

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

Bakalářská práce
Nemocnice Jihlava – porovnání histochemických výsledků
estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech prsu



Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Hradec Králové 2008

Hana Bláhová

Děkuji školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za pomoc, odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce.

OBSAH

1. SOUHRN	1
2. ÚVOD	2
3. KARCINOM PRSU	3
4. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU KARCINOMU PRSU	5
4.1. Rizikové faktory prokázané	5
4.2. Rizikové faktory pravděpodobně diskutované	6
4.3. Protektivní faktory	7
5. ANATOMIE MLÉČNÉ ŽLÁZY	8
6. IMUNOCHEMICKÉ REAKCE	9
6.1. Antigen	9
6.2. Protilátky	10
7. PRAKTICKÁ ČÁST	11
7.1. Monoklonal Mouse Anti - Human Estrogen receptor	11
7.2. Monoklonal Mouse Anti – Human Progesteron receptor	12
7.3. En Vision	12
7.4. HER2/neu	13
7.5. Hybridizace in situ	13
8. MATERIÁL A METODY	14
9. VÝSLEDKY	16
9.1. Porovnání výsledků estrogenových receptorů u operací	16
9.2. Porovnání výsledků estrogenových receptorů u punkcí prsu	16
9.3. Porovnání výsledků progesteronových receptorů u operací	17
9.4. Porovnání výsledků progesteronových receptorů u punkcí prsu	17
9.5. Příklady závislosti ER/PR na věku u operací a HER2/neu na věku	18
9.6. Porovnání výsledků HER2/neu	18
10. DISKUZE	19
11. ZÁVĚR	20
12. PŘÍLOHY	21
13. SEZNAM ZKRATEK	43
14. LITERATURA A ZDROJE	44

1. SOUHRN

Tato práce je zaměřena na problematiku karcinomu mléčné žlázy a imunohistochemické vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů.

Karcinom mléčné žlázy je nejčastějším maligním nádorovým onemocněním ženské populace. V kapitole Karcinom prsu, je popsána kaskáda morfoložických změn vedoucích k malignímu nádoru.

Snažili jsme se shrnout rizikové faktory vzniku karcinomu mléčné žlázy. Rizikové faktory jsou rozděleny do tří skupin:

1. Rizikové faktory prokázané
2. Rizikové faktory pravděpodobně diskutované
3. Rizikové faktory protektivní

Část práce je zaměřena na imunohistochemické vyšetření ER a PR. Zde je objasněna podstata imunohistochemických reakcí, vysvětlení pojmů antigen a protilátka. Principem imunohistochemie je reakce antigen - protilátka.

V praktické části je pojednáno o konkrétních protilátkách, které používáme k vyšetření ER a PR a účelu jejich použití. Je zde postup při imunohistochemickém vyšetření a zpracování tkání, hodnocení preparátů a postup při negativním výsledku.

Jedna z kapitol je věnována hybridizaci in situ (ISH) pomocí enzymaticky značených DNA sond. ISH se zakládá na vzájemné afinitě komplementárních sekvencí nukleových kyselin.

V kapitole Výsledky jsou zpracovány zjištěné hodnoty ER, PR a HER2 v Nemocnici Jihlava v letech 2000-2007. Je dokumentováno, že pravděpodobně v závislosti na kvalitě protilátek se měnily počty pozitivních a negativních pacientek nebo počty silně pozitivních a slabě pozitivních pacientek u ER a PR, kdežto výsledky HER2/neu nejevily takové rozdíly v různých letech.

U Operačních excizí výsledky ER a PR umožnily v různých letech prakticky vždy rozdělit pacientky na pozitivnější a méně pozitivní. Naopak u punkčních biopsií byly v prvních letech výsledky většinou pouze negativní. Když se podařilo dosahovat u nich podobných výsledků jako u operačních excizí, přestali klinici vyšetření jehlových biopsií požadovat.

Grafické zpracování výsledků všech pacientek považujeme za jednu z dalších metod kontroly našich výsledků.

2. ÚVOD

Cílem bakalářské práce je vypracovat přehled problematiky buněčných markerů karcinomu mléčné žlázy, hlavně estrogenových a progesteronových receptorů na našem pracovišti. Práce je zaměřena na zpracování a vyhodnocení výsledků estrogenových a progesteronových receptorů v Nemocnici Jihlava v letech 2000 – 2007.

Výsledky vyšetření a problematiku imunohistochemie jsme se snažili zpracovat tak, aby mohla být přínosem a eventuálně posloužit k zaškolení nových laborantek, které budou v této oblasti pracovat.

Výsledky jsou uspořádány tak, aby mohly být vzájemně porovnány s výsledky z jiných pracovišť, pro možnost mezilaboratorních odchylek.

V neposlední řadě jsme se pokusili výsledky uspořádat tak, aby posloužily onkologům v naší nemocnici.

3. KARCINOM PRSU

Karcinomy prsu/mléčné žlázy jsou nejčastější malignitou ženské populace a podílí se přibližně na 20% úmrtí žen způsobených zhoubnými nádory. Předpokládá se, že 90% karcinomů mléčné žlázy vzniká z buněk lokalizovaných v tzv. terminální duktulo-lobulární oblasti (TDLU-terminal ductulo-lobular unit), na podkladě existující premaligní léze. Byla popsána kaskáda morfologických změn vedoucí k malignímu nádoru, zahrnující:

Běžnou duktální a lobulární hyperplasii (UDH, UDL)

Atypickou duktální a lobulární hyperplasii (ADH, ALH)

Duktální a lobulární karcinom in situ (DCIS, LCIS)

Duktální a lobulární karcinom in situ je bezprostředním prekurzorem invazivního karcinomu.

Pravděpodobnost, že se z léze vyvine karcinom, je odstupňována. Pro běžnou duktální a lobulární hyperplasii se odhaduje zvýšení pravděpodobnosti oproti případům s normálním morfologickým obrazem až dvojnásobně.

Pro atypickou duktální a lobulární hyperplasii čtyřnásobně až šestnásobně.

Pro duktální a lobulární karcinom in situ až desetinásobně.

Byly definovány 3 typy DCIS, které se liší diferenciací, označují se jako dobře, středně a málo diferencovaný DCIS.

Nejnovější práce ukazují, že každý z těchto DCIS je předstupněm jiného typu invazivního karcinomu, který si podržuje diferenciační stupeň DCIS a který se pravděpodobně vyvíjí separátní patogenetickou dráhou jiným sledem genetických alterací.

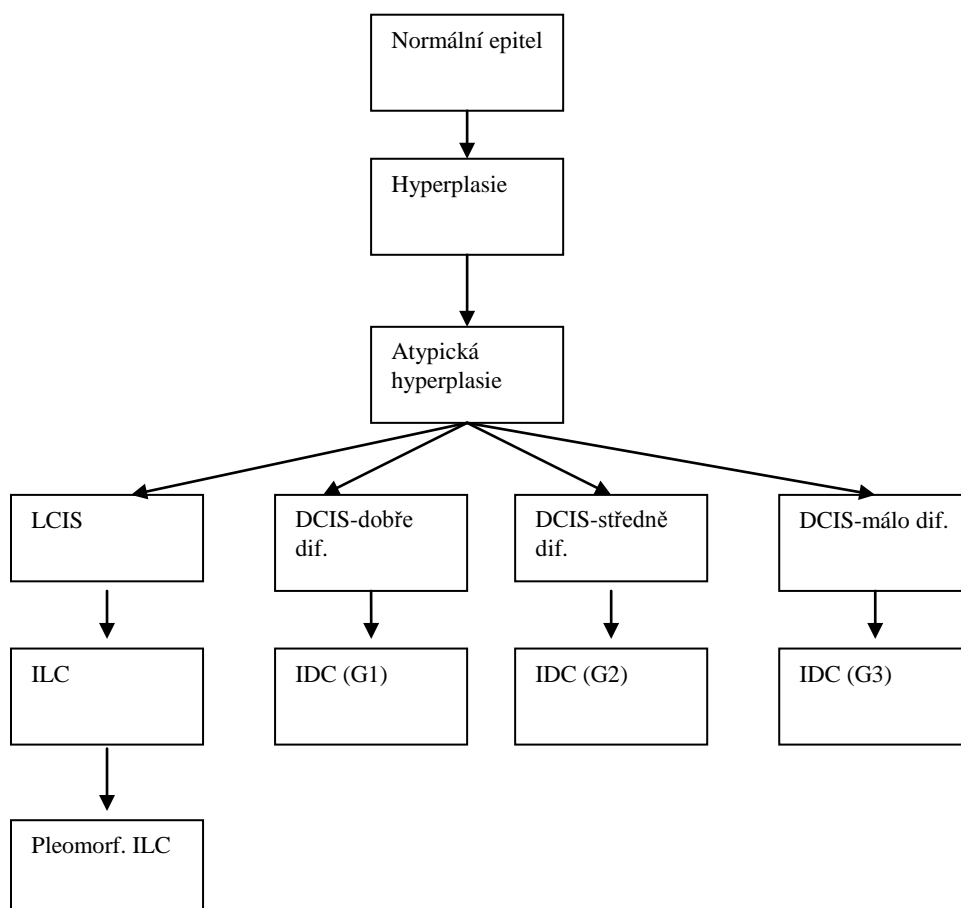
Patogenetické dráhy vedoucí k různým typům karcinomu mléčné žlázy nejsou dosud dokonale poznány, avšak je jasné, že zahrnují defekty různých onkogenů a nádorových supresorů. Pokud jsou recesivní, bývají nejprve ve formě heterozygotické – což ještě nedává vznik nádoru. Teprve vznik homozygotické formy má za následek maligní zvrát.

Většina studií, které se zabývají genetickou stránkou karcinogeneze analyzovala ztrátu heterozygosity pomocí metody RFLP (restriction fragment length polymorphism analysis). Studie odhalily, že genetické defekty se vyskytují již ve stadiu běžné duktální a lobulární hyperplasie a postihují více než 10 různých chromozomů.

Postupem času se vyselektovaly oblasti genomu, jejichž poškození se v karcinomech mléčné žlázy vyskytuje nejčastěji a zjistilo se, že zahrnují některé známé geny, jejichž

produkty fungují jako regulátory buněčného cyklu (cykliny, cyklin-dependentní kinázy, endogenní inhibitory Cdk) nebo jako regulátory proliferace a diferenciaci (myc, ras, jaderné estrogení receptory, c-erbB-2) i jako nádorové supresory (p53, Rb, PTEN, BRCA1/2). Předpokládá se, že pro nádory se známkami dobré diferenciaci je charakteristické zachování odpovědnosti na hormonální podněty, zprostředkované receptory pro estrogeny, a pro nádory špatně diferencované je charakteristická aktivace aberantní regulační dráhy, zprostředkované c-erbB-2, řídící proliferaci bez ohledu na stav hormonální regulační kaskády. (Zdeněk Kolář a kolektiv, 2003)

Model vývoje karcinomů mléčné žlázy z premaligních lézí:



4. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU KARCINOMU PRSU

4.1. Rizikové faktory prokázané

Věk - riziko karcinomu strmě narůstá během menoaktivního období, po menopauze se dále zvyšuje. Výjimečně se můžeme setkat s karcinomem před 20. rokem věku, nejvyšší riziko nemocnosti je patrné kolem 65. roku věku.

Karcinom prsu v rodinné anamnéze - karcinom prsu u pokrevních příbuzných výrazně zvyšuje pravděpodobnost vývoje této choroby. Měl by být registrován výskyt nejen u nejbližších pokrevních příbuzných (matka, sestra, dcera), ale i vzdálenějších (babička, sestřenice). Roli hraje i rozsah nemoci – unilateralita, bilateralita a hormonální stav – premenopauzální nebo postmenopauzální období. Riziko se zvyšuje, je-li postiženo více pokrevních příbuzných. V tomto případě je nutno pomyslet na geneticky podmíněný výskyt nádorů.

Karcinom prsu v osobní anamnéze - karcinom prsu je jednoznačným rizikem pro vývoj nádoru v druhostranném prsu.

Celková doba menstruační aktivity - časný věk menarche a pozdní věk menopauzy. Vyšší počet menstruačních cyklů (delší doba estrogenní stimulace) je příznivou okolností pro kancerogenezi. Bylo prokázáno, že ženy s přirozeným nástupem menopauzy před 45. rokem mají poloviční riziko oproti ženám s menopauzou po 55. roce věku. Také u žen, které se podrobily oboustranné ovariectomii před 45. rokem věku je pravděpodobnost vzniku karcinomu prsu významně nižší .

Nuliparita - ženy, které nerodily, mají obecně vyšší riziko vzniku karcinomu mléčné žlázy.

Pozdní věk prvního těhotenství - žena, jejíž první těhotenství ukončené porodem proběhlo po 35. roce věku, má riziko vzniku karcinomu prsu až třikrát vyšší než u žen, které poprvé rodily před 20. rokem. Vztah k potratům není dosud jednoznačně objasněn.

Fibrocystická nemoc prsu- atypická hyperplasie se udává jako nejčastější rizikový faktor. Histologická diagnóza je základní podmínkou posouzení rizika.

Užívání estrogenů- vztah mezi dlouhodobým užíváním estrogenů a zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu není dosud jednoznačně vyřešen. Existují studie potvrzující zvýšené riziko, ale i jiné, které nebezpečí vylučují. Postupně se však definují skupiny žen, kde je s největší pravděpodobností při dlouhodobém užívání estrogenů riziko vzniku karcinomu vyšší. Jsou to ženy s rodinným výskytem karcinomu prsu a ženy s histologicky ověřenou atypickou hyperplasií.

Jiná zhoubná onemocnění- výskyt jakékoliv malignity zvyšuje riziko karcinomu prsu. Pevnější vazba byla nalezena především pro karcinom ovaria a endometria, vzácněji pro zhoubné nádory tlustého střeva.

