

Porównanie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w gruczolakorakach gruczołu sutkowego u suk z aktywnością mitotyczną komórek nowotworowych

MARCIN NOWAK, JANUSZ A. MADEJ, PIOTR DZIĘGIEL*

Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM, ul Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław

Nowak M., Madej J. A., Dzięgiel P.

Comparison of expressions of oestrogen and progesterone receptors in adenocarcinomas of the mammary gland in bitches with mitotic activity of neoplastic cells

Summary

The study aimed at monitoring the expression of oestrogen (ER) and progesterone (PGR) receptors in mammary gland adenocarcinomas in bitches as compared to the mitotic activity of the neoplastic cells. Material for the study involved samples of mammary tumors obtained during surgery from 48 bitches of various races, aged 7 to 15 years. The obtained preparations were microphotographed and the patterns were subjected to computer-assisted image analysis in a system consisting of a computer linked to an Axiophot light microscope (Carl Zeiss). The expression of ER, PgR and of Ki-67 was evaluated using a semi-quantitative scale which involved evaluating the proportion of positive cells (0-5% – no reaction [-], 6-25%: weak reaction [+], 26-50%: moderate reaction [++], above 50%: intense reaction [+++]). The evident deficit of ER observed in our studies might indicate an oestrogen independency of the adenocarcinomas in bitches. This, however, does not preclude involvement of the receptors at earlier stages of carcinogenesis. The obtained strong correlation between expressions of Ki-67 and that of PgR ($r=0.67$), in view of the high prognostic value of Ki-67 expression, confirmed in numerous studies, allow the conclusion that presence of progesterone receptors in the cells of mammary gland adenocarcinoma in bitches is linked to the augmented proliferative potential of the tumors, similarly as it has been demonstrated in mammary glands in females.

Keywords: PgR, ER, Ki-67, mammary gland adenocarcinoma, bitch

Rak sutka jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet zarówno w Europie, jak i Stanach Zjednoczonych. Mimo prowadzonych na coraz szerszą skalę badań przesiewowych umieralność spowodowana tym nowotworem jest nadal bardzo wysoka. Najczęstszą przyczyną zgonów, pomimo zastosowanej terapii radykalnej jest pojawienie się i rozwój odległych przerzutów, jak również wznowy miejscowej. Dlatego też obok leczenia radykalnego stosuje się leczenie uzupełniające w postaci chemio- i hormonoterapii. Celem chemioterapii, w której stosuje się różne, często indywidualnie dobierane, wielolekowe programy leczenia, jest uzyskanie maksymalnego efektu cytostatycznego przy minimalnym efekcie cytotoksycznym. Z kolei hormonoterapia ma na celu zredukowanie aktywizującego wpływu hormonów płciowych na komórki rakowe. Obecność w komórkach nowotworowych recep-

torów dla tychże hormonów jest jednym z głównych czynników predykcyjnych stosowanych w praktyce klinicznej (10). Czynniki predykcyjne to takie wskaźniki, które określają stopień prawdopodobieństwa uzyskania remisji po zastosowaniu ściśle określonej metody leczenia. Wiedza na ich temat pozwala na wyodrębnienie grup pacjentów podatnych na określoną terapię, przez co można uniknąć nieskutecznego stosowania bardzo toksycznych leków.

Hormonowrażliwość raka sutka została po raz pierwszy opisana ponad 100 lat temu, kiedy to Beatson, chirurg z Glasgow, uzyskał remisję u chorych pacjentek z przerzutowym rakiem piersi po usunięciu przydatków macicy. Jednak dopiero 60 lat później Elwood Jensen opisał receptor estrogenowy (ER) (14). Szacuje się, że około 70-80% guzów sutka u kobiet wykazuje ekspresję ER. Guzy te cechują się wolniejszym

wzrostem, wyższym zróżnicowaniem i lepszym rokowaniem przy zastosowaniu odpowiedniego – celowanego schematu terapeutycznego (13).

