

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**

**Nemocnice Sokolov – porovnání histochemických
výsledků estrogenových a progesteronových
receptorů v nádorech prsu**

**Hospital Sokolov - comparison of the histochemical
results of the estrogen and progesterone receptors in
the breast tumours**

Bakalářská práce

Autor: Zuzana Pöpperlová

Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Sokolov 2009

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele MUDr. Jiřího Hochmanna, CSc. a veškeré použité zdroje uvádím v seznamu literatury.

Poděkování:

Děkuji svému školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za odborné vedení, rady a připomínky při zpracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat pracovníkům Karlovarské krajské nemocnice, a.s. – nemocnice v Sokolově, histologické laboratoře oddělení patologie za pomoc při získání potřebných dat a informací.

Obsah práce

1. Souhrn	4
2. Cíl práce	4
3. Teoretická část	5
3.1. Úvod	5
3.2. Epidemiologické charakteristiky	5
3.3. Příčiny vzniku	6
3.4. Patologie	8
3.5. Diagnostika karcinomu prsu – subjektivní příznaky	8
3.6. Odborná diagnostika	9
3.6.1. Zobrazovací metody	9
3.6.2. Bioptické vyšetřovací metody	10
3.6.3. Laboratorní metody	11
3.7. Tumorové markery	12
3.7.1. CA 15-3	13
3.7.2. Karcinoembryonální antigen CEA	13
3.7.3. Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)	13
3.7.4. Buněčné tumorové markery	13
3.7.5. Receptor epidermálního faktoru (Her-2)	14
3.8. Hormony estrogenu a progesteronu	14
3.9. Hormonální receptory u karcinomu prsu	15
3.9.1. Estrogenové receptory	15
3.9.2. Progesteronový receptor	16
3.9.3. Reakce na hormonální léčbu	17
4. Praktická část	18
4.1. Příprava vzorků v histologické laboratoři	18
4.2. Imunohistochemický průkaz estrogenových a progesteronového receptoru	19
4.3. Přehled vyšetření z roku 2007	20
4.4. Výsledky	22
5. Diskuse	25
6. Závěr	27
7. Seznam použitých zkratk	29
8. Přílohy	30
9. Seznam použité literatury a zdrojů	31

1. Souhrn

V teoretické části bakalářské práce podáváme obecný přehled o problematice karcinomu prsu. Popisujeme jeho epidemiologické charakteristiky, patologii, příznaky a diagnostiku. Uvádíme dále přehled tumorových markerů a hormonálních receptorů. V praktické části popisujeme způsob zpracování vzorků v histologické laboratoři Karlovarské krajské nemocnice a.s. – nemocnice v Sokolově. V souhrnné tabulce znázorňujeme výsledky imunohistochemických vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů provedených v roce 2007. V grafech zobrazujeme různé závislosti stanovených výsledků na věku pacientek.

Summary

We give a general overview about the breast cancer problems in the theoretic part of my bachelor thesis. We describe its epidemiological characteristic, pathology, symptoms and diagnostic. Further we show a summary of tumour markers and hormonal receptors. In the practical part we describe the way of sample treatment in the histological laboratory of the Karlovarská krajská nemocnice a.s. (Karlovy Vary regional hospital JSC) – Sokolov hospital. We present imunohistochemical investigation results of estrogen and progesterone receptors performed 2007 in a table and different dependencies of given results on the patients age in some diagrams.

2. Cíl práce

Po stanovení diagnózy karcinomu prsu vždy následuje imunohistochemické vyšetření nádorových markerů. Cílem této práce je zpracování a vyhodnocení výsledků vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů provedených v roce 2007 v Karlovarské krajské nemocnici, a.s. – nemocnici v Sokolově.

3. Teoretická část

3.1. Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním žen na celém světě a stejně jako většina nádorových onemocnění ovlivňuje svými důsledky veškeré oblasti života ženy a její rodiny. Karcinom prsu je také nejčastější příčinou úmrtí žen v produktivním věku. Toto onemocnění je již dlouho známé a první popis karcinomu prsu se dochoval z roku 1600 před Kristem ve starém Egyptě a již Galén ve starověkém Římě přirovnal rozšířené lymfatické a krevní cévy u pokročilého karcinomu prsu ke krabím nohám (odtud pochází název „cancer“), nejsou dosud zcela známy všechny příčiny tohoto onemocnění (Strnad, 2001). Proto je nejdůležitějším způsobem boje proti nádorům prsu včasná diagnostika a včasné zahájení léčby tohoto onemocnění. Diagnostika pokročilého karcinomu prsu není složitá, složitě je však včasné odhalení malých tumorů v počátečních stádiích. Stejně jako u jiných zhoubných nádorů platí, že úmrtnost je významně nižší u časných nálezů než u nálezů pokročilých.

3.2. Epidemiologické charakteristiky

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen v České republice. Tvoří zhruba 25 % všech maligních nádorů a postihuje 6 % ženské populace. Incidence má stoupající tendenci, mortalita v posledních několika letech stagnuje. K 31.12.1995 žilo v České republice s touto diagnózou 29 018 žen. V roce 1996 onemocnělo tímto nádorovým onemocněním 4 158 žen a 1 854 žen na něj zemřelo. V roce 2003 bylo hlášeno celkem 5 784 nových případů a 2 032 žen zemřelo v důsledku tohoto onemocnění (Petruželka, Novotný, 2002; Petráková a kol., 2007).

Karcinom prsu se vyskytuje řídce u žen mladších 30 let. Výskyt onemocnění s věkem prudce stoupá a kulminuje po 60. roce věku. Nádory prsu mohou vzniknout také u mužů. Poměr výskytu tohoto onemocnění oproti ženám je 1:140. Přibližně 70 % karcinomů prsu exprimuje v době diagnózy estrogenové (ER) a/nebo progesteronové receptory (PR), které jsou dnes nejdůležitějším a jediným standardně vyšetřovaným prediktivním faktorem pro hormonální léčbu (Petráková a kol., 2007). Hormonální léčba nespočívá jenom v antiestrogenových přípravcích (tamoxifen), ale i v kastraci (ovarektomie) nebo např. v podávání inhibitorů aromatázy, která může produkovat vaječnickové hormony přímo v prsu.

Incidence onemocnění stoupá v rozvinutých zemích světa. Nejvyšší je v USA, Švédsku, Velké Británii, nejnižší v jihozápadní Asii a Africe. V USA i většině zemí Evropy mortalita klesá. Pokles mortality je vysvětlován zavedením řádného mamografického screeningu a systémovou adjuvantní léčbou (Jandorová, 2008).

3.3. Příčiny vzniku

Vznik karcinomu prsu je v současné době považován za důsledek genetické aberace somatických buněk, kterou získávají mnohočetnými mutacemi v průběhu své klonální expanze. Výsledkem takovéto aberace je nekontrolovaný invazivní a metastatický růst. Přesná příčina a mechanismus vzniku tohoto onemocnění zůstává i přes velké pokroky v genetickém výzkumu (jako je např. objevení onkogenů, tumor supresorických genů a hormonálních a růstových faktorů a popis jejich úlohy v řízení proliferace normální i nádorové tkáně) nadále komplikovaná. Karcinom prsu je velmi heterogenní onemocnění a dá se předpokládat, že příčinná sekvence mutací nebude jen jedna (Strnad, 2001).

Nádory prsu tak vznikají jako důsledek nahromadění poruch genů regulujících buněčný růst, buněčnou diferenciaci, reparaci poškození genetické informace, proces stárnutí buňky a apoptózu v buňkách prsní žlázy (Petruželka, Novotný, 2002).

Detailně popisuje hormonální vlivy Prausová (2004). Existuje evidentní spojení mezi rakovinou prsu (a dělohy a vaječníků) a vysokou hladinou estrogenu. Estrogeny v děloze způsobují proliferaci buněk. Pod vlivem estrogenu se proliferace děložních buněk mnohonásobně urychluje. Poté nastupuje k účinku progesteron, způsobující uzrávání buněk a startující fázi sekrece, nutnou k uzrávání děložní sliznice, která je tak připravována k přijetí oplozeného vajíčka. Estrogen je hormon stimuluje buněčnou proliferaci, progesteron je hormon zastavující růst a stimuluje dozrávání. Estrogen také stimuluje tkáň prsu. Ženy trpící estrogenovou dominancí, před menstruací často trpí otokem a citlivostí prsou. Progesteron přivádí buňky zpět do rovnováhy a tím citlivost prsou eliminuje.

Bylo zjištěno, že rakovina prsu se v životě ženy nejčastěji vyskytuje v období, kdy převažuje celoměsíční estrogenová dominance, protože v polovině cyklu (během ovulace) se netvoří progesteron. Týká se to tedy především žen v období nástupu menopauzy, tj. zhruba kolem věku 50 let. Při porovnání skupiny pacientek s nízkou hladinou progesteronu se skupinou žen s normální hladinou progesteronu, se zjistilo,

že výskyt rakoviny prsu byl 5,4 krát větší u žen s nízkou hladinou progesteronu (typickými obtížemi těchto žen je zkrácení, případně výpadky cyklu, ale také např. únava, bolesti hlavy a kloubů, výkyvy nálad a pod.). To ukazuje, že tendence k výskytu rakoviny prsu byla přes 80 % vyšší než u žen s normální hladinou progesteronu. Později, při porovnávání vztahu nízké hladiny progesteronu ke všem ostatním typům rakoviny, se zjistilo, že ženy z této skupiny měly větší výskyt různých potíží souvisejících se zhoubnými typy rakoviny, než tomu bylo u žen s normální hladinou progesteronu.

Karcinom prsu je nádor hormonálně závislý (dependentní). Nejvýznamnější roli pro jeho vznik a růst mají estrogény – ženské pohlavní hormony. Podněcují k činnosti růstové faktory a onkogeny, jejichž produkty podporují buněčné bujení. Trvajícím vyšší estrogenní aktivita posouvá rovnováhu mezi proliferační a antiproliferační fyziologickou aktivitou působků ve prospěch proliferace. Na procesu se podílejí také kancerogeny, které zasahují do genetické informace buňky a způsobují její abnormality. Ty buňka někdy dokáže opravit. Pokud ne, aktivují se onkogeny nebo inaktivují či poškozují antionkogeny. Na základě poruchy své genetické informace mění buňka vzhled, a postupně se stává nádorovou. K neblahému vývoji přispívají i změny stromatu, při nichž stimulované stromální buňky produkují proteolytické enzymy a angiogenní působky, mající klíčovou úlohu v růstu a šíření nádoru. Tak se vyvíjí nádor u 75 – 85 % nemocných a hovoříme tak o sporadickém výskytu karcinomu.

Ostatní nádory prsu jsou výsledkem dědičných genetických vad, jedná se o hereditární karcinomy s familiárním výskytem. V postižených rodinách se vyskytuje nádorové onemocnění, mnohdy nejen prsu, u více příslušníků rodiny. Rozvoj této formy rakoviny prsu je podmíněn řadou genetických faktorů, mnohdy dosud ne zcela přesně definovaných, ve spojení s faktory hormonálními a faktory životního stylu. Přibližně 5 – 10 % nádorů se vyskytuje na dědičném základě. Postižení jedinci jsou převážně nositelé mutací supresorových genů BRCA1, BRCA2 s autozomálně dominantním typem dědičnosti. Riziko vzniku karcinomu prsu u nositelky mutace je velmi vysoké. Hereditární karcinom prsu je často oboustranný a postihuje mladé ženy do 35 let věku. Přítomnost mutace BRCA1 je odpovědná i za další malignity, jako jsou karcinom vaječníků a karcinom tlustého střeva.