Radiace prsu- zejména v dřívějších dobách bylo ozařování ordinováno při léčbě poporodní mastitidy a akné. Radiace spočívá v aplikaci malých radiačních dávek, které mají jistý kancerogenní efekt. Zvýšení kancerogenního rizika se dává často do souvislosti s frekvencí provádění mammografie. Jednoznačný přínos vyšetření však převyší malé zvýšení rizika. Je nezbytné indikovat mammografii racionálně, ne zbytečně častěji než doporučuje mamografický screening.

Obezita- výrazně obézní postmenopauzální ženy mají zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu. Na kancerogenezi se podílí přeměna androstendionu v estron v tukové tkáni.

4.2. Rizikové faktory pravděpodobné-diskutované

Dieta bohatá na tuky- pro domněnku, že dieta s větším obsahem tuku může zvyšovat pravděpodobnost vzniku karcinomu prsu svědčí některé pokusy na zvířatech.

Alkohol- přibližně 14 ze 17 epidemiologických studií hovoří o mírném zvýšení rizika kancerogeneze při abúzu alkoholu. Nutno zvážit četné práce vypovídající o ochranném efektu malé konzumace alkoholu před kardiovaskulárními příhodami.

Perorální kontraceptiva- současně distribuovaná hormonální kontraceptiva jsou prosta časného kancerogenního efektu. Dosud nezhodnocenou otázkou jsou však dlouhodobé efekty této léčby.

Kouření- kouření u mladých žen považují někteří autoři rovněž za možný etiologický faktor. Jiní souvislosti popírají.

4.3. Protektivní faktory

Těhotenství před 20. rokem věku – musí se jednat o první těhotenství končící porodem, nikoliv graviditu zakončenou potratem. Žena, která porodí poprvé před 20. rokem má riziko snížené o 2/3 oproti ženě, která poprvé rodí po 35. roce věku.

Fyzická aktivita- u žen, které se v dětství podrobovaly fyzické námaze je riziko zmenšeno. Jde patrně o vliv fyzické námahy na počátek ovulační aktivity, a tedy na věk menarche.

Laktace- jde o nepotvrzený ochranný faktor (Konopásek, Petruželka 1997)

5. ANATOMIE MLÉČNÉ ŽLÁZY

Báze prsu je zhruba kruhovitá a leží v úrovni druhého až šestého žebra. Navíc může být vytvořen směrem do axilly (podpažní jamky) výběžek mléčné žlázy, známý jako „cauda axillaris“ nebo „processus axillaris“. Velikost prsu je u žen různá. Je to hlavně pro obsah tukového vaziva, neboť velikost mléčné žlázy je prakticky v každém prsu stejná.

Mléčná žláza (glandula mamme) se skládá z 15 – 20 laloků (lobi mamme) – žlázové tkáně, kde se tvoří mléko. Z každého laloku je mléko odváděno kanálkem zvaným „duktus lactifer“, který ústí na prsní bradavce (papilla mamme).

Prsní bradavka je vyčnívající útvar obklopený kruhovitou, pigmentovanou oblastí, zvanou areola mamme. Kůže bradavky je velmi tenká a jemná, neobsahuje vlasové folikuly ani potní žlásky.

Mamma během života ženy mění svou strukturu. Největší změny se objevují v těhotenství, kdy se prs připravuje nato, aby byl zdrojem mléka pro dítě. (Abrahams, Druga 2001)

6. IMUNOCHEMICKÉ REAKCE

Imunohistochemii (imunocytochemii) můžeme chápat jako aplikaci imunologických principů a metod při studiu tkání nebo buněk, používá k detekci afinitu antigenu a specifické protilátky a jejich vzájemnou vazbu.

Antigen resp. jeho antigenní determinanty, hledáme či prokazujeme v buňkách a ve tkáních protilátkami, které se na buňky, tkáňové řezy nebo kultury nanášejí.

Antigeny jsou ve tkáních přítomny jako endogenní (cytoskeletární antigeny, membránové antigeny, produkty onkogenů) nebo exogenní (nejčastěji bakteriální a virové antigeny). Pokud je antigenní determinanta, proti níž je specifická protilátka namířena, ve tkáni přítomna, protilátka se na ni naváže svou vazebnou částí.

Imunohistochemické metody jsou pro rutinní diagnostiku doplňkem přehledně nebo speciálně barvených preparátů, avšak tam, kde se jedná o vzácné raritní výsledky bioptické diagnostiky, nebo výzkumné práce porovnávající dané parametry ve větších souborech, bývají doplňovány dalšími imunochemickými metodami (Western blotting, ELISA apod.).

Těmito metodami se dále charakterizují bílkovinné či enzymatické produkty genomu, které bývají patologicky změněné. Přítomnost těchto produktů bývá pak dále srovnávána s nálezy genetických poruch, mutací na chromosomech, na úrovni DNA nebo RNA s použitím metod jako Southern blotting, Northern blotting, PCR, hybridizace in situ a dalších (Alberts et al., 1994, Vonka et al., 1992)

6.1. Antigen

Antigeny jsou definovány jako objekty, proti kterým vzniká v těle imunitní reakce, tvorba protilátek. Hlavním rysem antigenu je cizorodost. Ale řada cizorodých látek není imunogenní (např. etanol, nikotin, sacharin), protože jde o nízkomolekulární látky.

Protilátky, které proti danému antigenu vzniknou nereagují s celou molekulou, ale pouze s jejími malými úseky které se nazývají epitopy nebo antigenní determinanty. Antigenní determinantu představuje 5-8 aminokyselin nebo monosacharidových jednotek. Protilátky mají schopnost rozlišovat rozdíly antigenních determinant a tím celých antigenů. Tato mimořádná schopnost protilátek je základem specifických imunitních reakcí.

Někdy může vzniknout specifická imunitní odpověď i proti látce s malou molekulou. Cizorodá nízkomolekulární látka se naváže pevnou chemickou vazbou na tělu vlastní

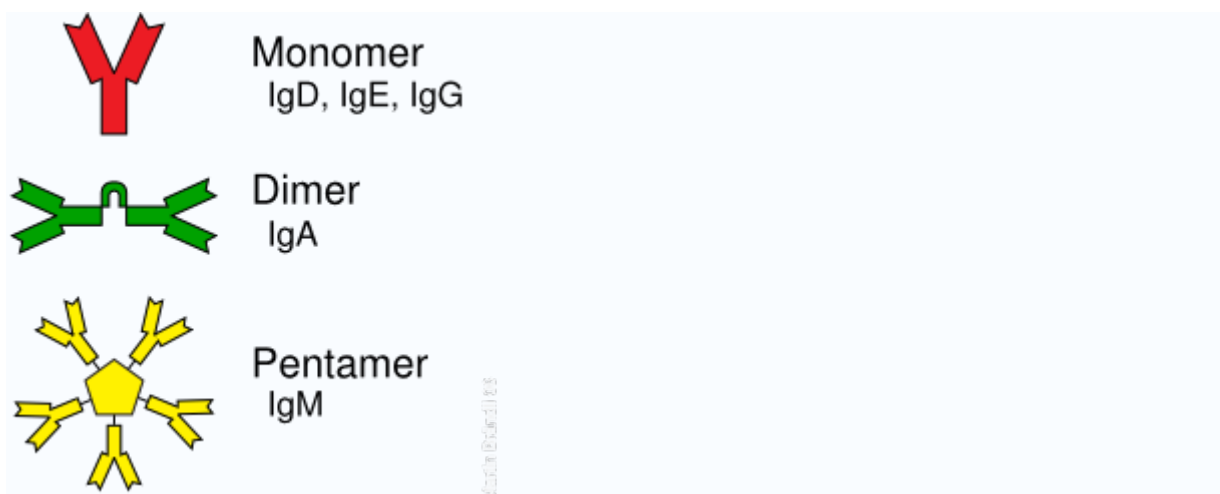
makromolekulu např. na albumin. Vzniklý komplex může fungovat jako antigen. Navázaná cizí molekula funguje jako antigenní determinanta, které říkáme haptenu.

6.2. Protilátky

Molekuly protilátek mají strukturu imunoglobulinů, tj. bílkoviny, která se stáčí do klubíčkových útvarů. Nestočená má symetrický tvar podobný Y. Tvoří ji 4 řetězce, 2 stejné delší označují se těžké (H), 2 shodné kratší se nazývají lehké (L). Řetězce jsou mezi sebou spojeny disulfidovými vazbami mezi dvěma aminokyselinami (cystein).

Imunoglobuliny (Ig) se dělí podle struktury do 5 tříd: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Pro označení těžkých imunoglobulinových řetězců se používá řecká abeceda, označení koresponduje s třídou např.: IgA má těžký řetězec α (alfa), IgG γ (gama). Lehké imunoglobulinové řetězce mají dvě strukturní varianty, vyskytují se ve všech třídách. Jednotlivá molekula má vždy buď lehké řetězce κ (kapa), nebo λ (lambda). Jednotlivé třídy imunoglobulinů se liší uspořádáním molekuly. Základem všech je čtyřřetězcová struktura (2L + 2H), která se vyskytuje u IgG, IgD, IgE. IgA má čtyřřetězcovou jednotku zdvojenou do dimeru, který je spojen řetězcem J. IgM má největší molekulu jde o pentamer spojený J řetězcem. Jedna molekula IgM má tedy 10 lehkých a 10 těžkých řetězců.

FORMY IMUNOGLOBULINU



7. PRAKTICKÁ ČÁST

Tato část práce je zaměřena na zpracování výsledků vyšetření estrogenových receptorů (ER) a progesteronových receptorů (PR) v karcinomu mléčné žlázy na Patologicko-anatomickém oddělení v Nemocnici Jihlava v letech 2000-2007.

Imunohistochemické vyšetření se provádí od roku 2000. Zpočátku jsme používali protilátky od firmy Biogenex. Protilátky byly koncentráty, musely se naředit podle doporučení výrobce.

Nyní používáme protilátky od firmy DakoCytomation, které jsou již předředené , připraveny k použití (Ready - to Use)

Monoklonal Mouse Anti – Human Estrogen receptor : clone 1D5

Monoklonal Mouse Anti – Human Progesteron receptor: clone PgR 636

EnVision+ Systém – HRP Labelled Polymer

Liquid DAB+ substrate-chromogen solution.

7.1. Monoklonal Mouse Anti – Human Estrogen receptor
(Následující text přeložen z anglického návodu od výrobce)

Účel použití

Monoklonální myší protilátka proti lidskému ER, klon 1D5 je určena pro laboratorní použití pro semi- kvantitativní detekci ER při světelné mikroskopii v normální a patologické lidské tkáni fixované v neutrálním formolu a zalité do parafínu.

Pozitivní výsledky pomáhají v hodnocení normálních a abnormálních buněk v tkáních a slouží jako doplněk v klasické histopatologii. Klinická interpretace jakýchkoliv pozitivních výsledků nebo jejich absence může být doplněk pro morfologické a histologické studie s vhodnými kontrolami.. Vyhodnocení může být provedeno spolu s pacientovou anamnézou a dalšími diagnostickými testy.

Souhrn

Steroidní receptory vykazují vysokou afinitu a specifitu pro jejich ligandy. Lidský ER je bílkovina (dimer) lokalizovaný především v membráně buněčných jader a patří do třídy transportních bílkovin, které stimulují transkripci vazbou na specifické úseky DNA. Pomocí těchto vazeb ER navozuje stimulaci genové transkripce, proto je také znám jako indukovatelný rozšiřující faktor.

7.2. *Monoklonal Mouse Anti – Human Progesterone receptor*

(Následující text přeložen z anglického návodu od výrobce)

Účel použití

Monoklonální myší protilátka proti lidskému PR, klon PgR 636 je určena pro laboratorní použití pro kvalitativní detekci PR při světelné mikroskopii v normální a patologické lidské tkáni fixované v neutrálním formolu a zalité do parafínu. Tato protilátka je určena jako pomůcka pro výběr pacientek nejvhodnějších k hormonální terapii. Stejně jako pomůcka v prognóze a léčbě karcinomu prsu.

Pozitivní výsledky pomáhají v hodnocení normálních a abnormálních buněk v tkáních a slouží jako doplněk v klasické histopatologii. Klinická interpretace jakýchkoliv pozitivních výsledků nebo jejich absence může být doplněk pro morfologické a histologické studie s vhodnými kontrolami.. Vyhodnocení může být provedeno spolu s pacientovou anamnézou a dalšími diagnostickými testy.

Souhrn

Úloha steroidních hormonálních receptorů karcinomu prsu je dobře známá. Absence ER a PR ukazuje na brzký opětovný výskyt a vysokou úmrtnost pacientek s karcinomem prsu. Přítomnost ER a PR v nádorech předpovídá možný úspěch endokrinní terapie. Množství ER a PR může být stanoveno kvalitativně použitím IHC nebo kvantitativně pomocí DCC, EIA. Spojitost mezi kvalitativním a kvantitativním hodnocením PR je v rozsahu 73% – 91% závisí na laboratoři a použité protilátce.

7.3. *En Vision+ System – HRP Labelled Polymer*

(Následující text přeložen z anglického návodu od výrobce)

Tento výrobek je určen pro použití s primárními myšími protilátkami, pro kvalitativní identifikaci antigenu ve světelné mikroskopii v normální a patologické tkáni fixované neutrálním formolem a zalité do parafínu, v zmrazených řezech.

Souhrn

En Vision je dvoukroková IHC barvicí metoda. Systém je založen na polymeru značeném HRP (křenová peroxidáza) a vázaném se sekundární protilátkou (koží anti myší Ig). Polymery neobsahují avitin, biotin.

System je extrémně citlivá metoda a výsledky jsou až 20x vyšší než při použití PAP techniky několikrát vyšší než při použití ABC nebo LSAB metody.

7.4. HER2/neu

V roce 2001 se začal vyšetřovat HER2/neu HercepTestem od firmy DAKO. Tímto testem byly vyšetřeny pacientky č. 1- 32. Od srpna 2001 jsme vyšetření HER2/neu posílali do FN Brno , jednalo se o pacientky č. 33 – 44.

