

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**VLIV VĚKU A JINÝCH FAKTORŮ NA POMĚR
ESTROGENOVÝCH KU PROGESTERONOVÝM RECEPTORŮM
(ER/PR) U KARCINOMU PRSU**

Rigorózní práce

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně pod vedením konzultanta MUDr. Jiřího Hochmanna, Csc. a veškeré zdroje uvádím v Seznamu literatury.

V Hradci Králové

Tereza Hanáková

Děkuji konzultantovi MUDr. Jiřímu Hochmannovi, Csc. za všestrannou pomoc, spoustu cenných připomínek a rad při vzniku této práce.

OBSAH

1. Souhrn.....	1
2. Summary.....	3
3. Úvod.....	5
4. Teoretická část	7
4.1. Vliv estrogenů na ER a na PR.....	7
4.2. Vliv ER/PR na prognózu	10
4.3. Vliv ER/PR na výsledek léčby karcinomů prsu.....	11
4.4. Definice rozhraní pro nebezpečně nízký poměr ER/PR	12
4.5. Definice rozhraní pro nebezpečně vysoký poměr ER/PR.....	15
4.6. Hledání nejpříznivějšího poměru ER/PR pro rozdílný věk	16
4.7. Abnormální hodnoty receptorů v populaci	18
5. Praktická část	20
5.1. Materiál a metody	20
5.1.1. Výpočet frekvence výskytu nádoru v závislosti na věku.....	20
5.1.2. Výpočet ER/PR.....	22
5.1.3. Výpočet překrývajících se věkových mediánů ER/PR.....	23
5.1.4. Výpočet mediánů ER/PR upřednostňujících počet pacientek místo věku....	24
5.1.5. Komplikovanější zásady v použití grafů upřednostňujících počet pacientek	25
6. VÝSLEDKY	28
6.1. Závislost ER/PR na věku	28
6.1.1. Grafy upřednostňující věk.....	28
6.1.2. Grafy upřednostňující počet pacientek místo věku.....	31
6.2. Společné posouzení všech parametrů v každé nemocnici	34
6.2.1. Společné posouzení ER a PR bez výpočtu zlomku ER/PR	34
6.2.2. Přidání ER/PR do společného grafu s ER a s PR.....	35
6.2.3. Přidání ER*PR neboli logaritmickeho součtu receptorů	36
6.2.4. Přidání křivky výskytu nádorů do společného grafu s ER, PR, ER/PR a ER*PR.....	38
6.3. Výsledky orientačního monitorování léčby hormonálními přípravky.....	39
7. Diskuse.....	43
7.1. Výška ER/PR z hlediska mezilaboratorních metodických rozdílů.....	43
7.2. Možnost vzájemného porovnání statistických souborů jednotlivých nemocnic..	43

7.3. Globální posouzení závislosti na věku – osová souměrnost ER a PR	44
7.4. Závislost ER/PR na věku – rozdíly mezi našimi soubory.....	44
7.5. Posouzení oblasti nástupu menopauzy u různých nemocnic	45
7.6. Posouzení dalších postmenopauzálních vln ER/PR a ER samotného u různých nemocnic	46
7.7. Posouzení součinu ER*PR (neboli log ER + log PR)	46
7.8. Možnost artefaktů při hledání menopauzálního zlomu receptorových koncentrací a hormonální substituční léčba.....	47
7.9. Porovnání našich výsledků s literaturou - Závislost zlomku ER/PR na věku v literatuře	48
7.10. Léčba klimakterických potíží hormonálními preparáty.....	49
8. ZÁVĚR	51
9. Seznam zkratk	52
10. Příloha	53
10.1. Grafy	53
10.1.1. Závislost ER/PR na věku	53
10.2. Tabulky	55
11. ZDROJE.....	57

1. Souhrn

Tereza Hanáková

Vliv věku a jiných faktorů na poměr estrogenových ku progesteronovým receptorům (ER/PR) u karcinomu prsu

Rigorózní práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

V rigorózní práci jsme se zabývali využitím poměru ER/PR u pacientek s diagnózou karcinomu prsu a snažili se poukázat na jeho důležitost pro zpřesnění diagnostiky tohoto onemocnění.

S pomocí metod využívajících sousední překrývající se mediány jsme porovnávali křivky v grafech pardubické, náchodské a hradecké nemocnice. Všimli jsme si shodných jevů či naopak odlišností a abnormalit v těchto grafech a snažili se vysvětlit příčiny těchto skutečností. Je důležité určit optimální hodnotu ER/PR, jelikož extrémní zvýšení zlomku zhoršuje prognózu stejně jako příliš nízký poměr ER/PR (způsobený zejména snížením ER) a stanovit hranici nebezpečně nízkého anebo vysokého poměru.

Zlomek ER/PR by měl zobrazovat nástup menopauzy výrazněji než ER samotné, neboť při snížené tvorbě estradiolu se nejenže zvyšuje koncentrace ER a tím i hodnota celého zlomku, ale ta se navíc zvyšuje současným poklesem PR ve jmenovateli. Naopak při podání estradiolu nebo při jeho vnitronádorové tvorbě se uměle snižuje ER a zároveň zvyšuje PR a hodnota zlomku tímto klesá.

Důležité je přemýšlet o vlivu různých faktorů na kvocient ER/PR – může se jednat o přednádorovou léčbu pomocí hormonální substituční terapie klimakterických potíží nebo užívání hormonální antikoncepce. V této souvislosti jsme získali údaje z databáze VFN v Praze s cílem zjistit četnost preskripce HST u postmenopauzálních pacientek a tímto dát podnět budoucím zájemcům o tuto problematiku – aby kromě údajů o koncentracích ER a PR u každé pacientky bylo intenzivně pátráno po užívání hormonálních preparátů před diagnostikou karcinomu prsu. Tímto by se mohly objasnit mnohé zvláštnosti v našich grafech.

Pomocí logaritmického součtu (ER*PR) jsme zjišťovali, zdali se jednalo v některém stádiu o hormonálně dependentní nádory či nikoli. Jelikož tvorba estradiolu v nádoru snižuje ER a zvyšuje PR, pak ER*PR zůstává stále stejný. Ale v případě snížení ER*PR se nedostatečně tvoří jak ER, tak PR, což znamená, že přestávají vznikat estrogeně závislé nádory.

Chtěli bychom poukázat na důležitost zvolení si vlastního rozmezí poměru ER/PR (kdy už je poměr nebezpečně vysoký) u každé laboratoře z důvodů mezilaboratorní variability. To se projevilo např. jako značné zvýšení ER/PR po 55 letech u hradecké nemocnice oproti méně výraznému zlomu u pardubické nemocnice.

Mnohé problémy jsme nedořešili, neboť jde o první vstup do této problematiky. Jestliže např. menopauza zpomalí tvorbu nádorů silně závislých na estradiolu (tedy silně pozitivních na ER i PR), tak poměr ER/PR je v tomto věku vypočítáván z abnormální statistické podskupiny. Nemůže se tedy přesně hovořit o vlivu estradiolu na průměrný nádor.

2. Summary

Tereza Hanáková

Influence of the age and other factors on the estrogen and progesterone receptor ratio (ER/PR) in breast cancer

Rigorous thesis

Charles university in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

In this rigorous thesis we dealt with ER/PR ratio of patients in the breast cancer and we tried to point out its importance for making the diagnostics more accurate.

We compared the curves in the graphs of hospitals in Pardubice, Náchod and Hradec Králové by the help of methods that exploited medians of the neighbouring – mutually overlapping groups of patients. In these graphs we were noticing the similar or on the contrary different features and also abnormalities and we tried to explain the reason of these events. It is important to define the optimal ER/PR value and determine the boundary of the dangerously low or high ER/PR ratio, because the extreme increase of this quotient as well as too low of ER/PR ratio make the prognosis worse.

The ER/PR quotient should represent the coming of the menopause more accurately than ER alone, because during low estradiol production not only concentration of ER, but also the extent of the whole ER/PR quotient rises, but in the addition, this ER/PR quotient rises together with the decrease of PR in the denominator. On the contrary, the application of estradiol or its intra-tumorous production leads to the artificial decrease of ER and simultaneous PR increase and the value of the whole ER/PR quotient is going down by this manner.

It is important to think about the influence of various factors on ER/PR quotient – it can be connected with the treatment by the hormonal substitution therapy of the menopausal disorders or the administration of the hormonal contraception before diagnosis of the tumour. In this connection we received the data from the database of VFN in Prague to find out some information about the hormonal substitution therapy prescription in case of postmenopausal patients and to motivate the future interesting persons in this problematics. In addition to the carrying data of concentrations of ER

and PR from each patient is important to search intensively for the facts concerning the administration of hormonal treatment before the diagnosis of tumour.

Some particularity in our graphs could be cleared up by this.

By the help of the logarithmic sum (ER*PR) we found out, whether tumours in certain age appeared to be hormone-dependent or not. Because the estradiol production reduces ER and on the other side increases PR proportionally, than ER*PR will stay still the same. But during ER*PR decreasing, ER and also PR are insufficiently produced, and that is why estrogen-dependent tumours stop to arise.

Because of certain interlab differences we would like to point out the importance of the determination of interval of ER/PR ratio by each lab (when ER/PR ratio is dangerously high). It was seen for instance as a considerable increasing of ER/PR after age of 55 by hospital in Hradec Králové compared to less considerable break by hospital in Pardubice.

Many problems haven't been solved yet, because it was only step one of this problematics. If for example menopause gets the tumour production strongly estradiol-dependent lower (strongly ER and PR positive) than ER/PR ratio is counted from abnormal statistic subgroup of this age. The estradiol influence on average tumour can't be accurately discussed.

3. Úvod

V publikaci školicího pracoviště (Hochmann 2007) byl řešen z matematického hlediska způsob využití poměru estrogenových ku progesteronovým receptorům (ER/PR) pro zpřesnění diagnózy a prognózy karcinomu prsu. Pro přesnější posouzení tohoto poměru se využívalo vytvoření PR-limitovaných skupin pacientek (pacientky s přibližně stejnými koncentracemi PR), neboť PR se s věkem téměř nemění (respektive mění se mnohem méně než ER). Proto se sledovaly změny věkového kvocientu ER/PR ve skupinách s přibližně stejnými koncentracemi PR.

Zdá se, že v případě extrémního snížení poměru ER/PR by byla prognóza karcinomu nepříznivá – kdyby snížení ER/PR bylo způsobeno – především snížením ER. Na to navazují otázky, jaké jsou příčiny změny tohoto poměru. Jednou z nich by mohla být extraovariální tvorba estradiolu přímo v nádorové tkáni prsu. V takovém případě by měly být hodnoty ER sníženy a PR naopak zvýšeny (Štambergová 2009).

Snížený poměr cytosolových koncentrací ER/PR může pomoci při diagnóze nadměrné tvorby estrogenů, nebo naopak geneticky snížené tvorby ER. Nebo (v příznivějším případě) by mohl být známkou příliš velké exprese genu pro PR.

Ale i opačný stav – extrémní zvýšení poměru ER/PR je nebezpečný, neboť koncentrace progesteronového receptoru je při něm snížena, takže signály progesteronu, jako supresoru nádorového bujení buňka nevnímá. Např. Hurlimann a spol. (1993) zjistili, že u PR(-) je prognóza špatná nejen v případě pacientek ER(-), ale také ER(+).

V diplomové práci (Hanáková 2009) jsme zjistili, že hradecká laboratoř dávala vyšší výsledky ER a zároveň naopak nižší výsledky PR než pardubická.

Je tedy nebezpečné převzít rozhraní pro nepříznivý poměr ER/PR z literatury. Každá laboratoř by si měla vytypovat své vlastní rozhraní - jak velký poměr ER/PR svědčí již o nebezpečné převaze ER nad PR (nebo nebezpečné převaze PR nad ER).

Proto by bylo vhodné zjišťovat „optimální“ hodnotu ER/PR a hranice pro nebezpečné extrémy a zkoumat, do jaké míry se tyto hranice mění vlivem věku pacientek.

Co se týče našich metod, které jsme využívali při posuzování koncentrace steroidních receptorů v závislosti na věku, osvojili jsme si zejména metodu překrývajících se sousedních mediánů především u ER/PR.

Cílem rigorózní práce bylo zjistit, jak se v závislosti na věku a menopauzálním stavu mění kvocient ER/PR a všimnout si shodných znaků popř. odlišností v rámci jednotlivých nemocnic v Hradci Králové, Pardubicích a Náchodě.

4. Teoretická část

Karcinom prsu je nejrozšířenější forma rakoviny u žen a druhá nejčastější příčina úmrtí na nádorové onemocnění žen (Kutová 2008). V případě pozitivity steroidních receptorů lze použít antihormonální léčbu.

Stanovení receptorů je prováděno buď v cytosolu – radioreceptorovou analýzou za pomoci dextransu pokrytého aktivního uhlí (DCC) nebo v histologických řezech nebo v nátěrech – imunohistochemicky či imunocytochemicky (ICC). Při ICC je často vyšetřováno jak % pozitivních buněk, tak intenzita jejich pozitivita. Při DCC jsou výsledky vztahovány na mg bílkovin nebo na mg DNA.

Steroidní receptory jsou pomocí ICC vyšetřovány i v mnohých periferních nemocnicích.

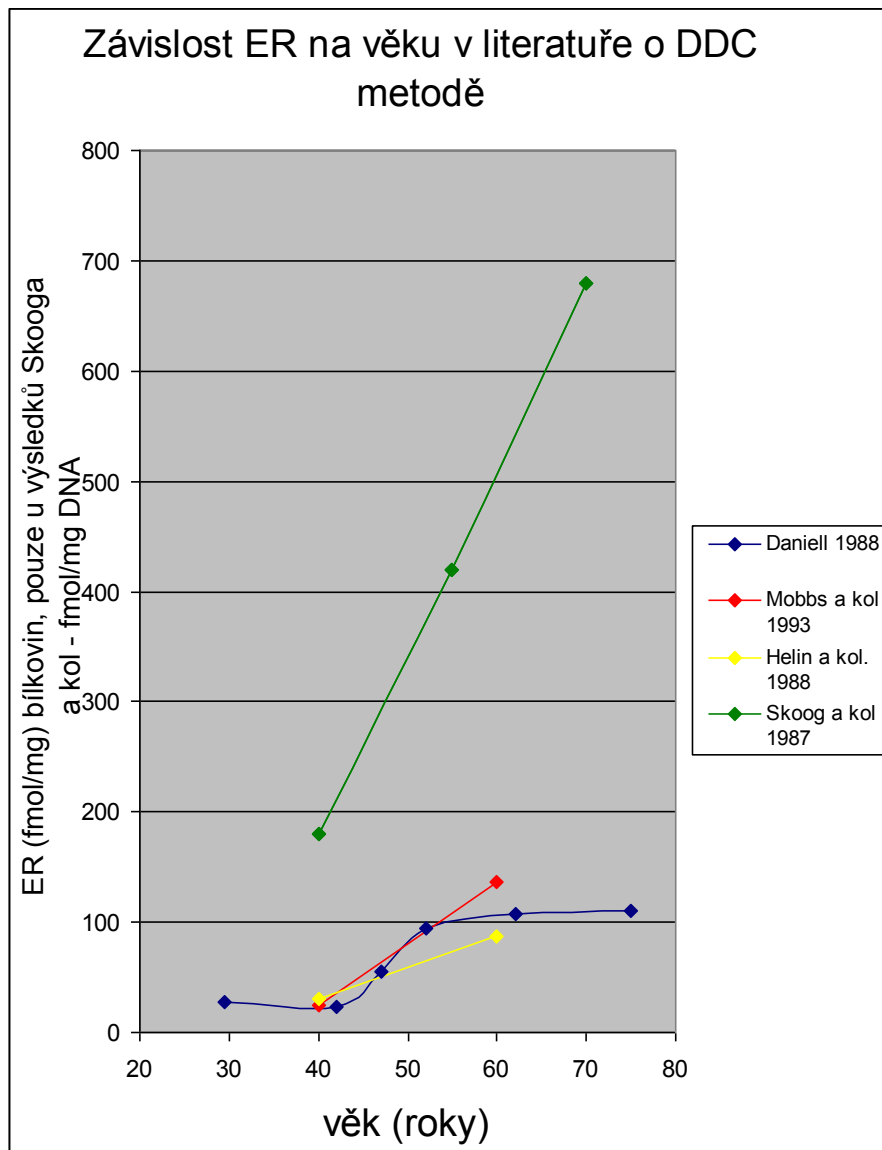
Jsou zde však obavy z falešné negativity a falešné pozitivita vlivem hormonů na ER a PR.

4.1. Vliv estrogenů na ER a na PR

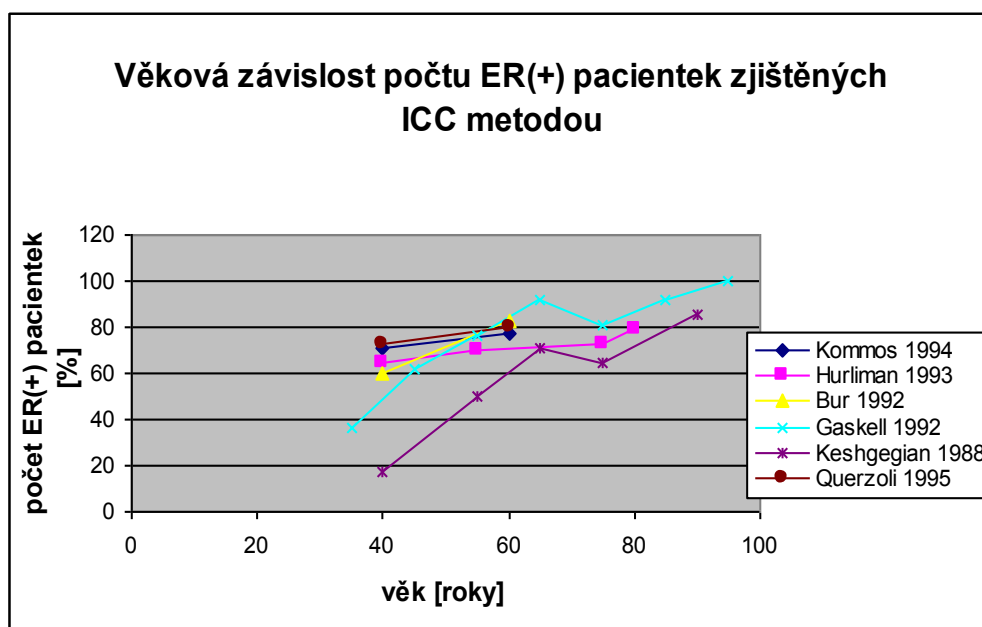
V mnohých pracích (které uvádíme graficky níže) byl v karcinomech prsu dokázán věkový nárůst cytosolových ER. Naopak, v případě PR, někteří autoři pozorovali věkový pokles – většinou jako pokles počtu PR(+) pacientek (Hurlimann 1993, Kommos 1994, Muresan 1986, Pujol 1998, Querzoli 1995, Salazar 1994, Soreide 1992). Obojí je vysvětlitelné poklesem koncentrace estrogenů v krvi (Raafat 1999).

