

Průkaz vlivu estrogenových a progesteronových receptorů na přežití u karcinomu prsu bez cytostatické a hormonální léčby v malém souboru pacientek

Demonstration of the Effect of Estrogen and Progesterone Receptors on Survival in Breast Cancer without Cytostatic and Hormonal Treatment in a Small Set of Patients

Hochmann J.

Katedra biologických a lékařských věd FaF UK, Hradec Králové

Souhrn

Východisko: Vzhledem k diagnostickému a terapeutickému pokroku se stává, že statistické soubory pacientek hodnocených a léčených jednotnými metodami jsou malé. Proto je smysluplné prověřovat větší počet statistických přístupů. Je vhodné ověřovat, zda např. rozdíly mezi výsledky (+) a (++) u estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) v karcinomech prsu mají vliv na délku přežití. Tuto otázku by bylo možno řešit několika Kaplan-Meierovými křivkami přežití. Je ovšem užitečné posuzovat též prostý graf přežití v závislosti na koncentraci receptorů. Ale klasická regrese vnáší do tohoto způsobu hodnocení značnou chybu. Proto je mnohem přesnější používat ortogonální regresi. Jelikož lze předpokládat, že v době operace u některých pacientek s N0 ještě nedošlo k neodhalitelnému mikro-metastazování, lze u nich snáze docílit vyléčení ad integrum pouhým chirurgickým zákrokem. Proto jsme došli k závěru, že při hledání důkazů o pooperačním vlivu věkového poklesu krevních estrogenů na přežití je nutno vyloučit z hodnocení skupinu pacientek v N0 přežívajících 10 let. **Typ studie a soubor:** Tyto úvahy jsme ověřovali v případě sledování vlivu ER a PR na celkové přežití. Analýzu jsme prováděli u vzorku 74 pacientek s uvedenou léčbou léčených během dvou let v pardubické nemocnici. V době operace jich bylo 56 postmenopauzálních a z nich 21 ve stadiu N1. **Metody a výsledky:** ER a PR v karcinomech prsu byly vyšetřeny v cytosolu operačních biopsií. Kromě chirurgické léčby primárního nádoru a jeho původních a pooperačních metastáz byla použita adjuvantní radiologická léčba. U pacientek premenopauzálních s ER (+) byla provedena terapeutická kastrace. Nález vyšších ER u přežívajících postmenopauzálních pacientek v porovnání se zemřelými byl pod hranicí statistické významnosti. Také delší přežití u vyšších koncentrací ER ve skupině zemřelých N1 bylo při klasické regresi pod hranicí statistické významnosti. Proto jsme spojili důkazy ze skupiny přežívajících s důkazy ze skupiny zemřelých. U pacientek N1 přežívajících 10 let jsme pro začlenění do grafu závislosti délky přežití na ER zaokrouhlili jejich dobu přežití na 15 let. V tom případě již při klasické regresi vyšla statistická spolehlivost delšího přežití u vyšších ER ve spojené skupině premenopauzálních s postmenopauzálními. Avšak u postmenopauzálních samotných vyšel rozdíl statisticky nevýznamný. Jestliže jsme ale místo klasické regrese použili ortogonální regresi (podobná Demingově regresi), spolehlivost závislosti délky přežití na ER se u posledně jmenovaného grafu zvýšila natolik, že i v případě postmenopauzálních samotných vyšla statisticky velmi významná (na hladině 0,001). Stejná hladina statistické spolehlivosti byla dosažena i Kaplan-Meierovou analýzou. Také u PR – zvýšení koncentrací tohoto receptoru u přeživších v porovnání se zemřelými nebylo statisticky významné. Ale (na rozdíl od ER) jsme v případě PR pozorovali statisticky významný nárůst doby přežití v závislosti na receptorové koncentraci uvnitř samotné skupiny zemřelých – tedy i bez sloučení s přežívajícími. **Závěry:** Graf Kaplan-Meierovy analýzy je v této problematice více využíván, ale graf prosté závislosti přežití na receptorové koncentraci by také neměl být opomíjen, neboť např. lépe zobrazuje rozdíl v přežití mezi ER (+) a (++) . Je ale nutno v něm použít ortogonální regresi. Lepší výpovědní schopnost PR pro krátkodobé a lepší výpovědní schopnost ER pro dlouhodobé přežití zjištěná v našem statistickém souboru je ve shodě s literaturou.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Katedra biologických a lékařských věd
FaF UK

Heyrovského 1203

500 05 Hradec Králové

e-mail: jiri.hochmann@faf.cuni.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 9. 2009

Přijato/Accepted: 19. 11. 2009

Klíčová slova

estrogenové receptory – progesteronové receptory – karcinom prsu – stadium – TNM – přežití – ortogonální regrese – Kaplan-Meierova analýza

Summary

Background: With respect to diagnostic and therapeutic progress, it may occur that the statistical sets of patients evaluated and treated with uniform methods are small. As a consequence, it is meaningful to check a greater number of statistical approaches. It is suitable to verify whether, for instance, the differences between the results (+) and (++) for estrogen and progesterone receptors (ER and PR) in breast cancer have an effect on the length of survival. This question could be answered with the use of several Kaplan-Meier survival curves. However, it is also profitable to judge the simple graph of survival in dependence on receptor concentration. Nevertheless, traditional regression brings too great an error to this method of assessment. Therefore, the use of orthogonal regression is much more precise. Since it can be assumed that no non-revealable micro-metastases were present at the time of operation in some patients with N0, it is possible to achieve healing ad integrum of them using only simple surgery. Consequently, we concluded that it was necessary to exclude from the evaluation the group of patients in N0 surviving 10 years (in the search for evidence of the post-operative impact of age-based reduction of blood estrogen on survival). **Design and Subjects:** We verified these considerations when monitoring the ER and PR influence on overall survival. We performed this analysis in an approximately 2-year sample of 74 female patients who received the described treatment in Pardubice hospital. At the time of operation, 56 were postmenopausal and 21 of these postmenopausal patients were in stage N1. **Methods and Results:** ER and PR in breast tumours were examined in the cytosol of operational biopsies. Adjuvant radiological treatment was used in addition to the surgical treatment of primary tumours and their original and post-operative metastases. In the case of premenopausal patients with ER, (+) therapeutic sterilization was performed. The finding of higher ER in postmenopausal surviving patients (in comparison to dead ones) was below the boundary of statistical significance. Also, longer survival in cases of higher ER concentrations in the group of dead N1 patients was below the boundary of statistical significance in the use of traditional regression. Therefore, we put together evidence from the group of surviving patients with evidence from the group of dead patients. In the case of N1 patients surviving 10 years, we rounded their survival period to 15 years for inclusion in the graph of survival dependence on ER. In the case of the combined (premenopausal with postmenopausal) group, statistical reliability appeared for longer survival of higher ER already in traditional regression. However, for the postmenopausal alone, the difference was statistically insignificant. Nevertheless, if we used orthogonal regression (similar to Deming regression) instead of traditional regression, then the reliability of the dependence of the length of survival on ER increased (in the last cited graph) to such a degree that it was statistically highly significant (at the level of 0.001) even in case of just postmenopausal patients. The same level of statistical reliability was achieved in the Kaplan-Meier analysis. Also in the case of PR – the higher concentrations of this receptor in survivors compared to dead patients were not statistically significant. But (in contrast to ER) in the case of PR, we observed a statistically significant increase in survival time depending on the receptor concentration within the group of only the dead patients – hence without putting them together with the surviving patients). **Conclusions:** The graph of the Kaplan-Meier analysis is more frequently used when solving these problems but the graph of simple dependence of survival on receptor concentration should not be neglected either because, for example, it better shows the difference in survival between ER(+) and (++) . Nevertheless, it is necessary to use orthogonal regression in it. The greater suitability of PR and ER for short-term and long-term prognosis, respectively, which we identified in our statistical set, is in concordance with the literature.