Pierwszym etapem leczenia hormonalnego raka sutka jest „sterylizacja farmakologiczna”. Najczęściej stosowane są niesterydowe antyestrogeny typu tamoksifen (TAM), które skutecznie blokują receptory estrogenowe. Dzięki takiej terapii uzyskuje się na pewien czas remisję, po której w późniejszym okresie może pojawić się nawrót choroby (21). Kolejnym etapem jest stosowanie specyficznych antyestrogenów sterydowych, gdyż hormonoreaktywność komórek raka jest jeszcze zachowana (11, 21). Tym sposobem można uzyskać ponowną remisję choroby. Niestety, prawie nieunikniony, kolejny nawrót choroby skutkuje właściwie całkowitym zanikiem hormonoreaktywności guza na oddziaływanie antyestrogenowe (21). W związku z tym nasuwa się pytanie, co takiego zmienia się w komórkach raka w trakcie progresji choroby i w czasie trwania leczenia? Zauważono w hodowli *in vitro* komórek estrogenozależnego raka sutka, że po usunięciu z medium estradiolu, powstaje efekt odpowiadający podaniu niesterydowych blokerów receptorów estrogenowych (12, 16). Brak estrogenów w pożywce powoduje bowiem wyraźne zahamowanie wzrostu komórek raka. Niestety, po pewnym czasie, w tych samych warunkach następuje nasilenie ich proliferacji, którą podobnie jak *in vivo* można było na pewien czas zahamować, podając antyestrogeny sterydowe (12). Tym sposobem udowodniono istnienie mechanizmu adaptacyjnego, umożliwiającego przystosowanie się pierwotnie hormonozależnych komórek raka do warunków deficytu steroidów. Polega on prawdopodobnie na wyraźnym, nawet 4-krotnym zwiększeniu ekspresji zarówno samych receptorów estrogenowych, jak i wzroście aktywacji genów docelowych dla tego hormonu, głównie *c-myc* i *c-myc* (6, 12). W ww. badaniach zauważono wyraźną aktywność receptora estrogenowego, wyrażoną aktywacją genów docelowych stymulujących proliferację, mimo braku związania ze swoistym ligandem (hormonem) (12). Tak więc po pewnym czasie w sytuacji braku estrogenów komórka rakowa wykazuje wzmożoną ekspresję receptorów estrogenowych, które niejako wymykają się spod kontroli hormonalnej i zaczynają autonomicznie, bez połączenia z ligandem, nasilać aktywność mitotyczną komórki (15). Ponadto udowodniono, że mechanizm estrogenoniezależnej aktywacji ER polega na fosforylacji jego seryny w pozycji 118 (7). Fosforylacji takiej dokonują MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) zaktywowane różnymi sygnałami mitogennymi, w tym nadekspresją receptorów rodziny HER (Human Epidermal Growth Factor Receptor). Aktywacja MAPKs odbywa się na drodze fosforylacji jej reszt tyrozynowych i treoninowych, dzięki czemu powstaje aktywna postać MAPKs (17). Zaktywowana MAPKs, fosforylując ER, indukuje taką zmianę konformacji tego receptora, że staje się on formą zaktywowaną kon-

stytucjonalnie, stale wysyłającą sygnały mitogenne niezależnie od połączenia z ligandem. Tak więc komórki raka sutka są w stanie przestawić się z hormonalnej i parakrynej na autokrynną regulację wzrostu. Badania na liniach komórkowych wykazały, że blokowanie ER lub brak w pożywce estradiolu doprowadza do stymulacji ekspresji genu kodującego receptor HER2, co wiąże się ze znacznym wzrostem liczby tych receptorów w błonie komórkowej (4). Mechanizm tego zjawiska polega na oddziaływaniu zależnej od ER sekwencji wzmacniającej DNA (tzw. enhancer) na promotory genów HER2 i HER3. W warunkach obecności estrogenów enhancer ten hamuje ekspresję ww. genów, a przy braku tych hormonów bądź przy blokowaniu ich receptorów pobudza ją, co prowadzi do znacznego wzrostu ilości cząsteczek receptorów HER2 i HER3 (4). Należy dodać, że bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na indukcję syntezy dużych ilości receptorów HER są autokrynnie produkowane czynniki wzrostu, tzw. hereguliny (HRG) (1). Polipeptydy te łączą się swoiście z receptorami HER3 i HER4, indukując ich aktywację i heterodimeryzację z receptorem HER2 (1, 23). W sytuacji dużego zagęszczenia receptorów HER w obrębie błony komórkowej dochodzi do masowego powstawania dimerów, które zaczynają wysyłać niezależne od sygnałów zewnątrzkomórkowych silne impulsy mitogenne, idące szlakiem *ras-raf-MAPKs* do jądra komórkowego, co prowadzi do wyraźnej progresji cyklu komórkowego, wzmożenia proliferacji, a z czasem utraty hormonoreaktywności komórek rakowych (15, 17, 27).