U autorů, kteří našli věkový pokles PR (nejen věkový vzestup ER) je možné, že používali jiné načasování operace s ohledem na menstruační cyklus. Např. na základě výsledků Pujola a spol. (1998) můžeme odvozovat, že když (v případě některého autora) premenopauzální pacientky jsou operovány v den ovulace a těsně před ní (kdy je PR nejvyšší), věkový pokles PR může být významnější než v případě autorů, kteří prováděli chirurgický zákrok týden před ovulací. Tím snížili premenopauzální hladinu na postmenopauzální úroveň, takže další pokles je nemožný.

Graf č. 1 Závislost ER na věku pacientek



Graf č. 2 Věková závislost počtu ER (+) patientek zjištěných ICC metodou



Příčinu změny intracelulární koncentrace ER lze hledat ve věkových změnách koncentrace hormonů, neboť to např. bylo zjištěno nejen in vivo – jako nízké hladiny ER v karcinomech prsu mladých žen v porovnání se starými (např. Yasui a spol. 1999), ale i v buněčných kulturách, kde expozice estradiolu vedla ke snížení množství ER (Bezwoda 1990), aby buňky nebyly přetíženy ER signálem. V mléčné žláze ovariectomizovaných myší za 24 hodin po estrogenové injekci kleslo signifikantně procento ER(+) buněk (jak žlázových tak stromálních) a byl pozorován 2,5-násobný nárůst progesteronových receptorů (PR) v cytosolu (Raafat 1999).

Naopak při nedostatku estradiolu v krvi – např. ve stáří se nádorové buňky snaží estradiolový signál zesílit. Takto chápaná malá úroveň signálu z ER je tedy kompenzována zvýšenou tvorbou ER bez zvýšení tvorby PR (Hochmann 2007). Není-li kompenzace ER dostatečná, tak PR klesá.

Zlomek ER/PR by měl být citlivý zejména na přítomnost estradiolu v nádorech, neboť ten snižuje koncentraci ER a zároveň zvyšuje koncentraci PR, což vyplývá i z citací v prvním odstavci této podkapitoly. Tedy, zvýšení jmenovatele (PR) snižuje hodnotu celého zlomku – čímž se ještě více zviditelní snížení čitatele (ER).

Proto by tento zlomek měl také výrazněji zobrazovat vliv menopauzy, kdy se estradiol ve vaječnicích přestává tvořit. Další využití zlomku ER/PR je vnitronádorová

tvorba estradiolu v nádorech prsu – místo ve vaječnících. Tedy mezi příčiny rozdílů krevních koncentrací steroidních hormonů, které ovlivňují koncentraci steroidních receptorů patří nejen ovariální cyklus, ale i mimovaječnicková tvorba hormonů v nádorech prsu nebo dělohy (Nakata a kol. 2003).

Poměr ER/PR se může snížit buď snížením ER (např. zvýšenou tvorbou estradiolu v nádorech). V tomto případě se nabízí otázka, zda-li tato tvorba estradiolu nezpůsobuje falešnou negativitu ER nebo snížení pozitivitu těsně nad hraniční hodnoty ER v karcinomech prsu. Nebo je poměr ER/PR snížen naopak zvýšením PR. V literatuře se však nevyskytují informace, které by poukazovaly na to, že na intratumorální tvorbu estradiolu by se dalo usuzovat z poměru ER/PR (Hochmann 2007b).

4.2. Vliv ER/PR na prognózu

Nádory chudé na ER a PR jsou růstově stimulované jinými mechanismy než estradiolovou signální dráhou. Proto u nich chybí příznivý vliv postmenopauzálního úbytku estradiolu na prognózu.

V diplomové práci Dvořákové (2007) je citován Castagnetta (1987), který uvádí, že nádory s pozitivitou hormonálních receptorů vykazují lepší prognózu i menší postižení regionálních lymfatických uzlin. Také Kutová (2008) uvádí, že pacientky s ER a nebo PR pozitivními nádory neléčené po iniciální chirurgické intervenci mají signifikantně delší interval remise i celkovou dobu přežití než mají pacienti s nádory ER či PR negativními. Statistiky o přežití jsou příznivější u pacientek s receptorově pozitivními nádory, které dostávají adjuvantní antihormonální terapii (tamoxifen) (Lukáš a kol. 1997).

Prognostický význam zlomku ER/PR bude tedy poněkud jiný při celkovém nadbytku receptorů než při nedostatku jak ER tak PR. Pro teoretické řešení významu zlomku ER/PR je tedy nutno hledat možnost zjednodušení tohoto pohledu.

Např. Hurlimann a spol. (1993) zjistili, že u PR(-) je prognóza špatná nejen v případě pacientek ER(-), ale také ER(+). (Nejčastěji je jak pro ER tak pro PR jako hranice mezi (+) a (-) používána hodnota 10 fmol/mg).

Z hlediska ovlivnění prognózy hladinou PR se pak většina použitých prací shoduje, že lépe přežívají pacientky s PR (+) nádory a u nádorů PR (-) je prognóza horší.

V připravované práci Dr. Hochmanna (2010) je řešena problematika kvalitativního (imunohistochemického) a kvantitativního (radioreceptorového) vyšetřování ER a PR z hlediska přesnosti detekce a následné správnosti zvolené terapie pro pacientky s nádorem prsu. V citované práci se poukazuje na důležitost vyšetřování PR (některými autory zpochybňovaného), a zároveň na využití přesnější kvantitativní radioreceptorové analýzy - bez níž by snáze mohlo dojít k tomu, že by pacientka dostala chybnou léčbu.

Již v úvodu bylo zdůrazněno, že v případě nejextrémnějšího snížení poměru ER/PR by byla prognóza nepříznivá (zejména snížení ER). Neboť proti tomu stojí skutečnost, že naopak extrémní zvýšení ER/PR je nebezpečné (Hochmann 2010-připravováno k publikaci).

4.3. Vliv ER/PR na výsledek léčby karcinomů prsu

Jak již bylo výše uvedeno, někteří autoři zastávají názor, že z kvantitativního nebo alespoň z kvalitativního poměru ER/PR (např. ER+/PR+, v kontrastu s ER+/PR-) lze určovat prognózu pacientek, což je důležité pro výběr některých léčebných postupů (Hochmann 2007).

Na základě prevalence hormonálních receptorů je možno zvolit vhodnou hormonální léčbu k potlačení proliferačního potenciálu prsní léze. Vysoký obsah ER v benigních formacích prsu je možno považovat za projev zvýšené senzitivity této cílové tkáně vůči cirkulujícím estrogenům (Strnad a kol. 1998) (Marešková 2006).

V případě maligních nádorů je kromě ER důležité vyšetření PR proto, aby byla vyčleněna skupina ER+/PR- u níž (navzdory pozitivitě ER) je jen malá pravděpodobnost, že nádory budou reagovat na hormonální léčbu tamoxifenem (na rozdíl od ER+/PR+) – viz tab. 1 (Bařinková 2008).

Číselné vyjádření poměru ER/PR je přesnější než vyjádření ER(+)/PR(-) - což je také důvod proč poměr ER/PR sledujeme.

Tab. 1: Význam vyšetřování progesteronových receptorů

	ER-	ER+
PR+	<u>ER-/PR+</u>	<u>ER+/PR+</u>
	Tamoxifen ano	
PR-	<u>ER-/PR-</u>	<u>ER+/PR-</u>
	Tamoxifen ne	

Jak pro kvalitativní tak pro číselné vyjádření poměru ER/PR je vhodné uvést, že jak tato podkapitola, tak obě následující se týkají postmenopauzálních pacientek, neboť těch je většina. Tak uvažovali i ostatní autoři.

4.4. Definice rozhraní pro nebezpečně nízký poměr ER/PR

Takovéto údaje pravděpodobně v literatuře nejsou a uvažujeme o nich téměř hypoteticky. Vycházíme z informací, že některé karcinomy prsu si samy vytváří extraovariální estrogény, čímž samy sebe stimulují k proliferaci. Ale zároveň tím arteficiálně snižují svoji hodnotu ER a zvyšují PR. Toto snížení ER však nejde až do negativity. Naopak, endogenním estrogenem jsou stimulovány k růstu pouze ER pozitivní prekancerózy, takže se přemění na ER pozitivní karcinom (Subramanian et al. 2008).

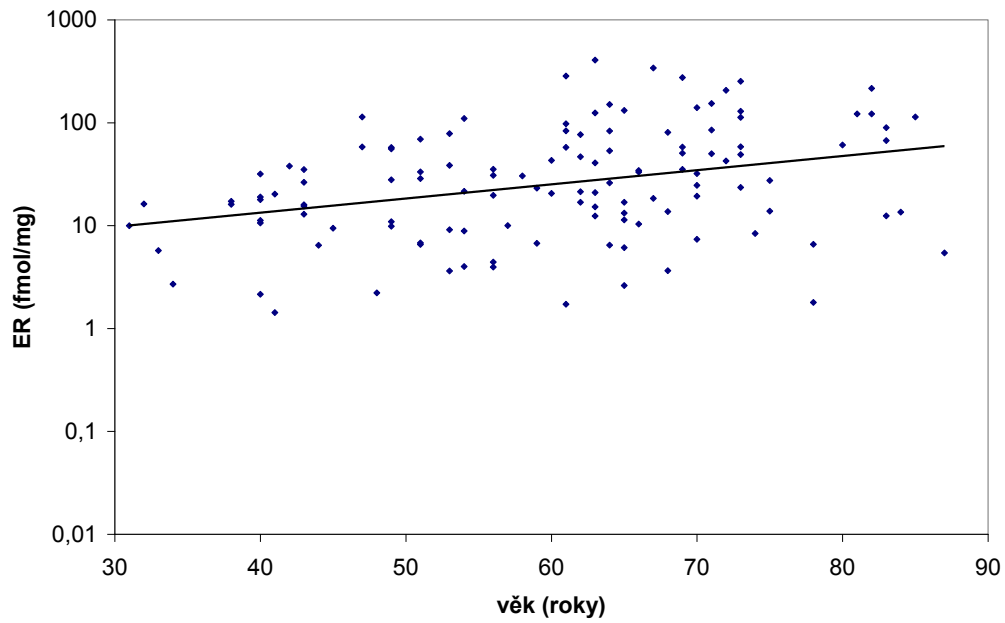
Je tedy vhodné zkoumat, od které hranice má význam považovat poměr ER/PR za neadekvátně snížený. K tomu lze využít také informace o koncentracích estrogenů (nejen jejich receptorů) přímo v nádorech.

Je zde jedna analogie, kterou bychom vzali jako záchytný bod. Jde o to, že u pacientek premenopauzálních jsou hodnoty ER o řád nižší než u postmenopauzálních, kde chybí funkce vaječníků. Postmenopauzální pokles PR někteří autoři neprokázali, tedy budeme pro zjednodušení uvažovat, že PR se s věkem téměř nemění. Vlivem menopauzy se tedy ER/PR zvýší 10x. Jestliže ale některá postmenopauzální pacientka má premenopauzální poměr ER/PR, tak lze u ní uvažovat o mohutné vnitronádorové tvorbě estradiolu.

Typickou představitelku bychom odvozovali následovně: Jestliže jsou některé premenopauzální pacientky ER(+) (viz. Subramanian et al. 2008), tak jejich střední hodnota ER se bude pohybovat řekněme do 20 fmol/mg. A jejich PR bychom pro tuto orientační úvahu mohli položit rovnou také hornímu premenopauzálnímu okraji statistického souboru – řekněme nad 100 fmol/mg (viz následující grafy z práce Hochmann 2007). Takto mladé pacientky by měly velmi zlou prognózu, pokud by nebyla provedena terapeutická kastrace. A jejich receptorový stav lze považovat za obdobný receptorovému stavu u nádorů, které v postmenopauzálním období dokážou tvořit extraovariální estradiol. Tedy poměr ER do 20 a PR kolem 100 fmol/mg (tedy po zaokrouhlení přibližně téměř 10 násobek) by měl být v postmenopauze nebezpečný – na základě analogie s premenopauzálními pacientkami. Mohlo by tedy jít o nejnižší postmenopauzální hodnoty v grafu č. 6.

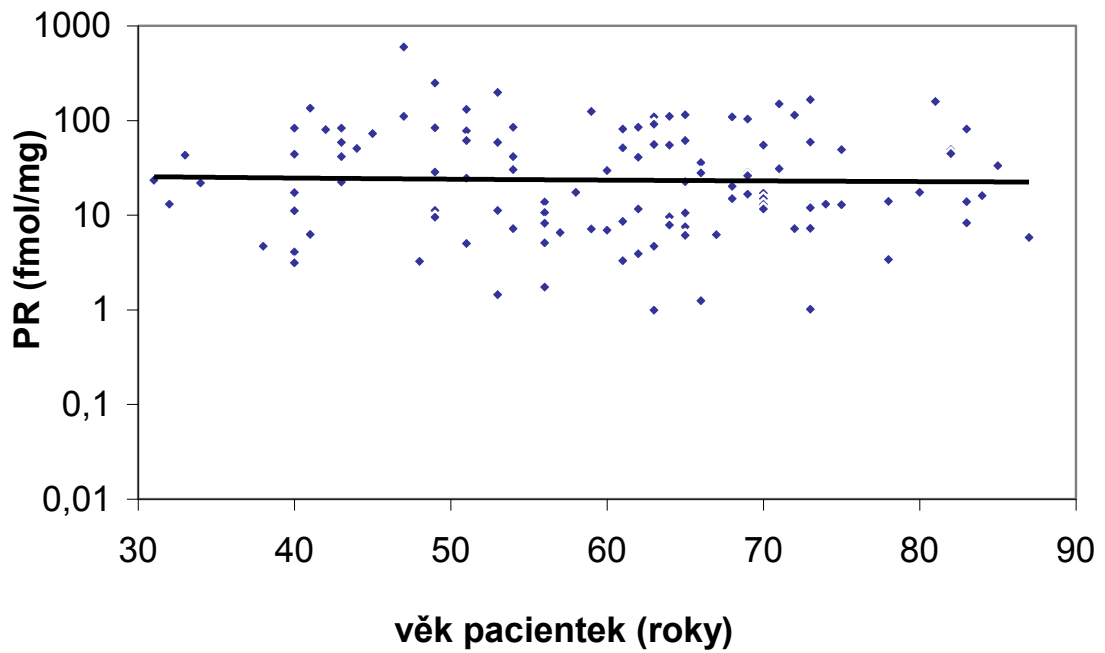
Graf č. 3 Závislosti ER na věku (Hochmann 2007)

Závislost ER na věku



Graf č. 4 Závislosti PR na věku (Hochmann 2007)

Závislost PR na věku



4.5. Definice rozhraní pro nebezpečně vysoký poměr ER/PR

Těžko bychom v literatuře hledali takovéto číselné údaje. Záchytným bodem je např. již výše citovaná práce Hurlimanna (1993) a obdobné další publikace, že nádory ER(+)/PR(-) mají špatnou prognózu. Jestliže pozitivita ER je nad 10 fmol/mg, tak pro velmi hrubou orientační představu budeme uvažovat, že medián ER této skupiny se pohybuje kolem 30 fmol/mg. Analogicky budeme uvažovat, že skupina PR(-) obsahuje výsledky pod 10 fmol/mg a že medián této skupiny by se mohl pohybovat kolem 3 fmol/mg. Nebezpečné by tedy mělo být, když ER je 10krát vyšší než PR. Opět se hovoří o postmenopauzálních pacientkách.

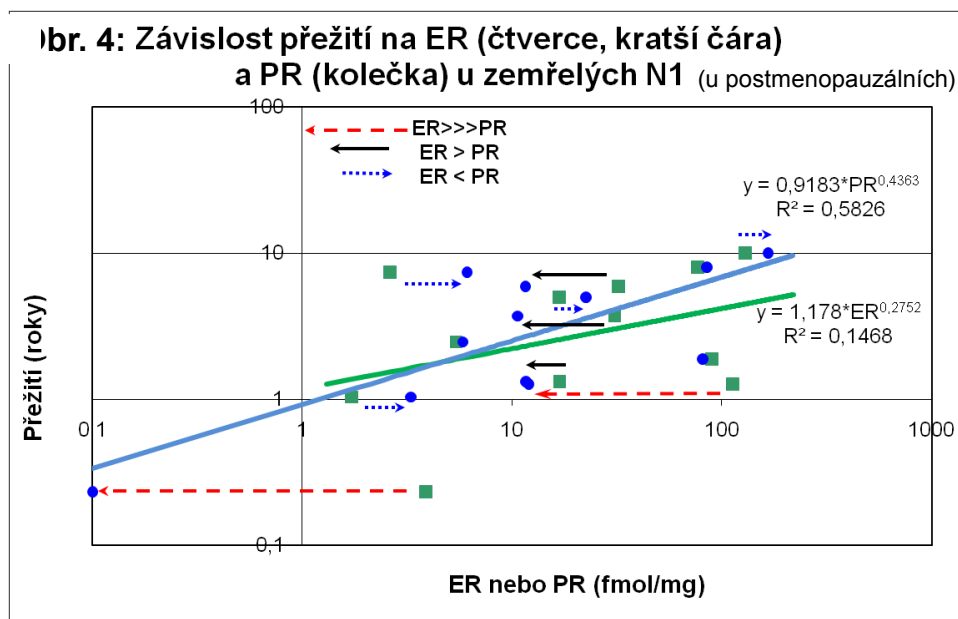
Z výsledků pardubické nemocnice u pacientek jejichž ER a PR bylo vyšetřeno na VÚOS Pardubice máme k dispozici pouze délku přežití dvou pacientek, které měly takto nebezpečný poměr ER/PR a skutečně zemřely velmi brzy. Jde o graf č. 5 přežití v závislosti na ER a PR s výsledky pacientek ve stádiu N1 léčených po operaci především adjuvantní radioterapií bez antiestrogenové a bez klasické cytostatické léčby (Hochmann 2010 - připravováno k publikaci).

