

**Agata Drabarek**



**KLINICZNE ZNACZENIE EKSPRESJI RECEPTORÓW  
ESTROGENOWYCH, PROGESTERONOWYCH  
I ANDROGENOWYCH U CHORYCH PODDANYCH  
LECZNICZEMU ZABIEGOWI OPERACYJNEMU Z POWODU  
RAKA KORY NADNERCZA**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: dr hab. med. Dorota Dworakowska**

Zakład Medycyny Nuklearnej  
Katedra Medycyny Nuklearnej i Informatyki Radiologicznej  
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa  
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. dr hab. med. Piotr Lass

Gdańsk 2015



Praca finansowana przez:

1) grant Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (POMOST/2012-5/3) współfinansowany przez Unię Europejską (7 Program Ramowy), przyznany promotorowi rozprawy - dr hab. med. Doroty Dworakowskiej

2) Projekt Młody Naukowiec wspierany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

## PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować wszystkim, dzięki którym niniejsza praca mogła powstać.

Chciałabym podziękować mojej promotor Pani dr hab. n. med. Dorocie Dworakowskiej za pomoc udzieloną w trakcie dotychczasowej współpracy, a zwłaszcza cenne uwagi merytoryczne. Jako kierownik w programie „POMOST” stworzyła dla mnie niezwykle szansę na rozwój naukowy, uwieńczony niniejszą pracą.

Następnie chciałabym podziękować Panu Profesorowi Wojciechowi Biernatowi, obecnemu kierownikowi Katedry i Zakładu Patologii GUMed za możliwość skorzystania z materiału biologicznego oraz wykonania w Zakładzie Patologii części laboratoryjnej badań. Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Patologii za pomoc i życzliwość okazaną mi w trakcie realizacji tej pracy.

Dziękuję także mojej koleżance Ingrid Wenzel, która współpracowała ze mną i towarzyszyła mi od samego początku naszego udziału w projekcie „POMOST”.

Słowa podziękowania pragnę skierować do moich rodziców, przyjaciół, oraz do wszystkich życzliwych mi osób, z którymi miałam okazję spotkać na swojej drodze w trakcie tworzenia tej pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego męża Tomasza, który przez cały czas wspierał mnie, okazywał cierpliwość i zrozumienie, nawet w najtrudniejszych chwilach.

## Spis treści

### 1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie.....	6
1.2. Rak kory nadnercza.....	9
1.3. Estrogeny i receptory estrogenowe.....	12
1.4. Progesteron i receptory progesteronowe.....	19
1.5. Androgeny i receptory androgenowe.....	23

### 2. Cele pracy.....27

### 3. Materiał.....28

### 4. Metody.....32

4.1. Metoda immunohistochemiczna.....	32
---------------------------------------	----

### 5. Analiza statystyczna.....34

### 6. Wyniki.....35

6.1. Porównanie cech klinicznych i demograficznych pomiędzy analizowanymi grupami.....	35
--	----

6.2. Mikrofotografie.....	37
---------------------------	----

6.3. Wyniki immunohistochemia.....	43
------------------------------------	----

6.3.1. Zdrowe nadnercza.....	45
------------------------------	----

- Receptor estrogenowy.....	45
-----------------------------	----

- Receptor progesteronowy.....	47
--------------------------------	----

- Receptor androgenowy.....	49
-----------------------------	----

6.3.2. Porównanie ekspresji receptorów w trzech grupach: rak kory nadnercza, gruczolak, zdrowe nadnercza.....	51
---	----

- Receptor estrogenowy.....	51
-----------------------------	----

- Receptor progesteronowy.....	52
--------------------------------	----

- Receptor androgenowy.....	53
6.4. Ocena zależności pomiędzy ekspresją badanych receptorów a cechami klinicznymi i demograficznymi w grupie chorych operowanych z powodu guza .....	54
6.5. Ocena rokowniczego znaczenia ocenianych receptorów dla raka kory nadnercza.....	58
6.6. Wieloczynnikowa analiza Cox'a dla raka kory nadnercza.....	62
<b>7. Omówienie wyników.....</b>	<b>63</b>
<b>8. Wnioski.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Streszczenie.....</b>	<b>72</b>
<b>9.1 Summary.....</b>	<b>73</b>
<b>10. Skróty.....</b>	<b>74</b>
<b>11. Ryciny.....</b>	<b>75</b>
<b>12. Tabele.....</b>	<b>77</b>
<b>11. Piśmiennictwo.....</b>	<b>79</b>

# Wstęp

## 1.1. Wprowadzenie

Rak kory nadnercza (RKN) jest endokrynnym nowotworem złośliwym występującym z częstością 0,5-2 przypadków na milion rocznie [1,2]. Częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn w stosunku około 2,5-3:1 [3]. Wyróżniamy dwa szczyty zachorowań: w pierwszej oraz piątej dekadzie życia [1,2,4]. Guzy nadnerczy u dzieci przeważają u płci żeńskiej i często towarzyszą im objawy kliniczne, wśród których najczęstszym objawem jest wirylizacja (84,2%). Z kolei Zespół Cushinga (ZC) bez cech wirylizacji u dzieci występuje niezwykle rzadko (5,5%) [5,6].

Guzy czynne hormonalnie występują częściej u kobiet niż u mężczyzn. Pomimo, iż 60-70% RKN jest zwykle czynna hormonalnie, to klinicznie nie zawsze jest to oczywiste, ponieważ zwiększona jest produkcja prekursorów, a nie biochemicznie czynnych hormonów steroidowych. W przypadku guzów aktywnych hormonalnie u około 30-40% dorosłych pacjentów obserwuje się kliniczny obraz ZC z klasycznymi objawami bawolego karku, twarzy księżycowatej, osteoporozy, nadciśnienia oraz świeżo rozpoznanej cukrzycy. Pozostałe 20-30% pacjentów prezentuje objawy w postaci wirylizacji z towarzyszącym hirsutyzmem, zaburzeniami cyklu miesięcznego, czy zaburzeniami libido [7]. Większość RKN występuje pod postacią znacznej wielkości guza. U tych pacjentów objawy zwykle związane są z masą guza i uciskiem na okoliczne tkanki. Pierwszymi dolegliwościami są zwykle: utrata masy ciała, nudności, uczucie pełności w jamie brzusznej, bóle pleców oraz inne związane z przerzutami odległymi najczęściej lokalizującymi się w płucach (45%), wątrobie (42%) i węzłach chłonnych (24%) [8].

RKN należy do nowotworów o złym rokowaniu, a jego wyleczenie można osiągnąć poprzez całkowitą resekcję zmiany. Dlatego też leczenie chirurgiczne jest leczeniem z wyboru. Mitotan znajduje zastosowanie zarówno w leczeniu adjuwantowym, jak i w przypadkach guzów nieresekcyjnych. Natomiast rola radio- oraz chemioterapii pozostaje nadal kontrowersyjna. Przeżywalność po zabiegu operacyjnym oscyluje w granicach 30% i jest związana z wysokim odsetkiem nawrotów. Rozpoznanie stawiane jest w oparciu o analizę histopatologiczną przy użyciu *Weiss Score*, jednakże analiza wydalania steroidów w moczu może okazać się pomocna w rozróżnieniu pomiędzy RKN a gruczolakiem nadnercza, a także innymi guzami nadnercza. Głównymi czynnikami prognostycznymi są: stopień zróżnicowania

i zaawansowania nowotworu oraz według ostatnich doniesień obecność hiperkortyzolemii [4,8].

W ciągu dwóch ostatnich dekad dokonał się znaczący postęp w rozumieniu biologii molekularnej RKN, jakkolwiek nadal ma to niewielki wpływ na przeżycie pacjentów [9]. Wydaje się, że najczęstsze zaburzenia występujące w RKN dotyczą dwóch szlaków sygnałowych: szlaku *Wnt/β kateniny* oraz szlaku insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (*IGF-2 insulin-like growth factor 2*). Jednakże dotychczasowe dane wskazują, iż prawdopodobnie zaburzenia te nie są wystarczające do powstania transformacji nowotworowej. Jak dotąd, główne czynniki odpowiedzialne za patogenezę RKN pozostają nieznane [5]. Rzadkość występowania choroby podziałała stymulująco na rozwój nowych metod terapeutycznych. Niezwykle potrzebne są nowe koncepcje leczenia RKN. Obecnie wysiłek wielu grup ma charakter międzynarodowy i skierowany jest na rozszerzenie genomiki oraz sekwencjonowania nowej generacji. Miejmy nadzieję, że doprowadzi to do głębszego zrozumienia patogenezы RKN, a tym samym do stworzenia doskonalszych opcji terapeutycznych [5].

Jak dotąd, nie badano wpływu obecności receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych w raku kory nadnercza na rokowanie pacjentów poddanych zabiegowi operacyjnemu. Receptory te należą do grupy receptorów jądrowych, będących jednocześnie czynnikami transkrypcyjnymi. W związku z tym, obecność wyżej wymienionych receptorów w chorobach nowotworowych stała się przedmiotem zainteresowania wielu naukowców. Wiemy, iż istnieje związek pomiędzy obecnością receptorów estrogenowych i progesteronowych a rokowaniem u chorych na raka sutka, czy jajnika. Oceniano także obecność receptorów estrogenowych i progesteronowych w raku płuca, jak również wpływ obecności receptorów androgenowych na rokowanie u pacjentów z rakiem prostaty. Ponadto badany jest związek obecności receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych w nowotworach przewodu pokarmowego jak na przykład: rak jelita grubego, rak żołądka, czy rak trzustki.

Ocena obecności receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych w raku kory nadnercza może okazać się przydatnym elementem na drodze rozwoju nowych opcji terapeutycznych, a dokładnie leczenia celowanego. Istnieje nadzieja na poprawę rokowania pacjentów, dla których leczenie chirurgiczne oraz terapia mitotanem pozostają jedynymi szansami na wyleczenie.

Receptory estrogenowe (RE), progesteronowe (RP) oraz androgenowe (RA) należą do rodziny receptorów jądrowych, do których należą również: receptory steroidowe, receptor dla hormonów tarczycy, receptor dla witaminy D, receptor kwasu retinowego oraz wewnątrzkomórkowe receptory sieroce, dla których nie udało się w pełni udokumentować istnienia endogennego liganda [10, 11]. Receptory jądrowe stanowią grupę homologicznych białek, które po związaniu z odpowiednim ligandem działają w jądrze komórkowym, jako czynniki transkrypcyjne, regulując w ten sposób wiele procesów komórkowych. Po związaniu się z określoną sekwencją nukleotydową w obszarze promotorowym danego genu mogą wpływać pobudzająco lub hamująco na proces transkrypcji genu [12].

Receptory RE, RP oraz RA są wrażliwe na działanie poszczególnych hormonów odpowiednio: estrogenów, progestagenów oraz androgenów. Z kolei działanie powyższych hormonów możemy podzielić na genomowe, czyli związane z regulacją transkrypcji genów oraz niegenomowe, które opiera się na interakcji z białkami regulatorowymi zarówno w błonie komórkowej, jak i cytoplazmie. W związku z tym, jest działaniem znacznie szybszym, niż w przypadku mechanizmu genomowego [13].

**Tab. 1.** Podział receptorów z uwagi na masę cząsteczkową i lokalizację genu [14].

Rodzaj receptora	Masa (kDa)	Gen	Lokalizacja
RE $\alpha$	67	ESR1	Chromosom 6q.25.1
RE $\beta$	59	ESR2	Chromosom 14q23.2
RP $\alpha$	90	PGR	Chromosom 11q22-q23
RP $\beta$	120	PGR	Chromosom 11q22-q23
RA	110-114	AR	Chromosom Xq12



## 1.2. Rak kory nadnercza

### Klasyfikacja kliniczna raka kory nadnercza

Zwykle zastosowanie znajduje klasyfikacja *European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT)*, z uwagi na najlepsze odzwierciedlenie rokowania dla pacjentów z rakiem kory nadnercza [16].

**Tab. 2.** Klasyfikacja *European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT)* dla raka kory nadnercza na podstawie [16].

Stadia I oraz II dotyczą pacjentów z guzami nieinwazyjnymi o wymiarach odpowiednio  $<5$  cm i  $\geq 5$  cm, bez zajęcia węzłów chłonnych i bez przerzutów odległych. Do stadium III kwalifikuje się pacjentów z zajęciem węzłów chłonnych, naciekaniem okolicznych tkanek, czy obecnością zatorów z komórek nowotworowych. Stadium IV dotyczy chorych, u których stwierdza się towarzyszące przerzuty odległe.

Stadium	ENSAT 2008
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1, T2 , N1, M0 T3- T4,N0- N1, M0
IV	T1-T4, N0-N1, M1

## Objawy, diagnostyka laboratoryjna i obrazowa

Większość RKN występuje pod postacią znacznej wielkości guza. U tych chorych objawy związane są zwykle z masą guza i uciskiem okolicznych tkanek. Pierwszymi dolegliwościami są zwykle: utrata masy ciała, nudności, uczucie pełności w jamie brzusznej, bóle pleców oraz inne związane z przerzutami odległymi najczęściej lokalizującymi się w płucach (45%), wątrobie (42%) i węzłach chłonnych (24%) [8].



Ryc. 1. Obraz Tomografii Komputerowej przedstawiający guz nadnercza lewego o wymiarach 107x94x115mm, u 27-letniej chorej, który ulega niejednorodnemu wzmocnieniu po podaniu kontrastu z 20-40 HU do 30-70 HU. Zmiana uciska i modeluje górny biegun nerki lewej, przylega do śledziony i ogona trzustki [9].

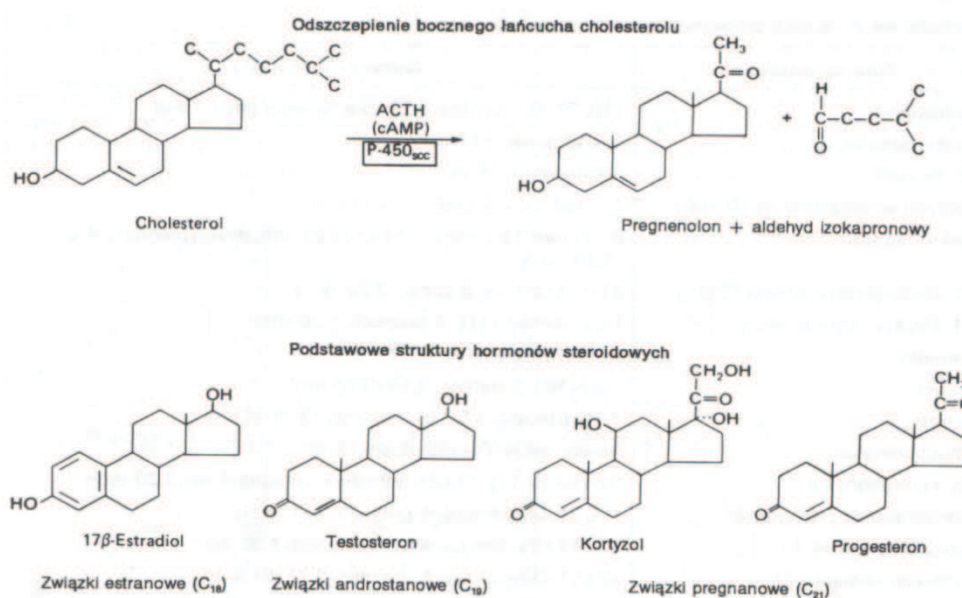
**Tab. 3.** Zalecane elementy diagnostyki RKN na podstawie *European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT)* Maj 2005r.

<b>Testy hormonalne</b>	
Nadmierne wydzielanie Glukokortykoidów (minimum 3 z 4 testów)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test hamowania deksametazonem “test krótki” (1 mg, 23:00 h)</li> <li>• Wolny kortyzol w moczu (zbiórka dobowo-24h)</li> <li>• Poziom kortyzolu w surowicy</li> <li>• Poziom ACTH w surowicy</li> </ul>
Steroidy płciowe oraz prekursory steroidowe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DHEA-S (surowica)</li> <li>• 17-OH-progesteron (surowica)</li> <li>• androstendion (surowica)</li> <li>• testosteron (surowica)</li> <li>• 17-beta-estradiol (surowica, jedynie u mężczyzn oraz u kobiet w okresie postmenopauzalnym)</li> </ul>
Nadmierne wydzielanie Mineralokortykoidów	<ul style="list-style-type: none"> <li>• potas (surowica)</li> <li>• wskaźnik aldosteron/renina (tylko u pacjentów z obecnością nadciśnienia tętniczego i/lub hipokaliemią)</li> </ul>
Wykluczenie pheochromocytoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wydzielanie Metoksykatecholamin z moczem (dobowa zbiórka moczu-24h)</li> <li>• meta- i normetanefryny (osocze)</li> </ul>
<b>Diagnostyka obrazowa</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TK lub MRI jamy brzusznej oraz TK klatki piersiowej</li> <li>• Scyntygrafia kości (w przypadku podejrzenia zmian o charakterze metastatycznym)</li> <li>• FDG-PET (opcjonalnie)</li> </ul>
<b>Monitorowanie pacjenta „follow-up”</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TK lub MRI jamy brzusznej oraz TK klatki piersiowej, co 2-3 miesiące</li> </ul>

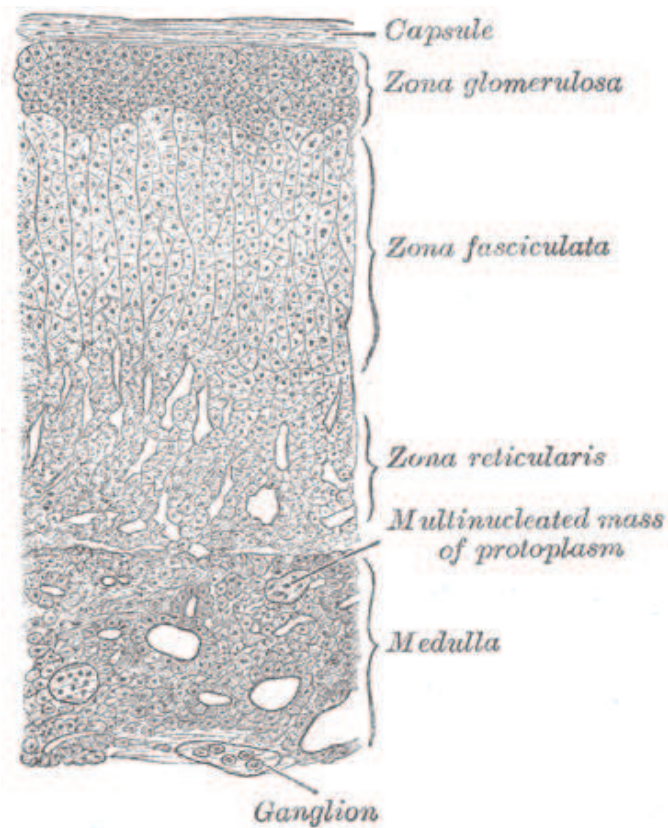
### 1.3. Estrogeny i receptory estrogenowe

#### Estrogeny

Należą do grupy hormonów steroidowych, są pochodnymi cholesterolu (ryc.2). Powstają poprzez aromatyzację androgenów. Ich synteza zachodzi głównie w jajnikach, łożysku, w mniejszym stopniu w jądrach (komórki podporowe kanalików nasiennych) i korze nadnerczy (w warstwie siatkowatej) (ryc. 3). Postacią najbardziej aktywną biologicznie jest estradiol (E2) (ryc. 2), nieco słabszą estron, a najslabsze działanie wykazuje estriol [17]. Mają strukturę silnie lipofilną, co pozwala na dyfuzję przez błonę komórkową, a następnie na związanie się z receptorem wewnątrzjądrowym. Są transportowane we krwi w formie nieaktywnej, związanej z białkiem wiązającym hormony płciowe *SHBG* (*sex hormone binding globulin*) w przypadku estradiolu, natomiast estron wiąże się z albuminami w około 90% [17, 18]. Estrogeny regulują wzrost, różnicowanie komórek oraz warunkują prawidłowy rozwój układu rozrodczego. Ich biologicznie działanie zależne jest od obecności receptora estrogenowego. Ponadto mają wpływ na: tkankę kostną, układ krążenia, mózgowie. Znany jest związek pomiędzy obniżeniem poziomu estrogenów u kobiet w okresie menopauzalnym, a wzrostem ryzyka osteoporozy. Zaobserwowano także wzrost ryzyka chorób sercowo-naczyniowych u kobiet po menopauzie [9, 19].



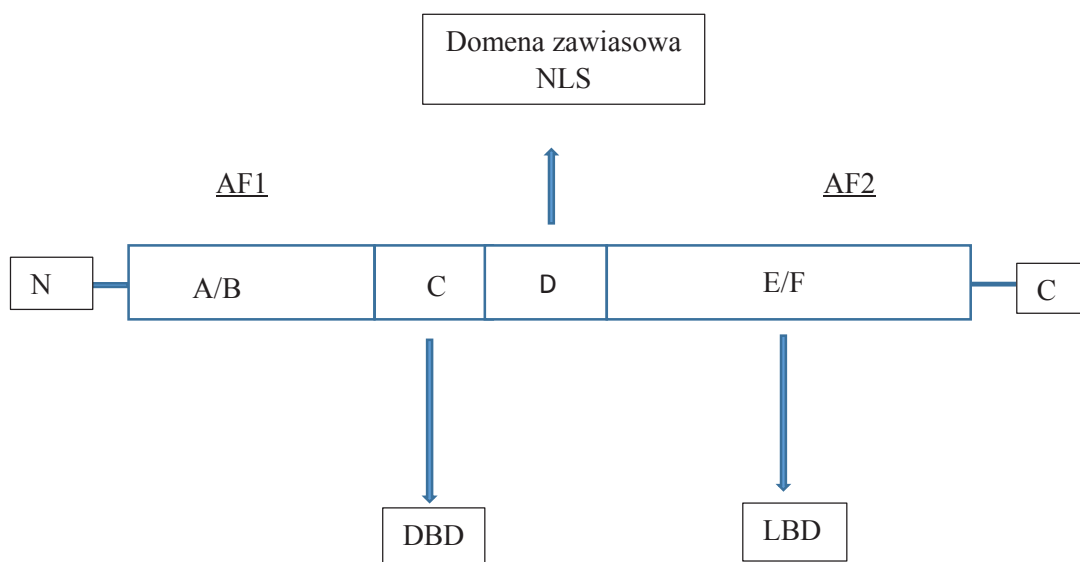
Ryc. 2. Odszczepienie bocznego łańcucha cholesterolu oraz strukturalna budowa chemiczna hormonów: estradiolu, testosteronu, kortyzolu i progesteronu [20].



Ryc. 3. Budowa histologiczna prawidłowego nadercza z podziałem na warstwy: kłębkową (*zona glomerulosa*), pasmową (*zona fasciculata*), siatkową (*zona reticularis*) oraz rdzeń nadnercza (*medulla*) [15].

### **Budowa i działanie receptora estrogenowego**

Wyróżniamy dwie izoformy receptora estrogenowego:  $RE\alpha$  i  $RE\beta$ , które są kodowane przez dwa odrębne geny (*ESR1* dla  $RE\alpha$  i *ESR2* dla  $RE\beta$ ) na dwóch różnych chromosomach.  $RE\alpha$  kodowany jest w regionie q24-q27 na chromosomie 6, natomiast  $RE\beta$  w regionie q23.2 na chromosomie 14. Izoforma alfa ma masę 67 kDa, a izoforma beta 59 kDa. Obie izoformy składają się z 6 domen funkcjonalnych, oznaczanych literami od A do F (podobnie jak inne receptory jądrowe). Do domen funkcjonalnych zaliczamy: domenę N-kończową - wiążącą koaktywatory, domeny wiążącej DNA, region zawiasowy oraz domeny wiążącej ligand [22] (ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat przedstawiający budowę receptora estrogenowego z uwzględnieniem funkcji poszczególnych domen: N - koniec aminowy, *AF1* i *AF2* - miejsca aktywacji transkrypcji, *DBD* - domena wiążąca DNA, *NLS* - sygnał lokalizacji jądrowej, *SLBD* - domena wiążąca ligand, C - koniec karboksylowy (na podstawie [9, 12] oraz własnej modyfikacji).

### Domena A/B

Jest regionem o największej zmienności wśród receptorów jądrowych. Jest fragmentem modulatorowym, zawierającym subdomenę o funkcji aktywacji transkrypcji *AF1* (*activation function 1*). Ponadto jest niezależny od przyłączenia liganda, jednak specyficzny dla promotora oraz tkanki. Może także odpowiadać za oddziaływanie ze swoistymi dla komórki kofaktorami [11].

### Domena C

Jest to domena wiążąca DNA domena *DBD* (*DNA binding domain*) - wykazuje największą konserwatywność ze wszystkich domen, stanowi 96% homologii pomiędzy izoformą  $\alpha$  i  $\beta$  receptora estrogenowego. Jest ona odpowiedzialna za dimeryzację receptora oraz przyłączenie kompleksu ligand- receptor do odpowiedniej sekwencji nukleotydów DNA [9].

## **Domena D**

Region zawiasowy łączy domeny *DBD* oraz *LBD*. Jest on domeną ruchomą, która umożliwia rotację *DBD* nawet do 180 st. w stosunku do pozostałych domen, ponadto zawiera sygnał lokalizacji jądrowej *NLS* (*nuclear localisation signal*) [11].

## **Domena E**

Jest domeną wielofunkcyjną ze względu na możliwość wiązania ligandu, dimeryzację oraz oddziaływanie z białkami szoku termicznego. Zawiera także, podobnie jak domena zawiasowa sygnał lokalizacji jądrowej. Ponadto pełni funkcję aktywatora transkrypcji zależnego od *AF2* (*activation function 2*), znajdującego się w odcinku karboksylowym [23].

## **Domena F**

Jej funkcja pozostaje nie w pełni poznana [24].

