

Anna Goździalska^{1,2}

Anna Gawędzka³

Dorota Lizak⁴

Jerzy Jaśkiewicz^{1,2,3}

Zależność pomiędzy ekspresją kolagenu typu IV a obecnością receptorów estrogenowych w tkance nowotworowej oraz w tkance prawidłowej gruczołu piersiowego kobiet

słowa kluczowe: rak piersi, receptory estrogenowe, kolagen typu IV

The relationship between the expression of collagen type IV and the presence of estrogen receptors in tumor and normal breast tissue

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common women cancer. According to recent data, in Poland, in 2007 there were 14,482 new cases and 5255 deaths due to cancer. As a result of tumor progression the basement membrane (BM) have been damaged. BM is a fundamental barrier that separates the cell from epithelial extracellular matrix (ECM). The main component of BM is collagen IV. Collagen IV is one of the regulators in the induction of expression of estrogen receptors α and β (ER β in the membrane of tumor cells. The presence of ER β encourages the development and proliferation of cancer cells.

Objective: The aim of this study was to examine the relationship between the expression of collagen type IV and the presence of estrogen receptors in tumor and normal breast tissue.

Results: It was a higher expression of collagen IV, both in tumor and normal tissue in patients with positive estrogen receptor, compared with patients without estrogen receptors.

Conclusions: The relationship found expression of collagen IV, the presence of estrogen receptors in tumor tissue and tissue which were histopathologically identified as normal, from the margins of surgically removed breast cancer.

key words: breast cancer, estrogen receptors, collagen IV

Wprowadzenie

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem u kobiet. Według najnowszych danych, w Polsce w 2007 r. zanotowano 14482 nowych zachorowań i 5255

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych.

² Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Analityki Biochemicznej.

³ Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie, Zakład Farmakologii i Biofizyki.

⁴ Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Klinika Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii.

zgonów z powodu tego nowotworu. Dokładna etiologia raka piersi nie jest znana, ale występuje wiele czynników, których wystąpienie zwiększa ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu. Do czynników tych należą: płeć, wiek, stan hormonalny oraz uwarunkowania genetyczne. Również otyłość może przyczynić się do zwiększenia ryzyka zachorowania na nowotwór gruczołu piersiowego. Najbardziej widoczny wzrost liczby zachorowań występuje u kobiet po 50. roku życia. Obserwuje się wyraźną tendencję do wzrostu zachorowań wraz z wiekiem. Przebyty rak jednego gruczołu piersiowego zwiększa kilkukrotnie ryzyko wystąpienia raka w drugim gruczole piersiowym [1].

Szacuje się, że 5 do 10% zmian nowotworowych gruczołu piersiowego i jajnika wiąże się z predyspozycją genetyczną. Do genów, w obrębie których występują mutacje odpowiedzialne za raka piersi należą: BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, HNPCC, MSH2, STK11. Nowotwór jest najczęściej następstwem uszkodzenia funkcji zespołu genów odpowiedzialnych za kontrolę szlaków metabolicznych w komórkach. W celu zidentyfikowania ewentualnych mutacji istotne jest wykonanie badania ekspresji genów w przypadkach podejrzenia raka piersi. Jest to przydatne przy rokowaniu oraz leczeniu [1, 2].

Wczesne rozpoznanie jest możliwe przez profilaktyczne badania, takie jak mammografia, ultrasonografia i badanie palpacyjne, ale nadal w dużym odsetku choroba wykrywana jest w stadium zaawansowanym. Istotne zatem jest poszukiwanie nowych markerów pozwalających na wczesne wykrycie raka piersi. Wdrażanie badań genetycznych pozwalających oszacować ryzyko wystąpienia tego rodzaju nowotworu jest drugim nurtem, dosyć intensywnie się ostatnio rozwijającym. Postępowanie takie przyczyni się do zwiększenia częstości badań profilaktycznych, szczególnie u kobiet występujących w grupach ryzyka.