Z grafu vyplývá, že nejkratší nebo téměř nejkratší přežití je u pacientek s největší (10násobnou) převahou ER nad PR. Při tom je nutno upozornit, že u jedné pacientky jsou obě hodnoty (jak ER tak PR) pod 10 fmol/mg – (tedy ER-PR-). U druhé pacientky, u které byla v grafu příliš dlouhá šipka jsou zase tyto hodnoty nad 10 fmol/mg (tedy ER+PR+).

Tedy u obou pacientek by tento nepříznivý poměr ER/PR zůstal neodhalen, kdyby se použilo jen kvalitativní hodnocení ER/PR (tedy nevznikl by výsledek ER+PR-).

To svědčí pro myšlenku, že je velmi užitečné tento poměr numericky vypočítávat – místo kvalitativní definice ER(+)/PR(-) (Hochmann 2010).

Graf č. 5 Závislosti přežití na ER a PR (Hochmann 2010)



4.6. Hledání nejpříznivějšího poměru ER/PR pro rozdílný věk

Jelikož uvažujeme, že nebezpečný je jak příliš vysoký, tak příliš nízký poměr ER/PR, je vlastně srozumitelnější definovat oblast optimálního poměru ER/PR, který je pro pacientku nejméně nebezpečný. Výška optimálního poměru ER/PR je jiná pro premenopauzální pacientky než pro postmenopauzální.

Bylo by možno uvažovat, že optimální poměr ER/PR je někde uprostřed mezi oběma výše popsanými krajnostmi a že v různých věkových obdobích je v místě mediánu ER/PR posuzovaného stáří. Ale to by se mohlo týkat průměrných nádorů a nikoliv např. nádorů PR negativních.

Proto další přístup k řešení těchto věkových změn optimálního ER/PR lze hledat v práci Dr. Hochmanna z roku 2007, kde je studován poměr ER/PR v rámci PR limitovaných skupin. Z důvodů přesnějšího posouzení tohoto poměru – pacientky tak byly rozděleny do skupin s přibližně stejnými koncentracemi PR – neboť PR není věkem příliš ovlivněno (na rozdíl od ER).

Při posuzování pacientek s téměř stejnými hodnotami PR byl věkový nárůst ER a ER/PR v těchto PR-limitovaných skupinách mnohem lépe pozorovatelný než v celém netříděném statistickém souboru.

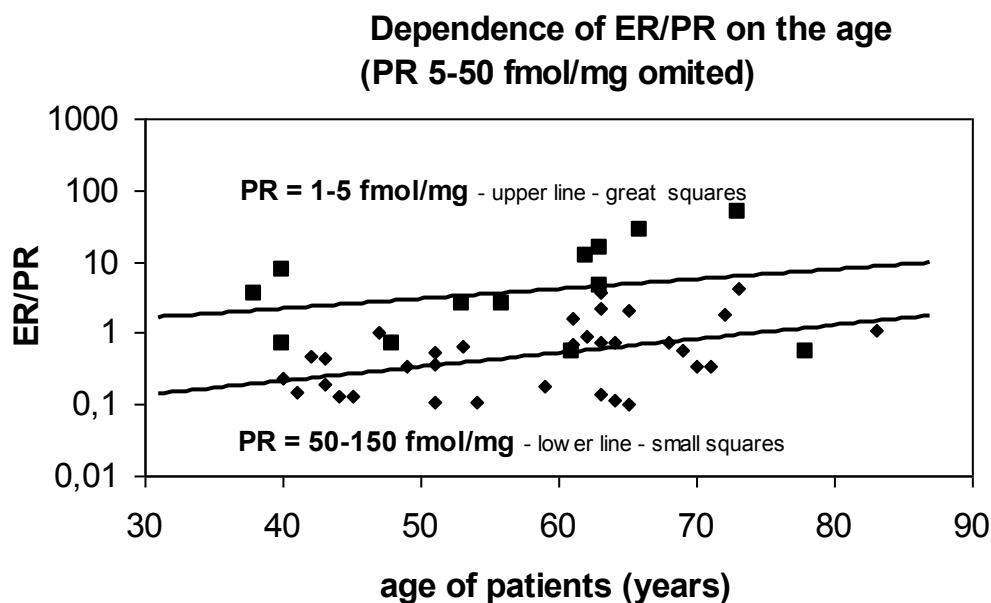
Bylo zjištěno, že nejobvyklejší (nejadekvátnější) poměr ER/PR byl vyšší u starších pacientek, ale hlavně byl přibližně 10krát nižší u vysokých PR než u nízkých PR. Proto by pravděpodobně nebylo správné posuzovat rizikovost poměru ER/PR jednotně bez ohledu na to, ze které PR specifické skupiny pochází. Hranice nebezpečného poměru ER/PR je tedy jiná u nízkého PR než u vysokého PR. Při nekorigovaném posuzování, zda u některé pacientky je ER neadekvátně vysoké nebo nízké v porovnání s jejím PR, může vzniknout více než 10 násobná chyba. Z toho vyplývá, že např. na nadměrnou tvorbu ER lze u jakékoliv (jedné) pacientky usuzovat z porovnání jejího ER/PR – nejlépe pouze v rámci její PR-limitované skupiny (a navíc s přihlédnutím k věku). To může mít význam pro léčbu a prognózu.

Z grafu č. 6 vyplývá, že ER/PR je v případě nejnižších PR více než 10krát vyšší než u nejvyšších PR (statisticky signifikantně). Vysoká PR-limitovaná skupina je pod nízkou PR-limitovanou skupinou proto, že PR je ve jmenovateli.

V grafu závislosti ER/PR na věku je skupina nádorů s vysokým PR 10krát níže, než skupina s nízkým PR (místo aby byly rozptýleny ve stejné – nebo méně se lišící úrovni). Nádory s vysokým ER/PR ze skupiny PR = 50 – 150 fmol/mg nejsou na horním okraji celého netříděného statistického souboru ale v jeho středu (jelikož většina nádorů této skupiny je v dolní polovině grafu č. 6).

Proto při využití kvocientu ER/PR je nutno brát v úvahu rozdílnost hodnot tohoto kvocientu v různých PR-limitovaných skupinách (Hochmann 2007).

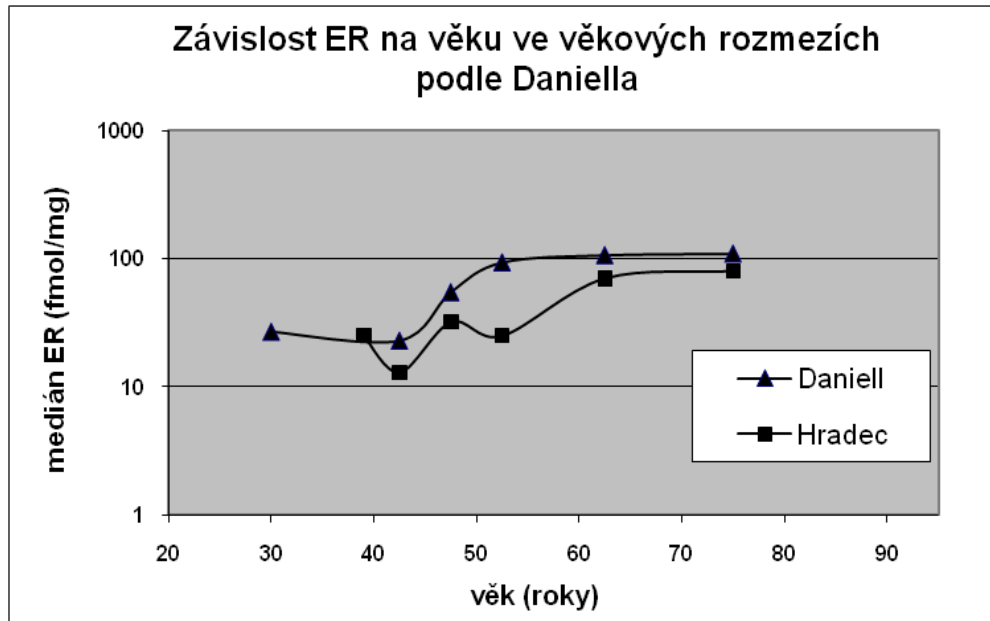
Graf č. 6 Závislosti ER/PR na věku



4.7. Abnormální hodnoty receptorů v populaci

V této rigorózní práci se však nehodláme zabývat vyhodnocováním jednotlivých pacientek, zda mají ER/PR optimální nebo extrémní. Jde nám o posuzování statistického souboru jako celku, zda je vystaven takovým vlivům, které by měnily kvocient ER/PR. Vycházíme z diplomové práce (Hanáková 2009), kde jsme porovnáním s literaturou (Daniell 1988) zjistili abnormální tvar věkového nárůstu ER viz. graf č. 7. Mohlo by v něm jít o posun menopauzy ke staršímu věku nebo naopak o přednárodovou léčbu pomocí estradiolu nebo také o jiné vlivy. To se snažíme osvětlit pomocí věkové závislosti kvocientu ER/PR v následující Experimentální části.

Graf č. 7 Závislosti ER na věku při použití Daniellových věkových intervalů



Při použití rigidních věkových rozmezí např. dle Daniella (1988) je výsledkem Daniellova statistického souboru ideální křivka v grafu č. 7 na rozdíl od nestabilního nárůstu ER v křivce hradecké nemocnice, jenž má oscilující tvar. Dochází u ní sice k počátečnímu nárůstu ER po 40. roce věku podobně jako u Daniellova souboru, ale v 50 letech je vidět nápadný pokles.

Graf mediánů ER rigidních věkových skupin podle Daniella však nebyl v diplomové práci (Hanáková 2009) schopen odhalit v hradeckém souboru skokový charakter vzestupu ER po 55. roce. V grafu s rigidně použitými Daniellovými intervaly lze tento hlavní nárůst ER u hradeckých pacientek nepravdivě chápat jako pozvolný místo skokového. Tento graf tedy není schopen odhalit i další – jemnější detaily hradeckého souboru.

Proto jsme používali nyní v rigorózní práci grafy mediánů ER/PR překrývajících se věkových skupin pacientek.

5. Praktická část

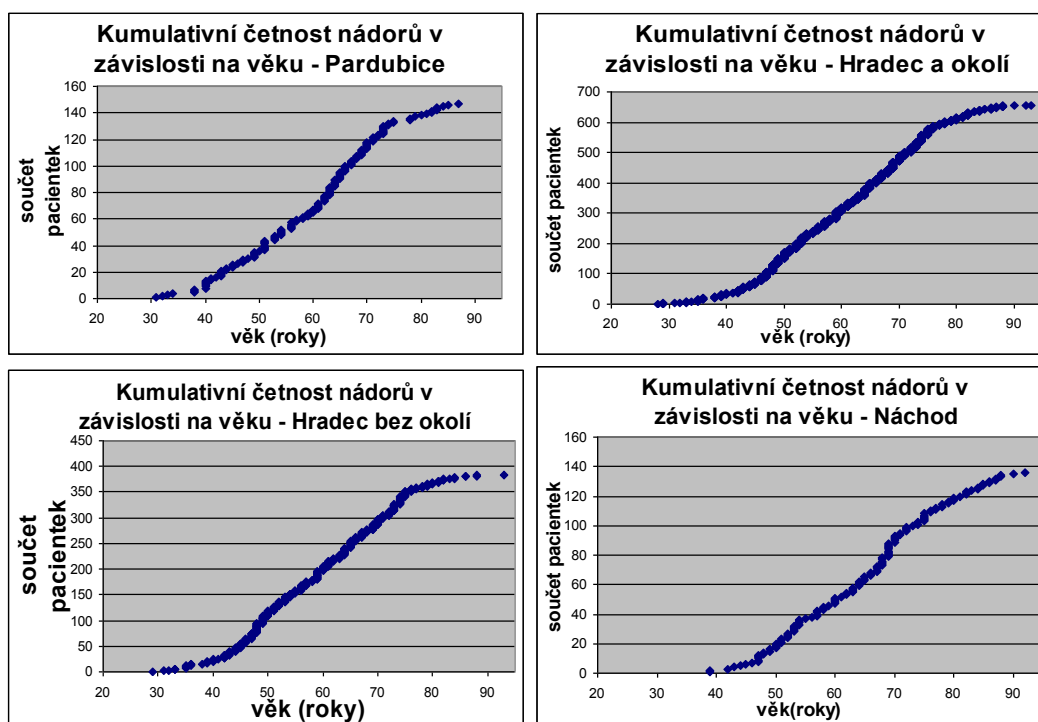
5.1. Materiál a metody

5.1.1. Výpočet frekvence výskytu nádoru v závislosti na věku

a) Grafy kumulativní četnosti

V programu EXCEL jsme celý statistický soubor všech pacientek s jejich výsledky seřadili podle věku. Do prázdného sloupce za hodnotami věku jsme vepsali pořadová čísla takto seřazených pacientek. Pak jsme sestrojili z těchto dvou sloupců graf závislosti pořadí na věku. Tím vznikla křivka, jejíž horizontálnější části znamenají, že přírůstek počtu pacientek je v tom věku jen malý (v nejnižším a nejvyšším věku). Nás především zajímal úsek nejprudšího nárůstu – kolik pacientek je v něm během 5-letého období. Podle toho jsme rozhodovali, zda v dané nemocnici budou vypočítávány např. 21-členné nebo naopak 41-členné mediány ER (nebo jiné počty). Níže jsou uvedené grafy ilustrující tento postup.

Grafy č. 8-11 Kumulativní četnosti nádorů v závislosti na věku



Nejdříve je vhodné vytvořit graf závislosti kumulativní četnosti nádoru na věku. Z něho je pak třeba zjistit, jaký je přírůstek počtu pacientek za 5 let uprostřed takového grafu a pak toto číslo použít pro řešení otázky, kolikačlenné mediány máme použít v grafu věkové závislosti ER.

b) Grafy na principu Gaussovy křivky (Výpočet průměrů incidence nově vzniklých nádorů v závislosti na věku)

Pracovali jsme opět v Excelovém souboru pacientek seřazených podle věku. Nejprve jsme do prázdného sloupce vložili u každé pacientky vzorec pro výpočet věkového přírůstku u každého nového případu (věk dotyčné pacientky minus věk předchozí pacientky). Ve většině řádků tam byla nula (stejně staré pacientky) a občas se vyskytla jednička (pacientka o rok starší než ta předchozí).

V dalším sloupci jsme pro skupiny např. 21 sousedních pacientek podobného stáří nevytvářeli mediány, ale průměry těchto přírůstků v rocích, neboť se nám to lépe osvědčilo a rozptyl v incidenci nádorů nemá logaritmicko-normální charakter. Šlo tedy o průměrný nárůst stáří pacientek, než se vyskytl další nový případ. (Hodnota tohoto zlomku byla např. 1/10 roku v případě, když bylo přesně 10 stejně starých pacientek) Počet členů těchto skupin jsme použili stejný jako v případě receptorových mediánů. V pardubickém souboru se tedy jednalo o 21-členné průměry věkového přírůstku každé nové pacientky. Jmenovaný vzorec jsme tedy vložili vždy do řádku 11. pacientky – jakožto prostřední z 21-členné skupiny.

V následujícím sloupci pak byla vypočítávána pro každý řádek obrácená hodnota tohoto zlomku – resp. věkového přírůstku z 21 případů. Šlo tedy o počet nově vzniklých případů při „zestárnutí“ souboru pacientek o rok. U pardubického souboru v některém roce přibývalo např. přibližně 5 pacientek, v jiném 3 atd..

Jestliže jsme pak v dalším sloupci vydělili tuto hodnotu celkovým počtem pacientek, tak nám pro každý řádek vyšel relativní roční přírůstek počtu pacientek. Pokud jsme jej vynásobili 100 krát, vyšel roční přírůstek pacientek jako % ze všech. Od 40 do 80 let stáří přibývalo průměrně 2,5 % pacientek za každý rok.

Tyto procentuální hodnoty jsme dali do grafu v závislosti na příslušných

mediánech věku. Osvědčilo se nám dále vložení všech křivek věkových závislostí (ER, PR, ER/PR, $\log ER + \log PR$ a křivky incidence) do téhož společného grafu.

5.1.2. Výpočet ER/PR

Nejprve jsme zrevidovali u všech pacientek hodnoty ER a PR. Pokud jsme objevili záporné hodnoty PR – jednalo se o chybu laboratoře a správná hodnota byla mezi 0 a 1. Nahradili jsme je velmi malým kladným číslem - tedy hodnotou 0,001. Učinili jsme tak proto, protože pokud by se vysoké ER dělilo nulovým PR, vznikne chyba a do grafu či do výpočtu mediánu se číslo nezařadí, neboť to pro počítač není číslo, ale nějaký text. Kdyby nulové PR nebylo nahrazeno číslem 0,001, tyto pacientky by z výpočtu zmizely.

Pokud se ale nulové nebo téměř nulové ER dělilo vysokým PR, vyjde téměř nula a nejsou s tím potíže, neboť pro výpočet mediánů není důležité, zda jsou takovéto hodnoty „pravdivě“ nízké, nebo nepravdivě téměř nulové (pokud je dostatečný počet hodnot vysokých). Ale i „záporné“ ER vzniklé chybou biochemické analýzy jsme nahrazovali kladným číslem 0,001, aby tato hodnota nebyla ztracena při jiných výpočtech v budoucnu (např. logaritmováním).

Problematická situace nastala, pokud jsme našli hodnotu $ER=1$ a PR záporné číslo. Zde může být nebezpečí, že u takovéto malé hodnoty byla použita metodika nepřesná a že skutečné PR bylo +0,5. Skutečné ER/PR by bylo $1/0,5 = 2$. Náhradou záporného PR námi používaným nejmenším kladným číslem 0,001 by vznikla tisícinásobná převaha ER nad PR, ale pravdivá by byla převaha pouze dvojnásobná.

Tento problém jsme neřešili vylučováním takovýchto pacientek z hodnocení a spoléhali jsme se, že při výpočtu mediánů alespoň z části vyruší vliv nepravdivě nulových ER (nízký ER/PR) s vlivem nepravdivě nulových PR (vysoký ER/PR).

Do excelové tabulky jsme vložili nový sloupec a nadepsali jej ER/PR. Z těchto hodnot jsme si vypočítali pětileté a také vícečlenné mediány ER/PR v závislosti na věku a postupně k nim vytvořili příslušné grafy.