Od března 2002, počínaje pacientkou č. 8 je HER2/neu vyšetřován protilátkami od firmy Novocastra .

Humén c-erbB-2 oncoprotein clone 5A2
clone10A7

7.5. Hybridizace in situ (ISH)

HER2/neu lze ve tkáňovém řezu vyšetřovat nejen imunohistochemicky, ale i hybridizací in situ pomocí enzymaticky značených DNA sond.

ISH se zakládá na vzájemné afinitě komplementárních sekvencí nukleových kyselin. Jedna z nich, po které se touto metodou pátrá (terčová sekvence), je nebo není přítomna ve zkoumaných chromosomech, buňkách či tkáňových řezech. Druhá (sonda) je hlavní složkou reakční či hybridizační směsi, která se na tento materiál nanáší. Jejich vzájemná vazba dovoluje zjišťovat hledané sekvence s vysokou specifitou.

Detekční metody jsou přímé nebo nepřímé. V přímé metodě je molekula též označována jako reportér, většinou je to fluorofor nebo enzym přímo navázaná na sondu. V případě, že dojde k hybridizaci, je vzniklý hybrid detekován vlastní fluorescencí nebo histochemickým průkazem navázaného enzymu in situ.

Nepřímá metoda vyžaduje, aby sonda obsahovala molekulu, skupinu nebo haptén navázané na sondu chemicky nebo enzymaticky. Ten se v dalších krocích přivede k vizualizaci afinitní cytochemií. (Lukáš, Dráberová, Feit, Vojtěšek 1997)

Na našem pracovišti vyšetřujeme HER2/neu pouze imunohistochemicky. Na žádost lékařů onkologického oddělení, se vzorky od některých pacientek po zhodnocení klinického a patologického staigingu posílají na vyšetření FISH do referenční laboratoře pro vyšetření HER2/neu do FN Olomouc.

8. MATERIÁL A METODY

Imunochemické vyšetření steroidních receptorů má být prováděno ve formalínem fixovaných a do parafínu zalitých tkáňových vzorků karcinomu mléčné žlázy a jejich recidiv. Používáme 10% neutrální formalín.

Fixace neutrálním formalinem je ve světě běžně používaná standardní metoda, roztok vydrží při pokojové teplotě několik měsíců. Slouží k fixaci tkáňových bločků maximálně 24 hodin. (Lukáš, Dráberová, Feit, Vojtěšek 1997)

Nesprávnou fixací může být možnost detekce ER a PR receptorů negativně ovlivněna. Stanovení exprese ve vzorku fixovaném např. pomocí Bouinova, Carnyova fixativa se nedoporučuje. Také u materiálu, který byl podroben dekalciфикаční proceduře, se vyšetření nedoporučuje.

Při stanovení negativního výsledku vyšetření receptorů je nutné vždy přihlédnout k vnitřní pozitivní kontrole (vývodové epitele). Jestliže je vnitřní kontrola rovněž negativní, mělo by být vyšetření opakováno s agresivnějším demaskováním antigenu.

Pokud je ve vyšetřovaném vzorku pouze nádorová tkáň, tak při barvení jako pozitivní kontrolu použijeme vzorek ze zdravé prsní tkáně, nebo současné vyšetření několika vzorků. Při přikrajování materiálu má patolog snahu odebrat vzorek tak, aby byla zachycena i nenádorová tkáň. Je to vzhledem k tomu, že se hodnotí i zdravé tkáně v okolí nádoru.

POSTUP IMUNOHISTOCHEMICKÉHO VYŠETŘENÍ

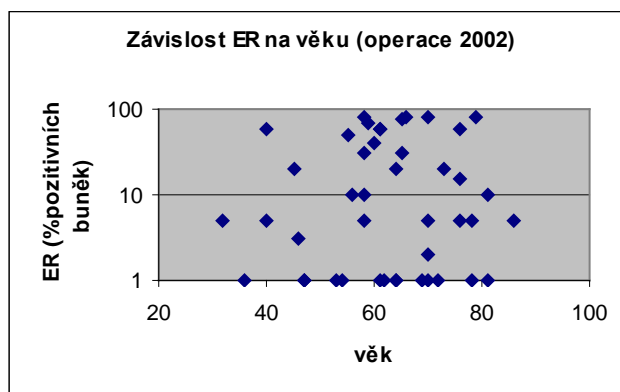
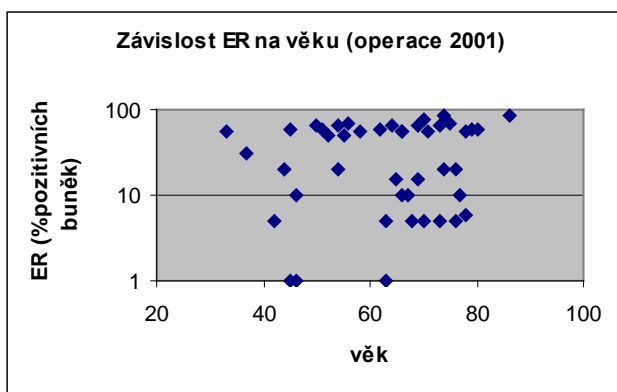
1. Odparafínovat
2. Oplach v destilované vodě
3. Mikrovlnná trouba – vařit v citrátovém pufru pH 9 20 minut
4. Oplach v destilované vodě
5. Blokování endogenní peroxidázy, 3% peroxid vodíku 30 minut
6. Oplach destilovanou vodou
7. Oplach puftrem TRIS 10 minut
8. Primární protilátka (přes noc v lednici)
9. Oplach puftrem TRIS
10. En Vision 30 minut
11. Oplach puftrem TRIS
12. Vyvolat barevnou reakci DAB+ 5 minut

13. Oplach destilovanou vodou
14. Gillův hematoxylin, dobarvení jader 0,5-1 minuta
15. Oplach vodou (modráání jader)
16. Odvodnit, projasnit, zamontovat

9. VÝSLEDKY

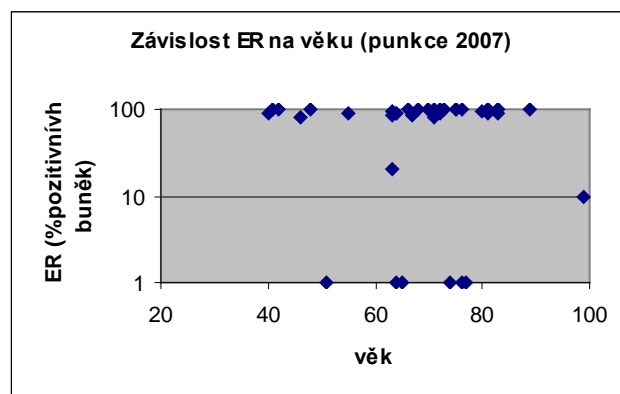
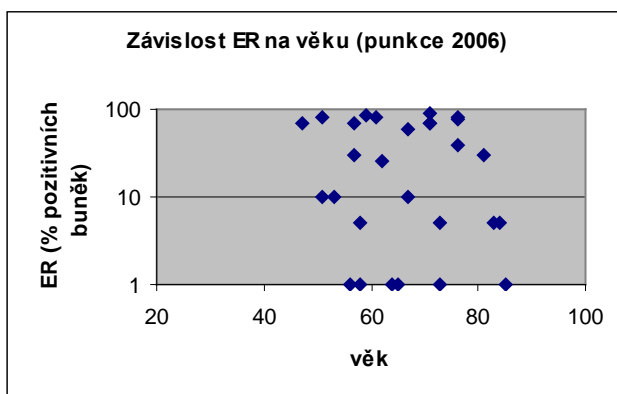
Příklady porovnání grafických zpracování výsledků steroidních receptorů jsou popsány a rozvedeny pro každý druh vyšetření zvlášť – v následujících jednotlivých podkapitolách.

9.1. Porovnání výsledků estrogenových receptorů u operací



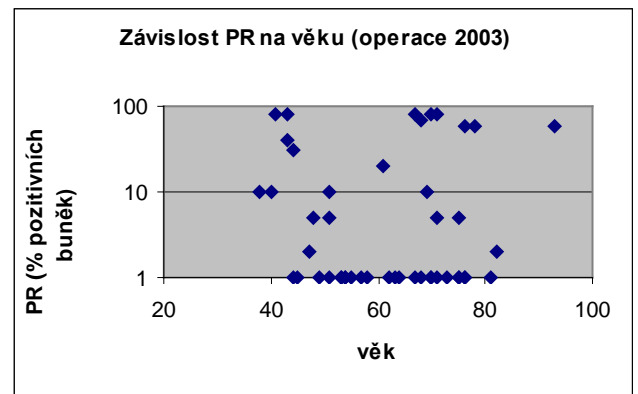
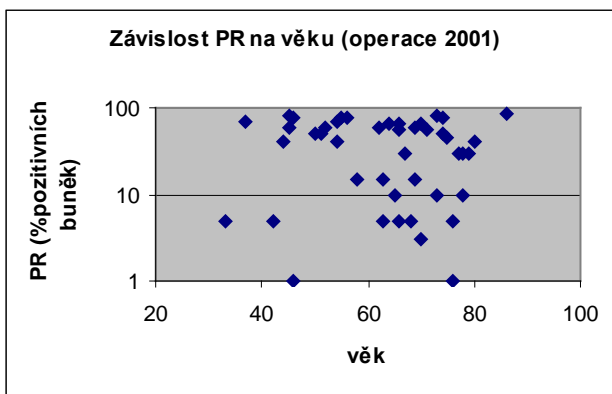
Porovnáním grafů v příloze lze zjistit, že po všechny roky se dařilo rozdělit pacientky na podobně velké skupiny negativních nebo slabě pozitivních pacientek a na skupiny (naopak) silně pozitivních pacientek. Neshody mezi roky tedy příliš markantní nebyly – a ty nejmarkantnější jsou znovu uvedeny zde – v textu této podkapitoly. Jde o roky 2001 a 2002. V r. 2001 bylo podezřele málo ER negativních a podezřele mnoho ER silně pozitivních.

9.2. Porovnání výsledků estrogenových receptorů u punkcí prsu



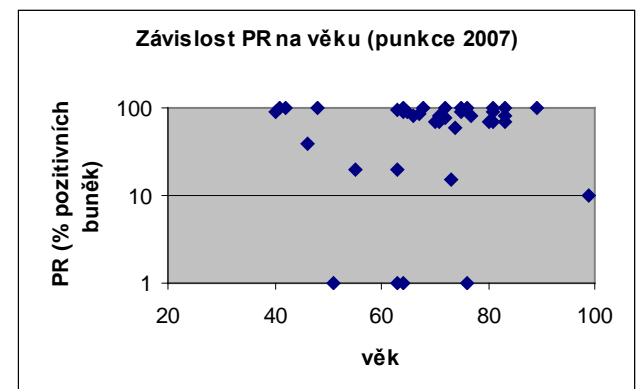
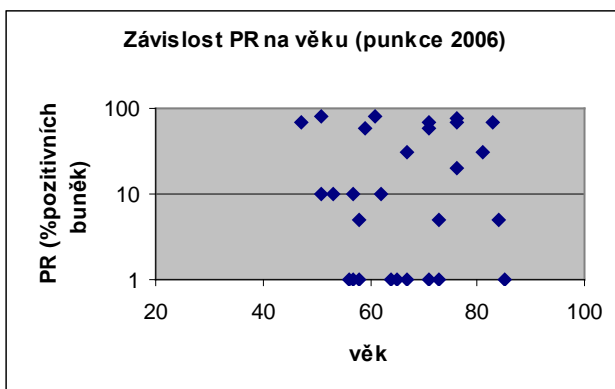
Když jsme začali vyšetřovat jehlové biopsie, dostávali jsme nejprve většinou jen velmi nízkou pozitivitu. Později se nám podařilo vyladit reakce tak, že v roce 2006 vycházely výsledky rovnoměrně rozptýleny v celé škále možností. V roce 2007 vychází dokonce ve většině punkcí 100 %ní pozitivita. V některých případech to již nelze eliminovat změnou rozhraní mezi pozitivitou a negativitou, takže lze mluvit o falešné pozitivitě.

9.3. Porovnání výsledků progesteronových receptorů u operací



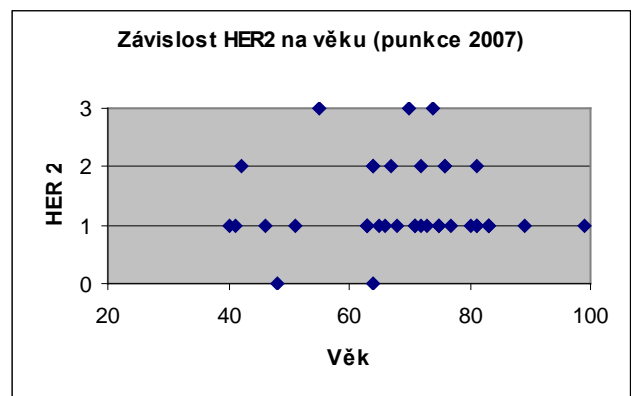
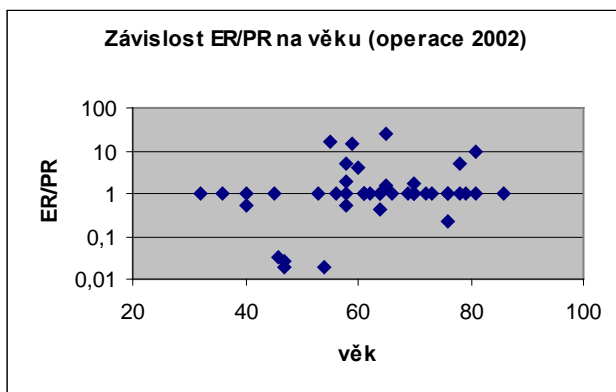
Stejně jako v případě ER u operačních excizí lze porovnáním grafů s PR u excizí v příloze zjistit, že po všechny roky se dařilo rozdělit pacientky na podobně velké skupiny negativních nebo slabě pozitivních pacientek a na skupiny (naopak) silně pozitivních pacientek. Neshody mezi roky tedy opět nebyly příliš markantní – a ty nejmarkantnější jsou znovu uvedeny v této podkapitole. Jde o roky 2001 a 2003. V roce 2003 je podezřele hodně pacientek s negativním výsledkem oproti roku 2001 kdy je mnoho pacientek s vysokým procentem pozitivních buněk.

