

## DIAGNOSTICKÉ VYUŽITÍ POMĚRU PROGESTERONOVÝCH RECEPTORŮ KU ESTROGENOVÝM RECEPTORŮM V KARCINOMECH MLÉČNÉ ŽLÁZY

### DIAGNOSTICAL EXPLOITATION OF THE RATIO OF PROGESTERONE RECEPTORS IN BREAST CANCERS

HOCHMANN J.

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

**Souhrn: Výhodiska:** Pro správné vyhodnocení poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům z hlediska hranic mezi jednotlivými prognostickými skupinami pacientek je nutno poznat zákonitosti, kterými se tento poměr řídí. Navíc, nekonstantní množství bílkovin v karcinomech prsu může vnášet chyby do rozhodování o cytosolové pozitivitě jak u estrogenových tak u progesteronových receptorů. Řešili jsme tedy otázku diagnostické využitelnosti poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům, neboť tímto zlomkem se vykrátí variabilita množství bílkovin. Navíc, pomocí grafu věkové závislosti tohoto zlomku jsme se pokusili zviditelnit a tím eliminovat vliv věku na koncentraci estrogenových receptorů. **Typ studie a soubor:** Provedli jsme studii klinických výsledků estrogenových a progesteronových receptorů u souboru pacientek z Pardubic a okolí (Česká Republika) s použitím základních statistických metod. **Metody a výsledky:** V každém mammarkarcinomu jsme vyšetřili jak estrogenové tak progesteronové receptory pomocí radioreceptorové analýzy homogenátu. Vzájemné matematické vztahy obou receptorů v každém nádoru jsme porovnávali v různých typech grafů. Analyzovali jsme, zda se jednotlivé body z našeho statistického souboru pacientek seskupují do charakteristických pásem. Zjistili jsme, že naše výsledky umožňují nejen potvrdit závěry jiných autorů o přímé závislosti koncentrace progesteronových receptorů na estrogenových receptorech v nádorech, ale i odhalit vliv věku na tuto závislost a navíc i oddělit vliv bílkovin od poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům. Klíčovými údaji k řešení této problematiky je věk pacientek. Věkově nerozdělený soubor a ani rozdělení výsledků (pouze) na premenopauzální a postmenopauzální zdaleka není u některých pacientek dostačující pro diagnózu (+), či naopak (-) u estrogenových receptorů. Z téhož důvodu není dostačující pro posouzení poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům. Pouze zohlednění plynulé věkové změny umožňuje posoudit správně receptorový stav. **Závěry:** Podařilo se nám zaujmout takový přístup k řešení této problematiky, že kterého lze upřesňovat diagnózu u jednotlivých pacientek. Lze se tak vyjádřit k fibroprodukcii, nekrotizaci, nebo naopak k vlivu koncentrace pohlavních steroidních hormonů, tvořených ve vaječnících nebo v intersticiu nádorů. Podle toho lze uvažovat o modifikaci terapie některých pacientek nebo o dalším vyšetřovacím postupu. Hlavní význam pro zjednodušení přístupu má výpočet poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům a porovnání výsledků tohoto zlomku s hodnotami, příslušejícími dotyčné věkové kategorii. Lze jej doporučit i pro vyšetření metastáz. Avšak pro nádor s průměrnou histologickou strukturou nelze opomíjet také skutečnosti jako např., že nedostatečně vysoké hodnoty obou receptorů mají větší diagnostický význam než jejich poměr.

**Summary: Background:** It is necessary to understand the rules by which the ratio of progesterone over estrogen receptors is directed to correctly evaluate this ratio from the point of view of boundaries between different prognostic groups of patients. In addition, non-constant amounts of proteins in breast cancers can cause errors at examination of cytosolic positivity of both, estrogen and progesterone receptors. For this reason, we examined the question of diagnostic exploitation of the fraction of progesterone receptors over estrogen receptors because by this ratio the variability of protein amount can be shortened. In addition, we tried to eliminate the influence of age on the concentration of estrogen receptors by visualization of this influence using graphs of age-relationship of the fraction progesterone over estrogen receptors. **Designs and Subjects:** We performed the study of clinical results of estrogen and progesterone receptors in the group of patients from Pardubice and surroundings (Czech Republic) with the use of simple statistical methods. **Methods and results:** We examined both estrogen and progesterone receptors in each mammarkarcinoma by radioreceptor analysis of the homogenate. We compared mutual mathematical connections of both receptors in each tumor. In different types of graphs we analyzed if different cases from our statistical collection of patients are arranged into characteristic line-forming groups. We ascertained that our laboratory results enable not only confirmation of conclusions of other authors about the direct relationship of progesterone receptors on estrogen receptors in the tumors, but also reveal the influence of the age on this relationship and also to detach mathematically the influence of proteins from the ratio of progesterone to estrogen receptors. The key information for solving these problems is the age of patients. Results of the receptors in the homogenate - if they are not age-sorted (or divided only as premenopausal and postmenopausal) are in the case of some patients non-sufficient and non-correct for simple diagnosis of (+) or in the contrary (-) result of estrogen receptors equipment. For this reason they are non-sufficient also for evaluation of the ratio of progesterone to estrogen receptors. Only taking into consideration the continuous change caused by the age enables to evaluate correctly receptor equipment of tumors. **Conclusions:** We are successful in taking of such mathematical approach (for the solving of these problems, thereby it is possible to make more strong and more detailed diagnostics of individual patients. By this approach it is possible to take the standpoint to the possibility or amount of the fibroproduction, necrotization, or in the contrary to the influence of the concentration of sex steroid hormones which are formed in the ovaries or in the interstitium of breast cancers. Using this it is possible to decide about a modification of therapy of some patients or about the use of subsequent examinations. The calculation of the ratio of progesterone receptors to estrogen ones and comparison of the result of this ratio with the values typical for the age of each patient is most important for simplified approach. It is possible to suggest the suitability of this ratio also for the examination of metastases. Nevertheless, for instance such information must not be neglected at the cancer with mean histological structure, which inform about insufficient concentrations of both receptors. In such cases, their concentrations are of greater significance than their ratio.

