Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Gynekologicko-porodnická klinika 1.LF a VFN

MOLEKULÁRNÍ VLASTNOSTI DUKTÁLNÍHO *CARCINOMA IN SITU* A JEJICH KLINICKÝ *IMPACT*

Disertační práce

MUDr. Jan BÖHM
Školitel: doc. MUDr. Michal ZIKÁN, Ph.D.
Gynekologicko-porodnická klinika 1.LF a VFN v Praze

2015

Předkladatel: MUDr. Jan Böhm
Henneberg-Kliniken BGmbH
Schleusinger Straße 17
98646, Hildburghausen
Spolková republika Německo
Email: jboehm@henneberg-kliniken.de

OBSAH

Obsah....3
1. Úvod 6
2. Hypotéza a cíle práce 7
3. Stavba prsní žlázy....8
4. Přehled a klasifikace preinvazivních lézí....10
4.1 Vývoj diagnózy preinvazivní léze....10
4.2 Klasifikace duktální intraepiteliální neoplazie (DIN)....10
4.3 Plochá epiteliální atypie (FEA)....11
4.4 Atypická duktální hyperplazie (ADH) 12
4.5 Duktální *carcinoma in situ* (DCIS)....14
4.6 Mikroinvazivní karcinom....15
4.7 Lobulární neoplazie.... 15
5. Teorie progrese preinvazivních stádií karcinomu prsu....17
5.1 Kmenové buňky v onkogenezi....17
5.2 Teorie lineární progrese vs. horizontální progrese.... 18
6. Vývoj epidemiologie DCIS ve vztahu k mamografickému screeningu.... 22
6.1 Organizace mamografického screeningu.... 22
6.2 Vliv mamografického screeningu na incidenci DCIS v Česku.... 22
6.3 Srovnání epidemiologie DCIS mezi Českem a zahraničím.... 26
7. Diagnostika DCIS....28
7.1 Mamografie.... 29
7.2 Sonografie....29
7.3 MR mamografie.... 29
7.4 Bioptické metody.... 29
8. Management DCIS.... 31
8.1 Chirurgická léčba.... 31
8.2 Radiační léčba.... 34
8.3 Systémová léčba DCIS.... 36
8.4 Shrnutí výsledků operačních modalit v kombinaci s radioterapií.... 37
9. Přehled prognostických faktorů DCIS.... 38
9.1 Definice pojmů....38
9.2 Věk v době diagnózy.... 39
9.3 Metoda detekce DCIS.... 41
9.4 Grading....41
9.5 Architektonická stavba DCIS.... 41

9.6 Komedonová nekróza..... 41
9.7 Resekční okraje..... 42
9.8 Reziduální kalcifikace..... 42
9.9 Velikost..... 42
9.10 Fokalita..... 42
9.11 Adjuvantní radioterapie..... 43
9.12 Van Nuys prognostický index (VNPI) 43
9.13 Estrogenový receptor..... 46
9.14 Progesteronový receptor..... 50
9.15 Proliferační index Ki67..... 51
9.16 - 9.27 Ostatní prognostické faktory 51
9.28 Vývoj prognostických faktorů – shrnutí..... 58
10. Analýza 250 případů duktálního *carcinoma in situ*.....65
10.1 Organizace mamografického screenigu v SRN.....65
10.2 Metodika..... 65
10.3 Výsledky.....66
10.3.1 Věk v době diagnózy.....66
10.3.2 Chirurgická léčba.....66
10.3.3 Velikost ložiska.....67
10.3.4 Grade..... 67
10.3.5 Imunohistochemické charakteristiky.....69
10.3.6 Van Nuys prognostický index.....69
10.3.7 Axilární staging.....72
10.3.8 Adjuvantní léčba ……74
10.4 Diskuze..... 74
10.4.1 Věk v době diagnózy.....74
10.4.2 Korelace věku s charakteristikami DCIS..... 75
10.4.3 Imunohistochemie..... 76
10.4.4 Axilární staging..... 76
11. Srovnávací analýza..... 77
11.1 Úvod..... 77
11.2 Rozvaha..... 77
11.2.1 BRCA1..... 77
11.2.2 BRCA2..... 77
11.2.3 p53..... 78
11.2.4 Bcl-2..... 79
11.2.5 VEGF..... 80

11.3 Metodika..... 82
11.3.1 Sběr a příprava vzorků..... 82
11.3.2 Izolace RNA..... 82
11.3.2.1 Izolace RNA ze zmražené tkáně..... 82
11.3.2.2 Kontrola množství izolované RNA..... 82
11.3.3 Příprava cDNA..... 82
11.3.4 Izolace DNA..... 83
11.3.4.1 Izolace DNA ze zmražené tkáně..... 83
11.3.4.2 Kontrola množství izolované DNA..... 83
11.3.5 Expresní analýza..... 83
11.3.5.1 Princip *real-time* PCR..... 83
11.3.5.2 *Real-time* PCR..... 84
11.3.6 Analýza ztráty heterozygozity..... 86
11.3.6.1 Mikrosatelitární markery..... 86
11.3.6.2 Amplifikace mikrosatelitárních markerů..... 86
11.3.6.3 Polymerázová řetězová reakce..... 86
11.3.6.4 Analýza mikrosatelitárních markerů..... 87
11.3.7 Statistická analýza..... 87
11.4 Výsledky..... 89
11.4.1 Výsledky analýzy ztráty heterozygozity..... 89
11.4.2 Výsledky analýzy genové exprese..... 90
11.5 Shrnutí výsledků..... 91
11.6 Diskuze..... 91
12. Závěr..... 93
13. Souhrn 95
Poděkování / Danksagung..... 97
Seznam použitých zkratek..... 98
Seznam vyobrazení..... 101
Seznam tabulek..... 103
Seznam literatury..... 104

1. ÚVOD

Preinvazivní léze prsní žlázy, a zejména pak duktální *carcinoma in situ* (DCIS), jsou onemocnění, jejichž význam v posledních dvou dekádách dramaticky vzrostl. Díky rozšíření mamografického screeningu se dnes v některých zemích pomalu začíná dosahovat hlavního cíle screeningu. Tím je snížení mortality zhoubného onemocnění prsní žlázy [Heinen-Kammerer T., 2014]. Mamografické vyšetření totiž dokáže odhalit maligní změny prsní žlázy v časných, a tedy lépe léčitelných stádiích. Vedlejším efektem tohoto vyšetření je bohužel i nárůst počtu diagnostikovaných přednádorových změn.

Hovoříme-li o nich jako o onemocněních s maligním potenciálem, implikujeme tím fakt, že u žádného DCIS nedokážeme s jistotou říci, jak vysoké je riziko lokální recidivy a s jakou pravděpodobností dojde u léze k progresi do invazivního karcinomu. Důsledkem této nejistoty pak může být léčebný přístup předpokládající, že z každého DCIS se velmi pravděpodobně může vyvinout invazivní karcinom a hlavním cílem léčby je vzniku tohoto invazivního karcinomu zabránit. Následkem toho je v praxi jistě mnoho pacientek léčeno často agresivněji (*overtreatment*), než by bylo s ohledem na biologickou povahu preinvazivní léze nutné. Naše současné omezení tedy spočívá v tom, že nejsme schopni bezpečně a jednoduše odlišit pacientky s nízce maligním DCIS od žen s vysokým rizikem.

Tato disertační práce vznikala s cílem ozřejmit vztahy mezi klinickými a molekulárními vlastnostmi premaligních lézí a jejich vlivem na léčbu.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Předkládaná práce se zabývá klinickými a molekulárními aspekty duktálního *carcinoma in situ* (DCIS) s cílem identifikovat charakteristiky podskupiny DCIS s nepříznivým prognostickým chováním.

Práce zahrnuje dva hlavní okruhy vlastního výzkumu:

- Analýzu incidence a prognostických faktorů DCIS.
- Analýzu molekulárních vlastností DCIS ve srovnání se zdravou tkání a tkání invazivního karcinomu.

Základními předpoklady našeho výzkumu byly tyto hypotézy:

- DCIS je častou lézí nacházenou v prsu – i když se jedná o lézi preinvazivní, je často řešena stejně radikálně jako invazivní nádor.
- Současné spektrum faktorů popisujících riziko recidivy DCIS a jeho progrese v invazivní nádor je nedostatečné.
- Molekulární charakteristiky některých DCIS mohou být shodné s charakteristikami invazivního nádoru, jejich srovnáním je možné identifikovat léze s nižším či vyšším potenciálem malignizace.

3. STAVBA PRSNÍ ŽLÁZY

Prsní žláza (*glandula mammaria*) je největší apokrinní žláza těla. Vývojově pochází z ektodermu. Produktem její sekrece je mateřské mléko.

Makroskopicky podmiňuje prsní žláza prominenci na přední straně hrudníku, zvanou prs (*mamma*). Plně vyvinutý prs sahá vertikálně od 3. k 6. žebru a horizontálně od parasternální čáry do přední čáry axilární. Kraniolaterálně vybíhá směrem do podpaží axilární výběžek prsní žlázy (*recessus axillaris*). Na vrcholu prsu se nachází pigmentovaný prsní dvorec (*areola mammae*) s prsní bradavkou (*papilla mammae*). Na hrotu bradavky ústí mlékovody (*ductūs lactiferi*). Kromě samotné prsní žlázy se na stavbě prsu podílí i řídké tukové vazivo, které tvoří vrstvu premammární a retromammární. Dorzální ohraničení prsu představuje *fascia pectoralis*. Mezi touto hlubokou fascií a podkožním vazivem probíhají tzv. Cooperské vazy (*ligamenta suspensoria mammae*) [Čihák R., 2007].

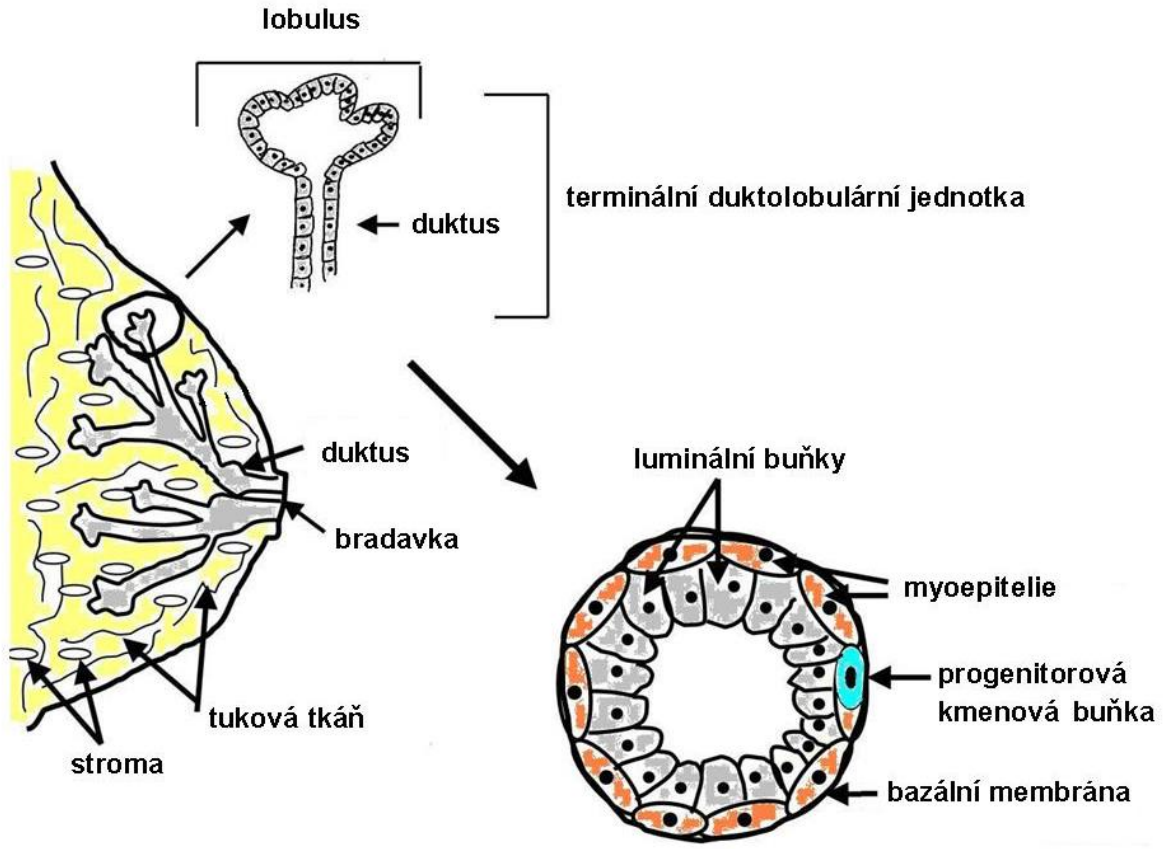
Vlastní prsní žláza je složená tuboalveolární. Její sekreční oddíl je tedy tvořen jednak alveoly neboli lalůčky (*lobuli*) a dále tubulózními vývody (*ductūs*). Hlavních mlékovodů, které ústí na prsní bradavce, je v jednom prsu 15-20. V době laktace se mlékovody pod bradavkou rozšiřují v rezervoáry, tzv. *sinūs lactiferi*. Směrem proximálním se mlékovody dále větví a jejich úseky se označují jako segmentální mlékovody, terminální extralobulární mlékovody a konečně jako terminální intralobulární mlékovody. Na jejích koncích se popisuje tzv. terminální duktolobulární jednotka (*terminal ductal-lobular unit* - TDLU), která představuje základní stavební jednotku mléčné žlázy. Můžeme si ji představit jako mlékovod obklopený 30-50 výchlipkami. V době mimo laktaci je velikost jedné TDLU 1-2 mm [Klika E., 1986] (obr. 1).

Jelikož je TDLU místem, kde vzniká naprostá většina malignit prsní žlázy, je důležité seznámit se i s její histologickou stavbou. TDLU je vystlána dvěma vrstvami epitelu. Vnitřní (luminární) vrstvu tvoří vlastní sekreční epitel, vně (bazálně) pak nacházíme diskontinuální vrstvičku myoepitelií (bazální buňky). Vše je dále zevně ohraničeno tenkou bazální membránou tvořenou převážně kolagenem IV a lamininem [Conklin M.W. a Keely P.J., 2012]. Z hlediska onkogeneze je důležitý fakt, že kromě těchto plně diferencovaných buněk jsou součástí bazální epitelové vrstvy i progenitorové buňky kmenové (*mammary stem cells*), které zajišťují obnovu epitelu a jsou schopné diferenciace jak v epitelie sekreční tak v myoepitelie [Tiede B. a Kang Y., 2011] (obr. 1).

Prsní žlázu obklopuje stroma. To se skládá převážně z extracelulární matrix, která je tvořena kolagenem I, a dále z buněk - fibroblastů, endotelií a leukocytů [Polyak K. a Kalluri R., 2010]. Aktuální práce předpokládají velmi intimní vztah mezi epitelem, bazální membránou a všemi celulárními i acelulárními složkami prostředí stromatu (*microenvironment*). Mezi všemi těmito komponentami existuje jak biochemická tak mechanická komunikace [Provenzano P.P. a

Keely P.J., 2011]. Správná resp. patologická interakce hraje důležitou roli ve všech fázích onkogeneze, její důležitost je ovšem mimořádná zejména v okamžiku progrese preinvazivní léze v invazivní karcinom.

V průběhu života se vlivem endokrinní stimulace mění morfologie prsní žlázy. Před pubertou je stavba prsu chlapců a dívek podobná, převládají zde duktální struktury. U žen během telarché dochází jednak ke zmnožení vazivově-tukové tkáně okolo prsní žlázy, zejména se ale prodlužují a větví dukty a formují lalůčky. Tento proces dále pokračuje s nástupem těhotenství. Zmnožení duktů je podmíněno estrogeny, růst sekrečních částí je pod vlivem progesteronu. Po ukončení kojení se vrací prsní žláza do klidového stavu. Sekreční oddíly zčásti zanikají a žlazové vývody se zúží [Klika E., 1986].



Obr. 1 Model stavby prsní žlázy. Terminální duktolobulární jednotka (TDLU) je místem vzniku většiny nádorů prsní žlázy. Barevně jsou odlišeny dva typy epitelií: vnitřní (luminární) vrstvu tvoří sekreční buňky, vně (bazálně) nacházíme myoepitelie. Modře je dále zobrazena progenitorová kmenová buňka (podle Dimri G. et al., 2005).

4. PŘEHLED A KLASIFIKACE PREINVAZIVNÍCH LÉZÍ

4.1 Vývoj diagnózy preinvazivní léze

Jakkoli nabyl duktální *carcinoma in situ* (DCIS) prakticky na významu teprve až v posledních dvou desetiletích, kdy v souvislosti s plošným zavedením mamografického screeningu stoupla dramaticky incidence DCIS, diagnóza samotná je známa již přes sto let. Poprvé byl DCIS popsán americkým chirurgem Bloodgoodem již v roce 1893 [Pavlišta D., 2008]. Je zřejmé, že při neexistenci mamografického vyšetření byly tenkrát vyšetřovány a následně operovány jen pacientky s hmatnou rezistencí a nebo se suspektním výtokem z bradavky. Diagnóza čisté preinvazivní léze (bez invazivní komponenty), tak jak je dnes známa, byla vzácná. První histologický popis preinvazivního karcinomu jako samostatné nosologické jednotky provedl až patolog MacCarty v roce 1911 [Pavlišta D., 2008]. Teprve o dalších 60 let později se pak v odborné literatuře začal objevovat pojem atypická duktální hyperplazie (ADH) [Goldenberg V.E. et al., 1969].

4.2 Klasifikace duktální intraepiteliální neoplazie (DIN)

Klasifikace atypických preinvazivních změn prsní žlázy není jednotná, v odborné literatuře lze narazit na různé, paralelně používané termíny. Za účelem sjednocení nomenklatury představil Tavassoli koncept duktální intraepiteliální neoplazie (DIN) [Tavassoli F.A., 2001]. Hlavní argumenty, proč při popisu preinvazivních změn akceptovat tuto klasifikaci, jsou:

- Všechny proliferační léze přecházejí plynule jedna v druhou, zejména mezi ADH a DCIS neexistuje jednoznačná hranice,
- stejná terminologie se osvědčila i v případě jiných orgánů (CIN, VIN, PIN etc.),
- při popisu onemocnění se takto vyhneme pojmu “karcinom“, který u pacientek může vyvolat zbytečný emoční stres.

Klasifikace DIN ovšem nebyla, a to ani přes své dílčí výhody, doposud všeobecně přijata. Proto ji zmiňujeme jen pro úplnost a v dalším textu nebude používána (tab. 1).

I přes zmíněnou nejednotnost v názvosloví lze obecně preinvazivní změny rozdělit na základě cytologického a histologického obrazu do tří skupin:

- plochá epiteliální atypie – *flat epithelial atypia* (FEA)
- atypická duktální hyperplazie (ADH)
- duktální *carcinoma in situ* (DCIS)

DIN klasifikace	mikroskopický popis	aktuální nomenklatura
***low-risk* DIN**	UDH[1]	UDH[1]
DIN 1A	FEA[2]	FEA
DIN 1B	ADH[2]	ADH
DIN 1C	extenzivní ADH[2] *low-grade* DCIS[2]	ADH *low-grade* DCIS
DIN 2	kribriformní nebo mikropapilární DCIS s nekrózou nebo atypiemi[2]	*intermediate-grade* DCIS
DIN 3	DCIS se signifikantními atypiemi (s nebo bez nekrózy) [2]	*high-grade* DCIS

Tab. 1 Přehled názvosloví preinvazivních lézí. UDH - *usual ductal hyperplasia*, FEA - *flat epithelial atypia*, ADH - atypická duktální hyperplazie, DCIS - duktální *carcinoma in situ* (Tavassoli F.A., 1998).

[1] WHO klasifikace z roku 2003 zahrnuje i jednotku UDH, pro kterou je typická intraepiteliální proliferace epitelií bez buněčných atypií a bez průkazu atypické architektoniky.
[2] Popis FEA, ADH a DCIS viz text.

4.3 Plochá epiteliální atypie (FEA)

Pro historický vývoj změn označovaných pojmem FEA platí to samé, co bylo již výše uvedeno pro DCIS a ADH. Před érou mamografického screeningu byla tato diagnóza extrémně vzácná. Termín FEA bylo poprvé zmíněn a definován až v roce 2003 pracovní skupinou WHO pod vedením Tavassoliho [Tavassoli F.A. et al., 2003]. Došlo tím k ujednocení označení pro změny tkáně, které se do té doby v literatuře označovaly nejrůznějšími termíny jako *clinging carcinoma*, *atypical cystic duct*, *ductal intraepithelial neoplasia of the flat monomorphic type* apod. [Schnitt S.J., 2003].

4.3.1 Histomorfologické charakteristiky FEA

Charakteristickým znakem FEA je průkaz buněk s mírným či nejvýše středním stupněm atypií (obr. 2). Buňky jsou kolumnárně uspořádané a vystýlají dilatované lobuly v jedné nebo i více vrstvách. Z uvedeného vyplývá, že spíše než o samostatnou nosologickou jednotku se tedy v případě FEA jedná o pojem zastřešující několik stupňů změn. Léze z kategorie FEA lze dále rozdělit na dvě podskupiny:

- kolumnární změny s atypií (*columnar cell change with atypia*)
- kolumnární hyperplazie s atypií (*columnar cell hyperplasia with atypia*)

4.3.1.1 Kolumnární změny s atypií

Do této podskupiny se řadí nálezy s výše uvedenou charakteristikou, atypické kolumnárně uspořádané buňky však vystýlají lobuly jen v jedné a nebo maximálně ve dvou vrstvách [Schnitt S.J., 2003].

4.3.1.2 Kolumnární hyperplazie s atypií

Cytologické změny jsou podobné těm u kolumnárních změn s atypií, buňky jsou zde ovšem uskupeny ve více než dvou vrstvách. Proliferující buňky mohou tvořit i drobné trsy nebo mikropapily, komplexní architektonické změny ale nejsou přítomny (odtud také označení *flat* = plochý). Četná je přítomnost intraluminárních mikrokalcifikací [Schnitt S.J., 2003].

4.3.2 Klinický význam FEA

V mamografickém snímku je někdy možné identifikovat výše zmíněné kalcifikace. Tyto jsou většinou oblé a diferenciálně diagnosticky je lze jen těžko odlišit od kalcifikací spojených s nízce maligním DCIS. Nález FEA je ve většině případů náhodný v souvislosti s diagnostikou jiné patologie prsní žlázy. Následný management FEA je odlišný v závislosti na tom, zda se jedná o nález spojený s excizí a nebo s minimálně invazivní biopsií. Důležité je, že FEA se sice může někdy vyskytovat i izolovaně, častěji ovšem spolu s komplexními proliferativními lézemi, které již splňují diagnostická kritéria ADH, DCIS nebo dokonce invazivního karcinomu. Při průkazu FEA v resekátu je tedy třeba po těchto lézích vyššího stupně cíleně pátrat. FEA v minimálně invazivním bioptátu (*core needle* nebo vakuově asistovaná biopsie) je indikací k diagnostické excizi [Weigel S. et al., 2013].

4.4 Atypická duktální hyperplazie (ADH)

Dalším stupněm "malignizace" epitelu prsní žlázy je atypická duktální hyperplazie (ADH). Tato je definována třemi parametry:

- cytologické změny
- architektura
- velikost

4.4.1 Histomorfologické charakteristiky ADH

ADH je tvořena uniformními buňkami s pravidelným uspořádáním. Podle definice musí být jejich jádra menší než dvojnásobek průměru erytrocytu. Větší jádra a *high-grade* jaderné atypie vylučují diagnózu ADH. Průkaz mitóz a nekrózy je vzácný. Na úrovni architektury tkáně jsou charakteristické kribriformní komplexy a mikropapily (obr. 2). Buňky jsou ovšem rovnoměrně rozmístěné se zachovanou orientací do lumen (jako známka žlazové

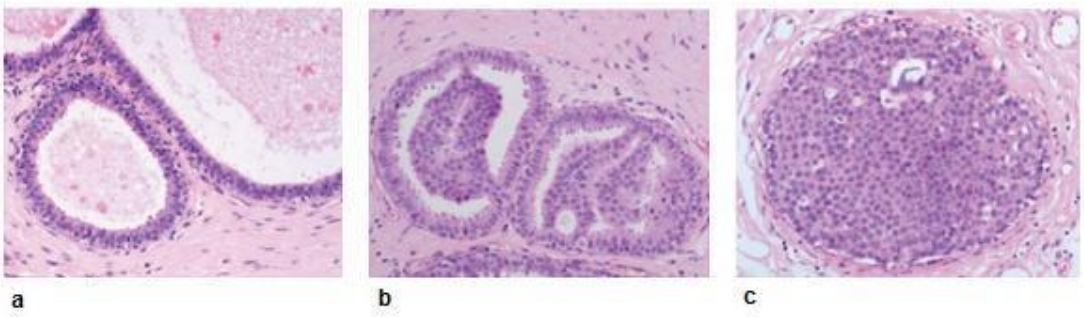
diferenciace). Třetím znakem ADH je pak její velikost. Podle ní se ADH diferenciálně diagnosticky odlišuje od *low-grade* DCIS. Obecně panuje shoda, že velikost ADH může být nejvýše 3mm a postižen je pouze jeden lobulus – větší léze, byť cytologicky i histologicky identické, se již označuje jako DCIS [Pinder S.E. a Ellis I.O., 2003]. ADH může obsahovat přibližně v 10% mikrokalcifikace zachytitelné mamograficky (o průměru minimálně 80μm). Tyto jsou ovšem vždy jemné a tvarem kulaté [Weigel S. et al., 2013].

ADH se od nízce maligního DCIS odlišuje pouze velikostí léze. Je tedy zřejmé, že v miniinvazivním bioptátu není možné obě entity s jistotou odlišit. Vyšetřující patolog totiž často nemá k dispozici dostatek tkáně. Z toho důvodu doporučuje *European Working Group for Breast Screening Pathology* se pojmu ADH při popisu takového bioptátu vyhnout a místo toho použít termín *atypical epithelial proliferation of ductal type* (AEPDT) [Amendoeira I. et al., 2006].

4.4.2 Klinický význam ADH

Praktický management ADH se, podobně jako u FEA, liší v závislosti na tom, zda byla atypie diagnostikována v miniinvazivním bioptátu a nebo v definitivním chirurgickém resekátu. V prvním případě je metodou volby excize z bioptovaného ložiska. Při nálezu ADH resp. AEPDT v biopsii má pacientka riziko 30-50%, že v definitivní histologii bude potvrzena neoplazie (*in situ* nebo invazivní) [Lieske B. et al., 2008].

Při potvrzení ADH v resekátu mohou nastat dvě konstelace. ADH může být buď vedlejší nález při potvrzeném karcinomu, potom nepředstavuje pro pacientku žádné další riziko. Je ovšem nutné vyloučit, že se atypie nachází na okraji resekátu – zde by mohla být známkou přehlédnutého *low-grade* DCIS. Druhou možností je ADH jako vedlejší nález u benigní léze. Terapeutické důsledky z tohoto neplynou žádné, pro pacientku se ovšem 4-5x zvyšuje relativní riziko malignity prsní žlázy ipsi- i kontralaterálně [Degnim A.C. et al., 2007].



Obr. 2 Příklady preinvazivních lézí v H-E barvení: FEA (a), ADH (b) a *low-grade* DCIS (c) (Weigelt B. a Reis-Filho J.S., 2009).

4.5 Duktální *carcinoma in situ* (DCIS)

DCIS je definován jako proliferace maligních epiteliálních buněk uvnitř prsní žlázy bez invaze přes bazální membránu (obr. 2). K potvrzení či vyloučení invaze se používají imunohistochemické metody s průkazem intaktnosti vrstvy myoepiteliálních buněk (aktin, myosin) nebo bazální membrány (kolagen IV, laminin) [Pinder S.E. a Ellis I.O., 2003]. Čistý DCIS, tj. bez přítomnosti invazivní komponenty, tvoří dnes 15-20 % všech diagnostikovaných zhoubných nádorů prsní žlázy [Böhm J. a Zikán M., 2014].

4.5.1 Klasifikace DCIS

Při popisu DCIS lze použít různé klasifikační systémy:

- cytologická klasifikace podle *Modified European Pathologists Scheme*,
- architektonická klasifikace,
- Van Nuys klasifikace (bude detailně popsána v kapitole o prognostických faktorech).

4.5.1.1.Modified European Pathologists Scheme

V závislosti na cytologických kritériích se DCIS dělí na tři skupiny – nízce, středně a vysoce maligní (*low-grade*, *intermediate-grade*, *high-grade*). Tato klasifikace je všeobecně akceptovaná a doporučená evropskou *Working Group on Breast Screening Pathology* [Bethwaite P. et al., 1998].

Low-grade DCIS je tvořen uniformní populací buněk s mírně zvýšeným nukleocytoplazmatickým poměrem a jen ojedinělými mitózami. Architektonicky se jedná o typ mikropapilární, kribriformní, někdy solidní. Mikrokalcifikace se mohou vyskytovat, nekrózy chybí.

Intermediate-grade DCIS je tvořen buňkami podobných vlastností jako nízce maligní DCIS, mohou být přítomna jadérka. Architektonika je převážně solidní, může být i kribriformní nebo mikropapilární, ale na rozdíl od *low-grade* jsou přítomny nekrózy. Mikrokalcifikace bývají časté.

High-grade DCIS je tvořen polymorfními buňkami i jádry. Mitotická aktivita je výrazná. Architektonika může zahrnovat libovolný typ (viz níže), nejčastěji je ale solidní s centrální komedonovou nekrózou a kalcifikacemi. U *high-grade* DCIS je typické mnohočetné a diskontinuální postižení duktů [Pavlišta D., 2008].

4.5.1.2. Architektura

Další dělení resp. charakterizace DCIS je možná na základě architektonického obrazu. Rozeznáváme tyto podtypy DCIS:

- plochý – jen ojediněle lze nalézt mikropapily bez stromatu a arkády.

- mikropapilární – papily postrádají stroma a jsou tvořeny jen shluky uniformích buněk s hyperchromním jádrem. Papily mohou splývat a vytvářet arkády se sekundárními luminy. Ty mohou obsahovat kalcifikace. Je zvýšená tendence k rozsáhlému postižení duktů.
- kribriformní – lumen duktu je vyplněno proliferujícím epitelem, který tvoří sekundární lumina. Tato jsou oválná až kulatá a může v nich být sekret nebo kalcifkace.
- solidní – proliferující epitelie takřka kompletně vyplňují lumen. Tento histotyp bývá spojován se vznikem centrálních nekróz s kalcifikacemi. Epitelie často vykazují vysoký stupeň malignity (*grade*), jedná se o tzv. komedonový DCIS.

Další vzácnější podtypy jsou:

- DCIS z prstencových buněk (*signet-ring cells*)
- DCIS s apokrinní diferenciací
- světlobuněčný DCIS aj. [Pavlišta D., 2008].

4.6 Mikroinvazivní karcinom

Pro všechny tři zmíněné typy preinvazivních lézí (FEA, ADH, DCIS) platí, že maligní buňky se nacházejí pouze uvnitř duktu a neinvadují do okolního interlobulárního stromatu. Imunohistochemicky je možné provést průkaz neporušenosti bazální membrány nebo vrstvy myoepitelií. Na pomezí mezi DCIS a invazivním karcinomem existuje jednotka zvaná mikroinvazivní karcinom. Jedná se relativně vzácnou diagnózu, incidence je <1% všech diagnostikovaných malignit prsní žlázy [Yi M. et al., 2008]. Odlišení této entity od DCIS může být někdy značně složité, a to i při použití imunohistochemických metod. Problémy může způsobovat chronická zánětlivá reakce, fibróza nebo i artefakty vzniklé při řezání vzorků [Schnitt S.J., 1998]. Nádorové buňky u mikroinvazivního karcinomu pronikají přes bazální membránu buď samostatně a nebo v drobných uskupeních, která mají nepravidelný tvar a připomínají buňky invazivního karcinomu. V doporučených postupech *European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis* z roku 2006 se diagnóza mikroinvazivního karcinomu (T1mic) vztahuje na léze, u kterých není rozsah invaze větší než 1mm [Amendoeira I. et al., 2006]. Původ tohoto mikroinvazivního karcinomu je ve většině případů duktální *carcinoma in situ* a to zejména *high-grade* s komedo nekrózou. Z preinvazivních lézí lobulárního typu vzniká mikroinvazivní karcinom velmi zřídka [Ross D.S. a Hoda S.A., 2011].

4.7 Lobulární neoplazie

V předchozích odstavcích byly detailně popsány preinvazivní změny duktálního typu. Ty klasická patologie vždy striktně odlišovala od neoplazií lobulárních. Dnes se však na základě nových poznatků o karcinogenezi dříve ostrá hranice mezi oběma typy lézí smazává (viz

kap. 5.2.1). Lobulární preinvazivní léze jsou mikroskopicky charakterizované proliferací malých monomorfních atypických buněk uvnitř zvětšených lobulů. Buňky nevykazují známky soudržnosti, což souvisí s chyběním mezibuněčného adhezivního proteinu E-kadherin. Tato vlastnost se přenáší i na jejich difuzní makroskopický vzhled. Invazivní lobulární karcinomy nevykazují žádný charakteristický makroskopický znak a jejich neostré hranice ztěžují i detekci zobrazovacími metodami [Weigel S. et al., 2013].

4.7.1 Názvosloví lobulárních prekanceróz

Dříve používané termíny atypická lobulární hyperplazie (ALH) a lobulární *carcinoma in situ* (LCIS) [Foote F.W. a Steward F.W., 1941] jsou dnes pomalu opouštěny a na návrh Haagensena byl zaveden zastřešující pojem lobulární neoplazie (LN) [Haagensen C.D. et al., 1978]. Této nomenklatury se drží i aktuální WHO klasifikace [Tavassoli F.A. et al., 2003]. Pokusy kvantifikovat míru malignizace lobulární neoplazie v podobě LIN klasifikace (lobulární intraepiteliální neoplazie 1-3) se neprosadily [Bratthauer G.L. a Tavassoli F.A., 2002].

Vedle klasické LN jsou dnes popisovány další subtypy, vykazující odlišné klinické chování:

- pleomorfní LN,
- LN s komedonovými nekrózami,
- extenzivní typ LN s expanzí do duktů.

Tyto tři formy se mohou do jisté míry vzájemně překrývat. Ve srovnání s klasickou variantou LN je charakteristická jejich horší prognóza a imunohistochemický průkaz vysokého proliferačního indexu Ki67, exprese p53 a HER2 pozitivita [Lakhani S.R. et al., 2006; Weigel S. et al., 2013].

5. TEORIE PROGRESE PREINVAZIVNÍCH STÁDIÍ KARCINOMU PRSU

Onkogeneze, tedy transformace zdravé buňky v buňku nádorovou, je proces mnohastupňový a zdlouhavý. Pro některé typy zhoubných nádorů se odhaduje, že latence mezi iniciací nádorového bujení a progresí v symptomatický tumor může trvat i desetiletí [Sporn M.B., 1991].

V průběhu onkogeneze dochází v buňce jak ke změnám genetickým, tak epigenetickým. Jako genetické mutace označujeme změny originální sekvence nukleotidů vzniklé například delecí, inzercí, translokací, chromozomální aneuploidií apod. Mnohem četnější, a to až o několik řádů, jsou modifikace epigenetické. Tyto sice nemění přímo sekvenci nukleotidů, mohou však ovlivnit genovou expresi a to nejčastěji methylací baze cysteinu nebo remodelací chromatinu. V důsledku genetických i epigenetických změn dochází v buňce k instabilitě, za níž stojí změna neaktivních protoonkogenů v aktivní onkogeny (*gain of function*) a nebo k vymizení funkce antionkogenů - tumorsupresorů (*loss of function*) [Choi J.D. a Lee J.S., 2013]. V této fázi mohou zafungovat četné kontrolní mechanizmy, které buď zajistí opravu poškozeného genomu a nebo, jedná-li se o změny zásadní a neopravitelné, pošlou buňku na cestu apoptózy, tj. kontrolované buněčné smrti. Pokud ovšem buňka těmto mechanizmům unikne, může se začít nekontrolovaně dělit a přemění se v buňku nádorovou. Její dceřiné buňky se sice mohou v následujícím průběhu v důsledku dalších mutací genotypově i fenotypově měnit, mají ale společný původ – vycházejí původně z jediné buňky, nazývají se proto monoklonální. Monoklonalita je typická vlastnost maligních nádorů [Pavlišta D., 2008].

5.1 Kmenové buňky v onkogenezi

Kmenové buňky lze v zásadě rozdělit podle mitotické aktivity a možností další diferenciace na totipotentní, multipotentní a pluripotentní. Posledně jmenované se také označují jako progenitorové a jsou ve tkáních poměrně četné. Typická je jejich vysoká mitotická aktivita, konečný replikační potenciál (nemohou se dělit donekonečna) a omezené spektrum jejich diferenciace. To znamená, že se z nich nemůže vyvinout libovolná tělní buňka, ale jen ta, která je specifická pro příslušnou tkáň nebo orgán [Beckmann J. et al., 2007]. Tyto progenitorové kmenové buňky jsou také důležitou součástí bazální epitelové vrstvy prsní žlázy. Díky nim je zajištěna stálá obnova tkáně, jejich dělením a diferenciací vznikají zralé specializované buňky, což v případě prsní žlázy znamená sekreční epitelie a myoepitelie. Tyto mají již velmi výrazně omezený replikační potenciál a doba jejich přežití je většinou krátká. Zmíněné charakteristiky kmenových buněk – tedy vysoká mitotická aktivita a jistý stupeň dediferenciace – jsou zároveň typické vlastnosti buněk zhoubných nádorů. Proto je

pravděpodobné, že primární nádorová buňka vzniká právě na úrovni kmenových buněk a nikoli ve zralých buňkách konečné tkáňové populace [Pavlišta D., 2008].