Key words

estrogen receptors – progesterone receptors – breast cancer – stage – TNM – survival – orthogonal regression – Kaplan-Meier analysis

Úvod

Správná znalost vlivu koncentrace estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) na délku přežití pacientek po operaci karcinomu prsu s pouze radiologickou adjuvantní léčbou je velmi důležitá při posuzování účinku především hormonální terapie. Např. Castagnetta et al [1] usuzují, že ER je dobrý prognostický ukazatel dlouhodobého přežití, ale není schopný předvídat časný relaps. Dále pak uvádějí, že výhodnější prognostický ukazatel pro předpověď časného relapsu je PR.

Také mnozí další autoři popsali příznivý vliv pozitivního „receptorového stavu“ na přežití (z české literatury např. [12]), ale v případě malého počtu pacientek může být takovýto průkaz zastřen z důvodu velké variability výsledků. Totéž se týká např. nádorů dělohy, u nichž Perts-

chuk et al [11] našli, a naopak Martin et al [10] nenašli příznivý vliv positivity ER a PR na přežití pacientek.

Je proto důležité popsat, jaké způsoby stratifikace statistického souboru je vhodné použít, aby správný výsledek analýzy nebyl zastřen podskupinami pacientek, které do výpočtu nesmí být zařazeny. Při stratifikaci jde např. nejen o oddělené posuzování pacientek premenopauzálních a postmenopauzálních, ale i o samostatné posuzování pacientek s N0 nebo N1 atd.

Zároveň je však nutno pokoušet se spojit malé skupiny adjustací dat, aby stratifikované skupiny nebyly příliš malé. Jde např. pro společné posouzení pacientek s rozdílným postižením uzlin s délkou přežití transformovanou na průměrné stadium N.

Problém je totiž také v získání dostatečně velkého statistického souboru k hodnocení. Jestliže některé pracoviště např. v polovině sledovaného období přešlo z cytosolových metod stanovení ER a PR na imunohistochemické techniky, zmenšil se počet jednotné hodnotitelných pacientek na polovinu. Také v rámci jedné metodiky se v průběhu několika roků značně změnila citlivost vyšetření. Existují i velké mezilaboratorní odchylky v citlivosti metod [4].

Navíc způsob péče o pacientky s karcinomem prsu, a tím i výsledky terapie se během desetiletého sledovacího období v jakékoliv moderní nemocnici poměrně rychle mění. Je tedy užitečné snažit se posoudit i malé statistické soubory.

Proto se v této práci snažíme přiblížit čtenáři některé základní statistické pří-

stupy posuzování našeho malého statistického souboru. Domníváme se, že porovnáním našich výsledků s takovýmito pracemi jiných autorů (o malých statistických souborech) může být získán spolehlivý statistický závěr o vlivu receptorů na přežití pacientek.

Materiál a metody

Vyšetřovali jsme excize z mamakarcinomů pacientek především z pardubické nemocnice. Pokud to bylo možné, operace byly prováděny v první fázi menstruačního cyklu. Žádná pacientka nebyla léčena před operací Tamoxifenem.

Vyšetření excizí byla provedena na Výzkumném ústavu organických syntéz Pardubice-Rybitví v letech 1993–1994. Po homogenizaci na přístroji Ultraturax (IKA Werke) a po ultracentrifugaci ve vakuové chlazené centrifuze VAC 600 (Janetzki) byla provedena radioreceptorová analýza využívající ^3H estradiol, analog progesteronu ^3H ORG.2058 (Amersham) a aktivní uhlí.

Pro výpočet koncentrace receptorů v oblasti jejich nízkých hodnot, kde nelze korektně vypočítat směrnici Scatchardovy přímky pomocí klasického způsobu, jsme pro její korekci použili průměrnou asociační konstantu z vysokých koncentrací ER a PR. Tímto způsobem jsme zmenšili možnost vzniku falešně nulových hodnot receptorů. Jestliže vyšly hodnoty receptorů nulové, nahradili jsme je hodnotou 0,1, aby byly použitelné pro logaritmické grafy.

Pooperační péče o pacientky spočívala především v adjuvantní radioterapii. Pokud u premenopauzálních pacientek bylo ER nad 10 fmol/mg, byly léčeny kastrací. Šlo však jen o poměrně malý počet pacientek. Soustředili jsme se především na postmenopauzální pacientky – a ty nebyly ovariectomizované. Dispenzarizační péče byla zaměřena především na včasné odhalování metastáz a na jejich chirurgickou nebo radiologickou léčbu.

V této práci jsou z nového hlediska statisticky vyhodnoceny stejné receptorové výsledky stejných nádorů, o kterých jsme referovali v pracích o řešení jiných závislostí – jako vlivu věku na ER, na PR a na ER/PR [5–7]. V tomto sdělení tedy nyní porovnáváme tyto výsledky vyšetření ER a PR s přežitím pacientek.

Tab. 1. Mediány ER (fmol/mg) u různých stadií karcinomů prsu postmenopauzálních pacientek při operaci.

	N0		N1
zemřelé	17,7 (n = 8)	← nevýznamné →	23,8 (n = 12)
	↑		↑
	nevýznamné		nevýznamné
	↓		↓
přežívající	16,8 (n = 22)	← statisticky významné (0,05) →	53,4 (n = 9)

Pro tento účel byly z tohoto statistického souboru vyřazeny pacientky, které byly léčeny klasickou cytostatickou terapií i pacientky s medikamentózní hormonální terapií – včetně tamoxifenové. Navíc z výše uvedených publikovaných výsledků byla v této práci posouzena jen novější část (přibližně polovina) pacientek, jejichž výsledky jsou v rámci pardubické nemocnice převedeny do elektronické formy, dostupné na celoustavní počítačové síti.

Tento statistický soubor nebyl tříděn na základě např. histologických vlastností nádorů. Avšak použili jsme dělení do skupin, které se liší předoperačním postižením uzlin. V těchto skupinách bylo sledováno přežití pacientek.

V grafech závislosti délky přežití na koncentraci receptorů jsme použili logaritmické souřadnice jak na ose x, tak na ose y. Důvodem bylo, že rozložení hodnot ER i PR v grafech při použití lineárních souřadnic bylo asymetrické – s převahou nižších hodnot. Totéž se týká i délky přežití pacientek. Z téhož důvodu jsme pak k proložení přímek grafem použili mocninovou regresi. Použití jiných závislostí, které nabízí program MS Excel pro nezlogaritmované hodnoty, dávalo vždy menší korelační koeficienty. U vybraných grafů byla po zlogaritmování hodnot x a y navíc použita ortogonální regrese, která je založena nikoliv na vertikálních odchylkách veličiny y od proložené čáry, ale na kolmých odchylkách od proložené čáry.