V závislosti na množství estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) v karcinomech prsu je rozhodováno o hormonální terapii pacientek. Pro správné vyhodnocení poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům z hlediska hra-

nic mezi jednotlivými prognostickými skupinami je nutno poznat zákonitosti, kterými se tento poměr řídí. Značného pokroku v této problematice dosáhli autofi, využívající u každé pacientky kombinaci výsledků biochemického vyšetření

s imunocytochemickým nebo imunohistochemickým. Imunohistochemická detekce dává výsledky obecně shodně s výsledky biochemickými, ale u některých pacientek dochází k výjimkám. Vysvětlujeme je tím, že kvantifikace je u imunohistochemie prováděna především na základě % buněk, pozitivních na receptory a často nedostatečně zohledňuje intenzitu buněčné pozitivity. U prací, používajících naopak biochemii cytosolu se nám zase nepodařilo najít snahu o vývoj korekce, která by důsledně zohledňovala % buněk, pozitivních na receptory. O takovou jsme se pokusili v naší minulé práci (3) upozorněním na adekvátnost náhrady % pozitivních buněk poměrem k věkovým mediánům cytosolové pozitivity.

Hurlimann a spol. (5) uvádí, že všechny jejich ER a zároveň PR biochemicky negativní a imunohistochemicky pozitivní případy byly nádory se silnou desmoplastickou reakcí, která vysvětluje negativní biochemický test. Pokud šlo (nezávisle na ER) pouze o PR imunohistochemicky negativní a biochemicky značně pozitivní případy, jednalo se o nádory žen starších 60 let. Tento autor uvádí, že v těchto případech by mohlo rozdíly mezi metodami vysvětlit velmi nízké množství cirkulujícího progesteronu. Navíc uvádí, že i v případě ER, u těch pacientek, které byly imunohistochemicky negativní a zároveň biochemicky pozitivní šlo o nejstarší věkovou skupinu 65-80 let. V souvislosti s tím upozorňuje na důležitost endogenních estrogenů (produkovaných ve vaječnících), kterou dokumentuje faktem, že imunohistochemie ER detekovala stejné procento pozitivních nádorů ve všech věkových skupinách, kdežto biochemie cytosolu vykazuje častější pozitivitu u starších žen. Lze doplnit, že citovaný autor používal jednotné rozhraní biochemické pozitivity pro všechny věkové skupiny a že z hlediska krevní hladiny estrogenů - v naší předchozí práci, zaměřené na věkový nárůst ER nabádáme k odstoupení od tradice jednotného prahu biochemické ER pozitivity cytosolu a k používání plynule s věkem se měnícího prahu, který doporučujeme posunout u nejstarších pacientek k hodnotám, nezvykle vzdáleným od pacientek mladých (3).

Jestliže je interpretace výsledků vyšetření receptorů v nádorech prsu komplikována rozdílnou tvorbou hormonů ve vaječnících, pak považujeme za nedostatečné používat (pro různé věkové kategorie) neměnné rozhraní pro rozlišení mezi ER (+) a (-). Ani skokově se měnící rozhraní, odlišující navzájem jen pre- a postmenopauzální pacientky nepovažujeme za dostačující (4). Místo toho je nutno hledat a vylepšovat důslednou plynulou věkovou korekci - a to nejen pro rozhraní, ale i pro význam vzdálenosti od rozhraní mezi (+) a (-) u každé pacientky. Narozdíl od histochemie je vliv věku na biochemické vyšetření homogenátu výraznější, ale příznivé je, že je mnohem lépe kvantifikovatelný.

