

## VLIV PŘEDOZÁŘENÍ NA NĚKTERÉ BIOCHEMICKÉ PARAMETRY MALIGNÍCH NÁDORŮ MLÉČNÉ ŽLÁZY: RECEPTORY STEROIDNÍCH HORMONŮ

## INFLUENCE OF PRE-IRRADIATION ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BREAST MALIGNANT TUMORS: STEROID HORMONE RECEPTORS

LANG B.A.<sup>1</sup>, ČERNOCH M.<sup>1</sup>, ŠIMÍČKOVÁ M.<sup>1</sup>, NEKULOVÁ M.<sup>1</sup>, FORBELSKÁ M.<sup>2</sup>, PECEN L.<sup>3</sup>, EBEN K.<sup>3</sup>,  
VONDRÁČEK J.<sup>3</sup>, PAČOVSKÝ Z.<sup>1</sup>, VERMOUSEK I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

<sup>2</sup> PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU BRNO

<sup>3</sup> ÚSTAV INFORMATIKY A VÝPOČETNÍ TECHNIKY PRAHA

**Souhrn: Východiska:** Otázka, zda ionizační ozáření nádoru ovlivňuje u rakoviny prsu stanovení receptorů steroidních hormonů ve tkáni, získané při následném operativním zákroku, nebyla dosud klinicky jednoznačně zodpovězena. **Materiál, metody:** U peroperačně získaných vzorků primárních nádorů rakoviny mléčné žlázy (pT 1-3, pN 0-2, M 0) u nemocných z let 1980 až 1990, které zahrnovaly skupinu 90 nádorů před operací frakcionovaně ozářených dávkou 20 Gy a skupinu 52 nádorů neozařených, byly stanoveny cytozolové receptory estradiolu (cER) a progesteronu (cPgR) i nukleární receptory estradiolu (nER) metodou saturační analýzy s aktivním uhlím a s použitím ligandů značených <sup>3</sup>H. **Výsledky:** Výrazně nižší hodnoty ER u předozářených nádorů (skupina A) jsme zaznamenali pouze u jaderné frakce, zatím co nižší hodnoty zjištěné u frakce cytozolové nebyly statisticky významné. Nižší hodnota mediánu cPgR u skupiny předozářených nádorů prsu je statisticky významná. S velkou pravděpodobností se zde projevuje i vliv stupně diferenciaci. Při klinickém posouzení hormonální pozitivivity nádorů je u skupiny A výrazně nižší procento nádorů, u nichž oba testované cytoplazmatické receptory jsou označeny jako pozitivní (cER+/cPgR+) a významně nižší je i procento nádorů s kombinací nER-/cPgR+. Procento předozářených nádorů s kombinací nER-/cPgR- je však podstatně vyšší. **Závěr:** Naše výsledky dokumentují rozdíly v expresi steroidních receptorů v maligních nádorech prsu po předozáření ve srovnání s nádory bez předozáření. Tyto výsledky podporují představu, že předozáření nádoru prsu narušuje stav signálních cest estrogenů a progesteronu v nádorové tkáni. Pochopit správně důsledky záření na zdravou i onkologicky postiženou tkáň mléčné žlázy je podle našeho soudu i klinicky stále aktuální.

**Klíčová slova:** rakovina prsu; receptor estrogenů; receptor progesteronu; radioterapie, nádorová buňka; ionizační záření

**Summary: Background:** The question of the ionising irradiation influence on steroid hormone receptor quantification in a subsequent breast carcinoma surgery remains clinically unanswered. **Material and Methods:** The saturation analysis technique with activated charcoal and <sup>3</sup>H labelled ligands was used to assay cytosol estradiol receptors (cER), cytosol progesterone receptors (cPgR) and nuclear estradiol receptors (nER) in two sets of primary breast carcinoma specimens (pT 1-3, pN 0-2, M0) collected during surgeries between 1980 and 1990. One group (Group A, N=90) consisted of specimens from tumours preoperatively fractionally irradiated with a total of 20 Gy, the specimens of the other group (Group B, N=52) were not subject to radiation therapy prior to surgery. **Results:** Markedly lower ER values in pre-irradiated tumours were found in the nuclear fraction only, while the ER level decrease in the cytosol fraction was not statistically significant. The statistically significantly lower cPgR median in pre-irradiated specimens was very probably partly due to the grade of differentiation. Compared with Group B, Group A had a significantly smaller number of tumours in which both cytoplasmic receptors of steroid hormones clinically tested as positive (cER+/cPgR+), significantly smaller number of nER-/cPgR+ tumours, but a substantially higher number of tumours with the nER-/cPgR- combination. **Conclusions:** Our results confirm the differences in the expression of steroid hormones in malignant breast tumours with and without pre-irradiation. The results seem to support the assumption that preoperative irradiation of breast tumours may impair the function of estrogen and progesterone signalling pathways in the tumour tissue. The authors believe that a thorough understanding of the consequences irradiation may produce in both healthy and oncologically affected tissue of the mammary gland remains a clinically topical issue even today.

