

## VLIV VĚKU NA MNOŽSTVÍ ESTROGENNÍCH RECEPTORŮ V KARCINOMECH PRSU

### THE EFFECT OF AGE ON THE BREAST CANCER ESTROGEN RECEPTOR LEVEL

HOCHMANN J.

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UK, HRADEC KRÁLOVÉ, KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

#### Souhrn:

*Východisko:* Pro zjišťování prognózy a rozhodování o hormonální terapii nádorů prsu je využíváno vyšetření estrogenových receptorů. Tyto výsledky v homogenátu jsou však u starších pacientek vyšší, pravděpodobně vlivem snížení funkce vaječníků. Proto někteří autoři používají u postmenopauzálních vyšší rozhraní mezi pozitivitou a negativitou, než u premenopauzálních.

*Typ studie a soubor:* Provedli jsme studii klinických výsledků estrogenních receptorů u souboru pacientek z Pardubic a okolí s použitím základních statistických metod.

*Metody a výsledky:* V práci jsme posoudili výsledky radioreceptorové analýzy estrogenových receptorů (ER) v karcinomech prsu v závislosti na věku. Připomenuli jsme, že zlogaritmování osy  $y$  je možno používat pro orientační posouzení statistického souboru. Při tom jsme poukázali na více než řádové rozdíly mezi teoretickými středními hodnotami u nejstarších pacientek různých statistických souborů.

*Závěr:* Odhadli jsme, že naše výsledky se více podobají italskému neselektovanému souboru pacientek, než jihoafrické skupině vybraných pacientek v pokročilém klinickém stavu, jehož příčiny jsou pravděpodobně důležitější než etnické rozdíly.

Hranici mezi pozitivitou a negativitou si u preklimakterických v porovnání s postklimakterickými pacientkami nepředstavujeme jako skokový rozdíl, ale jako plynulou křivku (možná místy zalomenou). V souvislosti s řešením této otázky jsme diskutovali např. o možnosti urychlení karcinogeneze vlivem vysokých hladin ER.

**Klíčová slova:** Estrogenové receptory, karcinom prsu, věk, prahové hodnoty

#### Summary:

*Background:* Examination of estrogen receptors is exploited for estimating the prognosis and for deciding about hormonal therapy of breast cancer. These results in the homogenate are higher in older patients probably due to the influence of decreases in the function of the ovaries. For this reason, some authors use a higher boundary between positivity and negativity for postmenopausal than for premenopausal patients.

*Design and Subjects:* We performed a study of clinical results for estrogen receptors in the group of patients from Pardubice and surrounding its with the use of simple statistical methods.

*Methods and results:* In this work, we assessed the results of radioreceptor analysis of estrogen receptors (ER) in breast cancers of patients and the dependence on age. We noted that the use of logarithmic axis  $y$  is possible to use instead of a linear one for approximate evaluation of results. In addition, we discussed the great differences in results of different authors in mean ER levels of oldest patients.

*Conclusions:* We estimated that our results are more similar to Italian nonselected patients than to South-African selected patients in the more progressive stage of disease. The causes of this stage are probably more important than ethnical differences.

We suppose that the boundary between positivity and negativity is not a discontinual change between premenopausal and postmenopausal patients but a continual one (maybe with changes in its direction). In connection with solving this question, we discussed the possibility of a carcinopromotional influence mediated by high levels of ER.

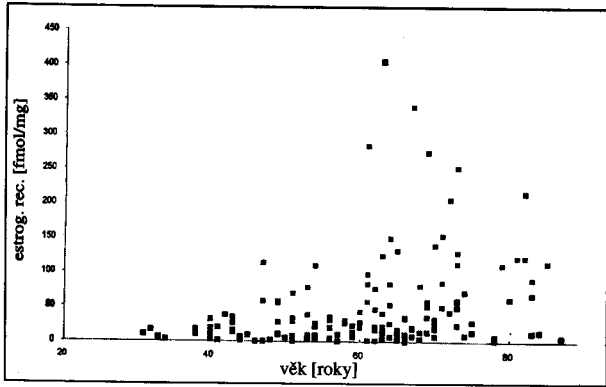
**Key words:** Estrogen receptors, breast cancer, age, threshold values

V závislosti na množství estrogenních receptorů (ER) v karcinomech prsu je rozhodováno o hormonální terapii pacientek. U pacientek ER pozitivních je např. doporučována léčba Tamoxifenem. V literatuře však není přijat jednotný a uspokojivý přístup k věkovým rozdílům, neboť vládne přílišná tendence zjednodušovat obecné zásady pro určení hranice mezi pozitivitou a negativitou a jen výjimečně se autoři pokouší o klasifikaci různých stupňů pozitivivity.