Navíc je ale biochemické vyšetření komplikováno především nekonstantní koncentrací bílkovin. Pokud však bychom dali ER a PR vztažené na hmotnost bílkovin do vhodného poměru, vznikne složený zlomek, ve kterém se vykrátí chyby z nežádoucího rozptylu koncentrace bílkovin. V této práci se tedy zabýváme možnostmi korekce na věk a na variabilitu proteinů u našich pacientek, neboť si od toho slibujeme výrazně přesnější posouzení receptorového stavu a přesnější dodatečný náhled na terapii těchto nádorů.

#### **Materiál a metody**

Vyšetřovány byly excize z mamkarcinomů 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.

Vyšetření 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 centrifuze VAC 600 (Janetki) byla provedena radioreceptorová analýza, využívající  $^3\text{H}$  estradiol a analog progesteronu  $^3\text{H}$  ORG.2058 (Amers-

ham) a dále aktivní uhlí. Pomocí Scatchardova výpočtu bylo stanoveno množství receptorů a vztaženo ke koncentraci bílkovin v cytosolu.

Ze souboru byly vyloučeny vzorky, zpracovatelné jen pro orientační výsledky (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.

Soubor výsledků jsme rozčlenili na tři menší databáze podle věku pacientek (do 50 let, 51-65, nad 65) a vyloučili jsme nulové hodnoty PR, které by znemožňovaly následující logaritmické zpracování. Rozložení hodnot PR i ER bylo přibližně logaritmicko-normální a proto jsme statistické zpracování výsledků prováděli takto: Každý z těchto podsouborů zvlášť jsme srovnali vzestupně podle ER a pro jedenáctičlenné sousední hodnoty PR vypočítali překrývající se průměry  $\ln$  PR. Ty jsme pak odlogaritovali a tak jsme je vrátili do oboustranné lineární osové soustavy. Tyto výsledky ze všech tří podsouborů byly umístěny do společného grafu závislosti PR na ER.

Pro další matematické zpracování jsme použili opět původní nerozdělenou databázi včetně nulových PR i ER hodnot (nahrazených číslem 0,01) a srovnali jsme ji celou podle věku pacientek. Do grafu závislosti na věku jsme pak vynesli zlomek PR/ER u každé pacientky zvlášť. (Chybný by byl poměr  $\log$  PR/ $\log$  ER, neboť pro takový postup nemáme dostatečné odůvodnění. Sice by bylo možno takovým způsobem získat přibližně Gaussovské rozložení hodnot statistického souboru, ale každá jednotlivá hodnota, reprezentující poměr PR/ER u každého nádoru - např. 100 : 10 - by ztratila přesnost a ani odlogaritmováním by ji nezískala zpět).

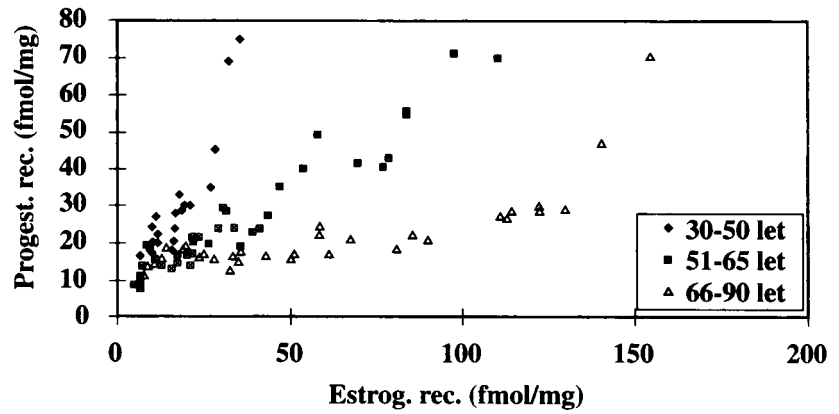
Pro graf č. 4 jsme vyloučili ty nádory, kde bylo buď PR nebo ER nižší než 5 fmol/mg. Cílem bylo zbavit se nepřesnosti těchto hodnot, které jsou na hranici použitelnosti biochemického vyšetření, aby mohla být přesněji proložena čára závislosti zlomku PR/ER na věku. Pro přesnější zjištění rovnice přímky a korelačního koeficientu jsme zároveň poměr PR/ER každé pacientky zlogaritovali a použili pak lineární souřadnice, místo předchozího použití logaritmické osy y pro nelogaritmované hodnoty. Ze stejné zpřesněné databáze jsme též vyjádřili opačný poměr 1/PR/ER a bez logaritmování proložili exponenciální závislost na věku. Neuvádíme to však v grafické příloze, aby přítomností opačně popisovatelného grafu nebyla narušena jednotnost úvah v „Diskusi“. Cílem byla kontrola korelačního koeficientu (který vyšel stejně) a orientační posouzení odlehklých hodnot v lineární soustavě os. Vylepšování korelačního koeficientu vylučováním hodnot na takovéto podkladě jsme však neprováděli. Ve stejné databázi jsme též sledovali závislost samotného ER na věku, ale jen pro porovnání korelačních koeficientů bez dokumentace grafem, neboť ten byl uveden v naší minulé práci (3).