Rak piersi to termin łączący grupę różnorodnych guzów o różnym rokowaniu i agresywności. Przeżycie pacjentki, stopień rozwoju choroby, a także możliwość efektywnej terapii zależą od zdolności komórek nowotworowych do naciekania sąsiadujących tkanek. Rozwój oraz stopień przerzutowania raka piersi są w bardzo dużym stopniu uzależnione od procesów degradacji macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) oraz składników błony podstawnej (*basement membrane* – BM). W skład ECM wchodzi m.in. białka kolagenowe, proteoglikany, lamininy oraz fibronektyna. Białka kolagenowe są również jednym z ważniejszych składników BM. Dotychczas rola BM ograniczana była jedynie do funkcji strukturalnej. Obecnie uważa się, że spełnia też istotną funkcję w transdukcji sygnałów oraz regulacji interakcji komórkowych. Głównym składnikiem BM jest kolagen IV [3]. Oprócz funkcji strukturalnej kolagen IV spełnia istotną rolę w procesie postępu nowotworzenia – podczas procesu angiogenezy jest syntetyzowany i odkładany wokół komórek endotelialnych i komórek przydanki, co ułatwia przerzutowanie [3, 4]. Przypuszcza się również, że degradacja kolagenu typu IV, m.in. przez metalopro-

teinazy, prowadzi do odsłonięcia specyficznej sekwencji w strukturze białka, która sprzyja procesowi angiogenezy i wzrostu guza [4, 5]. Ponadto kolagen IV, poprzez integryny, indukuje ekspresję receptorów estrogenowych α i β (*ER β -estrogen receptor*) w błonie komórek nowotworowych. Proteoliza kolagenu typu IV, który jest substratem dla metaloproteinaz (*matrix metalloproteinases MMPs*) jest procesem początkującym degradację błony podstawnej.

W raku piersi potwierdzona jest nadmierna aktywacja proteolizy zewnątrzkomórkowej, która wiąże się z zaburzeniami regulacji aktywności MMPs [4, 5, 6]. MMPs macierzy zewnątrzkomórkowej należą do rodziny endopeptydaz, których aktywność zależy od jonów cynku. Cechą charakterystyczną MMPs jest zdolność do degradacji przynajmniej jednego składnika ECM oraz obecność jonu cynku (Zn^{2+}) w centrum katalitycznym [7, 8]. Do pełnej aktywności enzymatycznej MMPs konieczne są również jony Ca^{2+} . W warunkach fizjologicznych MMPs syntetyzowane są w komórkach tkanki łącznej, a w szczególności w fibroblastach, leukocytach, monocytach, makrofagach, granulocytach obojętnochłonnych, komórkach śródbłonna i keratynocytach. W warunkach patologicznych również komórki nowotworowe wykazują zdolność od syntezy MMPs [9, 10]. Obecna klasyfikacja metaloproteinaz wyszczególnia 24 odrębne białka enzymatyczne, z których 23 występują w organizmie ludzkim [9, 12]. Ze względu na specyfikę substratową oraz mechanizm aktywacji MMPs podzielone zostały na sześć grup: żelatynazy, kolagenazy, stromielizyny, matrylizyny, metaloproteinazy błonowe oraz inne [9]. Efektywna hydroliza kolagenu typu IV przez MMPs warunkowana jest obecnością domeny typu fibronektyny II w cząsteczce MMP-2 oraz MMP-9 [10, 12]. MMPs degradując składniki struktury ECM, takie jak: białka kolagenowe, proteoglikany oraz lamininy zmieniają spistość tkanki, co umożliwia migrację komórek nowotworowych. Jest to jedna z możliwości tworzenia przerzutów [9, 13].

Rak piersi jest nowotworem, którego występowanie wiąże się z występowaniem hormonów płciowych żeńskich. Estrogeny dostają się przez błonę komórkową na drodze dyfuzji prostej. Po przedostaniu się do wnętrza komórki estrogeny łączą się z receptorem estrogenowym. W wyniku utworzenia połączenia hormon–receptor, konformacja przestrzenna receptora ulega zmianie, dzięki czemu może dojść do połączenia kompleksu z określonymi sekwencjami DNA, traktowanymi jako odcinki DNA reagujące na poziom estrogenu (*Estrogen Response Elements – EREs*). W następstwie takiego działania dochodzi do uruchomienia czynników transkrypcyjnych. Prowadzi to utworzenia aktywnego kompleksu transkrypcyjnego i wzmocnienia transkrypcji genu targetowego [14, 16]. Połączenie receptora estrogenowego z hormonem estrogenowym dodatkowo indukuje również syntezę receptora progesteronowego, indukuje także syntezę receptora progesteronowego [17]. Prawidłowe działanie receptora estrogenowego wpływa zatem stymulująco na powstawanie receptora progesteronowego. U blisko połowy pacjentek z rakiem piersi występuje