5.1.3. Výpočet překrývajících se věkových mediánů ER/PR

Soubor pacientek seřazený podle věku jsme překopírovali na 5 listů Excelového dokumentu. Na 1. listu jsme vytvořili pětileté mediány ER/PR, při čemž jsme začali od věku 28 a za každou pětiletkou vložili nový řádek. Do prázdného sloupce v tomto řádku jsme vložili medián ER/PR dotyčné pacientky. Jestliže data, ze kterých jsme chtěli získat medián, byla např. ve sloupci W a jestliže jsme je chtěli zapsat do políčka ve sloupci X, potom klepnutím na volné políčko ve sloupci X → fx → medián → OK → se objevilo v novém okně černé rozmezí sloupce dat X nad políčkem o které se jedná → přepsali jsme v černém políčku souřadnice sloupce tak, aby se jednalo o sloupec W a příslušnou pětiletku → OK a objevil se příslušný pětiletý medián. Tímto způsobem jsme pokračovali až do vytvoření poslední možné pětiletky.

Ve sloupci Y jsme stejným postupem vytvořili pětileté mediány věku. Graf jsme sestrojili tak, že oba dva sloupce s mediány věku a mediány ER/PR jsme celé vzali do bloku → menu → vložit → graf → typ grafu – bodový nespojený → název grafu → popisy os → dokončit.

Na 2. listu jsme použili postup analogický jako na listu 1, ale tak, že pětiletky byly 29 – 33 (včetně 33), 34 – 38 (včetně 38), 39 – 43 atd. a vytvořili jsme nový graf. Poté na listu 3 totéž, jen s pětiletkami 30 – 34, 35 – 39 až do nejvyšší možné pětiletky. Pak menu → vložit → list – a vše jsme zopakovali na 4. listu. Totéž analogicky na 5. listu – od 31. roku.

Pak jsme vždy klepnuli myší na jeden z grafů → CTRL C a přesunuli se na 6. list → CTRL V a tímto způsobem jsme přenesli na tento list všechny grafy. Dále levým tlačítkem dvojklik na libovolný bod v prvním grafu – vyskočilo okno, ve kterém jsme vybrali např. modrou barvu např. ve všech grafech nebo jen v prvním grafu v závislosti na našich záměrech.

Dále jsme levým tlačítkem klikli na libovolný graf a dali jsme příkaz CTRL C a na nové místo v tomto listu a pak jsme jej vložili pomocí CTRL V – objevil se překopírovaný graf na novém místě. Stejně jsme zkopírovali i další grafy, ale místo nového místa v tabulce jsme klikli na již překopírovaný graf a poté CTRL V – v grafu se objevily nové body. Takto jsme překopírovali všechny grafy do sebe a výsledný spojený graf jsme nazvali graf 5-letých mediánů.

5.1.4. Výpočet mediánů ER/PR upřednostňujících počet pacientek místo věku

Tato metoda např. 41-členných mediánů je rychlejší než metoda překrývajících se sousedních mediánů. Nevyžaduje vytvoření např. 5 kopií analyzovaného souboru dat a oddělování např. 5letých skupin pacientek vložím prázdného řádku.

V EXCELOvém souboru pacientek seřazených podle věku jsme nejprve do prázdného sloupce vedle prostřední pacientky z první 41-členné skupiny vložili vzorec pro výpočet mediánu ER/PR prvních 41 pacientek (= ke 21. pacientce). Potom jsme tento vzorec překopírovali do vhodného počtu řádků tohoto sloupce (nikoliv k prvním 20 a posledním 20 pacientkám). Do výpočtu nesmí být zahrnut žádný řádek bez pacientky. Analogicky jsme vytvořili 41-členné mediány věku.

Na podkladě těchto dvou sloupců jsme sestrojili graf závislosti mediánů ER/PR na věku. V porovnání s grafem 5-letých skupin v něm nevznikly žádné body v nejnižším a nejvyšším stáří pacientek, neboť v nich bylo málo pacientek. Jejich hodnoty ER/PR ale byly zahrnuty do výpočtu mediánů sousedních věkových období. V těchto grafech upřednostňujících počet pacientek je množství bodů daleko větší než v grafech upřednostňujících věk. Je to proto, že každá pacientka je centrem skupiny, ze které se vypočítává medián (kromě 20 pacientek nejstarších a 20 nejmladších v případě grafu 41-členných mediánů).

Počet členů (41 nebo jiný vhodný počet) jsme volili především tak, aby v grafu např. 41-členných mediánů byl přibližně stejný počet pacientek ve skupinách pro výpočet mediánů jako uprostřed grafu 5-letých mediánů. V tom případě (alespoň uprostřed grafu) tvar vzniklé vlnovité závislosti v grafu 41-členných mediánů je velmi podobný grafu 5-letých mediánů. Tento počet jsme odhadli z grafů věkové závislosti kumulativní četnosti nádorů.

Ale konečné rozhodnutí o počtu pacientek pro výpočet těchto mediánů vznikalo i na základě dalšího požadavku – aby vzniklá křivka začínala přibližně ve 40 a končila přibližně v 80 letech – jak u velkého souboru hradecké nemocnice – tak u malého souboru nějaké jiné nemocnice. Nakonec jsme použili kompromis mezi těmito přístupy.

5.1.5. Komplikovanější zásady v použití grafů upřednostňujících počet pacientek

a) Problematika oblastí řídkého výskytu nádorů

Jakákoliv věková období s malým počtem pacientek a tím s velkou náhodností se v grafu např. 41-členných mediánů spojují se svým okolím do početnějších skupin pacientek. Proto se při upřednostnění počtu pacientek pro výpočet mediánů může výhodně zmenšovat náhodnost hodnot nejen na „velmi řídkých“ okrajích tohoto grafu, ale kdekoliv uprostřed. To eliminuje náhodně přítomné extrémní hodnoty lépe než v grafu 5-letých mediánů. Velikost skupiny pacientek můžeme měnit podle toho, jak hodně chceme „vyhladit“ variabilitu.

Problém nastává, pokud odlišnosti od převažující věkové skupiny u extrémně mladého nebo extrémně starého věku jsou pravdivé nikoliv náhodné. Tak by mohlo dojít i k nepravdivému začlenění hodnot ER/PR těchto osobitých krajních věkových skupin do sousedních věkových oblastí. Tato metoda upřednostňující věk má tedy největší použitelnost pro řešení závislostí uprostřed studovaného věkového období. Navíc, čím více vyhlazujeme graf zvětšováním počtu členů mediánů, tím více se zkracuje rozsah grafu. Tak se může arteficiálně zvětšit šikmost čáry proložené celým grafem. Proto, kromě grafů upřednostňujících počet pacientek stále používáme i grafy pětiletých mediánů, aby případné rozpory zůstaly viditelné.

b) Arteficiální vyhlazování vln

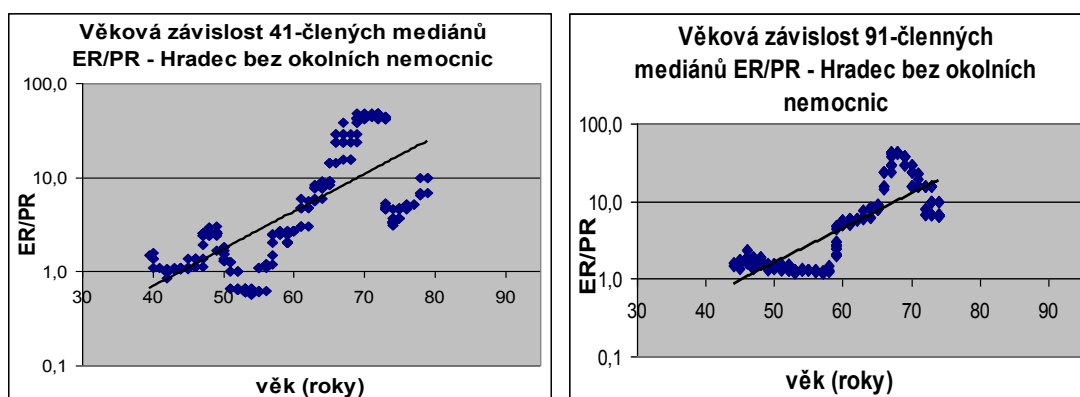
Také skokový charakter hlavního nárůstu ER/PR uprostřed grafu posuzovaný ze směru spojnic příliš velkého počtu sousedních bodů se tímto postupem může (naopak) arteficiálně snižovat.

Proto jsme se v grafech upřednostňujících počet pacientek snažili používat takový počet pacientek pro výpočet mediánu, který byl přibližně stejný jako počet pacientek ve středním věku u grafů 5-letých mediánů (Hochmann a spol. 2010).

c) Arteficiální přerušení nárůstu vlny

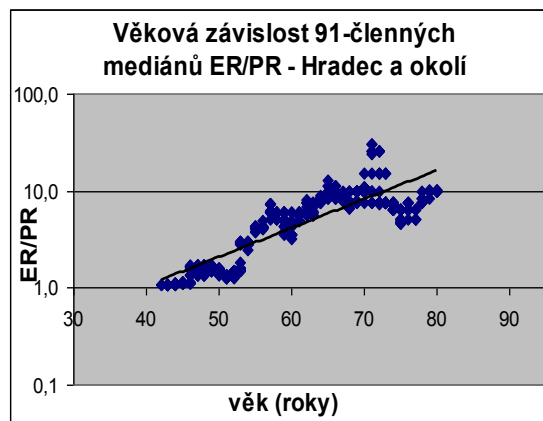
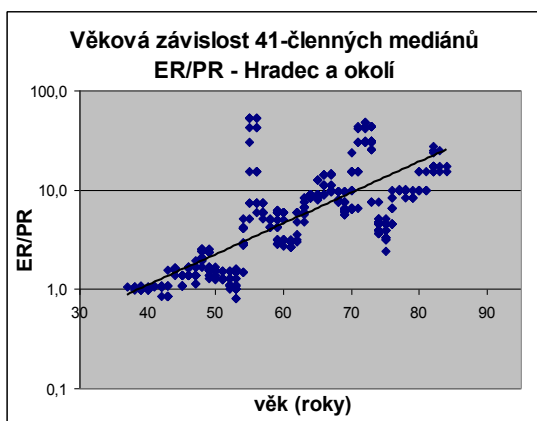
Je důležité upozornit na skutečnost, že graf ER/PR u pacientek z Hradce bez okolních nemocnic nemůže být 91-členný, jelikož vyhlazování rozkolísanosti proběhlo v tomto grafu již příliš agresivně. Tím vznikl kolem 60. až 65. roku velmi nepravdivý náznak horizontalizace, který se v grafu 41-členných mediánů neobjevuje. Díky této skutečnosti musí být graf upřednostňující věk pouze hradeckých pacientek 41-členný. V níže uvedených metodických grafech je ilustrováno, proč jsme se rozhodli nepoužívat nakonec 91-členné skupiny pro výpočet mediánů u Hradce samotného, ale použili jsme jej u Hradce s okolními nemocnicemi.

Grafy č. 12-13 Závislosti ER/PR na věku



Při porovnání 41-členného grafu s grafem 91-členným pacientek (naopak) z Hradce a okolí se v 41-členném grafu objevil kolem 55. roku vysoký hrot, který se ve vícečlenném grafu nevyskytuje. Zmenšením počtu pacientek zahrnutých do jednoho bodu se tedy pohled na statistický soubor zcitlivuje, ale nelze říci, jestli by tento hrot mohl něco důležitého signalizovat, nebo zda je toto zjemnění již příliš velké, takže zde vynikají nic neříkající náhodné odchylky. Díky vytvoření skupin s větším počtem pacientek se tak vyhladí oblasti rozkolísanosti grafu.

Grafy č. 14-15 Závislosti ER/PR na věku



6. VÝSLEDKY

6.1. Závislost ER/PR na věku

6.1.1. Grafy upřednostňující věk

Pardubice

V pardubickém souboru jsme zjistili, že u premenopauzálních pacientek kolem 30. až 40. roku není patrná převaha ER nad PR. Až po 50. roce nastává převaha ER nad PR. Okolo 60 let hodnoty ER dosahují jeden a půl až dvojnásobku hodnoty PR a tato převaha neustále roste až k 70. roku života ($ER/PR = 3$ až 4). Tuto hodnotu lze nejspíše odečítat na grafech s lineární osou y v příloze. V této oblasti grafu už jsou ale vidět značné rozkolísanosti hodnot.

Přímka proložená celým věkovým rozsahem v grafu s logaritmickou osou y má jednoznačně vzestupnou tendenci – snad o něco příkřejší než u ER samotných. Ale bylo by možné proložit dvě přímky jednou premenopauzální a druhou postmenopauzální, která by byla horizontálnější. To by svědčilo o skokovém nárůstu. Ten je naznačen mezi 54. a 56. rokem.

Hradec a okolí

V grafu zahrnujícím pacientky z Hradce a okolí je u premenopauzálních pacientek kolem 30. roku téměř čtyřnásobná převaha hodnot ER nad PR s následnou klesající převahou až k 40. roku, kde hodnoty ER se přibližují hodnotám PR ($ER/PR=1$). K nástupu menopauzy nastává opět pozvolná převaha ER nad PR až k dvojnásobným hodnotám a po 55. roku je patrný prudký nárůst až k desítnásobným hodnotám, kdy ER takto převyšuje PR. Od 70. roku jsou hodnoty značně rozkolísané.

Čára proložená celým věkovým rozsahem má jednoznačně vzestupnou tendenci. Ale velmi se zde vnucuje myšlenka o skokovitém nárůstu po menopauze (po 55. roce). Jak premenopauzální tak postmenopauzální přímka by pak byly prakticky horizontální.

Hradec bez okolních nemocnic

Co se týče hradeckého souboru zahrnujícího pouze hradecké pacientky, u premenopauzálních pacientek kolem 30. roku jsou patrné dvojnásobně vyšší hodnoty ER než PR ($ER/PR=2$), což není příliš znatelné u pardubického souboru, kde kolem 32 let jsou hodnoty ER/PR menší než 1. Instruktivněji je to demonstrováno při použití lineární osy y v Příloze. Kolem 40. roku je vidět mírný pokles ER/PR a poté až k 50 letům (k nástupu menopauzy) nastává skutečnost, že ER trojnásobně převyšuje hodnoty PR a tedy hlavně zde vidíme odlišnost od pardubického souboru. Po 50. roce nastává druhý pokles, který znamená nepříliš odlišné hladiny ER a PR.

U postmenopauzálních pacientek od 55. roku nastává několikanásobný až mnohonásobný nárůst ER na úkor PR, který dosahuje v 60 letech až osminásobku a k 70. roku až čtyřicetinasobku ($ER/PR = 40$). Po 70. roce je opět patrná značná neuspořádanost hodnot.

Proložení přímky je komplikováno vlnovitým průběhem, ale je možno přiklonit se k popisu analogickému jako u Hradci a okolí (tedy před menopauzou je ER/PR kolem 1,0 a u postmenopauzálních pacientek kolem 10).

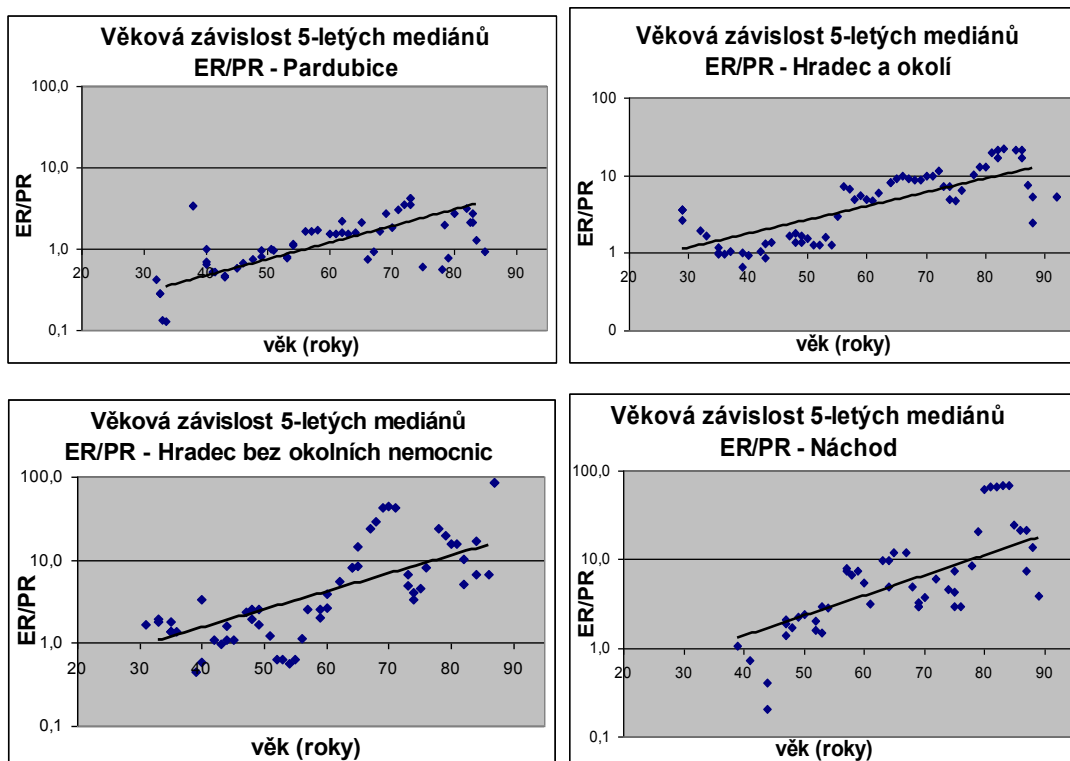
Náchod

V méně početném souboru náchodských pacientek dosahují hodnoty ER a PR u premenopauzálních žen přibližně obdobných hodnot (tedy ER/PR se blíží jedné). Koncentrace ER řádově nepřevyšují PR. Po 50. roce vidíme dvojnásobně vyšší hodnoty ER než jsou koncentrace PR. A tato převaha ER nad PR stoupá stále více až k 60. roku, kde dosahuje až osminásobek. Po 60. roce následuje vlnitý průběh mediánů ER/PR vedoucí přibližně v horizontále až k 80. roku s hodnotami ER až desetinásobně převyšujícími PR. Kolem 80 let je evidentní prudká šedesáti až sedmdesátinasobná převaha hodnot ER nad PR. Musíme ale brát v úvahu, že jde o méně početnou skupinu takto starých pacientek.

V 85 letech je ER/PR asi 20. Po 85 letech pak následuje pokles mediánu ER/PR opět možná zaviněný variabilitou z malého počtu pacientek.

Proložená přímka má jednoznačně vzestupný charakter na rozdíl od ER samotných. Je možno uvažovat o skokovitém nárůstu ER/PR po 55. roce. Tak by bylo možno proložit dvě horizontálnější přímky – jednu premenopauzální a druhou postmenopauzální.

