

# Ocena immunohistochemiczna ekspresji receptorów estrogenowych w nowotworach gruczołu sutkowego suk

Anna M. Badowska-Kozakiewicz, **Elżbieta Malicka**

Zakład Patomorfologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Fizjologicznie gruczoł mlekowy jest narządem, którego budowa i funkcje wiążą się z układem wydzielania wewnętrznego. Pierwszym badaczem, który zasugerował, że rak piersi jest nowotworem hormonozależnym, był Schinzinger. Miało to miejsce w 1889 r. (1). Hipotezę Schinzingera potwierdził 7 lat później Beatson, wykonując obustronne usunięcie jajników u kobiety przed menopauzą z nieoperacyjną wznową raka piersi. Po upływie 8 miesięcy od zabiegu autor stwierdził u chorej całkowity zanik tkanki nowotworowej (2). Zaobserwowany związek między

czynnością jajników a przebiegiem raka piersi stanowił punkt wyjścia do dalszych badań, które nabrały tempa po wyizolowaniu estrogenów z płynu pęcherzykowego jajników przez Allena w 1923 r. (3). Przełom w badaniach nad hormonozależnością nastąpił w latach 60. XX wieku, kiedy opisano mechanizm łączenia się estradiolu i progesteronu ze swoistymi receptorowymi białkami cytoplazmatycznymi. Dalsze badania nad receptorem estrogenowym potwierdziły, że, oprócz udziału w fizjologicznych przemianach zachodzących w czasie rozwoju i różnicowania

gruczołu piersiowego, pełni on również kluczową rolę w mechanizmie zależności hormonalnej raka piersi (4, 5, 6).

Estrogeny są steroidami produkowanymi przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych, w mniejszym stopniu przez komórki śródmiąższowe jajnika, a w czasie ciąży przez komórki syncytiotrofoblastu. Znikome ilości tych hormonów uwalniają także komórki podporowe kanalików nasiennych jądra oraz komórki warstwy siateczkowej kory nadnerczy. Znanych jest ponad 30 estrogenów, ale tylko estradiol, estron, estriol i 2- hydroksyestron występują w większych stężeniach, odgrywających rolę czynnościową (7). Najaktywniejszym estrogenem u kobiet jest 17-beta-estradiol, a u zwierząt dodatkowo estriol. Estrogeny pełnią kluczową rolę w funkcjonowaniu tak całego organizmu, jak i wielu tkanek zarówno w okresie embriogenezy, jak i też po jej zakończeniu. Mają wpływ na rozwój macicy, jajowodów, pochwy, zewnętrznych narządów płciowych oraz sutka, stymulując m.in. proliferację komórek podścieliska błony śluzowej macicy. Powodują też wzrost masy mięśniowej macicy,

a będąc znaczącymi aktywatorami prostaglandyn, regulują czynność skurczową tego narządu (8). Swoje efekty biologiczne indukują w komórkach docelowych zarówno za pomocą mechanizmów genomowych, jak i niegenomowych.

Przez wiele lat sądzono, że istnieje tylko jeden receptor, przez który estrogeny mogą oddziaływać na komórki. W 1996 r. w kilku laboratoriach niezależnie odkryto u szczura, myszy, człowieka i bydła domowego drugi receptor swoisty dla estrogenów. Wcześniej poznane i scharakteryzowane białko określano jako receptor estrogenowy alfa (ER alfa), zaś to nowe – jako receptor estrogenowy beta (ER beta; 9). Receptory estrogenowe alfa i beta nie są wzajemnymi izoformami, lecz dwoma różnymi białkami kodowanymi przez dwa odrębne geny zlokalizowane w różnych chromosomach (10, 11). Należą one do rodziny receptorów wewnątrzkomórkowych i pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych (12). Budowa obu receptorów estrogenowych wykazuje cechy wspólne ze wszystkimi receptorami jądrowymi. Receptory estrogenowe, tak jak inne receptory jądrowe zbudowane są z 6 domen oznaczonych literami od A do F. Estrogeny mają dwa miejsca aktywujące transkrypcję. Miejsca te zlokalizowane są na końcu aminowym białka w domenach A/B (activation function 1 – AF1) i na końcu karboksylowym (activation function 2 – AF2; 13).