9.4. Porovnání výsledků progesteronových receptorů u punkcí prsu



Když jsme začali vyšetřovat jehlové biopsie, dostávali jsme u PR nejprve většinou jen poměrně nízkou pozitivitu – podobně jako u ER. Později se nám podařilo vyladit reakce tak, že v roce 2006 vycházely výsledky rovnoměrně rozptýleny v celé škále možností. V roce 2007 je častá pozitivita PR oproti roku 2006, může se jednat o falešnou pozitivitu – viz výše uvedené grafy.

9.5. Příklady grafů závislost ER/PR na věku u operací a HER2/neu na věku



V případě jak poměru ER/PR tak výsledků HER2/neu je jejich rozložení v grafech navzájem podobné v různých letech. Tyto výsledky vychází tedy dobře. Jako příklady jsou výše uvedeny grafy ER/PR z operací v roce 2002 a výsledky HER/2neu u punkcí z r. 2007.

9.6. Porovnání výsledků HER2/neu

V letech 2001-2007 byl vyšetřen celkem 342 pacientkám faktor HER2/neu. Z toho 83 případů byla punkce z prsu.

Pozitivní HER2/neu tedy 3+ byl u 29 případů z operačního materiálu, pozitivní výsledek 3+ u punkcí prsu byl pouze ve třech případech.

Pozitivní faktor HER2/neu 3+ je u 3,6% pacientek v případě punkcí prsu a u 11% pacientek, vyšetřených z operačního materiálu.

10. DISKUZE

Metodika imunohistochemického vyšetření, kterou používáme je stále stejná. K demaskování antigenu používáme citrátový pufr a preparáty vaříme v mikrovlnné troubě. Protilátky proti ER a PR jsme v roce 2000 používali od firmy Biogenex, pak jsme začali používat produkty od firmy DAKO. Bohužel nelze přesně zjistit od kdy jsme jimi začali vyšetřovat.

U HER2/neu se nám tyto informace podařilo dohledat. V roce 2001 se začal vyšetřovat HER2/neu HercepTestem od firmy DAKO. Od srpna 2001 jsme vyšetření HER2/neu posílali do FN Brno. Od března 2002 HER2/neu vyšetřujeme protilátkami od firmy Novocastra .

Z tabulek a grafů vyplývá, že nejvíce pacientek s negativním – tedy nulovým výsledkem (v tabulkách – hodnota 1% pozitivních buněk, je to proto aby šly výsledky zpracovat do grafů s logaritmickým měřítkem na ose y) estrogenových i progesteronových receptorů je v roce 2003. Z 54 vyšetřených pacientek je to 23 pacientek, které mají negativní jak ER tak i PR. V různých laboratořích se počítá pozitivita od 15% pozitivních buněk, ale když je špatná protilátka, tak se pozitivita počítá třeba od 5% pozitivních buněk.

V roce 2007 je zase více pacientek kde se pozitivita ER a PR pohybuje mezi 80% - 100%.

Myslíme, že je to tím, že od roku 2007 používáme k demaskování antigenu citrátový pufr pH 9 , který je agresivnější . Doposud jsme používali citrátový pufr pH 6. Tuto metodiku jsme získali ve FN u Svaté Anny v Brně, kde mají s imunohistochemií bohaté zkušenosti.

Kvalita protilátek se liší nejen při vzájemném porovnání od různých firem, ale i různé šarže od stejné firmy mají rozdílnou kvalitu. Nejde jen o malé rozdíly, ale často se stane, že se musí některé šarže (i renomovaných firem) vracet a reklamovat. Tato informace pochází z letošního jednání mammologické sekce slovenské lékařské společnosti v Bratislavě (Dr. Hochmann – osobní sdělení).

V roce 2007 bylo prováděno vyšetření ER a PR hlavně z punkcí prsu, ale od letošního roku provádíme imunohistochemické vyšetření pouze z operačního materiálu. Tato změna nebyla zaviněna našimi (z počátku dlouhodobě) často negativními výsledky, neboť se nám podařilo později získávat výsledky (až vysoce) pozitivními. Je to po dohodě s lékaři onkologického oddělení, protože u punkcí je méně hodnotitelných buněk (chyba malých čísel).

11. ZÁVĚR

Výsledky vyšetření estrogeních a progesteronových receptorů, HER2/neu jsme zpracovali do tabulek a grafů. V každém roce jsme udělali zvlášť grafické zpracování výsledků a to závislost ER na věku, závislost PR na věku, závislost HER2/neu na věku a závislost ER/PR na věku. Většinou se nám podařilo rozdělit pacientky na negativní a na takové, které slaběji nebo silněji pozitivní. Pokud vycházely počty pozitivních buněk např. příliš nízké, byla hranice mezi pozitivitou a negativitou vyšetření snížena z 15 na 5 % pozitivních buněk. Po této korekci - pouze výsledky menšího počtu pacientek by mohly být označeny jako falešně pozitivní nebo falešně negativní.

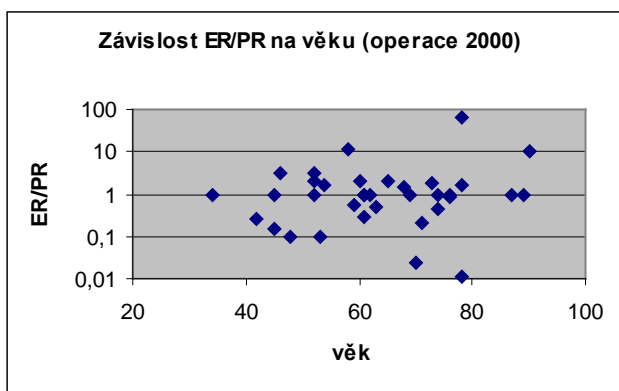
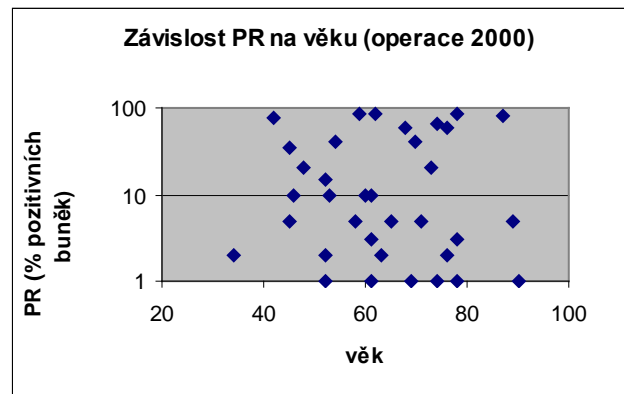
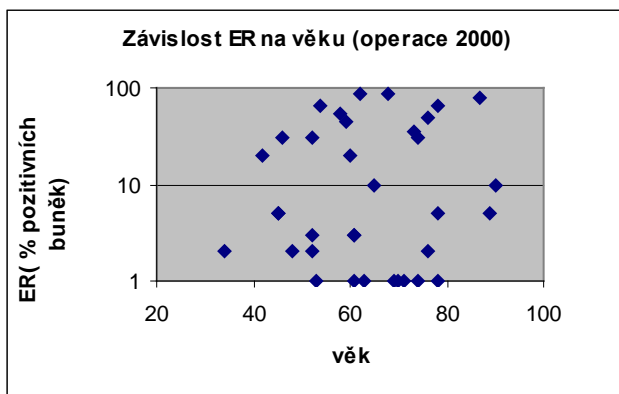
12. PŘÍLOHY

TABULKY A GRAFY

Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2000 – operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR
1	1930	18.1.	70	1	40	0,025
2	1938	19.1.	62	85	85	1
3	1938	20.1.	53	1	10	0,1
4	1911	3.2.	89	5	5	1
5	1927	17.2.	73	35	20	1,75
6	1939	29.2.	61	3	10	0,3
7	1922	29.3.	78	5	3	1,66666
8	1954	3.4.	46	30	10	3
9	1910	17.4.	90	10	1	10
10	1929	20.4.	71	1	5	0,2
11	1948	21.4.	52	2	2	1
12	1952	3.5.	48	2	20	0,1
13	1932	19.5.	68	85	60	1,416666
14	1924	1.6.	76	2	2	1
15	1939	28.6.	61	1	1	1
16	1942	28.6.	58	55	5	11
17	1922	11.7.	78	1	85	0,011765
18	1941	28.7.	59	45	85	0,529411
19	1937	16.8.	63	1	2	0,5
20	1958	18.8.	42	20	75	0,266666
21	1926	19.9.	74	1	1	1
22	1955	19.9.	45	5	35	0,142857
23	1940	19.9.	60	20	10	2
24	1939	11.10.	61	3	3	1
25	1926	19.10.	74	30	65	0,461538
26	1913	20.10.	87	80	80	1
27	1955	31.10.	45	5	5	1
28	1922	8.11.	78	65	1	65
29	1948	8.11.	52	3	1	3
30	1946	27.11.	54	65	40	1,625
31	1924	27.11.	76	50	60	0,833333
32	1935	7.12.	65	10	5	2
33	1966	7.12.	34	2	2	1
34	1931	13.12.	69	1	1	1
35	1948	15.12.	52	30	15	2
median			62	5	10	

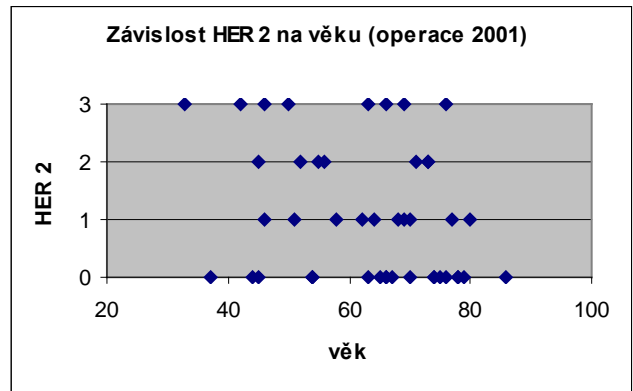
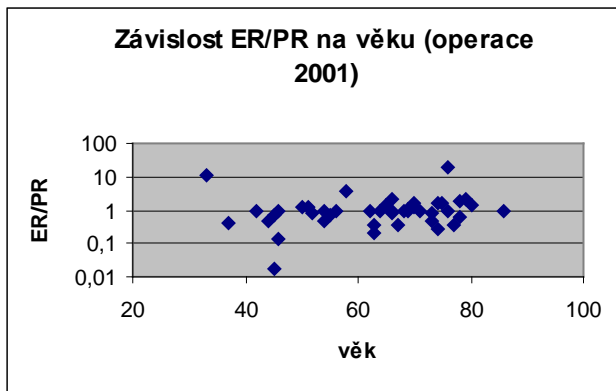
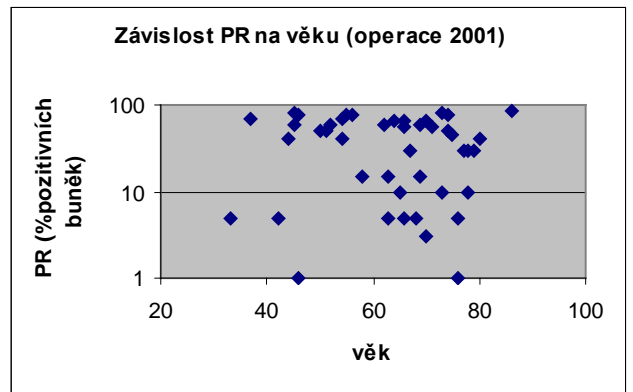
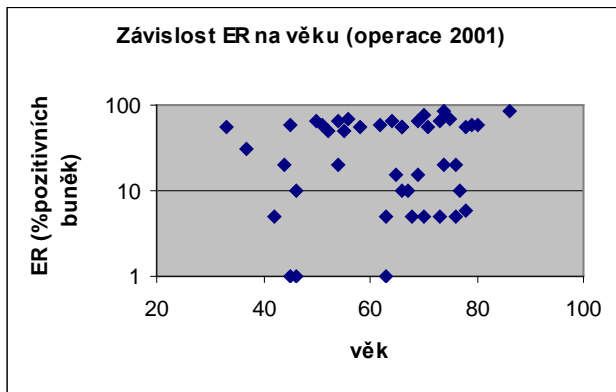
Grafické zpracování výsledků z roku 2000