Grafy č. 16-19 Věkové závislosti ER/PR upřednostňující věk pacientek



Společné shrnutí výsledků obou laboratoří:

Při výsledném porovnání hradecké a pardubické laboratoře můžeme říci, že u premenopauzálních pacientek ve 40 letech jsou koncentrace ER a PR obdobné (ER/PR je kolem 1), pak začíná k nástupu menopauzy narůstat převaha ER nad PR. U pardubického a náchodského souboru je evidentní před 50. rokem nárůst, který se u grafu hradeckých pacientek spíše neobjevuje. Hodnoty kolem 80 let jsou u pardubických pacientek pod proloženou přímku na rozdíl od ostatních souborů. Tak u hradeckých i náchodských pacientek dosahují hodnoty ER/PR několikanásobně (až desetinásobně) vyšších hodnot než u pardubických pacientek.

Pokud by byla hledána oblast skokového nárůstu ER/PR, bylo by možno ji lokalizovat do stáří 55 let. Avšak není pozorovatelná lépe než u ER v dalších kapitolách. Dostí výrazná je v náchodském souboru – zvláště po eliminaci nejmladších pacientek. Díky nim se vytvořil ostrý skokový nárůst ER/PR ve sloučeném souboru „Hradec a okolí“. Rozptýl hodnot kolem proložené čáry je podobný jako u ER. V porovnání s pardubickou laboratoří jsou výsledky hradecké laboratoře trojnásobné.

6.1.2. Grafy upřednostňující počet pacientek místo věku

Pardubice

Výsledky jsou podobné jako u grafu upřednostňujícím věk, ale zmizela počáteční a konečná rozkolísanost. Mezi 65. a 70. rokem se zde objevil velmi nápadný pokles, který byl v grafu 5-letých mediánů jen naznačen.

V souboru pardubických pacientek dosahují hodnoty ER v premenopauzálním věku v průměru nižších hodnot než jsou hodnoty PR (ER/PR je menší než 1). S přibližným nástupem menopauzy (resp. mezi 50. a 55. rokem) dochází k tomu, že začíná převažovat ER nad PR. Toto nastává kolem 60. roku, kde jsou koncentrace ER téměř dvojnásobně vyšší než PR. Kolem 70 let je převaha ER ještě vyšší.

Hradec a okolí

Co se týče grafu 91-členného mediánu zahrnujícího pacientky z Hradce a okolních nemocnic, u premenopauzálních žen jsou opět hodnoty ER a PR podobné (ER/PR jsou kolem jedné). S příchodem menopauzy je možné vidět pozvolna nastupující převahu ER nad PR. Tato převaha ER je k 60. roku téměř pětinašobná - tedy mnohem vyšší než je patrné v pardubickém souboru. Kolem 65. let je převaha ER přibližně desetinašobná a kolem 70. roku až téměř třicetinašobná (nikoliv čtyřicetinašobná jako v grafu 5-letých mediánů). Zatímco v grafu 5-letých mediánů je maxima dosaženo ve věku kolem 80 let, v grafu upřednostňujícím věk je maximum posunuto do oblasti 70. roku.

O možnosti proložení přímek lze říci totéž co u grafů upřednostňujících věk.

Hradec bez okolních nemocnic

U grafu 41-členných mediánů (viz graf č. 22) je výsledné řazení bodů věrným obrazem podobným grafu upřednostňujícímu věk. Pouze zmizely okrajové nepřesné oblasti.

Z grafu pouze hradeckých pacientek premenopauzálního věku můžeme vyčíst před 50. rokem hrotovitou vlnu nárůstu s následujícím poklesem do 55. roku. Druhá vlna nárůstu nastává s nástupem menopauzy – respektive po 55. roce. Tato převaha ER nad PR postupuje až k 72. roku, kde je tato převaha až osmačtyřicetinásobná. Od 73. let nastává prudké snížení převahy ER na pouze pětinasobek. To pak ale krátce stoupá na $ER/PR = 10$. Rozdíl oproti křivce 5-letých mediánů zde tedy není – jenom se vše zvýraznilo.

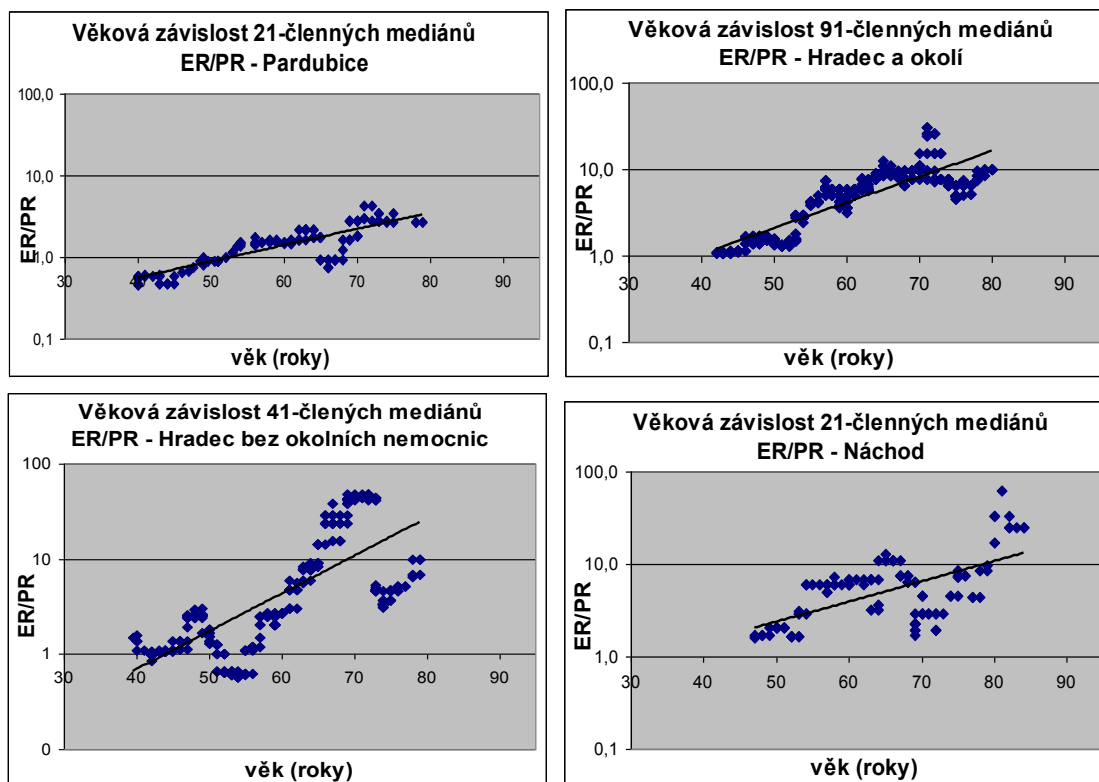
Přímka proložená celým věkovým rozsahem je jednoznačně vzestupná. U pouze premenopauzálních pacientek by bylo možno proložit horizontální přímku, ale u postmenopauzálních převládá vlnovitost nejextrémnějšího rázu.

Náchod

Výsledky jsou vyhlazenější než u grafu upřednostňujícího věk. U náchodských pacientek je převaha ER nad PR kolem 50. roku přibližně dvojnásobná a postupně se zvyšuje, k 60. roku je sedminásobná a k 65. roku přibližně dvanáctinásobná. Okolo 70 let dochází k poklesu převahy ER nad PR k dvojnásobku a k 80. roku opět nastává mnohonásobně výraznější převaha ER nad PR. V porovnání s grafem 5-letých mediánů zde vymizely věkové kategorie nejmladších a nejstarších, které měly nejnižší resp. velmi nízké ER/PR.

Kromě přímky proložené celým věkovým obdobím lze uvažovat i o proložení přímky- jen pro premenopauzální pacientky, ale ta by byla nesmírně krátká (45-55 let) neboť v náchodském souboru je velmi málo nejmladších pacientek. Na takovouto horizontálu neukazuje graf 5-letých mediánů – kvůli nejnižším hodnotám ER/PR u nejmladších pacientek.

Grafy č. 20-23 Věkové závislosti ER/PR upřednostňující počet pacientek



Společná shrnutí obou laboratoří:

V případě grafů upřednostňujících počet pacientek lze u ER/PR shrnout výsledky podobně jako u grafů upřednostňujících věk. Odlišnosti jsou v tom, že v případě grafů upřednostňujících počet pacientek jsme získali vyhlazené křivky s vymizením krajních rozkolísaností grafu.

V grafu 91-členných mediánů pouze hradecké nemocnice umazáváním okrajů grafu získává proložená přímka k 60. roku arteficiálně prudší stoupání - při porovnání s grafem 5-letých mediánů. Mezi 60 a 65 lety se soustava bodů arteficiálně linearizuje do směru proložené čáry. Naproti tomu v grafu 41-členných mediánů ER/PR ani v grafu 5-letých mediánů pouze hradecké nemocnice žádná linearizace není. Proto je pravdivý a použitelný.

Rozkolísanost je kromě postmenopauzálního „skoku“ prakticky v každém souboru jiná. Např. u pardubických pacientek je po 65. roce největší pokles, kdežto u hradeckých prudký vzestup a u náchodských je jeden z nejvyšších vrcholů.

Před 70 lety je v pardubickém souboru pokles ER/PR a u náhodského souboru je přesně v 70 letech. U hradeckého souboru je největší postmenopauzální pokles až po 70. roce. Ale je dominantní naopak vlna nárůstu ER/PR v 60 až 70 letech.

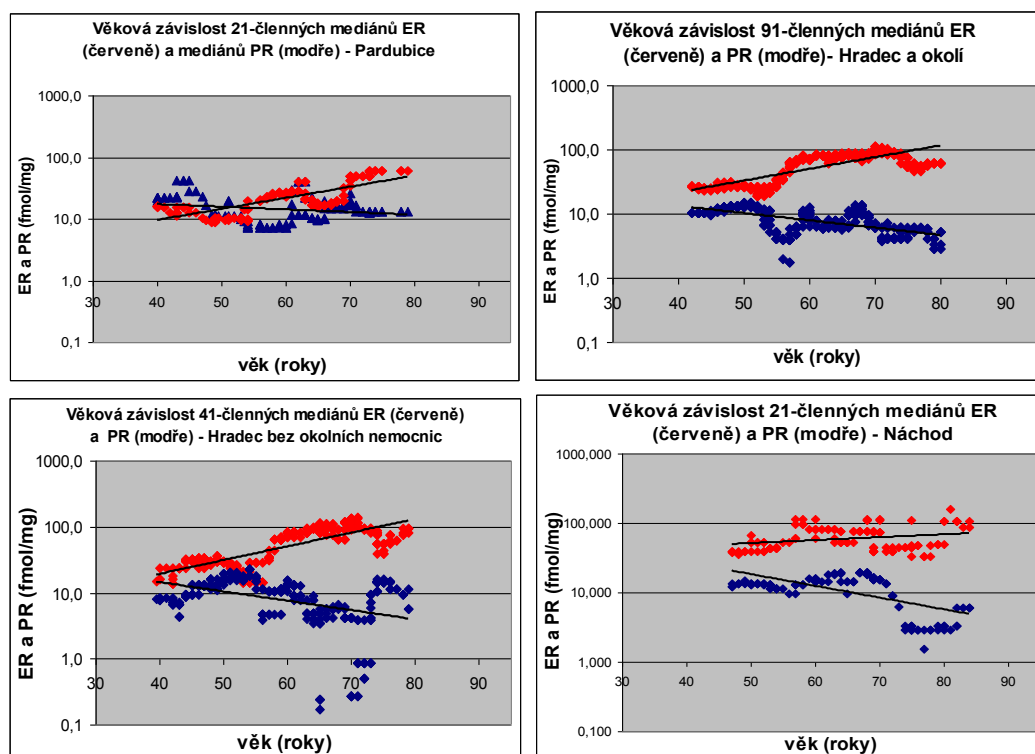
Jestliže se budeme snažit o optimistický pohled, lze uvést následující: V postmenopauzálním průběhu lze u všech nemocnic nalézt nápadný pokles kolem 70 let, který by mohl mít stejnou příčinu (např. hormonální substituční terapii – podávanou v jiné nemocnici – jinak starým pacientkám).

6.2. Společné posouzení všech parametrů v každé nemocnici

6.2.1. Společné posouzení ER a PR bez výpočtu zlomku ER/PR

Jestliže jsme křivku ER a křivku PR (vytvořené v rámci diplomové práce) zakreslili nyní – v rámci rigorózní práce - do společného grafu, vykreslila se především u souboru z hradecké nemocnice samotná osová symetrie těchto dvou křivek.

Grafy č. 24-27 Závislosti ER a PR na věku



V grafech závislosti ER a PR je u hradeckého a pardubického souboru pokles ER provázen vzestupem PR a naopak, zatímco u náchodského souboru je tomu tak jen u mladších pacientek, kdežto u starších tomu tak není. Zde je u nejstarších pacientek pokles ER provázen poklesem PR (75-80 let).

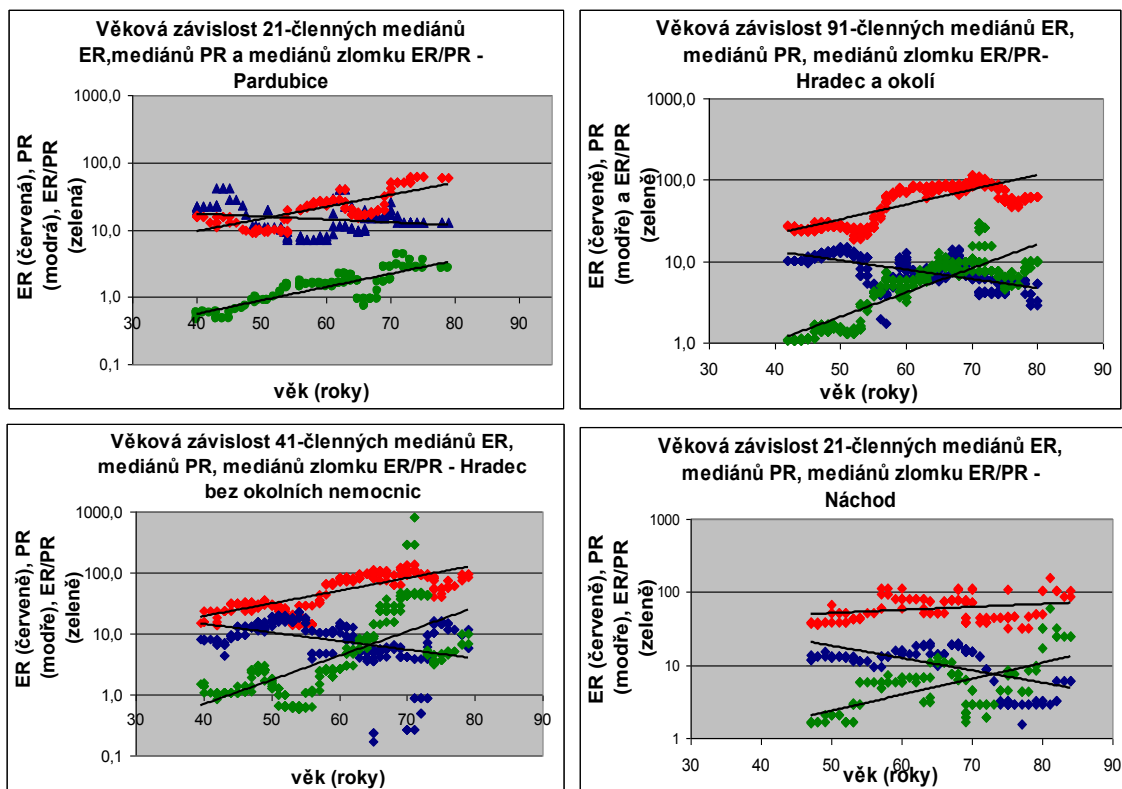
S rostoucí koncentrací ER se zároveň snižuje koncentrace PR. Je to dáno tím, že při snížení koncentrace estradiolu, je produkováno ER více, aby se příliš nesnížila hladina signálu. To potvrzuje i poznatek, že v menopauze roste hladina ER v důsledku snížení hladiny estradiolu v těle, a většina nádorů v tomto věku je ER(+). Snížením hladiny estradiolu dochází následně i k poklesu koncentrace PR, neboť ER signál pro tvorbu PR je přece jen snížen (viz. grafy č. 24-27).

6.2.2. Přidání ER/PR do společného grafu s ER a s PR

Na základě skutečnosti, že při vzestupu ER klesá PR, lze říci, že ER/PR by mělo tvořit nejsignifikantnější nález a to je důvod proč se tímto zlomkem zabýváme. V následujících grafech je názorně vidět, že při poklesu ER naopak roste PR a tento fakt

se nejvýrazněji projevuje jako vlna po 55. roce. U hradeckého souboru samotného je nárůst ER/PR nejvyšší a zároveň nejdelší, neboť tam velmi klesá PR vlna kolem 70. roku. V grafu si můžeme všimnout, zda-li je vzestup zlomku ER/PR vyvolán nárůstem ER nebo poklesem PR nebo současně vzestupem ER a poklesem PR v jednom témže věku.