5.2 Teorie lineární progrese vs. horizontální progrese

Pro vysvětlení vztahů mezi jednotlivými prekancerózami platila dlouhou dobu teorie lineární progrese. Podle tohoto názoru je prvním stupněm změn tzv. *usual ductal hyperplasia* (UDH), následovaná FEA, ADH a duktálním *carcinoma in situ* se vzrůstajícím stupněm malignity (*low-grade*, *intermediate-grade* a *high-grade*) a konečně invazivním karcinomem prsní žlázy [Wellings S.R. a Jensen H.M., 1973]. Tento názor byl v posledních letech opuštěn a nahrazen teorií horizontální progrese, jež je postavena na existenci dvou rozdílných, na sobě nezávislých cest (*pathways*) progrese prekanceróz, tzv. *low-grade pathway* a *high-grade pathway* [Simpson P.T. et al., 2005]. Důkazy pro tuto teorii vyplývají ze studia mutací nádorových buněk.

Na základě profilu genové exprese se podařilo invazivní karcinomy prsní žlázy rozdělit na čtyři tzv. intrinsické subtypy: *basal-like*, *HER2-like*, *luminal A* a *luminal B* [Perou C.M. et al. 2000]. Pro každou skupinu jsou charakteristické určité parametry, např. *grade*, vzorec exprese hormonálních receptorů a HER2 receptoru. Tímto zjištěním byl položen základ pro současný pohled na karcinom prsní žlázy jako na heterogenní skupinu nádorů s odlišnými biologickými vlastnostmi. To samé, zdá se, platí i pro *in situ* léze: molekulárně genetickými metodami bylo zjištěno, že různé genetické poruchy dávají vzniknout prekancerózám s navzájem odlišnými biologickými vlastnostmi. Jinými slovy, *low-grade* a *high-grade* prekancerózy se neodlišují pouze kvantitativně stupněm cytogenetických změn (*grade*), ale i kvalitativně typem genetických aberací. Takže zatímco *low-grade* nádory (*in situ* nebo invazivní karcinomy) jsou skoro vždy diploidní a vykazují *loss of function* na chromozomu 16q a *gain of function* na chromozomu 1q, vyznačují se *high-grade* DCIS a invazivní karcinomy *grade* 3 aneuploidií a komplexními změnamy typu *loss* na 11q, 14q, 8p, 13q, *gain* na 17q, 8q, 5p a amplifikacemi v lokusech 17q12, 17q22–24, 6q22, 8q22, 11q13 a 20q13 [Buerger H. et al., 1999]. Na základě těchto údajů se zdá být konverze *low-grade* DCIS na *high-grade* DCIS nepravděpodobná. Data favorizují spíše existenci dvou odlišných cest progrese: *low-grade pathway*, ve které *low-grade* DCIS progreduje v G1 invazivní karcinom a *high-grade* pathway, kde z *high-grade* DCIS vzniká G3 invazivní karcinom.

Půjdeme-li v úvahách ještě dále, můžeme na zákadě výše uvedených genetických aberací postulovat existenci dvou rozdílných skupin neoplazií [Simpson P.T. et al., 2005]. Jejich existence je důležitá pro správné pochopení a kategorizaci prekanceróz. Zatímco do rodiny *high-grade* neoplazií je zatím řazen pouze *high-grade* DCIS a G3 invazivní karcinom, je skupina *low-grade* neoplazií mnohem větší. Patří sem jednak nízce maligní DCIS, invazivní karcinomy *grade* 1 (např. tubulární nebo mucinózní histotypy), ale i invazivní lobulární

karcinomy. Na podkladě podobných genetických mutací do této *low-grade* skupiny dále řadíme prekurzory jako FEA, ADH a i lobulární *in situ* neoplazie (LN) [Weigel S. et al., 2013] (tab. 2).

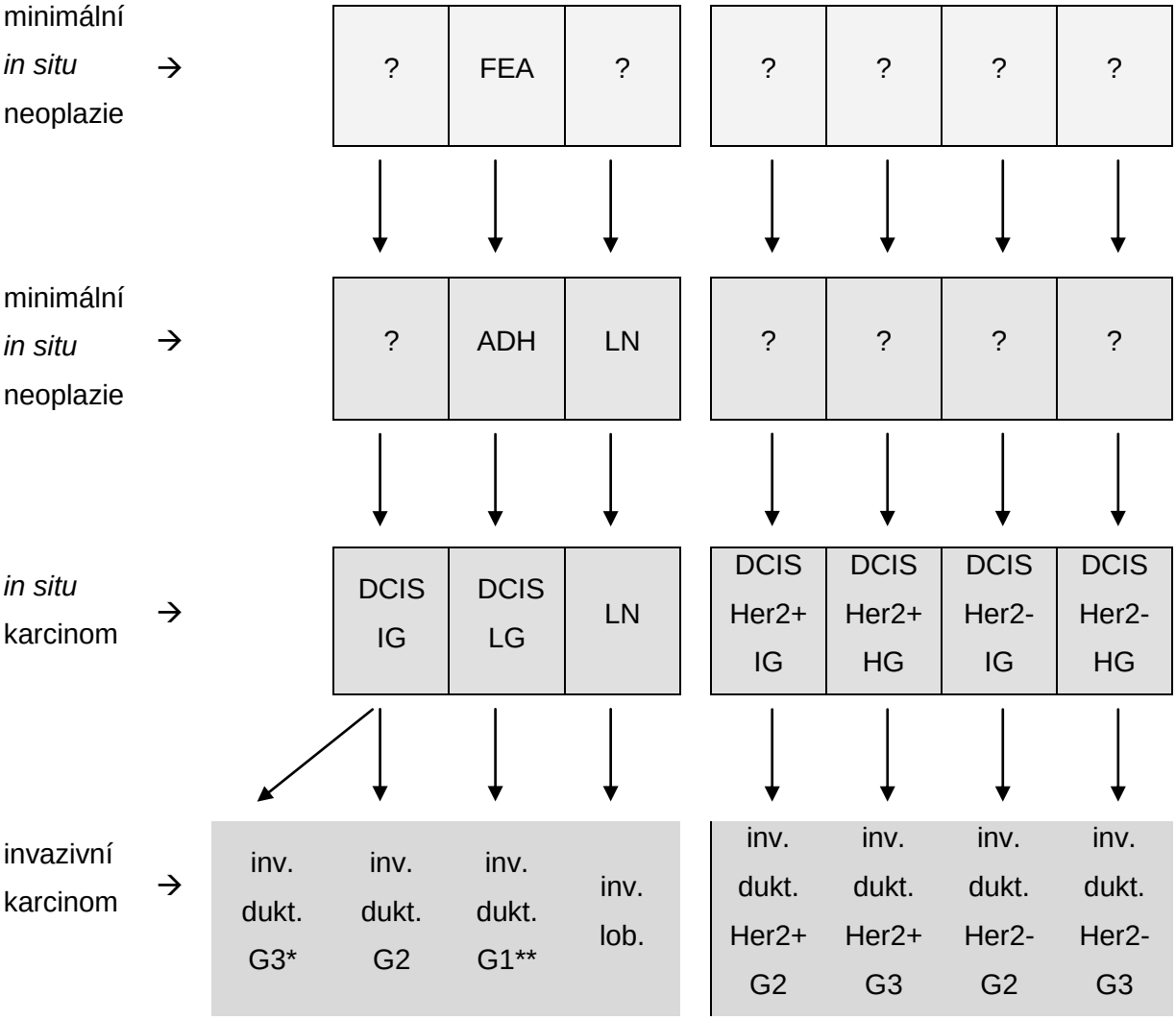
5.2.1 Místo lobulárních neoplazií v onkogenezi

Lobulární neoplazie dříve klasická patologie striktně odlišovala od lézí duktálních, a to zejména na podkladě typického mikroskopického vzhledu. Pro lobulární karcinomy je totiž typická ztráta genu CDH-1, což vede k chybění jeho produktu, adhezivního proteinu E-kadherinu. Lobulární karcinomy se tak vyznačují typickým difuzním růstem [Weigel S. et al., 2013]. Na úrovni genotypových, fenotypových a v neposlední řadě i prognostických vlastností byla ovšem zjištěna taková podoba s ostatními zástupci *low-grade* rodiny, že dnes se lobulární neoplazie do této skupiny také řadí. Pro lobulární neoplazie charakteristický chybějící CDH-1 gen je lokalizován v genomu na stejném raménku chromozomu (16q21) jako další pro *low-grade* skupinu typické aberace [Buerger H. et al., 1999].

5.2.2 Vztah ADH a DCIS z pohledu genetických mutací

Analýzou ztrát heterozygozity (LOH) byly zjištěny stejné genové aberace ve tkáni ADH a *low-grade* DCIS, což implikuje blízkou příbuznost obou lézí. Rozdělení ADH a *low-grade* DCIS na dvě samostatné nosologické jednotky je tedy nelogické, obě prekancerózy již *de facto* naplňují definici neoplazie. Pomyslná hranice mezi hyperplazií a neoplazií by měla vést spíše na úrovni FEA a ADH [Ellis I.O., 2010].

		low-grade pathway	***high-grade pathway***
genotypové a fenotypové charakteristiky		*loss:* 16q *gain:* 1q ER+ PgR+ HER2-	*loss:* 8p, 13q, 11q, 14q *gain:* 5p, 8q, 17q amplifikace: 17q12, 17q22–24, 6q22, 8q22, 11q13, 20q13 ER- PgR- HER2 +/-
progenitorová kmenová buňka	→	genetická mutace	genetická mutace



Tab. 2 Preinvazivní léze a horizontální cesty progrese (*pathways*): Model dvou paralelních cest progrese pro *low-grade* a *high-grade* karcinomy opírající se o nálezy rozdílných genetických mutací a o odlišnou expresi steroidních receptorů a HER2. Zatímco progrese ve středně diferencovaný (G2) a špatně diferencovaný (G3) karcinom je možná v obou hlavních oddílech, objevují se FEA, LN, ADH a *low-grade* DCIS pouze v tzv. *low-grade pathway*. ? = hypotetický prekurzor, * = skupina ER/PgR pozitivních, HER2 negativních, G3 karcinomů v *low-grade pathway* je velmi malá,** = do této skupiny G1 karcinomů patří některé histotypy (např. tubulární, mucinózní

karcinom). ER = estrogenový receptor, PgR = progesteronový receptor, FEA = *flat epithelial atypia*, LN = lobulární neoplazie, ADH = atypická duktální hyperplazie, DCIS = duktální *carcinoma in situ*, LG = *low-grade,* IG = *intermediate-grade*, HG = *high-grade*, inv. dukt. = invazivní duktální, inv. lob. = invazivní lobulární (podle Weigel S. et al., 2013).

6. VÝVOJ EPIDEMIOLOGIE DCIS VE VZTAHU K MAMOGRAFICKÉMU SCREENINGU

Incidence DCIS se za poslední čtvrtstoletí dramaticky zvýšila. Příčinou je zřejmě nárůst četnosti mamografického vyšetření prsu v souvislosti s rozvojem oportunního a v posledních letech i organizovaného screeningu. Principem screeningové mamografie je včasné odhalení drobných, asymptomatických změn, což mohou být na jedné straně invazivní karcinomy v časném stadiu, a nebo právě preinvazivní léze. Možnost detekce DCIS na mamografickém snímku souvisí s jeho typickým znakem – polymorfními kalcifikacemi. Čím četnější je tedy v populaci mamografické vyšetření, tím vyšší je incidence DCIS. Nárůst je absolutní, tj. zvyšuje se celkový počet pacientek s nově diagnostikovaným DCIS. Zároveň ale pozorujeme i proporcionální zvýšení četnosti DCIS ve skupině všech pacientek s maligní či premaligní lézí prsní žlázy.

6.1 Organizace mamografického screeningu

Ve všech zemích, kde byl zaveden organizovaný mamografický screening, je jeho hlavním cílem snížení mortality (úmrtnosti) na zhoubná onemocnění prsní žlázy. Teoreticky lze tohoto cíle dosáhnout odhalením nádorů v časných stádiích, která mají příznivější prognózou. Tak stoupají šance na uzdravení pacientky. Vedlejším cílem mamografického screeningu je dále snížení morbidity (nemocnosti). Při léčbě časných stádií se totiž často můžeme vyhnout agresivním terapeutickým modalitám (např. chemoterapii) [Malek D. a Rabe P., 2009].

Konkrétní forma organizovaného plošného screeningu se v jednotlivých zemích liší. V Česku jsou cílovou skupinou všechny ženy starší 45 let. Horní věková hranice pro účast na mamografickém screeningu není stanovena [věstník MZ, 2010]. Ve Spolkové republice Německo je cílová skupina užší, podmínkou je věk mezi 50 a 69 roky. Tyto ženy jsou o probíhajícím screeningu každé dva roky informovány metodou adresného zvaní. Pacientky s nádorovým onemocněním prsu v anamnéze nebo například ženy symptomatické jsou z organizovaného screeningu vyloučeny [Malek D. a Rabe P., 2009].

Podrobná doporučení pro zavedení screeningového programu jsou obsažena v dokumentu *European Guidelines for Quality Assurance in Breast Cancer Screening and Diagnosis* [Perry N. et al., 2006].

6.2 Vliv mamografického screeningu na incidenci DCIS v Česku

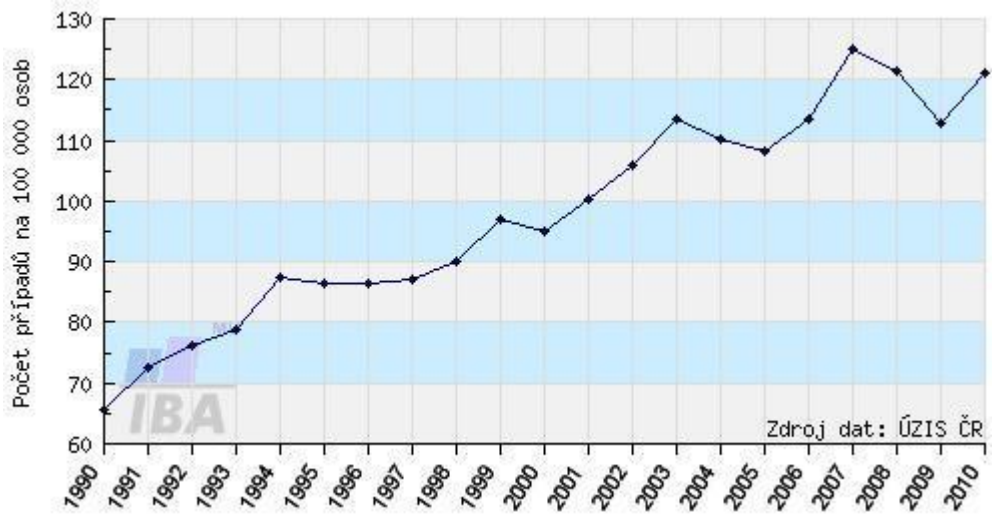
Se zavedením mamografického screeningu došlo k nárůstu četnosti diagnózy DCIS. Situaci v Česku dobře dokumentují epidemiologická data, která shromažďuje a vyhodnocuje Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS). Na internetu jsou data vyhledatelná na portálu www.svod.cz (Systém pro vizualizaci onkologických dat).

Podle těchto údajů došlo v ČR mezi lety 1990 až 2010 k nárůstu incidence invazivního karcinomu prsu (ICD kód diagnózy C50) z 65,46 na 121,14 případů na 100.000 obyvatel (tab. 3, obr. 3). Vyjádřeno v absolutních číslech to znamená 3487 pacientů v roce 1990 a 6498 pacientů v roce 2010 (tab. 4, obr. 4), což činí nárůst o 86 % [ÚZIS, 2014].

Pro diagnózu D05 (zahrnující duktální i lobulární *in situ* karcinomy) byl v uvedeném období zjištěn nárůst incidence o 939 %. V roce 1990 bylo v ČR diagnostikováno 44 preinvazivních lézí (0,83 na 100.000 obyvatel), v roce 2010 již 457 (8,52 na 100.000 obyvatel) (tab. 5 a 6, obr. 5 a 6) [ÚZIS, 2014].

rok	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
incidence	65,46	72,55	76,28	78,76	87,47	86,41	86,27
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
	87,01	89,95	96,85	94,9	100,35	105,89	113,45
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	110,24	108,05	113,4	124,95	121,32	112,76	121,14

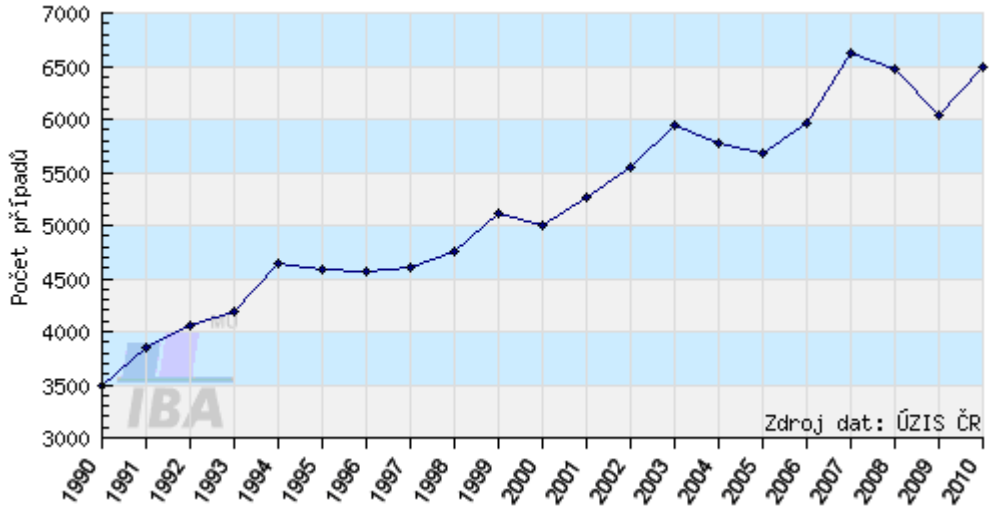
Tab. 3 Vývoj incidence (počet případů na 100.000 osob) invazivních karcinomů prsu (ICD kód C50) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).



Obr. 3 Grafické znázornění vývoje incidence invazivních karcinomů prsu (ICD kód C50) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).

rok	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
incidence	3487	3850	4052	4186	4647	4584	4570
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
	4603	4753	5111	5004	5257	5545	5941
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	5776	5671	5966	6620	6468	6032	6498

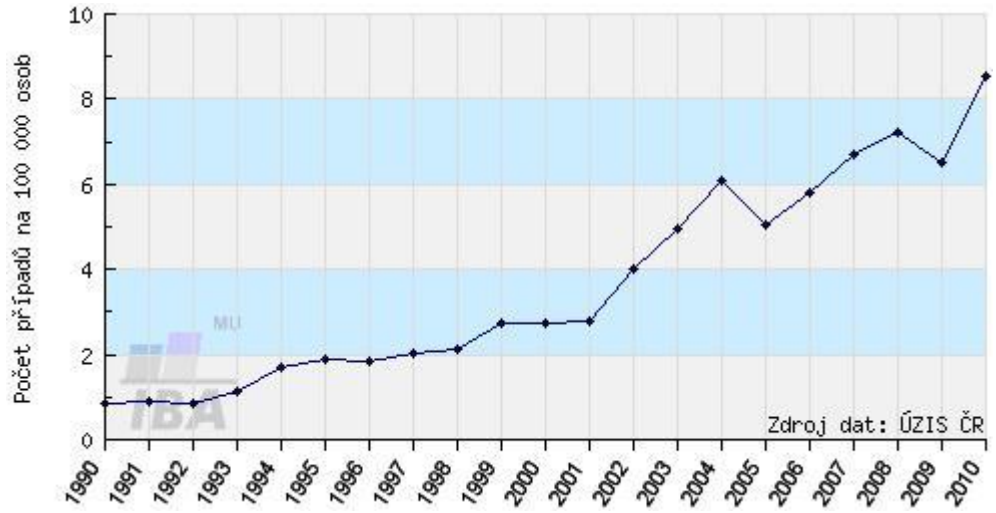
Tab. 4 Vývoj absolutní incidence invazivních karcinomů prsu (ICD kód C50) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).



Obr. 4 Grafické znázornění vývoje absolutní četnosti invazivních karcinomů prsu (ICD kód C50) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).

rok	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
incidence	0,83	0,9	0,85	1,11	1,69	1,9	1,85
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
	2,02	2,12	2,73	2,75	2,77	4,03	4,95
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	6,11	5,05	5,78	6,7	7,24	6,52	8,52

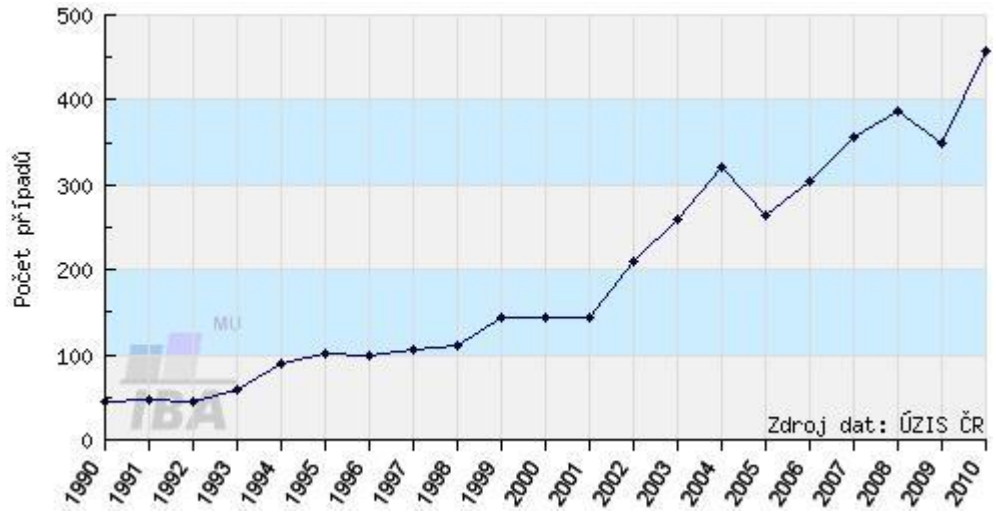
Tab. 5 Vývoj incidence (počet případů na 100.000 osob) *in situ* karcinomů prsu (ICD kód D05) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).



Obr. 5 Grafické znázornění vývoje incidence *in situ* karcinomů prsu (ICD kód D05) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).

rok	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
incidence	44	48	45	59	90	101	98
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
	107	112	144	145	145	211	259
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	320	265	304	355	386	349	457

Tab. 6 Vývoj absolutní incidence *in situ* karcinomů prsu (ICD kód D05) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).



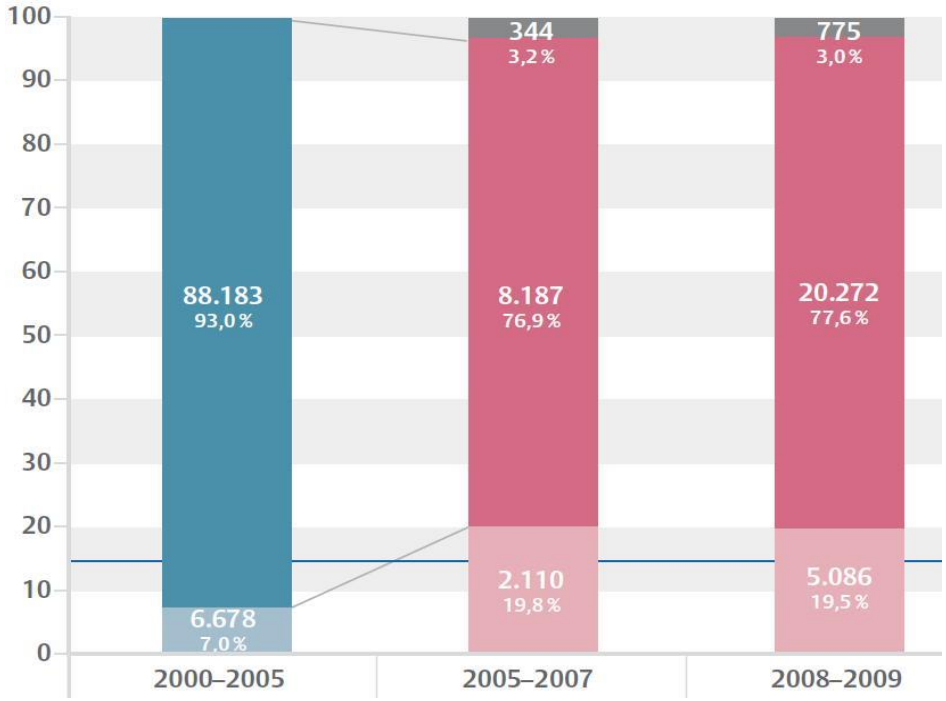
Obr. 6 Grafické znázornění vývoje absolutní četnosti *in situ* karcinomů prsu (ICD kód D05) v ČR mezi lety 1990-2010 (www.svod.cz).

Při srovnání incidence invazivních a *in situ* karcinomů prsní žlázy v Česku zjistíme, že i přes mnohasetprocentní nárůst incidence se DCIS podílí na všech zhoubných nádorech prsní žlázy pouhými 6,6 %. V Česku se tedy podíl DCIS ani zdaleka neblíží dvacetiprocentní hranici, která je často uváděna v odborné literatuře. Jako možné vysvětlení se nabízí teorie, že karcinomy diagnostikované v rámci mamografického screeningu (kde je vysoký podíl *in situ* lézí) se na množině všech diagnostikovaných zhoubných nádorů prsu v jednom roce podílí stále jen nízkým procentem. Nízké zastoupení *in situ* lézí může tedy být také výrazem nedostatečně rozšířeného mamografického screeningu.

6.3 Srovnání epidemiologie DCIS mezi Českem a zahraničím

Pro srovnání se zahraničím můžeme využít data z výroční zprávy německého programu mamografického screeningu z let 2008-2009 [Malek D. a Rabe P., 2009]. Údaje o četnosti DCIS a jeho podílu na množině všech karcinomů před a po zavedení screeningového programu jsou přehledně znázorněny v grafu (obr. 7). V letech 2000-2005, tedy před zavedením celoplošného screeningu, činila ve Spolkové republice Německo incidence všech zhoubných nádorů prsní žlázy v cílové kohortě (ženy 50-69 let) 94.861 případů. 6.678 diagnostikovaných *in situ* lézí představuje 7%.

V letech 2005-2007, kdy screeningový program plně fungoval jen v některých spolkových zemích, bylo zjištěno 10.297 zhoubných nádorů prsní žlázy. 2.110 případů *in situ* lézí činí 19,8 %. Za léta 2008-2009 již bylo pouze v rámci oficiálního screeningu zachyceno 25.358 nádorů prsu, podíl prekanceróz se opět blíží hranici 20% (5.086 případů *in situ* lézí představuje 19,5 %).



Obr. 7 Grafické znázornění podílu *in situ* karcinomů na všech diagnostikovaných zhoubných nádorech prsu ve Spolkové republice Německo. V prvním sloupci zleva (modrá barva) je znázorněno rozložení před plošným zavedením mamografického screeningu. Ve sloupcích růžových jsou uvedeny podíly jednotlivých typů karcinomů v příslušných letech. Šedivě jsou vyznačeny tumory, které nelze přiřadit ani skupině invazivních karcinomů ani skupině *in situ* lézí. Modrá linie odpovídá hranici 15%, kterou doporučují *guidelines* EU jako minimální podíl *in situ* karcinomů v rámci screeningu. Z grafu je patrný rozdíl mezi "nescreeningovou" populací, vykazující podíl *in situ* karcinomů 7% a podíl *in situ* lézí v mamografickém screeningu, blížící se 20% hranici (podle Malek D. a Rabe P., 2012).

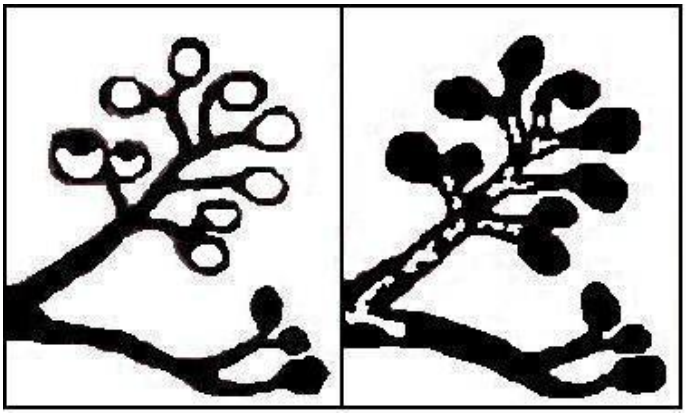
7. DIAGNOSTIKA DCIS

O problematice diagnostiky DCIS v souvislosti s mamografickým screeningem je podrobně pojednáno v kapitolách 6 a 10. Na tomto místě budou pouze stručně zmíněny zobrazovací techniky a metody bioptické.

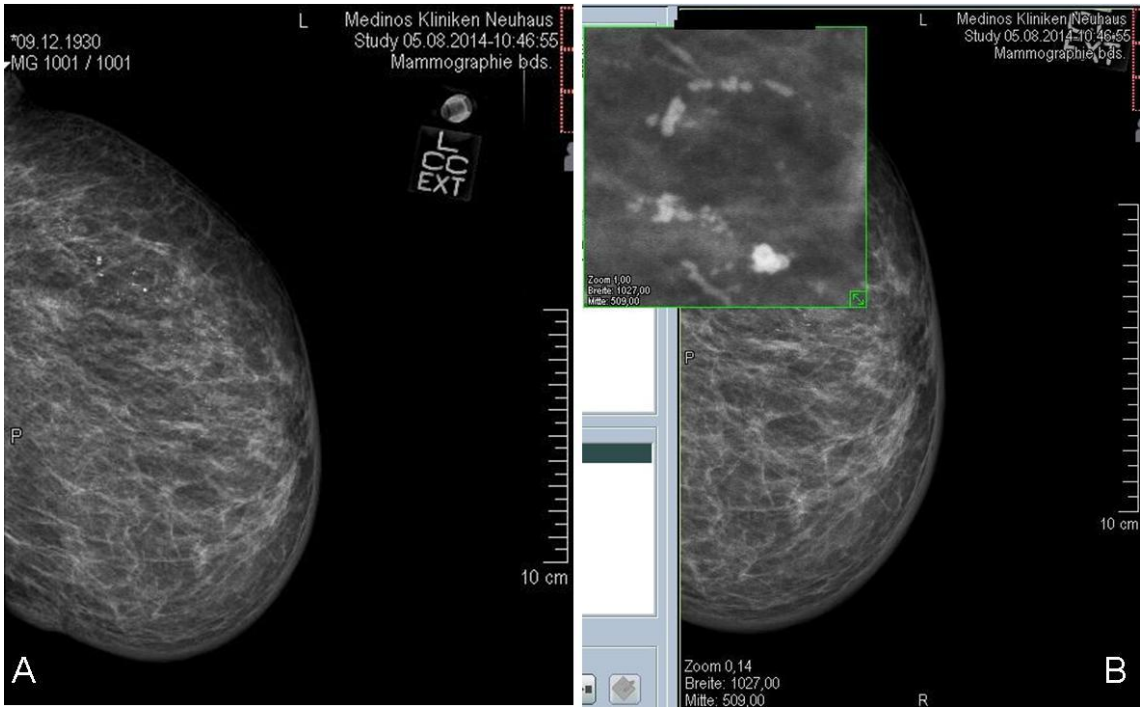
7.1 Mamografie

Suverénní metodu při detekci DCIS představuje rentgenologické vyšetření prsu - mamografie. Standardně se vyhotovují snímky ve dvou projekcích – projekci kraniokaudální (CC) a projekci mediolaterální šikmé (MLO). Při nejasném nálezu se doplňují projekce přídatné. Klasickým znakem DCIS v mamogramu jsou kalcifikace. Vyskytují se přibližně v 80-90%. Nález ložiskového stínu je také možný (5-10%), i když ne typický. Takové ložisko mívá v mamogramu všechny charakteristiky invazivního karcinomu, bioptický nález čistého DCIS bez invaze je pak spíše překvapivý. Histologicky se v takovém případě většinou jedná o *intermediate-grade* nebo *high-grade* DCIS. Kromě těchto dvou znaků se může v mamografickém obraze prokázat ještě stranová asymetrie nebo porucha architektoniky bez kalcifikací a bez ložiskových změn [Pavlišta D., 2008].

Kalcifikace provázející DCIS mají nejčastěji charakter dystrofických intraduktálních mikrokalcifikací (obr. 8 a 9). Rozdělení a hodnocení kalcifikací je komplikované, pro zařazení do BI-RADS skupiny a rozhodnutí o dalším postupu je nutné zvážit řadu parametrů, zejména celkový tvar shluku, distribuci v prsní žláze, počet kalcifikací a jejich morfologii.



Obr. 8 Schéma lokalizace a tvaru lobulárních a intraduktálních mikrokalcifikací. Lobulární mikrokalcifikace bývají ostře ohraničené a oblé, dignitou většinou benigní (BI-RADS 2). Intraduktální kalcifikace jsou naproti tomu nepravidelné, vykazují vysokou variabilitu velikosti, tvaru a denzity (jsou tzv. pleomorfní). Jejich nález je suspektní (BI-RADS 4 - 5).



Obr. 9 Mamografický obraz *high-grade* DCIS na digitálním snímku (a) a následné zvětšení v režimu lupa (b): Průkaz jemných pleomorfních kalcifikací v segmentální distribuci (archiv Patricia Müller-Laue).

7.2 Sonografie

Ultrazvuk je doplňkovou metodou k mamografii ve speciálních indikacích a slouží pro navigaci některých intervenčních výkonů (biopsií, značení). Sonografie může být indikovaná např. při nejednoznačném mamografickém nálezu nebo při diskrepanci mezi nejednoznačným či negativním mamogramem a hmatnou rezistencí.

7.3 MR mamografie

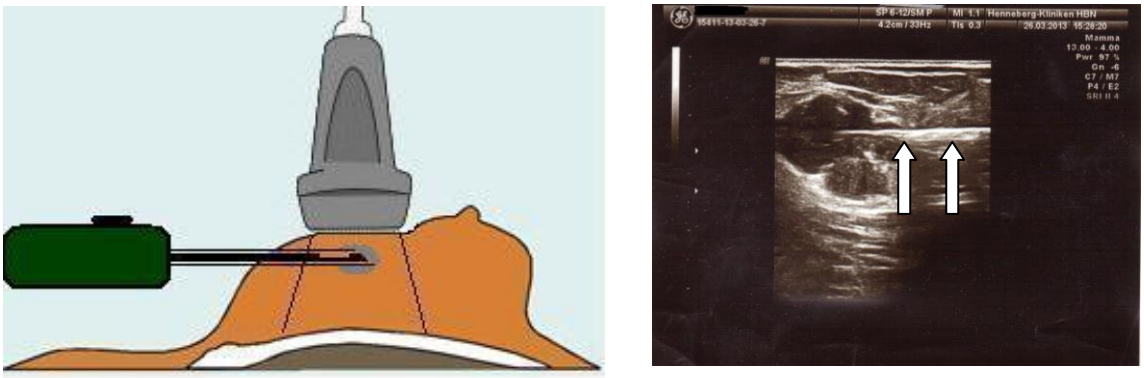
Magnetická rezonance prsní žlázy je další doplňková zobrazovací metoda. Spektrum indikací při vyšetřování invazivního karcinomu prsu je relativně široké, v rámci diagnostiky DCIS se ovšem jedná o metodu s marginálním významem. Hlavní přínos MR mamografie spočívá ve zhodnocení rozsahu DCIS a ve vyloučení multifokality resp. multicentricity. Přesto platí, že MR mamografie zobrazí přesněji léze invazivní než preinvazivní [Mennella S. et al., 2014].

7.4 Bioptické metody

Biopsie prsní žlázy se provádí buď za účelem přesné diferenciace nejasných mamografických či sonografických nálezů (BI-RADS 3) nebo slouží k potvrzení předpokládané malignity (BI-RADS 4-5) a předoperačnímu vyšetření biologických vlastností nádoru.

7.4.1 Core needle biopsie

Tato hojně využívaná bioptická metoda funguje na principu dvou koaxiálních jehel (*core* = jádro), které jsou vysokou rychlostí (syn. *high speed* biopsie) krátce po sobě vystřeleny z bioptické pistole. Často používané synonymum Tru-Cut™ biopsie odkazuje na obchodní název bioptické jehly. Velikost jehel je v porovnání s vakuovou biopsií (viz dále) menší, standardně se využívá jehel 14G (průměr přibližně 2,1mm). Ložiska nejčastěji bioptujeme pod sonografickou kontrolou, jehlu zavádíme z "volné ruky" po infiltraci kůže lokálním anestetikem a drobné incizi skalpelem (obr. 10).



Obr. 10 Schématické zobrazení navádění bioptické jehly pod sonografickou kontrolou (vlevo) a ultrazvukový obraz ložiska se zavedenou jehlou (vpravo).

7.4.2 Vakuová biopsie

Vakuová biopsie vhodně doplňuje spektrum minimálně invazivních bioptických metod. Celý systém bioptické jednotky – mamotomu – je konstrukčně složitý, navádění jehly probíhá pod stereotaktickou kontrolou řízenou počítačem. Systém využívá mnohem silnější jehly 11G - 8G (průměr 3mm - 4,1mm), díky kterým lze odebrat mnohonásobně větší objem tkáně (až 300mg vs. 30mg u 14G *core needle*). Nejdůležitější indikací stereotaktické mamotomie je ověření histologického povahy ložiska suspektních mikrokalcifikací, které nejsou zobrazitelné sonograficky [Pavlišta D., 2008].

8. MANAGEMENT DCIS

Základ strategie léčby DCIS spočívá v operativním odstranění nádorového ložiska. V případě provedení prs záchovného výkonu (*breast conserving surgery* - BCS) se pro snížení rizika vzniku lokální recidivy doporučuje aplikace adjuvantní radioterapie (RT). U lézí s prokázanou pozitivitou hormonálních receptorů indikujeme adjuvantní antiendokrinní léčbu [Lux M.P. a Souchon R., 2013].

DCIS je onemocnění s dobrou prognózou, 10-ti leté celkové přežití (*overall survival* - OS) dosahuje 96-98% [Allegra C.J. et al., 2010]. S tím souvisí hlavní cíl léčby, kterým není přežití pacientky, ale zabránění vzniku lokální recidivy. Ta již může mít invazivní charakter. Vzhledem k obecně dobré prognóze onemocnění je třeba při léčbě maximálně zohlednit zachování kvality života.

