastatických ložisek v jednotlivých orgánech [22,23].

1.9.1 Metastatická kaskáda

Metastazování je složitý vícestupňový proces, který probíhá v několika etapách zahrnujících: 1. průnik nádorové buňky přes bazální membránu a intersticiální stroma, 2. intravazaci do cévního řečiště, 3. schopnost perzistovat v cévním řečišti, 4. kolonizaci nádorových buněk, 5. extravazaci, 6. tvorbu mikrometastáz, 7. koncovým bodem kaskády je tvorba makrometastáz, které jsou již klinicky detekovatelné (obrázek 7).

Obrázek 7 Metastatická kaskáda



Zdroj: Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. Cell. Oct 14, 2011; 147(2): 275–292.

První etapou metastatické kaskády je invaze nádoru do okolí, která předpokládá průnik nádorové buňky bazální membránou a intersticiálním stromatem. Interakce nádorových buněk s bazální membránou se děje prostřednictvím buněčných receptorů. Kromě receptorů pro laminin se zde uplatní zejména receptory pro integriny. Právě jejich prostřednictvím přilne buňka k bazální membráně. Ztrátu vzájemné soudržnosti buněk působí E-cadherin.

V dalším kroku pak dochází k degradaci extracelulární matrix (ECM) a následné invazi nádorových buněk do okolní tkáně hostitele. K degradaci dochází účinkem proteolytických enzymů. Jsou to matrixové metaloproteázy (MMP) a urokinázový aktivátor plazminogenu (uPA), [24]. Po navázání uPA na receptor dochází ke konverzi plasminogenu na plasmin a k následné degradaci složek ECM a aktivaci latentních metaloproteáz a

růstových faktorů. Za klíčový faktor umožňující invazi buněk se považuje E-cadherin sdružený s molekulami cateninů.

Ve stromatu pak dochází k interakci nádorových buněk s fibroblasty a myofibroblasty, endotelovými buňkami, adipocyty, mezenchymálními kmenovými buňkami, makrofágy a jinými buňkami imunitního systému [25]. Tyto stromální buňky jsou schopny zvyšovat maligní potenciál nádorových buněk prostřednictvím různých signálních drah. Například, invazivní potenciál u karcinomu prsu může být stimulován prostřednictvím sekrece interleukinu-6 (IL-6) adipocyty, které jsou přítomné v místním mikroprostředí [26]. Stromální CD4⁺ T-lymfocyty také podporují invazivitu u karcinomu prsu stimulací tumor asociovaných makrofágů (TAM), s následnou aktivací receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), [27]. Tato zjištění poskytují příklady obousměrných interakcí, které se vyskytují mezi nádorovými buňkami a intersticiálním stromatem.

Mechanismus intravazace může být silně ovlivněn strukturou cév zásobujících nádorové ložisko. Prostřednictvím různých mechanismů, které většinou vedou k aktivaci růstového faktoru pro endotelie (VEGF), dochází ke ztrátě rovnováhy mezi stimulatory a inhibitory angiogeneze a následně k neoangiogenezi. Na rozdíl od krevních cév přítomných v normálních tkáních, neovaskulatura nádorového ložiska je klikatá, má sklon k netěsnosti a je ve stavu kontinuální rekonfigurace [28].

Při invazi, migraci a angiogenezi nádorových buněk hraje taky roli inhibitor plazminového aktivátoru 1 (PAI1). Migrace buněk je iniciována mnoha signály. Mezi klíčové faktory patří autokrinní pohybový faktor tzv. autotaxin (ATX) a hepatocytární růstový faktor (HGF). Transport nádorových buněk krevní nebo lymfatickou cestou je principiálně obdobný. Mezi oběma cévními systémy existují četné spoje, takže nádorové buňky z místních cév nakonec stejně pronikají do oběhu. Migrace může probíhat dvěma způsoby. První možností je tzv. chemoatrakce, kdy buňky putují po koncentračním gradientu určité látky – chemoatraktantu (chemokinu). Řadíme mezi ně např. osteonektin či chemotaktické cytokiny. Osteonektin je glykoprotein asociovaný s ECM regulující buněčnou migraci, adhezi a proliferaci. Působení osteonektinu vede ke snížení hladiny tkáňového inhibitoru metaloproteáz-2 (TIMP-2), čímž se aktivuje matrixová metaloproteináza MMP-2 rozkládající matrix [29].

Přímá migrace buněk je vyvolána gradientem chemotaktických cytokinů, které tvoří vazby s receptory na povrchu buněk. Např. chemokin CXCL12 se váže na receptor CXCR4 na nádorových buňkách, čímž dochází ke zvýšené pohyblivosti, invazi a schopnosti přežití nádorových buněk [30]. Aktivací CXCR4 dráhy dochází především k aktivaci

PI3K/PTEN/AKT/ mTOR signální dráhy. Tato signální dráha je pravděpodobně odpovědná za časnou diseminaci nádorových buněk, jelikož cirkulující nádorové buňky detekované v krvi se také vyznačují aktivací PI3K [31].

Průnik nádorových buněk do cirkulace ještě nemusí nutně znamenat vznik metastázy. Ukazuje se, že tvorba metastáz je velmi neefektivní proces, protože přibližně 1 z 1 000 000 uvolněných buněk se uchytí a dá vznik klinicky se manifestujícímu metastatickému ložisku. Ukázalo se, že většina cytokeratin-pozitivních nádorových buněk má nízký proliferační potenciál [32].

Za eliminaci cirkulujících nádorových buněk jsou odpovědné různé mechanismy. Jedná se např. o nespecifickou destrukci, na níž se podílejí makrofágy a granulocyty, imunologické mechanismy, zejména buněčné (T-lymfocyty, NK-buňky), mechanické faktory a tzv. kyslíkový efekt, tj. zvýšená tenze kyslíku v arteriální krvi a v plicních kapilárách. Předpokládá se, že buňky schopné metastazovat se překrývají s tzv. kmenovými buňkami nádoru. To jsou buňky odolné k apoptóze i poškození DNA protinádorovou léčbou nebo nepříznivými vlivy mikroprostředí [33]. Jsou schopné sebeobnovy a vycestování do orgánových rezervoárů, jako je například kostní dřeň, kde mohou přetrvávat ve „spícím“ dormantním stavu a být trvalým nebezpečím dalšího postupu nádoru do vzdálených orgánů. V současné době nejsou prozkoumány faktory způsobující "probuzení" spících nádorových buněk s následným přechodem do dynamické fáze metastazování. Rovnováha, která reguluje dormantní stav buněk, může být narušena jak změnami cirkulujících nádorových buněk (např. mutace genů regulujících proliferaci a apoptózu), tak změnami okolního mikroprostředí (např. uvolnění růstových a angiogenních faktorů), [34]. Úloha imunitního systému, jako potenciálně důležité hostitelské složky pro řízení progresu metastazování, je stále diskutabilní, ale pravděpodobná.

Nidace nádorových buněk a jejich zpětný průnik do tkáně se děje nejčastěji v kapilární síti parenchymatózních orgánů. K uchycení nádorových buněk však dochází jen za určitých předpokladů. V cirkulaci tvoří nádorové buňky agregáty s destičkami, agregát (mikroembolus) se snáze zachytí v kapilárách. Následně dochází k adhezi destiček (adhezni molekuly: cytoadheziny, E-cadherin) a jejich degranulaci (uvolnění např. tromboxanu A₂) čímž dochází k ireverzibilní agregaci a fixaci trombu s nádorovými buňkami na cévní stěnu. Následuje pak pochod nutný k průniku uchycených buněk zpět do tkáně, který je obdobný první etapě metastatické kaskády. Prostřednictvím růstového faktoru z trombocytů (PDGF) se stimuluje proliferace buněk mikrometastázy, zároveň se uvolní serotonin, čímž dojde k lehčímu průniku nádorových buněk změnou permeability kapilár. Mikroembolus se záhy

obalí fibrinem, čímž se zajistí větší odolnost mikroembolu ve srovnání s izolovanými nádorovými buňkami.

Růst metastázy v novém mikroprostředí neprobíhá uniformně. Úspěšná kolonizace závisí na interakci mezi mikroprostředím („soil“) vzdálených orgánů. Z Pagetovy teorie vyplývá, že metastáza může růst pouze v prostředí odpovídajícím druhu a povaze nádoru. Proliferace metastázy je podmíněna přítomností různých růstových faktorů a přísunem živin a kyslíku.

1.9.2 Epiteliálně – mezenchymální tranzice (EMT)

Epiteliálně – mezenchymální tranzice (EMT) je rychlá a reverzibilní změna buněčných fenotypů. V průběhu tohoto procesu buňka ztrácí své epitelové vlastnosti (např. schopnost adheze) a získává mezenchymální fenotyp, pro který je typická schopnost migrace a invaze přes extracelulární matrix prostřednictvím vylučování lytických proteáz. EMT je také spojována se ztrátou exprese cytokeratinu 8 a 18 a mezibuněčných adhezivních proteinů: E-cadherinu a plakoglobinu. To vede k odbourání adherentních spojů a desmozomů. Snížená exprese E-cadherinu je často pozorována během progresu nádorového onemocnění [35]. Mezenchymální fenotyp buněk je charakterizován zvýšenou expresí vimentinu, aktinu hladké svaloviny, fibronektinu, matrixové metaloproteinázy 2 (MMP-2), matrixové metaloproteinázy 9 (MMP-9), N-cadherinu a cadherinu 11 [36].

EMT proces je regulován transkripčními faktory, signálními dráhami a molekulami mikroRNA. Transkripční faktor je protein, který reguluje transkripci DNA. Během EMT mnoho genů řídí buněčnou adhezi, mezenchymální diferenciaci, buněčnou migraci a invazi. Dráha využívající E-cadherinový promotor je nejlépe prostudovaná transkripční modulace během EMT. Známe i jiné transkripční faktory-např. látky Snail a Slug jsou asociovány s embryonálním vývojem a kancerogenezí. Jsou pozitivně regulovány signálními dráhami TGF β (transforming growth factor β), Wnt (wingless, Int-1), FGF (fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) a ER (estrogen receptor). EMT indukovaná proteinem Snail urychluje proces metastázování skrze zvýšenou invazivitu u rakoviny prsu [37] a indukci imunosuprese [38]. Snail a Slug se také podílí na vzniku a zachování fenotypu nádorových kmenových buněk (CSC-cancer stem cells).

Transformující růstový faktor β (TGF- β) hraje důležitou roli v mnoha fyziologických a patologických procesech jako je proliferace, diferenciaci, embryonální vývoj, angiogeneze, hojení ran či invaze tumoru. Signální dráha TGF- β má dvojí funkci. TGF- β je nádorovým supresorem ve zdravých epitelových buňkách a v raném stádiu nádorové progresu. Během

pokročilé fáze nádorového růstu se růstově inhibiční funkce TGF- β selektivně ztrácí. Deregulace TGF- β indukuje růst, invazi a metastazování nádorových buněk [39].

Wnt/ β -katenin signální dráha hraje důležitou roli při zachování CSC fenotypu u nádorových kmenových buněk. Inhibice Wnt signalizace blokuje tvorbu nádoru podporou epiteliální diferenciaci a represí EMT transkripčních faktorů Twist1 a Slug [40].

Notch signalizace je zapojena do rezistence na onkologickou terapii. Pokud je inhibována, může indukovat citlivost na terapii, což vede k inhibici růstu nádorových buněk, invazivity a metastazování [41].

1.9.3 Nádorové kmenové buňky

Nádorové kmenové buňky (CSC) tvoří malou subpopulaci celého nádoru a vytváří zásobárnu buněk se schopností sebeobnovy. Od ostatních nádorových buněk se liší přítomností speciálních povrchových markerů na svých plazmatických membránách. V porovnání s normálními kmenovými buňkami je schopnost sebeobnovy u CSC značně menší [42]. Dále je pro CSC typický nekontrolovaný růst a množení (např. nejsou schopné kontaktní inhibice růstu). Pokud část nádorových kmenových buněk odolá chemoterapii, snadno dochází k relapsu onemocnění. Přitom právě nádorové kmenové buňky obvykle odolávají velice dobře, protože neproliferují a slouží tudíž jako „pojistka“ pro nádor.

CSC izolovány z karcinomu prsu byly identifikovány jako CD44⁺CD24^{-/low} [43]. Populace CSC nádoru prsu představují fenotypově heterogenní skupinu buněk. Navíc bylo dokázáno, že CSC jsou heterogenní nejenom v expresi povrchových markerů, ale také že existuje celá řada subpopulací [44].

Patofyziologické podmínky jako poškození tkáně nebo vznik nádoru mohou změnit fenotyp diferencovaných buněk na multipotentní nádorové kmenové buňky skrze indukci EMT. Na tom se podílí EMT signální dráhy Wnt [45], Notch a Hedgehog, které řídí obnovu a následné zachování kmenových i nádorových kmenových buněk [46]. V případě zvýšené exprese Notch-1 (Notch homolog 1), dochází ke zvýšení schopnosti sebeobnovy CSC buněk aktivací CD44 a EpCAM [47]. EMT vede ke vzniku CSC fenotypu, který je předpokladem pro metastazování nádorových buněk. Hlavním spouštěčem tohoto procesu je deregulovaná TGF- β signální dráha [48].

Signální dráhy, které poskytují invazivní a metastatické vlastnosti nádorovým buňkám, jsou velkou příležitostí k blokování nádorové progresi a zabránění metastázování. Pochopení přesných mechanismů EMT by v budoucnu mohlo pomoci k navržení cílenější terapie, která bude specifická pro daný typ nádoru.

1.10 Diseminované a cirkulující nádorové buňky

Detekce diseminovaných nádorových buněk (DTC) v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk (CTC) v periferní krvi je předmětem výzkumu četných pracovních skupin, které se snaží zdokonalit nové diagnostické postupy. Zhoubný nádor prsu hraje důležitou „řídící“ úlohu v oblasti výzkumu DTC/CTC. Generalizované onemocnění v době primární diagnózy nebo relaps nemoci jsou zodpovědné za drtivou většinu případů úmrtí v souvislosti s rakovinou (~90%), [49]. Důkazy naznačují, že metastatické šíření z primárního nádoru je časnou známkou progresu onemocnění a nikoli její pozdní následek, jak se dříve myslelo [50].