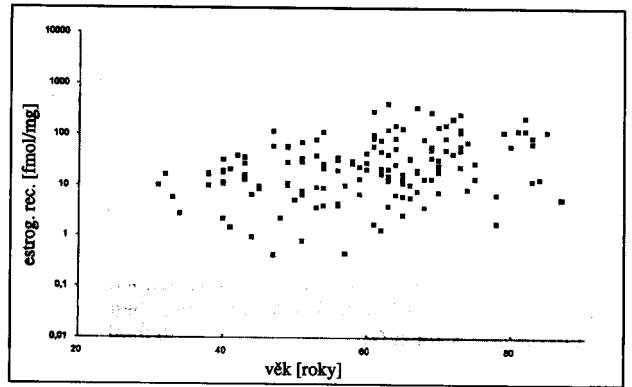
To jsme demonstrovali v naší loňské rešeršní práci (8). Tam jsme uvedli, že z námi prostudovaných publikací za posledních 10 let, ve kterých jsme našli hranici mezi ER (+) a ER (-) ve fmol/mg, byla u 25 použita pro hodnocení pozitivitu ER stejná hranice jak pro premenopauzální tak pro postmenopauzální pacientky. Mezilaboratorní rozdíly, z hlediska rozhraní mezi ER (+) a ER (-), jsou u takovýchto prací od 3 do 20 fmol/mg. Další rozpornou skutečností jsou literární údaje o procentu ER (+) pacientek v souborech publikovaných v posledních desíti letech. Pohybují se přibližně od 40 do 80 % u postmenopauzálních souborů - většinou více než stočlenných. Tatáž % lze uvést i u premenopauzálních souborů, které jsou méněčlenné. V těchto pracích, rozlišujících premeno- a postmenopauzální pacientky, sice byly použity také imunocytochemické meto-

dy stanovení ER, nicméně i v rámci výsledků pouze biochemického zpracování subcelulárního homogenátu u postmenopauzálních lze v tomto smyslu poukázat na rozdíly (8). Jde nejen např. o 10 %ní rozdíly v počtu ER pozitivních pacientek při použití stejného rozhraní (10 fmol/mg) mezi pozitivitou a negativitou (7, 9), ale i o (závažnější z důvodu blízkosti mediánů koncentrace ER) stejné % ER pozitivních pacientek při rozdílném rozhraní (10 a 20 fmol/mg) mezi pozitivitou a negativitou (3, 14).

Lze předpokládat, že zbývající variabilita po takto provedené eliminaci rozdílných přístupů ke stanovení hranice mezi ER (+) a ER (-) v rámci vybraného způsobu zpracování excízi je z části způsobena mezilaboratorními rozdíly v přesnosti stanovení a z části též věkovými a etnickými rozdíly mezi subpopulacemi. Předpokládáme sice, že každé takto zainteresované pracoviště provádí korekci využití hodnot ER pro terapii v závislosti především na věku, ale své přístupy nepublikovali, mohou se navzájem lišit a není možno porovnáním literatury optimalizovat takovéto korekce. Proto se domníváme, že i u nevelkých, ale stenorodých statistických souborů může zveřejnění matematické analýzy zpět pomocí dílčích závěrů k řešení této problematiky.



Obr. 1: Závislost estrogenových receptorů na věku v lineární osově soustavě



Obr. 2: Závislost logaritmu estrogenových receptorů na věku

## MATERIÁL A METODY

Vyšetřovány byly excize z mammakarcinomů pacientek z regionu spadajícího do radioterapeutické péče pardubické nemocnice. Pacientky lze charakterizovat jako soubor bez významné příměsi genofondu mimoevropských národností a bez pacientek černošského a mongolského původu.

Výšetření byla provedena na Výzkumném ústavu organických syntéz Pardubice - Rybitví v letech 1993 - 1994 a jsou charakterizována jednotným způsobem zpracování se stejným personálním obsazením laboratoře.

Po homogenizaci na přístroji Ultraturax (IKA Werke) a po ultracentrifugaci ve vakuové chlazené centrifuzě VAC 600 (Janetzki) byla provedena radioreceptorová analýza, využívající  $^3\text{H}$  estradiol a aktivní uhlí. Pomocí Scatchardova výpočtu bylo stanoveno množství receptorů a vztaheno ke koncentraci bílkovin v cytosolu.

Ze souboru byly vyloučeny vzorky zpracovatelné jen pro orientační výsledek (např. malé množství tkáně). Po této revizi byly pro studium grafické závislosti použity výsledky 147 pacientek. Soubor nebyl selektován podle stupně pokročilosti choroby, ale nebyly v něm pacientky, léčené před operací Tamoxifenem.

Výsledky ER jsme vynesli do různých typů grafů. Nejprve jde o všechny hodnoty v lineární osově soustavě a dále o totéž pozměněné zlogaritmováním osy y.

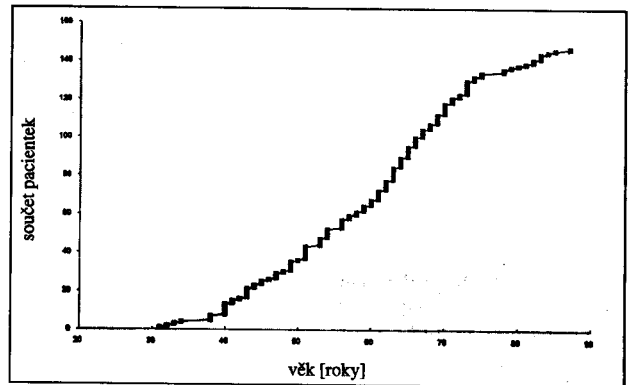
Dále jsme vypočítali překrývající se pětileté mediány ER pro každý rok a v obdobném grafu pak pětileté průměry  $\ln$  ER (po zpřůměrování odlogaritmované a tak vrácené do oboustranně lineární osově soustavy). Při těchto sumarizačních výpočtech jsme tolerovali jednoletou mezeru v datech. Jestliže však chyběly údaje v dvou sousedních letech, výpočet jsme neprováděli a v grafu pak ponechali mezeru.