Statistická významnost nalezených jevů byla v případě rozdílů skupinových mediánů testována pomocí Rank-sum testu. Statistická spolehlivost z hlediska tvaru proložené čáry v grafech byla testována pomocí korelačního koeficientu – zda dosahoval hodnoty 0,9. Statistická spolehlivost závěrů, že délka přežití

v těchto grafech je vyšší u větších koncentrací receptorů, byla provedena porovnáním tohoto korelačního koeficientu s tabulkami jeho kritických hodnot zohledňujících počet pacientek. V případě grafů závislosti snižujícího se počtu přežívajících pacientek v závislosti na době po operaci (Kaplan-Meierovy grafy) byly obě přímky vzniklé zlogaritmováním osy x porovnávány testem na neshodnost (přímka pro ER (+) proti přímce pro ER (–)).

Výsledky

Stadium choroby jako nejdůležitější faktor přežití

Naděje na přežití klesá vlivem postižení uzlin velmi markantně. Je to vidět z počtů postmenopauzálních pacientek v jednotlivých podskupinách tab. 1 (hodnoty n). Oblast mezi N0 a N1 může být označována za zlomovou, neboť naděje na přežití zde klesá ze 73 % u N0 na 43 % u N1. To je tedy na méně než na polovinu ze všech N1 pacientek. V tabulce již neuvádíme pacientky s N2, neboť jejich počet je pro statistické posouzení příliš malý.

Také délka přežití v rámci pouze zemřelých pacientek je kratší u vyšších N. To je vidět na obr. 1 ve skupině zemřelých. Pacientky v N0 přežívají více než třikrát déle než v N2.

Také prognostický význam stadia růstu nádoru T je v pardubických výsledcích prokazatelný (tabelárně ani graficky zde nedokumentováno). Pokles naděje na přežití na 50 % byl přibližně v oblasti mezi T2 a T3.

Rozdíly mezi zemřelými a přežívajícími 10 let – jsou výraznější u ER

Takováto analýza ER u postmenopauzálních skupin přežívajících v porovnání se zemřelými byla komplexnější a exaktnější, jestliže místo procenta ER (+) pa-

cientek byly ve stejných skupinách posuzovány mediány ER (tab. 1).

V případě postmenopauzálních N1 je zvýšení ER u přežívajících v porovnání se zemřelými sice nápadné, ale statisticky nevýznamné. Totéž se týká N2 a spojené skupiny N1 + N2 (v tabulce neuvedeno pro malý počet N2). Naopak u N0 je ER přežívajících prakticky stejné jako u zemřelých.

Kromě výše uvedených vertikálních rozdílů ER v tabulce – uvnitř skupin se stejným N, lze v tab. 1 porovnávat horizontálně receptorové hodnoty mezi různými N. Rozdíl mezi přežívajícími N0 a N1 je jako jediný statisticky signifikantní (ze všech výše uvedených rozdílů desetiletého přežití). Navíc při spojení N1 s N2 a testování proti N0 byla tak u přeživších zjištěna signifikance dokonce na hladině 0,05.

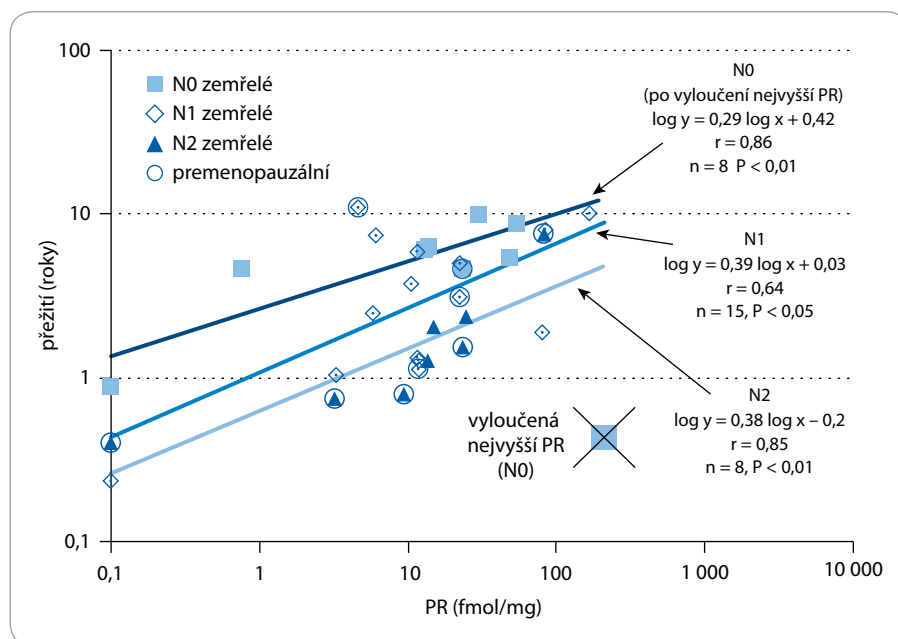
Analogický trend rozdílů receptorových koncentrací mezi N0 a N1 u přežívajících pacientek se objevuje i u mediánů PR. Ale je statisticky významný pouze po spojení N1 s N2 (v porovnání s N0 – na hladině 0,05). Bez spojení N1 + N2 tam není Rank-sum test pozitivní – stejně jako v případě vyšších koncentrací PR u přežívajících N1 v porovnání se zemřelými N1.

Délka přežití pouze v rámci zemřelých – výraznější je závislost u PR

Dále jsme posuzovali jednotlivé hodnoty ER a PR v rámci pouze zemřelých pacientek [4]. V kontrastu s tím, že při srovnání pouze celkového desetiletého přežití byly signifikantnější rozdíly v případě ER než PR, je při posouzení délky přežití pouze zemřelých statisticky mnohem signifikantnější vliv PR než u ER.

Pacientka s nejvyššími ER i PR ve stadiu N0 má ale extrémně krátké přežití, které je nejodlehlejší od proložené čáry. Snižuje statistickou významnost závislosti y na x v případě ER i PR a vede k úvaze o vhodnosti vylučování extrémních hodnot nad 100 fmol/mg. Mnozí autoři totiž upozorňují na paradoxnost jejich krátkého přežití [např. 2–3,8,14–5,17].

Po jejím vyloučení vznikla statistická významnost i u ER ($P < 0,05$), ale jen u N0 a u sloučení stadií N0, N1 a N2). V případě PR byla zjištěna signifikance u stadií N1 a N2 – a po vyloučení uvedené proble-



Obr. 1. Závislost přežití na PR u všech zemřelých.

matické pacientky i u N0. V tom případě pak po sloučení všech stadií dosáhla nejvyšší hladiny spolehlivosti (0,001). Stejně signifikantní výsledky vznikly, když jsme minimalizovali statistickou příznivost PR nulových hodnot tím, že jsme je nahrazovali hodnotou 0,1 fmol/mg, ale 1,0 fmol/mg.

V případě N2 patří závislost přežití na PR k nejtěsnější (P < 0,01) a je nutno zdůraznit, že se týká především premenopauzálních pacientek, označených v grafu prázdnými kroužky.

