

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

## Estrogenové a progesteronové receptory v nádoru prsu ve vztahu k jiným ukazatelům

Barbora Šustrová

Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.



Katedra biologických a lékařských věd  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Univerzita Karlova v Praze

2006

*Děkuji školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za cenné připomínky, vstřícnost při diskusích a všestrannou spolupráci při vzniku této práce.*

# OSNOVA

<b>1. SOUHRN .....</b>	<b>4</b>
<b>2. ÚVOD.....</b>	<b>5</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Funkce steroidních hormonů .....</b>	<b>6</b>
3.1.1. Estrogeny .....	6
3.1.2. Estrogenové receptory .....	6
3.1.3. Progesteron .....	7
<b>3.2. Ovariální cyklus a steroidní hormony .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3. Význam ovariálního cyklu pro prsní tkáň.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4. Genové inženýrství.....</b>	<b>9</b>
<b>3.5. Regulace transkripce – konformační motiv zinkového prstu .....</b>	<b>10</b>
<b>4. ČESKÁ SNADNO DOSTUPNÁ LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1. Stav řešení daného problému na školicím pracovišti .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2. Diplomové práce .....</b>	<b>14</b>
4.2.1. Diplomová práce Horáčkové .....	14
4.2.2. Diplomová práce Prokopové .....	15
<b>4.3. Práce na ostatních pracovištích .....</b>	<b>20</b>
4.3.1. Starší časopisová literatura .....	20
4.3.1.1. Česko-slovenská patologie .....	20
4.3.1.2. Klinická onkologie.....	20
4.3.1.3. Časopis lékařů českých.....	21
4.3.2. Novější časopisová literatura .....	21
4.3.2.1. Česká - Slovenská gynekologie .....	21
4.3.2.2. Lékařské listy .....	23
<b>5. ZPŮSOB VYHLEDÁVÁNÍ INFORMACÍ NA INTERNETU.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Obecný popis práce.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Použití vyhledavače.....</b>	<b>25</b>
5.2.1. Vyhledavače dostupné bez licence .....	25
5.2.2. Vyhledavače dostupné s licencí pro farmaceutickou fakultu .....	25
<b>5.3. Přehled kombinací klíčových slov pro dílčí otázky.....</b>	<b>26</b>
<b>6. PŘEHLED NOVĚ ZÍSKANÝCH POZNATKŮ O OVLIVNĚNÍ ER A PR.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1. Vztah mezi ER a PR .....</b>	<b>27</b>

<b>6.2. Vliv menstruačního a ovariálního cyklu .....</b>	<b>29</b>
6.2.1. Ovlivnění ER a PR v prsní tkáni.....	29
6.2.2. Vliv cyklů na jiné orgány.....	30
<b>6.3. Vliv stáří.....</b>	<b>30</b>
<b>6.4. Mimovaječnickové příčiny falešné negativity ER v nádorech prsu.....</b>	<b>31</b>
<b>6.5. Vliv tukové tkáně .....</b>	<b>32</b>
<b>6.6. Vliv farmaceutických přípravků .....</b>	<b>33</b>
<b>6.7. Vliv kationů kovů.....</b>	<b>34</b>
6.7.1. Hlinité kationty .....	34
6.7.2. Kationy selenu .....	35
6.7.3. Vápenaté kationty .....	35
<b>7. DISKUSE.....</b>	<b>37</b>
<b>7.1. Vztah mezi ER a PR .....</b>	<b>37</b>
<b>7.2. Vliv menstruačního a ovariálního cyklu .....</b>	<b>38</b>
<b>7.3. Vliv stáří.....</b>	<b>39</b>
<b>7.4. Mimovaječnickové příčiny falešné negativity ER v nádorech prsu.....</b>	<b>40</b>
<b>7.5. Ostatní vlivy.....</b>	<b>40</b>
<b>8. ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>9. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>43</b>
<b>10. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

# **1. SOUHRN**

Naší snahou v této rešeršní práci bylo nalézt nové informace o ovlivnění hladin estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) ve tkáni karcinomu prsu, porovnat je s informacemi již publikovanými na fakultě a případně poukázat na nově vzniklá fakta.

Zaměřili jsme se na hledání abstraktů, převážně v zahraniční časopisové literatuře, pro nás dostupnými internetovými databázemi. Pomocí česky psaných časopisů jsme pouze zmapovali práci na odborných pracovištích v České republice.

V první řadě byl řešen vzájemný vztah mezi ER a PR. Nalezli jsme zajímavá tvrzení, že pouze ER $\alpha$  souvisí s expresí PR. A při expresi PR, izoforma PRA projevuje dominantní inhibiční efekt na PRB. Při posouzení vlivu menstruačního, respektive ovariálního cyklu, jsme měli problémy nalézt články, které by se týkaly prsní tkáně. V těch se pak autoři v převážné většině shodují při hodnocení hladiny ER, maximálních hladin dosahují ER v době proliferace a menstruace. Avšak u hodnocení hladin PR jsou výsledky dosti nejednotné. A podobně je tomu při řešení vlivu věku pacientky na receptorové hladiny. Většina autorů se shoduje na tom, že hladiny ER s narůstajícím věkem rostou, ale jednotné potvrzení nárůstu či poklesu PR s věkem jsme nenašli.

Několik autorů ve svých pracích také upozornilo na mimovaječnickovou tvorbu estrogenů, přímo v nádorové tkáni nebo v nadbytečné tukové tkáni, což by mohlo vést k falešně negativním výsledkům laboratorního vyšetření hladin receptorů. Falešně negativní výsledky pro posouzení hladin PR mohou být způsobeny i podáním tamoxifenu před vyšetřením pacientky. Jedna práce navíc odlišuje izoformy receptorů a v tomto směru ukazuje na odlišný vliv rozdílných farmaceutických přípravků. Nalezli jsme i práce, kde autoři uvádí vliv kationtů kovů (hlinitých, vápenatých a kationtů selenu) na hladiny receptorů.

Domníváme se, že některé námi prezentované informace by mohly posloužit k lepšímu pohledu a hodnocení tohoto problému a mohly by pomoci k rozvoji dalších, přesnějších analytických postupů, zaměřených na posouzení pouze určitého faktoru, například na izoformy receptorů.

## **2. ÚVOD**

Cílem této bakalářské práce je posouzení přesnosti výsledků laboratorního vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) v nádoru prsu s ohledem na okolní faktory, jako například menstruační cyklus, věk, obezitu nebo předešlou hormonální léčbu. Tyto výsledky následně mohou napomoci k přesné diagnóze karcinomu a výběru nejvhodnější a nejúčinnější terapie.

Chtěli bychom poukázat na důležitost těchto faktorů, které by měly být brány v úvahu při konečném ustanovení lékaře, a také na nutnost spolupráce onkologa s laboratoří.

Svojí prací navazuji na studii školitele, který se tímto problémem zabývá již dlouhá léta. Vyhledáním a zpracováním nových informací se snažíme již existující fakta doplnit, utřídit a upřesnit, popřípadě poukázat na nově objevené skutečnosti.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

Pro objasnění problému vlivu vnějších faktorů na steroidní receptory v nádoru prsu je důležité znát základní informace. Ty jsme čerpali především z učebnicové literatury.

### **3.1. Funkce steroidních hormonů**

#### **3.1.1. Estrogeny**

Estrogeny patří mezi osmnácti-uhlíkaté steroidní hormony s aromatickým jádrem. Biosyntéza zahrnuje jejich tvorbu z androgenů. Jsou však také tvořeny aromatizací androstendionu v cirkulaci, pomocí enzymu aromatázy (Ganong 1993).

Hlavní sekreční oblastí jsou Graafovy folikuly, přesněji buňky theca interna folliculi. Sekrece je řízena adenohipofyzárně, pomocí FSH (folikuly stimulující hormon) a LH (luteinizační hormon). Nejúčinnějším estrogenem je estradiol. V plazmě jsou estrogeny transportovány ve vazbě na albumin a na specifické vazebné proteiny (SHBG). Estrogeny jsou metabolizovány v játrech a vylučovány močí jako konjugáty (sulfáty a glukuronidy).

Estrogeny mají trofický, růstový a diferenciací vliv na specifické cílové buňky. Stimulují růst a vývoj prsů, ukládání tuku a růst vývodného systému. V pohlavní dospělosti navozují proliferační fázi menstruačního cyklu (Schreiber a kol. 1998).

Estrogeny také podporují tvorbu receptorů pro progesteron (PR) a jejich výskyt ukazuje, že se estrogeny nejen váží, ale i působí na buňky nádoru. Výskyt příznivé odpovědi na cílené vyvolání poklesu sekrece estrogenů je vyšší, jestliže nádor obsahuje receptory pro estrogeny (ER(+)) nádor) a nejvyšší, jestliže obsahuje oba typy receptorů ER(+))PR(+)) nádor (Ganong 1993).

#### **3.1.2. Estrogenové receptory**

Aby se projevil účinek hormonu, musí se navázat na buněčný receptor. Estrogeny, stejně jako ostatní steroidní hormony, díky své lipofilní povaze pronikají

buněčnou membránou do cytoplasmy. Zde se váží na speciální cytoplasmatický receptor, což je vlastně transportní protein. Vytváří se komplex hormon-receptor, který je transportován do buněčného jádra, kde po vazbě na specifický receptor (chromatinový akceptor) dochází k derepresi (odblokování) genetické informace pro tvorbu proteinů (cestou mRNA). Může se tak aktivovat tvorba bílkovin strukturních (růst, diference buněk) nebo funkčních (enzymy) (Schreiber a kol. 1998). Taktéž je tomu i u progesteronových receptorů.

### 3.1.3. Progesteron

Progesteron je steroidní hormon o 21 uhlících, produkován žlutým tělískem (corpus luteum), placentou a v malých množstvích folikulem. V plazmě se nachází buď volný, větší množství je však vázáno na albumin nebo na kortikosteroid vázající globulin. Progesteron je stejně jako estrogen metabolizován v játrech. Probíhá zde přeměna na pregnandiol, který se konjuguje s kyselinou glukuronovou a vylučuje se močí (Ganong 1993).

Progesteron stimuluje rozvoj lobulů a alveolů mléčné žlázy a vyvolává jejich sekreční aktivitu (Schreiber a kol. 1998). Je zodpovědný za progestační změny v endometriu a za cyklické změny děložního krčku a pochvy. V endometriu také snižuje počet receptorů pro estrogény a zvyšuje stupeň přeměny  $17\beta$ -estradiolu na méně aktivní estrogény (Ganong 1993).

## 3.2. Ovariální cyklus a steroidní hormony

Ovariální cyklus, cyklická produkce steroidních hormonů ovarií, se dělí do tří fází.

První fáze (folikulární) trvá 12 – 14 dnů od 1. dne menstruace. V této fázi je vlivem FSH potencován růst primárního folikulu a v něm produkce estrogenů. K FSH se pak připojuje LH a spolu s ním působí na receptory buněk předovulačního folikulu. Tento folikul roste rychleji než zbylé a vyčnívá na povrch ovaria, Graafův folikul. Jeho růst je dán vysokou produkcí estrogenů zrajícího folikulu, které zpětně pozitivně působí na vlastní buňky folikulu.



Vrchol druhé fáze (ovulační) nastane asi 14. den cyklu, kdy Graafův folikul zduří a praskne a vajíčko s buňkami, které ho obklopují, se vyplaví do břišní dutiny, kde je zachyceno řasinkami vejcovodu.

Po ovulaci akumulují granulózní buňky folikulu vlivem LH lipid lutein – vytváří se corpus luteum – třetí fáze (luteální). Granulózní buňky rostou, hladké endoplazmatické retikulum žlutého tělíska produkuje hlavně progesteron, jehož biologická aktivita navazuje na změny vyvolané estrogény. Mimo progesteronu, tvoří buňky žlutého tělíska také estradiol a inhibin, tlumící adenohipofyzární produkci FSH.

V případě, že nedošlo k oplodnění, do vrstvy granulózních buněk žlutého tělíska začnou prorůstat kapiláry, které se plní krví.

Estrogeny a progesteron působí tlumivě na sekreci LH a FSH, což po dobu sekreční fáze (menstruačního cyklu) zabraňuje zrání dalšího folikulu. Stejně působí i inhibin. Snížením sekrece LH a FSH dochází k involuci žlutého tělíska. Snižuje se jeho prokrvení, klesá produkce progesteronu a estrogenů. Mechanismem zpětné vazby se opět zvýší vyplavování FSH z adenohipofýzy a je zahájen nový ovariální cyklus (Schreiber a kol. 1998).

Sekrece estrogenu má tedy dva vrcholy. Jeden těsně před ovulací a druhý uprostřed luteální fáze. Po menopauze klesá sekrece estrogenů k nízkým hodnotám.

Sekrece progesteronu roste ve folikulární fázi. Během luteální fáze produkuje žluté tělísko velké množství progesteronu a ovariální sekrece stoupá asi 20x. Výsledkem je vzestup hladiny progesteronu k maximu asi na 18 ng/ml (Ganong 1993).

Od 45. do 50. roku věku ženy ustává pravidelný cyklus a nastupuje období, charakterizované poklesem produkce pohlavních hormonů (hlavně estrogenů) v ovariích, které se po definitivní degradaci posledních primordiálních folikulů přestanou tvořit. Toto období nazýváme klimakterium (Schreiber a kol. 1998).