Grafy č. 28-31 Věkové závislosti ER, PR a zlomku ER/PR na věku



6.2.3. Přidání ER*PR neboli logaritmického součtu receptorů

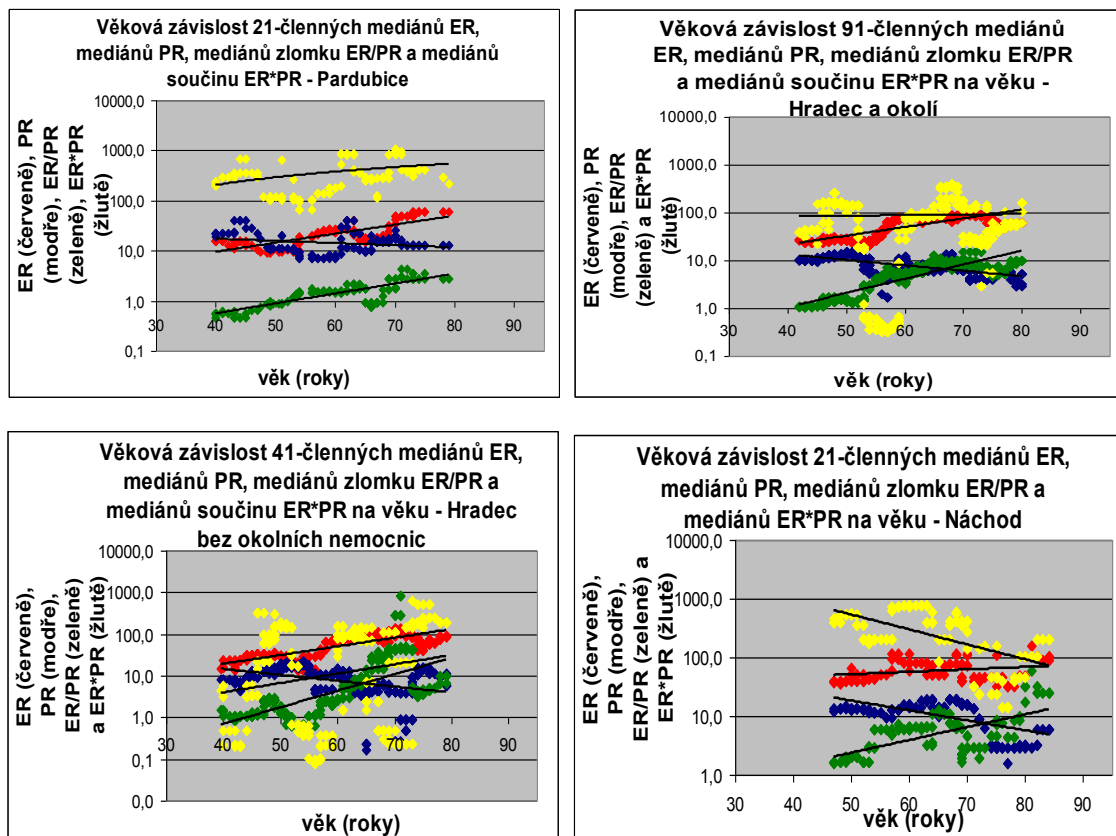
Pomocí součinu ER*PR – neboli – po zlogaritmování = logaritmického součtu (součet logaritmu ER a logaritmu PR u každé pacientky) jsme zjišťovali, zda-li je nádor závislý nebo nezávislý na estrogenech. V tomto případě nezáleží na tom, zda pacientka před diagnostikou nádoru prsu užívala HST, jelikož tato léčba arteficiálně snížila hladinu ER, ale zároveň arteficiálně zvýšila koncentraci PR a logaritmický součet tedy zůstává přibližně stejný. Logaritmický součet má však jednu nevýhodu – pokud nám vyjde PR rovno nule, tak nulou nelze dělit ani pořádně násobit. A pak je velice zásadní pro

výsledný součin nebo podíl, zda jsme takovéto hodnoty zaokrouhlovali na číslo 0,1 nebo 0,01.

V případech, kdy dochází k poklesu součinu ER*PR se přestávají tvořit ty nádory, které jsou hormonálně závislé. To znamená, že se netvoří takové nádory, které mají vysoké jak ER tak PR. Údaj o stáří, kdy k tomuto dochází je pravdivý a nejedná se o laboratorní artefakt.

U pardubické laboratoře byl nejhlubší pokles ER*PR kolem 55. roku a totéž lze říci o hradeckých pacientkách samotných. V náchodském souboru je v tomto věku také nápadný a velmi ostrý pokles ER*PR, ale zdaleka není nejhlubší. Druhý pokles ER*PR je v pardubickém souboru před 70. rokem, v hradeckém souboru samotném přibližně také a v náchodském by tomu z části mohl odpovídat největší pokles mezi 70 a 80 lety. U hradeckých je ještě premenopauzální pokles s ER/PR.

Grafy č. 32-35 Závislosti ER, PR, ER/PR a ER*PR na věku

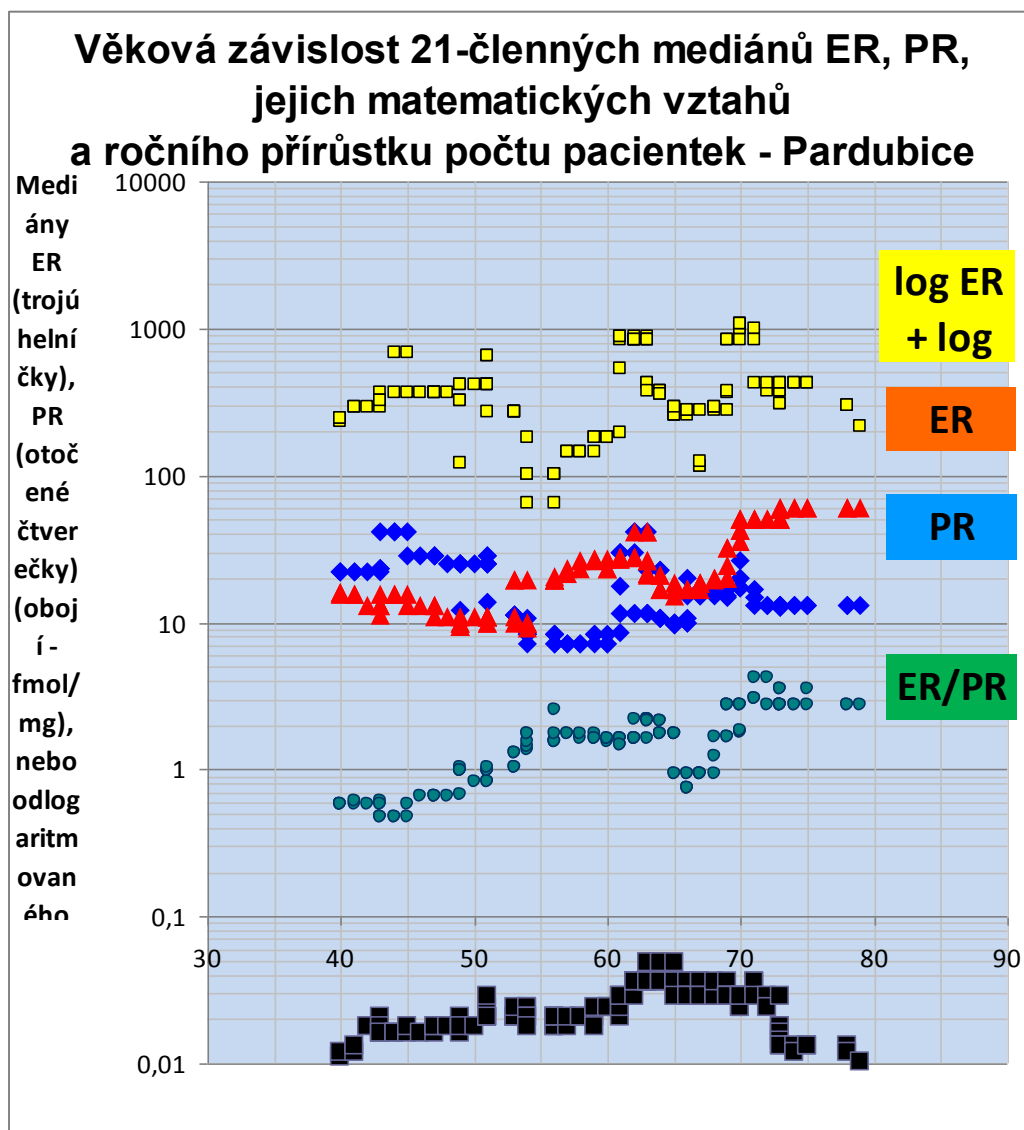


V hradeckém souboru se objevily 3 poklesy žluté křivky logaritmického součtu (ER*PR) a ten nejvýraznější z nich se projevil i v případě, když byl spojen hradecký soubor s náhodským.

6.2.4. Přidání křivky výskytu nádorů do společného grafu s ER, PR, ER/PR a ER*PR

Tento krok jsme udělali pouze u pardubického souboru. Nárůst počtu nádorů se vykreslil do období kolem 65 let – tedy do období postmenopauzálních změn ER a PR specifických pro pardubický soubor.

Obr. č. 1.: Závislost hodnot steroidních receptorů a dalších parametrů na věku pacientek



6.3. Výsledky orientačního monitorování léčby hormonálními přípravky

V pardubickém grafu incidence nově vzniklých nádorů v závislosti na věku je patrné, že s poklesem ER kolem 65 let je spjat nárůst vzniku nádorů. Dalšími městy jsme se dále již nezabývali a problematiku jsme rozšiřovali následujícím směrem.

Z databáze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze se nám podařilo získat data o preskripci hormonálních preparátů (zejména se jednalo o gynekologicko-porodnickou

kliniku) v roce 2008 – 2009. Jednalo se o přípravky předepisované postmenopauzálním pacientkám k řešení jejich klimakterických obtíží spojených s nástupem menopauzy. Jednalo se jak o preparáty obsahující pouze estrogenovou složku, tak o kombinaci estrogen-progestin anebo samotný progestin s ATC kódem G03 – pohlavní hormony a léky ovlivňující urogenitální systém.

Na základě toho jsme zjišťovali, které konkrétní preparáty zaujaly přední místa v žebříčku předepisovaných léčiv v předchozích dvou letech a o jaký typ hormonů se jednalo. Soubor zahrnoval kód ATC skupiny, název přípravku, kód SÚKLu, typ lékové formy. Některé údaje při výsledném třídění bylo nutné vyjmout z důvodů např. výskytu několika různých kódů SÚKLu v číselníku léčiv u jednoho preparátu.

Celkový počet předepsaných hormonálních přípravků v roce 2008 ve VFN činil 9875 preparátů.

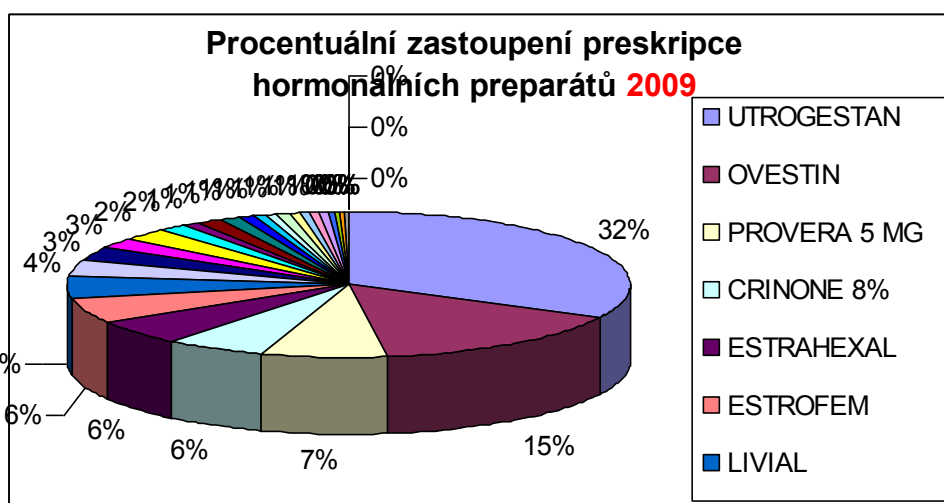
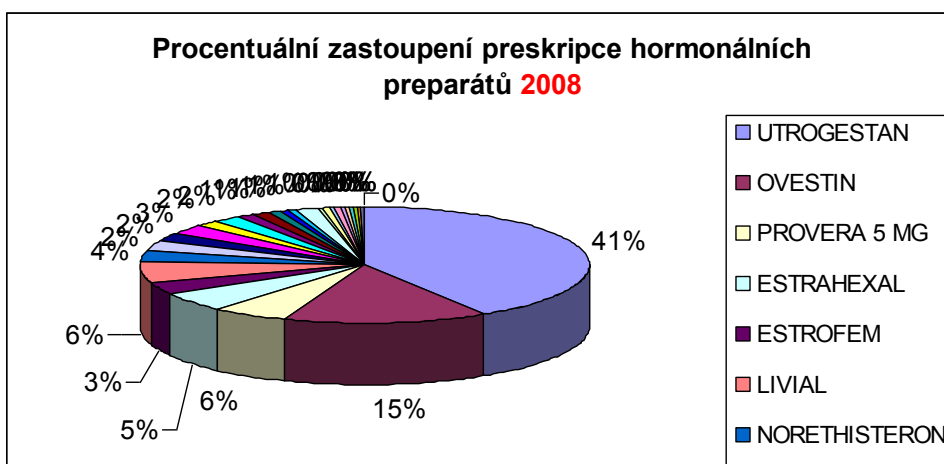
Nejčastěji předepisovaným hormonálním přípravkem za tento rok se stal Utrogestan (41 % celkové preskripce hormonů v postmenopauze) obsahující samotný progesteron, který se podává v rámci HST v kombinaci s estrogenem. 15% tvořil Ovestin (systémově či lokálně formou vaginálních tablet nebo krému) obsahující estriol. Třetí místo v žebříčku zaujímal přípravek Provera s progestinovým účinkem (6%), který se používá především v onkologické indikaci (léčba recidivujícího karcinomu prsu a endometria). Tibolon obsažený v přípravku Livial zaujal až 6. místo v žebříčku. Viz graf č. 36.

V roce 2009 se počet předepsaných hormonálních přípravků snížil oproti předešlému roku z 9875 na 9680. Důvodů může být několik – pacientky mohly dokonce i změnit svého lékaře, úmrtí nebo ukončení hormonální terapie.

V tomto roce zaujaly výše zmíněné přípravky stejná místa, avšak u Utrogestanu se snížilo procentuální zastoupení na 32 %, ostatní již zmíněné přípravky se příliš nelišily – Ovestin 15 % a Provera 7 %. Tibolon (Livial) se nacházel na 7. místě.

V Grafu procentuálního zastoupení proskribovaných přípravků dle ATC skupin se na prvním místě umístil preparát zařazený pod označení G03DA04, kde G značí léčivo používané u onemocnění urogenitálního ústrojí a pohlavní hormony a 03 – pohlavní hormony a modulátory genitálního systému.

Grafy č. 36-39 Procentuálního zastoupení preskripce rok 2008-2009



Povaha hormonálních přípravků z posledních grafů

Utrogestan – progestin

Ovestin – estrogen

Provera – progestin

Estrahexal – estrogen

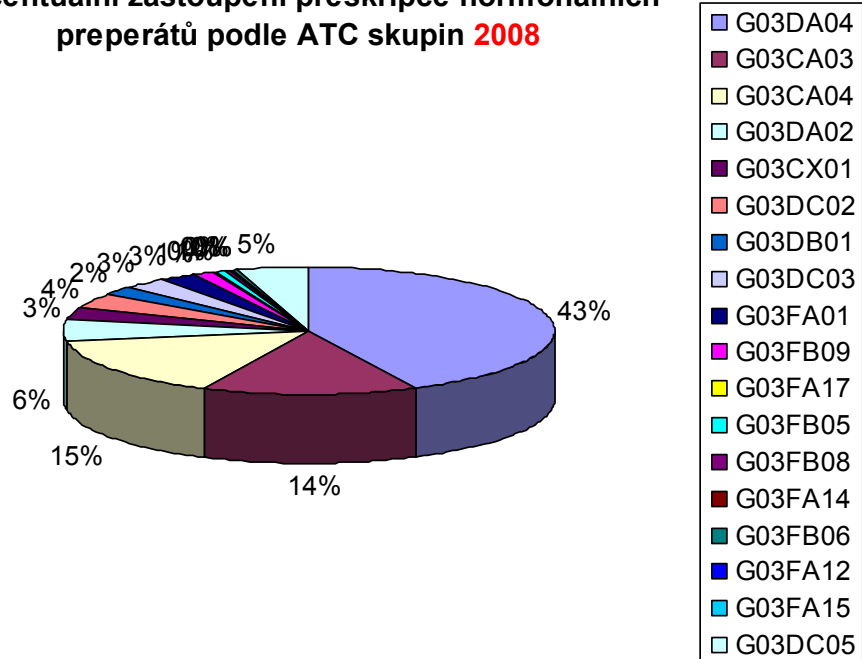
Estrofem - estrogen

Livial – progestinový i estrogenový účinek

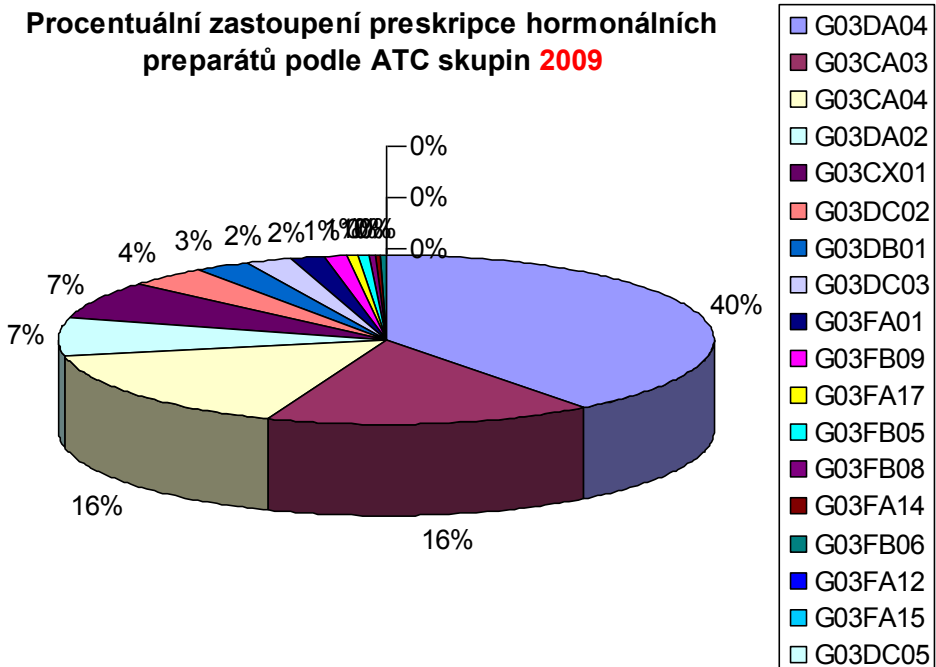
Norethisteron – progestin

Crinone – progestin

Procentuální zastoupení preskripce hormonálních preparátů podle ATC skupin 2008



Procentuální zastoupení preskripce hormonálních preparátů podle ATC skupin 2009



7. Diskuse

Použitými statistickými metodami jsme se snažili eliminovat chyby laboratoří a vystihnout hlavní podstaty biologických dějů. Ale teprve po provedení náročného statistického zpracování je možno usuzovat, zda některé zásady provedeného statistického postupu neměly být zvoleny jinak. Jde např. o nahrazování nulových hodnot receptorů malými kladnými čísly.

Navíc vznikla situace umožňující zobrazit zde větší počet parametrů (ER, PR, ER/PR, ER*PR) „formálním“ nasazením jednotného postupu. Tímto nasměrováním je ovšem znemožněno řešit s větší důkladností parametr jeden.