#### **Výsledky**

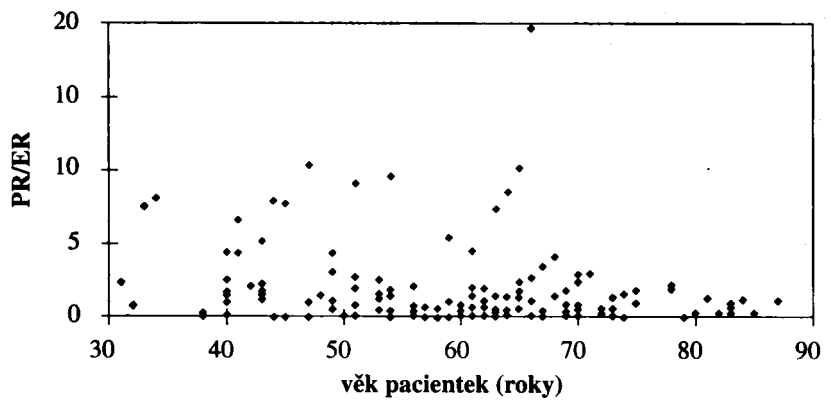
Z grafu č. 1, zobrazujícího logaritmicky zprůměrované PR u sousedních hodnot (řazených podle velikosti ER) vyplývá, že závislost v lineárních souřadnicích x a y směřuje dole k průsečíku os a že zvláště u starších pacientek se nejeví jako přímková. U nižší části hodnot připomíná logaritmickou nebo saturační závislost a u vyšších se naopak obrací vzhůru a to u každé z věkových kategorií. Nicméně, samotný typ tvaru považujeme zatím za statisticky nesignifikantní, nepříznivě ovlivněný vyloučením pacientek s nulovými hodnotami PR. Jím došlo (díky většinou nízkému ER v těchto nádorech) k větší vertikalizaci křivek blízko průsečíků os. Druhým důsledkem našeho postupu, zjednodušeného za účelem větší srozumitelnosti byl konečný vzestup křivek, způsobený nižším počtem pacientek s vysokými hodnotami ER. Avšak tvar z hlediska rozdílu mezi věkovými skupinami (především v rozsahu na ose x) již považujeme za signifikantně odlišný.

Tím, že byly pro graf č. 1 pacientky rozděleny podle věku do tří podsouborů, seskupily se i výsledné body do tří samostatných čar, směřujících z průsečíku os každá jiným směrem. Prud-

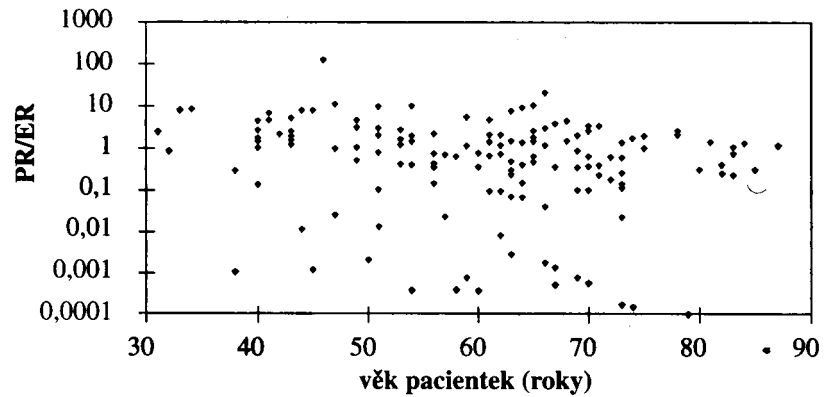
**Graf č. 1:** Analýza posloupnosti nádorů, řazených vzestupně podle ER ve třech věkových skupinách – odlogaritmované sousední překrývající se jednátičinné ln průměry PR v závislosti na ER.



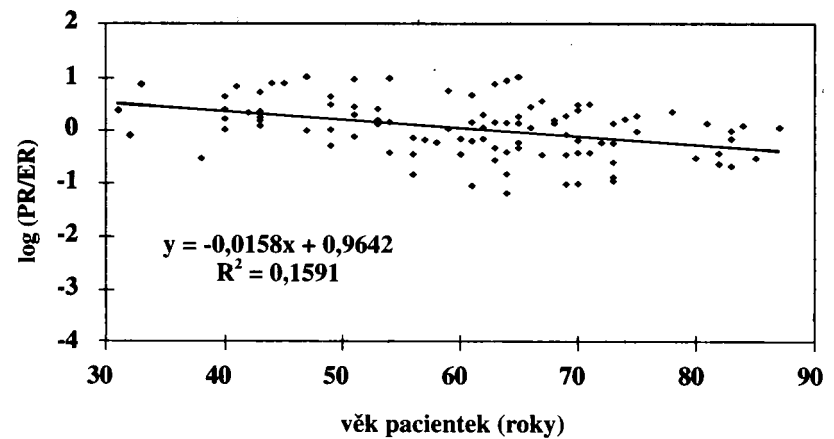
**Graf. 2:** Poměr progesteronových ku estrogenovým receptorům v závislosti na věku v lineární ose soustavě.