8.1 Chirurgická léčba

Dlouhá léta bývala metodou volby odstranění ložiska DCIS prostá mastektomie. Při tomto výkonu je odstraněna celá prsní žláza včetně kožního krytu. Směr incize se volí podle lokalizace tumoru. Mastektomii z indikace DCIS dnes vždy doplňujeme biopsií sentinelové uzliny (SLNB) (viz dále).

Zásadní změna v přístupu onkochirurgů nastala v osmdesátých letech 20. století. Po studiích Veronesiho, které prokázaly dostatečnou onkologickou jistotu prs záchovných výkonů, se tyto operace začaly prosazovat jak v terapii invazivního karcinomu prsní žlázy, tak i DCIS [Veronesi U. et al., 1990].

V chirurgické léčbě DCIS lze vysledovat několik obecných principů:

- Standardem by mělo být předoperační bioptické vyšetření ložiska.
- Cílem je vyjmout ložisko DCIS vcelku a pokud možno během jedné operace. Každá další reexcize zhoršuje kosmetický výsledek i možnost rekonstrukce resekátu patologem za účelem zhodnocení šíře lemu zdravé tkáně.
- Při peroperační lokalizaci (většinou) nehmatné léze jsme odkázáni na předem zavedené značkovací drátky.
- Tvar resekátu by měl respektovat topografickou anatomii prsní žlázy s ohledem na intraduktální šíření DCIS.
- Kontrolní snímek resekátu se zavedeným lokalizačním drátkem usnadní patologovi orientaci při následném histopatologickém zpracování.
- V určitých situacích je vhodné zvážit provedení simultánní SLNB (viz dále) [Pavlišta D., 2008].

8.1.1 Prs záchovný výkon (BCS)

Principem BCS je odstranění DCIS s dostatečně širokým lemem zdravé tkáně. Pokud je výkon správně indikován a jsou zachovány jisté podmínky, je možné dosáhnout kosmeticky uspokojivých výsledků při současném minimálním riziku lokální rekurence, které dosahuje stejné úrovně jako při provedené mastektomii a pohybuje se kolem 1% ročně [Lim Y.J. et al., 2014].

8.1.1.1 Problematika šíře lemu

Jednou ze základních podmínek je zajištění lemu zdravé tkáně (*free margins*) kolem ložiska DCIS. Jak široký lem lze považovat za dostatečný patří mezi často diskutovaná témata a tato otázka doposud nebyla s konečnou platností zodpovězena. Dříve požadovaných 10 mm dnes již není aktuální, často se v literatuře objevuje hodnota 5 mm, a nebo dokonce 2 mm. Otázkou resekčních okrajů u DCIS se zabývala Dunneova metaanalýza. Ve studii bylo identifikováno celkem 4.660 pacientek s diagnózou DCIS, které byly léčeny BCS a následnou adjuvantní RT. Podle očekávání měly pacientky s negativním lemem (*free margin*) menší riziko ipsilaterární rekurence než pacientky s pozitivním lemem (nádorové buňky v resekční linii) (*odds ratio* (OR) = 0,36; 95% CI: 0,27 - 0,47). Při zkoumání *cut-off* hodnot šíře lemu bylo zjištěno, že šíře 2mm zaručovala menší riziko recidivy než šíře < 2mm. (OR = 0,53; 95% CI: 0,26 - 0,96) Naproti tomu nebyl při porovnání šíře lemu 5mm a 2mm zjištěn žádný signifikantní rozdíl ve vztahu k četnosti lokální recidivy (OR = 1,51; 95% CI: 0,51 - 5,0; p > 0,05) [Dunne C. et al., 2009]. Výsledek lze tedy interpretovat tak, že šíře lemu 2-5mm zajišťuje dostatečnou onkologickou bezpečnost a reexcize není nutná. Naopak při šíři lemu < 2mm je třeba zvážit reexcizi. Z těchto údajů vychází i aktuální německá doporučení [Lux M.P. a Souchon R., 2013].

8.1.1.2 Terminologie BCS

Pojmenování jednotlivých prs záchovných výkonů je nejednoznačné a liší se na jednotlivých pracovištích. Za nejméně invazivní se označuje lumpektomie nebo *wide excision*. Při tomto zákroku je odstraněno pouze ložisko s odpovídajícím lemem zdravé tkáně. Segmentektomie znamená odstranění příslušného segmentu bez kožního krytu, kvadrantektomie pak odstranění části prsu – kvadrantu včetně kožního krytu a části fascia pectoralis [Pavlišta D., 2008].

8.1.1.3 Srovnání BCS a mastektomie

Při indikaci operačního výkonu by nemělo být hlavním cílem zachování prsu, spíše je třeba řídit se přáním pacientky s ohledem na zachování kvality života. V rámci poučení pacientky je povinností zdůraznit nutnost adjuvantní RT při BCS. Odmítání RT nebo její kontraindikace

je zároveň kontraindikací BCS. Faktory ovlivňující naše rozhodování o typu výkonu jsou shrnuty v tabulce 7.

faktory ze strany pacientky
• malý prs resp. nepoměr velikosti prsu a velikosti suspektního ložiska • preference pacientky (včetně odmítání RT) • osobní rizikové faktory, rodinná anamnéza • kontraindikace k RT • gravidita
faktory ze strany tumoru
• multicentricita • difuzní postižení celého prsu
terapeutické faktory
• pozitivní okraje resekátu i po event. reexcizi • reziduální kalcifikace v pooperačním mamogramu • lokální recidiva, stav po ipsilaterální adjuvantní RT

Tab. 7 Přehled kontraindikací k prs záchovnému výkonu v rámci operační léčby DCIS. RT - radioterapie

8.1.2 Onkoplastické výkony

V případě nepříznivé lokalizace tumoru nebo při nevhodném poměru velikosti prsu a nádoru může být obtížné provést BSC při současném zachování onkologické radikality a zároveň přitom docílit uspokojivého kosmetického efektu. Podle výsledků studií je hranicí zachování dobrého kosmetického výsledku resekce 10% celkového objemu prsu [Cochrane R.A. et al., 2003]. Řešit tento konflikt se daří využitím onkoplastických technik. Principem těchto výkonů je odstranění nádoru při zachování onkologických zásad a následná částečná rekonstrukce prsu při drobných defektech resp. okamžitá rekonstrukce velkých defektů využitím metod plastické chirurgie se zachování symetrie obou prsů [Abdallah A. et al., 2010]. Onkochirurg musí být seznámen s kompletním spektrem onkoplastických výkonů tak, aby byl schopen poučit pacientku o výhodách či nevýhodách té které metody a navrhnout takovou chirurgickou léčbu, která nejlépe zohlední jak onkologickou situaci, tak přání pacientky.

8.1.3 Axilární staging

Biopsie sentinelové uzliny (SLNB) představuje již řadu let alternativu k axilární dissekci při operačních výkonech prováděných z indikace invazivního karcinomu prsní žlázy. Mnohé experimenty prokázaly výpovědní hodnotu srovnatelnou s axilární dissekcí [Kim T. et al., 2010] při mnohem nižší morbiditě [DiSipio T. et al., 2013].

V managementu DCIS se axilární disekce již dávno stala metodou obsolentní a SLNB ji nahradila kompletně. Z charakteru DCIS vyplývá, že by neměl metastazovat. Průkaz nádorových buněk v lymfatických uzlinách bývá tedy vysvětlován tak, že u rozsáhlých DCIS není možné kompletní vyšetření vzorku, a v důsledku toho dojde k přehlédnutí invazivní komponenty [Pavlišta D., 2008].

Indikací k provedení SLNB je obecně diagnostická nejistota stran invazivity nádoru. Rozsáhlá léze, palpovatelný tumor, ložiskový stín na mamografii a *high-grade* DCIS patří mezi rizikové faktory následného zjištění invazivního karcinomu u původně biopticky potvrzeného DCIS [Meijnen P. et al., 2007]. V těchto indikacích by měla být zároveň s BCS vyšetřena i sentinelová uzlina.

Mastektomie je další indikací k provedení SLNB. Důvodem je nemožnost vyšetření sentinelové uzliny v druhé době v případě, že vyšetřením preparátu mastektomie zjistíme invazivní karcinom [Lux M.P. a Souchon R., 2013].

Jelikož průkaz mikrometastáz (< 2mm) ani metastáz v axilárních uzlinách v případě DCIS nijak nezvyšuje riziko lokální recidivy ani vzniku vzdálených metastáz, nabízí se ovšem otázka případných klinických důsledků takového zjištění [Murphy C.D. et al., 2008].

8.2 Radiační léčba

Indikace adjuvantní radioterapie (RT) je další z diskutovaných aspektů managementu DCIS. Adjuvantním ozářením prsu po BCS jsme schopni snížit riziko lokální recidivy minimálně o 50% [Delaney G. et al., 1997]. K těmto závěrům dospěly tři velké randomizované studie z 90. let, ve kterých byly porovnávány výsledky BCS s adjuvantní RT vs. bez adjuvantní RT [Fisher E.R. et al., 1995; Julien J.P. et al., 2000; Houghton J. et al., 2003]. Závěry těchto studií byly potvrzeny metaanalýzou, která demonstrovala celkovou frekvenci rekurence u pacientek bez RT 22,5%. Aplikací RT se podařilo četnost recidivy snížit na 8,9%. Největší přínos RT byl podle očekávání potvrzen u pacientek s *high-grade* DCIS s nekrózami a v případě nedostatečného lemu zdravé tkáně nebo dokonce při průkazu nádorových buněk v resekční linii (*positive margins*) [Delaney G. et al., 1997].

První studií zabývající se aplikací adjuvantní RT byla NSABP B-17. Pacientky (n=818) byly randomizovány do dvou skupin, první byla léčena pouze BCS, u druhé bylo aplikováno ozařování v celkové dávce 50 Gy. Aktualizací dat po osmiletém *follow-up* bylo prokázáno, že RT po BCS přináší 58% snížení incidence rekurence všech ipsilaterálních nádorů (*in situ* i

invazivních). Procento rekurence ve skupině bez RT bylo 31%, ve skupině s RT jen 13%. V celkovém přežití (OS) rozdíl nebyl [Fisher E.R. et al., 1995].
Další dvě prospektivní studie EORTC 10853 [Julien J.P. et al., 2000] a UK/ANZ [Houghton J. et al., 2003] rovněž prokázaly signifikantní snížení rizika rekurence, a to již po čtyřletém *follow-up*. Ze všech zdokumentovaných ipsilaterálních lokálních recidiv byla přibližně polovina *in situ* a polovina invazivní. Základní parametry všech tří zmíněných studií jsou shrnuty v tabulce 8.

Proti těmto přesvědčivým výsledkům se staví Silverstein [Silverstein M.J., 2000]. Dle jeho názoru existuje podskupina pacientek (definovaná USC/VNPI skóre 4-6 – viz dále), která z adjuvantní RT neprofituje buď vůbec, a nebo jen tak minimálně, že smysl aplikace RT v klasickém režimu je přinejmenším sporný. Silverstein argumentuje jednak metodickými nedostatky výše uvedených studií [Fisher E.R. et al., 1995; Julien J.P. et al., 2000; Houghton J. et al., 2003] (zejména nedostatečné informace o velikosti DCIS, pouze makroskopické hodnocení okrajů resektátu apod.) a jednak faktem, že bez ohledu na četnost recidiv neprokázala žádná z prací rozdíl v celkovém přežití. Silverstein je toho názoru, že pokud není rozdíl v úmrtnosti na invazivní karcinom prsu, vyplatí se pokusit se definovat podskupinu pacientek, kterým bychom mohli ušetřit čas, prostředky i vedlejší účinky léčby, kterou vlastně nepotřebují [Silverstein M.J., 2000].

Studie	**Počet pacientek (n)**	**Tamoxifen**	**Délka *follow-up* (roky)**	**Frekvence lokální recidivy (%)**	
				s RT	**bez RT**
NSABP B-17	818	ne	12	16	32
EORTC 10853	1010	ne	10	15	26
UK/ANZ	1701	ano v rámci 2x2 randomizace	12	6	14

Tab. 8 Shrnutí základních údajů třech stěžejních studií, které zkoumaly vliv adjuvantní RT na frekvenci ipsilaterální recidivy DCIS. RT - radioterapie

8.2.1 Klasická vs. alternativní formy radioterapie

Konvenční RT předpokládá ozáření celého prsu celkovou dávkou 50 Gy rozdělenou do 25 dílčích dávek (tzv. normofrakcionace). Takto lze zmírnit nežádoucí účinky za současného zachování potřebné efektivity. Celková délka takového léčby ovšem trvá 5 – 6 týdnů, což jsou ne všechny pacientky schopné nebo ochotné absolvovat (časová náročnost, vzdálenost od místa bydliště, celkový zdravotní stav). Alternativ k tomuto postupu je hned několik a jsou toho času předmětem studií: parciální radioterapie, akcelerovaná hypofrakcionovaná radioterapie celého prsu nebo metody brachyterapie – intraoperační radioterapie (IORT) nebo intersticiální brachyterapie [Yang T.J. a Ho A.Y., 2013].

8.3 Systémová léčba DCIS

Jediný preparát, který se prosadil v systémové léčbě DCIS, je selektivní modulátor estrogenových receptorů (SERM) tamoxifen. Ostatní substance, nasazované v léčbě invazivního karcinomu prsu, jako jsou inhibitory aromatázy, cytostatika, monoklonální protilátky nebo tzv. "*small molecules*", nejsou v managementu DCIS standardně indikované [Lux M.P. a Souchon R., 2013].

8.3.1 Tamoxifen

Tamoxifen není indikován u všech pacientek s DCIS. Faktorem, který predikuje účinnost této látky, je IHC průkaz estrogenových receptorů (ER) ve tkáni nádoru. Bližší popis těchto receptorů a vysvětlení jejich souvislosti s DCIS bude uvedeno v kapitole o prognostických faktorech.

Tamoxifen patří k látkám ze skupiny SERM. Takto označujeme molekuly, které se vážou na ER a zde působí buď agonisticky (stimulují) či antagonisticky (inhibují), a to v závislosti na lokalizaci receptoru. Na buňkách prsní žlázy působí tamoxifen jako kompetitivní antagonista, čímž dosáhneme požadovaného účinku látky. Naopak v děloze nebo v kostní tkáni převažuje účinek agonistický. S tím souvisí spektrum vedlejších účinků tamoxifenu [Riggs B.L. a Hartmann L.C., 2003].

Existují dvě velké randomizované studie zabývající se účinky tamoxifenu u DCIS. NSABP-B24 randomizovala pacientky léčené BCS a následnou RT do 2 skupin, v jedné užívaly ženy tamoxifen po dobu 5 let, ve druhé placebo. Poslední hodnocení je z roku 2012 s mediánem *follow-up* více než 14 let. Prokázáno bylo signifikantní snížení rizika rekurence prekanceróz, ale i invazivního karcinomu. Snížilo se i riziko vzniku kontralaterálního karcinomu. Podle očekávání nebyl pozorován účinek u DCIS s negativitou ER [Allred D.C. et al., 2012].

Druhou studií je již zmíněná UK/ANZ [Houghton J. et al., 2003]. V tomto experimentu se podařilo prokázat pouze snížení rekurence DCIS, pro invazivní recidivy nebyl zaznamenán žádný rozdíl.

Výsledky obou prací shrnuje aktuální metaanalýza [Staley H. et al., 2014]. Z jejích závěrů vyplývá snížení rizika *in situ* recidivy (DCIS) jak ipsilaterálně (HR 0,75; 95% CI: 0,61 - 0,92) tak kontralaterálně (RR 0,50; 95% CI: 0,28 - 0,87). I pro invazivní recidivu byl zaznamenán trend snížení jak ipsilaterálně (HR 0,79; 95% CI: 0,62 - 1,01) tak kontralaterálně (RR 0,57; 95% CI: 0,39 - 0,83). Počet pacientek, které je třeba léčit (*number needed to treat*), aby se zabránilo jakékoli recidivě činí 15. Nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v celkovém přežití (RR 1,11; 95% CI: 0,89 - 1,39).

8.4 Shrnutí výsledků operačních modalit v kombinaci s radioterapií

Jakkoli následující tabulka nezohledňuje rozdíly mezi některými podskupinami pacientek, představuje zajímavé shrnutí a srovnání jednotlivých léčebných modalit [Stuart K. et al., 2005].

Operační léčba	**Lokální recidivy - všechny (%)**	**Lokální recidivy - invazivní (%)**	**Pravděpodobnost zachování prsu (%)**	***Disease specific survival*** [1] **(%)**	**Možnost léčby v případě lokální rekurence**
BCS	22,5	11	80-90	90-95	• Mastektomie • Reexcize + RT
BCS+RT	8,9	4	90-95	96-98	• Mastektomie
Mastektomie	1,4	0,7	0	98-99,5	• Lokální excize • RT hrudní stěny

Tab. 9 Shrnutí výsledků terapie DCIS a rizika lokální recidivy v závislosti na léčebné modalitě (Stuart K. et al., 2005). BCS – *breast conserving surgery,* RT - radioterapie

[1] *Disease specific survival* (DSS) - procento sledovaných pacientů, kteří nezemřou na sledovanou chorobu.

9. PŘEHLED PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ DCIS

V následující kapitole se dostáváme k problému, který zároveň představuje i stěžejní téma této disertační práce. Budou popsány parametry, podle nichž můžeme odlišit agresivní DCIS od toho méně agresivního. Zásadní otázka totiž zní, jestli můžeme na základě určitých charakteristik diferencovat intenzitu terapie a pacientku s málo agresivním DCIS léčit jinak než pacientku s DCIS, který má špatnou prognózu.
S ohledem na terapeutické modality, zmíněné v předchozí kapitole, se dají vysledovat dvě oblasti, ve kterých by lepší znalost míry rizika onemocnění mohla vést ke změně léčebné strategie. První kontroverze se týká adjuvantní RT: existuje podskupina pacientek, u kterých bychom mohli vynechat RT bez zvýšení rizika rekurence? Druhým bodem je chirurgická léčba: musíme každou pacientku s biopticky zjištěným DCIS operovat? Nepředstavuje u *low-grade* pacientek observace (*watchful waiting*) smysluplnou alternativu?

9.1 Definice pojmů

Pro začátek definujme pojmy prognostický faktor a prediktivní faktor. Oba dva termíny se co do významu v mnohém překrývají a jejich použití v anglicky psané literatuře je občas nejednoznačné [Benson J.R. a Wishart G.C., 2013].

Význam **prognostických faktorů** (prognostických markerů) spočívá v určení prognózy, tedy závažnosti onemocnění. Prognostické faktory pomáhají s rozhodováním, s jakou intenzitou máme dané onemocnění léčit. Konkrétně se např. na základě prognostických faktorů rozhodujeme, která pacientka vůbec potřebuje adjuvantní terapii.

Naproti tomu **prediktivní faktory** (prediktory) definují odpověď na konkrétní léčebnou modalitu. To znamená, že indikují, která (adjuvantní) terapie je pro danou pacientku nejvhodnější.

Oba dva termíny se mohou překrývat. Určitý marker může být zároveň prognostickým i prediktivním. Typickým příkladem je zvýšená genová exprese proteinu HER2 u invazivního karcinomu prsu. Průkaz amplifikace genu nebo jeho overexprese představuje negativní prognostický faktor – pacientky s HER2 pozitivním karcinomem mají horší prognózu vyjádřenou např. nižším pětiletým přežíváním. (Stranou nyní ponechme fakt, že horší prognóza platí pouze při vynechání protilátky trastuzumabu z léčebného režimu.) Zároveň je HER2 negativita prediktorem rezistence na trastuzumab [Piccart-Gebhart M.J., 2006]. Zatímco prediktivním faktorem bývá většinou biomarker – určitá biologická vlastnost nádorové buňky, prognostickým faktorem může být vedle biomarkerů prakticky cokoli: věk

nebo celkový zdravotní stav pacienta, přitomnost nebo chybění uzlinových metastáz, *grade*, stádium onemocnění apod.

Cílem studia prognostických faktorů je tedy možnost odhadnout závažnost onemocnění, v případě DCIS závažností rozumíme individuální míru rizika pro vznik lokální recidivy. Při určování osobního rizikového profilu, a tedy selektování *low-risk* a *high-risk* pacientek, byly doposud, mimo jiné, zohledňovány konvenční parametry jako věk pacientky nebo např. velikost a *grade* prekancerózy [Silverstein M.J., 2003]. Výsledky experimentů, které zohledňovaly pouze tyto parametry a na jejichž základě se snažili odvodit doporučení pro adjuvantní léčbu, jsou bohužel nejednoznačné, často dokonce protichůdné a pro každodenní praxi nedostačující [Wong J.S. et al., 2006; Gilleard O. et al., 2008]. Budeme-li se tedy v budoucnu snažit o zpřesnění osobního rizikového profilu, neobejdeme se bez přesné znalosti molekulárních charakteristik léze. Které z mnoha studovaných parametrů by základní stavební kameny takovéhoto rizikového profilu měly tvořit, je ovšem doposud předmětem intenzivního výzkumu [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Na následujících stranách následuje podrobný přehled známých prognostických faktorů DCIS (tab. 14).

9.2 Věk v době diagnózy

Informace o celé řadě tradičních prognostických faktorů, mezi které patří i věk pacientky, pochází z výsledků desetiletého *follow-up* studie EORTC-10853 [Bijker N. et al., 2006]. Tato práce byla již zmíněna v kapitole o adjuvantní RT. Jedná se o prospektivní studii, která v letech 1986-1996 letech rekrutovala celkem 1010 pacientek léčených BCS. Primárním cílem studie bylo zhodnocení přínosu adjuvantní RT. Multivariátní analýzou byly zjištěny faktory spojené s rizikem ipsilaterální recidivy, patřil mezi ně i věk ≤ 40 let (HR = 1,89) (tab. 10).

Podobné údaje stran věku pacientky jako rizikového faktoru nabízí výsledky multicentrické retrospektivní analýzy Vidalové [Vidali C. et al., 2012]. Desetileté riziko lokální recidivy zde bylo pro celou kohortu vyčísleno na 9,6%. Pacientky s rekurencí byly rozděleny do tří věkových skupin a četnost recidivy byla vyčíslena pro každou skupinu zvlášť. Ipsilaterální recidiva se vyskytla v 10 ze 32 případů (31,3%) u žen ≤ 40 let, ve 46 případech z 517 (8,9%) ve skupině mezi 41 – 69 roky a u 3 žen z 38 (7,9%) ve skupině ≥ 70 let. Rozdíl byl statisticky signifikantní (p= <0,001). Další studie jen potvrzují již uvedené výsledky [Tunon-de-Lara C. et al., 2010].

proměnná	*hazard ratio* (HR)	95% CI	statistická signifikance (p)
věk (roky)			
> 40	1		
≤ 40	1,89	1,12 – 3,19	0,026
metoda detekce			
pouze mamografická diagnóza	1		
klinické symptomy	1,55	1,11 – 2,16	0,012
grade			
low-grade	1		
intermediate-grade	1,85	1,18 – 2,90	0,024
high-grade	1,61	0,93 – 2,78	
architektura DCIS			
***clinging* / mikropapilární**	1		
kribriformní	2,39	1,41 – 4,03	0,002
solidní / komedo	2,25	1,21 – 4,18	
resekční okraj			
***free-margin* (R0)**	1		
***positive-margin* (R1)**	1,84	1,32 – 2,56	0,0005
léčba			
BCS + RT	1		
BCS	1,82	1,33 – 2,49	0,0002

Tab. 10 Závěry studie EORTC-10853: multivariátní analýza rizikových faktorů souvisejících s lokální recidivou DCIS. HR – *hazard ratio*, CI – *confidence interval*, BCS – *breast conserving surgery*, RT – radioterapie [Bijker N. et al., 2006].

9.3 Metoda detekce DCIS

Podle výsledků EORTC-10853 je symptomatická (ve smyslu hmatná) léze rizikovým faktorem pro vznik lokální rekurence. V porovnání s DCIS diagnostikovaným mamograficky je HR = 1,55 (tab. 10). V této studii byl hmatný tumor častěji spojen s nálezem extenzivnějšího ložiska DCIS, stupeň diferenciace (*grade*) se ovšem nelišil [Bijker N. et al., 2006]. Palpovatelný tumor byl spojen s vyšším rizikem *in situ* nebo invazivní recidivy i ve studii Kerlikowské [Kerlikowske K. et al., 2010] (podrobněji viz dále). Metodu detekce jako rizikový faktor potvrdila i metaanalýza Wanga (HR = 1,35; 95% CI: 1,12 – 1,62) [Wang S.Y. et al., 2011].

9.4 *Grade*

Střední (*intermediate-grade*, G2) a nízký (*high-grade*, G3) stupeň diferenciace DCIS je asociován s vyšším rizikem lokální recidivy. K těmto závěrům došla studie EORTC-10853 [Bijker N. et al., 2006] (tab. 10). Pro G2 v porovnáním s dobře diferencovaným DCIS (G1) platí HR = 1,85, pro G3 vs. G1 pak HR = 1,61. Wang došel ve své metaanalýze k stejnému výsledku HR = 1,81 (95% CI: 1,53 – 2,13) [Wang S.Y. et al., 2011].

9.5 Architektonická stavba DCIS

Na základě architektonického obrazu rozlišujeme několik subtypů DCIS. Ty nejčastější se označují jako plochý, mikropapilární, kribriformní nebo solidní DCIS. I tento parametr bývá spojován s rizikem lokální rekurence. Ze závěrů EORTC-10853 vyplývá horší prognóza pro subtypy kribriformní a solidní, které v porovnání s mikropapilárním subtypem vykazují hodnotu *hazard ratio* HR = 2,39 resp. HR = 2,25 [Bijker N. et al., 2006] (tab. 10).

9.6 Komedonová nekróza

Nahromadění avitálních (nekrotických) maligních buněk v luminu duktů je označována jako komedonová nekróza (syn. komedonekróza). Její histologický průkaz je považován za nepříznivý faktor. Cornfield prokázal signifikantní vztah mezi přítomností a stupněm nekrózy a mezi rizikem lokální recidivy [Cornfield D.B. et al., 2004]. Do studie bylo zařazeno 151 pacientek léčených pouze BCS bez RT. Rozdíly byly zjištěny u četnosti recidivy: 38,2% pro nekrózu stupně 2 až 3 v porovnání se 17,3% pro nekrózu stupně 0 až 1 (p=0,006). Signifikantní rozdíl byl i u rychlosti vzniku recidivy (p=0,025). K podobným výsledkům došla již dříve i Ottesenová [Ottesen G.L. et al., 1992]. Přítomnost komedonové nekrózy jako rizikový faktor ipsilaterální recidivy byla zjištěna i v multivariátní analýze výsledků prospektivní randomizované studie NSABP B-17 [Fisher E.R. et al., 1995] a potvrdil ji konečně i Wang ve své metaanalýze. Míra rizika při přítomnosti nekrózy činila HR = 1,71(95% CI: 1,36 – 2,16) [Wang S.Y. et al., 2011].

9.7 Resekční okraje

Podmínkou provedení BCS je kompletní resekce ložiska DCIS. Při průkazu nádorových buněk v resekční linii (*positive margins*, R1) je zřejmé, že poroste pravděpodobnost lokální recidivy. Důkazů pro toto tvrzení je celá řada [Fisher E.R. et al., 1995; Vargas C. et al., 2005]. V již zmíněné studii EORTC-10853 vyšlo pro skupinu se šíří lemu <1mm a nejistým resekčním okrajem HR = 1,84 (v porovnání se šíří lemu ≥1mm resp. při průkazu reexcize bez nádorových buněk) [Bijker N. et al., 2006] (tab. 10). Wang vyčíslil míru rizika na HR = 2,25 (95% CI: 1,77 – 2,86) [Wang S.Y. et al., 2011]. Za dostatečnou se dnes považuje šíře lemu ≥ 2 mm [Lux M.P. a Souchon R., 2013].

9.8 Reziduální kalcifikace

Waddell zjišťoval pravděpodobnost záchytu reziduálních mikrokalcifikací po BCS. Pooperační mamografie byla provedena u 67 žen. Mikrokalcifikace byly takto diagnostikované u 16 pacientek (24%). 14 z nich bylo dále chirurgicky léčeno. Po následné reexcizi nebo mastektomii byly ve 64% (n=9) histologicky prokázány rezidua DCIS a to i přes původně patologem potvrzenou R0 excizi (*free margin* ve 33%) [Waddell B.E. et al., 2000].

9.9 Velikost

Velikost ložiska DCIS je další z rizikových faktorů, s nárůstem velikosti souvisí řada negativních jevů. Maffuz zkoumal souvislost mezi velikostí DCIS a přítomností invazivního růstu v konečné histologii resp. mezi velikostí a průkazem axilárních metastáz. Vzhledem k malému souboru (n=24) nebyly výsledky statisticky signifikantní, ukázaly přesto jistý trend. Incidence invazivity byla přímo úměrná velikosti ložiska (10% při velikosti 2,5 – 3,5 cm, 57% při 3,6 – 4,5 cm a 71% při velikosti nádoru 4,6 - 6 cm). Mimo to byl prokázán i vztah velikosti a přítomnosti axilárních metastáz (0% u DCIS 2,5 – 3,5cm, 14% při 3,6 – 4,5 cm a 28% u DCIS velikosti 4,6 – 6,0 cm) [Maffuz A. et al., 2006].

9.10 Fokalita

Jako multifokální nebo multicentrický nádor je označována situace s nálezem dvou nebo více ipsilaterálních lézí, které jsou od sebe odděleny zdravou tkání. Rozdíl je přitom definován hranicí mezi jednotlivými kvadranty prsu - jako multifokální onemocnění se většinou rozumí nádory lokalizované v jednom kvadrantu, pojem multicentrický naproti tomu označuje simultánní postižení více kvadrantů [Zhou M.R. et al., 2013].

Někteří autoři chápou rozdíl mezi oběma pojmy v počtu postižených hlavních mlékovodů prsní žlázy. Multifokalita znamená, že onemocnění je limitováno pouze na větvení jednoho hlavního mlékovodu. V tomto případě tedy lze předpokládat limitaci na jeden kvadrant a maximální vzdálenost mezi dvěma ložisky nepřesahuje 5 cm. Naproti tomu při postižení dvou

a více kvadrantů nebo při vzdálenosti mezi dvěma ložisky > 5cm lze předpokládat simultánní vznik nádoru ve dvou rozdílných mlékovodech a tehdy mluvíme o multicentricitě. Biologickým důsledkem této definice je, že u multifokálního nádoru lze ještě předpokládat jeho monoklonalitu, u multicentrického postižení ovšem nikoli [Noguchi S. et al., 1994].

Kromě toho lze v literatuře narazit na pojem *multifocal and multicentric breast cancer* (MMBC), tito autoři nerozlišují mezi multifokální a multicentrickou lézí [Bozzini A. et al., 2008].

Rakovitch provedl retrospektivní analýzu 615 případů DCIS. U více než jedné třetiny (n=270) lézí byla prokázaná multifokalita. Analyzovány byly rizikové faktory ipsilaterální recidivy. Výsledkem bylo zjištění, že multifokalita představuje nezávislý prognostický faktor lokální rekurence ve skupině pacientek léčených pouze prs záchovným výkonem (tj. bez adjuvantní radioterapie). V této kohortě bylo zjištěno 10-ti leté přežití bez recidivy (*recurrence-free survival rate*) 59% při multicentrickém onemocnění a 80% při unifokálním DCIS (p=0,02). Pro srovnání ve skupině pacientek léčených BSC plus adjuvantní RT byl rozdíl v 10-ti letém přežití bez recidivy minimální (80% vs. 87%, p=0,35). V multivariátní analýze byly pro multifokalitu zjištěny hodnoty HR = 1,80 (95% CI: 1,15 – 2,80) a hodnota p=0,01 [Rakovitch E. et al., 2007]. Wang došel ve své metaanalýze k výsledkům HR = 1,95 (95% CI: 1,59 – 2,40) [Wang S.Y. et al., 2011].

9.11 Adjuvantní radioterapie

Přínos adjuvantní RT po BCS byl podrobněji zmíněn v kapitole o léčbě DCIS. Zopakujeme, že bylo prokázáno snížení rizika lokální recidivy po BCS aplikací adjuvantní RT. Tento efekt je tím zřetelnější, čím vyšší riziko pacientka vykazuje [Delaney G. et al., 1997]. Podle Bijkera (studie EORTC-10853) bylo vynechání adjuvantní RT z léčebného protokolu u neselektované populace asociováno se zvýšením rizika recidivy HR = 1,82 (p=0,0002) [Bijker N. et al., 2006].

9.12 Van Nuys prognostický index (VNPI)

V roce 1996 představil Silverstein koncept skórovacího systému pro DCIS, takzvaný Van Nuys prognostický index - VNPI (Van Nuys /væn´naiz/ je název městské části Los Angeles – pozn. aut.). Cílem bylo objektivně stanovit míru agresivity DCIS a na základě výsledného skóre zvolit typ operační léčby (BCS vs. mastektomie) a dále doporučit či nedoporučit adjuvantní radioterapii [Silverstein M.J. et al., 1996]. Na základě výsledků předchozích prací [Silverstein M.J. et al., 1994] byly vybrány tři známé rizikové faktory lokální recidivy (velikost nádoru, šíře resekčního okraje a histologický *grade* resp. přítomnost nekróz) a podle míry závažnosti byly ohodnoceny od 1 (nejpříznivější) do 3 (nejrizikovější) bodů. Výsledkem je skóre, které nabývá hodnot od 3 (nejpříznivější) do 9 (nejrizikovější) (tab. 11). Do studie bylo

vybráno a tímto způsobem ohodnoceno 333 pacientek s diagnózou čistého DCIS. Všechny ženy byly léčeny BCS. U 138 pacientek následovala adjuvantní radioterapie, 195 žen bylo léčeno pouze chirurgicky. Po 8 letech *follow-up* nebyl u pacientek s VNPI skóre 3 – 4 zjištěn signifikantní rozdíl v přežití bez recidivy (*recurrence-free survival*) v závislosti na tom, zda byla či nebyla aplikována adjuvantní radioterapie (100% vs. 97%). U žen s VNPI skóre 5 – 7 naproti tomu byl vysledován statisticky signifikantní rozdíl v přežití bez recidivy v souvislosti s aplikovanou RT (85% vs. 68%; p = 0,017). Konečně pacientky se skóre 8 – 9 vykazovaly velmi vysokou četnost rekurence 60% a to i po proběhlé adjuvantní radioterapii. Závěr této studie byl takový, že pacientky s VNPI skóre 3 – 4 mohou být léčeny BCS bez adjuvantní RT. U žen s VNPI skóre 5 – 7 lze aplikací RT dosáhnout snížení rizika rekurence o 17%. Pacientky s VNPI skóre 8 – 9 mají vysoké riziko recidivy bez ohledu na RT a je tedy třeba u nich zvážit mastektomii [Silverstein M.J. et al., 1996].

9.12.1 USC/VNPI

S cílem dále zpřesnit predikci VNPI skóre přidal Silverstein k stávajícímu vzorci časem další parametr – věk pacientky. Analogicky byl věk v době diagnózy ohodnocen 1 (nejpříznivější) – 3 (nejrizikovější) body (tab 11). Tato modifikace se označuje *University of South California /* Van Nuys prognostický index (USC/VNPI). V práci publikované v roce 2003 bylo prospektivně vyšetřeno 706 pacientek s DCIS [Silverstein M.J., 2003]. Všechny byly chirurgicky léčeny BCS. U 280 žen byla aplikována adjuvantní RT, u 426 nikoli. Podle celkového dosaženého skóre byly pacientky stratifikovány do skupiny s nízkým (4 – 6 bodů), středním (7 – 9 bodů) a vysokým rizikem (10 – 12 bodů). Po 12ti letém *follow-up* byla v jednotlivých podskupinách zjišťována četnost lokální rekurence a její závislost na adjuvantní RT. Ve skupině s nízkým rizikem (USC/VNPI = 4 – 6) nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v přežití bez recidivy (*recurrence-free survival*). Pacientky s intermediálním rizikem (USC/VNPI = 7 – 9) signifikantně profitovaly z adjuvantní RT, četnost lokální recidivy se tím snížila o 12 – 15% (p=0,03). Ve skupině s nejvyšším skóre (USC/VNPI = 10 – 12) byla adjuvantní RT taktéž spojena se signifikantním snížením pravděpodobnosti lokální rekurence (p= 0,001), i přes tuto léčbu byla ovšem četnost recidiv velmi vysoká. Autor uzavírá práci doporučením léčit pacientky s nízkým rizikem pouze chirurgicky záchovně, u pacientek ze skupiny se středním rizikem provádět BCS + RT a u vysoce rizikových žen indikovat mastektomii [Silverstein M.J., 2003].

Obě dvě verze VNPI byly po svém publikování podrobeny kritickému zkoumání, řada autorů chtěla jejich výsledky ověřit na svém vlastním souboru pacientek. Tyto experimenty jsou ovšem bez vyjímky retrospektivní s relativně malým počtem žen (215 – 367) a jejich výsledky jsou nekonzistentní [de Mascarel I. et al., 2000; MacAusland S.G. et al., 2007; Di Saverio S. et al., 2008; Gilleard O. et al., 2008].

De Mascerel, která měla k dispozici nejpočetnější soubor (n = 367), potvrdila sice VNPI jako silný prognostický faktor rekurence při srovnání skupiny s nízkým a intermediálním rizikem, na druhou stranu ale zjistila neakceptovatelně vysokou četnost recidiv i u nízce rizikové skupiny (VNPI skóre 3 – 4) [de Mascarel I. et al., 2000].

MacAusland (n = 222) nepovažuje ani VNPI, ani parametr šíře lemu za vhodný prognostický faktor, který by pomohl stratifikovat pacientky po BCS s ohledem k míře rizika lokální recidivy [MacAusland S.G. et al., 2007].

DiSaverio (n = 259) pozoroval ve všech třech skupinách VNPI snížení rizika lokální rekurence po aplikaci RT. Čím vyšší bylo USC/VNPI skóre, tím větší benefit měly pacientky z adjuvantní RT. V žádné ze třech skupin ovšem nedosáhl rozdíl v četnosti lokální recidivy statistické signifikance. Multivariátní analýza potvrdila USC/VNPI skóre jako prognostický faktor lokální recidivy, ještě přesvědčivější výsledek byl ovšem dosažen pro samostatný parametr šíře resekčního lemu [Di Saverio S. et al., 2008].