V těchto logaritmických grafech závislosti přežití všech pacientek na koncentraci receptorů jsou hodnoty rozloženy přibližně do elipsoidního pole, nepříliš nápadně zvednutého u vyšších hodnot receptorů šikmo vzhůru k delšímu přežití. Jestliže se soustředíme pouze např. na pacientky N1, zvýší se procento pacientek uprostřed této elipsy, neboť téměř všechny pacientky s N0 přežívají déle a N2 kratší dobu – v porovnání s prostřední proloženou čarou.

Analogické ztenčení oblasti bodů je mnohem výraznější v případě samostatného posuzování N0 a N2. To je důvod, proč čára proložená takovýmto štíhlejším elipsoidním polem má v našich grafech často lepší (vyšší) korelační koeficient (než bez této stratifikace) – díky zmenšení rozptylu bodů kolem proložené čáry.

Ale signifikantnost závislosti y na x je výraznější naopak u sloučených stadií N0, N1 a N2 (navzdory horšímu korelačnímu koeficientu), neboť sloučením dochází ke zvýšení počtu pacientek (zvýšení hodnoty „n“).

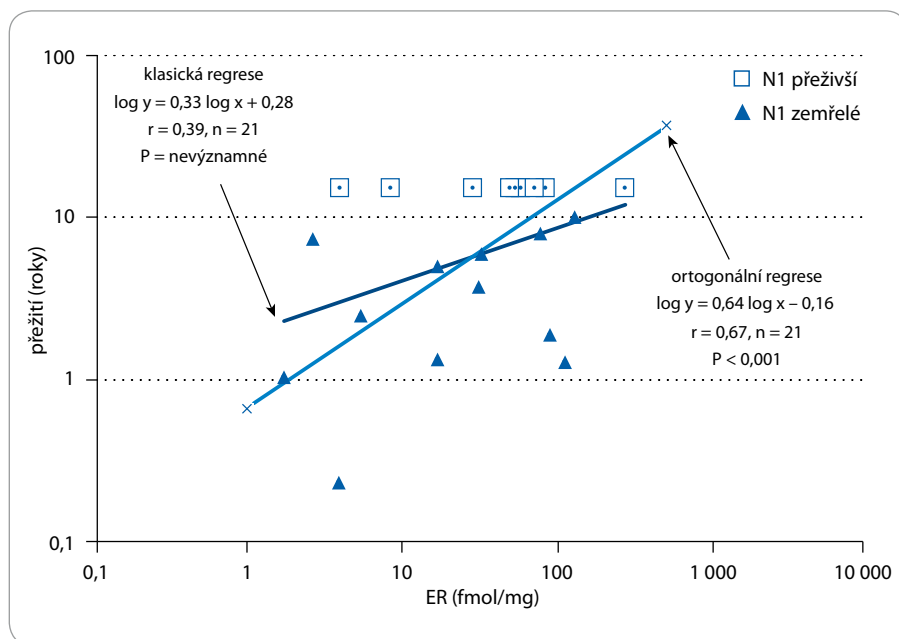
Zvýraznění rozdílů ve vlivu ER na přežití – spojením procenta přeživších s délkou přežití u zemřelých

Použití klasické regrese

Jestliže jsme u N1 spojili skupiny přežívajících pacientek (tab. 1) a zemřelých pacientek (obr. 1) do obr. 2, došlo ke spojení dvou souhlasných vlivů receptorů na přežití a zároveň ke zvýšení počtu pacientek pro statistické testování. Hodnoty ER pacientek přežívajících 10 let se v obr. 2 nacházejí nahoře a jsou na sebe nejtěsněji nahloučeny více vpravo (ve srovnání se zemřelými pacientkami).

Toto statistické porovnání je sice závislé na tom, jak dlouhé je odhadnuto další přežívání nad rámec sledovaného období u přeživších pacientek, ale dosazováním jiné hodnoty než 15 let u přežívajících nedocházelo ke znatelným změnám výsledků statistického testování (díky tomu, že rozložení hodnot je logaritmicko-normální).

Po tomto sloučení skupiny zemřelých s přežívajícími vyšel korelační koeficient proložené čáry prakticky stejný jako



Obr. 2. Závislost přežití na ER u N1 (jen postmenopauzální – spojený výpočet – přeživší se zemřelými).

u zemřelých N1 v obr. 1 – pokud nebyly vyloučeny premenopauzální pacientky. Pokud vyloučeny byly, byl nižší (obr. 2). V obou případech korelační koeficient z daleka nedosáhl hodnoty 0,9. Ale díky takto způsobenému zvýšení hodnoty „n“ došlo při testování závislosti přežití na koncentraci receptorů k přiblížení se hranici statistické signifikance (ale ne k jejímu překročení) – pokud se jednalo pouze o postmenopauzální pacientky. Signifikantní výsledky závislosti přežití na ER však byly již dosaženy, jestliže premenopauzální pacientky vyloučeny nebyly, neboť se tím ještě více zvýšila hodnota „n“.

Použití ortogonální regrese

Další zcitlivění analýzy této závislosti u sloučených skupin přežívajících se zemřelými spočívalo v použití ortogonální regrese. Jestliže jsme použili ortogonální regresi místo klasické, došlo především ke zvětšení strmosti směru proložené přímky. Jde o vertikálnější z přímek v obr. 2. Ta horizontálnější je naopak pro klasickou regresi.

Korelační koeficient ortogonální regrese je nápadně vyšší než u klasické regrese. Nedosahuje ovšem hranici 0,9 statisticky přijatelnou pro rozhodnutí, zda

studovaná závislost v logaritmických souřadnicích je přímkového tvaru. Avšak z tohoto korelačního koeficientu lze již odvodit, že závislost délky přežití na koncentraci receptorů je statisticky signifikantní na hladině 0,001 i při počtu pacientek $n = 21$ – tedy dokonce i při vyloučení premenopauzálních ze spojené skupiny přeživších se zemřelými N1. To podporuje myšlenku, že je vhodné používat ortogonální regresi jako výhodnější a přesnější v porovnání s regresí klasickou.

Použití grafu úbytku počtu přežívajících pacientek po operaci

Nejpoužívanějším a nejmarkantnějším způsobem vyjádření vlivu receptorové positivity na přežití jsou grafy úbytku dosud živých pacientek v závislosti na době po operaci. V případě našich pacientek (obr. 3 a 4) jsou výsledky velmi sugestivní a je vhodné připomenout, že se navíc jedná i o způsob testování statistické významnosti.

Tu je sice možno převzít z výsledku ortogonální regrese, ale přesnějším postupem je zlogaritmovat osu x, čímž vznikne možnost proložit uvedenými body přímky – místo křivek. Vzájemným statistickým testováním statistické neshody

těchto dvou přímek pak vyšlo, že při rozhraní mezi ER (+) a ER (–) 10 fmol/mg se tyto přímky liší na hladině 0,001 – stejně jako při rozhraní 20 fmol/mg. Pro rozhraní 40 a 50 fmol/mg to bylo již jen na hladině 0,01. Při rozhraní 60 fmol/mg se již jmenované čáry od sebe statisticky neliší. To, že se za rozhraním 50 fmol/mg tento rozdíl mezi jmenovanými přímkami zcela stírá, souvisí s blízkostí mediánu ER přežívajících pacientek ve stadiu N1.