Diseminaci nádoru u časného karcinomu prsu nelze zpočátku diagnostikovat ani pomocí zobrazovacích metod ani histopatologicky, proto se stále více uplatňují citlivé imunocytochemické a molekulární metody, určené k časnějšímu záchytu nádorových buněk v kostní dřeni, periferní krvi nebo lymfatických uzlinách. Včasný záchyt diseminovaných nádorových buněk je důležitou informací o nebezpečí budoucího znovuzplanutí nemoci a tedy i důvodem k podání systémové zajišťovací léčby a stává se jedinou „měřitelnou lézí“ pro posouzení efektu adjuvantní léčby. Také informace o přítomnosti izolovaných nádorových buněk v sentinelové uzlině posouvá hranice stagingu nádoru a podává informaci o možné lymfogenní propagaci [51].

Metastázy, jako konečný produkt vývoje zhoubného nádoru, jsou pro onkologa i jeho pacienta nežádoucím vyústěním průběhu choroby. TNM klasifikace i typing nádoru představují jen hrubou orientační metodu k posouzení rizika metastazování a volbě vhodné zajišťovací léčby. Vznik metastázy souvisí nejen s typem a rozsahem nádoru, ale i s charakteristikou mikroprostředí organismu, ve kterém se primární nádor nachází. Nádorová masa je tvořena heterogenní populací nádorových buněk a jen některé buňky jsou předurčeny k úspěšnému metastazování. Výzkum v oblasti metastatické kaskády na buněčné a molekulární úrovni poskytuje velký potenciál pro zlepšení diagnostiky a rozvoj účinné adjuvantní terapie.

Biopsie z primárního nádoru před zahájením léčby se v současné době používá ke stanovení molekulárních cílů. Tyto biopsie nesou určitá rizika pro pacienty, jsou invazivní, bolestivé, a stanovení výsledku trvá určitou dobu. Dalším problémem je, že populace nádorových buněk primárního nádoru je heterogenní, a proto může histologické vyšetření vzorku primárního nádoru vést k chybné představě o charakteru nádorových metastáz, které se v biologickém chování i případné léčebné odpovědi mohou od primárního nádoru zásadně

odlišovat. Posun v této oblasti přinesla tzv. tekutá biopsie (liquid biopsy), neinvazivní vyšetření cirkulujících nádorových buněk a cirkulujících nádorových nukleových kyselin. Uvedená metoda umožňuje sledovat genotyp nádoru v reálném čase, predikovat s dostatečným předstihem další vývoj onemocnění, odpověď na léčbu nebo riziko progresu. Výhledově by se vyšetření CTC mohlo uplatnit jako náhrada biopsie metastázy.

1.10.1 Definice, molekulární a funkční charakteristika DTC/CTC

Okulní nádorové buňky epiteliálního původu detekované v kostní dřeni a periferní krvi pacientek s karcinomem prsu nazýváme diseminované a cirkulující nádorové buňky. Jen zřídka jsou DTC/CTC nalezeny v kostní dřeni či krvi zdravých žen. Do krevního řečiště se denně odhadem uvolní přibližně 1×10^6 nádorových buněk na gram nádorové tkáně [52]. Uvolňování do cirkulace neprobíhá kontinuálně. Detekovaná populace DTC/CTC je velmi heterogenní skupinou buněk a jen část z nich je zdrojem pro vznik metastáz v životně důležitých orgánech. Kolonizace vzdálených orgánů cirkulujícími nádorovými buňkami je ve skutečnosti velmi neefektivní proces. Většina těchto buněk podstoupí apoptózu nebo může přetrvávat řadu let v inaktivovaném tzv. dormantním stavu vzhledem k absenci vhodných růstových faktorů.

Perzistence DTC v kostní dřeni po primární léčbě znamená trvalou hrozbu možného relapsu nemoci i po mnoha letech [53]. Jak změny v samotných DTC, například další mutace, tak i snížení imunologického dozoru nebo zvýšení angiogenetického potenciálu v okolním mikroprostředí mohou být spouštěcími mechanismy transformace nádorových buněk z klidové fáze do stádia metastázy [54]. Je známo, že se schopností metastazovat souvisí i overexprese tyrosinkinázového receptoru HER-2 na DTC [55]. Mezibuněčné signály zprostředkované HER-2 mohou být důležité právě v průběhu transformace buňky z dormantního do aktivního stavu. K probuzení dormantních buněk může ale přispět i jiný mechanismus, například větší počet p53 mutací [55], nahromadění genomické nerovnováhy [56] a sekrece růstových faktorů pro kmenové buňky jako je například epidermální růstový faktor (EGFR) nebo fibroblastový růstový faktor (FGF) a odpověď buněk na ně [57].

Úspěšnost záchytu DTC/CTC se může lišit na základě použitých klasifikačních kritérií a detekčních metod. Naume a kolektiv detekovali pozitivitu ve 13-15% případů a vycházeli přitom z morfologických klasifikačních kritérií [58], na rozdíl od pracovní skupiny, která pozorovala pozitivitu ve 30-35% a pozitivitu stanovovala na základě cytokeratin pozitivních buněk [59].

1.10.2 Morfologické vlastnosti DTC/CTC

- přítomnost buněčných shluků
- velké buňky s velkým jádrem a vysokým poměrem jádro-cytoplazma, silné nebo nepravidelné barvení cytoplazmy na cytokeratin
- je přítomné velké jádro, malé jádro je často zrnité nebo tečkované
- jedná se o EpCAM-pozitivní buňky
- je přítomna pozitivita pro CK8, 18, nebo 19
- jsou CD45 negativní
- velikosti minimálně 4 μm x 4 μm

V posledních letech se výzkum v oblasti minimální reziduální nemoci posouvá od stanovení počtu DTC/CTC k zjišťování genotypu a fenotypu nádorových buněk. Exprese HER-2 proto-onkogenu na povrchu buněk má prognostickou i potenciálně prediktivní hodnotu. Charakterizuje agresivní subpopulaci buněk s invazivním potenciálem [60,61]. Dále je známo, že většina DTC/CTC neexprimuje proliferační antigen Ki-67, a proto mohou být rezistentní k chemoterapii [62]. Imunocytochemické hodnocení fenotypu DTC/CTC je jenom jeden z aspektů výzkumu těchto buněk.

Detailní molekulární popis buněk karcinomu, nacházejících se v kostní dřeni, ukazuje rozmanitost jejich genotypu [56]. Pomocí moderních vyšetřovacích technik je možné provádět genomickou analýzu jednotlivých buněk, která může v případě DTC/CTC být zcela odlišná od buněk primárního nádoru [32]. Původní představa, že vývojem choroby dochází ke genetickým změnám odlišujícím metastatické buňky od buněk primárního nádoru, je v současné době nahrazována představou, že metastatický potenciál je zakódován již v primárním nádoru a vzniká v časnějších fázích tumorigeneze [63] v některých buňkách původního nádoru, což vysvětluje přítomnost DTC v kostní dřeni u časných stádií karcinomu prsu [63,64].

Kostní dřeň je cílovým orgánem nejenom pro DTC u karcinomu prsu, ale i jiných epitelových nádorů - například u kolorektálního karcinomu, karcinomu plic nebo prostaty. Výzkum se zaměřuje na molekulárně biologické vlastnosti metastazování, včetně podílu hypoxie a adhezních molekul [65,66].

Zajímavé je, že DTC exprimují CXC – chemokinový receptor CXCR4, což je možná klíčový faktor k vyhledání kostní dřene jako preferenčního rezervoáru, spíše než jiných vzdálených míst jako jsou plíce nebo játra. Další fenotypové změny se musejí objevit po

usazení v cílovém místě, aby se mohla nádorová buňka stát základem solidní metastázy. To vyžaduje i genetické změny, jako například genetické aberace, zahrnující receptory pro růstové faktory, adhezní molekuly, proteázy i hlavní histokompatibilní antigen (MHC), [67].

Dvě pracovní skupiny pod vedením autorů Alix-Panabieres a Balic prokázali, že značné množství DTC v kostní dřeni u pacientek s karcinomem prsu má fenotyp typický pro kmenové buňky a to buď $CD44^+ / CD24^- / \text{nizké}$ nebo $CK19^+ / MUC1^-$ [68,69]. Kromě toho se zdá, že uvedené buňky mají zvýšenou angiogenetickou kapacitu a expresi CXCR4 receptoru, což by jim mohlo usnadnit šíření do vzdálených orgánů [69,70].

Dosavadní poznatky vrhají tedy nové světlo na problematiku metastazování u karcinomu prsu a další podrobná molekulární charakteristika DTC/CTC prostřednictvím genomové amplifikace a popisu expresního profilu jednotlivých nádorových buněk jistě dále osvětlí metastatické mechanismy u karcinomu prsu.

1.11 Metody stanovení DTC/CTC

Pro detekci DTC z kostní dřene a CTC z periferní krve bylo vyvinuto několik detekčních metod [71-74]. V současnosti můžeme metody používané k detekci DTC/CTC rozdělit na metody k obohacení (enrichment), cytometrické/imunologické metody a molekulární metody. Publikované systémy detekce DTC/CTC se liší především svojí senzitivitou, specificitou, nákladností i pracností.

1.11.1 Metodické přístupy k obohacení DTC/CTC

DTC a CTC se nacházejí v kostní dřeni a periferní krvi ve velmi nízké koncentraci (1×10^{-5} až 1×10^{-6}), což je příčinou obtížné izolace uvedených buněk. Ke zvýšení zachytu DTC/CTC bylo nutné vyvinout různé metody, které jsou schopné zvýšit koncentraci těchto vzácných buněk - tzv. enrichment. Mezi tyto metody řadíme gradientovou centrifugaci využívající rozdělení buněk dle jejich hustoty pomocí separačního média o známé hustotě (např. Ficoll-Hypaque).

Další používanou metodou je imunomagnetická separace, která je založena na interakci mezi specifickými protilátkami a tumor-asociovanými antigeny (cytokeratiny, MUC-1, GA 733-2, mammaglobin, maspin a karcinoembryonální antigen), případně antigeny epiteliálního původu - např. anti-EpCAM (pozitivní selekce) nebo povrchovým antigenem leukocytů CD45 (negativní selekce), [71-74]. Následnou konjugací protilátky a magnetických

kuliček vzniká komplex protilátky a antigenu, který je izolován v prostředí magnetického pole.

Další možnou metodou k detekci epiteliálních nádorových buněk na základě jejich velikosti je metoda ISET (isolation by size of epithelial tumor cells), která izoluje buňky s využitím speciálních filtrů [75], nebo metoda MEMS (micro electro-mechanical system), která je založena na mikrofiltraci [76].

Nevýhodou metod založených na enrichmentu DTC/CTC pomocí velikosti buněk je různá velikost těchto buněk, což může při separaci buněk způsobovat kontaminaci leukocyty a vznik shluků buněk na filtrační membráně. Gradientová centrifugace s využitím roztoku Ficoll-Hypaque je velmi jednoduchá metoda, ale její nevýhodou je významný únik detekovaných buněk. Nevýhodou pozitivní selekce imunomagnetickou separací je, že některé nádorové buňky vykazují velmi nízkou nebo dokonce žádnou expresi EpCAM, jsou tedy EpCAM negativní DTC/CTC a touto metodou nemohou být detekovány [77].

1.11.2 Cytometrické/imunologické metody detekce DTC/CTC

- **CellSearch systém** (Veridex, NJ, USA) je v USA jediná technologie schválená FDA (Food and Drug Administration) k detekci CTC u metastazujícího karcinomu prsu, prostaty a kolorektálního karcinomu. Jedná se o automatizovaný imunomagnetický enrichment CTC exprimujících EpCAM antigen. Izolované buňky jsou pak označeny fluorescenčními monoklonálními protilátkami specifickými pro leukocyty (CD45) a buňky epiteliálního původu (cytokeratin 8,18,19). Analýza izolovaných fluorescenčně barvených CTC následně probíhá prostřednictvím automatizovaného mikroskopu. CTC jsou definovány jako CK⁺/CD45⁻ buňky obsahující jádro. Jejich množství se stanovuje pomocí CellSpotter Analyzer (Veridex, NJ, USA), [71].
- **AdnaTest BreastCancerSelect** (AdnaGen, Langenhagen, Německo) je další metodou pro separaci DTC/CTC prostřednictvím imunomagnetických kuliček konjugovaných s dvojicí protilátek – anti-MUC-1 a anti-EpCAM [78,79]. Izolované nádorové buňky jsou charakterizovány pomocí genové exprese tumor asociovaných genů HER-2, MUC1 a GA 733-2 prostřednictvím AdnaTest BreastDetect (AdnaGen, Langenhagen, Německo). Analýza fragmentů PCR je provedena pomocí Agilent Bioanalyzer 2100. Test je hodnocen jako pozitivní, pokud byl nalezen alespoň jeden PCR fragment transkriptu epiteliálních či nádorově specifických genů.