Jemnější výpočty a korekce jsme neprováděli vzhledem k malému počtu pacientek.

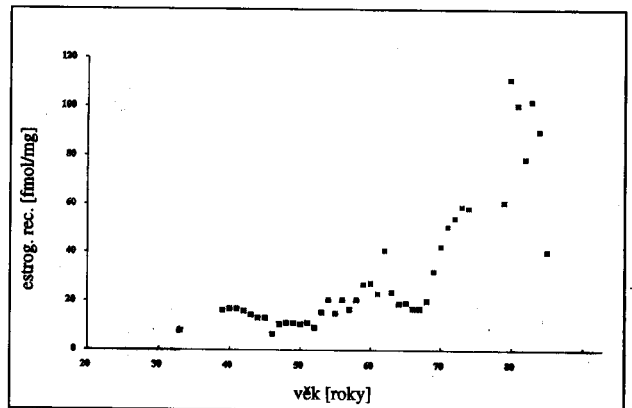
## VÝSLEDKY

V lineární i semilogaritmické osově soustavě naše grafy (č. 1 a 2) závislosti ER na věku ukazují jednoznačně, že jde o vztupnou funkci. Umístění hodnot v grafech naznačuje, že v různých věkových kategoriích mají hodnoty ER přibližně logaritmicko-normální rozložení. Nejvyšší odlehle hodnoty u čtyřicetiletých a mladších pacientek jsou přibližně desetkrát nižší než nejvyšší odlehle hodnoty starších - nad 60 let. Po 63. roce se ohraničení horní části našeho statistického souboru již nezvyšovalo, ale spíše snižovalo.

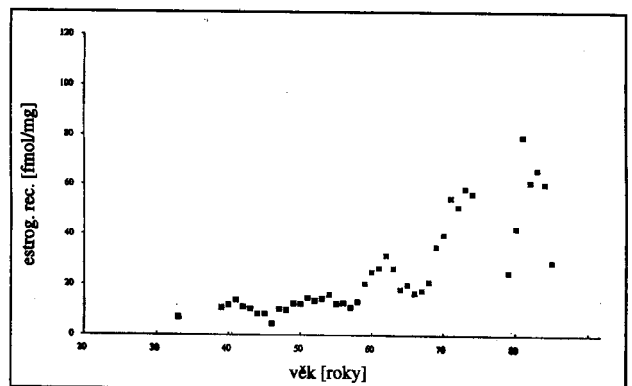
Náš graf věkového pořadí klinické manifestace, resp. stáří v době operace (č. 3) zobrazuje četnost jednotlivých věkových skupin způsobem, který je pro malé soubory jednodušší a přesnější, než snaha sestavit Gaussovu křivku. Jde vlastně o její integrál, který by měl mít uprostřed nejvertikálnější průběh



Obr. 3: Závislost kumulativní četnosti pacientek na věku



Obr. 4: Závislost pětiletých mediánů ER na věku



Obr. 5: Závislost pětiletých  $\ln$ -průměrů na věku

(inflexní bod místo vrcholu Gaussovy křivky), kdyby se jednalo o normální rozdělení. Z tohoto grafu kumulativní četnosti vyplývá, že nekumulativní četnost nových případů v našem statistickém souboru je přibližně stejná od 40 do 75 let věku. Od 60 do 75 let je jen poněkud vyšší, neboť proložená čára v grafu č. 3 je nepřilíhající nápadně strmější.

Z toho usuzujeme, že v grafech 1 a 2 tedy vzestup horních odlehých hodnot ER kolem 50 a pak znovu kolem 60 let není způsoben nárůstem četnosti, ze které by vyplývala větší pravděpodobnost výskytu extrémních hodnot. Z tohotož usuzujeme, že zastavení nárůstu horních odlehých hodnot našeho statistického souboru po 63 letech zase není způsobeno menším počtem pacientek mezi 65 a 75 lety.

Grafy závislosti mediánů a logaritmických průměrů ER na věku (č. 4 a 5) sice naznačují možnost skokové změny ER vlivem nástupu menopauzy (kolem 50 let), ale úspěšněji by se zřejmě dala hájit hypotéza, že jde o změny plynulé a výkyvy náhodné. Rozhodně jde o změnu nevelkou. Jako pravděpodobnější se jeví úvaha, že ER stoupá mnohem prudčeji v dalších věkových obdobích. Tak jsou na konci obou těchto sumarizačních grafů hodnoty ER přibližně pětikrát větší než na jeho začátku. Zároveň se také zvětšují výkyvy mezi některými sousedními roky. Při tom se graf mediánů velmi podobá grafu logaritmických průměrů, což svědčí ve prospěch hypotézy, že rozložení ER v rámci každé z věkových kategorií je logaritmicko-normální.