## **Lokalizacja tkankowa receptorów estrogenowych**

Rozmieszczenie  $RE\alpha$  i  $RE\beta$  wykazuje znaczne zróżnicowanie tkankowe. W niektórych narządach występują oba typy receptora, natomiast w innych wykazuje przewagę jedynie jeden typ receptora. Na podstawie badań ekspresji mRNA dla  $RE\alpha$  i  $RE\beta$  metodą RT-PCR uwidoczniło różnice w dystrybucji receptorów w poszczególnych tkankach. Przewagę ekspresji  $RE\alpha$  stwierdzono w komórkach: jajnika, macicy, gruczołu sutkowego, najądrzy, jąder, nerek, nadnerczy, podwzgórza oraz przysadki mózgowej. Ekspresja  $RE\alpha$  w komórkach nadnerczy prawdopodobnie jest związana z procesem prawidłowego rozwoju nadnerczy zarówno w okresie rozwoju płodowego, jak również ma związek z produkcją DHEA w okresie przedpokwitaniowym oraz w wieku dojrzałym [25, 26, 27, 28]. Nieco mniejsza ekspresja  $RE\alpha$  ma miejsce w komórkach epitelialnych prostaty, pęcherza moczowego, wątroby, serca oraz aorty [29, 30, 31]. Natomiast najwyższy poziom ekspresji mRNA dla  $RE\beta$  stwierdzono w komórkach gruczołu krokowego oraz jajnika. Ponadto obecność  $RE\beta$  potwierdzono w komórkach pęcherza moczowego, płuca oraz jąder [29, 32].

**Tab. 4.** Rozmieszczenie RE $\alpha$  i RE $\beta$  w układach i narządach (na podstawie [9] oraz własnej modyfikacji).

Narząd/Układ	Obecność RE $\alpha$	Obecność RE $\beta$
Mózgowie	+	+
Płuca		+
Gruzoł piersiowy	+	+
Nerki		+
Przewód pokarmowy		+
Układ moczowy	+	+
Macica	+ (dominujący)	
Gruzoł krokowy		+ (dominujący)
Kości	+	+

## Receptory estrogenowe w chorobach nowotworowych

### Rak piersi

Nadal pozostaje jedną z głównych chorób nowotworowych u kobiet, stanowiąc około 29% zachorowań na nowotwory. Jest drugą przyczyną zgonu z powodu choroby nowotworowej w tej populacji [33]. Wraz z odkryciem hormonozależności raka piersi pod koniec XIX wieku i odkryciem RE miał miejsce dynamiczny rozwój badań nad nowymi możliwościami leczenia tego nowotworu. Istnieje wiele publikacji dotyczących obecności receptorów estrogenowych w raku piersi [34, 35]. Poza leczeniem chirurgicznym oraz radioterapią, zastosowanie znajduje również leczenie systemowe, w tym leczenie hormonalne.

Obecność RE w komórkach raka piersi daje większe szanse pozytywnej odpowiedzi na leczenie hormonalne. Ponadto lepsze rokowanie dotyczy pacjentek zarówno RE+, RP+, jak i HER2+ (*HER2, human epidermal growth factor 2*). Z drugiej strony brak obecności RE jest ważnym, niezależnym wskaźnikiem wyższego ryzyka nawrotu choroby, jak i krótszej przeżywalności [36]. Jednakże istnieją doniesienia, iż w sytuacji w której ma miejsce ekspresja tylko jednego receptora: RE+RP-HER2- lub RE-RP+HER2- rokowanie pacjentek jest gorsze niż w przypadku pacjentek RE+PR+HER2-, a jednocześnie porównywalne do pacjentek z potrójnie negatywnym rakiem piersi *TNBC (triple negative breast cancer)*.



## Rak prostaty

Faktem powszechnie znanym jest wpływ androgenów i RA na rozwój raka prostaty. Z uwagi na zmieniający się wraz z wiekiem mężczyzn stosunek testosteronu do estradiolu, zainteresowano się rolą estrogenów i RE w powstawianiu i progresji raka prostaty [37, 38]. W badaniach Royouela i wsp. wykazano obecność RE $\alpha$  i RE $\beta$  zarówno w komórkach stromalnych i podstawnych prostaty, jak i w raku prostaty [39]. Ponadto w kolejnej pracy zauważono zwiększenie ekspresji receptora RE $\alpha$  wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej raka prostaty [40]. Z drugiej strony istnieją doniesienia o protekcyjnej roli RE $\beta$ , który miałby mieć hamujący wpływ na rozwój raka prostaty poprzez hamowanie ekspresji receptora RE $\alpha$  i RA oraz hamowanie wzrostu komórek nowotworowych [41].

## Rak jajnika

Najczęściej rozwija się u kobiet w okresie około- i postmenopauzalnym. W większości przypadków wywodzi się z komórek pokrywających jajnika [42]. Bardzo często wykrywany jest w późnym stadium zaawansowania, ponieważ nie jest objawowy na wczesnym etapie rozwoju [43]. Pomimo faktu, iż około 2/3 przypadków raka jajnika wykazuje ekspresję RE, odpowiedź na leczenie hormonalne nie jest zadowalająca [44]. Według dostępnej literatury istnieją badania sprzeczne, co do wyników dotyczących proporcji RE $\alpha$  i RE $\beta$  w raku jajnika. Jednak większość publikacji zdaje się popierać wersję, w której RE $\alpha$  pełni dominującą rolę w raku jajnika. Nadal jednak potrzeba kolejnych badań, aby wyjaśnić wpływ RE $\alpha$  i RE $\beta$  na patogenezę raka jajnika. Ponadto trwają badania nad szlakiem *PI3K/Akt/mTOR* w raku jajnika, jak i możliwością zastosowania inhibitorów tego szlaku [45].

## Rak płuca

Nadal pozostaje wiodącą przyczyną zgonu z powodu choroby nowotworowej na świecie. Najczęstszą postacią histologiczną jest niedrobnokomórkowy rak płuca NDKRP (*NSCLC, non-small cell lung cancer*). Choć udowodniono, że główną przyczyną raka płuca pozostaje palenie tytoniu, to około 53% wszystkich kobiet z rakiem płuca nigdy nie paliło [46, 47]. Jednakże pomimo stale zmniejszającej się liczby palaczy tytoniu, nadal obserwowany jest wzrost zachorowalności na raka płuca, w znacznej mierze gruczolakoraka [48, 49]. Związek z obecnością ekspresji RE w raku płuca zauważono już w latach 80 XX wieku. Od tego czasu

powstało wiele publikacji dotyczących związku RE z rakiem płuca. Znaczna ilość badań potwierdza obecność RE $\alpha$  i RE $\beta$  w NDKRP, a w szczególności w przypadkach gruczolakoraka [49, 50, 51]. Wiadomo, iż estrogeny mają swój udział w rozwoju oraz progresji NDKRP, w szczególności po związaniu z izoformą  $\beta$  receptora estrogenowego [52]. Istnieją również doniesienia, które wykazują obecność RE zarówno w NDKRP, jak i w zdrowej tkance płuca oraz wykazują, iż w obu przypadkach uzyskano biologiczną odpowiedź na zastosowanie estrogeny [49].

W tegorocznej publikacji Hsu LH i wsp., która przedstawiła badanie obejmujące 1434 pacjentek z NDKRP wykazano, iż dominującym typem receptora estrogenowego był RE $\beta$  [53]. Ponadto wnioskowano, iż obecność receptora estrogenowego ma negatywny wpływ na rokowanie pacjentów z gruczolakorakiem płuca. Pomimo wielu przeprowadzonych badań związek RE i NDKRP nadal pozostaje kontrowersyjny. W dużej mierze poprzez brak konsensusu, co do stopnia ekspresji RE w NDKRP, jak również wewnątrzkomórkowej dystrybucji RE. Sugeruje się standaryzację stosowanych przeciwciał oraz zdefiniowanie pozytywnej odpowiedzi [50].

### **Rak jelita grubego**

Według dostępnych publikacji RE $\beta$  jest obecny w liniach komórkowych raka jelita grubego: HCT116, HCT8, DLD-1, LoVo, HT29, Colo3290, SW480, Colo205, przy jednoczesnym braku ekspresji RE $\alpha$  [9]. Ponadto zaobserwowano utratę RE $\beta$  w trakcie transformacji nowotworowej jelita grubego [54]. Ponadto wykazano, iż poziom mRNA RE $\beta$  w komórkach raka jelita grubego jest niższy, niż w zdrowej tkance jelita grubego, przy porównywalnym poziomie RE $\alpha$  [55]. To kolejny przypadek nowotworu (jak np. w raku prostaty), w którym RE $\beta$  zdaje się mieć wpływ protekcyjny w rozwoju nowotworu.

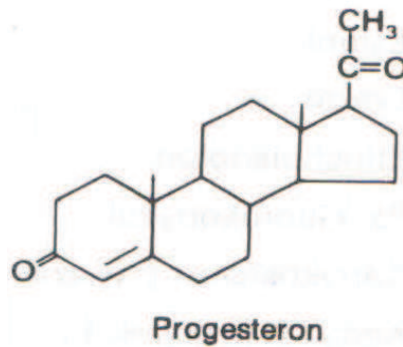
### **Rak kory nadnercza**

Ilość publikacji dotyczących ekspresji receptora estrogenowego w raku kory nadnercza jest skąpa. Najczęściej obejmują one niewielką ilość przypadków z uwagi na rzadkość nowotworu. W badaniu Barzon L i wsp. z 2008r. wykazano wzmożoną ekspresję RE $\alpha$ , jak i zwiększoną produkcję IGF-2, który to bierze udział w indukcji proliferacji komórkowej w komórkach raka kory nadnercza [56]. W kolejnej publikacji Siriani i wsp. z 2012r. na linii komórkowej raka kory nadnercza H295R badano efekt działania tamoksyfenu na proliferację powyższej linii komórkowej. W wyniku doświadczenia wykazano znaczące zahamowanie proliferacji komórek linii H295R po zastosowaniu tamoksyfenu [57].

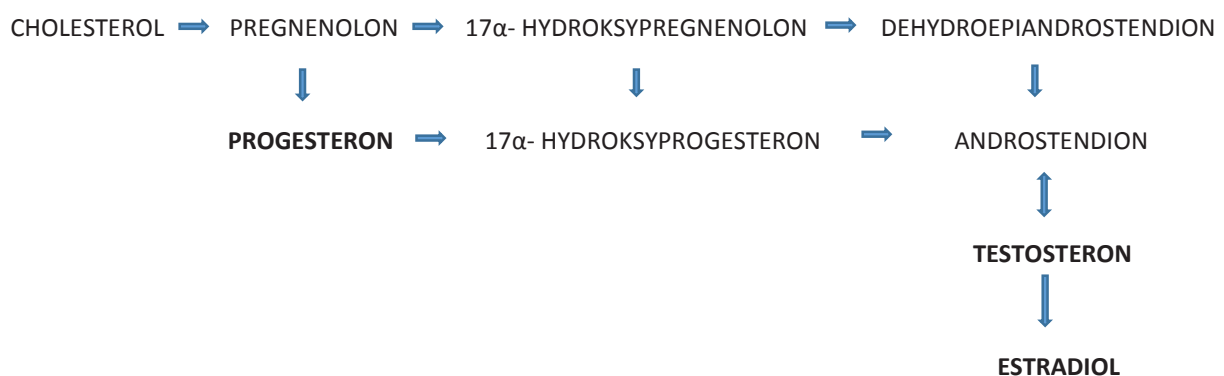
### 1.3. Progesteron i receptory progesteronowe

#### Progesteron

To hormon o budowie steroidowej (ryc. 5). Jest pochodną pregnenolonu, który jest również prekursorem dla testosteronu (ryc. 6). Wytwarzany jest przez komórki jajnika w drugiej fazie cyklu miesięcznego oraz komórki jąder, warstwę pasmowatą i siatkowatą kory nadnerczy, w ośrodkowym układzie nerwowym, a w okresie ciąży- przez ciało żółte i łożysko. Ciąża jest okresem, w którym dochodzi do wzrostu poziomu progesteronu, koniecznego jest do rozwoju płodu, wpływającego na laktację, niezbędnego do utrzymania ciąży [58, 59]. Poza wpływem na układ rozrodczy progesteron ma wpływ na układ krwionośny, kostny oraz ośrodkowy układ nerwowy [60].



Ryc. 5. Wzór strukturalny progesteronu [61].



Ryc. 6. Schemat przemian hormonów steroidowych [21].

## **Budowa i działanie receptora progesteronowego**

Wyróżniamy, podobnie jak w przypadku receptora estrogenowego, dwie izoformy A i B. Mogą one tworzyć homo (A/A, B/B) lub heterodimery (A/B), jednakże są kodowane przez ten sam gen znajdujący się na chromosomie 11. Powstają w wyniku alternatywnego splicingu. Receptor progesteronowy zbudowany jest z 4 domen funkcjonalnych: domenę regulatorową, domenę wiążącą DNA, domenę zawiasową i domenę wiążącą ligand [62]. Ponadto izoforma B receptora (RP-B) zawiera dodatkowo formę *BUS* (*B- upstream segment*), znajdującą się na końcu aminowym, która pełni funkcję aktywatora transkrypcji. Izofорма A jest krótsza od izoformy B o 164 aminokwasy. Pomimo dużego podobieństwa izoformy receptora progesteronowego wykazują często przeciwstawne działanie, jako że są funkcjonalnie różnymi czynnikami transkrypcyjnymi [63, 64]. Wyróżniamy także trzecią izoformę receptora progesteronowego RP-C, która nie jest izoformą funkcjonalną, jako że nie wiąże się z DNA. Ekspresja izoformy C jest ograniczona [65]. Lokalizacja RP-A ma miejsce głównie w jądrze komórkowym, natomiast RP-B jest izoformą krążącą pomiędzy przedziałami: jądrowym i cytoplazmatycznym. Dlatego też RP-B może działać w dwóch mechanizmach: zarówno genomowym, jak i szybkim niegenomowym, czyli na przykład działać poprzez szlaki kinaz: *MAPK*, *c-Src*, *PI3K/Akt*, czy *Jak2* [66, 67, 69]. Wobec braku połączenia z ligandem przy fragmencie C-końcowym RP transkrypcja zostaje zahamowana. W momencie połączenia z ligandem dochodzi do dimeryzacji receptora, a następnie do uruchomienia aktywności transkrypcyjnej. Ponadto działanie receptora RE i RP jest ze sobą związane, chociażby z uwagi na fakt, iż indukcja transkrypcji genu dla RP jest pobudzana poprzez estrogen, a jednocześnie hamowana poprzez obecność samego progesteronu [70].

## **Lokalizacja tkankowa receptora progesteronowego**

Ekspresja receptora progesteronowego ma miejsce w wielu tkankach m.in.: macicy, gruczole sutkowym, mózgowiu, trzustce, kośćcu, jajników, jąder oraz w układzie moczowym [71, 72, 73]. Ekspresja RP ma miejsce zarówno w komórkach nabłonka, jak i stromalnych gruczołu sutkowego, jak również macicy [74]. RP-B jest dominującą izoformą, która niezbędna jest do prawidłowego rozwoju gruczołu sutkowego, z kolei RP-A jest konieczna do prawidłowego rozwoju tkanek macicy [75]. RP występuje także w osteoblastach układu kostnego, gdzie poprzez działanie protekcyjne progesteronu ma wpływ na remodeling, przeciwdziałając utracie tkanki kostnej [76]. W mózgowiu u szczurów stwierdzono obecność

receptorów progesteronowych w podwzgórzu, gdzie dominujący jest RP-A oraz w korze mózgowej, gdzie przeważa izoforma RP-B. Progesteron poprzez działanie z RP odpowiada za zachowania seksualne u zwierząt. Badania dotyczące działania RP w mózgowiu u ludzi są znacznie ograniczone [77].

### **Receptory progesteronowe w chorobach nowotworowych**

W opublikowanych badaniach nadekspresja RP-B dla nowotworów korelowała ze stopniem złośliwości dla raka endometrium oraz raka nabłonkowy jajnika, natomiast niedobór RP-A występował w rakach przewodowych gruczołu sutkowego [78, 79].

### **Rak piersi**

Na podstawie dużych, wieloośrodkowych badań klinicznych (*Women's Health Initiative, Million Woman's study, Finish Cancer Registry*) wykazano, że kobiety przyjmujące hormonalną terapię zastępczą zawierającą progestageny w połączeniu z estrogenami są w grupie wyższego ryzyka rozwoju nowotwory gruczołu sutkowego. Jednakże w badaniu Fournier i wsp. wykazano, iż ryzyko powstania raka piersi nie wzrasta istotnie w przypadku stosowania naturalnych progestagenów w porównaniu do syntetycznych [80].

### **Rak jajnika i endometrium**

Według raportu *FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics)* z 2013r. rak jajnika jest siódmą na świecie przyczyną zachorowań na nowotwory u kobiet. Cechuje się wysoką śmiertelnością. W około 85%-90% jest to rak wywodzący się z komórek nabłonkowych [42, 81]. Rak endometrium jest jednym z częstszych nowotworów narządu rodnoego u kobiet. Około 70-80% przypadków raka endometrium stanowią raki gruczołowe, związane z ekspozycją na estrogeny nieprzeciwstawioną działaniem progesteronu. Zwykle ten typ nowotworu cechuje się niższym stopniem zaawansowania oraz lepszym rokowaniem [59]. Wykazano, iż progesteron działa protekcyjnie przeciwko indukowanemu estrogenami rozrostowi nowotworowemu endometrium. Dlatego terapia progesteronowa znalazła zastosowanie w leczeniu zarówno w przypadkach hiperplazji endometrium, jak i wczesnych stadiach raka endometrium [82]. Najczęściej do zachorowań dochodzi w okresie około- i postmenopauzalnym. Szczyt zachorowań przypada na okres pomiędzy 50-65 rokiem życia

[83]. Wzrost zachorowań na raka endometrium zaobserwowano w latach 70 XX wieku, kiedy to wprowadzono HTZ (hormonalną terapię zastępczą), bazującą wyłącznie na estrogenach. Sytuacja ta zmieniła się od momentu włączenia progestagenów do HTZ [84]. Ekspresja izoform RP-A i RP-B ma miejsce w komórkach nabłonkowych i stromalnych endometrium, a natężenie ekspresji ma związek z fazami cyklu miesięcznego kobiet. Przy czym zauważono, iż RP-A jest izoformą dominującą w komórkach stromalnych, a jego ekspresja ulega zmniejszeniu w fazie lutealnej. Natomiast RP-B dominuje w komórkach nabłonka gruczołowego w fazie sekrecyjnej cyklu. Ponadto wydaje się, iż to stromalna izoforma RP odpowiada za antyproliferacyjne działanie progesteronu na tkanki [85].

### **Rak prostaty**

Istnieją doniesienia o obecności RP w komórkach stromalnych prostaty, jak i udziału receptora progesteronowego w progresji raka prostaty [86]. Ponadto zauważono, iż wysoka ekspresja RP ma związek z gorszym rokowaniem pacjenta, a wysoki poziom RP może być traktowany, jako niezależny negatywny czynnik prognostyczny u chorych z rakiem prostaty [87].

### **Rak kory nadnercza**

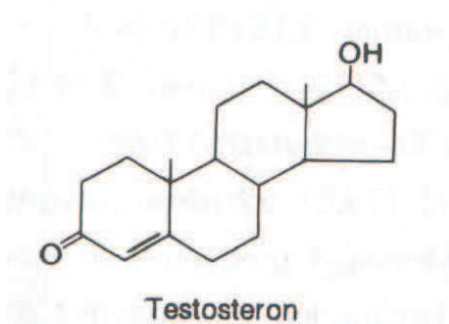
Istnieje skąpa ilość informacji na temat obecności receptora progesteronowego w komórkach raka kory nadnercza. W publikacji Patrici de Cremoux i wsp. badano ekspresję receptora estrogenowego oraz progesteronowego zarówno w zdrowych nadnerczach, jak i nowotworach kory nadnercza. Autorzy stwierdzili znamiennej ekspresję RP oraz RE $\beta$  w zdrowych nadnerczach i guzach nadnerczy. Natomiast RE $\alpha$  wykazywał bardzo niską ekspresję [88]. Według badaczy RP jest obecny w zdrowych nadnerczach, jak i tych zmienionych nowotworowo. Zwiększonej ekspresji RP towarzyszy niski poziom ekspresji RE $\alpha$  i wysoki poziom ekspresji RE $\beta$ . Pomimo, iż patofizjologia wysokiego poziomu RP w komórkach nadnerczy nadal pozostaje niejasna, można zadać pytanie o podłoże mechanizmu działania receptorów w komórkach nadnercza i ich potencjalnej roli w procesie nowotworzenia, a także o możliwości zastosowania terapii hormonalnej.

## 1.4. Androgeny i receptory androgenowe

### Androgeny

Pochodne cholesterolu, należące do rodziny hormonów steroidowych nazywane często męskimi hormonami płciowymi. Ich produkcja zachodzi zarówno u mężczyzn w komórkach śródmiąższowych jąder (komórki Leydiga), jak i w jajnikach u kobiet, a także w warstwie siatkowatej i pasmowatej kory nadnerczy obu płci [89][90]. Ponadto synteza testosteronu ma miejsce w niektórych rejonach OUN (ośrodkowego układu nerwowego) [91]. Do androgenów zaliczamy: testosteron (TTE) (ryc. 7), dihydrotestosteron (DHT) - aktywna postać testosteronu, androstendion, dehydroepiandrosteron (DHEA) [89, 91]. Większość (ok. 99%) testosteronu transportowana jest w osoczu w postaci nieaktywnej hormonalnie, związanej z białkiem *SHBG* (*sex hormone binding globulin*) lub związanej z albuminami, natomiast 1-2% pozostaje w postaci wolnej [90, 92]. Największym powinowactwem do receptora androgenowego cechuje się dihydrotestosteron, mniejsze powinowactwo wykazuje testosteron, a następnie androstendion i dehydroepiandrosteron [93].

Do najważniejszych funkcji androgenów należą: wpływ na wykształcenie męskich narządów płciowych w okresie płodowym, wpływ na procesy dojrzewania płciowego - w tym wykształcenie drugorzędowych i trzeciorzędowych cech płciowych u mężczyzn, wpływ na prawidłową spermatogenezę, udział w procesach anabolicznych organizmu (udział w procesie wzrostu kości czy rozwoju tkanki mięśniowej). Ponadto bierze udział w prawidłowym rozwoju funkcji poznawczych. U kobiet wykazuje działanie przeciwstawne do estrogenów. Przy nadmiernym wydzielaniu androgenów u kobiet może dojść do wirylizacji [94].



Ryc. 7. Wzór strukturalny testosteronu [61]



## **Budowa i działanie receptora androgenowego**

Gen dla receptora androgenowego znajduje się na chromosomie X i koduje białko o masie cząsteczkowej 110-114 kDa [95]. Składa się on z 4 domen czynnościowych: domeny regulującej transkrypcję, domeny wiążącej DNA, domeny zawiasowej i domeny wiążącej steroidy. Znajdująca się w pierwszym z ośmiu egzonów kodujących białko sekwencja zasad: cymetydyna, adenina, guanina (CAG), zdaje się mieć związek z nasileniem aktywności receptora. Wzrost ilości powtórzeń (CAG), wiąże się ze spadkiem jego aktywności. Natomiast krótsze allele mogą przyczyniać się do wzrostu jego aktywności [93]. Badania wykazały obecność dwóch izoform receptora androgenowego (RA): RA-A i RA-B. Izoformy występują w wielu tkankach i mogą wykazywać różnice w działaniu w zależności od lokalizacji, jednakże nie zostało to udowodnione [96]. W przypadku braku androgenów dochodzi do wiązania receptora z białkami i zahamowania procesów transkrypcji.

## **Lokalizacja tkankowa receptora androgenowego**

Według dostępnego piśmiennictwa potwierdzono obecność receptorów androgenowych w komórkach zrębu i wydzielniczych gruczołu krokowego, spermatogoniach, spermatocytach, komórkach Sertoliego i Leydiga jąder, w komórkach fibroblastów, w komórkach gruczołów potowych i włosów, komórkach wątrobowych. Ponadto obecność RA stwierdzono w mięśniówce gładkiej prostaty, macicy, pęcherza moczowego, przewodu pokarmowego oraz tętnicach i tętniczkach [97, 98]. Istnieją również doniesienia o obecności RA w chondrocytach, osteoblastach (analogicznie jak w przypadku ekspresji receptorów estrogenowych). Działanie androgenów w tkance kostnej może być dwojakie: poprzez bezpośrednie działanie na RA oraz pośrednio - poprzez działanie na receptory estrogenowe na drodze aromatyzacji testosteronu. Postuluje się również możliwy wpływ androgenów na angiogenezę poprzez RA obecne w nabłonku naczyń krwionośnych. Nadal trwają prace badające powyższy związek [99].

## **Receptory androgenowe w chorobach nowotworowych**

### **Rak gruczołu krokowego**

Powszechnie znana jest rola RA w rozwoju oraz leczeniu raka prostaty. W przypadku zmniejszonej liczby powtórzeń CAG (<22), a co za tym idzie wzrostu aktywności RA, wzrasta ryzyko rozwoju raka prostaty [100]. Obecność RA u pacjentów niekwalifikujących się do



zabiegu operacyjnego jest wskazaniem do rozpoczęcia terapii antyandrogenowej. Co raz większym problemem jest rak prostaty oporny na kastrację, co przyczynia się do poszukiwania nowych opcji terapeutycznych.

## **Rak piersi**

Z uwagi na wartość prognostyczną i predykcyjną standardowo oznaczano obecność receptorów RE, RP oraz receptora ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu *HER2 (human epidermal growth factor 2)* w raku piersi. Od niedawna zainteresowano się obecnością receptora RA w tej grupie chorych. Wydaje się, iż RA pełni ważną rolę zarówno w zdrowym, jak i zmienionym nowotworowo gruczole piersiowym [101]. Szczególną rolę RA upatruje się w przypadkach dotyczących potrójnie negatywnego raka piersi *TNBC*. W opublikowanej w pracy He J z 2012r., związanej z tematyką *TNBC*, stwierdzono rzadsze występowanie przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentek ze stwierdzoną obecnością RA, niż w przypadku pacjentek niewykazujących obecności RA. Obecność RA pacjentek z *TNBC* powiązano z większą przeżywalnością [102]. W związku z powyższym, postuluje się wprowadzenie oznaczeń RA, jako standardu, upatrując szansy na zastosowanie leczenia celowanego w przypadku pozytywnych oznaczeń. Natomiast największe korzyści z leczenia osiągnięto by w przypadkach *TNBC RA+*.