Oba receptory estrogenowe występują w zmiennych proporcjach w różnych komórkach. Gromadzenie się estrogenów w niektórych komórkach zostało po raz pierwszy stwierdzone w 1959 r. przez Glasscocka i wsp. (14). Korenman i wsp. (6) w 1969 r. zaobserwowali szczególnie duże nagromadzenie białek wiążących estrogeny w cytozolu komórek guzów nowotworowych piersi w stosunku do niezmiennych komórek tego gruczołu lub jego tkanki tłuszczowej. Receptor estrogenowy alfa występuje najliczniej w macicy, jajniku, gruczole sutkowej, najdruzu, jądrze, sercu, aorcie, nerce, nadnerczu, przysadce, podwzgórze i wątrobie (15, 16). Receptor estrogenowy beta występuje w gruczole krokowym (komórkach śródbłonka prostaty), w jajniku (komórki ziarniste pęcherzyków przedowulacyjnych), a także w wielu innych tkankach, np. ośrodkowym układzie nerwowym oraz układach krwionośnym, odpornościowym, moczowo-płciowym, pokarmowym i oddechowym (15). W gruczole sutkowym, macicy, jajniku oraz w naczyniach krwionośnych i w ośrodkowym układzie nerwowym stwierdzono współdziałanie obu postaci receptorów (15, 17, 18). Dotychczasowa wiedza na temat znaczenia predyktoryjnego i rokowniczego w nowotworach receptora ER beta jest ograniczona,

a wyniki prac są często niejednoznaczne. Bardzo interesujące wyniki przynoszą badania nad rolą receptorów estrogenowych beta, prowadzone na liniach komórkowych. W linii komórek MCF-7 zawierających tylko receptory estrogenowe alfa (ER alfa+) i niezawierających receptorów estrogenowych beta wykazano, że estradiol nasilał proliferację. W tych samych komórkach po wprowadzeniu ER beta dochodziło zahamowania proliferacji poprzez wstrzymanie transkrypcji genów dla c-myc, cykliny D1 i cykliny A i zwiększenie ekspresji p21 i p27. Wyniki te świadczą o tym, że receptory estrogenowe alfa i beta mogą wywierać przeciwne działanie na proliferację i tworzenie się guzów (19). Na podstawie wielu badań naukowcy przypuszczają, że obecność receptorów beta w komórkach nowotworowych może okazać się korzystnym czynnikiem rokowniczym (20).

Znana jest rola estrogenów w procesie karcynogenezy. Działanie estrogenów w tym procesie jest związane z ich bezpośrednim wpływem na komórkę docelową i współdziałanie z innymi czynnikami egzogennymi: fizycznymi, chemicznymi i wirusowymi. Estrogeny modyfikują metabolizm substancji karcynogennych, a także zaburzają funkcje układu immunologicznego (21, 22). Estrogeny zwiększają proliferację komórkową, indukują białka receptorowe i nasilają syntezę DNA zarówno w tkance gruczolowej, jak i podścieliskowej narządu, co pobudza rozwój i wzrost nowotworów (23). Hormony te działają na komórkę docelową poprzez wiązanie kompleksu steroid – receptor z DNA, co powoduje zmianę transkrypcji genów (24).

Ekspresja receptorów estrogenowych w rakach sutka u ludzi stanowi ważny czynnik prognostyczny i predyktoryjny. W leczeniu raka sutka u ludzi zastosowanie znalazły leki, które hamują syntezę estrogenów (inhibitory aromatazy; 25), leki obniżające poziom estrogenów we krwi (uwalniające hormon luteinizujący LH; 26) oraz leki oddziałujące na same receptory estrogenowe (27). Dyskusyjne wydają się wyniki badań mających wyjaśnić przydatność oceny ekspresji receptorów estrogenowych jako czynników prognostycznych u suk. W większości badań wykazano, że ekspresja receptorów estrogenowych wiąże się z lepszym rokowaniem. O wpływie estrogenów na rozwój nowotworów gruczołu sutkowego świadczy to, że u suk, które zostały poddane wczesnej sterylizacji nowotwory te występują rzadziej (28, 29). Badania ekspresji receptorów estrogenowych u psów dowodzą przydatności oznaczania ekspresji receptorów estrogenowych w przewidywaniu rozwoju choroby (9, 30, 31). Niska ekspresja receptorów estrogenowych wiązała się

### Immunohistochemical evaluation of estrogen receptor expression in mammary gland neoplasms in bitches

Badowska-Kozakiewicz A.M., Malicka E.:

Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Mammary gland tumors are the most common neoplasms in canines. The aim of this study was to estimate estrogen receptors expression in mammary gland tumors that were removed during surgery. In a throughout examination the histological type of neoplasm, the degree of histological malignancy and tumor cells proliferative activity was established. These results were compared with histochemical and immunohistochemical examination. Simple cancers showed the elevated expression of estrogen receptors whereas the solid cancers expressed them on a lesser level. No correlation between the level of estrogen receptors and other histopathological parameters was found. Also no statistically significant correlation between the type of neoplasm and the degree of histological malignancy was established in canine mammary tumors.