Diskuze

Význam postižení uzlin pro hodnocení délky přežití

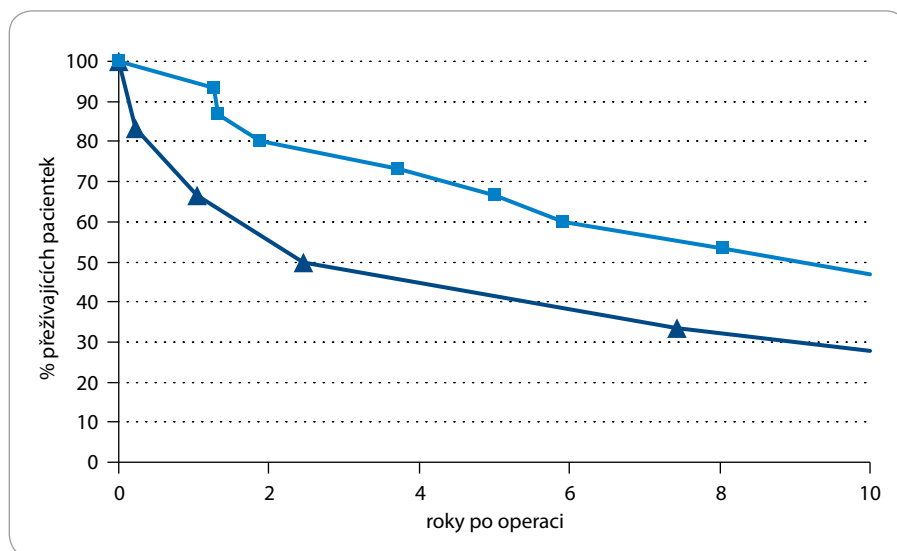
Nevhodnost posuzování skupiny N0 při analýze vlivu ER a PR na přežití

U nádorů s makroskopickými metastázami v uzlinách je velká pravděpodobnost, že, kromě těchto snadno diagnostikovatelných metastáz, jsou v organizmu navíc ještě neodhalitelné mikrometastázy, které jsou schopny způsobit recidivu onemocnění. Dokonce i některé nádory ve stadiu N0 – také již před operací vytvořily nediodagnostikovatelné mikrometastázy (a tím později způsobily smrt pacientek). Ale navíc je nutno předpokládat existenci další podskupiny N0, ve které se ještě mikrometastázy nevytvořily v uzlinách žádné (podobně jako u carcinoma in situ).

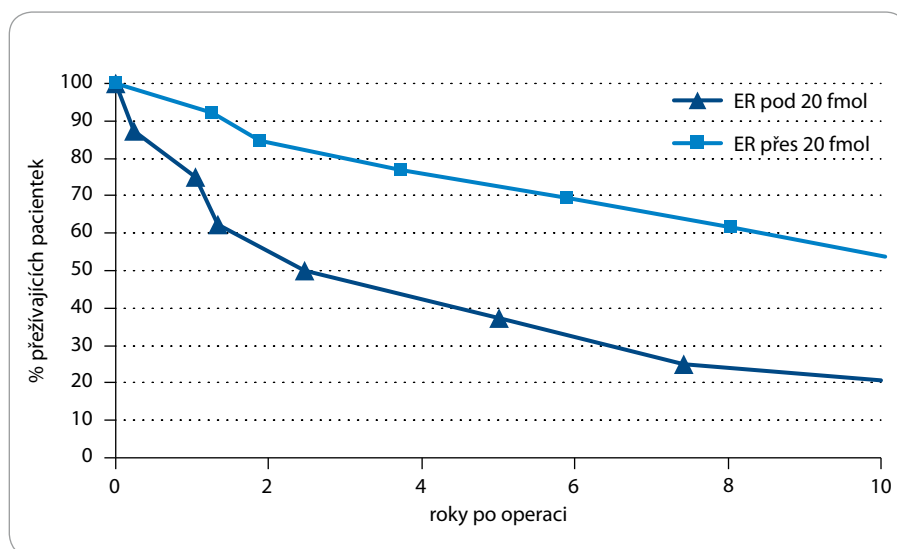
Jestliže se u takovýchto pacientek s N0 ještě nevytvořily v uzlinách ani mikrometastázy, tak chirurgický zákrok samotný vyléčí nádor ad integrum – i v případě nepříznivé hladiny receptorů. Případná nevýhodnost nízké receptorové koncentrace na metastázy se nemůže uplatnit, když po operaci žádné (ani mikrometastázy) nikde nejsou.

Proto nemá smysl hledat vliv ER na celkové přežití u N0. Z toho důvodu jsme se soustředili na vliv ER u N1, kde vyléčení ad integrum samotným chirurgickým zákrokem je mnohem méně pravděpodobné.

Do důsledku tedy – když některý karcinom v N0 má sice nepříznivě nízkou hladinu receptorů, ale je vyléčen ad integrum chirurgicky (navzdory nepříznivosti jeho negativity ER a PR), posune arteficiálně mediánu ER a PR ve skupině přežívajících k nižším hodnotám. To se skutečně projevilo a u N0 jsme nenašli žádný receptorový rozdíl mezi zemřelými a přeživšími celých 10 let.



Obr. 3. Rozdíly přežití N1 u rozhraní ER 10 fmol/mg u postmenopauzálních pacientek.



Obr. 4. Rozdíly přežití N1 u rozhraní ER 20 fmol/mg u postmenopauzálních pacientek.

Také u N1 může být příznivý vliv menopauzálního snížení koncentrace estrogenů zastřen poměrně velkou úspěšností primárního chirurgického zákroku u některých pacientek. Můžeme se však domnívat, že to nehraje tak velkou roli, aby zastřela důkazy pro naši úvahu o statistické výhodnosti N1 v porovnání s N0.

U ještě horšího stadia – N2 – je možno uvažovat v tom smyslu, že stoprocentní vyléčení pacientek pouhým chirurgickým zákrokem je téměř nemožné. V našem statistickém souboru je však stadium N2 zastoupeno především premenopauzálními pacientkami. Z postmenopauzálních N2 přežily jen dvě pacientky, takže

v jejich případech nejsou výsledky ze statistického hlediska závažné (navzdory jejich vysokým hladinám receptorů, které svědčí ve prospěch hypotézy o výhodnosti vysokých ER). Navíc při analýze délky života u zemřelých (místo tohoto počtu přežívajících) jsme opět nacházeli velmi příznivý vliv vyšší receptorové koncentrace na délku přežití u těch N2 pacientek, které zemřely.

Vliv předoperačního stadia choroby na přežití

Naděje na celkové přežití u N0 je 73 %, kdežto u N1 je o 30 % nižší. Z počtů pacientek v grafu délky přežití zemřelých

pacientek vyplývá, že u většího postižení uzlin (node – N) je přežití horší. Obdobné nálezy jsou v literatuře velmi časté [18]. Analogický byl v našich výsledcích i důsledek velikosti a rozvoje nádoru (tumor – T). V návaznosti na to by bylo vhodné sestavit statistické skupiny ještě detailněji rozčleněné. Každá skupina N by se tak rozpadla na několik dalších podskupin, neboť lze předpokládat, že přežití u T1 N1 bude jiné než např. u T3 N1.