Gilleard (n = 215) sledoval četnost recidiv na souboru pacientek léčených pouze BCS. Adjuvantní RT ani endokrinní léčba nebyly aplikovány. Multivariátní analýza potvrdila VNPI a přítomnost komedonové nekrózy jako signifikantní prognostický faktor [Gilleard O. et al., 2008].

proměnná	**1 bod**	**2 body**	**3 body**
velikost DCIS[1]	≤ 15 mm	16 – 40 mm	≥ 41 mm
šíře resekčního okraje[1]	≥ 10 mm	1 – 9 mm	< 1 mm
histologický *grade* DCIS[1]	*non-high-grade* bez nekróz	*non-high grade* s nekrózami	*high-grade*
věk pacientky (roky)[2]	> 60	40 – 60	< 40

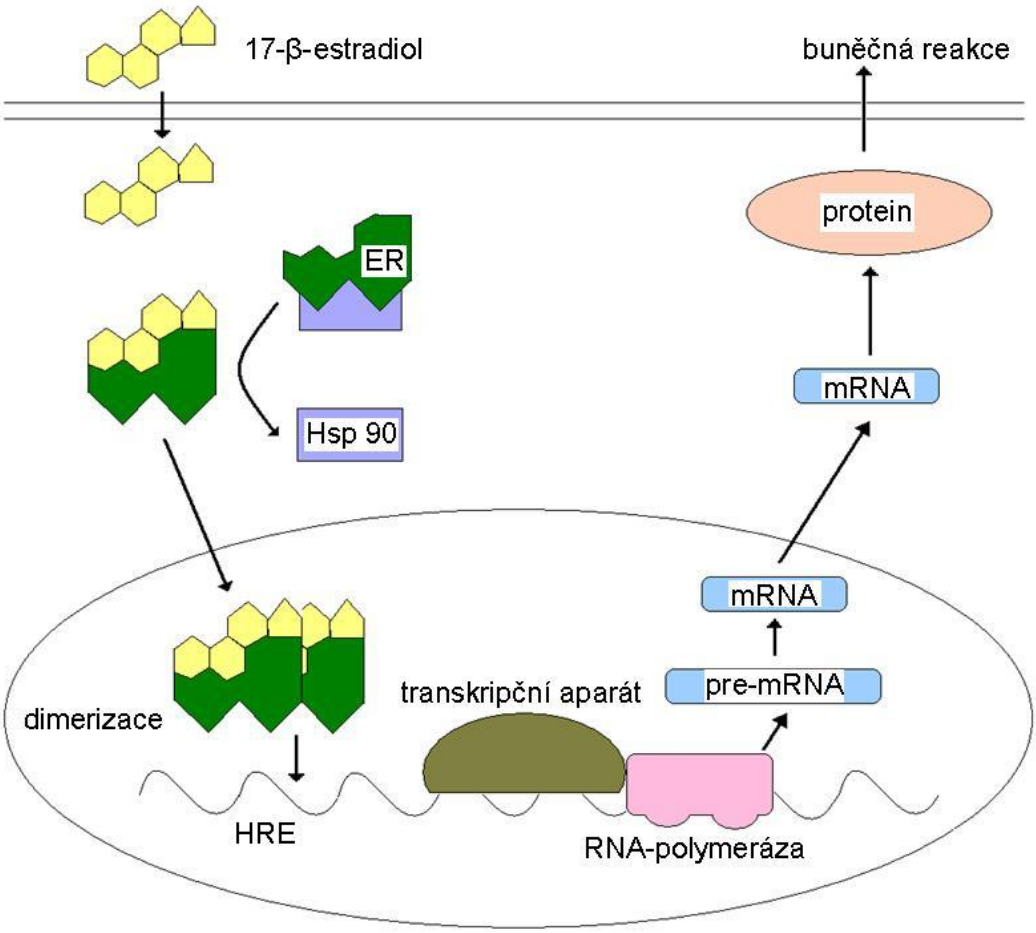
celkový součet (body)		**management DCIS**
VNPI: 3-4	USC/VNPI: 4-6	BCS
VNPI: 5-7	USC/VNPI: 7-9	BCS + RT
VNPI: 8-9	USC/VNPI: 10-12	mastektomie

Tab. 11 Přehled bodového ohodnocení jednotlivých parametrů DCIS v závislosti na jejich hodnotě (nahoře) a doporučený postup léčby DCIS podle výsledku VNPI resp. USC/VNPI (dole). BCS – *breast conserving surgery*, RT – radioterapie [Silverstein M.J. et al., 1996; Silverstein M.J., 2003].

[1] Tyto tři proměnné jsou součástí VNPI.
[2] Čtvrtá proměnná doplňuje USC/VNPI.

9.13 Estrogenový receptor

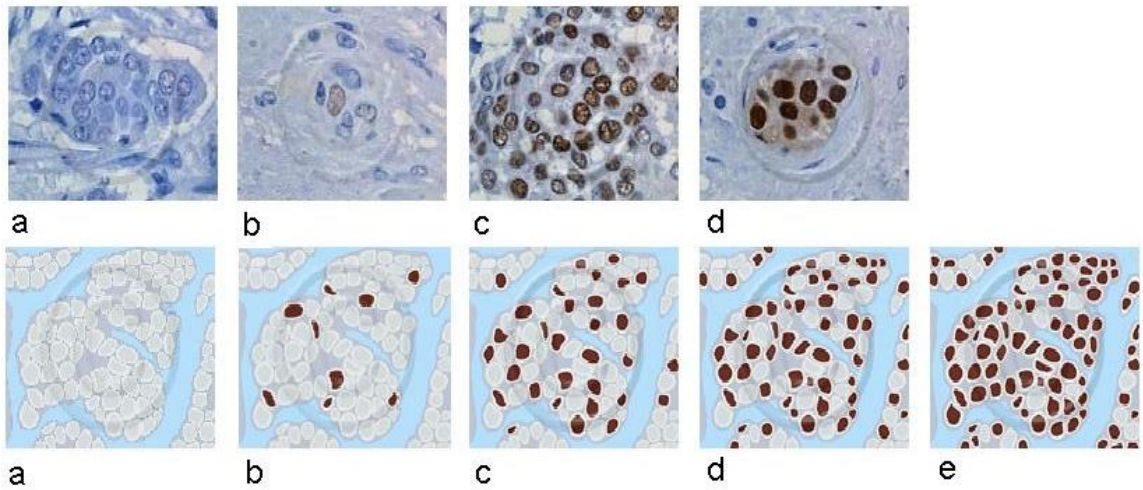
Estrogeny hrají klíčovou roli v růstu a diferenciaci prsní žlázy. Místem jejich působení je estrogenový receptor (ER). ER patří, podobně jako ostatní steroidní receptory, do rodiny nukleárních receptorů. Strukturou se jedná o polypeptid složený z několika domén, které mají své specifické funkce. Neaktivovaný ER je lokalizovaný v cytoplazmě navázán na tzv. *heat shock protein (HSP)*. Po vazbě 17β-estradiolu na ER dojde ke zrušení vazby s HSP, dále k dimerizaci receptoru a jeho translokaci do jádra. Zde působí ER jako tzv. transkripční faktor: dimerizovaný receptor se svou DNA-vazebnou doménou naváže na příslušnou *enhancer* sekvenci DNA a pozitivně tím ovlivní aktivitu transkripčního aparátu – rychlost přepisu (transkripce) genetické informace z DNA do mRNA se zvýší. Tímto mechanismem se podílí ER na regulaci exprese cílového genu [Löffler G. et al., 2007] (obr. 11).



Obr. 11 Schéma mechanismu transdukce signálu steroidních hormonů. Po přestupu steroidního hormonu (ligandu) buněčnou membránou a jeho vazbě na receptor dojde k uvolnění vazby na *heat shock protein* (HSP) a translokaci komplexu ligand-receptor do jádra. Po dimerizaci se komplex naváže na příslušný úsek DNA, tzv. *hormone response element* (HRE), a aktivuje transkripční aparát (podle Löffler G. et al., 2007).

Ve zdravé premenopauzální prsní žláze představují buňky exprimující ER (ER pozitivní nebo ER+) pouze malou část, asi 7% všech epitelií. Jejich zastoupení stoupá v postmenopauze [Pavlišta D., 2008]. ER se vyskytuje v prsní žláze ve dvou izoformách: ER-alfa a ER-beta. Oba dva typy ovlivňují do jisté míry protichůdné fyziologické pochody. Zatímci ER-alfa působí spíše proliferačně, ER-beta jsou připisovány proapoptotické a prodiferenciační účinky [Morani A. et al., 2008].

Estrogenový receptor byl jeden z prvních biomarkerů studovaných v souvislosti s karcinomem prsu a i dnes patří k důležitým a rutinně vyšetřovaným parametrům invazivních i neinvazivních lézí prsní žlázy [Lux M.P. a Souchon R., 2013]. Na vzorku tkáně se ER prokazuje imunohistochemickou (IHC) analýzou. Popisuje se jak procentuální podíl zbarvených buněčných jader tak intenzita jejich zbarvení (obr. 12). K interpretaci je možné použít jeden ze dvou skórovacích systémů: imunoreaktivní skóre (IRS) dle Remmeleho a Stegnera [Remmele W. a Stegner H.E., 1987] (tab. 12) nebo celkové skóre (TS) dle Allreda [Allred D.C. et al., 1998] (tab 13).



Obr. 12 Imunohistochemické barvení estrogenových receptorů (ER) v buněčných jádrech. V horní řádce zobrazeny příklady intenzity zbarvení (SI – *staining intensity*): 0 = negativní (a), 1 = slabá (b), 2 = mírná (c), 3 = silná (d). V dolní řádce příklad procentuálního podílu (PP) pozitivních jader: 0 = negativní (a), 1 = <10% pozitivních buněk (b), 2 = 10-50% pozitivních buněk (c), 3 = 51-80% pozitivních buněk (d), 4 = >80% pozitivních buněk (e) (podle Remmele W. a Stegner H.E., 1987).

Pozitivita ER je nejenom prognostický faktor, ale i důležitý prediktor úspěchu endokrinní léčby. To platí jak pro invazivní karcinom prsu tak i pro DCIS [Ma C.X. et al., 2009].

PP \ SI	negativní reakce SI = 0	slabá reakce SI = 1	mírná reakce SI = 2	silná reakce SI = 3
žádná pozitivní jádra PP = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
<10% pozitivních jader PP = 1	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-50% pozitivních jader PP = 2	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80% pozitivních jader PP = 3	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
>80% pozitivních jader PP = 4	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Tab. 12 Imunoreaktivní skóre (IRS) podle Remmeleho a Stegnera: Skóre představuje součin intenzity zbarvení (SI – *staining intensity*) a podílu (PP) zbarvených jader (IRS = SI x PP). Skóre může nabývat hodnoty 0 – 12 bodů. Za pozitivní se považuje IRS ≥ 3 body [Remmele W. a Stegner H.E., 1987].

PS \ IS	negativní reakce SI = 0	slabá reakce SI = 1	mírná reakce SI = 2	silná reakce SI = 3
žádná pozitivní jádra PS = 0	TS = 0	TS = 1	TS = 2	TS = 3
0-1% pozitivních jader PS = 1	TS = 1	TS = 2	TS = 3	TS = 4
1-10% pozitivních jader PS = 2	TS = 2	TS = 3	TS = 4	TS = 5
10-33% pozitivních jader PS = 3	TS = 3	TS = 4	TS = 5	TS = 6
33-66% pozitivních jader PS = 4	TS = 4	TS = 5	TS = 6	TS = 7
66-100% pozitivních jader PS = 5	TS = 5	TS = 6	TS = 7	TS = 8

Tab. 13 Celkové skóre (TS – *total score*) podle Allreda: Skóre představuje součet intenzity zbarvení (IS – *intensity score*) a zastoupení (PS – *proportion score*) zbarvených jader (TS = IS + PS). Skóre může nabývat hodnoty 0 – 8 bodů. Za pozitivní se považuje TS ≥ 3 body [Allred D.C. et al., 1998].

9.13.1 Estrogenový receptor jako prognostický faktor

Informace o významu ER jako prognostického faktoru DCIS nabízí přehledový článek Lariové [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011]. Tato práce zmiňuje celkem 36 studií, které měřily míru exprese ER neboli procento ER+ vzorků DCIS. Průměrná hodnota exprese ER (tj. ER+ vzorků) činila 68,7% (49-96,6%). Jednotlivé studie ovšem vykazovaly odlišná kritéria ER pozitivity [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Byla zjištěna celá řada souvislostí mezi ER a dalšími biologickými vlastnostmi DCIS. Například existuje vztah mezi mírou exprese ER a diferenciací – čím vyšší exprese ER, tím lepší stupeň diferenciace DCIS. Zjištěna byla i nepřímo úměrná souvislost mezi mírou exprese ER a HER2 resp. p53 a přímo úměrná souvislost mezi expresí ER a Bcl-2 [Albonico G. et al., 1998].

Lariové se podařilo identifikovat celkem 16 prací, které hodnotily vztahy mezi expresí ER a rizikem lokální recidivy [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011]. Čtyři z těchto studií odhalily souvislost mezi negativitou ER a rizikem recidivy [Ringberg A. et al., 2001; Provenzano E. et al., 2003; Roka S. et al., 2004; Kerlikowske K. et al., 2010].

První prací je vnořená studie případů a kontrol Provenzanové, ve které bylo porovnáno 53 žen s recidivou po BCS a 42 k nim přiřazených kontrol bez recidivy. 10 pacientek bylo léčeno adjuvantní RT, 85 bylo pouze operováno (BCS). U případů s lokální rekurencí byla větší pravděpodobnost negativity ER než u kontrol bez rekurence (62% vs. 35%; OR: 0,2; p=0,01) [Provenzano E. et al., 2003].

Co do počtu probandek je nejpočetnější další vnořená studie případů a kontrol Kerlikowské. Z celkem 329 pacientek s DCIS vybrali autoři 72 žen, které onemocněly invazivní recidivou, 71 s následnou *in situ* recidivou a 186 bez recidivy. Zjištěné výsledky překvapivě vykazovaly rozdíly mezi skupinou s invazivní a s *in situ* recidivou. Zatímco u žen s následnou DCIS rekurencí byla častěji zjištěna negativita ER v porovnání s pacientkami bez recidivy (31% vs. 20%), v případě invazivní recidivy žádná podobná souvislost vysledována nebyla. ER negativita tedy představovala rizikový prognostický faktor *in situ* rekurence a to jak individuálně tak i v kombinaci s dalšími biomarkery HER2 a Ki67 (viz dále) [Kerlikowske K. et al., 2010].

Ve třetí zmíněné studii vyšetřil Roka 132 pacientek s DCIS léčených buď pouze BCS (n = 33) nebo BCS + RT (n=99). Pacientky s ER negativním tumorem častěji onemocněly lokální recidivou ve srovnání s pacientkami s ER pozitivní lézí (12,2% vs. 3,7%) [Roka S. et al., 2004]. Hlavní přínos této práce spočívá v tom, že jasně vyčíslila rozdíl četnosti lokální rekurence mezi ER negativním a ER pozitivním DCIS (8,5%) [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Ringbergová studovala kohortu 187 žen s DCIS léčených buď pouze BCS (n = 66) nebo BCS + RT (n=121). Za účelem ohodnocení buněk DCIS byl navržen tzv. *Cell Biological Index* (CBI-7), který zahrnoval celkem 7 biomarkerů. Pro fenotyp vykazující ER negativitu

v kombinaci s negativitou progesteronových receptorů (PgR), overexpresí HER2, nízkou Bcl-2 expresí, vysokým průkazem p53, nondiploidií a vysokou expresí Ki67 bylo zjištěno významně zvýšené riziko lokální rekurence (RR: 1,3; 95% CI: 1,0 – 1,6; p=0,051) [Ringberg A. et al., 2001].

V práci Zhouové bylo ve skupině 392 pacientek s DCIS identifikováno 32 pacientek s *triple* negativním fenotypem (ER negativita, PgR negativita, HER2 negativita). Po srovnání četnosti recidiv mezi skupinou s *triple* negativním a jiným než *triple* negativním fenotypem bylo sice zjištěno dvojnásobně zvýšené riziko recidivy u pacientek s *triple* negativním DCIS, rozdíl ovšem nedosáhl statistické signifikance [Zhou W. et al., 2010].

Poměr zastoupení obou izoforem ER-alfa a ER-beta ve tkáni DCIS a vztah tohoto poměru k riziku lokální recidivy doposud studován nebyl.

9.14 Progesteronový receptor

Podobně jako ER představuje progesteronový receptor (PgR) důležitý biomarker invazivních i neinvazivních onemocnění prsní žlázy. Struktura i mechanismus transdukce signálu jsou u obou těchto steroidních receptorů velmi podobné [Löffler G. et al., 2007].

Také progesteronový receptor se vyskytuje v prsní žláze ve dvou iozoformách: PgRA a PgRB. Změnám poměru jejich zastoupení ve tkáni se připisuje vliv na průběh onkogeneze [Pavlišta D., 2008]. Souvislosti mezi oběma izoformami a rizikem lokální recidivy DCIS doposud zkoumány nebyly.

Existují studie odkrývající vztahy mezi přítomností PgR a histologickými vlastnostmi DCIS (*grade*, histotyp). V přehledové práci Lariové bylo identifikováno 28 prací zkoumajících míru exprese PgR ve tkáni DCIS. Zjištěný průměr exprese činil 59,6% (40 – 83,3%) [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011]. Dále byla podrobně zkoumána koexprese PgR a některých dalších biomarkerů. Existují také práce zabývající se souvislostí mezi expresí PgR a rizikem lokální recidivy [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011]. Ve dvou případech byla opravdu taková souvislost prokázána [Ringberg A. et al., 2001; Provenzano E. et al., 2003].

Zaprvé se jedná o již zmíněnou vnořenou studii případů a kontrol Provenzanové, která zjistila spojitost mezi negativitou PgR a zvýšeným rizikem lokální recidivy. Při srovnání tkání DCIS od pacientek, jejichž onemocnění recidivovalo a těch, které zůstaly zdravé, bylo zjištěno, že recidivující DCIS byl častěji PgR negativní (63% vs. 34%) [Provenzano E. et al., 2003].

Ringbergová navrhla skóre CBI-7, které zahrnovalo celkem 7 markerů, mimo jiné i negativitu PgR. Pro tento fenotyp bylo zjištěno významně zvýšené riziko lokální rekurence (RR: 1,3; 95% CI: 1,0 – 1,6) [Ringberg A. et al., 2001].

9.15 Proliferační index Ki67

Antigen Ki67 je protein, který se vyskytuje pouze u dělících se buněk, tj. ve fázích G1, S, G2 a M (fáze buněčného cyklu). U buněk, které se nalézají v klidové fázi G0, tato bílkovina chybí. To dělá z proteinu Ki67 vhodný nástroj k měření intenzity buněčného dělení, mluvíme o tzv. proliferačním indexu [Scholzen T. a Gerdes J., 2000].

Jednoznačné doporučení pro *cut-off* hodnotu, která odliší Ki67 negativní a pozitivní DCIS, neexistuje. V odborné literatuře se nejčastěji objevuje údaj 10% (tj. IHC zbarvení minimálně 10% buněk DCIS). Podíl vzorků DCIS, které vykazují zbarvení ≥10% a lze je tedy považovat za Ki67 pozitivní, v jednotlivých studiích kolísá (3,4 – 65,4%) a tento podíl je závislý na typu DCIS. Byla prokázána přímá úměra mezi vysokou proliferační aktivitou a přítomností komedonových nekróz resp. *high-grade* DCIS [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Lariová ve svém přehledovém článku identifikovala 9 prací, které zkoumaly vztahy mezi expresí Ki67 a rizikem lokální recidivy. Ve třech případech žádná souvislost nalezena nebyla, šest studií naproti tomu prokázalo Ki67, a to buď jako nezávislý rizikový faktor recidivy, a nebo v kombinaci s dalšími biomarkery [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Například v již výše zmíněné studii Kerlikowské představovala vysoká proliferační aktivita (s *cut-off* hodnotou Ki67 10%) nezávislý rizikový faktor *in situ* recidivy. Jako rizikový faktor invazivní recidivy se ovšem Ki67 jako samostatný marker neprokázal. Dále se potvrdily jako rizikové následující fenotypy: vysoká proliferační aktivita kombinovaná s vysokou koexpresí proteinu p16 a cyklooxygenázy-2 (Ki67+p16+COX-2+) byla spojena s rizikem invazivní recidivy (19,6%, 95% CI: 18,0% - 21,3%). Oproti „*triple* negativnímu“ fenotypu (Ki67-p16-COX-2-) byl rozdíl statisticky signifikantní (p=0,018). Riziko bylo potvrzeno i v multivariátním modelu (HR= 2,2; 95% CI: 1,1 – 4,5). S rizikem následné lokální *in situ* recidivy byly nejvíce asociovány dva fenotypy: Ki67+p16+COX-2- (HR = 3,7; 95% CI: 1,7 – 7,9) a Ki67+ ER-HER2+ (HR = 5,8; 95% CI: 2,4 - 14) [Kerlikowske K. et al., 2010].

9.16 Cykliny

Jako cykliny se označuje skupina proteinů, jež hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu. V důsledku zvýšené exprese nebo naopak degradace cyklinů dochází v průběhu buněčného cyklu (odtud jejich označení) ke změnám jejich koncentrace. S měnící se koncentrací cyklinů příslušným způsobem roste nebo klesá aktivita tzv. cyklin-dependentních kináz (CDK). Tyto enzymy fosforylují řadu dalších substrátů a tím prakticky ovlivňují pochody související s buněčným cyklem [Chasle J. et al., 2003]. (Za objev cyklinů a CDK obdrželi Hartwell, Hunt a Nurse v roce 2001 Nobelovu cenu – pozn. aut.)

Nadměrná exprese cyklinu D1 byla pozorována u celé řady malignit, mimo jiné i u prsní žlázy. Studie zkoumající míru exprese u DCIS zjistily hodnoty 37 – 70,6% (průměr 55,9%) při *cut-off* hodnotě pozitivity 5 – 10% [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Jirströmová zkoumala na vzorku 92 pacientek expresi čtyř různých regulátorů buněčného cyklu (cyklin D1, cyklin E, p16, p21). 64 žen nebylo léčeno adjuvantní RT a 16 z nich onemocnělo lokální recidivou. V této podskupině byla sledována souvislost exprese jednotlivých biomarkerů s rizikem recidivy. Pro cyklin D1 byl zjištěn nepřímo úměrný vztah: pacientky s nízkou expresí cyklinu D1 měly signifikantně vyšší pravděpodobnost ipsilaterální recidivy než pacientky s vysokou expresí cyklinu D1 (32,3% vs. 18,2%, p=0,002). Jedná se o jedinou práci potvrzující vliv cyklinu D1 na riziko lokální rekurence [Jirström K. et al., 2003].

Další ze skupiny cyklinů (A, E) jsou již v souvislosti s prognózou DCIS méně významné.

9.17 p16

Protein p16 je další důležitý regulátor buněčného cyklu. Svoji vazbou na CDK4 a CDK6 totiž p16 způsobuje jejich inhibici – CDK nemohou dále fosforylovat své substráty a buněčný cyklus se zastaví na přechodu z fáze G1 do fáze S. Tato role dělá z proteinu p16 důležitý tumorsupresor. Nedostatek správně fungujícího proteinu p16 – ať už v důsledku mutace či potlačené exprese – bývá dáván do souvislosti se vznikem řady malignit [Sridhar J. et al., 2006].

Souvislosti mezi expresí p16 ve tkáni DCIS a rizikem lokální rekurence již byly zmíněny výše. [Kerlikowske K. et al., 2010].

9.18 p21

Další regulátor buněčného cyklu je protein p21 (syn. WAF1 / CIP1). Podobně jako p16 může vazbou na CDK řadu z nich inhibovat a tím zastavit progresi z G1 do S-fáze buněčného cyklu.

Role proteinu p21 jako prognostického faktoru lokální recidivy DCIS je kontroverzní. Na jednu stranu identifikovala Provenzanová ve své studii p21 jako nezávislý rizikový faktor recidivy – pacientky, které onemocněly recidivou byly častěji p21-pozitivní než pacientky zdravé (54% vs. 15%, p=0,01) [Provenzano E. et al., 2003].

Na druhou stranu existuje práce Ohové, která zkoumala závislost mezi expresí p21 (pozitivitou vzorku) a dalšími histomorfologickými a imunohistochemickými charakteristikami DCIS. Pozitivita p21 byla překvapivě spojena se samými příznivými znaky: *low-grade*, nepřítomností komedonových nekróz, pozitivitou ER a negativitou p53 [Oh Y.L. et al., 2001].

9.19 p27

Strukturou i funkcí je proteinu p21 velmi podobný další inhibitor CDK, tumorsupresor p27 [Wander S.A. et al., 2011]. Několik prací se zabývalo vztahy mezi expresí p27 a dalšími parametry DCIS (morfologie tumoru, exprese steroidních receptorů, exprese regulátorů buněčného cyklu), dvě studie zjišťovali korelaci mezi expresí p27 a rizikem lokální rekurence. Ani jedna z nich nepotvrdila p27 jako prognostický faktor DCIS [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

9.20 Retinoblastom

Protein retinoblastom (Rb) je tumorsupresor typu *gatekeeper*. Jeho hlavní funkcí tedy není oprava poškozené genetické informace, ale blokování progrese z fáze G1 buněčného cyklu do fáze S. Buňka tak získá čas a jiné tumorsupresory typu *caretaker* mohou vzniklé poškození opravit dřív, než začne replikace DNA. Rb kontroluje buněčný cykus tím způsobem, že v hypofosforylovaném stavu na sebe váže transkripční faktor E2F. K fosforylaci Rb dojde účinkem CDK. Fosforylovaný Rb (pRb) je funkčně neaktivní a nemůže dále vázat E2F. Takto uvolněný transkripční faktor spustí expresi potřebných genů a buňka se může posunout do další fáze cyklu.

Nepatřičná inaktivace Rb umožní dělení i poškozené buňce a vede ve svém důsledku ke vzniku buňky nádorové. Příkladem může být interakce s virovým proteinem E7, který se může navázat na Rb a uvolnit tak z vazby E2F [Löffler G. et al., 2007].

Okumura srovnával imunohistochemicky míru exprese Rb na tkáni čistého DCIS a DCIS s mikroinvazí. Oba typy neoplazií se v expresi Rb významně nelišily a její frekvence činila 68,6% při *cut-off* hodnotě pozitivity 10%. Rb jako prognostický faktor lokální recidivy DCIS nebyl dosud identifikován [Okumura Y. et al., 2008].

9.21 HER2

Gen HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) je lokalizovaný na dlouhém raménku 17. chromozomu. Jeho produkt, protein, který patří do rodiny receptorů s tyrosinkinázovou aktivitou, má řadu synonym: Her-2/neu, ErbB2, c-erbB2 nebo EGFR2. Aktivace tohoto receptoru vede ke stimulaci buněčné proliferace cestou Ras-Raf-MAPK a dále umožňuje ovlivňovat buněčný cyklus cestou mTOR-transdukční kaskády. Důsledkem stimulace receptoru je tedy nekontrolované buněčné dělení a vznik maligního nádoru.

HER2 patří vedle steroidních receptorů k nejčastěji zkoumaným biomarkerům v terénu maligních a premaligních lézí prsní žlázy. Amplifikace genu a nebo jeho zvýšená exprese je prokazována přibližně u 20 – 30% invazivních karcinomů prsu, mluvíme pak o HER2 pozitivním karcinomu. Tento stav je spojen s vysokým rizikem recidivy a špatnou prognózou,

pokud není do léčebného protokolu zahrnuta biologická léčba protilátkou trastuzumabem (Herceptin®, Roche) [Mitri Z. et al., 2012].

Vliv HER2 pozitivity na prognózu DCIS nebyl dosud přesně objasněn, přestože se tomuto tématu věnuje celá řada prací. Lariová zmiňuje ve svém přehledovém článku celkem 36 studií, jejichž cílem bylo kromě jiného změřit frekvenci HER2 pozitivity na vzorcích DCIS. Průměrná pozitivita HER2 byla vyčíslena na 40,1% (rozmezí 9 – 67%), ovšem definice HER2 pozitivity byla v jednotlivých studiích rozdílná [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

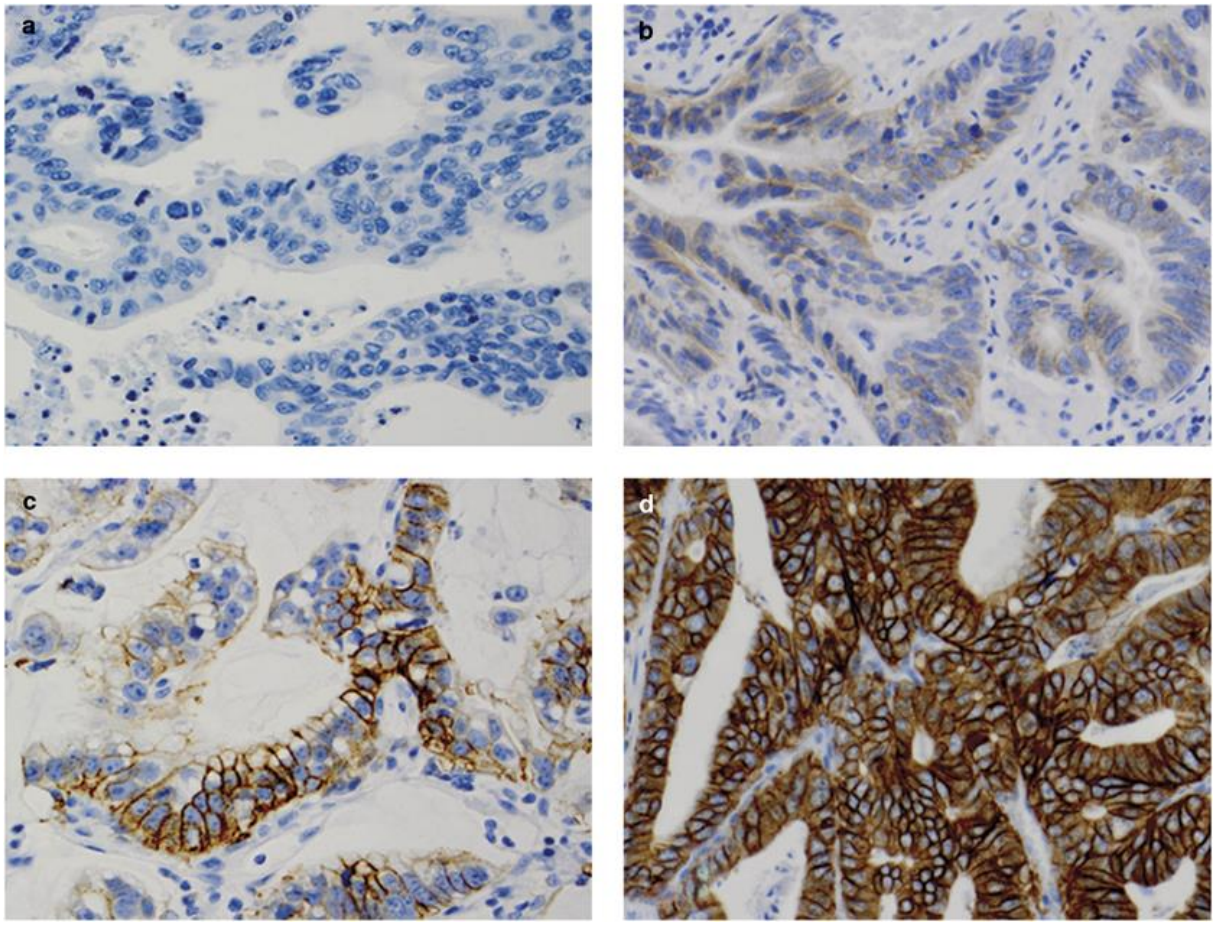
Existují dva diagnostické přístupy k vyšetřování míry exprese HER2, které je možné v praxi kombinovat. Zaprvé lze imunohistochemicky vizualizovat HER2 receptory na buněčné membráně. Intenzitu zbarvení vyjadřuje skóre, které nabývá hodnot 0, 1+ (negativní), 2+ (hraniční) nebo 3+ (pozitivní) (obr. 13). V případě hraničního nálezu 2+ je možné provést analýzu amplifikace genu [Lux M.P. a Souchon R., 2013]. Hybridizačními metodami (FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace nebo CISH – chromogenní *in situ* hybridizace) se vyšetřuje počet kopií HER2 genu v buněčném jádře. Ke zjištění referenční hodnoty slouží barvení centromer 17. chromozomu (CEN-17). Na vzorku se odečítá počet modrých teček (CEN-17) a počet teček červených (HER2) (obr. 14). Hodnota výsledného poměru HER2/CEN-17 rozhoduje o negativitě či pozitivitě vzorku, tj. o amplifikaci genu HER2 [Ross J.S., 2009].

V přehledové práci Lariové byla identifikována řada studií, které vyšetřovaly vztahy mezi zvýšenou expresí HER2 a dalšími parametry DCIS. Většina prací popsala korelaci mezi nadměrnou expresí HER2 a dalšími nepříznivými znaky: negativitou ER, negativitou PgR, expresí p53, nízkou expresí Bcl-2, vysokým jaderným gradem nebo vysokou proliferační aktivitou [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Asociaci mezi HER2 pozitivitou a rizikem lokální rekurence DCIS se podařilo prokázat čtyřem autorům. Celá řada dalších prací ovšem tento vztah nepotvrdila [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Ringbergová navrhla *Cell Biological Index* (CBI-7), který zahrnoval celkem 7 biomarkerů, mimo jiné i overexpresi HER2 (dále ER negativitu, PgR negativitu, nízkou expresi Bcl-2, pozitivitu p53, nondiploidii a vysokou expresi Ki67). Pro tento fenotyp bylo zjištěno významně zvýšené riziko lokální rekurence (RR = 1,3; 95% CI: 1,0-1,6; p=0,051) [Ringberg A. et al., 2001].

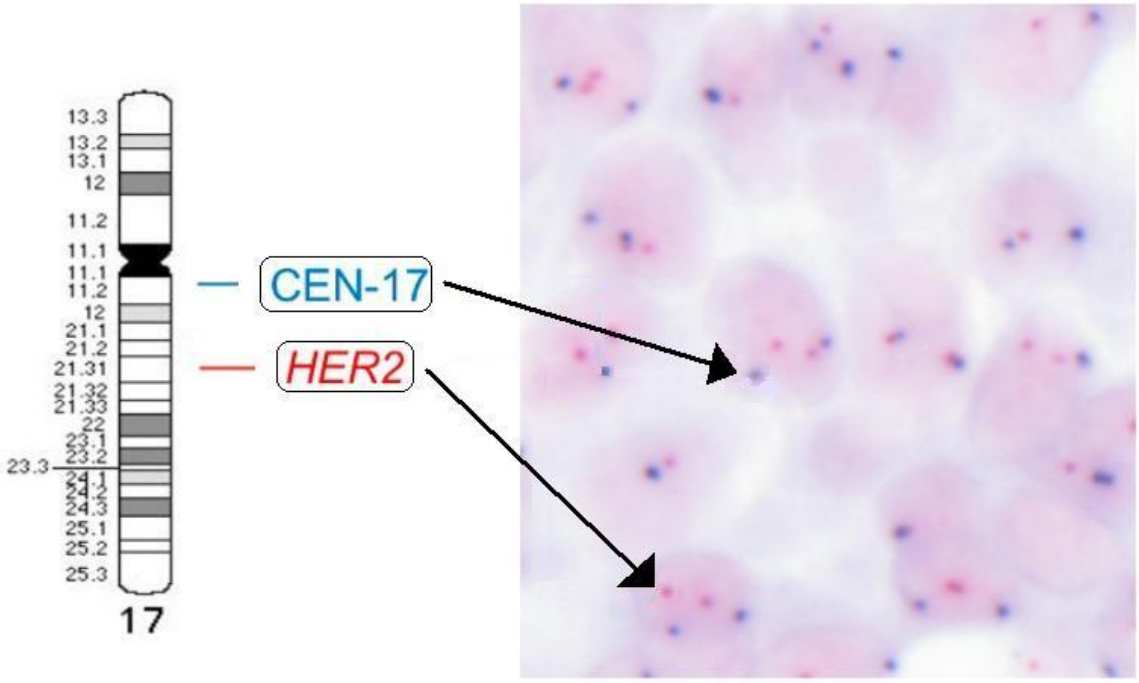
Další prací s pozitivním výsledkem je studie případů a kontrol Provenzanové, která zjistila asociaci mezi HER2 overexpresí a zvýšeným rizikem lokální recidivy. Při srovnání tkání DCIS od pacientek, jejichž onemocnění recidivovalo a těch, které zůstaly zdravé, vyšlo najevo, že recidivující DCIS byl častěji HER2 pozitivní (41% vs. 12%) [Provenzano E. et al., 2003].



Obr. 13 Imunohistochemická vizualizace HER2 na buněčné membráně. Výsledek je semikvantitativně ohodnocen jako 0 (a), 1+ (b) = negativní, 2+ (c) = hraniční a nebo 3+ (d) = pozitivní. V případě hraničního výsledku 2+ se doplňuje vyšetření *in situ* hybridizací (Hu, 2011).

Výsledky práce Kerlikowské byly již v přechozích odstavcích opakovaně popsány. Pro úplnost tedy na tomto místě jen zopakujeme, že jedním z fenotypů, které multivariátní analýza potvrdila jako prognostický znak *in situ* recidivy, kombinoval vysokou proliferační aktivitu, negativitu estrogenového receptoru a overexpresi HER2 (Ki67+ ER- HER2+). Zjištěné riziko činilo HR = 5,8 (95% CI: 2,4 – 14) [Kerlikowske K. et al., 2010].