Celem badań było określenie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w gruczolakorakach gruczołu sutkowego u suk w porównaniu z aktywnością mitotyczną komórek tych nowotworów.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wycinki nowotworów sutka pobranych w trakcie zabiegu chirurgicznego od 48 suk, różnej rasy, w wieku od 7 do 15 lat. Wycinki utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie, odwadniano, a następnie zatapiano w bloczki parafinowe.

Do oznaczania na skrawkach parafinowych badanych guzów (zwyfikowanych histopatologicznie jako gruczolakoraki) ekspresji receptorów ER, PgR oraz antygenu Ki-67 użyto mysich monoklonalnych przeciwciał (odpowiednio: klon 1D5; w rozcieńczeniu 1 : 50, klon PgR636; w rozcieńczeniu 1 : 50 i MIB-1; 1 : 100). W przypadku stosowania ww. przeciwciał przeprowadzono odblokowanie determinant antygenowych w kuchence mikrofalowej w Antygen Retrieval Solution. Do wizualizacji reakcji barwnej wykorzystano zestaw odczynników LSAB2 oraz diaminobenzydynę (DAB). We wszystkich reakcjach wykonano także kontrole ujemne z zastosowaniem zestawu Primary Negative Control. Wszystkie odczynniki oraz przeciwciała pochodziły z firmy DakoCytomation, Polska.

Z otrzymanych preparatów wykonano zdjęcia mikroskopowe, które poddano komputerowej analizie na stanowisku złożonym z komputera sprzężonego z mikroskopem

firmy Carl Zeiss model Axiophot. Cały zestaw miał możliwość zapisu obrazu i jego cyfrowej analizy. Do pomiarów wykorzystano program MultiScaneBase V 14.02 pracujący w środowisku Windows.

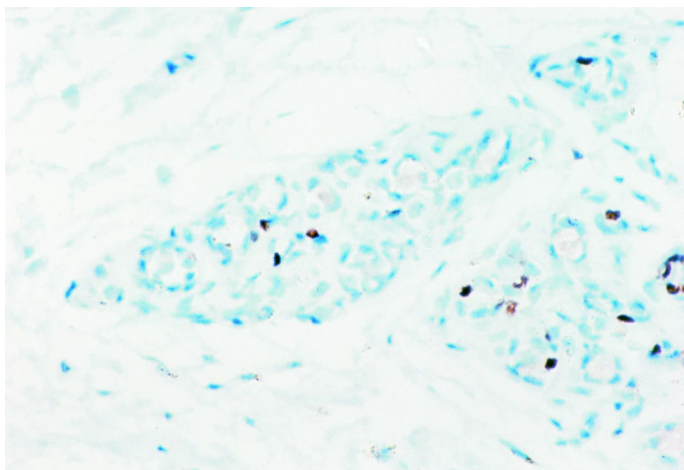
Dla oceny ekspresji ER, PgR oraz Ki-67 zastosowano skalę półilościową, oceniając odsetek pozytywnych komórek (0-5% – brak reakcji (-), 6-25% słaba reakcja (+), 26-50%, średnia reakcja (++) , powyżej 50% intensywna reakcja (+++)). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica PL (StatSoft, Polska), wykorzystując analizę korelacji Spearmana.

Wyniki i omówienie

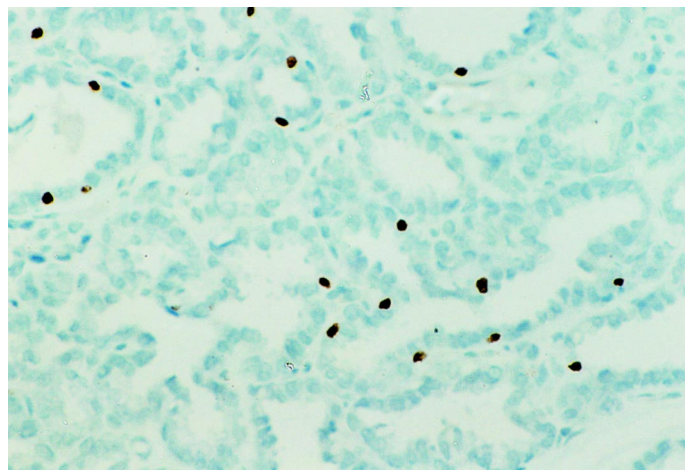
W celu wykrycia receptorów estrogenowych i progesteronowych stosowane są zasadniczo dwie metody – biochemiczna i immunohistochemiczna. Badanie biochemiczne dotyczy świeżej tkanki nowotworowej, a jej wynikiem jest liczba receptorów podana w fentomolach na jeden miligram białka cytozolu. Metoda immunohistochemiczna bazuje na skrawkach parafinowych, ewentualnie mrożeniowych, a wynik przedstawia odsetek komórek dodatnich, czyli wykazujących ekspresję receptora. Mimo że metoda biochemiczna jest uważana za nieco czulszą, to jednak obie uznawane są za w pełni wiarygodne (2).