V našem statistickém souboru však byly počty pacientek v podskupinách již příliš malé a naše nálezy po takovémto dalším rozčlenění by byly nepřesné a nesignifikantní. Pro hodnocení vlivu receptorových koncentrací na přežití by jistě bylo vhodné mít k dispozici takové množství pacientek, aby bylo možno sestavit statistické podskupiny podle výše popsané úvahy. Avšak naším cílem je dokázat, že i malý soubor lze účelně statisticky vyhodnotit – tedy alespoň z hlediska nejmarkantnějších statisticky významných skutečností.

Nicméně se v tomto kontextu nabízí určité zjednodušení přístupu k zohlednění stadia T, neboť Younes et al [18] rozdělili toto stadium pouze na dvě skupiny s rozhraním velikosti nádoru 3 cm. Prognostickému významu T dávají přednost před prognostickým významem ER pouze v případě pozitivy N. Naopak N používají jako nejhlavnější prognostický faktor – což jsme učinili i my.

Vliv koncentrace ER a PR na přežití

Po excizi karcinomu v postmenopauzálním věku, když nádor znovu roste z nepatrně nedignostikovatelné mikrometastázy, jsou již estrogenové hladiny vlivem vysokého věku pacientky nízké. To by mělo mít za následek zpomalení růstu těchto metastáz. K témuž důsledku dochází, je-li u premenopauzální pacientky s ER (+) nádorem provedena kastrace.

Naopak, u nádorů stimulovaných jinými růstovými faktory neznáme takovýto logický věcný důvod k věkovému snížení proliferace. To považujeme za vysvětlení skutečnosti, že nádor s vysokým ER může mít prognózu lepší než nádor s nízkým ER – pokud jsou oba operovány ve stejném stadiu TNM.

Avšak mnohé nádory prsu mohou být stimulovány k růstu jak vlivem aktivace

ER, tak vlivem aktivace např. HER2/neu. Příznivý vliv menopauzálního stavu lze potom kvantifikovat podle toho, zda nádor je např. nejen ER (+), ale ER (++), a tudíž, zda aktivace z ER značně převahuje nad aktivací např. z HER2/neu. Tato podkapitola tedy zaujímá teoretické stanovisko i k otázce, zda pacientky s ER (+) nádorem, které před operací došly do stejného stadia (např. N1), se navzájem liší v délce přežití z důvodu rozdílně silné positivity ER (nikoliv jen porovnání ER (+) proti ER (-)).

Příznivý vliv dalšího námi sledovaného markeru PR na délku přežití vyplývá z toho, že vliv progesteronu vede buňky spíše k diferenciaci než k proliferaci. Tedy i zde je možno očekávat rozdíl ve vlivu na délku přežití – mezi PR (+) a PR (++). Ale zároveň výsledek vyšetření PR dává informaci, do jaké míry je nádor mutován k neschopnosti tvořit PR vlivem aktivace ER (a provádět i jiné diferenciační kroky).

Jak je rozvedeno níže, v případě desetiletého přežití nám vyšel statisticky významnější vliv ER, kdežto u kratšího období byl významnější vliv PR. To je v souladu s literaturou. V pracích některých autorů [9] se objevuje upozornění na možnost lepší prognostické použitelnosti PR než ER. Ale Castagnetta et al [1] usuzují, že ER je dobrý prognostický ukazatel dlouhodobého přežití, ale není schopen předvídat časný relaps. A v případě PR uvádí, že je výhodnějším prognostickým ukazatelem pro předpověď časného relapsu. V tomto smyslu lze vyložit i naše výsledky – v nichž PR nekorelovaly s celkovým přežitím tak dobře jako s délkou přežití u zemřelých.

Rozdíly ER mezi přežívajícími 10 let a zemřelými

Pokud jsme z hlediska desetiletého přežití analyzovali celý náš statistický soubor pacientek bez rozdělení do podskupin podle postižení uzlin, byl vliv receptorových hladin na přežití pacientek naprosto nesignifikantní. Naopak, když jsme vybrali pro analýzu jen pacientky ve stadiu N1, byl vliv ER na přežití výraznější.

Jestliže jsme u pacientek v N1 posuzovali pouze postmenopauzální, byl pozorován výrazně vyšší medián ER u přeživších než u zemřelých. Avšak bylo to statisticky nesignifikantní a teprve po

spojení N1 s N2 se výsledek alespoň přiblížil té nejnižší hladině statistické významnosti. Nabízí se možnost spojit celkové přežití u postmenopauzálních s premenopauzálními – pro důkaz závislosti přežití na koncentraci receptorů. Ale za exaktnější považujeme možnost spojit pro důkaz signifikance postmenopauzální přežívající s postmenopauzálními zemřelými – viz níže.

Naopak u N0 k vlivu ER na přežití nedošlo a medián ER u postmenopauzálních přeživších byl prakticky stejný jako u zemřelých. To bylo vysvětleno v podkapitole o upřednostnění statistické analýzy N1.

Rozdíly přežití pouze v rámci skupiny zemřelých pacientek

Lze uvažovat, že proložení přímek v logaritmické soustavě bylo nejsprávnější, neboť proložení čar jiného typu dávalo horší (nižší) korelační koeficienty. Avšak na přesnost tvaru proložené čáry se můžeme spolehnout teprve tehdy, dosáhne-li korelační koeficient hodnoty alespoň 0,9. Nám však v této práci nešlo o důkaz přímé úměrnosti v logaritmických souřadnicích, ale o přímou závislost. Šlo tedy o důkaz, že y závisí na x, k čemuž stačí i mnohem nižší hodnota korelačního koeficientu – za předpokladu, že počet pacientek je dostatečně velký.

Ke tvaru proložených čar lze navíc říci, že po oboustranném odlogaritmování by přežití nejprve prudce stoupalo a u vysokých receptorových hodnot by již byla proložená čára téměř horizontální (přežití by se již nezvyšovalo). Proto by mohlo být považováno rozhraní mezi pozitivitou a negativitou receptorů za zlomové z hlediska délky přežití.

Možnost hodnotit též premenopauzální pacientky

Oprávněnost připojení premenopauzálních pacientek k postmenopauzálním při analýze délky přežití by mohla vyplývat z toho, že u premenopauzálních ER (+) pacientek byla provedena terapeutická kastrace, čímž u nich nastaly podobné hormonální poměry jako u postmenopauzálních. Pokud by však nebyla provedena kastrace, tento argument u ER (+) by neplatil.

Navíc pokud byly některé premenopauzální nádory naopak ER (-), a kastrace

proto u takových pacientek provedena nebyla, opět by to nemělo být překážkou pro spojení skupiny postmenopauzálních s premenopauzálními. Důvodem je, že hormonální (estrogenové) koncentrace by měly být pro růst takovýchto nádorů téměř bezvýznamné.

Problém je pouze v tom, že není vyřešena otázka, zda by premenopauzální hodnoty ER měly být adjustovány transformací na postmenopauzální úroveň. Bez této transformace lze spojit premenopauzální pacientky s postmenopauzálními do jedné skupiny pouze pro kvalitativní posouzení závislosti, nikoliv k přesnému využití sklonu a tvaru proložené čáry. To se v našem statistickém souboru týkalo především pacientek ve stadiu N2, u nichž se ve značné části jednalo o premenopauzální.