jednocześnie ekspresja obu tych receptorów – zarówno estrogenowego, jak i progesteronowego. W diagnostyce stopnia ekspresji receptorów estrogenowego i progesteronowego w komórkach raka piersi wykorzystywane są następujące metody: test wiązania ligandu, test immunoenzymatyczny i testy immunocytochemiczne. Uzyskiwane wyniki są bardzo do siebie zbliżone [14, 17].

Komórki raka piersi często wykazują ekspresję receptorów steroidowych ER i PgR. Hormony wiążąc się z receptorami pobudzają wzrost komórek nowotworowych. Guzy wykazujące ekspresję receptorów ER i PgR wykazują także większą wrażliwość na terapię hormonalną [15]. Chorzy, u których wykazano ekspresję receptorów ER i PgR w komórkach nowotworowych mają z reguły lepsze rokowania [15, 16]. Nie dochodzi wtedy do zajęcia węzłów chłonnych, a nowotwór charakteryzuje się wolniejszym tempem rozwoju [17]. Za brak odpowiedzi na leczenie są odpowiedzialne mutacje genu dla receptora estrogenowego. Mutacje te prowadzą do powstania form białka receptorowego, które charakteryzują się zmianami konformacyjnymi i strukturalnymi. Takie formy receptora estrogenowego nie są czynne biologicznie, nie ma zatem zachowanych prawidłowych interakcji pomiędzy molekułami [14, 16]. Guzy, które nie wykazują ekspresji receptorów ER i PgR cechuje zazwyczaj wzmożona agresywność i zdolność przerzutowania [14]. Obecność ER β sprzyja rozwojowi i proliferacji komórek rakowych. Określenie poziomu ekspresji receptorów estrogenowych jest jednym z badań włączanych do panelu oznaczeń wykonywanych w diagnostyce raka piersi. Podobnie jak PgR i HER2, receptory ER są zaliczane do molekularnych markerów raka piersi. Analizę ekspresji receptorów ER i PgR wykonuje się z zastosowaniem półilościowej skali IRS (*immunoreactive score*) Remmele i Stegner. Ocena receptorów ER i PgR warunkuje wybór odpowiedniej metody leczenia raka piersi [18, 20].

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy ekspresją kolagenu typu IV a obecnością receptorów estrogenowych w tkankach nowotworowych i prawidłowych gruczołu piersiowego.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wycinki guza pobrane śródoperacyjnie. Tkanka nienowotworowa gruczołu piersiowego kobiet została potraktowana jako grupa kontrolna względem tkanki pobranej z centrum guza. Materiał pobrano w trakcie zabiegu operacyjnego od 20 pacjentek, u których wcześniej zdiagnozowano, przy pomocy badania histopatologicznego nowotwór piersi. Wiek pacjentek wynosił średnio od 35 do 85 lat. W trakcie zabiegu rutynowo przeprowadzono badania histopatolo-