Tyto grafy (č. 4 a 5) naznačují možnost proložení přímkou v celém věkovém průběhu semilogaritmického grafu č. 2, ale zastavení nárůstu (resp. pokles) nejvyšších odlehých hodnot po 63. roce se vymyká z této možnosti (časově neomezené) semilogaritmické linearizace - ať již náhodně, nebo zákonitě. V těchto grafech však není vyloučeno proložit čáru zalomenou k příkřejšímu vzestupu např. v 50 letech a je nutno upozornit na zvýšení rozptylu ER spojené s vyšším věkem a uzavřít, že pro zcela přesné proložení regresních čar není náš statistický soubor dostatečně velký.

## DISKUZE

### 1) Vliv klimakteria na ER

Naše grafy dokumentují věkový nárůst ER - časově souvisí s úbytkem estrogenů v krvi. To je v souladu spíše s novějšími než se staršími literárními údaji o hranici mezi ER (+) a ER (-).

Pomineme-li ty údaje z literatury, které nerespektují vliv věku, lze naopak uvést práce, posuzující přímou závislost ER na věku jako „zlomovou“. Jde např. o rozdílnou hranici mezi ER (+) a ER (-) pro premeno- a postmenopauzální pacientky (16, 17). Avšak některé práce z tohoto desetiletí, které jsou dokumentovány grafem vzestupné závislosti ER na věku, sice tak respektují mnohem detailněji věkové rozdíly, ale řeší tuto závislost jako nezlomovou pomocí lineární regrese logaritmických hodnot ER (1, 6). Logaritmická stupnice ER v jejich grafech sice umožňuje alespoň formálně použít gaussovskou lineární regresi, ale zakrývá nebo znevýrazňuje i desetinásobné rozdíly ER mezi horními odlehými seskupeními různých věkových kategorií, v oblasti poměrně přesných výsledků mezi 10 a 1000 fmol/mg. Naopak zvýrazňuje chyby v oblasti nízkých výsledků na hranici použitelnosti biochemické metody. Provedení lineární regrese po logaritmování ER obou citovaných souborů sice umožnilo autorům použít snazší porovnání nebo lepší zobrazení jednotlivých podskupin, ale autoři neuvádějí v textu, že jejich způsob zpracování je univerzální pro tuto problematiku, nebo, že závislost na věku je nezlomová. Nicméně jejich zjednodušení je natolik sugestivní, že považujeme za užitečné detailněji probrat tuto problematiku. K jejímu řešení nás vedla potřeba vystihnout co nejpřesněji věkové změny rozhraní mezi ER (+) a ER (-), což má význam pro způsob léčení a prognózu.

Proti jejich hypotéze o možnosti proložit nezalomenou přímkou hodnotami ER v celém věkovém průběhu logaritmických hodnot ER lze postavit hypotézu, že proložená čára by mohla být esovitěho tvaru s pre- a postperimenopauzálním zalomením.

Jedná se o teoretický předpoklad, který opíráme o údaj z literatury, že kolem období klimakteria dochází ke zlomovému lineárnímu poklesu koncentrace estrogenů v krvi po 40. roku věku, který se vrací do horizontálního směru před 60. rokem blízko nulových hodnot (11). Z toho - na základě nepřímé závislosti mezi krevní hladinou estrogenů z vaječnicků a ER v mléčné žláze lze uvažovat o možnosti nápadného nárůstu ER, který by se měl teoreticky zastavit ve stejném věkovém období, kdy se zastaví pokles estrogenů, aby si buňky zachovaly přibližně stejnou úroveň hormonálního signálu. Jako jeden z operných bodů pro tuto hypotézu je možno citovat, že procento ER (+) buněk se v karcinomech prsu během perimenopauzy prakticky nemění, ale zvyšuje se intracelulární koncentrace ER se zvyšujícím se věkem (2, 5, 18).

Z prací (16 a 17), rozlišujících premeno- a postmenopauzální hodnoty ER prahu je možno usuzovat, že kolem menopauzy (tedy v blízkosti 50 let věku) autoři nacházeli trojnásobný vzestup hodnot ER. Spíše se ale domníváme, že jde jen o jejich „uzančení“ zaokrouhlené rozdělení pacientek a že nepředpokládají vliv progesteronu a tedy ani menopauzy na ER. Ani v našich výsledcích jsme nepozorovali „dramatický“ vzestup v rozmezí např. dvou let kolem menopauzálního věku 50 let, ale dosti plynulý vzestup od 40 do 60 let a to spíše jen v odlehých vysokých hodnotách ER. Mediány se nepravidelně zvyšovaly i po 60. roku věku.

Pokud by trojnásobný rozdíl mezi premenopauzálním a postmenopauzálním rozhraním mezi ER (+) a ER (-) z literatury (16 a 17) mohl být chápán jako rozdíl mezi středy premenopauzálního a postmenopauzálního věkového období, korespondovalo by to s naším pětinasobným rozdílem mezi začátkem a koncem křivek v našem mediánovém a logaritmicko-průměrovém grafu (č. 4 a 5).