**Keywords:** dogs, mammary gland, neoplasms, estrogen receptors.

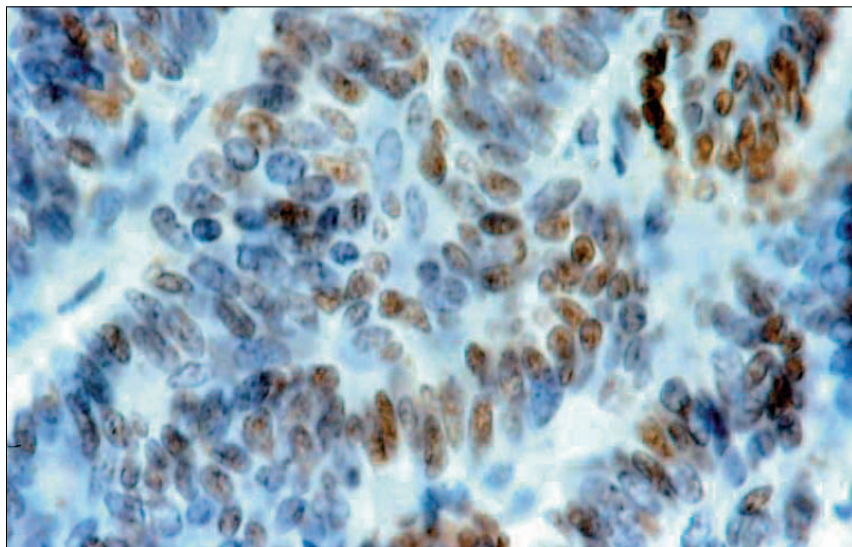
z częstszym powstawaniem przerzutów i krótszym czasem przeżycia (30). Wyższą ekspresją receptorów estrogenowych charakteryzowały się nowotwory niezłośliwe (30, 32). Większą ekspresję wykazywały gruczolakoraki złożone, o mniejszym stopniu histologicznej złośliwości, z mniejszym rozmiarem guzów (30, 33). Mulas nie stwierdził jednak związku ekspresji receptorów estrogenowych z długością bezobjawowego pooperacyjnego okresu przeżycia (33).

### Cel pracy

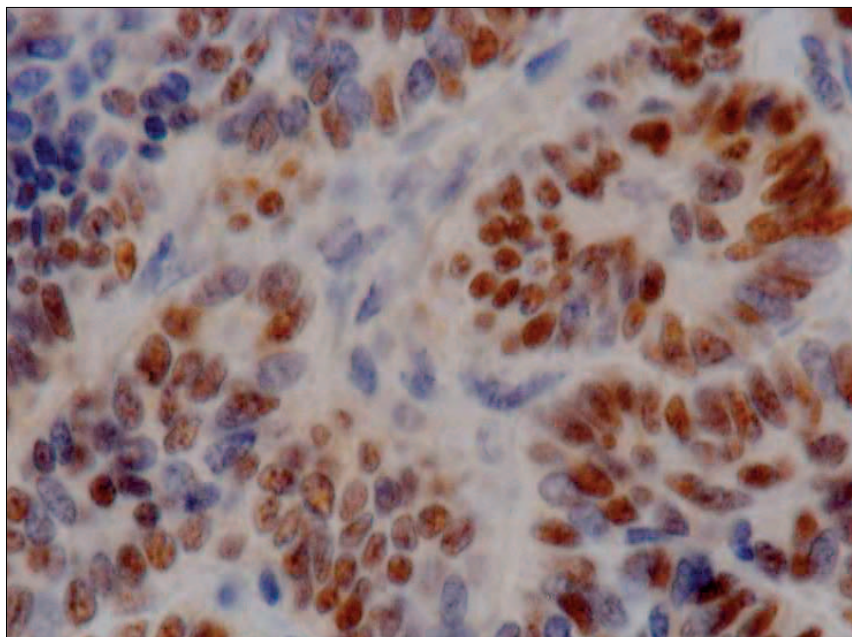
W świetle przytoczonych danych wydawało się interesujące podjęcie pracy, której celem było badanie ekspresji receptorów estrogenowych w nowotworach gruczołu sutkowego suk w korelacji z typem histologicznym guza i stopniem jego histologicznej złośliwości. Badania przeprowadzono na określonych grupach nowotworów pochodzenia nabłonkowego.

Do osiągnięcia celu zaplanowano wykonanie następujących badań histopatologicznych:

- określenie rodzaju nowotworu i stopnia jego złośliwości,
- ocenę aktywności proliferacyjnej poprzez obliczenie indeksów mitotycznych, ekspresji antygenu jądrowego Ki-67,
- określenie ekspresji receptorów estrogenowych alfa.



Ryc. 1. Gruczolakorak prosty (*adenocarcinoma simplex*), obraz ekspresji receptorów estrogenowych, IHC, pow. 100×



Ryc. 2. Gruczolakorak prosty (*adenocarcinoma simplex*), obraz ekspresji receptorów estrogenowych, IHC, pow. 100×

### Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły guzy gruczołu sutkowego suk, pobrane w trakcie zabiegów chirurgicznych przeprowadzonych w warszawskich lecznicach weterynaryjnych oraz w Klinice Małych Zwierząt Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW. W przypadku każdego pacjenta odnotowywano dane dotyczące rasy i wieku psa.