- **Membrane Microfilter Assay** je metoda, která používá speciální mikrofiltry pro rozdělení buněk dle jejich velikosti. Je schopná oddělit CTC od cirkulujících leukocytů a krevních destiček. Polykarbonátové filtry jsou poměrně jednoduchou, účinnou a levnou technikou pro CTC enrichment. Nevýhodou uvedené metody je možnost kontaminace CTC leukocyty a poměrně široké rozmezí velikosti CTC, které je v rozpětí 4-30 μm . Následně může dojít ke ztrátě těch CTC, které jsou menší než otvor v membráně [80].
- **Microfluidic CTC chip** je další možností získání obohacené frakce CTC. Toto mikrofluidní zařízení se skládá z řady mikropotů potažených anti-EpCAM protilátkou. Laminárním prouděním přechází periferní krev přes uvedené zařízení. Izolované CTC jsou obarvené protilátkami proti různým epiteliálním povrchovým antigenům, mezenchymálním antigenům či antigenům kmenových buněk. Následná detekce CTC probíhá pod fluorescenčním mikroskopem [81].
- **Fiber-optic Array Scanning Technology (FAST)** je kombinací fluorescenční cytometrie a automatické digitální mikroskopie. Tento zobrazovací systém dokáže oskenovat 300 000 buněk za sekundu a používá k detekci imunofluorescenčně značených CTC. Tato metoda je však ve fázi vývoje a není zatím otestována na větším souboru pacientů [82].
- **Epithelial Immunospot (EPISPOT)** je technologie, která stanovuje pouze viabilní nádorové buňky. Po krátkodobé kultivaci (48hod) jsou nádorové buňky schopné produkovat nádorově specifické proteiny. K negativní selekci leukocytů se používá monoklonální protilátka anti-CD45. Neviabilní CTC proteiny neprodukují. Tato metoda byla využita k izolaci DTC/CTC z kostní dřeně i periferní krve u metastazujícího karcinomu prsu se zacílením na antigen MUC-1 a CK19 [83].
- **Laser Scanning Cytometry (MAINTRACTM)** je další metoda založena na detekci EpCAM pozitivních buněk. K izolaci CTC z periferní krve využívá průtokovou cytometrii. Následně probíhá analýza morfologických vlastností izolovaných buněk, které jsou EpCAM pozitivní a CD45 negativní. Nevýhodou všech EpCAM pozitivních

metod je možnost falešně negativních výsledků v případě, že je snižená exprese EpCAM v průběhu epiteliálně-mezenchymální tranzice [84].

- **MagSweeper** je metoda založena na imunomagnetické separaci cirkulujících epiteliálních buněk z krve. Izolované buňky exprimují EpCAM antigen a v dalším kroku podléhají molekulární analýze [85].

1.11.3 Molekulární metody detekce DTC/CTC

Molekulární postupy využívající real-time RT-PCR jsou nejčastější alternativou po imunocytochemickém stanovení DTC/CTC. U karcinomu prsu jsou molekulární metody zaměřené nejčastěji na stanovení CK19 specifické mRNA. Nevýhodou je, že některé transkripty (např. CK18, CK19, CK20, MUC-1, PSA a CEA) mohou být produkovány normálními buňkami v krvi či kostní dřeni [86]. Řešením je využití kvantitativní RT-PCR a přesné stanovení cut-off hodnot.

Problémem může být i snižená exprese některých genů v DTC/CTC (např. v důsledku EMT procesu). Proto se doporučuje použít multimarkerovou RT-PCR analýzu. Nejvíce specifický přístup k detekci DTC/CTC je detekce nádorově specifických DNA aberací. Nicméně problémem zůstává genetická heterogenita solidních nádorů. Je známo, že nádorovou masu mohou tvořit subpopulace heterogenních buněk. Senzitivní detekční systém založený na DNA analýze tak musí používat panel sond proti různým genomovým aberacím.

Dalším potenciálním problémem přesnosti detekce DTC/CTC na bázi PCR je skutečnost, že volná amplifikovaná nukleová kyselina se může uvolnit z primárního nádoru do lymfatického systému a následně být přítomna v krvi.

Mezi hlavní výhody molekulárních metod řadíme jejich vysokou senzitivitu a velký výběr dostupných primerů, ale extrakce, skladování a příprava relativně nestabilní mRNA může vést ke ztrátě senzitivity a chybné identifikaci tumor specifických markerů [83].

Nedávno vyvinutá molekulární technologie AdnaTest (AdnaGen, Německo) je založena na kombinaci imunomagnetické separace MUC-1/HER-2/EpCAM pozitivních buněk karcinomu prsu a následné multiplex RT-PCR detekující transkripty epiteliálních či nádorově specifických genů [87]. Limitací EpCAM pozitivních technologií a RT-PCR představuje skutečnost, že exprese MUC-1 je přítomna i u aktivovaných T-lymfocytů.

1.11.4 Charakterizace DTC/CTC

DTC/CTC můžeme charakterizovat na úrovni DNA, RNA a produkovaných proteinů. Pro klinickou praxi jsou důležité biologické vlastnosti DTC/CTC ke stanovení terapeutických cílů a pro eliminaci minimální reziduální nemoci. Důležitou prognostickou a prediktivní informací je sledování změn biologických vlastností DTC/CTC v čase (např. změny indukované chemoterapií nebo cílenou biologickou léčbou). Molekulární charakterizace DTC/CTC má velký význam v diagnostickém a terapeutickém managementu pacientů s karcinomem prsu.

- **DNA analýza**

Chromozomální změny DTC/CTC izolovaných od pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním můžeme sledovat prostřednictvím fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Souběžná analýza několika mutací v jedné buňce je možná kombinací amplifikačních metod celého genomu a separačních metod jednotlivých buněk. Vzhledem k rozvoji dosavadních technologií je možné díky stanovení oligonukleotidů určit přesný počet kopií změn v genomu každé jednotlivé DTC/CTC [88]. Uvedený postup je důležitým krokem směrem ke komplexní analýze celého genomu jednotlivé DTC/CTC. Zejména vysoký stupeň amplifikace (např. HER-2 genu) se může stát cenným cílem pro cílenou léčbu.

- **RNA analýza**

Stanovení genové exprese DTC/CTC je možné též kvantitativní real-time RT-PCR. Většina výzkumných skupin využívá k analýze mRNA EpCAM pozitivní frakci buněk, která není kontaminována leukocyty [88]. Současné postupy doporučují izolaci DTC/CTC a následnou analýzu expresních profilů jednotlivých nádorových buněk.

- **Analýza nádorově specifických proteinů produkovaných DTC/CTC**

Barvení DTC/CTC založené na expresi různých epiteliálně-specifických proteinů (např. CK, povrchově adhezivních molekul nebo receptorů růstových faktorů) může mít klinický význam. Stanovení nádorově specifických proteinů secernovaných viabilními DTC/CTC je možné pomocí technologie EPISPOT (Epithelial ImmunoSpot). Analýza na úrovni proteinu prokázala, že DTC/CTC mají biologické vlastnosti důležité pro přežití a růst ve vzdálených orgánech. Dále je známo, že některé jejich vlastnosti jsou v souladu

s fenotypem nádorových kmenových buněk (CD44⁺, CD24⁻), což může vysvětlovat rezistenci k chemoterapii pozorovanou v několika klinických studiích [60,62,90].

2 Hypotézy a cíle práce

2.1 Pracovní hypotéza

Karcinom prsu je morfologicky a geneticky velmi heterogenní onemocnění. I přes pokrok ve včasné diagnostice karcinomu prsu a zlepšení adjuvantní terapie je prognóza pacientek limitována v důsledku výskytu vzdálených metastáz, které jsou okultní a zůstávají nedetekovatelné v době stanovení primární diagnózy. Proto se současný výzkum soustřeďuje na stanovení dalších parametrů, které umožňují individuální posouzení rizik a stratifikaci pacientů pro cílenou terapii. Tradiční prognostické faktory totiž nejsou dostatečné k tomu, aby předpověděly relaps onemocnění.

Vysoce citlivé a specifické imunomagnetické, imunofluorescenční a molekulární metody nyní umožňují detekci a charakterizaci DTC/CTC na úrovni jediné buňky v kostní dřeni a periferní krvi, což nám poskytuje náhled do prvního zásadního stupně v metastatické kaskádě. Mnoho studií prokázalo, že přítomnost DTC v kostní dřeni koreluje s horší prognózou u pacientek s karcinomem prsu. Periferní krev je ideálním zdrojem pro detekci a monitorování CTC kvůli neinvazivnosti vyšetření s možností opakování odběru. Kromě toho by mohla molekulární charakterizace CTC přispět ke zlepšení cílené onkologické léčby. Perspektivně by vyšetření DTC/CTC mělo být zařazeno mezi doporučené standardy léčebného schématu u karcinomu prsu jako biomarker odhadu rizika relapsu vhodný pro individualizaci terapie, monitorování účinnosti léčby a v neposlední řadě i pro rozvoj nových léčebných postupů u zhoubných onemocnění prsu. Cílená onkologická léčba tzv. „šitá na míru“ (tailored therapy) znamená i snížení nákladů individuální léčby jednotlivé pacientky s úmyslem léčit dostatečně adresně s minimalizací nežádoucích účinků.

2.2 Cíle práce

- Zavedení metodiky stanovení minimální reziduální choroby.
 - Stanovení diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni u pacientek s časným karcinomem prsu pomocí denzní gradientové centrifugace a imunocytochemické detekce

- Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientek s časným karcinomem prsu pomocí diagnostického systému AdnaTest
- Korelace výskytu DTC/CTC s klinicko-patologickými charakteristikami primárního nádoru
- Vztah mezi přítomností CTC v periferní krvi a DTC v kostní dřeni
- Monitorování výskytu DTC/CTC v průběhu léčby ve skupině pacientek s neoadjuvantní a adjuvantní terapií

3 Materiál a metodika

3.1 Subjekty hodnocení

Do studie byly zařazeny pacientky, které byly v období let 2010 až 2013 diagnostikovány a léčeny pro karcinom prsu na Onkologické klinice VFN a 1. LF UK v Praze. Odběr vzorků byl proveden na základě písemného souhlasu pacientek a podepsání informovaného souhlasu schváleného lokální etickou komisí VFN a 1. LF UK. Vzorky byly zpracovány v Laboratoři klinické imunologie a alergologie Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze.

Vstupní kritéria pro zařazení pacientek byla následující: histologicky verifikovaný karcinom prsu, věk 18-75 let, bez předchozího chirurgického zákroku a bez předešlé onkologické terapie. Vylučujícími kritérii byly vzdálené metastázy a předešlá chirurgická či onkologická terapie. Stadium nemoci bylo hodnoceno podle TNM klasifikace, 6. vydání, česká verze z roku 2004. Klinicko-patologická charakteristika pacientek v době diagnózy je shrnuta v tabulce 7.

Tabulka 7 Klinicko-patologická charakteristika pacientek (n=50)

Klinicko-patologická charakteristika	Celkem	%
Medián věku, y	37 let	NA
T – primární nádor		
T1	24	48
T2	19	38
T3/4	7	14
Stupeň diferenciacie – grade		
Dobře diferencovaný	3	6
Středně diferencovaný	20	40
Nízce diferencovaný	27	54
Histologický typ nádoru		
Duktální	44	88
Lobulární	2	4
Jiný	4	8
Stav hormonálních receptorů		
Estrogenové receptory pozitivní	30	60
Progesteronové receptory pozitivní	29	58
HER-2 pozitivní	11	22
Stav lymfatických uzlin		
Lymfatické uzliny negativní	30	60
Lymfatické uzliny pozitivní	18	36
Nelze hodnotit lymfatické uzliny	2	4

Pozn.: NA- not applicable (neaplikovatelný)

Vstupně podstoupila každá pacientka stagingová vyšetření (RTG plic, UZ břicha, scintigrafii skeletu) k vyloučení generalizace základního onemocnění. Cut-off hodnota použitá ke stanovení hormonální positivity byla 5%. Nádor byl vyhodnocen jako HER-2 pozitivní v případě, že výsledek HercepTestu byl 3+. Ve sporných případech (2+) byla doplněna fluorescenční in situ hybridizace. Ve studii byly dvě podskupiny pacientek podle pokročilosti onemocnění a léčebného schématu. V první podskupině bylo vyšetřeno 29 pacientek s onemocněním ve stadiu T2-4 N0-2, které zahájily léčbu neoadjuvantní chemoterapií (NACT), poté následovala operace a adjuvantní terapie. Vyšetřili jsme u nich kostní dřeň a periferní krve před zahájením NACT a po ukončení NACT, kdy kontrolní odběr dřeně i krve proběhl v době operace. Ve druhé podskupině bylo vyšetřeno 21 pacientek stadia T1-2 N0-1, které podstoupily primární chirurgický výkon doplněný adjuvantní léčbou.

Vzorky kostní dřeně a periferní krve byly získány v průběhu operace - segmentektomie nebo ablace. Kontrolní odběr byl proveden po 12 měsících adjuvantní léčby.

3.2 Odběr vzorku kostní dřeně

Při sternální punkci jednorázovou punkční jehlou (SteryLab, Itálie) bylo aspirováno 3-5 ml kostní dřeně. Výkon probíhal v místním znečistlivění nebo v celkové anestezii v době chirurgického zákroku. Kostní dřeň byla odebrána do zkumavek Vacutainer® BD K3EDTA (Becton Dickonson Diagnostics, USA). Časová sekvence odběru kostní dřeně je uvedená v předchozím odstavci.

3.3 Odběr vzorku periferní krve

Periferní krev množství 7 ml byla odebrána do zkumavek BD Vacutainer® K3EDTA (okamžité zpracování) nebo do speciálních zkumavek AdnaCollect (zpracování vzorku do 24 hodin). Vzorky krve byly odebrány ve stejnou dobu jako vzorky kostní dřeně.

3.4 Stanovení přítomnosti diseminovaných nádorových buněk

3.4.1 Zpracování vzorků kostní dřeně a izolace diseminovaných nádorových buněk

Do zkumavky o objemu 50 ml naplněné 20 ml Hankova roztoku byl přidán aspirát kostní dřeně a zkumavka byla centrifugována po dobu 10 minut při 168 x 125 g. Centrifugací došlo k oddělení jednotlivých frakcí, horní vrstva byla následně odstraněna a peleta byla resuspendována. Tato buněčná suspenze byla přidána do zkumavek Leucosep™ (Greiner Bio-One GmbH, Německo) a centrifugována s použitím gradientového separačního media k získání frakce mononukleárních buněk. Densní gradientová centrifugace byla provedena podle instrukcí výrobce. Cílem gradientové centrifugace bylo též očištění vzorku o mrtvé buňky, které mají tendenci k nespecifickému značení a záchytu v koloně. V jednokrokové proceduře by tak mohly výrazně kontaminovat pozitivní frakci.