Na základě našeho mediánového a logaritmicko-průměrového grafu se více zamýšlíme nad závěry autorů, prosazujících nezlomový věkový vzestup ER i po 60. nebo 70. roce. V našich grafech č. 1 a 2 (vykreslujících každou jednotlivou hodnotu) vykazovaly zastavení vzestupu jen horní odlehé hodnoty. Je tedy nutno uvažovat i o možnosti zvíkat náš dřívější předpoklad, že po 60. roce věku již ER nestoupá, když hodnoty estrogenů podle literatury (11) nemají kam klesat. Není totiž vyloučeno, že estrogeny jsou i po 60 letech v krvi přítomné, ale v nepatrných koncentracích, dále klesajících pod detekčními možnostmi biochemických metod, na nichž byly založeny údaje citované práce. Ale i v takovém případě má smysl hledat, zda dojde k linearizaci v pozdějším období. Horní meze schopnosti tvořit ER by mohly být odhaleny vyšetřením nádorů prsu nebo jejich metastáz po ovariectomii.

### 2) Teoretické důvody k výjimkám z převažujícího směru závislosti

V literatuře jsme se s detailním rozbořením výsledků ER setkali jen ojediněle a souvisí i s otázkou zvyšování přesnosti použitých metodik. Např. Mobbs a spol. (12) pomocí stejného biochemického postupu s naším popsali logaritmicko-normální rozložení hodnot ER ve svém statistickém souboru, kdežto pomocí enzymoimunoanalýzy výraznou bimodalitu ER. Tak by bylo možno očekávat, že se hodnoty ER budou seskupovat do čar, paprscitě rozložených kolem věkové spojnice mediánů. V našich výsledcích jsme však pozorovali spíše seskupení s opačnou šikmostí - např. pravé horní ohraničení našeho statistického souboru a pod ním znovu - seskupení vysokých hodnot.

Z hlediska čárových seskupení např. vysokých hodnot ER v grafu jednotlivých nádorů je nutno uvést, že takovýto nález jsme schopni podpořit různými fyziologickými hypotézami, ale zatím nemůžeme vyvrátit statistickou hypotézu o náhodnosti takovýto seskupení v našem souboru výsledků. Nicméně i v grafech citovaných prací (1 a především 6) vykazují pravé horní ohraničení jejich statistických souborů obdobný statisticky nepřilíhivý zlom věkového nárůstu jako v našich grafech č. 1 a 2.

Jedním z mechanismů u nichž by bylo vhodné řešit závislost klinické manifestace na věku je vliv imunologického dozoru. Biochemickým projevem tohoto vlivu by bylo větší množství (ER neobsahujících) bílkovin (mg) s přítomností např. bílých krvinek nebo nekrotické nádorové tkáně - na úkor nádorových ER (+) buněk. Hodnota ER v takovýchto nádorech (která je podílem ER ve fmol na mg bílkovin) by podle této hypotézy měla být nižší u pacientek, jejichž nádory se vlivem nadprůměrného imunitního dozoru manifestují až v pozdějším věku, neboť zánětlivý infiltrát nemá ER a jen zvětšuje jmenovatele zlomku fmol/mg. Tím by ale mohla být u některých pacientek maskována hormonální závislost a léčitelnost. Pokud by se jednotlivé podtypy nádorů sdružovaly v grafu závislosti ER na věku do podskupin, pak vlivem imunity by se takovéto shluky bodů rozvíjely do šikmo klesajících čar.

V té části každé skupiny (uvažované v předchozím odstavci), kde jsou místo nadprůměrné imunity naopak nádory s nadprůměrným % ER (+) buněk, předpokládáme, že vlivem těchto opačných vlastností v rámci skupiny je u takto charakterizovaných nádorů vyvolán opačný směr posunu v grafu závislosti ER na věku, resp. urychlení klinické manifestace karcinopromóčním vlivem ER. Lze tedy zároveň i předpokládat stejný vliv na šikmost skupin bodů v grafu, představujících nádory obdobného typu, pokud nejde o období vysoké ovariální činnosti (viz poslední odstavec tohoto bodu č. 2 Diskuse). V dostupné literatuře jsme se s touto myšlenkou v přesně této podobě neseťkali a svou úvahu opíráme především o výsledky dotýkající se prognózy pacientek u všech autorů. Předpokládáme, že má-li hladina receptorů vliv zodpovědný za prognostický význam po klinické manifestaci nádoru, má analogický vliv i před ní. Jestliže pak kastrace a blokáda ER antiestrogenní léčbou působí proti růstu ER (+) nádorů, je nutno připustit, že nadměrná přítomnost ER urychluje nadměrně množení buněk v prekancerózách. Tudíž že urychluje i jejich klinickou manifestaci.