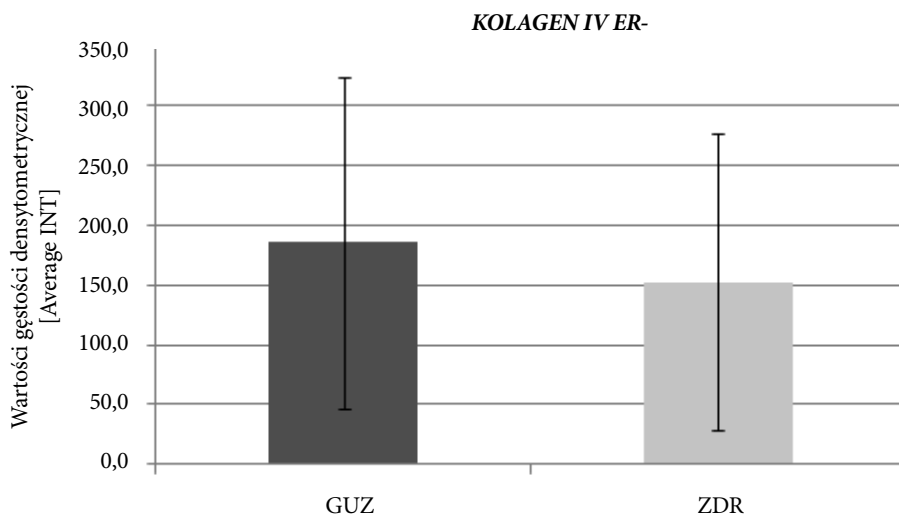
giczne. Klasyfikacja stopnia złośliwości zmian nowotworowych przeprowadzona została w oparciu o zmodyfikowaną klasyfikację Blooma Richardsona. Wszystkie nowotwory zostały sklasyfikowane w stopniu G3.

W każdym wycinku tkanki nowotworowej wykonane zostały oznaczenia ekspresji receptorów estrogenowych wyrażonej w skali IRS Remmele i Stegner. Każdej pacjentce została pobrana tkanka nowotworowa oraz tkanka prawidłowa gruczołu piersiowego. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy: z dodatnią i ujemną ekspresją receptorów estrogenowych. Na podstawie decyzji Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego uzyskano zgodę na wykonanie planowanych analiz. Próbkki tkanki, zarówno zmienione nowotworowo, jak i zdrowe, po pobraniu z pola operacyjnego, umieszczane były w jałowych pojemnikach, a następnie umieszczano w ciekłym w temperaturze ciekłego azotu. Do momentu wykonania oznaczeń tkanki przechowywane były w temperaturze -80°C . Tkanki gruczołu piersiowego (100 mg) homogenizowano w 200 μl buforu o pH 7,5 (50 mM Tris-base, 15 mM EDTA, 1 N NaCl, 1 mM PMSE, 5 mM NEM) w temperaturze 4°C . Analizę ekspresji kolagenu typu IV wykonano techniką Western blot z detekcją chemiluminescencyjną. Prowadzono elektroforezę SDS PAGE w temperaturze pokojowej (50 mA i 150 V). Żele poddawano elektrotransferowi na membrany nitrocelulozowe w buforze (Tris-base, glicyna, metanol, pH 8,3), używając zestawu Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell firmy Bio-Rad (USA) (20 V, 0,3 mA, 30 min). W kolejnych etapach procedury membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi, monoklonalnymi Anti-Human, Collagen type IV (Mouse; MBL Int. Co), a następnie z przeciwciałami drugorzędowymi poliklonalnymi Immuno 0 Anti-Mouse IgG (Goat) H + L Affin, HRP Conj. W celu wywołania reakcji chemiluminescencji stosowano odczynniki ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham, UK). Otrzymane na kliszach fotograficznych (Amersham, UK) wyniki opracowano przy użyciu programu do obróbki densytometrycznej – Quantity One (4.6.7). Wyniki uzyskane dla kolagenu IV z tkanek guza i tkanek prawidłowych przedstawiono jako średnią wartość ekspresji $\pm\text{SD}$.