Holmesová zjistila studiem kohorty 141 pacientek léčených pouze BCS, že HER2 představuje nezávislý prognostický faktor rekurence. Univariátní analýzou bylo zjištěno, že HER2 pozitivita signifikantně korelovala s dobou do výskytu recidivy (*time to recurrence*). HER2 pozitivní léze recidivovaly dříve (průměrná doba do recidivy 100 měsíců) než léze HER2 negativní (průměrná doba do recidivy 213 měsíců, p=0,028). Nápadná je v této práci vysoká frekvence recidiv (42,6%) při průměrném *follow-up* 10,2 roků. Taktéž multivariátní analýza potvrdila HER2 overexpresi jako nezávislý prognostický znak lokální recidivy (HR = 1,82; 95% CI: 1,03 - 3,22; p=0,041) [Holmes P. et al., 2011].



Obr. 14 Chromogenní *in situ* hybridizace (CISH) analyzující počet kopií HER2 genu v buněčném jádře. Jako kontrola metody slouží barvení centromer 17. chromozomu (CEN-17). Na vzorku se pak odečítá počet modrých teček (CEN-17) a počet teček červených (HER2). Hodnota výsledného poměru HER2/CEN-17 rozhoduje o negativitě či pozitivitě vzorku, tj. o amplifikaci genu HER2. V tomto případě je poměr HER2/CEN-17 <2,0 – vzorek je HER2 negativní (upraveno podle Dako).

9.22 EGFR, HER3, HER4

Do rodiny čtyř podobných receptorů s tyrosinkinázovou aktivitou, která je označována jako erbB, patří kromě již výše uvedeného erbB-2 (syn. HER2) dále erbB-1 (syn. *epidermal growth factor receptor* – EGFR), erbB-3 (syn. HER3) a erbB-4 (syn. HER4). Jejich klinický význam je ovšem ve srovnání s HER2 menší.

Tři resp. dva identifikované experimenty zjišťující míru exprese jednotlivých receptorů ve tkáni DCIS přinesly tyto výsledky: Průměrná exprese HER1 byla 23,8% (rozsah 13 – 36,4%), průměrná exprese HER3 činila 59% (56% a 62%) a konečně pro HER4 byla zjištěna průměrná exprese 46% (37% a 55%) [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Barnesová nezjistila pro HER1 a HER3 žádnou souvislost mezi expresí a četností recidivy. Biomarker HER4 byl naproti tomu v této studii spojen s menším rizikem rekurence. Pacientky, které zůstaly zdravé, vykazovaly častěji HER4 overexpresi nežli pacientky s recidivou DCIS (63,3% vs. 35,9%, p = 0,004) [Barnes N.L. et al., 2005].

9.23 DCIS skóre

Solin ve své práci definoval tzv. DCIS skóre, jehož hodnota koreluje s mírou rizika lokální (*in situ* nebo invazivní) rekurence. Způsob výpočtu DCIS skóre byl odvozen od diagnostického testu Oncotype DX^{TM} (Genomic Health). Touto metodou se zjišťuje míra exprese 21 genů na vzorku invazivního karcinomu. Výsledek může při určitých klinických konstelacích (např. premenopauzální pacientka, ER+, HER2-, pN0) pomoci při rozhodování o indikaci adjuvantní chemoterapie [Paik S. et al., 2006].

Solin zredukoval počet vyšetřovaných genů na 12 (7 genů relevantních pro DCIS a 5 genů referenčních) a tímto panelem otestoval vzorky DCIS od 327 pacientek léčených pouze BCS, tj. bez adjuvantní radioterapie. Výsledkem analýzy exprese genů bylo skóre, které nabývalo hodnoty 0 – 100. Podle míry rizika byly definovány tři skupiny: nízké riziko (DCIS skóre ≤ 39), střední riziko (DCIS skóre = 39 - 54) a vysoké riziko (DCIS skóre ≥ 55). Pro tyto předdefinované kohorty bylo zjištěno desetileté riziko lokální recidivy 10,6%, 26,7%, resp. 25,9%. Pro invazivní rekurenci bylo toto riziko vyčísleno na 3,7%, 12,3%, resp. 19,2%. DCIS skóre bylo signifikantně asociováno s rizikem jakékoli (*in situ* nebo invazivní) lokální recidivy (HR = 2,31; 95% CI: 1,15 – 4,49; p = 0,02) [Solin L.J. et al., 2013].

9.24 GGI-VNPI

Invazivní karcinomy prsní žlázy se tradičně dělí podle histomorfologických kritérií na dobře diferencované (G1), středně diferencované (G2) a špatně diferencované (G3). S ohledem na indikaci adjuvantní chemoterapie bývá v praxi největší nejistota právě u prostřední skupiny G2. Doporučení k adjuvantní léčbě bývá často vysloveno pouze na základě subjektivního názoru lékaře a nikoli na podkladě objektivních kritérií. S cílem vyhnout se tomuto problému a být schopen každý invazivní karcinom jednoznačně ohodnotit buď jako *low-grade* nebo *high-grade* byl pracovní skupinou kolem Ivshinové definován tzv. *Genomic grade index* (GGI). Metodou *microarray* byla vyšetřena exprese celkem 97 relevantních genů a podle výsledků byla každá léze označena buď jako *low-grade* nebo jako *high-grade* [Ivshina A.V. et al., 2006].

Altintasová poté aplikovala metodu GGI, původně vyvinutou na klasifikování invazivního karcinomu prsu, ke zhodnocení DCIS. Pro každou z 88 pacientek s intraduktální lézí byl vypočítán GGI a touto proměnnou nahrazen parametr „nukleární grade“ v modifikovaném USC/VNPI. Výsledné skóre bylo označeno jako GGI-VNPI. Tento parametr se ukázal být přesnější pro predikci lokální rekurence ve srovnání s klasickým (modifikovaným) USC/VNPI: USC/VNPI (HR = 7,72; 95% CI: 1,01 – 58,91; p = 0,049) vs. GGI-VNPI (HR = 18,14; 95% CI: 1,75 – 188; p = 0,015) [Altintas S. et al., 2011].

9.25 E-kadherin

E-kadherin patří mezi tzv. adhezivní molekuly, které zajišťují mezibuněčná spojení. Mluvíme také o tzv. transmembránových molekulách. Ztráta genu CDH-1 resp. jeho bílkovinného produktu E-kadherinu je typická pro lobulární karcinomy. Je možné, že ztráta E-kadherinu v terénu DCIS přispěje k rozvolnění mezibuněčné vazby a uspíší tak invazivní růst. Bylo prokázáno, že exprese E-kadherinu koreluje s mírou diferenciace DCIS. Nízká exprese E-kadherinu byla prokázána u lézí s nízkým stupněm diferenciace (*high-grade*). Výsledek byl signifikantní bez ohledu na to, jakým způsobem byla diferenciace definována (nukleární grade, nekróza, VNPI) [Gupta S.K. et al., 1997].

9.26 uPA/PAI-1

Urokináza (*urokinase-type plasminogen activator* – uPA) a inhibitor aktivátoru plasminogenu typ 1 (PAI-1) jsou dva funkčně související enzymy. V hemostazeologickém kontextu je důležitý jejich vztah k fibrinolýze. PAI-1 inhibuje uPA, tím brání přeměně proenzymu plasminogen na aktivní plasmin, v důsledku čehož dojde k zástavě fibrinolýzy. Z onkologického hlediska je důležitá přítomnost těchto dvou enzymů v ECM. Jejich vzájemná interakce ovlivňuje schopnost invazivního růstu a metastazování nádorových buněk [Harbeck N. et al., 2001].

U pacientek s invazivním karcinomem prsu (při konstelaci pN0, G2) může vyšetření tohoto parametru pomoci při rozhodování o indikaci adjuvantní chemoterapie [Harris L. et al., 2007]. Ve srovnání s invazivním karcinomem nebyla exprese uPA/PAI-1 ve tkáni DCIS doposud podrobně studována.

9.27 Ostatní prognostické faktory

V aktuálních pracích je možné identifikovat ještě řadu dalších méně důležitých biomarkerů, které byly zkoumány ve vztahu k biologickým vlastnostem DCIS a k riziku lokální recidivy DCIS (tab. 14).

K významným prognostickým faktorům DCIS patří dále Bcl-2, p53, VEGF, BRCA1 a BRCA2. Analýza těchto biomarkerů byla součastí vlastního laboratorního výzkumu. Jejich podrobný popis bude tedy následovat v příslušné kapitole.

9.28 Vývoj prognostických faktorů - shrnutí

Jak je z předchozích odstavců zřejmé, prošel v posledních letech způsob klasifikování rizikovosti DCIS dynamickým vývojem. Na druhou stranu je z množství studovaných biomarkerů (tab. 14) patrné, že hledání ideálního prognostického parametru ještě zdaleka není u konce. Jakým směrem se bude výzkum v příštích letech ubírat je přitom evidentní. Po éře klinických, histomorfologických a imunohistochemických markerů směřuje v dnešní době

výzkum hlavně do oblasti molekulární genetiky. Zejména metoda mikročipů (*microarray*) zažívá nebývalý rozmach. Relativně jednoduchým způsobem je možné v jednom diagnostickém kroku zhodnotit expresi několika desítek genů a tím přesně definovat biologické vlastnosti nádoru. Znalost těchto vlastností bude v budoucnu jistě esenciální při plánování operační léčby DCIS a výběru vhodné adjuvantní terapie.

prognostický faktor	**stručná charakteristika**	**souvislost s rizikem lokální recidivy**	**AGO[1]**	**LOE[2]**
různé				
věk	věk v době diagnózy	nízký věk v době diagnózy je spojen s vyšším rizikem lokální rekurence	++	1a
metoda detekce	pouze mamografický nález vs. symptomatický (hmatný) tumor	hmatné ložisko DCIS bývá rozsáhlejší a má vyšší riziko lokální recidivy	++	1a
histomorfologie				
architektura	subtyp DCIS s určitým architektonickým obrazem	kribriformní nebo solidní subtyp má vyšší riziko recidivy ve srovnání s mikropapilární architekturou	+	2b
grade	stupeň diferenciace	čím vyšší *grade* (nízká diferenciace), tím vyšší riziko riziko lokální recidivy	++	1a
komedonekróza	nahromadění nekrotických buněk v luminu duktů	komedonekróza je spojena s častější a rychleji vznikající lokální recidivou	++	1a
velikost	velikost ložiska	s rozsahem ložiska roste riziko invazivního růstu i nodálních metastáz	++	1a
fokalita	unifokální vs. multifokální vs. multicentrická léze	multifokalita představuje nezávislý prognostický faktor lokální rekurence u pacientek léčených pouze BCS	++	1a
iatrogenní vlivy				
reziduální kalcifikace	mamograficky detekované mikrokalcifikace po BCS	reziduální mikrokalcifikace zvyšují riziko reziduální choroby po BCS	++	2b

resekční okraje	nádorové buňky v resekční linii (*positive-margin*, R1) vs. lem zdravé tkáně okolo nádorového ložiska (*free-margin*, R0)	šíře lemu <2mm nebo nejistý resekční okraj zvyšuje riziko lokální recidivy	++	1a
adjuvantní RT	aplikace adjuvantní radioterapie po BCS (normofrakcionace, 50Gy)	vynechání adjuvantní RT z léčebného protokolu u neselektované populace zvyšuje riziko lokání recidivy	+	1a
prognostická skóre				
VNPI	• velikost nádoru • šíře resekčního okraje • histologický grade resp. přítomnost nekróz	VNPI definuje kohortu pacientek s nízkým rizikem recidivy, u kterých lze vynechat RT z léčebného protokolu. USC/VNPI dále zpřesňuje skóre přidáním čtvrté proměnné. Výsledky potvrzovacích studií jsou nekonzistentní.	+/-	2b
USC/VNPI	• velikost nádoru • šíře resekčního okraje • histologický grade resp. přítomnost nekróz • věk pacientky		+/-	2b
steroidní receptory				
ER	pozitivita ER je prokazována imunohistochemicky	existuje souvislost mezi pozitivitou ER a příznivými biologickými vlastnostmi DCIS ER negativita je spojena s vyšším rizikem lokální rekurence	+/-	1a
PgR	pozitivita PgR prokazována imunohistochemicky	PgR negativita je spojena s vyšším rizikem lokální rekurence.	+/-	1a

marker proliferace				
Ki67	protein vyskytující se u všech buněk mimo klidovou fázi (dělící se buňky) procento pozitivních, tj. dělících se buněk = proliferační index	proliferační index Ki67 je prognostický faktor lokální recidivy (individuálně i v kombinaci s dalšími markery)	+/-	2b[3]
regulace buněčného cyklu a markery apoptózy				
cyklin D1	regulátory buněčného cyklu	nízká exprese cyklinu D1 je spojena s vyšším rizikem recidivy		
cyklin A		vysoká exprese cyklinu A v kombinaci s vysokou hodnotou Ki67 koreluje s četností ipsilaterální recidivy		
cyklin E		souvislost s rizikem rekurence neprokázána		
p16	inhibiční regulátor buněčného cyklu (tumorsupresor)	pozitivita p16 je rizikový faktor recidivy (individuálně i v kombinaci s dalšími markery)	+/-	2b[3]
p21	inhibiční regulátor buněčného cyklu (tumorsupresor)	prognóza pozitivity p21 nejasná (protichůdné výsledky studií)		
p27	inhibiční regulátor buněčného cyklu (tumorsupresor)	souvislost s rizikem rekurence neprokázána		
p53	průkaz p53 je známkou akumulace mutovaného a tedy nefunkčního proteinu (tumorsupresor)	pozitivita p53 asociována s nepříznivými histologickými znaky p53 představuje rizikový faktor ipsilaterální rekurence		

Bcl-2	inhibiční regulátor apoptózy (antiapoptotické účinky)	exprese Bcl-2 (paradoxně) asociována s příznivými znaky negativita Bcl-2 je rizikový faktor recidivy (individuálně i v kombinaci s dalšími markery)		
Bax	proapoptotický regulátor	souvislost s rizikem rekurence neprokázána		
survivin	inhibiční regulátor apoptózy (antiapoptotické účinky)	kombinace exprese survivinu a COX-2 koreluje s rizikem recidivy		
Myc	gen regulující transkripci	souvislost s rizikem rekurence neprokázána		
Rb	tumorsupresor	souvislost s rizikem rekurence neprokázána		
faktory asociované s angiogenezí				
VEGF	růstový faktor stimulující angiogenezi (např. nádorem indukovanou angiogenezi)	souvislost s rizikem rekurence nebyla jednoznačně prokázána (nedosažena statistická signifikance)		
heparanáza-I	enzym hrající roli v angiogenezi a invazivním růstu	míra exprese koreluje s histopatologickými vlastnostmi souvislost s rizikem rekurence neprokázána		
receptory epidermálních růstových faktorů (EGFR)				
HER2	receptor s tyrosinkinázovou aktivitou. V praxi se rutinně vyšetřuje amplifikace genu nebo míra exprese receptoru	existují důkazy o korelaci mezi overexpresí HER2 a nepříznivými znaky HER2 pozitivita je rizikový faktor recidivy (individuálně i v kombinaci s dalšími markery)	+/-	1a
EGFR	receptory s tyrosinkinázovou aktivitou	nebyla zjištěna souvislost s rizikem recidivy		
HER3		nebyla zjištěna souvislost s rizikem recidivy		
HER4		exprese HER4 spojena s menším rizikem lokální recidivy		

proteiny asociované s extracelulární matrix				
neprilysin	enzym inaktivující signální molekuly	prognóza exprese neprilysinu nejasná (protichůdné výsledky studií)		
osteonectin	molekula s řadou fyziologických funkcí (angiogeneze, migrace atd.)	osteonectin byl identifikován jako nezávislý prognostický faktor recidivy		
enzymy asociované s prostaglandiny				
COX-2	enzym katalyzující vznik např. prostaglandinů předpokládaný vliv na apoptózu, angiogenezi a migraci	vysoká exprese COX-2 souvisí s prognosticky nepříznivými znaky byla prokázána souvislost mezi vysokou expresí COX-2 a rizikem lokální rekurence (individuálně i v kombinaci)	+/-	2b
prognostická skóre druhé generace				
DCIS skóre	skóre získané analýzou exprese 12 genů (hodnota 0-100)	DCIS skóre signifikantně asociováno s rizikem jakékoli (*in situ* nebo invazivní) lokální recidivy	+/-	2c
GGI-VNPI	GGI je skóre získané analýzou exprese 97 genů tímto skóre byl dále upraven USC/VNPI	GGI-VNPI je přesnější pro predikci lokální rekurence ve srovnání s klasickým resp. modifikovaným USC/VNPI		
méně významné biomarkery				
E-kadherin	adhezivní molekula ztráta genu typická pro lobulární histotyp	nízká exprese E-kadherinu koreluje s nízkým stupněm diferenciace souvislost s rizikem recidivy nezjištěna		
BRCA1-2	tumorsupresorové geny	souvislost s rizikem recidivy nezjištěna		
TGF-beta	cytokin signalizující buněčnou proliferaci	souvislost s rizikem recidivy nezjištěna		
stratifin	role v transdukci signálu	souvislost s rizikem recidivy nezjištěna		

LRRC-15	transmembránový protein na volně migrujících buňkách	souvislost s rizikem recidivy nezjištěna	
MMP-11	role při štěpení ECM předpokládaný vliv na invazivní růst	míra exprese koreluje se stupněm malignity léze souvislost s rizikem recidivy nezjištěna	
uPA / PAI-1	vliv na invazivní růst a metastazování buněk	souvislost s rizikem recidivy nezjištěna	
BPAG1 TJP3 Claudin 4	role v mezibuněčných vazbách resp. vazbě na bazální membránu	souvislost s rizikem recidivy nezjištěna	

Tab. 14 Stručný přehled všech prognostických faktorů zmíněných v této kapitole a stupeň doporučení německou gynekoonkologickou společností. AGO – *Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie*, LOE – *level of evidence*

[1] V tomto sloupci je uvedeno hodnocení příslušného prognostického faktoru německou gynekoonkologickou společností AGO (www.ago-online.de): ++ = parametr jednoznačně doporučen, + = parametr spíše doporučen, +/- = data nekonzistentní. Není-li uvedené žádné hodnocení, znamená to, že se k příslušnému faktoru AGO nevyjádřila.

[2] *level of evidence*: Ia – data z metaanalýzy randomizovaných kontrolovaných studií, IIa – data z minimálně jedné kontrolované studie bez randomizace, IIb – data z minimálně jedné dobře plánované experimentální studie

[3] Údaj se týká palpovatelného tumoru a kombinovaného fenotypu COX-2+p16+Ki67+ resp. ER-HER2-Ki67+

10. ANALÝZA 250 PŘÍPADŮ DUKTÁLNÍHO *CARCINOMA IN SITU*

Klinické a epidemiologické údaje z mamografického screeningu představují veliké množství dat, která by bylo možné využít ke studiím o zhoubných nádorech prsní žlázy. Jaké přesně jsou vlastnosti DCIS zjištěného v rámci screeningu jsme se pokusili zjistit retrospektivní analýzou pacientek s DCIS a následným srovnáním výsledků s údaji z literatury [Böhm J. a Zikán M., 2014].

10.1 Organizace mamografického screeningu v SRN

V posledním desetiletí byl ve Spolkové republice Německo postupně zaváděn celoplošný organizovaný mamografický screening cílený na kohortu žen ve věku mezi 50-69 roky. Jednotlivé kroky screeningu jsou precizně definované a zahrnují adresné pozvání, vyhotovení digitálního mamografického snímku, nezávislé dvojité čtení i konzilium v případě diskordantních nálezů či nálezů z kategorií BI-RADS 3-5 (*Breast Imaging-Reporting and Data* systém). V případě suspektních výsledků případně následuje vyhotovení snímků se zvětšením či bodovou kompresí nebo rovnou biopsie. Bioptický vzorek je poté vyhodnocen nezávisle dvěma patology. Dalším krokem je onkologické konzilium, kterého se účastní minimálně patolog, radiolog a operatér (v SRN většinou gynekolog). V tomto rámci je vydáno doporučení k další chirurgické léčbě. Posledním krokem je pooperační onkologické konzilium, jehož složení se řídí doporučením Německé onkologické společnosti (*Deutsche Krebsgesellschaft*). V certifikovaných onkologických centrech (*Brustzentrum*) je podmínkou účast operatéra, patologa, radiologa a klinického onkologa. Alternativně mohou být přizváni specialisté z některých dalších oborů (chirurgie, plastická chirurgie, nukleární medicína, klinická psychologie). Na pooperační onkologické konzilium bývají také zváni ošetřující ambulantní gynekologové. Výsledkem je doporučení k případné adjuvantní léčbě nebo je pacientka rovnou předána k dispenzarizaci. Z každého z výše uvedených kroků je vyhotoven podrobný protokol [Malek D. a Rabe P., 2012].

V každé ze spolkových zemí funguje jedna screeningová centrála, samotnou výkonnou jednotkou je tzv. screeningová jednotka (*Screening-Einheit*). Těch je v celé SRN 94, jedna jednotka zahrnuje region s přibližně 1 miliónem obyvatel. Žen ve věku 50-69 let je v každé screeningové jednotce kolem 120 tisíc [Malek D. a Rabe P., 2012].

10.2 Metodika

V naší retrospektivní analýze byly zkoumání podrobeny všechny pacientky, u kterých byl ve screeningové jednotce jihovýchodní Duryňsko v období mezi květnem 2007 a lednem 2013 diagnostikován čistý DCIS. Nálezy DCIS s invazivní komponentou a mikroinvazivní karcinom

(pT1mic) v bioptátu nebo v definitivní histologii byly ze studie vyloučeny. Čistý DCIS byl zařazen do analýzy bez ohledu na mamografické charakteristiky, klinický obraz, velikost, fokalitu nebo *grade*.

Z databáze screeningové jednotky byly nejprve vybrány pacientky, které splňovaly výše uvedená kritéria. V dalším kroku byla ke každé pacientce z archivu vyhledána dokumentace, která sestávala z popisu mamogramu, histologického nálezu bioptátu i definitivního histopatologického nálezu, operačního protokolu, propouštěcí lékařské zprávy a protokolu pooperačního onkologického konzilia.

10.3 Výsledky

Mezi květnem 2007 a lednem 2013 bylo ve sledované screeningové jednotce provedeno celkem 297 tisíc vyšetření (1 žena během 1 dvouletého cyklu = 1 vyšetření). Invazivní karcinom prsu byl biopticky zjištěn ve 1465 případech. U 19 pacientek byl diagnostikován DCIS s mikroinvazí. Ve 250 případech u 249 pacientek byl biopticky diagnostikován čistý DCIS bez invazivní komponenty, jednou se jednalo o bilaterální lézi.

Procentuální podíl čistých DCIS na všech zhoubných nádorech činil v této jednotce za uvedené období 14,41%.

Analyzovány byly následující charakteristiky.

10.3.1 Věk v době diagnózy

V naší studii byl medián věku diagnózy DCIS 61 let (průměr 60,52 roků). Výsledek je samozřejmě zkreslen věkovým intervalem, ve kterém je v SRN pacientkám screening nabízen, a srovnání s obecnou populací není možné.

Informace o menopauzálním situaci nebyly součástí dokumentace, vzhledem k věku se dá ovšem předpokládat postmenopauzální status u většiny pacientek.

10.3.2 Chirurgická léčba

Všech 249 pacientek s DCIS podstoupilo chirurgický zákrok. 84,8% z nich (n=212) bylo léčeno prs záchovným výkonem (*breast conserving surgery* – BCS). U 5,6% (n=14) pacientek byla provedena primární mastektomie se zachováním kožního krytu resp. mamiloareolárního komplexu, tzv. *skin-sparing* mastektomie (SSM) nebo *nipple-sparing* mastektomie (NSM). Tento výkon zajišťuje vhodné výchozí podmínky pro následnou jednodobou rekonstrukci prsu při zachování radikality na žláze. Klasickou mastektomií bylo léčeno 9,6% žen (n=26).

Ve 4,8% případů (n=12) nezjistil patolog v resekátu žádnou nádorovou tkáň. U těchto pacientek lze předpokládat kompletní odstranění malého ložiska DCIS již během biopsie.

Vzhledem k nemožnosti vyšetření šíře lemu zdravé tkáně (*surgical margin*) byly ovšem tyto případy z další analýzy vyřazeny.

Ve 23,5 % (n=58) vzorků byla sice v histopatologickém nálezu potvrzena R0 resekce (*free-margin*), šíře lemu ovšem nebyla patologem přesně uvedena.

Ve 3 případech léčených prs záchovným výkonem byla dosažena pouze R1 situace (*positive-margin*) a další reexcize přesto nenásledovala.

Po provedení selekce jsme měli k dispozici celkem 177 vzorků s negativním lemem zdravé tkáně o přesně definované šíři. Tyto vzorky byly způsobilé k další analýze.

10.3.3 Velikost ložiska

Rozsah ložiska DCIS byl ve většině případů uveden v histopatologickém nálezu. Ve 12 případech nebyly v resekátu zjištěny žádné zbytky preinvazivní léze. U těchto pacientek lze předpokládat kompletní odstranění DCIS již během biopsie. V těchto případech jsme při zjišťování velikosti ložiska DCIS vycházeli z mamografického nálezu.

Multicentrický růst DCIS byl popsán v 8% vzorků (n=20).

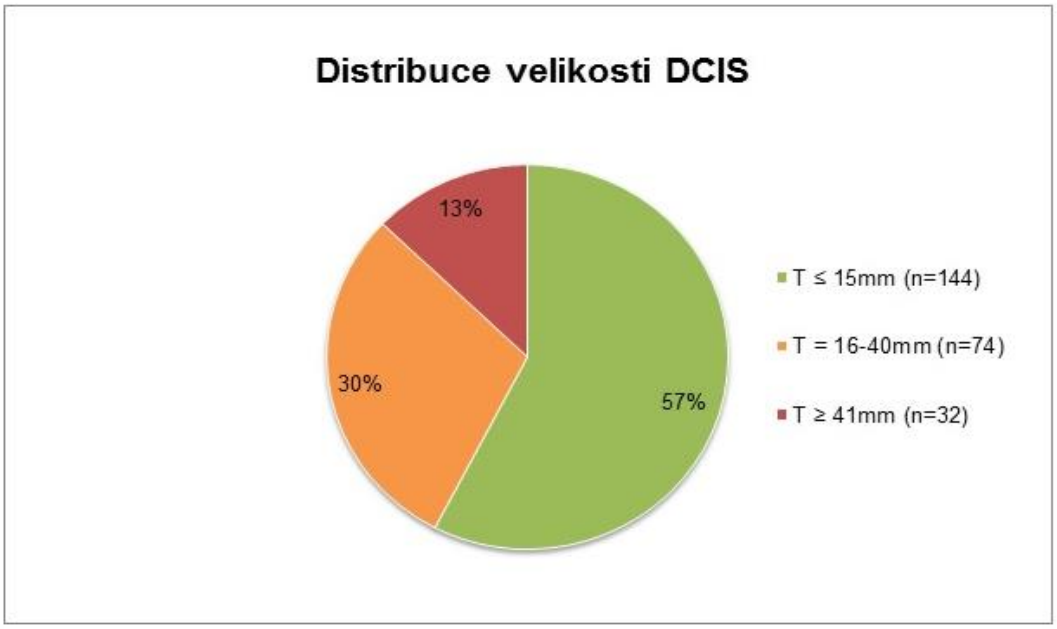
Ve zkoumaných resekátech byla zjištěna velikost DCIS v rozmezí mezi 2mm a 100mm. DCIS menší než 2 mm nebyl popsán ani jednou. To samozřejmě souvisí s definicí DCIS. Prekancerózy menší než 2-3mm jsou označovány jako ADH, byť stavba léze je cytologicky i histologicky identická [Pinder S.E. a Ellis I.O., 2003].

Medián velikosti ložiska DCIS byl v naší analýze 14mm (průměr 20,5mm).

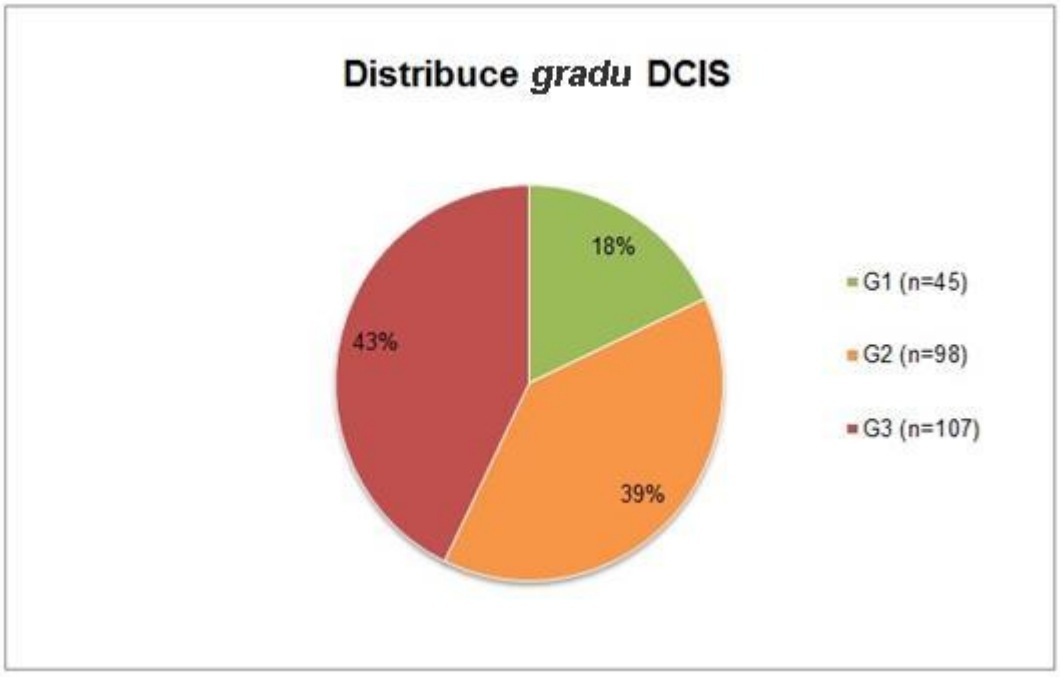
Analogicky s klasifikací Van Nuys prognostický index (VNPI) jsme vzorky DCIS rozdělili do tří skupin podle velikosti ložiska: ≤ 15mm (57%, n=144), 16-40mm (30%, n=74) a ≥ 41mm (13%, n=20) (obr. 15).

10.3.4 Grade

Stupeň diferenciace, tedy *grade*, jsme byli v naší studii schopni zjistit pro všechny vzorky DCIS. Tyto byly klasifikovány jako *low-grade* (G1 neboli *non-high-grade* bez nekrózy), *intermediate-grade* (G2 neboli *non-high-grade* s nekrózou) nebo *high-grade* (G3 neboli *high-grade* s nebo bez nekrózy). Zjištěno bylo 45 *low-grade* DCIS, 98 *intermediate-grade* DCIS a 107 *high-grade* DCIS (obr. 16).



Obr. 15 Distribuce jednotlivých ložisek DCIS podle velikosti. Hraniční hodnoty byly zvoleny analogicky k VNPI skóre. Nejčastěji byly zastoupeny nádory do velikosti 15mm (57%), ložiska velikosti 16-40mm představovala 30% a nejméně početné byly léze rozsahem větší než 40mm (13%).



Obr. 16 Distribuce jednotlivých ložisek DCIS podle stupně diferenciace. Nejčastěji byly zastoupeny nádory špatně a středně diferencované (*high-grade* a *intermediate-grade*). *Low-grade* ložiska tvořila pouze 18%.

10.3.5 Imunohistochemické charakteristiky

Imunohistochemie (IHC) je metoda, která slouží k vizualizaci tkáňových molekul (antigenů) pomocí vazby značené protilátky. V našem souboru vzorků bylo IHC vyšetření provedeno vždy, když měl patolog v resektátu k dispozici dostatečný objem tkáně DCIS (n=229). Ve všech těchto případech byla zjišťována přítomnost estrogenových receptorů (ER) a progesteronových receptorů (PgR). Skoro dvě třetiny vzorků DCIS (n=154) byly pozitivní pro oba typy steroidních receptorů (ER+/PgR+). Hormonální negativita (ER-/PgR-) byla nalezena ve 43 případech. Výsledky analýzy receptorů a jejich korelace s *gradem* nádoru je zobrazen v grafech na obr. 17 - 20.

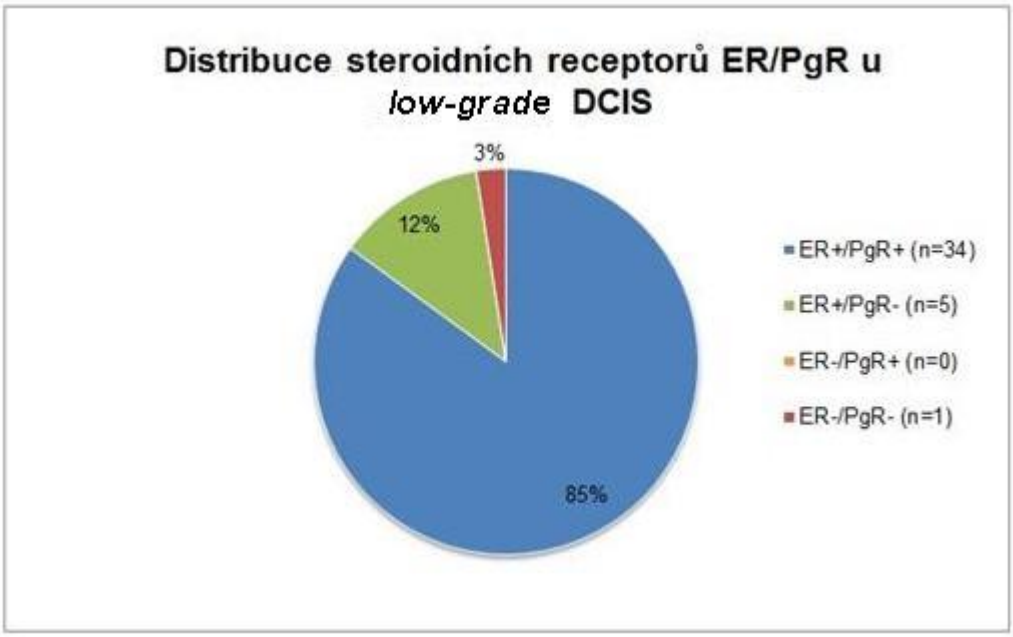
Vyšetření overexprese HER2 probíhalo standardně metodou IHC, u negativního nálezu (0, 1+) byly vzorky označeny jako HER2 negativní. Pouze v případě nejasného výsledku (2+) bylo v souladu s aktuálními doporučeními doplněno vyšetření *in situ* hybridizací (fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH nebo chromogenní *in situ* hybridizace – CISH) [Lux M.P. a Souchon R., 2013]. Analýza tohoto parametru proběhla pouze u 79 vzorků. Pozitivní nález (HER2+) byl zjištěn ve 32,9% (n=26), negativita byla prokázána u 67,1% (n=53).

Triple-negativita DCIS (ER- / PgR- / HER2-) byla detekována pouze jednou.

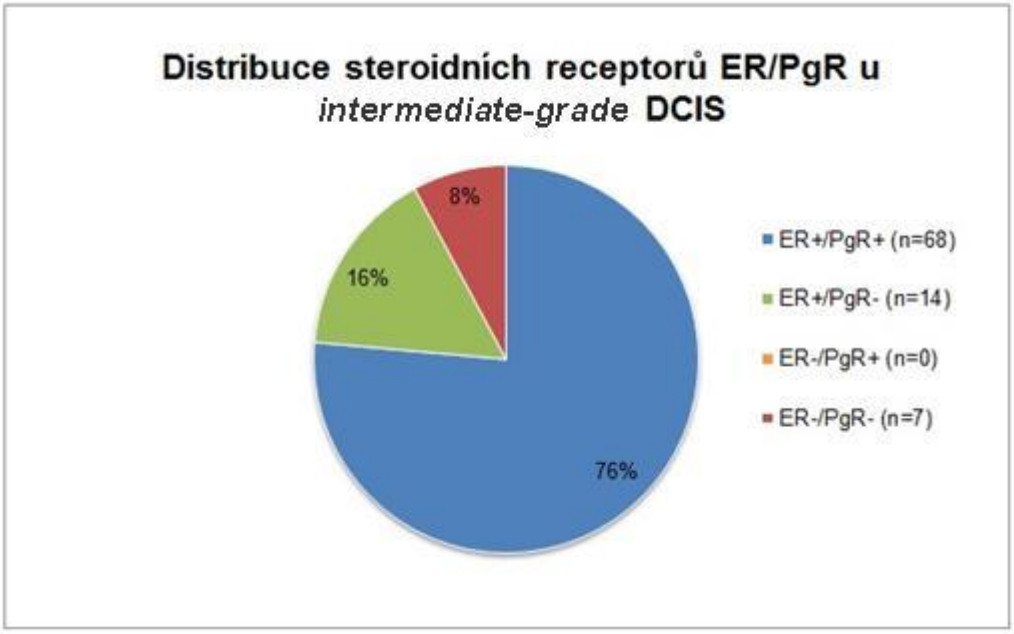
Marker proliferační aktivity Ki67 byl testován celkem na 36,24% vzorků (n=83). Vysoká četnost tohoto vyšetření bylo zajímavé zjištění, uvážíme-li, že konkrétní klinický důsledek výsledku analýzy Ki67 zatím chybí. U *low-grade* DCIS jsme podle očekávání pozorovali nízkou proliferační aktivitu vyjádřenou indexem Ki67, u *high-grade* DCIS pak vyšší proliferační aktivitu. Mezi *gradem* a hodnotou Ki67 jsme zjistili střední míru korelace vyjádřenou korelačním koeficientem r (r=0,43). Průměrná proliferační aktivita pro všechny testované vzorky činila 27,4% (obr. 21).