Jinými slovy - jestliže některé z prekanceróz obsahují např. větší % ER (+) buněk, dostávají při stejné hladině hormonů více hormonálních proliferčních impulsů a tak by se teoreticky měly dříve manifestovat jako nádory. Tomu odpovídá poměrně častý nález nádorů kolem 40. roku v našich grafech. Ten lze demonstrovat v grafu č. 3 věkového pořadí. Pokud by byl derivován na nekumulativní četnostní graf, nevznikla by Gaussova křivka, nebo dvě za sebou, ale po počátečním pozvolném nárůstu příkře stoupající a ostře se lámající čára, tvaru jednoho, nebo dvou schodů. Je však obtížné vyjádřit se zde ke statistické spolehlivosti.

Chrenko a spol. (10) uvádí obdobný celorepublikový graf závislosti incidence na věku s prudkým nárůstem také již kolem 40. roku, avšak nejde pravděpodobně jen o nově se manifestující případy. Přesnost závěrů z tohoto grafu omezují citováním práce Cope a spol. (4), že pacientky odkládaly návštěvu lékaře od 4 měsíců do 5 let (u 37 nemocných ze 131).

Není vyloučeno, že prekancerózy s nejvyššími % ER (+) buněk se začínou zvrhávat již v premenopauzálním období, čímž se rychlost jejich karcinogeneze znásobí vlivem vyšších koncentrací estrogenů. Tentýž (v časnějším věku silnější) hormonální vliv brzdí zpětnou vazbou tvorbu ER, která tak zdaleka nedosáhne úplného (postklimakterického) rozsahu. Tím může dojít k diagnostickému omylu, neboť fungující hormonální

závislost je tak pro biochemika maskována a u těchto premenopauzálních nádorů nezjistíme vysoké hladiny ER. Hladinami ER u fibrocystické mastopatie jako u nejnámější prekancerózy prsu se zabývali Salazar a Calzada (15) a diskutují o nich v návaznosti na ovariální disfunkci a na hladinu hormonů v krvi.

### 3) Podklady ke stanovení hranice mezi ER (+) a ER (-)

Antiestrogenní terapie karcinomů předpokládá, že nádorové buňky reagují na hormony podle stejných zákonitostí, jako původní žlázová tkáň. Lze tedy sice uvažovat o postupné involuci žlázové tkáně postupem věku, ale zároveň je nutno připustit, že tkáň mléčné žlázy je schopna změnou tvorby receptorů zmírňovat důsledky výkyvů hladiny estrogenů, a tak alespoň částečně udržet svůj stupeň diferenciací při kolísání hormonální funkce vaječníků. Hodnoty v našich grafech č. 1 a 2 se však prakticky neshlukují kolem mediánů do paprsků, které by mohly rozčlenit nádory na podtypy, vhodné pro rozlišení mezi ER (-) a ER (+) a mezi různými stupni ER pozitivitu. Ani proložení vrstevnic četnosti kolem mediánů by nebylo hladké, stejnětak jako nejsou hladké spojnice mediánů samotných. To lze vysvětlit nejen vysokým rozptylem a malým počtem hodnot, ale také tím, že do karcinogeneze zasahují přídatné faktory.

Přesto, na základě histochemických citací o zvýšení koncentrace ER v ER (+) buňkách (2, 5, 18) i na základě našich grafů se domníváme, že např. premenopauzální mammakarcinom s nízkou hladinou ER by vlivem přechodu do postmenopauzálního věku nebo vlivem kastrace mohl získat vysokou hladinu receptorů, aniž by se kvalitativně změnila jeho schopnost k hormonální závislosti.

Zde je nutno uvést, že již před 10 lety obdobné stanovisko zaujali Skoog a spol. (1987). Po přepočtu (13) by se hranice pozitivitu Skooga a spol. pohybovaly pro premenopauzální kolem 2 fmol/mg a pro postmenopauzální přibližně 6 fmol/mg. Obdobně Vij a spol. (1990) určili hranici pozitivitu 3 fmol/mg pro premeno- a 10 fmol/mg pro postmenopauzální. Skutečnost, že v naší práci se objevují rozdíly desetinásobné je způsobeno tím, že jako o dělicím období neuvažujeme o menopauze, ale o perimenopauze. Desetinásobné rozdíly jsme sice původně uvedli pro nejvyšší odlehle hodnoty, ale ze zákonitostí o logaritmicko-normálním rozdělení nevyplývá, že by rozdíly mediánů měly být menší než desetinásobné, pokud není situace zkomplikována extrémním nedostatkem hodnot. Nicméně v našem logaritmicko-průměrovém ani mediánovém grafu jsme pozorovali jen přibližně pětinasobné rozdíly ER pro uvažovaný věk.

Vzhledem k tomu, že stáří pacientek je průměrně přibližně 60 let a hodnota mediánů v tomto stáří je přibližně 20 fmol/mg a že u publikací, které nerespektovaly věk a určily hranici mezi pozitivitou a negativitou 10 fmol/mg, lze uvažovat, že tuto hranici lze položit i v ostatních věkových obdobích také na 1/2 z příslušných mediánů. Tuto úvahu však zatím považujeme za orientační. Z opatrnosti bychom použili 1/4. Při jiném zaměření „korekce z opatrnosti“ lze vzít v úvahu možnost karcinopromóčního účinku ER, který by mohl zvyšovat nejen premenopauzální četnost nádorů, ale i vliv takto věkově přesunutých ER poměrně bohatých nádorů na mediány ER. Také proto jsme v minulých letech uvažovali o desetinásobném rozdílu mezi pre- a postklimakterickou hranicí pozitivitu ER - i když karcinopromóční účinek ER zatím jen nezávazně předvídáme bez řádných statistických důkazů.