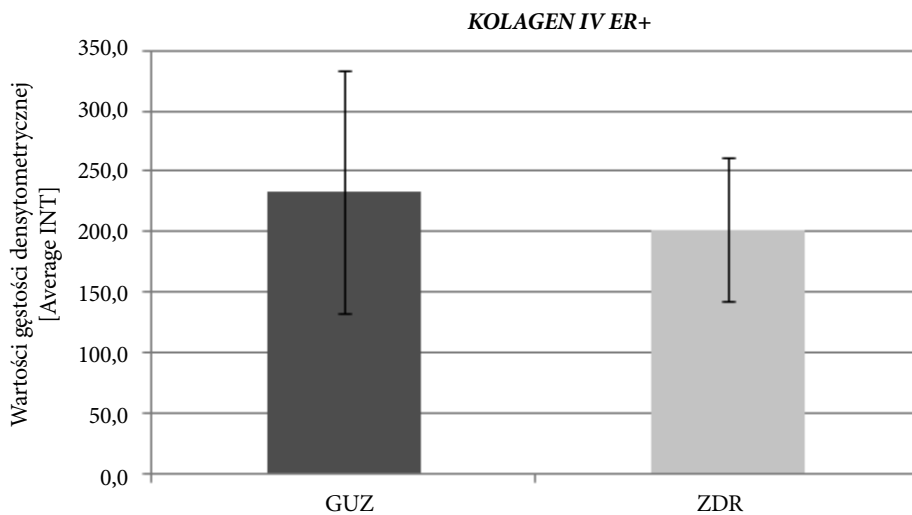
Analiza statystyczna

Testem D'Agostino oceniono normalność rozkładu, a dla sprawdzenia różnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną użyto testu parametrycznego t-Studenta oraz testu kolejności par Wilcozona przy założonym poziomie istotności $p < 0,05$. Do obliczeń statystycznych wykorzystano program Statistica 8.

Ryc. 1. Ekspresja kolagenu IV w grupie pacjentek, u których stwierdzono obecność dodatnich receptorów estrogenowych przedstawione jako średnia \pm SD, n = 13



Ryc. 2. Ekspresja kolagenu IV w grupie pacjentek, u których nie stwierdzono obecności receptorów estrogenowych przedstawione jako średnia \pm SD, n = 7



Dyskusja

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem w Polsce. Bezpośrednią przyczyną zgonów na ten typ nowotworu są przerzuty komórek nowotworowych najczęściej obserwowane w wątrobie, kościach, płucach oraz mózgu. Ze względu na częstość występowania raka piersi i zagrożeń z tego wynikających poszukuje się stale nowych metod precyzyjnej diagnostyki tego nowotworu. Istotne jest wciąż poznawanie markerów procesu nowotworowego, których ocena pozwoliłaby na odróżnienie na poziomie molekularnym fenotypu komórek prawidłowych występujących w bezpośrednim sąsiedztwie guza, od komórek, który już uległy transformacji. Stosowane są obecnie oznaczenia takich markerów, jak receptory ER, PgR i HER2. Jako czynnik, którego ekspresja ma istotne znaczenie dla procesu nowotworzenia uznawany jest również kolagen IV.

W obu grupach badanych pacjentek (podzielonych według kryterium dodatniej lub ujemnej ekspresji ER) stwierdzono wyższą ekspresję kolagenu typu IV w próbkach pochodzących z guza w stosunku do tkanki uznanej jako prawidłowa, różnica ta nie była jednak znamienna statystycznie. Wyższa ekspresja kolagenu IV towarzyszy obecności receptorów estrogenowych. U pacjentek, u których nie stwierdzono ekspresji ER, zaobserwowano niższą ekspresję kolagenu typu IV. Kolagen IV poprzez integryny indukuje ekspresję receptorów estrogenowych α i β w błonach komórek nowotworowych. Zatem wyższa ekspresja tego białka pozwala na wzrost ekspresji receptorów estrogenowych, co jednocześnie polepsza szanse leczenia i rokowanie dla pacjentek. Degradacja kolagenu IV w BM ułatwia przerzutowanie, a spadający poziom ekspresji tego białka jest jednym z czynników uniemożliwiających ekspresję ER w błonach komórek nowotworowych. Oznaczanie ekspresji kolagenu IV w tkankach gruczołu piersiowego usuniętego operacyjnie może uzupełnić molekularną diagnostykę raka piersi. Przyczyni się to do zmniejszenia liczby wznów wynikających z obecności tkanki, która histopatologicznie uznawana jest za prawidłową, ale na poziomie molekularnym komórki tej tkanki nabyły już fenotyp inwazyjny. Badania, na podstawie których dokonuje się obecnie rozróżnienia pomiędzy tkanką prawidłową a tkanką zmienioną nowotworowo nie pozwalają na precyzyjne rozpoznanie różnic. Tkanka traktowana jako prawidłowa na podstawie badania histopatologicznego może wykazywać już cechy zmian nowotworowych. Tkanka nieprawidłowa uważana może być za zdrową w związku z niejednorodnym utkaniem komórek zmienionych nowotworowo. Sugerować można zatem, że badania molekularne tkanek mogą być znacząco bardziej czułe niż badania histopatologiczne. Dlatego uzupełnienie badań o markery molekularne pozwoliłoby na precyzyjne określenie granicy marginesu wyciętego guza, co ma duże znaczenie rokownicze.