10.3.6 Van Nuys prognostický index

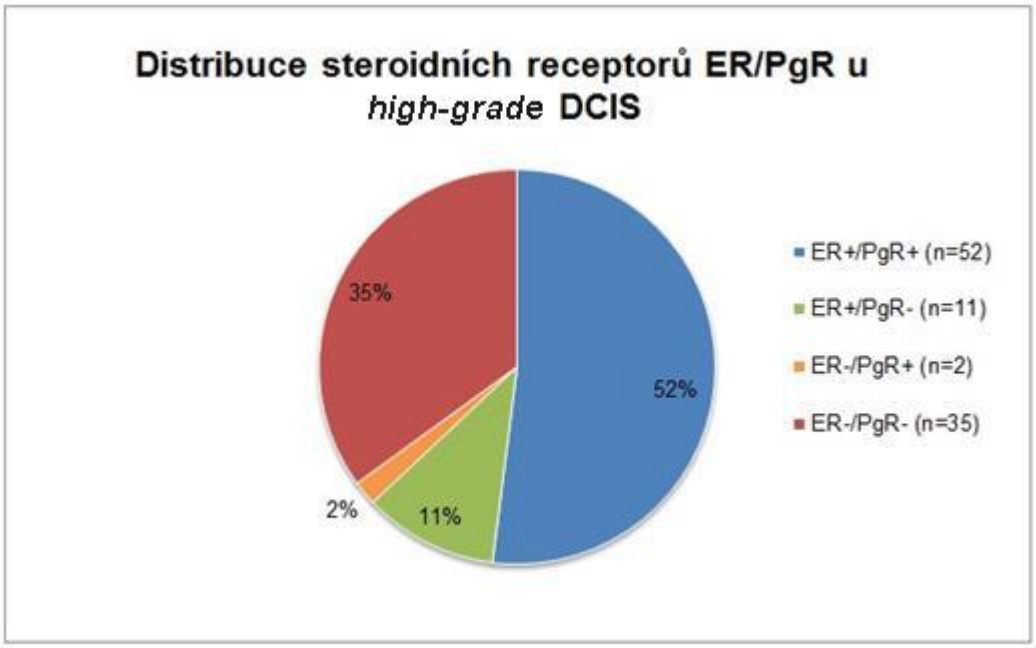
Za účelem klasifikace DCIS podle míry rizika byl v roce 1996 Silversteinem představen tzv. Van Nuys prognostický index (VNPI) [Silverstein M.J. et al., 1996]. Kombinace tří parametrů definuje skóre, jehož hodnota rozdělí DCIS na léze s nízkým, středním a vysokým rízikem. Těmito třemi proměnnými jsou velikost, grade a šíře lemu zdravé tkáně. Později byl VNPI upraven přidáním čtvrtého parametru – věku pacientky. Pak mluvíme o modifikovaném VNPI neboli *University of Southern California* / Van Nuys prognostický index (USC/VNPI) [Silverstein M.J., 2003].



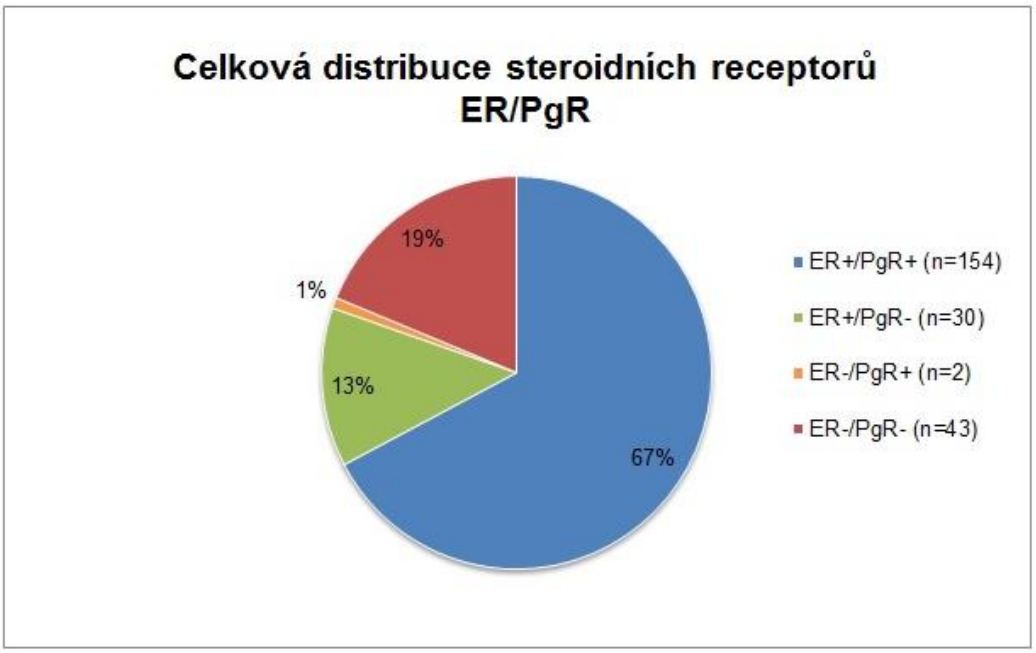
Obr. 17 Distribuce přítomnosti estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR) u nízce maligních ložisek DCIS (*low-grade*). ER pozitivní léze tvořily naprostou většinu (97%).



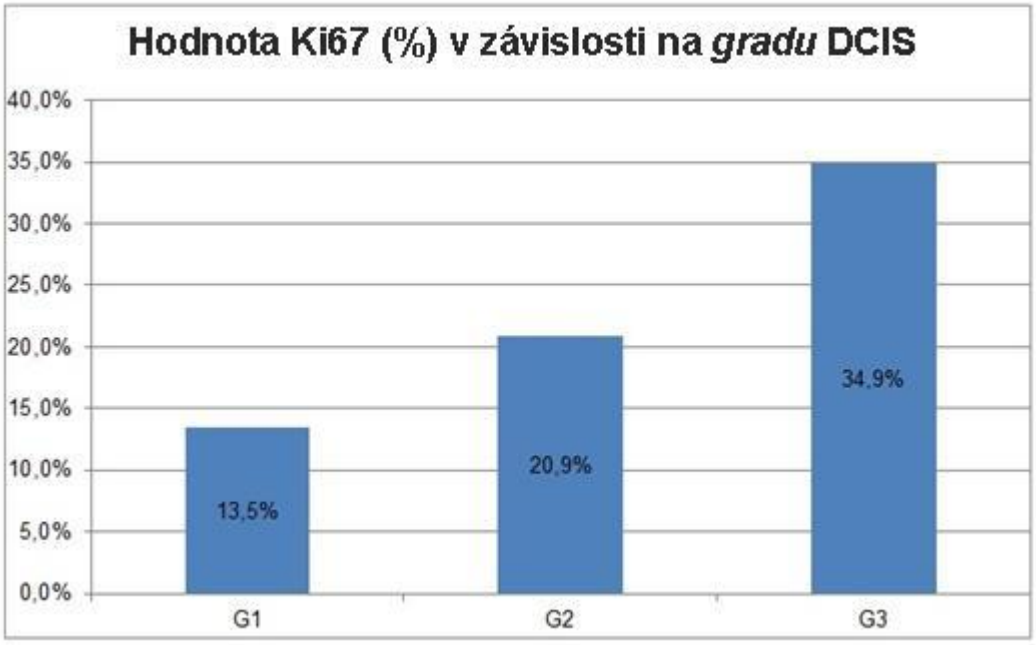
Obr. 18 Distribuce přítomnosti estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR) u středně maligních ložisek DCIS (*intermediate-grade*). I v této kohortě převládaly ER pozitivní léze (92%).



Obr. 19 Distribuce přítomnosti estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR) u vysoce maligních ložisek DCIS (*high-grade*). Také v této kohortě tvořily ER pozitivní léze většinu (63%), přibylo ovšem nádorů ER- / PgR-.



Obr. 20 Celková distribuce přítomnosti estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR) u všech ložisek DCIS (n=229).



Obr. 21 Grafické znázornění zjištěné hodnoty proliferačního indexu Ki67 v závislosti na stupni diferenciace DCIS. Průměrná proliferační aktivita pro všechny vzorky činila 27,4%. Mezi *gradem* a hodnotou Ki67 jsme zjistili střední míru korelace vyjádřenou korelačním koeficientem r (r=0,43).

Úvodní analýzou souboru všech účastnic mamografického screeningu jsme vybrali 250 pacientek s diagnózou čistého DCIS. Pro 72% z nich (n=180) jsme byli spolehlivě schopni zjistit údaje o velikosti léze, stupni diferenciace (*grade*), šíři lemu zdravé tkáně a o věku pacientky, každému vzorku přiřadit 1-3 body podle velikosti proměnné a na základě těchto údajů stanovit skóre USC/VNPI.

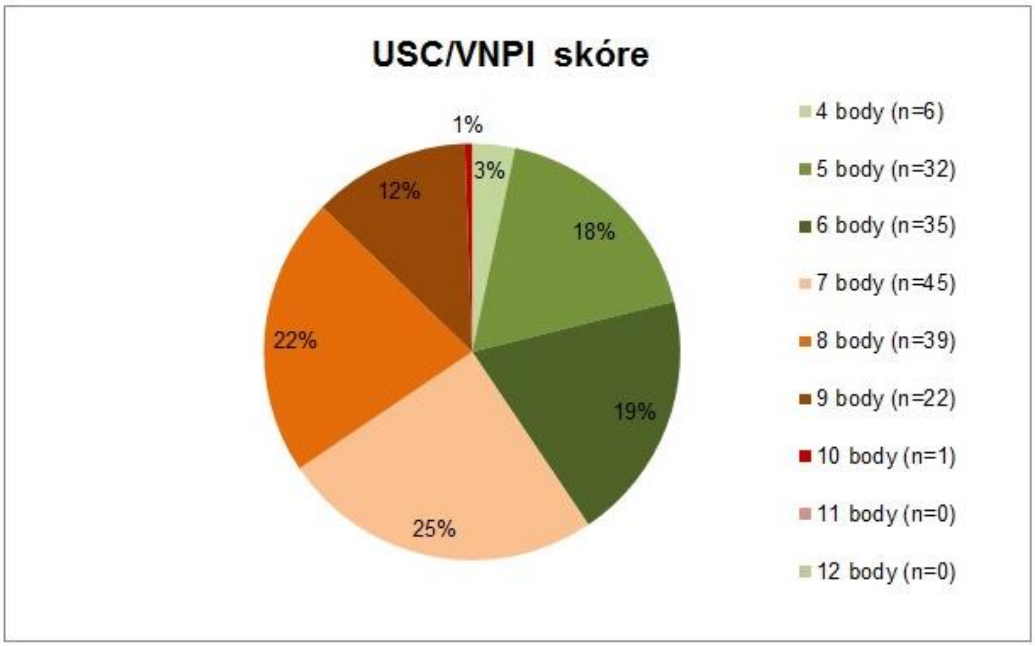
40,6% pacientek (n=73) obdrželo 4-6 bodů a zařadily se tím do skupiny USC/VNPI s nízkým rizikem. Nejpočetnější skupinu tvořil USC/VNPI s intermediálním rizikem (7-9 bodů), 106 pacientek představuje 58,8%. Jen v jednom případě byl USC/VNPI vyšší než 10, tato pacientka se tím řadí do skupiny s vysokým rizikem (obr. 22).

10.3.7 Axilární staging

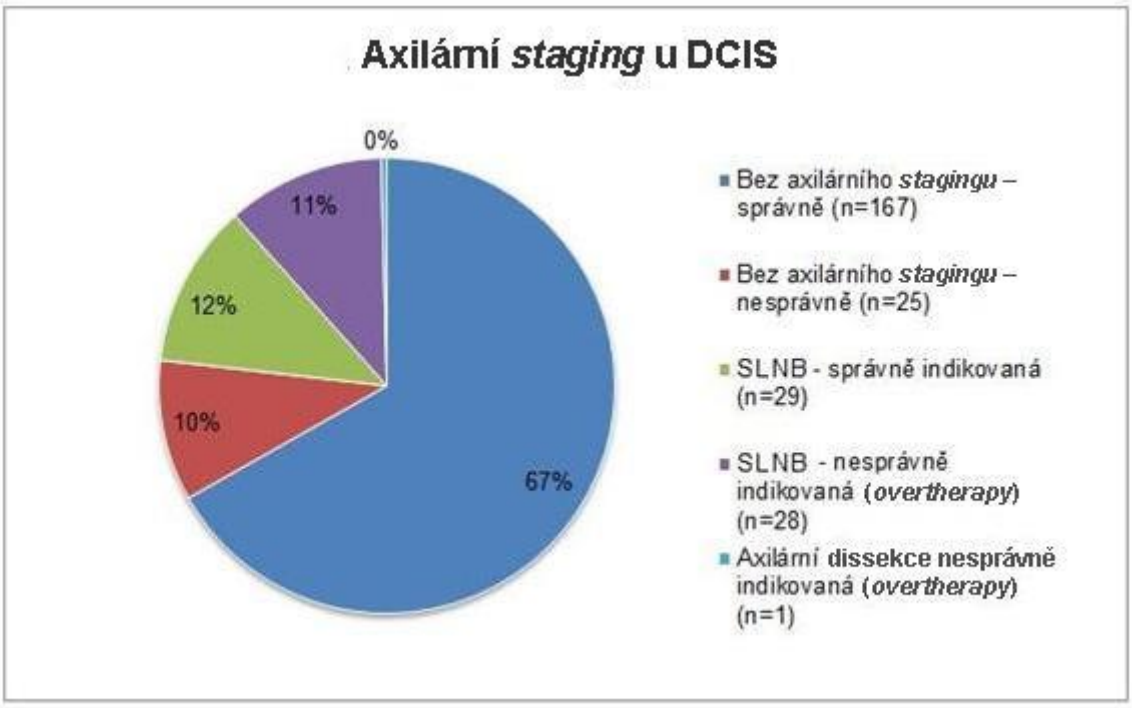
Axilární *staging* metodou biopsie sentinelové uzliny (SLNB) by měl být standardem u všech pacientek s extenzivním DCIS nebo v případě plánované mastektomie (viz kapitola 8.1.3) [Lux M.P. a Souchon R., 2013]. Dissekce axilárních uzlin se stala metodou obsolentní, zejména s ohledem na vysokou morbiditu a nízkou informační výtěžnost (*risk-benefit ratio*) [Berveiller P. et al., 2010].

V naší analýze byla zjišťována i četnost a metoda axilárního *stagingu*. Žádná z metod axilárního *stagingu* nebyla využita u 76,8% pacientek (n=192). V jednom případě byla provedena kompletní axilární dissekce. Metoda SLNB byla využita u 22,8% žen (n=57). Z těchto 57 biopsií sentinelové uzliny byla jen polovina (n=29) indikovaná v souladu s aktuálními doporučeními [Lux M.P. a Souchon R., 2013]. Ve druhé polovině případů (n=28) byla provedena SLNB bez toho, že by se jednalo o extenzivní DCIS > 4cm a nebo byla zároveň prováděna ablace prsu. Na druhou stranu jsme zjistili insuficientní *staging* u 25 pacientek. Ve 14 případech (5,6%) byla totiž provedena mastektomie bez simultánní SLNB a u 11 žen (4,4%) nebyla SLNB indikovaná, i když ložisko DCIS bylo > 4cm (obr. 23).

U žádné z 58 pacientek, u kterých byla provedena některá z forem axilárního *stagingu*, nebyly zjištěny uzlinové metastázy.



Obr. 22 Rozdělení jednotlivých ložisek DCIS (n=180) podle rizika vyjadřeného USC/VNP indexem. Nejpočetnější byla skupina se středním (n=106) a nízkým (n=73) rizikem. Vysoké riziko vykazovala pouze jedna pacientka.



Obr. 23 Grafické znázornění metod axilárního *stagingu* na souboru 250 případů DCIS. Axilární *staging* nebyl (v souladu s *guidelines*) indikován u 67% pacientek (n=167). Naopak v souladu s *guidelines* byla správně indikována biopsie sentinelové uzliny (SLNB) ve 12% (n=29). Ve 21% neodpovídalo rozhodnutí o provedení axilárního *stagingu* aktuálním doporučením: U 28 pacientek byla (zbytečně) provedena SLNB a v jednom případě kompletní axilární dissekce. Ve 25% byl axilární *staging* chybně opomenut.

10.3.8 Adjuvantní léčba

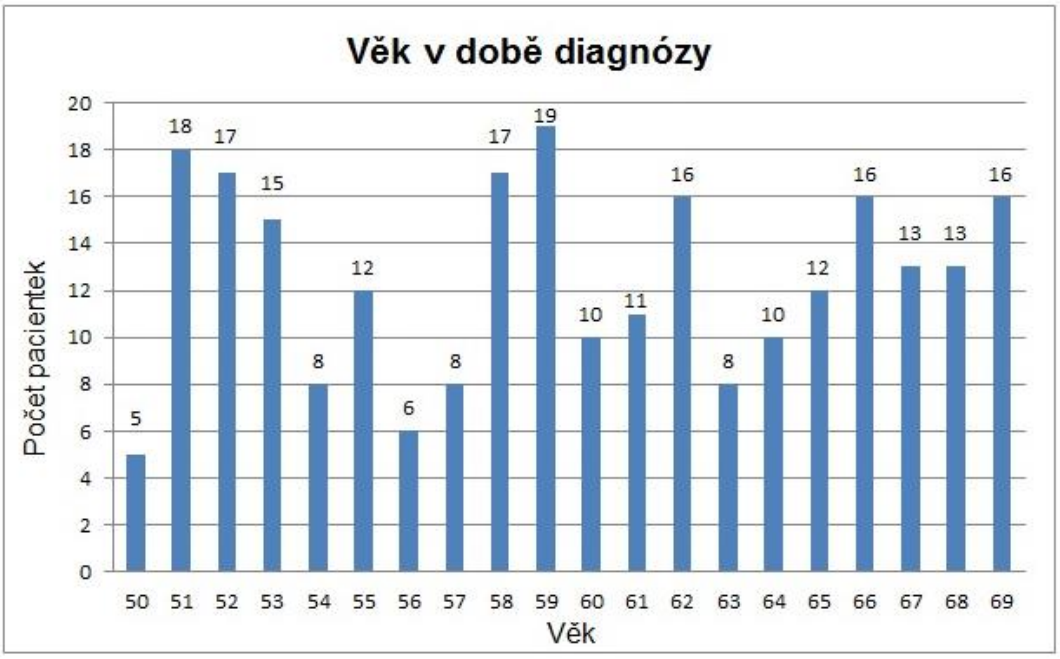
Analýzou protokolů pooperačních onkologických konzilií jsme zjistili, že indikace k adjuvantní RT byla stanovena u všech pacientek operovaných BCS bez ohledu na jejich věk, velikost léze, grading, šířku resekčních okrajů nebo USC/VNPI.

10.4 Diskuze

Ve skupině pacientek, které podstoupily mamografický screening a u nichž byl histologicky diagnostikován DCIS, jsme analyzovali parametry rizika recidivy jejich onemocnění. Zjištěná data byla následně porovnána s údaji z literatury.

10.4.1 Věk v době diagnózy

Zjistili jsme homogenní distribuci pacientek s DCIS v intervalu 50-69 let (obr. 24). V kohortě pacientek mezi 50-59 lety byl tedy DCIS stejně frekventní ve srovnání s kohortou žen ve věku 60-69 let. Toto pozorování je v rozporu s výsledky jedné retrospektivní studie, které prokázala, že u mladších žen jsou signifikantně častější *in situ* léze ve srovnání se ženami staršími, u kterých diagnostikujeme spíše invazivní karcinomy (p=0,007) [Zhang W. et al., 2012].

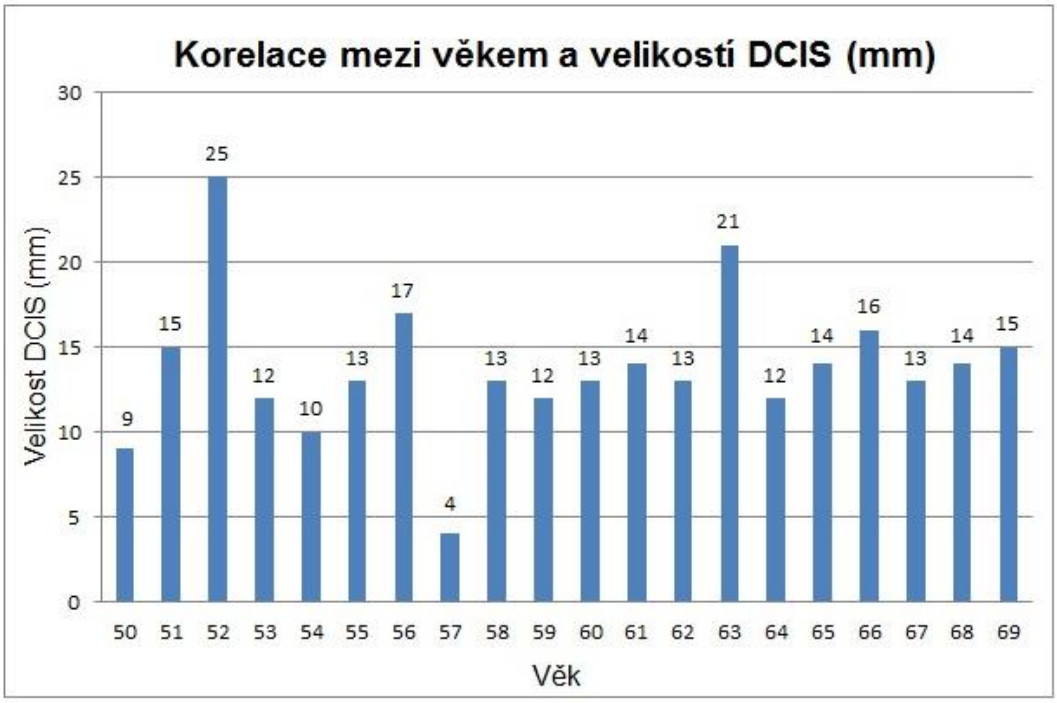


Obr. 24 Homogenní rozložení počtu pacientek v závislosti na věku.

10.4.2 Korelace věku s charakteristikami DCIS

Existují studie zabývající se korelací věku a histologickým vlastnostmi DCIS [Goldstein N.S. et al., 2000, Daly M.B., 2006, Collins L.C. et al., 2009]. Výsledky některých z nich naznačují, že u mladších žen jsou ložiska DCIS extenzivnější než u žen starších. Například ve studii Collinsové, kde byly pacientky stratifikovány podle věku do 4 skupin (<45, 45–54, 55–64, ≥65 let) byly zjištěny výsledky (měřeno v *low power fields*): 18,6; 14,2; 10,8; resp. 11,3 (p<0,001) [Collins L.C. et al., 2009]. V naší analýze se tyto závěry nepotvrdily (obr. 25).

Výsledky studií srovnávající věk a *grade* nejsou koherentní. Goldstein rozdělil pacientky podle věku do 3 skupin (<45, 45-59, ≥60) a zjistil, že DCIS u mladších žen častěji vykazuje vysoký *grade* a centrální nekrózu oproti DCIS u pacientek starších (*high-grade*: 69%, 60%, 39%; p=0,003 a nekróza: 72%, 62%, 44%; p=0, 01). Prokázal tak signifikantně vyšší *grade* u mladších pacientek ve srovnání se ženami staršími [Goldstein N.S. et al., 2000]. Jiné práce nezjistily žádné rozdíly v *gradu* napříč celým věkovým spektrem [Collins L.C. et al., 2009]. V našem vzorku byla distribuce *gradu* ve vztahu k věku pacientky rovnoměrná (průměr *low-grade* 60,5 let, průměr *intermediate-grade* 61 let a průměr *high-grade* 61 let).



Obr. 25 Homogenní distribuce velikosti DCIS (mm) v závislosti na věku. V naší analýze se nepotvrdil předpoklad, že u mladších žen jsou ložiska DCIS extenzivnější než u žen starších.

10.4.3 Imunohistochemie

V této studii jsme potvrdili výsledky [Daly M.B., 2006; Zhang W. et al., 2012] prokazující pozitivitu hormonálních receptorů ve tkáni DCIS v rozmezí 60 – 78%. Korelaci mezi expresí ER, PgR nebo HER2 ve vztahu k věku pacientky doposud žádná publikovaná studie neprokázala [Collins L.C. et al., 2009].

Míra zvýšené exprese proteinu HER2 bývá ve studiích popisována mezi 50-65% [Allred D.C. et al., 1992, Zhang W. et al., 2012]. V naší kohortě jsme HER2 pozitivitu zjistili pouze ve 32,9%. Tento významný rozdíl může být způsoben příliš malým vzorkem. Analýza HER2 byla provedena pouze v 79 případech z celkových 250 (31,6%).

10.4.4 Axilární staging

Frekvence uzlinových metastáz v případě DCIS je v literatuře popisována mezi 1 – 7%. Metoda axilárního *stagingu* přitom nehraje roli [Zavagno G. et al., 2005; Zhang W. et al., 2012]. V této naší studii jsme neprokázali uzlinové metastázy u žádné z 58 pacientek, u kterých byly axilární uzliny vyšetřovány. Tento výsledek potvrzuje, že nález uzlinových metastáz je v případě čistého DCIS jev velmi vzácný.

11. SROVNÁVACÍ ANALÝZA

11.1 Úvod

V experimentální části disertační práce byly na vlastním vzorku tkání vyšetřeny některé z biomarkerů, jež mohou být asociovány s prognózou zhoubného onemocnění prsní žlázy. Podstatou experimentu byla srovnávací analýza příslušného markeru na různých typech tkáně (zdravá tkáň prsní žlázy, vzorek DCIS, tkáň invazivního karcinomu prsní žlázy) a popis rozdílů či shod mezi těmito vzorky.

11.2 Rozvaha

Pro pokus byl vybrán panel pěti biomarkerů. Jednalo se o geny, případně jejich proteinové produkty: BRCA1, BRCA2, p53, VEGF a Bcl-2. Při výběru těchto markerů byla zohledněna jejich role v buněčných pochodech, které vedou ke vzniku a dále k progresi zhoubného onemocnění prsní žlázy (signalizace buněčného růstu a dělení, vnitřní a vnější cesta aktivace apoptózy, oprava DNA, angiogeneze).

11.2.1 BRCA1

Bílkovinný produkt zdravého genu BRCA1 hraje klíčovou roli při aktivaci vnitřní cesty apoptózy [Duncan J.A. et al., 1998]. Důvodem k iniciaci programované smrti buňky může být např. ireverzibilní poškození DNA nebo narušení struktury mitotického vřeténka.

11.2.2 BRCA2

Proteinový produkt BRCA2 je důležitou součástí komplexu, který se váže na dvouvláknové zlomy (poruchy) DNA a je schopen je opravit mechanismem tzv. homologní rekombinace [Duncan J.A. et al., 1998]. Poškození proteinu BRCA1 nebo BRCA2 vede k přežívání buněk s vadnou genetickou informací, k hromadění těchto poruch v buňce a v konečném důsledku k přeměně zdravé buňky v buňku nádorovou.

Mutace genů BRCA1/BRCA2 se kromě karcinomu ovária a invazivního karcinomu prsu podílí i na vzniku DCIS. U žen s prokázanou mutací BRCA1/BRCA2 se preinvazivní léze vyskytují v signifikantně mladším věku (cca 10 - 15 let) v porovnání s v normální populací. Prevalence mutací BRCA1/BRCA2 v populaci pacientek s preinvazivními lézemi prsní žlázy se pohybuje mezi 4 - 6%. Pro srovnání u pacientek s invazivním karcinomem prsní žlázy je četnost mutací o málo vyšší, cca 5 - 8% [Pavlišta D., 2008]. Jasné dosud není, zda přítomnost mutace BRCA1/BRCA2 nějak ovlivňuje prognózu pacientky s invazivním karcinomem (ve srovnání se sporadickým karcinomem). Stejně tak neexistují ani data a souvislosti mezi mutací genu a rizikem lokální rekurence DCIS.

11.2.3 p53

TP53 je označení pro tumorsupresorový gen lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozomu. Jeho produkt, protein p53, hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a v indukci kontrolované buněčné smrti – apoptózy (obr. 26) [Nag S. et al., 2014].

Mutace genu lze vystopovat ve většině solidních nádorů. Produktem mutovaného genu je nefunkční protein, který ovšem může zpětnovazebně blokovat svoji degradaci ve tkáni. Imunohistochemický průkaz vysoké exprese p53 (pozitivita p53) je tedy nepřímou známkou mutace genu resp. nefunkčnosti proteinu [Nag S. et al., 2014].

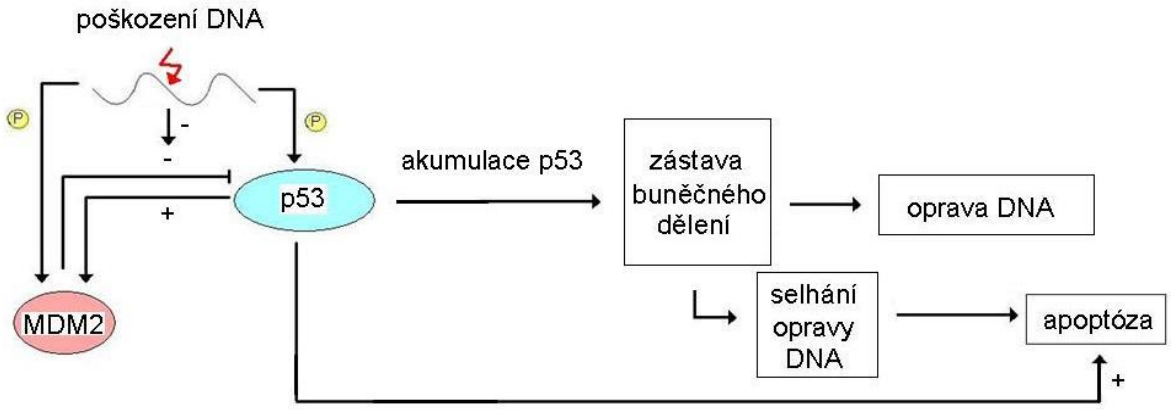
K mutaci p53 dochází zřejmě již časně v průběhu kancerogeneze, imunohistochemická pozitivita p53 byla zdokumentována již v terénu ploché epiteliální atypie (FEA) a její frekvence dále stoupá u DCIS [Abdel-Fatah T.M. et al., 2008]. Lariová ve své přehledové práci identifikovala 17 studií, které vyšetřovaly četnost exprese p53 ve vzorcích DCIS. *Cut-off* hodnota pro pozitivitu p53 se mezi jednotlivými studiemi lišila a pohybovala se v širokém intervalu mezi 5 - 25%. Průměrná pozitivita p53 byla 41,4% (rozmezí 11,3% - 88%). Pozitivitu p53 častěji vykazovaly vzorky s komedonovou nekrózou a *high-grade* DCIS [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Souvislost mezi průkazem exprese p53 a rizikem lokální rekurence DCIS se podařilo prokázat třem autorům.

Ringbergová navrhla CBI-7, ve kterém bylo obsaženo celkem 7 biomarkerů. Fenotyp vykazující pozitivitu p53 v kombinaci s negativitou estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PgR), overexpresí HER2, nízkou Bcl-2 expresí, nondiploidií a vysokou expresí Ki67 byl asociován s významně zvýšeným rizikem lokální rekurence (RR = 1,3; 95% CI: 1,0 – 1,6; p=0,051) [Ringberg A. et al., 2001].

Hiekenová měla k dispozici skupinu 34 pacientek léčených pouze BCS a 41, které absolvovaly i adjuvantní RT. Protein p53 byl exprimován u 63% žen s recidivou a u 24% žen bez recidivy (p=0,03). Autoři tak předkládají důkaz, že pozitivita p53 představuje rizikový faktor ipsilaterální rekurence [Hieken T.J. et al., 2001].

Podobně i de Roos prokázal, že p53 představuje individuální rizikový faktor lokální recidivy a to jak pro invazivní karcinom tak i pro DCIS (HR = 3,0; 95% CI: 1,1 – 8,2; p = 0,036) [de Roos M.A. et al., 2007].



Obr. 26 Funkce tumorsupresoru p53. Poškození DNA vede k fosforylaci jak proteinu p53, tak jeho inhibitoru MDM2. Tím je blokována vazba MDM2 na p53. Odblokování inhibice p53 vede k nárůstu koncentrace aktivní molekuly p53, v důsledku čehož dojde k zástavě buněčného dělení a buňka získá čas na opravu poškozené genetické informace. V případě ireverzibilní poruchy DNA spustí p53 programovanou buněčnou smrt - apoptózu (podle Theobald M. a Offringa R., 2003).

11.2.4 Bcl-2

Zkratkou Bcl-2 označujeme buď konkrétní gen resp. jeho produkt protein Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) a nebo se jedná o pojmenování celé velké rodiny regulátorů apoptózy, kam patří jak řada proapoptotických proteinů (např. Bax, Bak, Bad aj.), tak i antiapoptotické působky (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w aj.) (obr. 27). Tyto proteiny hrají klíčovou roli v intracelulárních kaskádách, na jejichž konci dochází k aktivaci proteolytických enzymů kaspáz a buňka zaniká programovanou smrtí – apoptózou. Pro- a antiapoptotické regulátory (např. Bax a Bcl-2) mohou tvořit heterodimery a tak se navzájem neutralizovat. Rovnováha mezi oběma skupinami nakonec určí osud buňky. Převáží-li antiapoptotický vliv regulátorů, jak je tomu například při zvýšené expresi Bcl-2, dojde k poruše spouštění apoptózy, což představuje důležitý krok na cestě ke vzniku nádorové buňky [Löffler G. et al., 2007].

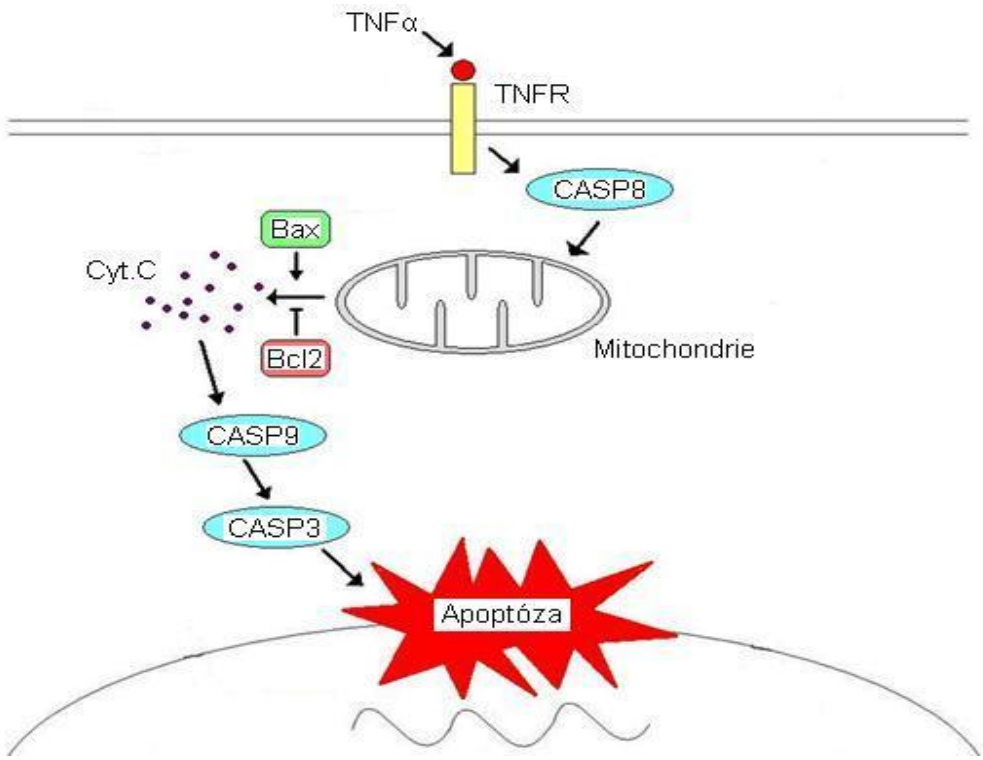
Onkogenní potenciál Bcl-2 byl poprvé ověřen na vzorcích non-hodgkinského lymfomu. Exprese proteinu zde byla spojena s nepříznivou prognózou onemocnění [Tsujimoto Y. et al., 1984]. U časných invazivních nádorů prsní žlázy, kde byl Bcl-2 již také identifikován jako individuální prognostický biomarker, byla exprese Bcl-2 naopak asociována s příznivou prognózu [Dawson S.J. et al., 2010]. Tento paradoxní jev je vysvětlován neapoptotickými vedlejšími účinky Bcl-2, zejména schopností zastavit růst buněk. Pietenpolová například pozorovala *in vitro* inhibici růstu buněčných linií různých solidních nádorů pod vlivem Bcl-2 [Pietenpol J.A. et al., 1994]. Další teorie, snažící se vysvětlit příznivý efekt zvýšené exprese Bcl-2, předpokládá poruchu rovnováhy mezi jednotlivými členy Bcl-2 rodiny, která ve svém důsledku vede ke zvýšené expresi proapoptotických faktorů [Cory S. et al., 2003].

Podle Lariové byla na vzorcích DCIS zjištěna pozitivita Bcl-2 v rozmezí mezi 48 – 58,8% (průměr 55,4%). Ve zmíněných studiích se *cut-off* hodnota pro pozitivitu Bcl-2 pohybovala mezi 5 – 10% [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Ve shodě s pozorováními na tkáních invazivních nádorů prsu byla i u DCIS asociována exprese Bcl-2 s řadou dalších příznivých biomarkerů: *low-grade*, expresí ER a PgR nebo negativitou HER2 [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Při studiu souvislostí mezi expresí Bcl-2 a rizikem rekurence se podařilo Provenzanové potvrdit tento regulátor apoptózy jako individuální prognostický faktor. Pacientky, které onemocněly ipsilaterální recidivou byly signifikantně častěji Bcl-2 negativní v porovnání s pacientkami, které zůstaly zdravé (66% vs. 26%; p=0,003; OR = 0,18) [Provenzano E. et al., 2003].

Ringbergová naproti tomu prokázala prognostickou hodnotu exprese Bcl-2 pouze v kombinaci s dalšími biomarkery jako tzv. *Cell Biological Index* (CBI-7) (RR = 1,3; 95% CI: 1,0 – 1,6; p=0,051) [Ringberg A. et al., 2001].