### 4) Vývoj způsobu interpretace výsledků ER

Zde je vhodné uvést, že původní názory byly takové, že v premenopauzálním věku vznikají většinou jen ER (-) nádory. Jako jeden z opěrných bodů pro vyvrácení této původní domněnky je třeba opakovaně citovat, že procento ER (+) buněk se během

perimenopauzy prakticky nemění, ale zvyšuje se intracelulární koncentrace ER (2, 5, 18).

Kolem roku 1985 byl Tamoxifen preferován pro postmenopauzální ER (+) pacientky s postiženými uzlinami, ale během dalších dvou let byly publikovány studie potvrzující úspěšnost léčby tímto preparátem nezávisle na menopauzálním stavu (19).

Věková závislost změny hranice mezi ER (+) a ER (-) byla v literatuře přijímána překvapivě pomalu - jak již jsme popsali v úvodu. Rozdíly mezi premeno- a postmenopauzálními hranicemi pro ER pozitivitu navrhli sice Skoog a spol. již v r. 1987 (16), ale mnozí autoři se tím dlouho neřídili. Plynulě prokládání regresní čáry hodnotami ER v závislosti na věku publikovali v r. 1991 Bezwoda a spol. (1) a v r. 1992 Giuffrida a spol. (6). My jsme se brzy po zavedení metodiky v r. 1993-4 pokusili odvodit věkovou změnu hranice mezi ER (+) a ER (-) z obav před mezilaboratorními rozdíly - pokud možno nezávisle na převládajícím trendu literatury. Při tom jsme také již předpokládali pozvolný nárůst ER místo menopauzálního zvratu - i když jen od 40 do 60 let. To jsme odpřednášeli na semináři pardubické biologické společnosti v r. 1995, vycházející převážně z teoretických úvah o esovitém tvaru věkové závislosti tohoto rozhraní. Tytéž laboratorní výsledky jsme nyní přepracovali s větším využitím matematických přístupů. Nejsprávněji by se však problematika prahu dala řešit křivkami přežití a bezkomplikacího období v rámci statistiky izolovaných skupin u stejně starých pacientek. Domníváme se, že některá pracoviště v současnosti mají již tak velké statistické soubory, že by mohla sestavit statisticky spolehlivé grafy závislosti přežití na ER alespoň pro každé pětileté období věku zvlášť. Jinou možností, jak přispět k řešení těchto problémů je kombinace výsledků ze subcelulárního homogenátu (fmol/mg) s imunohistochemií (% ER pozitivních buněk) - vždy u nádoru téže pacientky.

#### 5) Rozdíly ve výsledcích jednotlivých autorů

Jak medián tak logaritmický průměr ER (grafy č. 4 a 5) u našich nejstarších pacientek leží kolem 80 fmol/mg. Proložení přímky po zlogaritmování (graf č. 2) bychom dostali teoretický průměr pro naše nejstarší pacientky přibližně v téže oblasti.

Statistický soubor Bezwody a spol. (1) je mimo jiné charakterizovaný tím, že neměli žádnou pacientku nad 75 let, kdež-

to v práci Giuffrida a spol. (6) byl věk nejstarší pacientky v době operace téměř 90 let. Přesto vrchol přímky, kterou proložili (přibližně - teoretická střední hodnota ER pro nejstarší pacientky) je v práci Bezwody a spol. (1) nečekaně vyšší (kolem 1000 fmol/mg) než v práci Giuffrida a spol. (6), kteří uvádějí vrchol proložení přímky u nejstarších pacientek kolem 50 fmol/mg.

Hlavní možnosti, jak vysvětlit rozdíly mezi citovanými pracemi je klinická forma nádorů, celkový klinický stav a způsob léčení před operací. Bezwoda a spol. (1) vybral pro svou studii 415 pacientek ve velmi pokročilém klinickém stavu s metastázami nebo s recidivou (pravděpodobně pooperační). U nich přichází v úvahu předčasný spontánní nástup menopauzy nebo terapeutická kastrace. Toto však autoři nespecifikovali, přestože to může být hlavní důvod pro neobvykle vysoké hodnoty ER ve srovnání s takto neselektovaným souborem Giuffridových (615 pacientek) nebo naším. Jiným důvodem může být větší invazivita nádorů, mají-li extrémní množství ER již před menopauzou nebo kastrací.

Bezwoda a spol. (1) ve svém jihoafrickém statistickém souboru téměř nenacházeli hodnoty pod 10 fmol/mg u pacientek starších padesáti let - narozdíl od obdobně starých italských pacientek (6). I to však může být vyvoláno nenáhodným výběrem pacientek k vyšetření. Teprve po zvážení rozdílů v klinickém stavu je třeba uvažovat o možnosti a velikosti vlivu mezilaboratorních, etnických nebo sociálních rozdílů na ER. Naše výsledky se podobají spíše podobají Giuffridovým.