Można też wnioskować, że z procesem rozwoju guza związane są również inne białka wchodzące w interakcje z białkami kolagenowymi. W patologicznych wa-

runkach, jakimi są procesy nowotworzenia, komórki transformowane nabywają zdolności do syntezy enzymów degradujących ECM, co też może być przyczyną zaburzeń w obrębie struktury tkanki gruczołu piersiowego. Niepodlegająca kontroli synteza enzymów proteolitycznych, w tym MMPs, zmienia fizjologiczne podście-lisko tkanki i tak już mocno zmienione w związku z osiągniętym przez organizm wiekiem. Ponadto zwiększona aktywność tych czynników proteolitycznych prowa-dzić może paradoksalnie do wzrostu ekspresji genów kodujących kolageny. Swoista nadprodukcja kolagenu byłaby obroną komórek przed niszczeniem podścieliska. Przypuszcza się jednak również, że degradacja kolagenu typu IV, m.in. przez me-taloproteinazy, prowadzi do odsłonięcia specyficznej sekwencji w strukturze biał-ka, która sprzyja procesowi angiogenezy i wzrostu guza. Dlatego też w intensywnie proliferujących i przerzutujących nowotworach, zwłaszcza u osób starszych, może się zaznaczać wyższa ekspresja białek kolagenowych. Szczególnie podatny na ta-kie zmiany byłby kolagen typu IV, umożliwiający tworzenie naczyń krwionośnych guza, co sprzyja przerzutowaniu. Przedstawione powyżej badania stanowią argu-ment przemawiający za taką właśnie hipotezą.

W celu pełnego zobrazowania zależności ekspresji białek kolagenowych w proce-sie nowotworzenia konieczne jest poznanie ekspresji na poziomie mRNA. Pozwoli to wyjaśnić, czy poziom ekspresji białka kolagenowego wzrasta w wyniku wzmo-żonej transkrypcji mRNA lub też czy regulacja dotyczy innego poziomu ekspresji genów dla kolagenu.

Dodatkowo warto wziąć pod uwagę jeszcze inny powód uzyskania powyższych wyników. Badania, na podstawie których dokonuje się obecnie rozróżnienia pomię-dzy tkanką prawidłową a tkanką zmienioną nowotworowo nie pozwalają na precy-zyjne rozpoznanie.

Podsumowanie

Występuje zależność ekspresji kolagenu IV od obecności receptorów estrogenowych w tkankach nowotworowych oraz tkankach rozpoznanych histopatologicznie jako prawidłowe, pochodzące z marginesów operacyjnie usuniętego nowotworu pier-si. Zróznicowana ekspresja białek kolagenowych w tkankach prawidłowych w sto-sunku do tkanek nowotworowych może stać się jednym z markerów stosowanych w diagnostyce raka piersi.

Bibliografia

- [1] Pawlak W. Z. et al., *Genetic Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Sus-ceptibility*, „Współczesna Onkologia” 2002, nr 6, s. 201–204.
- [2] Bednarek A. et al., *New Molecular Prognostic Factors in Patients with Breast Can-cer*, „Współczesna Onkologia” 2004, nr 8, s. 296–302.