Vznik karcinomu prsu může také ovlivnit déle trvajícím působení estrogenů. Příčinou může být časný nástup menstruační aktivity a pozdní menopauza, pozdní

první těhotenství, krátká laktace a dlouhodobá léčba exogenními estrogeny. Více ohroženy jsou ženy, které nikdy nerodily. Neblahý vliv na vznik má také alkohol, vysoký příjem tuků a nedostatek fyzické aktivity spojený s váhovým nárůstem. Zvýšenou zásobu tuků provází vyšší koncentrace estrogenu v plazmě jako důsledek přeměny androgenních prekurzorů na estrogeny v tukové tkáni. Nebezpečné mohou být i některé bující benigní léze – hyperplázie. Nepříznivou roli může sehrát také zevní prostředí, např. působení ionizujícího záření před 40. rokem věku, je-li prs v pásmu ozařování při léčbě jiné malignity (Prausová, 2004).

3.4. Patologie

Vznik karcinomu prsu mohou signalizovat premaligní změny, kterými jsou duktální hyperplazie a atypická duktální a lobulární hyperplazie. Z hyperplazií se vyvinou nejprve neinvazivní karcinomy, které se nazývají karcinomy in situ. Vyrůstají z maligně pozměněných epitelových buněk vývodů (duktální karcinom in situ) nebo pocházejí z epitelových buněk lalůček (lobulární karcinom in situ), ale nepronikají jejich bazální membránou.

Invazivní duktální karcinomy tvoří 84 % a lobulární karcinomy 15 %. Invazivní lobulární karcinomy rostou ve více ložiskách, a to buď vzdálených od sebe (multicentrických), nebo se vyskytujících v jednom z prsních kvadrantů (multifokálních). Invazivní karcinomy se šíří lymfatickými cévami do lymfatických uzlin v podpaží a dále krví do vzdálených orgánů. Jsou-li lobulárního původu, pak především do pohrudnice, pobřišnice a vaječníků, u původu duktálního zejména do plic, jater a kostí. Vzdálené metastázy se mohou u karcinomu prsu vyskytovat již při velmi malé nehmátné lézi. Proto musí být toto onemocnění vnímáno jako systémové.

Velmi agresivní formou je erysipeloidní (inflamatorní) karcinom prostupující celým prsem, který je zarudlý, bolestivý a jeho kůže má vzhled pomerančové kůry. Roste velmi rychle a záhy zakládá metastázy v podpažních uzlinách a dalších orgánech (Prausová, 2004).

3.5. Diagnostika karcinomu prsu – subjektivní příznaky

Karcinom prsu může být dlouho bez zjevných příznaků. I přesto může být toto onemocnění odhaleno při pravidelném samovyšetření prsu. K odbornému lékařskému vyšetření by měly ženu podnítit počáteční projevy onemocnění, jako jsou změna tvaru

a velikosti prsu, změna tvaru a vtažení bradavky, ekzém bradavky, výtok z bradavky, změna charakteru kůže a jejího zbarvení, bolesti prsů a hmatná bulka v prsu či podpaží.

Celkové projevy (bolesti v kostech, nechutenství, hubnutí, teploty) se dostavují až při výskytu vzdálených metastáz. Některé počáteční nálezy však nelze odhalit při vyšetření pohmatem, proto jsou nutná preventivní vyšetření ultrazvuková a rentgenová (Prausová, 2004).

3.6. Odborná diagnostika

Na možný genetický původ nemoci, dobu trvání a dynamiku růstu nádoru upozorní pečlivá rodinná a osobní anamnéza. Následuje kompletní **fyzikální vyšetření** pohledem (aspekce) a pohmatem (palpace) se zaměřením na prsy. Hledají se asymetrie, vyklenutí nebo vklesliny, hodnotí se barva kůže, žilní reliéf a strie. Hodnotí se velikost bradavky, její barva, symetrie, prominence nebo naopak retrakce. Nezbytnou součástí stanovení diagnózy jsou **zobrazovací metody** (viz dále).

Před zahájením léčby je třeba získat o nemocné další poznatky. Slouží k tomu **biochemická vyšetření**. Stanovují se jaterní testy, stav ledvinných funkcí, hladina iontů v plazmě, celková bílkovina a údaje o metabolismu tuků. Vyhledávají se nádorové znaky CEA (karcinoembryonální antigen) a CA 15-3 (karbohydrátový antigen onkofetálního charakteru), jejichž koncentrace jsou zvýšeny při rozsevu nádoru do dalších orgánů. Tyto ukazatele se sledují během léčby i po jejím ukončení a podle nich se odhaduje další vývoj choroby. **Hematologická vyšetření** ověřují stav krvetvorby. V kostní dřeni, která se získává trepanobiopsií, lze zachytit i nepatrná množství nádorových buněk, jež představují vysoké riziko výskytu mikrometastáz. K jejich stanovení slouží monoklonální protilátky (Prausová, 2004).

3.6.1. Zobrazovací metody

Mamografie je rentgenologické vyšetření měkkým zářením ve dvou projekcích. Slouží k vyhledávání ještě nehmatných patologických změn nebo ke stanovení velikosti hmatných lézí a jejich vztahu k okolním strukturám. Největší přínos mamografie je u žen středního a vyššího věku, kdy je parenchym žlázy již v involuci a obraz žlázy je dobře přehledný.

Sonografie je ultrazvukové vyšetření prsů. Vyšetření podpažních a nadklíčkových uzlin je doplňkové. Má význam zejména u mladých žen s hmatnou rezistencí, u nichž je mamografie nepřehledná. Umožní odlišit cystu od solidního útvaru a pod ultrazvukovou kontrolou lze provést i bioptické vyšetření (odběr tkáně pro histopatologické hodnocení).

Vyšetření magnetickou rezonancí se provádí při nejasných nálezech na mamografii a sonografii. Nepoužívá se jako rutinní vyšetření. Je významné při určení nezbytného rozsahu operačního výkonu a při průkazu multifokálního postižení.

Duktografie, duktoskopie se používá k určení intraduktálních nádorů. Metoda spočívá v aplikaci kontrastní látky do mlékovodu kanylou a v kontrastním rentgenologickém zobrazení vývodu.

Scintigrafie je radioizotopové vyšetření, které je významnou doplňkovou metodou mamologického vyšetření. Používá se především v případech, kdy mamografie vykazuje vysokou hustotu tkáně prsu a ultrazvukové vyšetření nachází hypoechogenní zóny.

Počítačová tomografie a pozitronová emisní tomografie hodnotí vztah nádoru k okolí. Dokáže odlišit nenádorový původ rezistence.

Zobrazovací metody slouží také ke stanovení nálezu v ostatních orgánech, které mohou být postiženy metastázami. Karcinom prsu nejčastěji metastazuje do kostí, jater a plic. Plicní postižení zviditelní rentgenový snímek nebo počítačová tomografie. Zasažení orgánu břišní dutiny odhalí ultrazvuk nebo opět počítačová tomografie. Stav kostního postižení přiblíží scintigrafie (Jandorová, 2008; Prausová, 2004).

3.6.2. Bioptické vyšetřovací metody

Biopsie je vyšetření vzorku lidského orgánu nebo tkáně a odběr této tkáně za života nemocného. Biopsie slouží k cytologickému, histologickému, histochemickému či jinému vyšetření, které má rozhodující význam ve stanovení definitivní diagnózy, ale také např. při kontrole výsledků léčby. Kromě základní klasické diagnostiky patologických chorobných postižení (odlišení nádorových a nenádorových stavů, histologická typizace nádorů) současná biopsie popisuje i další charakteristiky procesu. Např. stupeň diferenciacce nádoru (grading), nebo jeho anatomický rozsah (staging) (Jandorová, 2008; Motlík, Živný, 2001).

Základní bioptické metody odběru materiálu jsou:

Aspirační biopsie tenkou jehlou – fine needle aspiration biopsy (FNAB) - metoda, kterou se provádí aspirace buněk pomocí podtlaku vytvořeného stříkačkou nebo kapilárním vírem. U hmatných lézí je jehla vedena pomocí palpce, u nehmatných nebo vícečetných lézí se prosazuje zavedení pod sonografickou kontrolou. Přístupová cesta u této biopsie musí být zvolena tak, aby aspirační kanál mohl být při definitivním zákroku odstraněn a byla tak vyloučena kontaminace nádorovými buňkami. Nevýhodou této metody je riziko nedostatečného odběru.

Core biopsie - metoda, při které se silnější samořeznou jehlou odebere část patologické tkáně, tedy ne pouze buňky jako v případě předchozí metody FNAB. Touto biopsií se získá dostatečné množství nádorové tkáně ke spolehlivému histopatologickému zhodnocení a i k určení přítomnosti hormonálních receptorů.

Bioptická excize – provádí se při operačním výkonu. Hmatné léze jsou excidovány s lemem tkáně za kontroly palpací, nehmatné léze jsou označovány drátem nebo barvicím materiálem. Pokud je tumor zobrazitelný sonograficky, lze toto provést i přímo na operačním sále. Výhodou bioptické excize je odstranění celého ložiska a dostatečné množství tkáně k histologickému vyšetření (Jandorová, 2008).

V případě našich výsledků jsme jehlové biopsie označovali zkráceně „biopsie“, kdežto operační biopsie jsme označovali pro snadnější rozlišení jen jako „operace“, přestože jde také o biopsii.

3.6.3. Laboratorní metody

Cytologické zhodnocení sekretu z bradavky - při odběru sekretu je třeba komprimovat areolu od periferie k bradavce postupně ve směru hodinových ručiček. Kapka sekretu z bradavky se stírá na podložní sklíčko. Je-li sekretu větší množství, zhotovuje se více nátěrů. Po rozetření se nátěr okamžitě fixuje a nechá zaschnout. Cytologie sekretu umožňuje zachytit časná stádia nemoci, karcinomy in situ a malé invazivní karcinomy.

Cytologické vyšetření po FNAB - po punkci ložiska se obsah jehly natře na podložní sklíčko a ihned ponoří do fixačního roztoku, nejčastěji metylalkoholu.

Otisková cytologie - je to rychlá pooperační metoda. Nátěr se zhotoví otláčením excize z podezřelého místa na podložní sklíčko. Nátěr se pak barví a hodnotí.

Tumorové markery - nejčastěji sledované nádorové markery jsou karcinoembryonální antigen (CEA) a CA 15-3. Karcinoembryonální antigen se vyskytuje ve 40-50 % případů s přítomností vzdálených metastáz. Marker CA 15-3 bývá zvýšen v případě lokálního onemocnění. Na druhou stranu může být i pokročilé onemocnění bez zvýšení uvedených markerů. Stanovení těchto markerů má význam především pro monitorování průběhu onemocnění (Jandorová, 2008).