## **Rak jajnika i rak endometrium**

Ekspresja RA ma miejsce zarówno w zdrowych komórkach jajnika, jak również w komórkach raka jajnika. Ponadto RA ulega częściej ekspresji niż RE i jest wykrywany nawet w 90% badanych przypadków raka jajnika [103]. Edmondson i wsp. wykazali, iż komórki nabłonkowe jajnika w reakcji na pobudzenie RA reagują zwiększoną proliferacją i opóźnieniem procesu apoptozy [104]. Dodatkowo w pracy Shi i wsp. wykazano, że androgeny mają wpływ na przetrwanie komórek raka jajnika poprzez zwiększenie ekspresji, aktywności oraz fosforylacji telomerazy [105]. Ponadto dzięki działaniu androgenów wykazują zdolność do degradacji białka p27 (inhibitora cyklu komórkowego).

Według dostępnego piśmiennictwa funkcja androgenów w patogenezie raka jajnika oraz endometrium nadal nie jest w pełni jasna. Jednak według pracy opublikowanej przez Douglas i wsp., istnieje związek między ekspozycją na podwyższone poziomy androgenów a rozwojem raka endometrium jak i raka jajnika. Z uwagi na wykazane antyproliferacyjne działanie androgenów w przypadku raka endometrium, RA mógłby stać się potencjalnym celem terapii celowanej. W przeciwieństwie do raka jajnika, w którym to androgeny mogą przyczyniać się

do rozwoju nowotworu. W tym przypadku proponowane jest zastosowanie terapii anty-androgenowej.

### **Rak kory nadnercza**

Jak dotąd istnieje niewiele publikacji na temat obecności RA w raku kory nadnercza. W pracy Rossi i wsp. z 1998r. badano ekspresję RA w komórkach zdrowych nadnerczy i linii komórkowej NCI-H295 raka kory nadnercza, a także wpływ dihydrotestosteronu (DHT) na wzrost wyżej wymienionych komórek. Wykazano obecność RA w komórkach zdrowych nadnerczy, natomiast komórki linii komórkowej NCI-H295 nie wykazały istotnej ekspresji RA. Z kolei zastosowanie DHT może mieć wpływ na hamowanie proliferacji komórek zdrowych nadnerczy [106].

## 2. CELE PRACY

1. ocena częstości występowania receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego w zdrowych nadnerczach (warstwa kłębkowata, pasmowata, siatkowata) oraz w łagodnych i złośliwych guzach nadnercza
2. ocena zależności pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych a cechami klinicznymi i demograficznymi chorych leczonych operacyjnie z powodu nowotworów kory nadnercza
3. ocena wartości rokowniczej obecności receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych w grupie chorych poddanych zabiegowi operacyjnemu z powodu raka kory nadnercza

### 3. MATERIAŁ

Materiał do badania stanowiły 33 wycinki raka kory nadnercza od chorych poddanych leczniczemu zabiegowi chirurgicznemu w Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (UCK) w latach 1998-2014, przechowywane w postaci bloczków parafinowych. Ponadto do badań włączono 50 guzów łagodnych otrzymanych podczas zabiegu adrenalektomii w Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej UCK w latach 2008-2014 oraz 20 zdrowych nadnerczy uzyskanych podczas nefrektomii z powodu raka nerki w Klinice Urologii UCK w latach 2008-2014. Z uwagi na ograniczoną dostępność materiału biologicznego oraz dostępność do dokumentacji medycznej ostatecznie wykonano oznaczenia immunohistochemiczne odpowiednio u 27 chorych z rakiem kory nadnercza, 49 guzach łagodnych i 20 zdrowych nadnerczach. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Badania immunohistochemiczne na obecność receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych przeprowadzono na materiale utrwalonym w formalinie i przechowywanym w postaci bloczków parafinowych. Ocenę histopatologiczną wszystkich skrawków z oznaczeniami immunohistochemicznymi receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych przeprowadziło dwóch patomorfologów dr n. med. Piotr Czapiewski i Adam Gorczyński z Zakładu Patomorfologii UCK w Gdańsku.

W bazie danych zawarto następujące informacje: wiek oraz płeć chorego, datę i doszczętność zabiegu operacyjnego, postać histologiczną guza, wielkość guza, aktywność hormonalną guza, wyniki badań biochemicznych, datę ostatniej obserwacji chorego.

Dane dotyczące przebiegu choroby: diagnostyka hormonalna przed zabiegiem oraz przebieg choroby po leczeniu operacyjnym uzyskiwano z dostępnej dokumentacji medycznej.

Badana grupa obejmowała łącznie 96 chorych (w tym 27 przypadków raka kory nadnercza, 49 gruczolaków nadnercza oraz 20 prawidłowych nadnerczy). W grupie chorych z rakiem kory nadnercza 19 (70,4%) stanowiły kobiety, a 8 (29,6%) mężczyźni. W grupie chorych z gruczolakiem nadnercza kobiety i mężczyźni stanowili odpowiednio 31 (63,3%) i 18 (36,7%). Natomiast w grupie badanych z prawidłowymi nadnerczami 3 (15%) stanowiły kobiety, a 46 (85%) mężczyźni.

### Skala Allred

Jest to skala, umożliwiająca procentową ocenę ilości komórek (od 0 do 5) barwiących się metodą immunohistochemiczną wraz z oceną intensywności barwienia (od 0 do 3). Maksymalny wynik skali wynosi osiem. Skala ta pomaga w ocenie prawdopodobieństwa odpowiedzi na leczenie hormonalne. Znajduje zastosowanie m. in w planowaniu leczenia hormonalnego u chorych z rakiem sutka.

**Tab. 5.** Schemat skali Allred „Allred score” [34].

<b>Procent pozytywnie wybarwionych jąder komórkowych</b>	<b>Intensywność barwienia</b>	<b>Wynik</b>
Brak – 0 pkt < 1 % - 1 pkt 1-10%- 2 pkt 11-33%- 3 pkt 34-66%-4 pkt 67-100%- 5pkt	Brak- 0 pkt Słaba reakcja- 1 pkt Pośrednia reakcja- 2pkt Mocna reakcja- 3 pkt	Punkty za procentowe wybarwienie jąder komórkowych + Punkty uzyskane za intensywność barwienia

### Skala Remelle „Remelle score”

**Tab. 6.** Schemat skali Remelle – IRS [107].

<b>Procent pozytywnie wybarwionych jąder komórkowych</b>	<b>Intensywność barwienia</b>	<b>Wynik</b>
Brak- 0pkt < 10% - 1 pkt 10-50%- 2 pkt 51-80%- 3 pkt 81-100%- 4 pkt	Brak- 0 pkt Słaba reakcja- 1 pkt Pośrednia reakcja- 2pkt Mocna reakcja- 3 pkt	Punkty za procentowe wybarwienie jąder komórkowych + Punkty uzyskane za intensywność barwienia

## Skala H-score „H-score”

Jest kolejną powszechnie stosowaną półilościową metodą oceniającą oznaczenia immunohistochemiczne nazywaną “H-score”. Zakres skali obejmuje wartości od 0 do 300. Wynik uzyskiwany jest na podstawie sumy procentowego wybarwienia komórek w stopniu silnym, średnim oraz słabym. Jest to skala preferowana w wielu ośrodkach ze względu na jej szeroki zakres. Wynik otrzymujemy poprzez zastosowanie formuły:

$3 \times \% \text{ silnie wybarwionych komórek} + 2 \times \% \text{ średnio wybarwionych komórek} + 1 \times \% \text{ słabo wybarwionych komórek}$ .

## Charakterystyka kliniczna badanej grupy chorych

Materiał do badania stanowiły zdrowe nadnercza (20), gruczolaki (49) oraz raki kory nadnercza (27) (tab. 7).

W grupie badanych z prawidłowymi nadnerczami 3 (15%) stanowiły kobiety, a 46 (85%) mężczyźni (tab. 8) Wśród chorych z gruczolakiem nadnercza kobiety i mężczyźni stanowili odpowiednio 31 (63,3%) i 18 (36,7%) (tab. 9). Natomiast w grupie chorych z rakiem kory nadnercza 19 (70,4%) stanowiły kobiety, a 8 (29,6%) mężczyźni (tab. 10). Średni wiek w momencie zabiegu operacyjnego u chorych z gruczolakiem nadnercza i z rakiem nadnercza wynosił odpowiednio 61 lat i 49 lat.

**Tab. 7.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 96 chorych z prawidłowymi nadnerczami, gruczolakami oraz rakami nadnercza.

Cecha	Liczba chorych (%)
Postać histologiczna	
prawidłowe nadnercza	20 (21%)
gruczolak nadnercza	49 (51%)
rak nadnercza	27 (28%)

**Tab. 8.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 20 chorych z **prawidłowymi nadnerczami**.

Cecha	Liczba chorych (%)
Wiek	
średnia	65
zakres	50-80
Płeć	
kobiety	3 (15%)
mężczyźni	17 (85%)

**Tab. 9.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 49 chorych z **gruczolakiem nadnercza**.

Cecha	Liczba chorych (%)
Wiek- gruczolaki nadnercza średnia zakres	61 40-84
Płeć kobiety mężczyźni	31 (63,3%) 18 (36,7%)
Wielkość guza <5cm ≥5cm	34 (69,4%) 15 (30,6%)
Aktywność hormonalna* obecna brak	13 ( 33,3%) 26 ( 67,7%)
Obecność hiperkortyzolemii* obecna brak	6 (15,4%) 33 (84,6%)

\*w 10 przypadkach gruczolaków nadnercza brak w dokumentacji medycznej informacji o aktywności hormonalnej i hiperkortyzolemii. (W przypadkach aktywności hormonalnej było rozpatrywane również wydzielanie mineralokortykoidów, jednak ze względu na niewielką liczebność grupy nie włączano do analizy).

**Tab. 10.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 27 chorych z **rakiem kory nadnercza**.

Cecha	Liczba chorych (%)
Wiek- gruczolaki nadnercza średnia zakres	49 21-69
Płeć kobiety mężczyźni	19 (70,4%) 8 (29,6%)
Wielkość guza <5cm ≥5cm	3 (11,1%) 24 (88,9%)
Aktywność hormonalna* obecna brak	5 (33,3%) 10 (66,7%)
Obecność hiperkortyzolemii* obecna brak	5 (31,3%) 10 (66,7%)

\*w 12 przypadkach raka kory nadnercza brak w dokumentacji medycznej informacji, co do występowania aktywności hormonalnej / hiperkortyzolemii.

Z uwagi na fakt, iż u badanych z rakiem kory nadnercza aktywność hormonalna była równa występującej liczbie przypadków hiperkortyzolemii, do dalszych obliczeń włączono jedynie hiperkortyzolemię.

## 4. Metody

### 4.1 Analiza immunohistochemiczna

Oznaczenia immunohistochemiczne wykonano w okresie od stycznia do marca 2015r. w Zakładzie Patomorfologii UCK w Gdańsku. Fragmenty guzów dostarczono do laboratorium w postaci bloczków parafinowych umieszczonych w plastikowych kasetkach. Materiał do oceny ekspresji poszczególnych receptorów stanowiły w przypadku guzów łagodnych nadnercza mikromacierze (*TMA*s - *tissue microarrays*), natomiast bloczki z materiałem raka nadnercza oraz zdrowe nadnercza zostały skrojone z dostępnego w kasetkach materiału.

#### **Procedura immunohistochemiczna**

Do badań immunohistochemicznych wykorzystano materiał tkankowy utrwalony w 4% roztworze formaldehydu oraz zatopiono w niskokropliwej parafinie. Następnie bloczki parafinowe umieszczono w kasetkach plastikowych, co umożliwiło dokładniejsze skrajanie. Bloczki w kasetkach krajano na mikrotomie Leica SM 2000R na skrawki o grubości 3-5  $\mu\text{m}$ , które zostały naniesione na silanizowane szkiełka podstawowe i suszone przez całą noc w temperaturze 50°C. Preparaty pozbawiano parafiny poprzez zanurzenie w ksylenie oraz ponownie nawadniano poprzez zanurzenie w kolejnych rozcieńczeniach alkoholu etylowego. Szkiełka były następnie przepłukiwane wodą destylowaną i umieszczone w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS).

Odczyny immunohistochemiczne wykonano na przypadkach: 20 zdrowych nadnerczy, 49 guzach łagodnych nadnercza, oraz 27 rakach kory nadnercza. Do oznaczeń immunohistochemicznych receptora estrogenowego, progesteronowego i androgenowego zastosowano odczynniki firmy Dako oraz system detekcyjny Dako EnVison FLEX (tab. 11).



**Tab. 11.** Rodzaje zastosowanych przeciwciał oraz rodzaj systemu detekcyjnego wykorzystane do oceny ekspresji poszczególnych receptorów RE, RP oraz RA.

Typ badanego receptora	Klon	Immunogen	Typ przeciwciała	System detekcyjny
RE $\alpha$	EP1	aminokwasy 1-300 ludzkiego receptora estrogenowego alfa	królicze	En Vision FLEX/HRP
RP-A, RP-B	PgR636	rekombinowana forma A ludzkiego receptora progesteronowego	mysie	En Vision FLEX/HRP
RA	AR441	aminokwasy 229-315 ludzkiego receptora androgenowego	mysie	En Vision FLEX/HRP

Skrawki poddano procedurze odmaskowania w urządzeniu Dako w buforze zasadowym (pH= 9) En Vision Flex Dako przez 1,5 godziny, podgrzewając do temperatury 99 °C przez 40 minut. Następnie umieszczano preparaty w aparacie Dako Autosteiner. Oznaczenia dla receptorów estrogenowych oraz progesteronowych wykonano w całości w aparaturze Dako Autosteiner Link 48, natomiast oznaczenie dla receptora androgenowego wykonano ręcznie, używając przeciwciała w rozcieńczeniu 1:800.

Czas inkubacji przeciwciał trwał 1 godzinę w systemie ręcznym. Natomiast w aparaturze Dako dla receptora estrogenowego oraz progesteronowego proces polegał na wielokrotnym przepłukiwaniu preparatów buforem, przedmuchiwaniu oraz naniesieniu na preparat kolejno przeciwciała pierwotnego i wtórnego. Na końcu, celem uzyskania odpowiedniego kontrastu, barwiono preparaty hematoksyliną i przepłukiwano wodą. Cały proces w aparaturze Dako trwał około 4 godzin. Następnie preparaty zakraplano środkiem utrwalającym i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.

W odniesieniu do receptora estrogenowego i progesteronowego, jako kontroli dodatniej używano fragmentów raka piersi, którego komórki wykazywały wcześniej dodatnie jądrowe barwienie dla receptora estrogenowego. W odniesieniu do receptora androgenowego, jako kontroli dodatniej używano fragmentów raka prostaty, którego komórki wykazywały wcześniej dodatnie jądrowe barwienie dla receptora androgenowego.

Ocenę obecności receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych przeprowadziło dwóch patomorfologów (dr n. med. Piotr Czapiewski oraz lek. Adam Gorczyński z Katedry i Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku). Ekspresja oraz intensywność barwienia preparatów była porównywana z wykonaną dodatnią kontrolą odpowiednio dla receptorów: estrogenowego, progesteronowego i androgenowego.

W ocenie uwzględniano obecność receptorów w jądrach komórek zdrowych nadnerczy, guzów łagodnych i raka nadnerczy. Ponadto w zdrowych nadnerczach oceniano odrębnie warstwy kłębkowatą, pasmowatą i siatkowatą. Wszystkie przypadki zostały ocenione w trzech skalach: Allred, Remelle oraz H-score dla uzyskania dokładniejszych wyników. W przypadku rozbieżności, która dotyczyła około 15% przypadków, ostateczna ocena preparatów ustalana była podczas konsultacji pomiędzy patologami.

## **5. Analiza statystyczna**

Analiza statystyczna została wykonana w Zakładzie Medycyny Nuklearnej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przy użyciu programu komputerowego Statistica 10 we współpracy z Panem dr Tomaszem Bandurskim. Baza danych obejmowała następujące informacje: imię i nazwisko chorego, datę urodzenia, płeć, wiek w chwili zabiegu operacyjnego, rozpoznanie histopatologiczne, datę zabiegu operacyjnego, wielkość guza (w przypadku guzów nadnercza), ocenę aktywności hormonalnej (w przypadku guzów nadnercza), wyniki badań biochemicznych, datę ostatniej obserwacji lub zgonu chorego. Spośród zastosowanych trzech skali oceny intensywności barwienia: Allred, Remelle i H-score, przyjęto H-score, ponieważ zawiera ona najszerszy zakres. Ponadto dla celów statystycznych przyjęto dwa kryteria oceny H-score  $>0\%$  oraz H-score  $>10$ , ze względu na brak standaryzacji dla raka kory nadnercza w ocenie barwień immunohistochemicznych.

Analizę jednoczynnikową przeprowadzono przy użyciu testu chi-kwadrat i testu Fishera (dla małych liczebnie grup). Podczas tej analizy określono zależność pomiędzy występowaniem receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych a cechami klinicznymi chorych. Czas przeżycia chorych liczono od daty zabiegu operacyjnego do daty ostatniej obserwacji lub daty zgonu. Czas przeżycia wyrażano w miesiącach. Krzywe przeżycia dla raka kory nadnercza wykonano metodą Kaplana- Meiera i porównano za pomocą testu log-rank. Dodatkowo wykonano analizę wieloczynnikową z zastosowaniem modelu regresji Coxa. Próg zmienności statystycznej przyjęto na poziomie 0,05.

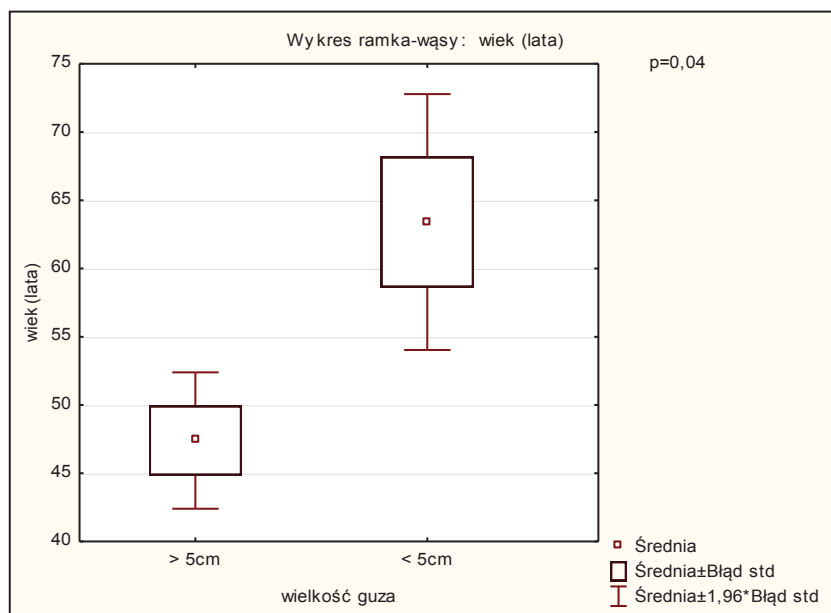
## 6. WYNIKI

### 6.1. Porównanie cech klinicznych i demograficznych pomiędzy analizowanymi grupami

Do chwili zamknięcia bazy danych w kwietniu 2015r. spośród ogółu pacjentów z rakiem kory nadnercza żyło 10 (37%). Mediana okresu przeżycia dla chorych z rakiem kory nadnercza wynosiła 39,5 miesiąca. Według dostępnego piśmiennictwa w zależności od badań czas pięcioletniego przeżycia waha się od 16-38%. Grupa chorych z RKN była młodsza niż chorych z gruczolakiem nadnercza. Średnia wieku pacjentów z RKN i gruczolakiem nadnercza wynosiła odpowiednio 49 i 61 lat ( $p<0,05$ ) (tab. 12). Zarówno w grupie badanych z rakiem, jak i gruczolakiem nadnercza przeważały kobiety, stanowiąc odpowiednio 70,4% i 63,3% ( $p=0,35$ ). Wśród chorych z RKN przeważały guzy  $\geq 5\text{cm}$  w porównaniu do gruczolaków, gdzie odpowiednio wartości te wynosiły 88,9% i 30,6% ( $p<0,001$ ). Nie wystąpiły znamienne statystycznie różnice w aktywności hormonalnej i hiperkortyzolemii dla raków oraz gruczolaków kory nadnercza, przy czym dla RKN aktywność hormonalna była równa obserwowanej hiperkortyzolemii. Dla badanych z rakiem kory nadnercza z wielkością guza  $<5\text{cm}$  oraz  $\geq 5\text{cm}$  średni wiek wynosił odpowiednio 63 i 47 lat ( $p=0,04$ ) (ryc. 8).

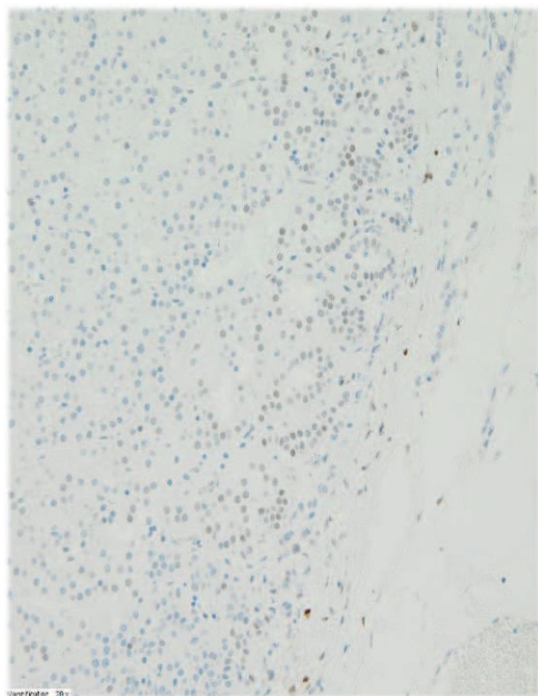
**Tab. 12.** Porównanie zależności rozpoznania histopatologicznego dla chorych z gruczolakiem nadnercza i rakiem nadnercza a cech klinicznych i demograficznych chorych (test Fishera).

Cecha	Rak nadnercza	Gruczolak nadnercza	p
<b>Wiek</b>			
Średnia	49	61	<b>&lt;0,001</b>
Zakres	36-62	51-70	
<b>Płeć</b>			
K	19 (70,4%)	31 (63,3%)	0,35
M	8 (29,6%)	18 (36,7%)	
<b>Wielkość guza</b>			
$<5\text{cm}$	3 (11,1%)	34 (69,4%)	<b>&lt;0,001</b>
$\geq 5\text{cm}$	24 (88,9%)	15 (30,6%)	
<b>Aktywność hormonalna</b>			
Tak	5 (33,3%)	13 (33,3%)	0,62
Nie	10 (66,7%)	26 (66,7%)	
<b>Hiperkortyzolemia</b>			
Tak	5 (31,3%)	6 (15,4%)	0,16
Nie	10 (66,7%)	33 (84,6%)	

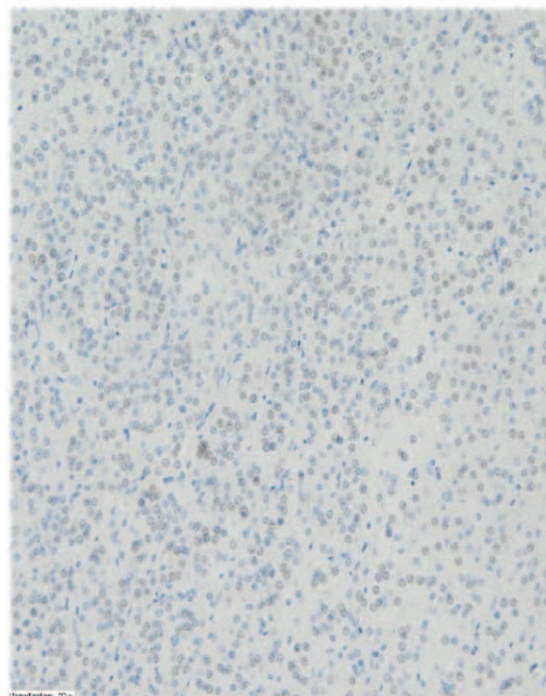


Ryc. 8. Wykres ramka-wąsy przedstawiający zależność wielkości guza dla wartości  $\geq 5$ cm i  $< 5$ cm od wieku w chwili zabiegu operacyjnego badanych z rakiem kory nadnercza (t-Studenta,  $p=0,04$ ) (N=27).