Około 50% guzów sutka u kobiet, opisywanych jako ER pozytywne wykazuje koekspresję z receptorami PgR, w tym aż 75% guzów ER(+), PgR(+) cechuje się hormonozależnością (14). W około 20% guzów sutka u kobiet nie stwierdza się występowania receptorów zarówno ER, jak i PgR (24).

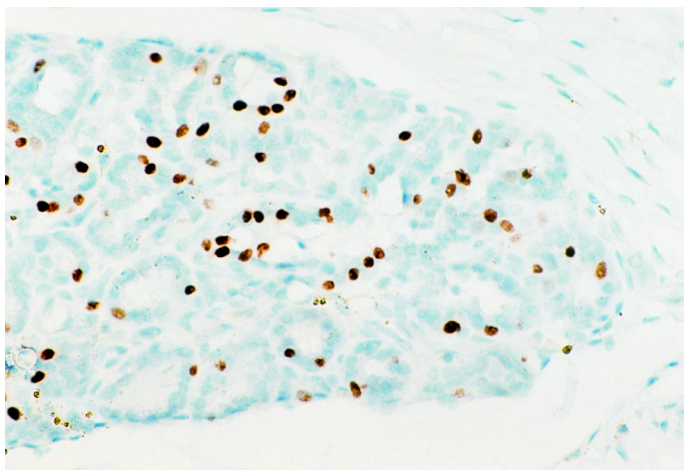
W niniejszych badaniach ekspresję receptora estrogenowego, receptora progesteronowego, jak również obu receptorów jednocześnie wykazano w 50% przebadanych gruczolakoraków. Wśród nich ekspresję (+) receptora ER (ryc. 1) (samego bądź razem z PgR) wykazano jedynie w 6% guzów, a występowanie ER bez koekspresji PgR stwierdzono w 2% badanych guzów. Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku receptorów progesteronowych. Mianowicie, ponad 47% przebadanych guzów cechowało się ekspresją PgR (z lub bez ER), a ponad 43% zmian nowotworowych wykazywało ekspresję samego PgR bez udziału ER. Analizując nasilenie ekspresji wykazano, że prawie 10,5% guzów cechowało się ekspresją PgR ocenianą na +++, 25% na ++, 12,5% na +, natomiast w 52% wycinków nie stwierdzono ekspresji tego receptora (ryc. 2-4). Należy zaznaczyć, że podobnie jak u kobiet, ponad 60% guzów wykazujących ekspresję



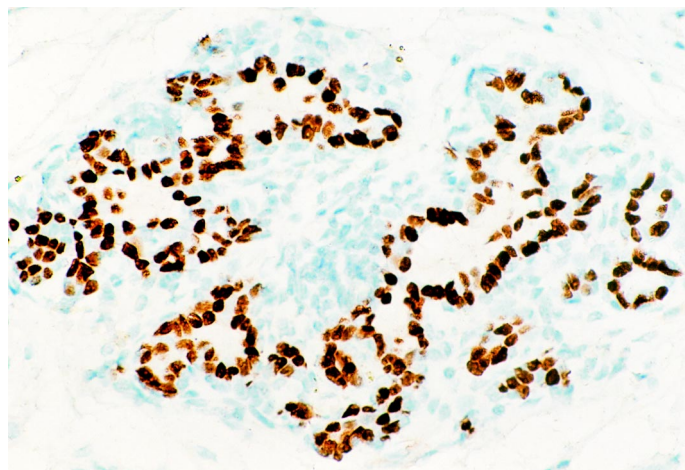
Ryc. 1. Ekspresja ER (+) w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego suki. Pow. 400 ×