- [3] Baluk P. et al., *Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors*, „American Journal of Pathology” 2003, nr 163, s. 1801–1815.
- [4] Mazouni C. et al., *Collagen IV Levels are Elevated in the Serum of Patients with Primary Breast Cancer Compared to Healthy Volunteers*, „British Journal of Cancer” 2008, nr 99, s. 68–71.
- [5] Xu J. et al., *Proteolytic Exposure of a Cryptic Site within Collagen Type IV is Required for Angiogenesis and Tumor Growth in Vivo*, „Journal of Cell Biology” 2001, nr 154, s. 1069–1080.
- [6] Pusztai L. et al., *Gene Expression Profiles Obtained from Fine-needle Aspirations of Breast Cancer Reliably Identify Routine Prognostic Markers and Reveal Large – Scale Molecular Differences between Estrogen-negative and Estrogen-positive Tumors*, „Clinical Cancer Research” 2003, nr 9, s. 2406–2415.
- [7] Hopp T. A., Weiss H. L., Hilsenbeck S. G. et al., *Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-rich Tumors have Poorer Disease-free Survival Rates*, „Clinical Cancer Research” 2004, nr 10, s. 2751–2760.
- [8] Jacobsen B. M., Schittone S. A., Richer J. K. et al., *Progesterone-independent Effects of Human Progesterone Receptors (PRs) in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer: PR Isoform-specific Gene Regulation and Tumor Biology*, „Molecular Endocrinology” 2005, nr 19, s. 574–587.
- [9] Caterina J. J., Yamada S., Caterina N. C. M., Longenecker G., Holmback K., Shi J., Yermovsky A. E., Engler J. A., Birkedal-Hansen H., *Inactivating Mutation of the Mouse Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (Timp-2) Gene Alters ProMMP-2 Activation*, „Journal of Biological Chemistry” 2000, nr 275, s. 26416–26422.
- [10] Caudroy S., Polette M., Nawrocki-Raby B., Cao J., Toole B. P., Zucker S., Birembaut P., *EMMPRIN-mediated MMP Regulation in Tumor and Endothelial Cells*, „Clinical and Experimental Metastasis” 2002, nr 19, s. 697–702.
- [11] Chang C., Werb Z., *The Many Faces of Metalloproteases: Cell Growth, Invasion, Angiogenesis and Metastasis*, „Trends in Cell Biology” 2001, nr 11, s. 37–43.
- [12] Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., Chakraborti T., *Regulation of Matrix Metalloproteinases: an Overview*, „Molecular and Cellular Biochemistry” 2003, nr 253, s. 269–285.
- [13] Ślubowski T., Ślubowska M., *Biomarkery w raku piersi. Część I: Receptory, czynniki wzrostu, geny i onkogeny*, „Współczesna Onkologia” 2007, nr 11, s. 167–174.
- [14] Osborne C. K., *Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer Management*, „Breast Cancer Research and Treatment” 1998, nr 51, s. 227–238.
- [15] Vashisht A., Studd J. W., *Molecular Mechanisms of Oestrogen – The Gynaecologists’ Viewpoint*, „European Journal Cancer” 2000, nr 36, suppl. 4, s. 14–15.
- [16] Kastner P., Krust A., Turcotte B. et al., *Two Distinct Estrogen-regulated Promoters Generate Transcripts Encoding the Two Functionally Different Human Progesterone Receptor Forms A and B*, „European Molecular Biology Organization Journal” 1990, nr 9, s. 1603–1614.

- [17] Reiner A., Neumeister B., Spona J. et al., *Immunocytochemical Localization of Estrogen and Progesterone Receptor and Prognosis in Human Primary Breast Cancer*, „Cancer Research” 1990, nr 50, s. 7057–7061.
- [18] Ogawa Y., Moriya T., Kato Y. et al., *Immunohistochemical Assessment for Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status in Breast Cancer: Analysis for a Cut-off Point as the Predictor for Endocrine Therapy*, „Breast Cancer” 2004, nr 11, s. 267–275.
- [19] Allemani C., Sant M., Berrino F. et al., *Prognostic Value of Morphology and Hormone Receptor Status in Breast Cancer – a Population-based Study*, „Breast Journal Cancer” 2004, nr 91, s. 1263–1268.
- [20] Bejar J., Sabo E., Eldar S. et al., *The Prognostic Significance of the Semiquantitatively Determined Estrogen Receptor Content of Breast Carcinomas. A Clinicopathological Study*, „Pathology, Research and Practice” 2002, nr 198, s. 455–460.