7.1. Výška ER/PR z hlediska mezilaboratorních metodických rozdílů

V hradecké laboratoři byly zjištěny hodnoty ER u premenopauzálních žen přibližně stejné jako PR (ER/PR=1), zatímco u pardubického souboru v tomto věku byly nižší ER než PR. Proložená čára je u hradeckého souboru v tomto věku přibližně dvojnásobně vyšší než u pardubického. Zatímco u pardubické laboratoře je převaha ER v 60. roce přibližně jedna a půl násobná, u hradecké až pětinásobná. Z toho vyplývá, že proložená čára u hradeckého souboru je přibližně třikrát vyšší než v pardubickém.

Je tedy nebezpečné převzít rozhraní pro nepříznivý poměr ER/PR z literatury. Každá laboratoř by si měla vytypovat své vlastní rozhraní jak velký poměr ER/PR svědčí již o nebezpečné převaze ER nad PR.

7.2. Možnost vzájemného porovnání statistických souborů jednotlivých nemocnic

Metodickými a výsledkovými rozdíly mezi laboratořemi nebyla vyloučena možnost posuzovat vliv věku na koncentrace ER a PR uvnitř jednotlivých souborů. Žádná z laboratoří totiž neprováděla vyšetření jinak u starých než u mladých pacientek. To se týká hlediska věkového, ale výška jednotlivých vln mezilaboratorními rozdíly ovlivněna nebyla.

Hlavním cílem bylo zvýraznit vliv nadbytku nebo nedostatku estradiolu na receptorové koncentrace. Jelikož estradiol snižuje koncentraci ER a zvyšuje koncentraci PR – tak kvocientem ER/PR jsou tyto změny potencovány. To se projevilo nápadně u hradecké nemocnice, kdežto mnohem méně u pardubické nemocnice jako postmenopauzální zlom v 55 letech. Hlavně nárůst ER/PR je v hradecké nemocnici od 55 let do 70 let stonásobný, kdežto nárůst ER samotného je v tomtéž intervalu desetinásobný. Dvojnásobné zvýšení počtu členů mediánů ER/PR v hradeckém souboru tuto vlnu nedokázalo vyhladit. Zmenšila se jen o 1/6. V pardubickém souboru byl v tomto věku největší pokles ER/PR.

7.3. Globální posouzení závislosti na věku – osová souměrnost ER a PR

Popisované vlny v jednotlivých souborech jsou na první pohled velmi málo spolehlivé a nemůžeme vyloučit náhodnost některých z nich. Naopak za spolehlivé lze označit věkový vzestup ER a věkový pokles PR. Tyto dvě veličiny dokonce místy tvoří křivky osově souměrné. Proto by mohly zobrazovat vliv změny koncentrace estradiolu.

Estrogeny také podporují tvorbu receptorů pro progesteron (PR) a jejich výskyt ukazuje, že se estrogeny nejen váží, ale i působí na buňky nádoru (Ganong 1993).

7.4. Závislost ER/PR na věku – rozdíly mezi našimi soubory

V případě souměrnosti křivky věkových změn ER a PR by zlomek ER/PR měl vykazovat prudší věkový nárůst než ER samotný. K tomu však došlo u souboru hradeckého – nikoli u pardubického. Znamená to, že se u pardubických pacientek častěji stalo, že vzestup ER se týkal jiné pacientky než pokles PR.

Nejstrmější nárůst ER/PR je evidentní u souboru Hradce bez okolních nemocnic a tato převaha je nejvyšší po 60. roce. Obrovská rozkolísanost v tomto souboru nabízí myšlenku, že 100-násobný rozdíl mezi 55-letými a 70-letými pacientkami není způsoben antikoncepcí u mladých pacientek nebo naopak hormonálně substituční léčbou u starých pacientek.

V souboru pacientek „ Hradec včetně okolí " je v porovnání s Hradcem samotným méně vidět pokles po 50. roce. Způsobuje to odlišná hladina receptorů u náhodských pacientek, která se tak více zviditelňuje.

V Pardubicích není nárůst ER/PR příkřejší než v případě samotných ER. Je to způsobeno nedostatečným poklesem PR – ale také tím, že pokles PR, který tam je, se týká stáří především 55 až 60 let a ne nejstarších pacientek. Má na to tedy vliv i pardubická vlna poklesu ER a vzestupu PR před 70 lety a nejde jen o vliv odlišnosti laboratorní metodiky.

U náhodského souboru je nárůst ER/PR s věkem zcela odlišný než u samotných ER – v tomto případě má přímka vysoce vzestupnou tendenci, kdežto u ER se přímka jeví takřka horizontálně. Je to vlivem konečného poklesu PR.

7.5. Posouzení oblasti nástupu menopauzy u různých nemocnic

Ukončení reprodukční aktivity a poslední menstruace se označuje jako menopauza. Funkce ovaria se snižuje postupně. U žen okolo 45. roku nastává klimakterium (Kobilková a kol. 1990). Neznáme ovšem interval, který lze vložit mezi nástup menopauzy charakterizovaný poklesem cyklické funkce vaječnicků a zvýšení exprese ER. Zlom v expresi ER je u pardubických pacientek přibližně v 53. roce života. V souboru Hradce a okolních nemocnic je přibližně v 54. roce a pouze hradecké nemocnici kolem 56. roku.

Nejpozději dochází k nástupu menopauzálního zlomu u náhodských pacientek – kolem 57. roku. Začátek menopauzy jsme vyčetli z křivky ER, kde nastává počáteční zlom z nižších hodnot na prudší (až skokový) nárůst koncentrace ER. Zajímavé ovšem je, že jedině u náhodského souboru je menopauzální zlom ER mnohem později než menopauzální zlom ER/PR.

Po nástupu menopauzy kolem 55. roku života se vlny nárůstu zlomku ER/PR u jednotlivých nemocnic liší strmostí – tedy o skokovém nárůstu lze hovořit zejména v případě hradecké nemocnice a to jak samotné, tak i s okolními nemocnicemi. U pardubické nemocnice je skokový nárůst ER/PR spíše jen naznačen

7.6. Posouzení dalších postmenopauzálních vln ER/PR a ER samotného u různých nemocnic

Klesající vlna ER/PR je v pardubickém souboru nápadná mezi 65. a 70. rokem – nejméně výrazněji se jeví v grafu několikačlenných mediánů oproti 5-letým mediánům (naproti tomu v hradeckém souboru nastává v 65 letech vlna prudkého nárůstu a u náhodského souboru je v tomto roce jedna z největších vln nárůstu). U náhodského souboru je pokles ER/PR přesně v 70 letech a u hradeckých nastává po 70. roce.

Klesající i rostoucí postmenopauzální vlny se u jednotlivých nemocnic objevují v různém stáří. Za abnormalitu u postmenopauzálních pacientek považujeme pokles ER – spíše než jeho vzestup.

7.7. Posouzení součinu ER*PR (neboli log ER + log PR)

Velmi zajímavý je pokles logaritmického součtu receptorů (=ER*PR) v souvislosti s menopauzou. Je to nejméně výraznější změna v hradeckém souboru. Ten koresponduje s úbytkem nádorů s vysokou koncentrací receptorů v práci, kterou připravujeme pro publikaci (Hochmann a spol. 2010) – viz poslední graf Přílohy. V menší míře je vlna menopauzálního poklesu ER*PR vidět i v pardubickém a náhodském souboru.

Pokles obojího najednou – jak ER tak PR (tedy pokles jejich součinu neboli pokles součtu jejich logaritmů) – to není vliv nadbytku nebo nedostatku estradiolu. Mohlo by to zobrazovat zpomalení tvorby nádorů bohatých na receptory. Byl by to důsledek absence proliferačního vlivu estradiolu způsobený menopauzou, kteroužto je nutno lokalizovat do mladšího věku než 55 let – alespoň u některých pacientek.

Při porovnání grafů součinu ER*PR jsou patrné abnormální křivky u pacientek hradecké laboratoře, kde jednotlivé body křivky jsou velmi neuspořádané. Je to způsobeno nepřesností hradecké laboratoře v oblasti nízkých receptorových koncentrací. Je nutno předeslat, že věk, ve kterém vznikly dotyčné vlny není chybný a jen hloubka vlny je arteficiální.

I v tom nejjednodušším grafu Věkové závislosti ER v Hradecké nemocnici (viz. Příloha) je vidět prudký pokles v 55 letech a tímto je také vysvětleno, proč nastal tak

hluboký pokles logaritmického součtu v hradeckém souboru v těchto letech. Chybí zde vysoké hodnoty receptorů a tím vyniknou nízké hodnoty logaritmického součtu resp. prostého součinu.

Jelikož rozhraní pro pozitivitu je 10 fmol/mg, tak mnohé laboratoře se nesnažily získat přesné hodnoty u receptorově negativních vzorků (nezáleželo jim na tom, zda jsou hodnoty 1 fmol/mg nebo 0,01 fmol/mg).

Pokud se nevychází z přesných koncentrací negativních ER, pak dojde např. k tomu že rozumná hodnota ER je vynásobena nesmyslným číslem 0,01 – místo např. jedničkou nebo dvojkou a výsledkem je nečekaně nízká hodnota součinu. Potom tedy zvětšený rozptyl kolem proložené čáry ER*PR hovoří o nepřesnostech laboratoře a je v hradecké laboratoři rozšířen směrem dolů – a nikdy směrem vzhůru. Místa skutečného poklesu jsou tím arteficiálně zvýrazněna. Pardubická křivka ER*PR nikdy neklesne pod ER nebo pod PR - na rozdíl od hradecké.

To dokáže udělat jedině receptorový výsledek nižší než 1 fmol/mg – přemístí body ER*PR níže než je bod ER samotný nebo PR samotný.

Absurdně veliká hloubka poklesové vlny ER*PR je chybou laboratoře, že místo správného výsledku např. ER = 0,5 fmol/mg vyšla v hradecké laboratoři záporná hodnota. Mnohé laboratoře se nesnažily získat přesné hodnoty, když rozhraní pro pozitivitu je 10 fmol/mg a proto se nezabývali skutečností, zda u receptorově negativních vzorků vznikla hodnota 1 fmol/mg či 0,01 fmol/mg.

Zdá se, že po nástupu menopauzy se tvoří málo hormonů a tedy snadněji vznikají nádory, které jsou růstově stimulovány spíše epidermálním růstovým faktorem než estradiolem.

7.8. Možnost artefaktů při hledání menopauzálního zlomu receptorových koncentrací a hormonální substituční léčba

Je nutno připustit možnost, že nízké hodnoty ER kolem 55. roku nezobrazují jen pozdější nástup menopauzy, ale že se tam zobrazuje i arteficiální pokles ER u některých postmenopauzálních pacientek.

Jednou z příčin tohoto arteficiálního poklesu ER by mohla být substituční terapie menopauzálních obtíží (léčba pomocí HST by měla být zahájena především u žen krátce po menopauze, tj. ve věku 50-55 let).

I kdyby bylo podávání těchto estrogenů snižujících koncentraci ER zastaveno již před biopsií, je nutno vzít v úvahu možnost, že se koncentrace ER v době biopsie ještě nestihne vrátit k normální (= k vysoké) postmenopauzální koncentraci.

Zde se nabízí otázka, za jak dlouho po ukončení estrogenové substituční terapie dojde k návratu ER k vysokým hodnotám (Hochmann a spol. 2010).

Velice užitečné by bylo zjištění přesných údajů o tom, zda-li pacientky neměly tuto hormonální léčbu před zjištěním diagnózy karcinomu prsu ve své lékové anamnéze. To by mohlo objasnit některé zvláštnosti v našich grafech.

Je všeobecně známo, že HST představuje zvýšené riziko pro výskyt hormonálně dependentních nádorů prsu.

Jak již bylo řečeno, vlivem HST u postmenopauzálních pacientek může dojít k arteficiálnímu snížení koncentrace ER (tedy i k poklesu zlomku ER/PR). S klesající vlnou ER se setkáváme u pardubického souboru, kde k poklesu dochází kolem 65. roku života.

7.9. Porovnání našich výsledků s literaturou - Závislost zlomku ER/PR na věku v literatuře

Quong a kol. (2002) ve své práci zjistil, že jimi posuzované pacientky vykazují překvapivý nárůst rizikovějších ER (+) a PR (-) nádorů prsu, který se zvyšuje po 50. roce života. Šlo tedy o nápadné zvýšení ER/PR v jeho práci. Z našich výsledků byl zjištěn také vyšší počet ER (+) po nástupu menopauzy. Co se týče počtu PR(-) nádorů zjištěných v našich laboratořích, tak v pre- i postmenopauze dosahují méně než 50% - tedy počet PR(-) pacientek je nižší než počet PR(+) s výjimkou postmenopauzálních žen v souboru pouze hradecké nemocnice a souboru Hradec a okolí – zde počty PR(-) postmenopauzálních žen nepatrně převyšují počty PR(+). Tento rozdíl však není nijak markantní, činí pouze několik procent. Z toho vyplývá že naše laboratoře vykazovaly

větší výskyt PR(+) pacientek než PR(-) a v premenopauze byl počet PR(+) pacientek vyšší než v postmenopauze.

Jestliže v postmenopauze je velká většina nádorů ER(+), tak k odhadu počtu pacientek ER(+), PR(-) na podkladě našich grafů stačí posoudit křivku PR – kdy se dostává pod 10 fmol/mg. Vidíme, že v pardubickém souboru jsou PR(-) pacientky většinou mladší než 60 let. Naopak u hradeckého souboru jsou od 63 do 73 let. A u náchodského souboru jsou dokonce jen starší než 75 let. Potom je otázkou, jak tomu bylo u souboru Quong a kol. (2002). Pokud byly pacientky tak staré jako u náchodského souboru, tak zlá prognóza mohla být způsobena stářím.

To jsou údaje z diplomové práce (Hanáková 2009), která se zabývala izolovaně ER nebo PR. Výpočet receptorového poměru ER/PR se nyní ukázal v této rigorózní práci překvapivě výrazný v hradecké laboratoři. V literatuře jsme nenašli, zda by někdo tuto problematiku řešil tímto způsobem.

7.10. Léčba klimakterických potíží hormonálními preparáty

Za nejvhodnější pro podezření z farmakologického ovlivnění receptorových koncentrací považujeme období poklesu ER a ER/PR v pardubickém souboru kolem 65 let.

Hormonální substituční terapie je používána k léčbě klimakterického syndromu a k prevenci metabolických a orgánových patologických změn v důsledku snížené produkce endogenních estrogenů v období postmenopauzálním (Lincová a spol. 2007).

Typy léčebných režimů zahrnují samostatný estrogen, estrogen plus gestagen podávaný kontinuálně (což je nejčastěji podávaný režim u žen s intaktní dělohou) a estrogen plus gestagen podávaný cyklicky.

Je-li gestagen podáván cyklicky, pak to může být buď v každém měsíci nebo v každém třetím nebo čtvrtém měsíci, přičemž jediným důvodem pro přidání gestagenu je snížení rizika karcinomu a hyperplazie endometria (Bruce 2007).

Ze zjištěných údajů o preskripci hormonálních preparátů se nabízí otázka, zda-li některé z našich pacientek neužívaly v době zjištění diagnózy nádoru prsu tyto

hormonální přípravky v rámci HST - ty by pak mohly mít vliv na koncentraci ER a PR a tím i ER/PR a vysvětlit tak některé zvláštnosti v našich grafech. Např. proč hlavní nárůst ER nebo ER/PR je až v 55 až 60 letech a ne tak jako v souboru Daniella, u něhož dochází k nárůstu ER v 50 letech - viz Hochmann a spol 2010.

Tímto bychom chtěli poukázat na možnost zabývat se hlouběji touto problematikou. Pro objasnění některých našich nejasností a potvrzení hypotéz by bylo dobré zjistit podrobnější údaje o pacientkách s nádorem prsu. Spolu s údaji o koncentracích ER a PR by bylo uvedeno kdy a po jak dlouhou dobu v přednádorové anamnéze užívaly HST a o jaký konkrétní přípravek se jednalo.

Koncentrace ER a PR z počítačového archivu dotyčné nemocnice u pacientek s karcinomem prsu, které užívaly např. nejčastější hormonální kombinaci by mohly být porovnávány v našich typech grafů s pacientkami se stejným nádorem, které neužívaly hormony.

Proto naše posouzení spotřeby hormonálních preparátů ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze má smysl jen jako orientační nahlédnutí. Je potřeba, aby nebyl podceněn význam Ovestinu (že jde „jen o krém“). Nesmí se vynechat ani posouzení antikoncepce. Jestliže je zjištěno podezření na karcinom prsu, tak je okamžitě hormonální léčba vysazena. Ale do 2 až 3 týdnů jde žena na operaci a receptorové hladiny se pravděpodobně nestačí vrátit k normě a hrozí falešná negativita ER nebo PR.

8. ZÁVĚR

V problematice zlomku ER/PR jsme nejmarkantněji poukázali na existenci mezilaboratorních rozdílů. Jestliže hradecká laboratoř měla z části vyšší citlivost stanovení ER a nižší citlivost PR než pardubická laboratoř – potom je samozřejmé, že hradecká laboratoř musí mít vyšší rozhraní, od kterého je nutno považovat převahu ER nad PR (resp. hodnotu ER/PR) za nebezpečnou. Jelikož rozdíl mezi Hradcem a Pardubicemi je v hodnotě ER/PR téměř 5-násobný, není možno používat hodnotu převzatou z literatury a každá laboratoř si musí nalézt své vlastní rozhraní.

Vzhledem k tomu, že v hodnotě ER/PR se zobrazuje nejen věkový nárůst ER, ale i věkový pokles PR, ukazuje se markantněji nevhodnost skutečnosti, že převážná většina autorů ignoruje jak věkové změny ER tak věkové změny PR pro určení rozhraní pozitivivity a negativity. Věkové změny rozhraní pro nebezpečnost hodnoty ER/PR by měly tedy ještě víc být brány v úvahu než věkové změny každého z těchto receptorů zvlášť.

Nejožehavější otázkou je hypotéza, zda dřívější vznik nádorů v hradecké a pardubické oblasti než v náchodské není vyvolán častějším používáním hormonální terapie klimakterických a menopauzálních obtíží nebo hormonální antikoncepce v Hradci a Pardubicích než v Náchodě. Tento problém jsme nemohli našimi metodami zodpovědět, ale poukázali jsme na něj našimi grafy incidence.

Další důležitou otázkou je, zda nedochází k falešné negativitě ER či PR vlivem hormonální terapie. A dále zda ve jmenovaných oblastech je hormonální terapie podávána rozdílným způsobem v rozdílném věku. Na tento problém poukazují naše křivky „zrcadlovitých“ změn ER a PR, neboť vlivem estradiolu dochází k poklesu ER a vzestupu PR a tyto vlivy se tedy k sobě přibližují.