Obr. 27 Reakce vedoucí k aktivaci apoptózy. O osudu buňky rozhodne rovnováha mezi proapoptotickými (např. Bax) a antiapoptotickými (např. Bcl-2) faktory. K aktivaci apoptózy může dojít buď vnitřní (např. v důsledku poškození DNA) nebo vnější (např. aktivací TNFR) cestou. Zvýšená permeabilita mitochondriální membrány vede k úniku cytochromu C do cytosolu. Cytochrom C se podílí na kaskádovité aktivaci výkonných enzymů apoptózy – kaspáz. TNFα – *tumor necrosis factor α*, TNFR – receptor pro *tumor necrosis factor*, CASP – kaspáza, Cyt.C – cytochrom C (podle Hulo C. et al., 2011).

11.2.5 VEGF

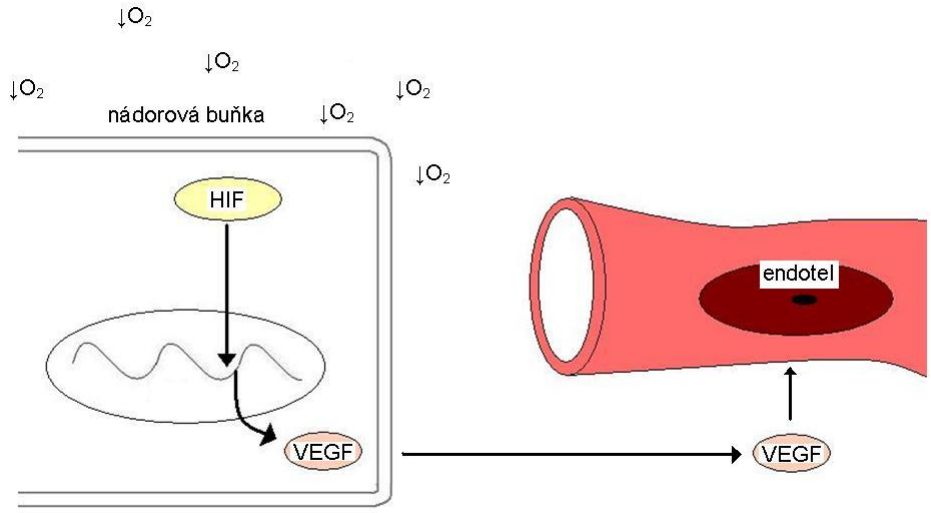
Vascular endothelial growth factor (VEGF) je růstový faktor, který hraje důležitou roli v nádorem indukované angiogenezi. Invazivně rostoucí nádor se totiž záhy dostává do stavu hypoxie, když stávající kapilární řečiště není schopné zajistit dostatečnou oxygenaci. Aby mohl nádor dále růst, je třeba aktivovat tvorbu nových cév. Nedostatek kyslíku spustí v nádorových buňkách tvorbu hypoxií indukovaného faktoru (HIF). Tento transkripční faktor pak indukuje expresi signální molekuly VEGF. Vazbou na receptor s tyrosinkinázovou aktivitou může VEGF stimulovat endotelové buňky a tak indukovat angiogenezi (obr. 28) [Al-Salam S. et al., 2012].

K léčbě některých typů solidních nádorů je dnes indikována biologická léčba využívající principu blokování angiogeneze. Monoklonální protilátka bevacizumab (Avastin® , Roche) se po i.v. podání váže na cirkulující VEGF a takto jej neutralizuje, komplex bevacizumab/VEGF totiž není schopen aktivovat receptor a je z těla vyloučen [Levene A.P. et al., 2005].

Zvýšená vaskularizace byla pozorována u všech typů *in situ* lézí prsní žlázy. Ve dvou experimentech byla zjišťována míra exprese VEGF. Při shodné *cut-off* hodnotě pozitivity 10% byla zjištěna míra exprese 86% resp. 93,8% [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Studie zkoumající korelaci exprese VEGF s histomorfologickými charakteristikami DCIS nebyly identifikovány [Lari S.A. a Kuerer H.M., 2011].

Hiekenová zkoumala vztah mezi expresí VEGF a rizikem lokální rekurence. Pacientky, které onemocněly recidivou, vykazovaly v této práci častěji expresi VEGF než pacientky, které zůstaly zdravé. Rozdíl ovšem nebyl statisticky signifikantní a VEGF se tedy jako prognostický faktor nepotvrdil [Hieken T.J. et al., 2001].



Obr. 28 Způsob, jakým nádorová buňka ovlivňuje tvorbu nových cév (tzv. nádorem indukovaná angiogeneze). Za stavu hypoxie dojde v maligní buňce k akumulaci HIF. Tento transkripční faktor zvýší expresi VEGF, který má schopnost parakrinně stimulovat proliferaci endotelových buněk. HIF – hypoxií indukovaný faktor, VEGF – *vascular endothelial growth factor.*

Zmíněných pět biomarkerů tedy představuje molekuly, které hrají klíčové role v různých fázích iniciace onkogeneze a následné progrese prekancerózy v invazivní karcinom. V tomto experimentu jsme se rozhodli metodou ztráty heterozygozity (*loss of heterozygosity* – LOH) vyšetřit inaktivaci genů p53, BRCA1 a BRCA2 a dále metodou *real-time* PCR analyzovat genovou expresi Bcl-2 a VEGF.

11.3 Metodika

11.3.1 Sběr a příprava vzorků

Vzorky určené k vyšetření pocházely od pacientek operovaných na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN. Resekát prsu s nádorem byl bezprostředně po odebrání na operačním sále zmrazen a odeslán k dalšímu vyšetření na Ústav patologie 1.LF UK a VFN. Pro analýzu byly použity pouze vzorky, v nichž bylo zastoupení nádorových buněk větší než 50%. Patologem byly vyhledány a k následné analýze připraveny vzorky duktálního *carcinoma in situ* (n=25), vzorky invazivního karcinomu prsní žlázy (n=42) a vzorky morfologicky zdravé, nádorem nepostižené tkáně prsní žlázy (n=65).

11.3.2 Izolace RNA

11.3.2.1 Izolace RNA ze zmražené tkáně

K izolaci celkové buněčné RNA ze zmražené tkáně byl použit komerční kit RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen, SRN). Zmražená tkáň byla uchovávána ve stabilizačním roztoku RNAlater (Qiagen, SRN) při -80°C. Po vyjmutí nádoru z hlubokomrazícího boxu z něj byla za sterilních podmínek skalpelem oddělena částka odpovídající hmotnosti cca 20-30 mg a přenesena do zvážené 1,5 ml zkumavky. Poté byl vzorek se zkumavkou převážen, tkáň byla mechanicky homogenizována, a vzorek byl smíšen s lyzačním pufrem s přídavkem β-merkaptoetanolu. Dále bylo postupováno dle instrukcí výrobce.

11.3.2.2 Kontrola množství izolované RNA

Koncentrace izolované RNA byla změřena spektrofotometricky při vlnových délkách 260 a 280 nm. Integrita získané RNA byla ověřena elektroforézou na 1% agarózovém gelu (UltraPure Agarose, Gibco) barveném etidiumbromidem (Amresco) v 1 x TBE pufru 90 minut při 75 V. Izolovaná RNA byla dále skladována v mrazícím boxu při -80°C.

11.3.3 Příprava cDNA

Z izolované celkové buněčné RNA byla bezprostředně po její izolaci metodou reverzní transkripce připravena komplementární DNA (cDNA), která sloužila jako templát pro analýzu exprese genů Bcl-2 a VEGF.

1 µg celkové buněčné RNA byl inkubován při 65°C po dobu 10 min v 200µl mikrozkumavce se 100 ng směsi nahodilých primerů (*random hexanucleotides*) (Roche Molecular Biochemicals). Celkový objem reakce činil 50µl. Ihned po inkubaci byl vzorek rychle zchlazen na ledu a poté inkubován při 30°C 10 min a při 45°C 45 min ve 20 µl směsi obsahující 1x RTPCR pufr (Roche Molecular Biochemicals), 10 mM DTT, 1 mM dNTPs a 20 U Expand reverzní transkriptázy (Roche Molecular Biochemicals).

11.3.4 Izolace DNA

11.3.4.1 Izolace DNA ze zmražené tkáně

K izolaci DNA ze zmražené tkáně byl použit komerční kit QIA Amp DNA Tissue Mini Kit (Qiagene, SRN). Po vyjmutí vzorku tkáně z hlubokomrazícího boxu byla z nádoru za sterilních podmínek skalpelem oddělena částka odpovídající hmotnosti cca 100-200 mg a přenesena do zvážené 1,5 ml zkumavky. Poté byl vzorek se zkumavkou převážen, skalpelem rozkrájen na drobné části a opět ve zkumavce smíšen s odpovídajícím množstvím lyzačního pufru a proteinázy K. Dále bylo postupováno dle instrukcí výrobce.

11.3.4.2 Kontrola množství izolované DNA

Koncentrace izolované DNA byla změřena spektrofotometricky při vlnových délkách 260 a 280 nm. Integrita získané DNA byla ověřena elektroforézou na 1% agarózovém gelu (UltraPure Agarose, Gibco BRL) barveném etidiumbromidem (Amresco) v 1 x TBE pufru 90 minut při 75 V. DNA byla dále uchovávána v 1,5 ml zkumavkách při +4°C.

11.3.5. Expresní analýza

Analýza exprese genů Bcl-2 a VEGF byla provedena metodou kvantitativní *real-time* PCR (qPCR) a kvantifikována softwarovým nástrojem REST (*Relative Expression Software Tool*) 2008 verze 2.0.7 (Corbett Research Pty. Ltd.) [Pfaffl M.W., 2001; Pfaffl M.W. et al., 2002].

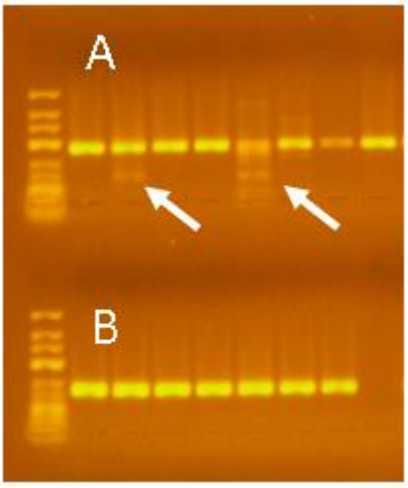
11.3.5.1 Princip real-time PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (*real-time* PCR nebo qPCR) je laboratorní metoda založená na principu klasické polymerázové řetězové reakce (*polymerase chain reaction* - PCR). Oproti klasické PCR ovšem qPCR umožňuje nejen amplifikaci (množení kopií určitého úseku DNA), ale zároveň i simultánní kvantifikaci sledovaného úseku nukleové kyseliny. Při qPCR je totiž zaznamenáván průběh každého cyklus PCR ve skutečném čase (*real-time*). K detekci průběhu amplifikace (množství produktu v čase) se používají fluorescenčně značené sondy, které se váží na amplifikované úseky DNA. Kvantifikace reakce se provádí většinou relativně, tj. neměří se absolutní množství kopií genu, ale srovnává se s množstvím referenčního genu (většinou ze skupiny tzv. *housekeeping genes* –

genů, které jsou bohatě exprimovány prakticky ve všech buňkách těla) [Pfaffl M.W. et al., 2002].

11.3.5.2 Real-time PCR

V našem experimentu probíhala qPCR v 10µl reakční směsi, která obsahovala 1 µl cDNA, 4 pmol každého příslušného primeru a nespecifickou flourescenční sondu SybrGreen LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). Amplifikace byla provedena na přístroji LightCycler 2.0 (Roche) dle instrukcí výrobce. qPCR byla započata iniciální denaturací (95°C 10 min), po níž následovalo 45 amplifikačních cyklů (95°C 10 sec, 60°C/66°C 10 sec, 72°C 10 sec). Kontrola specifičnosti amplifikační reakce byla provedena analýzou denaturace (*melting analysis*) (72-95°C) a elektroforézou na agarózovém gelu na konci každé qPCR (obr. 29). Pro všechny amplikony byly provedeny negativní kontroly. Pro každý amplikon byly připraveny kalibrační křivky naředěním kontrolní cDNA (tab. 15). Účinnost qPCR byla analyzována softwarovým nástrojem REST 208 verze 2.0.7. K relativní kvantifikaci analyzovaných genů srovnáním s referenčním genem (*housekeeping gene*) pro kolagen typ II alfa 1 (COL2A1) byla využita softwarová aplikace qGENE.



Obr. 29 Kontrolní elektroforéza v agarózovém gelu k posouzení kvality (a specificity) produktu po proběhlé qPCR. A – COL2A1, B – VEGF. Šipka označuje reakce, v nichž vznikají nespecifické produkty – tyto reakce je nutné opakovat. Bez provedení této kontroly kvality by byla v některých případech získána zavádějící data.

cDNA [ng]	CP [referenční gen] COL2A IA	CP [cílový gen 1] COL2A IB	CP [cílový gen 2] COL2A IIA	CP [cílový gen 3] COL2A IIB
200	21,565	21,220	21,620	21,575
100	22,165	22,025	22,665	22,680
50	22,500	22,940	23,800	23,605
25	24,555	24,230	24,735	24,665
10	24,435	24,680	23,975	26,135
1	29,705	29,820	30,375	28,580
0,1	32,960	33,000	33,000	32,950
s	-3,61	-3,68	-3,53	-3,33
E	1,89	1,87	1,92	2,00
korelace	-0,99	-0,99	-0,98	-1,00

Tab. 15 Příklad konstrukce kalibrační křivky pro qPCR. cDNA = komplementární DNA, CP = *crosing point* (průsečík), COL2A = kolagen typ 2 alfa, s = *slope* (sklon křivky), E = *efficiency* (výtěžnost).

VEGF	
forward	5′-CGC GAA GCT TCC ACC ATG GAC TTT CTG CTC TCT TGG GT-3′
reverse	5′-CGC GGA TAT CAC CGC CTT GGC TTG TCA CA-3′
Bcl-2	
forward	5´-AAG CGG TCC CGT GGA TAG A-3´
reverse	5′-TCC GGT ATT CGC AGA AGT CC-3´
COL2A1	
forward	5´-TCT AAC AAT TAT AAA CTC C-3´
reverse	5´-GGG AAG ATG GGA TAG AAG G-3´

Tab. 16 Sekvence primerů využitých pro amplifikaci v rámci *real-time* PCR.

K amplifikaci genů VEGF [May D. et al., 2005] a Bcl-2 [Bourgarel-Rey V. et al., 2009] byly využity primery již dříve zmíněné v literatuře (tab. 16). Primery pro gen COL2A1 byly připraveny firmou Generi Biotech, ČR.

Změny v expresi vyšetřovaných genů, vyjádřené výtěžností qPCR pro každou reakci, byly analyzovány softwarem REST 2007 verze 2.0.7. Výsledky měly podobu průměrné míry exprese včetně 95% konfidenčního intervalu pro příslušný cílový gen.

11.3.6. Analýza ztráty heterozygozity

11.3.6.1 Mikrosatelitární markery

Jako mikrosatelitární markery (*short tandem repeats* - STRs) jsou označovány úseky DNA, v nichž se opakovaně za sebou vyskytuje jedno až šesti bázový motiv. Celková délka takové sekvence je do několika set párů bází. Mikrosatelitární markery jsou velmi frekventní, jeden připadá zhruba na 6 kb genomické sekvence. Pro svou vysokou heterozygozitu jsou mikrosatelitové markery využívány v mnoha aplikacích [Zikán M., 2009]. V naší studii jsme je použili pro analýzu ztráty heterozygozity. Jako informativní byl označen marker, pro nějž byla pacientka heterozygotní. V případě homozygozity se jednalo o neinformativní marker. Ztráta heterozygozity (*loss of heterozygosity* - LOH) v nádoru byla posuzována vzájemným srovnáním intenzity alel ve zdravé a nádorové tkáni podle vzorce (At x Bn)/(Bt x An), přičemž A a B je označení alel, t = tumor (nádorová tkáň) a n = *normal* (zdravá tkáň). LOH byla přítomna, pokud byla intenzita předpokládané deletované alely snížena na méně než 50 % (posuzováno podle plochy pod křivkou).

11.3.6.2 Amplifikace mikrosatelitárních markerů.

K analýze pro úsek každého z genů BRCA1/BRCA2 byly zvoleny tři mikrosatelitární markery, pro oblast genu p53 markery dva. Všechny markery pro gen BRCA1 a jeden marker pro gen p53 byly intragenové (součást vlastního genu), jeden marker pro gen *p53* a tři markery pro gen *BRCA2* hraničící (*flanking*). Vzdálenost markeru D13S169 od začátku kódující sekvence genu *BRCA2* (*up-stream*) byla 284,5 kb, a markerů D13S1699 a D13S1701 od konce kódující sekvence genu *BRCA2* (*down-stream*) 550 kb a 171 kb, vzdálenost markeru TP02 od konce kódující sekvence genu *p53* byla 27 kb. Amplifikace byla provedena pomocí PCR.

11.3.6.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace genomových fragmentů probíhala ve 12,5 µl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM každého primeru, 0,5 U LA Taq DNA polymerázy (Takara Shuzo Co., Japonsko) a 30-50 ng genomické DNA. Amplifikační cyklus se skládal z iniciační denaturace (93°C 2min), po níž

následovalo 32 cyklů (93°C 1min, 58°C 1min, 72°C 4 min) a závěrečná elongace 5 min při 72°C. Použité primery a délku amplikonu uvádí tabulka 17.

11.3.6.4 Analýza mikrosatelitárních markerů

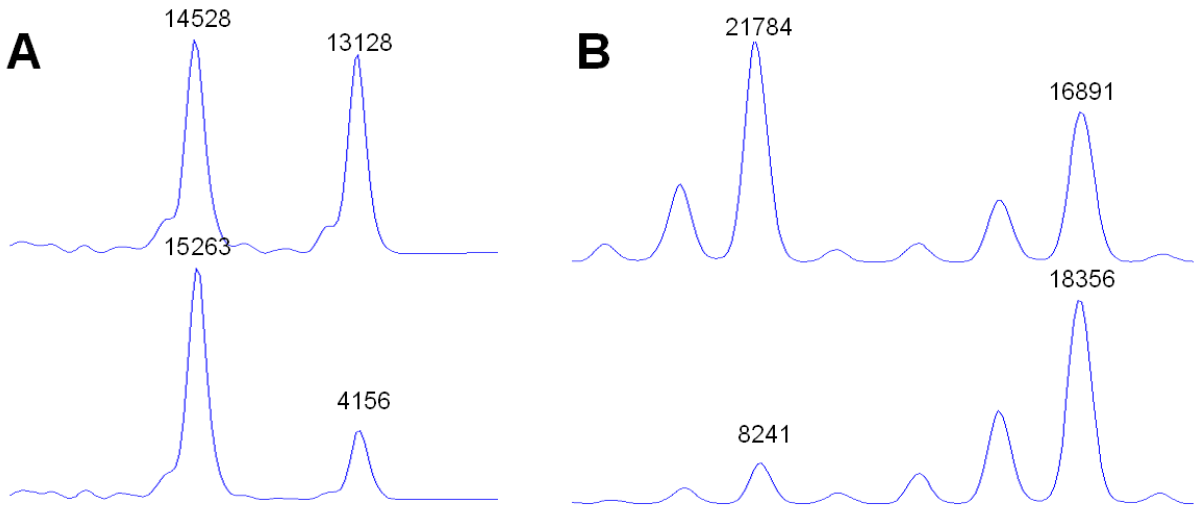
Pro analýzu mikrosatelitárních markerů byla použita metoda fragmentační analýzy na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 310. Pro analýzu na automatickém sekvenátoru byly *forward* primery na 5‘ konci fluorescenčně označeny pomocí FAM. 0,5 – 1 µl PCR produktu byly smíseny s 10,5 µl formamidu a 0,5 µl velikostního standardu TAMRA. Směs byla denaturována 2 min při 95°C a ihned ochlazena na 4°C v předchlazeném kovovém bločku. Elektroforéza probíhala za denaturujících podmínek dle pokynů výrobce ve 47 cm kapiláře plněné polymerem POP-4. Ztráta heterozygosity byla hodnocena jako snížení plochy pod křivkou o více než 50% ve srovnání se zdravou tkání pomocí softwaru GeneScan (Applied Biosystems, USA) (obr. 30).

11.3.7 Statistická analýza

Statistická analýza změn genové exprese byla provedena pomocí *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*, který je součástí softwarového nástroje REST 2008 verze 2.0.7. Ke srovnání a korelaci dat byl využit buď jednovýběrový t-test nebo Mann-Whitneyův test a Spearmanův korelační koeficient. Prah statistické signifikance byl stanoven na $p<0,05$.

Název	Sekvence (5´- 3´)	Pozice v genomové DNA	Intron	Délka repetice a amplikonu
Gen BRCA1				
D17S1323F	TAGGAGATGGATTATTGGTG	42555-42574	12	2 bp
D17S1323R	AAGCAACTTTGCAATGAGTG	42685-42704		149-161 bp
D17S1322F	CTAGCCTGGGCAACAAACGA	69171-69190	19	3 bp
D17S1322R	GCAGGAAGCAGGAATGGAAC	69273-69293		119-131 bp
D17S855F	ACACAGACTTGTCCTACTGCC	75856-75876	20	2 bp,
D17S855R	GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG	75990-76010		143-157 bp
Gen BRCA2				
D13S1699F	AGACAGAGAATCTCAACTGG	280294-280313	-	2 bp
D13S1699R	TTTGATTTTCACAGCAGATG	280444-280425		240 bp
D13S1701F	GAATGTCGAAGAGCTTGTC	818761-818780	-	4 bp
D13S1701R	AAACATACGCTTAGCCAGAC	819051-819032		300 bp
D13S1695F	AGAATCATTGCCCTACTTA	1197781-1197799	-	4 bp
D13S1695R	GATAACTTACCAGCATGTGA	1198020-1198001		150 bp
Gen p53				
TP01F	ACAAAACATCCCCTACCAAACAGC	6423563-6423586	10	5 bp
TP01R	AAGAGCTGAGACTCCGTCTCAAAAT	6423676-6423652		105-120 bp
TP02F	AGGGATACTATTCAGCCCGAGGTG	6458424-6458447	-	2 bp
TP02R	ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC	6458533-6458512		110 bp

Tab. 17 Sekvence primerů použitých pro amplifikaci mikrosatelitových markerů. Pro fragmentační analýzu na automatickém sekvenátoru byly *forward* primery fluorescenčně značeny (FAM).



Obr. 30 Příklad ztráty heterozygozity (LOH) při fragmentační analýze fluorescenčně značených amplifikátů na přístroji ABI PRISM 310. A = marker TP01, B = marker D17S855. Čísla na vrcholy křivky popisují plochu pod křivkou. Přídatné vrcholky jsou tzv. *stutter bands* vznikající jako nespecifity amplifikační reakce. Horní křivka – analýza DNA izolované ze zdravé tkáně, dolní křivka – analýza DNA z nádoru.

11.4 Výsledky

Dvěma různými molekulárně biologickými metodami – analýzou LOH a *real-time* PCR – byla provedena srovnávací studie molekulárně genetického profilu tří rozdílných tkání: zdravé prsní tkáně (n=65), DCIS (n=25) a tkáně invazivního karcinomu prsní žlázy (n=42).

11.4.1 Výsledky analýzy ztráty heterozygozity

Analýza byla provedena ve třech tumorsupresorových genech – *BRCA1*, *BRCA2* a *p53* – za použití intragenových a sousedících (flanking) mikrosatelitových markerů.

V ojedinělých přápadech nastala situace, že pacientka byla pro daný marker homozygotní, tento byl označen jako neinformativní a nebyl hodnocen. V případě heterozygozity se jednalo o marker tzv. informativní. Celková heterozygozita (informativnost) se pohybovala mezi 84 % a 95,24 %.

Na vzorcích invazivního karcinomu v markerech pro alelickou ztrátu v oblasti genu BRCA1 nebyly informativní čtyři pacientky (9,52 %), v oblasti BRCA2 a p53 vždy po dvou pacientkách (4,76 %). Na vzorcích DCIS v markerech pro oblast genu BRCA1 nebyly informativní dvě pacientky (8%), v oblasti BRCA2 čtyři pacientky (16%) a pro oblast genu p53 tři pacientky (12%). V nepostižené prsní tkáni v markerech pro alelickou ztrátu v oblasti genu BRCA1 nebylo informativních 6 pacientek (9,23%), v oblasti BRCA2 čtyři pacientky (6,15%) a pro oblast p53 pět pacientek (7,69%).

Na vzorcích invazivního karcinomu byla v oblasti genu BRCA1 zjištěna ztráta heterozygozity ve 44,74% (17/38 informativních vzorků), v oblasti genu BRCA2 ve 45% (18/40 informativních vzorků) a v oblasti genu p53 ve 32,5% (13/40 informativních vzorků). V terénu DCIS byla v oblasti genu BRCA1 zjištěna ztráta heterozygozity ve 8,70% (2/23 informativních vzorků), v oblasti genu BRCA2 ve 9,25% (2/21 informativních vzorků) a v oblasti genu p53 ve 31,82% (7/22 informativních vzorků). Ve zdravé tkáni prsní žlázy nebyla zachycena žádná ztráta heterozygozity (59 informativních vzorků pro BRCA1, 61 pro BRCA2 a 60 pro gen p53). Výsledky analýzy ztráty heterozygozity pro jednotlivé mikrosatelitární markery jsou uvedené v tabulce 18.

BRCA1	**D17S855**	**D17S1322**	**D17S1323**
invazivní karcinom	16/36	12/30	10/28
DCIS	2/23	1/17	0/12
BRCA2	**D13S1695**	**D13S1699**	**D13S1701**
invazivní karcinom	10/37	12/26	14/38
DCIS	0/19	1/17	2/20
p53	**TP01**	**TP02**	
invazivní karcinom	11/38	6/35	
DCIS	5/19	6/20	

Tab. 18 Přehled výsledků analýzy ztráty heterozygozity pro jednotlivé mikrosatelitární markery.

Četnost informativních vzorků odpovídala očekávání a údajům o frekvenci heterozygozity odpovídajících mikrosatelitních markerů (tab. 19).

11.4.2 Výsledky analýzy genové exprese

Analýza genové exprese prokázala u obou studovaných genů změny exprese v závislosti na typu vyšetřované tkáně. VEGF byl ve vzorcích invazivního karcinomu prsní žlázy nadměrně exprimován ve 14,3% (6/42) a ve tkáni DCIS s četností 12,0% (3/25). Zvýšená exprese genu Bcl-2 byla pozorována v 11,9% (5/42) v případě invazivního karcinomu a v 8,0% (2/25) v případě DCIS (tab. 20).

	Invazivní karcinom		DCIS		Statistická signifikance
BRCA1	44,74%	(17/38)	8,7%	(2/23)	p=0,026
BRCA2	45,0%	(18/40)	9,52%	(2/21)	p=0,036
p53	32,5%	(13/40)	31,82%	(7/22)	p=0,97

Tab. 19 Výsledky analýzy ztráty heterozygozity (LOH) pro oblast genů BRCA1, BRCA2 a p53 na vzorcích invazivního karcinomu prsní žlázy a duktálního *carcinoma in situ* (DCIS). Na vzorku zdravé prsní tkáně nebyla zjištěna žádná LOH. Procentuální výsledky jsou vztaženy na všechny informativní vzorky (viz text).

	Invazivní karcinom		DCIS		Statistická signifikance
VEGF	14,3%	(6/42)	12,0%	(3/25)	p=0,79
Bcl-2	11,9%	(5/42)	8,0%	(2/25)	p=0,61

Tab. 20 Overexprese genů VEGF a Bcl-2 zjištěná na vzorcích invazivního karcinomu prsní žlázy a duktálního *carcinoma in situ* (DCIS).

11.5 Shrnutí výsledků

Četnost LOH byla pro oba geny BRCA1 a BRCA2 signifikantně vyšší pro invazivní karcinom prsní žlázy ve srovnání se vzorky DCIS (p=0,026 resp. p=0,036). Pro rozdíl četnosti LOH pro gen p53 statistická signifikance dosažena nebyla (p=0,97).

Rozdíl v expresi genu VEGF a Bcl-2 nebyl při srovnání invazivního karcinomu prsní žlázy a DCIS statisticky signifikantní (p=0,79 resp. p=0,61).

11.6 Diskuze

Ztráta kontroly nad integritou genomu, ztráta schopnosti aktivovat apoptózu a vystupňovaná angiogeneze jsou některé z rizikových faktorů onkogeneze a invazivního růstu.

Ztráta kontroly nad integritou genomu a nemožnost opravit poškozenou DNA jsou klíčovou podmínkou vzniku mutací, které ve svém důsledku vedou k přeměně zdravé buňky v buňku preinvazivní a poté invazivní léze. Na tomto místě hrají důležitou roli bílkovinné produkty genů BRCA1 a BRCA2. BRCA1 je schopný spustit apoptózu nezávisle na proteinu p53 tím

způsobem, že aktivuje molekuly, nacházející se dále (*downstream*) v apoptotické kaskádě (Bax, Bak). Inaktivace BRCA1 a BRCA2 (nejčastěji v důsledku delece jedné alely a následné somatické mutace či hypermetylace alely druhé) vede ke ztrátě kontroly nad integritou genomu (BRCA1) a ztrátě schopnosti opravit poškozenou DNA mechanismem homologní rekombinace (BRCA2) [Hu M. Et al., 2008].

Bílkovinný produkt genu p53 představuje klíčovou molekulu zodpovědnou za aktivaci apoptózy. Inaktivaci p53 prokazujeme u řady solidních nádorů. Vadný a nefunkční p53 může vést k poruše vnitřní (intrinsické) cesty aktivace apoptózy. Buňka se v důsledku toho vymkne kontrolním mechanismům, které zajišťují její smrt v případě neopravitelného poškození genomu nebo v případě hypoxie. Podobný efekt má i dysbalance mezi proapoptotickými a antiapoptotickými faktory, např Bcl-2 [Reis-Filho J.S. a Lakhani S.R., 2003]. Výsledky našeho experimentu naznačují, že k inaktivaci genu p53 dochází v časných stádiích vzniku zhoubných nádorů prsní žlázy.

Růst zhoubného nádoru je závislý na adekvátním přísunu kyslíku a živin a to zejména cestou novotvořených cév prorůstajících do nádoru. Angiogenezi může stimulovat nádor sám cestou exprese signální molekuly vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [Al-Salam S. et al., 2012]. Výsledky naší práce podporují tvrzení, že nadměrná exprese VEGF a Bcl-2 může představovat časný krok v procesu kancerogeneze prsní žlázy.

Porucha výše popsaných buněčných pochodů je nezbytná pro růst populace nádorových buněk a také pro rozvoj vlastností typických pro maligní bujení, např. schopnosti invazivního růstu nebo tvorbu metastáz. Popisem molekulárních vlastností zhoubného nádoru můžeme definovat jeho potenciál k progresi, invazivnímu růstu a tvorbě vzdálených metastáz.

12. ZÁVĚR

Studie 250 případů DCIS měla několik dílčích cílů. Za prvé nás zajímala četnost diagnózy duktálního *carcinoma in situ* v rámci jedné screeningové jednotky. V porovnání s celostátními údaji (v rámci SRN) bylo v naší screeningové jednotce zjištěno nižší procento čistého DCIS. Dále jsme zaznamenali homogenní distribuci incidence DCIS ve věkové skupině 50-69 let. V naší práci byla tedy incidence DCIS významná i ve vyšší věkové skupině.

Za druhé jsme analyzovali některé charakteristiky DCIS, které zároveň představují rizikové faktory recidivy onemocnění. Z podkladů, které jsme měli k dispozici, jsme byly schopni zjistit u většiny pacientek údaje ohledně věku v době diagnózy, typu operace, výsledku operace, velikosti prekancerózy a stupni diferenciace prekancerózy. Z těchto výsledků jsme pro většinu pacientek určili jejich rizikový profil vyjádřený modifikovaným Van Nuys prognostickým indexem. Dále jsme analyzovali některé fenotypové parametry DCIS: expresi steroidních receptorů, HER2 a proliferační index Ki67.

Za třetí nás zajímal četnost a typ axilárního *stagingu* a jeho výsledky.

Zjištěné údaje jsme porovnali s dostupnou literaturou. Naše data se shodují s aktuálními studiemi v otázce četnosti exprese estrogenových a progesteronových receptorů. Naopak shodu jsme nepotvrdili při korelaci mezi věkem a některými rizikovými faktory: velikostí DCIS, stupněm diferenciace a zvýšenou expresí HER2. Nepotvrdilo se tedy, že by mladší pacientky vykazovaly extenzivnější, hůře diferencované a biologicky agresivnější preinvazivní léze.

V naší analýze se ukázaly nedostatky v praktické indikaci axilárního *stagingu*. Biopsie sentinelové uzliny bývá často nesprávně opomíjena, nebo naopak prováděna v neindikovaných případech. Prokázali jsme velmi nízké riziko uzlinových metastáz v případě čistého DCIS.

Důležitým zjištěním bylo, že preinvazivní léze DCIS je v praxi léčena stejně radikálně jako invazivní karcinom prsu. Adjuvantní RT byla indikována u všech pacientek léčených BCS bez ohledu na přítomnost rizikových markerů. V naší práci se tedy potvrdila hypotéza, že prognostické faktory nemají doposud vliv na management DCIS.

I přes jistá omezení může databáze mamografického screeningu poskytnout množství dat, která by bylo možné využít ve studiích o DCIS nebo invazivním karcinomu prsní žlázy.

V experimentální části disertace jsme srovnáním vzorků DCIS se vzorky invazivního karcinomu prsní žlázy potvrdili, že některé jejich molekulární vlastnosti jsou identické. Neprokázali jsme totiž statisticky signifikantní rozdíl mezi mírou exprese Bcl-2 a VEGF a dále jsme neprokázali ani rozdíl mezi četností ztrát heterozygozity p53 při srovnání DCIS a invazivního karcinomu. Tyto markery tedy nelze využít jako indikátory odlišující DCIS s nízkým a vysokým rizikem. Inaktivace jmenovaných genů zřejmě hraje roli ve velmi časné fázi karcinogeneze.

Naopak se potvrdil rozdíl ve frekvenci alelických ztrát genů BRCA1 a BRCA2 při korelaci DCIS a invazivního karcinomu prsní žlázy. Tím se nám podařilo identifikovat dva biomarkery, které by mohly indikovat podskupinu DCIS s vyšším rizikem malignizace. Lze předpokládat, že porucha reparace DNA, na níž se oba geny BRCA podílejí, je procesem důležitým pro rozvoj karcinogeneze, a v tom případě pro progresi preinvazivní léze v invazivní.

Rozšířením panelu markerů, zkoumáním na vyšším počtu pacientek a korelací výsledků s klinickými údaji by se mohlo v budoucnu podařit určit další parametry, jež by odkazovaly na DCIS s vysokým rizikem. Tento přístup by v budoucnu mohl pomoci rozdělit DCIS na podskupiny definované na základě prognostických faktorů a jejich individuálnímu riziku pak přizpůsobit intenzitu jednotlivých léčebných modalit.

13. SOUHRN

Cílem předložené disertační práce bylo ozřejmit vztahy mezi prognostickými faktory duktálního *carcinoma in situ,* jeho biologickým chováním a léčbou této prekancerózy s cílem pokusit se o identifikaci podskupiny s nepříznivým prognostickým chováním. Vzhledem k vysoké incidenci DCIS, která je důsledkem rozšíření mamografického screeningu, se jedná o onemocnění se značným klinickým významem. Existují dvě oblasti, ve kterých by spolehlivý odhad rizika recidivy mohl vést k přesnému individuálnímu nastavení intenzity léčby. Za prvé se jedná o problematiku chirurgické léčby. Nevíme totiž, zda je opravdu nezbytné všechny pacientky s DCIS radikálně operovat. Druhá oblast se týká adjuvantní radioterapie po prs záchovném výkonu. Kohorta žen, u kterých by bylo možné vypustit radioterapii z léčebného protokolu bez toho, aniž by signifikantně stouplo riziko lokální recidivy, nebyla doposud definována.

Ve vlastním výzkumu zaměřeném na incidenci a prognostické faktory DCIS jsme zaznamenali homogenní distribuci incidence DCIS ve věkové skupině 50-69 let. V naší práci byla tedy incidence DCIS významná i ve vyšší věkové skupině. Dále jsme v uvedené kohortě pacientek zjistili homogenní rozložení velikosti a gradu DCIS. Nepotvrdilo se tedy, že by mladší pacientky vykazovaly extenzivnější, hůře diferencované a biologicky agresivnější léze. Ve sledované skupině pacientek s čistým DCIS jsme ani v jednom případě nezaznamenali uzlinové metatsázy.

K odhadu individuálního rizika onemocnění slouží prognostické faktory. V případě DCIS je zřejmé, že hledání optimálního prognostického parametru (nebo spíše panelu parametrů) není u konce. Po éře klinickomorfologických a imunohistochemických markerů směřuje v dnešní době výzkum zejména do oblasti molekulární genetiky. Například metodou mikročipů je možné v jednom diagnostickém kroku zhodnotit expresi několika desítek genů a tím přesně definovat biologické vlastnosti nádoru.

Dosavadní prognostické faktory nedokáží dostatečně predikovat prognózu pacientky. V naší práci se potvrdila hypotéza, že prognostické faktory nemají doposud vliv na management DCIS.

Některé z biomarkerů DCIS byly předmětem zkoumání v experimentální části disertace. Při korelaci mezi DCIS, invazivním karcinomem a zdravou tkání jsme v souladu s původní hypotézou prokázali shody i rozdíly v přítomnosti těchto markerů. Zvýšená exprese genů kontrolujících apoptózu a angiogenezi byla u invazivního karcinomu i DCIS téměř shodná,

jde tedy zřejmě o časnou událost v karcinogenezi, podobně jako alelické ztráty genu p53. Naopak alelické ztráty genů BRCA1 a BRCA2 mohou poukazovat na agresivnější biologické chování DCIS.

Další studie biomarkerů a zejména korelace jejich výsledků s klinickými údaji by mohla vést k další identifikaci parametrů, jež by definovaly DCIS s nízkým nebo vysokým rizikem. Zdrojem takovýchto klinických údajů by mohly být databáze center mamografického screeningu.

PODĚKOVÁNÍ

Na prvém místě bych rád poděkoval svému školiteli, doc. MUDr. Michalu Zikánovi, PhD. Zejména za jeho odvahu riskovat a ujmout se v kombinované formě studenta pracujícího v „bezejmenné“ německé nemocnici. Postgraduální studium „na dálku“ bylo nakonec složitější, než jsem si uměl představit. Díky doc. Zikánovi jsem vydržel až do konce.