### **3.3. Význam ovariálního cyklu pro prsní tkáň**

Ovariální cyklus, s periodickými změnami hladin steroidních hormonů, vede též k periodickým změnám v prsní tkáni. Estrogeny vyvolávají proliferaci mlékovodů, zatímco progesterony působí růst lalůčků a váčků. Prsa zduřují, jsou asi 10 dní před menstruací citlivá na dotek a bolestivá. To je pravděpodobně způsobeno rozpětím

vývodů, hyperémií a otokem intersticiální tkáně prsu. Během menstruace všechny tyto změny zmizí, včetně bolestivých symptomů (Ganong 1993).

### 3.4. Genové inženýrství

Technologie rekombinantní DNA umožnila identifikovat a izolovat konkrétní gen z mnoha tisíců genů v buňce a po jeho amplifikaci stanovit přesnou molekulární strukturu genu.

Základem této technologie je možnost štěpit velké molekuly DNA na specifickou a reprodukovatelnou sadu fragmentů pomocí restričních endonukleáz, které štěpí dvojšroubovici DNA pouze v určité nukleotidové sekvenci.

Hybridizací nukleových kyselin lze detegovat jakoukoliv sekvenci DNA nebo RNA ve směsi fragmentů těchto nukleových kyselin. Jednořetězcová DNA i RNA vytváří dvojšroubovici pouze s řetězcem s komplementární nukleotidovou sekvencí.

Jednořetězcové molekuly DNA se známou sekvencí, označené fluorescenčními barvami nebo radioizotopy, jsou používány jako sondy při hybridizačních reakcích.

Pro spojení fragmentů DNA může být využito postupné klonování. Prvním krokem při klonování je inserce požadovaného fragmentu do molekuly DNA, která je schopna replikace, jako je například plazmid nebo virový genom. Vytvořená rekombinantní molekula je pak vložena do rychle se dělící hostitelské buňky a při každém buněčném dělení dochází i k její replikaci.

Tímto způsobem je možno vyprodukovat mnoho buněčných proteinů v množstvích, která jsou dostatečná pro detailní strukturní a funkční studie (Alberts a kol. 1998).

Další cennou metodou ke stanovení struktury a funkce určitého proteinu je transfekce – vnesení cizorodé DNA do eukaryontní buňky. Lze použít tři základních postupů: chemickou transfekcí, elektroporací a lipofekcí. Pro důkaz, že transfekce DNA byla úspěšná, je vnesen do cizorodé DNA mimo jiné také tak zvaný reportérový gen pro určitý reportérový protein se schopností např. autofluorescence. Fúzí tohoto genu a DNA organismu vlastní (či vlastní viru, jako vektoru ostatních transplantovaných genů) vzniká reportérový systém. Jedním z velmi často používaných reportérových genů je zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein) GFP. Původně byl

izolován z fluoreskující medúzy *Aequorea victoria*. Tento protein po ozáření dlouhovlnným UV světlem zeleně fluoreskuje (Uhlíková 2001).

### **3.5. Regulace transkripce – konformační motiv zinkového prstu**

Exprese genetické informace začíná transkripcí nukleotidových sekvencí DNA do sekvencí RNA. Syntézu RNA podle matrice DNA katalyzuje enzym RNA polymeráza. Ta se váže na specifický úsek genu zvaný promotor. Pro vazbu RNA polymerázy s promotorem a pro iniciaci transkripce jsou nutné transkripční faktory, které se váží na promotor ještě před RNA polymerázou. Jsou to regulační proteiny, navazující se na regulační sekvence promotoru a určující, který gen bude v daném okamžiku transkribován (Nečas 2000).

Proteiny mohou rozpoznávat určité sekvence DNA díky svým povrchům, které se pevně váží na určité specifické rysy konkrétního úseku dvojšroubovice DNA. Většina proteinů se váže do velkého žlábků dvojšroubovice DNA, kde vytváří řadu kontaktů s páry bazí. Vazba je uskutečněna pomocí stabilních konformačních motivů, které proteiny, podílející se na regulaci genů, obsahují.

Motiv zinkového prstu je tvořen  $\alpha$ -šroubovicí a  $\beta$ -skládaným listem, navzájem propojenými atomem zinku. Obvykle je několik zinkových prstů kovalentně spojeno tak, aby mohly jmenované  $\alpha$ -helixy rozpoznávat baze ve větším žlábků dvojšroubovice DNA (Alberts a kol. 1998).

## **4. ČESKÁ SNADNO DOSTUPNÁ LITERATURA**

### **4.1. Stav řešení daného problému na školicím pracovišti**

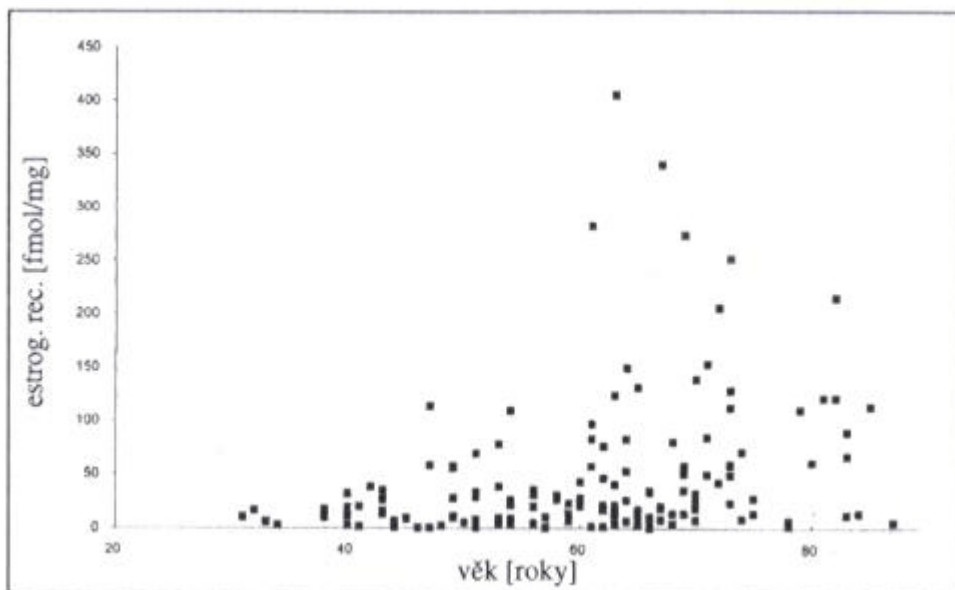
V letech 1990 – 1995 prováděl školitel vyšetření ER a PR v nádoru prsu patientek v Pardubicích, což bylo dokumentováno některými výzkumnými zprávami a diplomovými pracemi, ale jen z hlediska provedení metodiky.

Na Farmaceutické fakultě poté navázala na školitelovu studii studentka Horáčková svojí diplomovou prací, kterou zaměřila převážně na ovlivnění hladiny receptorů věkem. V pozdějších letech byla sepsána diplomová práce studentkou Prokopovou, zabývající se i jinými vlivy.

Informací, získaných Horáčkovou, použil Dr. Hochmann ve dvou publikacích v roce 1999 a doprovodil jimi grafy výsledků z Pardubic. V první z nich se věnoval ovlivnění množství estrogenových receptorů v karcinomu prsu věkem a určení rozhraní mezi pozitivitou a negativitou.

V lineární (graf č. 1) i semilogaritmické osově soustavě závislosti ER na věku ukazují jednoznačně, že jde o vzestupnou funkci. Umístění hodnot v grafech naznačuje, že v různých věkových kategoriích mají hodnoty ER přibližně logaritmicko-normální rozložení. Nejvyšší odlehle hodnoty u čtyřicetiletých a mladších patientek jsou přibližně desetkrát nižší než nejvyšší hodnoty starších, nad 60 let. Po 63. roce se ohrazení horní části statistického souboru již nezvyšovalo, ale spíše snižovalo.

Je to dáno pravděpodobně vlivem snížení funkce vaječníků. Hranici mezi pozitivitou a negativitou si u preklimakterických v porovnání s postklimakterickými patientkami nepředstavujeme jako skokový rozdíl, ale jako plynulou křivku (možná místy zalomenou) (Hochmann 1999/a).



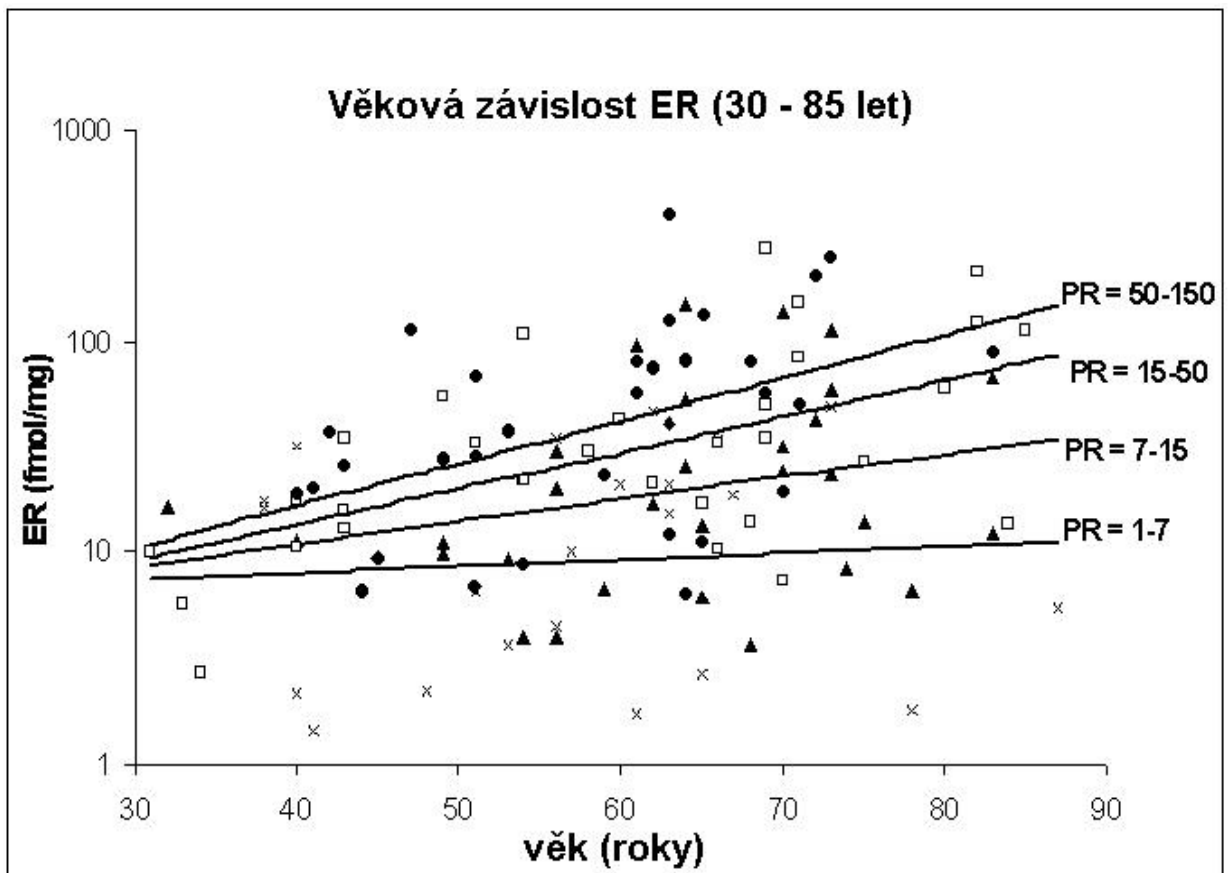
Graf č. 1: Závislost estrogenových receptorů na věku v lineární osově soustavě (Hochmann 1999/a)

Druhá ze zmíněných prací se týkala diagnostického využití poměru progesteronových receptorů ku estrogenovým receptorům. Pro správné vyhodnocení poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům z hlediska hranic mezi jednotlivými prognostickými skupinami pacientek je nutno poznat zákonitosti, kterými se tento poměr řídí. Navíc, nekonstantní množství bílkovin může vnášet chyby do rozhodování o cytosolové pozitivitě jak u estrogenových tak u progesteronových receptorů. Byla řešena tedy otázka diagnostické využitelnosti poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům, neboť tímto zlomkem se vykrátí variabilita množství bílkovin. Touto prací bylo zjištěno, že výsledky umožňují nejen potvrdit závěry jiných autorů o přímé závislosti koncentrace progesteronových receptorů na estrogenových receptorech v nádorech, ale i odhalit vliv věku na tuto závislost a navíc i oddělit vliv bílkovin od poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům. Věkově nerozdělený soubor a ani rozdělení výsledků (pouze) na premenopauzální a postmenopauzální zdaleka není u pacientek dostačující pro diagnózu (+), či naopak (-) u estrogenových receptorů. Z téhož důvodu není dostačující pro posouzení poměru progesteronových ku estrogenovým receptorům. Proto zohlednění plynulé věkové změny umožňuje posoudit přesněji receptorový stav (Hochmann 1999/b).

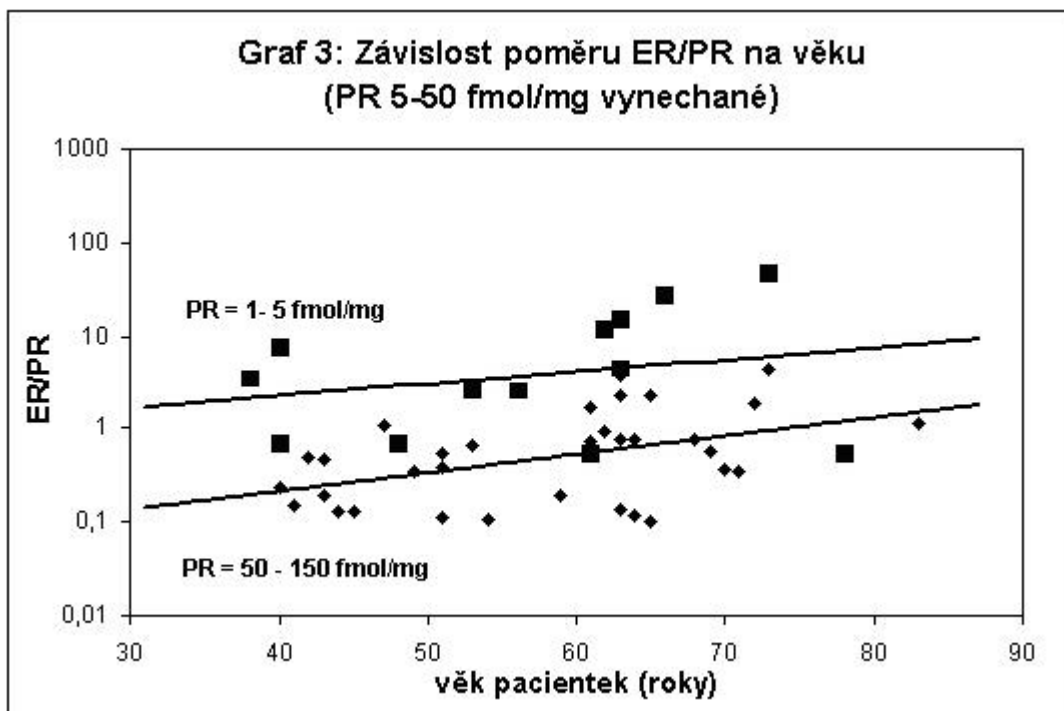
V dalších grafech, připravovaných pro publikaci, rozdělil školitel statistický soubor výše uvedených výsledků na podskupiny s přibližně stejným PR a zjistil tak:

1) že v případě vysokých PR je značný (řádový) věkový nárůst ER. Naopak u nízkých PR je věkový nárůst ER malý (graf č. 2).

2) že poměr ER/PR je veličina zrádná neboť je jiný v podskupinách s nízkým PR než v podskupinách s vysokým PR (graf č. 3) (Hochmann 2006).



Graf č. 2: Závislost ER na věku (Hochmann 2006)



Graf č. 3: Závislost poměru ER/PR na věku (Hochmann 2006)

## 4.2. Diplomové práce

### 4.2.1. Diplomová práce Horáčkové

Studentka Pavla Horáčková navázala na pardubickou studii Dr. Hochmanna. Svoji rešeršní práci zaměřila na hledání odborných článků, týkajících se problému ovlivnění hladiny estrogenových receptorů věkem. Následně vše doplnila informacemi o progesteronových receptorech a porovnáním metodik zkoumajících jednotlivé hladiny receptorů. Dospěla k závěru, ve kterém se shodovalo mnoho autorů, včetně Dr. Hochmanna. Hladina ER je pozitivně ovlivňována věkem, tedy s přibývajícím věkem roste koncentrace ER a tím též roste podíl ER(+) pacientek. Ve své Diskusi také uvedla důležité informace, které by měly být brány v úvahu: Zajímavý byl poznatek, že s věkem neroste množství pozitivních buněk, ale pouze počet receptorů v buňce (Gaskell 1992, Bur 1992, Walker 1992). Podnětná byla rovněž úvaha Santena (1988).

Skutečnost, že postmenopauzální pacientky měly vyšší nádorové hladiny estrogenů, vysvětlil možností lokální produkce estrogenů v nádorové tkáni (Horáčková 1997).

V problému závislosti PR na věku zjistila značné odlišnosti v názorech autorů: Nalezla tvrzení, že množství PR s věkem roste - dva autoři, vůbec se nemění - osm prací nebo naopak klesá - sedm prací (Horáčková 1997).

Další otázkou, jíž se Horáčková zabývala, bylo určení hranice ER pozitivivity a negativity a její závislosti na věku. V tomto směru došla k závěru: Přítomnost ER a PR, měřených ve fmol/mg, indikuje úroveň senzitivity nádorových buněk k jejich hormonům. Proto většina autorů uváděla konkrétní množství fmol/mg jako hranici, nad níž pacientky nějak výrazněji reagovaly na hormonální léčbu. Přesto, že hraniční hodnoty se pohybovaly u různých autorů od 3 do 20 fmol/mg, nejčastěji používanou hladinou bylo 10 fmol/mg, uvádělo ji více než 70% prací, které prostudovala (Horáčková 1997). Avšak tato hraniční hodnota platila obecně pro všechny věkové kategorie. Pouze u dvou autorů byla hranice pozitivivity rozdílná pro pacientky premenopauzální a postmenopauzální. Vij (1990) uvádí pro premenopauzální 3 a pro postmenopauzální 10 fmol/mg bílkovin. Skoog (1987) má vzhledem k metodě měření ER, isoelektrické fokusaci, fmol přepočteny na obsah DNA. Pro premenopauzální uvádí hranici 100 a pro postmenopauzální 300 fmol/mg DNA. Porovnání hodnot fmol/mg bílkovin a DNA uvádí Remvikos, hodnota 500 fmol/mg DNA odpovídá 10 fmol/mg bílkovin (Horáčková 1997). Autoři se tedy shodovali v tom, že hranice ER pozitivivity postmenopauzálních žen je trojnásobkem hranice u žen premenopauzálních.

V závěru citované diplomové práce byl ještě posuzován vzájemný vztah mezi ER a PR. Většina nalezených autorů tuto souvislost potvrzuje a též ve studii školitele byla určitá závislost naznačena.

#### 4.2.2. Diplomová práce Prokopové

Druhá diplomová práce, zabývající se tématem steroidních receptorů v nádoru prsu, byla na tomto pracovišti sepsána v roce 2001, Radkou Prokopovou.

Práce navazovala na získané poznatky z předcházejících let, na práci školitele a diplomovou práci studentky Horáčkové a doplnila vše o nové pohledy.

V první části se zaměřila na řešení hranice pozitivivity ER a PR a jejich souvislost s prognózou. Posouzení pozitivní hranice ER rozdělila na dva přístupy, starší ortodoxní



a novější progresivní přístup. V přístupu starším, ortodoxním se autoři převážně shodují s hranicí  $\geq 10$  fmol/mg cytosolických bílkovin, ale v některých pracích jsou uvedeny též hodnoty 5, 15 i 20 fmol/mg.

Novější progresivní přístup bere v úvahu i další charakteristiky nádoru jako je velikost, citlivost nádoru na hormonální terapii, věk pacientky, atd. Tento přístup byl však většinou kombinován s ortodoxním přístupem, tedy fixně danou hodnotou. Poté byla tato hodnota posuzována z hlediska ostatních faktorů. Prokopová ve své Diskusi uvedla: Poměr ortodoxního a částečně progresivního přístupu je 1:1 (do progresivního přístupu zahrnula také práce, kombinující ortodoxní hranici s progresivním celkovým hodnocením), z čehož usuzovala, že jmenované prohlubování znalostí o významu steroidních receptorů je v literatuře stále aktuálnější. Uvedla názor, že v budoucnu by měl progresivní multifaktoriální přístup zcela převažovat, zejména také díky rozvoji počítačové techniky (Prokopová 2001).

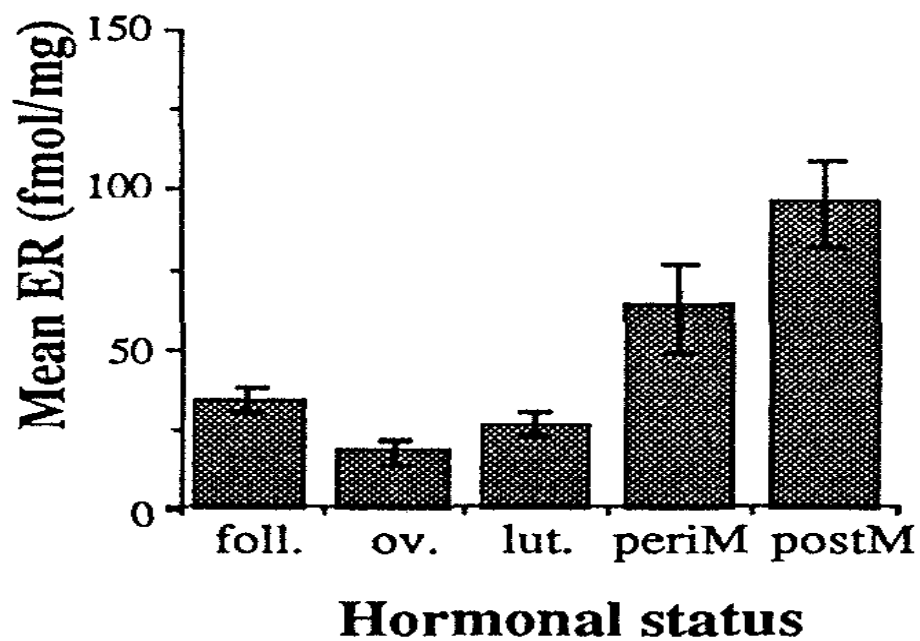
Dále v literatuře zjistila, že u pacientek s nízkými a velmi vysokými hladinami ER je prognóza špatná. U žen, které mají tyto hladiny ve středních hodnotách (10-99 fmol/mg), je doba přežití delší.

Při posuzování hranice pozitivitu pro PR Prokopová uvádí: Převažují stále názory ortodoxní, v nichž tato hranice kolísá mezi 10 a 20 fmol/mg cytosolických bílkovin. Důvodem je to, že PR se s věkem nemění, na rozdíl od ER, což ale řada prací zpochybňuje. Progresivní práce (celkem 3: Neskovic-Konstantinovic a kol. 2000, Raabe a kol. 1998, Hupperets a kol. 1997) se vyznačují použitím vyšších hodnot pro PR pozitivitu oproti ortodoxním, které se většinou pohybují mezi 20 a 80 fmol/mg cytosolických bílkovin (Prokopová 2001). Z hlediska ovlivnění prognózy PR se pak většina použitých prací shoduje, že na přežití mají pozitivní vliv PR(+) nádory a u nádorů PR(-) je prognóza horší.

Další problematiky, kterými se Prokopová zabývala, byly vliv věku na přežití, závislost rozhodnutí o terapii na hladinách PR a ER a také, jako u Horáckové, závislost ER a PR na věku a otázka závislosti ER a PR mezi sebou. Závislost ER a PR na věku a vliv věku na prognózu jsou úzce spjaté. U premenopauzálních pacientek se nejčastěji vyskytuje fenotyp ER(-)PR(+). U starších pacientek v postmenopauzální době pak převažuje fenotyp ER(+)PR(+), který s věkem roste. Také fenotyp ER(+)PR(-) s věkem roste, nejvyšší nárůst je však v době menopauzy. Naopak fenotyp ER(-)PR(-) s věkem klesá, nejvýrazněji kolem 50 roku, poté se již nemění. Střední hodnoty koncentrace ER se častěji vyskytují u postmenopauzálních žen a právě u středních hodnot ER (10-99

fmol/mg) je lepší prognóza. Avšak Prokopová uvádí ve své kapitole Vliv věku na prognózu shodu autorů a to v tom, že u premenopauzálních žen je prognóza lepší než u žen postmenopauzálních. Barchielli a kol. (2000) ale toto odůvodňuje tak, že horší prognóza starších pacientek souvisí s vyšší úmrtností na jiné choroby (Prokopová 2001). Zajímavý je též názor: Pokud nebyla použita věková korekce ER, mohly některé pacientky dostat špatnou léčbu, kvůli které se objevuje takovýto rozdíl v přežití. Mladé ER(-) pacientky totiž při ortodoxním určení rozhraní ER pozitivity a negativity bývají často při novějším přístupu ER(+) (Prokopová 2001).

Prokopová se také zabývala ovlivněním hladin ER a PR menstruačním cyklem. 5 prací tento vliv uvádí (Pujol a kol. 1998, Mangia a kol. 1998, Nikolic-Vukosavljevic a kol. 1996, Donnay a kol. 1995, Coradini a kol. 1984), přičemž se většinou shodují v tom, že hladiny ER i PR jsou vyšší přibližně v období proliferace a menstruace (tedy 1. a 4. týden menstruačního cyklu), kdy jsou relativně nejnižší hladiny estrogenů i progesteronu. Naopak v období s vysokým hormonálním působením jsou hladiny ER a PR nižší. To může mít nepříjemný vliv na přesnost diagnózy a tím i na volbu vhodné terapie (Prokopová 2001). Ve studii Pujola a kolektivu (1998), nalezené Prokopovou, autoři uvádí vliv ovulačního cyklu, ale hladiny PR se v cyklu diametrálně liší od hladin ER: Průměrná hladina ER byla vyšší ve folikulární fázi (30 fmol/mg) oproti luteální (25 fmol/mg) a ovulační (20 fmol/mg) (graf č. 4). Průměrná hladina PR byla vyšší v ovulační fázi (177 fmol/mg) oproti folikulární (134 fmol/mg) a luteální (92 fmol/mg) (graf č. 5).



Graf č. 4: Změny estrogenních receptorů v závislosti na hormonálním stavu (Pujol a kol. 1998).

Vysvětlivky ke grafům:

Mean PgR – průměr PR

Hormonal status – hormonální stav

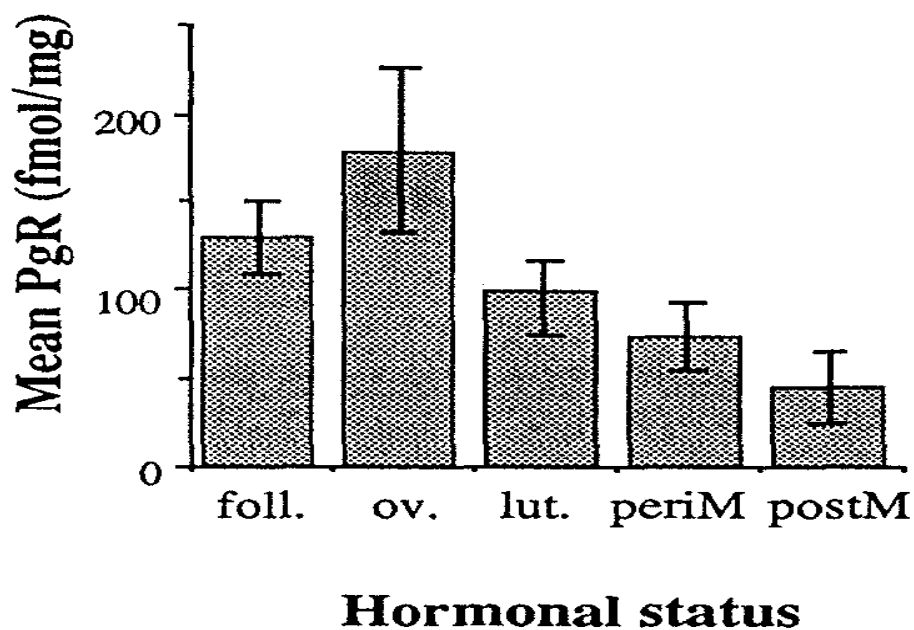
foll. – folikulární fáze

ov. – ovulace

lut. – luteální fáze

periM – perimenopauza

postM – postmenopauza



Graf č. 5: Změny progesteronových receptorů v závislosti na hormonálním stavu (Pujol a kol. 1998).

Zajímavá byla studie Kahna, zaměřená na porovnání hladin ER v průběhu menstruačního cyklu u zdravých žen a u pacientek s nádorem prsu. Pacientky s rakovinou prsu a kontrolní skupina žen bez rakoviny prsu vykazují opačný trend v kolísání ER exprese během menstruačního cyklu. Zdravé ženy vykazaly klesající závislost exprese ER během cyklu (maxima dosáhl medián ER jako procenta pozitivních buněk 6.-9. den od počátku menstruace, pak se objevil výrazný pokles). Naopak u žen s rakovinou prsu se projevila tendence ke vzrůstu exprese ER během menstruačního cyklu (v období 6.-9. dne od začátku menstruace byla nejnižší, postupně vzrůstala s maximem před menstruací) (Khan a kol. 1997).

Na závěr diplomové práce, byla uvedena kapitola „Receptory v nádorech mammy některých domácích zvířat“. V Diskusi pak porovnává nalezené poznatky z veterinárního vyšetření s poznatky vyšetření lidského tumoru prsu. Obdobně jako u lidí je i u zvířat lepší prognóza spojená s ER(+) a PR(+) stavem, na čemž se shodují všichni uvedení autoři.

V souvislosti s tím uvedla, že ER je vyšší v normální nebo benigní oproti nádorové tkáni mléčné žlázy, jak napsali 2 autoři (Donnay a kol. 1995, Rutteman a kol. 1988). V kontrastu s tímto tvrzením byl však v diplomové práci Horáčkové 1997

nalezen údaj, že u lidí je koncentrace ER nižší u benigní oproti maligní nádorové tkáni. Také práce Khana a kol. 1997 potvrzuje opačný jev u lidí: Nižší koncentrace ER ve zdravé a vyšší v nádorové tkáni mammy (Prokopová 2001).

### **4.3. Práce na ostatních pracovištích**

Problémem nádorového onemocnění prsu a různými faktory jej ovlivňujícími se zabývá mnoho výzkumných ústavů a klinických pracovišť.

Použili jsme zde rozdělení na základě časopisů, ve kterých byly články publikovány.

#### **4.3.1. Starší časopisová literatura**

##### **4.3.1.1. Česko - slovenská patologie**

V roce 1993 zde publikoval článek Kolář, z Ústavu patologické anatomie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, o estrogenových receptorech (ER) v karcinomech mléčné žlázy. Zabýval se patofyziologií ER, především z pohledu jejich úlohy při vzniku a progresi nádorového onemocnění, laboratorním stanovením ER a využitím získaných výsledků k prognostickým závěrům.

V roce 1997 zaměřil Kolář svoji analýzu na vztah mezi expresí ER, progesteronových receptorů (PR), proliferační aktivitou a expresí „estrogen receptor related“ proteinu p29, ve snaze nalézt způsob interpretace výsledků imunohistochemických vyšetření z hlediska funkčního stavu estrogeny zprostředkované regulační kaskády. Na základě své analýzy poté navrhl algoritmus pro vyhodnocení funkčnosti ER v karcinomech mléčné žlázy.

##### **4.3.1.2. Klinická onkologie**

V tomto časopise jsme našli výsledky studií z Masarykova onkologického ústavu v Brně.

Rejtar a Nenutil (1993) na základě semikvantitativní analýzy histologického obrazu karcinomu prsu zařadili jednotlivé typy nádorů do prognostických skupin.

Žaloudík a kol. (1995) vydali článek, zabývající se časováním operace karcinomu prsu vzhledem k menstruačnímu cyklu. Ve své práci popírají vliv fází cyklu na léčebné výsledky operovaných pacientek v souvislosti s proliferací aktivitou nebo citlivostí primárního karcinomu k hormonální stimulaci. Avšak za bezpečnější uvedli provedení operace v luteální fázi.

V roce 1997 publikovali Žaloudík a kol. studii, zabývající se vlivem terapie na nárůst heterogenity znaků a vlastností nádoru (diverzifikaci). Analýzou klinických souborů a experimentálních výsledků došli k závěru, že riziko diverzifikace přináší především subletální chemoterapie. Naopak například hormonální terapii považují za anti-diverzifikační (neovlivňující vlastnosti nádoru), avšak lze ji využít pouze u hormonálně dependentních nádorů. Svoji studií upozorňují na fenomén iatrogeně (= lékařským zásahem nebo omylem) indukované diverzifikace karcinomů prsu.

#### 4.3.1.3. Časopis lékařů českých

V roce 1997 byl otištěn článek Skálové a Michala z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Zabývali se zde významem stanovení proliferčních markerů a hormonálních receptorů v karcinomu mléčné žlázy. Ve své studii pracovali s metodami imunohistochemie a jejich cílem bylo ukázat spolehlivost a klinickou relevantnost použitých metod pro stanovení těchto markerů.

#### 4.3.2. Novější časopisová literatura

##### 4.3.2.1. Česká – Slovenská gynekologie

Konopásek (1997) z VFN onkologické kliniky v Praze publikoval svůj referát z Kongresu České gynekologické a porodnické společnosti, kde poukázal na problematiku včasného záchytu, vyčerpávající diagnostiky a úvodní léčby karcinomu prsu. Zabýval se hodnocením jednotlivých prognostických faktorů a přítomnost či absenci ER a PR v karcinomu uvedl jako jeden z hlavních prognostických faktorů.

V témže roce zveřejnil dvě ze svých prací Strnad z VFN. 1. gynekologicko-porodnické kliniky v Praze. První ze článků se týkal vztahu délky užívání hormonální substituční léčby (HST) a rizika karcinomu prsu.

V následně publikované práci se zabýval rizikovým vlivem dávky nebo typu používání estrogenů jako HST a otázkou rizikového či protektivního vlivu přidání progestinů k monoterapii estrogenu. Došel k závěru, že přidáním progestinů bylo eliminováno riziko estrogenální léčby na vývoj karcinomu endometria. Avšak zvýšení či snížení rizika karcinomu prsu přidáním progestinů nebylo prokázáno.

V roce 2001 předložil Strnad a kol. počátek studie o mastopatii (vysoké denzité prsu), jako o rizikovém faktoru karcinomu prsu. Na podkladě svého výzkumu došli k závěru, že výrazná mastopatie není rizikovým faktorem karcinomu prsu. Není projevem hyperproliferace epitelu prsu, ale involuce prsu a morfologický podklad těchto změn tvoří výraznější přítomnost vaziva a fibróza. Uvádí též, že mastopatie zhoršuje mamografickou diagnostiku časných stádií karcinomu prsu.

V závislosti na vyšetření mastopatie provedli též vyšetření exprese hormonálních receptorů v biopsicky odebrané, vysoce denzní tkáni. Vyšetřované ženy byly rozděleny do 3 skupin, nejpočetnější s neproliferujícími změnami, s proliferací bez atypií a s pozorovanou atypickou hyperplazií. Celkové nálezy byly ve shodě s průběhem hladin hormonálních receptorů, kdy v benigních lézích jsou jejich hodnoty nízké, zvyšují se u prekanceróz a nádorů in situ. U invazivních nádorů pozitivita hormonálních receptorů klesá se stupněm invazivity a dediferenciace. Metastatický karcinom, který je příčinou mortality, již hormonální receptory většinou neobsahuje.

Též v roce 2002 byla tématem Strnadovy studie hormonální substituční terapie (HST). Snažil se prokázat histologické a imunochemické změny tkáně prsu mezi uživatelkami HST. Ve sledované skupině uživatelék HST však nenalezl souvislost mezi užíváním HST a zvýšením proliferace zdravé tkáně prsu. Závěrem uvedl, že HST tímto mechanismem nezvyšuje riziko karcinomu prsu.

Ve stejném roce publikoval svoji studii také Saksun z 2. gynekologicko-porodnické kliniky LF L. Pasteura v Košicích. Zaměřil se na vyšetření tloušťky a struktury endometria u postmenopauzálních pacientek s karcinomem prsu, jako na projev hormonálního stavu pacientky. Jeho výsledky se shodovaly se současnými poznatky o významné úloze endogenních estrogenů v patogenezi karcinomu prsu.

Zajímavý byl článek Kinkora a kol. (2004) z biopsické laboratoře s.r.o. v Plzni o novém typu karcinomu, matrix produkujícím karcinomem prsu s myoepiteliální

diferenciací. Uvádí je, jako jedinečnou entitu z hlediska morfologického, odlišnou od myoepiteliálního karcinomu i od heterologního metaplastického karcinomu, která si zasluhuje samostatné postavení v klasifikaci. Svoji práci obohatil též o přehled literatury, zabývající se histogenezi a diferenciální diagnostikou.

Houserková a Matlochová (2004) z radiologické kliniky FN a LF UP v Olomouci pozorovaly změny mamografického a ultrazvukového obrazu prsní žlázy u žen, užívajících HST. Statisticky významné zvýšení denzity mamografie bylo prokázáno v souborech žen, užívajících jak kombinovanou, tak i estrogenní monoterapii. Statisticky významně vyšší nárůst denzity mamografie však bylo v souboru žen, užívajících kombinovaný hormonální preparát, oproti souboru žen, užívajících estrogenní monoterapii.

#### 4.3.2.2. Lékařské listy

Z časopisu Lékařské listy jsme vybrali pouze některé články. Ve většině případů se autoři zabývali především terapií, což není naše téma.

Valík a kol. (2001) z Masarykova onkologického ústavu v Brně a Fakultní porodnice FN v Brně publikovali článek s názvem Prediktory účinnosti hormonální léčby. Popisují v něm vznik a funkci estrogenů, jejich vliv na maligní transformace prsní žlázy, citlivost prsní tkáně k jejich působení a tyto poznatky v závěru vztahují k použití antiestrogenální terapie.

Zajímavý byl fakt o izoformách estrogenových receptorů: Varianty  $\alpha$  a  $\beta$  se od sebe liší jednak rozdílností v tkáňové expresi a afinitou k estrogenu (varianta  $\alpha$  má afinitu vyšší). In vitro bylo pozorováno, že obě varianty tvoří homo- i heterodimery a že varianta  $\beta$  snižuje citlivost varianty  $\alpha$  k estrogenu. Lze ji tedy pravděpodobně považovat za fyziologický regulátor proliferativního potenciálu varianty  $\alpha$ . Také se zmiňují o lokální produkci estrogenů v prsní tkáni: 17beta hydroxysteroid dehydrogenázy katalyzují přeměnu estronu na estradiol. Jejich aktivita bývá vyšší v tumorech prsní žlázy než v normální tkáni a mohou tedy zvyšovat lokální (tj. parakrinně) produkci estradiolu, který je v určitých fázích karcinogeneze jedním z hlavních růstových faktorů tohoto onemocnění (Valík a kol. 2001).

Také Fait (2002) z gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze vydal článek týkající se HST. Zabývá se otázkou možného zvýšení rizika karcinomu



prsu používáním této terapie. V závěru uvádí, že dlouhodobé užívání estrogenů může být spojeno se zvýšením relativního rizika karcinomu prsu pravděpodobně stimulací růstu existujících nádorových kmenů.

Hormonální léčbu karcinomu prsu popisuje ve své práci Chovanec (2003), z gynekologicko-porodnické kliniky MU v Brně. Dělí ji do skupin, podle způsobu dosažení léčebného efektu. U metod ablačních je léčebný efekt vyvolán chirurgickým odstraněním či ozářením endokrinní žlázy. U metod aditivních se podávají steroidní hormony (i synteticky vyrobené – medroxyprogesteron acetát) ve vyšších než substitučních dávkách, čímž se blokuje vazba hormonů na nukleární steroidní receptory. Princip inhibičních metod spočívá v blokování syntézy hormonů nebo jiných metabolických účinků a podávání přípravků, které soutěží o receptor s přirozeným hormonem (tamoxifen), je základem kompetitivních metod.

Ve svém článku se také zmiňuje o fenotypové přeměně karcinomu: Spontánní ztráta receptorů u recidivujícího karcinomu prsu může poskytnout částečné vysvětlení pro rezistenci na hormonální terapii, kdy byl původní primární karcinom ER pozitivní. Tento jev může být vysvětlen genetickými mutacemi receptorů (Chovanec 2003).

O nových perspektivách a možnostech léčby postmenopauzálních žen s hormonálně dependentním karcinomem prsu sepsal článek Petruželka z onkologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Rozdělení HST je v jeho článku obdobné, jako u Chovance. U antiestrogenů, tedy kompetitivních inhibitorů, doplňuje fakta o jejich funkci o nová: Steroidní „čisté“ antiestrogeny (fulvestrant) nejen antagonizují transkripční aktivaci estrogenních receptorů, ale způsobují též degradaci receptorů.

V souvislosti s terapií uvádí, že vyšetření exprese hormonálních receptorů je obligatorní (povinnou, nutnou) podmínkou a predikuje odpověď na hormonální léčbu. Hormonální manipulace u nádorového onemocnění bez imunohistochemicky prokázané exprese receptorů je neúčinná a zbytečná.

Článek též obsahoval pro nás velmi zajímavou informaci: Poměrně značné množství estrogenů vzniká aromatizací přímo ve tkáni nádoru. Ačkoliv množství estrogenů, vznikajících při periferní aromatizaci je významně nižší ve srovnání s ovariální produkcí u menoaktivních žen, je stále dostačující k transkripční aktivitě prostřednictvím estrogenových receptorů (Petruželka 2004).

## **5. ZPŮSOB VYHLEDÁVÁNÍ INFORMACÍ NA INTERNETU**

### **5.1. Obecný popis práce**

Pro získávání informací k tématu této bakalářské práce bylo použito převážně internetových vyhledavačů.

Nejprve jsme vymezili dobu, z jaké by články měly pocházet, tedy nejnovější poznatky. Zadáním klíčového slova jsme dostali seznamy článků s abstrakty, které podle klíčového slova souvisejí s daným problémem. Ty jsme redukovali pomocí dalších slov a hledání jsme směřovali k určitému problému.

Takto získaná abstrakta jsme třídili po prvotním shlédnutí textu podle frekvence výskytu zadaných slov a podle názvu článku.

Z vybraných abstraktů jsme po důkladném přeložení a pročtení vybírali věty do kontextu a texty byly zásadním podkladem rešeršní práce.

### **5.2. Použití vyhledavače**

#### **5.2.1. Vyhledavače dostupné bez licence**

Vyhledavačů jako GOOGLE nebo ATLAS jsme pro vyhledávání použily jen omezeně, převážně v kapitole Teoretická část, přičemž postup byl stejný, jako u vyhledavačů dostupných s licencí.

#### **5.2.2. Vyhledavače dostupné s licencí pro farmaceutickou fakultu**

Pro vyhledávání abstraktů jsme využili databáze Medline, Science Direkt a Scirus. Pracovní postup při hledání abstraktů je uveden výše.

### **5.3. Přehled kombinací klíčových slov pro dílčí otázky**

Jako základní slova jsme používali (estrogen or oestrogen) receptor and (progesteron or progestin) receptor. Pro zúžení výběru a zpřesnění hledaných údajů jsme pak doplňovali slovy: (menstr\* cycle or menstruation), (ovul\* cycle or ovulation or ovarial cycle), menopause, age, regulation, expression, level, ratio, change.

Jejich kombinací jsme tak dostali mnoho abstraktů. Jako poslední klíčové slovo jsme uvedli breast cancer. Tedy zúžili vše pouze na nádor prsu. Důvodem byl fakt, že při zadání tohoto klíčového slova jako základního, jsme dostali velké množství abstraktů, ale v nich bylo minimum informací o ovlivnění receptorů steroidních hormonů, což je tématem této práce.

## **6. PŘEHLED NOVĚ ZÍSKANÝCH POZNATKŮ O OVLIVNĚNÍ ER A PR**

### **6.1. Vztah mezi ER a PR**

Samotný vztah mezi oběma typy receptorů je úzce spjat s působením vlastních hormonů. Například aktivace estrogenového receptoru (ER) estradiolem (E2) vede ke kaskádě dějů, které mohou mít vliv na funkci či samotnou expresi druhého typu receptorů, progesteronového receptoru (PR).

Z námi nalezených abstraktů vyplynula další důležitá fakta: Významná korelace byla pozorována mezi hladinou intratumorového estradiolu (E2) a hladinou PR pomocí statistického testu pro jednoduchou křivku ( $r = 0.39$ ,  $P < 0.01$ ) v ER(+) nádorech. U lidí jsou PR v nádorech prsu indukovány nejen ovariálními estrogeny, ale také intratumorovým estradiolem pomocí ER. Progesteronový receptor, jehož výskyt je zde oprávněn jak z důvodu přítomnosti funkčních ER, tak z důvodu dostatečné hladiny intra-tumorového estradiolu, může sloužit u pacientek jako lepší faktor pro prognózu primárního karcinomu prsu, než intra-tumorová hladina estradiolu nebo ER. Je to pravděpodobně proto, že PR je lepší marker estrogenně-dependentního nádorového růstu (Miyoshi a kol. 2004).

Je však důležité brát v úvahu přítomnost receptorů v několika izoformách. Studie Viononena a kol. (2002) ukazuje: Estradiol indukoval expresi PR ve všech studovaných buněčných liniích, poměr exprese PRA/PRB, indukovaný estradiolem, závisel na buněčných liniích. Odlišná regulace těchto izoform byla též pozorována na hladině mRNA. To naznačuje, že promotory PRA a PRB jsou odlišně regulované estradiolem (E2) v odlišných buňkách nádoru prsu. Inzulín, IGF-1 nebo cAMP, o kterých bylo dříve publikováno, že indukují expresi PR, však v jejich studii expresi PR nijak nemění.

Také jednotlivé izoformy mají schopnost se ovlivňovat navzájem: PRA projevuje dominantní inhibiční efekt na aktivitu PRB a na další jaderné receptory.

PRA a PRB jsou exprimovány v cílových tkáních ve srovnatelných hladinách, nicméně mohou být identifikovány buňky, produkující přednostně pouze jednu z izoform. V některých tumorech probíhá exprese vysokých hladin PRA a to může být

spjata se špatnou prognózou. Nadměrná exprese PRA je spojena se změnou adhezivních vlastností v buňkách nádoru prsu a ovlivňuje endogenní progestinové cíle, které závisely na buněčném poměru PRA:PRB. Závěry této studie se shodují s názorem, že exprese PRA může kolísat v širokém rozsahu cílových buněk bez ovlivňování přirozeného účinku progestinu na cíle nižší úrovně, ale tato nadměrná exprese může být spjata s inhibicí účinku progestinu a později se špatnou prognózou (McGowan EM a kol. 1999).

V podmínkách promotoru a buněčného typu, kde (vlivem první ligandy – progesteronu) na ligandu změněný PR nebyl dobrým aktivátorem transkripce, PR izoformy se chovaly jako silný, ligandově závislý represor ER transkripční aktivity (Kraus a kol. 1997).

Autoři identifikovali rozmanité determinanty této represe pomocí systematicky manipulujících potenciálně důležitých matematických „proměnných“ v tomto systému (například poměr PRA:PRB, sekvence složek odpovědi (genetického aparátu), receptorové struktury a typu ligandu). Změny v několika z těchto parametrů měly veliký vliv na schopnost PR potlačit aktivitu ER. Pokles v poměru PRA:PRB a změny v pořadí elementů progestinové odpovědi ve tvorbě reportérového genu zrušily inhibiční účinek agonisticky působícího PRA na ER transkripční aktivitu.

Změny ve struktuře ER ligandu a pořadí elementů estrogenové reakce neovlivnily velikost represe zprostředkované PR. Vázané (ligandované) PR interferují se schopností ER produktivně interagovat s transkripční mašinerií (Kraus a kol. 1997).

S expresí PR byly úzce spjaty ER $\alpha$ , ne ER $\beta$ . To nasvědčuje tomu, že ER $\alpha$  je hlavní regulátor tohoto estrogenem indukovaného genu progesteronového receptoru v nádorech prsu. Zatímco exprese ER $\alpha$  pozitivně korelovala s nízkým (histologickým) stupněm nádoru, diploidií, a s nízkým % buněk v S-fázi, tedy se všemi biologickými parametry dobrého prognostického profilu, měly ER $\beta$  tendenci tíhnout pouze k aneuploidii a souvislost se stupněm nádoru nebo S-fází nebyla pozorována.

Z uvedeného vyplývá, že jednotlivé izoformy jsou nezaměnitelné. I když obsahují stejné vazebné místo pro stejný hormon, navázáním a následnými ději působí odlišně. Citovaní autoři zjistili: Expresse ER $\beta$  může způsobit falešně pozitivní interpretace pro ER $\alpha$ . Tento závěr naznačuje, že v klinických nádorech prsu exprese ER $\beta$  není zastupující pro ER $\alpha$  a ER $\beta$  může být použitelným biomarkerem (Fugua a kol. 2003).

Podle studie Andersona: Vzrůst exprese ER $\alpha$  a ztráta inverzní (opačné) závislosti mezi receptorovou expresí a proliferací (při větší koncentraci receptorů je menší proliferace) se děje ve velmi raných stádiích kancerogeneze, což znamená, že dysregulace exprese ER přispívá k tvorbě nádoru prsu. Je zde též důkaz o změnách poměru mezi dvěma izoformami PR v premaligních prsních lézích (Anderson 2002).

## **6.2. Vliv menstruačního a ovariálního cyklu**

### **6.2.1. Ovlivnění ER a PR v prsní tkáni**

Podářilo se nám najít abstrakta z novějších studií, zabývajících se touto problematikou. V první řadě, je jen velice málo informací o samotné regulaci steroidních receptorů, přítomných v prsní tkáni. Další problém jsou různé izoformy, ve kterých se receptory vyskytují. Estrogenové i progesteronové receptory se nachází ve dvou izoformách.

ER byly pozitivní u 57 (64.8%) a PR u 40 (70.2%) pacientek v samostatných studiích. 49 pacientek bylo ve fázi folikulární a 39 pacientek ve fázi luteální, které byly určeny na základě sérové hormonální hladiny. ER pozitivita byla významně vyšší v hormonálně definované folikulární fázi a také měla tendenci být vyšší v perimenstruální fázi. Naopak stav PR, jak bylo nalezeno, byl nezávislý na fázích menstruačního cyklu (Atalay a kol. 2002).

Studie Chenga a kolektivu byla zaměřena na pozorování regulace receptorů, a to obou izoform, v prsní žláze opice maccacus rhesus během menstruačního cyklu, období těhotenství a laktace. Svojí prací objasnili nová fakta. Našli, že ER $\alpha$ , ale ne ER $\beta$ , jsou regulovány směrem dolů, když hladina E2 roste, a když buňky vstupují do buněčného cyklu. Exprese PRB, ale ne PRA, probíhá v proliferujících buňkách. Tudíž za normálních podmínek závisí poměr ER $\alpha$  a ER $\beta$  v prsu na plasmatické koncentraci E2. Zvýšená exprese ER $\alpha$  (vyskytující se u postmenopauzálních žen) je normální odpovědí na pokles E2 a indikuje neproliferující buňky (Cheng a kol. 2005).

Někteří autoři se zaměřili na pozorování morfologických změn nádorové tkáně během menstruačního cyklu: Menstruační změny a proliferační aktivita (3H-Thymidine Labeling Index = 3H-TLI) projevovaly významnou periodicitu s maximy ve 12. a 18.

dni, ER vykazovaly významnou periodicitu s mnohem výraznějším maximem ve 27. dni a PR s maximy v 15. a 24. dni menstruačního cyklu (Paradiso a kol. 2001).

V případě transplantabilních nádorů u myši, během preovulační (folikulární) fáze a fáze ovulační docházelo k malým změnám velikosti nádoru nebo k nim nedocházelo vůbec. Velikost nádoru narostla několikrát během postovulační fáze (luteální) a částečně se zmenšila při přiblížení další preovulační fáze (folikulární) (Wood a Hrushesky 2005).

### 6.2.2. Vliv cyklů na jiné orgány

Další z nalezených článků se zaměřil pouze na hladiny PR a to ve žlutém tělísku (corpus luteum): Celkové koncentrace PR (PR-AB) a PRB mRNA v pozdější části sekreční fáze byly statisticky ( $P < 0.01$ ) nižší než ty v časném nebo středním úseku sekreční fáze menstruačního cyklu. Poměr koncentrace PRB k PR-AB mRNA neukázal žádné statisticky významné změny během trvání sekreční fáze. V časném a středním úseku sekreční fáze se projevila negativní korelace mezi koncentrací PRB mRNA a koncentrací progesteronu v séru, a mezi poměrem koncentrací PRB k PR-AB mRNA a koncentrací progesteronu v séru ( $P < 0.01$ ). Tyto nálezy ukazují, že lidské corpus luteum může intracelulárně syntetizovat PRA a PRB, a proto může být zahrnuto do steroidních funkčních regulací sebe samotného, speciálně v časně a střední sekreční fázi, a tak progesteron může regulovat syntézu PRA a PRB (Misao a kol. 1998).

Vlivem cyklu na receptory v děloze, především v endometriu, se zabývá bakalářská práce Evy Hirmerové, která bude letos též odevzdána.

### 6.3. Vliv stáří

Pro posouzení hladin ER a PR je nutné brát v úvahu také věk pacientky. V různých fázích života je totiž hladina hormonů v těle jiná.

Pujol, toto ve své studii potvrzuje: Procentuální vyjádření ER(+) nádorů bylo větší mezi ženami v menopauze než mezi premenopauzálními ženami (67% vs. 59%). A naopak procentuální vyjádření PR(+) nádorů bylo mezi menopauzálními ženami nižší než mezi premenopauzálními (65% vs. 78%). V období premenopauzálním byla slabě

negativní korelace mezi hladinami ER a estradiolu (E2). Ale mezi premenopauzálními a menopauzálními ženami nebyly nalezeny žádné korelace mezi hladinami ER a progesteronem (Pg) a hladinami FSH a LH nebo mezi hladinami PR a E2, Pg, a FSH a LH (Pujol 1998).

Další autoři se zabývali ovlivněním receptorových hladin cirkulujícími hormonálními koncentracemi a jejich závěry se částečně lišily od předešlých:

Drafta a kol. (2002) uvádí, že hladina cirkulujícího estradiolu u postmenopauzálních žen byla vyšší u ER(+) nádorů než u ER(-) nádorů. Jejich výsledky dokazují, že: a) přítomností endogenních estrogenů pravděpodobně nejsou způsobeny falešně negativní výsledky ER, b) v ER(+) nádorech jsou obsažena vyšší množství estronu a estradiolu než v ER(-).

Postmenopauzální ženy vykazovaly korelaci mezi hladinou ER a hladinou „arteriálního“  $17\alpha$ -hydroxyprogesteronu v prsní tkáni. Hladiny ER, vyjádřené matematicky jako funkce plasmatického (arteriálního) steroidního molárního koncentračního poměru ( $Pg/17 Pg$  – poměr progesteronu ku  $17\alpha$ -hydroxyprogesteronu), byly distribuovány v podobě hyperboly, což značí existenci kontrolního mechanismu pro hladiny ER buněk prsu (Duvivier a kol. 2003).

Vyhledali jsme také práci, ve které autor uvádí: Pozitivní exprese ER a PR korelovala s pozdním nástupem menarche a časnou menopauzou (Liao a kol. 2004).

#### **6.4. Mimovaječnickové příčiny falešné negativy ER v nádorech prsu**

Jak jsme již citovali Petruželku (2004) v kapitole Česká snadno dostupná literatura: Poměrně značné množství estrogenů vzniká aromatizací přímo ve tkáni nádoru. Na základě námi nalezených internetových abstraktů lze předpokládat, že tyto „endogenní“ estrogeny mohou ovlivňovat hladinu ER.

Pro růst estrogenově závislých nádorů prsu a pro přežití v případě postmenopauzálních žen je lokální tvorba estrogenů v nádorech prsu důležitější než cirkulující estrogeny v plazmě. Hladiny estrogenů ve tkáni postmenopauzálních nádorů prsu jsou 10 – 40krát vyšší než v plazmě (Nakata a kol. 2003).

Jiný mechanismus lokálního přebytku estrogenů je snížení degradace ovariálních estrogenů v cílové prsní tkáni, nebo přeměna méně aktivních estrogenů na aktivnější: Enzymy 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenázy (17 beta-HSD) jsou zapojeny do



přeměny biologické aktivity a inaktivity pohlavních steroidů a předpokládá se, že hrají kritickou roli v metabolismu estrogenu in situ, speciálně v nádoru prsu, závislém na estrogenu. Gen, kódující 17 beta-HSD typu 2, je chromozomálně lokalizován na 16q24.1-2 a dřívější studie ukázaly, že ztráta alely v této oblasti je časný a frekventovaný děj při progresi tumoru. Normální prsní žláza exprimuje oba typy 17 beta-HSD, 1 i 2, zatímco nádory mají často nedostatečné hladiny typu 2. Pouhých 10% ER(+) nádorů exprimuje typ 2, zatímco u nádorů ER(-) je to 31% (Gunnarsson a kol. 2001).

Další článek ukazuje na spojitost dalšího typu 17 beta-HSD s nádorem prsu. Byla pozorována statisticky signifikantní spojitost mezi expresí ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Byla zde také významná inverzní spojitost mezi ER $\alpha$  a 17 beta-HSD1 (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1), stejně tak jako mezi ER $\alpha$  a 17 beta-HSD5 (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 5). Pacientky s nádory, ve kterých probíhá exprese 17 beta-HSD1 mRNA nebo samotného proteinu, měly významně kratší celkové přežití a kratší interval bez projevů choroby než ostatní pacientky. Exprese 17 beta-HSD5 byla významně vyšší ve vzorcích nádoru prsu než v normální tkáni. Skupina s nadměrnou expresí 17 beta-HSD5 měla horší prognózu oproti ostatním pacientkám (Oduwole a kol. 2004).

## 6.5. Vliv tukové tkáně

Několik autorů se zmínilo o možném vlivu množství tukové tkáně na nádor prsu.

Viscerální obezita\* a přírůstek váhy jsou považovány za odpovědné za rostoucí riziko nádoru prsu u postmenopauzálních žen. Prsní žláza je citlivá na hladinu cirkulujících estrogenů a obezita je obvykle spojena s vyššími hladinami volných steroidních hormonů. Tuková tkáň vykonává důležité endokrinní funkce. Tato souvislost je spojena s přítomností estrogenových a progesteronových receptorů v buňkách nádoru (La Guardia a Giammanco 2001).

Ostatní autoři nehovoří přímo o ovlivnění hladiny receptorů, ale o tukové tkáni jako rizikovém faktoru a to převážně u žen po menopauze.

---

\* Viscerální obezita = nadměrná kumulace útrobního tuku, nacházející se v oblasti hrudníku a břicha zejména uvnitř břicha

Tkáňové hladiny celkových lipidů, triglyceridů a cholesterolu byly velmi významně zvýšené u žen s tumorem prsu oproti ženám s benigním prsním onemocněním a též významně korelovaly s hladinou estradiolu. Z toho může být usuzováno, že příjem lipidů z plasmy nádorovou tkání velmi koreluje s estradiolem a může potvrdit pravděpodobnou roli lipidů jako rizikového faktoru v nádoru prsu (Essam 2001).

Ženy, u kterých během období mezi peri- a postmenopauzou (od 50 let) vzrostla váha více než o 11 kg, měly 1.62-krát větší riziko nádoru prsu oproti ženám, u kterých se váha v tomto období nezměnila. Tento efekt přírůstku váhy se vyskytl pouze u žen, které nikdy nebraly HRT a byl mnohem více přítomen mezi pacientkami s ER(+)/PR(+) nádorem prsu (Eng a kol. 2005).

Odhady hmotnosti netukové tkáně, tukové tkáně a obvodu pasu byly spojeny s rizikem nádoru prsu (nárůst větší jak 10kg). Mezi ženami, které byly 15 let po menopauze toto riziko ostře stoupalo a setrvalo zvýšené (MacInnis a kol. 2004).

## **6.6. Vliv farmaceutických přípravků**

Podávání tamoxifenu jako antiestrogenu před vyšetřením karcinomu prsu může způsobit vznik falešných výsledků PR. Tamoxifen je podáván preventivně u postmenopauzálních žen s vysokým rizikem tumoru prsu. Tamoxifen, jak se zdá, má stimulační efekt na dělohu a endometrium (Plouffe Jr a kol. 2000).

V práci Isakssona a kolektivu je uveden vliv tamoxifenu a HRT na prsní tkáň makaků, především na expresi progesteronových receptorů a to obou izoforem: Poměr dvou izoforem progesteronového receptoru, PRA/PRB, může určit odezvu k progesteronu v reprodukční tkáni. Při studii využili imunohistochemické zobrazovací metody a došli k výsledkům: Celkové zbarvení PR v glandulárním epitelu bylo mnohem hojnější během podávání CEE (konjugované koňské estrogy) (12%) a tamoxifenu (11%) v porovnání s kombinovanou léčbou CEE/MPA (medroxyprogesteron acetát) (5%) a samotnou léčbou MPA (4%). Mezi vlivem jednotlivých farmak byly pozorovány rozdíly v expresi PRB. Při používání CEE hladiny PRA zůstaly nezměněny, zatímco kombinace CEE/MPA vedla k poklesu koncentrace. Ovlivnění tamoxifenem mělo obdobný účinek jako použitý konjugovaný estrogen (Isaksson a kol. 2003). Tyto látky mají tedy odlišný vliv na expresi dvou

izoforem PR. Jejich používání vede k narušení rovnováhy mezi PRA a PRB, která se za fyziologických podmínek tvoří.

Jak již bylo popsáno výše, tamoxifen vazbou na ER inhibuje jeho funkci. Ve článku Mediny, který se zaměřil na studii inhibice estrogenových receptorů tamoxifenem, byl uveden názor: Mnoho nádorů prsu, které se objevují po léčbě tamoxifenem, je ER $\alpha$ -negativní, přestože premaligní poruchy, jako atypická duktální hyperplasie, jsou vysoce ER $\alpha$ -pozitivní. Z výzkumu, provedeného na myších, dospěl k závěru, že tamoxifen blokoval estrogenové signály u těchto myší, což se projevilo poklesem progesteronem indukovaného laterálního řetězení a epiteliální proliferace v epitelu prsu. Tamoxifen nezměnil zvýšené hladiny progesteronu v krvi, naproti tomu výrazně zredukoval cirkulující hladinu prolaktinu (Medina a kol. 2005).

Synteticky vyráběný progesteron medroxyprogesteron acetát (MPA) patří k blokátorům PR. Při volbě léčby právě tímto přípravkem je nutné brát v úvahu hladiny androgenních receptorů. Podle článku Buchanan a kolektivu (2005): Snížení hladiny androgenních receptorů a receptorové funkce v nádoru prsu přispívá k nedostatečné odpovědi na MPA. Nádory s větším množstvím androgenních receptorů než je střední (mediánová) hladina (37 fmol/mg proteinu) měly významně nižší hladinu PR (30 fmol/mg proteinu) než nádory s nižší hladinou AR (PR, 127 fmol/mg proteinu), oproti porovnatelným hladinám ER.

Ligandově závislá aktivace AR v lidských T47D a MCF-7 buňkách nádoru prsu měla za následek inhibici estradiolem stimulované buněčné proliferace a redukci ve schopnosti ER indukovat expresi PR (tyto účinky mohou být odvráceny pomocí specifického oligonukleotidu, který působí snížení citlivosti na AR). Narůstající poměr AR k ER způsobil větší, na androgenech závislou inhibici funkce estrogenových receptorů (Buchanan a kol. 2005).

## **6.7. Vliv kationů kovů**

### **6.7.1. Hlinité kationty**

Schopnost hlinitých kationů působit změny v DNA je známa. Pokud k těmto změnám dochází v buňkách prsní tkáně, může dojít ke zvrhnutí buněčné linie a k rozvoji karcinomu. Hlinité soli jsou často využívány v kosmetice jako aktivní

antiperspiranty proti pocení. Otázkou působení alumina na steroidní receptory se zabýval Darbre. Vliv estrogenu na nádor prsu a jeho účinek, závislý na intracelulárních receptorech, fungujících jako ligandem aktivované transkripční faktory v podobě zinkových prstů, naznačuje možnost interference s alumiem. Výsledky, které autor uvádí, ukazují, že aluminium ve formě aluminium chloridu (chloridu hlinitého) nebo aluminium chlorhydrátu (hydrogenchloridu hlinitého) může interferovat s funkcí ER lidských nádorových buněk karcinomu prsu, zvaných MCF7, v obou významech, tedy jak z pohledu ligandové vazby, tak z pohledu exprese estrogenem regulovaného reportérového genu (Darbre 2005).

### 6.7.2. Kationy selenu

Oproti tomu je přítomnost selenu v organismu žádaná. Má schopnost působit v těle chemopreventivně. Selen, obsažený v methylselenové kyselině (MSA) inhibuje estrogenové receptory (ER alfa) v ER-pozitivních MCF-7 nádorových buňkách, jak bylo dokázáno pomocí snížení nádorového růstu, závislého na estradiolu a pomocí genové exprese. MSA minimalizuje estradiolovou indukci endogenních genů, regulovaných pomocí ER, stejně tak jako expresi ER-regulujících reportérových genů. Hlavní způsob účinku MSA na signalizování ER je pomocí snížené regulace ER $\alpha$ , tedy tlumivé regulace exprimování genu ER $\alpha$  (Shah a kol. 2005).

### 6.7.3. Vápenaté kationy

Vápenaté kationy jsou pro lidský organismus nezbytné a jsou v něm fyziologicky obsažené, nejvíce v kostní tkáni. Otázku: „Jak působí na nádorovou tkáň?“, si ve své práci položili Journe a kol. a založili na tom svoji studii. Uvedli jakousi zpětnou vazbu mezi vápenatými kationy v kosti a metastazujícím tumorem. Nádor má schopnost indukovat osteolýzu, což vede k uvolnění množství vápníku. Pokusem zjistil, že 20 mM roztok extracelulárního Ca $^{2+}$  způsobil tlumící regulaci ER proteinu v MCF-7 buňkách a v jiných buněčných kulturách (v MVLN buňkách) způsobil ER zprostředkovanou transaktivaci reportérového genu o 55 +/- 10%. Navíc 3 mM roztok Ca $^{2+}$  zvýšil expresi PR o 45 +/- 8%. Mg $^{2+}$ , testované v množství do 20 mM, neovlivnilo žádné účinky.

Účinek  $\text{Ca}^{2+}$  na ER pravděpodobně začíná na úrovni buněčné membrány, protože velký influx (vtékání)  $\text{Ca}^{2+}$  snižuje aktivaci ER. Autor tím došel k závěru: Účinek extracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  na expresi ER a na aktivitu ER je zprostředkovaný, přinejmenším z části, kalciovými receptory (CaR). Souhrnně, kalcium, uvolněné v průběhu procesu metastazující kostní destrukce, může modulovat funkci ER, klíčového receptoru růstu nádorových buněk (Journe a kol. 2004).

## **7. DISKUSE**

### **7.1. Vztah mezi ER a PR**

Z předešlých studií vyplývá, že estradiol (E2) snižuje koncentraci ER vazbou na daný receptor a následnými genetickými regulačními mechanismy, odstartovanými právě touto vazbou. Pokud se tedy koncentrace estradiolu sníží, je produkováno ER více, protože ke zprostředkovanému signálu nedochází. To potvrzuje i poznatek, že v menopauze roste hladina ER v důsledku snížení hladiny E2 v těle, a většina nádorů v tomto věku je ER(+).

Snížením hladiny E2 dochází následně i k poklesu koncentrace PR, jehož exprese je regulována komplexem E2-ER. Zároveň je však nutno uvažovat o možnosti současného vlivu opačného mechanismu, kdy snížení hormonální hladiny E2 a Pg např. v menopauze nebo v průběhu ovariálního cyklu vede ke zvýšení hladiny PR. Tím by mohlo být vysvětleno, proč někteří autoři našli věkový pokles a jiní naopak věkový vzestup PR při vyšetření premenopauzálních pacientek, které se nacházeli v odlišných fázích ovariálního cyklu.

Uvedené vlivy věku se mohou navzájem vyrušit, s čímž pracuje Miyoshi a kol. (2004). Autoři také uvádí závislost mezi ER a PR v ER(+) nádorech prsu, ale berou v úvahu také E2, tvořící se intratumorálně a z tohoto důvodu považují PR za lepší faktor pro prognózu primárního karcinomu prsu, protože lépe indikuje estrogeně dependentní nádorový růst.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, ER se exprimuje ve tkáni ve dvou izoformách  $\alpha$  a  $\beta$ . Podle Fugua a kol. (2003): S expresí progesteronových receptorů byly úzce spjaty ER $\alpha$ , ne ER $\beta$ . To nasvědčuje tomu, že ER $\alpha$  je hlavní regulátor tohoto estrogenem indukovaného genu progesteronového receptoru v nádorech prsu.

PR je však v nádorové tkáni také tvořen ve dvou izoformách A a B. Z tohoto hlediska jsou velice zajímavé výsledky studie Viononena a kol. (2002) o vlivu estradiolu na PR. Promotory PRA a PRB jsou odlišně regulované estradiolem v odlišných buňkách nádoru prsu. S tím souhlasí také Mc Gowan a kol. (1999): Mohou být identifikovány buňky, produkující přednostně pouze jednu z izoform. A navíc podle jejich studie: PRA projevuje dominantní inhibiční efekt na aktivitu PRB a na další jaderné receptory. Nadměrná exprese PRA ovlivňuje endogenní progestinové cíle, které

závisely na buněčném poměru PRA:PRB, což může být spjato s inhibicí účinku progestinu a později se špatnou prognózou.

Studie Krause a kol. (1997) také popisuje inhibiční schopnost izoform PR, v jejich případě se zabývají schopností represe transkripční aktivity ER. Jejich studie ukazuje, že transkripční aktivita ER je způsobena několika faktory, jejichž změnou může dojít ke zrušení inhibičního účinku izoformy PRA na transkripční aktivitu ER. Naopak změny ve struktuře ER ligandu a v pořadí elementů estrogenové reakce represí ER pomocí PR nijak neovlivňují.

## **7.2. Vliv menstruačního a ovariálního cyklu**

Stejně tak jako Prokopové i nám se podařilo nalézt práce potvrzující ovlivnění hladin steroidních hormonů menstruačním a ovariálním cyklem. Avšak vyhledávání abstraktů vztahujících se pouze k prsní tkáni bylo problematičtější a nalezené výsledky jsou značně nejednotné.

Prokopová v Diskusi shrnuje: Autoři se většinou shodují v tom, že hladiny ER i PR jsou vyšší přibližně v období proliferace a menstruace (tedy 1. a 4. týden menstruačního cyklu), kdy jsou relativně nejnižší hladiny estrogenů i progesteronu. Naopak v období s vysokým hormonálním působením jsou hladiny ER a PR nižší.

Námi nalezené studie s tímto z části souhlasí. Jak jsme již několikrát uvedli, při vysoké koncentraci hormonů v těle dochází ke zvýšené negativní regulaci exprese receptorů, aby signálů, zprostředkovaných navázáním hormonu na receptor, nebylo mnoho a hladiny steroidních receptorů jsou proto nižší. Zčásti se výsledky shodují i se studií Pujola a kol. (také zmíněné v diplomové práci Prokopové) a to tím, že hladiny PR a ER se v cyklu od sebe liší. Paradiso a kol. (2001) uvádí výrazná maxima ER ve 27. dni (tedy luteální fázi) a maximální hladiny PR v 15. a 24. dni menstruačního cyklu (ovulační a luteální fázi ovulačního cyklu). K jiným závěrům došel Atalay a kol. (2002): ER pozitivita byla významně vyšší v hormonálně definované folikulární fázi, čímž se shodují se závěrem Prokopové, a také měla tendenci být vyšší v perimenstruační fázi. Hladiny PR však uvedli jako na cyklech nezávislé. A již zmiňovaný Pujol a kol. (1998) uvádí průměrnou hladinu ER vyšší ve folikulární fázi a průměrnou hladinu PR vyšší ve fázi ovulační.

Velice zajímavá byla studie Chenga a kol. (2005), provedená na prsní žláze opice makaka. Uvedli, že nadbytek estradiolu v průběhu ovariálního cyklu a vstup buněk do buněčného cyklu snižuje expresi pouze izoformy ER $\alpha$  a proliferující buňky produkují pouze PR izotypu B.

### 7.3. Vliv stáří

Ovlivnění hladiny steroidních receptorů věkem úzce souvisí s funkcí vaječnicků a jimi produkovanými hormony. Jak již bylo zmíněno, s přibývajícím věkem vaječnický produkují menší množství hormonů, což je kompenzováno zvýšenou produkcí steroidních receptorů, aby byl signál pro cílovou tkáň dostačující.

V případě ER se většinou autoři s tímto shodují, tedy hladina ER s věkem roste. To potvrzuje také Ashba a kol. (1999), citovaný Prokopovou: Převaha ER(+) $PR(+)$  nádorového fenotypu roste s věkem. Naproti tomu převaha ER(-) $PR(-)$  a ER(-) $PR(+)$  nádorových fenotypů se s věkem snižuje. U fenotypu ER(+) $PR(-)$  pozorují také nárůst s věkem, největší v menopauze. Jak je vidět, nárůst hladiny receptorů v nádorové tkáni, korelující s rostoucím věkem, se týká především ER. Ale PR jsou v ER(+) fenotypech pozitivní i negativní a taktéž je tomu u s věkem klesající incidence fenotypu ER(-). Horáčková uvádí v závěru své práce také nejednotnost mezi autory. Nalezla tvrzení, že množství PR s věkem roste - dva autoři, vůbec se nemění - osm prací nebo naopak klesá - sedm prací (Horáčková 1997). A námi citovaný Pujol (1998) hovoří o poklesu hladiny PR s věkem: Procentuální vyjádření PR(+) nádorů bylo mezi menopauzálními ženami nižší než mezi premenopauzálními.

Je nutné poznamenat, že hormonální změny se nedějí nárazově, ale plynule na sebe navazují. Z toho důvodu je možno připomenout starší školitelovu úvahu: Věkově nerozdělený soubor a ani rozdělení výsledků (pouze) na premenopauzální a postmenopauzální zdaleka není u pacientek dostačující pro diagnózu (+), či naopak (-). Pouze zohlednění plynulé věkové změny umožňuje posoudit správně receptorový stav (Hochmann 1999/b).

Vhodné je zde také připomenutí závěru Prokopové o hodnocení positivity nádoru, tedy ze dvou pohledů. Staršího ortodoxního, který uvádí jako pozitivní hodnoty nad fixně stanovený limit a novějšího progresivního, jenž pro stanovení positivity bere



v úvahu charakteristiky nádoru jako např. velikost nebo výskyt předoperačních metastáz.

#### **7.4. Mimovaječnickové příčiny falešné negativity ER v nádorech prsu**

Značné množství estrogenů je vytvářeno přímo nádorovými buňkami prsní tkáně a v případě postmenopauzálních pacientek tato sekrece převládá nad produkcí hormonů ovarií.

Kromě samotné produkce estrogenů tvoří buňky také enzymy 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenázy (17 beta-HSD), které se podílejí na metabolismu estrogenů. Ve článku z roku 2001 od Gunnarssona a kol. píše autoři: Normální prsní žláza exprimuje oba typy 17 beta-HSD, 1 i 2, zatímco nádory mají často nedostatečné hladiny typu 2. Pouhých 10% ER(+) nádorů exprimuje typ 2, zatímco u nádorů ER(-) je to 31%. S tím se shoduje i Oduwale a kol. (2004). Autoři uvádí inverzní spojitost mezi ER $\alpha$  a 17 beta-HSD1. Uvádí, že pacientky s nádory, ve kterých probíhá exprese 17 beta-HSD1 mRNA nebo samotného proteinu, měly významně kratší celkové přežití a kratší interval bez projevů choroby než ostatní pacientky. V jejich článku zmiňují ještě jeden typ 17 beta-HSD, 5. A jeho nadměrná exprese, stejně jako typu 1, má nepříznivý vliv na prognózu.

Také obezita může mít vliv na falešně negativní hodnoty receptorů v nádorové tkáni, podle La Guardia a Giammanca (2001) endokrinní funkcí tukové tkáně. Tuková tkáň bývá spojena s vyššími hladinami volných steroidních hormonů a s tím dochází ke snížení hladin receptorů, což má za následek horší prognózu. Na tomto se shodují i ostatní nalezení autoři.

#### **7.5. Ostatní vlivy**

Ovlivnění receptorové hladiny farmaceutickými přípravky není přímo tématem této práce. Přesto bychom chtěli poukázat na některé závěry studií. Podávání tamoxifenu jako antiestrogenu před vyšetřením karcinomu prsu může způsobit vznik falešných výsledků PR (Plouffe Jr a kol. 2000). Isaksson a kol. (2003) již rozlišili izoformy PR. Uvedli i jiné farmaceutické látky, jejichž porovnáním prokázali odlišný

vliv na expresi izoforem PR a schopnost narušit fyziologickou rovnováhu mezi PRA a PRB.

Velice zajímavý byl i výsledek studie Mediny a kol. (2005): Mnoho nádorů prsu, které se objevují po léčbě tamoxifenem jsou ER $\alpha$ -negativní, přestože premaligní poruchy jsou vysoce ER $\alpha$ -pozitivní.

Na závěr naší rešeršní práce jsme uvedli podkapitulu o vlivu kovů na ER a PR. Darbre (2006) ukazuje na možnou interferenci hlinitých kationtů s funkcí ER v nádorových buňkách MCF-7. Naproti tomu selen, v podobě methylselenové kyseliny, v těchto buňkách inhibuje estrogenové receptory (ER $\alpha$ ) (Shah a kol. 2005). Mezi vápenatými kationty kostní tkáně a metastázujícím tumorem uvedli Journe a kol. (2004) jakousi zpětnou vazbu. Nádor má schopnost indukovat osteolýzu, což vede k uvolnění množství vápníku. Na druhé straně kalcium, uvolněné v průběhu procesu metastazující kostní destrukce, může modulovat funkci ER, snížením jejich aktivity.

## **8. ZÁVĚR**

Z výsledků námi prezentovaných studií je patrné, že pro stanovení diagnózy a z ní vycházející vhodné terapie je nesmírně důležitá spolupráce s odbornou laboratoří a s odborníkem, schopným provádět korekce laboratorních výsledků proti zde popsaným arteficiálním vlivům. Jak je patrné, hladiny steroidních receptorů mohou být ovlivněny mnoha faktory: věkem, farmaky, které pacientka užívá, ale také fází ovulačního cyklu, ve které se pacientka během vyšetření nachází. Také je vhodné posoudit fyzický stav pacientky a v případě obezity brát v úvahu možnost extraovariální tvorbu steroidních hormonů, což u postmenopauzálních žen může hrát důležitou roli, stejně tak jako tvorba hormonů samotnou nádorovou tkání.

Na laboratorní stanovení ER a PR, ale hlavně na odlišení mezi izotypy, ve kterých se receptory nachází, by měl být brán větší ohled. V několika námi nalezených pracích, autoři uvádí odlišnosti v regulacích funkcí i expresí mezi jednotlivými izoformami.

Tento problém by měl být v nejbližší budoucnosti vyřešen a tím i zdokonalena laboratorní analýza, čímž by se zamezilo chybnému stanovení terapie a zvýšila se úspěšnost léčby.

## **9. SEZNAM ZKRATEK**

FSH	folikul stimulující hormon
LH	luteinizační hormon
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
GFP	Green Fluorescent Protein (zelený fluorescenční protein)
E2	estradiol
Pg	progesteron
ER	estrogenový receptor
PR	progesteronový receptor
(+)	pozitivní
(-)	negativní
HST = HRT	Hormon Replacement Therapy (Hormonální Substituční Terapie)
3H-TLI	3H-Thymidine Labeling Index
17 Pg	17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron
17 beta-HSD	17 beta-hydroxysteroid dehydrogenáza
MPA	medroxyprogesteron acetát
CEE	konjugované koňské estrogény
MSA	methylselenová kyselina

## **10. POUŽITÁ LITERATURA**

ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P.: Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, 1998, p. 337-338, 342-343, 259-260

ANDERSON E: Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer - The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. Breast cancer research 4 (5): 197-201 2002

ATALAY C, KANLIOZ M, ALTINOK M: Menstrual cycle and hormone receptor status in breast cancer patients. Neoplasma 49 (4): 278-282 2002

BUCHANAN G, BIRRELL SN, PETERS AA, BIANCO-MIOTTO T, RAMSAY K, COPS EJ, YANG M, HARRIS JM, SIMILA HA, MOORE NL, BENTEL JM, RICCIARDELLI C, HORSFALL DJ, BUTLER LM, TILLEY WD: Decreased androgen receptor levels and receptor function in breast cancer contribute to the failure of response to medroxyprogesterone acetate. Cancer research 65 (18): 8487-8496 SEP 15 2005

DRAFTA, D., PRISCU, A., NEACSU, E., GANGURA, M., SCHINDLER, A.E., STROE, E., ANGHEL, C., PANAITESCU, G.: Estradiol and progesterone receptor levels in human breast cancer in relation to cytosol and plasma estrogen level. Received 11 May 1982. Available online 12 December 2002

DUVIVIER, J., COLIN, C., HUSTIN, J., ALBERT, A., LAVIGNE, J., DIVE, G., MONTFORT, F.: Comparison of levels of cytosol estrogen receptors with "arterial" and "venous" concentrations of gonadic steroids in mammary tumors. Received 11 October 1980., Available online 20 January 2003

ENG SM, GAMMON MD, TERRY MB, KUSHI LH, TEITELBAUM SL, BRITTON JA, NEUGUT AI: Body size changes in relation to postmenopausal breast cancer among women on Long Island, New York. American journal of epidemiology 162 (3): 229-237 AUG 1 2005

ESSAM A. MADY: Association between estradiol, estrogen receptors, total lipids, triglycerides, and cholesterol in patients with benign and malignant breast tumors. Accepted 25 October 2000 Available online 26 March 2001.

FAIT TOMÁŠ: Hormonální substituční terapie a riziko karcinomu prsu. Lékařské listy, 47, 2002, p. 8-9

FUQUA SAW, SCHIFF R, PARRA I, MOORE JT, MOHSIN SK, OSBORNE CK, CLARK GM, ALLRED DC: Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: Correlation with clinical tumor parameters. *Cancer research* 63 (10): 2434-2439 MAY 15 2003

GANONG WILLIAM F.: Přehled lékařské fyziologie. H & H, 1995, p. 368, 369, 373, 374, 381

GUNNARSSON C, OLSSON BM, STAL O: Abnormal expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in breast cancer predicts late recurrence. *Cancer research* 61 (23): 8448-8451 DEC 1 2001

HOCHMANN J.: Poměr koncentrací estrogenových receptorů : progesteronovým receptorům (ER/PR) v cytosolu karcinomů prsu. Přípravováno pro publikaci 2006

HOCHMANN JIŘÍ: Diagnostické využití poměru progesteronových receptorů ku estrogenovým receptorům v karcinomech mléčné žlázy. *Klinická onkologie*, 5, 1999, p. 174-178

HOCHMANN JIŘÍ: Vliv věku na množství estrogenních receptorů v karcinomech prsu. *Klinická onkologie*, 1, 1999, p. 22-26

HORÁČKOVÁ PAVLA: Nádorové markery – estrogenové receptory v karcinomech prsu žen. Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 1997

HOUSERKOVÁ DANA, MATLOCHOVÁ J.: Změny mamografického a ultrazvukového obrazu prsní žlázy u žen užívajících hormonální substituční terapii. *Čes. Gynek.*, Roč. 69, č. 4 (2004), s. 320-329

CHOVANEC JOSEF: Hormonální léčba karcinomu prsu. *Lékařské listy*, 17, 2003, p. 8-12

ISAKSSON E, WANG H, SAHLIN L, VON SCHOULTZ B, CLINE JM, VON SCHOULTZ E: Effects of long-term HRT and tamoxifen on the expression of progesterone receptors A and B in breast tissue from surgically postmenopausal cynomolgus macaques. *Breast cancer research and treatment* 79 (2): 233-239 MAY 2003

KINKOR ZDENĚK, BOUDOVA L., RYŠKA A., KAJO K., ŠVEC, A.: Matrix produkující karcinom prsu s myoepiteliální diferenciací - popis 11 případů a přehled literatury se zaměřením na histogenezi a diferenciální diagnostiku. *Čes. Gynek.*, Roč. 69, č. 3 (2004), s. 229-236

KOLÁŘ Z.: Diagnostický algoritmus pro vyhodnocení funkčnosti estrogenových receptorů v karcinomech mléčné žlázy. Čs. Patol., 33, 1997, No. 1, p. 4-8

KOLÁŘ Z.: Estrogenové receptory a karcinomy mléčné žlázy. Čs. Patol., 29, 1993, No. 3, p. 85-92

KONOPÁSEK B.: Problematika včasného záchytu, vyčerpávající diagnostiky a úvodní léčby karcinomu prsu (Kongres České gynekologické a porodnické společnosti, Karlovy Vary, 20.-23.3.1997. Referát. 6. Senologie.). Čes. Gynek., Suppl., Roč. 62, č. prosi (1997), s. 80-83

KRAUS WL, WEIS KE, KATZENELLENBOGEN BS: Determinants for the repression of estrogen receptor transcriptional activity by ligand-occupied progestin receptors. Journal of steroid biochemistry and molecular biology 63 (4-6): 175-188 NOV-DEC 1997

KROMAN N, THORPE SM, WOHLFAHRT J, ANDERSEN KW, MOURIDSEN HT: Variations in prognostic factors in primary breast cancer throughout the menstrual cycle. European journals of surgical oncology 26 (1): 11-16 FEB 2000

LA GUARDIA M, GIAMMANCO M: Breast cancer and obesity. Panminerva medica 43 (2): 123-133 JUN 2001

LEO PLOUFFE JR MD, FACOG, CM, FRCS(C): Selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice. Eli Lilly and Co., US Medical Endocrine Division, Indianapolis, Indiana, USA, Available online 21 February 2000.

MACINNIS RJ, ENGLISH DR, GERTIG DM, HOPPER JL, GILES GG: Body size and composition and risk of postmenopausal breast cancer. Cancer epidemiology biomarkers & prevention 13 (12): 2117-2125 DEC 2004

MCGOWAN EM, CLARKE CL: Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. Molecular endocrinology 13 (10): 1657-1671 OCT 1999

MEDINA D, KITTRELL FS, HILL J, SHEPARD A, THORDARSON G, BROWN P: Tamoxifen inhibition of estrogen receptor-alpha-negative mouse mammary tumorigenesis. Cancer research 65 (8): 3493-3496 APR 15 2005

MEI-LIN LIAO, JIAN-HWA WANG, HWEI-MIN WANG, AI-QIN OU, XIAO-JUN WANG AND WAN-QING YOU: A study of the association between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in the lung, and history of menstruation in Shanghai women, China. Available online 19 March 2004

MIYOSHI Y, AKAZAWA K, KAMIGAKI S, UEDA S, YANAGISAWA T, INOUE T, YAMAMURA J, TAGUCHI T, TAMAKI Y, NOGUCHI S: Prognostic significance of intra-tumoral estradiol level in breast cancer patients. *Cancer letters* 216 (1): 115-121 DEC 8 2004

NAKATA T., TAKASHIMA S., SHIOTSU Y., MURAKATA CH, ISHIDA H, AKINAGA S., LI PUI-KI, SASANO H., SUZUKI T. AND 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*, 86/3-5: 455-460, 2003.

NEČAS OLDŘICH A KOLEKTIV: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. H & H, 2000, p. 103, 105

ODUWOLE OO, LI Y, ISOMAA VV, MANTYNIEMI A, PULKKA AE, SOINI Y, VIHKO PT: 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer research* 64 (20): 7604-7609 OCT 15 2004

PARADISO A, SERIO G, FANELLI M, MANGIA A, CELLAMARE G, SCHITTULLI F: Predictability of monthly and yearly rhythms of breast cancer features. *Breast cancer research and treatment* 67 (1): 41-49 MAY 2001

PETRUŽELKA LUBOŠ: Nové perspektivy a možnosti léčby postmenopausálních žen s hormonálně dependentním karcinomem prsu. *Lékařské listy*, 34, 2004, p.11-13

PROKOPOVÁ RADKA: Markery nádorů prsu (estrogenové a progesteronové receptory). Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2001

PUJOL P, DAURES JP, THEZENAS S, GUILLEUX F, ROUANET P, GRENIER J: Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer* 83 (4): 698-705 AUG 15 1998

REJTAR A., NENUTIL R.: Prognosticky závažná morfoloická klasifikace karcinomu prsu. *Klinická onkologie*, 5, 1993, p. 132-136

SAKSUN LADISLAV, OSTRÓ A., WÁGNEROVÁ M.: Hrúbka endometria u postmenopauzálnych pacientok s karcinómom prsníka predbežné výsledky. *Čes. Gynek.*, Roč. 67, č. 5 (2002), s. 275-277

SCHREIBER MICHAL A KOLEKTIV: *Funkční somatologie*. H & H, 1998, p. 268, 270, 298, 299, 300, 302-303



SKÁLOVÁ A., MICHAL M.: Význam stanovení proliferačních markerů a hormonálních receptorů v karcinomu mléčné žlázy. Čas. Lék. Čes., 136, 1997, No.15, p. 473-478

STRNAD P.: Speciální případy vztahu hormonální substituční léčby k riziku karcinomu prsu. Čes. Gynek., Roč. 62, č. 5 (1997), s. 304-312

STRNAD P.: Vztah délky užívání hormonální substituční léčby a rizika karcinomu prsu. Čes. Gynek., Roč. 62, č. 4 (1997), s. 243-249

STRNAD PAVEL, ROB L., ZUNTOVÁ A., MORAVCOVÁ Z., CHOD J., HALAŠKA M.: Hormonální substituční léčba, proliferace prsu a riziko karcinomu. Čes. Gynek., Roč. 67, č. 6 (2002), s. 337-343

STRNAD PAVEL, DANEŠ JAN, KODETOVÁ DANIELA, KAČÍREK J.: Mastopatie a riziko karcinomu prsu. Čes. Gynek., Roč. 66, č. 1 (2001), s. 75-81

UHLÍKOVÁ TAŘÁNA: Testování inhibitorů HIV-1 proteiny ve tkáňových kulturách. Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2001

VALÍK DALIBOR, VYZULA ROSTISLAV, JANDÁKOVÁ EVA, NENUTIL RUDOLF: Prediktory účinnosti hormonální léčby karcinomu prsu. Lékařské listy, 46, 2001, p. 17-19

VIENONEN A, SYVALA H, MIETTINEN S, TUOHIMAA P, YLIKOMI T: Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines. Journal of steroid biochemistry and molecular biology 80 (3): 307-313 MAR 2002

WOOD PA, HRUSHESKY WJM: Sex cycle modulates cancer growth. Breast cancer research and treatment 91 (1): 95-102 MAY 2005

ŽALOUDÍK J., FAIT V., VERMOUSEK I., VAGUNDA V., JANÁKOVÁ L., CHRENKO V., SHEARD M., TALAČ R., PAČOVSKÝ Z.: Diverzifikace karcinomu prsu terapií. Klinická onkologie, 10, 2, 1997, p. 43-53

ŽALOUDÍK J., PAČOVSKÝ Z., JANÁKOVÁ L., VERMOUSEK I.: Časování operace karcinomu prsu v rámci menstruačního cyklu. Klinická onkologie, 2, 1995, p. 49-51