### Metodyka badań

#### Barwienie metodą przeglądową hematoksylina – eozyna (H&E)

W preparatach barwionych metodą H&E określano:

- rodzaj nowotworu (klasyfikacja WHO;34),
- stopień histologicznej złośliwości uwzględniając formowanie tubul, intensywność dzielenia się i stopień zróżnicowania komórek nowotworowych. Preparaty oceniano zgodnie z określonymi zasadami (29).

#### Metody immunohistochemiczne

W metodach immunohistochemicznych używano skrawków parafinowych, które naklejano na szkiełka podstawowe pokryte 2% roztworem silanu (Sigma) w acetonie i suszono przez 24 godziny w temp. 42°C. Przed rozpoczęciem procedury immunohistochemicznej skrawki były poddawane rutynowemu procesowi odparafinowania w szeregu alkoholi.

#### Zestaw przeciwciał stosowanych w reakcjach immunohistochemicznych:

W reakcjach immunohistochemicznych użyto przeciwciał monoklonalnych w odpowiednich rozcieńczeniach w 1% BSA (Sigma).

Stosowano następujące przeciwciała:

- 1) mysie monoklonalne przeciwko filamentom pośrednim:
  - wimentynie (Anti-Vimentin; DAKO), w rozcieńczeniu 1:50,
  - cytokeratynie (Anti-Cytokeratin; DAKO), w rozcieńczeniu 1:50.
- W wybranych nowotworach pochodzenia nabłonkowego w celu wykazania odpowiednich antygenów i białek stosowano przeciwciała w odpowiednich rozcieńczeniach w 1% BSA (Sigma):
- 2) mysie monoklonalne przeciw ludzkiemu antygenowi jądrowemu Ki-67 (DAKO) w rozcieńczeniu 1:75 (30),
- 3) mysie monoklonalne przeciw ludzkiemu receptorowi estrogenowemu alfa (DAKO) w rozcieńczeniu 1:35 (33).

#### Interpretacja wyników reakcji dla receptorów estrogenowych alfa

Do interpretacji wyników zastosowana została komputerowa analiza obrazu i program Lucia v. 4.21, za pomocą których zliczano zabarwione jądra komórek nowotworowych w 1000 komórek nowotworowych.

#### Statystyczne opracowanie wyników

Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych ( $\bar{x} \pm SD$ ). Wyniki opracowano za pomocą programu SPSS v. 12.0 PL Windows. Różnice uznano za istotne statystycznie przy  $p \leq 0,05$ .

#### Wyniki

Ekspresja receptorów estrogenowych występowała w jądrach komórek nowotworowych, niekiedy również stwierdzana była w cytoplazmie (ryc. 1, 2, 3, 4). Reakcja cytoplazmatyczna została uznana za nieswoistą. Wśród wszystkich przebadanych nowotworów pochodzenia nabłonkowego 79 (59,4%) nowotworów nie wykazywało ekspresji receptorów estrogenowych (ER), a 54 (40,6%) nowotwory wykazywały reakcję pozytywną.

Ekspresję receptorów estrogenowych alfa stwierdzono w największym procencie w rakach złożonych (43,9%), następnie w rakach prostych (42,6%), gruczolakach (28,6%), a najmniejszy procent guzów wykazujących ekspresję ER stanowiły raki lite (16,7%). Biorąc pod uwagę stopień histologicznej złośliwości, największy procent

guzów wykazujących ekspresję ER stanowiły raki o drugim (41,0%) i trzecim (46,9%) stopniu złośliwości (tab. 1, 2).

Analizując średnią liczbę komórek wykazujących ekspresję ER stwierdzono najwyższą ich ekspresję w rakach prostych. Nie wykazano istotnych różnic między poszczególnymi rodzajami nowotworów (ryc. 5), a pod względem stopnia histologicznej złośliwości najwyższą ekspresję stwierdzono w rakach o najwyższym stopniu złośliwości. Nie stwierdzono również statystycznej istotności różnic pomiędzy guzami o różnym stopniu histologicznej złośliwości. Analiza średniej liczby komórek wykazujących pozytywną reakcję ER pokazuje, że wraz ze wzrostem złośliwości nowotworów rośnie ekspresja receptorów estrogenowych (ryc. 6).