Interfáze obsahující mononukleární buňky kostní dřeně byla promyta 10 ml fosfátového pufru (PBS) a poté centrifugována po dobu 10 minut při 250 x g. Tento krok byl opakován dvakrát. Buněčná peleta byla resuspendována s 5 ml PBS. Ve vzorku byl stanoven počet buněk a následně byla buněčná suspenze naředěna na koncentraci $1 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$. 300 μl buněčné suspenze bylo pipetou naneseno na mikroskopické sklíčko potažené poly-L-lysinem (Poly-Prep sklíčka, Sigma-Aldrich, USA). Sklíčka s nanesenou buněčnou suspenzí byla inkubována ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut a následně vysušena při pokojové teplotě.

3.4.2 Imunocytochemická detekce diseminovaných nádorových buněk

Po usušení buněčné suspenze byla sklíčka fixována 3,7% roztokem p-formaldehydu po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Sklíčka byla třikrát promyta (po 5 minutách) PBS pufrem a pak byl přidán 0,5% Tween 20 roztok a sklíčka byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po oplachu PBS pufrem (3 krát po 5 minutách) byl aplikován roztok protilátky. Roztok protilátky sestával z ředícího pufru (Couating Stabilizer and Blocking Buffer, Sigma Aldrich, USA) a pan-cytokeratin protilátky konjugované s FITC (Monoclonal Anti-Cytokeratin antibody F3418, Sigma Aldrich, USA). Sklíčka byla inkubována s roztokem protilátky po dobu 12 hodin při pokojové teplotě ve tmě. Následoval další proplach v PBS (3 krát po 5 minutách). K montáži sklíček bylo použito montážní médium ProLong® Gold Antifade s DAPI činidlem (Molecular Probes®, Life Technologies, USA). Po zaschnutí preparátu probíhala detekce DTC pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51.

3.5 Stanovení přítomnosti cirkulujících nádorových buněk

3.5.1 Zpracování vzorků periferní krve a izolace cirkulujících nádorových buněk

Analýza a izolace CTC probíhala z 5 ml plné krve pomocí diagnostického kitu AdnaTest Breast Cancer™ (AdnaGen GmbH, Langenhagen, Německo). Periferní krev byla zpracována podle pokynů výrobce. Detekce byla založena na imunomagnetické separaci CTC z plné krve, následné lýze CTC a identifikaci genové exprese s nádorem asociovaných markerů pomocí PCR. Imunomagnetická separace byla založena na využití protilátky proti epiteliálnímu glykoproteinu GA733-2 (EpCAM) a epiteliálnímu antigenu MUC-1. Tyto protilátky byly konjugovány s magnetickými kuličkami (Dynabeads), které umožňují separaci

jednotlivých frakcí. Magnetické kuličky byly přidány do odebrané krve. Vzorek byl následně inkubován a poté byl pomocí magnetického separátoru získán komplex magnetických kuliček s konjugovanými protilátkami navázanými na obohacenou frakci nádorových buněk. Po následném promytí byly navázané CTC lyzovány. Z lyzátu byla izolovaná mRNA pro detekci tumor-asociované mRNA získané z CTC. Dále byla reversní transkripcí vytvořena komplementární DNA, která byla detekována a charakterizována PCR.

3.5.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk

mRNA izolace z lyzovaných, obohacených buněk byla provedena s použitím Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro kitu (Dynal Biotech GmbH, Hamburg, Německo) v kombinaci s oligo(dT) konjugovanými magnetickými kuličkami (Dynabeads). Komponenty byly součástí AdnaTest BreastCancer Detect kitu (Adnagen AG, Langenhagen, Německo). mRNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Analýza nádorově-asociované mRNA získané z CTC byla provedena s využitím multiplex PCR pro 3 nádorově asociované transkripty: receptor lidského epidermálního faktoru 2 (HER-2), Mucin 1 (MUC-1) a epiteliálního glykoproteinu GA733-2 (EpCAM). Gen aktin byl použit jako vnitřní pozitivní kontrola PCR. Přístroj 2100 Bioanalyzer s DNA 1000 kitem (Agilent Technologies, Německo) posloužil ke kvantitativnímu vyhodnocení a vizualizaci amplifikovaných PCR transkriptů. Za pozitivní výsledek byla považována zřetelná detekce alespoň jednoho ze sledovaných PCR transkriptů. Jako pozitivní byly hodnoceny píky s koncentrací vyšší než 0,30 ng/μl. Nedetekovatelné píky nebo ty s koncentrací méně než 0,15 ng/μl byly negativní. Píky, jejichž koncentrace byla v rozmezí 0,15 – 0,30 ng/μl byly neprůkazné a bylo tedy nutné provést re-testování nového vzorku. Ve vzorcích všech pacientů musel být při vyhodnocení detekován aktin. V případě negativní PCR a RT kontroly nesměly být zaznamenány píky o velikosti vyšší než 80 bp. Přítomnost fragmentu většího než 1 kb by znamenala, že vzorek byl kontaminován genomovou DNA, takový výsledek musel být vyřazen.

3.6 Statistická analýza

Požadovaná velikost souboru byla vypočtena pomocí freeware Epi Info™ 6,04 z Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (USA). Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu STATISTICA CZ verze 12.0 (StatSoft Inc, USA). Pro deskriptivní popis spojitých parametrů byly vypočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Pro srovnání hodnot

měřených opakovaně v čase byl použit párový t-test. Souhrnné údaje jsou vyjádřeny jako mediány (interquartile range) nebo procenta. Fisherův test byl použit pro výpočet významnosti rozdílu dvou rozptylů. Různé skupiny byly porovnány s použitím neparametrického Kruskal-Wallisova testu. Spearmanův test byl použit ke korelaci mezi dvěma proměnnými. Za statisticky významnou byla považována p-hodnota ≤ 0.05 .

4 Výsledky

4.1 Charakteristika souboru pacientek

Do celkového hodnocení bylo zařazeno celkem 50 nemocných s karcinomem prsu. Medián věku pacientek byl 37 let (věkové rozmezí 33 – 40 let). 24 pacientek z 50 (48%) bylo stadia T1, 19 pacientek (38%) bylo stadia T2 a ostatní pacientky měly primární nádor stadia T3/T4. U 18 pacientek (36%) byly předoperačně prokázány metastázy v regionálních mízních uzlinách (odpovídá N1 nebo N2). 88% pacientek mělo histologicky potvrzený invazivní duktální karcinom. Stupeň diferenciacie nádoru byl u 3 pacientek stanoven jako low grade karcinom, u 20 pacientek se jednalo o grade 2 a u 27 pacientek byl stupeň diferenciacie vyhodnocen jako grade 3. Expres HER-2 byla prokázána v 11 z 50 případů (22%). Dále byla v primárním nádoru imunohistochemicky stanovena exprese hormonálních receptorů. Ve 30 z 50 (60%) případů šlo o ER pozitivní nádory a PR pozitivita byla u 29 z 50 (58%) vyšetřených. Triple negativní nádory (ER negativní/PR negativní/HER-2 negativní) byly zastoupeny u 28% (14/50). Klinická data jsou uvedena v tabulce 7.

4.2 Korelace výskytu CTC/DTC v souvislosti s TNM klasifikací

Vstupně byla CTC pozitivita prokázána u 11 z 50 (22%) pacientek. Rozdělení CTC ve vztahu k TNM klasifikaci je uvedeno v tabulce 8. DTC byly iniciálně detekovány u 15 z 50 (30%) pacientek, viz tabulka 9. Pouze přítomnost DTC v kostní dřeni byla signifikantně vyšší u pacientek s pokročilejším stadiem onemocnění. DTC pozitivita tedy signifikantně koreluje s velikostí primárního nádoru (T-stadium) a infiltrací lymfatických uzlin (N-stadium). Neprozkázali jsme žádnou korelaci mezi CTC a DTC ($r = -0,097$, $p = 0,504$).

Tabulka 8 Výskyt CTC v korelaci s TNM klasifikací

		Pacientky n = 50		CTC pozitivní n = 11		CTC negativní n = 39		<i>p</i>	
		n	%	n	%	n	%		
T-stadium	T1	24	48	5	45.5	19	48.7	0.418	
	T2	19	38	4	36.4	15	38.5		
	T3/4	7	14	2	18.2	5	12.8		NS
N-stadium	N0	30	60	7	63.6	23	59.0	0.304	
	N1	17	34	4	36.4	13	33.3		
	N2	1	2	0	0	1	2.6		NS
	Nx	2	4	0	0	2	5.1		

NS, nesignifikantní

**, $p < 0.05$*

****, $p < 0.01$*

Tabulka 9 Výskyt DTC v korelaci s TNM klasifikací

		Pacientky n = 50		DTC pozitivní n = 11		DTC negativní n = 39		<i>p</i>
		n	%	n	%	n	%	
T-stadium	T1	24	48	4	26.7	20	58.3	0.011*
	T2	19	38	8	53.3	11	30.6	
	T3/4	7	14	3	20.0	4	11.1	
N-stadium	N0	30	60	7	46.7	23	65.7	0.002**
	N1	17	34	6	40.0	11	31.4	
	N2	1	2	1	6.7	0	0	
	Nx	2	4	1	6.7	1	2.9	

NS, nesignifikantní

**, $p < 0.05$*

****, $p < 0.01$*

4.3 Korelace výskytu CTC/DTC v souvislosti s expresí hormonálních receptorů a HER-2

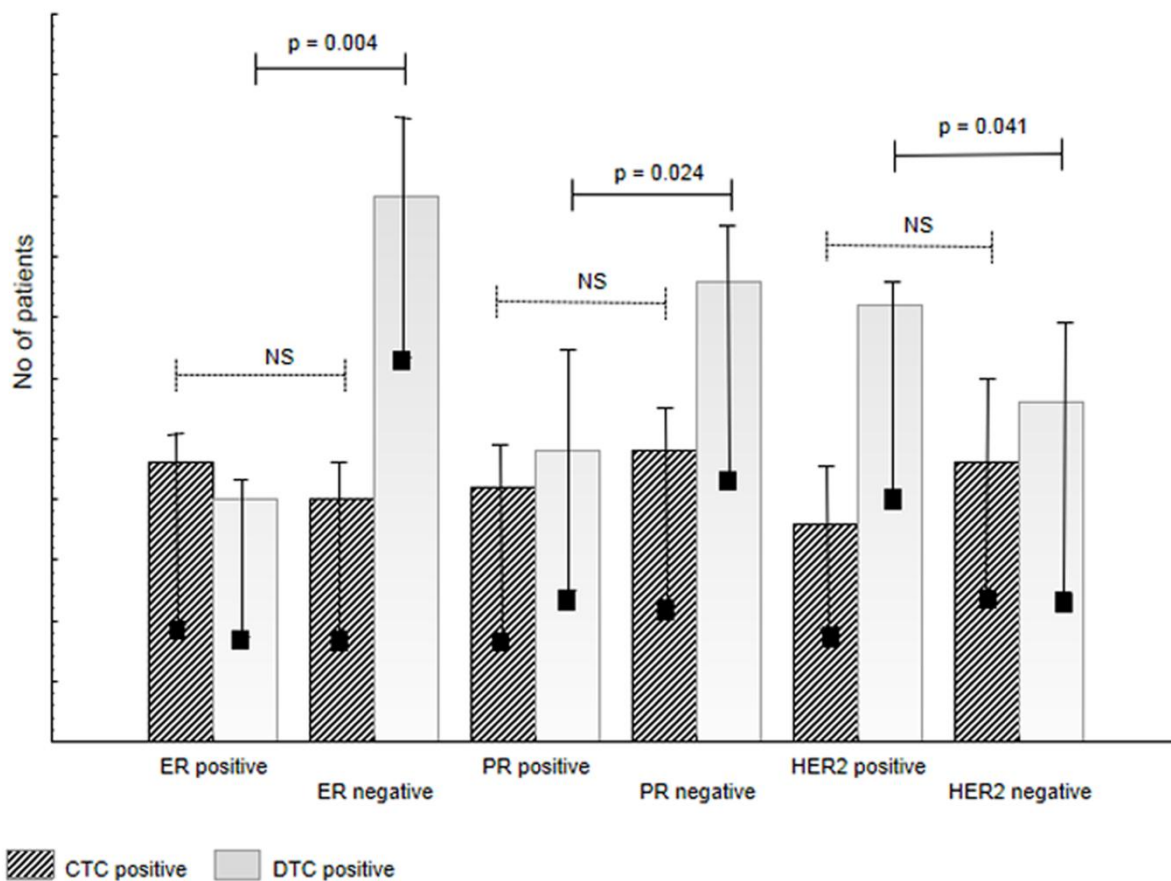
CTC byly detekovány u 23% pacientek s pozitivní expresí ER a u 20% pacientek s ER negativním nádorem, u 21% pacientek s PR pozitivním onemocněním ve srovnání s 24% pacientek s PR negativním onemocněním. V případě HER-2 positivity byly CTC prokázány u 18% pacientek, u HER-2 negativních nemocných byla CTC pozitivita prokázána u 23%.

DTC pozitivita byla pozorována u 20% pacientek s ER pozitivním nádorem a u 45% pacientek s ER negativním nádorem, u 24% pacientek s PR pozitivním nádorem a u 38% s PR

negativním nádorem. U HER-2 pozitivních pacientek to bylo u 36% ve srovnání s 28% u pacientek s HER-2 negativním onemocněním.

V souhrnu byla CTC pozitivita zastoupena u pacientek stejnoměrně bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů, jako je exprese ER, PR a HER-2. DTC pozitivita se naopak ukázala signifikantně vyšší u ER/PR negativních pacientek. Přítomnost DTC byla podstatně častější u HER-2-pozitivních pacientek. Overexprese HER-2 onkoproteinu, respektive amplifikace HER-2 genu je spojena se signifikantně horší prognózou. Obrázek 8 znázorňuje CTC a DTC pozitivitu v korelaci s expresí hormonálních receptorů a HER-2 expresí, které byly stanoveny ve vstupní biopsii.