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2001 - operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER2
1	1926	4.1.	75	70	45	1,555555	0
2	1930	18.1.	71	55	55	1	2
3	1925	5.2.	76	20	1	20	3
4	1950	26.1.	51	60	50	1,2	1
5	1936	7.2.	65	15	10	1,5	0
6	1928	8.2.	73	65	80	0,8125	2
7	1925	31.1.	76	5	5	1	0
8	1939	7.3.	62	60	60	1	1
9	1956	23.2.	45	1	60	0,016667	2
10	1945	23.2.	56	70	75	0,933333	2
11	1937	1.3.	64	65	65	1	1
12	1946	9.3.	55	50	75	0,666666	2
13	1928	8.3.	73	5	10	0,5	2
14	1932	10.4.	69	15	15	1	1
15	1933	11.4.	68	5	5	1	1
16	1938	11.4.	63	5	15	0,333333	3
17	1931	10.5.	70	75	65	1,153846	1
18	1949	27.4.	52	50	60	0,833333	2
19	1932	26.4.	69	65	60	1,083333	3
20	1951	27.4.	50	65	50	1,3	3
21	1927	15.5.	74	20	75	0,266666	0
22	1955	31.5.	46	10	75	0,133333	1
23	1934	22.5.	67	10	30	0,333333	0
24	1922	23.5.	79	60	30	2	0
25	1956	25.5.	45	60	80	0,75	0
26	1968	6.6.	33	55	5	11	3
27	1923	15.6.	78	6	10	0,6	0
28	1943	19.6.	58	55	15	3,666666	1
29	1924	22.6.	77	10	30	0,333333	1
30	1921	26.6.	80	60	40	1,5	1
31	1935	18.7.	66	55	65	0,846153	3
32	1947	1.8.	54	65	70	0,928571	0
33	1915	7.8.	86	85	85	1	0
34	1957	8.8.	44	20	40	0,5	0
35	1923	9.8.	78	55	30	1,833333	0
36	1959	14.9.	42	5	5	1	3
37	1927	24.9.	74	85	50	1,7	0
38	1964	1.10.	37	30	70	0,428571	0
39	1931	10.10.	70	5	3	1,666666	0
40	1935	20.11.	66	55	55	1	0
41	1935	20.11.	66	10	5	2	0
42	1955	23.11.	46	1	1	1	3
43	1947	27.11.	54	20	40	0,5	0
44	1938	30.11.	63	1	5	0,2	0
median			66	50	42,5		

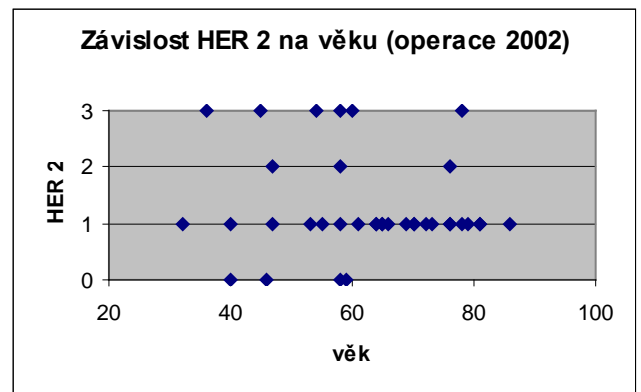
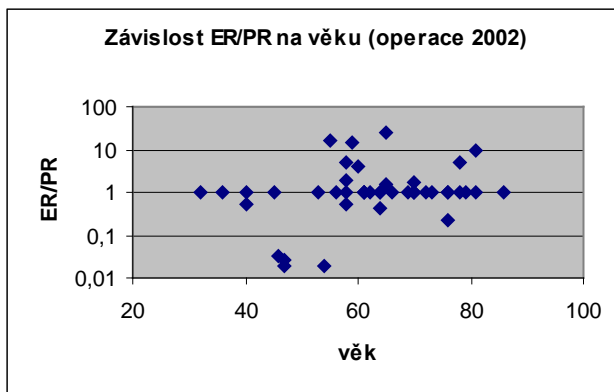
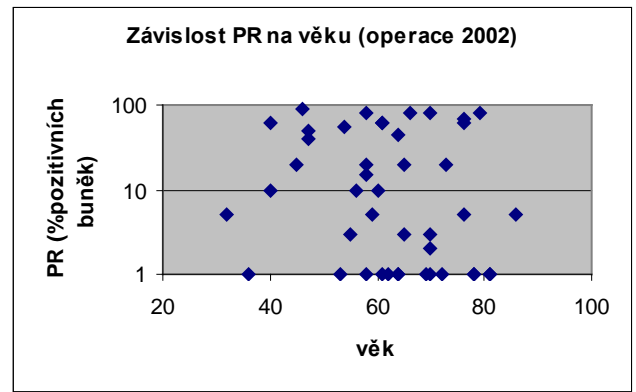
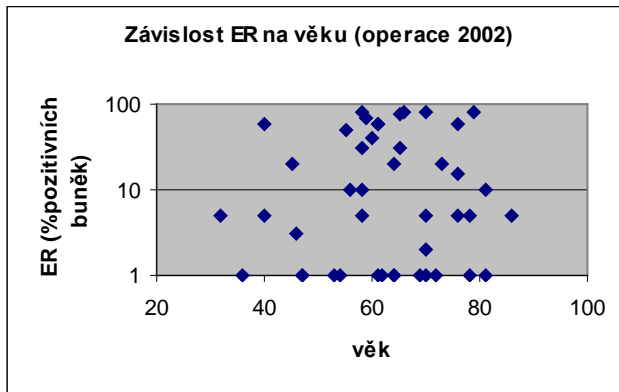
Grafické zpracování výsledků z roku 2001



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2002 – operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER2
1	1938	7.1.	64	20	45	0,444444	
2	1932	11.1.	70	1	1	1	
3	1941	11.1.	61	60	60	1	
4	1940	14.2.	62	1	1	1	
5	1946	19.2.	56	10	10	1	
6	1932	20.2.	70	2	2	1	
7	1941	25.2.	61	60	60	1	
8	1948	10.3.	54	1	55	0,018182	3
9	1936	29.3.	66	80	80	1	1
10	1956	17.5.	46	3	90	0,033333	0
11	1929	27.5.	73	20	20	1	1
12	1938	23.5.	64	1	1	1	1
13	1937	23.5.	65	75	3	25	1
14	1926	23.5.	76	15	70	0,214285	2
15	1944	28.5.	58	30	15	2	2
16	1949	25.6.	53	1	1	1	1
17	1955	25.6.	47	1	40	0,025	1
18	1955	25.6.	47	1	50	0,02	2
19	1933	27.6.	69	1	1	1	1
20	1942	27.6.	60	40	10	4	3
21	1926	2.7.	76	60	60	1	1
22	1944	8.7.	58	5	1	5	3
23	1938	4.7.	64	1	1	1	1
24	1932	16.7.	70	80	80	1	1
25	1947	22.8.	55	50	3	16,66666	1
26	1966	6.8.	36	1	1	1	3
27	1926	8.8.	76	5	5	1	1
28	1921	8.8.	81	10	1	10	1
29	1962	23.8.	40	5	10	0,5	1
30	1944	29.8.	58	80	80	1	0
31	1962	29.8.	40	60	60	1	0
32	1944	3.9.	58	10	20	0,5	1
33	1923	12.9.	79	80	80	1	1
34	1941	25.9.	61	1	1	1	1
35	1970	25.9.	32	5	5	1	1
36	1924	1.10.	78	5	1	5	3
37	1930	1.10.	72	1	1	1	1
38	1921	4.10.	81	1	1	1	1
39	1924	5.11.	78	1	1	1	1
40	1957	22.11.	45	20	20	1	3
41	1916	29.11.	86	5	5	1	1
42	1932	29.11.	70	5	3	1,666666	1
43	1937	17.12.	65	30	20	1,5	1
44	1943	20.12.	59	70	5	14	0
median			63	5	7,5		

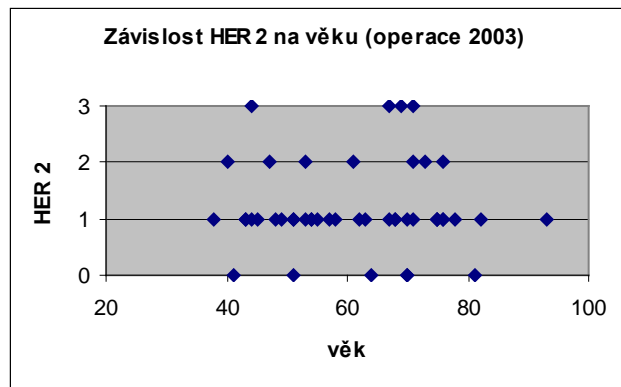
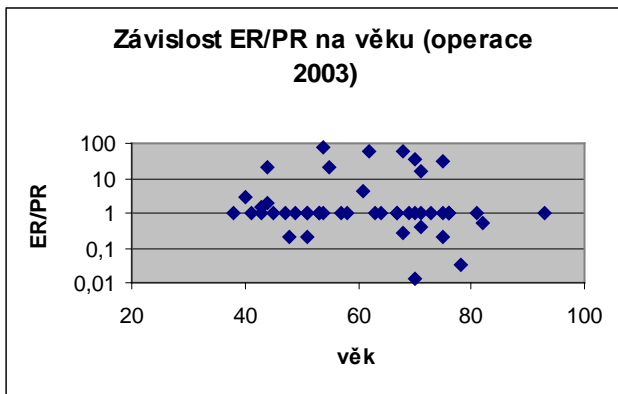
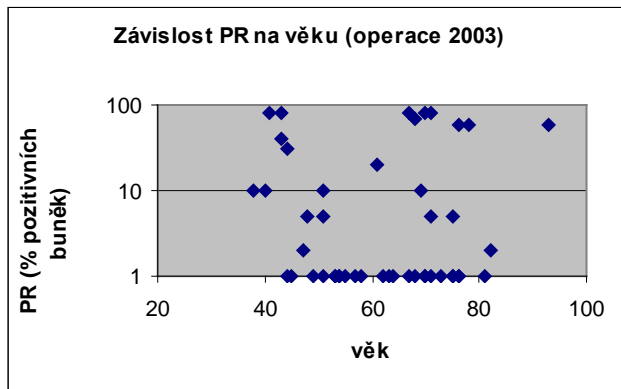
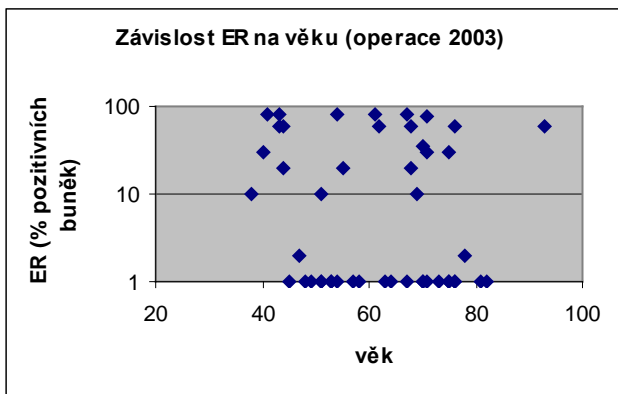
Grafické zpracování výsledků z roku 2002



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2003 – operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1927	9.1.	76	1	1	1	2
2	1948	23.1.	55	20	1	20	1
3	1960	17.1.	43	60	40	1.1	1
4	1949	4.2.	54	1	1	1	1
5	1956	4.2.	47	2	2	1	2
6	1958	6.2.	45	1	1	1	1
7	1952	7.2.	51	10	10	1	1
8	1954	11.2.	49	1	1	1	1
9	1955	28.2.	48	1	5	0,2	1
10	1927	28.2.	76	60	60	1	1
11	1921	5.3.	82	1	2	0,5	1
12	1928	6.3.	75	1	5	0,2	1
13	1922	12.3.	81	1	1	1	0
14	1952	13.3.	51	1	5	0,2	0
15	1950	27.3.	53	1	1	1	1
16	1932	7.4.	71	75	5	15	3
17	1910	8.4.	93	60	60	1	1
18	1942	24.4.	61	80	20	4	2
19	1927	16.5.	76	1	1	1	1
20	1928	22.5.	75	30	1	30	1
21	1928	27.5.	75	1	1	1	1
22	1930	3.6.	73	1	1	1	2
23	1949	3.6.	54	80	1	80	1
24	1963	4.6.	40	30	10	3	2
25	1945	5.6.	58	1	1	1	1
26	1941	11.6.	62	60	1	60	1
27	1940	4.7.	63	1	1	1	1
28	1959	10.6.	44	60	30	2	1
29	1935	18.6.	68	60	1	60	1
30	1925	25.6.	78	2	60	0,0333	1
31	1952	15.8.	51	1	1	1	1
32	1960	16.7.	43	80	80	1	1
33	1950	5.8.	53	1	1	1	2
34	1932	7.8.	71	30	80	0,375	1
35	1936	8.8.	67	80	80	1	1
36	1962	12.8.	41	80	80	1	0
37	1933	14.8.	70	1	1	1	0
38	1946	15.8.	57	1	1	1	1
39	1934	9.9.	69	10	10	1	3
40	1933	10.9.	70	35	1	35	1
41	1933	10.9.	70	1	80	0,0125	0
42	1939	17.10.	64	1	1	1	0
43	1935	17.10.	68	20	70	0,285714	1
44	1959	30.10.	44	20	1	20	3
45	1965	6.11.	38	10	10	1	1
46	1932	5.12.	71	1	1	1	2
47	1936	5.12.	67	1	1	1	3
median			63	2	1		