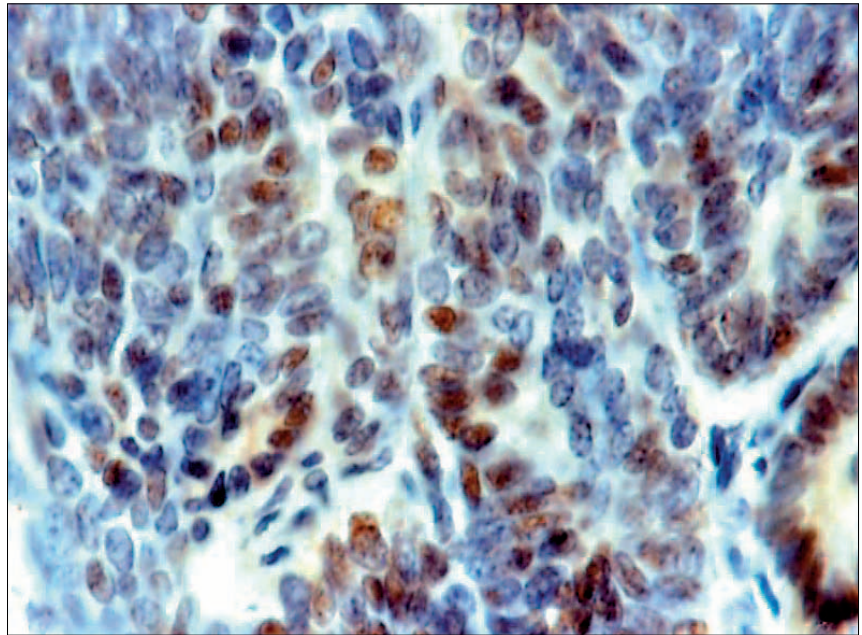
Analizując grupy wiekowe suk stwierdzono, że największej nowotworów wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych (56,5%) było u suk poniżej 8 roku życia (tab. 3).

Stwierdzono dodatnią korelację między indeksem mitotycznym a ekspresją receptorów estrogenowych w poszczególnych rodzajach nowotworów i wykazano istotność statystyczną między tymi cechami nowotworów ( $p=0,042$ ). Pod względem stopnia histologicznej złośliwości nie wykazano istotnych statystycznie różnic między badanymi cechami nowotworów.

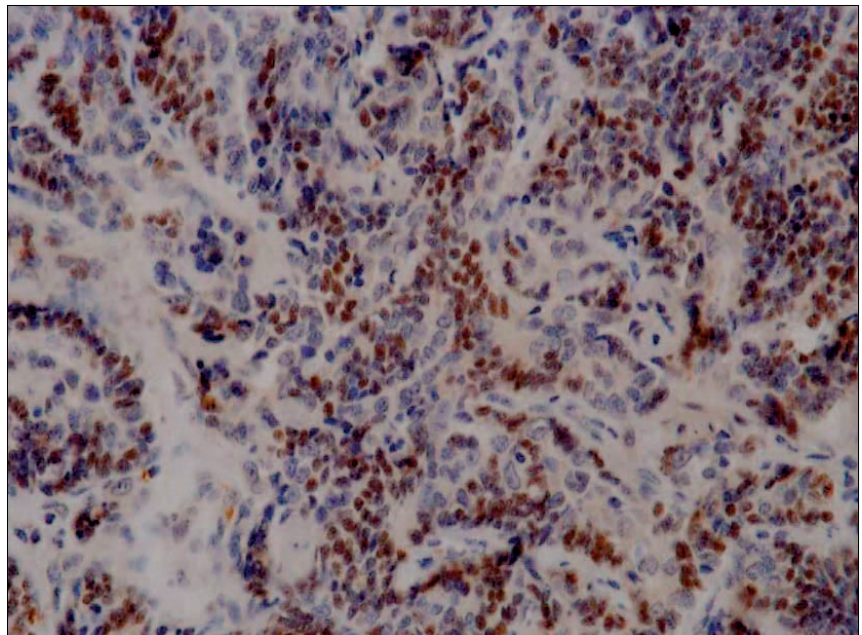
### Omówienie wyników

W badaniach własnych nowotwory pochodzenia nabłonkowego stanowiły 92%. Raki stanowiły 89,8% nowotworów pochodzenia nabłonkowego. Najwięcej zdiagnozowanych zostało raków złożonych – 66 przypadków i raków prostych – 47 przypadków, najmniej liczną grupę stanowiły raki lite – 6 przypadków. Nowotwory gruczołu sutkowego pochodziły od suk należących do 18 ras, w wieku od 3 do 16 lat.

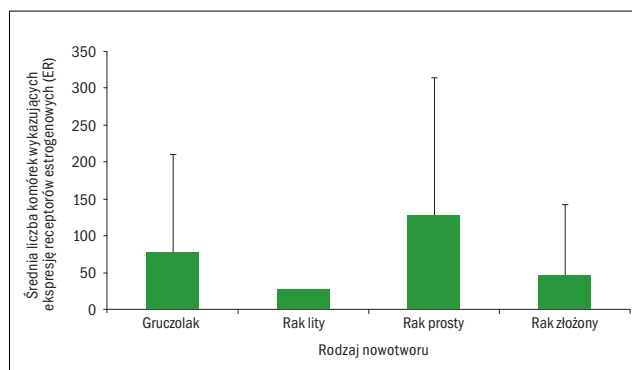
Uznany markerem w raku sutka u kobiet są receptory estrogenowe. W prawidłowym nabłonku gruczołu sutkowego u kobiet receptor estrogenowy wykrywany jest