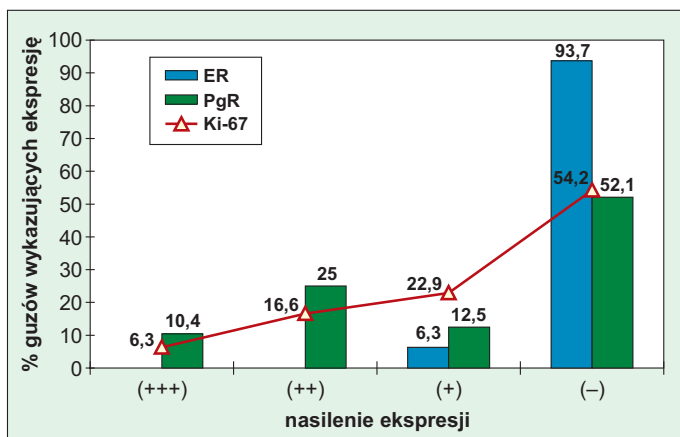
Ryc. 2. Ekspresja PgR (+) w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego suki. Pow. 400 ×



Ryc. 3. Ekspresja PgR (++) w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego suki. Pow. 400 ×



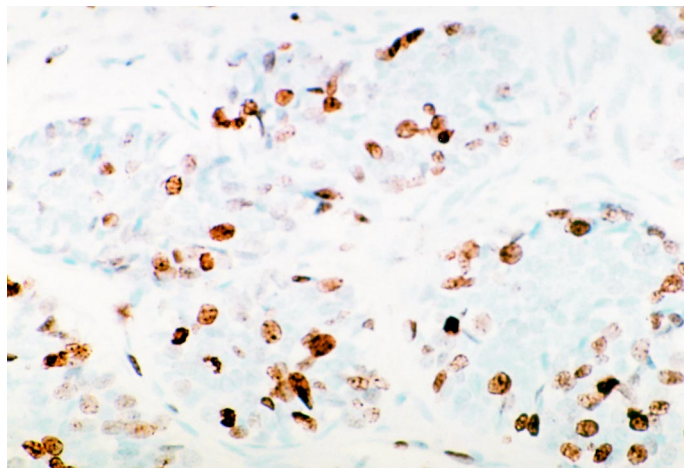
Ryc. 4. Ekspresja PgR (+++) w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego suki. Pow. 400 ×



Ryc. 5. Nasilenie ekspresji receptorów steroidowych (ER, PgR) oraz antygenu proliferacyjnego (Ki-67) w guzolakorakach gruczołu sutkowego u suk

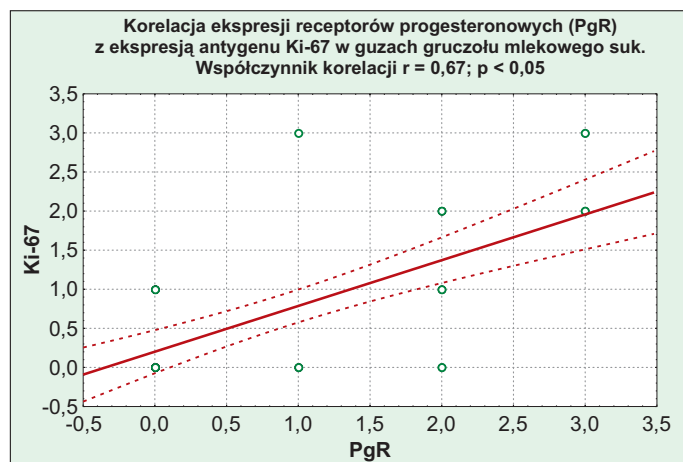
ER cechowało się również jednoczesnym występowaniem PgR, aczkolwiek koekspresję zarówno ER, jak i PgR stwierdzono jedynie w niecałych 4,2% przebadanych guzów. Martan i wsp. (18), badając 228 guzów sutka u suk, wykazali ekspresję ER, PgR albo obu receptorów w 75% nowotworów, w prawie 42,9% tylko PgR, w 30% ER razem z PgR, a jedynie w 2,1% tylko ER bez PgR. Z kolei Pena i wsp. (22), diagnozując 21 przypadków raka sutka u suk z jednocześnie toczącym się procesem zapalnym, nie stwierdzili w badanych wycinkach ekspresji receptora ER. Inni wykazali, że podobnie jak u kobiet ekspresja receptorów ER i/lub PgR jest ważnym wskaźnikiem prognostycznym i koreluje z długością przeżycia po zabiegu – DFP (disease free period) (18, 19). Według Sartin i wsp. (25), największe szanse na długi okres przeżycia po zabiegu mają te suki, w guzach których wykazano ekspresję samego ER lub w koekspresji z PgR, bowiem przy braku ekspresji ER i PgR autorzy zaobserwowali najkrótsze okresy przeżycia. Z kolei Millanta i wsp. (20), diagnozując 47 raków sutka u suk stwierdzili, że ekspresja ER oraz PgR w tych guzach nie koreluje z czasem przeżycia ani z histologicznymi parametrami guza. Podobnie Sobczak-Filipiak i Malicka (26) wykazały brak korelacji między ekspresją receptorów estrogenowych a indeksem mitotycznym.

Ze względu na duże rozbieżności w uzyskiwanych wynikach przez różnych autorów, postanowiono sprawdzić w badaniach własnych korelację między nasileniem ekspresji receptorów ER i PgR a stopniem agresywności guza (ryc. 5). Jednym ze sposobów określania stopnia agresywności guza nowotworowego jest ocena nasilenia proliferacji komórek poprzez wykrywanie charakterystycznych białek pojawiających się w czasie cyklu komórkowego, jak np. Ki-67. Antygen ten należy do grupy niehistonowych białek występujących w jądrze komórkowym. Jego obecność stwierdza się już w fazie G_1 cyklu komórkowego, następnie wyraźnie wzrasta w fazie S i G_2 , ze szczytem w fazie M i zanikiem w G_0 . Czasowy układ ekspresji tego białka sprawia, że jest ono wykrywane tylko w komór-



Ryc. 6. Wysoka ekspresja białka Ki-67 (+++) w guzolakoraku gruczołu sutkowego suk. Pow. 400 ×

kach dzielących się (5, 9). Stosunek komórek wykazujących ekspresję Ki-67 do komórek nie wykazujących jej nosi nazwę indeksu proliferacyjnego, będącego wykładnikiem stopnia aktywności mitotycznej komórek guza (3). W niniejszych badaniach wykazano silną ($r = 0,67$ przy $p < 0,05$), dodatnią korelację między ekspresją PgR a Ki-67 (ryc. 6). Podobne wyniki uzyskali w swoich najnowszych badaniach Burcombe i wsp. (8), którzy analizując 118 przypadków raka sutka u kobiet, stwierdzili wyraźną korelację między indeksem proliferacyjnym wyznaczonym za pomocą Ki-67 a ekspresją PgR. Jest to kolejny przykład podobieństwa w ekspresji markerów nowotworowych w guzach kobiet i suk, co umacnia hipotezę, że rak sutka u suk może być dobrym modelem nowotworzenia u kobiet. Nasiloną ekspresją Ki-67 jako sprawdzony niekorzystny czynnik prognostyczny korelująca dodatnio z ekspresją PgR nasuwa podejrzenie udziału receptorów progesteronowych w rozwoju złośliwego fenotypu komórek nowotworowych u suk. Zaobserwowany w badaniach własnych układ ekspresji receptorów z wyraźnym deficytem ER może wskazywać na estrogenoniezależność guzolakoraków gruczołu sutkowego u suk, co jednak nie wyklucza udziału tych receptorów na wcześniejszych etapach kancerogenezy.



Ryc. 7. Silna, dodatnia korelacja między ekspresją PgR a Ki-67

Podsumowując należy zaznaczyć, że uzyskane wyniki są tylko częściowo zbieżne z wynikami innych autorów lub są wyraźnie przeciwstawne, co dobitnie potwierdza ogromną złożoność procesów kierujących kancerogenezą. Taka sytuacja inspirowa do poszukiwania nowych czynników predykcyjnych i prognostycznych zarówno w medycynie, jak i weterynarii, gdyż istnieją duże rozbieżności w interpretacji i znaczeniu poszczególnych czynników. Nieznane są również dokładne korelacje między nowo odkrywanymi czynnikami predykcyjnymi. Bardzo ważne jest także wprowadzenie określonych, jednolitych standardów zarówno utrwalania materiału, jak i sposobu przeprowadzenia oznaczenia. Dokładne oznaczenie, rozpoznanie oraz przeprowadzenie licznych analiz dotyczących markerów nowotworzenia umożliwi nie tylko dokładniejsze poznanie biologii komórki nowotworowej, ale także może pozwolić na wyodrębnienie ścisłej grupy pacjentów, dla których zastosowanie określonej metody leczenia będzie najskuteczniejsze, a działania uboczne zminimalizowane.