Obrázek 8 CTC a DTC pozitivita v korelaci s expresí hormonálních receptorů a HER-2 expresí



ER- estrogenové receptory
 PR- progesteronové receptory
 HER2- receptor lidského epidermálního růstového faktoru
 CTC- cirkulující nádorové buňky
 DTC- diseminované nádorové buňky
 NS- nesignifikantní
 Černé čtverce představují mediány.

Pro analýzu vztahů mezi binárními proměnnými, kterými klasifikujeme (1) T1 versus \geq T2 velikost primárního nádoru, (2) N0 versus \geq N1 infiltrace axilárních uzlin, (3) stav

hormonálních receptorů - ER pozitivní versus ER negativní, PR pozitivní versus PR negativní, a (4) stupeň diferenciacce grade 1 versus grade 2-3, a spojitými prediktory CTC a DTC jsme použili logistický regresní model.

DTC pozitivita korelovala s větším primárním nádorem a vyšším rizikem postižení axilárních uzlin a tyto výsledky byly signifikantní. Toto však nebylo prokázáno pro CTC, viz tabulka 10.

Tabulka 10 Kroková multivariační regrese výskytu CTC a DTC před zahájením terapie.

		CTC pozitivita	DTC pozitivita
Velikost nádoru	OR	1.24	2.317
T1 versus ≥T2	95% CI	0.51 - 5.71	0.035–4.667
	<i>P</i>	0.102, NS	0.0249*
Stav lymfatických uzlin	OR	1.65	3.260
N0 versus ≥N1	95% CI	0.85 - 12.90	1.059–8.374
	<i>P</i>	0.093, NS	0.0047**
Stav hormonálních receptorů	OR	0.95	1.984
ER+ versus ER-	95% CI	0.42 - 3.24	0.98 - 4.26
	<i>P</i>	0.345, NS	0.0371*
Stav hormonálních receptorů	OR	0.89	1.879
PR+ versus PR-	95% CI	0.32 - 2.99	0.09 - 3.54
	<i>P</i>	0.410, NS	0.0405*
Stupeň diferenciacce	OR	1.09	1.04
I versus II, III	95% CI	0.58 - 4.27	0.047 - 2.98
	<i>P</i>	0.108, NS	0.057*

Pozn.: Poměr šancí (ORs) a 95% konfidenční interval (CIs) jsou uvedeny pro primární charakteristiky nádoru.

NS- nesignifikantní

*, $p < 0.05$

***, $p < 0.01$

4.4 Vztah mezi přítomností CTC v periferní krvi a DTC v kostní dřeni

Vstupně jsme vyšetřili periferní krev a kostní dřev u 50 pacientek. U 9 (18%) z 50 pacientek jsme zjistili pouze CTC pozitivitu a u 13 (26%) z 50 pacientek pouze DTC pozitivitu. Ve dvou případech z 50 jsme prokázali současně pozitivitu CTC i DTC. Klinicko-patologická charakteristika těchto 2 pacientek se významně nelišila od pacientek, které byly

bud' CTC pozitivní nebo DTC pozitivní nebo u kterých nebyla detekována minimální reziduální nemoc. V naší studii jsme neprokázali vztah mezi přítomností CTC v periferní krvi a DTC v kostní dřeni ($p = 0,054$). CTC negativní a zároveň DTC negativní nález byl u 26 (52%) z 50 vyšetřených pacientek. Klinicko-patologické vlastnosti těchto 26 pacientek se významně nelišily od charakteristik pacientek s prokázanou minimální reziduální nemocí. V další fázi projektu jsme monitorovali hladiny CTC a DTC v průběhu terapie. U náhodně vybrané skupiny pacientek jsme opakovaně vyšetřili krev i kostní dřeň před zahájením léčby i v jejím průběhu.

4.5 Monitorování výskytu DTC/CTC v průběhu terapie

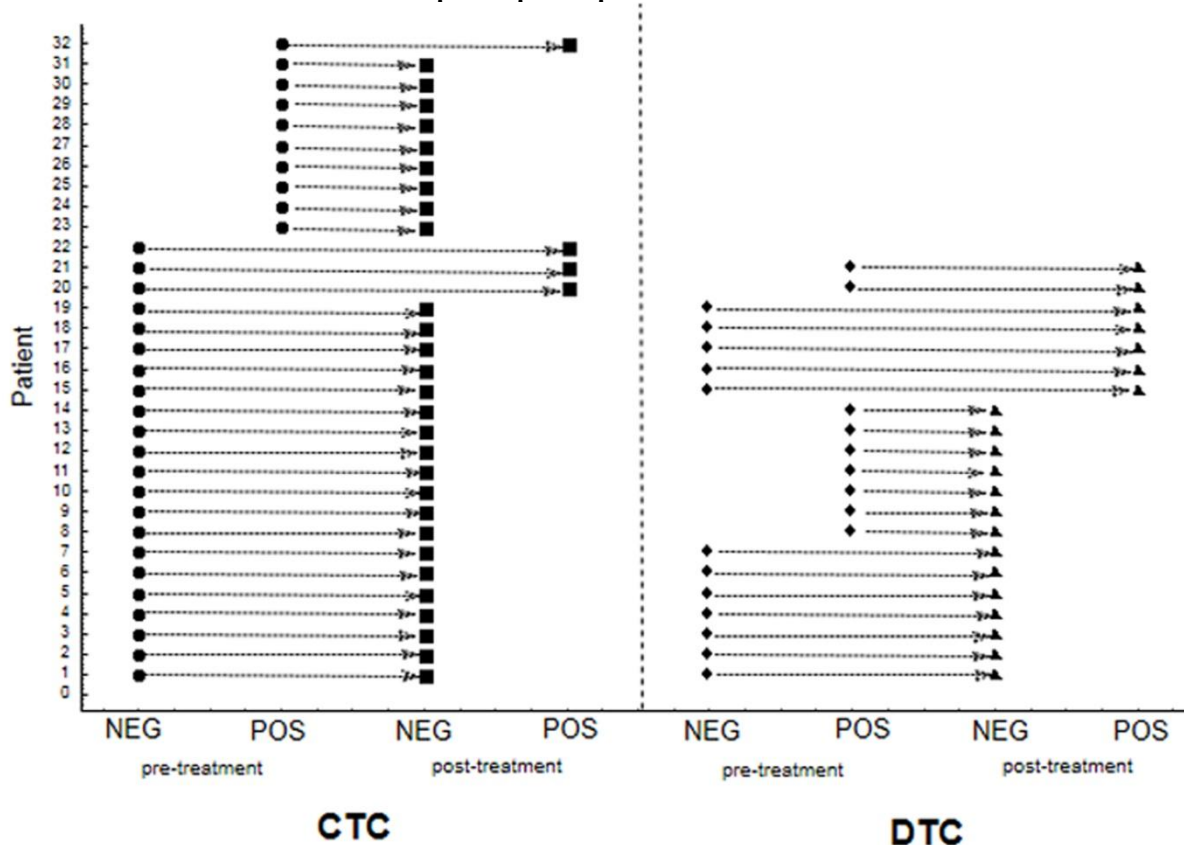
4.5.1 CTC v průběhu terapie

U 32 pacientek jsme opakovaně vyšetřili přítomnost CTC. Z nich v 10 případech byla vstupně prokázána CTC pozitivita a ve 22 případech CTC negativita. Tři (13,6%) z původně negativních pacientek (3/22) byly při kontrolním odběru pozitivní. V průběhu terapie jsme při kontrolním vyšetření krve nedetekovali CTC u 9 (90%) z 10 vstupně CTCs pozitivních pacientek viz obrázek 9.

4.5.2 DTC v průběhu terapie

Opakovaně bylo vyšetřeno 21 pacientek na přítomnost DTC. Z toho bylo 12 DTC negativních a 9 DTC pozitivních. 41,7% (5/12) pacientek vstupně DTC negativních bylo při kontrolním odběru pozitivních. U 2 pacientek (22%) přetrvával pozitivní nález v kostní dřeni při kontrolním odběru v průběhu terapie. U většiny pacientek (7/9, tj. 78%) s pozitivním vstupním nálezem v kostní dřeni došlo po léčbě k vymizení DTC z dřene, viz obrázek 9.

Obrázek 9 Srovnání nálezu CTC/DTC před a po terapii



NEG- negativní nález
 POS- pozitivní nález
 CTC- cirkulující nádorové buňky
 DTC- diseminované nádorové buňky

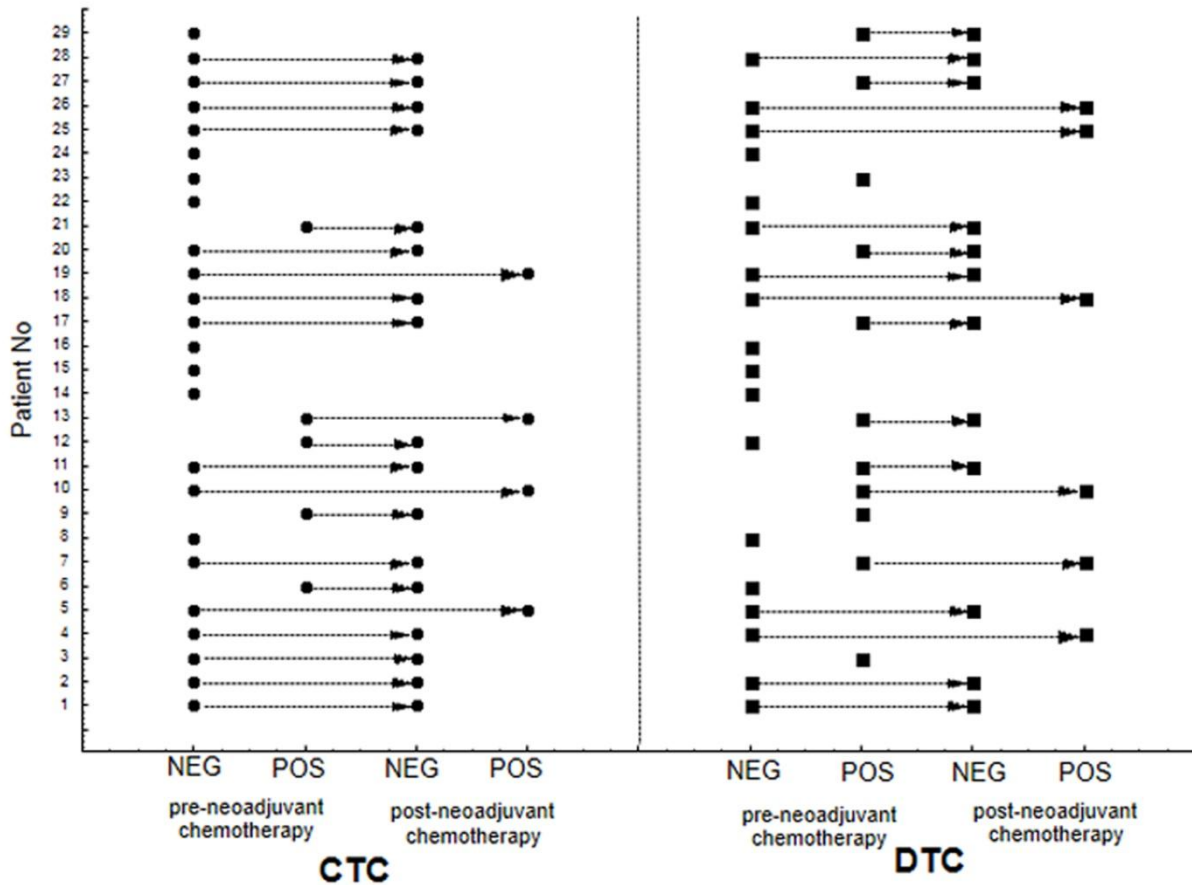
4.6 Monitorování výskytu DTC/CTC v průběhu léčby u pacientek s neoadjuvantní a adjuvantní terapií

V podskupině pacientek indikovaných k neoadjuvantní chemoterapii bylo 29 pacientek. Odběr kostní dřeně a periferní krve byl proveden před zahájením neoadjuvantní chemoterapie a po ukončení neoadjuvantní léčby. Vstupně jsme detekovali DTC u 11 z 29 (38%) pacientek a CTC u 5 z 29 (17%) pacientek. Po ukončení neoadjuvance byl kontrolní odběr proveden u 8 z 11 pacientek, u 2 pacientek přetrvávala pozitivita v kostní dřeni, 6 pacientek bylo negativních.

Vstupní vyšetření dřeně bylo DTC negativní u 18 pacientek (22%). Kontrolní odběr byl v této skupině proveden u 10 případů, z nichž 4 byly pozitivní a 6 negativních. Opakovaná analýza krve byla provedena u všech 5 pacientek vstupně pozitivních na přítomnost CTC,

pozitivita byla zjištěna u 1 (20%) pacientky. Pacientek vstupně CTC negativních bylo 24, kontrolní odběr byl proveden u 16 z nich a ve 3 případech byla prokázána pozitivita, viz obrázek 10.

Obrázek 10 Vývoj CTC/DTC v podskupině pacientek léčených neoadjuvantní terapií



NEG- negativní nález

POS- pozitivní nález

CTC- cirkulující nádorové buňky

DTC- diseminované nádorové buňky

V operačním nálezu bylo v této skupině dle histologického vyšetření dosaženo patologické kompletní remise (pCR) u 9 z 29 (31%) pacientek. Patologická kompletní remise korelovala s nízkým stupněm diferenciací nádoru (8/9 měly grade 3) a triple negativitou (ER negativní/PR negativní/HER-2 negativní) - 8 z 9 pacientek.

Výskyt DTC a CTC nekorespondoval s odpovědí na léčbu. Nicméně toto zjištění nebylo statisticky významné.