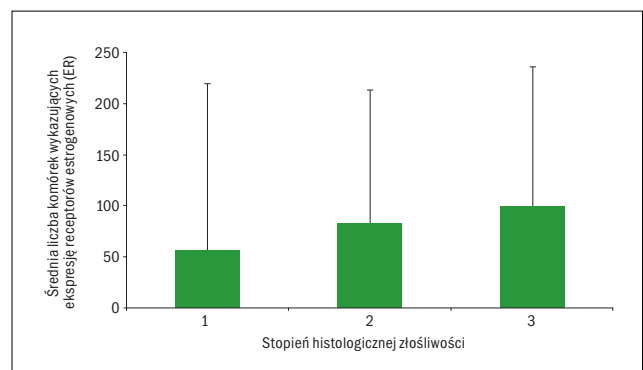
Ryc. 3. Gruczolakorak prosty (*adenocarcinoma simplex*), obraz ekspresji receptorów estrogenowych, IHC, pow. 100×



Ryc. 4. Gruczolakorak złożony (*adenocarcinoma complex*), obraz ekspresji receptorów estrogenowych, IHC, pow. 40×



Ryc. 5. Średnia liczba komórek wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych alfa w poszczególnych rodzajach nowotworów. Wyniki przedstawiono w postaci średnich  $\pm$  SD



Ryc. 6. Średnia liczba komórek wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych alfa w poszczególnych rodzajach nowotworów. Wyniki przedstawiono w postaci średnich  $\pm$  SD

**Tabela 1.** Liczba i procent nowotworów wykazujących pozytywną reakcję receptorów estrogenowych w zależności od rodzaju nowotworu, jak również liczba nowotworów niewykazujących reakcji pozytywnej

Rodzaj nowotworu	Liczba guzów wykazujących pozytywną reakcję (ER)	Procent guzów wykazujących pozytywną reakcję (ER)	Liczba guzów niewykazujących reakcji pozytywnej (ER)	Procent guzów niewykazujących reakcji pozytywnej (ER)
Gruzołak (n=14)	4	28,6	10	71,4
Rak prosty (n=47)	20	42,6	27	57,4
Rak złożony (n=66)	29	43,9	37	56,1
Rak lity (n=6)	1	16,7	5	83,3

**Tabela 2.** Liczba i procent nowotworów wykazujących pozytywną reakcję receptorów estrogenowych w zależności od stopnia histologicznej złośliwości, jak również liczba nowotworów niewykazujących reakcji pozytywnej

Stopień histologicznej złośliwości	Liczba guzów wykazujących pozytywną reakcję (ER)	Procent guzów wykazujących pozytywną reakcję (ER)	Liczba guzów niewykazujących reakcji pozytywnej (ER)	Procent guzów niewykazujących reakcji pozytywnej (ER)
I°(n=48)	19	39,6	29	60,4
II°(n=39)	16	41,0	23	59,0
III°(n=32)	15	46,9	17	53,1

**Tabela 3.** Liczba nowotworów wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych w zależności od grupy wiekowej suk

Grupa wiekowa suk	Liczba guzów wykazujących pozytywną reakcję	Procent guzów wykazujących pozytywną reakcję	Liczba guzów niewykazujących reakcji pozytywnej	Procent guzów niewykazujących reakcji pozytywnej
poniżej 8 lat (n=23)	13	56,5	10	43,5
od 8 do 12 lat (n=90)	35	38,9	55	61,1
powyżej 12 lat (n=20)	6	30,0	14	70,0

w 7–17% komórek. Szacuje się, że około 70–80% guzów sutka kobiet wykazuje ekspresję receptorów estrogenowych. Guzy te cechują się wolniejszym wzrostem, wyższym zróżnicowaniem i lepszym rokowaniem przy zastosowaniu odpowiedniego schematu terapeutycznego, co koreluje z długością przeżycia po chirurgicznym usunięciu (35, 36). Badania ekspresji receptorów estrogenowych w guzach gruczołu sutkowego u suk jak dotychczas dały niejednoznaczne wyniki. Martin i wsp. (9), badając 228 guzów u suk wykazali ekspresję ER zaledwie w 2,1% badanych nowotworów. Z kolei Peña i wsp. (37), diagnozując 21 przypadków raka z jednocześnie toczącym się procesem zapalnym, nie stwierdzili ekspresji receptorów estrogenowych. Według Sartin i wsp. (31) największe szanse na długi okres przeżycia po zabiegu mają suki, u których w guzach wykazano ekspresję samego ER lub w koekspresji z receptorami dla progesteronu (PgR), bowiem przy braku ER i PgR badacze zaobserwowali najkrótszy okres przeżycia. Millanta i wsp. (38) w badanych 47 rakach sutka suk stwierdzili, że ekspresja ER oraz PgR w tych guzach nie koreluje z czasem

przeżycia ani histologicznymi parametrami guza. Podobnie Sobczak-Filipiak i Malicka (39) wykazały brak korelacji między ekspresją receptorów estrogenowych a indeksem mitotycznym.