Vliv stratifikace a adjustace podle stadia N na statistickou významnost

Lze říci, že (na rozdíl od PR) možnost delšího přežití vlivem vyšší koncentrace ER v nádoru je v celém souboru – bez vyloučení pacientky s nejvyššími hodnotami receptorů a bez rozřídění do podskupin podle N – pouze v náznaku. Vlivem tohoto rozřídění se korelační koeficienty zvedají, ale vzniklé skupiny mají pak malý počet pacientek. Proto nám toto rozřídění nepomohlo ke zvýšení statistické signifikance závislosti přežití na ER. Dopomohlo k tomu jediné vyloučení nejvyšší – nejdlejší hodnoty ER.

Je ale nutno zdůraznit, že (na rozdíl od ER) v případě PR již v grafu délky přežití všech zemřelých pacientek byla prokázána naopak výrazná statistická spolehlivost závislosti délky přežití na receptorové koncentraci – u spojené skupiny N0 + N1 + N2 – i bez vyloučení nejdlejší hodnoty ER. Stratifikací podle stadia N docházelo ke stejným statistickým jevům jako u ER, ale u všech podskupin N byla statistická signifikance závislosti y na x.

Přínosem stratifikace je ale především možnost odhadnutí rozdílu v délce přežití u rozdílných stadií N. Díky tomu by bylo možné provést adjustaci hodnot přežití na průměrné N, čímž by se dále zvyšovala statistická signifikance závislosti přežití na koncentraci receptorů. Tuto adjustaci všech skupin na průměrné N jsme však

již neprováděli ani u ER, neboť závislost y na x byla v případě ER statisticky prokázána i bez ní (především ortogonální regresi – viz níže).

Korelačně-regresní analýza skupiny N0 se značně zlepšila vyloučením pacientky s nejkratším přežitím a zároveň nejvyšším ER i PR a zlepšil se tím i korelační koeficient u spojené skupiny všech zemřelých. Jinou než tuto hodnotu jsme nevylučovali. V jejím případě jde pravděpodobně již o nadměrnost receptorové koncentrace, což je argumentem k jejímu vyloučení z hodnocení. Nepříznivý vliv nadměrné receptorové koncentrace nad 100 fmol/mg na přežití byl popsán v mnoha pracích [2–3,8,14–15,17].

Spojení počtu přežívajících s rozdíly v délce přežití zemřelých

Kromě adjustace přežití na průměrné N existuje i další cesta, jak prokázat statistickou významnost vlivu receptorů na přežití i pro případ ER. Jde o spojení vnitřní uspořádanosti závislosti přežití na ER ve skupině zemřelých s vysokými hodnotami ER u pacientek přežívajících 10 let.

Při použití klasické regrese tím došlo k průkazu statistické signifikance vlivu ER na délku přežití, pokud byly do výpočtu zahrnuty i pacientky premenopauzální. Pokud však byly zahrnuty do tohoto grafu jen pacientky postmenopauzální (obr. 2), nedošlo k průkazu statistické spolehlivosti z důvodu nedostačce velkého počtu pacientek.

Použití ortogonální regrese

Tento problém dořešila ortogonální regrese, která kromě správnějšího směru čáry dává vyšší (příznivější korelační koeficient). Ten lze pak transformovat na statistický odhad signifikance závislosti y na x – stejným matematickým postupem jako v případě klasické regrese. Lze tedy říci, že závislost délky přežití na hodnotách ER je statisticky významná, i když byla hodnocena skupina pouze postmenopauzálních N1 pacientek, a že tento závěr bylo možno získat spojením důkazů od pacientek zemřelých a od pacientek přežívajících.

Je nutno zde připomenout, že matematický princip výpočtu parametrů proložené přímky v případě klasické regrese vychází z předpokladu, že hodnoty na

ose x jsou naměřeny přesně a že chyba měření je pouze u hodnot osy y. To se ale v biologickém systému často vůbec nestává. V případě nepřesných hodnot na obou osách je proto automatické proložení čáry např. v programu MS Excel velmi nepřesné. Proložená čára je většinou ležetější, než má být. Naopak ortogonální regrese předpokládá, že hodnoty ovlivněné neznámými faktory jsou na obou osách.

V otázce chyb na ose x je nutno zdůraznit, že radioreceptorová analýza je málo přesná metoda především u nízkých hodnot receptorů (a že imunohistochemická analýza je ještě méně přesná). K nepřesnosti receptorových koncentrací v karcinomu prsu dále přispívá jejich variabilita u jedné a téže pacientky v průběhu času – např. z důvodu ovariálního cyklu [13], ale i z jiných příčin. A z hlediska chyb na ose y lze říci, že i když délku přežití „změříme“ velmi přesně, zobrazuje nepřesně kvantitativní vliv choroby z důvodu rozdílné obranyschopnosti organismu různých pacientek.

Z důvodu chyb na ose x je používání klasické regrese chybou. A z důvodu chyb na ose y nelze využít ani regresi inverzní ke klasické a vhodná je jen regrese ortogonální. Ovšem výpočetní program ortogonální regrese je pro mnohá pracoviště zdánlivě složitý tím, že není jednoduše nabízen v programu MS Excel (a ta proto používají pouze regresi klasickou). Avšak směr proložené čáry i korelační koeficient v takovém případě je nesprávný a může vnášet i značně velkou chybu do navazujících závěrů.

Graf úbytku procenta přežívajících

ER (+) a ER (–)

Naprosto jiným přístupem ke statisticky spolehlivému průkazu závislosti přežití na koncentraci receptorů je (v klinice velmi využívané) kvalitativní rozdělení nádorů na ER (+) a ER (–). Na to lze opět navázat spojením výsledků celkového přežití s délkou přežití u zemřelých (Kaplan-Meierova analýza). Dokonce je možné tak prověřovat otázku, zda počty úmrtí nemají v závislosti na čase vlnovitý charakter a zda např. rozdíl krátkodobého přežití se na konci sledovaného období setřel.

Po spojení většího procenta „konečného“ přežití pacientek ER (+) s pozděj-

ším úmrtím ER (+) z podskupiny zemřelých (obojí v porovnání s ER (–)) vznikly v našich výsledcích velmi sugestivní grafy závislosti počtu dosud žijících pacientek na délce pooperačního intervalu (v takto spojené skupině N1). Z těchto grafů lze např. vyčíst, že postmenopauzální pacientky ve stadiu N1 s nádorem ER (+) mají naději přežít o několik roků déle než N1 s nádorem ER (–).

Statistická odlišnost přežití ER (+) od ER (–) je v těchto grafech na hladině 0,001, čímž jsou potvrzeny závěry z ortogonální regrese. Není ovšem obvyklé dokumentovat práci tohoto druhu např. čtyřmi téměř stejnými grafy o počtu dosud žijících pacientek při různých rozhraních mezi ER (+) a ER (–). Navíc rozhraní mezi ER (+) a ER (–) je hrubě orientační hodnotou, v níž se projevuje zaokrouhlování na násobky pěti. A někteří autoři volí jiné rozhraní mezi ER (+) a ER (–) než většina ostatních. Na rozdíl od běžně používaného rozhraní pro pozitivitu ER 10 fmol/mg uvádějí např. Ruder et al 20 fmol/mg [16].