Ve druhé skupině bylo 21 pacientek indikovaných primárně k chirurgickému výkonu a následně k adjuvantní systémové léčbě. U 4 z 21 pacientek (19%) byly detekovány DTC v kostní dřeni v době operace. CTC pozitivita byla zjištěna u 6 z 21 pacientek (29%) v době

primárního chirurgického zákroku. Kontrolní analýza kostní dřeně a krve byla provedena po 12 měsících adjuvantní léčby. Zatím jsme neprovedli kontrolní odběr u všech pacientek, které absolvují adjuvantní terapii.

4.7 DTC/CTC u premenopauzálních a postmenopauzálních pacientek

V našem souboru jsme z celkového počtu 50 pacientek vyšetřili pouze 4 (8%) postmenopauzální pacientky. V těchto dvou skupinách pacientek nebyly pozorovány žádné rozdíly ve výskytu DTC / CTC, viz tabulka 11. Nicméně, výsledek může být zatížen chybou v důsledku malé velikosti souboru.

Tabulka 11 Výskyt DTC/CTC u premenopauzálních a postmenopauzálních pacientek

		premenopauzální pacientky, n = 46	postmenopauzální pacientky, n = 4	<i>p</i>
CTC	negativní, n (%)	36 (78 %)	3 (75 %)	0.674, NS
	pozitivní, n (%)	10 (22 %)	1 (25 %)	
DTC	negativní, n (%)	31 (67 %)	4 (100 %)	0.508, NS
	pozitivní, n (%)	15 (33 %)	0	

NS, nesignifikantní

5 Diskuse

Zkvalitněním diagnostických metod a léčby se celkové přežívání pacientek s karcinomem prsu v posledních dekádách prodloužilo. Standardně užívaný staging (TNM-klasifikace) karcinomu prsu charakterizuje prognózu onemocnění nedostatečně, a to zejména u pacientek s časným stádiem karcinomu prsu bez postižení axilárních uzlin, u kterých je velice obtížné stanovit riziko relapsu a tudíž zvolit vhodnou formu terapie. Dle četných výzkumných prací se předpokládá, že detekce diseminovaných nádorových buněk (DTCs) v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk (CTCs) v periferní krvi může poskytnout další informace vztahující se k prognóze onemocnění a přesněji stratifikovat skupinu nemocných. Mikrometastázy jako následek diseminačního procesu jsou jen těžko detekované standardními zobrazovacími a laboratorními metodami. Právě výskyt mikrometastáz je po potenciálně kurativním operačním zákroku příčinou časného relapsu onemocnění. Systémová adjuvantní terapie by měla být právě v případech pozitivní detekce DTCs a CTCs prostředkem, kterým metastatickému relapsu předcházíme.

V této práci jsme zkoumali diseminované nádorové buňky v kostní dřeni a cirkulující nádorové buňky v krvi u 50 pacientek s časným karcinomem prsu. Zjistili jsme, že u pacientek v časně fázi onemocnění, je možné imunocytochemicky (ICC) stanovit DTCs v kostní dřeni přibližně u 30% nemocných. V závislosti na detekčních metodách se DTCs diagnostikují v kostní dřeni dle údajů v literatuře u 0% [91] až 100% [92] pacientek bez známek vzdálených metastáz prokazatelných běžnými postupy. Souhrnná analýza velkého souboru pacientek (4703 nemocných) s karcinomem prsu stadií I, II a III imunocytochemicky potvrdila přítomnost DTCs v kostní dřeni u 30,6% nemocných [59]. V současné době jsou k dispozici dvě základní skupiny metod umožňujících detekci DTCs ve dřeni, a to cytologické/cytometrické postupy (na bázi monoklonálních protilátek) a molekulární metody [68,93,94].

Imunocytochemická analýza je nejrozšířenější cytologickou metodou, která umožňuje izolaci a stanovení počtu jednotlivých buněk [93]. Hlavní výhodou cytologických metod je možnost značení izolovaných buněk monoklonálními protilátkami a jejich následná morfologická charakteristika, která nám umožňuje stanovit velikost a tvar buněk, jakož i určit vztah jádro-plazma. Na základě uvedené charakteristiky lze odhadnout nelegitimní expresi proteinu v buňkách kostní dřeni.

Kromě imunocytochemických metod je další široce užívanou metodou molekulárně biologické stanovení nukleových kyselin, které umožňuje detekci DTC na úrovni jedné buňky. Hlavní výhodou molekulární detekce je téměř neomezená možnost primerů pro téměř jakýkoliv gen. Populace nádorových buněk u karcinomu prsu je velmi heterogenní, proto v současnosti neexistuje univerzální DNA marker pro primární screening DTCs a doporučuje se použít multimarkerovou analýzu [93,95].

Naše výsledky jsme korelovali s histopatologickými a imunohistochemickými charakteristikami primárního nádoru. Zjistili jsme, že DTC pozitivita signifikantně korelovala s velikostí primárního nádoru a infiltrací lymfatických uzlin. Dále bylo zjištěno, že DTC byly převážně detekovány u pacientek ER/PR negativních a HER-2 pozitivních. Naše výsledky byly v souladu se závěry studií Braun a kolektiv [59] a Wiedswang a kolektiv [96], které potvrdily, že pacientky s infiltrací kostní dřeně měly větší primární nádor, nízký stupeň diferenciacie nádoru, měly častěji postižené axilární lymfatické uzliny a negativní hormonální receptory ($p < 0,001$ pro všechny proměnné). Na druhé straně některé studie neprokázaly korelaci mezi přítomností DTC a stádiem onemocnění, pozitivitou uzlin, hormonálním stavem či HER-2 expresí [97-99].

Pro stanovení CTC v periferní krvi jsme používali diagnostický test AdnaTestBreastCancer. V našem souboru byla CTC pozitivita prokázána u 22% pacientek s primárním karcinomem prsu. Různé pracovní skupiny potvrdily záchyt CTC v krvi v rozmezí od 9% do 50%. Výsledek byl závislý na použité detekční metodě a klinickém stádiu nemoci [62,100-103]. Dosud není jednoznačně prokázáno, které z metod jsou vhodnější do klinické praxe pro monitorování efektu terapie a pro predikci prognózy, zda detekce založená na RT-PCR (například AdnaTestBreastCancerTM) nebo imunocytochemická detekce (například systém Cell-SearchTM). Oba typy metod jsou zatíženy pravděpodobností falešné positivity, jelikož se k detekci nejčastěji používají antigeny epiteliálního původu a neexistuje specifický antigen, který by identifikoval pouze nádorové buňky rakoviny prsu. Toto téma zpracovává v literatuře více autorů [104,105].

V další analýze jsme srovnávali klinicko-patologickou charakteristiku nádoru a CTC pozitivitu. Zjistili jsme, že CTC pozitivita byla zastoupena u pacientek stejnoměrně bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů, jako je exprese ER, PR a HER-2. CTC pozitivita nekorelovala ani s velikostí nádoru či infiltrací axilárních uzlin. Naše výsledky byly v souladu s pozorováním pracovní skupiny Krishnamurthy a kolektivu. Vyšetřili celkem 92 pacientek s časným karcinomem prsu a k detekci CTC použili CellSearch system. Přítomnost CTCs v periferní krvi byla prokázána u

13 ze 43 pacientek (30%) s nádorem stádia T1 a u 12 z 38 pacientek (32%) s nádorem stádia T2. CTC pozitivita byla zastoupena u pacientek stejnoměrně, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi výskytem CTC a počtem postižených lymfatických uzlin nebo mezi přítomností mikrometastáz versus makrometastáz v lymfatických uzlinách [98].

Na rozdíl od předchozích zjištění Krishnamurthy a našich zjištění, Fehm a kolektiv vyhodnotili CTCs v krvi u 431 pacientek s primárním karcinomem prsu a prokázali, že přítomnost CTCs významně koreluje s postižením lymfatických uzlin ($p = 0,04$), ER ($p = 0,05$) a PR negativitou ($p = 0,01$). Nejvyšší záchyt CTCs byl zejména u triple negativních pacientek, dále následovaly pacientky s ER pozitivním a/nebo PR pozitivním nádorem (30% vs. 13%, $p=0,01$). Žádné CTCs nebyly detekovány v podskupině HER-2 pozitivních nemocných [87].

V naší studii jsme současně detekovali CTCs v krvi a DTCs v dřeni pouze u 2/50 pacientek (4%) s primárním karcinomem prsu. Klinicko-patologické vlastnosti těchto 2 pacientek se významně nelišily od charakteristik nemocných, u kterých byla stanovena samostatně buď CTC nebo DTC pozitivita, nebo od pacientek bez průkazu minimální reziduální nemoci. Neprokázání závislosti mezi CTCs a DTCs a mezi CTCs a standardními prognostickými a prediktivními markery v naší studii zvyšuje pravděpodobnost teorie o nezávislém způsobu šíření nádorových buněk do vzdálených orgánů. Doba sledování byla v našem souboru dosud velmi krátká, a proto jsme v této práci nemohli hodnotit výskyt CTCs/DTCs v závislosti na celkovém přežití. Nicméně máme v plánu další sledování pacientek a následnou analýzu získaných dat.

Naše výsledky nejsou v souladu se zjištěním Piergy a kolektivu [101], který našel korelaci mezi výskytem diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientek s primárním a metastatickým karcinomem prsu. Nepozorovali však kompletní shodu mezi přítomností CTCs v krvi a DTCs v kostní dřeni. Možným vysvětlením těchto výsledků je teorie, že krev je pouze dočasným prostředím pro diseminované buňky v průběhu šíření. CTCs přežívají v cirkulaci jen krátkou dobu [106] a ne všechny uvolněné nádorové buňky jsou schopné vytvořit sekundární nádorové ložisko v novém prostředí hostitelského organismu, jako je například osídlení kostní dřene. Na základě zjištění klinických studií u pacientek s nemetastazujícím karcinomem prsu se doporučuje monitorovat hladiny CTCs v krvi i DTCs v dřeni s cílem získat více informací o rozsahu onemocnění.

V naší studii jsme použili analýzu DTCs/CTCs pro sledování efektu neoadjuvantní chemoterapie u malé skupiny pacientek (29 pacientek). Nejistili jsme žádnou signifikantní korelaci mezi výskytem DTCs/CTCs a odpovědí na primární neoadjuvantní terapii. Také jsme pozorovali výskyt CTCs u pacientek, které byly původně CTC negativní, což naznačuje teorii, že CTC se mohou uvolňovat do oběhu ze vzdálených orgánů [107]. Uvedený stav může být způsoben také falešně negativním výsledkem při vstupním vyšetření CTCs nebo skutečností, že tyto buňky přežívají v cirkulaci krátkou dobu.

Na druhé straně jsme identifikovali skupinu pacientek, které byly vstupně CTC pozitivní, a při kontrolním odběru jsme zjistili negativní nález v krvi, což můžeme vysvětlit cytotoxickým efektem chemoterapie v uvedené podskupině pacientek. Rovněž změnu nálezu z DTC negativního na DTC pozitivní lze vysvětlit přítomností nízkého počtu DTC, které jsou rezistentní k terapii (buď pod, nebo nad detekčním limitem) a které budou při dalším kontrolním odběru perzistovat ve dřeni. Předchozí zjištění naznačují, že DTCs/CTCs jsou relativně odolné vůči chemoterapii, pravděpodobně v důsledku jejich nízkého proliferačního potenciálu [108,109]. Většina DTCs/CTCs se nachází v neproliferativní fázi, která vykazuje absenci exprese nukleárního proteinu Ki-67, jež je asociována s buněčnou proliferací [62].

Zajímavé je, že pouze polovina pacientů s pozitivitou DTC relabuje v průběhu deseti let od diagnózy, zbývající polovina zůstává bez známek nemoci [59]. Na druhou stranu, tento spící (dormantní) stav DTCs/CTCs může být také příčinou nedostatečné účinnosti adjuvantní chemoterapie na odstranění těchto buněk u pacientek s vysoce rizikovým karcinomem prsu [110]. K transformaci nádorových buněk z klidové fáze do stadia metastázy mohou přispět jak změny v samotných DTCs/CTCs, například další mutace, tak i snížení imunologického dozoru nebo zvýšení angiogenetického potenciálu v okolním mikroprostředí [111,112]. Nicméně dosud není objasněno, za jakých podmínek dochází k probuzení dormantních buněk.

Naše výsledky jsou v souladu s dosud publikovanými závěry několika studií, které neprokázaly korelaci mezi přetrvávající DTC/CTC pozitivitou a odpovědí na terapii [104,113,114]. Naproti tomu, Hayes a kolektiv zjistili, že výskyt CTCs v periferní krvi u pacientů s metastatickým karcinomem prsu kdykoli během léčby přímo hodnotí odpověď na léčbu, buď ve smyslu prokázané efektivity, nebo selhání terapie [115]. CTC se tedy jeví jako lepší metoda k monitoraci odpovědi na terapii než dosud používané zobrazovací metody [116,117].

Patologická kompletní remise (pCR) po neoadjuvantní chemoterapii je definovaná jako nepřítomnost nádorových buněk s možností reziduálního nádoru in situ v histologickém

hodnocení operačního preparátu po neoadjuvantní léčbě. Tento nález je spojen s výrazným zlepšením období bez nemoci a celkovým přežitím pacientů.