#### DODATEK

Poděkování patří především Prim. MUDr. J. Dostálové z pardubické nemocnice, která pro období, kdy bylo v sousední hradecké nemocnici vyšetření receptorů na přechodnou dobu opuštěno, iniciovala zavedení těchto metod na Výzkumném ústavu organických syntéz Pardubice - předchozím pracovišti autora.

Děkuji též doc. RNDr. V. Semeckému, CSc. z naší katedry za podporu v dořešení této problematiky. Za podnětné připomínky ze statistického hlediska děkuji doc. Klemrovi z naší fakulty.

Za pečlivé zpracování excizií děkuji paní Holdíkové z VÚOS Pardubice.

#### Literatura:

1. Bezwoda W. R., Esser J. D., Dansey R., Kessel I., Lange M.: The value of estrogen receptor and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. *Cancer* 68, 867-72, 1991.
2. Bur M. E., Zimarowski M. J., Schnitt S. J., Baker S., Lew R.: Estrogen receptor immunohistochemistry in carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 69, 1174-81, 1992.
3. Ciatto S., Palli D., Iossa A., Pacini P., Cataliotti L., Distante V., Teglia C., Caridi G., Messeri G.: Prognostic significance of Estrogen receptor determination in primary breast cancer. *Radiother. Oncol.*, 12, 187-192, 1988.
4. Cope O., Wang C. A., Chu A. a spol.: Limited excision as a basis of a comprehensive therapy for cancer of the breast. *Am. J. Surg.* 1976, 131-400.
5. Gaskell D. J., Sangster K., Tesdale A. L., Carson D., Hawkins R. A.: Change in the estrogen receptor status of breast cancer with age-comparison of two types of assay. *Br. J. Cancer*, 66 (4), 610-613, 1992.
6. Giuffrida D., Lupo L., LaPorta G. A., LaRosa G. L., Padova G., Foti E., Marchese V., Belfiore A.: Relation between steroid receptor status and body weight in breast cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 28, 112-15, 1992.
7. Harlan L. C., Coates R. J., Block G., Greenberg R. S., Ershow A., Forman M., Austin D. F., Chen V., Heymsfield S. B.: Estrogen receptor status and dietary intakes in breast cancer patients. *Epidemiology*, 4, 25-31, 1993.
8. Horáčková P.: Nádorové markery - estrogenové receptory v karcinomech prsu žen. Diplomová práce - školitel Hochmann J., katedra biologických a lékařských věd, farmaceutická fakulta University Karlovy, Hradec Králové, 1997.
9. Hurlimann J., Gebhard S., Gomez F.: Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology*, 23, 239-248, 1993.
10. Chrenko V., Pačovský Z., Žaloufík J., Kašťák B., Čoupek P.: Psychologické aspekty u rakoviny mléčné žlázy. *Klinická onkologie* 3, 22-24, 1990.
11. Kobilková J., Siračský J., Králová A., Dvořák O., Smetana K., Lajda Z.: Cytodiagnostika v gynekologii. Avicenum, Praha, str. 46, 1990.
12. Mobbs B. G., Champman J. A., Sutherland J. D., Ryan E., Sustanoff E. R., Teik C. O., Murthy P. V. N.: Evidence for bimodal distribution of breast carcinoma ER and PgR values quantitated by enzyme immunoassay. *Eur. J. Cancer*, 29 A, 1293-97, 1993.
13. Remvikos Y., Magdelenat H., Dutrillaux B.: Genetic evolution of breast cancer. III: Age dependent variations in the correlations between biological indicators or prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 34, 25-33, 1995.
14. Ruder A. M., Lubin F., Wax Y., Geier A., Alfundary E., Chetrit A.: Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Epidemiologic characteristics and Survival differences. *Cancer*, 64, 196 až 202, 1989.
15. Salazar E. L., Calzada L.: The role of estradiol and progesterone receptors in the selection of endocrine therapy of patients with fibrocystic mastopathy. *Ginecol. Obstet. Mex.* 1, 132-5, 1993.
16. Skoog L., Humla S., Axelsson M., Frost M., Norman A., Nordenskjöld B., Wallgren A.: Estrogen receptor levels and survival of breast cancer patients. A study on patients participating in randomized trials of adjuvant therapy. *Acta Oncologica* 26, 95-100, 1987.
17. Vij U., Murugesan K., Kapur B. M. L., Sarin R., Dhawan I. K., Farooq A.: Functional estrogen receptors as biochemical marker for the detection of hormone-dependent breast cancer. *J. Surg. Oncol.*, 43, 13-18, 1990.
18. Walker K. J., McClelland R. A., Candlish W.: Heterogeneity of oestrogen receptor expression in normal and malignant breast tissue. *Eur. J. Cancer*, 28, 34-37, 1992.
19. ZENCA: Nolvadex (tamoxifen) in the treatment of breast cancer. ZENCA Pharmaceuticals, England 1993