3.7. Tumorové markery

Tumorové markery jsou molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. Mohou se vyskytovat v nádorových buňkách nebo na jejich povrchu. Daleko častěji se prokazují v tělesných tekutinách (humorální markery). Pomocí tumorových markerů lze prokázat riziko vzniku, přítomnost, prognózu a účinnost či neúčinnost terapie nádorového onemocnění. Markery pomáhají sledovat průběh onemocnění i stupeň jeho pokročilosti. Nová aktivita nemoci se často projeví jejich vzestupem dříve, než se zjistí nějaké postižení jinými vyšetřovacími metodami. Problémem zůstává to, že stanovením humorálních nádorových markerů nemůžeme zhoubné onemocnění diagnostikovat v časném – tedy stoprocentně léčitelném stádiu. Existuje také řada nezhooubných onemocnění s pozitivitou některých tumorových markerů. Proto význam tumorových markerů spočívá především v monitorování terapie, včasném rozpoznání recidivy, hodnocení prognózy, určení rizika a určení specifické individuální terapie.

Tumorové markery jsou rozdělovány podle místa jejich vzniku. Mohou být produkovány přímo nádorovými buňkami (s nádorem spojené antigeny, hormony a enzymy, onkogeny a antionkogeny) nebo jinými tkáněmi, které je tvoří jako odpověď na přítomný maligní proces v organismu (indukované nádorové markery).

Při diagnostice karcinomu prsu se jako buněčné nádorové markery zjišťují receptory pro estrogény, receptory pro progesteron a jako humorální tumorové markery se používají nejčastěji CA 15-3, CEA, TPA, TPS. Novějším specifickým markerem je mamaglobin z rodiny uteroglobinu (váže se na syntofylin B) a receptor epidermálního faktoru Her-2/neu – jednak jako buněčný marker –

imunohistochemicky a jednak jako humorální marker (Racek a kol., 2006; Valík a kol., 2008).

3.7.1. CA 15-3

Jedná se o antigen polymorfního epiteliálního mucinu. V dospělosti je syntetizován v epiteliálních buňkách vývodů mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů. Je to glykoprotein, jehož stanovení se užívá k posouzení úspěchu léčby a včasné předpovědi recidivy. Citlivost u generalizovaného tumoru je 75 % případů, zatímco u nádorů bez metastáz je citlivost mnohem nižší – je pozitivní jen u 9 % pacientek. Umožňuje předpovědět návrat onemocnění s předstihem několika měsíců před některými zobrazovacími metodami (Racek a kol., 2006).

3.7.2. Karcinoembryonální antigen (CEA)

Jedná se o glykoprotein vytvářený buňkami sliznice střeva ve fetálním období. Jeho zvýšená koncentrace se nachází i u karcinomu prsu (a řady jiných). Vyšší hodnoty tohoto antigenu doprovází některá nenádorová onemocnění jater a tlustého střeva, někdy jsou pozorovány i u kuřáků (Racek a kol., 2006).

3.7.3. Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)

TPA je směsí fragmentů cytokeratinů různých typů. Není specifickým indikátorem určitého nádoru, ale spíše ukazatelem buněčné proliferace. Převažuje u něj citlivost nad specifičností. Z tohoto důvodu je zvýšený u řady rychle rostoucích nádorů. V případě účinné terapie a zastavení buněčné proliferace koncentrace TPA rychle klesá. Jiné fragmenty keratinu představují tzv. specifický TPA – tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS) (Racek a kol., 2006).

3.7.4. Buněčné tumorové markery

Buněčné tumorové markery jsou komponenty buněčné membrány či jiných organel. Jsou typické pro nádorovou buňku nebo mají význam pro diagnostiku a léčbu nádorového onemocnění. Neuvolňují se do krevního oběhu a musí se prokazovat v buněčných homogenátech nebo in situ.

Hormonální receptory u karcinomu prsu se prokazují v homogenátu nádorové tkáně kvantitativní imunoanalýzou, ligandovou analýzou nebo dnes nejčastěji imunohistochemicky. Nález receptorů estrogenů a progesteronu je známkou větší diferenciaci nádorových buněk a vypovídá o jejich citlivosti k hormonální léčbě. Jsou to nejvýznamnější prognostické markery karcinomu prsu (Racek a kol.,2006; Valík a kol., 2008).

3.7.5. Receptor epidermálního faktoru (Her-2)

Poměrně novým markerem je výskyt proteinu lidského epidermálního růstového faktoru HER-2 na buněčné membráně. Jedná se o produkt genu Her2/neu (erbB2). Jeho zvýšený výskyt je dokladem invazivního karcinomu prsu, je spojován s horší prognózou onemocnění. Extracelulární část tohoto receptoru se snadno uvolňuje do krve, takže její imunobiochemická detekce může být využita jako humorální marker (Onkomagazín 3/2008).

3.8. Hormony estrogeny a progesterony

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony. Patří ke steroidním hormonům a vznikají z androgenů působením aromatázy. Nejdůležitějším přirozeným estrogenem je estradiol, který je tvořen v ovariích, v menší míře v kůře nadledvin a v tukové tkáni. K dalším estrogenům patří estron a estriol.

K fyziologickým účinkům estrogenů patří:

- vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků
- růst a zrání folikulů
- podpora proliferace endometria
- snížení viskozity cervikálního hlenu (viditelná arborizace)
- urychlení transportu vajíčka ve vejcovodu
- inhibice, respektive stimulace sekrece gonadotropinů v hypofýze (podle fáze cyklu)
- ovlivnění ženského pohlavního citění a chování
- stimulace syntézy řady proteinů v játrech (např. některé faktory srážení, vazebné proteiny pro některé lipofilní hormony)
- zvýšení srážlivosti krve, snížení erythropoezy (tvorba červených krvinek)
- zvýšení zpětné resorpce sodíku a vody v ledvinách

- snížení rychlosti reabsorpce kosti antagonizací účinků parathormonu na kost
- zvýšení hladin triglyceridů
- zvýšení HDL, snížení LDL frakce lipoproteinů, snížení plazmatických hladin cholesterolu

Progesterony (synonymem jsou gestageny, progestageny nebo progestiny) jsou rovněž ženské pohlavní hormony. Jediným přirozeným gestagenem je progesteron. Je fyziologicky tvořen žlutým tělískem v luteální fázi menstruačního cyklu, v menším množství v nadledvinách, a to i u muže. Ve velkém množství vzniká v těhotenství.

K fyziologickým účinkům progesteronu patří:

- příprava k těhotenství - sekreční transformace endometria (podmínka nidace)
 - udržení těhotenství (snižuje kontraktilitu dělohy) a činnost mléčné žlázy
 - termogenní efekt (zvýšení bazální teploty po ovulaci)
 - zvýšení viskozity cervikálního hlenu
 - ovlivnění sekrece gonadotropinů
 - mírné zvýšení periferní inzulínové rezistence
- (Vokurka, Hugo a kol., 2005; Racek a kol., 2006).

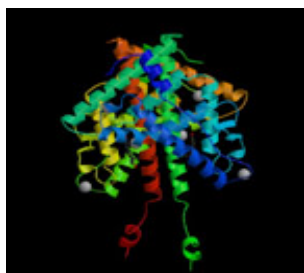
3.9. Hormonální receptory u karcinomu prsu

Nejúčinnější systémovou léčbou karcinomu prsu pro pacientky s pozitivními steroidními receptory je hormonální léčba. Proto má stanovení přítomnosti estrogenových a progesteronových receptorů zásadní význam. Umožňují identifikovat nádory senzitivní k hormonální léčbě.

3.9.1. Estrogenové receptory

V současné době jsou známy dva druhy estrogenových receptorů (ER). ER α a ER β . Receptor ER α je detailně prostudován a slouží jako prediktivní marker pro hormonální léčbu. Patří do skupiny jaderných receptorů aktivovaných ligandy. Po vstupu do buňky se estrogen naváže na ER, ten se prostorově změní, fosforyluje a dimerizuje. Následně se naváže na úseky genů, které v oblasti svých promotorů obsahují úsek závislý na estrogenu. Tím dochází k transkripci genů (klasický způsob přepisu). Komplex estradiolu a ER může regulovat expresi genů i bez přímé interakce

s DNA cestou jiných transkripčních faktorů, jako je komplex aktivovaného proteinu Fos/Jun a AP-1 (neklasický způsob přepisu).



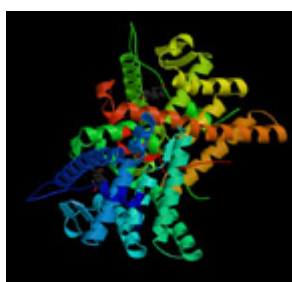
Estrogenový receptor
převzato z: <http://www.wdv.com>

ER se skládá z několika funkčních domén. Doména A/B má vnitřní schopnost aktivovat transkripci - aktivační funkci 1 (AF-1). Tato funkce je nezávislá na vazbě estrogenů nebo antiestrogenů. Pro plnou aktivaci AF-1 je nutná fosforylace serinu na pozici 118 v ER. Doména C je důležitá při umístění receptoru do jádra, dimerizaci receptorů a vazbu heat-shock proteinů. Doména D slouží k oddělení domény C a E. Doména E je významná pro vazbu přirozeného ligandu ER estradiolu. Kromě toho je hlavní oblastí dimerizace receptorů a aktivace transkripce závislé na ligandech (funkce AF-2).

Funkce AF-1 a AF-2 působí ve většině buněk synergicky. U některých genů však mohou být aktivizovány nezávisle na sobě. Jejich funkce může být dále modulována přítomností koregulačních proteinů. Byly popsány jak koaktivátory, které transkripci zesilují, tak korepresory, které jí tlumí (Petráková a kol., 2007).

3.9.2. Progesteronový receptor

Za nádory s pozitivními steroidovými receptory jsou označovány všechny nádory, které mají pozitivní estrogenový a/nebo progesteronový receptor (PR). Vzhledem k tomu, že promotor genu pro PR obsahuje úsek závislý na estrogenu, měla by exprese PR sloužit i jako marker endokrinní závislosti. Navíc preklinické studie potvrdily, že bloádou funkce PR lze u buněk navodit inhibici proliferace a indukci apoptózy. Na základě těchto poznatků byly vyvinuty inhibitory PR k použití do klinické praxe (Petráková a kol., 2007).



Progesteronový receptor
převzato z: <http://www.wdv.com>

3.9.3. Reakce na hormonální léčbu

Přibližně 60 – 70 % všech karcinomů prsu obsahuje hormonální receptory HR(+), avšak jen polovina z nich reaguje na hormonální léčbu. U nádorů ER negativních ER(-) a zároveň PR negativních PR(-) reaguje na hormonální léčbu 10 %.