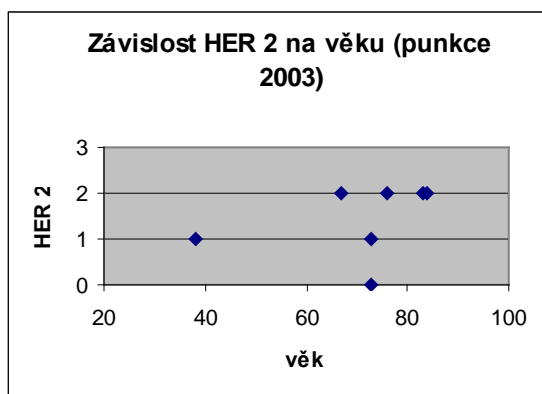
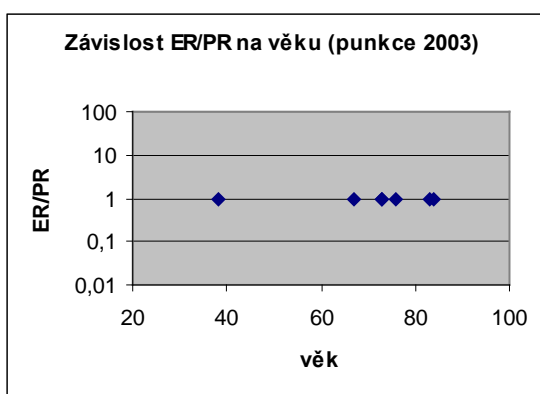
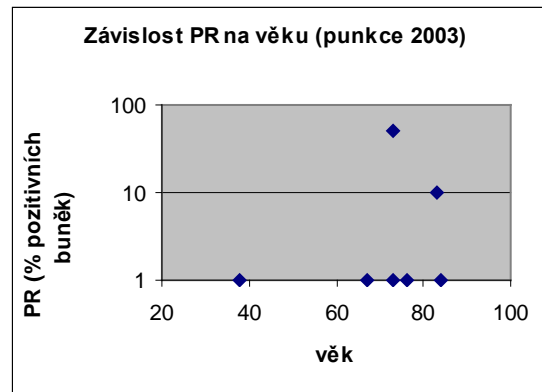
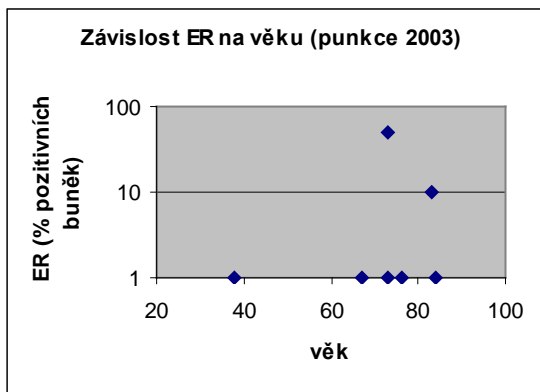
Grafické zpracování výsledků z roku 2003 z operací



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2003 - punkce prsu

pacient	r. naroz.	punkce	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1927	19.2.	76	1	1	1	2
2	1920	20.5.	83	10	10	1	2
3	1930	10.6.	73	50	50	1	1
4	1965	26.6.	38	1	1	1	1
5	1919	1.7.	84	1	1	1	2
6	1931	3.10.	73	1	1	1	0
7	1936	12.11.	67	1	1	1	2
median			73	1	1		

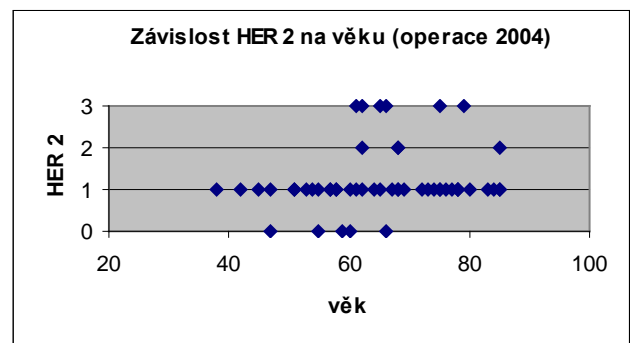
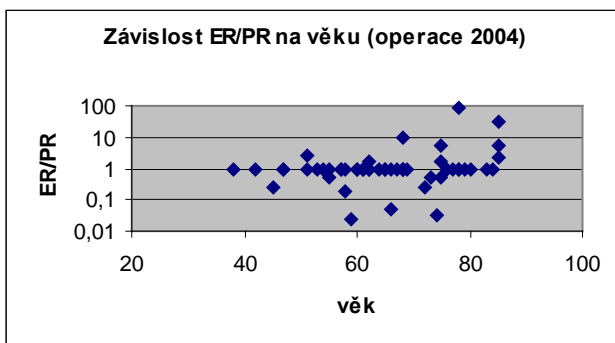
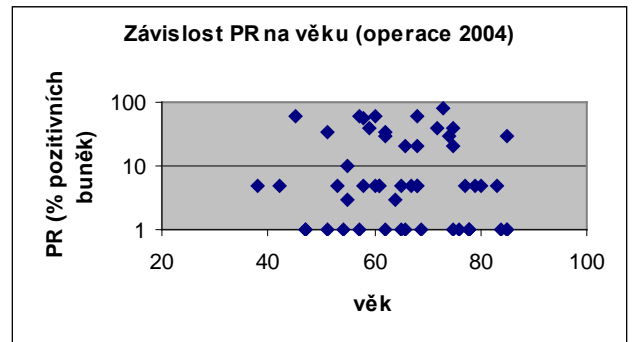
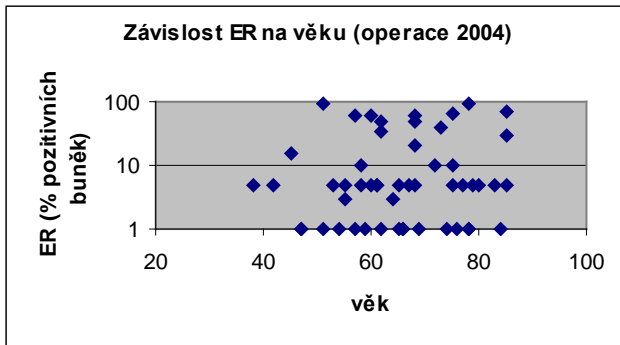
Grafické zpracování výsledků z roku 2003 z punkcí prsu



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2004 – operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1937	7.1.	67	5	5	1	1
2	1930	13.1.	74	1	30	0,033333	1
3	1951	26.1.	53	5	5	1	1
4	1962	4.1.	42	5	5	1	1
5	1949	13.2.	55	3	3	1	0
6	1942	17.2.	62	1	1	1	3
7	1929	3.3.	75	5	1	5	3
8	1945	23.2.	59	1	40	0,025	0
9	1950	25.2.	54	1	1	1	1
10	1919	2.3.	85	30	1	30	2
11	1938	9.3.	66	1	20	0,05	3
12	1939	12.3.	65	5	5	1	1
13	1921	18.3.	83	5	5	1	1
14	1932	23.3.	72	10	40	0,25	1
15	1936	23.3.	68	20	20	1	2
16	1942	23.3.	62	50	30	1,666666	1
17	1949	19.4.	55	5	10	0,5	1
18	1953	2.4.	51	1	1	1	1
19	1946	8.4.	58	5	5	1	1
20	1946	15.4.	58	10	55	0,181818	1
21	1938	30.4.	66	1	1	1	0
22	1943	11.5.	61	5	5	1	1
23	1940	2.6.	64	3	3	1	1
24	1957	11.6.	47	1	1	1	1
25	1947	16.6.	57	1	1	1	1
26	1920	17.6.	84	1	1	1	1
27	1926	17.6.	78	1	1	1	1
28	1935	22.6.	69	1	1	1	1
29	1936	27.7.	68	50	5	10	1
30	1953	23.8.	51	90	35	2,571428	1
31	1926	6.8.	78	90	1	90	1
32	1936	10.9.	68	60	60	1	1
33	1919	7.9.	85	70	30	2,333333	1
34	1929	8.9.	75	65	40	1,625	1
35	1924	24.9.	80	5	5	1	1
36	1957	27.9.	47	1	1	1	0
37	1928	12.10.	76	1	1	1	1
38	1966	13.10.	38	5	5	1	1
39	1943	4.11.	61	5	5	1	3
40	1944	26.10.	60	5	5	1	0
41	1927	3.11.	77	5	5	1	1
42	1925	9.11.	79	5	5	1	3
43	1936	16.11.	68	5	5	1	2
44	1929	19.11.	75	10	20	0,5	1
45	1942	23.11.	62	35	35	1	2
46	1939	30.11.	65	1	1	1	3
47	1931	30.11.	73	40	80	0,5	1
48	1926	3.12.	78	1	1	1	1
49	1919	7.12.	85	5	1	5	1
50	1959	10.12.	45	15	60	0,25	1
51	1944	10.12.	60	60	60	1	1
52	1947	14.12.	57	60	60	1	1
median			65,5	5	5		

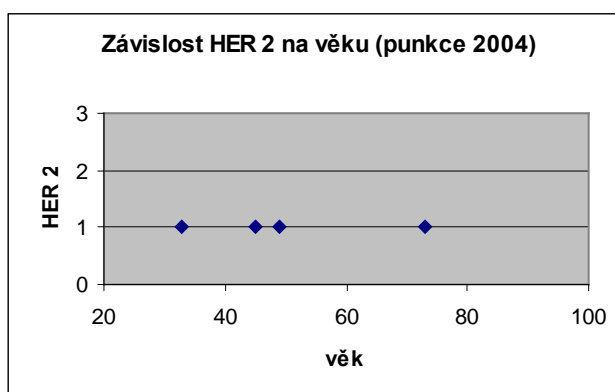
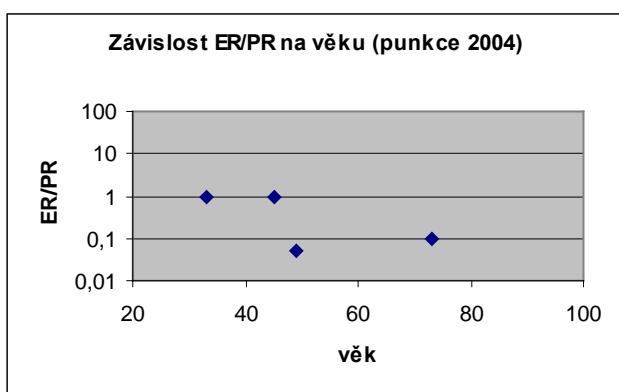
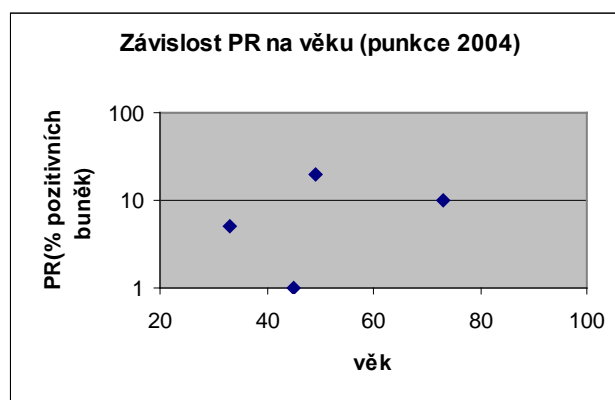
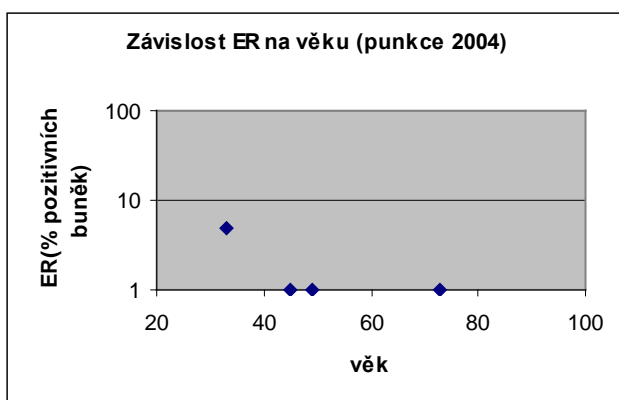
Grafické zpracování výsledků z roku 2004 z operací



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2004 – punkce prsu

pacient	r. naroz.	punkce	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1959	12.1.	45	1	1	1	1
2	1931	18.2.	73	1	10	0,1	1
3	1955	27.10.	49	1	20	0,05	1
4	1971	20.12.	33	5	5	1	1
median			47	1	7,5		

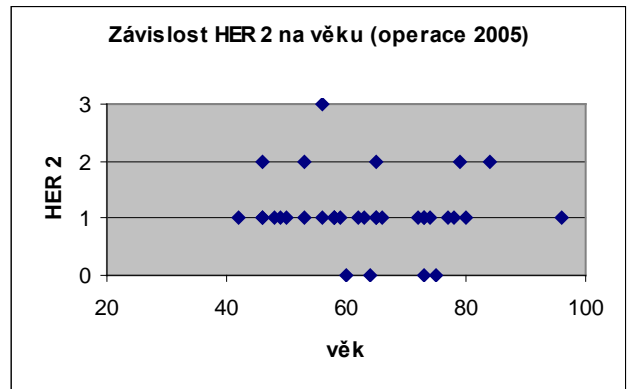
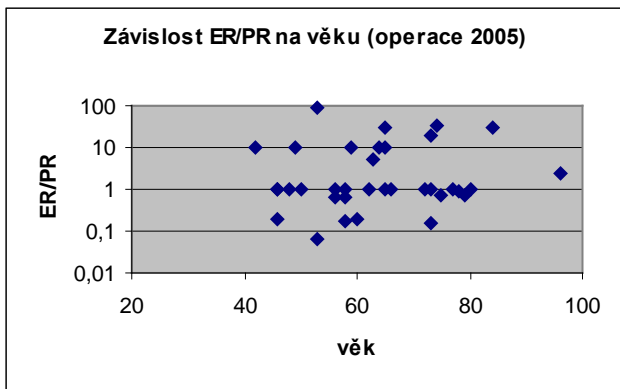
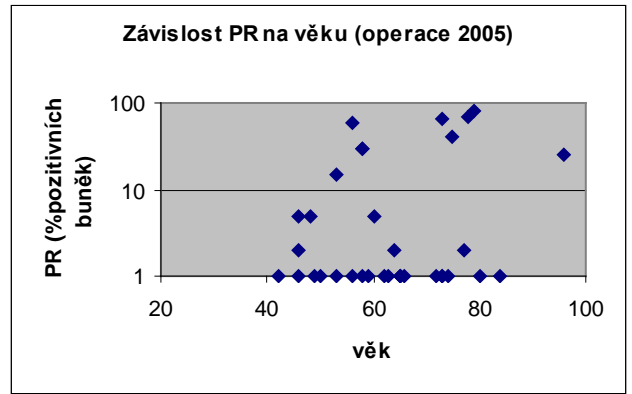
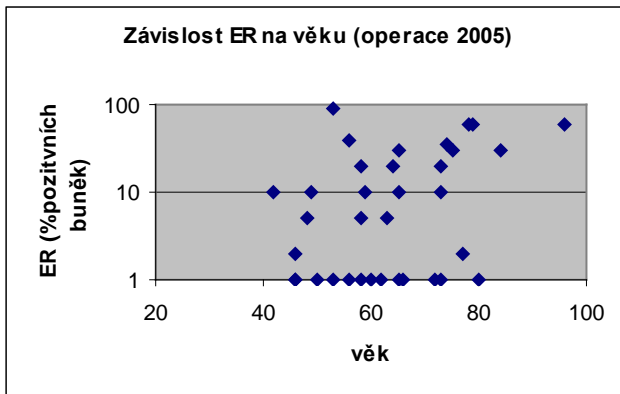
Grafické zpracování výsledků z roku 2004 z punkcí prsu