Ze všech těchto důvodů mají naše grafy s přesnými (kvantitativními) hodnotami receptorů na ose x (nezaokrouhlenými ke kvalitativnímu vyjádření ER (+), nebo ER (–)) v dokumentaci výsledků přežití své místo. Detailněji kvantifikují vliv receptorů na přežití a jsou neprávem opomíjeny. Hlavně však v případě ortogonální regrese přinášejí nejvyšší statistickou spolehlivost – stejnou jako grafy úbytku procenta přežívajících ER (+) a ER (–) (Kaplan-Meierova analýza).

Závěr

V poměrně malém statistickém souboru jsme prokázali statisticky významný vliv koncentrace ER a PR na přežití především N1 pacientek. Bylo dostačující provádět přibližně dvouletou analýzu přežití u vzorku 74 pacientek. V době operace jich bylo s uvedenou léčbou 56 postmenopauzálních a z nich 21 ve stadiu N1. Statistická významnost vyšla v několika různých logicky vybraných podskupinách – jak v případě ER, tak v případě PR.

Je patrné, že nejen překročení hranice pro pozitivitu ER (10 fmol/kg), ale i výška hodnot ER nad tímto rozhraním přináší další prodloužení života. Tedy má smysl hodnotit s potřebnou dávkou přesnosti

jak oblast pod tímto rozhraním, tak i nad ním – nikoliv pouze uvádět, že pacientka je ER (+) nebo ER (–).

Linearitu proložených čar vlivu ER na přežití je však nutno posuzovat z hlediska zlogaritmovaných os – že tedy v klasické soustavě lineárních os x a y čára závislosti přežití na ER nejprve prudce stoupá a pak se do značné míry horizontalizuje (před jejím prudkým poklesem v blízkosti hodnoty 100 fmol/mg). Před hodnotou 100 fmol/mg je desetinásobek ER spojen přibližně s dvojnásobkem doby přežití – pokud je použita klasická regrese. Je-li použita ortogonální regrese, jde přibližně o čtyřnásobek doby přežití místo dvojnásobku. Rozdíly v obratnosti jednotlivých pacientek jsou však pro přesnost takového odhadu příliš velké.

Vysvětlili jsme výhodnost některých statistických přístupů. Zvlášť lze upozornit na ortogonální (nebo obdobnou – Demingovu) regresi, bez jejíhož použití je prokládání přímky grafem v této problematice nepřesné – z hlediska její směrnice, ale i korelačního koeficientu. Díky tomu ortogonální regrese odhaluje statistickou významnost závislosti y na x citlivěji než klasická regrese.

Z hlediska statistické významnosti se tento málo běžný způsob proložení přímky vyrovná grafům závislosti úbytku procenta přežívajících ER (+) a ER (–) na době po operaci (Kaplan-Meierově analýze), kterými je klasická i ortogonální regrese z této problematiky vytlačována. Je nutno zdůraznit, že ortogonální regrese prosté závislosti přežití na receptorové koncentraci umožňuje přirozenější matematický pohled než Kaplan-Meierova analýza, a tím snazší pochopení např. roz-

dílů přežití i mezi vyššími receptorovými hladinami.

Upozorňujeme na nutnost ignorování výsledků u pacientek ve stadiu N0 při sledování vlivu receptorů na celkové přežití. Důvodem je, že receptorová hladina nemá vliv na možnost provedení přesného, a tím vysoce úspěšného chirurgického zákroku v tomto stadiu. Bez tohoto upřednostnění N1 se zdálo, že v našem statistickém souboru receptorové hladiny nádorů nemají statisticky signifikantní vliv na celkové desetileté přežití.

Cílem této práce bylo mimo jiné dát návod, jak pomocí statistického přístupu kontrolovat vliv některých faktorů na výsledky léčby i v případě malých statistických souborů.

Poděkování

Děkuji MUDr. Vondráčkové z pardubické nemocnice za poskytnutí údajů o nádorech z hlediska TNM klasifikace a o metastazování a o délce přežití pacientek. Za pomoc, podnětné připomínky ze statistického hlediska a provedení výpočtů ortogonální regrese děkuji doc. Klemmerovi z naší fakulty.

Literatura

1. Castagnetta LAM, Traina A, Liquori M et al. Quantitative image analysis of estrogen and progesterone receptors as a prognostic tool for selecting breast cancer patients for therapy. *Anal Quantit Cytol Histol* 1999; 21(1): 59–62.
2. Coradini D, Oriana S, Biganzoli E et al. Relationship between steroid receptors (as continuous variables) and response to adjuvant treatments in postmenopausal women with node positive breast cancer. *Int J Biol Markers* 1999; 14(2): 60–67.
3. Costa SD, Lange S, Klinga K et al. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer – results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer* 2002; 38(10): 1329–1334.
4. Dvořáková E. Hormonální receptory v nádorech prsu. Diplomová práce, školitel Hochmann J., Katedra biologických

a lékařských věd. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2007.

5. Hochmann J. The effect of age on the breast cancer estrogen receptor level. *Klin Onkol* 1999; 12(1): 22–29.
6. Hochmann J. Diagnostical exploitation of the ratio of progesterone to estrogen receptors in breast. *Klin Onkol* 1999; 12(5): 174–178.
7. Hochmann J. Ratio of concentrations of estrogen receptors to progesterone receptors (ER/PR) in the cytosol of breast cancers (stratification by forming of groups differing in PR). *Neoplasma* 2007; 54(4): 290–296.
8. Hupperets PS, Volovics L, Schouten LJ et al. The prognostic significance of steroid receptor activity in tumor tissues of patients with primary breast cancer. *Am J Clin Oncol* 1997; 20(6): 546–551.
9. Hurlimann J, Gebhard S, Gomez F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology* 1993; 23(3): 239–248.
10. Martin JD, Hähnel R, McCartney AJ et al. The influence of estrogen and progesterone receptors on survival in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic Oncol* 1986; 23(3): 329–335.
11. Pertschuk LP, Masood S, Simone J et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in endometrial carcinoma: a prognostic marker for survival. *Gynecol oncol* 1996; 63(1): 28–33.
12. Petružalka L, Konopásek B, Tesařová P. Hormonální léčba – nové perspektivy a nové možnosti léčby postmenopauzálních žen s hormonálně dependentním karcinomem prsu. *Lék Listy* 2007; 56(9): 23–25.
13. Pujol P, Daures JP, Thezenas S et al. Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer* 1998; 83(4): 698–705.
14. Raabe NK, Hagen S, Haug E et al. Hormone receptor measurements and survival in 1335 consecutive patients with primary invasive breast carcinoma. *Int J Oncol* 1998; 12(5): 1091–1096.
15. Sauerbrei W, Hubner K, Schmoor C et al. Validation of existing and development of new prognostic classification schemes in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42: 149–163.
16. Ruder AM, Lubin F, Wax Y et al. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Epidemiologic characteristics and survival differences. *Cancer* 1989; 64(1): 196–202. <http://www3.interscience.wiley.com/journal/112685931/abstract>.
17. Thorpe SM, Christensen IJ, Rasmussen BB et al. Short recurrence-free survival associated with high estrogen receptor levels in the natural-history of postmenopausal primary breast cancer. *Europ J Cancer* 1993; 29A(7): 971–977.
18. Younes M, Lane M, Miller CC et al. Stratified multivariate analysis of prognostic markers in breast cancer: a preliminary report. *Anticancer Res* 1997; 17 (2B): 1383–1390.