W badaniach stwierdzono ekspresję receptorów estrogenowych w 40% przebadanych nowotworów. Uzyskane wyniki wskazują najwyższą ekspresję ER alfa w rakach prostych (ryc. 5, 6) oraz rakach o najwyższym stopniu złośliwości. Wykazano istotną statystycznie korelację między indeksem mitotycznym a ekspresją receptorów estrogenowych. Nowak (40) w swoich badaniach spośród 48 guzów od suk w wieku od 7 do 15 lat stwierdził ekspresję ER tylko w 6%. Mulas (33) uzyskał odmienne wyniki, stwierdził on ekspresję ER alfa w nowotworach niezłośliwych. Podobnie w badaniach McEwen i wsp. (41) wykazali ekspresję receptorów estrogenowych w około 50% przypadków, a poziom ekspresji znacząco wyższy był w nowotworach niezłośliwych. Wyniki Nieto i wsp. (30) są odmienne, gdyż ich badania pokazują korelację pomiędzy ekspresją antygenu jądrowego Ki-67 a ekspresją ER. Autorzy tych badań najwyższy poziom ekspresji obserwowali

w rakach prostych i złożonych, podobnie jak w badaniach własnych. Inaczej uważają Rutteman (42), Sartin (31) oraz Galdes (32), którzy twierdzą, że wysoka ekspresja ER jest obecna w gruczolakach, a gruczolakoraki wykazują niższy poziom ekspresji tego markera.

Literatura prezentuje rozbieżne wyniki badań immunohistochemicznych ekspresji ER alfa w nowotworach gruczołu sutkowego. Zdania co do receptorów estrogenowych jako czynników rokowniczych są bardzo podzielone, niektórzy autorzy uznali je za pozytywny czynnik (33, 43), ale też istnieją głosy postulujące, iż są one negatywnym markerem rokowniczym (44). Ciekawe wydaje się, że w badaniach własnych niska ekspresja ER alfa korelowała ujemnie z wysoką ekspresją antygenu jądrowego Ki-67, tego samego zdania jest Peña (37), która prowadziła badania w nowotworach sutka u suk, oraz Ding (45) badający raki sutka kobiet. Na podstawie badań własnych można wnioskować, że ekspresja receptorów estrogenowych może mieć znaczenie w ocenie złośliwości nowotworów, lecz nie wykazano znaczących powiązań z innymi markerami.

## Piśmiennictwo

- Schinzigler A.: Über carcinoma mammae. Bericht über die Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Kongressals Beilage zum Centralblatt für Chir 1889; 29: 55. W: Bland K.L., Copeland E.M.: *The Breast*, WB Saunders Company, Philadelphia 1991.
- Beatson G.T.: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1896, 2, 104-107.
- Allen E., Doisy E.A.: An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *J. Am. Med. Assoc.* 1923, 81, 891-921.
- Jensen E.V., Suzuki T., Kawashima T.: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968, 59, 632-638.
- Toft D., Gorski A.: A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1966, 55, 1574-1581.
- Korenman S.G., Dukes B.A.: Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J. Clin. Endocrinol.* 1970, 30, 639-645.
- Farhi D., Nosanchuk J., Silverberg S. Endometrial adenocarcinoma in women under 25 years of age. *Obstet. Gynecol.* 1986, 61, 966-972.
- Pelletier G., El-Alfy M.: Immunohistochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 4835-4840.
- Martin de las Mulas J., Ordás J., Millán M.Y., Chacón F., De Lara M., Espinosa de los Monteros A., Jover A.: Immunohistochemical expression of estrogen receptor  $\beta$  in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet. Pathol.* 2004, 41, 269-272.
- Giguere V., Tremblay A., Tremblay G.B.: Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 1998, 63, 335-339.
- Lewandowski S., Kalita K., Kaczmarek L.: Estrogen receptor  $\beta$ . Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Letters* 2002, 524, 1-5.
- Tkaczyk M., Kalita K.: Receptor estrogenowy  $\beta$ -budowa, regulacja i funkcja. *Post. Biochem.* 2001, 47, 72-79.
- Speirs V., Kerin M.J. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br. J. Surg.* 2000, 87, 405-409.
- Glasscock R.F., Hoekstra W.G.: Selective accumulation of tritium-labeled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. *Biochem. J.* 1959, 72, 673-682.