Odpověď na hormonální léčbu je odhadována následovně:

75 % u nádorů s ER (+) / PR (+)

27 % u nádorů s ER (+) / PR (-)

46 % u nádorů s ER (-) / PR (+)

11 % u nádorů s ER (-) / PR (-)

Existují však výrazné rozdíly v distribuci hormonálních receptorů uvnitř nádoru i u jedné pacientky. Stanovení HR v nádoru je tedy vždy zatíženo určitou metodologickou chybou s nemožností získání reprezentativního vzorku z celého nádoru. Pro heterogenitu v obsahu hormonálních receptorů v nádoru svědčí i ten fakt, že pravděpodobnost reakce nádoru na hormonální léčbu koreluje lépe s kvantitativním, než pouze s kvalitativním stanovením HR. Nádory s pozitivitou hormonálních receptorů měly lepší prognózu i menší postižení regionálních lymfatických uzlin. Ale i nádory ER pozitivní s postižením lymfatických uzlin měly významně příznivější prognózu než nádory, které hormonální receptory neobsahovaly. V souboru 257 žen s nádorovým postižením lymfatických uzlin bylo pětileté přežití 73,9 % v případech positivity estrogenových receptorů, proti 55,2 % případů estrogen-receptorové negativity ($p = 0,01$). Pravděpodobnost recidivy u ER(+) případů byla významně nižší (32,8 %) proti ER(-) případům (56,5 %), $p = 0,002$. Významný vztah byl prokázán mezi histologickým grade nádoru a obsahem HR. Nádory grade 1 mívají pozitivitu ER okolo 90 % oproti nádorům grade 3, které obsahují estrogenové receptory jen v 50 % všech buněk. Podobný vztah platí i pro stav receptorů progesteronových (Strnad, 2001).

4. Praktická část

4.1. Příprava vzorků v histologické laboratoři

Imunohistochemická vyšetření a stanovení estrogenových a progesteronových receptorů ve tkáni následují vždy po stanovení histologické diagnózy karcinomu prsu. Stanovení estrogenových a progesteronových receptorů má zásadní význam pro další onkologickou léčbu pacientky.

V Karlovarské krajské nemocnici, a.s. – nemocnici v Sokolově zajišťuje přípravu vzorků z nádorů prsu pro mikroskopické vyšetření histologická laboratoř oddělení patologie.

Po odběru vzorku tkání je nutná jeho včasná fixace. Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které má zabránit samovolnému rozkladu tkáně (autolýze). Autolýza je podmíněna působením buněčných enzymů a vede rychle k hrubým změnám protoplazmy, až k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixační prostředky musí zachovat co nejlépe strukturu tkáně, zachovat barvitelnost tkáně, zvýšit afinitu protoplazmy k přijímání barviva a umět rychle pronikat do tkáně. Nejlépe všem uvedeným požadavkům vyhovuje neutrální formol (roztok formaldehydu ve vodě).

Po přijetí vzorku histologickou laboratoří, kontrole označení a jeho zaevidování, je vzorek lékařem makroskopicky popsán a jsou vybrány části tkáně, ze kterých se zhotoví preparáty pro studium pod mikroskopem. Vybrané části vzorků jsou upravovány do podoby vhodných bločků a zalévány do parafínu. Zalévání do parafínu se skládá z několika etap. A to z odvodnění tkáně, prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín, prosycení parafínem a vlastního zalití. Odvodnění tkáně se provádí postupně koncentrovanější řadou alkoholů. Alkohol je ze vzorku vytěsněn xylenem, jenž je i rozpouštědlem parafínu, kterým pak lze bloček prosytit. Na sokolovském pracovišti je celý proces prováděn pomocí prosycovacího automatu CITADEL 2000.

Parafínem prosycený bloček uzavřený v kazetce se vkládá do zalévací misky. Po zalití parafínem se vše ochladí pod bod mrazu a na mikrotomu se pomocí ostrých žiletkových nožů zkrájují řezy. Nakrájené řezy se dávají na vodní hladinu, natahují na sklíčko, suší a v xyleny se zbavují parafínu.

Připravené řezy je možno barvit paletou barvicích metod, které selektivně vyzvednou různé buněčné a tkáňové komponenty. Při barvení se využívá toho, že

různé součásti buněk a tkání vážou různá barviva, takže se pak dají v mikroskopu odlišit. Nejčastěji používané barvení je hematoxylinem-eosinem. Na sokolovském pracovišti je k barvení preparátů využíván barvicí automat Autocolor 16-16000. Zhotovené barevné preparáty je nutno chránit před vyblednutím a poškozením. Řezy jsou proto uzavírány (montovány) médii, která musí být průhledná, nesmí ovlivňovat zbarvení tkáně a musí mít vysoký index lomu světla. Po vyhodnocení preparátů lékařem jsou preparáty archivovány.

4.2. Imunohistochemický průkaz estrogenových a progesteronového receptoru

Histochemické a cytochemické metody sledují průběh a důsledky normálních i abnormálních metabolických dějů v buňkách a ve tkáních a jsou přínosné v diagnostice i ve výzkumu. Imunohistochemie se rozvíjela jako jedna z modernějších metod vycházející z histochemie, a to zaváděním postupně objevovaných zákonitostí specifické imunologické reakce a s rozvojem její dostupnosti pro běžné laboratoře.

Základním cílem imunohistochemických a imunocytologických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, t.j. principu vazby antigenu a protilátky. Je to jakoby vazba specifického klíče (protilátky, která je zpravidla volná) a zámku (tkáňovému antigenu, jenž je zpravidla pevně fixován na určitou strukturu, např. na povrch buňky).

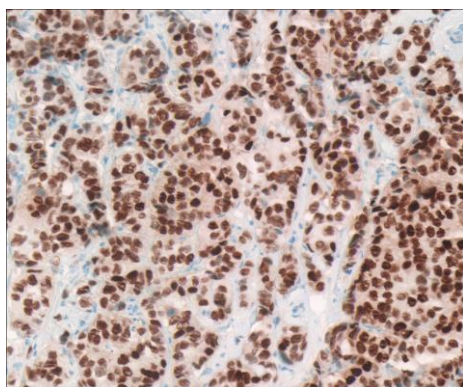
Základní typy imunohistochemických metod jsou:

- přímá metoda s vazbou antigenu a protilátky značené např. barvivem
- nepřímá dvojstupňová metoda – komplikovanější, ale citlivější metoda, ve které se aplikuje neoznačená protilátka, ve druhé vrstvě je nanášena značená protilátka proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky
- nepřímá trojstupňová metoda – slouží k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu v tkáni je malé, ve třetí fázi se nanáší značený komplex. (Ke značení protilátek může být použita radioaktivní látka nebo klasické barvivo nebo barvivo fluoreskující v UV světle (fluorochrom). Nejčastěji je nyní jako značka na protilátku navázán enzym - křenová peroxidáza, která dokáže přeměnit nebarevnou rozpustnou sloučeninu na nerozpustný barevný pigment).

Imunohistochemická vyšetření vzorků odebraných v nemocnici v Sokolově a stanovení estrogenových a progesteronových receptorů jsou prováděná na

specializovaném externím pracovišti - v nemocnici ve Slezské Ostravě. Vlastní provedení metody spočívá v odparafinování řezů a jejich zavodnění, restauraci antigenu např. povařením v pufru, blokování endogenních peroxidáz (inhibuje enzymovou aktivitu), blokování nespecifických vazeb a aplikaci primární protilátky se specifickou vazbou na antigen. Po odstranění nezabudované primární protilátky promytím následuje nanesení sekundární protilátky a po dalším promytí – nanesení enzymového komplexu (označení imunokomplexu enzymem). Pro tuto enzymatickou reakci bývá nejčastěji používán diamino-benzidin, ze kterého křenová peroxidáza vytvoří hnědý pigment. Kontrastním obarvením jader (hematoxylinem) dojde ke kontrastnějšímu zviditelnění antigenu. Značí se jádra v hormon-senzitivních buňkách (hnědě, nebo jinou barvou než dává hematoxylin), v nichž hormony působí jako regulační faktory genové exprese a diferenciací buněk. Jádra, ve kterých nejsou hledané receptory jsou modrá (hematoxylin). Metody se také užívá v diferenciální diagnostice nádorů prsu (zda nejde např. o karcinom jiné žlázy) (Beranová, Tonar, 2002).

Ukázka průkazu receptorů v tkáňových řezech:



*Příklad velmi silné positivity ER
převzato z <http://www.nibib.nih.gov>*

4.3. Přehled vyšetření z roku 2007

Výsledky vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) v nádorech prsu za rok 2007 v sokolovské nemocnici jsou uvedené v tabulce č. 1 (Příloha č.3). Celkem bylo v roce 2007 provedeno 62 vyšetření. Z toho 41 vzorků pocházelo z operací (operačních excizi), 21 vzorků z biopsií. Stáří operovaných

pacientek bylo od 41 do 86 roků, jejich průměrný věk byl 62 roků. Druhá skupina žen byla ve věku 41 až 85 roků, jejich průměrný věk byl 65 roků.

V tabulce č. 1 je doplněn rovněž stupeň diferenciacce nádorů (grading nádorů). Až na výjimky je u všech vzorků grade 1 (dobře diferencovaný nádor). U jednoho vzorku je grade 2 (středně diferencovaný nádor), u dvou vzorků je grade 3 (nizce diferencovaný nádor). Ve třech případech nebyla diferenciacce nádoru uvedena. Aby byl statistický soubor jednotný, vyloučili jsme z hodnocení pacientky, jejichž nádory mají nejtěžší histologickou formu nádoru (grade 3).

Naměřené hodnoty hormonálních receptorů jsme graficky zpracovali. Z hodnot v tabulce jsme sestavili grafy závislosti procentuelního množství ER a PR a poměru ER/PR na věku pacientek u obou skupin a u všech pacientek. Dále jsme sestavili graf závislosti PR na ER u všech vzorků. Celkem tedy 9 grafů klasického typu. Do každého z výše popsaných grafů je vložena spojnice lineárního trendu.

Vzhledem k tomu, že tyto proložené čáry nedávají přesnou informaci, v jakém stáří dochází k věkovému nárůstu nebo poklesu procenta ER(+) nebo PR(+) buněk, použila jsem na základě doporučení školitele ještě grafy průměrů překrývajících se věkových skupin pacientek.

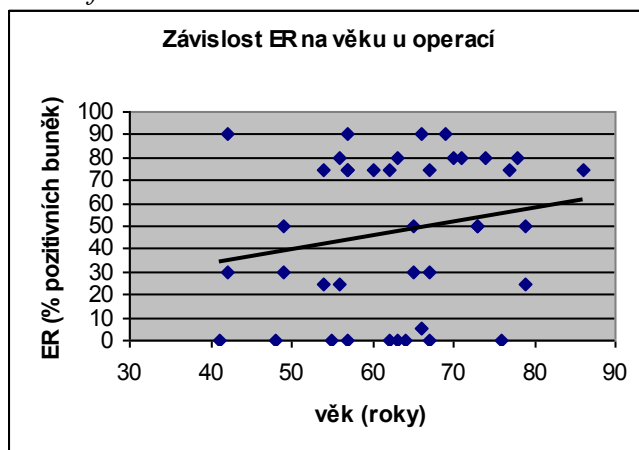
Pacientky jsme v pomocné tabulce seřadili nejprve podle jejich stáří pomocí příkazu DATA v horním menu excelového souboru. Potom jsme vytvořili průměr věku např. posledních sedmi pacientek. Ten jsme přiřadili do řádku patřící k pacientce, která je uprostřed této skupiny. Pak jsme dotyčný vzorec z tohoto políčka zkopírovali do celého sloupce (kromě prvních tří a posledních tří pacientek). Analogicky jsme vytvořili průměry procentuelního množství ER a PR a poměru ER/PR sedmičlenných skupin. Z těchto nových (průměrových) sloupců jsme vytvořili grafy věkové závislosti receptorových hodnot.

Z celkového počtu uvedených vyšetření bylo u devíti pacientek provedeno vyšetření jehlové biopsie i operační biopsie. Výsledky vyšetření receptorů poskytlo relativně srovnatelné hodnoty. V pěti případech z devíti byly hodnoty receptorů u operačních biopsií mírně vyšší. Ve třech případech to bylo naopak. Konkrétní hodnoty dvojic vyšetření jsou uvedené v tabulce č.3 (Příloha č. 6).

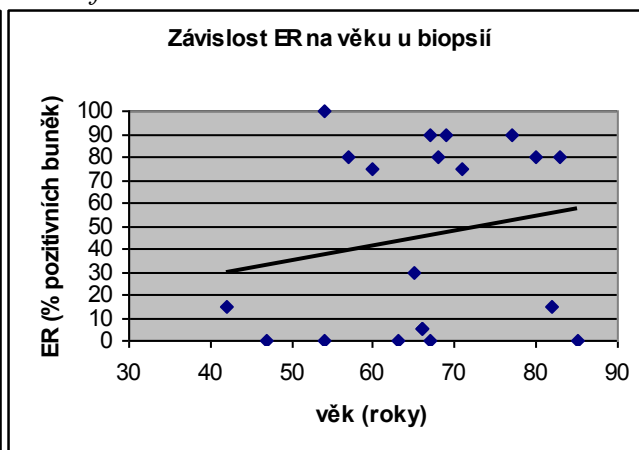
4.4. Výsledky

Receptorové hodnoty obou pacientek (s grade 3) vyloučených ze statistického zpracování byly ER negativní. Rozložení počtu ER(+) buněk v biopsiích a u operovaných pacientek je názorné z připojených grafů. U obou skupin bylo cca 25 % vzorků ER negativních. Průměrná hodnota počtu ER(+) buněk u operací je 43 %,

Graf č.1



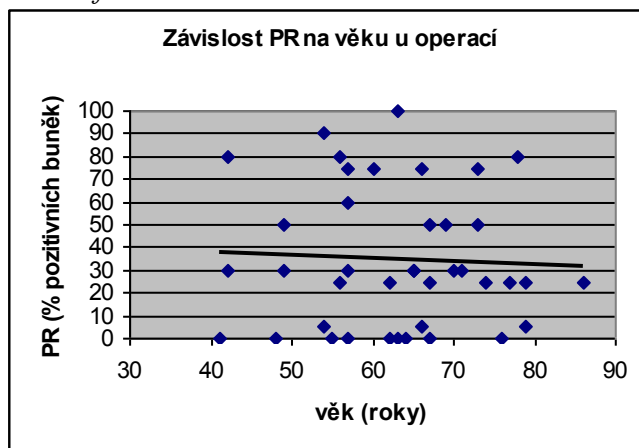
Graf č.2



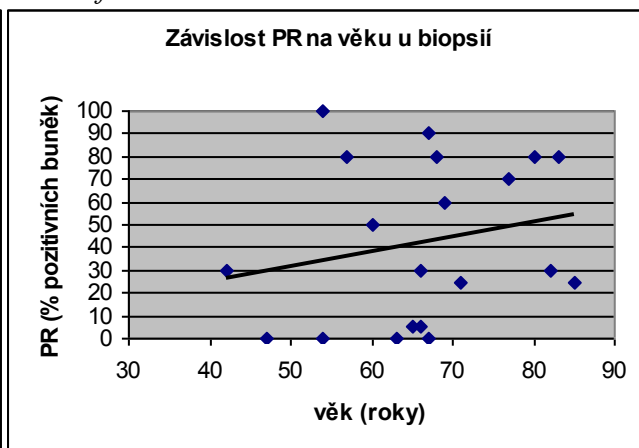
medián souboru je 50 %. U souboru biopsií je průměrná hodnota ER(+) buněk 46 %, medián souboru je 53 %. Soubor biopsií není zřejmě dostatečně velký. Je poloviční proti souboru operací. Největší rozdíl mezi skupinami operací a biopsií je ve výskytu od 20 % do 70 % ER(+) buněk. U skupiny operací je to 28 % vzorků, u skupiny biopsií pouze 5 % vzorků. Proto zřejmě není správné sloučit biopsie a operace do jednoho grafu. Proto je spojený graf daný pouze do příloh (Příloha č.4). V grafech obou skupin je spojnice lineárního trendu rostoucí, je patrný růst pozitivivity ER s věkem.

V případě PR se zdá, že rozvrstvení pozitivivity se příliš neliší u biopsií od operací a že sloučení operací a biopsií do jednoho grafu by bylo oprávněné. Spojený

Graf č.3



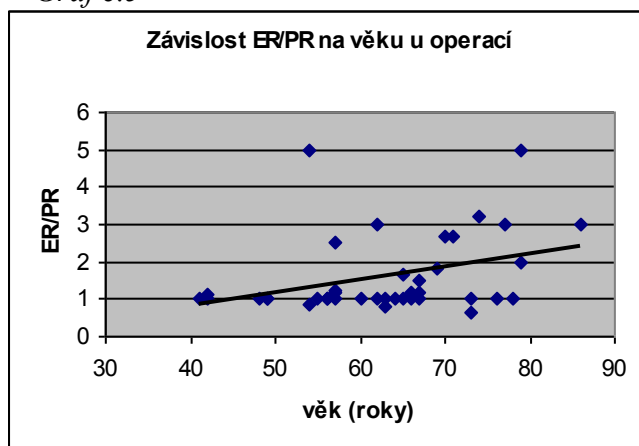
Graf č.4



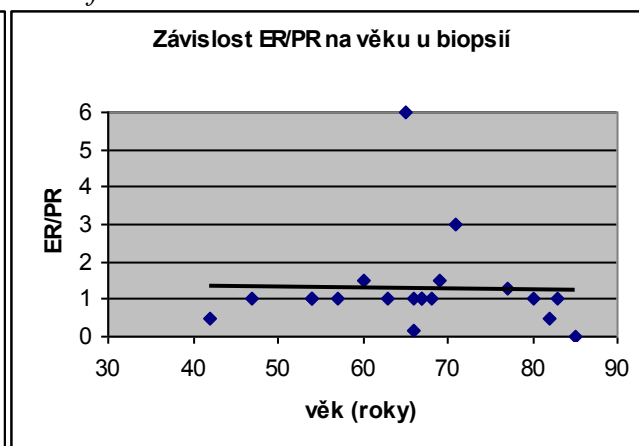
graf je však uvedený rovněž pouze v přílohách (Příloha č.4). I zde bylo u obou skupin zhruba 25 % vzorků PR negativních. Průměrná hodnota počtu PR(+) buněk u operací je 35 %, medián souboru je 30 %. U souboru biopsií je průměrná hodnota PR(+) buněk 42 %, medián souboru je 30 %. Spojnice lineárního trendu je rostoucí pouze u skupiny biopsií. U skupiny operací je mírně klesající.

V případě grafů závislosti poměrů ER/PR na věku chybí výskyt vyšších hodnot ER/PR u skupiny biopsií. Zde rovněž není vhodné slučovat do jednoho grafu výsledky z operací a biopsií. Poměr ER/PR nejčastěji dosahuje u obou skupin vzorků hodnoty 1. Rovněž medián obou souborů je roven 1. Spojnice lineárního trendu u skupiny operací je rostoucí, je patrný trend růstu poměru ER/PR s věkem. Je to jediný na první pohled zjevný trend z grafů nezprůměrovaných hodnot, kterému lze uvěřit bez matematického výpočtu. U skupiny biopsií je spojnice lineárního trendu neklesající, resp. velmi mírně klesající.

Graf č.5

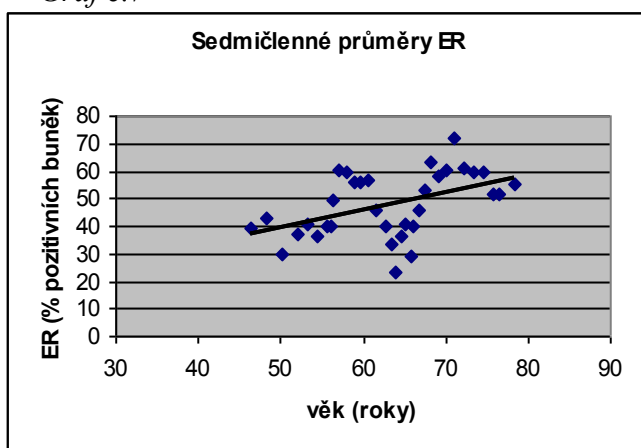


Graf č.6

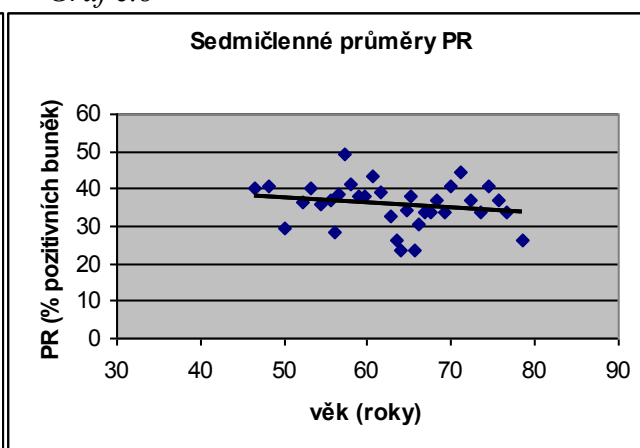


V grafech závislosti sedmičlenných průměrů ER, PR a poměrů ER/PR na věku (grafy č. 7, 8 a 9) u skupiny operací sestavených způsobem popsáním v předchozí kapitole je závislost na věku markantnější. Proložení čar vypadá na první pohled správně – na rozdíl od grafů č. 1 až 4. Dobře patrný je nárůst hodnot ER a poměru ER/PR od věku pacientek zhruba šedesáti let. Zajímavý je také pokles hodnot ER, PR a ER/PR kolem šedesátého pátého roku. Koeficienty korelace spojnice lineárního trendu v grafech sedmičlenných průměrů ER a ER/PR jsou o trochu vyšší, než u spojnic v předchozích grafech. Koeficient korelace u grafu sedmičlenného průměru ER (Graf č.7) je 0,47, u grafu sedmičlenných průměrů ER/PR (Graf č.9) je to 0,55.

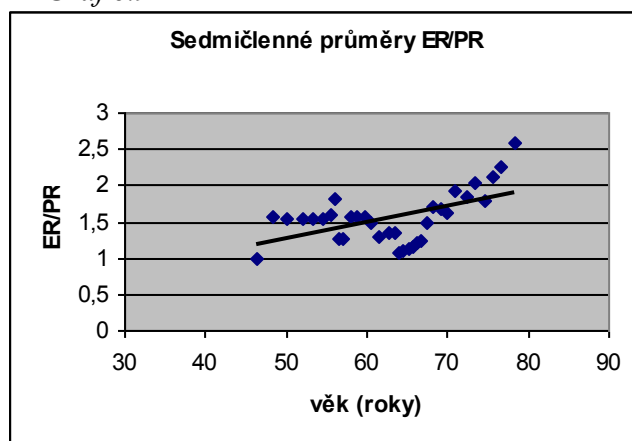
Graf č.7



Graf č.8



Graf č.9



Spojnice lineárního trendu u grafu závislosti ER u operací (Graf č.1) a poměru ER/PR u operací (Graf č.5) měla koeficient korelace 0,20, resp. 0,35. Rovněž pokles pozitivity PR s věkem je u grafu sedmičlenných průměrů (Graf č.8) výraznější. Spojnice lineárního trendu zde má koeficient korelace 0,20. U grafu PR u operací (Graf č.3) byla hodnota koeficientu korelace spojnice lineárního trendu minimální (0,04).

Koeficienty korelace lineárních trendů závislosti u hodnocených grafů nebyly příliš vysoké. Vypovídají o míře pravděpodobnosti, že hodnocená závislost je přímková. Pokud by koeficient korelace byl např. větší než 0,9, znamenalo by to, že studovaná závislost je s více než 90 % pravděpodobností přímkového tvaru.

Metoda sedmičlenných průměrů překrývajících se věkových skupin tedy lépe ověřila směr studovaných závislostí a připomněla, že věková změna počtu receptorově pozitivních buněk může být vlnovitého charakteru a nikoliv přímková.

5. Diskuze

Dle poznatků z literatury je koncentrace ER v karcinomech prsu závislá na věku. S rostoucím věkem stoupá. Je věkově nestabilní. Naproti tomu se koncentrace PR vlivem věku téměř nemění, (někteří autoři zaznamenali i malý pokles) (Hochmann, 2007).

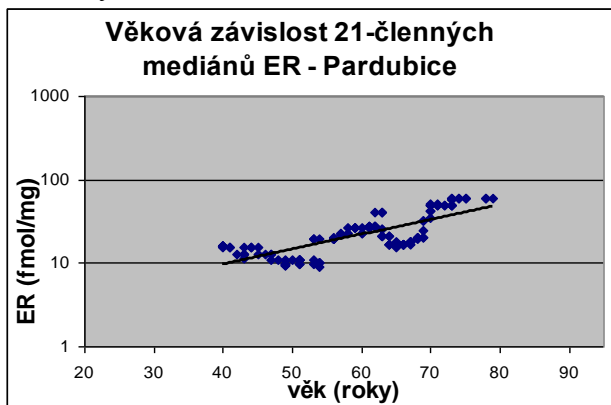
Jestliže analyzujeme poměr ER/PR v suspenzi tvořené rozpuštěnými buňkami (cytosolová analýza), je výsledek stanovení koncentrace hormonálních receptorů v karcinomu prsu v různé míře ovlivněn procentem stromatu (podpůrné tkáně) a také karcinomovými nestromatickými buňkami (buňky negativní v obou receptorech). Toto lze označit jako variabilitu karcinomové a nekarcinomové části bílkovin. Koncentrace ER i PR je ovlivněna stejně. Poměr koncentrací ER/PR proto eliminuje např. rozdíl v množství stromatu mezi jednotlivými pacientkami. Pomocí poměru ER/PR lze lépe posuzovat např. vliv estrogenů na hladinu ER a PR, což může pomoci při diagnóze nadměrné tvorby estrogenů apod. (Hochmann, 2007). Vlivem nadbytku estrogenů dochází k poklesu ER a ke vzestupu PR. Naopak ve stáří – neboli vlivem nedostatku estrogenů ER stoupá a PR klesá.

Jestliže naopak hodnotíme poměr ER/PR v imunohistochemickém preparátu, tak v tom případě vazivové stroma není vůbec vyšetřováno a jsou počítána procenta receptorově pozitivních buněk pouze v rámci žlázového (epitelového) typu. Je zde však jiný problém – že velmi silně pozitivní buňky nelze dobře odlišit od středně silně pozitivních buněk. To by nemuselo být na škodu při řešení otázky, zda poměr ER/PR je u některé pacientky nevýhodný, ohrožující např. život do 1 roku. Ale velmi slabě pozitivní buňky se mohou jevit jako negativní. Proto je vhodné sledovat, zda % buněk pozitivních např. na ER je v souladu s literaturou (Hochmann, 2007). Jestliže by se naše grafy a procentuální údaje hodnoty lišily od publikovaných údajů, znamenalo by to, že výsledkům ER a PR dodavatelské laboratoře není možno stoprocentně věřit v otázkách rozhodování o hormonální terapii. Ale může to naopak být pravdivým zobrazením skutečnosti, pokud v našem statistickém souboru jsou v nadměrném počtu zastoupeny premenopauzální pacientky s estrogenovou dominancí nebo postmenopauzální pacientky léčené hormonálně pro zdravotní obtíže spojené s přechodem.

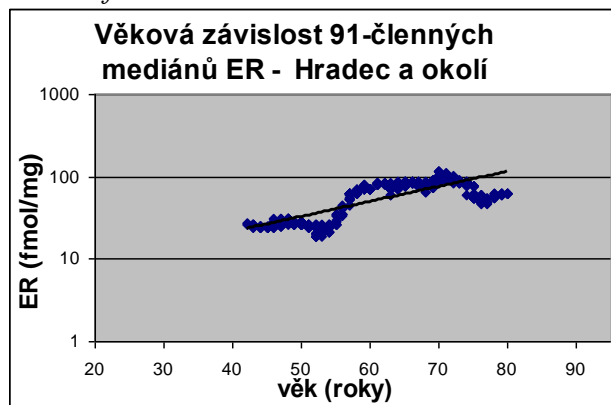
Problémem je, že v literatuře těžko nalzáme dostatek prací zaměřených tímto směrem, respektive hlavně takových, které jsou zaměřeny na poměr ER/PR. Již nyní však můžeme říci, že výsledky z punkčních biopsií nedosahují takové kvality jako

výsledky z operačních biopsií. To je ovšem známá skutečnost, o které kliničtí onkologové vědí. A vědí též, že je to způsobeno nedostatečnou velikostí odebraných vzorků a že to tedy není způsobeno nekvalitní prací laboratoře.

Graf č.10



Graf č.11



V grafech číslo 10 a 11 převzatých z jiné diplomové práce (Hanáková, 2009) jsou příklady výsledků ER z biochemických laboratoří různých měst. Statistické soubory se liší. Výška hodnot je zřejmě rozdílná z důvodu mezilaboratorních metodických rozdílů, ale rozdíly ve tvaru vzniklé závislosti jsou způsobeny rozdílností mezi pacientkami. Možná, byly způsobeny i tím, že u některých pardubických 65letých pacientek byla prováděna odlišným způsobem léčba zdravotních problémů spojených s přechodem.

Dříve byla prováděna velmi hojně pomocí estrogenů a nyní se od toho pokud možno ustupuje kvůli nebezpečí vzniku nebo urychlení rozvoje rakoviny prsu. Naopak léčba karcinomů prsu se nyní neprovádí estrogeny, ale antiestrogeny – na rozdíl od léčby obtíží kolem přechodu. Obdobný pokles ER ve stejném věku 65 let lze pozorovat u našich sokolovských pacientek. Smyslem bakalářských prací není vyvozovat podobné závěry, ale vyzkoušet metody statistického zpracování výsledků.

6. Závěr

Grafické zpracování hodnot získaných z výsledků vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech prsu za rok 2007 v histologické laboratoři oddělení patologie Karlovarské krajské nemocnice, a.s. – nemocnice v Sokolově dokládá veliký rozptyl hodnot bez zjevné závislosti. Rostoucí spojnice lineárního trendu však potvrzuje růst pozitivitu hormonálních receptorů s věkem ve všech grafech s výjimkou progesteronových receptorů u skupiny operovaných pacientek a poměru ER/PR u skupiny s biopsií. Avšak operované pacientky je třeba brát jako lépe vyšetřené než v případě punkčních biopsií. A pozitivita progesteronových receptorů by měla podle literatury v závislosti na věku klesat. To se však mnohým autorům často nedařilo prokázat – bývá to na hranicích průkaznosti. Tedy u našich výsledků z operací alespoň nestoupá.

Správným výsledkem by pravděpodobně bylo, kdyby kromě věkového nárůstu ER byl prokázán věkový pokles PR. Díky věkovému poklesu PR (jelikož je to jmenovatel zlomku ER/PR) by věkový nárůst zlomku ER/PR byl prudší než věkový nárůst ER samotného a poznalo by se to mimo jiné zvýšením korelačního koeficientu proložené přímky. Hranice pro nevýhodnost poměru ER/PR – ohrožující život pacientky (např. život do 1 roku) by se v závislosti na věku pravděpodobně měla zvyšovat prudčeji. Tato hranice však dosud z daleka není přesně určena – možná právě z důvodu nejasné věkové závislosti koncentrace receptorů. Snad by mohlo jít o 5 až 10-ti násobnou převahu ER nad PR u pacientek průměrně starých. Námi uvedená tabulka reakce na hormonální léčbu karcinomu prsu uvádí, že kromě nevýhodnosti ER(-)/PR(-) je nevýhodná také převaha ER nad PR.

Vyšetření hormonálních receptorů je velmi citlivá metoda a spolehlivost výsledků závisí na mnoha faktorech. Od fixace vzorků, zvolených protilátek po vlastní stanovování receptorů nebo vyhodnocování grade. Zda nedošlo ke zkreslení výsledků vyšetření lze ověřit také např. porovnáním závislosti histologického stupně nádorů (grade) na ER. Pokud by receptory byly naměřeny chybně, nešla by stanovit žádná závislost. Díky konkrétním hodnotám stupně diferenciaci nádorů (až na výjimky vždy 1) u vyšetření z roku 2007 nebylo možné takové porovnání provést statisticky spolehlivě. Ale tyto výjimky s horším grade poukazovaly na dobrou spolehlivost vyšetření receptorů, neboť měly nízké ER. Na dobrou spolehlivost vyšetření receptorů

u našich pacientek též poukazuje věkový nárůst ER a ER/PR u výsledků z operací. Oproti tomu dávají punkční biopsie méně spolehlivý výsledek.

Jednoduché statistické zpracování souborů dat (podmínkou je jejich dostatečná velikost) umožňuje porovnat dosažené výsledky s údaji uvedenými v odborných publikacích. Zjištění případných rozdílů pak dává podnět k ověření postupů a vyhledání možných zdrojů chyb.

7. Seznam použitých zkratk

AF	aktivační funkce
BRCA	breast cancer
CA 15-3	glykoprotein onkofetálního charakteru
CEA	karcinoembryonální antigen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	estrogenový receptor
FNAB	fine needle aspiration biopsy
HDL	high density lipoprotein
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2/neuroglioblastoma
HR	hormonální receptor
JSC	joint stock company
LDL	low density lipoprotein
PR	progesteronový receptor
TPA	tkáňový polypeptidový antigen
TPS	tkáňový polypeptidový specifický antigen
(+)	pozitivita
(-)	negativita

8. Seznam příloh

Příloha č. 1 - Fotografie z histologické laboratoře oddělení patologie

Příloha č. 2 - Ukázka průvodního listu s výsledky imunohistochemického vyšetření na
hormonální receptory

Příloha č. 3 - Tabulka č. 1 – Výsledky vyšetření ER a PR za rok 2007

Příloha č. 4 - graf závislosti ER na věku u operací a biopsií

- graf závislosti PR na věku u operací a biopsií

- graf závislosti ER/PR na věku u operací a biopsií

Příloha č. 5 - Tabulka č. 2 - Pomocná tabulka sedmičlenných průměrů u operací

Příloha č. 6 - Tabulka č. 3 - Výsledky vyšetření ER a PR – porovnání obou metod
vyšetření

9. Seznam použité literatury a zdrojů

1. BERANOVÁ, M., TONAR, Z. – *Principy a příklady imunohistochemie*, příručka pro studenty, Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni, 2002, : 5-7, [cit. 2009-03-30]
Dostupný z www: <http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc/index.html>
2. HANÁKOVÁ, T. – *Vliv věku a jiných faktorů na cytosolovou koncentraci steroidních receptorů u karcinomu prsu*, diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2009: 39
3. HOCHMANN, J. – *Ratio of concentrations of estrogen receptors to progesterone receptors (ER/PR) in the cytosol of breast cancer (stratification by forming of groups differing in PR); (Poměr koncentrací estrogenových receptorů ku progesteronovým receptorům v cytosolu karcinomu prsu)*, Neoplasma. Vol 54, 2007, No. 4: 290-296
4. JANDOROVÁ, V. – *Porovnání diagnostiky a léčby karcinomu prsu v letech 1991 a 2006*, Fakulta zdravotnických studií Univerzity Pardubice, 2008: 11-16, [cit. 2009-04-09]
Dostupný z www: <https://dspace.upce.cz:8443/>
5. KARÁSKOVÁ, O. – *Nemocnice Kolín – porovnání histochemických výsledků estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech prsu*, bakalářská práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2008
6. MOTLÍK, K., ŽIVNÝ, J. – *Patologie v ženském lékařství*, 1. vyd., Grada Publishing, Praha, 2001, ISBN 80-7169-460-6: 483
7. PETRÁKOVÁ, K., NENUTIL, R., GRELL, P., SVOBODA, M., FABIÁN, P., PALÁTOVÁ, M., VYZULA, R. – *Mechanismy rezistence na Tamoxifen*, Masarykův onkologický ústav Brno, Klinická onkologie 20, 6/2007: 369, 370, 373, [cit. 2009-03-27]
Dostupný z www: https://www.linkos.cz/odborniciuvzdelavani/6_07/01.pdf
8. PETRUŽELKA, L., NOVOTNÝ, J. – *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Karcinom prsu*, 2002, : 2, [cit. 2009-03-23]
Dostupný z www: <http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/t104.rtf>
9. PRAUSOVÁ, J. – *Nádory prsu*, Časopis Vesmír 83, 495, 9/2004: 3-5, [cit. 2009-04-09]
Dostupný z www: <http://www.vesmir.cz/clanek/nadory-prsu>
10. RACEK, J. a kol. – *Klinická biochemie*, 2. přepracované vydání, Galén, Praha, 2006, ISBN 80-7262-324-9: 247-252, 256
11. STRNAD, P. – *Karcinom prsu*, Senologická sekce ČGPS, 2001: 1-2, 6-7, 11, [cit. 2009-03-27] Dostupný z www: <mhtml:file://E:\karcinom prsu\Senologická sekce ČGPS-Karcinom prsu.mht>
12. VALÍK, D., NEKULOVÁ, M., DUBSKÁ, L., ZIMA, T., SPRINGER, D., MALBOHAN, I., TOPOLČAN, O. - *Doporučení České společnosti klinické biochemie, České onkologické společnosti, České společnosti nukleární*

*medicíny-sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů
v klinické praxi, 2008: 6, 18-22, [cit. 2009-03-27]*

Dostupný z www:<https://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/TM/TM_dopor.pdf>

13. VOKURKA, M, HUGO, J. a kol. – *Velký lékařský slovník*, 5. aktualizované vydání, Jessenius, Maxdorf s.r.o., Praha, 2005, ISBN 80-7345-058-5
14. Onkomagazín číslo 3/2008 – *Liečba karcinómu prsníka*, Med Media, s.r.o., Bratislava, 2008, ISBN 3899/2008



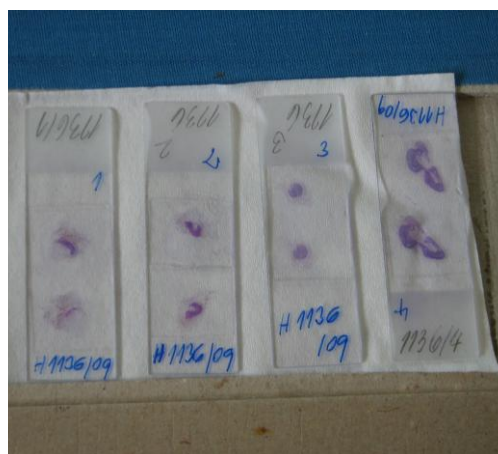
Barvicí automat Autocolor 16-1600



Prosyrovací automat Citadel 2000



Zalévací linka



Vyhotovené preparáty

Ukázka průvodního listu s výsledky imunohistochemického vyšetření na hormonální receptory:

Zpráva z vyšetření

Pacient		Histologie - 07/00444	
R.Č.	Pojišťovna	Žádanka	
Naroz.		Datum 26.02.07	
Jméno		IČP/VS 48 001 013 /	
Adresa		Odborn.807	
		Název MUDr. Hawawrehová Marcela,	
		Adresa Slovenská 545	
		356 01 Sokolov	
Provedl			
IČP 91 738 000			
Odborn.807			
Název MUDr. Vladimír Benčík			
Uzavř.			

Odběr: . . . / Příjem: . . . / Odeslání: . . . /

Klinická dg. C509 ZN- prs, NS

Makropopis

KN a.s., nemocnice v Sokolově, odd. patologie - prim.MUDr. M.Hawawrehová

Dg.: Infiltrující duktální karcinom mammy.
punktát P prsu

Blok: H 634/07 - 3

Nález

Imunohistochemické vyšetření:

estrogen receptor:	80%
progesteron receptor:	80%
PCNA:	negativní
Ki67:	30%
p53:	30%
c-erbB2:	slabá pozitivita, skóre 1+
E-Cadherin:	pozitivní

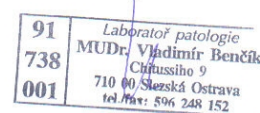
KARCINOM DUKTALNI INFILTRUJICI (T04) M85003 G P

prs dx

T0402 1

Datum

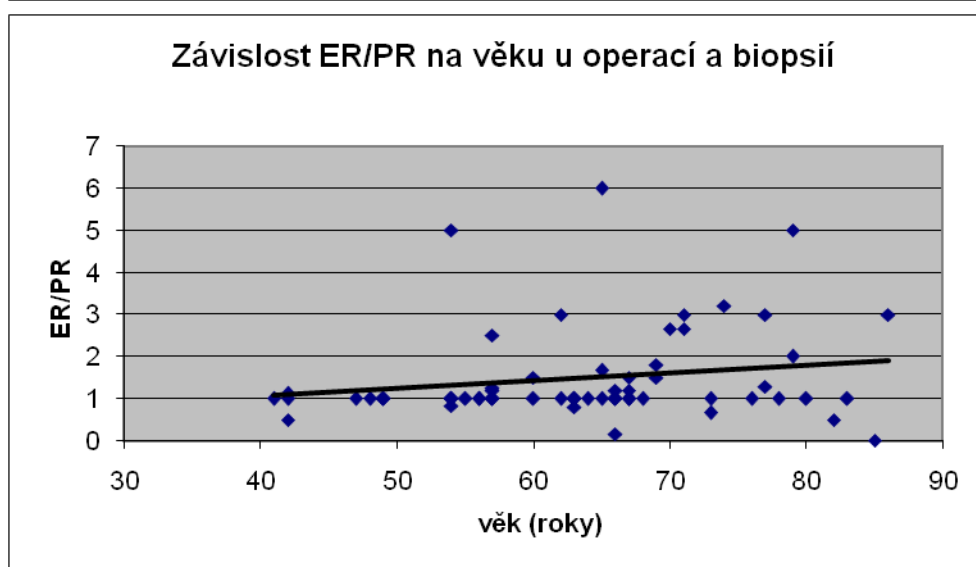
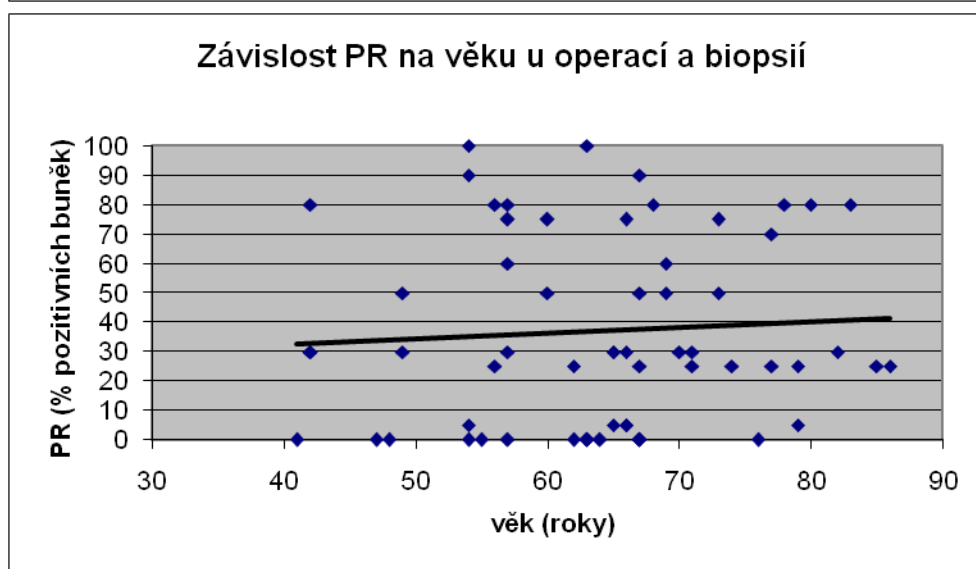
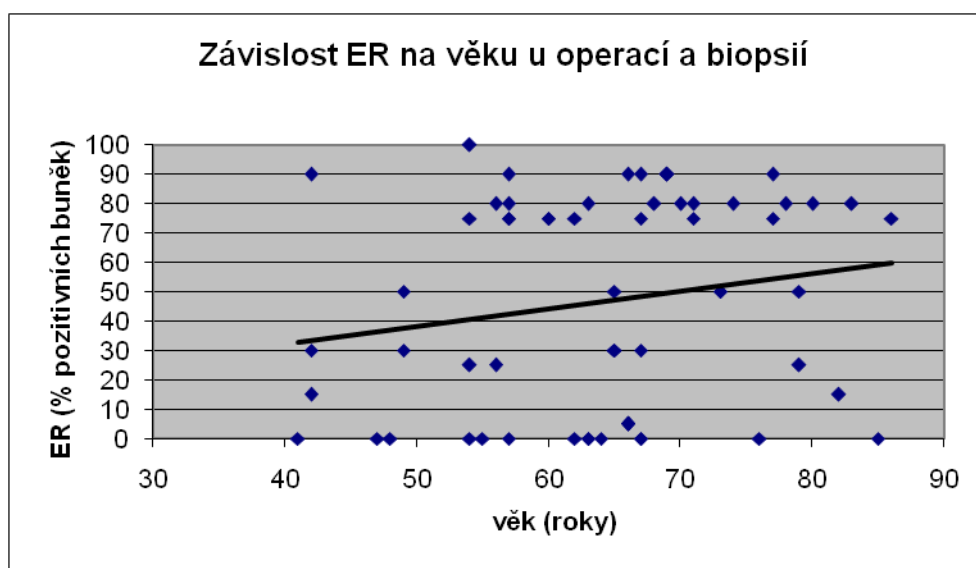
MUDr. Benčík