9. Seznam zkratek

ATC	anatomicko-terapeutická klasifikace
DCC	dextran coated charcoal = dextranem potažené aktivní uhlí (biochemická metoda)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	estrogenové receptory
fmol/mg	femtomol na miligram
HST	hormonální substituční terapie
ICC	imunocytochemická analýza
PR	progesteronové receptory
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
(+)	pozitivita
(-)	negativita

10. Příloha

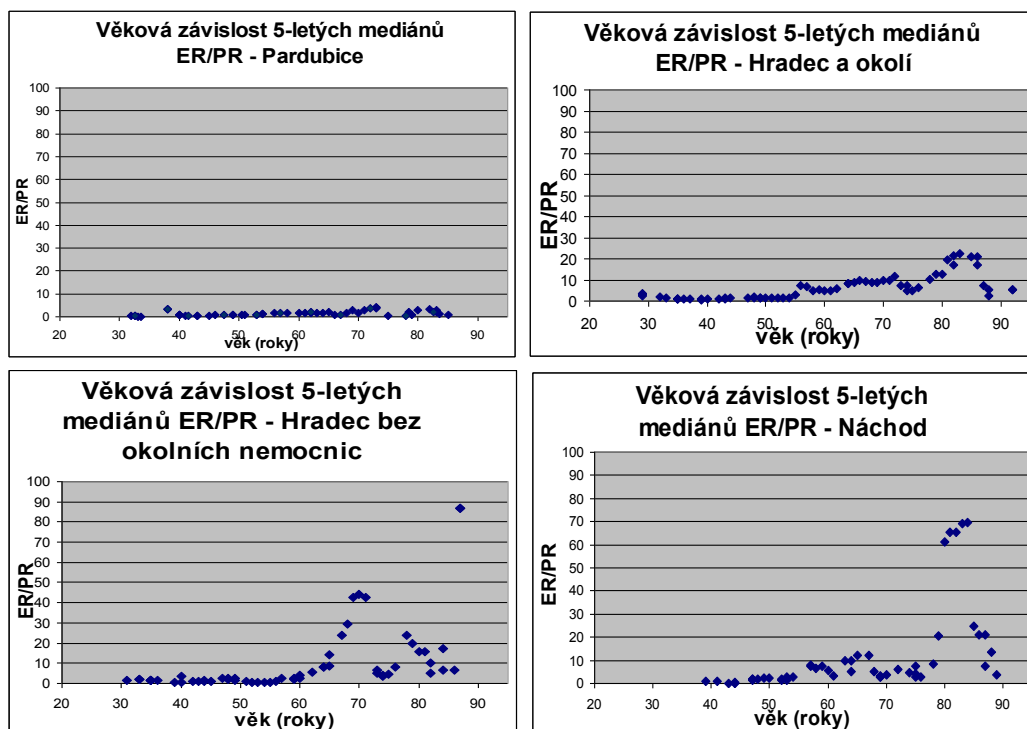
10.1. Grafy

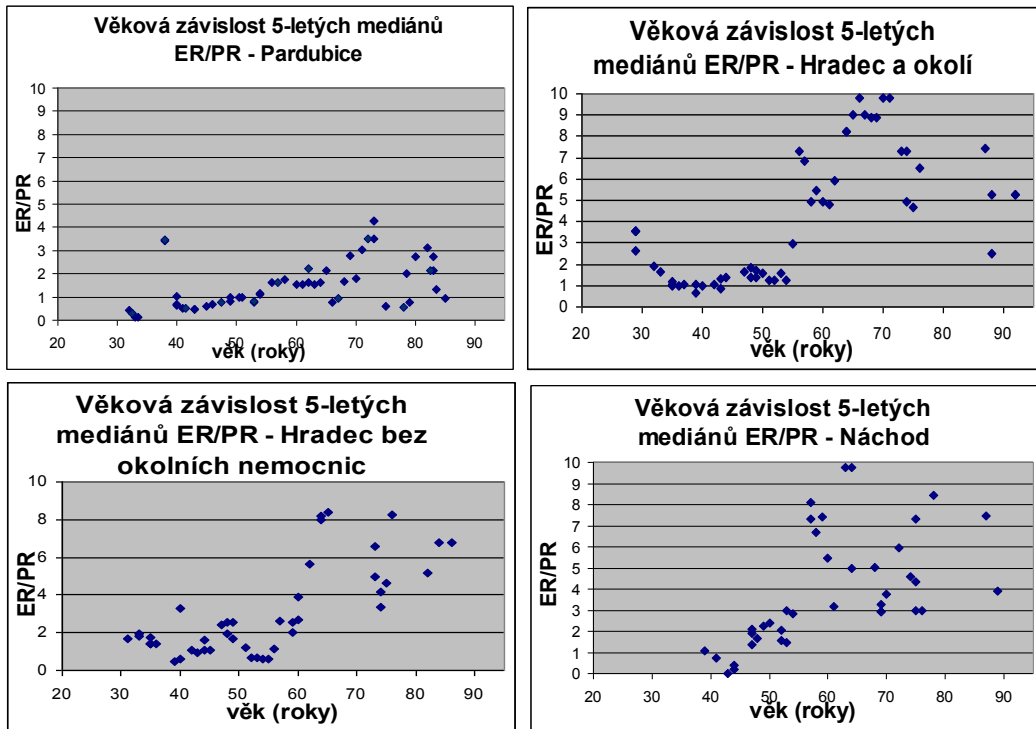
10.1.1. Závislost ER/PR na věku

10.1.1.1. Grafy upřednostňující věk

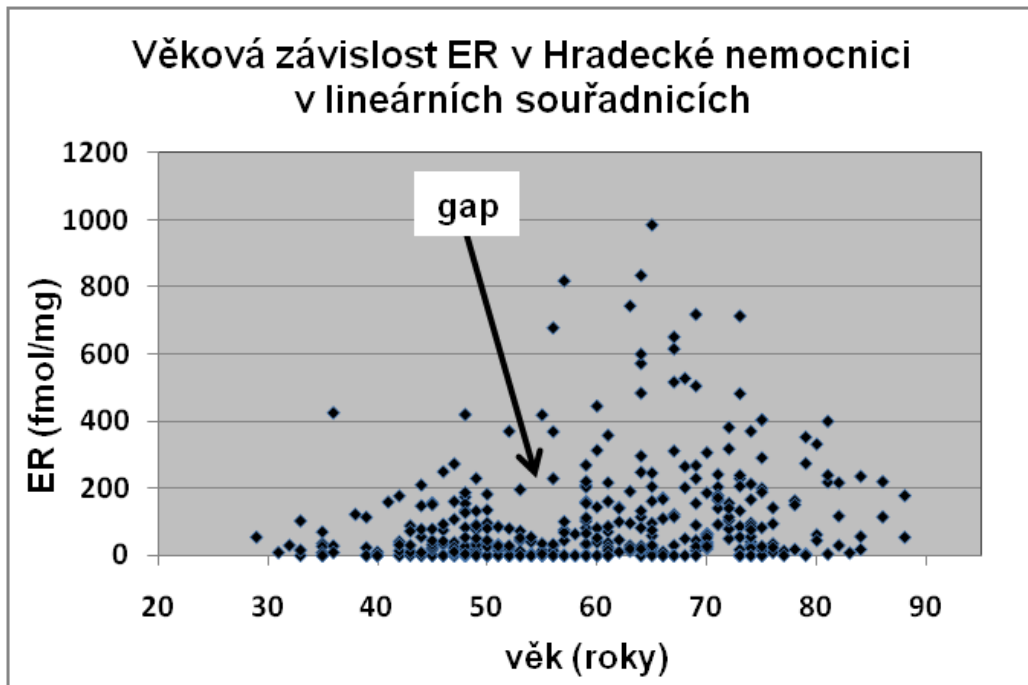
POUŽITÍ LINEÁRNÍ – MÍSTO LOGARITMICKÉ OSY Y

**Grafy č. 40-47 Věkové závislosti ER/PR upřednostňující věk pacientek-
nelogaritmické**





Graf č. 48 Závislosti ER v lineárních souřadnicích



10.2. Tabulky

Tabulka č. 2 Preskribované preparáty za rok 2008/2009 – procenta

název	2008	2009	procenta 2008	procenta 2009
UTROGESTAN	4056	3134	41,07%	32,38%
OVESTIN	1457	1486	14,75%	15,35%
PROVERA 5 MG	549	709	5,56%	7,32%
CRINONE 8%		561	0,00%	5,80%
ESTRAHEXAL	527	547	5,34%	5,65%
ESTROFEM	330	539	3,34%	5,57%
LIVIAL	560	458	5,67%	4,73%
NORETHISTERON	352	368	3,56%	3,80%
DUPHASTON	239	266	2,42%	2,75%
LADYBON	229	243	2,32%	2,51%
ORGAMETRIL	263	238	2,66%	2,46%
AGOLUTIN	166	156	1,68%	1,61%
ACTIVELLE	201	120	2,04%	1,24%
OESTROGEL	124	119	1,26%	1,23%
KLIMONORM	123	108	1,25%	1,12%
RISELLE 25 MG				
IMPLANTÁT	84	84	0,85%	0,87%
DIVIGEL 0,1%	63	78	0,64%	0,81%
VAGIFEM	68	73	0,69%	0,75%
CLIMARA 50	146	65	1,48%	0,67%
FEMOSTON	45	59	0,46%	0,61%
ORTHO-GYNEST	48	57	0,49%	0,59%
ANGELIQ	35	53	0,35%	0,55%
NOVOFEM	48	40	0,49%	0,41%
ESTRADERM	20	18	0,20%	0,19%
SYSTEM	25	17	0,25%	0,18%
DERMESTRIL	15	15	0,15%	0,15%
DIVINA	16	13	0,16%	0,13%
KLIOGEST	25	13	0,25%	0,13%
TRISEQUENS	16	12	0,16%	0,12%
AGOFOLLIN	10	10	0,10%	0,10%
INDIVINA	11	6	0,11%	0,06%
KLIANE	13	6	0,13%	0,06%
KLIMODIEN	11	5	0,11%	0,05%
NEOFOLLIN		3	0,00%	0,03%
ESTRIMAX		1	0,00%	0,01%
Celkový součet	9875	9680	100,00%	100,00%

Tabulka č 3 Seznam předepisovaných ATC skupin za rok 2008/2009 - procenta

ATC	2008	2009		
G03DA04	4222	3851	42,75%	39,78%
G03CA03	1399	1560	14,17%	16,12%
G03CA04	1505	1543	15,24%	15,94%
G03DA02	549	709	5,56%	7,32%
G03CX01	332	701	3,36%	7,24%
G03DC02	352	368	3,56%	3,80%
G03DB01	239	266	2,42%	2,75%
G03DC03	263	238	2,66%	2,46%
G03FA01	251	148	2,54%	1,53%
G03FB09	123	108	1,25%	1,12%
G03FA17	35	53	0,35%	0,55%
G03FB05	65	52	0,66%	0,54%
G03FB08	30	40	0,30%	0,41%
G03FA14	15	19	0,15%	0,20%
G03FB06	16	13	0,16%	0,13%
G03FA12	11	6	0,11%	0,06%
G03FA15	11	5	0,11%	0,05%
G03DC05	457		4,63%	0,00%
Celkový součet	9875	9680	100,00%	100,00%

11. ZDROJE

Bařinkov, V.: Farmakologick přístup k výsledkům vyšetřeni estrogeNových a progesteronových receptor v nádorech prsu. Diplomov práce, řkolitel Hochmann J., Katedra biologickch a lkařskch vd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2008

Bezwoda, W.R., Meyer, K.: Effect of alpha-interferon, 17 beta-estradiol, and tamoxifen on estrogen receptor concentration and cell cycle kinetics of MCF 7 cells. *Cancer Res.* 1990; 50(17): 5387-91

Bruce, R.C.: Hormonln terapie. *Gynekologie po promoci* 6/2007

Bur, M., Zimarowski, M., Schnitt, S., Baker, S., Lew, R.: Estrogen receptor immunohistochemistry in carcinoma in situ of the breast. *Cancer.* 1992; 69(5): 1174-81

Castagnetta, L., Traina, A., Dicarlo, A., Latteri, A.M., Carruba, G., Leake, R.E.: Heterogeneity of soluble and nuclear estrogen receptors status of involved nodes in relation to primary breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1987; 23: 31-35

Daniell, HW.: The influence of obesity and age at diagnosis on the estrogen receptor status of breast cancers. Perimenopausal predominance of estrogen receptor negative tumors. *Cancer.* 1988; 61(6): 1237-40

Dvořkov, E.: Hormonln receptory v nádorech prsu. Diplomov práce, řkolitel Hochmann J., Katedra biologickch a lkařskch vd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2007

Ganong, W.F.: Přehled lkařsk fysiologie. H & H, 1995; p. 368, 369, 373, 374, 381

Gaskell, D., Sangster, K., Tesdale, A., Carson, D., Hawkins, R.: Change in the oestrogen receptor status of breast cancer with age-comparison of two types of assay. *Br. J. Cancer.* 1992; 66(4): 610-3

Hanáková, T.: Vliv věku a jiných faktorů na cytosolovou koncentraci steroidních receptorů u karcinomu prsu. Diplomová práce, školitel Hochmann J., Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2009

Helin, HJ., Helle, MJ., Helin, ML., Isola, JJ.: Immunocytochemical detection of estrogen and progesterone receptors in 124 human breast cancers. *Am. J. Clin. Pathol.* 1988; 90(2): 137-42

Hochmann, J.: The effect of age on the breast cancer estrogen receptor level (Vliv věku na množství estrogenních receptorů (ER) v karcinomech prsu). *Klinická onkologie (Brno)*. 1999/a (in Czech);12(1): 22-29

Hochmann, J.: Diagnostical exploitation of the ratio of progesterone to estrogen receptors in breast cancers (Diagnostické využití poměru progesteroneových receptorů ku estrogenovým receptorům v karcinomech mléčné žlázy). *Klinická onkologie (Brno)*. 1999/b (in Czech);12(5): 174-178

Hochmann, J.: Ratio of concentrations of estrogen receptors to progesterone receptors (ER/PR) in the cytosol of breast cancers (stratification by forming of groups differing in PR). *Neoplazma*. 2007; 54(4): 290-6

Hochmann, J., Vávrová, J., Hanáková, T.: Analýza věkové závislosti cytosolových výsledků estrogenových receptorů v karcinomech prsu pomocí mediánů překrývajících se věkových skupin. (Připravováno k publikaci) 2010

Hurlimann J., Gebhard S., Gomez F.: Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invazive ductal breast carcinomas. *Histopathology*, 23(3): 239-48, 1993

Keshgegian, A., Inverso, K., Kline, T.: Determination of estrogen receptor by monoclonal antireceptor antibody in aspiration biopsy cytology from breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1988; 89(1): 24-9

- Kobilková, J. a kol.: Cytodiagnostika v gynekologii. Praha, Avicenum, 1990: 46
- Kommoss, F., Pfisterer, J., Idris T.: Steroid receptors in carcinoma of the breast. Results of immunocytochemical and biochemical determination and their effects on short-term prognosis. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1994; 16(3): 203-10
- Kutová, R., Vliv okolních faktorů na hormonální receptory nádorů prsu. Bakalářská práce, školitel Hochmann J., Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2008
- Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén 2007, str. 443 – 446
- Lukáš, Z., Dráberová, E., Feit, J., Vojtěšek, B.: Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. Brno, Vydavatelství Masarykovy university 1997, str. 113-4
- Marešková, B.: Estrogenové a progesteronové receptory v nádorech dělohy ve vztahu k terapii. Bakalářská práce, školitel Hochmann J., Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 2006
- Mobbs, B.G., Chapman, J.A., Sutherland, D.J., Ryan, E., Tustanoff, E.R.: Evidence for bimodal distribution of breast carcinoma ER and PgR values quantitated by enzyme immunoassay. *Eur. J. Cancer.* 1993; 29A(9): 1293-7
- Muresan, Z., Dutu, R., Voiculescu, N.: Relationship of steroid hormone receptors, age and histological characteristics in human breast cancer. *Neoplazma.* 1986; 33(3): 371-7
- Nakata, T., Takashima, S., Shiotsu, Y., Murakata, Ch., Ishida, H., Akinaga, S., Li Pui-ki, Sasano, H., Suzuki, T., Saeki, T.: Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2003; 86(3)-5: 455-460
- Pichon, M., Pallid, C., Hacene, K.: Prognostic value of progesterone receptor after long-term follow-up in primary breast cancer. *Eur. J. Cancer.* 1992; 28A(10): 1676-80

Pujol, P., Daures, J.P., Thezenas, S., Guilleux, F., Rouanet, P., Grenier, J.: Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer*. 1998; 83(4): 698-705

Quong, J., Eppenberger-Castori, S., Moore, D., Scott, G.K., Birrer, M.J., Kueng, W., Eppenberger, U., Benz, CH. C. : Age-Dependent Changes in Breast Cancer Hormone Receptors and Oxidant Stress Markers. *Cancer*. 2002; 76(3): 181-293

Querzoli, P. Ferretti, S. Algonico, G.: Application of quantitative analysis to biologic profile evaluation in breast cancer. *Cancer*. 1995; 76(12): 2510-7

Raafat, A.M., Hofseth, L.J., Li, S., Bennett, J.M., Haslam, S.Z.: A mouse model to study the effects of hormone replacement therapy on normal mammary gland during menopause: enhanced proliferative response to estrogen in late postmenopausal mice. *Endocrinology*. 1999; 140(6): 2570-80

Salazar, E.E.L., Morales, N.R., Calzada, S.L.: Infiltrating duct breast carcinoma: role of estradiol and progesterone receptors. *Ginecol. Obstet. Mex*. 1994; 62: 85-90

Skoog, L., Humla, S., Axalsson, M., Frost, M.: Estrogen receptor levels and survival of breast cancer patients. *Acta Oncol*. 1987; 26(2): 95-100

Soreide, J.A., Lea, O.A., Varhaug, J.E., Skarstein, A., Kvinnsland, S.: Androgen receptors in operable breast cancer: relation to other steroid hormone receptors, correlations to prognostic factors and predictive value for effect of adjuvant tamoxifen treatment. *Eur. J. Surg. Oncol*. 1992; 18(2): 112-8

MUDr. Strnad, P., CSc., Gynekologicko-porodnická klinika 2.LF UK a FN Motol

Subramanian, A., Salhab, M., Mokbel, K.: Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 111:191-202

Štambergová, H., Tvorba ovariálních hormonů v nádorech prsu, školitel Hochmann J.,
Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy,
Hradec Králové, 2009

Yasui, Y., Potter, J.D.: The shape of age-incidence curves of female breast cancer
by hormone-receptor status. *Cancer Causes Control*. 1999; 10(5): 431-7