**Graf. 3:** Poměr progesteronových ku estrogenovým receptorům v závislosti na věku v semilogaritmické soustavě.



**Graf. 4:** Log. poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům v závislosti na věku (nádory s PR nebo ER pod 5 fmol/mg vyloučeny).



čejí stoupaly u mladších pacientek. Prodloužení křivek blíže k průsečíku os by bylo proveditelné na základě našich dat, ale pro tyto okrajové hodnoty bychom museli použít méněčlenné logaritmické průměry a navíc by se v té oblasti slévaly body všech tří křivek.

V grafu (č. 2) věkového rozvoje zlomku PR/ER v oboustranně lineární osově soustavě se hodnoty  $\delta$  většinou sdružují do středního pásma, ale u levé a střední části grafu je i náznak pásma vysokých odlehklých hodnot. Pásmo spíše nulové není u tohoto typu grafu odlišitelné od středního pásma. Poměr PR/ER se snižuje s přibývajícím věkem a stejnou tendenci jeví i rozptyl. Při použití logaritmické osy  $y$  (graf č. 3) zaniká částečně markantnost rozdílů mezi nejhustším polem bodů a horními odlehklými hodnotami a naopak vynikají odlišnosti dolních odlehklých hodnot. Otázka vlivu věku na rozptyl (z předchozího grafu) byla použitím logaritmické osy  $y$  vyjasněna jako nepříliš významná. Dolní odlehklé hodnoty je třeba chápat jako z části nepřesně rozložené, neboť jsme u těch z nich, které měly nulový číselný číselník místo něho 0,01 a vliv jmenovatele jsme nekorigovali. V tomto grafu je možno předběžným odhadem vymezit hustší pásmo častěji se vyskytujících hodnot od 1 do 10 na ose  $y$  ve 30 letech, které klesá v logaritmických souřadnicích přibližně přímkovitě tak, že v 90 letech by bylo ohraničení tohoto pásma přibližně o řád níže.

Graf č. 4 dokládá, že vyloučením nízkých hodnot ER a PR (z blízkosti rozhraní mezi použitelností a nepoužitelností metodiky) bylo možno snadněji proložit přímkou v semilogaritmickém grafu. Ta má stejný směr, jak bylo naznačeno v předchozím textu. Její korelační koeficient (jako odmocnina z  $R^2$ ) není sice blízký 1, ale je (alespoň o málo) příznivější u závislosti tohoto poměru PR/ER na věku ( $r = 0,4$ ) než u závislosti ER na věku (přibližně 0,34 u téhož souboru se stejným způsobem vyloučení nízkých hodnot ER a PR). Při tom je nutno uvést, že věk se měnil v rozsahu necelého trojnásobku minima, zatímco i po vyloučení nízkých hodnot v tomto upraveném souboru se výsledek ER pohyboval v rozsahu osmdesátinásobku minima, PR v rozsahu přibližně dvě stě padesátinásobku minima a PR/ER v rozsahu sto padesátinásobku minima. U takto charakterizovaného souboru je nutno spoléhat na shodnost s výsledky jiných autorů více než na korelační koeficient, neboť velké dediferenčně-mutační rozpětí na ose  $y$  je dáno nádorovou povahou a věkové rozpětí souboru na ose  $x$  nelze zvětšit. Úspěšnost korekce na bílkoviny vyplývá z toho, že rozsah hodnot PR/ER je menší než by vyplývalo ze součtu relativních chyb PR a ER, resp. je dokonce menší než rozsah hodnot PR.

## Diskuse

### A. Příspěvek ke korelačně-regresní analýze

Ze všech tří křivek našeho 1. grafu vyplývá, že PR koreluje s ER. Tím jsme potvrdili starší práce jiných autorů (1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Pouze jedna studie uvádí, že neprokázala vztah mezi PR a ER (2). To, že křivka pro nejmladší pacientky má nejstrmější průběh časově souvisí s ovariální produkcí estrogenů. Ty mají za následek nadměrný hormonální impuls a tím pravděpodobně i nižší tvorbu receptorů ve žlázo- tkáni prsu. Proto body v premenopauzální křivce se neposunují tolik doprava k vyšším hodnotám ER ani u nádorů s vysokými PR. Naopak u starších pacientek je estrogenů v krvi málo a ER jsou vyšší, než u mladých. Obdobné výsledky získala i Thorpeová (11), avšak svou Diskusi směřovala na spíše na poměry jaderných a cytoplazmatických ER.

Z našeho 1. grafu vyplývá, že všechny grafy z prací citovaných z literatury (1, 7, 11) mají jen globálně orientační význam, když do stejného tvaru závislosti PR na ER spojují všechny věkové kategorie v jednu čáru. Důrazně to také připomíná, jak užitečné je zřít se stereotypu, který má kořeny v používání jednotného rozhraní pro cytosolovou ER pozitivitu ve všech věkových oblastech. Právě věkový rozdíl v rozpětí především ER navzájem odděluje křivky prvního grafu a u nejstarší skupiny je v části grafu vzestup PR téměř nezatelný v oblasti ER mezi 25 a 125 fmol/mg. V souhlasu s tím je i údaj Thorpeové (11), že korelace PR a jaderných ER je nápadně silnější u pacientek

s věkem pod 50 let než u starších. Z různých prací včetně naší předchozí práce (3) totiž vyplývá, že u starších pacientek je přímá závislost ER na věku tak prudká (a zvětšuje se i rozptyl ER), že tím může být zastřena korelace ER s věkově tolik neovlivnitelnými PR.

Proto jsme v dalších grafech vynášeli na osu  $x$  věk, aby byl přesněji vystihnut (a tím se stal eliminovatelný) jeho zkreslující vliv na řešení této problematiky. Jelikož, jak jsme uvedli v předchozích dvou odstavcích, PR a ER spolu koreluje a připravujeme pro publikaci, že v jejich vztazích hraje velkou roli přímá úměrnost, vytvořili jsme z nich pro věkovou závislost zlomek PR/ER. Tím, jak roste ER v závislosti na věku (3), zvětšuje se v grafu č. 2 jmenovatel zlomku PR/ER. To je příčinou poklesu studovaného poměru při zvyšujícím se věku. Jako příčinu nedostatečně vysokého korelačního koeficientu jsme v kapitole "Výsledky" detailně uvedli rozsah hodnot, který je na ose  $y$  přibližně 50 krát větší než na ose  $x$ . To je zavínou variabilitou nádorů. Jako extrémní příklad pro omezenou spolehlivost násilného formálního nasazování regresních vzorců na tuto problematiku je, že kdyby byla proložena přímkou pouze jadoletým obdobím, byla by vertikální a bez výkyvů.

Ve prospěch hypotézy, že hodnota zlomku PR/ER je závislá na věku svědčí převážná shodnost se závěry jiných autorů, které jsme uvedli v naší rešeršní práci (4). Našli jsme 7 autorů, kteří uvedli, že PR klesá (narozdíl od ER) se stoupajícím věkem. Dva jiní autoři sice naopak popisují věkový pokles PR, ale dalších 8 autorů uvádí, že PR je nezávislé na věku. V našich výsledcích bylo PR prakticky nezávislé na věku (zatím nezpracováno k publikaci). K tomu lze připojit, že druhý z receptorů (ER) podle většího počtu jiných autorů věkem naopak stoupá. Na základě toho lze tedy z literatury usuzovat, že zlomek PR/ER s věkem pravděpodobně klesá podobně, jako v našich, zde uvedených laboratorních výsledcích. Takto se domníváme, že je třeba přejít ze závislosti PR na hodnotách ER (viz 8 proti 1 citaci - na začátku této kapitoly Diskuse) k závislosti PR/ER na věku, aby vznikla bohatší příležitost pro statistické úvahy o literatuře (dalších 15 proti 2 odkazům o PR - když změny ER jsou prokázány ještě spolehlivěji).

### B. Možnost klinického využití

Místo tří křivek je možno v grafu č. 1 uvažovat např. o deseti křivkách pro kratší věková období a o vytvoření nomogramu na tomto podkladě. Ten by byl použitelný pro kliniky s tou výhodou, že narozdíl od následujících poměrových grafů obsahuje ještě původní hodnoty ER a PR. Při tom již by z něho bylo možno vyčíst odchylky od průměrného nádoru, neboť v nomogramu by byly odlišeny věkové rozdíly ve vlivu vaječníků. Proti grafu věkové závislosti poměru PR/ER (ve kterém zanikne např. extrémní sklon k současným delečním mutacím PR i ER v tomtéž nádoru) lze u takovýchto pacientek výše uvedený nomogram pro diagnostiku preferovat. Umožňuje rozpoznat u kterých pacientek je v závislosti na věku hladina receptorů „podhraniční“ a zohlednit i nepřesnost těchto nízkých hodnot. Zjištění posunu po příslušné nomogramové věkové křivce by tedy bylo užitečné pro odhalení nejvyššího % buněk negativních současně na oba druhy receptorů. To ale dává stejnou změnu jmenovatele zlomku fmol/mg jako odhalení vlivu proteinů z drobných nekroz (kde receptory jsou autolyzovány) či desmoplastického vlivu. I bez imunohistochemie však může histopatolog pomoci řešit toto dilema. (Tyto informace se opět ztratí použitím závislosti zlomku PR/ER na věku i kdyby šlo o současnou extrémní pozitivitu PR i ER.) Ve jmenovaném nomogramu by se ale daly jako vybočení z příslušné věkové křivky zohlednit i další odchylky od průměrného nádoru, které vysvětlujeme až v podílových grafech.

Avšak vytvoření spolehlivého nomogramu považujeme za příliš náročné - zvláště pak pokud by si ho měl sestavit každý kliník sám s ohledem na nebezpečí mezilaboratorních rozdílů. V takovém případě lze snadněji vyžít některé informace z podílových grafů PR/ER. Je v nich zcela eliminován vliv bílkovin, včetně informace o tom, kolik % buněk je zároveň PR (+) i ER (+). Vyniká tedy pouze vliv ER na PR, nezatížený vari-

abilitou bílkovin. Nemusí však jít jen o míru aktivačního vlivu estrogenů, zapřičinujících tvorbu PR, ale i o zvýraznění např. poměru delečních mutací, zatěžujících buď „mateřské“ buňky nádoru nebo některé jejich klony.

Grafy č. 3 a 4 prokázaly, že šíře středního pásma poměru PR/ER se příliš výrazně neliší v různých věkových skupinách statistického souboru. Dále lze uvažovat, že by v klinické praxi alespoň mohly být porovnávány výsledky jednotlivých pacientek vizuálně - v rámci grafu č. 4, zda a jak se vymykají ze středního pásma hustšího výskytu hodnot PR reakci na přítomnost ER. Tak lze eliminovat zkreslující vliv průměrné fungujících vaječnic pomocí důsledného respektování věku pacientek a šikmosti grafu č. 4. Jmenovaný graf by také mohl upřesnit diagnózu při vyšetřování receptorů v metastázách, které může být více komplikováno proměnlivým množstvím bílkovin tkáň např. lymfatických uzlin než původní nádor (mg pro určení receptorů ve fmol/mg). Z hlediska posouzení diagnostického přínosu grafu č. 4 je vhodné popis rozčlenit.

1. U abnormálně nízké hodnoty zlomku PR/ER lze zvažovat diagnózu:

a) absence či blokády PR genu, nebo naopak zvýšení vaječnickové nebo intratumorové tvorby progesteronu, které obě mohou snižovat čitatele tohoto zlomku. Lze mezi nimi rozhodnout např. tím, že při absenci PR genu nebude nádor histologicky diferencován ve směru progesteronového účinku.

b) Kromě toho by se v této nízké oblasti závislosti PR/ER na věku mohly vyskytnout i nádory, mající čítec sledovaného zlomku blízký průměru, ale mající vysoký jmenovatel. Mohlo by jít např. o zmnožení ER genu nebo o absenci zpětné vazby uvnitř buněk a výsledné neschopnosti registrovat přesycenost buňky tímto receptorem. Terapeutická kastrace v postklimakteriu by měla obdobný vliv na jmenovatele studovaného zlomku, pokud v postklimakterických vaječnicích lze uvažovat o reziduální tvorbě estrogenů a nulové produkci progesteronu.

2. Naopak u abnormálně vysoké hodnoty zlomku PR/ER :

a) Lze opět začít zvažováním možných příčin vysokého čitatele. Jde tedy např. o zmnožení PR genu v nádoru prsu, nebo naopak předčasný nástup menopauzy u mladších pacientek, což lze odlišit anamnézou. V úvahu přichází i neschopnost buněk regulovat nadprodukcii PR.

b) Jestliže u některé pacientky je naopak abnormálně nízký jmenovatel tohoto zlomku (nízké množství ER v nádoru), lze hledat příčinu příslušného receptorového stavu, ale zároveň i rychlejšího rozvoje mammakarcinomu nejprve v ovariální hyperfunkci. Pokud by byla vyloučena gynekologickým vyšetřením, lze uvažovat i o možnosti intratumorové tvorby estrogenů. Tu by teoreticky bylo možno vyšetřit histochemicky již přímo na operačním sále nebo biochemicky v homogenátu (včetně inhibovatelnosti zúčastněných enzymů např. ionty těžkých kovů nebo látkami, vhodnými pro terapii).

3. Je-li nízký jak čítec tak jmenovatel poměru PR/ER, mohou se nádory dostat sice do středního pásu grafu č. 3, ale když jde o tak nízké hodnoty, že je znatelně ohrožena přesnost, dostanou se kamkoliv jinam. Proto je třeba je posuzovat spíše z pozice grafu č. 1. U takovýchto nádorů lze ještě provést korekci na

statisticky ohodnocenou nadprůměrnou přítomnost bílkovin nebo podprůměrné množství DNA v 1 g nádoru, což velmi snadno dodá biochemik. Také histopatolog (jak již bylo řečeno v diskuzi k nomogramu) může přispět k upřesnění diagnózy, neboť i při značné variabilitě mikroskopického obrazu dokáže upozornit na abnormálnost změny fibroprodukce a přítomnosti nekroz. Tím lze skupinu s nízkými hodnotami receptorů rozdělit na část negativní a část falešně negativní.

### C. Doplňující úvahy

Tak bylo namátkou vytypováno několik diagnostických hypotéz, které je možno vytěžit důsledným matematickým zpracováním cytosolových výsledků pouze dvou receptorů. Lze tak i upřesnit některé nerozhodné hraniční nálezy např. z histologické laboratoře. Podle těchto diagnostických kombinací lze pak různým způsobem modifikovat terapii.

Dosavadní literatura však naopak většinou používá jen informaci ER či PR (+) nebo (-) a navíc s nepřesným (jednotným pro všechny věkové kategorie) rozhraním mezi pozitivitou a negativitou. Pokud se klinický lékař tomuto zastaralému pohledu některých článků z odborné literatury neubrání, pak si položí otázku, zda jsou z praktického hlediska výhodnější PR, nebo naopak ER a které z těchto vyšetření by se dalo zrušit a nahradit např. vyšetřením jiného markeru.

Již Hurlimann a spol. (5) ale popisuje podskupinu, která se vyčlenila jako ER (+) PR (-) a má špatnou prognózu. Navíc prokázal, že úspěšnost antiestrogenní léčby lépe koreluje u jeho pacientek s imunohistochemickou než s biochemickou pozitivitou ER, když pro rozhodnutí mezi biochemickou pozitivitou a negativitou použil stejné rozhraní - nehlédě na věk. Nyní se však domníváme, že použitím přístupu s kontinuálně (věkově) se měnícím rozhraním mezi ER (+) a (-) a různými dalšími korekcemi může nabýt cytosolové vyšetření většího významu. Značnou část diagnostických kombinací, které jsme předložili v této práci, nedokáže histochemie sama tak spolehlivě poskytnout. Pokud by se podařilo náš přístup ověřit i v jiných laboratořích, vyšetření homogenátu by získalo opět na významu a bylo by možno vyčlenit více terapeutických podskupin pacientek.

Vždy jsme ale prosazovali kombinaci obou přístupů - jak biochemické vyšetření homogenátu tak imunohistochemii řezů - a to zvláště u premenopauzálních pacientek, neboť mají tak málo receptorů, že je to blízko hranice citlivosti jak biochemie tak imunohistochemie.

### 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. Semecckému, CSc. z naší katedry za podporu v dořešení této problematiky. Za podnětné připomínky ze statistického hlediska děkuji doc. Klemmerovi z naší fakulty. Za pečlivé zpracování excizí 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*. 1991 Aug 15; 68(4): 867-72.
2. Giani C., Campani D., DeNegri F., Capototi E., Savarese M. R., Benigni G., Incasanti M. R., Breccia M., Miccoli P., Evangelista G., Squartini F., Pinchera A.: Relationship between progesterone receptor, axillary node status and productive fibrosis in ductal infiltrating carcinoma of the breast. *Appl. Pathol.* 1989; 7(4): 225-32.
3. Hochmann J.: Vliv věku na množství estrogenních receptorů (ER) v karcinomech prsu. *Klinická onkologie (Brno)*, přijato k publikaci, 1999/1.
4. 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.
5. Hurlimann J., Gebhard S., Gomez F.: Estrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology*. 1993 Sep; 23(3): 239-48.
6. Krieger N., King W.D., Rosenberg L., Clarke E.A., Palmer J.R., Shapiro S.: Steroid

receptor status and the epidemiology of breast cancer. *Ann. Epidemiol.* 1991 Nov; 1(6): 513-23.

7. Nikolic V. D., Kanjer K., Brankovic M., Spuzic I.: Association among an autocrine paramet (EGF-R) and endocrine paramet (ER and PR) in locoregional breast cancer. *Neoplasma*. 1994; 41(3): 137-40.
8. Ruder A.M., Lubin F., Wax Y., Geier A., Alfundary E., Chetrit A.: Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Epidemiologic characteristic and survival differences. *Cancer*. 1989 Jul 1; 64(1): 196-202.
9. Seymour L., Bezwoda W.R., Meyer K.: Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of P24 predicts for response to treatment and duration of survival. *Cancer*. 1990 Dec 1; 66(11): 2390-4.
10. Soreide J.A., Lea O.A., Varhaug J.E., Skarstein A., Kvinnsland S.: Androgen receptors in operable breast cancer: relation to other steroid hormone receptors, correlations to prognostic factors and predictive value for effect of adjuvant tamoxifen treatment. *Eur. J. Surg. Oncol.* 1992 Apr; 18(2): 112-8.
11. Thorpe S.M.: Immunological quantitation of nuclear receptors in human breast cancer: relation to cytosolic estrogen and progesterone receptors. *Cancer. Res.* 1987 Apr 1; 47(7): 1830-5.