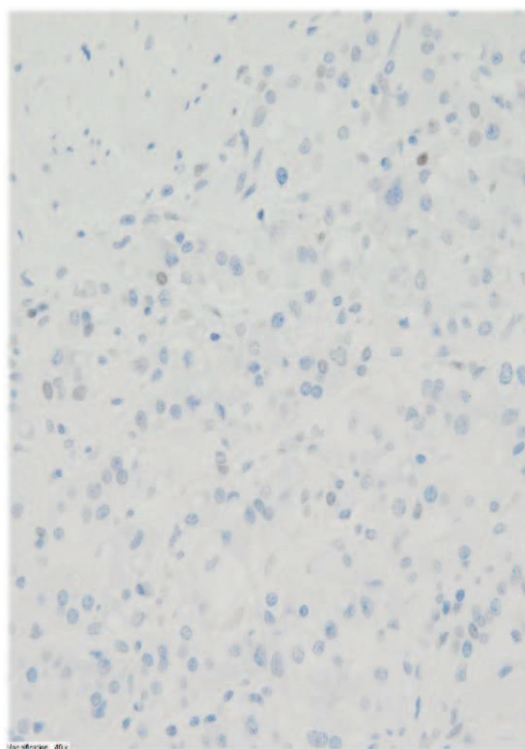
## 6.2. Mikrofotografie



**A**

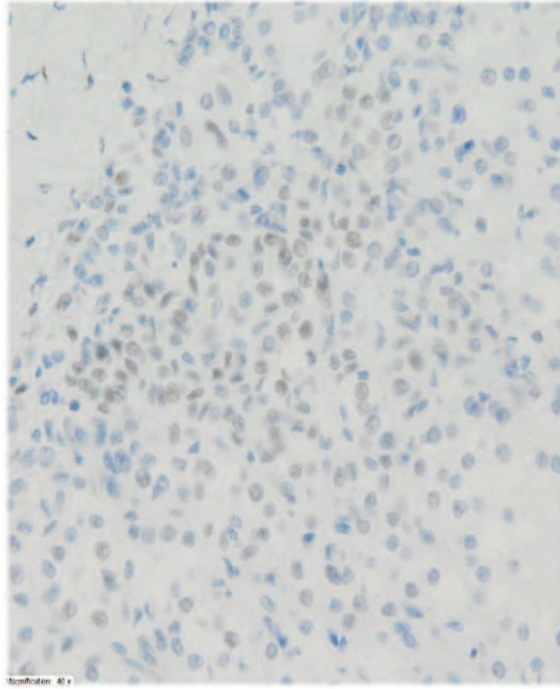


**B**

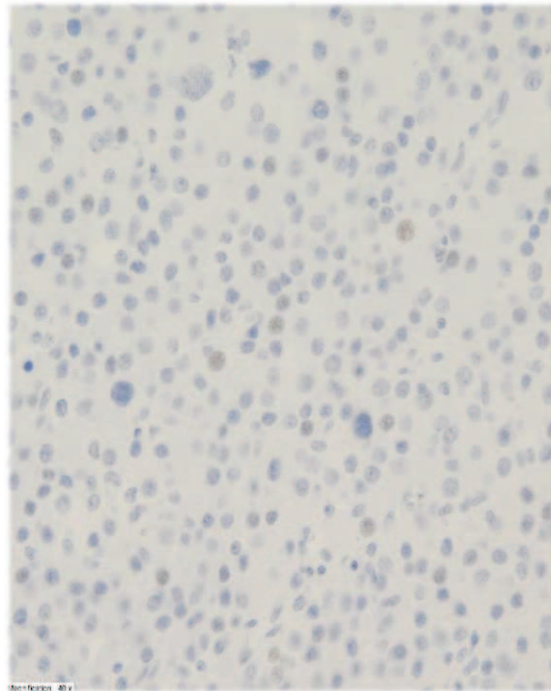


**C**

Ryc. 9. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RE) w warstwie:  
**A.** kłębkowatej kory nadnercza (powiększenie 20 x), **B.** pasmowatej kory nadnercza (powiększenie 20 x),  
**C.** siatkowatej kory nadnercza (powiększenie 40x)



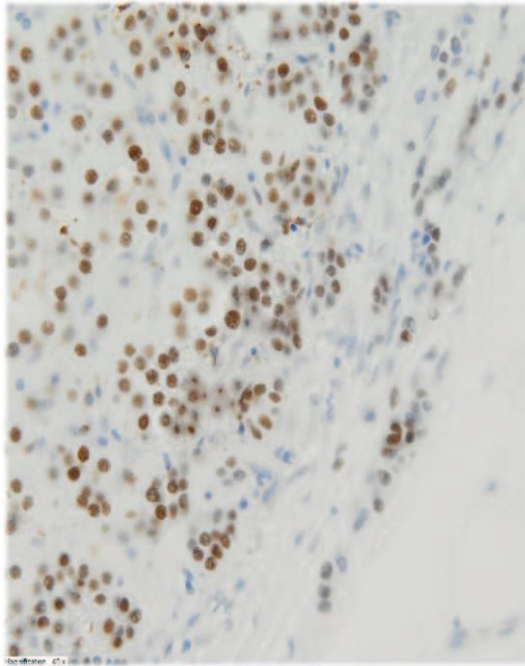
**A**



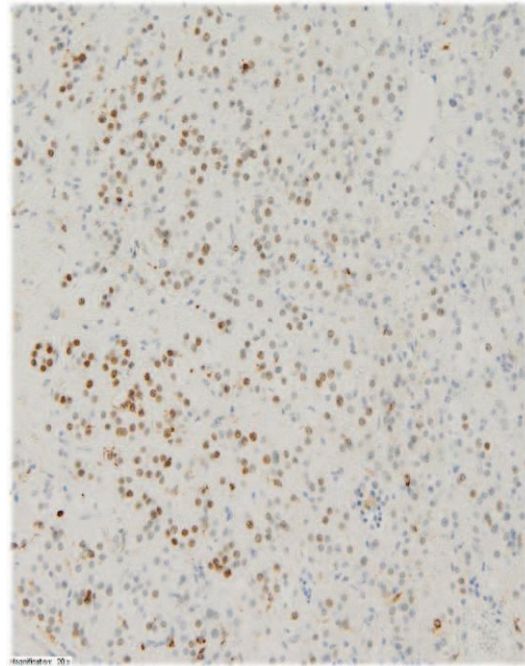
**B**

Ryc. 10. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RE):  
**A.** gruczolak nadnercza (powiększenie 40x) **B.** rak kory nadnercza (powiększenie 40x)

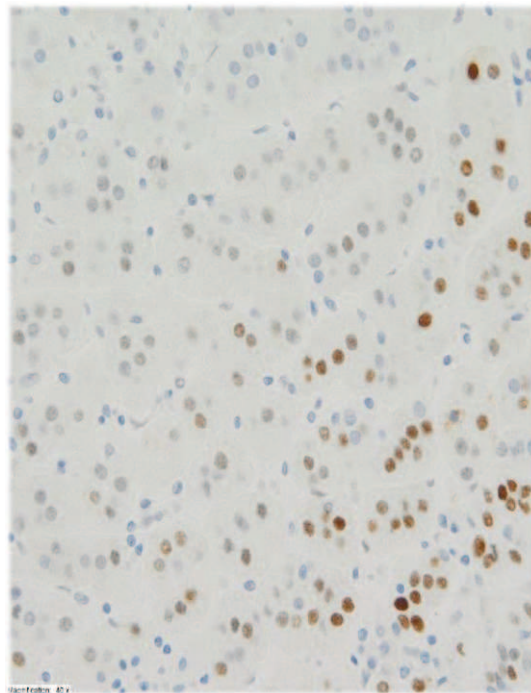




**A**

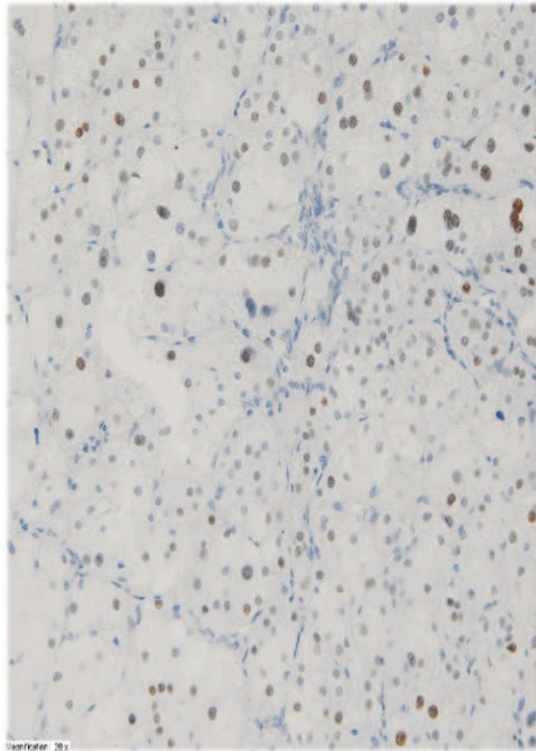


**B**

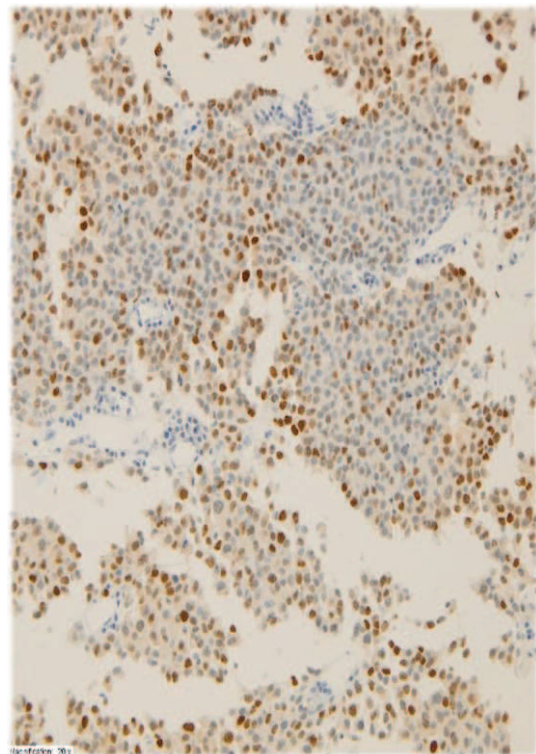


**C**

Ryc. 11. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora progesteronowego (RP):  
**A.** w warstwie kłębkowej kory nadnercza (powiększenie 40x), **B.** w warstwie pasmowej kory nadnercza (powiększenie 20 x), **C.** w warstwie siatkowej kory nadnercza (powiększenie 40 x)



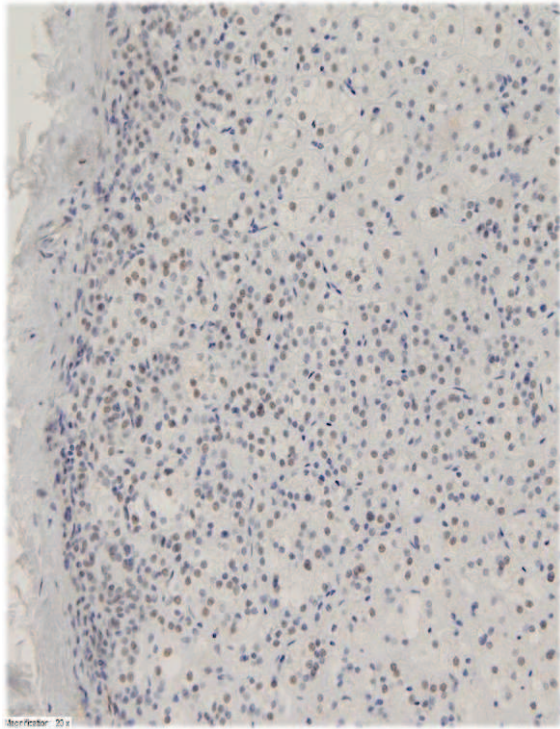
**A**



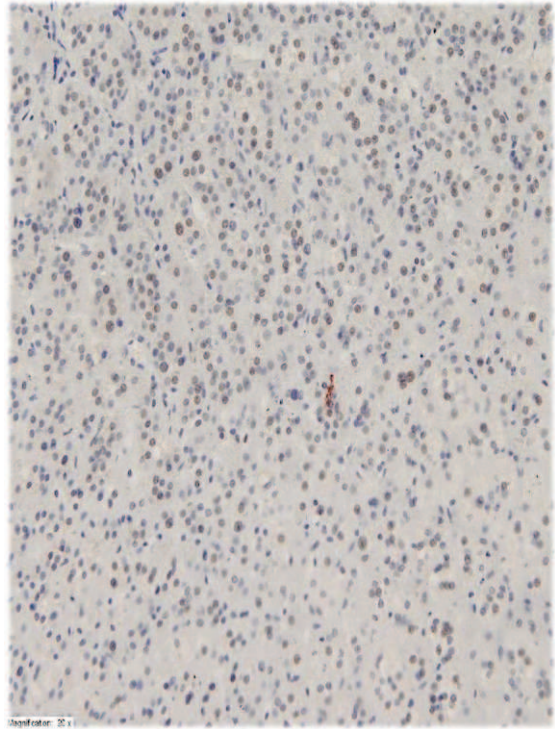
**B**

Ryc. 12. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora progesteronowego (RP):  
**A.** gruczolak nadnercza (powiększenie 20x), **B.** rak kory nadnercza (powiększenie 20x)

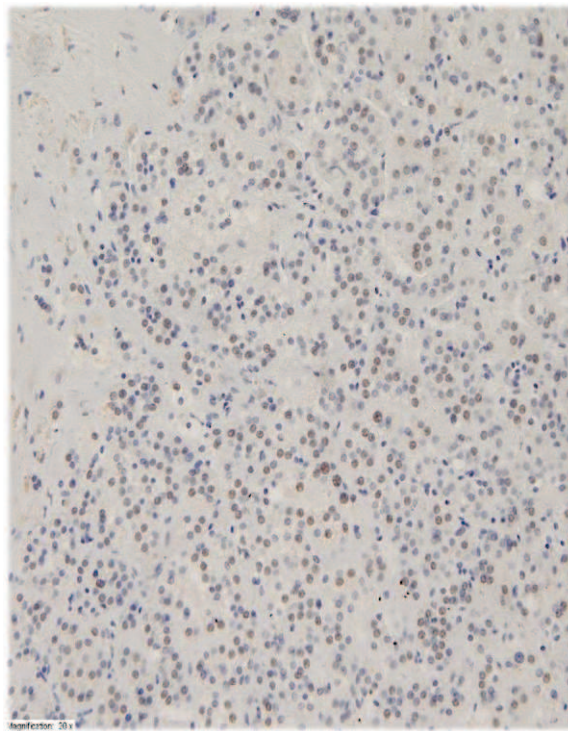




**A**

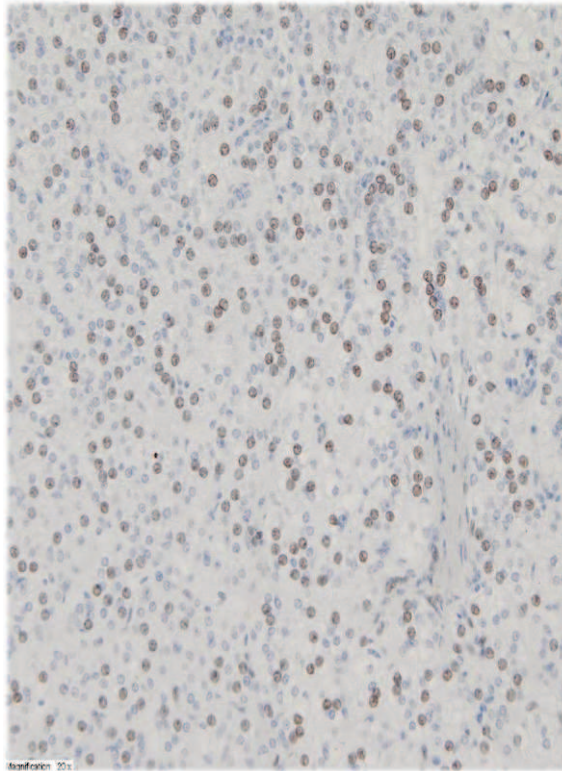


**B**

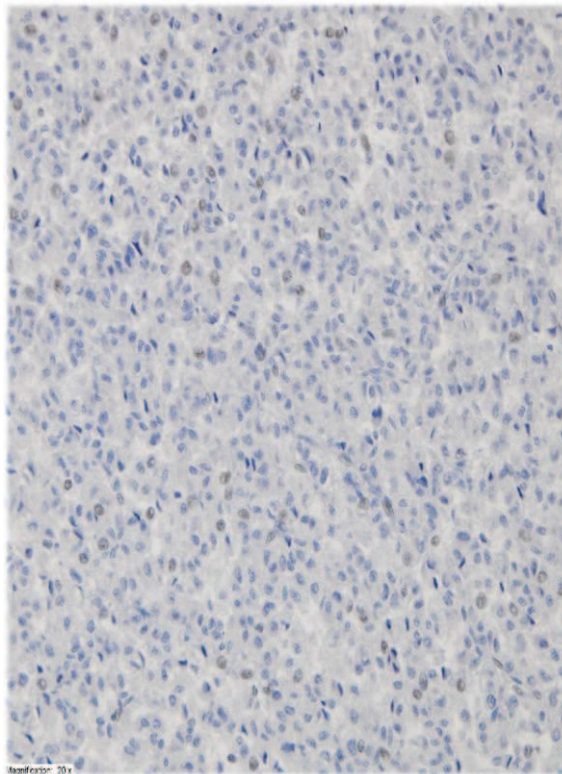


**C**

Ryc. 13. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora androgenowego (RA) w warstwie:  
A. kłębkowatej kory nadnercza (powiększenie 20 x), B. pasmowatej kory nadnercza (powiększenie 20 x)  
C. siatkowatej kory nadnercza (powiększenie 20 x)



**A**



**B**

Ryc. 14. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora androgenowego (RA):  
**A.** gruczolak kory nadnercza (powiększenie 20 x), **B.** rak kory nadnercza (powiększenie 20 x)

### 6.3. Wyniki immunohistochemia

Oznaczenia receptorów: estrogenowego (RE), progesteronowego (RP) oraz androgenowego (RA) zostały wykonane w 20 przypadkach zdrowych nadnerczy (z zachowaniem podziału na warstwy: kłębkowatą, pasmowatą oraz siatkowatą), 49 przypadkach gruczolaków, 27 rakach kory nadnercza.

W poniższych tabelach (tab. 13, tab. 14) zamieszczono ilościowe oraz procentowe wartości dla obecności poszczególnych receptorów, w zależności od rozpoznania histopatologicznego. Pozwala to, na lepsze zobrazowanie wyników. Uwzględniono podział zdrowych nadnerczy na warstwy. Szczegółowy opis wyników dotyczących zdrowych nadnerczy i guzów nadnercza zamieszczono poniżej.

W wyniku analizy zdrowych nadnerczy stwierdzono obecność RE w warstwach kłębkowatej, pasmowatej i siatkowatej odpowiednio w 17 (85%), 7 (35%) i 3 (18%) przypadkach. Obecność RP stwierdzono w warstwach kłębkowatej, pasmowatej i siatkowatej odpowiednio w 18 (90%), 17 (85%) i 8 (40%) przypadkach. Natomiast obecność RA stwierdzono w warstwach kłębkowatej, pasmowatej i siatkowatej odpowiednio w 14 (70%), 11 (55%) i 6 (30%) (tab. 13). Wartości te stanowiły sumę wyników H-score>0% dla obu płci łącznie, w poszczególnych warstwach zdrowych nadnerczy.

**Tab. 13.** Występowanie receptorów estrogenowych (RE), progesteronowych (RP) i androgenowych (RA) w zdrowych nadnerczach.

Rodzaj receptora	RE >0%	RP >0%	RA >0%
Warstwa kłębkowata	17 (85%)	18 (90%)	14 (70%)
Warstwa pasmowata	7 (35%)	17 (89%)	11 (55%)
Warstwa siatkowata	3 (18%)	8 (40%)	6 (30%)

Obecność RE w gruczolakach i rakach stwierdzono odpowiednio w 3 (6,1%) i 5 (18%) badanych guzach. Obecność RP w gruczolakach i rakach stwierdzono odpowiednio w 24 (49%) i 13 (48,1%) badanych guzach. Nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy gruczolakami a rakami kory nadnercza w występowaniu RE i RP odpowiednio  $p=0,10$  i  $p=0,94$ . Natomiast pomiędzy gruczolakami i rakami kory nadnercza wykazano znamiennej statystycznie różnicę w ekspresji RA ( $p=0,005$ ). Obecność RA w gruczolakach i rakach stwierdzono odpowiednio w 42 (85,7%) i 15 (55,6%) badanych guzach (tab. 14).

**Tab. 14.** Występowanie receptorów estrogenowych (RE), progesteronowych (RP) i androgenowych (RA) u pacjentów z rakiem i gruczolakiem nadnercza.

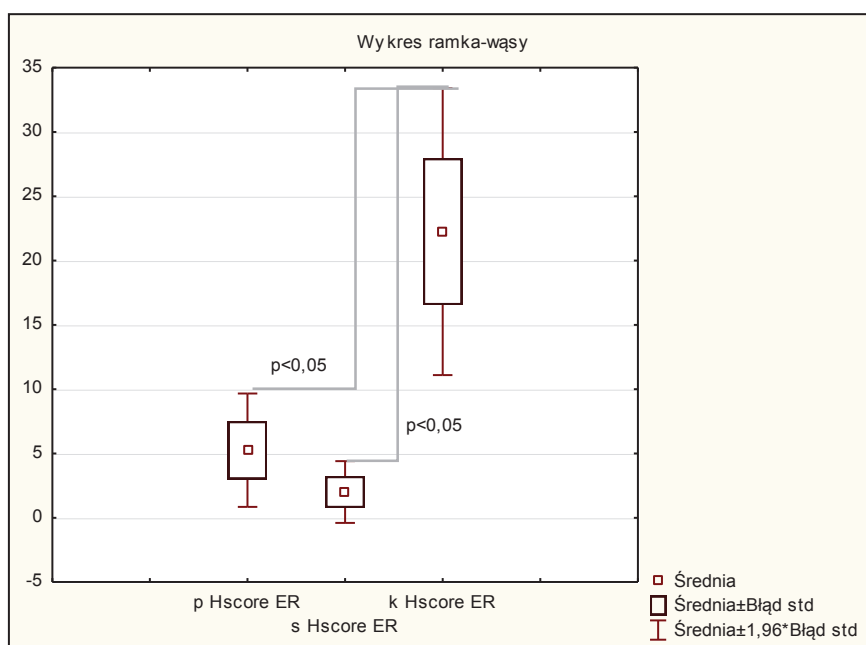
	<b>RE &gt;0%</b>	<b>p</b>	<b>RP &gt;0%</b>	<b>p</b>	<b>RA &gt;0%</b>	<b>p</b>
<b>Gruczolak nadnercza</b>	3 (6,1%)	0,10	24 (49%)	0,94	42 (85,7%)	0,005
<b>Rak nadnercza</b>	5 (18%)		13 (48,1%)		15 (55,6%)	



### 6.3.1. Zdrowe nadnercza

#### *Receptor estrogenowy*

Receptor estrogenowy (RE) został określony dla 20 przypadków zdrowych nadnerczy. Największy odsetek dla receptora estrogenowego stwierdzono w warstwie kłębkowatej kory nadnercza, gdzie był pozytywny w 85% przypadków. W warstwie pasmowatej i siatkowatej stanowił odpowiednio 35% i 18%. Za wynik dodatni przyjęto jakąkolwiek ekspresję receptora estrogenowego (H-score>0%). Istotnie statystycznie różnice występowały pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego w warstwach pasmowatej i kłębkowatej ( $p<0,05$ ) oraz siatkowatej i kłębkowatej ( $p<0,05$ ) (ryc. 15). Średni H-score dla warstwy kłębkowatej, pasmowatej, siatkowatej wynosił odpowiednio 22,25; 5,25 i 2,0. Analiza została także wykonana dla punktów odcięcia H-score  $<10/\geq 10$  oraz mediany H-score, jednak nie wpłynęło to na uzyskanie wyników znamiennej statystycznie. Ponadto nie stwierdzono istotnej różnicy w ekspresji RE we wszystkich warstwach w zależności od płci (tab. 15). Do zobrazowania wyników zastosowano test ANOVA Friedmana w postaci wykresu ramka-wąsy. Z uwagi na lepsze zobrazowanie różnic pomiędzy poszczególnymi warstwami kory nadnercza w ekspresji receptora RE przedstawiono wykres ze średnią H-score (ryc. 15).



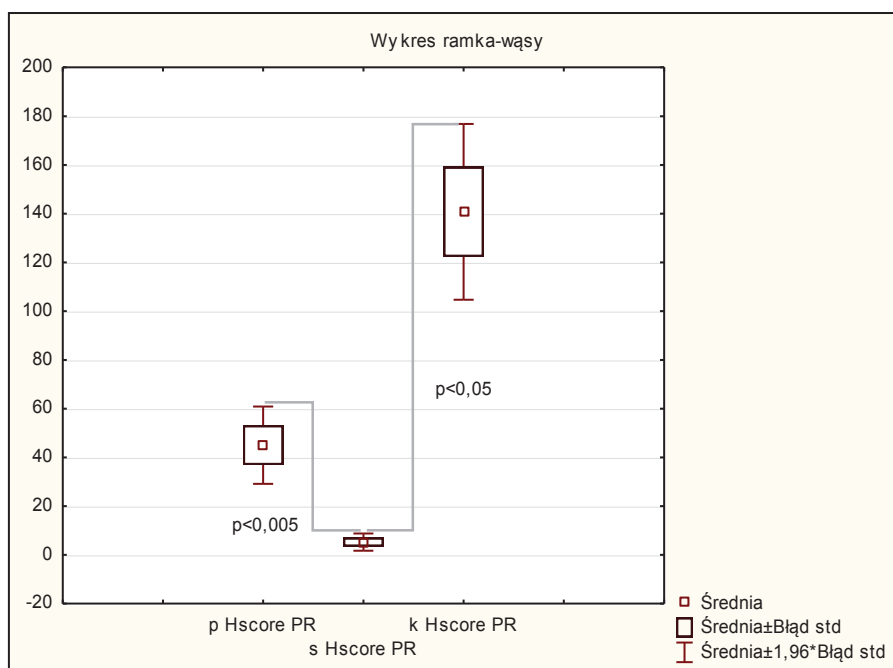
Ryc. 15. Porównanie średniej wartości H-score dla receptora estrogenowego pomiędzy warstwami zdrowego nadnercza: k - warstwa kłębkowata, p - warstwa pasmowata, s - warstwa siatkowata, (test chi2 ANOVA,  $p<0,05$  dla warstw p - k i s - k) (N=20).

**Tab. 15.** Korelacja pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego (RE) a płcią w grupie chorych z prawidłowymi nadnerczami. RE wyrażono dla trzech punktów odcięcia: 0 vs >0%, H-score <10 vs ≥10 oraz < vs ≥ mediany dla H-score (dokładny test Fishera).

	RE 0% (%)	RE >0% (%)	p	RE H-score <10 (%)	RE H-score ≥10 (%)	p	RE H-score med. < (%)	RE H-score med. ≥ (%)	p
<b>Warstwa kłębkowata</b>									
Kobiety	0 (0)	3 (100)	0,59	0 (0)	3 (100)	0,19	2 (66,7)	1 (33,3)	0,56
Mężczyźni	3 (17,6)	14 (82,4)		8 (47,1)	9 (52,9)		9 (52,9)	8 (47,1)	
<b>Warstwa pasmowata</b>									
Kobiety	3 (100)	0 (0)	0,25	3 (100)	0 (0)	0,60	3 (100)	0 (0)	0,25
Mężczyźni	10 (58,8)	7 (41,2)		14 (82,4)	3 (17,6)		10 (58,8)	7 (41,2)	
<b>Warstwa siatkowata</b>									
Kobiety	3 (100)	0 (0)	0,60	3 (100)	0 (0)	0,71	3 (100)	0 (0)	0,60
Mężczyźni	14 (82,4)	3 (17,6)		15 (88,2)	2 (11,8)		14 (82,4)	3 (17,6)	

## Receptor progesteronowy

Obecność receptorów progesteronowych stwierdzono w największym odsetku dla warstwy kłębkowatej oraz pasmowatej kory nadnercza, odpowiednio 90% i 89%. W warstwie siatkowatej stanowił 40%. Za wynik dodatni przyjęto jakąkolwiek ekspresję receptora estrogenowego (H-score >0%). Istotnie statystycznie różnice występowały pomiędzy ekspresją receptora progesteronowego w warstwach p i s ( $p < 0,05$ ) oraz s i k ( $p < 0,05$ ) (ryc. 16). Analiza została także wykonana dla punktów odcięcia H-score  $< 10$  /  $\geq 10$  oraz mediany H-score, jednak nie wpłynęło to na uzyskanie wyników znamiennej statystycznie. Średni H-score dla warstwy kłębkowatej, pasmowatej, siatkowatej wynosił odpowiednio 140; 45; 5.25. Ponadto nie stwierdzono istotnej różnicy w ekspresji RP we wszystkich warstwach w zależności od płci (tab. 16). Do zobrazowania wyników zastosowano test ANOVA Friedmana w postaci wykresu ramka-wąsy. Z uwagi na lepsze zobrazowanie różnic pomiędzy poszczególnymi warstwami kory nadnercza w ekspresji receptora RP przedstawiono wykres ze średnią H-score.



Ryc. 16. Porównanie średniej wartości H-score dla receptora progesteronowego pomiędzy warstwami zdrowego nadnercza: k - warstwa kłębkowata, p - warstwa pasmowata, s - warstwa siatkowata, (test chi2 ANOVA,  $p < 0,05$  dla warstw p - s i s - k) (N=20).

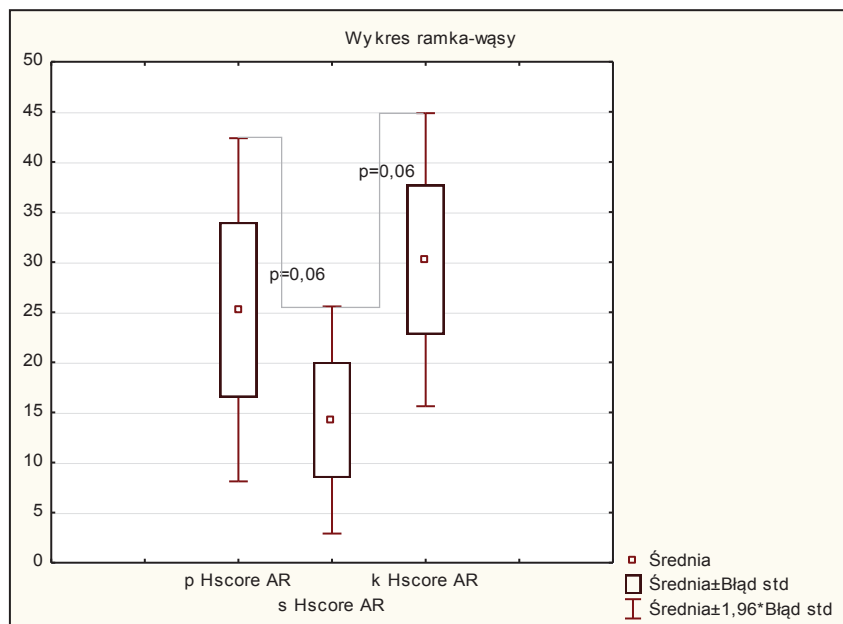
**Tab. 16.** Korelacja pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego (RP) a płcią w grupie chorych z prawidłowymi nadnerczami. RP wyrażono dla trzech punktów odcięcia: 0 vs >0%, H-score <10 vs ≥10 oraz < vs ≥ mediany dla H-score (dokładny test Fishera).

	RP 0% (%)	RP >0% (%)	p	RP H-score <10 (%)	RP H-score ≥10 (%)	p	RP H-score med. < (%)	RP H-score med. ≥ (%)	p
<b>Warstwa kłębkowata</b>									
Kobiety	0 (0)	3 (100)	0,71	0 (0)	3 (100)	0,58	0 (0)	3 (100)	0,05
Mężczyźni	2 (11,8)	15 (88,2)		3 (18,8)	13 (81,3)		12 (70,6)	5 (29,4)	
<b>Warstwa pasmowata</b>									
Kobiety	0 (0)	3 (100)	0,70	1 (33,3)	2 (66,7)	0,60	1 (33,3)	2 (66,7)	0,42
Mężczyźni	2 (11,8)	15 (88,2)		4 (23,5)	13 (76,5)		10 (58,8)	7 (41,2)	
<b>Warstwa siatkowata</b>									
Kobiety	2 (66,7)	1 (33,3)	0,66	3 (100)	0 (0)	0,60	2 (66,7)	1 (33,3)	0,66
Mężczyźni	10 (58,8)	7 (41,2)		14 (82,4)	3 (17,6)		10 (58,8)	7 (41,2)	



## Receptor androgenowy

Największa ekspresja RA w zdrowych nadnerczach dotyczyła warstwy kłębkowatej i pasmowatej, gdzie odpowiednio wynik był dodatni w 70% i 55% przypadków. Natomiast w warstwie siatkowatej ekspresja RA wynosiła 30%. Za wynik dodatni przyjęto jakąkolwiek ekspresję receptora estrogenowego (H-score>0%). Analiza została także wykonana dla punktów odcięcia H-score <10/≥10 oraz mediany H-score, jednak nie wpłynęło to na uzyskanie wyników znamiennej statystycznie. Stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic w wyniku H-score pomiędzy poszczególnymi warstwami prawidłowego nadnercza (ryc. 17). W żadnym z przypadków nie osiągnięto  $p < 0,05$ . Średnie wartości H-score dla poszczególnych warstw: kłębkowatej, pasmowatej, siatkowatej wynosiły odpowiednio 30, 25, 14. Ponadto nie stwierdzono istotnej różnicy w ekspresji RA we wszystkich warstwach zdrowych nadnerczy w zależności od płci (tab. 17). Do zobrazowania wyników zastosowano test ANOVA Friedmana w postaci wykresu ramka-wąsy. Z uwagi na lepsze zobrazowanie różnic pomiędzy poszczególnymi warstwami kory nadnercza w ekspresji receptora RA przedstawiono wykres ze średnią H-score.



Ryc. 17. Porównanie średniej wartości H-score dla receptora androgenowego pomiędzy warstwami zdrowego nadnercza: k - warstwa kłębkowata, p - warstwa pasmowata, s - warstwa siatkowata, (test chi2 ANOVA,  $p=0,06$  dla warstw p - s i s - k) (N=20).

**Tab. 17.** Korelacja pomiędzy ekspresją receptora androgenowego (RA) a płcią w grupie chorych z prawidłowymi nadnerczami. RA wyrażono dla trzech punktów odcięcia: 0 vs >0%, H-score <10 vs ≥10 oraz < vs ≥ mediany dla H-score (dokładny test Fishera).

	RA 0% (%)	RA >0% (%)	p	RA H-score <10 (%)	RA H-score ≥10 (%)	p	RA H-score med. < (%)	RA H-score med. ≥ (%)	p
<b>Warstwa kłębkowata</b>									
Kobiety	2 (66,7)	1 (33,3)	0,20	2 (66,7)	1 (33,3)	0,34	2 (66,7)	1 (33,3)	0,66
Mężczyźni	4 (23,5)	13 (76,5)		6 (35,3)	11 (64,7)		10 (58,8)	7 (41,2)	
<b>Warstwa pasmowata</b>									
Kobiety	2 (66,7)	1 (33,3)	0,42	2 (66,7)	1 (33,3)	0,66	2 (66,7)	1 (33,3)	0,58
Mężczyźni	7 (41,2)	10 (58,8)		10 (58,8)	7 (41,2)		9 (52,9)	8 (47,1)	
<b>Warstwa siatkowata</b>									
Kobiety	2 (66,7)	1 (33,3)	0,68	2 (66,7)	1 (33,3)	0,68	2 (66,7)	1 (33,3)	0,68
Mężczyźni	12 (70,6)	5 (29,4)		12 (70,6)	5 (29,4)		12 (70,6)	5 (29,4)	

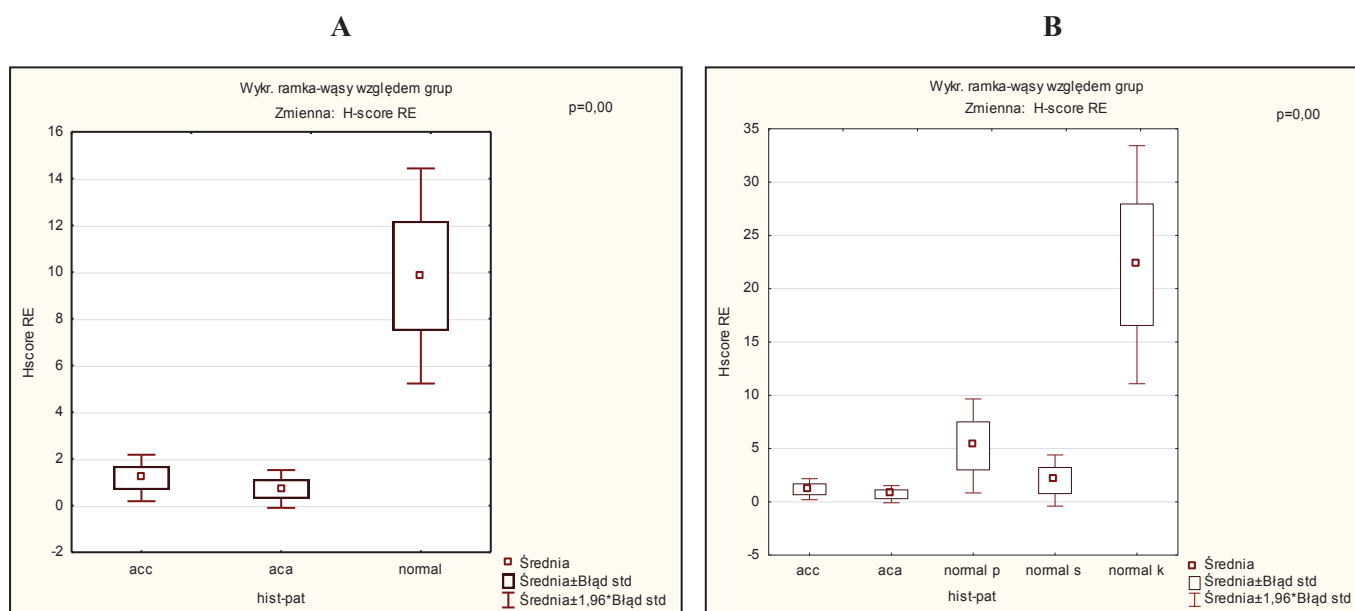
### 6.3.2. Porównanie ekspresji receptora w trzech grupach: rak nadnercza, gruczolak nadnercza, zdrowe nadnercza.

#### Receptor estrogenowy

Poniżej przedstawiono średnią wyniku H-score dla receptora estrogenowego (RE) w zależności od rozpoznania histopatologicznego w grupie badanych z rakiem kory nadnercza (*acc* - *adrenocortical cancer*), gruczolakiem (*aca* - *adrenocortical adenoma*) oraz prawidłowych nadnerczy (*normal* – *adrenal gland*). Jako pierwszy przedstawiono wykres dla prawidłowych nadnerczy - jest to wynik dla ocenianych łącznie trzech warstw nadnercza (kłębkowatej, pasmowatej oraz siatkowatej) (ryc. 18A). Jako drugi przedstawiono wynik ocenianych trzech warstw nadnercza z osobna (ryc. 18B). W teście Kruskala-Wallisa stwierdzono różnice w średniej wartości H-score dla receptora estrogenowego pomiędzy badanymi z gruczolakiem nadnercza a prawidłowymi nadnerczami, gdzie różnice wynosiły odpowiednio 0,71 i 9,83. Najwyraźniejsze różnice w średnim wyniku H-score wystąpiły dla warstwy kłębkowatej (ryc. 18). Średnie wartości H-score RE dla raka kory nadnerczy, gruczolaka nadnerczy, warstwy pasmowatej, siatkowatej i kłębkowatej wynosiły odpowiednio 1.18; 0.71; 5.25; 2.0; 22.25. Mediany dla H-score RE w przypadku łącznej oceny wszystkich trzech warstw nadnercza dla raka, gruczolaka, warstwy pasmowatej, siatkowatej wynosiły 0, natomiast dla warstwy kłębkowatej 15.

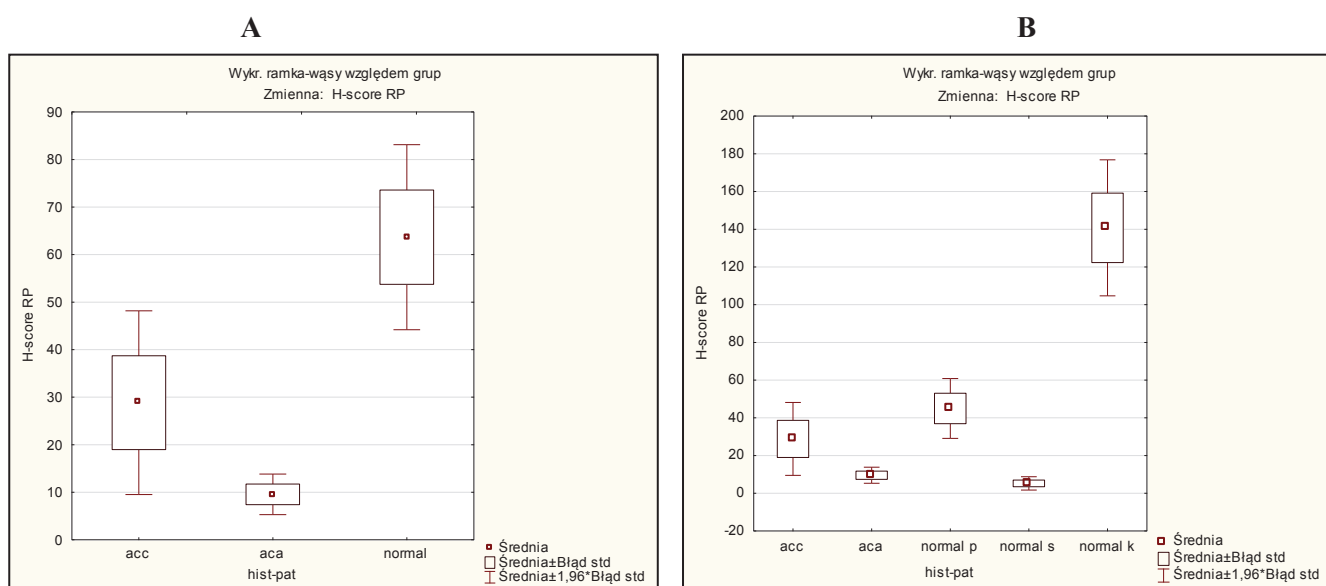
Ryc. 18. Średnia wartość H-score dla receptora estrogenowego (RE) w poszczególnych grupach chorych z rakiem nadnercza, gruczolakiem oraz prawidłowymi nadnerczami - test Kruskala-Wallisa (N=136).

- A. we wszystkich warstwach łącznie
- B. z podziałem na warstwy: pasmowatą (p), siatkowatą (s) i kłębkowatą (k)



## Receptor progesteronowy

Poniżej przedstawiono średnią wartość H-score dla receptora progesteronowego (RP) w zależności od rozpoznania histopatologicznego w grupie badanych z rakiem kory nadnercza (*acc*), gruczolakiem (*aca*) oraz prawidłowych nadnerczy (*normal*). Jako pierwszy przedstawiono wykres dla prawidłowych nadnerczy - jest to wynik dla ocenianych łącznie trzech warstw nadnercza (kłębkowatej, pasmowatej oraz siatkowatej) (ryc. 19A). Jako drugi przedstawiono wynik ocenianych trzech warstw nadnercza z osobna (ryc. 19B). W teście Kruskala-Wallisa stwierdzono różnice w średniej wartości H-score dla receptora progesteronowego pomiędzy badanymi z rakiem kory nadnercza a prawidłowymi nadnerczami ( $p=0,03$ ) oraz gruczolakiem nadnercza a prawidłowymi nadnerczami ( $p<0,001$ ). Średnie wartości H-score RP dla raka, gruczolaka i prawidłowego nadnercza wynosiły odpowiednio 28,9; 63,6; 9,6. Wartości mediany H-score RP wynosiły dla raka kory nadnercza, gruczolaka oraz prawidłowego nadnercza odpowiednio 0; 0 i 25.



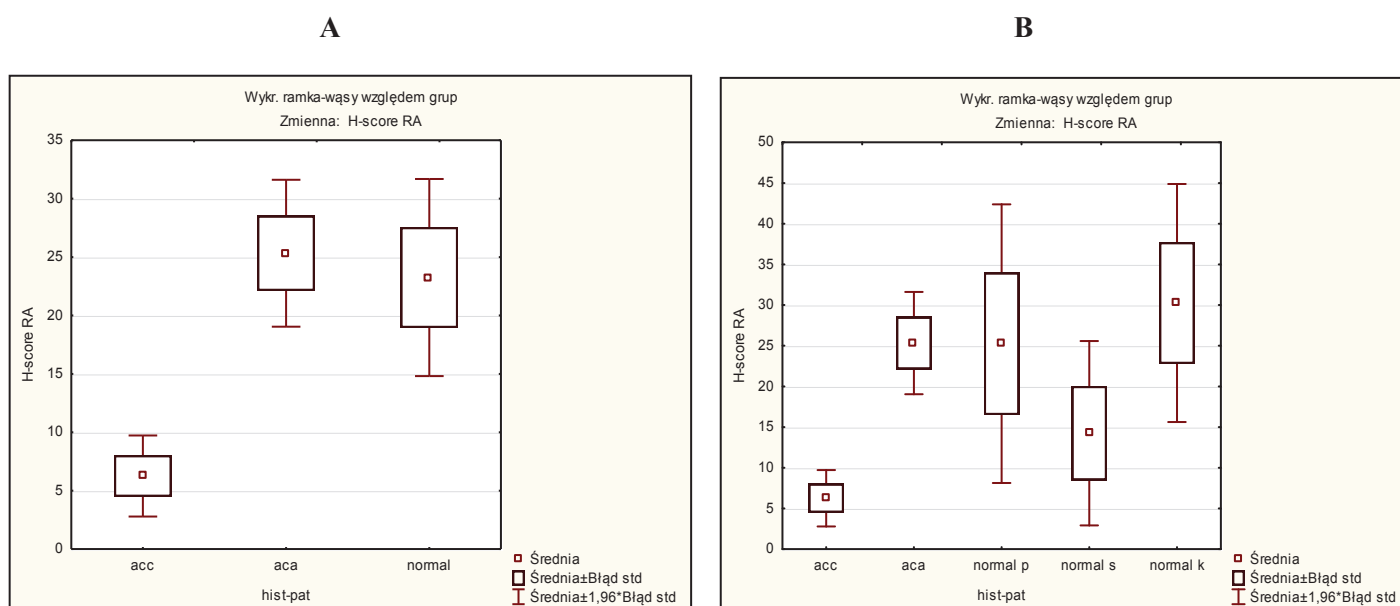
Ryc. 19. Średnia wartość H-score dla receptora progesteronowego (RP) w poszczególnych grupach chorych z rakiem nadnercza, gruczolakiem oraz prawidłowymi nadnerczami – (test Kruskala-Wallisa,  $p<0,001$ ) (N=136).

A. we wszystkich warstwach łącznie

B. z podziałem na warstwy: pasmowatą (p), siatkowatą (s) i kłębkowatą (k)

## Receptor androgenowy

Poniżej przedstawiono średnią wyniku H-score dla receptora androgenowego (RA) w zależności od rozpoznania histopatologicznego w grupie badanych z rakiem kory nadnercza (*acc*), gruczolakiem (*aca*) oraz prawidłowych nadnerczy (*normal*). Jako pierwszy przedstawiono wykres dla prawidłowych nadnerczy - jest to wynik dla ocenianych łącznie trzech warstw nadnercza (kłębkowatej, pasmowatej oraz siatkowatej) (ryc. 20A). Jako drugi przedstawiono wynik ocenianych trzech warstw nadnercza z osobna (ryc. 20B). W teście Kruskala-Wallisa stwierdzono różnice w średniej wartości H-score dla receptora androgenowego pomiędzy badanymi z rakiem kory nadnercza a gruczolakiem nadnercza ( $p < 0,001$ ) oraz pomiędzy gruczolakiem nadnercza a prawidłowymi nadnerczami ( $p = 0,04$ ). Średnie H-score RA dla raka, gruczolaka i prawidłowego nadnercza wynosiły odpowiednio 6,26; 25,32; 23,2. Wartości mediany H-score RA dla raka kory nadnerczy, gruczolaka oraz prawidłowego nadnercza wynosiły odpowiednio 1,0; 25; 5.



Ryc. 20. Średnia wartość H-score dla receptora androgenowego (RA) w poszczególnych grupach chorych z rakiem nadnercza, gruczolakiem oraz prawidłowymi nadnerczami – (test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,001$ ) (N=136).

A. we wszystkich warstwach łącznie

B. z podziałem na warstwy: pasmowatą (p), siatkowatą (s) i kłębkowatą (k)

#### **6.4. Ocena zależności pomiędzy ekspresją badanych receptorów a cechami klinicznymi i demograficznymi w grupie chorych operowanych z powodu guza nadnercza.**

W badanej grupie chorych z 49 gruczolakami nadnercza oraz 27 rakami kory nadnercza porównywano występowanie receptorów: estrogenowych, progesteronowych i androgenowych z cechami klinicznymi i demograficznymi.

Ze względu na małą liczebność grupy zastosowano dokładny test Fishera. Nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy w występowaniu receptorów estrogenowych i progesteronowych pomiędzy grupą chorych z gruczolakiem i rakiem kory nadnercza (tab. 18, 19). Natomiast stwierdzono różnicę w ekspresji receptora androgenowego zarówno dla ekspresji RA (0%)/( $>0\%$ ), jak również dla wyników RA  $10 < \text{H-score} < 10$  (tab. 20). Receptor androgenowy występował częściej u badanych z gruczolakiem nadnercza, niż u chorych z rakiem kory nadnercza odpowiednio 85,7% i 55,6%. Również więcej wyników z H-score RA  $\geq 10$  wystąpiło u badanych z gruczolakiem nadnercza w stosunku do badanych z rakiem odpowiednio 65,3% i 25,9% (tab. 20).

W analizie  $\chi^2$  uwzględniono: wiek, płeć, wielkość guza, obecność hiperkortyzolemii, rodzaj rozpoznania histopatologicznego. Nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością rozpatrywanych oddzielnie receptorów estrogenowych i progesteronowych a analizowanymi cechami demograficznymi i klinicznymi. Związku takiego nie stwierdzono również, po przyjęciu kryteriów występowania dla H-score ( $<10$ )/( $\geq 10$ ) oraz dla wartości powyżej i poniżej mediany H-score, dla której wyniki były zbieżne jak dla analizy (0%)/( $>0\%$ ). Dlatego nie uwzględniano mediany H-score w tabelach. Stwierdzono związek obecności RA z wielkością guza ( $p=0,02$ , tab. 20) dla punktu odcięcia H-score RA ( $<10$ )/( $\geq 10$ ). Dodatkowo różnica wielkości guza pomiędzy gruczolakami i rakami była istotna statystycznie ( $p < 0,001$ ). Wśród raków przeważały guzy o wielkości  $\geq 5\text{cm}$  w stosunku do gruczolaków odpowiednio 88,9% i 30,6%. Ponadto stwierdzono różnice w ekspresji RA pomiędzy gruczolakami i rakami kory nadnerczy dla dwóch punktów odcięcia: (0%)/( $>0\%$ ) ( $p=0,005$ ) oraz H-score ( $<10$ )/( $\geq 10$ ) ( $p=0,001$ ). Ekspresja RA była większa w przypadku gruczolaków w stosunku do raków dla punktów odcięcia RA (0%)/( $>0\%$ ) oraz H-score RA ( $<10$ )/( $\geq 10$ ) odpowiednio 85,7% i 55,6% oraz 65,3% i 25,9% (tab. 20).

**Tab. 18.** Występowanie ekspresji receptora estrogenowego (RE) w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=76, test Chi<sup>2</sup>).

Cecha	RE (0%)(%)	RE (>0%)(%)	p	RE H-score (<10)(%)	RE H-score (≥10)(%)	p
Wiek						
≤55	6 (18,2)	27 (81,8)	0,06*	33 (100)	0 (0)	0,56*
>55	2 (4,7)	41 (95,3)		42 (97,7)	1 (2,3)	
Płeć						
K	6 (12)	44 (88)	0,44*	50 (100)	0 (0)	0,34*
M	2 (7,7)	24 (92,3)		25 (96,2)	1 (3,8)	
Wielkość guza						
<5cm	6 (15,4)	35 (94,6)	0,14*	37 (100)	0 (0)	0,51*
≥5cm	2 (5,4)	33 (84,6)		38 (97,4)	1 (2,6)	
Hiperkortyzolemia						
Tak	2 (18,2)	9 (81,8)	0,25*	11(100)	0 (0)	0,80*
Nie	3 (6,8)	41 (93,2)		43 (97,7)	1 (2,3)	
Rozpoznanie histopatologiczne						
Gruczolak	46 (93,9)	3 (6,1)	0,10*	48 (98)	1 (2)	0,64*
Rak	22 (81,5)	5 (18,5)		27 (100)	0 (0)	

\*dokładny test Fishera

**Tab. 19.** Występowanie ekspresji receptora progesteronowego (RP) w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=76, test Chi<sup>2</sup>).

Cecha	RP (0%)(%)	RP (>0%)(%)	p	RP H-score (<10)(%)	RP H-score (≥10)(%)	p
Wiek						
≤55	17 (51,5)	16 (48,5)	0,97	23 (69,7)	10 (30,3)	0,99
>55	22 (51,2)	21 (48,8)		30 (69,8)	13 (30,2)	
Płeć						
K	26 (52)	24 (48)	0,86	37 (74)	13 (26)	0,26
M	13 (50)	13 (50)		16 (61,5)	10 (38,5)	
Wielkość guza						
<5cm	20 (54,1)	17 (45,9)	0,64	27 (73)	10 (27)	0,55
≥5cm	19 (48,7)	20 (51,3)		26 (66,7)	13 (33,3)	
Hiperkortyzolemia						
Tak	6 (54,5)	5 (45,5)	0,52*	9 (81,8)	2 (18,2)	0,36*
Nie	22 (50)	22 (50)		31 (70,5)	13 (29,5)	
Rozpoznanie histopatologiczne						
Gruczolak	25 (51)	24 (49)	0,94*	35 (71,4)	14 (28,6)	0,42*
Rak	14 (51,9)	13 (48,1)		18 (66,7)	9 (33,3)	

\*dokładny test Fishera

**Tab. 20.** Występowanie ekspresji receptora androgenowego (RA) w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=76, test Chi<sup>2</sup>).

Cecha	RA (0%)(%)	RA (>0%)(%)	p	RA H-score (<10)(%)	RA H-score (≥10)(%)	p
Wiek						
≤55	7 (21,2)	26 (78,8)	0,35*	15 (45,5)	18 (54,5)	0,39*
>55	12 (27,9)	31 (72,1)		22 (51,2)	21 (48,8)	
Płeć						
K	14 (28)	36 (72)	0,29*	25 (50)	25 (50)	0,75
M	5 (19,2)	21 (80,8)		12 (46,2)	14 (53,8)	
Wielkość guza						
<5cm	7 (18,9)	30 (81,1)	0,18*	13 (35,1)	24 (64,9)	<b>0,02</b>
≥5cm	12 (30,8)	27 (69,2)		24 (61,5)	15 (38,5)	
Hiperkortyzolemia						
Tak	3 (27,3)	8 (72,7)	0,58*	4 (36,4)	7 (63,6)	0,32*
Nie	11 (25)	33 (75)		22 (50)	22 (50)	
Rozpoznanie histopatologiczne						
Guczolak	7 (14,3)	42 (85,7)	<b>0,005*</b>	17 (34,7)	32 (65,3)	<b>0,001</b>
Rak	12 (44,4)	15 (55,6)		20 (74,1)	7 (25,9)	

\*dokładny test Fishera

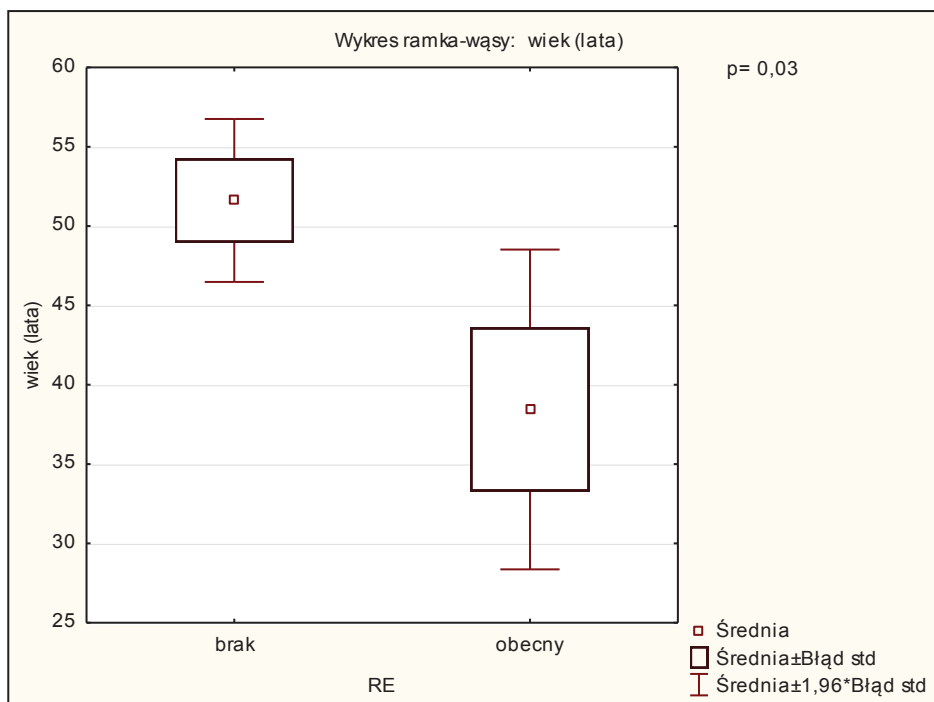
### *Ocena ekspresji poszczególnych receptorów w zależności od wieku*

W niniejszym badaniu stwierdzono statystycznie znamiennej zależność od wieku dla:

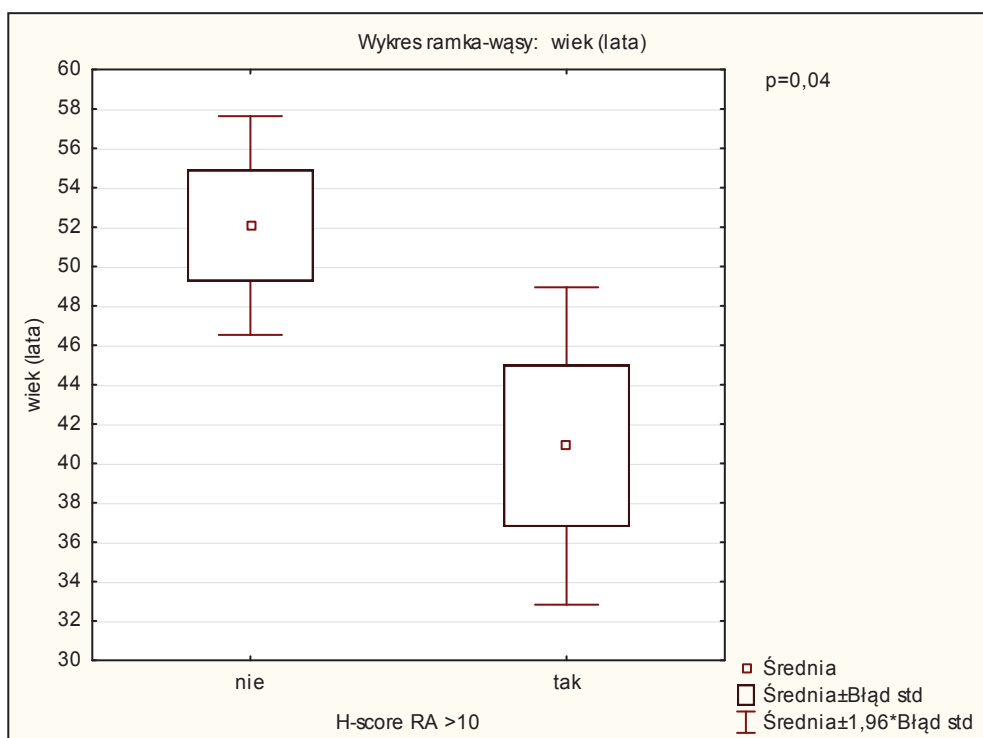
- receptora estrogenowego z punktem odcięcia RE 0% vs >0%, gdzie wiek u pacjentów z dodatnią i ujemną ekspresją RE wynosił odpowiednio 38 lat i 51 lat (p=0,03, ryc. 21)
- receptora androgenowego z punktem odcięcia H-score RA <10 vs ≥10, gdzie wiek u pacjentów wynosił odpowiednio 52 lat i 41 lata (p=0,04, ryc. 22)

Dla ekspresji receptora progesteronowego oraz dla obecności lub braku hiperkortyzolemii nie stwierdzono istotnych różnic w wieku badanych.





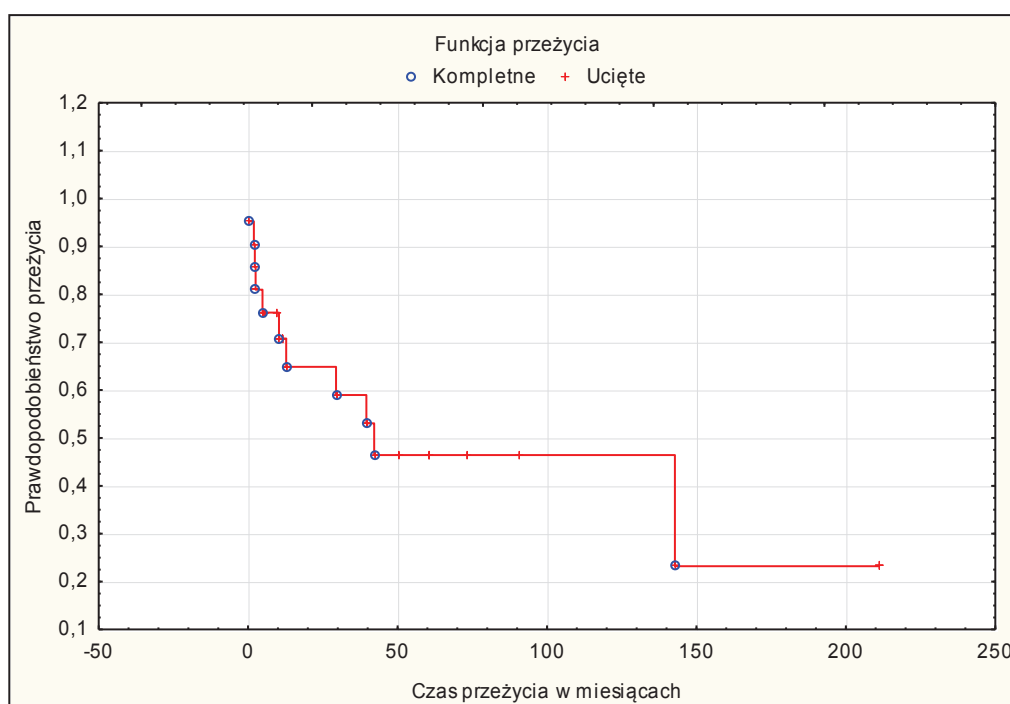
Ryc. 21. Wykres ramka- wąsy przedstawiający zależność ekspresji receptora estrogenowego od wieku w chwili zabiegu operacyjnego (t-Studenta,  $p=0,03$ ) (N=27).



Ryc. 22. Wykres ramka- wąsy przedstawiający zależność ekspresji receptora androgenowego dla H-score>10 (nie/tak) od wieku w chwili zabiegu operacyjnego (t-Studenta,  $p=0,04$ ) (N=27).

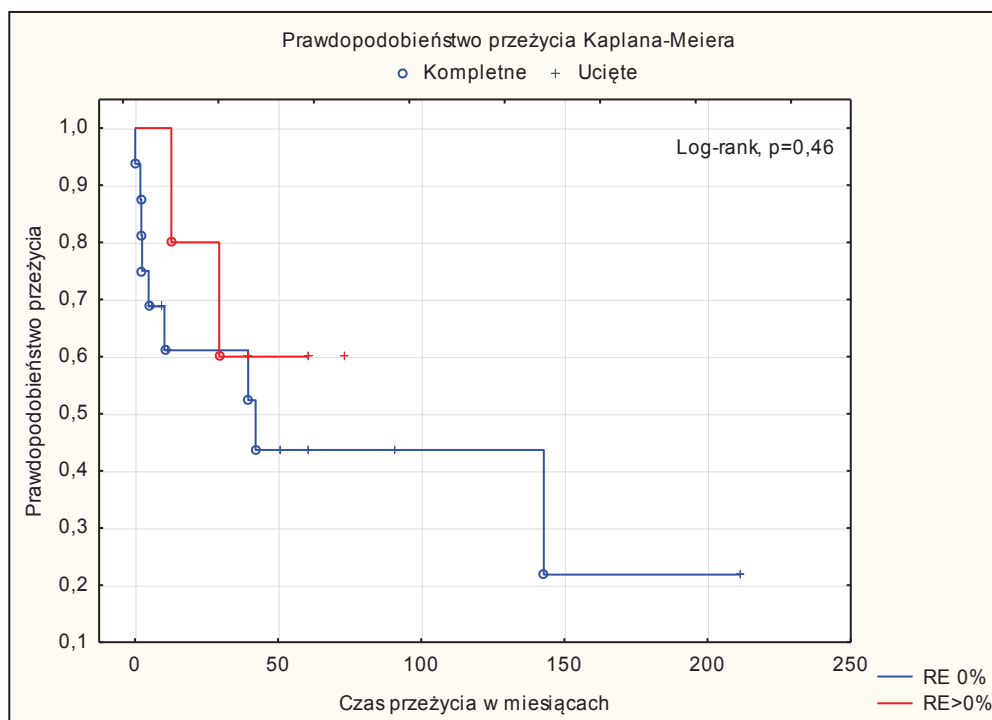
## 6.5. Ocena rokowniczego znaczenia ocenianych receptorów dla raka kory nadnercza.

W chwili zamknięcia bazy danych (kwiecień 2015r.) spośród ogółu 27 badanych z rakiem kory nadnercza żyło 10 pacjentów (37%). Mediana okresu przeżycia dla chorych z rakiem kory nadnercza wynosiła 39,5 miesiąca. W analizie uwzględniano badanych, u których znana była data ostatniej obserwacji u żyjących lub data zgonu. Do analizy przeżycia włączono 21 pacjentów (ryc. 23).



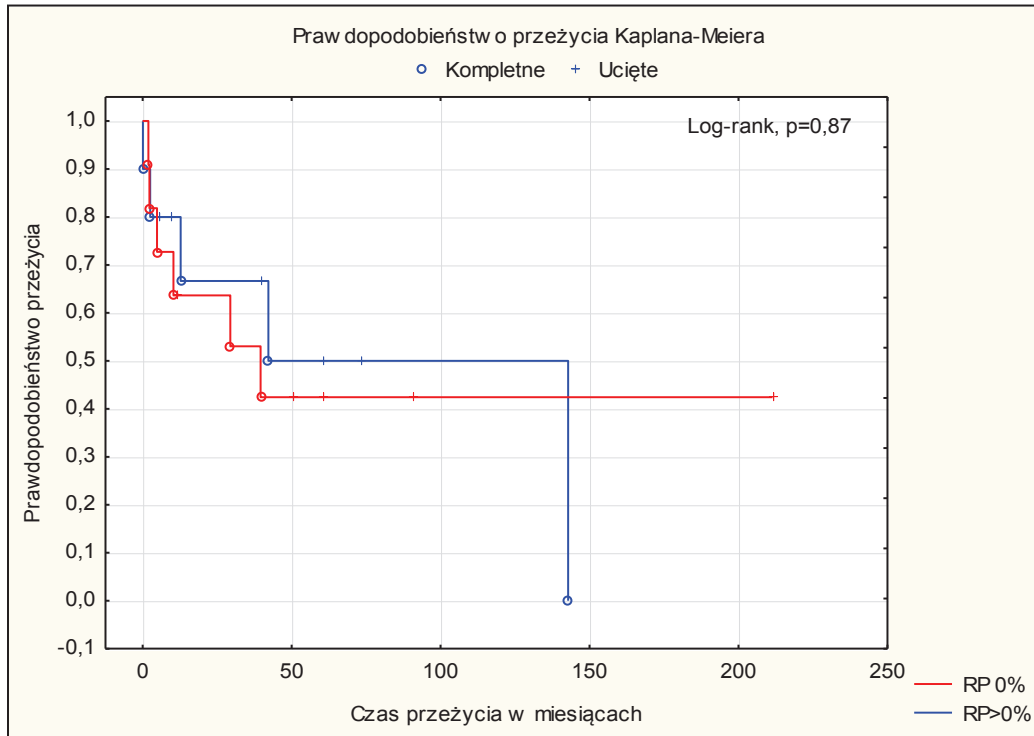
Ryc. 23. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza (N=21).

Nie stwierdzono istotnej różnicy w przeżyciu pacjentów z guzami aktywnymi hormonalnie w porównaniu do badanych nie wykazujących aktywności hormonalnej. Ze względu na fakt, iż wszyscy chorzy wykazujący aktywność hormonalną cechowali się hiperkortyzolemią, można stwierdzić, że hiperkortyzolemia nie wpływała w znaczący sposób na przeżycie chorych z rakiem nadnercza.

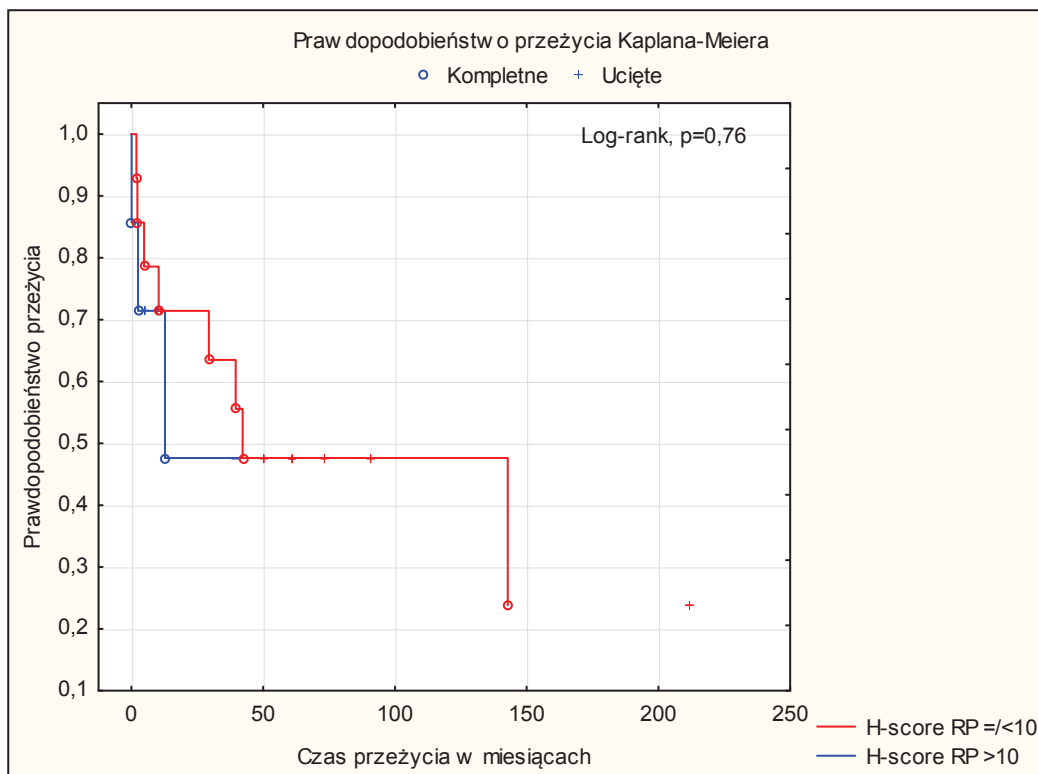


Ryc. 24. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z ujemną RE (0%) oraz dodatnią ekspresją receptora estrogenowego RE (>0%) (N=21).

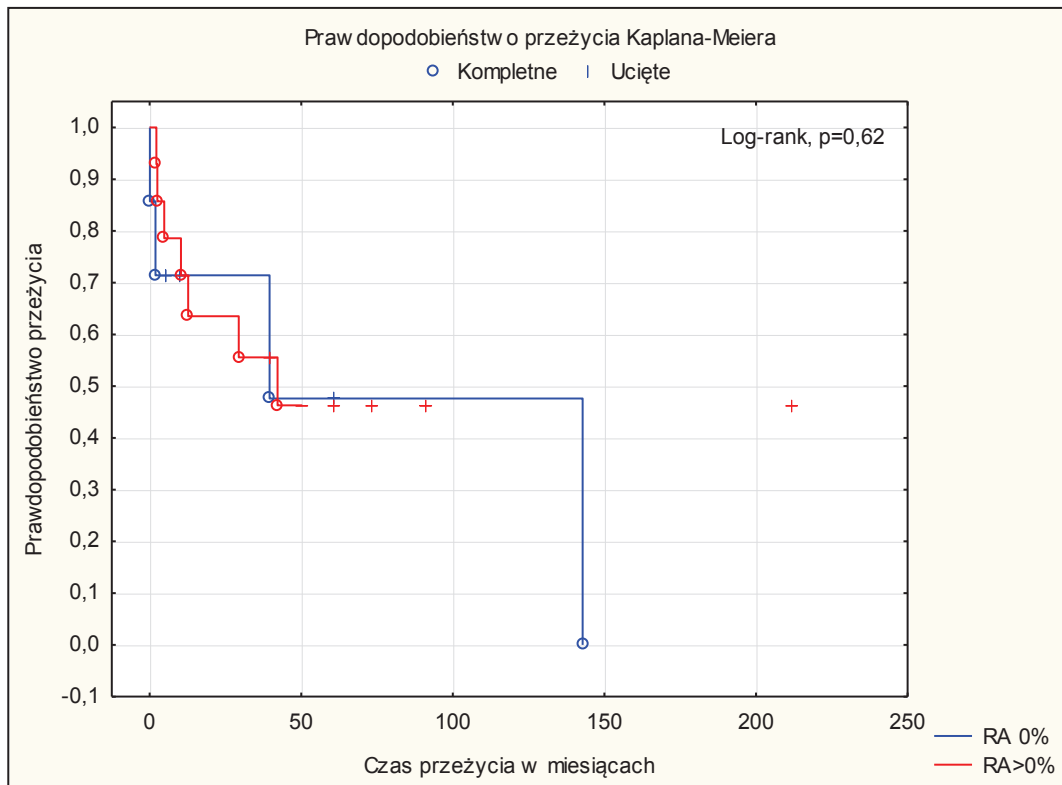
Z uwagi na zbyt małą liczebność grupy pacjentów z punktem odcięcia dla wartości  $10 < \text{H-score RE} < 10$  nie wykonano wykresu dla tej grupy badanych.



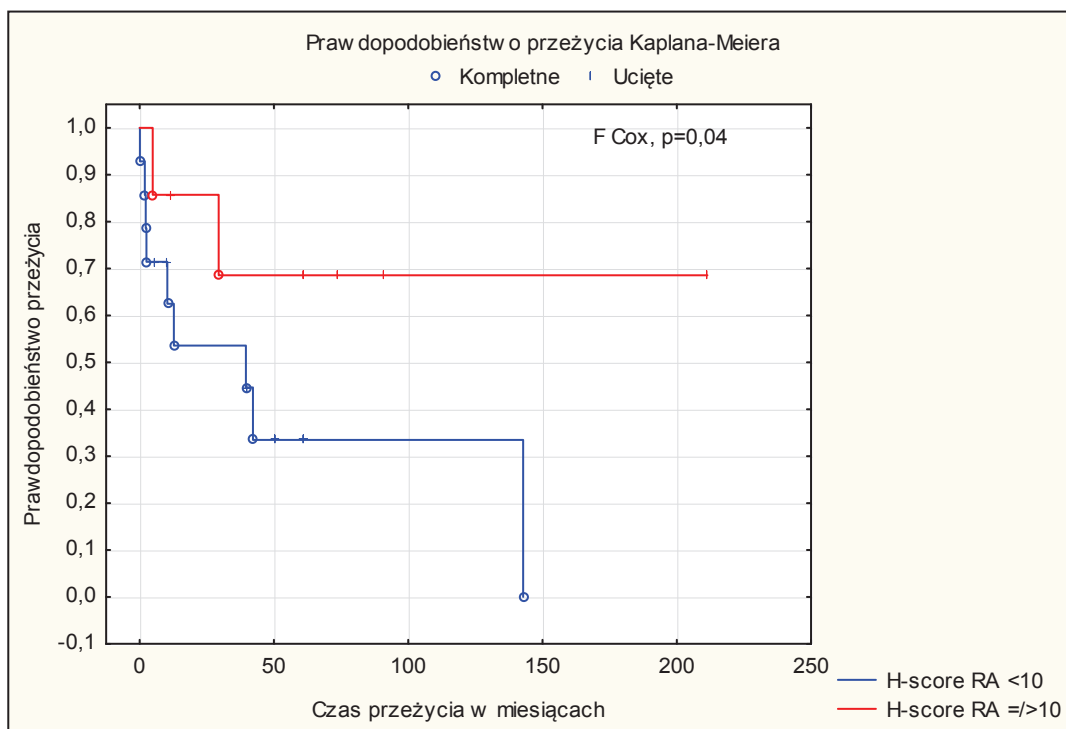
Ryc. 25. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z ujemną RP (0%) oraz dodatnią RP (>0%) ekspresją receptora progesteronowego (N=21).



Ryc. 26. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z wartościami  $10 < H\text{-score} < 10$  dla receptora progesteronowego (N=21).



Ryc. 27. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z ujemną RA (0%) oraz dodatnią RA (>0%) ekspresją receptora androgenowego (N=21).



Ryc. 28. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z wartościami  $10 < H\text{-score} \leq 10$  dla receptora androgenowego (RA) (N=21).

Analiza jednoczynnikowa dotyczyła oceny ekspresji poszczególnych receptorów RE, RP i RA na całkowity czas przeżycia w grupie badanych z rakiem kory nadnercza. Jedynie w przypadku receptora androgenowego, dla punktu odcięcia H-score (<10)/(≥10), stwierdzono znamienne wpływy na rokowanie ( $p=0,04$ , ryc. 28).

### 6.6. Wieloczynnikowa analiza Coxa dla raka kory nadnercza

W analizie uwzględniano badanych, u których znana była data ostatniej obserwacji u żyjących lub data zgonu. Jako punkt odcięcia receptorów wybrano kryterium 0% vs >0%. W analizie nie uwzględniono wielkości guza (<5cm vs ≥5cm), ponieważ tylko w przypadku 11,1% (3 przypadki) chorych z rakiem kory nadnercza w chwili zabiegu operacyjnego guza był mniejszy niż 5cm. Większość 88,9% (24 przypadki) guzów znajdowała się w przedziale powyżej 5cm. Żadna z rozpatrywanych w analizie wieloczynnikowej cech nie ma znaczenia rokowniczego ( $p>0,05$  w każdym z przypadków).

**Tab. 21.** Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a, obejmująca wpływ cech klinicznych chorych na czas przeżycia u chorych z rakiem kory nadnercza (N=21).