V naší studii dosáhlo 31% pacientek patologické kompletní remise a neprokázali jsme u nich korelaci pCR s výskytem DTCs po neoadjuvantní chemoterapii. Naše výsledky jsou v korelaci s analýzou pracovní skupiny Beckera a kolektivu, která vyšetřila 120 pacientek podstupujících primární systémovou léčbu, a zjistila, že i přes dosažení patologické kompletní remise perzistoval pozitivní DTC nález v kostní dřeni [108]. Obdobné výsledky publikovala i jiná pracovní skupina, která sledovala 154 pacientek a potvrdila přítomnost DTCs v kostní dřeni u 10 z 24 pacientek, které dosáhly patologické kompletní remise [118]. Pierga a kol. v souboru 118 pacientek s lokálně pokročilým karcinomem prsu pozoroval, že po ukončení neoadjuvantní chemoterapie přetrvávala přítomnost CTCs v krvi. Pozitivní CTC nález však nekoreloval s odpovědí na léčbu, ale ukázal se jako nezávislý prognostický faktor časného relapsu onemocnění [114]. Patologická kompletní remise byla signifikantně asociovaná s nízkým stupněm diferenciací a triple negativitou. Uvedené výsledky jsou v souladu s německou studií GeparQuattro. Studie byla zaměřena na detekci CTCs v periferní krvi před zahájením neoadjuvantní chemoterapie a po jejím ukončení. Zjistila, že u 20 pacientek (15%) vstupně CTC pozitivních byl kontrolní odběr krve po ukončení léčby již negativní. Zatímco 11 pacientek (8,3%) bylo po terapii CTC pozitivních, avšak před léčbou u nich CTCs nebyly prokázány. CTC nález nekoreloval s charakteristikami primárního nádoru. Nebyl zjištěn ani žádný vztah mezi odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii a výskytem CTCs [90] .

6 Závěry

Karcinom prsu je v České republice každoročně nově diagnostikován u 7000 žen všech věkových kategorií. I přes narůstající incidenci zhoubných nádorů prsu lze od poloviny 90. let 20. století sledovat pokles mortality na toto onemocnění díky screeningovým programům a novým možnostem diagnostiky a onkologické léčby. Nádory prsu jsou morfologicky a geneticky velmi heterogenní onemocnění. Genové profilování karcinomu prsu pomocí DNA čipů vedlo ke změně v chápání karcinomu prsu a na molekulární úrovni ukázalo, že se jedná o složitou nosologickou jednotku. Molekulární rozmanitost nádorů prsu je dnes podkladem pro volbu léčebné strategie, v níž se mohou uplatnit také nové postupy cílené terapie. Díky možnostem moderní léčby patří dnes karcinom prsu k nejlépe léčitelným solidním nádorům. Využití detekce výskytu diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u časného karcinomu prsu je pokusem implementovat moderní diagnostické technologie do klinické praxe.

V naší práci jsme se zaměřili na izolaci a detekci diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientek s časným karcinomem prsu.

Z výsledků předkládané práce vyplývají tyto závěry:

- Výskyt DTC v kostní dřeni jsme pomocí imunocytochemické analýzy stanovili přibližně u 30% pacientek. Pro stanovení CTC v periferní krvi jsme používali diagnostický test AdnaTestBreastCancer založený na principu RT-PCR. CTC pozitivita byla prokázána u 22% pacientek s primárním karcinomem prsu. Naše zjištění dokazují, že použité metody stanovení DTC/CTC přinášejí výsledky konzistentní se závěry dosavadních klinických studií, avšak dosud není jednoznačně prokázáno, které z metod jsou vhodnější pro použití v klinické praxi.
- Studie potvrdila, že DTC pozitivita signifikantně korelovala s velikostí primárního nádoru a infiltrací lymfatických uzlin. DTC byly převážně detekovány u pacientek ER/PR negativních a HER-2 pozitivních. CTC pozitivita nekorelovala ani s velikostí nádoru či infiltrací axilárních uzlin. Až

další analýza po pěti letech by měla přinést informaci o prognostickém a prediktivním významu DTC/CTC.

- Nebyla prokázána závislost mezi CTC v krvi a DTC v kostní dřeni. Poznatky z některých studií ukazují, že infiltrace dřeně je častější. Možným vysvětlením je fakt, že dřeň je cílovým orgánem pro DTC, kdežto vyšetření CTC je jenom informací o momentálním stavu procesu diseminace nádoru. Zdá se tedy, že vyšetření DTC má větší prognostickou váhu než vyšetření CTC u pacientek s časným karcinomem prsu.
- Výskyt DTC/CTC nekoreloval s odpovědí na primární neoadjuvantní terapii. Výsledky však nebyly statisticky významné. Zatím jsme neprovedli kontrolní odběr u všech pacientek, které absolvují adjuvantní terapii, proto uvedenou skupinu ještě nelze hodnotit.

Závěrem možno říci, že možnosti zlepšení terapeutických výsledků prostřednictvím současné systémové léčby jsou zřejmě již značně omezeny. K průlomu v léčbě všech nádorů včetně karcinomu prsu je nezbytné pochopení klíčových molekulárních mechanismů vedoucích ke vzniku maligních onemocnění. Další výzkum a podrobná molekulární charakteristika DTC/CTC prostřednictvím genomové amplifikace a popisu expresního profilu jednotlivých nádorových buněk může být užitečná pro lepší pochopení molekulárních mechanismů vedoucích k tvorbě metastáz, ke zlepšení a individualizaci strategie léčby a k objasnění rezistence na terapii.

Seznam zkratek

ACTH	adrenokortikotropní hormon, kortikotropin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	kináza AKT čili protein kináza B (PKB)
ASCO	The American Society of Clinical Oncology
ATM	gen ATM (ataxia telangiectasia mutated)
ATX	autotaxin
BRCA1	gen BRCA1 (breast cancer 1, early onset)
BRCA2	gen BRCA2 (breast cancer 2, early onset)
CA 15-3	carbohydrate antigen 15-3
CASP-8	gen caspase-8
CD4	klastr diferenciac 4 (cluster of differentiation 4)
CD24	klastr diferenciac 24 (cluster of differentiation 24)
CD44	klastr diferenciac 44 (cluster of differentiation 44)
CD45	společný leukocytární antigen (lymphocyte common antigen)
CDC25A/C	cell division cycle 25A/C
cDNA	komplementární kyselina deoxyribonukleová (complementary deoxyribonucleic acid)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CI	konfidenční interval (confidence interval)
CK8	cytokeratin 8
CK18	cytokeratin 18
CK19	cytokeratin 19
CMF	cyklofosfamid/ metotrexát/ fluorouracil
CSC	nádorová kmenová buňka (carcinoma stem cell)
CTC/CTCs	cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells)
CXCL12	C-X-C chemokin 12 (C-X-C motif chemokine 12, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1))
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typu 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, fusin)
ČR	Česká republika

DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DCIS	duktální karcinom in situ (ductal carcinoma in situ)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
DTC/DTCs	diseminované nádorové buňky (disseminated tumor cells)
E-cadherin	E-kadherin (epithelial cadherin)
ECM	extracelulární matrix (extracellular matrix)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EGFR	receptor pro lidský epidermální růstový faktor ErbB-1 čili HER1 (epidermal growth factor receptor)
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice (epithelial-mesenchymal transition)
EpCAM	epiteliální buněčná adhezni molekula (epithelial cell adhesion molecule)
EPISPOT	epithelial immunospot
ER	estrogenový receptor
ErbB-1	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 1 čili HER-1 (epidermal growth factor receptor 1)
ErbB-2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili HER-2 (epidermal growth factor receptor 2)
ESMO	The European Society for Medical Oncology
FAST	fiber-optic array scanning technology
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescent in situ hybridisation)
FITC	fluorescein-izothiokyanát (fluorescein isothiocyanate)
FSH	folikuly stimulující hormon, folitropin (follicle stimulating hormone)
GA733-2	gen GA733-2
HER-2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili ErbB-2 (human epidermal growth factor receptor 2)
HGF	hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor)
HR	hormonální receptor
CHEK2	gen CHEK2 (checkpoint kinase 2)
IL-6	interleukin 6
ISET	isolation by size of epithelial tumor cells
Ki67	antigen Ki67

LCIS	lobulární karcinom in situ (lobular carcinoma in situ)
LH	luteinizační hormon, lutropin (luteinizing hormone)
LHRH	luteinizační hormon uvolňující hormon, luteoliberin (luteinizing hormone-releasing hormone)
LKB1/STK11	gen LKB1/STK11 (serine/threonine kinase 11)
MEMS	mikro elektro-mechanické systémy (micro electro-mechanical systems)
MIB1	antigen MIB1
MMP	matrixová metaloproteináza (matrix metalloproteinase)
MMP-2	matrixová metaloproteináza 2 (matrix metalloproteinase 2)
MMP-9	matrixová metaloproteináza 9 (matrix metalloproteinase 9)
MRE11	protein MRE11
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
mTOR	savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
MUC-1	mucin 1
NACT	neoadjuvantní chemoterapie
NBS1/NBN	gen nibrin (Nijmegen breakage syndrome 1)
NICE	The National Institute for Health and Clinical Excellence
NK buňky	„přirození zabíječi“ (natural killer cell)
NOR	Národní onkologický registr
OR	odds ratio
OS	celkové přežití (overall survival)
p	hodnota p
p53	tumor protein p53
PAI-1	inhibitor plazminogenového aktivátoru 1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PALB2	gen PALB2 (partner and localiser of BRCA2)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pCR	patologická kompletní remise (pathologic complete remission)
PDGF	růstový faktor krevních deštiček (platelet-derived growth factor)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (phosphatidylinositol-3-kinases)
PR	progesteronový receptor
PTEN	fosfatáza a homolog tensinu (phosphatase and tensin homolog)
RAD50	gen RAD50

RAD51	gen RAD51
RNA	kyselina ribonukleová (ribonucleic acid)
RTG	rentgenové vyšetření
RT-PCR	reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)
SERM	selektivní modulátory estrogenních receptorů (selective estrogen receptor modifiers)
TAM	tumor-asociované makrofágy (tumor-associated macrophages)
TGFβ	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
TGFβ1	transformující růstový faktor beta 1 (transforming growth factor beta 1)
TIMP-2	tkáňový inhibitor metaloproteinázy 2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)
TNM	klasifikace nádorů podle tumoru, uzlin a metastáz (tumor, nodi, metastasis)
TP53	transformation-related protein 53
uPA	urokinázový aktivátor plazminogenu (urokinase plasminogen activator)
UZ	ultrazvukové vyšetření
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
Wnt	Wingless/Int-1
ZN	zhoubný novotvar

Seznam obrázků

OBRÁZEK 1 VÝVOJ INCIDENCE A MORTALITY ONEMOCNĚNÍ KARCINOMEM PRSU V LETECH 1977-2011 (ÚZIS ČR)	3
OBRÁZEK 2 ZASTOUPENÍ KLINICKÝCH STADIÍ – VÝVOJ V ČASE (ÚZIS ČR).....	4
OBRÁZEK 3 SCHEMA PROTEINŮ PODÍLEJÍCÍCH SE NA REPARACI DVOUŘETĚZCOVÝCH ZLOMŮ V DNA	6
OBRÁZEK 4 RELATIVNÍ RIZIKO (RR) VZNIKU KARCINOMU PRSU U NOSIČŮ MUTACÍ V JEDNÉ Z ALEL UVEDENÝCH GENŮ	7
OBRÁZEK 5 ZASTOUPENÍ KLINICKÝCH STADIÍ V PROCENTECH.....	24
OBRÁZEK 6 VÝVOJ ZASTOUPENÍ KLINICKÝCH STADIÍ	24
OBRÁZEK 7 METASTATICKÁ KASKÁDA.....	26
OBRÁZEK 8 CTC A DTC POZITIVITA V KORELACI S EXPRESÍ HORMONÁLNÍCH RECEPTORŮ A HER-2 EXPRESÍ.....	50
OBRÁZEK 9 SROVNÁNÍ NÁLEZU CTC/DTC PŘED A PO TERAPII	53
OBRÁZEK 10 VÝVOJ CTC/DTC V PODSKUPINĚ PACIENTEK LÉČENÝCH NEOADJUVANTNÍ TERAPII.....	54

Seznam tabulek

TABULKA 1 KLINICKÁ STÁDIA DLE AJCC CLASSIFICATION OF BREAST CANCER, AJCC 2010	13
TABULKA 2 PROGNOSTICKÉ DĚLENÍ RIZIKOVÝCH PACIENTEK PRO DOPORUČENÍ ADJUVANTNÍ LÉČBY ZE ST. GALENU.	14
TABULKA 3 ZÁKLADNÍ PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY VYUŽÍVANÉ PŘI LÉČEBNÝCH ROZHODNUTÍCH U KARCINOMU PRSU.....	14
TABULKA 4 NOTTINGHAMSKÝ PROGNOSTICKÝ INDEX	15
TABULKA 5 CYTOSTATIKA ÚČINNÁ U KARCINOMU PRSU A ODPOVĚD NA JEJICH PODÁNÍ V MONOTERAPII.....	20
TABULKA 6 SYSTÉMOVÁ LÉČBA PODLE SUBTYPŮ (PODLE ZÁVĚŘŮ ST. GALLEN 2013)	21
TABULKA 7 KLINICKO-PATOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA PACIENTEK (N=50).....	43
TABULKA 8 VÝSKYT CTC V KORELACI S TNM KLASIFIKACÍ	49
TABULKA 9 VÝSKYT DTC V KORELACI S TNM KLASIFIKACÍ.....	49
TABULKA 10 KROKOVÁ MULTIVARIAČNÍ REGRESE VÝSKYTU CTC A DTC PŘED ZAHÁJENÍM TERAPIE.	51
TABULKA 11 VÝSKYT DTC/CTC U PREMENOPAUZÁLNÍCH A POSTMENOPAUZÁLNÍCH PACIENTEK	55

Seznam literatury

1. ÚZIS ČR 2013. **Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010.**
2. Pohlreich P, Kleibl Z, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Machackova E *et al.*: **The clinical importance of a genetic analysis of moderate-risk cancer susceptibility genes in breast and other cancer patients from the Czech Republic.** *Klin Onkol* 2012, **25 Suppl:** S59-S66.
3. Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P: **Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found?** *Crit Rev Oncol Hematol* 2007, **63:** 125-149.
4. Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L, Aaltonen K, Tamminen A, Heikkinen T *et al.*: **Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene.** *Mol Oncol* 2008, **2:** 296-316.
5. Prausová J: **Karcinom prsu - problém i v 21. století.** *Interní Med* 2010, **12:** 26-32.
6. Abrahámová J, Dušek L, Dvořák K, Foretová L, Geryk E, Holub J *et al.*: **Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu.** 1 edition Grada Publishing Avicenum; 2003: 41-60.
7. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL *et al.*: **Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies.** *Cancer Cell* 2006, **10:** 529-541.
8. **Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2012, **490:** 61-70.
9. Klener P *et al.*: **Klinická onkologie.** 1 edition Galén; 2002: 495-513.
10. Adam Z, Vorlíček J, Vaníček J, *et al.*: **Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob.** Grada Publishing; 2004: 213-230.