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2005 - operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER2
1	1943	4.1.	62	1	1	1	1
2	1955	18.1.	50	1	1	1	1
3	1933	8.2.	72	1	1	1	1
4	1959	10.2.	46	1	1	1	1
5	1952	8.3.	53	90	1	90	2
6	1940	8.3.	63	5	1	5	1
7	1931	1.4.	74	35	1	35	1
8	1959	8.4.	46	2	2	1	1
9	1940	10.5.	65	1	1	1	1
10	1940	11.5.	65	30	1	30	1
11	1921	18.5.	84	30	1	30	2
12	1959	18.5.	46	1	5	0,2	2
13	1946	24.5.	59	10	1	10	1
14	1957	1.6.	48	5	5	1	1
15	1940	7.6.	65	10	1	10	2
16	1947	8.6.	58	20	30	0,666667	1
17	1925	4.7.	80	1	1	1	1
18	1941	12.7.	64	20	2	10	0
19	1939	1.8.	66	1	1	1	1
20	1927	19.7.	78	60	70	0,857143	1
21	1949	22.7.	56	40	60	0,666667	1
22	1930	22.7.	75	30	40	0,75	0
23	1932	28.7.	73	20	1	20	1
24	1909	29.7.	96	60	25	2,4	1
25	1932	9.8.	73	10	65	0,153846	1
26	1952	17.8.	53	1	15	0,066667	1
27	1947	5.10.	58	5	30	0,166667	1
28	1945	11.10.	60	1	5	0,2	0
29	1963	19.10.	42	10	1	10	1
30	1932	21.10.	73	1	1	1	0
31	1947	11.11.	58	1	1	1	1
32	1926	6.12.	79	60	80	0,75	2
33	1928	7.12.	77	2	2	1	1
34	1949	9.12.	56	1	1	1	3
35	1956	9.12.	49	10	1	10	1
median			63	5	1		

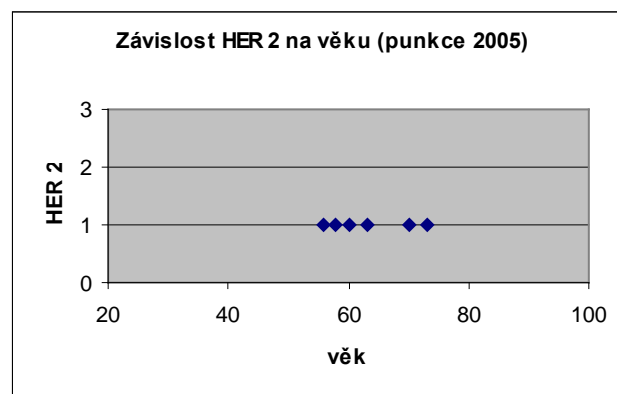
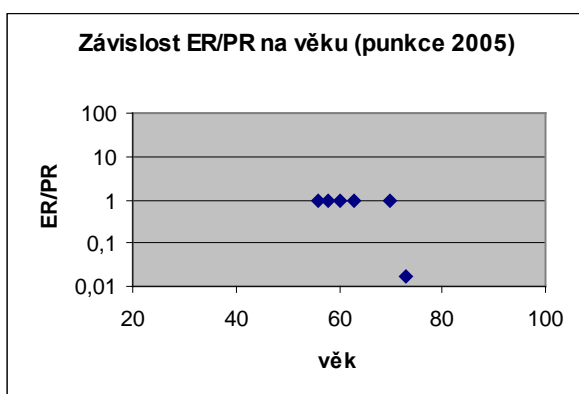
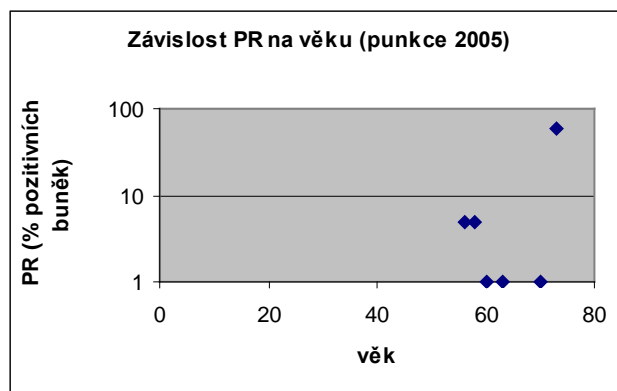
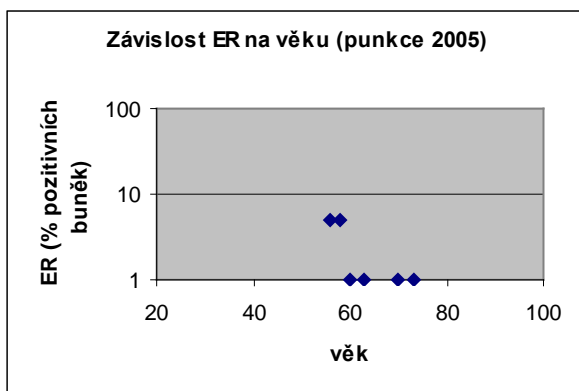
Grafické zpracování výsledků z roku 2005 z operací



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2005 – punkce prsu

pacient	r. naroz.	punkce	věk	ER	PR	ER/PR	HER2
1	1935	9.2.	70	1	1	1	1
2	1942	30.3.	63	1	1	1	1
3	1945	13.6.	60	1	1	1	1
4	1949	11.7.	56	5	5	1	1
5	1932	28.7.	73	1	60	0,016667	1
6	1947	19.10.	58	5	5	1	1
median			61,5	1	3		

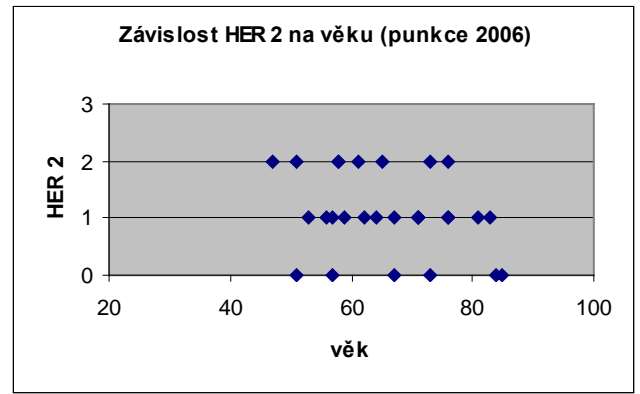
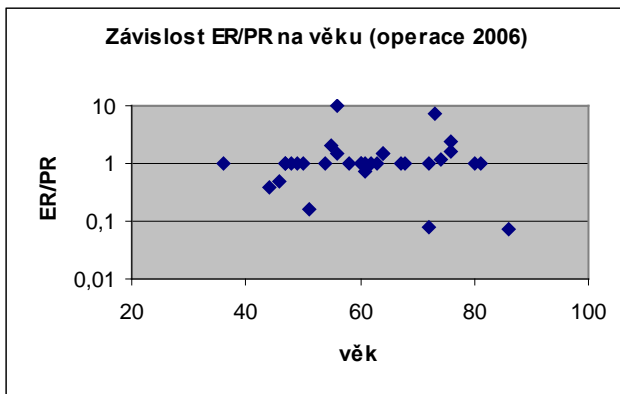
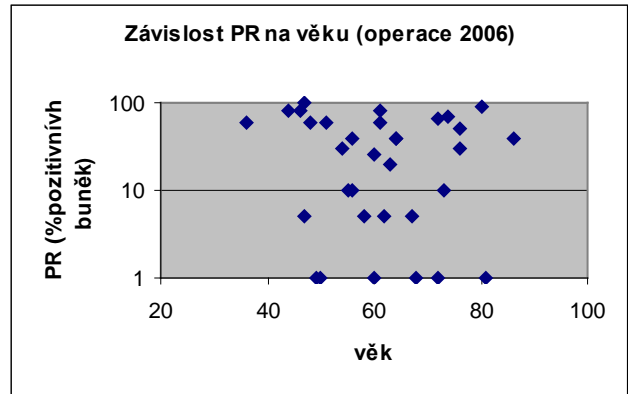
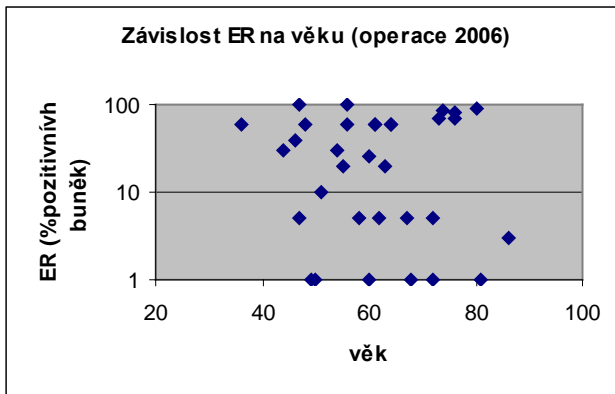
Grafické zpracování výsledků z roku 2005 z punkcí prsu



Vyšetření ER a P R receptorů v roce 2006 – operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER2
1	1934	10.1.	72	5	65	0,076923	1
2	1920	12.1.	86	3	40	0,075	1
3	1938	27.1.	68	1	1	1	2
4	1934	27.1.	72	1	1	1	1
5	1945	31.1.	61	60	60	1	1
6	1970	8.3.	36	60	60	1	1
7	1946	22.3.	60	1	1	1	0
8	1956	22.3.	50	1	1	1	0
9	1955	29.3.	51	10	60	0,166667	0
10	1943	24.3.	63	20	20	1	1
11	1951	7.4.	55	20	10	2	1
12	1933	27.4.	73	70	10	7	1
13	1939	11.5.	67	5	5	1	3
14	1925	25.5.	81	1	1	1	1
15	1944	2.6.	62	5	5	1	2
16	1942	2.6.	64	60	40	1,5	1
17	1962	6.6.	44	30	80	0,375	1
18	1958	5.6.	48	60	60	1	3
19	1960	14.6.	46	40	80	0,5	0
20	1946	23.6.	60	25	25	1	1
21	1950	26.7.	56	60	40	1,5	3
22	1930	26.7.	76	80	50	1,6	1
23	1930	28.7.	76	70	30	2,333333	1
24	1957	18.8.	49	1	1	1	3
25	1942	10.8.	64	60	40	1,5	0
26	1932	6.10.	74	85	70	1,214286	2
27	1959	9.11.	47	100	100	1	1
28	1959	31.10.	47	5	5	1	0
29	1948	10.11.	58	5	5	1	1
30	1950	16.11.	56	100	10	10	1
31	1952	20.11.	54	30	30	1	1
32	1926	14.12.	80	90	90	1	1
33	1945	15.12.	61	60	80	0,75	1
median			61	30	30		

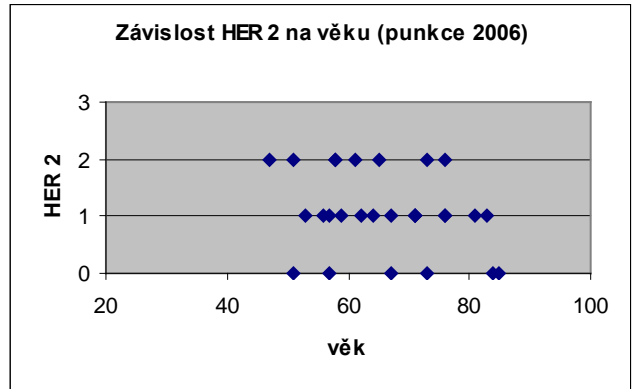
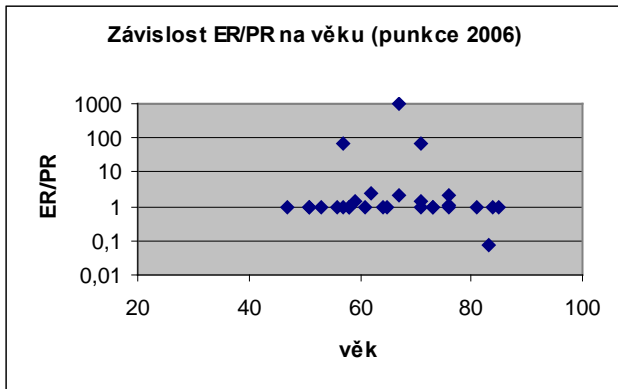
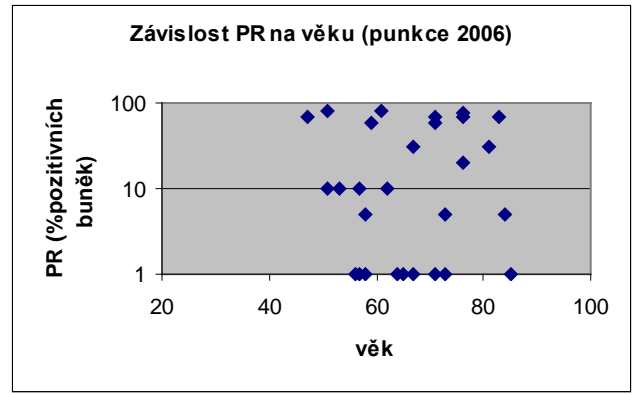
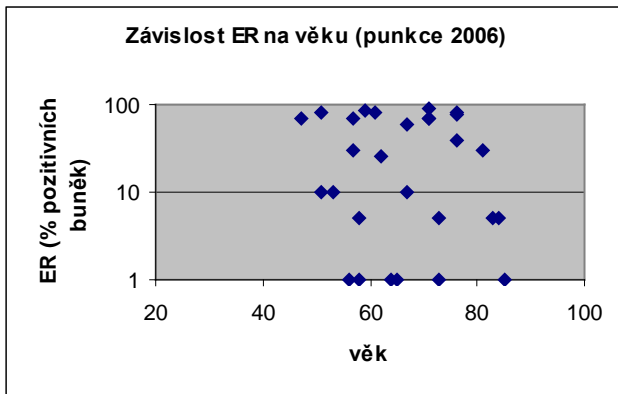
Grafické zpracování výsledků z roku 2006 z operací