Dále patří veliký dík mému prvnímu primáři, Dr. med. Volkeru Heyerovi. Za jeho asistence jsem před deseti lety provedl svoji první exstirpaci fibroadenomu. V letech následujících jsem díky jeho důvěře mohl samostatně operovat a zdokonalovat se tak v senologii a v onkologické problematice obecně. Dr. Heyer mi ukázal, jak dělat medicínu s láskou.

Za třetí patří obrovský dík mé manželce. Za podporu ve chvílích, kdy ne vše probíhalo tak jednoduše, jak jsem si na začátku plánoval.

Neuhaus, duben 2015

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, doc. MUDr. Michal Zikán, PhD. bedanken. Vor allem für seinen Mut zu riskieren und einen Studenten aus einer „namenslosen“ deutschen Klinik durchs Studium zu begleiten. Ein Fernstudium war in der Tat viel komplizierter, als ich mir am Anfang vorstellen konnte. Dank doc. Zikán habe ich es bis zum Ende geschafft.

Des Weiteren geht ein großer Dank an meinen ersten Chefarzt, Dr. med. Volker Heyer. Unter seiner Assistenz durfte ich vor zehn Jahren meine erste Exstirpation eines Fibroadenoms durchführen. In den folgenden Jahren konnte ich dank seines Vertrauens selbständig operieren und mich somit in der Senologie sowie allgemein in der Onkologie weiterbilden. Dr. Heyer hat mir gezeigt, wie man Medizin mit Liebe machen kann.

Zuletzt ein riesen Dank an meine Ehefrau. Für ihre Unterstützung in den Zeiten, wo die Dinge nicht so glatt gelaufen sind, wie ich es mir am Anfang ausgemalt habe.

Neuhaus, April 2015

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADH	atypická duktální hyperplasie
ALH	atypická lobulární hyperplasie
AEPDT	*atypical epithelial proliferation of ductal type* (atypická epiteliální proliferace duktálního typu)
Bcl-2	*B-cell lymphoma* 2
BCS	*breast conserving surgery* (prs záchovný operační výkon)
BI-RADS	*Breast Imaging-Reporting and Data* systém
BIRC5	*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing* 5
BPAG	*bullous pemphigoid antigen*
BRCA	*breast cancer* (gen)
CALLA	*common acute lymphoblastic leukemia antigen*
CBI-7	*Cell Biological Index*
CC	kraniokaudální (mamografická projekce)
CDH-1	cadherin-1
CDK	cyklin dependentní kináza
cDNA	komplemetární DNA
CEN-17	centromera 17. chromozomu
CI	konfidenční interval
CISH	chromogenní *in situ* hybridizace
COL2A1	kolagen typ II alfa 1
COX	cyklooxygenáza
DCIS	duktální *carcinoma in situ*
DIN	duktální intraepiteliální neoplazie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
DTT	dithiothreitol
ECM	extracelulární matrix
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
ER	estrogenový receptor
FAM	6-karboxyfluorescein
FEA	*flat epihelial atypia* (plochá epiteliální atypie)
FISH	fluorescenční *in situ* hybridizace
GGI	*Genomic Grade Index*
Gy	Gray

HER2	*human epidermal growth factor receptor* 2
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HR	*hazard ratio*
HSP	*heat shock protein*
HSPG	heparansulfát proteoglykan
ICD	*International Classification of Diseases* (mezinárodní klasifikace nemocí)
IHC	imunohistochemie
IORT	intraoperační radioterapie
IRS	imunoreaktivní skóre
LN	lobulární neoplazie
LOE	*level of evidence*
LRRC-15	*Leucin rich repeat containing* 15
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MDM2	*mouse double minute 2 homolog*
MLO	mediolaterální šikmá (mamografická projekce)
MMBC	*multifocal and multicentric breast cancer*
MME	membránová metaloendopeptidáza
MMP	matrixová metaloproteináza
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
NSM	*nipple-sparing* mastektomie
OR	*odds ratio*
OS	*overall survival* (celkové přežití)
PAI	inhibitor aktivátoru plasminogenu
PgR	progesteronový receptor
PI3K	fosfatidyl-inositol 3 kináza
PTEN	*phosphatase and tensin homolog*
Rb	retinoblastom
RNA	ribonukleová kyselina
RT	radioterapie
SERM	selektivní modulátor estrogenových receptorů
SI	*staining intensity* (intenzita barvení)
SLNB	*sentinel node biopsy* (biopsie sentinelové uzliny)
SPARC	*secreted protein acidic and rich in cysteine*
SSM	*skin-sparing* mastektomie
TBE	tris-borate-EDTA

TDLU	*terminal ductal-lobular unit* (terminální duktolobulární jednotka)
TGF-beta	*transforming growth factor beta*
TJP	*tight junction protein*
TS	*total score* (barvení estrogenových receptorů)
uPA	*urokinase-type plasminogen activator*
USC/VNPI	*University of South California* / Van Nuys prognostický index
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VNPI	Van Nuys prognostický index
WHO	*World Health Organisation* (Světová zdravotnická organizace)

SEZNAM VYOBRAZENÍ

Obr. 1 Model stavby prsní žlázy a terminální duktolobulární jednotky..... str. 9
Obr. 2 Příklady preinvazivních lézí..... str. 13
Obr. 3 Graf vývoje incidence invazivních karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 23
Obr. 4 Graf vývoje absolutní incidence invazivních karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 24
Obr. 5 Graf vývoje incidence *in situ* karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 25
Obr. 6 Graf vývoje absolutní incidence *in situ* karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 25
Obr. 7 Graf podílu *in situ* karcinomů v rámci screeningu v SRN..... str. 27
Obr. 8 Schéma lokalizace a tvaru lobulárních a intraduktálních mikrokalcifikací..... str. 28
Obr. 9 Mamografický obraz pleomorfních mikrokalcifikací v souvislosti s *high-grade* DCIS..... str. 29
Obr. 10 Ultrazvuková navigace *core needle* biopsie..... str. 30
Obr. 11 Estrogenový receptor..... str. 46
Obr. 12 Příklad imunohistochemického barvení estrogenových receptorů..... str. 47
Obr. 13 Imunohistochemická vizualizace HER2..... str. 55
Obr. 14 Chromogenní *in situ* hybridizace - analýza amplifikace genu HER2..... str. 56
Obr. 15 Distribuce velikosti DCIS..... str. 68
Obr. 16 Distribuce *gradu* DCIS..... str. 68
Obr. 17 Distribuce steroidních receptorů u *low-grade* DCIS..... str. 70
Obr. 18 Distribuce steroidních receptorů u *intermediate-grade* DCIS..... str. 70
Obr. 19 Distribuce steroidních receptorů u *high-grade* DCIS..... str. 71
Obr. 20 Celková distribuce steroidních receptorů u DCIS..... str. 71
Obr. 21 Hodnota proliferačního indexu Ki67 v závislosti na *gradu*..... str. 72
Obr. 22 Distribuce DCIS podle rizika vyjadřeného indexem USC/VNPI..... str. 73
Obr. 23 Metody axilárního stagingu u DCIS..... str. 74
Obr. 24 Věk v době diagnózy DCIS..... str. 75
Obr. 25 Korelace mezi věkem a velikostí DCIS..... str. 76
Obr. 26 Funkce tumorsupresoru p53 ..... str. 79
Obr. 27 Reakce aktivace apoptózy ..... str. 80

Obr. 28 VEGF v procesu angiogeneze .....str. 81
Obr. 29 Kontrolní elektroforéza produktu qPCR.....str. 84
Obr. 30 Příklad ztráty heterozygozity při fragmentační analýze..... str. 89

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled názvosloví preinvazivních lézí..... str. 11
Tab. 2 Preinvazivní léze a schéma horizontální cesty progrese..... str. 20
Tab. 3 Vývoj incidence invazivních karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 23
Tab. 4 Vývoj absolutní incidence invazivních karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 24
Tab. 5 Vývoj incidence *in situ* karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 24
Tab. 6 Vývoj absolutní incidence *in situ* karcinomů prsu v ČR mezi lety 1990-2010..... str. 25
Tab. 7 Kontraindikace prs záchovného výkonu..... str. 33
Tab. 8 Přehled studií o adjuvantní radioterapii z indikace DCIS..... str. 35
Tab. 9 Shrnutí výsledků různých modalit léčby DCIS..... str. 37
Tab. 10 Rizikové faktory – závěry studie EORTC-10853..... str. 40
Tab. 11 Van Nuys prognostický index / modifikovaný Van Nuys prognostický index..... str. 45
Tab. 12 Imunoreaktivní skóre..... str. 48
Tab. 13 Celkové skóre..... str. 48
Tab. 14 Přehled prognostických faktorů DCIS..... str. 64
Tab. 15 Příklad konstrukce kalibrační křivky pro qPCR..... str. 85
Tab. 16 Sekvence primerů pro qPCR..... str. 85
Tab. 17 Sekvence primerů pro amplifikaci mikrosatelitárních markerů..... str. 88
Tab. 18 Výsledky analýzy ztráty heterozygozity pro jednotlivé mikrosatelitární markery..... str. 90
Tab. 19 Celkové výsledky analýzy ztráty heterozygozity..... str. 91
Tab. 20 Výsledky analýzy genové exprese..... str. 91

SEZNAM LITERATURY

Abdallah A, Papadopoulos S, Audretsch W. Onkoplastische Operationstechniken bei brusterhaltender Therapie. Frauenarzt 51(2010): 30-37.

Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Reis-Filho JS, Lee AH, Ellis IO. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. Am J Surg Pathol. 2008 Apr;32(4):513-23.

Albonico G, Querzoli P, Ferretti S, Rinaldi R, Nenci I. Biological profile of in situ breast cancer investigated by immunohistochemical technique. Cancer Detect Prev 1998;22:313-8.

Allegra CJ, Aberle DR, Ganschow P, Hahn SM, Lee CN, Millon-Underwood S, Pike MC, Reed SD, Saftlas AF, Scarvalone SA, Schwartz AM, Slomski C, Yothers G, Zon R. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: Diagnosis and Management of Ductal Carcinoma In Situ September 22-24, 2009. J Natl Cancer Inst. 2010 Feb 3;102(3):161-9.

Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, McGuire WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. Human Pathology. 1992; 23(9): 974–979.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol. 1998 Feb;11(2):155-68.

Allred DC, Anderson SJ, Paik S, Wickerham DL, Nagtegaal ID, Swain SM, Mamounas EP, Julian TB, Geyer CE Jr, Costantino JP, Land SR, Wolmark N. Adjuvant tamoxifen reduces subsequent breast cancer in women with estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ: a study based on NSABP protocol B-24. J Clin Oncol. 2012 Apr 20;30(12):1268-73.

Al-Salam S, Balalaa N, Faour I, Akhter S, Alashari M. HIF-1α, VEGF and WT-1 are protagonists in bilateral primary angiosarcoma of breast: a case report and review of literature. Int J Clin Exp Pathol. 2012;5(3):247-53.

Altintas S, Lambein K, Huizing MT, Braems G, Asjoe FT, Hellemans H, Van Marck E, Weyler J, Praet M, Van den Broecke R, Vermorken JB, Tjalma WA. Prognostic signifi-cance of oncogenic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a clinicopathologic study. Breast J 2009;15:120-32.

Altintas S, Toussaint J, Durbecq V, Lambein K, Huizing MT, Larsimont D, Van Marck E, Vermorken JB, Tjalma WA, Sotiriou C. Fine tuning of the Van Nuys prognostic index (VNPI) 2003 by integrating the genomic grade index (GGI): new tools for ductal carcinoma in situ (DCIS). Breast J. 2011 Jul-Aug;17(4):343-51.

Amendoeira I, Wells CA, Apostolikas N. Quality assurance guidelines for pathology: Cytological and histological non-operative procedures. In: Perry N, Broeders M, de Wolf C, Toernberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. 4. vyd., Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2006, 416 s. ISBN 92-79-01258-4.

Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. Br J Cancer 2006;94:253-8.

Barnes NL, Khavari S, Boland GP, Cramer A, Knox WF, Bundred NJ. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. Clin Cancer Res 2005;11:2163-8.

Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. Blood 2007 Jun 15; 109 (12): 5494–501.

Benson JR, Wishart GC. Predictors of recurrence for ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery. Lancet Oncol. 2013 Aug;14(9):e348-57.

Berveiller P, Mir O, Veyrie N, Barranger E. The sentinel-node concept: a dramatic improvement in breast-cancer surgery. Lancet Oncol. 2010 Sep;11(9):906.

Bethwaite P, Smith N, Delahunt B, Kenwright D. Reproducibility of new classification schemes for the pathology of ductal carcinoma in situ of the breast. J Clin Pathol. 1998 Jun;51(6):450-4.

Bijker N, Meijnen P, Peterse JL, Bogaerts J, Van Hoorebeeck I, Julien JP, Gennaro M, Rouanet P, Avril A, Fentiman IS, Bartelink H, Rutgers EJ, EORTC Breast Cancer Cooperative Group, EORTC Radiotherapy Group. Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853 – a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. J Clin Oncol 2006; 24: 3381–3387.

Böhm J, Zikán M. Ductal carcinoma in situ: analysis of 250 cases. Eur J Gynaecol Oncol. 2014; 35(5): 525-529.

Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1995 Apr 5;87(7):506-16.

Bourgarel-Rey V, Savry A, Hua G, Carré M, Bressin C, Chacon C, Imbert J, Braguer D, Barra Y. Transcriptional down-regulation of Bcl-2 by vinorelbine: identification of a novel binding site of p53 on Bcl-2 promoter. Biochem Pharmacol. 2009 Nov 1;78(9):1148-56.

Bozzini A, Renne G, Meneghetti L, Bandi G, Santos G, Vento AR, Menna S, Andrighetto S, Viale G, Cassano E, Bellomi M. Sensitivity of imaging for multifocal-multicentric breast carcinoma. BMC Cancer. 2008;8:275.

Bratthauer GL, Tavassoli FA. Lobular intraepithelial neoplasia: previously unexplored aspects assessed in 775 cases and their clinical implications. Virchows Arch 2002; 440: 134 – 138.

Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. J Pathol 1999; 187: 396 – 402.

Cochrane RA, Valasiadou P, Wilson AR, Al-Ghazal SK, Macmillan RD. Cosmesis and satisfaction after breast-conserving surgery correlates with the percentage of breast volume excised. Br J Surg. 2003 Dec;90(12):1505-9.

Collins LC, Achacoso N, Nekhlyudov L, Fletcher SW, Haque R, Quesenberry CP Jr, Puligandla B, Alshak NS, Goldstein LC, Gown AM, Schnitt SJ, Habel LA. Relationship between clinical and pathologic features of ductal carcinoma in situ and patient age: an analysis of 657 patients. Am J Surg Pathol. 2009 Dec; 33(12):1802-8.

Conklin MW, Keely PJ. Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. Cell Adh Migr. 2012 May-Jun;6(3):249-60.

Cornfield DB, Palazzo JP, Schwartz GF, Goonewardene SA, Kovatich AJ, Chervoneva I, Hyslop T, Schwarting R. The prognostic significance of multiple morphologic features and biologic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a study of a large cohort of patients treated with surgery alone. Cancer. 2004 Jun 1;100(11):2317-27.

Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene. 2003;22:8590–8607.

Čihák R, Anatomie 3, 1. vyd., Praha, Grada Publishing, 1997, 672 s. ISBN 80-7169-140-2.

Daly MB. Tamoxifen in ductal carcinoma in situ. Semin Oncol. 2006; 33:647–649.

Daniel PT. Zellzyklus und Apoptose. In: Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. 1. vyd., Heidelberg, Springer-Verlag, 2003, 521 s. ISBN 978-3-642-59343-7.

Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. Br J Cancer 2010;103:668-75.

Degnim AC, Visscher DW, Berman HK, Frost MH, Sellers TA, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, de Groen PC, Lingle WL, Ghosh K, Penheiter L, Tlsty T, Melton LJ 3rd, Reynolds CA, Hartmann LC. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. J Clin Oncol. 2007 Jul 1;25(19):2671-7.

Delaney G, Ung O, Bilous M, Cahill S, Boyages J. Ductal carcinoma in situ. Part II: Treatment. Aust NZ J Surg 1997;67:157–65.

de Mascarel I, Bonichon F, MacGrogan G, de Mascarel I, Bonichon F, MacGrogan G, de Lara CT, Avril A, Picot V, Durand M, Mauriac L, Trojani M, Coindre JM. Application of the van nuys prognostic index in a retrospective series of 367 ductal carcinomas in situ of the breast examined by serial macroscopic sectioning: practical considerations. Breast Cancer Res Treat. 2000 May;61(2):151-9.

de Roos MA, de Bock GH, de Vries J, van der Vegt B, Wesseling J. p53 overexpression is a predictor of local recurrence after treatment for both in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. J Surg Res 2007;140:109-14.

Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. Breast Cancer Res. 2005;7(4):171-9.

Di Saverio S, Catena F, Santini D, Ansaloni L, Fogacci T, Mignani S, Leone A, Gazzotti F, Gagliardi S, De Cataldis A, Taffurelli M. 259 Patients with DCIS of the breast applying USC/Van Nuys prognostic index: a retrospective review with long term follow up. Breast Cancer Res Treat. 2008 Jun;109(3):405-16.

DiSipio T, Rye S, Newman B, Hayes S. Incidence of unilateral arm lymphoedema after breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):500-15.

Duncan JA, Reeves JR, Cooke TG. BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease. Mol Pathol. Oct 1998; 51(5): 237–247.

Dunne C, Burke JP, Morrow M, Kell MR. Effect of margin status on local recurrence after breast conservation and radiation therapy for ductal carcinoma in situ. J Clin Oncol. 2009 Apr 1;27(10):1615-20.

Ellis IO. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. Mod Pathol. 2010 May;23 Suppl 2:S1-7.

Fisher ER, Costantino J, Fisher B, Palekar AS, Redmond C, Mamounas E. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) Protocol B-17.

Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ). The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborating Investigators. Cancer. 1995 Mar 15;75(6):1310-9.

Foote FW, Steward FW. Lobular carcinoma in situ. American Journal of Pathology 1941; 17: 491 – 496.

Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. Cancer Res. 2005 May 15;65(10):3980-5.

Gilleard O, Goodman A, Cooper M, Davies M, Dunn J. The significance of the Van Nuys prognostic index in the management of ductal carcinoma in situ. World J Surg Oncol. 2008 Jun 18;6:61.

Goldenberg VE, Goldenberg NS, Sommers SC. Comparative ultrastructure of atypical ductal hyperplasia, intraductal carcinoma, and infiltrating ductal carcinoma of the breast. Cancer. 1969 Dec;24(6):1152-69.

Goldstein NS, Vicini FA, Kestin LL, Thomas M. Differences in the pathologic features of ductal carcinoma in situ of the breast based on patient age. Cancer. 2000; 88(11):2553–60.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat Rev Cancer. 2001 Oct;1(1):11-21.

Gupta SK, Douglas-Jones AG, Jasani B, Morgan JM, Pignatelli M, Mansel RE. E-cadherin (E-cad) expression in duct carcinoma in situ (DCIS) of the breast. Virchows Arch. 1997 Jan;430(1):23-8.

Haagensen CD, Lane N, Lattes R, Bodian C. Lobular neoplasia (so-called lobular carcinoma in situ) of the breast. Cancer. 1978 Aug;42(2):737-69.

Harbeck N, Krüger A, Sinz S, Kates RE, Thomssen C, Schmitt M, Jänicke F. Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1--a multifaceted proteolytic factor. Onkologie. 2001 Jun;24(3):238-44.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology

2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol. 2007 Nov 20;25(33):5287-312.

Heinen-Kammerer T. Mammografie-Screening auf Erfolgskurs. Frauenarzt 55 (2014) Nr. 4, 332.

Hieken TJ, Farolan M, D'Alessandro S, Velasco JM. Predicting the biologic behavior of ductal carcinoma in situ: an analysis of molecular markers. Surgery 2001;130:593-600.

Holmes P, Lloyd J, Chervoneva I, Pequinot E, Cornfield DB, Schwartz GF, Allen KG, Palazzo JP. Prognostic markers and long-term outcomes in ductal carcinoma in situ of the breast treated with excision alone. Cancer. 2011 Aug 15;117(16):3650-7.

Houghton J, George WD, Cuzick J, Duggan C, Fentiman IS, Spittle M; UK Coordinating Committee on Cancer Research; Ductal Carcinoma in situ Working Party; DCIS trialists in the UK, Australia, and New Zealand. Radiotherapy and tamoxifen in women with completely excised ductal carcinoma in situ of the breast in the UK, Australia, and New Zealand: randomised controlled trial. Lancet. 2003 Jul 12;362(9378):95-102.

Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, Richardson A, Violette S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Bauerlein EL, Hahn WC, Gelman RS, Allred C, Bissell MJ, Schnitt S, Polyak K. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. Cancer Cell. 2008 May;13(5):394-406.

Chasle J, Delozier T, Denoux Y, Marnay J, Michels JJ. Immunohistochemical study of cell cycle regulatory proteins in intraductal breast carcinomas--a preliminary study. Eur J Cancer. 2003 Jul;39(10):1363-9.

Choi JD, Lee JS. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. Genomics Inform. 2013 Dec;11(4):164-173.

Ivshina AV, George J, Senko O, Mow B, Putti TC, Smeds J, Lindahl T, Pawitan Y, Hall P, Nordgren H, Wong JE, Liu ET, Bergh J, Kuznetsov VA, Miller LD. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. Cancer Res. 2006 Nov 1;66(21):10292-301.

Jirström K, Ringberg A, Fernö M, Anagnostaki L, Landberg G. Tissue microarray analyses of G1/S-regulatory proteins in ductal carcinoma in situ of the breast indicate that low cyclin D1 is associated with local recurrence. Br J Cancer. 2003 Nov 17;89(10):1920-6.

Julien JP, Bijker N, Fentiman IS, Peterse JL, Delledonne V, Rouanet P, Avril A, Sylvester R, Mignolet F, Bartelink H, Van Dongen JA. Radiotherapy in breast-conserving treatment for ductal carcinoma in situ: first results of the EORTC randomised phase III trial 10853. EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. Lancet. 2000 Feb 12;355(9203):528-33.

Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, Sanchez H, Jimenez C, Stewart K, Chew K, Ljung BM, Tlsty TD. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. J Natl Cancer Inst. 2010 May 5;102(9):627-37.

Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis. Cancer. 2006 Jan 1;106(1):4-16.

Klika E, Histologie. 1. vyd., Praha, Avicenum, 1986, 612 s., ISBN 08-110-86.

Lakhani SR, Audretsch W, Cleton-Jensen AM, Cutuli B, Ellis I, Eusebi V, Greco M, Houslton RS, Kuhl CK, Kurtz J, Palacios J, Peterse H, Rochard F, Rutgers E; EUSOMA. The management of lobular carcinoma in situ (LCIS). Is LCIS the same as ductal carcinoma in situ (DCIS)? Eur J Cancer. 2006 Sep;42(14):2205-11.

Lari SA, Kuerer HM. Biological markers in DCIS and risk of breast recurrence: a systematic review. J Cancer 2011; 2: 232–26.

Lebeau A, Unholzer A, Amann G, Kronawitter M, Bauerfeind I, Sendelhofert A, Iff A, Löhrs U. EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. Breast Cancer Res Treat 2003;79:187-98.

Leong AS, Sormunen RT, Vinyuvat S, Hamdani RW, Suthipintawong C. Biologic markers in ductal carcinoma in situ and concurrent infiltrating carcinoma. A comparison of eight contemporary grading systems. Am J Clin Pathol. 2001 May;115(5):709-18.

Levene AP, Singh G, Palmieri C. Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. J R Soc Med. 2005 Apr;98(4):146-52.

Lieske B, Ravichandran D, Alvi A, Lawrence DA, Wright DJ. Screen-detected breast lesions with an indeterminate (B3) core needle biopsy should be excised. Eur J Surg Oncol. 2008 Dec;34(12):1293-8.

Lim YJ, Kim K, Chie EK, Han W, Noh DY, Ha SW. Treatment outcome of ductal carcinoma in situ patients treated with postoperative radiation therapy. Radiat Oncol J. 2014 Mar;32(1):1-6.

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. 8. vyd., Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2007, 764 s., ISBN 978-3-540-32680-9.

Lux MP, Souchon R. AGO Leitlinien. http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2007_Ductal_Carcinoma_in_Situ_%28DCIS%29.pdf; (vid. 23.8.2014).

Ma CX, Sanchez CG and Ellis MJ. Predicting endocrine therapy responsiveness in breast cancer. Oncology (Williston Park) 2009;23:133-42.

MacAusland SG, Hepel JT, Chong FK, Galper SL, Gass JS, Ruthazer R, Wazer DE. An attempt to independently verify the utility of the Van Nuys Prognostic Index for ductal carcinoma in situ. Cancer. 2007 Dec 15;110(12):2648-53.

Maffuz A, Barroso-Bravo S, Nájera I, Zarco G, Alvarado-Cabrero I, Rodríguez-Cuevas SA. Tumor size as predictor of microinvasion, invasion, and axillary metastasis in ductal carcinoma in situ. J Exp Clin Cancer Res. 2006 Jun;25(2):223-7.

Malek D, Rabe P. Mammographie-Screening Programm. http://www.mammo-programm.de/cms_upload/datenpool/evaluationsbericht05-07_web.pdf (vid. 20.8.2014).

Malek D, Rabe P. Mammographie-Screening Programm. http://www.mammo-programm.de/cms_upload/fck-userfies/Evaluationsbericht_2008-2009_web.pdf (vid. 20.8.2014).

May D, Itin A, Gal O, Kalinski H, Feinstein E, Keshet E. Ero1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer. Oncogene. 2005 Feb 3;24(6):1011-20.

Meijnen P, Oldenburg HS, Loo CE, Nieweg OE, Peterse JL, Rutgers EJ. Risk of invasion and axillary lymph node metastasis in ductal carcinoma in situ diagnosed by core-needle biopsy. Br J Surg. 2007 Aug;94(8):952-6.

Mennella S, Garlaschi A, Paparo F, Perillo M, Celenza M, Massa T, Rollandi GA, Garlaschi G. Magnetic resonance imaging of breast cancer: factors affecting the accuracy of preoperative lesion sizing. Acta Radiol. 2014 Feb 13.

Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemother Res Pract. 2012;2012:743193.

Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. J Intern Med. 2008 Aug;264(2):128-42.

Murphy CD, Jones JL, Javid SH, Michaelson JS, Nolan ME, Lipsitz SR, Specht MC, Lesnikoski BA, Hughes KS, Gadd MA, Smith BL. Do sentinel node micrometastases predict recurrence risk in ductal carcinoma in situ and ductal carcinoma in situ with microinvasion? Am J Surg. 2008 Oct;196(4):566-8.

Nag S, Zhang X, Srivenugopal KS, Wang MH, Wang W, Zhang R.Targeting MDM2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet? Curr Med Chem. 2014;21(5):553-74.

Noguchi S, Aihara T, Koyama H, Motomura K, Inaji H, Imaoka S. Discrimination between multicentric and multifocal carcinomas of the breast through clonal analysis. Cancer. 1994;74:872–877.

Oh YL, Choi JS, Song SY, Ko YH, Han BK, Nam SJ, Yang JH. Expression of p21, Waf1, p27, Kip1 and cyclin D1 proteins in breast ductal carcinoma in situ: Relation with clinicopathologic characteristics and with p53 expression and estrogen receptor status. Pathol Int. 2001 Feb;51(2):94-9.

Okumura Y, Yamamoto Y, Zhang Z, Toyama T, Kawasoe T, Ibusuki M, Honda Y, Iyama K, Yamashita H, Iwase H. Identification of biomarkers in ductal carcinoma in situ of the breast with microinvasion. BMC Cancer 2008 Oct 6;8:287.

Ottesen GL, Graversen HP, Blichert-Toft M, Zedeler K, Andersen JA. Ductal carcinoma in situ of the female breast. Short-term results of a prospective nationwide study. The Danish Breast Cancer Cooperative Group. Am J Surg Pathol. 1992 Dec;16(12):1183-96.

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. J Clin Oncol. 2006 Aug 10;24(23):3726-34.

Pavlišta D, Neinvazivní karcinomy prsu, 1. vyd., Praha. Maxdorf, 2008, 184 s. ISBN: 978-80-7345-173-8.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. 4. vyd. http://www.euref.org/european-guidelines (vid. 23.8.2014).

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002 May 1;30(9):e36.

Piccart-Gebhart MJ. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn. Eur J Cancer. 2006 Aug;42(12):1715-9.

Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. Cancer Res. 1994 Jul 15;54(14):3714-7.

Pinder SE, Ellis IO. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)--current definitions and classification. Breast Cancer Res. 2003;5(5):254-7.

Polyak K, Kalluri R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Nov;2(11):a003244.

Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, Marr G, Venter DJ, Armes JE. Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. Eur J Cancer 2003;39:622-30.

Provenzano PP, Keely PJ. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. J Cell Sci. 2011 Apr 15;124(Pt 8):1195-205.

Rakovitch E, Pignol JP, Hanna W, Narod S, Spayne J, Nofech-Mozes S, Chartier C, Paszat L. Significance of multifocality in ductal carcinoma in situ: outcomes of women treated with breast-conserving therapy. J Clin Oncol. 2007 Dec 10;25(35):5591-6.

Reis-Filho JS, Lakhani SR. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. Breast Cancer Res. 2003;5(6):313-9.

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Pathologe. 1987 May;8(3):138-40.

Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. N Engl J Med. 2003 Feb 13;348(7):618-29.

Ringberg A, Anagnostaki L, Anderson H, Idvall I, Fernö M; South Sweden Breast Cancer Group. Cell biological factors in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast-relationship to ipsilateral local recurrence and histo-pathological characteristics. Eur J Cancer 2001;37:1514-22.

Roka S, Rudas M, Taucher S, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Kandioler D, Gnant M, Jakesz R. High nuclear grade and negative estrogen receptor are significant risk factors for re-currence in DCIS. Eur J Surg Oncol 2004;30:243-7.

Ross JS. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. Drug News Perspect. 2009 Mar;22(2):93-106.

Ross DS, Hoda SA. Microinvasive (T1mic) lobular carcinoma of the breast: clinicopathologic profile of 16 cases. Am J Surg Pathol. 2011 May; 35(5):750-6.

Schnitt SJ. Microinvasive carcinoma of the breast: a diagnosis in search of a definition. Adv Anat Pathol. 1998 Nov;5(6):367-72.

Schnitt SJ. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: flat epithelial atypia--classification, pathologic features and clinical significance. Breast Cancer Res. 2003;5(5):263-8.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000 Mar;182(3):311-22.

Silverstein MJ, Gierson ED, Colburn WJ, Cope LM, Furmanski M, Senofsky GM, Gamagami P, Waisman JR. Can intraductal breast carcinoma be excised completely by local excision? Clinical and pathologic predictors. Cancer. 1994 Jun 15;73(12):2985-9.

Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, Waisman JR, Lewinsky BS, Colburn WJ, Poller DN. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer. 1996 Jun 1; 77(11):2267-74.

Silverstein MJ. Not everyone with ductal carcinoma in situ of the breast treated with breast preservation needs post-excisional radiation therapy. Breast. 2000 Aug;9(4):189-93.

Silverstein MJ. The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. Am J Surg. 2003 Oct; 186(4):337-43.

Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. J Pathol 2005; 205: 248 – 254.

Solin LJ, Gray R, Baehner FL, Butler SM, Hughes LL, Yoshizawa C, Cherbavaz DB, Shak S, Page DL, Sledge GW Jr, Davidson NE, Ingle JN, Perez EA, Wood WC, Sparano JA, Badve S. A multigene expression assay to predict local recurrence risk for ductal carcinoma in situ of the breast. J Natl Cancer Inst. 2013 May 15;105(10):701-10.

Sporn MB. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. Cancer Res. 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6215-8.

Sridhar J, Akula N, Pattabiraman N. Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. AAPS J. 2006 Mar 24;8(1):E204-21.

Staley H, McCallum I, Bruce J. Postoperative Tamoxifen for ductal carcinoma in situ: Cochrane systematic review and meta-analysis. Breast. 2014 Jul 9.

Stuart K, Boyages J, Brennan M, Ung O. Ductal carcinoma in situ--management update. Aust Fam Physician. 2005 Nov;34(11):949-54.

Tavassoli FA. Ductal carcinoma in situ: introduction of the concept of ductal intraepithelial neoplasia. Mod Pathol. 1998 Feb;11(2):140-54.

Tavassoli FA. Ductal Intraepithelial Neoplasia of the Breast. Virchows Arch.2001.438:221-7.
Tavassoli FA, Hoefler H, Rosai J, Holland R, Ellis I, Schnitt S, Lakhani SRM, Boecker W, Heywang-Kobrunner SH, Moinfar F, Peterse J. Intraductal proliferative lesions. In: Tavassoli FA, Devilee P, editor. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. 1. vyd., Lyon. IARC Press, 2003, 432 s. ISBN 92-832 2412 4.

Theobald M, Offringa R. Anti-p53-directed immunotherapy of malignant disease. Expert Rev Mol Med. 2003 Mar 28;5(11):1-13.

Tiede B, Kang Y. From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. Cell Res. 2011 Feb;21(2):245-57.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science. 1984; 226: 1097–1099.

Tunon-de-Lara C, Lemanski C, Cohen-Solal-Le-Nir C. Ductal carcinoma in situ of the breast in younger women: a subgroup of patients at high risk. Eur J Surg Oncol. 2010;36:1165–1171.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, http://www.svod.cz (vid. 23.8.2014).

Vargas C, Kestin L, Go N, Krauss D, Chen P, Goldstein N, Martinez A, Vicini FA. Factors associated with local recurrence and cause-specific survival in patients with ductal carcinoma in situ of the breast treated with breast-conserving therapy or mastectomy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Dec 1;63(5):1514-21.

Veronesi U, Salvadori B, Luini A, Banfi A, Zucali R, Del Vecchio M, Saccozzi R, Beretta E, Boracchi P, Farante G, Galimberti V, Mezzanotte G,Sacchini V, Tana S, Marubini E. Conservative treatment of early breast cancer. Long-term results of 1232 cases treated with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy. Ann Surg. 1990 Mar;211(3):250-9.

věstník Ministerstva zdravotnictví 04-2010. http://www.mamo.cz/res/file/legislativa/vestnik-mzcr-04-2010.pdf (vid. 23.8.2014).

Viacava P, Naccarato AG, Bocci G, Fanelli G, Aretini P, Lonobile A, Evangelista G, Montruccoli G, Bevilacqua G. Angiogenesis and VEGF expression in pre-invasive lesions of the human breast. J Pathol. 2004 Oct;204(2):140-6.

Vidali C, Caffo O, Aristei C, Bertoni F, Bonetta A, Guenzi M, Iotti C, Leonardi MC, Mussari S, Neri S, Pietta N. Conservative treatment of breast ductal carcinoma in situ: results of an Italian multi-institutional retrospective study. Radiat Oncol. 2012 Oct 25;7:177.

Waddell BE, Stomper PC, DeFazio JL, Hurd TC, Edge SB. Postexcision mammography is indicated after resection of ductal carcinoma-in-situ of the breast. Ann Surg Oncol. 2000 Oct;7(9):665-8.

Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. Eur J Cancer 1992, 28:641-644.

Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. Clin Cancer Res. 2011 Jan 1;17(1):12-8.

Wang SY, Shamliyan T, Virnig BA, Kane R. Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2011 May;127(1):1-14.

Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol. 2009 Dec;6(12):718-30.

Weigel S, Decker T, Heindel W. Bildgebung und Vorgehen bei präinvasiven Läsionen der Mamma, Senologie, 2013 Sep, 142-153.

Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast J Natl Cancer Inst. 1973 May;50(5):1111-8.

Wong JS, Kaelin CM, Troyan SL, Gadd MA, Gelman R, Lester SC, Schnitt SJ, Sgroi DC, Silver BJ, Harris JR, Smith BL. Prospective study of wide excision alone for ductal carcinoma in situ of the breast. J Clin Oncol. 2006 Mar 1; 24(7):1031-6.

Yang TJ, Ho AY. Radiation therapy in the management of breast cancer. Surg Clin North Am. 2013 Apr;93(2):455-71.

Yi M, Krishnamurthy S, Kuerer HM, Meric-Bernstam F, Bedrosian I, Ross MI, Ames FC, Lucci A, Hwang RF, Hunt KK. Role of primary tumor characteristics in predicting positive sentinel lymph nodes in patients with ductal carcinoma in situ or microinvasive breast cancer. The American Journal of Surgery. 2008;196:81–7.

Zavagno G, Carcoforo P, Marconato R, Franchini Z, Scalco G, Burelli P, Pietrarota P, Lise M, Mencarelli R, Capitanio G, Ballarin A, Pierobon ME, Marconato G, Nitti D. Role of axillary sentinel lymph node biopsy in patients with pure ductal carcinoma in situ of the breast. BMC Cancer. 2005 Mar 11;5:28.

Zhang W, Gao EL, Zhou YL, Zhai Q, Zou ZY, Guo GL, Chen GR, Zheng HM, Huang GL, Zhang XH. Different distribution of breast ductal carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ with microinvasion, and invasion breast cancer. World J Surg Oncol. 2012 Dec 8;10:262.

Zhou MR, Tang ZH, Li J, Fan JH, Pang Y, Yang HJ, Zheng S, Bai JQ, Lv N, Qiao YL, Qi HZ, Xu F. Clinical and Pathologic Features of Multifocal and Multicentric Breast Cancer in Chinese Women: A Retrospective Cohort Study. J Breast Cancer. Mar 2013; 16(1): 77–83.

Zhou W, Jirstrom K, Johansson C, Amini RM, Blomqvist C, Agbaje O, Wärnberg F. Long-term survival of women with basal-like ductal carcinoma in situ of the breast: a population-based cohort study. BMC Cancer 2010;10:653.

Zikán M. Molekulární biologie v klinické praxi. In: Cibula D, Petruželka L et al. Onkogynekologie, 1. vyd., Praha, Grada Publishing, 2009, 614 s. ISBN 978-80-2472-665-6.