11. Staněk L., Lísová S: **Nové možnosti v prediktivní diagnostice karcinomu prsu z pohledu patologa.** *Lékařské listy* 2003.
12. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B *et al.*: **Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013.** *Ann Oncol* 2013, **24**: 2206-2223.
13. Morrow M, Strom EA, Bassett LW, Dershaw DD, Fowble B, Giuliano A *et al.*: **Standard for breast conservation therapy in the management of invasive breast carcinoma.** *CA Cancer J Clin* 2002, **52**: 277-300.
14. Novotný J, Vítek P, et al: **Onkologie v klinické praxi.** Mladá Fronta; 2012:261-262.
15. De Lorenzi F, Lohsiriwat V, Barbieri B, Rodriguez Perez S, Garusi C, Petit JY *et al.*: **Immediate breast reconstruction with prostheses after conservative treatment plus intraoperative radiotherapy. long term esthetic and oncological outcomes.** *Breast* 2012, **21**: 374-9.
16. Eisen A, Weber BL: **Prophylactic mastectomy for women with BRCA1 and BRCA2 mutations--facts and controversy.** *N Engl J Med* 2001, **345**: 207-208.
17. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R *et al.*: **Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer.** *N Engl J Med* 2006, **354**: 809-820.
18. Werkhoven E, Hart G, Tinteren H, Elkhuizen P, Collette L, Poortmans P *et al.*: **Nomogram to predict ipsilateral breast relapse based on pathology review from the EORTC 22881-10882 boost versus no boost trial.** *Radiother Oncol* 2011, **100**: 101-107.
19. Vyzula R, et al: **Modrá kniha České onkologické společnosti.** 19 edition 2014.
20. Fleeman N, Bagust A, Beale S, Dwan K, Dickson R, Proudlove C *et al.*: **Pertuzumab in combination with trastuzumab and docetaxel for the treatment of HER2-positive metastatic or locally recurrent unresectable breast cancer.** *Pharmacoeconomics* 2015, **33**: 13-23.

21. Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M *et al.*: **Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study.** *Lancet Oncol* 2013, **14**: 461-471.
22. Fidler IJ, Kripke ML: **Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor.** *Science* 1977, **197**: 893-895.
23. Hart IR, Fidler IJ: **Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma.** *Cancer Res* 1980, **40**: 2281-2287.
24. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: **The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.** *Int J Cancer* 1997, **72**: 1-22.
25. Joyce JA, Pollard JW: **Microenvironmental regulation of metastasis.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**: 239-252.
26. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B *et al.*: **Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion.** *Cancer Res* 2011, **71**: 2455-2465.
27. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N *et al.*: **CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages.** *Cancer Cell* 2009, **16**: 91-102.
28. Carmeliet P, Jain RK: **Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases.** *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**: 417-427.
29. Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW: **SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines.** *Cancer Res* 1998, **58**: 5529-5536.
30. Mansel RE, Fodstad, Oystein, Jiang, Weng G: **Metastasis of Breast Cancer.** Springer; 2008.

31. Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, Stournaras C: **Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells.** *Mol Med* 2007, **13**: 79-88.
32. Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR: **Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 3457-3464.
33. Imoto S, Ochiai A, Okumura C, Wada N, Hasebe T: **Impact of isolated tumor cells in sentinel lymph nodes detected by immunohistochemical staining.** *Eur J Surg Oncol* 2006, **32**: 1175-1179.
34. Aguirre-Ghiso JA: **Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**: 834-846.
35. Thiery JP, Sleeman JP: **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**: 131-142.
36. Shook D, Keller R: **Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development.** *Mech Dev* 2003, **120**: 1351-1383.
37. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J *et al.*: **Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.** *Oncogene* 2002, **21**: 3241-3246.
38. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y: **Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells.** *Cancer Cell* 2009, **15**: 195-206.
39. Massague J: **TGFbeta in Cancer.** *Cell* 2008, **134**: 215-230.
40. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Fan C, Perou CM, Naber S *et al.*: **A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer.** *Cancer Res* 2009, **69**: 5364-5373.

41. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D *et al.*: **Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1806**: 258-267.
42. Shackleton M: **Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different.** *Semin Cancer Biol* 2010, **20**: 85-92.
43. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**: 3983-3988.
44. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q *et al.*: **Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers.** *PLoS One* 2010, **5**: e10277.
45. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P *et al.*: **Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling.** *Nature* 2008, **452**: 650-653.
46. Peacock CD, Watkins DN: **Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer.** *J Clin Oncol* 2008, **26**: 2883-2889.
47. Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Li Y, Ahmad A *et al.*: **Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells.** *Cancer Lett* 2011, **307**: 26-36.
48. Singh A, Settleman J: **EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer.** *Oncogene* 2010, **29**: 4741-4751.
49. Fidler IJ: **Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, **43 Suppl**: S3-10.
50. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E *et al.*: **Systemic spread is an early step in breast cancer.** *Cancer Cell* 2008, **13**: 58-68.
51. Herbert GS, Sohn VY, Brown TA: **The impact of nodal isolated tumor cells on survival of breast cancer patients.** *Am J Surg* 2007, **193**: 571-573.

52. Paterlini-Brechot P, Vona G, Brechot C: **Circulating tumorous cells in patients with hepatocellular carcinoma. Clinical impact and future directions.** *Semin Cancer Biol* 2000, **10**: 241-249.
53. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S *et al.*: **The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence.** *Cancer* 2005, **103**: 884-891.
54. Vessella RL, Pantel K, Mohla S: **Tumor cell dormancy: an NCI workshop report.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**: 1496-1504.
55. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P *et al.*: **Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance.** *Ann Oncol* 2007, **18**: 851-858.
56. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH *et al.*: **Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.** *Lancet* 2002, **360**: 683-689.
57. Fehm T, Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K: **Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance.** *Breast Cancer Res* 2008, **10 Suppl 1**: S1.
58. Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H *et al.*: **The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 3091-3097.
59. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC *et al.*: **A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, **353**: 793-802.
60. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G *et al.*: **Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 5342-5348.

61. Wulfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zanker KS, Kiesel L *et al.*: **HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 1715-1720.
62. Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A *et al.*: **Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**: 3678-3685.
63. Bernards R, Weinberg RA: **A progression puzzle.** *Nature* 2002, **418**: 823.
64. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR: **A molecular signature of metastasis in primary solid tumors.** *Nat Genet* 2003, **33**: 49-54.
65. Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Wigfield S *et al.*: **Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 4562-4568.
66. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P *et al.*: **Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**: 1840-1847.
67. Pantel K, Brakenhoff RH: **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**: 448-456.
68. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V *et al.*: **Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients.** *Clin Chem* 2007, **53**: 537-539.
69. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G *et al.*: **Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 5615-5621.
70. Wicha MS: **Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 5606-5607.

71. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.** *N Engl J Med* 2004, **351**: 781-791.
72. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C *et al.*: **A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation.** *Cancer* 2006, **107**: 885-892.
73. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K: **Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients.** *Int J Cancer* 2008, **123**: 1991-2006.
74. Zach O, Lutz D: **Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow.** *Curr Opin Oncol* 2006, **18**: 48-56.
75. Wong NS, Kahn HJ, Zhang L, Oldfield S, Yang LY, Marks A *et al.*: **Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **99**: 63-69.
76. Zheng S, Lin H, Liu JQ, Balic M, Datar R, Cote RJ *et al.*: **Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells.** *J Chromatogr A* 2007, **1162**: 154-161.
77. Woelfle U, Breit E, Zafrakas K, Otte M, Schubert F, Muller V *et al.*: **Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients.** *J Immunol Methods* 2005, **300**: 136-145.
78. Hauch S, Zimmermann S, Lankiewicz S, Zieglschmid V, Bocher O, Albert WH: **The clinical significance of circulating tumour cells in breast cancer and colorectal cancer patients.** *Anticancer Res* 2007, **27**: 1337-1341.
79. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R *et al.*: **Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **115**: 581-590.

80. Pinzani P, Salvadori B, Simi L, Bianchi S, Distante V, Cataliotti L *et al.*: **Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection.** *Hum Pathol* 2006, **37**: 711-718.
81. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L *et al.*: **Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.** *Nature* 2007, **450**: 1235-1239.
82. Bethel K, Scuderi R, Marrinucci D, Fisher JM, Lazarus N, Lazar D *et al.*: **Morphologic assessment of peripheral blood smears in patients with circulating tumor cells (CTCs).** *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008, **26**: 1137.
83. Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K: **Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**: 5013-5021.
84. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M *et al.*: **Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse.** *J Clin Oncol* 2008, **26**: 1208-1215.
85. Talasz AH, Powell AA, Huber DE, Berbee JG, Roh KH, Yu W *et al.*: **Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**: 3970-3975.
86. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B: **Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**: 329-340.
87. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D *et al.*: **Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**: R59.

88. Paris PL, Kobayashi Y, Zhao Q, Zeng W, Sridharan S, Fan T *et al.*: **Functional phenotyping and genotyping of circulating tumor cells from patients with castration resistant prostate cancer.** *Cancer Lett* 2009, **277**: 164-173.
89. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de VJ, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW *et al.*: **Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **118**: 455-468.
90. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M *et al.*: **Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**: 2634-2645.
91. Fetsch PA, Cowan KH, Weng DE, Freifield A, Filie AC, Abati A: **Detection of circulating tumor cells and micrometastases in stage II, III, and IV breast cancer patients utilizing cytology and immunocytochemistry.** *Diagn Cytopathol* 2000, **22**: 323-328.
92. Slade MJ, Singh A, Smith BM, Tripuraneni G, Hall E, Peckitt C *et al.*: **Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years.** *Int J Cancer* 2005, **114**: 94-100.
93. Lacroix M: **Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13**: 1033-1067.
94. Wolfle U, Muller V, Pantel K: **Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance.** *Future Oncol* 2006, **2**: 553-561.
95. Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K: **Current status in human breast cancer micrometastasis.** *Curr Opin Oncol* 2007, **19**: 558-563.
96. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H *et al.*: **Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2003, **21**: 3469-3478.

97. Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A, Bhattacharyya A, Anderson A, Kuerer H *et al.*: **Disseminated tumor cells predict survival after neoadjuvant therapy in primary breast cancer.** *Cancer* 2012, **118**: 342-348.
98. Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, Reuben J, Gao H, Cohen EN *et al.*: **Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer.** *Cancer* 2010, **116**: 3330-3337.
99. Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A, Lokkevick E, Nesland JM, Anker G *et al.*: **Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**: R117.
100. Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D: **Circulating tumor cells in breast cancer.** *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008, **20**: 55-60.
101. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de CP, Nos C, Blin N *et al.*: **Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 1392-1400.
102. Rack B, Andergassen U, Neugebauer J, Salmen J, Hepp P, Sommer H *et al.*: **The German SUCCESS C Study - The First European Lifestyle Study on Breast Cancer.** *Breast Care (Basel)* 2010, **5**: 395-400.
103. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A *et al.*: **Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 2006, **24**: 3756-3762.
104. Becker S, Becker-Pergola G, Banys M, Krawczyk N, Wallwiener D, Solomayer E *et al.*: **Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **117**: 227-233.
105. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N *et al.*: **The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse**

- transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19.** *Eur J Cancer* 1997, **33**: 854-861.
106. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**: 563-572.
107. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L: **Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors.** *Blood* 1994, **83**: 636-640.
108. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T: **Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **106**: 239-243.
109. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G *et al.*: **Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.** *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**: 1419-1424.
110. Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F *et al.*: **Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high risk breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 2000, **18**: 80–86.
111. Marches R, Scheuermann R, Uhr J: **Cancer dormancy: from mice to man.** *Cell Cycle* 2006, **5**: 1772-1778.
112. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E *et al.*: **A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype.** *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**: 316-325.
113. Drageset V, Nesland JM, Erikstein B, Skovlund E, Sommer H, Anker G *et al.*: **Monitoring of disseminated tumor cells in bone marrow in high-risk breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy.** *Int J Cancer* 2006, **118**: 2877-2881.
114. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S *et al.*: **Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant**

chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res* 2008, **14**: 7004-7010.

115. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 4218-4224.
116. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 6403-6409.
117. De Giorgi U, Valero V, Rohren E, Dawood S, Ueno NT, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for outcome prediction in metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2009, **27**: 3303-3311.
118. Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G, Sotlar K, Gebauer G, Durr-Storzer S *et al.*: **Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**: R60.

Seznam vlastních publikací

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

- s impact factorem

1. **Cabinakova M**, Mikulova V, Malickova K, Vrana D, Pavlista D, Petruzelka L, Zima T, Tesarova P. Predictive factors for the presence of tumor cells in bone marrow and peripheral blood in breast cancer patients. *Neoplasma*. 2015;62(2):259-268. **IF=1,642**
2. Mikulová V, **Čabiňaková M**, Janatková I, Mestek O, Zima T, Tesařová P. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014 Mar;74(2):132-42. **IF =2,009**
3. **Čabiňaková M**, Tesařová P. Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. *Folia Biol (Praha)*. 2012;58(3):87-97. **IF=1,219**

Seznam příloh

Příloha 1 Cabinakova M, Mikulova V, Malickova K, Vrana D, Pavlista D, Petruzelka L, Zima T, Tesarova P. Predictive factors for the presence of tumor cells in bone marrow and peripheral blood in breast cancer patients. *Neoplasma*. 2015;62(2):259-268.

Příloha 2 Mikulová V, Čabiňáková M, Janatková I, Mestek O, Zima T, Tesařová P. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014 Mar;74(2):132-42.

Příloha 3 Čabiňáková M, Tesařová P. Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. *Folia Biol (Praha)*. 2012;58(3):87-97.