Tabulka č. 1

VYŠETŘENÍ ER A PR ZA ROK 2007										
Pacient číslo	Rok narození	Datum operace	Rok vyšetření	Stáří při operaci	Datum biopsie	Stáří při biopsii	ER	PR	ER/PR	Grade
1	1930		2007		12.2.	77	90 %	70 %	1,2857	1
2	1945	8.2.	2007	62			75 %	25 %	3,0000	1
3	1921	8.2.	2007	86			75 %	25 %	3,0000	1
4	1941		2007		5.2.	66	5 %	30 %	0,1667	1
5	1944		2007		2.2.	63	neg. %	neg. %	1,0000	1
6	1936	1.2.	2007	71			80 %	30 %	2,6667	1
7	1947		2007		1.2.	60	75 %	50 %	1,5000	1
8	1934	25.1.	2007	73			50 %	50 %	1,0000	1
9	1953		2007		16.1.	54	neg. %	neg. %	1,0000	1
10	1939		2007		15.1.	68	80 %	80 %	1,0000	1
11	1950	11.1.	2007	57			neg. %	neg. %	1,0000	1
12	1938		2007		10.1.	69	90 %	60 %	1,5000	1
13	1927		2007		9.1.	80	80 %	80 %	1,0000	1
14	1936		2007		4.1.	71	75 %	25 %	3,0000	
15	1950	15.3.	2007	57			75 %	60 %	1,2500	1
16	1965		2007		14.3.	42	15 %	30 %	0,5000	1
17	1953		2007		6.3.	54	100 %	100 %	1,0000	1
18	1947	7.3.	2007	60			75 %	75 %	1,0000	1
19	1944	1.3.	2007	63			neg. %	neg. %	1,0000	1
20	1965	22.2.	2007	42			90 %	80 %	1,1250	
21	1966	22.2.	2007	41			neg. %	neg. %	1,0000	
22	1966		2007		19.2.	41	neg. %	neg. %	1,0000	3
23	1950		2007		15.2.	57	80 %	80 %	1,0000	1
24	1945	15.2.	2007	62			neg. %	neg. %	1,0000	1
25	1938	15.2.	2007	69			90 %	50 %	1,8000	1
26	1940	15.2.	2007	67			30 %	25 %	1,2000	1
27	1953	14.5.	2007	54			75 %	90 %	0,8333	1
28	1942	10.5.	2007	65			50 %	30 %	1,6667	1
29	1953	10.5.	2007	54			25 %	5 %	5,0000	1
30	1940	4.5.	2007	67			neg. %	neg. %	1,0000	1

Pacient číslo	Rok narození	Datum operace	Rok vyšetření	Stáří při operaci	Datum biopsie	Stáří při biopsii	ER	PR	ER/PR	Grade
31	1942	3.5.	2007	65			30 %	30 %	1,0000	1
32	1958	27.4.	2007	49			30 %	30 %	1,0000	1
33	1951	26.4.	2007	56			80 %	80 %	1,0000	1
34	1959	12.4.	2007	48			neg. %	neg. %	1,0000	1
35	1942		2007		4.4.	65	30 %	5 %	6,0000	1
36	1925		2007		3.4.	82	15 %	30 %	0,5000	1
37	1958	21.6.	2007	49			50 %	50 %	1,0000	1
38	1937	20.6.	2007	70			80 %	30 %	2,6667	1
39	1965	14.6.	2007	42			neg. %	neg. %	1,0000	3
40	1965	31.5.	2007	42			30 %	30 %	1,0000	1
41	1943	30.8.	2007	64			neg. %	neg. %	1,0000	1
42	1944	23.8.	2007	63			80 %	100 %	0,8000	1
43	1940		2007		14.8.	67	90 %	90 %	1,0000	1
44	1941		2007		13.8.	66	5 %	5 %	1,0000	1
45	1950	12.7.	2007	57			75 %	30 %	2,5000	1
46	1929	10.7.	2007	78			80 %	80 %	1,0000	1
47	1931	4.7.	2007	76			neg. %	neg. %	1,0000	1
48	1952	28.6.	2007	55			neg. %	neg. %	1,0000	1
49	1930	19.10.	2007	77			75 %	25 %	3,0000	2
50	1922		2007		18.10.	85	neg. %	25 %	0,0004	1
51	1950	15.10.	2007	57			90 %	75 %	1,2000	1
52	1940	11.10.	2007	67			75 %	50 %	1,5000	1
53	1934	11.10.	2007	73			50 %	75 %	0,6667	1
54	1951	20.9.	2007	56			25 %	25 %	1,0000	1
55	1933	18.9.	2007	74			80 %	25 %	3,2000	1
56	1960		2007		13.9.	47	neg. %	neg. %	1,0000	1
57	1941	13.9.	2007	66			5 %	5 %	1,0000	1
58	1928	11.9.	2007	79			25 %	5 %	5,0000	1
59	1924		2007		28.11.	83	80 %	80 %	1,0000	1
60	1928	23.11.	2007	79			50 %	25 %	2,0000	1
61	1941	22.11.	2007	66			90 %	75 %	1,2000	1
62	1940		2007		20.11.	67	neg. %	neg. %	1,0000	1



Tabulka č.2

Pomocná tabulka sedmičlenných průměrů u operací							
Stáří při operaci	7mi-členné průměry věku	ER	7mi-členné průměry ER	PR	7mi-členné průměry PR	ER/PR	7mi-členné průměry ER/PR
41	-	neg. %	-	neg. %	-	1,0000	-
42	-	90 %	-	80 %	-	1,1250	-
42	-	30 %	-	30 %	-	1,0000	-
48	46,4	neg. %	39,2886	neg. %	40,0029	1,0000	0,9940
49	48,3	30 %	42,8586	30 %	40,7157	1,0000	1,5655
49	50,1	50 %	30,0029	50 %	29,2886	1,0000	1,5476
54	52,1	75 %	37,1457	90 %	36,4314	0,8333	1,5476
54	53,3	25 %	40,7157	5 %	40,0014	5,0000	1,5476
55	54,4	neg. %	36,4314	neg. %	35,7171	1,0000	1,5476
56	55,6	80 %	40,0029	80 %	37,1457	1,0000	1,5833
56	56,0	25 %	40,0029	25 %	28,5743	1,0000	1,8214
57	56,4	neg. %	49,2886	neg. %	38,5743	1,0000	1,2786
57	57,1	75 %	60,0014	60 %	49,2871	1,2500	1,2786
57	58,0	75 %	59,2871	30 %	41,4300	2,5000	1,5643
57	58,9	90 %	55,7171	75 %	37,8600	1,2000	1,5643
60	59,7	75 %	55,7171	75 %	37,8600	1,0000	1,5643
62	60,6	75 %	56,4314	25 %	43,5743	3,0000	1,5000
62	61,6	neg. %	45,7186	neg. %	39,2900	1,0000	1,2857
63	62,7	neg. %	40,0043	neg. %	32,8614	1,0000	1,3524
63	63,4	80 %	33,5757	100 %	26,4329	0,8000	1,3524
64	64,0	neg. %	23,5757	neg. %	23,5757	1,0000	1,0667
65	64,6	50 %	36,4314	30 %	34,2886	1,6667	1,0952
65	65,1	30 %	40,7157	30 %	37,8586	1,0000	1,1238
66	65,7	5 %	29,2886	5 %	23,5743	1,0000	1,1524
66	66,1	90 %	40,0014	75 %	30,7157	1,2000	1,2238
67	66,7	30 %	45,7157	25 %	33,5729	1,2000	1,2429
67	67,4	neg. %	52,8586	neg. %	33,5729	1,0000	1,4810
67	68,1	75 %	63,5729	50 %	37,1443	1,5000	1,7190
69	69,1	90 %	57,8586	50 %	33,5729	1,8000	1,6905
70	70,0	80 %	60,7157	30 %	40,7157	2,6667	1,6143
71	71,0	80 %	72,1429	30 %	44,2857	2,6667	1,9286
73	72,3	50 %	61,4300	50 %	37,1443	1,0000	1,8571
73	73,4	50 %	59,2871	75 %	33,5729	0,6667	2,0286
74	74,6	80 %	59,2871	25 %	40,7157	3,2000	1,7905
76	75,7	neg. %	51,4300	neg. %	37,1443	1,0000	2,1238
77	76,6	75 %	51,4300	25 %	33,5729	3,0000	2,2667
78	78,4	80 %	55,0014	80 %	26,4300	1,0000	2,6000
79	-	25 %	-	5 %	-	5,0000	-
79	-	50 %	-	25 %	-	2,0000	-
86	-	75 %	-	25 %	-	3,0000	-

Tabulka č.3

VYŠETŘENÍ ER A PR ZA ROK 2007- porovnání obou metod vyšetření

Pacient číslo	Rok narození	Datum operace	Rok vyšetření	Stáří při operaci	Datum biopsie	Stáří při biopsii	ER	PR	ER/PR	Grade
14	1936		2007		4.1.	71	75 %	25 %	3,0000	
6	1936	1.2.	2007	71			80 %	30 %	2,6667	1
7	1947		2007		1.2.	60	75 %	50 %	1,5000	1
18	1947	7.3.	2007	60			75 %	75 %	1,0000	1
5	1944		2007		2.2.	63	neg. %	neg. %	1,0000	1
19	1944	1.3.	2007	63			neg. %	neg. %	1,0000	1
23	1950		2007		15.2.	57	80 %	80 %	1,0000	1
15	1950	15.3.	2007	57			75 %	60 %	1,2500	1
9	1953		2007		16.1.	54	neg. %	neg. %	1,0000	1
29	1953	10.5.	2007	54			25 %	5 %	5,0000	1
12	1938		2007		10.1.	69	90 %	60 %	1,5000	1
25	1938	15.2.	2007	69			90 %	50 %	1,8000	1
17	1953		2007		6.3.	54	100 %	100 %	1,0000	1
27	1953	14.5.	2007	54			75 %	90 %	0,8333	1
16	1965		2007		14.3.	42	15 %	30 %	0,5000	1
40	1965	31.5.	2007	42			30 %	30 %	1,0000	1
35	1942		2007		4.4.	65	30 %	5 %	6,0000	1
28	1942	10.5.	2007	65			50 %	30 %	1,6667	1