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2006 – punkce prsu

pacient	r. naroz.	punkce	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1942	19.1.	64	1	1	1	1
2	1948	7.2.	58	1	1	1	2
3	1955	17.2.	51	10	10	1	0
4	1933	17.3.	73	5	5	1	0
5	1933	29.3.	73	1	1	1	2
6	1944	3.5.	62	25	10	2,5	1
7	1923	13.4.	83	5	70	0,071429	1
8	1939	14.4.	67	10	1	1000	1
9	1949	14.4.	57	30	10	1	0
10	1922	25.5.	84	5	5	1	0
11	1950	23.6.	56	1	1	1	1
12	1921	29.6.	85	1	1	1	0
13	1925	4.7.	81	30	30	1	1
14	1939	12.7.	67	60	30	2	0
15	1930	12.7.	76	40	20	2	1
16	1948	11.8.	58	5	5	1	2
17	1941	12.9.	65	1	1	1	2
18	1959	22.9.	47	70	70	1	2
19	1930	22.9.	76	80	70	1,142857	1
20	1947	3.10.	59	85	60	1,416667	1
21	1930	18.10.	76	75	75	1	2
22	1955	1.11.	51	80	80	1	2
23	1935	1.11.	71	90	60	1,5	1
24	1949	14.11.	57	70	1	70	1
25	1945	6.12.	61	80	80	1	2
26	1953	12.12.	53	10	10	1	1
27	1935	12.12.	71	70	1,00	70	1
28	1935	12.12.	71	70	70	1	1
median			66	28	10		

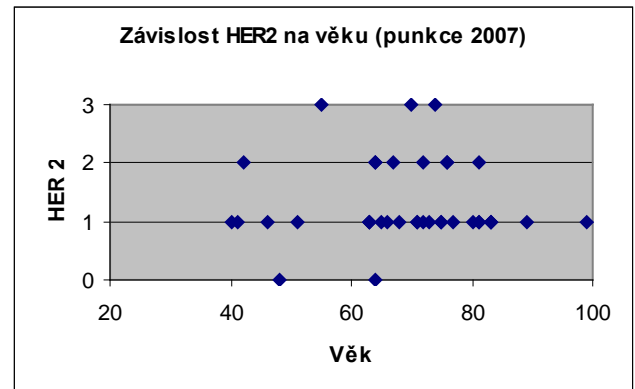
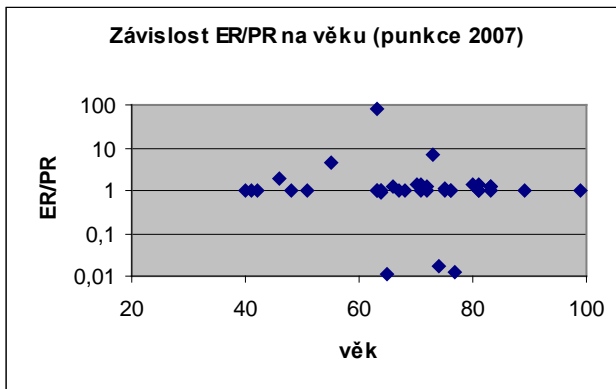
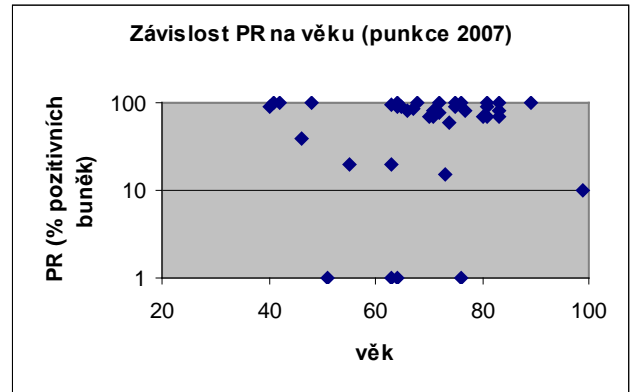
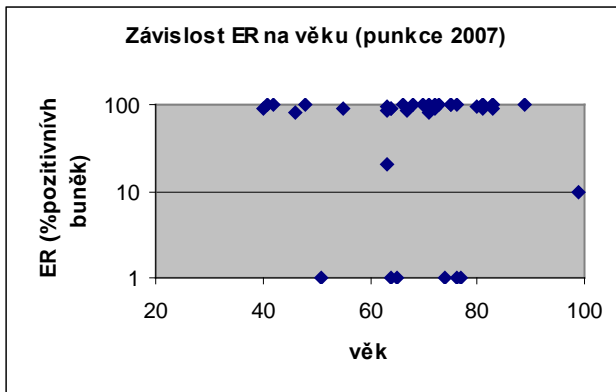
Grafické zpracování výsledků z roku 2006 z punkcí prsu



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2007 - punkce prsu

pacient	r. naroz.	punkce	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1943	11.1.	64	90	100	0,9	0
2	1930	17.1.	77	1	80	0,0125	1
3	1943	2.3.	64	90	90	1	2
4	1933	13.3.	74	1	60	0,016667	3
5	1956	10.4.	51	1	1	1	1
6	1937	11.4.	70	100	70	1,428571	3
7	1966	24.4.	41	100	100	1	1
8	1931	4.5.	76	1	1	1	2
9	1935	4.5.	72	90	75	1,2	2
10	1932	11.5.	75	100	90	1,111111	1
11	1927	15.5.	80	95	70	1,357143	1
12	1959	15.5.	48	100	100	1	0
13	1924	22.5.	83	90	70	1,285714	1
14	1926	13.6.	81	100	70	1,428571	1
15	1943	13.6.	64	1	1	1	2
16	1944	21.6.	63	20	20	1	1
17	1924	2.7.	83	100	80	1,25	1
18	1952	27.7.	55	90	20	4,5	3
19	1926	26.7.	81	100	100	1	2
20	1924	31.7.	83	100	100	1	1
21	1908	8.8.	99	10	10	1	1
22	1961	22.8.	46	80	40	2	1
23	1918	11.9.	89	100	100	1	1
24	1940	14.9.	67	85	85	1	2
25	1935	23.10.	72	100	100	1	1
26	1936	23.10.	71	100	70	1,428571	1
27	1965	9.10.	42	100	100	1	2
28	1931	12.10.	76	100	100	1	2
29	1941	23.10.	66	100	80	1,25	1
30	1926	23.10.	81	90	90	1	1
31	1967	24.10.	40	90	90	1	1
32	1932	29.10.	75	100	100	1	1
33	1944	13.11.	63	85	1	85	1
34	1942	16.11.	65	1	90	0,011111	1
35	1936	28.11.	71	80	80	1	1
36	1934	12.12.	73	100	15	6,666667	1
37	1939	11.12.	68	100	100	1	1
38	1944	18.12.	63	95	95	1	1
median			71	92,5	80		

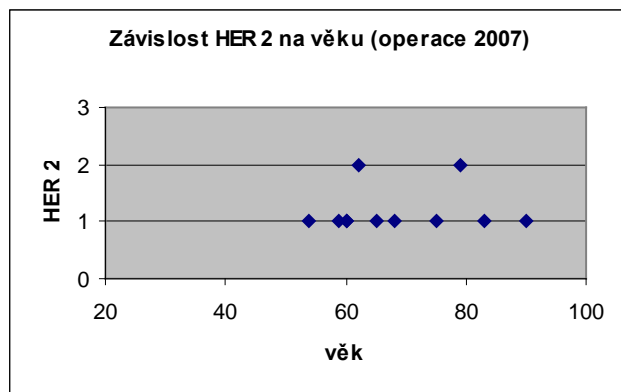
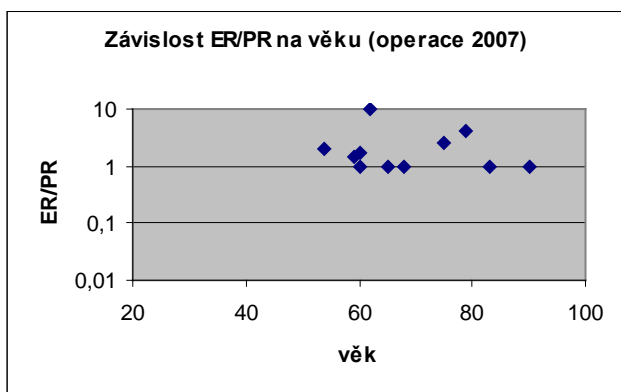
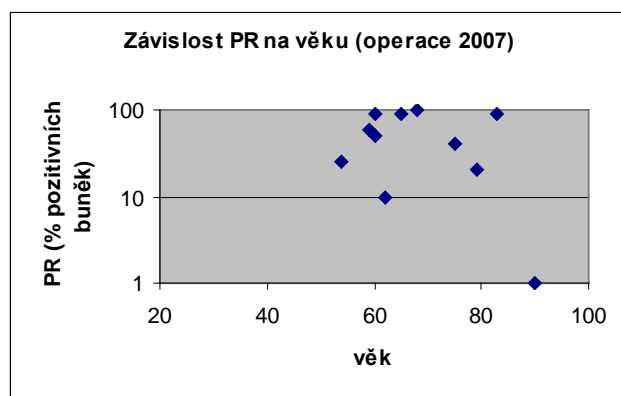
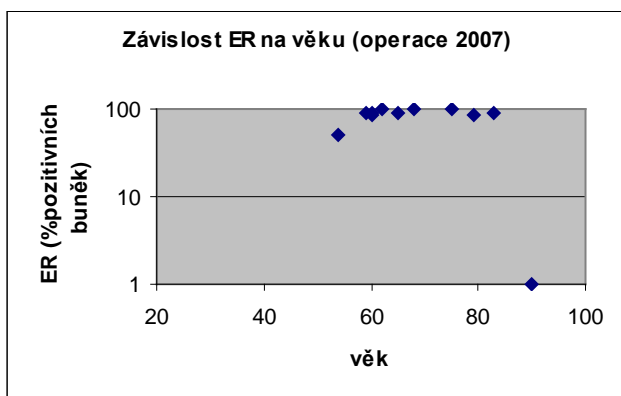
Grafické zpracování výsledků z roku 2007 z punkcí prsu



Vyšetření ER a PR receptorů v roce 2007 – operace

pacient	r. naroz.	operace	věk	ER	PR	ER/PR	HER 2
1	1917	16.1.	90	1	1	1	1
2	1928	6.3.	79	85	20	4,25	2
3	1953	5.4.	54	50	25	2	1
4	1942	12.6.	65	90	90	1	1
5	1948	28.6.	59	90	60	1,5	1
6	1947	14.8.	60	85	50	1,7	1
7	1932	19.9.	75	100	40	2,5	1
8	1924	11.10.	83	90	90	1	1
9	1947	17.10.	60	90	90	1	1
10	1945	5.12.	62	100	10	10	2
11	1939	14.12.	68	100	100	1	1
median				65	90	50	

Grafické zpracování výsledků z roku 2007 z operací



13. SEZNAM ZKRATEK

ADH	atypická duktální hyperplasie
ALH	atypická lobulární hyperplasie
BRCA1	nádorový supresor
BRCA2	nádorový supresor
Cdk	cyklin dependentní kináza
c- erbB – 2	receptorová tyrozin kináza
DAB	3,3 - diaminobenzidin
DCIS	duktální karcinom in situ
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme – linked immunosorbent assay
ER	estrogenový receptor
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
HRP	křenová peroxidáza
IDC	invazivní duktální karcinom
Ig	imunoglobulin
IHC	imunohistochemie
ILC	invazivní lobulární karcinom
ISH	hybridizace in situ
LCIS	lobulární karcinom in situ
myc	onkogeny kódující transkripční regulační faktory
p53	nádorový supresor
PCR	polymerázová řetězová reakce
PR	progesteronový receptor
PTEN	nádorový supresor
ras	onkogeny kódující signální transduktory
Rb	nádorový supresor
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
TDLU	terminální duktulo – lobulární oblast
TRIS	pufrovací roztok
UDH	běžná duktální hyperplasie
ULH	běžná lobulární hyperplasie

14. LITERATURA A ZDROJE

ABRAHAMS Peter, DRUGA Rastislav, *Lidské tělo, Atlas anatomie člověka*, Ottovo nakladatelství 2003, Praha

JÍLEK Petr, *Základy imunologie*, Ewopharma s.r.o. 1999, Praha

KOLÁŘ Zdeněk a kolektiv, *Molekulární patologie nádorů*, EPAVA 2003, Olomouc

KONOPÁSEK Bohuslav, PETRUŽELKA Luboš, *Karcinom prsu, Manuál diagnostiky a léčby*, Galén 1997, Praha

LUKÁŠ Zdeněk, DRÁBEROVÁ Eduarda, FEIT Josef, VOJTĚŠEK Bořivoj, *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*, Lékařská fakulta Masarykovy university v Brně 1997

<http://www.patologie.info/patologie/soubor/standardy/8-standard%20prs> definit.doc

Doporučený postup pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu (Kolář, Nenutil, Ryška)