Piśmiennictwo

- Amundadottir L. T., Leder P.: Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes. *Oncogene* 1998, 16, 737-746.
- Andersen J., Thorpe S. M., King W., Rose C., Christensen I., Rasmussen B. B., Poulsen H. S.: The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin embedded and frozen sections versus that of steroid-binding assays. *Eur. J. Cancer* 1990, 26, 442-449.
- Barnard N. J., Hall P. A., Lemoine N. R., Kadarr N.: Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J. Pathol.* 1987, 152, 287-295.
- Bates N. P., Hurst H. C.: An intron 1 enhancer element mediates oestrogen-induced suppression of ERBB2 expression. *Oncogene* 1997, 15, 473-481.
- Brown D. C., Gatter K. C.: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990, 17, 489-503.
- Brünnner N., Boulay V., Fojo A., Freter C. E., Lippman M. E., Clarke R.: Acquisition of hormone-independent growth in MCF-7 cells is accompanied by increased expression of estrogen-regulated genes but without detectable DNA amplifications. *Cancer Res.* 1993, 53, 283-290.
- Bunone G., Briand P. A., Miksicek R. J., Pcard D.: Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 1996, 15, 2174-2183.
- Burcombe R. J., Makris A., Richman P. I., Daley F. M., Noble S., Pittam M., Wright D., Allen S. A., Dove J., Wilson G. D.: Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br. J. Cancer* 2005, 92, 147-155.
- Giziński S., Boryczko Z., Katkiewicz M., Bostedt H.: Białko Ki-67 jako wskaźnik prognostyczny w nowotworach gruczołu mlekowego u suk. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 888-891.
- Goldhirsch A., Wood W. C., Senn H. J., Glick J. H., Gelber R. D.: IX International consensus conference on primary treatment of breast cancer. *Cancer Res.* 1996, 140, 325-335.
- Howell A., DeFriend D., Robertson J., Blamey R., Walton P.: Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* 1995, 345, 29-30.
- Jeng M. H., Shupnik M. A., Bender T. P., Westin E. H., Bandyopadhyay D., Kumar R., Masamura S., Santen R. J.: Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology* 1998, 139, 4164-4174.
- Keen J. C., Davidson N. E.: The biology of breast carcinoma. *Cancer suppl.* 2003, 97, 825-833.
- Kordek R., Kusińska R., Pluciennik E., Bednarek A.: Nowe molekularne czynniki prognostyczne u chorych na raka piersi. *Współcz. Onkol.* 2004, 8, 296-302.
- Kozłowski W., Szacikowska E.: Współczesna interpretacja niepowodzeń hormonoterapii raka piersi. *Współcz. Onkol.* 2001, 5, 99-104.
- Levenson A. S., Jordan V. C.: MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997, 57, 3071-3078.
- Lewis T. S., Shapiro P. S., Ahn N. G.: Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998, 74, 139-149.
- Martin de Las Mulas J., Millan Y., Dios R.: A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet. Pathol.* 2005, 42, 200-212.
- Martin P. M., Cotard M., Mialot J. P., André F., Raynaud J. P.: Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1984, 12, 13-17.
- Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vannozzi I.: A Poli Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet. Sci.* 2005, 79, 225-232.
- Parczyk K., Schneider M. R.: The future of antihormone therapy: innovations based on an established principle. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1996, 122, 383-396.
- Pena L., Perez-Alenza M. D., Rodriguez-Bertos A., Nieto A.: Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003, 78, 141-148.
- Pinkas-Kramarski R., Shelly M., Glathe S., Ratzkin B. J., Yarden Y.: Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate receptor combination. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 1929-1932.
- Ravdin P. M., Green S., Mehn K.: Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen a results of prospective Southwest Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 1992, 10, 1284-1291.
- Sartin E. A., Barnes S., Kwapien R. P., Wolfe L. G.: Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992, 53, 2196-2200.
- Sobczak-Filipiak M., Malicka E.: Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002, 5, 1-5.
- Szacikowska E., Kozłowski W.: Receptory HER/ErbB w prawidłowym nabłonku i w kancerogenezie. *Współcz. Onkol.* 2000, 1, 7-12.

Adres autora: dr Marcin Nowak, ul. Bończyka 6/1, 51-138 Wrocław;
e-mail: martin75@ozi.ar.wroc.pl