15. Kalita K., Lewandowski S., Skrzypczak M., Szymczak S., Tkaczyk M., Kaczmarek L.: Receptory estrogenowe. W: *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału*. pod red. J. Nowaka i J.B. Zawilskiej, PW, Warszawa 2004.
16. Kim H., Peterson T.G., Barnes S.: Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor  $\beta$  signaling pathways. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, **68**, 1418-1425.
17. Vashisht A., Studd J.W.: Molecular mechanisms of oestrogen-the gynaecologists' viewpoint. *Eur. J. Cancer* 2000, **36**, 814-815.
18. King M.M., Mccay P.B.: Modulation of tumor incidence and possible mechanisms of inhibition of mammary carcinogenesis by dietary antioxidants. *Cancer Res.* 1983, **43**, 2485-2490.
19. Paruthiyil S., Parmar H., Kerekatte V.: Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2004, **64**, 423-428.
20. Speirs V.: Oestrogen receptor beta in breast cancer: good, bad or still too early to tell? *J. Pathol.* 2002, **197**, 143-147.
21. Rosenfeld C.S., Yuan X., Manikkam M., Calder M.D., Garverich H.A., Lubahn D.B.: Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor beta within ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 1999, **60**, 691-697.
22. Schmahl D.: Combination effects in chemical carcinogenesis. *VCH Weinheim, Germany* 1988, 202-207.
23. Kawiak J.: *Seminaria z cytologii*. Wyd. Med. Urban&Bartner. Wrocław 2002, s. 243-253.
24. Beato M.: Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989, **56**, 335-339.
25. Duffy M.J.: Estrogen receptors: Role in breast cancer. *Clin. Lab. Sci.* 2006, **43**, 325-347.
26. Jonat W.: Luteinizing hormone-releasing hormone analogues, the rationale for adjuvant use in premenopausal women with early breast cancer. *Br. J. Cancer* 1998, **19**, 213-217.
27. Zdrojewicz Z., Sztuka-Pietkiewicz A.: Selektywne modulatory receptorów estrogenowych. *Endokrynol. Pol.-Polish J. Endocrinol.* 1999, **50**, 267-276.
28. Moulton J.E.: Tumors of mammary gland. W: *Tumors in Domestic Animals*. 3<sup>rd</sup> ed., University of California Press, Berkeley 1990, s. 518-549.
29. Misdorp W.W., Meuten D. (edit.): *Tumors in Domestic Animals*. Iowa State Press, Black Publishing Company. 4<sup>th</sup> ed., 2002, s. 575-606.
30. Nieto A., PENA L., Pérez-Alenza M.D., Sánchez M.A., Flores J.M., Castaño M.: Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 239-247.
31. Sartin E.A., Barnes S., Kwapien R.P., Wolfe L.G.: Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992, **53**, 2196-2200.
32. Gerales M., Gärtner F., Schmitt F.: Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. *Vet. Rec.* 2000, **146**, 403-406.
33. Mulas J.M., Millán Y., Dios R.: A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet. Pathol.* 2005, **42**, 200-212.
34. Misdorp W., Else R.W., Hellmen E., Lipscomb T.P.: *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. World Health Organization, Geneva 1999.
35. Bacus S.S., Goldschmidt R., Chin D., Moran G., Weinberg D., Bacus J.W.: Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. *Am. J. Pathol.* 1989, **135**, 783-792.
36. Barzanti F., Dal Susino M., Volpi A., Amadori D., Riccobon A., Scarpi E., Medri L., Bernardi L., Naldi S., Aldi M., Gaudio M., Zoli W.: Comparison between different cell kinetic variables in human breast cancer. *Cell. Prolif.* 2000, **33**, 75-89.
37. Peña L., Nieto A., Perez-Alenza D.: Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998, **10**, 237-246.
38. Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vannozzi I., Poli A.: Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet. Sci.* 2005, **70**, 225-232.
39. Sobczak-Filipiak M., Malicka E.: Diagnostyka nowotworów gruczołu mlekowego z uwzględnieniem metod immunocytochemicznych. *Materiały Konferencyjne. Onkologia weterynaryjna* pod red. Rotkiewicza T., Olszyn 1997, s. 100-107.
40. Nowak M., Madej J.A., Dzięgiel P.: Porównanie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w gruczołakorakach gruczołu sutkowego u suk z aktywnością mitotyczną komórek nowotworowych. *Medycyna Wet.* 2007, **63**, 1211-1215.
41. McEwen E.G., Patnaik A.K., Harvey H.J., Panko W.B.: Estrogen receptor in canine mammary tumors. *Cancer Res.* 1982, **42**, 2255-2259.
42. Rutteman G.R., Withrow S.J., MacEwen E.G.: Tumors of the mammary gland. W: *Small Animal Clinical Oncology*. Withrow S.J., MacEwen E.G. (edit.), 3<sup>rd</sup> ed., Philadelphia 2001, s. 455-477.
43. Rodo A.: *Ekspresja receptorów HER-2, kadheryny E oraz białka p53 w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa 2007.
44. Skrzypczak M.: *Angiogeneza w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa 2004.
45. Ding L., Huang K., Snyder M.L., Cook J., Zhang L., Weston N., Okunieff P.: Tumor growth and tumor radiosensitivity in mice given myeloprotective doses of fibroblast growth factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, **88**, 1399-1404.

Dr Anna Badowska-Kozakiewicz, Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa