

Ingrid Wenzel



**KLINICZNE ZNACZENIE EKSPRESJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO,
PROGESTERONOWEGO I ANDROGENOWEGO U CHORYCH PODDANYCH
LECZNICZEMU ZABIEGOWI OPERACYJNEMU Z POWODU
NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUC**

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 ze środków:

1. grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, POMOST/2012-5/3, współfinansowanego przez Unię Europejską (7 Program Ramowy), przyznanego promotorowi pracy - dr hab. med. Dorocie Dworakowskiej
2. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na realizację zadania badawczego projektu Młody Naukowiec (MN) nr 01-0199/08/126

Chciałabym serdecznie podziękować promotor **Pani dr hab. n. med. Dorocie Dworakowskiej** za wsparcie i pomoc udzieloną w trakcie dotychczasowej współpracy, oraz za niezwykle szansę na rozwój naukowy, jaką było uczestnictwo w jej programie „POMOST”.

Chciałabym podziękować również Panu **Profesorowi Wojciechowi Biernatowi**, 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.

Specjalne podziękowania i ogromną wdzięczność kieruję do Pana **Profesora Piotra Lassa**, kierownika Zakładu Medycyny Nuklearnej, w którym mam szczęście pracować oraz do opiekuna mojej specjalizacji Pana **dr n. med. Grzegorza Romanowicza** za cierpliwość, wsparcie i okazaną pomoc.

Dziękuję również za ogromne wsparcie wszystkim moim współpracownikom z Zakładu Medycyny Nuklearnej.

Dziękuję także mojej koleżance Agacie Drabarek za owocną współpracę i wsparcie udzielane mi od samego początku naszego wspólnego udziału w projekcie „POMOST”.

Pragnę wyrazić ogromną wdzięczność mojej Rodzinie, przyjaciołom, oraz wszystkim życzliwym mi osobom, z którymi miałam okazję spotkać w trakcie tworzenia tej pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego przyszłego męża Filipa, za niegasnącą wiarę, wsparcie i pomoc które dodawały mi siły podczas wędrówki po pełnej wyzwień ścieżce, jaką jest praca badawcza.

SPIS TREŚCI

WSTĘP	6
1.1 EPIDEMIOLOGIA	6
1.2 PODZIAŁ	8
1.2.1 Rak płaskonabłonkowy.....	9
1.2.2 Rak gruczołowy	10
1.2.3 Rak wielkokomórkowy	11
1.2.4 Rak drobnokomórkowy.....	12
1.3 KLASYFIKACJA TNM NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUC.....	13
1.4 LECZENIE OPERACYJNE	15
1.5 RECEPTORY HORMONÓW STEROIDOWYCH.....	17
1.5.1 Receptor estrogenowy	20
1.5.2 Receptor progesteronowy.....	22
1.5.3 Receptor androgenowy	23
CELE PODJĘTYCH BADAŃ.....	24
MATERIAŁ	25
METODY	28
4.1 MIKROMACIERZE TKANKOWE	28
4.2 BARWIENIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE	29
4.3 ANALIZA STATYSTYCZNA.....	34
WYNIKI	36
5.1 MIKROFOTOGRAFIE	36
5.2 WYNIKI BARWIEŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH.....	41
5.3 EKSPRESJA RECEPTORÓW A CECHY KLINICZNE I DEMOGRAFICZNE	42
5.3.1 Receptor estrogenowy alfa	42
5.3.2 Receptor progesteronowy.....	47
5.3.3 Receptor androgenowy	53
5.4 ANALIZA PRZEŻYĆ W BADANEJ GRUPIE CHORYCH.....	59
5.5 ZNACZENIE ROKOWNICZE EKSPRESJI RECEPTORÓW	62
5.5.1 Receptor estrogenowy alfa.....	62
5.5.2 Receptor progesteronowy.....	63
5.5.3 Receptor androgenowy	65
5.6 ANALIZA WIELOCZYNNIKOWA OPARTA NA MODELU COX'A.....	67
OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	68

WNIOSKI	76
STRESZCZENIE	77
SUMMARY	79
SKRÓTY	81
BIBLIOGRAFIA.....	82
SPIS GRAFÓW, TABEL I RYCIN.....	92

WSTĘP

Rak płuca jest najczęstszym nowotworem na świecie. Umieralność z powodu raka płuca pozostaje wiodącą przyczyną zgonów u chorych na nowotwory złośliwe. Leczeniem z wyboru jest zabieg operacyjny z doszczętną resekcją. Estrogeny działając za pośrednictwem receptorów, wpływają na rozwój komórek, ich proliferację oraz na ekspresję genów. Liczne doniesienia wspominały o wpływie progesteronu na angiogenezę, istotną zarówno podczas powstawania jak i rozsiewu nowotworów. Oddziaływanie czynników hormonalnych na onkogenezę, zwłaszcza w świetle rosnącej liczby nowych zachorowań na NDKRP u niepalących kobiet, wymaga głębszego poznania. Receptory estrogenowy, progesteronowy i androgenowy mogą mieć znaczenie w rozwoju nowych terapii celowanych.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Nowotwory złośliwe płuc, pomimo wieloletnich badań nad etiologią, czynnikami ryzyka, metodami szybkiego wykrywania czy ścieżkami postępowania terapeutycznego, wciąż stanowią globalny problem medyczny i socjologiczny. W przeciągu ostatnich lat wzrosły zarówno zapadalność jak i śmiertelność z powodu nowotworów płuc z odpowiednio 1,6 miliona i 1,4 miliona w 2008 roku do 1,8 miliona nowych przypadków oraz 1,6 miliona odnotowanych w 2012 roku zgonów [1,2]. W 2012 roku nowotwory płuc były nie tylko najczęściej diagnozowanymi, ale i zarazem nowotworami najczęściej prowadzącymi do zgonu pośród mężczyzn w globalnych statystykach [2]. Nowotwory płuc w grupie kobiet zajmowały trzecie miejsce wśród najczęściej diagnozowanych oraz stanowiły drugą najczęstszą onkologiczną przyczynę śmierci [2]. Nowotwory płuc są odnotowywane z podobną częstością w krajach wysoko rozwiniętych jak i tych rozwijających się. Taką zależność można zaobserwować również w Europie. Pomimo tego, że nowotwory złośliwe płuc plasowały się w 2012 roku dopiero na drugiej pozycji pośród najczęściej rozpoznawanych nowotworów w grupie mężczyzn oraz trzeciej u kobiet to stanowiły one najczęstszą przyczynę śmierci Europejczyków z powodów onkologicznych, będąc zarazem

pod tym względem odpowiednio na pierwszym miejscu wśród mężczyzn oraz na drugim w grupie kobiet [3]. Najwyższą zapadalność na nowotwory płuc w Europie u mężczyzn obserwuje się w krajach Europy Środkowej i Wschodniej, w grupie kobiet pierwsze miejsca zajmują kraje północnoeuropejskie [3]. W Polsce zaobserwować można nakładanie się tych dwóch niekorzystnych trendów. Konsekwencją tego jest zajmowanie przez Polaków wyjątkowo wysokich miejsc w europejskich statystykach zachorowań na nowotwory złośliwe płuc zarówno pośród mężczyzn jak i kobiet, odpowiednio 4 i 9 miejsce [3]. Warto podkreślić, że zapadalność na nowotwory płuc u obu płci wyliczona jako średnia dla krajów Europy jest aż o 30% niższa niż w Polsce [3]. Ponadto, choć w Polsce ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe płuc wciąż jest 3 razy wyższe u mężczyzn niż u kobiet, od 20 lat obserwujemy systematyczne, znaczące obniżenie współczynników zapadalności wśród pierwszej grupy, jak i stały od ponad trzech dekad trend wzrostowy tych współczynników w drugiej grupie [4]. Współczynniki zapadalności są wyjątkowo wysokie w województwie pomorskim, które w 2012 roku plasowało się pod tym względem na pierwszym miejscu wśród kobiet oraz na trzecim wśród mężczyzn [5].

Współczynnik umieralności u mężczyzn jak i u kobiet w Polsce jest także znacznie wyższy od średniego dla krajów Europy [3]. W naszym kraju nowotwory złośliwe płuc stanowią najczęstszą przyczynę śmierci z powodów onkologicznych u obu płci, wyprzedzając pod tym względem nowotwory sutka u kobiet [4]. Jest to tendencja, którą obserwuje się u kobiet w rosnącej liczbie krajów Europy Północnej i Zachodniej [3]. Wysoki stopień zaawansowania nowotworu w momencie rozpoznania oraz zwykle niekorzystne rokowanie powodują, że 5-letni współczynnik przeżywalności wynosi w Polsce jedynie nieco powyżej 10% dla mężczyzn oraz 15% dla kobiet, przy czym w województwie pomorskim ten współczynnik dla kobiet jest na poziomie jedynie 13,2% [6]. W Polsce do 2025 roku prognozuje się stały wzrost umieralności z powodu nowotworów złośliwych płuc we wszystkich grupach wiekowych u kobiet oraz u mężczyzn powyżej 70 roku życia [7].

1.2 PODZIAŁ

Według obowiązujących wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO) pochodzących z 2004 roku wraz z wprowadzonymi 2011 roku rozszerzonymi zaleceniami International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), American Thoracic Society (ATS) oraz European Respiratory Society (ERS) wśród pierwotnych, złośliwych nowotworów płuc wyróżniamy cztery podstawowe typy raka: płaskonabłonkowy, gruczołowy, wielkokomórkowy oraz drobnokomórkowy (Graf 1.).



Graf 1. Podział inwazyjnego raka płuc zgodnie z WHO 2004 oraz IASLC/ATS/ERS 2011.

Trzy pierwsze typy, ze względu na podobny przebieg kliniczny oraz niską wrażliwość na chemioterapię dotychczas łączone były w grupę niedrobnokomórkowego raka płuc (NDKRP) stanowiąc łącznie około 85% wszystkich nowotworów. Wiele doniesień wskazuje jednak na znaczące różnice w odpowiedzi na leczenie molekularne wśród nowotworów stanowiących dwie największe podgrupy NDKRP – w raku gruczołowym i płaskonabłonkowym. Postępy w systemowym leczeniu onkologicznym sprawiły, że określenie dokładnego rozpoznania histopatologicznego NDKRP jest szczególnie istotne w wypadku chorych niekwalifikujących się do leczenia operacyjnego.

Innymi, znacznie rzadszymi nowotworami nabłonkowymi płuc, są rak gruczołowo-płaskonabłonkowy, rak mięsakowy, nowotwory typu śliniankowego czy rakowiaki. Nowotwory nienabłonkowe, takie jak guzy mezenchymalne, zarodkowe czy pochodzące z układu chłonnego są diagnozowane sporadycznie. Ponadto klasyfikacja WHO z późniejszymi rozszerzeniami IASLC/ATS/ERS wyróżnia szereg zmian przedinwazyjnych – szczegóły w Grafie 2 [8–10].

Zmiany przedinwazyjne poprzedzające raka płuc

Dysplazja płaskonabłonkowa lub rak In situ	
Atypowy wzrost gruczołakowaty pneumocytów	
Rak gruczołowy In situ:	niewydzielający śluzu śluzowy mieszany
Rozlany samoistny rozrost komórek neuroendokrynych płuca	

Graf 2. Podział zmian przedinwazyjnych raka płuc zgodnie z WHO 2004 oraz IASLC/ATS/ERS 2011.

1.2.1 Rak płaskonabłonkowy

Nabłonek płaski nie występuje fizjologicznie w drogach oddechowych. Powstanie raka płaskonabłonkowego dróg oddechowych związane jest z metaplastacją oraz dysplazją nabłonka wyściełającego oskrzela spowodowanymi narażeniem prawidłowych komórek nabłonkowych na dym tytoniowy lub inne substancje drażniące takie jak azbest czy metale ciężkie. W związku z tym większość raków płaskonabłonkowych diagnozowana jest u palaczy, ponadto zlokalizowana jest wzdłuż dużych oskrzeli. Złuszczenie się komórek nowotworu do oskrzeli, uwarunkowane korzystną lokalizacją raków płaskonabłonkowych, umożliwia diagnozę już w typowym cytologicznym badaniu plwociny. Wciąż rak płaskonabłonkowy jest rozpoznawany znacznie częściej wśród mężczyzn niż wśród kobiet, choć liczba nowych zachorowań na ten typ NDKRP maleje w pierwszej grupie, a rośnie w drugiej. Makroskopowo nowotwory te osiągają duże rozmiary, często z wtórną martwicą centralną, prowadzą do zmniejszenia drożności dróg oddechowych powodującego pogorszenie powietrzości płuc z towarzyszącymi zmianami zapalnymi. Mikroskopowo dobrze zróżnicowane nowotwory charakteryzują się obecnością rogowaciejących komórek z tak

zwanymi perłami rogowymi [8,9,11,12]. W wypadku guzów o niższym stopniu zróżnicowania, małych wycinków lub rozmazów cytologicznych z badań biopsyjnych w celu rozpoznawania raka płaskonabłonkowego proponowane jest immunohistochemiczne oznaczenie obecności specyficznych markerów. Wdrożenie terapii celowanej w przypadku rozpoznania raka płaskonabłonkowego zależy jest od obecności mutacji lub amplifikacji genów receptorów należących do rodziny kinaz tyrozynowych [11,13–15].

1.2.2 Rak gruczołowy

Nowotwory o utkaniu gruczołowym pochodzą z nabłonka wyściełającego pogranicze pęcherzyków płucnych i oskrzelików (zazwyczaj z pneumocytów typu II, komórek Clary bądź z komórek produkujących śluz). W związku z tym duża część raków gruczołowych tworzy zmiany położone obwodowo mające tendencję do naciekania zarówno opłucnej, z towarzyszącym włóknieniem, jak i ściany klatki piersiowej (w 15% przypadków). Korelacja pomiędzy paleniem wyrobów tytoniowych a powstaniem raka gruczołowego jest mniej wyraźna niż w przypadku raka płaskonabłonkowego. Częstość zachorowań na raka gruczołowego wciąż jest wyższa wśród mężczyzn niż u kobiet, choć obserwuje się wzrost zapadalności na ten nowotwór zwłaszcza u kobiet z ujemnym wywiadem w kierunku palenia papierosów. Makroskopowo nowotwory te zwykle tworzą niewielkie lite zmiany, bez tendencji do rozpadu w części centralnej. Mikroskopowo charakterystyczne jest występowanie struktur gruczołowych, brodawkowatych lub obecność śluzu śródcytoplazmatycznego. Materiał pozyskany podczas resekcji nowotworu jest preferowany podczas określania histopatologicznego typu nowotworu. Jednak jedynie w około 15-20% chorych w momencie rozpoznania choroby nowotworowej kwalifikuje się do leczenia operacyjnego. W pozostałych przypadkach mamy do czynienia z materiałem otrzymanym z płwociny, wymazu z oskrzela, popłuczyn oskrzelowych czy na drodze biopsji cienkoigłowej przez ścianę klatki piersiowej lub przez ścianę oskrzela. Nawet przy otrzymaniu małych ilości materiału cytologicznego w większości przypadków ostateczne rozpoznanie histopatologiczne może być postawione na podstawie barwienia hematoksyliną i eozyną (H+E). W pozostałych przypadkach w diagnostyce raka gruczołowego płuc pomocne jest oznaczenie specyficznych markerów.

Zgodnie z wprowadzonymi w 2011 roku rozszerzonymi zaleceniami IASLC/ATS/ERS guzy niewykazujące w barwieniu H+E ewidentnych cech raka gruczołowego, jednak z dodatnią reakcją immunohistochemiczną w kierunku charakterystycznych markerów powinno się zaliczać do grupy „raka niedrobnokomórkowego, prawdopodobnie gruczołowego” bez względu na wynik barwienia w kierunku markerów charakterystycznych dla raka typu płaskonabłonkowego w tych samych komórkach. Reakcja pozytywna dla znaczników charakterystycznych dla obu wcześniej omawianych typów nowotworów obserwowana w różnych grupach komórek świadczy o złożonym różnicowaniu guza oraz przemawia za zaklasyfikowaniem takiego nowotworu jako „raka gruczołowo-płaskonabłonkowego” [8,9,11,12,15,16]. W wypadku nowotworów o utkaniu gruczołowym często obserwowana jest heterogenność zarówno pod względem równoczesnego występowania odmiennych typów histologicznych jak i różnego typu wzrostu nowotworów gruczołowych [17]. Określenie typu wzrostu jest istotnym uzupełnieniem rozpoznania gruczolakoraka ze względu na opisywane znaczenie rokownicze typu wzrostu guza. Ponadto podczas planowania spersonalizowanej terapii raka gruczołowego płuc wskazane jest wykonanie badań w kierunku obecności mutacji genetycznych w celu zbadania wrażliwości nowotworów na leki [14,15]. W wielu ośrodkach na całym świecie prowadzone są intensywne badania nad możliwością zastosowania terapii celowanych w kierunku innych mutacji często obserwowanych w raku gruczołowym.

1.2.3 Rak wielkomórkowy

Nowotwory płuc nieposiadające cech zróżnicowania drobnokomórkowego, gruczołowego ani płaskonabłonkowego były do 2011 roku kwalifikowane jako raki wielkomórkowe. Charakteryzowały się zróżnicowaniem morfologii komórek, wysokim indeksem mitotycznym oraz często występującą martwicą [8]. Dzięki wdrażaniu nowych technik barwienia preparatów przy zastosowaniu markerów specyficznych dla określonych typów nowotworów rozpoznanie raka wielkomórkowego jest aktualnie dopuszczalne jedynie w preparatach pooperacyjnych, poddanych szczegółowym badaniom immunohistochemicznym, w których nie udało się wykryć cech specyficznych dla jakiegokolwiek innego sklasyfikowanego

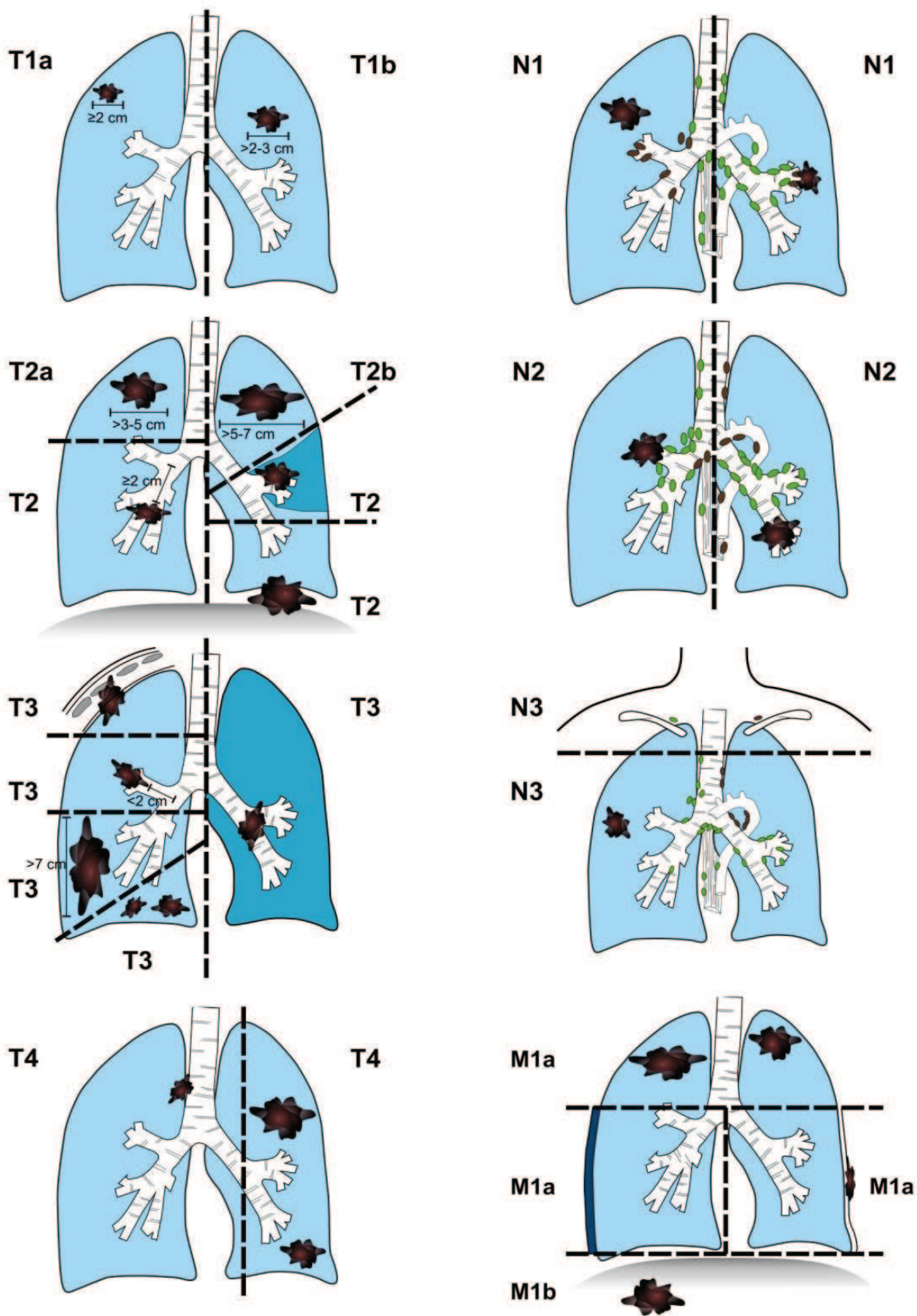
podtypu nowotworu płuc. Taki sam wynik w przypadku badań przeprowadzonych na tkankach uzyskanych na drodze biopsji upoważnia jedynie do postawienia rozpoznania „raka niedrobnokomórkowego bez możliwości określenia podtypu” [12,18]. Ponadto spośród grupy nowotworów klasyfikowanych wcześniej jako raki wielkokomórkowe należy wyodrębnić również raki wielkokomórkowe neuroendokryne, czyli nowotwory o cechach zróżnicowania lub obecnych markerach neuroendokrynych [12,17].

1.2.4 Rak drobnokomórkowy

Nowotwory drobnokomórkowe płuc wywodzą się z komórek neuroendokrynych. W związku z tym w ich przebiegu obserwuje się zespoły paranowotworowe związane z ekotopową produkcją hormonów peptydowych lub zmianą reakcji immunologicznych. Choć rakowiak czy rak wielkokomórkowy neuroendokryny również wywodzą się z komórek neuroendokrynych, jednak z powodu dużych różnic w epidemiologii jak i przebiegu tych raków nie łączy się ich w jedną grupę. Rak drobnokomórkowy stanowi około 15-20% wszystkich nowotworów płuc. W przypadku raka drobnokomórkowego płuc, podobnie jak w raku płaskonabłonkowym, dobrze udokumentowany jest silny wpływ palenia papierosów na etiopatogenezę, jak i predylekcja do występowania przywnękowo lub w śródpiersiu. Podstawowym kryterium rozpoznania raka drobnokomórkowego jest ocena mikroskopowa preparatu, w którym obecne powinny być drobne, okrągłe komórki o dużym jądrze komórkowym bez wyodrębniającego się jąderka oraz niewielką ilością cytoplazmy. Ponadto rak drobnokomórkowy charakteryzuje się bardzo wysokim indeksem mitotycznym, co związane jest z szybkim uogólnieniem choroby obserwowanym u 70% chorych w momencie diagnozy [8].

1.3 KLASYFIKACJA TNM NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUC

Wybór optymalnej ścieżki postępowania terapeutycznego zależy od dokładnego ustalenia stopnia zaawansowania nowotworu. Podstawą oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej jest klasyfikacja TNM. Aktualnie obowiązującą jest opublikowana w 2010 roku siódma edycja wytycznych. Najczęściej używanymi wersjami klasyfikacji TNM jest cTNM oceniająca kliniczne (c - clinical) zaawansowanie nowotworu oraz pTNM biorąca pod uwagę ocenę patologiczną zmiany (p - pathologic) otrzymanej w trakcie operacji, dodatkowo dającą możliwość oceny stopnia złośliwości nowotworu w badaniu histopatologicznym (G - grade). Przedoperacyjnie zasięg anatomiczny nowotworu w skali cTNM określa się biorąc pod uwagę wielkość oraz zasięg naciekania guza pierwotnego (T - tumor), obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N – lymph nodes) oraz obecność przerzutów odległych (M - metastasis). Na Ryc.1. przedstawiono schematycznie kryteria stosowane podczas klasyfikacji. Ocenę guza pierwotnego, cechy T, dokonujemy w oparciu o badanie tomografii komputerowej (TK) klatki piersiowej z podaniem środka kontrastującego. Zajęcie regionalnych węzłów chłonnych, czyli cechę N, oceniamy w łączonym badaniu pozytonowej tomografii emisyjnej i TK (PET-TK), lub, jeśli węzły dostępne są biopsji, w badaniu wykonanym na wycinkach pobranych podczas mediastinoskopii bądź przezprzełykowo czy przezoskrzelowo pod kontrolą USG. W wypadku ryzyka obecności przerzutów odległych (cecha M) lokalizujących się najczęściej w kościach oraz mózgowiu przeprowadzamy badanie TK lub rezonansu magnetycznego (MR) mózgu oraz scyntyografię kości [19]. Stopień zaawansowania choroby przyporządkowywany jest do odpowiedniej grupy (od 0 do IV, gdzie stopień IV oznacza chorobę rozsianą) w zależności od łącznej oceny trzech cech klasyfikacji TNM. W ten sposób warunkuje się wybór postępowania terapeutycznego. Chorzy w dobrym stanie ogólnym, u których nie występują przerzuty odległe (M1) przechodzą pozytywnie kwalifikację do leczenia operacyjnego, w określonych przypadkach poprzedzonego lub uzupełnionego chemioterapią i/lub radioterapią. Zajęcie węzłów chłonnych wnątkowych czy śródpiersiowych po stronie przeciwległej do nowotworu a także zajęcie węzłów nadobojczykowych dyskwalifikuje chorego z leczenia operacyjnego (N3) [8,12,19,20].



Ryc.1. Schematyczne przedstawienie klasyfikacji TNM 2010 w niedrobnokomórkowym raku płuc.
 Źródło: Opracowanie własne na podstawie Atlas TNM 7th Edition, 2014.

1.4 LECZENIE OPERACYJNE

Zgodnie z zaleceniami European Society for Medical Oncology (ESMO) leczenie operacyjne dla chorych w stopniu zaawansowania I-II i części przypadków IIIA w dobrym stanie klinicznym jest metodą z wyboru (Tab.1.) [21]. Kwalifikacja do zabiegu operacyjnego, poza oceną stopnia zaawansowania raka płuc, obejmuje również szereg testów wysiłkowych, ocenę gazometrii krwi tętniczej w spoczynku i po wysiłku, spirometrię a także ocenę układu krążenia. Zgodnie z wytycznymi ESMO chory może być poddany operacji, gdy w badaniu zdolności dyfuzji gazów w płucach oraz w badaniu nasilonej pierwszosekundowej objętości wydechowej (forced expiratory volume in one second – FEV1) ocenianej w spirometrii osiągnie wynik >80%. W wypadku osiągnięcia gorszych rezultatów wskazane jest przeprowadzenie kolejnych testów. Chorzy osiągający pułap tlenowy (VO_2) >20ml/kg/min mogą zostać poddani nawet pneumonektomii. W wypadku chorych o wynikach <10ml/kg/min nie powinno się przeprowadzać resekcji ze względu na zbyt wysokie ryzyko operacyjne [21].

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez North American Lung Cancer Study Group (LSCG) lobektomia jest aktualnie metodą z wyboru u chorych zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego [22,23]. Coraz częściej takie operacje przeprowadza się metodą wideoskopową (video-assisted thoracoscopic surgery - VATS) co, zgodnie z posiadaną na dzień dzisiejszy wiedzą, wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka powikłań pooperacyjnych oraz nawrotów a także zwiększeniem stopnia 5-letniego przeżycia [24,25]. Należy jednak wziąć pod uwagę, że do tej pory nie zostały jeszcze przeprowadzone randomizowane badania porównujące klasyczną i wideoskopową metodę przeprowadzenia lobektomii.

Chorym zdyskwalifikowanym z leczenia operacyjnego, pomimo niskiego stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, zgodnie z zaleceniami ESMO możemy zaproponować radykalne napromienianie zmiany metodą radioterapii stereotaktycznej [21,26].

Zasięg nowotworu	Zajęcie węzłów chłonnych			
	N0	N1	N2	N3
T1	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2	IB	IIB		
T3	IIB	IIIA		
T4	Stoień IV – M+, dowolny T, dowolny N			

- leczenie operacyjne
- leczenie operacyjne (z ew. chemioterapią neoadjuwantową/adjuwantową) lub radiochemioterapia
- radioterapia lub radiochemioterapia
- chemioterapia lub leczenie objawowe

Tab. 1. Sugerowana optymalna metoda leczenia w zależności od stopnia zaawansowania niedrobnokomórkowego raka płuc.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Gajewski P, Szczeklik A. Interna Szczeklika 2013, Kraków, Medycyna Praktyczna, 2013, wyd.5, s. 522-530. ISBN 978-83-7430-377-4.

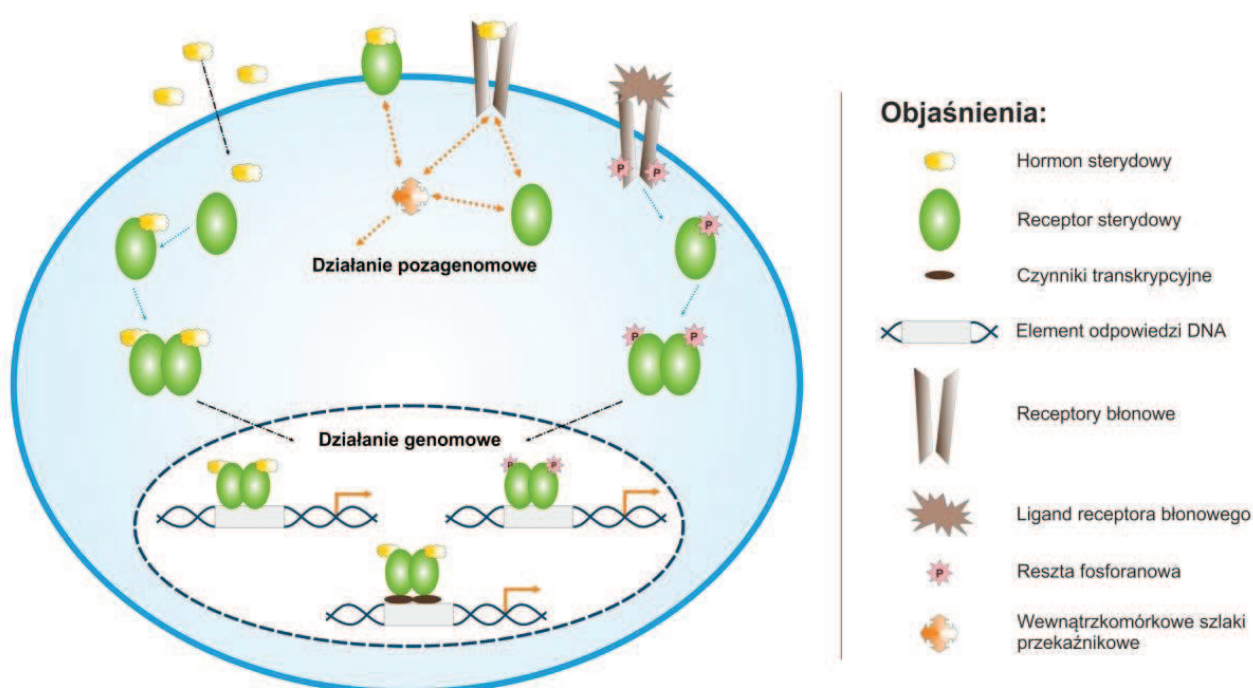
1.5 RECEPTORY HORMONÓW STEROIDOWYCH

Receptory hormonów steroidowych stanowią dużą podrodzinę receptorów jądrowych o aktywności czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulowaniu wielu procesów fizjologicznych [27].

Receptory jądrowe stanowią wewnątrzkomórkowe czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów w głównej mierze poprzez bezpośrednie oddziaływanie na DNA. W skład grupy receptorów jądrowych wchodzi receptory glukokortykoidów, mineralokortykoidów, estrogenowe, progesteronowe, androgenowe, hormonów tarczycy, witaminy D czy kwasu retinowego. Ligandy poszczególnych receptorów jądrowych różnią się między sobą pod wieloma względami natomiast ich cechą wspólną jest lipofilność, dzięki której łatwo przenikają przez błony komórkowe. Ligandy dla wielu receptorów jądrowych nie są jeszcze poznane a receptory te nazywane są sierocymi.

Po przyłączeniu ligandu do receptora hormonu steroidowego następuje zmiana jego konformacji, umożliwiająca dimeryzację, oraz translokacja z cytoplazmy do jądra komórkowego. Aktywowany w ten sposób receptor moduluje ekspresję odpowiednich genów przyłączając się do elementu odpowiedzi DNA na hormony (hormone response element - HRE). Receptory hormonów steroidowych mogą również wpływać na transkrypcję genów w sposób pośredni. W takim wypadku receptory po przyłączeniu koaktywatorów lub korepresorów wiążą się z niespecyficznymi dla siebie fragmentami DNA (Ryc. 2.) [28–32]. Ponadto receptory hormonów steroidowych wykazują także działanie niezależne od związania z ligandem. Aktywacja receptora w takim wypadku wynika z jego potranslacyjnych modyfikacji takich jak na przykład fosforylacji, a nie z przyłączenia ligandu (Ryc. 2.) [33]. Działanie genomowe hormonów steroidowych poprzez zmianę transkrypcji genów indukuje późną odpowiedź komórki na drodze szlaku sygnalizacji inicjowanej w obszarach jądra komórkowego (nuclear-initiated steroid signaling - NISS) [34].

Poza wewnątrzkomórkowym położeniem receptorów, obserwowanym najczęściej, opisywane jest także ich zakotwiczenie w błonie komórkowej. Zlokalizowane w ten sposób receptory biorą udział w transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych szlaków przekąźnikowych (Ryc. 2.). Ponadto hormony steroidowe mogą przyłączać się do innych, nieswoistych dla siebie, receptorów błonowych również generując odpowiedź. Działanie pozagenomowe hormonów steroidowych indukuje szybką odpowiedź komórkową na drodze szlaku sygnalizacji inicjowanej w obrębie błony komórkowej (membran-initiated steroid signaling - MISS) [28–32,34].



Ryc. 2. Mechanizmy transdukcji sygnału związane z działaniem hormonów steroidowych na szlakach NISS oraz MISS.

Źródło: Opracowanie własne.

Budowa wszystkich receptorów steroidowych jest w dużej mierze homologiczna i zgodna z przedstawionym poniżej schematem (Ryc. 3.). Koniec aminowy (N-koniec) receptora steroidowego, inaczej nazywany domeną A/B zawiera obszar odpowiedzialny za aktywację transkrypcji (activation function; AF-1) niezależny od obecności ligandu.

Działanie obszaru aktywującego znajdującego się w domenie A/B nie jest silne, może jednak ulec wzmocnieniu podczas połączenia z podobnym obszarem aktywującym znajdującym się na pograniczu domen D/E (activation function 2; AF-2). Domena A/B receptorów jądrowych wyróżnia się największą heterogennością wykazując różnicę w długości nie tylko pomiędzy różnymi typami receptorów, ale i pomiędzy podtypami tego samego receptora [29]. W kolejnej domenie (domena C) znajduje się obszar wiążący HRE, czyli swoiste sekwencje DNA. Domena C jest najbardziej homologiczną wśród wszystkich receptorów [35]. Kolejną domeną jest domena D zwana również giętką, cechuje się dużą heterogennością wynikającą z licznych potranslacyjnych modyfikacji i zarazem jest najmniej poznaną częścią receptorów steroidowych. Najprawdopodobniej dzięki tej części możliwa jest zmiana konformacji receptora po przyłączeniu ligandu [36]. Obszar wiążący ligand wchodzi w skład domeny E/F. Choć domena różni się w zależności od ligandu, z którym ma się łączyć, zbudowana jest we wszystkich wypadkach według podobnego schematu. Ponadto w jej skład wchodzi wspomniany wcześniej drugi obszar aktywujący transkrypcję, który w przeciwieństwie do pierwszego jest zależny od związania receptora z ligandem [37].



Objaśnienia:

Domena wiążąca DNA
 Domena wiążąca ligand
 Zn Palec cynkowy
 AF Obszar aktywujący transkrypcję

Ryc. 3. Schemat budowy receptora.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Mangelsdorf DJ et al. *The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell* 1995; 83: 835-839.

1.5.1 Receptor estrogenowy

Receptor estrogenowy (RE) to wewnątrzkomórkowy receptor należący do rodziny receptorów jądrowych wiążący się z hormonami z grupy estrogenów. Opisano występowanie dwóch RE α i β , które wykazują różne poziomy ekspresji w tkankach. RE α jest kodowany przez gen ESR1 znajdujący się na długim ramieniu chromosomu 6, a RE β przez gen ESR2 zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 14 [38–40]. Ponadto zidentyfikowano dwie izoformy receptora RE α [38] oraz pięć izoform receptora RE β [41] różniących się od siebie długością łańcucha polipeptydowego.

Zarówno RE α jak i RE β zbudowane są zgodnie ze schematem obowiązującym wszystkie receptory jądrowe. Wyróżniamy w nich trzy domeny aktywne: domenę końca aminowego regulującą transkrypcję, domenę odpowiadającą za wiązanie kompleksu z DNA oraz domenę wiążącą ligand znajdującą się na końcu karboksylowym (C-koniec) [38,41,42]. Początkowo sądzono, że łańcuchy polipeptydowe stanowiące izoformy 4 i 5 RE β są krótsze od łańcuchów pozostałych izoform RE β . Najnowsze badania przemawiają za tym, że łańcuchy izoform 4 i 5 są pełnej długości, jednak zmiany w budowie domeny E są na tyle istotne, że te warianty RE β utraciły zdolność wiązania ligandu [38,41,43].

RE łączy się z hormonami estrogenowymi obecnymi zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Największe powinowactwo wśród naturalnych estrogenów, zarówno wobec RE α jak i RE β , wykazuje 17 β -estradiol (E2). Znacznie niższe powinowactwo do RE wykazuje estriol, przy czym jest ono wyższe dla RE β niż RE α . Najniższe powinowactwo wobec obu RE wykazuje estron [44–46]. Stężenia hormonów estrogenowych są najwyższe u kobiet w okresie przedmenopauzalym. Dominującym hormonem jest E2. Estriol jest dominującym estrogenem u kobiet w czasie ciąży, natomiast u kobiet w okresie pomenopauzanym dominuje estron [47].

RE pełnią kluczową rolę podczas rozwoju oraz w prawidłowym dojrzewaniu wielu tkanek zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Ekspresję RE obserwuje się zarówno w komórkach tkanek związanych z układem rozrodczym jak i w pozostałych narządach takich jak płuca,

jelito grube, prostata, układ nerwowy czy sercowo-naczyniowy. Podczas gdy ekspresję obu RE opisuje się w komórkach gruczołów piersiowych, macicy, płucach, sercu czy mózgu ekspresja tylko RE α obserwowana jest w hepatocytach i hipokampie a samego RE β została opisana w prostaty, mózdzku, pochwie czy na białych krwinkach [40,43].

Doustne przyjmowanie estrogenów jako środków antykoncepcyjnych oraz hormonalnej terapii zastępczej jest związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby zakrzepowo-zatorowej [48,49]. Estrogeny odgrywają kluczową rolę w prawidłowym metabolizmie kości, ich niedobór związany jest z rozwojem osteoporozy. Wciąż jednak, pomimo wielu przesłanek, nie udowodniono bezpośredniej korelacji pomiędzy zaburzeniami funkcji bądź ekspresji RE a rozwojem patologii kośćca [50–53]. Opisywane jest również działanie neuroprotektoryjne estrogenów za pośrednictwem RE wobec epizodów niedokrwiennych oraz chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto wciąż nie do końca poznany jest ich wpływ na zmniejszenie ryzyka nagłych epizodów niedokrwiennych mięśnia sercowego. Estrogeny przez RE wpływają także na gospodarkę lipidową organizmu [54].

RE działają przeciwstawnie wobec siebie nie tylko w komórkach prawidłowych, ale również w nowotworowych. RE α wpływa na proliferację i wzrost tkanek, [55–58] podczas gdy RE β sprzyja różnicowaniu oraz inicjowaniu apoptozy w komórkach nowotworów sutka, prostaty czy jelita grubego [59–62]. Przeciwstawne działanie RE α i RE β opisywane jest również w rdzeniastym raku tarczycy [63]. Ekspresji RE β w raku sutka przypisuje się pozytywny wpływ na przeżycie między innymi poprzez hamowanie proliferacji komórek nowotworowych [64–67] podczas gdy występowanie RE α łączy się z hamowaniem szlaku apoptotycznego indukowanego przez białko p53 [58,68–70]. RE α jest celem terapii hormonalnej w raku sutka od wielu lat. Najczęściej stosowanymi terapeutykami są selektywne modulatory receptora estrogenowego (selective estrogen receptor modulators SREM) wykazujące działanie antagonistyczne wobec RE α w tkankach piersi, oraz agonistyczne w kościach i macicy, czy leki o aktywności kompetencyjnych antagonistów receptora estrogenowego (selective estrogen receptor down-regulators – SERDs).

1.5.2 Receptor progesteronowy

Receptor progesteronowy (RP) to wewnątrzkomórkowy receptor należący do rodziny receptorów jądrowych wiążący się z progesteronem. Występuje w dwóch izoformach (RP typu A i typu B) różniących się ilością budujących je białek. Oba typy RP kodowane są przez jeden gen znajdujący się na długim ramieniu chromosomu 11, jednak ich transkrypcja uzależniona jest od różnych promotorów [71,72]. W wielu tkankach ekspresja obu izoform RP jest zależna od działania estrogenów [71]. RP zbudowane są zgodnie ze schematem obowiązującym wszystkie receptory jądrowe. Wyróżniamy w nich trzy domeny aktywne: domenę końca aminowego regulującą transkrypcję, domenę odpowiadającą za wiązanie kompleksu z DNA oraz domenę wiążącą ligand znajdującą się na końcu karboksylowym (C-koniec) [73,74].

Od prawidłowego działania RP zależy przede wszystkim regulacja owulacji, ułatwienie implantacji, podtrzymanie ciąży przez pobudzanie do wzrostu oraz hamowanie skurczy macicy a także wystąpienie laktacji. Poza tym wykazano prenatalną ekspresję RP w komórkach tkanki mięśniowej serca, hepatocytach, komórkach kanalików nerkowych, wyspach trzustkowych, komórkach Cajala oraz komórkach podścieliska śledziony [75]. W większości tkanek płodowych dominowała forma B RP, a ekspresja dotyczyła głównie preparatów pozyskanych do 21 tygodnia życia płodowego, co może potwierdzać rolę PR w różnicowaniu się tych tkanek.

Wykazano wpływ działania progesteronu na rokowanie u chorych na nowotwory jajnika, różniło się ono w zależności od typu nowotworu [76–78]. Ponadto ekspresja RP została wykazana w nowotworach gruczołów sutkowych, endometrium oraz ośrodkowego układu nerwowego, zarówno niezależnie jak i przy współwystępowaniu receptora estrogenowego [79–82]. Wykazuje się skuteczność stosowana tamoksifenu w raku piersi u chorym z guzem RE(-) PR(+). Przemawia to za jego działaniem onkogennym, niezależnym od działania estrogenów i daje możliwość wprowadzenia terapii przeciwnowotworowej [83,84].

1.5.3 Receptor androgenowy

Receptor androgenowy (RA) to wewnątrzkomórkowy receptor należący do rodziny receptorów jądrowych wiążący się z hormonami androgenowymi. RA wykazuje największe powinowactwo wobec dihydrotestosteronu, nieznacznie mniejsze wobec testosteronu. Kodowany jest przez gen znajdujący się na długim ramieniu chromosomu X [85]. Badania wykazały obecność dwóch izoform RA różniących się liczbą budujących je aminokwasów. Podstawową postacią jest izoforma dłuższa - RA B. Nie zaobserwowano różnic w występowaniu, ani aktywności izoform RA A i RA B w tkankach [86]. RA zbudowany jest zgodnie ze schematem obowiązującym wszystkie receptory jądrowe. Wyróżniamy trzy domeny aktywne: domenę końca aminowego regulującą transkrypcję, domenę odpowiadającą za wiązanie kompleksu z DNA oraz domenę wiążącą ligand znajdującą się na końcu karboksylowym. Właściwe funkcjonowanie receptora zależy od prawidłowej budowy domeny A/B, a dokładnie od ilości powtórzeń tripletów CAG (cytozyna-adenina-guanina) w egzonie kodującym domenę.

Prawidłowy RA pełni kluczową rolę w różnicowaniu płciowym w okresie płodowym, podczas dojrzewania płciowego oraz w momencie podjęcia funkcji rozrodczych. Opisano ekspresję RA w płucach u ludzi zarówno prenatalnie jak i u dorosłych [87,88]. Gdy organizm wykazuje oporność, na działanie androgenów mówimy o zespole niewrażliwości na androgeny, będącym najczęstszą przyczyną hermafrodytyzmu typu męskiego. W wypadku nadaktywności RA dochodzi do hiperandrogenizmu przejawiającego się hirsutyzmem u kobiet oraz łysieniem androgenowym typu męskiego u chorych obu płci.

Ponadto wykazano związek pomiędzy występowaniem RA a rozwojem oraz modyfikowaniem skłonności do rozsiewu nowotworów prostaty, jąder, jajników, endometrium, sutka czy wątroby [89–93]. Zgodnie z wytycznymi European Association of Urology (EAU) hormonoterapia jest zalecana zarówno podczas leczenia chorych z zaawansowanym rakiem stercza jak i z grup pośredniego i wysokiego ryzyka progresji [94,95].

CELE PODJĘTYCH BADAŃ

W niniejszej pracy badania immunohistochemiczne wykonano na preparatach tkankowych pozyskanych od chorych poddanych leczniczemu zabiegowi operacyjnemu z powodu niedrobnokomórkowego raka płuc w celu:

1. oceny ekspresji receptora estrogenowego alfa ($RE\alpha$), progesteronowego (RP) i androgenowego (RA) w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (NDKRP);
2. określenia zależności pomiędzy występowaniem analizowanych receptorów, a cechami demograficznymi i klinicznymi badanej grupy chorych;
3. określenia wartości rokowniczej występowania $RE\alpha$, RP i RA w grupie chorych poddanych zabiegowi operacyjnemu z powodu NDKRP.

MATERIAŁ

Materiał użyty do badań stanowiły wycinki niedrobnokomórkowego raka płuc uzyskane podczas resekcji miąższu płucnego u chorych leczonych w Klinice Torakochirurgii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 1994 - 2005. Żaden z operowanych chorych nie otrzymał leczenia przeciwnowotworowego przed zabiegiem operacyjnym. Pobrane preparaty były przechowywane w postaci bloków parafinowych w archiwum patomorfologicznym Katedry i Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego do momentu rozpoczęcia badań przedstawionych w niniejszej pracy. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Badania immunohistochemiczne w kierunku obecności receptora estrogenowego, progesteronowego i androgenowego przeprowadzono na materiale utrwalonym w formalinie i przechowywanym w postaci bloczków parafinowych. Ocena histopatologiczna wycinków niedrobnokomórkowego raka płuc została ponownie przeprowadzona przez dwóch niezależnych patomorfologów (dr n. med. Piotr Czapiewski i lek. Adam Gorczyński - Katedra i Zakład Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego). W przypadku rozbieżności w określaniu podtypu raka ostateczna ocena była ustalana na podstawie konsultacji pomiędzy patomorfologami w oparciu o wytyczne WHO 2004 oraz IASLC/ATS/ERS 2011 [8,12]. Stopień zaawansowania nowotworu w skali pTMN oceniany był na podstawie badania mikroskopowego usuniętych operacyjnie tkanek zgodnie z siódmą edycją zaleceń [19].

W bazie danych zgromadzono informacje dotyczące: danych identyfikacyjnych chorego, daty urodzenia, płci, palenia papierosów, rozpoznania typu histopatologicznego nowotworu, stopnia jego zróżnicowania, stopnia zaawansowania klinicznego w skali TNM, daty i doszczętności zabiegu operacyjnego, czasu do nawrotu choroby oraz jego lokalizacji, daty ostatniej obserwacji lub zgonu, oceny ekspresji receptora, estrogenowego, progesteronowego i androgenowego zgodnie z punktacją skal Allred, H-score (dla prognozy

odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele. Do analizy statystycznej została użyta punktacja zgoda ze skalą H-score.

Dane dotyczące przebiegu choroby po leczeniu operacyjnym uzyskiwano z dokumentacji medycznej. Ocenę przeżycia oparto na danych uzyskanych telefonicznie na przełomie marca i kwietnia 2015 od chorych i ich rodzin.

Badaną grupę stanowiło 118 chorych, w tym 96 mężczyzn oraz 22 kobiety (Tab.2.). Średni wiek chorych w momencie zabiegu wynosił 62 lata (zakres od 37 do 85 lat). U 12 chorych po zabiegu operacyjnym stwierdzono cechę T1, u 71 chorych cechę T2, u 29 chorych cechę T3, zaś u 6 chorych cechę T4. Cechę N0 stwierdzono u 65 chorych, u 28 chorych cechę N1 i u 25 chorych cechę N2. W chwili zabiegu u 4 chorych obecne były przerzuty odległe (cecha M1). Na podstawie powtórnej oceny badań mikroskopowych usuniętych chirurgicznie tkanek stopień zaawansowania „patologicznego” IA i B, IIA i B, IIIA i IIIB/IV potwierdzono odpowiednio u 49, 30, 31 i 8 chorych. U jednej osoby rozpoznano raka płaskonabłonkowego in situ. Doszczętność mikroskopową (R0) stwierdzono u 102 chorych, niedoszczętność mikroskopową (R1) u 15 chorych i niedoszczętność makroskopową (R2) u jednego chorego.

W badaniu histopatologicznym wykazano 67 raków płaskonabłonkowych, 35 raków gruczołowych, 3 raki wielkokomórkowe oraz 13 raków o utkaniu gruczołowo-nabłonkowym. Wysoki stopień zróżnicowania nowotworu stwierdzono u 17 chorych (G1), średni stopień zróżnicowania u 71 (G2) oraz niski stopień zróżnicowania nowotworu u 30 chorych (G3).

W odniesieniu do 112 chorych udało się retrospektywnie ustalić dane na temat palenia papierosów. W momencie zabiegu operacyjnego 39 chorych miało za sobą mniej niż 30 paczkolet. Ponadto w badanej grupie 4 osoby wypaliły mniej niż 100 papierosów.

U 103 chorych oceniono przebieg kliniczny nowotworu po leczeniu operacyjnym. W momencie ostatniej analizy (kwiecień 2015) 28 osób żyło bez cech nawrotu choroby nowotworowej. U 38 wystąpił nawrót nowotworu (w tym u 4 pod postacią wznowy

miejscowo-regionalnej, u 31 pod postacią przerzutów odległych, a u 3 wystąpiły równocześnie obie formy nawrotu). W momencie ostatniej analizy żyło 34 chorych. Mediana okresu wolnego od nawrotu choroby w odniesieniu do całej grupy wynosiła 56 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby 50%. Mediana okresu przeżycia dla całej grupy wynosiła 63 miesiące (zakres od 1 dnia do 142 miesięcy), a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia 56%.

Cecha	Liczba chorych (%)
Wiek	
≤60	49 (42%)
>60	69 (58%)
Płeć	
mężczyźni	96 (81%)
kobiety	22 (19%)
T	
1	12 (10%)
2	71 (60%)
3	29 (25%)
4	6 (5%)
N	
0	65 (55%)
1	28 (24%)
2	25 (21%)
Stopień zaawansowania klinicznego	
IA i B	49 (42%)
IIA i B	30 (25%)
IIIA	31 (26%)
IIIB/IV	8 (7%)
Doszczętność zabiegu operacyjnego	
R0	102 (86%)
R1	15 (13%)
R2	1 (1%)
Postać histologiczna guza	
rak płaskonabłonkowy	67 (57%)
rak gruczołowy	35 (30%)
rak wielkomórkowy	3 (2%)
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	13 (11%)
Stopień zróżnicowania guza	
G1	17 (12%)
G2	71 (62%)
G3	30 (26%)
Nałóg palenia papierosów	
niepalący	4 (4%)
< 30 paczkolet	39 (35%)
≥30 paczkolet	68 (61%)

Tab. 2. Charakterystyka kliniczna badanej grupy 118 chorych na NDKRP.

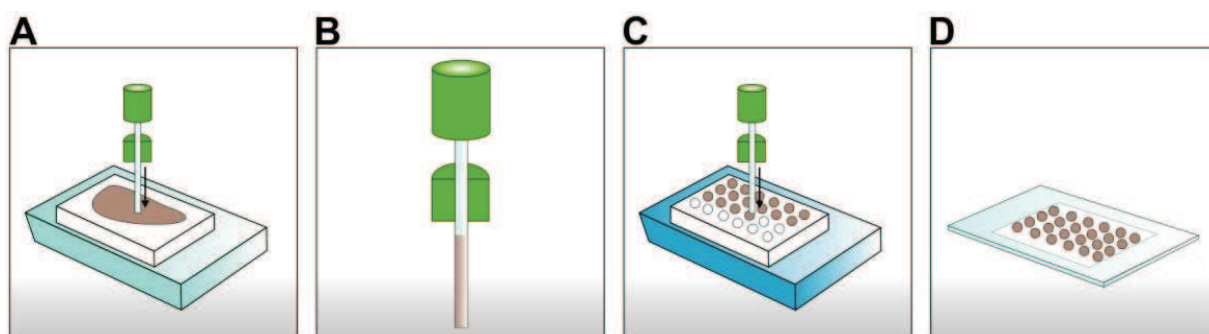
4.1 MIKROMACIERZE TKANKOWE

W ostatnich latach położono szczególny nacisk na usprawnienie diagnostyki histochemicznej. Jedną ze stosowanych od kilkunastu lat metodą umożliwiającą ocenę wielu tkanek w krótkim czasie jest technika mikromacierzy tkankowych (tissue microarray - TMA). Została ona zaprojektowana w celu ułatwienia badania biomarkerów w materiałach tkankowych. Budowanie mikromacierzy polega na wprowadzeniu do pojedynczego bloku parafinowego wielu tkanek zarówno nowotworowych jak i kontrolnych, które następnie są oceniane łącznie, jako pojedynczy preparat mikroskopowy. Za pomocą TMA możemy dokonać oceny tkanek pod względem występowania markerów molekularnych związanych z powstawaniem nowotworów, ich progresją, rokowaniem czy możliwością wprowadzenia określonej terapii celowanej. Daje możliwość oceny tkanek pod względem ekspresji na poziomie genów (DNA/RNA) jak i obecności ich produktów białkowych (barwienia immunohistochemiczne). Największą zaletą TMA jest możliwość jednoczesnego przeprowadzania badań histopatologicznych materiału z wielu różnych próbek, pochodzących zarówno z nowotworów jak i tkanek kontrolnych, w identycznych warunkach, znacznie krótszym czasie i przy zastosowaniu istotnie mniejszych ilości odczynników. Ponadto analiza TMA może być skutecznie przeprowadzona nie tylko na tkankach pochodzących z bieżących badań, ale i na materiale archiwalnym pochodzącym z długiej obserwacji. Warto jednak mieć na uwadze, że TMA nie może być metodą referencyjnie stosowaną podczas oceniania typu histologicznego nowotworu [96–99].

Konstrukcja macierzy tkankowych polega na wprowadzeniu wyselekcjonowanych, reprezentatywnych rdzeni tkankowych pobranych z bloków macierzystych do specjalnie przygotowanego bloku parafinowego (Ryc.4.) [96]. W niniejszej pracy z każdego bloku tkankowego, igłą o średnicy 1 mm, pobierano co najmniej dwa rdzenie tkankowe, z lokalizacji oddalonych od siebie o co najmniej 1mm [100–102]. Rdzenie następnie były wprowadzane do bloku w ściśle określonym miejscu. Tak przygotowane bloki TMA były cięte przy zastosowaniu mikrotomu, skrawki o grubości 4µm umieszczane były na płytkach,

pobrane tkanki poddawane barwieniom immunohistochemicznym, a następnie barwione były hematoksyliną oraz eozyną.

Podczas konstruowania mikromacierzy tkankowych z preparatów nowotworowych należy pamiętać o heterogennej budowie guzów. Często możemy wyróżnić w nowotworach obszary nie tylko o różnym utkaniu histologicznym, ale i różniące się ekspresją genów [97,99,100].



Ryc. 4. Technika konstruowania mikromacierzy tkankowych (szczegóły w tekście).

Źródło: Opracowanie własne.

4.2 BARWIENIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE

Oznaczenia immunohistochemiczne wykonano w okresie od lutego do kwietnia 2015 w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Fragmety guzów odnaleziono w archiwum preparatów Katedry i Zakładu Patomorfologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Dostarczono je do laboratorium w postaci bloczków parafinowych, z których następnie przygotowano mikromacierze tkankowe. Tak uzyskany materiał skrajany był na preparaty o grubości około 4 μm i umieszczany na szkiełkach podstawnych.

Barwienia immunohistochemiczne wykonano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych zgodnie z zaleceniami producenta (Tab. 3.). W kierunku obecności receptora estrogenowego α użyto króliczego przeciwciała monoklonalnego (klon EP1, w rozcieńczeniu 1:50; Dako)

przeznaczonego do półilościowej oceny ludzkiego receptora estrogenowego. Do barwień w kierunku receptora progesteronowego zastosowano mysie przeciwciała monoklonalne (klon PgR 636, Ready-to-use, w rozcieńczeniu 1:50; Dako) przeznaczone do półilościowej detekcji receptora progesteronowego metodami laboratoryjnymi w ludzkich tkankach. W kierunku receptora androgenowego zastosowano mysie przeciwciała monoklonalne (klon AR 441, izotyp: IgG1k, w rozcieńczeniu 1:800; Dako) dedykowane przeciw ludzkiemu receptorowi androgenowemu.

Receptor	Przeciwciało	Miejsce wiązania	System detekcyjny
RE α	EP1 (Dako)	epitop N-końcowy	DAB
RP A i B	PgR 636 (Dako)	epitop N-końcowy	DAB
RA	AR 441(Dako)	epitop N-końcowy	DAB

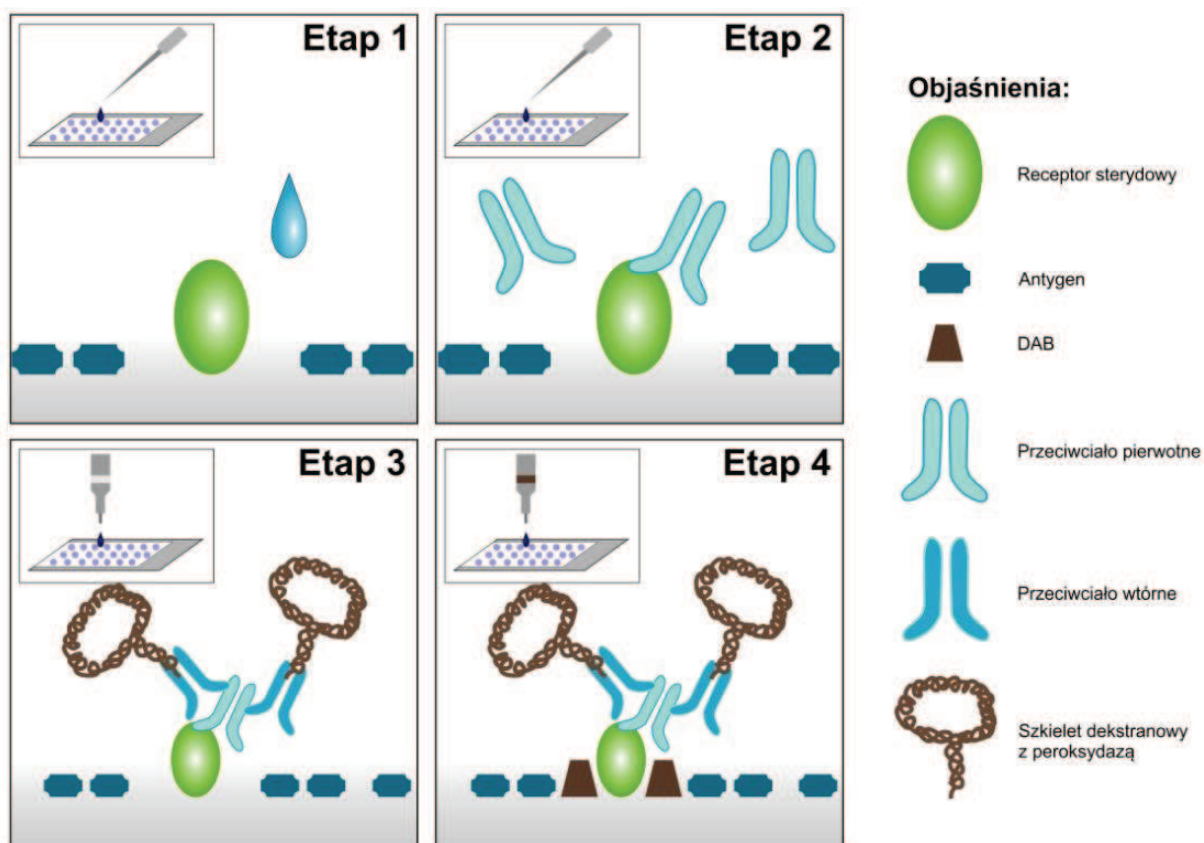
Tab. 3. Przeciwciała monoklonalne użyte podczas barwienia immunohistochemicznego.

W odniesieniu do receptora estrogenowego alfa i progesteronowego jako kontroli dodatniej używano tkanek raka piersi o wcześniej potwierdzonej ekspresji receptorów. W odniesieniu do receptora androgenowego jako kontroli dodatniej używano tkanek otrzymanych z gruczołu krokowego. Przygotowane mikromacierze zawierały od 36 do 81 rdzeni pobranych z tkanek nowotworowych i kontrolnych. Na każdą przygotowaną płytkę TMA przypadają 4 rdzenie kontrolne. Wszystkie barwienia immunohistochemiczne płytek TMA wykonano jednocześnie. Barwienie w preparatach kontrolnych podczas wszystkich oznaczeń było właściwe.

Preparaty pozbawiono parafiny poprzez trzykrotne zanurzenie w ksylenie, a następnie ponownie je uwodniono poprzez zanurzenie kolejno w roztworach alkoholu etylowego o malejących stężeniach (99%, 96%, 70%). Następnie szkiełka przepłukano w wodzie destylowanej i umieszczano w buforze. Następnym etapem było cieplne odmaskowanie miejsc wiązania przeciwciał pierwotnych poprzez inkubację preparatów w wysokiej temperaturze.

Procedurę barwienia rozpoczęto od zablokowania w preparatach aktywności endogennej peroksydazy buforem fosforanowym zawierającym nadtlenuk wodoru i detergent (Ryc. 5. Etap 1). Następnie na przepłukane buforem preparaty nakrapiano odpowiednie przeciwciała (Ryc. 5. Etap 2). Barwienie w kierunku receptora estrogenowego i progesteronowego wykonywane było automatycznie natomiast barwienie w kierunku receptora androgenowego wykonano ręcznie. W wypadku barwienia w kierunku receptora estrogenowego α stosowano królicze przeciwciała EP1. Barwienie w kierunku receptora progesteronowego związane było z zastosowaniem mysich przeciwciał PgR 636. Wzmocnienie ich sygnału uzyskiwano poprzez dodanie buforowanego roztworu zawierającego białko stabilizujące i środek antybakteryjny. Barwienie w kierunku receptorów androgenowych przeprowadzane było również przy zastosowaniu przeciwciał mysich AR441 w temperaturze 4°C przez 12 godzin.

W kolejnym etapie barwienia zastosowano systemy wizualizacyjne pod postacią przeciwciał wtórnych przeciwko immunoglobulinom króliczym oraz mysim związanym odpowiednio z receptorami estrogenowymi oraz progesteronowymi i androgenowymi. Przeciwciała wtórne były osadzone na szkielecie dekstranowym polimerów wraz z peroksydazą chrzanową - HRP (Ryc. 5. Etap 3). W ostatnim etapie uzyskiwano brązowe zabarwienie preparatu w miejscach występowania receptorów rozpoznawanych przez przeciwciała pierwotne. Wybarwienie otrzymywano poprzez dwukrotne płukanie preparatów roztworem zawierającym związki diaminobenzyny – DAB (Ryc. 5. Etap 4). Preparaty pomiędzy poszczególnymi etapami barwienia były przepłukiwane roztworem soli buforowanym Tris (Dako). W celu uzyskania kontrastu, zgodnie z zalecaniem, wykonano barwienia hematoksyliną. Tak wybarwione mikromacierze tkankowe zostały poddane utrwalaniu.



Ryc. 5. Technika wykonania barwień immunohistochemicznych (opis w tekście).

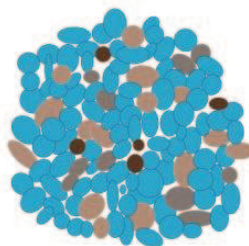
Źródło: Dako, ER/PR pharmDx™ Interpretation Manual, 2007; Zmienione.

Ocena stanu receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego została dokonana na podstawie skal Allred, H-score (dla progu odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele przez dwóch niezależnych patomorfologów (dr n. med. Piotr Czapiewski i lek. Adam Gorczyński - Katedra i Zakład Patomorfologii, GUMed). Wybarwione preparaty były porównywane z równocześnie wykonanymi kontrolami dodatnią i ujemną.

Interpretacja barwienia w skali H-score uwzględnia łączny odsetek wybarwionych komórek w zależności od siły uzyskanego barwienia. Przykładową ocenę schematycznego preparatu przedstawia Ryc. 6.. Na ocenę końcową składa się suma wielokrotności procentu komórek wybarwionych na każdym z trzech poziomów, gdzie wynik ostateczny zawiera się w zakresie od 0 do 300. W zależności od preparatów poddawanych ocenie stosowane są różne progi odcięcia dla pozytywnego wyniku barwienia (w niniejszej pracy >0 oraz ≥ 10).

Ocena procentowej składowej intensywności wybarwienia komórek

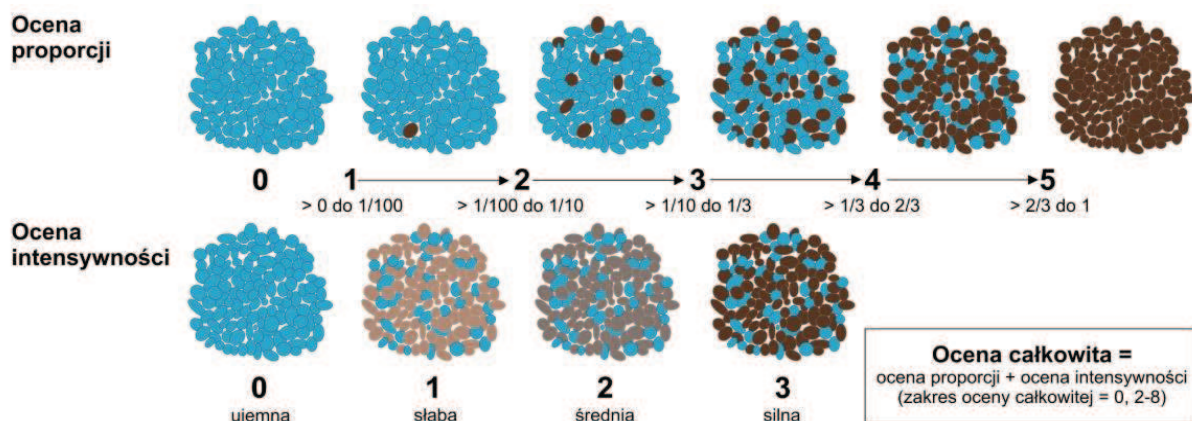
- 1 - słabo 15%
- 2 - średnio 10%
- 3 - silnie 5%



Ocena całkowita =
 $1 \times \dots\%$ słabo wybarwionych komórek +
 $2 \times \dots\%$ średnio wybarwionych komórek +
 $3 \times \dots\%$ silnie wybarwionych komórek
 (zakres oceny całkowitej = 0-300)

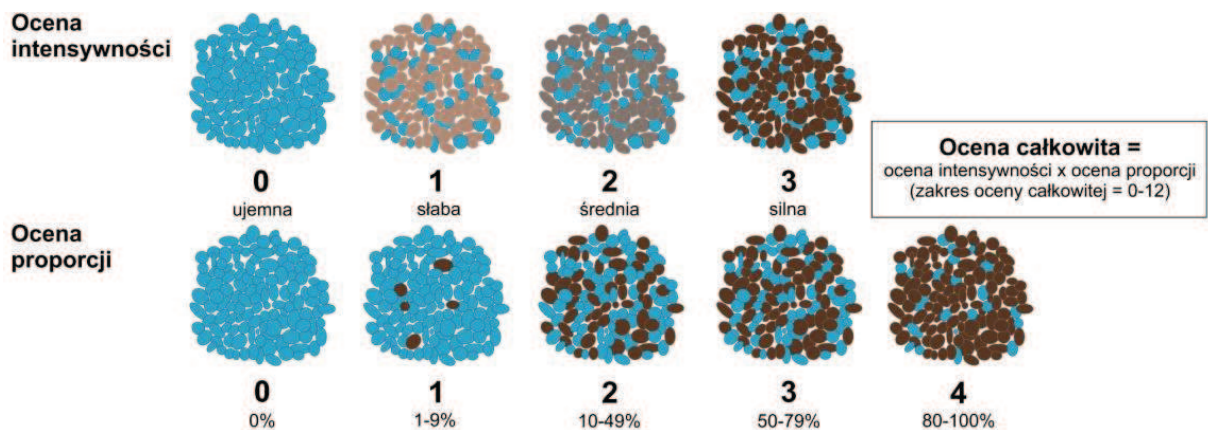
Ryc. 6. Schemat zastosowania skali H-score podczas oceny przykładowego preparatu.
 Źródło: Opracowanie własne.

W skali Allred ocenie podlega wybarwienie jąder komórek nowotworowych. Interpretacja obejmuje proporcję ilości wybarwionych do niewybarwionych komórek oraz intensywność barwienia. Wynik końcowy określany jest jako suma wyniku proporcji i intensywności barwienia. Szczegółowe stopnie skali Allred przedstawione są na Ryc. 7. Za dodatni wynik przyjmuje się sumaryczną ocenę wyższą lub równą 3.



Ryc. 7. Zasady oceniania barwienia immunohistochemicznego zgodnie ze skalą Allred.
 Źródło: Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol. 1998;11:155-68; za Dako, ER/PR pharmDx™ Interpretation Manual, 2007; Nieznacznie zmienione

Skala Remmele również uwzględnia proporcję ilości wybarwionych do niewybarwionych komórek oraz intensywność barwienia. Wynik końcowy otrzymywany jest po pomnożeniu stopnia intensywności barwienia oraz stopnia odpowiadającego odsetkowi wybarwionych komórek. Szczegółowe stopnie skali Remmele przedstawione są na Ryc. 8



Ryc. 8. Zasady oceniania barwienia immunohistochemicznego zgodnie ze skalą Remmele.
 Źródło: Opracowanie własne

W praktyce klinicznej, zgodnie z zaleceniami zawartymi w postanowieniach z St. Gallen z roku 2009, każda swoista reakcja barwna interpretowana jest jako wynik dodatni, a nasilenie odczynu nie jest brane pod uwagę.

4.3 ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną wyników badań immunohistochemicznych przeprowadzono w Zakładzie Medycyny Nuklearnej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W bazie danych zgromadzono informacje dotyczące: danych identyfikacyjnych chorego, daty urodzenia, płci, palenia papierosów, rozpoznania typu histopatologicznego nowotworu, stopnia jego zróżnicowania, stopnia zaawansowania klinicznego w skali TNM, daty i doszczętności zabiegu operacyjnego, czasu do nawrotu choroby oraz jego lokalizacji, daty ostatniej obserwacji lub zgonu, oceny ekspresji receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego zgodnie z punktacją skal Allred, H-score (dla prognozy odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele. Do analizy statystycznej została użyta punktacja zgodną ze skalą H-score.

Analizę jednoczynnikową przeprowadzono przy użyciu testu chi-kwadrat (χ^2) z poprawkami Pearson'a, NW, Yates'a i Fishera, w zależności od liczby chorych zakwalifikowanych do najmniej licznej analizowanej podgrupy. Podczas analizy określano zależność między występowaniem receptora estrogenowego, progesteronowego i androgenowego a cechami klinicznymi chorych. Przeprowadzono również wielokrotną analizę jednoczynnikową przy użyciu testu Kruskala-Wallisa. Dodatkowo wykonano analizę wieloczynnikową z zastosowaniem modelu regresji Coxa.

Czas przeżycia chorych liczono od momentu zabiegu operacyjnego do daty ostatniej obserwacji lub daty zgonu. Czas nawrotu choroby liczono od momentu zabiegu operacyjnego do chwili, w której pojawił się nawrót choroby, bądź do daty ostatniej obserwacji, gdy nie doszło do wznowy. Zarówno czas przeżycia jak i czas do nawrotu choroby wyrażono w miesiącach. Krzywe przeżycia sporządzono metodą Kaplana-Meiera i porównano za pomocą testu log-rank [103]. Próg istotności statystycznej ustalono na poziomie 0.05.

Analizę statystyczną ekspresji receptorów przeprowadzono przy użyciu programu Statistica v.10 - licencja akademicka Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

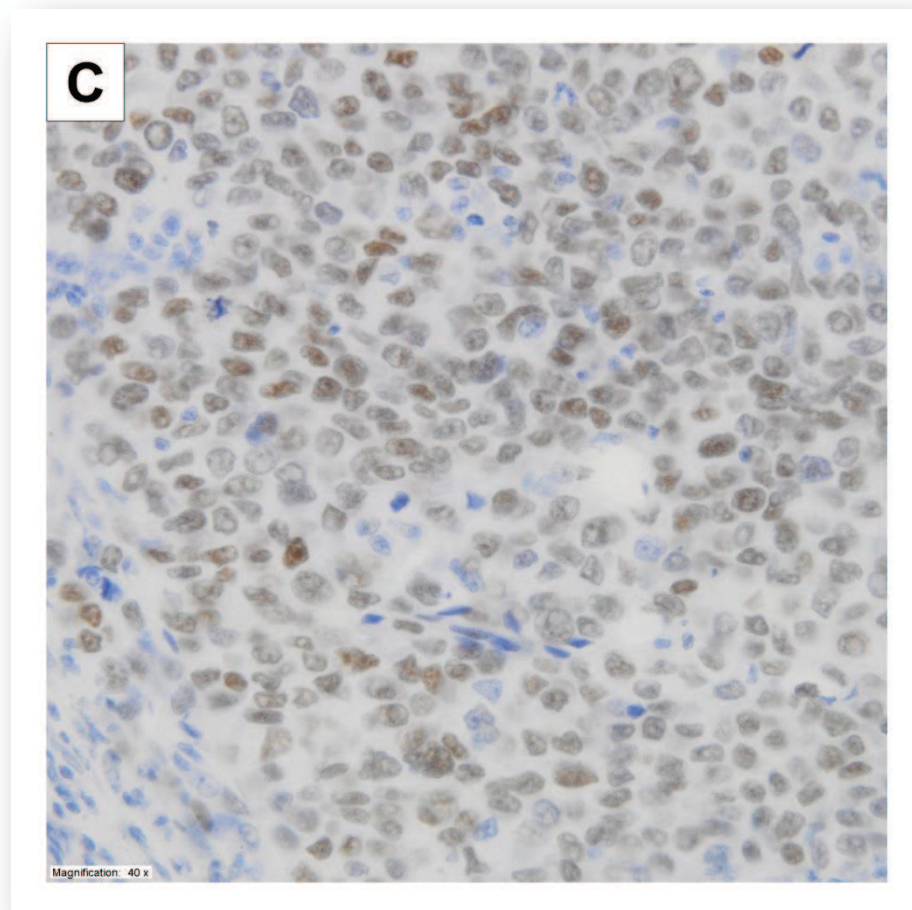
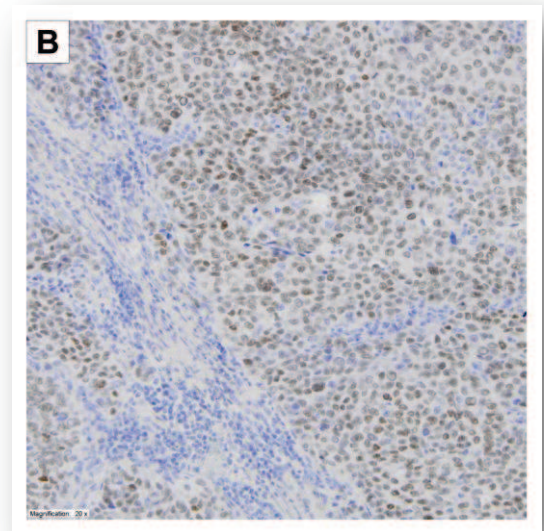
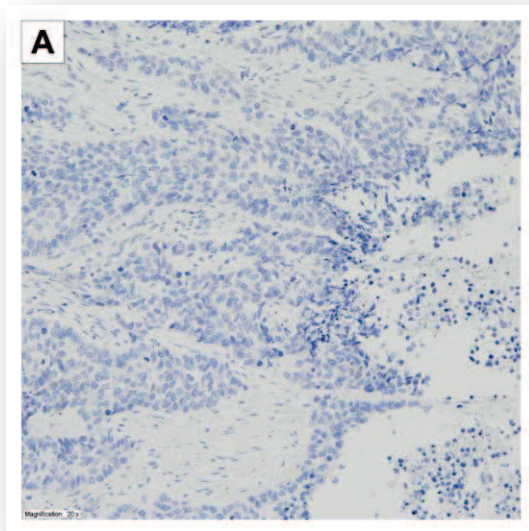
5.1 MIKROFOTOGRAFIE

Barwienie immunohistochemiczne zostało przeprowadzone na mikromacierzach tkankowych skonstruowanych w oparciu o 118 przypadków NDKRP i preparaty kontrolne. Barwienie immunohistochemiczne preparatów NDKRP oraz kontroli zarówno pozytywnych jak i negatywnych na wszystkich płytках TMA było właściwe.

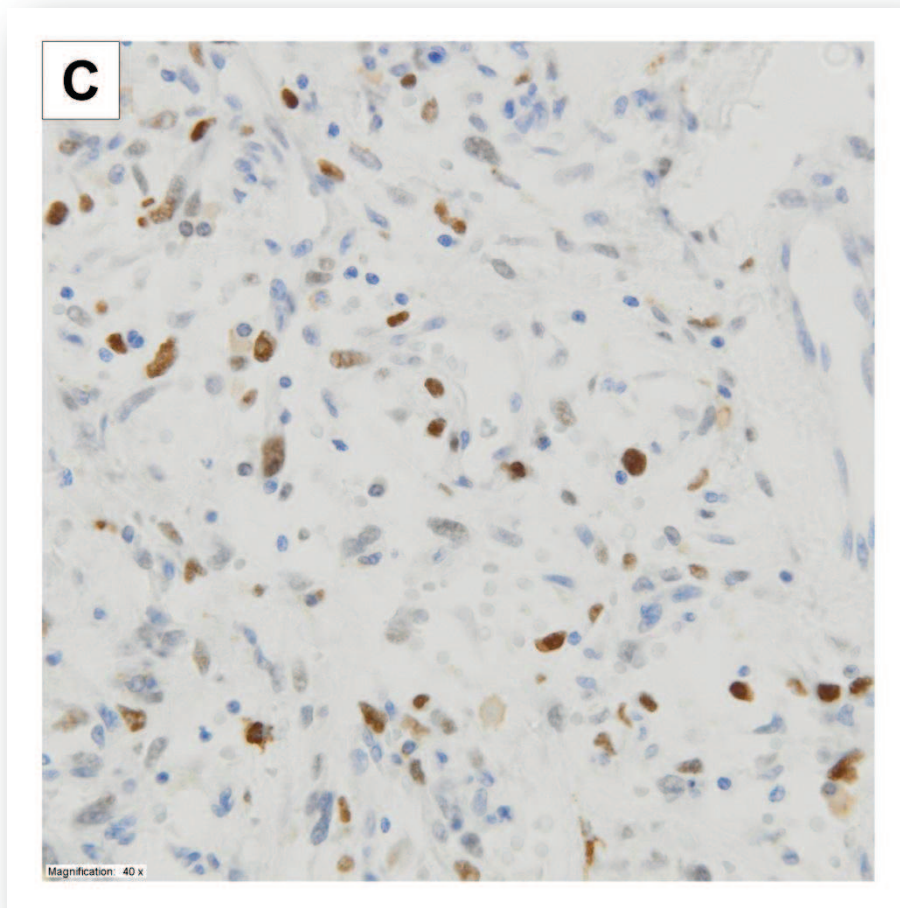
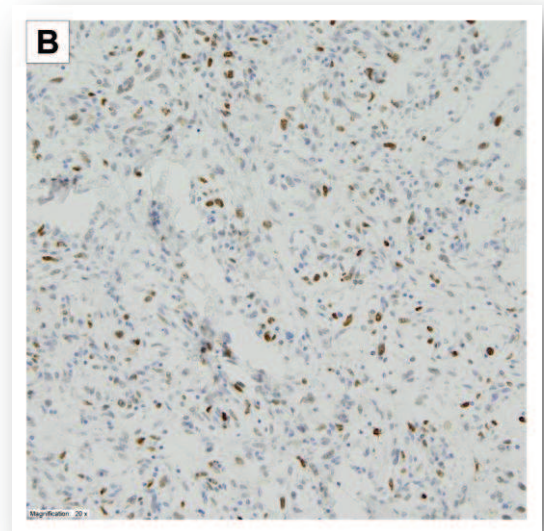
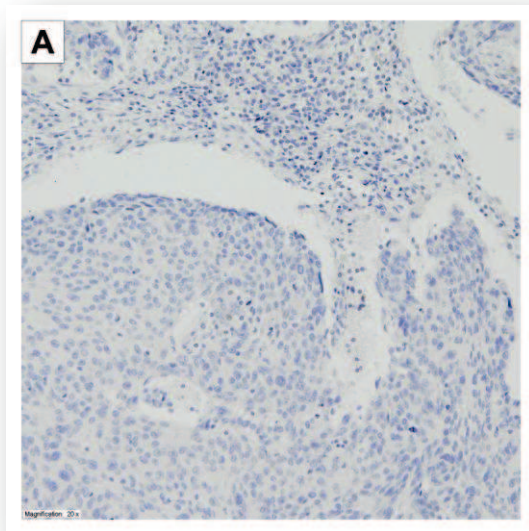
Ocena ekspresji receptora estrogenowego alfa (Ryc. 9.), progesteronowego (Ryc. 10.) i androgenowego (Ryc. 11.) została dokonana na podstawie skal Allred, H-score (dla progu odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele. Do dalszych analiz zastosowano ocenę nasilenia reakcji zgodną ze skalą H-score. Każdą jądrową reakcję barwną (próg odcięcia >0) przyjęto za wynik dodatni.

W wypadku NDKRP wykazującego jądrową ekspresję RE α , u chorego, którego stan zajęcia węzłów chłonnych określono jako N2, wykonano dodatkowe barwienie preparatu węzła chłonnego w kierunku tego receptora, otrzymując również dodatnią reakcję barwną (Ryc. 12.).

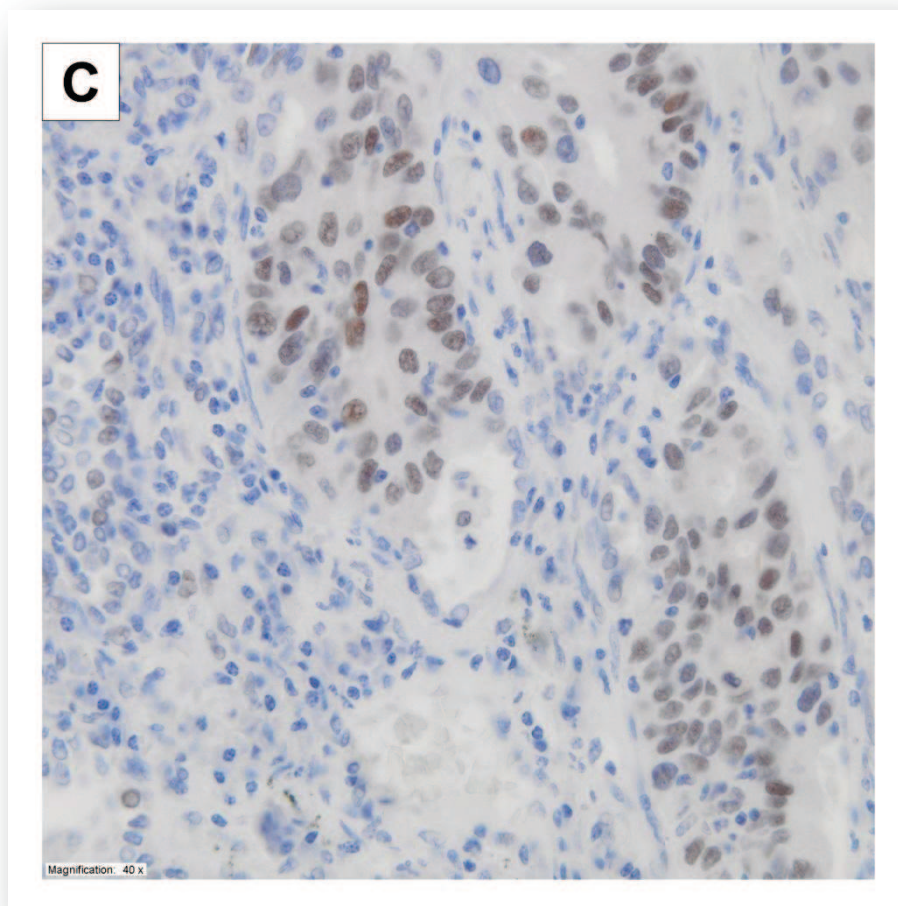
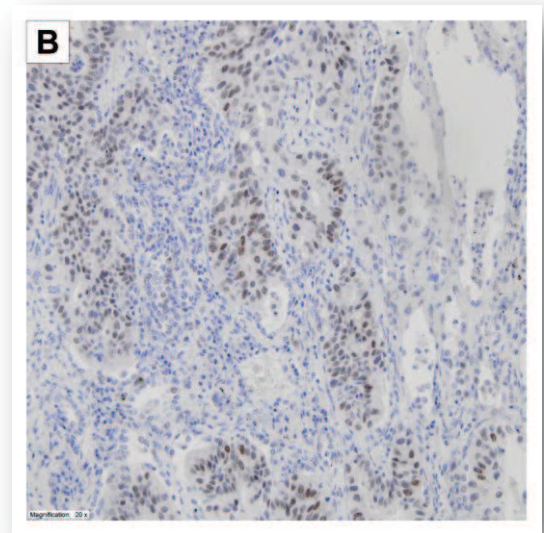
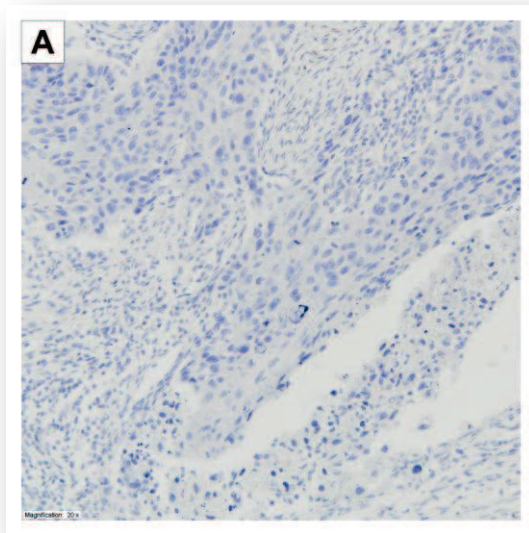
W komórkach NDKRP w wypadku receptora progesteronowego obserwowano również pozajądrową ekspresję (Ryc. 13.). W niniejszej pracy ocena tej cechy nie została włączona do analizy.



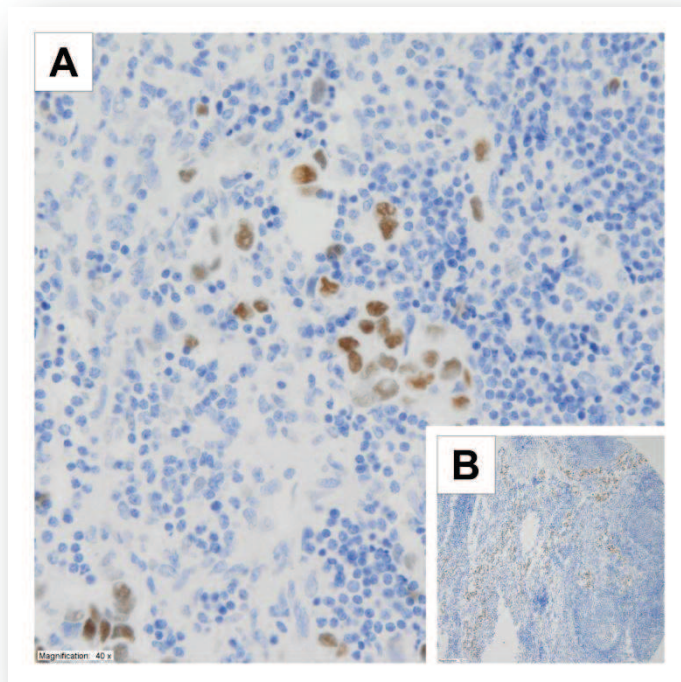
Ryc. 9. Negatywne barwienie preparatu NDKRP w kierunku receptora estrogenowego alfa (A) w powiększeniu x20 oraz pozytywne barwienie tego receptora w powiększeniu x20 i x40 (odpowiednio B i C).



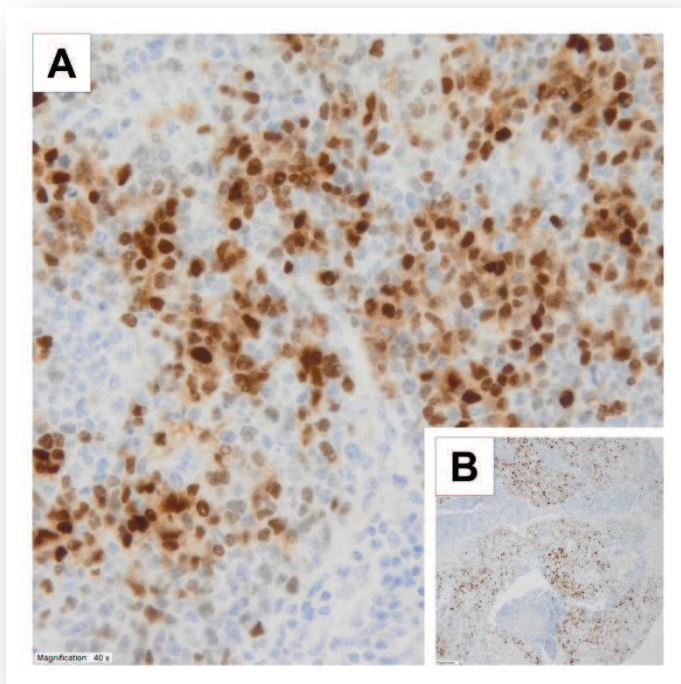
Ryc. 10. Negatywne barwienie preparatu NDKRP w kierunku receptora progesteronowego (A) w powiększeniu x20 oraz pozytywne barwienie tego receptora w powiększeniu x20 i x40 (odpowiednio B i C).



Ryc. 11. Negatywne barwienie preparatu NDKRP w kierunku receptora androgenowego (A) w powiększeniu x20 oraz pozytywne barwienie tego receptora w powiększeniu x20 i x40 (odpowiednio B i C).



Ryc. 12. Pozytywne barwienie w kierunku receptora estrogenowego alfa preparatu węzła chłonnego, w którym opisano zmiany przerzutowe, w wypadku NDKRP wykazującego ekspresję tego receptora w powiększeniu x40 i x10 (odpowiednio A i B).



Ryc. 13. Pozajądrowa ekspresja receptora progesteronowego w preparacie NDKRP w powiększeniu x40 i x10 (odpowiednio A i B).

5.2 WYNIKI BARWIEŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

Ocena ekspresji RE α , RP i RA została dokonana na podstawie skal Allred, H-score (dla progu odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele. Do dalszych analiz zastosowano ocenę nasilenia reakcji zgodną ze skalą H-score (Tab. 4.). Za wynik dodatni barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję receptorów (H-score >0) [104].

Ekspresję receptora estrogenowego alfa stwierdzono w 8 spośród 118 przypadków NDKRP poddanych analizie. W pozytywnie wybarwionych preparatach mediana ekspresji receptora estrogenowego oceniona w skali H-score wynosiła 15,5, podczas gdy średnia wynosiła 65 \pm 99. U dwóch mężczyzn stwierdzono bardzo wysoką wartość indeksu H-score, odpowiednio 145 i 280.

Ekspresję receptora progesteronowego stwierdzono u 20 chorych spośród 118 przypadków NDKRP poddanych analizie. W wybarwionych preparatach mediana ekspresji receptora progesteronowego wynosiła 3, podczas gdy średnia wynosiła 6,85 \pm 13. U jednego z mężczyzn stwierdzono wyższą wartość indeksu H-score (60) niż u pozostałych chorych prezentujących dodatnią ekspresję receptora progesteronowego.

Ekspresję receptora androgenowego stwierdzono w 44 spośród 118 przypadków NDKRP poddanych analizie. W pozytywnie wybarwionych preparatach mediana ekspresji receptora androgenowego oceniona w skali H-score wynosiła 4, podczas gdy średnia wynosiła 11 \pm 24. U jednego z mężczyzn stwierdzono znacznie wyższą wartość indeksu H-score (150) niż w przypadku pozostałych chorych z dodatnią ekspresją receptora androgenowego.

Cecha	RE α	RP	RA
Liczba chorych z ekspresją (%)	8 (7%)	20 (17%)	44 (37%)
mężczyźni	6 (6%)	16 (17%)	37 (39%)
kobiety	2 (9%)	4 (18%)	7 (32%)
Mediana ekspresji	15,5	3	4
Ekspresja minimalna	0	0	0
Ekspresja maksymalna	280	60	150

Tab. 4. Ekspresja receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w badanej grupie chorych (N=118).

5.3 EKSPRESJA RECEPTORÓW A CECHY KLINICZNE I DEMOGRAFICZNE

5.3.1 Receptor estrogenowy alfa

Ocena ekspresji receptora estrogenowego alfa została dokonana na podstawie skali Allred, H-score (dla progu odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele. Do dalszych analiz zastosowano ocenę nasilenia reakcji zgodną ze skalą H-score.

W badanej grupie 118 chorych w analizie χ^2 nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego alfa a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (uwzględniający klasyfikację pTNM), stopień zróżnicowania guza jak i nałóg palenia papierosów (Tab. 5.).

Cecha	RE α (-)	RE α (+)	p
Wiek			
≤60	48	1	0,17
>60	62	7	
Płeć			
mężczyźni	90	6	0,46
kobiety	20	2	
Stopień zaawansowania klinicznego			
In situ, IA i B	45	5	0,61
IIA i B	27	2	
IIIA	31	0	
IIIB/IV	7	1	
Postać histologiczna guza			
rak płaskonabłonkowy	59	8	0,02*
rak gruczołowy	35	0	
rak wielkokomórkowy	3	0	
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	13	0	
Stopień zróżnicowania guza			
G1	16	1	0,60
G2	65	6	
G3	29	1	
Nałóg palenia papierosów			
niepalący	4	0	0,32
< 30 paczkolet	37	1	
≥30 paczkolet	62	6	

Tab. 5. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2)(*wynik fałszywie dodatni).

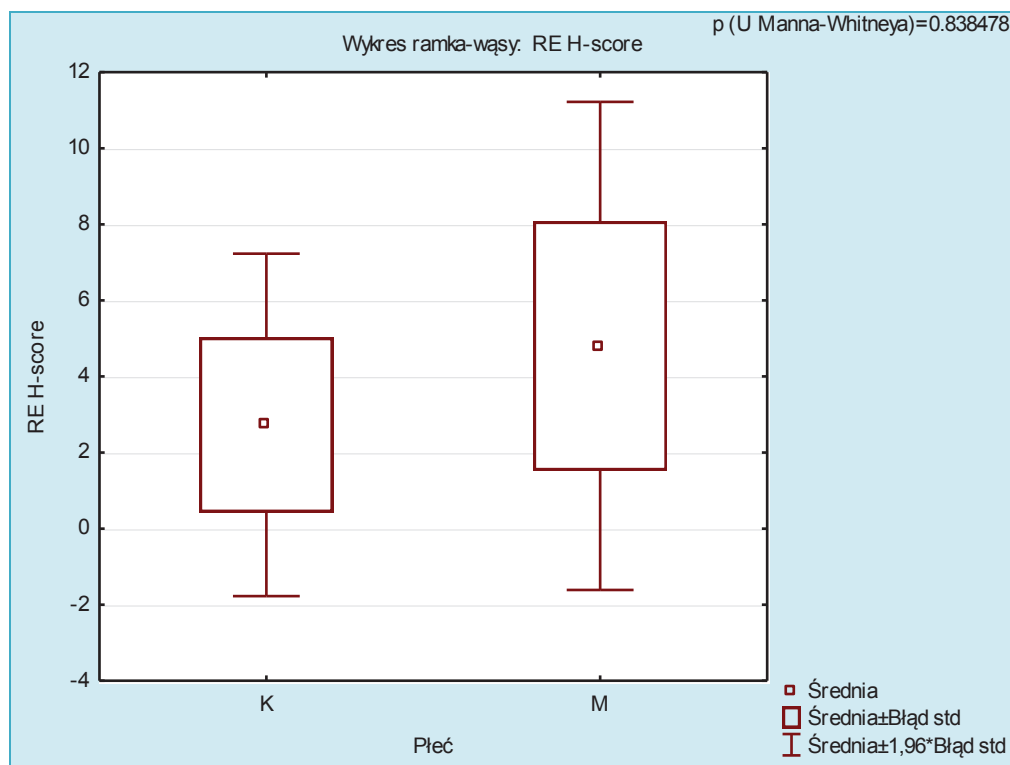
Wykazana zależność pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego alfa a rakiem płaskonabłonkowym wynika z braku ekspresji RE α u chorych z pozostałymi typami histologicznymi NDKRP, które miały niewielką liczbę przypadków. Wynik ten powinien być interpretowany jako fałszywie dodatni.

Ponadto w badanej grupie chorych w analizie χ^2 nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (uwzględniający klasyfikację pTNM), typ histologiczny nowotworu, stopień zróżnicowania guza jak i nałóg palenia papierosów (Tab. 6.). Do dalszych analiz za wynik dodatni barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję receptorów (H-score > 0).

Cecha	RE α <10	RE α ≥ 10	p
Wiek			
≤ 60	48	1	0,40
> 60	64	5	
Płeć			
mężczyźni	92	4	0,31
kobiety	20	2	
Stopień zaawansowania klinicznego			
In situ, IA i B	46	4	0,76
IIA i B	28	1	
IIIA	31	0	
IIIB/IV	7	1	
Postać histologiczna guza			
rak płaskonabłonkowy	61	6	0,07
rak gruczołowy	35	0	
rak wielkokomórkowy	3	0	
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	13	0	
Stopień zróżnicowania guza			
G1	16	1	0,86
G2	67	4	
G3	29	1	
Nałóg palenia papierosów			
niepalący	4	0	0,60
< 30 paczkolet	37	1	
≥ 30 paczkolet	64	4	

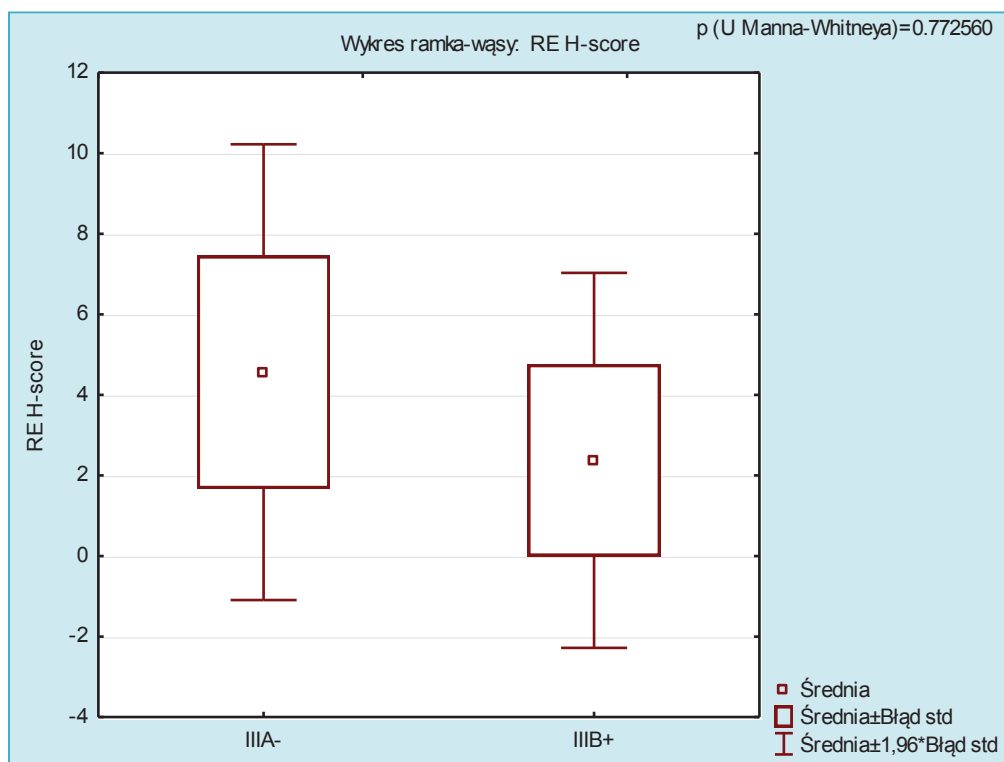
Tab. 6. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora estrogenowego alfa od płci. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego u kobiet i u mężczyzn. Średnia ekspresja receptora estrogenowego u kobiet wynosiła 2,3, a u mężczyzn 4,8 ($p=0,84$) (Ryc. 14.).



Ryc. 14. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w odniesieniu do płci chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

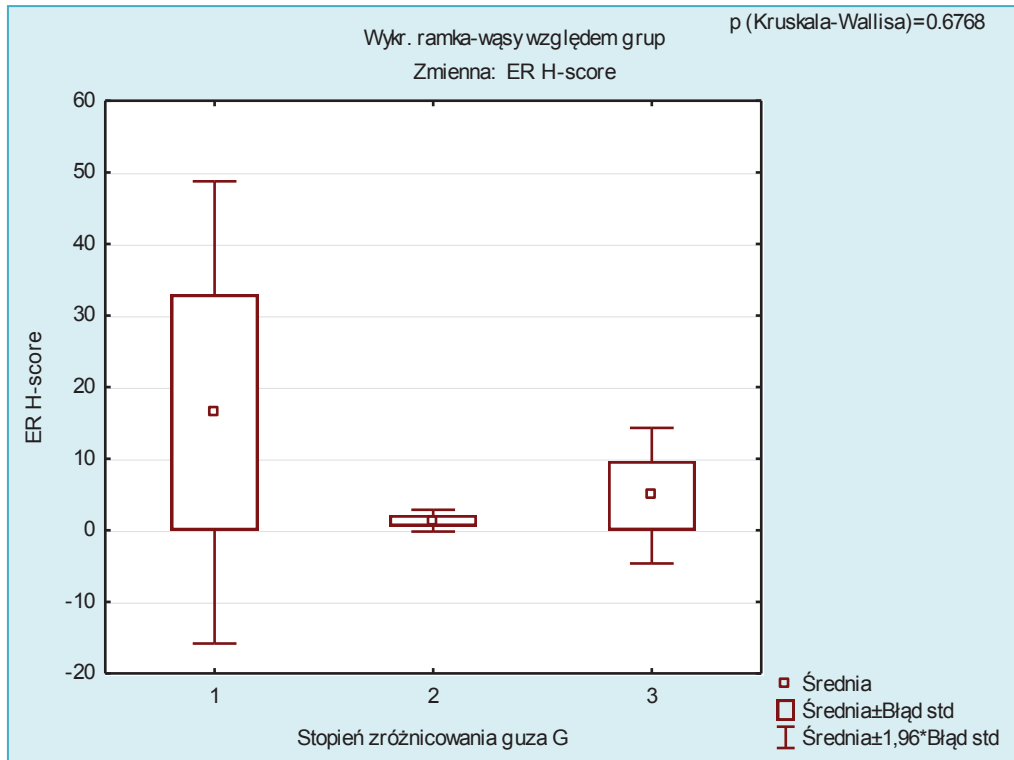
W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora estrogenowego alfa u chorych ze stopniem zaawansowania klinicznego niższym bądź równym IIIA oraz u chorych ze stopniem zaawansowania równym bądź wyższym od IIIB. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego u chorych ze stopniem zaawansowania niższym bądź równym IIIA oraz u chorych ze stopniem zaawansowania równym bądź wyższym od IIIB. Średnia ekspresja receptora estrogenowego w pierwszej grupie wynosiła 4,6, podczas gdy w drugiej grupie wynosiła 2,4 ($p=0,77$) (Ryc. 15.).



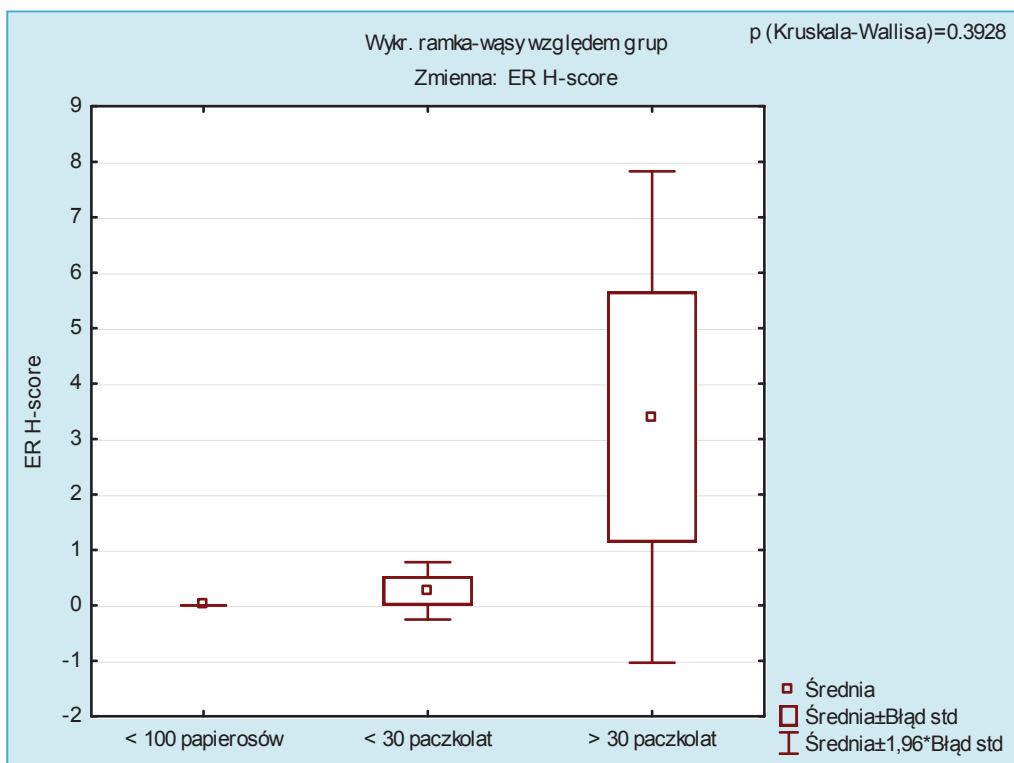
Ryc. 15. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora estrogenowego alfa od stopnia zróżnicowania guza. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa w guzach o stopniu zróżnicowania G1, G2, ani G3. Średnia ekspresja receptora estrogenowego w guzach w zależności od stopnia zróżnicowania wynosiła odpowiednio 16,5, 1,4 i 4,8 ($p=0,68$) (Ryc. 16.).

W badanej grupie 112 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora estrogenowego alfa od nałogu palenia papierosów. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa u chorych, którzy wypalili mniej niż 100 papierosów w ciągu życia, u chorych, którzy w mieli za sobą mniej niż 30 paczkołat oraz u chorych podających w wywiadzie więcej niż 30 paczkołat. Średnia ekspresja receptora estrogenowego alfa w podgrupach chorych w zależności od nałogu palenia papierosów wynosiła odpowiednio 0, 0,3 i 3,4 ($p=0,39$) (Ryc. 17.).



Ryc. 16. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w odniesieniu do stopnia zróżnicowania guza (N=118, test Kruskala-Wallis).



Ryc. 17. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w odniesieniu do nałogu palenia papierosów (N=112, test Kruskala-Wallis).

5.3.2 Receptor progesteronowy

Ocena ekspresji receptora progesteronowego została dokonana na podstawie skal Allred, H-score (dla progu odcięcia >0 oraz ≥10) i skali Remmele. Do dalszych analiz zastosowano ocenę nasilenia reakcji zgodną ze skalą H-score.

W badanej grupie 118 chorych w analizie χ^2 nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora progesteronowego a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (uwzględniający klasyfikację pTNM), typ histologiczny guza, stopień zróżnicowania guza jak i nałóg palenia papierosów (Tab. 7.).

Cecha	RP (-)	RP (+)	p
Wiek			
≤60	42	7	0.69
>60	56	13	
Płeć			
mężczyźni	80	16	0.53
kobiety	18	4	
Stopień zaawansowania klinicznego			
In situ, IA i B	45	5	0.23
IIA i B	24	5	
IIIA	23	8	
IIIB/IV	6	2	
Postać histologiczna guza			
rak płaskonabłonkowy	57	10	0.26
rak gruczołowy	26	9	
rak wielkokomórkowy	3	0	
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	12	1	
Stopień zróżnicowania guza			
G1	14	3	0.99
G2	59	12	
G3	25	1	
Nałóg palenia papierosów			
niepalący	3	1	0.09
< 30 paczkolet	36	2	
≥30 paczkolet	55	13	

Tab. 7. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

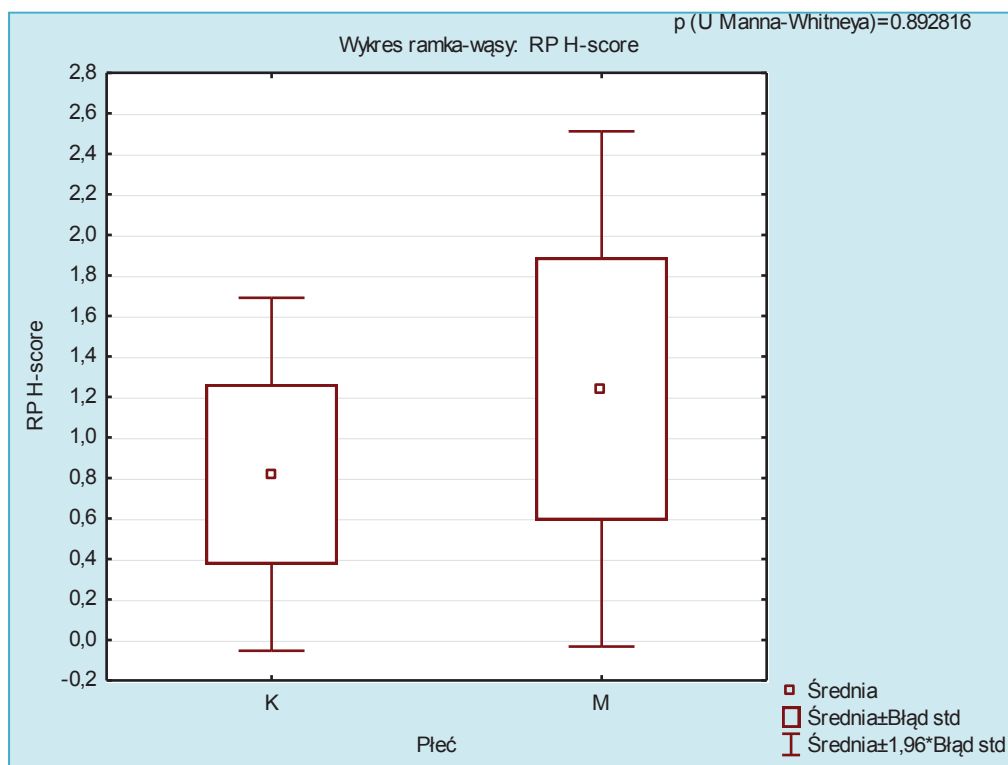
Ponadto w badanej grupie chorych w analizie χ^2 nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (uwzględniający klasyfikację pTNM), typ histologiczny nowotworu, stopień zróżnicowania guza jak i nałóg palenia papierosów (Tab. 8.). Do dalszych analiz za wynik dodatni barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję receptorów (H-score > 0).

Cecha	RP <10	RP ≥ 10	p
Wiek			
≤ 60	48	1	0.76
> 60	67	2	
Płeć			
mężczyźni	93	3	0.53
kobiety	22	0	
Stopień zaawansowania klinicznego			
In situ, IA i B	47	3	0.60
IIA i B	29	0	
IIIA	31	0	
IIIB/IV	8	0	
Postać histologiczna guza			
rak płaskonabłonkowy	64	3	0.33
rak gruczołowy	35	0	
rak wielkokomórkowy	3	0	
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	13	0	
Stopień zróżnicowania guza			
G1	16	1	0.59
G2	70	1	
G3	29	1	
Nałóg palenia papierosów			
niepalący	4	0	0.38
< 30 paczkolet	38	0	
≥ 30 paczkolet	66	2	

Tab. 8. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

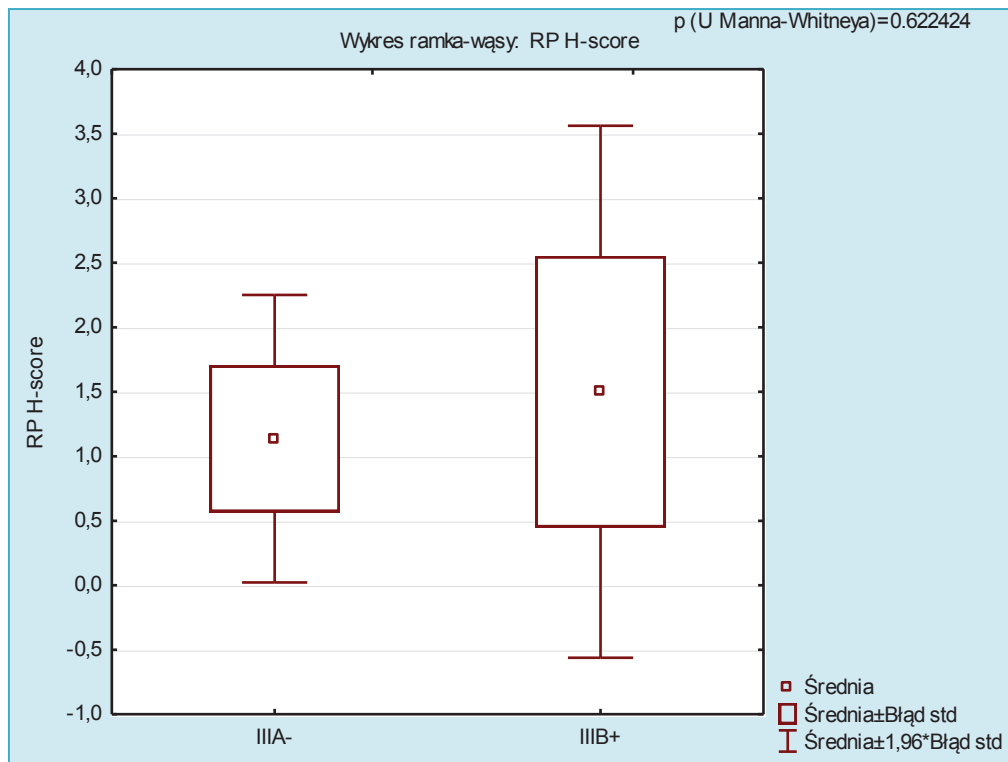
W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora progesteronowego od płci. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora

progesteronowego u kobiet i u mężczyzn. Średnia ekspresja receptora progesteronowego u kobiet wynosiła 0,8, a u mężczyzn 1,2 ($p=0,89$) (Ryc. 18.).



Ryc. 18. Ekspresja receptora progesteronowego w odniesieniu do płci chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

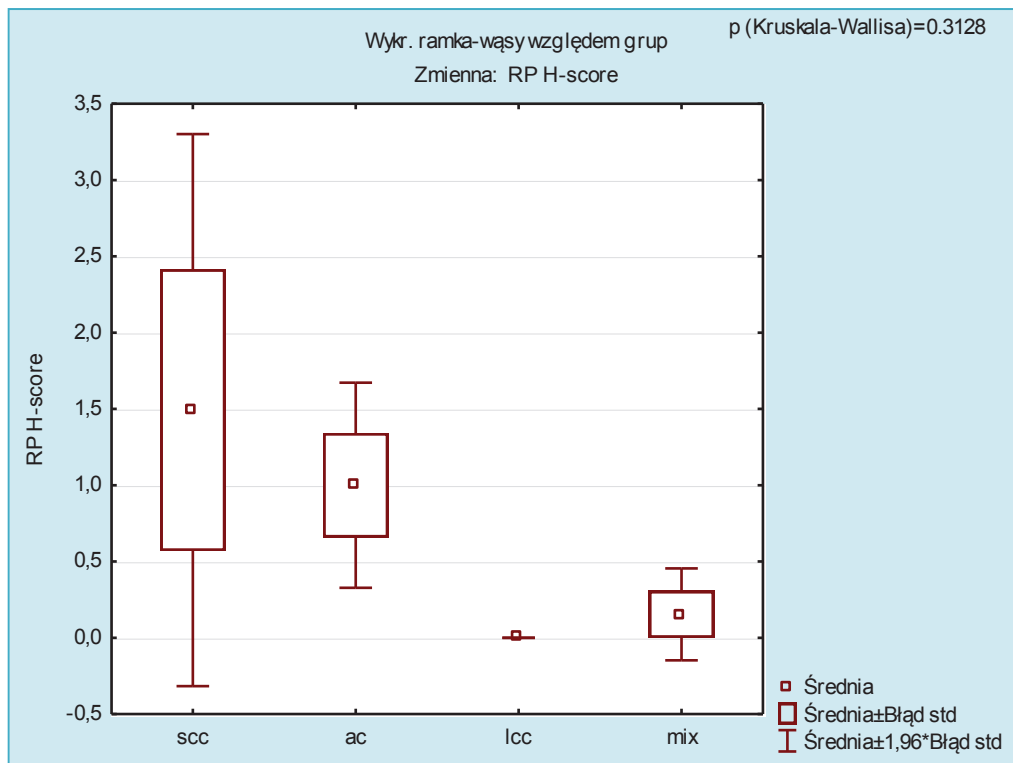
W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora progesteronowego u chorych ze stopniem zaawansowania klinicznego niższym bądź równym IIIA oraz u chorych ze stopniem zaawansowania równym bądź wyższym od IIIB. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora progesteronowego u chorych ze stopniem zaawansowania niższym bądź równym IIIA oraz u chorych ze stopniem zaawansowania równym bądź wyższym od IIIB. Średnia ekspresja receptora progesteronowego w pierwszej grupie wynosiła 1,1, podczas gdy w drugiej grupie wynosiła 1,5 ($p=0,62$) (Ryc. 19.).



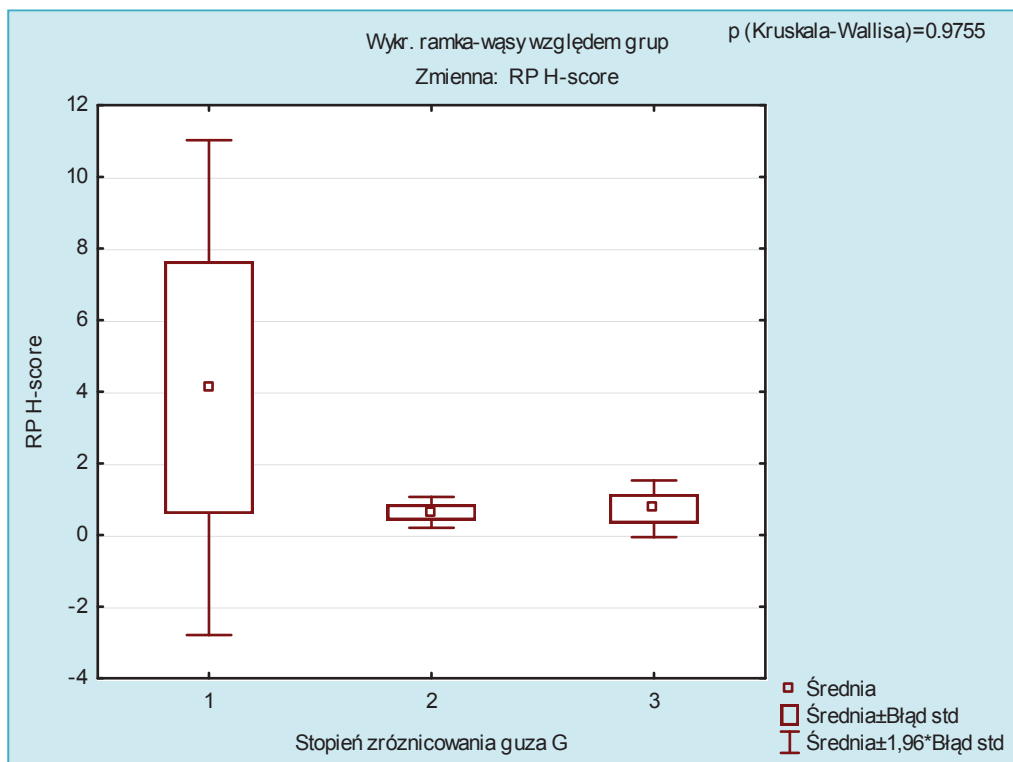
Ryc. 19. Ekspresja receptora progesteronowego w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora progesteronowego od typu histologicznego guza. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora progesteronowego pomiędzy podtypami histologicznymi NDKRP. Średnia ekspresja receptora progesteronowego w wypadku raka płaskonabłonkowego wynosiła 1,5, w raku gruczołowym wynosiła 1, w raku wielkokomórkowym wynosiła 0, a w raku o płaskonabłonkowo-gruczołowym 0,2 (p=0,31) (Ryc. 20.).

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora progesteronowego od stopnia zróżnicowania guza. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora progesteronowego w guzach o stopniu zróżnicowania G1, G2, ani G3. Średnia ekspresja receptora progesteronowego w guzach w zależności od stopnia zróżnicowania wynosiła odpowiednio 4,1, 0,6 i 0,7 (p=0,98) (Ryc. 21.).

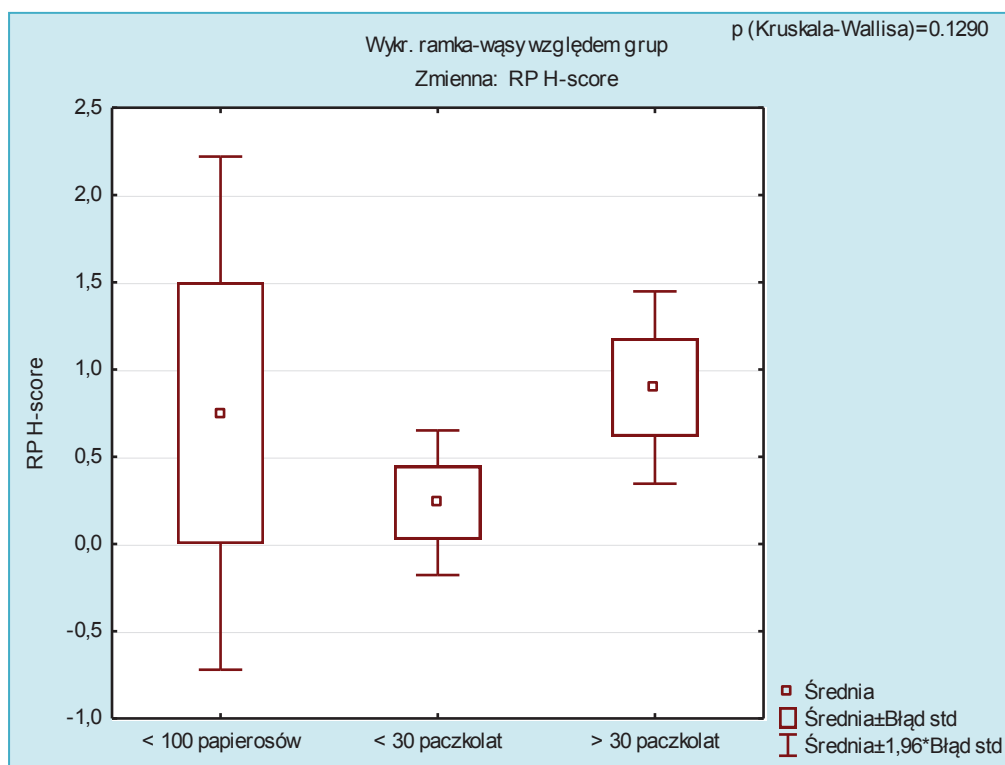


Ryc. 20. Ekspresja receptora progesteronowego w odniesieniu do typu histologicznego guza (N=118, test Kruskala-Wallis).



Ryc. 21. Ekspresja receptora progesteronowego w odniesieniu do stopnia zróżnicowania guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

W badanej grupie 112 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora progesteronowego od nałogu palenia papierosów. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora progesteronowego u chorych, którzy wypalili mniej niż 100 papierosów w ciągu życia, u chorych, którzy mieli za sobą mniej niż 30 paczkołat oraz u chorych podających w wywiadzie więcej niż 30 paczkołat. Średnia ekspresja receptora progesteronowego u chorych w zależności od nałogu palenia papierosów wynosiła odpowiednio 0,8, 0,2 i 0,9 ($p=0,13$) (Ryc. 22.).



Ryc. 22. Ekspresja receptora progesteronowego w odniesieniu do nałogu palenia papierosów (N=112, test Kruskala-Wallis).

5.3.3 Receptor androgenowy

Ocena ekspresji receptora androgenowego została dokonana na podstawie skal Allred, H-score (dla progu odcięcia >0 oraz ≥ 10) i skali Remmele. Do dalszych analiz zastosowano ocenę nasilenia reakcji zgodną ze skalą H-score.

W badanej grupie 118 chorych w analizie χ^2 nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora androgenowego a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (uwzględniający klasyfikację pTNM), typ histologiczny guza, stopień zróżnicowania guza jak i nałóg palenia papierosów (Tab. 9.).

Cecha	RA (-)	RA (+)	p
Wiek			
≤60	35	14	0.14
>60	39	30	
Płeć			
mężczyźni	59	37	0.37
kobiety	15	7	
Stopień zaawansowania klinicznego			
In situ, IA i B	33	17	0.26
IIA i B	13	16	
IIIA	22	9	
IIIB/IV	6	2	
Postać histologiczna guza			
rak płaskonabłonkowy	39	28	0.08
rak gruczołowy	21	14	
rak wielkokomórkowy	2	1	
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	12	1	
Stopień zróżnicowania guza			
G1	13	4	0.16
G2	46	25	
G3	15	15	
Nałóg palenia papierosów			
niepalący	2	2	0.19
< 30 paczkolet	29	9	
≥30 paczkolet	41	27	

Tab. 10. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

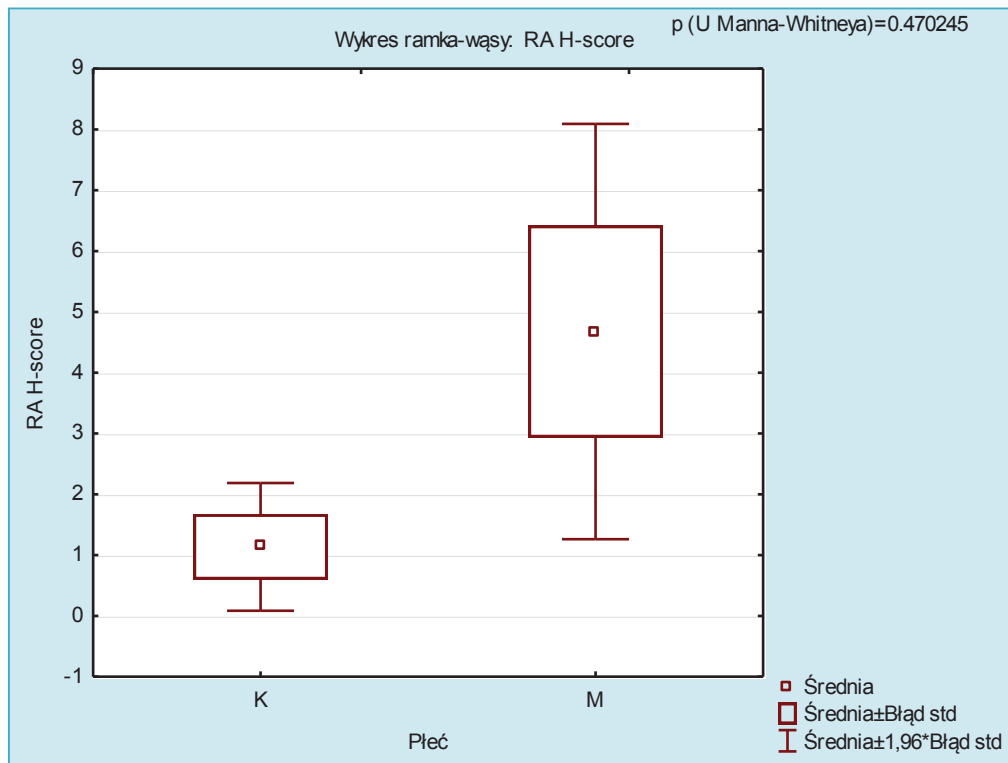
Ponadto w badanej grupie chorych w analizie χ^2 nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 a cechami

klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (uwzględniający klasyfikację pTNM), typ histologiczny nowotworu, stopień zróżnicowania guza jak i nałóg palenia papierosów (Tab. 10.). Do dalszych analiz za wynik dodatni barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję receptorów (H-score >0).

Cecha	RA <10	RA ≥10	p
Wiek			
≤60	44	5	0.95
>60	61	8	
Płeć			
mężczyźni	84	12	0.49
kobiety	21	1	
Stopień zaawansowania klinicznego			
In situ, IA i B	44	6	0.74
IIA i B	25	4	
IIIA	30	1	
IIIB/IV	8	0	
Postać histologiczna guza			
rak płaskonabłonkowy	60	7	0.97
rak gruczołowy	30	5	
rak wielkokomórkowy	3	0	
rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	12	1	
Stopień zróżnicowania guza			
G1	16	1	0.11
G2	66	5	
G3	23	7	
Nałóg palenia papierosów			
niepalący	4	0	0.27
< 30 paczkolet	37	1	
≥30 paczkolet	60	10	

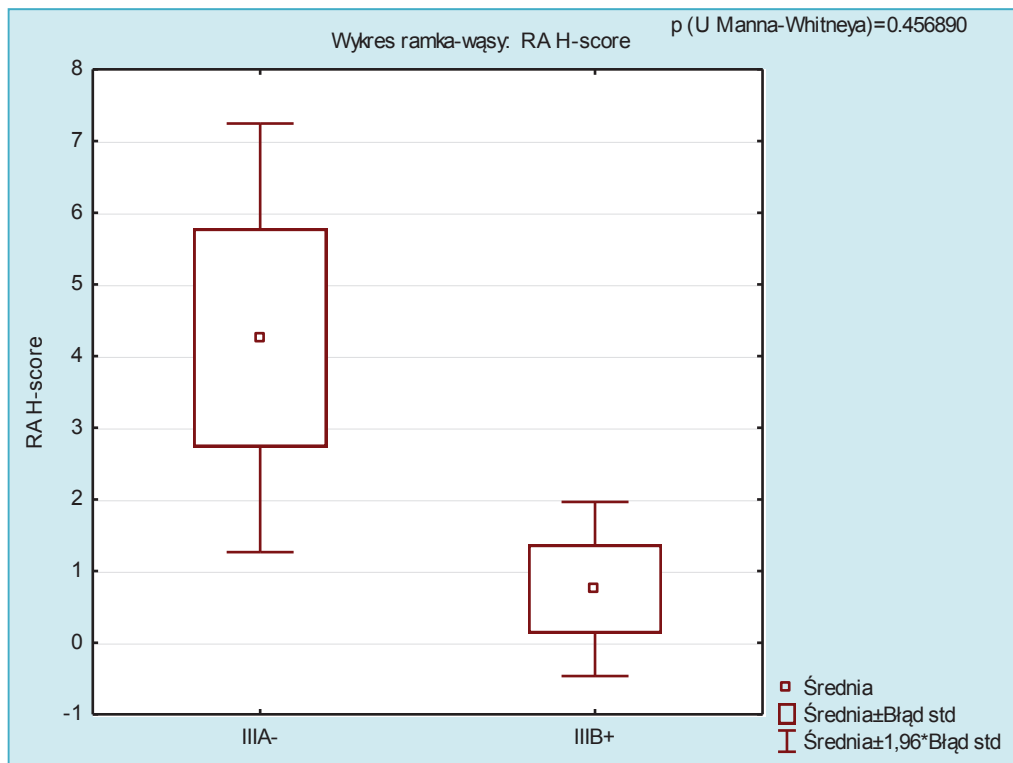
Tab. 10. Ekspresja receptora androgenowego w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora androgenowego od płci. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora androgenowego u kobiet i u mężczyzn. Średnia ekspresja receptora androgenowego u kobiet wynosiła 1,1, a u mężczyzn 4,7 (p=0,47) (Ryc. 23.).



Ryc. 23. Ekspresja receptora androgenowego w odniesieniu do płci chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

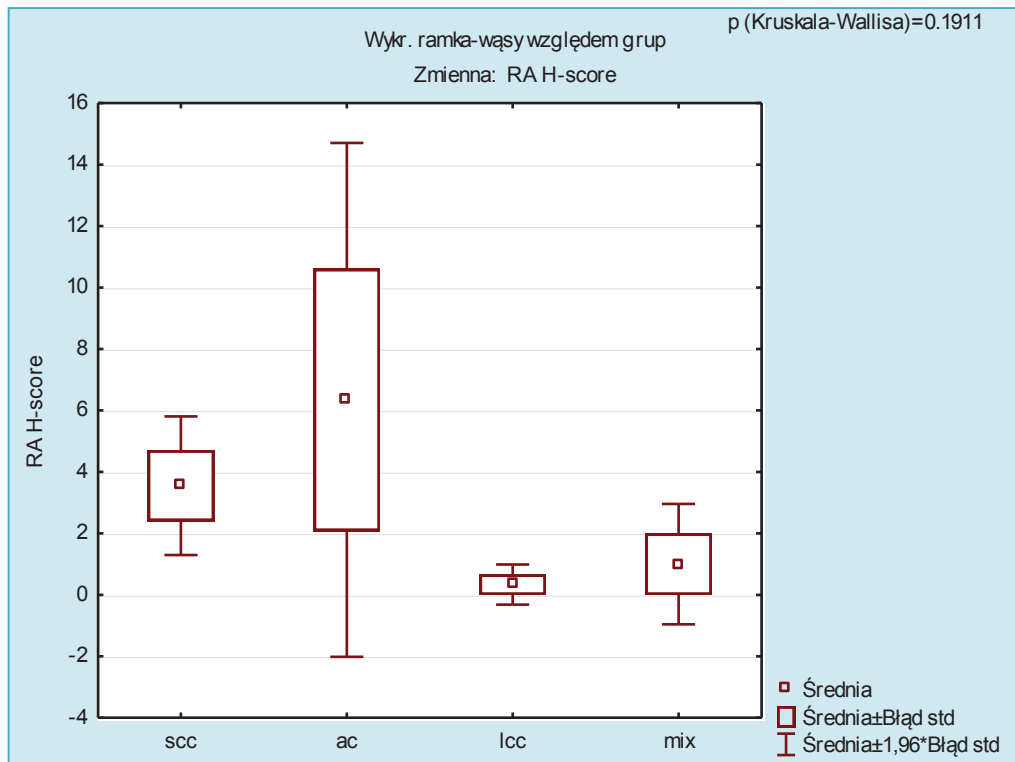
W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora androgenowego u chorych ze stopniem zaawansowania klinicznego niższym bądź równym IIIA oraz u chorych ze stopniem zaawansowania równym bądź wyższym od IIIB. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora androgenowego u chorych ze stopniem zaawansowania niższym bądź równym IIIA oraz u chorych ze stopniem zaawansowania równym bądź wyższym od IIIB. Średnia ekspresja receptora androgenowego w pierwszej grupie wynosiła 4,3, podczas gdy w drugiej grupie wynosiła 0,8 (p=0,46) (Ryc. 24.).



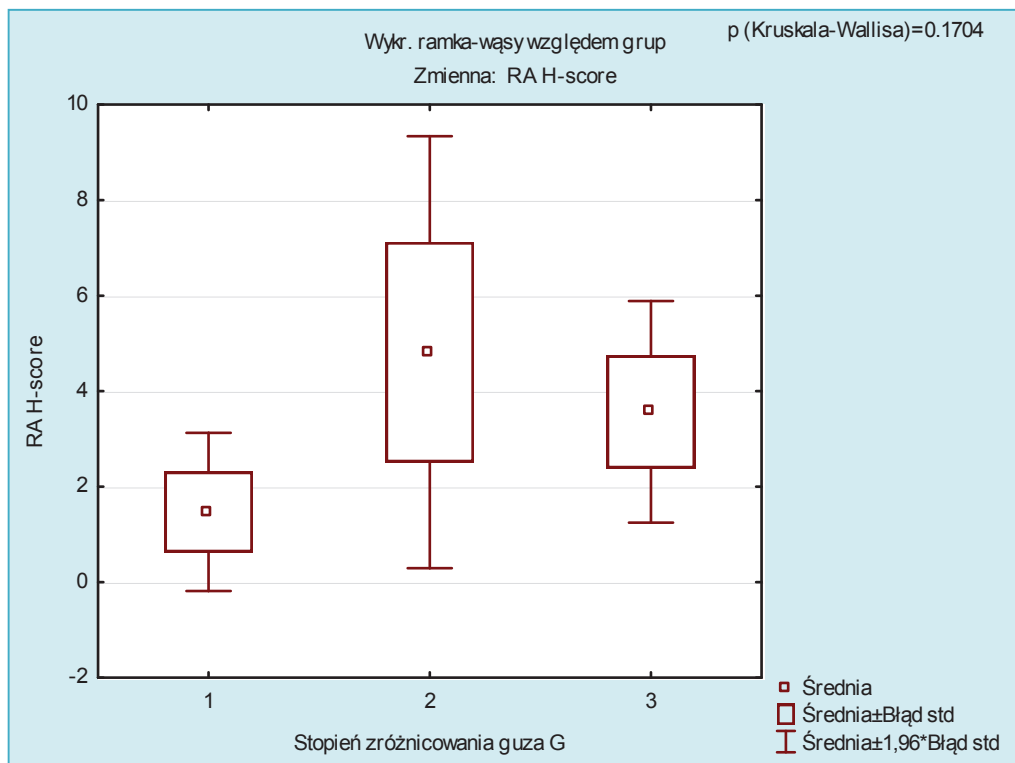
Ryc. 24. Ekspresja receptora androgenowego w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora androgenowego od typu histologicznego guza. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora androgenowego pomiędzy podtypami histologicznymi NDKRP. Średnia ekspresja receptora androgenowego w wypadku raka płaskonabłonkowego wynosiła 3,6, w raku gruczołowym wynosiła 6,3, w raku wielkokomórkowym wynosiła 0,3, a w raku płaskonabłonkowo-gruczołowym 1 (p=0,19) (Ryc. 25.)

W badanej grupie 118 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora androgenowego od stopnia zróżnicowania guza. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora androgenowego w guzach o stopniu zróżnicowania G1, G2, ani G3. Średnia ekspresja receptora androgenowego w guzach w zależności od stopnia zróżnicowania wynosiła odpowiednio 1,5, 4,8 i 3,6 (p=0,17) (Ryc. 26.).

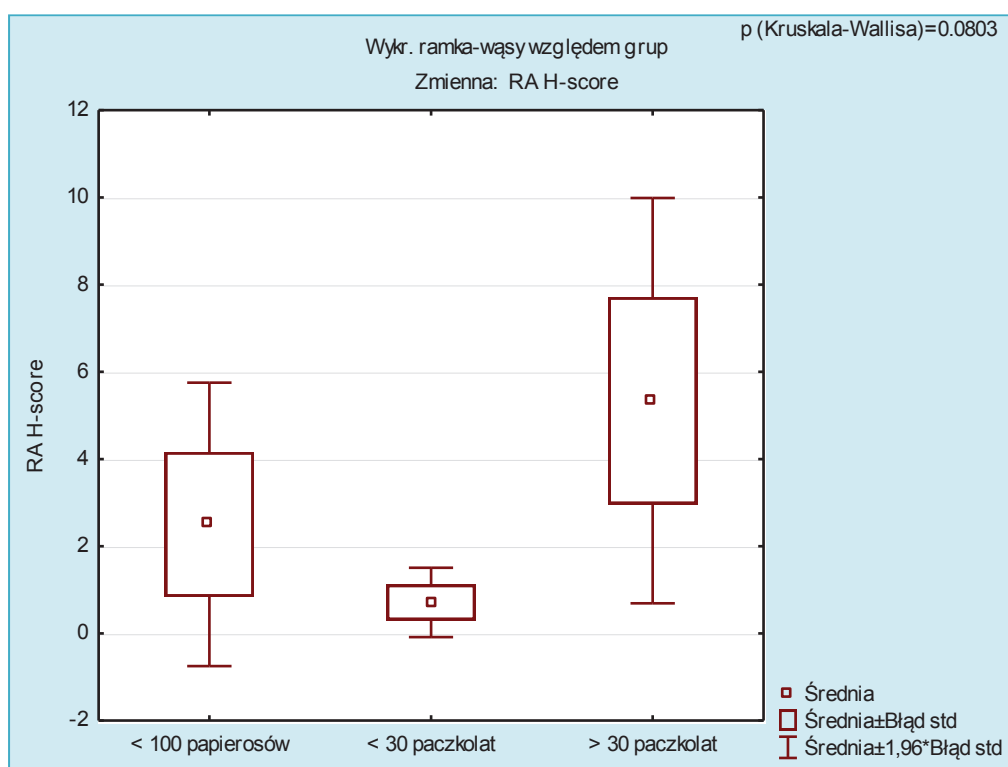


Ryc. 25. Ekspresja receptora androgenowego w odniesieniu do typu histologicznego guza (N=118, test Kruskala-Wallis).



Ryc. 26. Ekspresja receptora androgenowego w odniesieniu do stopnia zróżnicowania guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

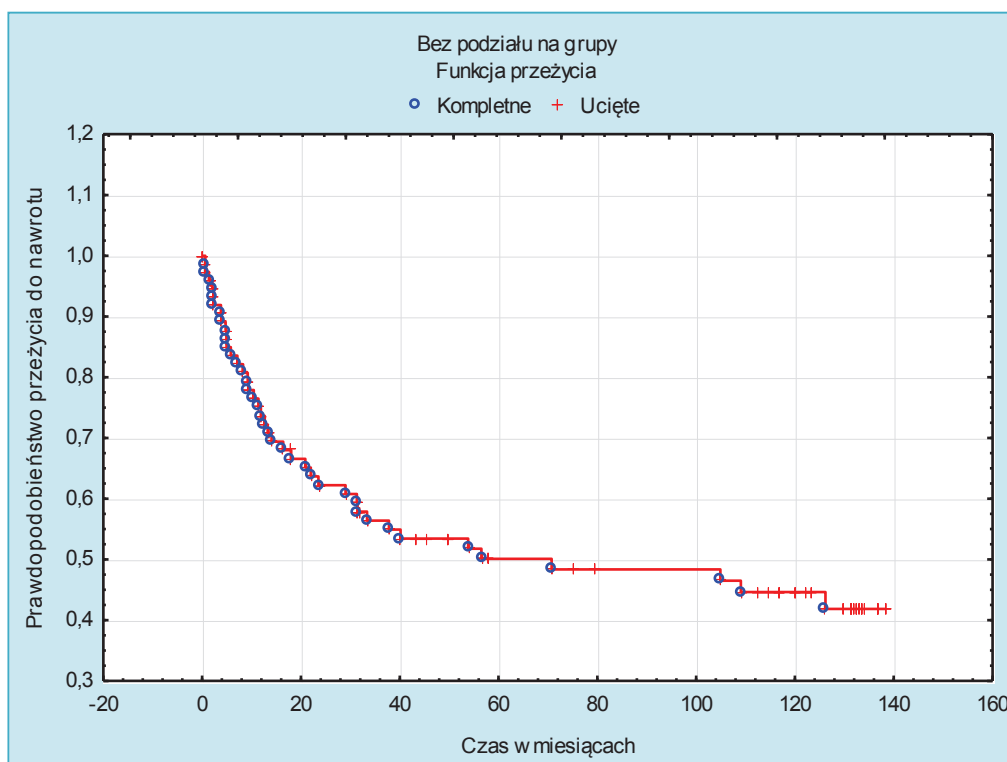
W badanej grupie 112 chorych poddano analizie zależność ekspresji receptora androgenowego od nałogu palenia papierosów. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora androgenowego u chorych, którzy wypalili mniej niż 100 papierosów w ciągu życia, u chorych, którzy w mieli za sobą mniej niż 30 paczkołat oraz u chorych podających w wywiadzie więcej niż 30 paczkołat. Średnia ekspresja receptora androgenowego w podgrupach chorych w zależności od nałogu palenia papierosów wynosiła odpowiednio 2,5, 0,7 i 5,3 ($p=0.08$) (Ryc. 27.).



Ryc. 27. Ekspresja receptora androgenowego w odniesieniu do nałogu palenia papierosów (N=112, test Kruskala-Wallis).

5.4 ANALIZA PRZEŻYĆ W BADANEJ GRUPIE CHORYCH

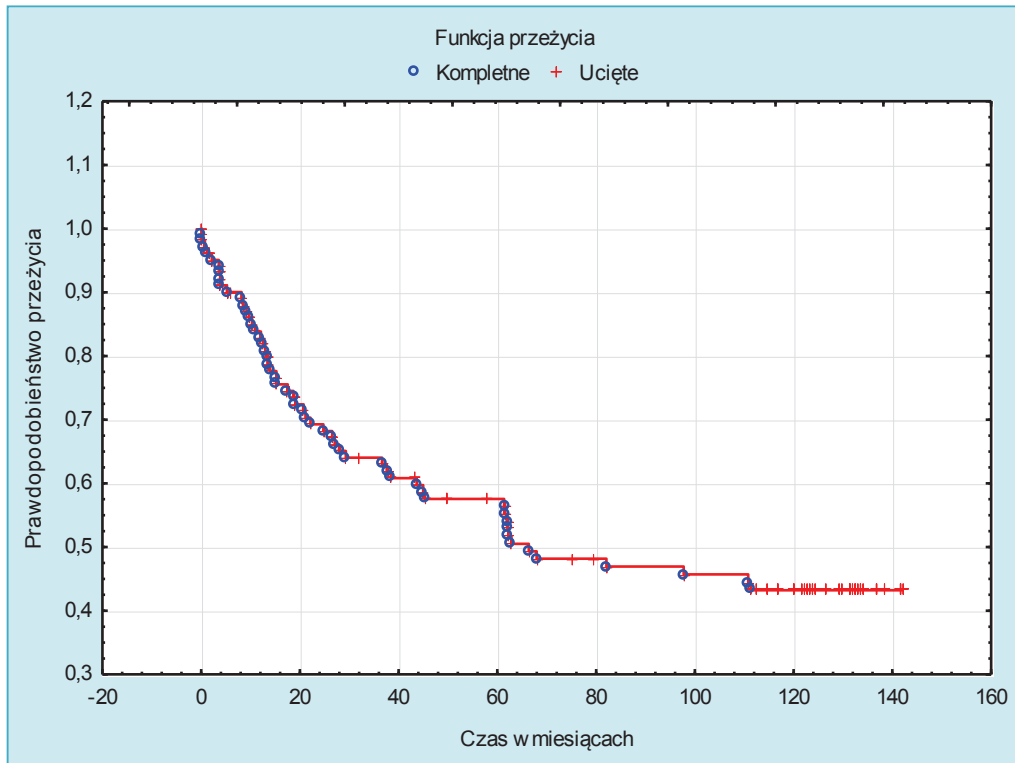
Analiza statystyczna została przeprowadzona dla 118 przypadków NDKRP w tym dla 22 kobiet i 96 mężczyzn. Mediana czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby w całej grupie wynosiła 56 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby wynosiło 49% (Ryc. 28.).



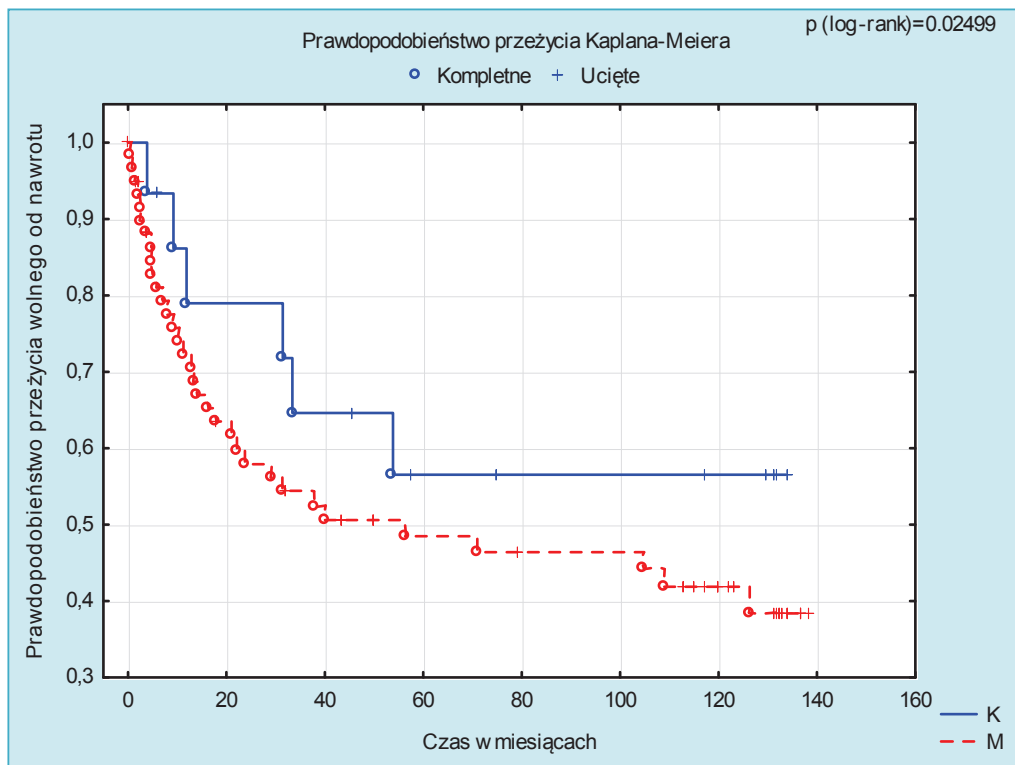
Ryc. 28. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u wszystkich chorych (N=118).

Mediana czasu przeżycia w całej grupie wynosiła 63 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosiło 56% (Ryc. 29.).

Mediana czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby dla kobiet i mężczyzn wynosiła odpowiednio 54 i 40 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby wynosiło odpowiednio 56% i 49% ($p=0,03$) (Ryc. 30.).



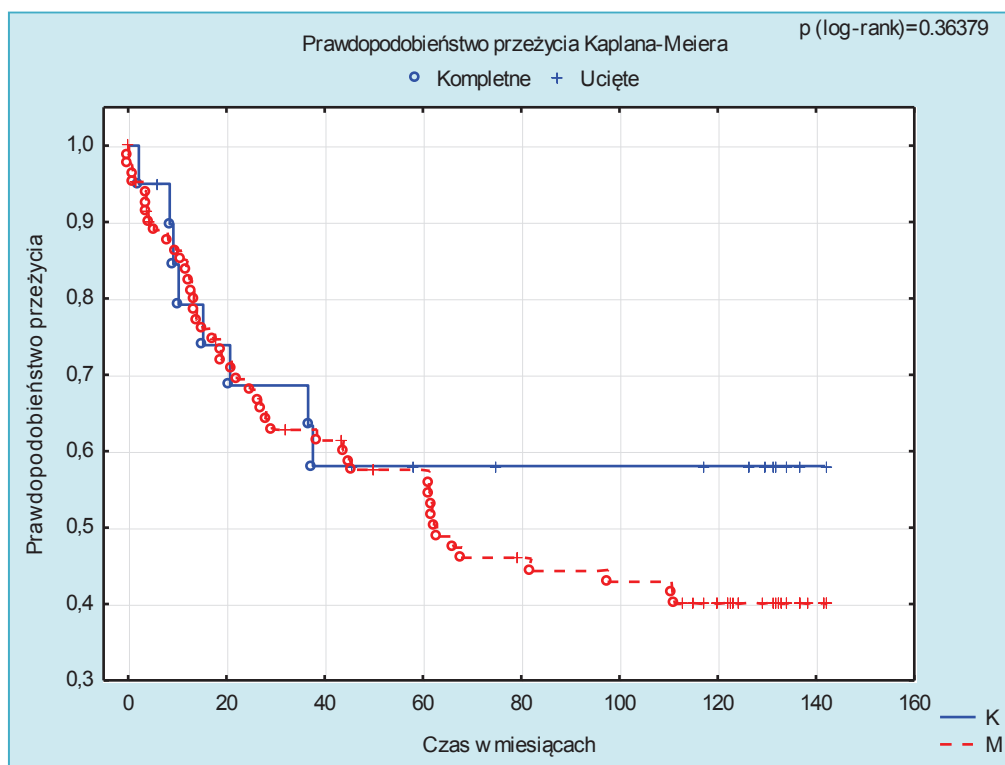
Ryc. 29. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyera u wszystkich chorych (N=118).



Ryc. 30. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u kobiet (N=22) w stosunku mężczyzn (N=96).

Mediana czasu przeżycia u kobiet i mężczyzn chorujących na NDKRP wynosiła około 38 i 62 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosiło około 58% oraz 56% ($p=0,36$) (Ryc. 31.)

Pomimo korzystnego wpływu płci żeńskiej na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby nie wykazano różnic w całkowitym czasie przeżycia pomiędzy analizowanymi podgrupami kobiet i mężczyzn.

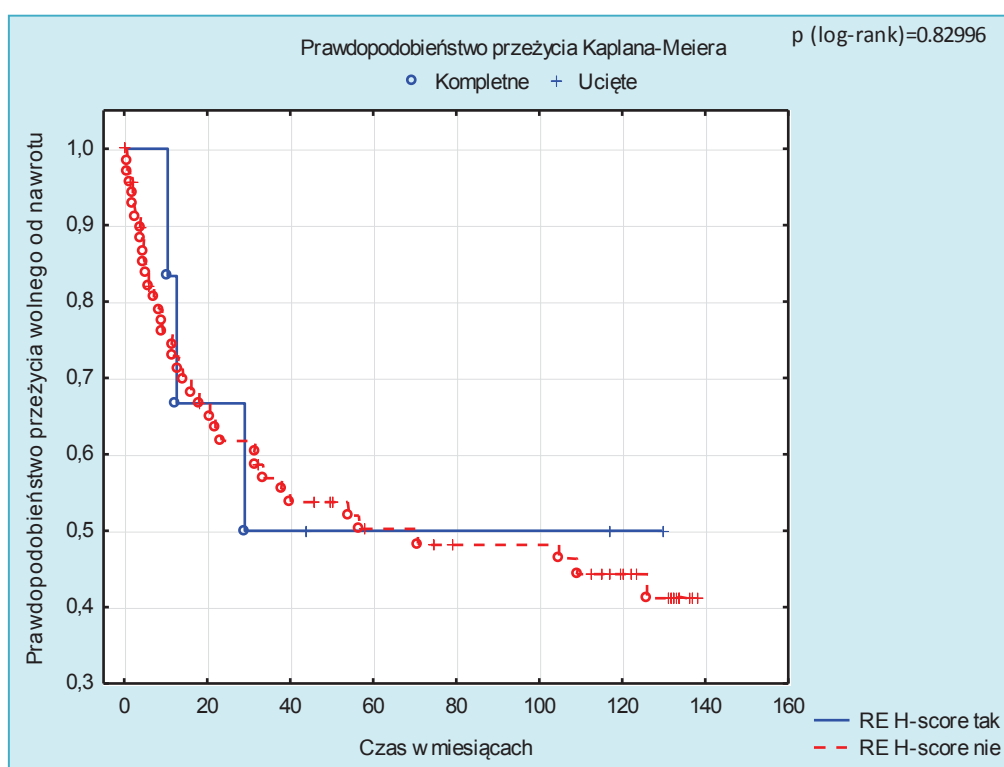


Ryc. 31. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u kobiet ($N=22$) w stosunku do mężczyzn ($N=96$).

5.5 ZNACZENIE ROKOWNICZE EKSPRESJI RECEPTORÓW

5.5.1 Receptor estrogenowy alfa

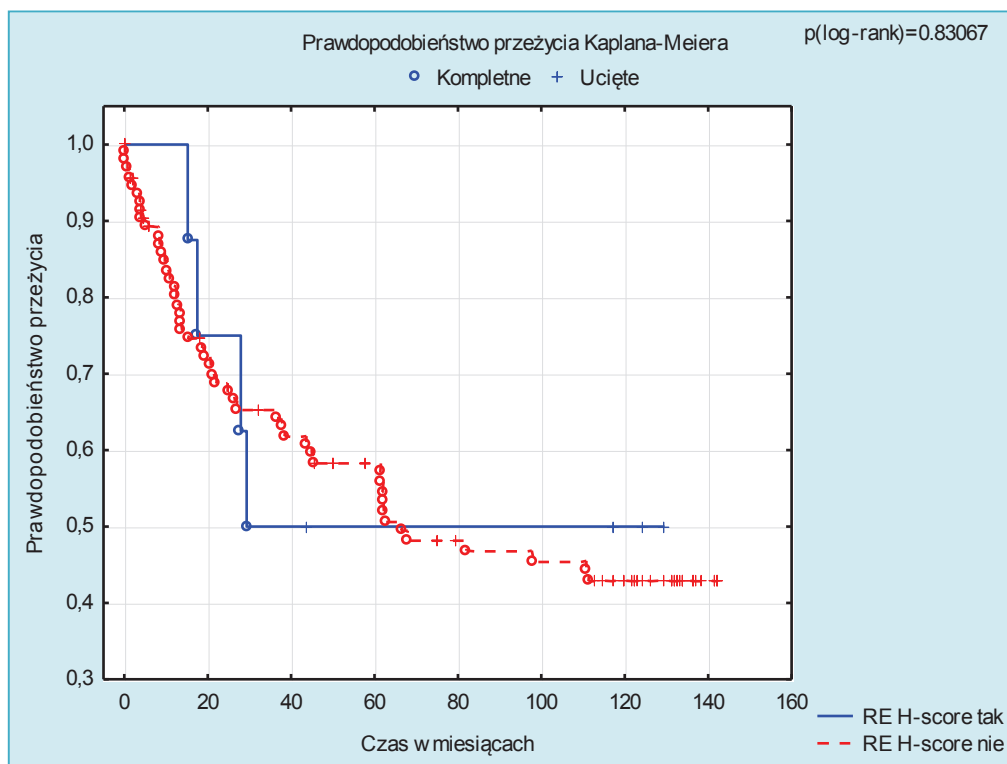
Mediana czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby dla chorych z dodatnią i ujemną ekspresją receptora estrogenowego alfa wynosiła odpowiednio 29 i 56 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby wynosiło odpowiednio 33% i 50% ($p=0,83$) (Ryc. 32.).



Ryc. 32. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora estrogenowego alfa ($N=6$) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora estrogenowego alfa ($N=112$).

Mediana czasu przeżycia chorych na NDKRP z dodatnią i ujemną ekspresją receptora estrogenowego alfa wynosiła odpowiednio 29 i 63 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosiło 32,5% oraz 57% ($p=0,83$) (Ryc.33.)

Nie stwierdzono różnicy w czasie przeżycia do nawrotu choroby oraz całkowitym czasie przeżycia pomiędzy analizowanymi podgrupami.



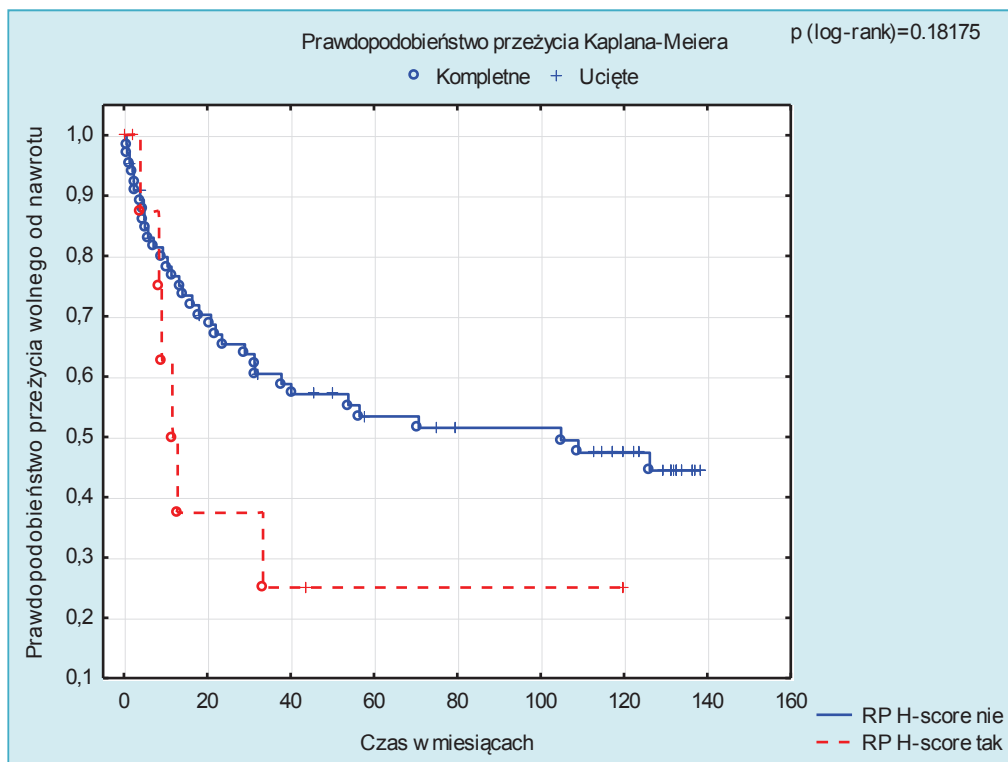
Ryc. 33. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora estrogenowego alfa (N=8) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora estrogenowego alfa (N=110).

5.5.2 Receptor progesteronowy

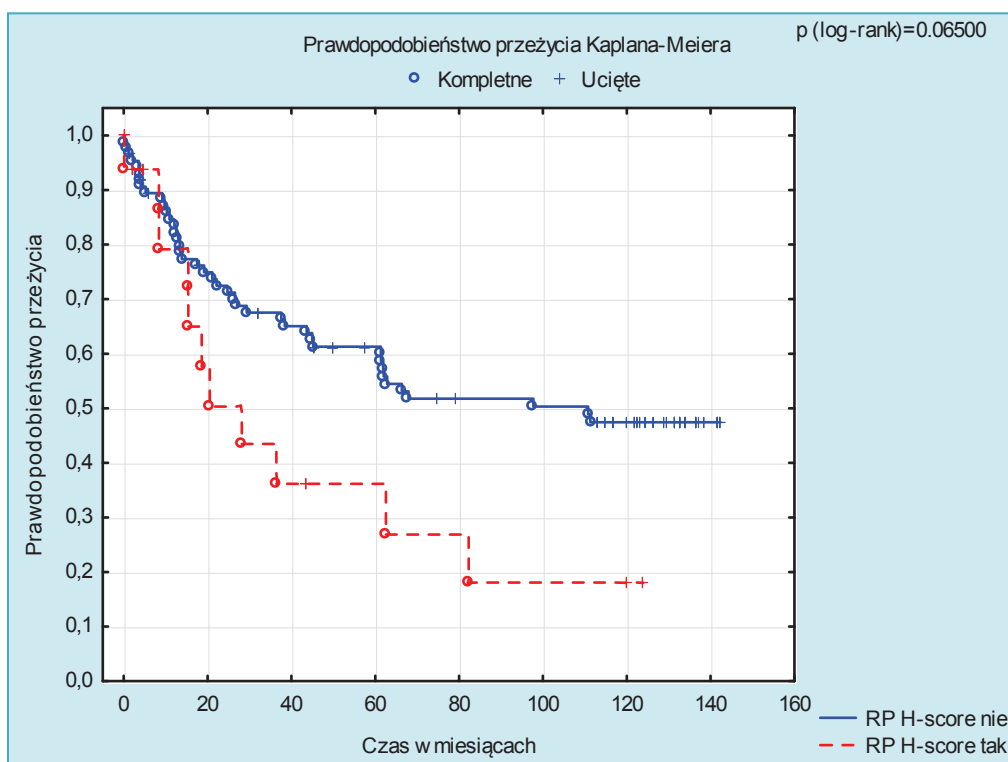
Mediana czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby dla chorych z dodatnią i ujemną ekspresją receptora progesteronowego wynosiła odpowiednio 12 i 71 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby wynosiło odpowiednio 12,5% i 53% (p=0,19) (Ryc.34.).

Mediana czasu przeżycia chorych na NDKRP z dodatnią i ujemną ekspresją receptora progesteronowego wynosiła odpowiednio 21 i 98 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosiło 27% oraz 60% (p=0,06) (Ryc.35.)

Nie stwierdzono różnicy w czasie przeżycia do nawrotu choroby pomiędzy analizowanymi podgrupami. Różnica całkowitego czasu przeżycia pomiędzy analizowanymi podgrupami wykazuje wartość graniczną, na niekorzyść chorych z ekspresją receptora progesteronowego.



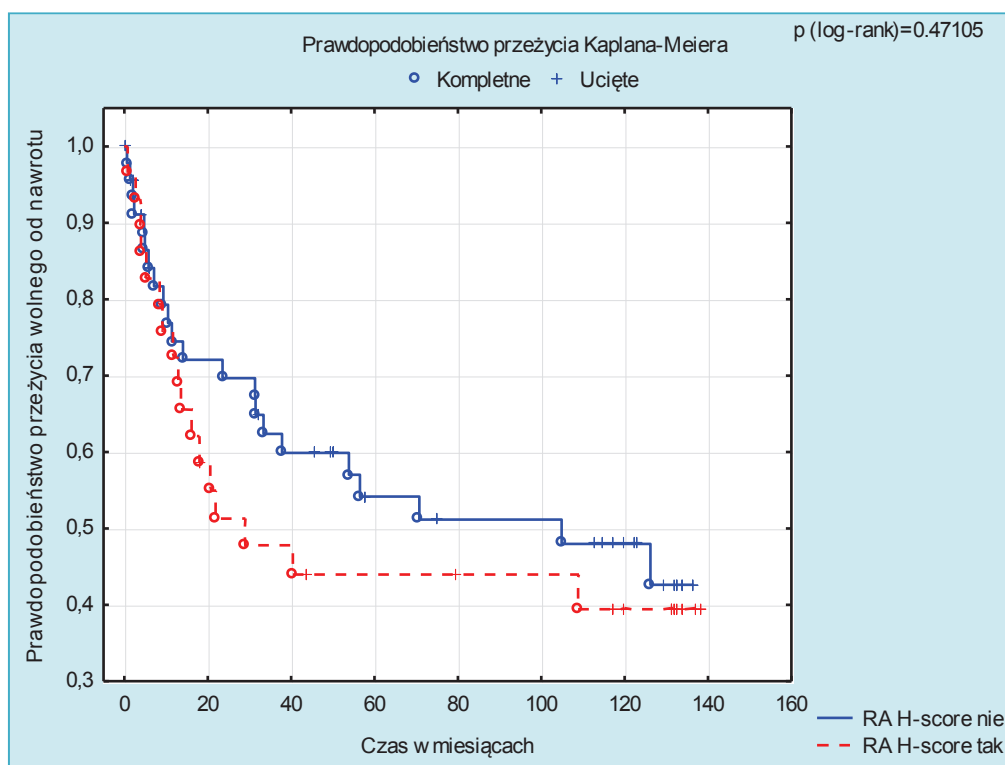
Ryc. 34. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora progesteronowego (N=20) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora progesteronowego (N=98).



Ryc. 35. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora progesteronowego (N=20) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora progesteronowego (N=98).

5.5.3 Receptor androgenowy

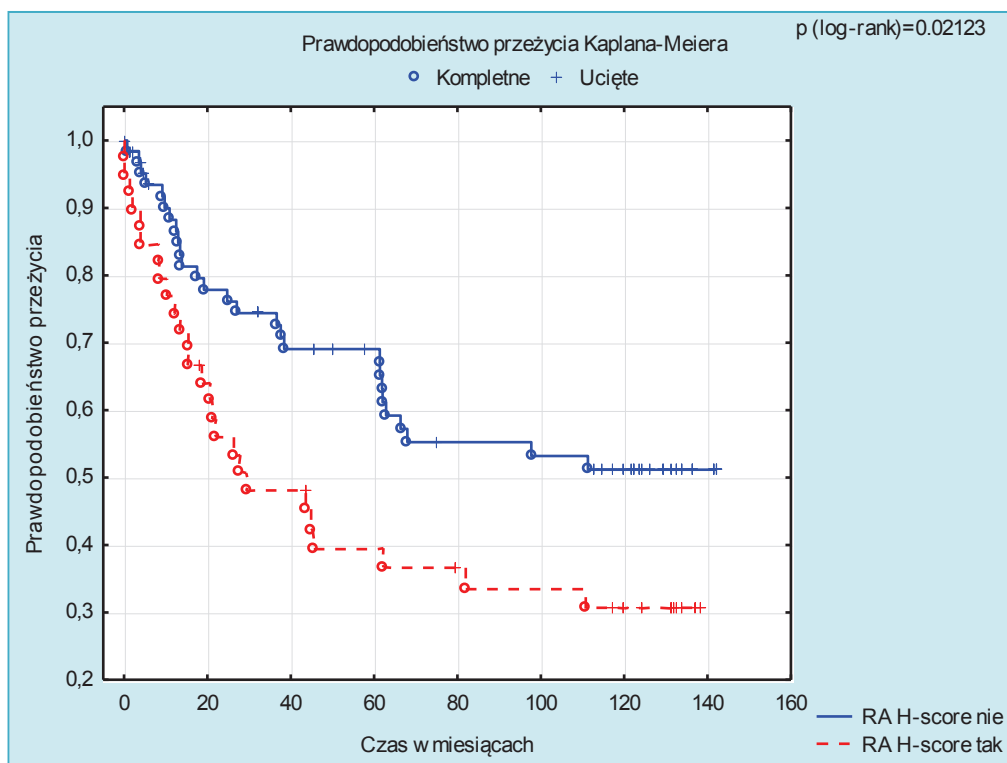
Mediana czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby dla chorych z dodatnią i ujemną ekspresją receptora androgenowego wynosiła odpowiednio 22 i 71 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby wynosiło odpowiednio 44% i 54% ($p=0,47$) (Ryc.36.).



Ryc. 36. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora androgenowego (N=44) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora androgenowego (N=74).

Mediana czasu przeżycia chorych na NDKRP z dodatnią i ujemną ekspresją receptora androgenowego wynosiła odpowiednio 28 i 111 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosiło 37% oraz 67% ($p=0,02$) (Ryc. 37.).

Nie stwierdzono różnicy w czasie przeżycia do nawrotu choroby pomiędzy analizowanymi podgrupami. Różnica całkowitego czasu przeżycia pomiędzy analizowanymi podgrupami jest istotna statystycznie na niekorzyść chorych z ekspresją receptora androgenowego.



Ryc. 37. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora androgenowego (N=44) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora androgenowego (N=74).

5.6 ANALIZA WIELOCZYNNIKOWA OPARTA NA MODELU COX'A

W analizie wieloczynnikowej, poza stopniem zaawansowania klinicznego, żadna z analizowanych cech, w tym ekspresja receptora estrogenowego alfa, progesteronowego oraz androgenowego nie wykazała znaczenia rokowniczego w odniesieniu do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby jak i całkowitego czasu przeżycia wyrażonych w miesiącach (Tab. 11.).

Cecha	Przeżycie wolne od nawrotu		Ogólne przeżycie	
	p	WR (95% ZU)	p	WR (95% ZU)
Wiek	0,63	0,99 (0,96-1,01)	0,67	0,99 (0,97-1,02)
Płeć	0,20	0,50 (0,17-1,44)	0,74	0,86 (0,35-2,12)
Stopień zaawansowania klinicznego	0,002	5,52 (1,81-16,83)	0,02	2,73 (1,18-6,33)
Postać histologiczna guza	0,26	0,43 (0,06-3,09)	0,29	0,43 (0,10-1,86)
Stopień zróżnicowania guza	0,48	0,64 (0,16-2,52)	0,24	1,63 (0,71-3,75)
Nałóg palenia papierosów	0,22	0,57 (0,23-1,39)	0,25	0,63 (0,29-1,38)
Ekspresja receptora estrogenowego alfa	0,31	0,97 (0,92-1,03)	0,36	0,97 (0,92-1,03)
Ekspresja receptora progesteronowego	0,33	1,11 (0,89-1,39)	0,34	1,10 (0,90-1,34)
Ekspresja receptora androgenowego	0,44	0,98 (0,94-1,03)	0,23	0,97 (0,92-1,02)

Tab. 11. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresję receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=118, dla nałogu palenia papierosów N=112). WR – współczynnik ryzyka; ZU – zakres ufności.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zapadalność na NDKRP wśród kobiet, zwłaszcza z negatywnym wywiadem w kierunku nałogu papierosowego, wciąż rośnie. Ponadto od dawna podkreślane są różnice epidemiologiczne pomiędzy grupą kobiet, a grupą mężczyzn zapadających na nowotwory płuc [105]. Odpowiedź na leczenie oraz rokowanie u osób z tym samym stopniem zaawansowania klinicznego, poddanych jednakowym procedurom leczniczym może różnić się w zależności od płci [106]. Najbardziej jawną odmiernością mogącą leżeć u podstaw tych różnic jest status hormonalny kobiet i mężczyzn. Drugą odnotowywaną często różnicą jest częstość występowania mutacji naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor - EGFR) [107]. Co więcej, znana jest bezpośrednia zależność pomiędzy tymi zmiennymi [108–111].

W niniejszym opracowaniu, tak jak w obszernym badaniu populacji polskich chorych na nowotwory płuc autorstwa Radzikowskiej i wsp. [105], kobiety stanowiły 18% badanej grupy chorych poddanych leczniczemu zabiegowi operacyjnemu. Barwienie immunohistochemiczne zostało przeprowadzone na mikromacierzach tkankowych skonstruowanych w oparciu o 118 archiwalnych przypadków NDKRP i preparaty kontrolne. Jak wykazało badanie przeprowadzone przez Kokkat i wsp. bloki parafinowe fragmentów NDKRP przechowywane nawet kilkanaście lat wykazują utrzymujący się, porównywalny poziom ekspresji DNA, RNA oraz białek [112]. Ocena ekspresji receptora estrogenowego alfa (RE α), progesteronowego (RP) i androgenowego (RA) została wykonana przy użyciu przeciwciał monoklonalnych odpowiednio EP1, PgR 636 oraz AR 441 (Dako).

Występowanie RE opisywane jest u obu płci zarówno w komórkach zdrowego mięszu płucnego jak i w nowotworach [43,113,114]. Na modelu mysim wykazano zależność prawidłowego dojrzewania pęcherzyków płucnych od obecności RE, przy czym zależność była silniej zaznaczona u osobników płci żeńskiej [115,116]. Znana jest większa wrażliwość mięszu płuc u kobiet niż u mężczyzn na patogenne działanie dymu papierosowego [117].

Udowodniono, że RE α wpływa na zwiększenie wrażliwości komórek w mięszu płucnym na stres oksydacyjny wywołany między innymi paleniem papierosów [118,119]. Kobiety częściej chorują na astmę, co może wynikać z wykazanej na modelu zwierzęcym zaostromej odpowiedzi zapalnej na alergeny związanej z ekspresją RE [120]. Ponadto RE wpływa na zwiększoną produkcję śluzu u chorych na mukowiscydozę pogarszając przepływ powietrza i zaostrome choroby, co obserwuje się zwłaszcza u kobiet [121].

Pomimo wielu badań dotyczących związku RE z powstawaniem i rokowaniem u chorych na NDKRP wciąż nie mamy jasności, co do jego roli. Wykazano związek ekspresji RE α z obecnością mutacji EGRF [109,122,123] oraz ekspresji RE β z obecnością aromatazy [124–126]. Poziom ekspresji waha się w zakresie 0-97% w wypadku RE α oraz 30-100% w wypadku RE β [108,109,113,122–139]. Tak wyraźna rozbieżność pomiędzy otrzymywanymi wynikami może zależeć zarówno od różnorodności używanych przeciwciał, jak i przyjmowanego kryterium wyniku dodatniego (Tab. 12.). W badaniu porównującym przeciwciała 1D5, 6F11 i SP1 skierowane przeciwko RE α podczas barwienia preparatów gruczołowego raka płuca wykazano najwyższy odsetek detekcji podczas zastosowania klonu SP1 [140]. W podobnym badaniu przeprowadzonym przez Dabbs'a i wsp. wykazano znacznie wyższą czułość klonu 6F11 niż klonu 1D5 [127]. Po wprowadzeniu nowego przeciwciała, jakim jest EP1, potwierdzono wysoki poziom korelacji pomiędzy wynikami barwień wykonywanych przy jego użyciu z barwieniami wykorzystującymi przeciwciałami 1D5 i SP1 [141].

W badanej grupie chorych ekspresję RE α opisano jedynie u 8 ze 118 (7%) osób poddanych analizie przy zastosowaniu progu odcięcia >0 oraz u 6 chorych (5%) przy zastosowaniu progu odcięcia na poziomie ≥ 10 . Podobnie niską ekspresję wykazali w badaniach Kaiser i wsp., Skov i wsp. oraz Abe i wsp. [114,125,137]. Całkowity brak ekspresji RE α w badaniach przeprowadzonych przez Di Nunno i wsp. oraz Schwatrz'a i wsp. mógł być związany z zastosowaniem wyższego progu odcięcia (≥ 10), lub zastosowanego przeciwciała [136,142].

Autor	Liczba chorych	RE	Przeciwciało	Kryterium oceny (+)
Kaiser [114]	52	8%	ER-ICA	>0
Di Nunno [142]	248	0	1D5	≥10
Omoto [113]	30	0	1D5	>0
Dabbs [127]	45	0	1D5	≥25
		66%	6F11	≥25
Ishibashi [143]	228	38%	6F11	≥10
Kawai [122]	132	73%	HC-20	≥2*
Kawai [108]	122	52%	HC-20	≥4*
Schwartz [136]	94	0	1D5	≥10
		0	6F11	
Niikawa [132]	59	54%	6F11	≥10
Skov [137]	104	3%	1D5	≥2*
Raso [109]	317	7%	6F11 α1	BD
		36%	6F11 α2	
		5%	HC-20	
		34%	1D5	
Abe [125]	105	1%	6F11	≥10
Mauro [144]	58	38%	6F11	≥5
Sun [123]	316	36%	HC-20	BD
Stabile [145]	121	>50%	HC-20	>0
Rouquette [135]	100	18%	1D5	≥10
		16%	F10 sc8002	
Rades [134]	64	19%	1D5	≥5

Tab. 12. Częstość ekspresji receptora estrogenowego alfa w niedrobnokomórkowym raku płuc w poszczególnych doniesieniach. BD – brak danych; * zgodnie ze skalą Allred; ** zgodnie ze skalą Remmele;

W przeciwieństwie do badania Mauro i wsp. [144], gdzie wykazano odwrotną korelację pomiędzy ekspresją REα a wiekiem chorych, w niniejszym opracowaniu zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy tymi czynnikami, nieosiągającą jednak poziomu istotności statystycznej ($p=0.17$).

Wielokrotnie wykazywano wyższą ekspresję REα u kobiet [109,114,123,135,146], nie potwierdzono jednak tej zależności w obecnym badaniu.

W żadnym z dotychczasowo przeprowadzonych badań, podobnie jak w niniejszym opracowaniu nie wykazano zależności ekspresji REα od stopnia zaawansowania klinicznego.

W obejmującym dużą, ponad 300 osobową próbę, badaniu Rasso i wsp. [109] wykazali częstszą ekspresję REα u chorych z rakiem gruczołowym płuca. W obecnym opracowaniu

wykazano związek ekspresji RE α z rakiem płaskonabłonkowym płuca, wynik ten jednak należy interpretować jako fałszywie dodatni ze względu na brak ekspresji tego receptora w badanej grupie chorych w innych typach histologicznych NDKRP.

W niniejszym badaniu, tak jak i w dostępnym piśmiennictwie, nie wykazano związku pomiędzy obecnością RE α w jądrze komórkowym a stopniem zróżnicowania histologicznego guza. Z kolei wykazano tę zależność w badaniu Kawai i wsp. [108] gdy analizowano ekspresję cytoplazmatyczną RE α .

Wykazano dyskretnie niższy odsetek metylacji promotora RE u osób palących niż u osób niepalących [147], która powoduje wyciszenie ekspresji genów, co może stanowić pośredni dowód na to, że u osób palących będziemy obserwowali zwiększoną ekspresję RE. Wyniki badania Kawai i wsp. potwierdzają tę hipotezę [108]. W niniejszym opracowaniu nie potwierdzono jednak tej zależności, co może być związane z bardzo niskim odsetkiem osób wolnych od nałogu palenia w badanej grupie. Z drugiej strony Raso i wsp. oraz Stabile i wsp. wykazują przeciwną zależność [109,145]. W tych badaniach ekspresja RE α jest wyższa u osób niepalących.

Ciekawą obserwacją było wykazanie w niniejszym badaniu u jednego z chorych obecności RE α zarówno w guzie pierwotnym jak i w zajętych przez proces przerzutowy węzle chłonny. W dostępnym piśmiennictwie brak jest badań dotyczących znaczenia klinicznego równoczesnej ekspresji RE w komórkach guza pierwotnego i w przerzutach.

Ekspresja RP jest opisywana zarówno w zdrowym mięszu płuc, jak i w komórkach nowotworowych [129]. Na modelu zwierzęcym wykazano, że obecność RP wpływa na poprawę funkcji oddechowych [148–150]. Często opisywana jest ścisła korelacja antagonistycznego działania RP i RE, RP wpływa na różnicowanie się tkanek oraz zmniejsza ich proliferację [143]. Zauważono również częstsze zaostrzenia w astmie w momencie najwyższego stężenia progesteronu podczas cyklu menstruacyjnego, co koreluje

ze wzrostem stężenia tlenu azotu (NO), wykładnika stanu zapalnego, w wydychanym powietrzu [151].

Progesteron może być syntezowany przez komórki NDKRP [143]. Badania nad preparatami NDKRP wykazują szeroki zakres poziomów ekspresji RP, wykazując zarówno gorszy rokowniczo wpływ niskiego poziomu ekspresji RP jak i całkowity brak korelacji [109,125,134,137,143,145]. Na modelu zwierzęcym wykazano, że zarówno podanie progesteronu jak i jego antagonisty prowadzi do zahamowania proliferacji w NDKRP, a współdziałanie RE i RP może wpływać na poziom czynnika wzrostu śródbłona naczyniowego (vascular endothelial growth factor - VEGF) [129,152].

Autor	Liczba chorych	RP	Przeciwciało	Kryterium oceny (+)
Kaiser [114]	52	44%	PGR1A6	>0
Di Nunno [142]	248	0	hPRa3	>10
Ishibashi[143]	228	46%	MAB429	>10
Skov [137]	104	0	PgR-312	>2*
Raso [109]	317	63%	SP2	BD
Abe [125]	105	14%	MAB429	>10
Sun [123]	316	45%	SP2	>10
Stabile [145]	121	>50%	MAB429	>0
Rouquette [135]	100	22%	PgR 636	>10
Rades [134]	64	8%	SP2	>5
Skjefstad [153]	335	34%	1E2	>0

Tab. 13. Częstość ekspresji receptora progesteronowego w niedrobnokomórkowym raku płuc w poszczególnych doniesieniach. BD – brak danych; * zgodnie ze skalą Allred.

W dostępnym piśmiennictwie dotyczącym ekspresji RP wykazywano użycie różnych przeciwciał oraz kryteriów wyniku dodatniego, co może być powodem tak dużej rozbieżności wyników (Tab. 13.). W niniejszym opracowaniu ekspresja RP była dość rzadka. Dla kryterium wyniku dodatniego na poziomie >0 opisano ją u 20 chorych (17%), natomiast dla kryterium na poziomie ≥ 10 występowała jedynie u 3 osób poddanych analizie (3%).

W niniejszym opracowaniu, tak jak w dostępnym piśmiennictwie, nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją RP a wiekiem, płcią czy stopniem zaawansowania klinicznego chorych. W pracy Kaiser'a i wsp. [114] opisano częstsze występowanie RP w raku gruczołowym,

natomiast w badaniu Raso i wsp. [109] ekspresja receptora była wiązana z typem płaskonabłonkowym NDKRP, jednak oba wykazane trendy nie osiągnęły płaskonabłonkowym NDKRPcznej. W niniejszym opracowaniu nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją RP a typem histologicznym guza.

W dotychczas przeprowadzonych badaniach, jak i w niniejszej pracy nie wykazano zależności pomiędzy stopniem zróżnicowania histologicznego guza a ekspresją RP.

W przeciwieństwie do badania Stabile i wsp. [145], gdzie wykazano niższą ekspresję RP u osób z dodatnim wywiadem w kierunku palenia papierosów, w niniejszym opracowaniu wykazano odwrotny trend. Wyższa ekspresja RP u osób wykazujących powyżej 30 paczkolet w wywiadzie nie osiągnęła jednak poziomu istotności statystycznej w obecnym badaniu ($p=0,09$).

W badaniach przeprowadzonych przez Sun i wsp. oraz Stabile i wsp. wykazano korelację pomiędzy ekspresją RE α i RP [123,145]. W niniejszym opracowaniu nie potwierdzono tej zależności.

Na modelu zwierzęcym wykazano, że ekspresja RA związana jest z hamowaniem prenatalnego rozwoju płuc u osobników płci męskiej [154]. Obecność RA jest opisywana zarówno w prawidłowym mięszu płuc jak i komórkach NDKRP [88]. Wpływa na osłabienie reakcji zapalnej alergicznej i zaostrza niealergiczną, co wykazano na modelu mysim [155,156].

Autor	Liczba chorych	RA	Przeciwciało	Kryterium oceny (+)
Kaiser [114]	52	17%	AN 1-15	>0
Rades [134]	64	31%	AR441	>5

Tab. 14. Częstość ekspresji receptora androgenowego w niedrobnokomórkowym raku płuc w poszczególnych doniesieniach.

Piśmiennictwo dotyczące ekspresji RA w NDKRP jest wyjątkowo ubogie (Tab. 14.). Wykazana w niniejszym opracowaniu ekspresja RA była zjawiskiem częstym, podobnie jak w badaniu Rades i wsp. [134]. Występowała ona u 44 chorych (37%) gdy kryterium

wyniku pozytywnego było ustalone na poziomie >0 oraz u 13 chorych (11%) gdy kryterium było podwyższone do ≥ 10 .

W obu przytaczanych pracach nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją RA a cechami klinicznymi i demograficznymi badanych grup pacjentów. W niniejszym opracowaniu wykazano trend w kierunku wyższej ekspresji RA u chorych powyżej 60 roku życia ($p=0,14$), z typem płaskonabłonkowym NDKRP ($p=0,08$) oraz z niższym stopniem zróżnicowania histologicznego guza ($p=0,16$), żadna z wymienionych zależności nie osiągnęła jednak poziomu istotności statystycznej.

Prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia w badanej grupie chorych wynosiło 56%, będąc wyższym od otrzymanego poziomu 41,4% dla chorych holenderskich operowanych z powodu NDKRP [157]. W niniejszej grupie chorych nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w rokowaniu pomiędzy podgrupą kobiet a mężczyzn. W badaniu Radzikowskiej i wsp. [105] wykazano negatywną korelację pomiędzy płcią męską a rokowaniem dla ogółu chorych na nowotwory płuc, nie zaprezentowano jednak danych dla podgrupy chorych poddanych leczeniu zabiegowi operacyjnemu. Podziału na podgrupę mężczyzn i kobiet nie przeprowadzono również w badaniu van Rens'a i wsp. [157]. W późniejszych badaniach doniesienia o korelacji pomiędzy płcią żeńską a lepszym rokowaniem pojawiały się często [158–161].

Kawai i wsp. w swoim badaniu wykazał gorsze rokowanie chorych z cytoplazmatyczną ekspresją RE α [122]. W badaniu oceniającym ekspresję RE α w jądrze komórkowym Rouquette i wsp. wykazali dłuższe przeżycie wolne od nawrotu choroby oraz całkowite przeżycie u kobiet a także dłuższe przeżycie wolne od nawrotu nowotworu u ogółu chorych z obecnym receptorem [135]. W niniejszym opracowaniu nie wykazano znaczenia rokowniczego ekspresji ER α . W pracy Kawai i wsp. wykazano gorsze znaczenie prognostyczne jednoczesnej ekspresji cytoplazmatycznego RE α i EGFR [108]. Ponadto w pracy Rades i wsp. wykazano zależność pomiędzy ekspresją RE α a gorszą kontrolą

lokalno-regionalną guzów poddanych naświetlaniu oraz niższymi wartościami całkowitego przeżycia chorych [134].

Ishibashi i wsp. wykazali lepsze rokowanie chorych z ekspresją RP potwierdzone w analizie wieloczynnikowej [146]. Natomiast Stabile i wsp. wykazali krótsze przeżycie wolne od nawrotu choroby u osób z obecnym RP [145] korelację potwierdzono w grupie kobiet w badaniu przeprowadzonym przez Skjefstad i wsp. [153]. W niniejszym badaniu wykazano tendencję do gorszego całkowitego przeżycia oraz przeżycia wolnego od nawrotu nowotworu u chorych z dodatnią ekspresją RP, zależności te nie osiągnęły jednak poziomu istotności statystycznej (odpowiednio $p=0,06$ i $p=0,18$). Sun i wsp. wykazali lepsze rokowanie u chorych wykazujących jednoczesną ekspresję RP oraz EGFR [123]. Ponadto Skjefstad i wsp. wykazali zależność pomiędzy ekspresją RP w komórkach podścieliska nowotworu a dłuższym przeżyciem wolnym od nawrotu choroby [153].

W dostępnym piśmiennictwie nie wykazano wpływu ekspresji RA na rokowanie chorych na NDKRP. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że dotychczas ukazały się jedynie dwie prace opisujące ten problem. W niniejszym opracowaniu wykazano silną zależność pomiędzy ekspresją RA a krótszym całkowitym przeżyciem chorych. W świetle badań wykazujących sprzężenie pomiędzy wewnątrzkomórkowymi szlakami przekąźnikowymi zależnymi od receptora androgenowego oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu wskazane jest podjęcie badań w kierunku określenia roli ekspresji receptora androgenowego podczas selekcji chorych do leczenia uzupełniającego.

WNIOSKI

1. Ekspresja receptora estrogenowego alfa (RE α) i progesteronowego (RP) jest zjawiskiem dość rzadkim w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDKRP), natomiast receptor androgenowy (RE), choć stwierdzany częściej, występuje w mniej niż połowie przypadków z NDKRP.
2. Nie ma związku pomiędzy ekspresją ocenianych receptorów (RE α , RP, RA) a cechami demograficznymi i klinicznymi badanej grupy chorych.
3. Obecność RA i prawdopodobnie RP ma niekorzystne znaczenie rokownicze w odniesieniu do całkowitego czasu przeżycia chorych z NDKRP, i może mieć znaczenie w rozwoju przyszłych strategii leczniczych. Ze względu na fakt, że nie potwierdzono wartości rokowniczej ani RA ani RP w wieloczynnikowej analizie Cox'a, badanie powinno być powtórzone na większej grupie chorych.

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była ocena klinicznego znaczenia ekspresji receptora estrogenowego alfa (RE α), progesteronowego (RP) i androgenowego (RA) w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (NDKRP) u chorych poddanych leczniczemu zabiegowi operacyjnemu. Badaniem objęto 118 chorych leczonych w Klinice Torakochirurgii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 1994 – 2005. W bazie danych zgromadzono informacje dotyczące: danych identyfikacyjnych chorego, daty urodzenia, płci, palenia papierosów, rozpoznania typu histopatologicznego nowotworu, stopnia jego zróżnicowania, stopnia zaawansowania klinicznego w skali TNM, daty i doszczętności zabiegu operacyjnego, czasu do nawrotu choroby oraz jej lokalizacji, daty ostatniej obserwacji lub zgonu, oceny ekspresji receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego zgodnie z punktacją skali H-score z progami odcięcia na poziomie >0 oraz ≥ 10 . Ekspresję receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego oceniono immunohistochemicznie przy użyciu dedykowanych przeciwciał monoklonalnych, odpowiednio EP1, PgR 636, AR 441, firmy Dako. Do dalszych analiz interpretowano każdą jądrową reakcję barwną (próg odcięcia H-score >0) jako wynik dodatni,.

Ekspresję receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego stwierdzono odpowiednio u 8 (7%), 20 (17%) i 44 (37%) chorych. W badanej grupie chorych nie wykazano związku pomiędzy występowaniem żadnego z analizowanych receptorów a cechami demograficznymi i klinicznymi, chorych. W analizie jednoczynnikowej wykazano niekorzystną zależność pomiędzy obecnością receptora androgenowego a rokowaniem w badanej grupie chorych w odniesieniu do całkowitego czasu przeżycia. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu ekspresji receptora androgenowego na czas do nawrotu choroby. Obecność receptora estrogenowego alfa i progesteronowego w badanej grupie chorych nie wykazała wpływu na czas przeżycia chorych i na czas do nawrotu choroby.

W analizach jednoczynnikowej oraz wieloczynnikowej wykazano znamiennej wpływ stopnia zaawansowania klinicznego na czas przeżycia wolny od nawrotu oraz na całkowity czas przeżycia, potwierdzający dokładność bazy danych, ponieważ jest to znany i najlepszy czynnik rokowniczy w NDKRP.

Uzyskane wyniki przemawiają za istotnym wpływem ekspresji receptora androgenowego na przebieg NDKRP. W przeprowadzonych badaniach ekspresja receptora estrogenowego alfa oraz progesteronowego nie wykazały istotnego wpływu rokowniczego, jakkolwiek ocena wpływu obecności RP (ze względu na wynik bliski znamienności statystycznej) na przebieg NDKRP powinna być kontynuowana. W świetle badań wykazujących sprzężenie pomiędzy wewnątrzkomórkowymi szlakami przekąźnikowymi zależnymi od receptora androgenowego oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu wskazane jest podjęcie badań w kierunku określenia roli ekspresji receptora androgenowego podczas selekcji chorych do leczenia uzupełniającego.

SUMMARY

THE CLINICAL VALUE OF ESTROGEN, PROGESTERONE AND ANDROGEN RECEPTOR EXPRESSION IN SURGICALLY TREATED NON-SMALL-CELL LUNG CANCER PATIENTS

The aim of this study was to evaluate the clinical significance of estrogen alfa (ER α), progesterone (PR) and androgen receptor (AR) expression in patients undergoing surgery for non-small-cell lung cancer. 118 patients treated in the Department of Thoracic Surgery at the Medical University of Gdańsk in the years 1994 - 2005 were enrolled into the study group. The patient database contained information on date of birth, gender, smoking habit, histopathological type and grade of the tumor, TNM stage, date of surgery and its completeness, time to recurrence of the disease and its location, the date of last follow-up or death, ER α , PR and AR in accordance to the H-score scale. Expression of all analyzed receptors was assessed immunohistochemically with use of monoclonal antibodies EP1, PgR 636, AR 441 (Dako, Poland), respectively. Any specific color reaction was interpreted as a positive result, further analysis was applied to the cut-off threshold of >0 and ≥ 10 according to H-score.

Expression of ER α , PR and AR was found in 8 (7%), 20 (17%) and 44 (37%) patients, respectively. There was no correlation between the occurrence of analyzed markers and neither demographic nor clinical patients' characteristics. Univariate analysis demonstrated the presence of an unfavorable relationship between the AR expression and overall survival (OS) but not disease free survival (DFS). The expression of ER α and PR has impacted neither OS nor DFS in this group of patients. In uni- and multivariate analysis clinical stage was the only independent prognostic factor for DFS and OS.

The present study suggests a correlation between the AR expression and the progression of the disease, whilst ER α and PR status did not show a significant influence on prognosis. Recent research highlights cross-talk between intracellular pathways dependent on

androgen receptor and epidermal growth factor receptor. The potential role for using androgen receptor expression for the selection of patients suitable for adjuvant therapy needs to be elucidated by further clinical studies.

SKRÓTY

AF-1	activation function 1; obszar aktywujący transkrypcję 1
AF-2	activation function 2; obszar aktywujący transkrypcję 2
EGFR	epidermal growth factor receptor; naskórkowy czynnik wzrostu
HRE	hormone response element; element odpowiedzi DNA na hormony
H+E	hematoksylinia i eozyna
MISS	membran-initiated steroid signaling; szlak sygnalizacji inicjowanej w obrębie błony komórkowej
NDKRP	niedrobnokomórkowy rak płuca
NISS	nuclear-initiated steroid signaling; szlak sygnalizacji inicjowanej w obszarach jądra komórkowego
RA	receptor androgenowy
RE	receptor estrogenowy
RP	receptor progesteronowy
SREM	selective estrogen receptor modulators; selektywny modulator receptora estrogenowego
SERD	selective estrogen receptor down-regulator; antagonist receptor estrogenowego
TNM	skala tumor, lymph nodes, metastases
TMA	tissue microarray; mikromacierz tkankowa
VEGR	vascular endothelial growth factor; czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

BIBLIOGRAFIA

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90. doi:10.3322/caac.20107. Available.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *GLOBOCAN 2012 v10, Cancer Incid Mortal Worldw IARC CancerBase No 11* [Internet] 2013:2–7.
- [3] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374–403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- [4] Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. *Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie* n.d. <http://onkologia.org.pl/raporty/> (accessed January 20, 2015).
- [5] Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. *NOWOTWORY ZŁOŚLIWE W POLSCE W 2012 ROKU* 2014.
- [6] Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. *Nowotwory Złośliwe W Polsce – Wskaźniki 5-Letnich Przeżyć Według Województw.* 2010.
- [7] Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku 2009:35–7.
- [8] Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris C. *World Health Organization classification of tumours; tumours of lung, pleura, thymus and heart.* 2004.
- [9] Devesa SS, Bray F, Vizcaino a. P, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 2005;117:294–9. doi:10.1002/ijc.21183.
- [10] Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2011;378:1727–40. doi:10.1016/S0140-6736(10)62101-0.
- [11] Mino-Kenudson M. Update on histologic classification of non-small cell lung cancer. *Diagnostic Histopathol* 2014;20:385–91. doi:10.1016/j.mpdhp.2014.09.006.
- [12] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244–85. doi:10.1513/pats.201107-042ST.
- [13] Gold K a., Wistuba II, Kim ES. New strategies in squamous cell carcinoma of the lung: Identification of tumor drivers to personalize therapy. *Clin Cancer Res* 2012;18:3002–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2055.
- [14] Pikor L a., Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer* 2013;82:179–89. doi:10.1016/j.lungcan.2013.07.025.
- [15] Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012;76:1–18. doi:10.1016/j.lungcan.2011.10.017.
- [16] Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett* 2006;239:1–9. doi:10.1016/j.canlet.2005.06.030.
- [17] Cadioli A, Rossi G, Costantini M, Cavazza A, Migaldi M, Colby T V. Lung cancer histologic and immunohistochemical heterogeneity in the era of molecular therapies: analysis of 172 consecutive

- surgically resected, entirely sampled pulmonary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2014;38:502–9. doi:10.1097/PAS.0000000000000154.
- [18] Pelosi G, Barbareschi M, Cavazza A, Graziano P, Rossi G, Papotti M. Large cell carcinoma of the lung: A tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal. *Lung Cancer* 2015;87:226–31. doi:10.1016/j.lungcan.2015.01.008.
- [19] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TMN Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. New York: Wiley-Liss; 2009.
- [20] UyBico SJ, Wu CC, Suh RD, Le NH, Brown K, Krishnam MS. Lung cancer staging essentials: the new TNM staging system and potential imaging pitfalls. *Radiographics* 2010;30:1163–81. doi:10.1148/rg.305095166.
- [21] Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WEE, Lim E, Senan S, Felip E, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24:1–10. doi:10.1093/annonc/mdt241.
- [22] Ginsberg RJ, Rubinstein L V. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1995;60:615–23. doi:10.1016/0003-4975(95)00537-U.
- [23] Rubinstein L V., Ginsberg RJ. Reply to: Lederle FA. Lobectomy versus limited resection in T1 N0 lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1249–50.
- [24] Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2553–62. doi:10.1200/JCO.2008.18.2733.
- [25] Cao C, Manganas C, Ang SC, Peeceeyen S, Yan TD. Video-assisted thoracic surgery versus open thoracotomy for non-small cell lung cancer: A meta-analysis of propensity score-matched patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013;16:244–9. doi:10.1093/icvts/ivs472.
- [26] Fernando HC, Schuchert M, Landreneau R, Daly BT. Approaching the High-Risk Patient: Sublobar Resection, Stereotactic Body Radiation Therapy, or Radiofrequency Ablation. *Ann Thorac Surg* 2010;89:S2123–7. doi:10.1016/j.athoracsur.2010.02.101.
- [27] Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 1999;97:161–3. doi:S0092-8674(00)80726-6 [pii].
- [28] Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995;377:454–7.
- [29] McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002;108:465–74. doi:10.1016/S0092-8674(02)00641-4.
- [30] Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: Continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005;23:1616–22. doi:10.1200/JCO.2005.10.036.
- [31] Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: Molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev* 2008;29:217–33. doi:10.1210/er.2006-0045.
- [32] Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:309–17. doi:10.1210/me.2002-0368.
- [33] Maggi A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2011;1812:1054–60. doi:10.1016/j.bbadis.2011.05.001.
- [34] Adlanmerini M, Solinhac R, Abot A, Fabre A, Raymond-Letron I, Guihot A-L, et al. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor α in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E283–90. doi:10.1073/pnas.1322057111.

- [35] Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225–36. doi:10.1093/humupd/6.3.225.
- [36] Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan M-C, Corbo L. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2005;19:2671–84. doi:10.1210/me.2005-0042.
- [37] Pike a C, Brzozowski a M, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell a G, Engström O, et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* 1999;18:4608–18. doi:10.1093/emboj/18.17.4608.
- [38] Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *EMBO J* 2000;19:4688–700. doi:10.1093/emboj/19.17.4688.
- [39] Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;140:5566–78. doi:10.1210/endo.140.12.7179.
- [40] Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human Estrogen Receptor beta-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258–65.
- [41] Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones S a, Horne EL, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:75–8. doi:S0006-291X(98)98738-1 [pii]r10.1006/bbrc.1998.8738.
- [42] Arnal JF, Gourdy P, Lenfant F. In vivo dissection of the estrogen receptor alpha: Uncoupling of its physiological effects and medical perspectives. *Ann Endocrinol (Paris)* 2013;74:82–9. doi:10.1016/j.ando.2013.03.001.
- [43] Taylor a. H, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000;24:145–55.
- [44] Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, et al. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1459–69. doi:10.1016/j.bcp.2006.02.002.
- [45] Bao TZ, Han GZ, Shim JY, Wen Y, Jiang XR. Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor α and β subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* 2006;147:4132–50. doi:10.1210/en.2006-0113.
- [46] Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen J a., Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 2014;90:13–29. doi:10.1016/j.steroids.2014.06.012.
- [47] Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: Impact on human health. *Mol Aspects Med* 2006;27:299–402. doi:10.1016/j.mam.2006.07.001.
- [48] Koh KK, Yoon BK. Controversies regarding hormone therapy: Insights from inflammation and hemostasis. *Cardiovasc Res* 2006;70:22–30. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.004.
- [49] Pomp E, Rosendaal F, Doggen C. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol* 2008;83:97–102. doi:10.1002/ajh.
- [50] Writing Group For The Women's Health Initiative Investigators. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *Jama* 2002;288:321–33. doi:10.1001/jama.288.3.321.
- [51] Smith EP, Boyd J, Frank G, Takahashi H, Cohen R, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331:1056–61.

- [52] Batra GS, Hainey L, Freemont AJ, Andrew G, Saunders PTK, Hoyland J a., et al. Evidence for cell-specific changes with age in expression of oestrogen receptor (ER) α and β in bone fractures from men and women. *J Pathol* 2003;200:65–73. doi:10.1002/path.1332.
- [53] Braidman IP, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PT, Hoyland J a. Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone. *J Bone Miner Res* 2001;16:214–20. doi:10.1359/jbmr.2001.16.2.214.
- [54] Williams G. Aromatase up-regulation, insulin and raised intracellular oestrogens in men, induce adiposity, metabolic syndrome and prostate disease, via aberrant ER-alpha and GPER signalling. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351:269–78. doi:10.1016/j.mce.2011.12.017.
- [55] Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, et al. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001;60:595–602. doi:VL - 60.
- [56] Sun PM, Gao M, Wei LH, Mustea a., Wang JL, Könsgen D, et al. An estrogen receptor α -dependent regulation of estrogen receptor-related receptor α in the proliferation of endometrial carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:564–8. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00697.x.
- [57] Teng J, Wang ZY, Jarrard DF, Bjorling DE. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:351–64. doi:10.1677/erc.1.01255.
- [58] Bailey ST, Shin H, Westerling T, Liu XS, Brown M. Estrogen receptor prevents p53-dependent apoptosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:18060–5. doi:10.1073/pnas.1018858109.
- [59] Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64:423–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2446.
- [60] Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor beta inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line 2004;101:1566–71.
- [61] Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, Zhao C, Williams C, Ström A, et al. Tumor repressive functions of estrogen receptor β in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:6100–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0506.
- [62] McPherson SJ, Hussain S, Balanathan P, Hedwards SL, Niranjana B, Grant M, et al. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3123–8. doi:10.1073/pnas.0905524107.
- [63] Cho MA, Lee MK, Nam K-H, Chung WY, Park CS, Lee JH, et al. Expression and role of estrogen receptor alpha and beta in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis. *J Endocrinol* 2007;195:255–63. doi:10.1677/JOE-06-0193.
- [64] Saunders P, Millar M. Expression of oestrogen receptor beta (ER β 1) protein in human breast cancer biopsies. *Br J Cancer* 2002;86:250–6. doi:10.1038/sj/bjc/6600035.
- [65] Maehle BO, Collett K, Tretli S, Akslen L a, Grotmol T. Estrogen receptor beta -an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer? *APMIS* 2009;117:644–50. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02510.x.
- [66] Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes T a, Harkins L, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:5228–35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4528.
- [67] Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson J a, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61:2537–41.
- [68] Sayeed A, Konduri SD, Liu W, Bansal S, Li F, Das GM. Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional repression: implications for the regulation of apoptosis. *Cancer Res* 2007;67:7746–55. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3724.

- [69] Konduri SD, Medisetty R, Liu W, Kaiparettu BA, Srivastava P, Brauch H, et al. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15081–6. doi:10.1073/pnas.1009575107.
- [70] Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, et al. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001;60:595–602. doi:VL - 60.
- [71] Kastner P, Krust a, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603–14.
- [72] Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:8356–64. doi:10.1128/MCB.14.12.8356.
- [73] Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 1994;8.
- [74] Leonhardt S a., Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 2003;68:761–70. doi:10.1016/S0039-128X(03)00129-6.
- [75] Inoue T, Akahira JI, Takeyama J, Suzuki T, Darnel a. D, Kaneko C, et al. Spatial and topological distribution of progesterone receptor A and B isoforms during human development. *Mol Cell Endocrinol* 2001;182:83–9. doi:10.1016/S0303-7207(01)00549-4.
- [76] Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: Implications for biomarker studies. *PLoS Med* 2008;5:1749–60. doi:10.1371/journal.pmed.0050232.
- [77] Sieh W, Köbel M, Longacre T a., Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol* 2013;14:853–62. doi:10.1016/S1470-2045(13)70253-5.
- [78] Ciucci A, Zannoni GF, Travaglia D, Petrillo M, Scambia G, Gallo D. Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ER β) isoforms ER β 1, ER β 2, and ER β 5 in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014;132:351–9. doi:10.1016/j.ygyno.2013.12.027.
- [79] Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev* 2013;34:130–62. doi:10.1210/er.2012-1043.
- [80] Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, et al. Characterization of Progesterone Receptor A and B Expression in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 1995;55:5063–8.
- [81] González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez a, Cerbón M a, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 2001;56:43–8.
- [82] Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Kujas M. Immunocytochemical study of progesterone receptor in human meningioma. *Acta Neurochir (Wien)* 1992;115:20–30.
- [83] Wu H, Guan S, Sun M, Yu Z, Zhao L, He M, et al. Ano1/TMEM16A Overexpression Is Associated with Good Prognosis in PR-Positive or HER2-Negative Breast Cancer Patients following Tamoxifen Treatment. *PLoS One* 2015;10:e0126128. doi:10.1371/journal.pone.0126128.
- [84] Ward EC, Hoekstra A V., Blok LJ, Hanifi-Moghaddam P, Lurain JR, Singh DK, et al. The regulation and function of the Forkhead transcription factor, Forkhead box O1, is dependent on the progesterone receptor in endometrial carcinoma. *Endocrinology* 2008;149:1942–50. doi:10.1210/en.2007-0756.
- [85] 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 (80-)* 1988;240:327–30.

- [86] 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* 1998;12:654–63. doi:10.1210/mend.12.5.0112.
- [87] Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1996;120:51–7.
- [88] Mikkonen L, Pihlajamaa P, Sahu B, Zhang F-P, Jänne O a. Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Mol Cell Endocrinol* 2010;317:14–24. doi:10.1016/j.mce.2009.12.022.
- [89] Beilin J, Ball EM a, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* 2000:85–96. doi:10.1677/jme.0.0250085.
- [90] Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, et al. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:1647–51.
- [91] Gibson D a., Simitsidellis I, Collins F, Saunders PTK. Evidence of androgen action in endometrial and ovarian cancers. *Endocr Relat Cancer* 2014;21:203–18. doi:10.1530/ERC-13-0551.
- [92] McGrath M, Lee I-M, Hankinson SE, Kraft P, Hunter DJ, Buring J, et al. Androgen receptor polymorphisms and endometrial cancer risk. *Int J Cancer* 2006;118:1261–8. doi:10.1002/ijc.21436.
- [93] Grassetti D, Giannandrea F, Paoli D, Masciandaro P, Figura V, Carlini T, et al. Androgen receptor polymorphisms and testicular cancer risk. *Andrology* 2015;3:27–33. doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00252.x.
- [94] Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Van Der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part I: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent - Update 2013. *Eur Urol* 2014;65:124–37. doi:10.1016/j.eururo.2013.09.046.
- [95] Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Van Der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2014;65:467–79. doi:10.1016/j.eururo.2013.11.002.
- [96] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi a, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844–7. doi:10.1038/nm0798-844.
- [97] Hoos a, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001;81:1331–8. doi:10.1038/labinvest.3780347.
- [98] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001;159:2249–56. doi:10.1016/S0002-9440(10)63075-1.
- [99] Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: Progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol* 2008;26:5630–7. doi:10.1200/JCO.2008.17.3567.
- [100] Pøhl M, Olsen KE, Holst R, Ditzel HJ, Hansen O. Tissue microarrays in non-small-cell lung cancer: Reliability of immunohistochemically-determined biomarkers. *Clin Lung Cancer* 2014;15:222–30.e3. doi:10.1016/j.clcc.2013.09.004.
- [101] Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: A methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2014–21. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0743.
- [102] Schmidt LH, Biesterfeld S, Kümmel A, Faldum A, Sebastian M, Taube C, et al. Tissue microarrays are reliable tools for the clinicopathological characterization of lung cancer tissue. *Anticancer Res* 2009;29:201–9.

- [103] Fendler W. Techniki analizy przeżycia stosowane w onkologii — założenia , metodyka i typowe problemy interpretacyjne. *Onkol W Prakt Klin* 2011;7:89–101.
- [104] Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:907–22. doi:10.1200/JCO.2009.25.6529.
- [105] Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: Age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol* 2002;13:1087–93. doi:10.1093/annonc/mdf187.
- [106] Thomas L, Doyle LA, Edelman MJ. Lung cancer in women: Emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest* 2005;128:370–81. doi:10.1378/chest.128.1.370.
- [107] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339–46. doi:10.1093/jnci/dji055.
- [108] Kawai H, Ishii A, Washiya K, Konno T, Kon H, Yamaya C, et al. Combined overexpression of EGFR and estrogen receptor alpha correlates with a poor outcome in lung cancer. *Anticancer Res* 2005;25:4693–8.
- [109] Raso MG, Behrens C, Herynk MH, Liu S, Prudkin L, Ozburn NC, et al. Immunohistochemical Expression of Estrogen and Progesterone Receptors Identifies a Subset of NSCLCs and Correlates with EGFR Mutation. *Clin Cancer Res* 2009;15:5359–68. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.07.002.Identification.
- [110] Recchia AG, Musti AM, Lanzino M, Panno ML, Turano E, Zumpano R, et al. A cross-talk between the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor leads to p38MAPK-dependent activation of mTOR and cyclinD1 expression in prostate and lung cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:603–14. doi:10.1016/j.biocel.2008.07.004.
- [111] Pietras RJ, Márquez DC, Chen H-W, Tsai E, Weinberg O, Fishbein M. Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells. *Steroids* 2005;70:372–81. doi:10.1016/j.steroids.2005.02.017.
- [112] Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi V a, Baloch ZW. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank* 2013;11:101–6. doi:10.1089/bio.2012.0052.
- [113] Omoto Y, Kobayashi Y, Nishida K, Tsuchiya E, Eguchi H, Nakagawa K, et al. Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:340–7. doi:10.1006/bbrc.2001.5158.
- [114] Kaiser U, Hofmann J, Schilli M, Wegmann B, Klotz U, Wedel S, et al. Steroid-hormone receptors in cell lines and tumor biopsies of human lung cancer. *Int J Cancer* 1996;67:357–64. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<357::AID-IJC9>3.0.CO;2-Q.
- [115] Massaro D, Massaro GD. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L866–70. doi:10.1152/ajplung.00396.2005.
- [116] Massaro D, Massaro GD. Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss, and regeneration in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L1154–9. doi:10.1152/ajplung.00228.2004.
- [117] Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A. Sex Differences in Lung CYP1A1 Expression and DNA Adduct Levels among Lung Cancer Patients *Advances in Brief Sex Differences in Lung CYP1A1 Expression and DNA Adduct Levels among Lung* 1999:3317–20.
- [118] Han W, Pentecost BT, Pietropaolo RL, Fasco MJ, Spivack SD. Estrogen receptor α increases basal and cigarette smoke extract-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1, but not GSTP1, in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Carcinog* 2005;44:202–11. doi:10.1002/mc.20128.

- [119] Chen Z, Zhang Y, Yang J, Jin M, Wang XW, Shen ZQ, et al. Estrogen promotes benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenesis through oxidative stress damage and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathways in female mice. *Cancer Lett* 2011;308:14–22. doi:10.1016/j.canlet.2011.04.007.
- [120] De Oliveira APL, Domingos HV, Cavriani G, Damazo AS, Dos Santos Franco AL, Oliani SM, et al. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1120–8. doi:10.1152/ajpcell.00286.2006.
- [121] Coakley RD, Sun H, Clunes L a., Rasmussen JE, Stackhouse JR, Okada SF, et al. 17 β -Estradiol inhibits Ca²⁺-dependent homeostasis of airway surface liquid volume in human cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest* 2008;118:4025–35. doi:10.1172/JCI33893.
- [122] Kawai H, Ishii A, Washiya K, Konno T, Kon H, Yamaya C, et al. Estrogen receptor alpha and beta are prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5084–9.
- [123] Sun H, Zheng Y, Ou W, Fang Q, Li P, Ye X, et al. Association between hormone receptor expression and epidermal growth factor receptor mutation in patients operated on for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2011;91:1562–7. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.02.001.
- [124] Mah V, Marquez D, Alavi M, Maresh EL, Zhang L, Yoon N, et al. Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011;74:318–25. doi:10.1016/j.lungcan.2011.03.009.
- [125] Abe K, Miki Y, Ono K, Mori M, Kakinuma H, Kou Y, et al. Highly concordant coexpression of aromatase and estrogen receptor beta in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2010;41:190–8. doi:10.1016/j.humpath.2009.07.010.
- [126] Verma MK, Miki Y, Abe K, Nagasaki S, Niikawa H, Suzuki S, et al. Co-expression of estrogen receptor beta and aromatase in Japanese lung cancer patients: Gender-dependent clinical outcome. *Life Sci* 2012;91:800–8. doi:10.1016/j.lfs.2012.08.029.
- [127] Dabbs DJ, Landreneau RJ, Liu Y, Raab SS, Maley RH, Tung MY, et al. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002;73:403–6. doi:10.1016/S0003-4975(01)03358-6.
- [128] Karlsson C, Helenius G, Fernandes O, Karlsson MG. Oestrogen receptor beta in NSCLC - prevalence, proliferative influence, prognostic impact and smoking. *Apmis* 2012;120:451–8. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02850.x.
- [129] Marquez-Garban DC, Mah V, Alavi M, Maresh EL, Chen HW, Bagryanova L, et al. Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids* 2011;76:910–20. doi:10.1016/j.steroids.2011.04.015.
- [130] Monica V, Longo M, Felice B, Scagliotti G V., Papotti M, Novello S. Role of hormone receptor expression in patients with advanced-stage lung cancer treated with chemotherapy. *Clin Lung Cancer* 2012;13:416–23. doi:10.1016/j.clc.2012.03.006.
- [131] Navaratnam S, Skliris G, Qing G, Banerji S, Badiani K, Tu D, et al. Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer. *Horm Cancer* 2012;3:93–100. doi:10.1007/s12672-012-0105-y.
- [132] Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, et al. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:4417–26. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1950.
- [133] Nose N, Sugio K, Oyama T, Nozoe T, Uramoto H, Iwata T, et al. Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2009;27:411–7. doi:10.1200/JCO.2008.18.3251.
- [134] Rades D, Setter C, Dahl O, Schild SE, Noack F. The prognostic impact of tumor cell expression of estrogen receptor- α , progesterone receptor, and androgen receptor in patients irradiated for nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;118:157–63. doi:10.1002/cncr.26282.

- [135] Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C, Bouchet L, Milia J, Nicaise Y, et al. Characteristics of lung cancer in women: Importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer* 2012;76:280–5. doi:10.1016/j.lungcan.2011.11.023.
- [136] Schwartz AG, Prysak GM, Murphy V, Lonardo F, Pass H, Schwartz J, et al. Nuclear estrogen receptor beta in lung/cancer: Expression and survival differences by sex. *Clin Cancer Res* 2005;11:7280–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0498.
- [137] Skov BG, Fischer BM, Pappot H. Oestrogen receptor beta over expression in males with non-small cell lung cancer is associated with better survival. *Lung Cancer* 2008;59:88–94. doi:10.1016/j.lungcan.2007.07.025.
- [138] Wu C-T, Chang Y-L, Shih J-Y, Lee Y-C. The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:979–86. doi:10.1016/j.jtcvs.2005.06.012.
- [139] Canver C, Memoli V, Vanderveer P, Dingivan C, Jr MR. Sex hormone receptors in non-small-cell lung cancer in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:153–7.
- [140] Gomez-Fernandez C, Mejias A, Walker G, Nadji M. Immunohistochemical expression of estrogen receptor in adenocarcinomas of the lung: the antibody factor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:137–41. doi:10.1097/PAI.0b013e3181bec23b.
- [141] Badve S, Vladislav IT, Spaulding B, Strickland A, Hernandez S, Bird-Turner L, et al. EP1: a novel rabbit monoclonal antibody for detection of oestrogen receptor α . *J Clin Pathol* 2013;66:1051–7. doi:10.1136/jclinpath-2012-201391.
- [142] Di Nunno L, Larsson LG, Rinehart JJ, Beissner RS. Estrogen and progesterone receptors in non-small cell lung cancer in 248 consecutive patients who underwent surgical resection. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1467–70. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<1467:EAPRIN>2.0.CO;2.
- [143] Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, et al. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer--a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Res* 2005;65:6450–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3087.
- [144] Mauro LV, Dalurzo M, Carlini MJ, Smith D, Nunez M, Simian M, et al. Estrogen receptor β and epidermal growth factor receptor as early-stage prognostic biomarkers of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2010;24:1331–8. doi:10.3892/or.
- [145] Stabile LP, Dacic S, Land SR, Lenzner DE, Dhir R, Acquafondata M, et al. Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2011;17:154–64. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0992.
- [146] Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, et al. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer--a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Res* 2005;65:6450–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3087.
- [147] Issa JPJ, Baylin SB, Belinsky S a. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res* 1996;56:3655–8.
- [148] Marcouiller F, Boukari R, Laouafa S, Lavoie R, Joseph V. The nuclear progesterone receptor reduces post-sigh apneas during sleep and increases the ventilatory response to hypercapnia in adult female mice. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0100421.
- [149] Bairam A, Lumbroso D, Joseph V. Effect of progesterone on respiratory response to moderate hypoxia and apnea frequency in developing rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;185:515–25. doi:10.1016/j.resp.2012.11.001.
- [150] Lefter R, Morency CE, Joseph V. Progesterone increases hypoxic ventilatory response and reduces apneas in newborn rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;156:9–16. doi:10.1016/j.resp.2006.08.007.

- [151] Farha S, Asosingh K, Laskowski D, Hammel J, Dweik R a., Wiedemann HP, et al. Effects of the menstrual cycle on lung function variables in women with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:304–10. doi:10.1164/rccm.200904-0497OC.
- [152] Check JH, Sansoucie L, Chern J, Dix E. Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous lung cancer. *Anticancer Res* 2010;30:119–22.
- [153] Skjefstad K, Richardsen E, Donnem T, Andersen S, Kiselev Y, Al-saad S. The prognostic role of progesterone receptor expression in non-small cell lung cancer patients : Gender-related impacts and correlation with disease-specific survival. *Steroids* 2015;98:29–36. doi:10.1016/j.steroids.2015.01.020.
- [154] Nielsen HC, Zinman HM, Torday JS. Dihydrotestosterone inhibits fetal rabbit pulmonary surfactant production. *J Clin Invest* 1982;69:611–6. doi:10.1172/JCI110488.
- [155] Hayashi T, Adachi Y, Hasegawa K, Morimoto M. Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in BALB/c Mice. *Scand J Immunol* 2003;57:562–7. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01269.x.
- [156] Card JW, Carey M a., Bradbury J a., DeGraff LM, Morgan DL, Moorman MP, et al. Gender Differences in Murine Airway Responsiveness and Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *J Immunol* 2006;177:621–30. doi:10.4049/jimmunol.177.1.621.
- [157] Van Rens MTM. Prognostic Assessment of 2,361 Patients Who Underwent Pulmonary Resection for Non-small Cell Lung Cancer, Stage I, II, and IIIA<xref rid="AFF1"></xref>. *CHEST J* 2000;117:374. doi:10.1378/chest.117.2.374.
- [158] Goya T, Asamura H, Yoshimura H, Kato H, Shimokata K, Tsuchiya R, et al. Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: A Japanese lung cancer registry study. *Lung Cancer* 2005;50:227–34. doi:10.1016/j.lungcan.2005.05.021.
- [159] Pfannschmidt J, Muley T, Bülzebruck H, Hoffmann H, Dienemann H. Prognostic assessment after surgical resection for non-small cell lung cancer: Experiences in 2083 patients. *Lung Cancer* 2007;55:371–7. doi:10.1016/j.lungcan.2006.10.017.
- [160] Caldarella a, Crocetti E, Comin CE, Janni a, Pegna a L, Paci E. Gender differences in non-small cell lung cancer: a population-based study. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:763–8. doi:10.1016/j.ejso.2007.01.001.
- [161] Cerfolio RJ, Bryant AS, Scott E, Sharma M, Robert F, Spencer S a., et al. Women with pathologic stage I, II, and III non-small cell lung cancer have better survival than men. *Chest* 2006;130:1796–802. doi:10.1378/chest.130.6.1796.

SPIS GRAFÓW, TABEL I RYCIN

GRAFY

Graf 1. Podział inwazyjnego raka płuc zgodnie z WHO 2004 oraz IASLC/ATS/ERS 2011.

Graf 2. Podział zmian przedinwazyjnych raka płuc zgodnie z WHO 2004 oraz IASLC/ATS/ERS 2011.

TABELE

Tab.1. Sugerowana optymalna metoda leczenia w zależności od stopnia zaawansowania niedrobnokomórkowego raka płuc.

Tab. 2. Charakterystyka kliniczna badanej grupy 118 chorych na NDKRP.

Tab. 3. Przeciwciała monoklonalne użyte podczas barwienia immunohistochemicznego.

Tab. 4. Ekspresja receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w badanej grupie chorych (N=118).

Tab. 5. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

Tab. 6. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

Tab. 7. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

Tab. 8. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

Tab. 9. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

Tab. 10. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie ≥ 10 w skali H-score w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=118, dla palenia papierosów N=112, test χ^2).

Tab. 11. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresję receptora estrogenowego alfa, progesteronowego i androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=118), WR – współczynnik ryzyka; ZU – zakres ufności.

Tab. 12. Częstość ekspresji receptora estrogenowego alfa w niedrobnokomórkowym raku płuc w poszczególnych doniesieniach. BD – brak danych; * zgodnie ze skalą Allred.

Tab. 13. Częstość ekspresji receptora progesteronowego w niedrobnokomórkowym raku płuc w poszczególnych doniesieniach. BD – brak danych; * zgodnie ze skalą Allred.

Tab. 14. Częstość ekspresji receptora androgenowego w niedrobnokomórkowym raku płuc w poszczególnych doniesieniach.

RYCINY

Ryc.1. Schematyczne przedstawienie klasyfikacji TNM 2010 w niedrobnokomórkowym raku płuc.

Ryc. 2. Mechanizmy transdukcji sygnału związane z działaniem hormonów sterydowych na szlakach NISS oraz MISS.

Ryc. 3. Schemat budowy receptora.

Ryc. 4. Technika konstruowania mikromacierzy tkankowych (szczegóły w tekście).

Ryc. 5. Technika wykonania barwień immunohistochemicznych (opis w tekście).

Ryc. 6. Schemat zastosowania skali H-score podczas oceny przykładowego preparatu.

Ryc. 7. Zasady oceniania barwienia immunohistochemicznego zgodnie ze skalą Allred.

Ryc. 8. Zasady oceniania barwienia immunohistochemicznego zgodnie ze skalą Remmele.

Ryc. 9. Negatywne barwienie preparatu NDKRP w kierunku receptora estrogenowego (A) w powiększeniu x20 oraz pozytywne barwienie tego receptora w powiększeniu x20 i x40 (odpowiednio B i C).

Ryc. 10. Negatywne barwienie preparatu NDKRP w kierunku receptora progesteronowego (A) w powiększeniu x20 oraz pozytywne barwienie tego receptora w powiększeniu x20 i x40 (odpowiednio B i C).

Ryc. 11. Negatywne barwienie preparatu NDKRP w kierunku receptora androgenowego (A) w powiększeniu x20 oraz pozytywne barwienie tego receptora w powiększeniu x20 i x40 (odpowiednio B i C).

Ryc. 12. Pozytywne barwienie w kierunku receptora estrogenowego alfa preparatu węzła chłonnego, w którym opisano zmiany przerzutowe, w wypadku NDKRP wykazującego ekspresję tego receptora w powiększeniu x40 i x10 (odpowiednio A i B).

Ryc. 13. Pozajądrowa ekspresja receptora progesteronowego w preparacie NDKRP w powiększeniu x40 i x10 (odpowiednio A i B).

Ryc. 14. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do płci chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

Ryc. 15. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

Ryc. 16. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do stopnia zróżnicowania guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 17. Ekspresja receptora estrogenowego alfa z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do nałogu palenia papierosów (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 18. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do płci chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

Ryc. 19. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego chorych (N=118, test U Manna-Whitneya).

Ryc. 20. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do typu histologicznego guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 21. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do stopnia zróżnicowania guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 22. Ekspresja receptora progesteronowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do nałogu palenia papierosów (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 23. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do płci chorych (N=118, test U Manna-Whitney).

Ryc. 24. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego chorych (N=118, test U Manna-Whitney).

Ryc. 25. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do typu histologicznego guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 26. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do stopnia zróżnicowania guza (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 27. Ekspresja receptora androgenowego z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w odniesieniu do nałogu palenia papierosów (N=118, test Kruskala-Wallis).

Ryc. 28. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u wszystkich chorych (N=118).

Ryc. 29. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyera u wszystkich chorych (N=118).

Ryc. 30. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u kobiet (N=22) w stosunku mężczyzn (N=96).

Ryc. 31. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u kobiet (N=22) w stosunku do mężczyzn (N=96).

Ryc. 32. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora estrogenowego alfa (N=6) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora estrogenowego (N=112).

Ryc. 33. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora estrogenowego alfa (N=8) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora estrogenowego (N=110).

Ryc. 34. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora progesteronowego (N=20) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora progesteronowego (N=98).

Ryc. 35. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora progesteronowego (N=20) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora progesteronowego (N=98).

Ryc. 36. Krzywa przeżycia do nawrotu choroby Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora androgenowego (N=44) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora androgenowego (N=74).

Ryc. 37. Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera u chorych z dodatnią ekspresją receptora androgenowego (N=44) z punktem odcięcia na poziomie >0 w skali H-score w stosunku do chorych bez ekspresji receptora androgenowego (N=74).