	Całkowity czas przeżycia		
	p	WR	95%ZU
Wiek	0,21	1,11	0,93-1,33
Płeć	0,64	0,42	0,01-14,89
Hiperkortyzolemia	0,22	0,18	0,01-2,82
Receptor estrogenowy	0,1	0,02	0,00
Receptor progesteronowy	0,78	1,0	0,97-1,03
Receptor androgenowy	0,73	1,03	0,85-1,24

WR - współczynnik ryzyka  
ZU - 95% zakres ufności

## 7. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny klinicznego znaczenia ekspresji receptorów estrogenowych (RE), progesteronowych (RP) i androgenowych (RA) u chorych poddanych leczniczemu zabiegowi operacyjnemu z powodu raka kory nadnercza. Dla lepszego porównania włączono do badania grupę kontrolną gruczolaków nadnercza. Dodatkowo wzbogacono pracę o ocenę ekspresji powyższych receptorów w poszczególnych warstwach kory zdrowych nadnerczy, ponieważ do tej pory nie oceniano w jednym badaniu występowania receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz androgenowych w zdrowych ludzkich nadnerczach. Każdy z receptorów był oceniany we wszystkich grupach chorych. W przypadku raków i gruczolaków oceniono także zależność pomiędzy obecnością receptorów a wybranymi cechami klinicznymi. Natomiast wyłącznie w przypadku raków oceniono wartość rokowniczą wszystkich trzech typów receptorów, wykonując analizę jedno- i wieloczynnikową.

Występowanie RE, RP oraz RA ma miejsce w prawidłowych tkankach organizmu ludzkiego. W zależności od narządu oraz płci ich ilość jest zróżnicowana. W warunkach patologii może dochodzić do zaburzeń zarówno ilościowych, jak i jakościowych wyżej wymienionych receptorów, a także do zmian w proporcjach pomiędzy poszczególnymi izoformami. Obecność lub brak ekspresji receptorów wiąże się z różną dynamiką nowotworów oraz ma wpływ na wybór odpowiedniej terapii, a także rokowanie chorych. Dlatego istotne jest poznanie zarówno fizjologicznego występowania receptorów, jak i oceny ich ekspresji w warunkach patologicznych, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezy nowotworowo zmienionej tkanki kory nadnercza.

### *Receptor estrogenowy*

Obecność RE stwierdzono m.in. w komórkach: jajnika, macicy, gruczołu sutkowego, najądrzy, jąder, nerek, nadnerczy, podwzgórza oraz przysadki mózgowej, a także w gruczole krokowym, pęcherzu moczowym, płucach, wątrobie i układzie krwionośnym [25-29]. Obecność RE w komórkach nowotworowych ma miejsce w wielu nowotworach. Sztandarowym przykładem jest rak piersi oraz nowotwory narządu rodno u kobiet, gdzie obecność lub brak receptora RE decyduje o wyborze metody leczenia chorych [34]. Ponadto obecność ER i PR rokuję lepiej w tej grupie chorych [108] (tab. 22). Z kolei w badaniach dotyczących raka prostaty zauważono, że wraz ze wzrostem ekspresji receptora RE $\alpha$  wzrasta stopień złośliwości histologicznej guza [40, 44] (tab. 22). Jednocześnie RE $\beta$ , zdaje się mieć hamujący wpływ na rozwój nowotworu [45]. Wiadomo również, że estrogeny mają swój udział

w rozwoju oraz progresji niedrobnokomórkowego raka płuca, w szczególności po związaniu z RE $\beta$  [52]. Dodatkowo wnioskowano, iż obecność receptora estrogenowego ma negatywny wpływ na rokowanie pacjentów z gruczolakorakiem płuca. Ilość publikacji dotycząca obecności RE w komórkach raka kory nadnercza jest skąpa i zwykle obejmuje niewielką ilość przypadków (najliczniejsza grupa liczyła 17 przypadków raka kory nadnercza [109]). Istnieją pojedyncze publikacje dotyczące obecności RE $\alpha$  oraz RE $\alpha$  i RE $\beta$  w raku kory nadnercza [56, 88] (tab. 22). W powyższych doniesieniach obecność receptora estrogenowego stwierdzano zarówno w prawidłowych nadnerczach gruczolakach oraz w raku kory nadnercza. W pracy Shen i wsp., w której wśród 17 badanych przypadków raka kory nadnercza wykryto obecność RE w 8 przypadkach (47%). W pracy de Cremoux i wsp. badano obecność RE w zdrowych nadnerczach, gruczolakach i 12 przypadkach raka kory nadnercza. Obecność RE $\beta$  wykryto w 83% przypadków raka kory nadnercza [88]. Poziom RE $\alpha$  natomiast był niski we wszystkich przypadkach: zdrowych, gruczolaków oraz raków nadnercza. W pracy Barzon i wsp. stwierdzono, że ekspresja RE ma miejsce głównie w warstwie kłębkowatej i pasmowatej nadnerczy [56]. Przy czym zauważono, iż dominującym typem we wszystkich badanych grupach nadnerczy był ER $\beta$ . W przypadku raka kory nadnercza obecność RE $\beta$  wykazano u 65% badanych. Ponadto w porównaniu do zdrowych nadnerczy i gruczolaków rak kory nadnercza charakteryzował się znacznie wyższym stosunkiem RE $\alpha$ /RE $\beta$  oraz wyższym poziomem aromatazy. Sugerowałoby to, iż lokalna produkcja aromatazy mogłaby przyczynić się do wzmożonej proliferacji komórkowej komórek raka kory nadnercza np. w drodze mechanizmu auto/parakrynnego. Ponadto stwierdzono lepsze rokowanie dla grupy RE (+) ( $p < 0,05$ ) niż w przypadku grupy bez ekspresji RE [109]. Wyniki te mogą sugerować, iż korzystniejsza jest obecność izoformy  $\beta$  RE. Powyższe wyniki są jednak rozbieżne. Brak standaryzacji w ocenie RE w przypadku raka kory nadnercza oraz stosowanie przeciwciał różnych producentów do oceny RE mogą wpływać na różnicę w wynikach. Ponadto stosowano różne kryteria oceny ekspresji RE. W przypadku pracy de Cremoux podano informacje o wykorzystaniu metody i odczynników analogicznie jak w przypadku raka piersi. Natomiast w pracy Barzon i wsp. kryterium pozytywnej detekcji przyjęto na poziomie  $\geq 0\%$  dodatnio wybarwionych jąder komórkowych, a w pracy Shen dodatnia ekspresja dotyczyła  $> 5\%$  pozytywnie wybarwionych jąder komórkowych. W niniejszym badaniu zdecydowano się na oznaczanie RE $\alpha$  z uwagi zarówno na sytuację finansową, jak również mniejszą ilość publikacji dotyczących oznaczeń izoformy  $\alpha$  RE. Oznaczenie RE $\beta$  jest obecnie wykonywane do publikacji. Wszystkie oznaczenia RE w niniejszej pracy dotyczą izoformy RE $\alpha$ .



Obecność receptora estrogenowego stwierdzono we wszystkich warstwach prawidłowych nadnerczy, przy czym warstwa kłębkowata stanowiła największy odsetek (85%). Kolejno w warstwie pasmowatej i siatkowatej odsetek ten wynosił: 35% i 18%. Są to wyniki zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Barzon i wsp. RE stwierdzono również u 6,1% przypadków gruczolaków oraz 18,5% raków nadnercza, co oznacza, iż RE estrogenowy występuje trzy razy częściej w przypadku RKN niż gruczolaka. Wyniki dotyczące pozytywnej ekspresji RE dla przypadków raka kory nadnercza nie pokrywają się z zakresami podawanymi w powyższych przykładach piśmiennictwa. Może wynikać to z faktu, iż badano jedynie ekspresję RE $\alpha$ , jak również dlatego, że przyjęto różne punkty odcięcia dla pozytywnej oceny obecności RE. Natomiast podobnie jak w pracy Barzon i wsp. stwierdzono największy odsetek ekspresji RE w warstwie kłębkowatej zdrowego nadnercza [56]. Nie potwierdzono jednak związku obecności RE z rokowaniem u chorych z rakiem kory nadnercza w przeciwieństwie do pracy Shen i wsp. [109]. Ponadto nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem RE, a cechami klinicznymi badanych chorych. Wykazano natomiast, że pacjenci wykazujący ekspresję RE są młodszy niż badani bez jego ekspresji. Pomimo, iż większość zachorowań dotyczy kobiet nie udało się do tej pory ustalić przyczyny tego faktu. Wysoka częstość zachorowań na nowotwory kory nadnerczy wśród pacjentek z hiperkortyzolemią podczas ciąży mogłaby świadczyć o wrażliwości nowotworów nadnerczy na żeńskie hormony [110]. Co ciekawe w pracy Barzon i wsp. przeprowadzano terapię z użyciem estrogenów na linii komórkowej NCI-H295R raka kory nadnercza i stwierdzono wzrost proliferacji komórkowej. Natomiast w badaniu Montanaro i wsp. z 2005r. stwierdzono hamowanie proliferacji tej samej linii komórkowej po podaniu tamoksyfenu (antyestrogen) [111]. Ze względu na fakt, iż w jednej pracy badano wpływ receptora estrogenowego na rokowanie pacjentów, a dwie wykazały związek z pomiędzy estrogenami a proliferacją komórkową linii komórkowej RKN nadal nie można jednoznacznie przesądzić o roli RE w patogenezie raka kory nadnercza. Ilość badań dotyczących ekspresji receptora estrogenowego w raku kory nadnercza jest skąpa. Najczęściej obejmują one niewielką ilość przypadków z uwagi na rzadkość nowotworu. Z pewnością konieczne są badania wielośrodkowe, które obejmowałyby większą ilość przypadków. Ponadto wydaje się zasadnym ujednoczenie metody oznaczania RE. Dodatkowo wykorzystanie linii komórkowej NCI-H295R stwarza możliwość przeprowadzania badań molekularnych oraz badań z zastosowaniem terapii lekowych w warunkach in vitro.

### *Receptor progesteronowy*

Obecność receptora progesteronowego potwierdzono w wielu tkankach m.in.: macicy, gruczole sutkowym, mózgowiu, trzustce, kośćcu, jajników, jąder oraz układu moczowego [71, 72, 73]. W opublikowanych badaniach nadekspresja RP-B dla nowotworów korelowała ze stopniem złośliwości dla raka endometrium oraz raka nabłonkowego jajnika, natomiast niedobór RP-A występował w rakach przewodowych gruczołu sutkowego [78, 79]. Istnieją także publikacje dotyczące możliwego udziału receptora progesteronowego w progresji raka prostaty [86, 87] (tab. 22). Według wiedzy autorki istnieje jedna publikacja dotycząca ekspresji RP w raku kory nadnercza u ludzi. Wcześniej badano obecność RP w zdrowych nadnerczach u małp, gdzie nie potwierdzono obecności RP [112]. W pracy de Cremoux i wsp. badano obecność RP w zdrowych nadnerczach, gruczolakach i 12 przypadkach raka kory nadnercza. Wykazano w niej, iż RP jest obecny zarówno w komórkach zdrowych nadnerczy jak i w guzach, przy czym wyższą ekspresją cechowały się guzy nadnercza, a najwyższa ekspresja dotyczyła raków [88] (tab. 22).

W niniejszym badaniu największą ekspresję RP stwierdzono w warstwie kłębkowatej oraz pasmowatej kory nadnercza, a następnie siatkowatej, która wynosiła odpowiednio 90%, 89,5% i 40%. W badanej grupie gruczolaków receptor progesteronowy stwierdzono w 24 przypadkach (49%), a w przypadku raka kory nadnercza w 13 przypadkach (48%). Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem receptora progesteronowego, a cechami klinicznymi badanych chorych. Nie stwierdzono także wpływu na rokowanie u pacjentów z rakiem kory nadnercza. Skąpa ilość badań oraz publikacji na temat obecności receptora progesteronowego w tym nowotworze sprawia, iż funkcja RP w jego patogenezie nadal pozostaje niejasna. Można by podjąć próbę analizy współwystępowania RE i RP w raku kory nadnercza. Jednak wymagałoby to większej grupy badanych. Warto także zadać pytanie o podłoże mechanizmu działania receptorów progesteronowych w komórkach nadnerczy i ich potencjalnej roli w procesie nowotworzenia.

### *Receptor androgenowy*

W piśmiennictwie można znaleźć dowody na obecność receptorów androgenowych w komórkach układu rozrodczego i moczowego u kobiet oraz mężczyzn, w komórkach fibroblastów, w komórkach gruczołów potowych i włosów, komórkach przewodu pokarmowego i wątroby, tętnicach i tętniczkach, osteoblastach, a także w korze nadnercza [97,

98, 99, 112]. Powszechnie uznany jest związek RA z rakiem prostaty [100]. Wzrosło również zainteresowanie RA wśród naukowców badających raka piersi, szczególnie szukających nowych metod terapeutycznych u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi (TNBC) [101, 102]. Dodatkowo stwierdzono, iż jednoczesna obecność u badanych RE $\alpha$  oraz RA rokuje gorzej [101] (tab. 22). Również badany jest wpływ RA na rozwój raka jajnika, gdzie zauważono, iż komórki nabłonkowe jajnika w reakcji na pobudzenie RA reagują zwiększoną proliferacją i opóźnieniem procesu apoptozy [104, 105].

W niniejszym badaniu ekspresję RA stwierdzono w warstwie kłębkowatej, pasmowatej i siatkowatej kory nadnercza, gdzie odpowiednio był dodatni w 70%, 55% i 30% przypadków. W badanej grupie gruczolaków receptor androgenowy stwierdzono w 42 przypadkach (85,7%), a w przypadku raków był obecny w 15 przypadkach (55,6%). Ekspresja RA występuje częściej w przypadku zdrowych nadnerczy (w warstwie kłębkowatej) oraz gruczolakach, różnicując je od raka kory nadnercza. Receptor androgenowy występował częściej u badanych z gruczolakiem nadnercza niż u chorych z rakiem odpowiednio: (85,7%) vs (55,6%). Jak również więcej wyników z H-score  $\geq 10$  wystąpiło u badanych z gruczolakiem nadnercza w stosunku do badanych z rakiem odpowiednio: (65,3%) vs (25,9%).

Stwierdzono również związek obecności receptora androgenowego z wielkością guza ( $p=0,02$ ) dla punktu odcięcia H-score RA ( $<10$ )/( $\geq 10$ ). Dodatkowo różnica w wielkości guza pomiędzy gruczolakami i rakami była istotna statystycznie ( $p<0,001$ ). Wśród raków przeważały guzy  $\geq 5$ cm w stosunku do gruczolaków podobnej wielkości odpowiednio 88,9% i 30,6%. Podobne wyniki dotyczące wielkości guzów można znaleźć w dostępnym piśmiennictwie. Poza wielkością guza istotne są także cechy radiologiczne takie jak: obecność ognisk martwicy, gęstość tkankowa czy reakcja na podanie kontrastu, które pozwalają na różnicowanie zmian łagodnych i złośliwych [16]. W niniejszym badaniu stwierdzono także różnice w ekspresji RA pomiędzy gruczolakami i rakami kory nadnercza dla dwóch punktów odcięcia: RA (0%)/( $>0\%$ ) ( $p=0,005$ ) oraz H-score RA ( $<10$ )/( $\geq 10$ ) ( $p=0,001$ ). W tych przypadkach ekspresja RA była większa dla gruczolaków w stosunku do raków dla punktów odcięcia RA (0%)/( $>0\%$ ) oraz H-score RA ( $<10$ )/( $\geq 10$ ) odpowiednio: 85,7% vs 55,6% oraz 65,3% vs 25,9%.

Średni wiek badanych z wielkością guza  $<5$ cm i  $\geq 5$ cm wynosił odpowiednio 63 lat i 47 lata. Może mieć to związek z większą dynamiką wzrostu i zdolnością proliferacji patologicznych komórek u młodszych pacjentów. W konsekwencji guzy szybciej stają się objawowe i chorzy są wcześniej operowani.

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć informacje o obecności RA w komórkach zdrowych nadnerczy, gruczolakach nadnercza oraz linii komórkowej raka kory nadnercza NCI-H295 [112, 113]. Jednak ilość publikacji jest bardzo ograniczona. Interesujące są badania przeprowadzone przez Rossi i wsp., w których badano wpływ dihydrotestosteronu (DHT) na proliferację linii komórkowej NCI-H295 i stwierdzono zredukowanie jej proliferacji. Co więcej po podaniu antyandrogenów uzyskano rewersję tego efektu, co mogłoby świadczyć o bezpośrednim oddziaływaniu androgenów na komórki nadnercza w drodze aktywacji receptora androgenowego. Jednak istnieje także publikacja, w której nie potwierdzono obecności RA w komórkach ludzkich nadnerczy [114]. Różnice w badaniach mogą wynikać zarówno z zastosowania odmiennego typu przeciwciał jak i możliwych różnic w poziomach RA badanych tkanek. Nowotworem, którego patogeneza bezsprzecznie związana z RA jest rak prostaty [100,115] (tab. 22). Wśród wytycznych *European Association of Urology (EAU)* poza leczeniem operacyjnym oraz w zależności od stopnia zaawansowania choroby stosuje się również blokadę androgenową najczęściej tzw. Maksymalną blokadę androgenową, w której skład wchodzi:

-agonista/ antagonist LHRH (np. buserelina/abareliks)

- antyandrogen steroidowy (np. octan cyproteronu/ megestrolu) lub niesteroidowy (np. flutamid, bikalutamid)

Ponadto zastosowanie w terapii znajduje estrogen pod postacią dietylstilbestrolu (*DES*), jednak z uwagi na liczne powikłania sercowo-naczyniowe nie jest lekiem często stosowanym. W przypadku raka prostaty opornego na kastrację trwają poszukiwania nowych opcji terapeutycznych. Zgodnie z wytycznymi EAU, zastosowanie w leczeniu znajduje octan abirateronu (inhibitor CYP17) oraz enzalutamid. W przeciwieństwie do bikalutamidu, enzalutamid cechuje się większym powinowactwem do RA i skuteczniej blokuje transfer receptora do jądra komórkowego. Obydwa terapeutyki zwykle stosuje się po terapii decetaxelem [114]. W trakcie badań są także szczepionki z immunizowanych komórek autologicznych czy terapia czynnikiem stymulującym kolonii granulocytów (*GM-CSF*, *Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor*), a także próby zastosowania terapii genowej.

**Tab. 22.** Wartość rokownicza receptorów RE, RP, RA w wybranych chorobach nowotworowych.

Autor	RE	RP	RA	Nowotwór	Wpływ na całkowity czas przeżycia		Uwagi
					analiza jedno-czynnikowa	analiza wielo-czynnikowa	
Alexieva-Figush i wsp. [108]	+	+		rak piersi	RP (p<0,001)	RE (p=0,02) RP (p=0,04)	najlepsze rokowanie u badanych RE (+) i RP (+)
Bae i wsp. [36]	-/+	+/-			RE (-)PR (+) (p=0,009) RE (+)RP (-) (p=0,001) gorsze rokowanie	RE (-)RP (+) RE (+)RP (-) hazard ratio= 4.79 gorsze rokowanie	u badanych z jednym pozytywnym receptorem (przy tym również HER2-) rokowanie jest gorsze niż u RE (+) i RP (+), a zbliżone do rokowania pacjentek z TNBC
Peters i wsp. [101]	+		+		nie podano	RA (+) REα (+) gorsze rokowanie (p=0,002)	4,6 x wyższe ryzyko zgonu i u badanych REα (+) i RA (+)
Bonkoff i wsp. [40]	+			rak prostaty	nie badano	RE (+) gorsze rokowanie (p<0,001)	RE α korelował pozytywnie ze skalą Gleasona, przy
Grindstad i wsp. [87]		+			RP (+) gorsze (p=0,006)	RP(+) gorsze (p=0,012)	RP - niezależny czynnik prognostyczny gorzej rokujący
Pertschuk i wsp. [115]			+		nie podano	AR (+) lepsze (p=0,02)	pozytywna korelacja z odpowiedzią na leczenie hormonalne (p=0,03)
de Cremoux i wsp. [88]	+	+		rak kory nadnercza	nie badano	nie badano	badano 12 RKN poziom REβ (+) (83% przypadków) wyższy niż REα RP (+)
Shen i wsp. [109]	+				RE(+) lepsze rokowanie (p=0,0032)	RE(+) lepsze rokowanie (p=0,02)	badano 17 RKN RE(+) korelowały z wcześniejszym stadiem zaawansowania
Barzon i wsp. [56]	+		+		nie badano	nie badano	badano 16 RKN REβ niski i REα wysoki RA wysoki

Jak dotąd terapia chorych z rakiem kory nadnercza nie jest zadowalająca, a rokowanie pacjentów jest niepomysłne. Trwają równoległe badania pogłębiające wiedzę o molekularnych zaburzeniach w raku kory nadnercza. Analiza obecności receptorów hormonalnych w raku kory nadnercza stanowi ważny aspekt poznawczy. Jakkolwiek większość z analizowanych parametrów nie wpływa na rokowanie w badanej grupie chorych, wyniki niniejszej pracy mogą stanowić pewien krok na drodze do lepszego zrozumienia patofizjologii omawianego nowotworu. Można zadać pytanie, w którym momencie oraz w jakim mechanizmie dochodzi do zmiany w ekspresji receptorów hormonalnych w trakcie transformacji nowotworowej. Ponadto zauważono, że wielkość guza  $\geq 5$ cm cechuje zwykle młodszą grupę pacjentów. Może

mieć to związek z większą złośliwością zmiany i większą dynamiką rozwoju nowotworu. Najciekawsze wyniki dotyczyły wpływu RA na rokowanie pacjentów z RKN, gdzie obecność RA pozytywnie korelowała z czasem przeżycia w tej grupie chorych. Zapewne badania dotyczące RA w zdrowych i patologicznie zmienionych nadnerczach zasługują na szczególną uwagę, chociażby z uwagi na to, że mogą stanowić podłoże do wzbogacenia terapii raka kory nadnercza o leczenie hormonalne. Pomimo tego, iż jest to największa do tej pory grupa chorych z rakiem kory nadnercza (27), w której badano obecność receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych, nadal potrzebne są badania wielośrodkowe obejmujące większą liczbę przypadków. Praca została wzbogacona nie tylko o grupę gruczolaków nadnercza, ale także o zdrowe nadnercza. W przypadku tych ostatnich istnieje niewielka ilość badań oceniająca wszystkie omawiane w tej pracy receptory. Jest to pierwsza praca na świecie, oceniająca zarówno obecność RE $\alpha$ , RP i AR, jak również ich wpływu na rokowanie u pacjentów z rakiem kory nadnercza, w całości wykonana na materiale polskim. Ponadto jest to także pierwsza praca, w której wykazano pozytywną wartość rokowniczą dla obecności receptora androgenowego. W przyszłości być może będzie możliwe wyselekcjonowanie odpowiedniej grupy chorych, którzy odnieśliby korzyści z zastosowanej terapii hormonalnej.

## 8. WNIOSKI

1. W zdrowym nadnerczu receptor estrogenowy alfa i androgenowy występuje głównie w warstwie kłębkowatej nadnercza, natomiast receptor progesteronowy występuje zarówno w warstwie kłębkowatej, jak i pasmowatej.
2. Receptor estrogenowy alfa występuje trzy razy częściej w raku kory nadnercza w porównaniu do zmian łagodnych, jakkolwiek ogólna ilość dodatnich przypadków nie przekracza 20%. Receptor progesteronowy występuje w podobnym odsetku zarówno w gruczolakach, jak i nowotworach złośliwych nadnercza. Receptor androgenowy występuje w większości guzów łagodnych, natomiast w rakach kory nadnercza obserwowany jest w połowie przypadków.
3. Obecność receptorów estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego nie wiąże się ani z cechami klinicznymi, ani demograficznymi w grupie chorych operowanych z powodu guza nadnercza. Jakkolwiek średnia wieku w grupie chorych z rakiem kory nadnercza, która wykazywała obecność RE bądź RA jest niższa w porównaniu do przypadków negatywnych, sugerując związek pomiędzy ich obecnością a wiekiem chorych.
4. W grupie chorych z rakiem kory nadnercza wielkość guza koreluje negatywnie z wiekiem chorych wskazując, że nowotwór w przypadku młodszych chorych był bardziej agresywny. Ze względu na niską liczebność chorych z guzami <5cm konieczne są dalsze badania na większym materiale, aby ocenić tę korelację w wieloczynnikowej analizie Cox'a.
5. Obecność receptora androgenowego wiąże się z lepszym przeżyciem w grupie chorych poddanych leczniczemu zabiegowi operacyjnemu z powodu raka kory nadnercza. Wydaje się, że obecność receptora estrogenowego czy progesteronowego nie ma znaczenia rokowniczego w tej grupie chorych. Ze względu na niską liczebność badanej grupy, wyniki wymagają dalszej oceny na większym materiale klinicznym.



## 9. STRESZCZENIE

Celem badania było określenie klinicznego znaczenia obecności receptora estrogenowego alfa (RE $\alpha$ ), progesteronowego (RP) i androgenowego (RA) u chorych operowanych z powodu gruczolaka (N=49) i raka kory nadnercza (RKN) (N=27). Oceniono również 20 zdrowych nadnerczy (ZN), pochodzących od chorych operowanych z powodu raka nerki. Baza danych zawierała informacje dotyczące wieku, płci, rozpoznania histopatologicznego, wielkości i aktywności hormonalnej guza, całkowitego czasu przeżycia, oraz obecności receptorów RE $\alpha$ , RP i RA. Jądrową ekspresję receptorów oceniono immunohistochemicznie przy użyciu przeciwciał monoklonalnych z firmy DAKO, POLSKA (EP1, PgR 636, AR44), wyrażając wynik w skali Allred, Remelle oraz H-score.

RE $\alpha$  i RA występował głównie w warstwie kłębkowatej ZN i był obecny odpowiednio u 85% i 55% badanych. RP występował zarówno w warstwie kłębkowatej i pasmowatej odpowiednio u 90% i 85% badanych. RE $\alpha$  występował trzy razy częściej w RKN niż w zmianach łagodnych ( $p=0,10$ ), jakkolwiek ogólna ilość dodatnich przypadków nie przekraczała 20%. RP występował w podobnym odsetku zmian łagodnych i złośliwych ( $p=0,94$ ). RA występował w większości gruczolaków, natomiast w RKN - w połowie przypadków ( $p=0,005$ ).

Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem analizowanych receptorów a cechami demograficznymi i klinicznymi chorych. Jakkolwiek średnia wieku u pacjentów z RKN była niższa u chorych z pozytywną ekspresją RE $\alpha$  ( $p=0,03$ ) i RA ( $p=0,04$ ). Dodatkowo, wiek chorych korelował negatywnie z wielkością guza wskazując, że nowotwór w przypadku młodszych chorych był bardziej agresywny.

W analizie jednoczynnikowej ekspresja RA miała korzystny wpływ na całkowity czas przeżycia chorych z rakiem kory nadnercza ( $p=0,04$ ), natomiast w przypadku RE $\alpha$  i RP nie stwierdzono istotnej zależności. Wyniki przedstawionych badań mogą w przyszłości pomóc w wyselekcjonowaniu chorych, którzy odnieśliby korzyści z zastosowanej terapii hormonalnej, jakkolwiek wymagają ponownej oceny na większym materiale, szczególnie z kontekście wartości rokowniczej i predykcyjnej analizowanych receptorów. Jest to pierwsza praca na świecie (dodatkowo wykonana na materiale polskim) równocześnie oceniająca obecność RE $\alpha$ , RP i AR w zdrowych nadnerczach jak również w guzach nadnercza. Unikalna jest również analiza wartości rokowniczej tych receptorów w RKN.

## 9.1 SUMMARY

### **The clinical value of estrogen alfa, progesterone and androgen receptor in in adrenocortical cancer patients**

The aim of this study was to assess the clinical value of expression of estrogen alpha ( $ER\alpha$ ), progesterone (PR) and androgen (AR) receptor in the group of patients treated surgically for adrenocortical adenoma (ACA) (N=49) and cancer (ACC) (N=27). 20 normal adrenal glands, obtained during surgical intervention for renal carcinomas, were also examined. The patient database included age, gender, histology, tumour size, hormonal activity, overall survival and expression of  $ER\alpha$ , PR and AR. Nuclear expression of receptors was assessed immunohistochemically with the use of monoclonal antibodies (EP1, PgR 636, AR441, DAKO POLAND). The samples were scored according to Allred, Remelle and H-score system.

Normal adrenal glands exhibited  $ER\alpha$  and AR expression predominantly in zona glomerulosa (85% vs 55% of cases, respectively). PR was expressed in both zona glomerulosa and zona fasciculata (90% vs 85% of cases, respectively). Even though the occurrence of  $ER\alpha$  was three times higher in ACA than in ACC ( $p=0.10$ ), the overall number of positive ACA cases did not exceed 20%. The number of PR positive cases was in similar in ACA and ACC ( $p=0.94$ ). AR was found in most of ACA cases but only in about a half of ACC cases ( $p=0.005$ ).

There was no relationship between the presence of  $ER\alpha$ , PR, AR and neither clinical nor demographical features of patients with adrenal tumors. However, the mean age of ACC patients with positive either ER or AR expression was lower in comparison to negative cases ( $p=0.03$  vs  $p=0.04$ , respectively). There was a negative correlation between patients' age and the tumour size, suggesting that the tumors were more aggressive in younger patients. In univariate analysis a presence of AR (but not ER or PR) positively impacted overall survival in ACC patients ( $p=0.04$ ).

This is the first report of simultaneous analysis of  $ER\alpha$ , PR and AR in normal adrenals, ACA and ACC (including exclusively polish cohort). Because the positive prognostic value of AR expression in ACC has never been reported, the study needs to be repeated in a larger group of ACC patients, specifically focusing on the predictive and prognostic value of analyzed marker. If confirmed, in the future those results can help to select ACC patients who may benefit from anti-androgen treatment.

## Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

ACA	gruczolak nadnercza ( <i>adrenocortical adenoma</i> )
AF-1	miejsce aktywacji transkrypcji 1 ( <i>activation function 1</i> )
AF-2	miejsce aktywacji transkrypcji 2 ( <i>activation function 2</i> )
DBD	domena wiążąca DNA ( <i>DNA binding domain</i> )
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHT	dihydrotestosteron
E2	estradiol
HU	jednostki Hounsfielda ( <i>Hounsfield Units</i> )
IHC	immunohistochemia ( <i>immunohistochemistry</i> )
LHRH	lutiberyna ( <i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i> )
MRI	tomografia rezonansu magnetycznego ( <i>magnetic rezonans imaging</i> )
NDKRP	niedrobnokomórkowy rak płuca ( ang. NSCLC <i>non- small cell lung cancer</i> )
NLS	sygnał lokalizacji jądrowej ( <i>nuclear localisation signal</i> )
RA/AR	receptor androgenowy ( <i>androgen receptor</i> )
RE/ER	receptor estrogenowy ( <i>estrogen receptor</i> )
RP/PR	receptor progesteronowy ( <i>progesterone receptor</i> )
RKN/ACC	rak kory nadercza ( <i>adrenocortical cancer</i> )
TK	tomografia komputerowa
RT-PCR	PCR w czasie rzeczywistym ( <i>real time PCR (polymerase chain reaction)</i> )
TMA	mikromacierze tkankowe ( <i>tissue microarrays</i> )
TNBC	potrójnie ujemny rak piersi ( <i>triple negative breast cancer</i> )
TTE	testosteron
ZN/normal	zdrowe nadnercza ( <i>normal adrenal gland</i> )

## Ryciny

- Ryc. 1. Obraz Tomografii Komputerowej przedstawiający guz nadnercza lewego.
- Ryc. 2. Odszczepienie bocznego łańcucha cholesterolu oraz strukturalna budowa chemiczna hormonów: estradiolu, testosteronu, kortyzolu i progesteronu.
- Ryc. 3. Budowa histologiczna prawidłowego nadnercza z podziałem na warstwy.
- Ryc. 4. Schemat przedstawiający budowę receptora estrogenowego.
- Ryc. 5. Wzór strukturalny progesteronu.
- Ryc. 6. Schemat przemian hormonów steroidowych.
- Ryc. 7. Wzór strukturalny testosteronu.
- Ryc. 8. Wykres ramka-wąsy przedstawiający zależność wielkości guza dla wartości  $\geq 5\text{cm}$  i  $< 5\text{cm}$  od wieku w chwili zabiegu operacyjnego badanych z rakiem kory nadnercza.
- Ryc. 9. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RE) w warstwie k,p,s zdrowych nadnerczy.
- Ryc. 10. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RE) dla gruczolaka i raka kory nadnercza.
- Ryc. 11. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora progesteronowego (RP) w warstwie k,p,s zdrowych nadnerczy.
- Ryc.12. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RP) dla gruczolaka i raka kory nadnercza.
- Ryc.13. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RA) w warstwie k,p,s zdrowych nadnerczy.
- Ryc. 14. Mikrofotografia przedstawiająca dodatni odczyn dla receptora estrogenowego (RA) dla gruczolaka i raka kory nadnercza.
- Ryc. 15. Porównanie średniej wartości H-score dla receptora estrogenowego pomiędzy warstwami zdrowego nadnercza.
- Ryc. 16. Porównanie średniej wartości H-score dla receptora progesteronowego pomiędzy warstwami zdrowego nadnercza.
- Ryc. 17. Porównanie średniej wartości H-score dla receptora androgenowego pomiędzy warstwami zdrowego nadnercza.
- Ryc. 18. Średnia wartość H-score dla receptora estrogenowego (RE) w poszczególnych grupach chorych z rakiem nadnercza, gruczolakiem oraz prawidłowymi nadnerczami.
- Ryc. 19. Średnia wartość H-score dla receptora progesteronowego (RP) w poszczególnych grupach chorych z rakiem nadnercza, gruczolakiem oraz prawidłowymi nadnerczami

- Ryc. 20. Średnia wartość H-score dla receptora androgenowego (RA) w poszczególnych grupach chorych z rakiem nadnercza, gruczolakiem oraz prawidłowymi nadnerczami.
- Ryc. 21. Wykres ramka- wąsy przedstawiający zależność ekspresji receptora estrogenowego od wieku w chwili zabiegu operacyjnego.
- Ryc. 22. Wykres ramka- wąsy przedstawiający zależność ekspresji receptora androgenowego dla H-score > 10 (nie/tak) od wieku w chwili zabiegu operacyjnego.
- Ryc. 23. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza.
- Ryc. 24. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z ujemną RE (0%) oraz dodatnią ekspresją receptora estrogenowego RE (>0%).
- Ryc. 25. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z dodatnią RP (0%) oraz ujemną RP (>0%) ekspresją receptora progesteronowego.
- Ryc. 26. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z wartościami  $10 < \text{H-score} < 10$  dla receptora progesteronowego.
- Ryc. 27. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z ujemną RA (0%) oraz dodatnią RA (>0%) ekspresją receptora androgenowego.
- Ryc. 28. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana- Meiera u chorych z rakiem kory nadnercza z wartościami  $10 < \text{H-score} < 10$  dla receptora androgenowego (RA).

## ***Tabele***

- Tab. 1.** Podział receptorów z uwagi na masę cząsteczkową i lokalizację genu.
- Tab. 2.** Klasyfikacja *European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT)* dla raka kory nadnercza.
- Tab. 3.** Zalecane elementy diagnostyki RKN na podstawie *ENSAT* Maj 2005r.
- Tab. 4.** Rozmieszczenie RE $\alpha$  i RE $\beta$  w układach i narządach.
- Tab. 5.** Schemat skali Allred „Allred score”.
- Tab. 6.** Schemat skali Remelle.
- Tab. 7.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 96 chorych z prawidłowymi nadnerczami, gruczolakami oraz rakami nadnercza.
- Tab. 8.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 20 chorych z prawidłowymi nadnerczami.
- Tab. 9.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 49 chorych z gruczolakiem nadnercza.
- Tab. 10.** Charakterystyka kliniczna badanej grupy 27 chorych z rakiem kory nadnercza
- Tab. 11.** Rodzaje zastosowanych przeciwciał oraz rodzaj systemu detekcyjnego wykorzystane do oceny ekspresji poszczególnych receptorów RE, RP oraz RA.
- Tab.12.** Porównanie zależności rozpoznania histopatologicznego dla chorych z gruczolakiem nadnercza i rakiem nadnercza a cech klinicznych i demograficznych chorych.
- Tab.13.** Występowanie receptorów estrogenowych (RE), progesteronowych (RP) i androgenowych (RA) w zdrowych nadnerczach.
- Tab.14.** Występowanie receptorów estrogenowych (RE), progesteronowych (RP) i androgenowych (RA) u pacjentów z rakiem i gruczolakiem nadnercza.
- Tab. 15.** Korelacja pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego (RE) a płcią w grupie chorych z prawidłowymi nadnerczami.
- Tab. 16.** Korelacja pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego (RP) a płcią w grupie chorych z prawidłowymi nadnerczami.
- Tab. 17.** Korelacja pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego (RA) a płcią w grupie chorych z prawidłowymi nadnerczami.
- Tab. 18.** Występowanie ekspresji receptora estrogenowego (RE) w odniesieniu do cech klinicznych chorych.
- Tab. 19.** Występowanie ekspresji receptora progesteronowego (RP) w odniesieniu do cech klinicznych chorych.
- Tab. 20.** Występowanie ekspresji receptora androgenowego (RA) w odniesieniu do cech klinicznych chorych.

**Tab. 21.** Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a, obejmująca wpływ cech klinicznych chorych na czas przeżycia u chorych z rakiem kory nadnercza.

**Tab. 22.** Wartość rokownicza receptorów RE, RP, RA w wybranych chorobach nowotworowych.



## 11. Piśmiennictwo

1. Stigliano A, Cerquetti L, Sampaoli C, Bucci B, Toscano V. Current and emerging therapeutic options in adrenocortical cancer treatment. *J Oncol.* 2012;2012:408131.
2. Patalano A, Brancato V, Mantero F. Adrenocortical cancer treatment. *Horm Res.* Vol 71 Suppl 1. Switzerland: 2009 S. Karger AG, Basel.; 2009:99-104.
3. Audenet F, Mejean A, Chartier-Kastler E, Roupret M. Adrenal tumours are more predominant in females regardless of their histological subtype: a review. *World J Urol.* Oct 2013;31(5):1037-1043.
4. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* Vol 91. United States2006:2027-2037.
5. Hubalewska-Dydejczyk A, Jabrocka-Hybel A, Pach D, Gilis-Januszewska A, Sokolowski G. Current and future medical therapy, and the molecular features of adrenocortical cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* Vol 7. United Arab Emirates2012:132-145.
6. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol.* Vol 22. United States2004:838-845.
7. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec 2011;96(12):3775-3784.
8. Lafemina J, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma: Past, present, and future. *Journal of Surgical Oncology.* 2012;106(5):586-594.
9. Dworakowska D, Drabarek A, Wenzel I, Babinska A, Swiatkowska-Stodulska R, Sworczak K. Adrenocortical cancer (ACC) - literature overview and own experience. *Endokrynol Pol.* Vol 65. Poland2014:492-512.
10. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* Vol 50. Ireland2004:3-22.
11. Enmark E, Gustafsson JA. Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Mol Endocrinol.* Nov 1996;10(11):1293-1307.
12. Kopij M, Rapak A. [The role of nuclear receptors in cell death]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* Vol 62. Poland2008:571-581.
13. Zielniok K, Gajewska M, Motyl T. [Molecular actions of 17beta-estradiol and progesterone and their relationship with cellular signaling pathways]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* Vol 68. Poland2014:777-792.

14. Online Mendelian Inheritance in man. An online catalog of human genes and genetic disorders updated april 2015.
15. H. Gray, *Anatomy of the Human Body*. 1918 ryc. nr 1185
16. Fassnacht M, Wittekind C, Allolio B. [Current TNM classification systems for adrenocortical carcinoma]. *Pathologe*. Sep 2010;31(5):374-378.
17. Switalska M, Strzadala L. [Non-genomic action of estrogens]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. Vol 61. Poland2007:541-547.
18. Gryniewicz G, Gadzikowska M. Fitoestrogeny jako selektywne modulatory aktywności receptorów estrogenowych. *Post. Fitoter*. Vol1. Poland2003: 28-35.
19. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. Vol 288. United States2002:321-333.
20. R. K. Murray, D. K. Granner, P.A. Mayes i in., *Biochemia Harpera*. Wyd.5, Warszawa 2006 s. 711.
21. R. K. Murray, D. K. Granner, P.A. Mayes i in., *Biochemia Harpera*. Wyd.5, Warszawa 2006 s. 713.
22. Fuller PJ. The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J*. Dec 1991;5(15):3092-3099.
23. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. Feb 15 2003;116(Pt 4):585-586.
24. Kalita K, Lewandowski S, Skrzypczak M, Szymczak S, Tkaczyk M, Kaczmarek L. Receptory estrogenowe. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. red.: Nowak J.Z, Zawilska J.B. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2004: 604–616
25. Conzen SD. Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol*. Oct 2008;22(10):2215-2228.
26. Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 2000;85(12):4835-4840.
27. Kelly MJ, Qiu J. Estrogen signaling in hypothalamic circuits controlling reproduction. *Brain Res*. Dec 10 2010;1364:44-52.
28. Friend KE, Chiou YK, Lopes MB, Laws ER, Jr., Hughes KM, Shupnik MA. Estrogen receptor expression in human pituitary: correlation with immunohistochemistry in normal tissue, and immunohistochemistry and morphology in macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun 1994;78(6):1497-1504.

29. Sar M, Welsch F. Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. *Andrologia*. Sep 2000;32(4-5):295-301.
30. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*. Vol 416. Netherlands1997:107-112.
31. Ahlbory-Dieker DL, Stride BD, Leder G, et al. DNA binding by estrogen receptor-alpha is essential for the transcriptional response to estrogen in the liver and the uterus. *Mol Endocrinol*. Vol 23. United States2009:1544-1555.
32. Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, et al. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *J Mol Endocrinol*. Feb 1999;22(1):37-44.
33. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. Jan-Feb 2014;64(1):9-29.
34. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. May 1999;17(5):1474-1481.
35. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, 3rd, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*. Dec 15 1980;46(12 Suppl):2884-2888.
36. Bae SY, Kim S, Lee JH, et al. Poor prognosis of single hormone receptor- positive breast cancer: similar outcome as triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:138.
37. Wu JP, Gu FL. The prostate 41-65 years post castration. An analysis of 26 eunuchs. *Chin Med J (Engl)*. Apr 1987;100(4):271-272.
38. Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, van Pottelberg I. Estradiol in elderly men. *Aging Male*. Jun 2002;5(2):98-102.
39. Royuela M, de Miguel MP, Bethencourt FR, et al. Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol*. Vol 168. England2001:447-454.
40. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol*. Aug 1999;155(2):641-647.
41. Yeh CR, Da J, Song W, Fazili A, Yeh S. Estrogen receptors in prostate development and cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(2):161-168.
42. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*. Apr 2001;22(2):255-288.
43. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*. Vol 89. United States: 2000 American Cancer Society.; 2000:2068-2075.

44. Makar AP. Hormone therapy in epithelial ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*. Jun 2000;7(2):85-93.
45. Cheaib B, Auguste A, Leary A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer*. Jan 5 2015;34(1):4-16.
46. Samet JM, Wiggins CL, Humble CG, Pathak DR. Cigarette smoking and lung cancer in New Mexico. *Am Rev Respir Dis*. May 1988;137(5):1110-1113.
47. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol*. Vol 25. United States 2007:561-570.
48. Jemal A, Ward E, Thun M. Declining death rates reflect progress against cancer. *PLoS One*. 2010;5(3):e9584.
49. Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, et al. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Res*. Apr 1 2002;62(7):2141-2150.
50. Olivo-Marston SE, Mechanic LE, Mollerup S, et al. Serum estrogen and tumor-positive estrogen receptor-alpha are strong prognostic classifiers of non-small-cell lung cancer survival in both men and women. *Carcinogenesis*. Oct 2010;31(10):1778-1786.
51. Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer*. Vol 37. Ireland 2002:153-159.
52. Liu C, Liao Y, Fan S, et al. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) mediates NSCLC progression induced by 17beta-estradiol (E2) and selective agonist G1. *Med Oncol*. Apr 2015;32(4):104.
53. Hsu LH, Liu KJ, Tsai MF, et al. Estrogen adversely affects the prognosis of patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. Jan 2015;106(1):51-59.
54. Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res*. Jan 15 2000;60(2):245-248.
55. Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res*. Jan 15 2001;61(2):632-640.
56. Barzon L, Masi G, Pacenti M, et al. Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors. *Virchows Arch*. Feb 2008;452(2):181-191.
57. Sirianni R, Zolea F, Chimento A, et al. Targeting estrogen receptor-alpha reduces adrenocortical cancer (ACC) cell growth in vitro and in vivo: potential therapeutic role of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for ACC treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol 97. United States 2012:E2238-2250.

58. Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol.* Jul 2009;23(7):947-954.
59. Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol.* Apr 2015;54(2):R31-R53.
60. Graham JD, Clarke CL. Preview: MCE special issue on molecular mechanisms of action in progesterone signalling. *Mol Cell Endocrinol.* Vol 357. Ireland2012:1-3.
61. R. K. Murray, D. K. Granner, P.A. Mayes i in., *Biochemia Harpera.* Wyd.5, Warszawa 2006 s. 744.
62. De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res.* Sep 1 2003;63(17):5236-5238.
63. Dębska, Sylwia. In: Potemski Piotr. Structure and function of hormone receptors and their crosstalk with growth factor receptors. 2010;14:347-354.
64. 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. *EMBO J.* May 1990;9(5):1603-1614.
65. Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol.* Vol 20. United States2006:764-775.
66. Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* Dec 1991;10(12):3851-3859.
67. Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids.* Vol 73. United States2008:922-928.
68. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev.* Vol 28. United States2007:726-741.
69. Proietti C, Salatino M, Rosembli C, et al. Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* Jun 2005;25(12):4826-4840.
70. Savouret JF, Rauch M, Redeuilh G, et al. Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem.* Nov 18 1994;269(46):28955-28962.

71. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)*. Feb 2000;98(2):217-240.
72. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. Aug 1997;18(4):502-519.
73. Tincello DG, Taylor AH, Spurling SM, Bell SC. Receptor isoforms that mediate estrogen and progestagen action in the female lower urinary tract. *J Urol*. Vol 181. United States 2009:1474-1482.
74. Kim JJ, Chapman-Davis E. Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med*. Jan 2010;28(1):81-90.
75. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*. Vol 68. United States 2003:771-778.
76. Prior JC. Progesterone as a bone-trophic hormone. *Endocr Rev*. May 1990;11(2):386-398.  
Kato J, Hirata S, Nozawa A, Yamada-Mouri N. Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm Behav*. Vol 28. United States 1994:454-463.
77. Kato J, Hirata S, Nozawa A, Yamada-Mouri N. Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm Behav*. Vol 28. United States 1994:454-463.
78. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Nishigaki M, Tamaya T. Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in gynecologic malignant tumors. *Tumour Biol*. 1995;16(4):254-260.
79. Ariga N, Suzuki T, Moriya T, et al. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders. *Jpn J Cancer Res*. Mar 2001;92(3):302-308.
80. Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F. Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. Jan 2008;107(1):103-111.
81. Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol*. Vol 23 Suppl 10. England 2012:x111-117.
82. Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev*. Feb 2013;34(1):130-162.
83. Purdie DM, Green AC. Epidemiology of endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. Vol 15. England: 2001 Harcourt Publishers Ltd.; 2001:341-354.
84. Beral V, Bull D, Reeves G. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. Vol 365. England 2005:1543-1551.



85. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* Aug 1999;84(8):2963-2971.
86. Yu Y, Yang O, Fazli L, Rennie PS, Gleave ME, Dong X. Progesterone receptor expression during prostate cancer progression suggests a role of this receptor in stromal cell differentiation. *Prostate.* Apr 1 2015.
87. Grindstad T, Andersen S, Al-Saad S, et al. High progesterone receptor expression in prostate cancer is associated with clinical failure. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116691.
88. de Cremoux P, Rosenberg D, Goussard J, et al. Expression of progesterone and estradiol receptors in normal adrenal cortex, adrenocortical tumors, and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocr Relat Cancer.* Vol 15. England2008:465-474.
89. Lloyd CW, Lobotsky J, Weisz J, et al. Concentration of unconjugated estrogens, androgens and gestagens in ovarian and peripheral venous plasma of women: the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* Feb 1971;32(2):155-166.
90. Wu TS, Hammond GL. Naturally occurring mutants inform SHBG structure and function. *Mol Endocrinol.* Jul 2014;28(7):1026-1038.
91. Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K. Androgen biosynthesis in the quail brain. *Brain Res.* Vol 948. Netherlands2002:180-185.
92. Holka- Pokorska, Justyna. Androgeny–wspólny marker biologiczny zaburzeń snu oraz wybranych dysfunkcji seksualnych? In: Jarema, Marek, eds. Vol 48.4: *Psychiatr. Pol* 2014:701-714.
93. Skłaba, Piotr. Receptor androgenowy. In: Huć D-, Anna, eds. Vol 11: *Gin. Prakt*; 2003:12-18.
94. Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril.* Vol 77 Suppl 4. United States2002:S3-5.
95. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science.* Apr 15 1988;240(4850):327-330.
96. Gao T, McPhaul MJ. Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol.* May 1998;12(5):654-663.

97. Chang C, Chodak G, Sarac E, Takeda H, Liao S. Prostate androgen receptor: immunohistological localization and mRNA characterization. *J Steroid Biochem.* 1989;34(1-6):311-313.
98. Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem.* Jul 1991;39(7):927-936.
99. Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct 1997;82(10):3493-3497.
100. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, et al. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* Mar 15 1997;57(6):1194-1198.
101. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor- $\alpha$  activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res.* Vol 69. United States 2009:6131-6140.
102. He J, Peng R, Yuan Z, et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol.* Jun 2012;29(2):406-410.
103. van Doorn HC, Burger CW, van der Valk P, Bonfrer HM. Oestrogen, progesterone, and androgen receptors in ovarian neoplasia: correlation between immunohistochemical and biochemical receptor analyses. *J Clin Pathol.* Mar 2000;53(3):201-205.
104. Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR. The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *Br J Cancer.* Mar 18 2002;86(6):879-885.
105. Shi P, Zhang Y, Tong X, Yang Y, Shao Z. Dihydrotestosterone induces p27 degradation via direct binding with SKP2 in ovarian and breast cancer. *Int J Mol Med.* Jul 2011;28(1):109-114.
106. Rossi R, Zatelli MC, Valentini A, et al. Evidence for androgen receptor gene expression and growth inhibitory effect of dihydrotestosterone on human adrenocortical cells. *J Endocrinol.* Dec 1998;159(3):373-380.
107. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe.* May 1987;8(3):138-140.
108. Alexieva-Figusch J, Van Putten WL, Blankenstein MA, Blonk-Van Der Wijst J, Klijn JG. The prognostic value and relationships of patient characteristics, estrogen and progestin receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer.* Feb 15 1988;61(4):758-768.



109. Shen XC, Gu CX, Qiu YQ, Du CJ, Fu YB, Wu JJ. Estrogen receptor expression in adrenocortical carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B*. Jan 2009;10(1):1-6.
110. Kasperlik-Zaluska AA, Szczupacka I, Leszczynska-Bystrzanowska J, Drus-Przybyszewska G. Pregnancy-dependent Cushing's syndrome in three pregnancies. *BJOG*. Jun 2000;107(6):810-812.
111. Montanaro D, Maggiolini M, Recchia AG, et al. Antiestrogens upregulate estrogen receptor beta expression and inhibit adrenocortical H295R cell proliferation. *J Mol Endocrinol*. Vol 35. England2005:245-256.
112. Hirst JJ, West NB, Brenner RM, Novy MJ. Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adult rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. Jul 1992;75(1):308-314.
113. Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*. Jul 1991;39(7):927-936.
114. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*. Vol 65. Switzerland: 2013. Published by Elsevier B.V.; 2014:124-137.
115. Pertschuk LP, Macchia RJ, Feldman JG, et al. Immunocytochemical assay for androgen receptors in prostate cancer: a prospective study of 63 cases with long-term follow-up. *Ann Surg Oncol*. Nov 1994;1(6):495-503.