**Key words:** breast cancer; estrogen-receptor; progesterone-receptor; radiotherapy; cancer cell; ionizing radiation

### Úvodní část

Po překonání nejradykálnějších chirurgických léčebných postupů u rakoviny prsu, ovlivněných Halstedovou představou pouze lokálního onemocnění, formovala se v padesátých až sedmdesátých letech dvacátého století nová představa léčebného postupu u maligních nádorů této lokalizace založená na rozšiřujících se vědomostech o kinetice a heterogenitě nádorových buněk mléčné žlázy. Velký vliv na další vývoj v této oblasti měly hlubší poznatky hormonální závislosti tkáni prsu, mole-

kulární biologie estrogenů a ve spojitosti s receptory estrogenů pak dramatický účinek objevu tamoxifenu. Klinický přístup byl poznamenán technickým pokrokem mamografie a radiační terapie. V důsledku toho všeho se měnily také chirurgické postupy ve smyslu menší radikality se snahou maximálně možného uchování integrity postiženého prsu. Do tohoto trendu se zapojilo v jisté fázi vývoje nových představ kombinovaných postupů i užití preoperativní radioterapie. Z klinického hlediska je spojen s radioterapií jeden závažný

problém při volbě následně vhodné terapie: Ovlivňuje předozáření u rakoviny prsu správné stanovení ER a PgR ve tkáni získané při následném operativním zákroku? Jak ovlivňuje záření koncentraci receptorů v buňce mléčné žlázy vůbec? V letech 1976 až 1981 bylo publikováno několik klinických pozorování, která naznačila možnost, že ionizační záření snižuje koncentrace cytoplasmatických forem jak ER tak PgR<sup>1,2,3,4</sup>. Jediná práce, jejíž výsledky tomuto zjištění odporují, byla studována na vzorcích metastáz z kůže, podkoží a z lymfatických uzlin ozářených bezprostředně před excizi<sup>5</sup>. Studie uveřejněné v letech osmdesátých a devadesátých, až byly metodicky provedeny v experimentech na kulturách buněčných linií lidské rakoviny prsu<sup>6,7,8,9,10</sup> nebo na maligních nádorech mléčných žláz zvířat<sup>11</sup>, potvrdily sice představu dřívějších klinických studií, ale nevyjasnily důsledky z toho plynoucí pro klinické rozvahy o dalším průběhu a prognóze onemocnění, ani molekulárně biologické mechanismy působení ionizačního záření na signalizační cesty hormonálního řízení.

Při biochemickém sledování klinického průběhu nemocných s rakovinou prsu u tří postupně studovaných souborů jsme v letech 1980 až 1990 vyšetřili i řadu biochemických parametrů primárních nádorů po ablací prsu. V rozmezí těchto let se ale v terapii tohoto onemocnění měnily názory na léčebné postupy, zvláště na výhody a nevýhody předoperačního ozáření nádoru. Získali jsme tak nechtěně u sledovaných žen dva soubory nádorů, které se lišily v předoperační fázi: Jednu skupinu tvořily nádory, které byly před ablací prsu nebo extirpací nádoru ozářeny, druhou skupinu představovaly nádory bez radiační terapie před základní léčbou chirurgickou.

Srovnání výsledků vyšetření ER a PgR u takto vzniklých souborů může přispět, podle našeho názoru, k další objektivizaci představy o vlivu ozáření na následné stanovení receptorů steroidních hormonů, když přesně experimentálně postihnout biochemické změny v lidských nádorech ozářených in situ je z etických důvodů nepřipustné.

#### Výběr nemocných a metody stanovení

**Výběr nemocných:** Byly analyzovány vzorky tkáně z operabilních primárních karcinomů prsu 142 nemocných léčených v Masarykově onkologickém ústavu v Brně v letech 1980-1990. Bližší charakteristika souboru je patrná z tab.1: Skupina A – nemocné s předoperační radioterapií rakoviny prsu (N=90). Skupina B – nemocné bez této předoperační terapie (N=52).

**Metody stanovení**<sup>12,13</sup>. Vzorky tkáně byly odebírány patologem z nádorů v těsném sousedství vzorku pro histopatologické vyšetření. Ihned po odebrání zmrazeny a uchovávány při -70 °C. Před analýzou byly - po zchlazení tekutým dusíkem - homogenizovány rozpráškovaním v mikrodismembrátoru (Braun-Melsungen, SRN). Cytosoly byly připraveny suspendováním prášku tkáně v pufru Tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 0,5 mmol/l, monothioglycerol 12 mmol/l, glycerol 10%, pH 7,4, a centrifugací při 105 000x g, při 20 °C po 1 h.

**Stanovení cER a cPgR.** Receptory steroidních hormonů byly stanovovány metodou saturační analýzy s aktivním uhlím a s použitím ligandů značených <sup>3</sup>H podle doporučení E.O.R.T.C.. Pro měření cER byl použit (2,4,6,7-<sup>3</sup>H)estradiol (Amersham Int. plc, Anglie). Nespecifická vazba byla měřena za přítomnosti 200-násobného přebytku diethylstilbestrolu jako neradioaktivního ligandu. Stanovení cPgR bylo provedeno principiálně stejnou metodou s použitím ligandu (<sup>3</sup>H)ORG.2058 (Amersham Int. plc, Anglie). Nespecifická vazba byla měřena za přítomnosti 200-násobného přebytku ORG.2058.

Výsledky měření obou steroidních receptorů byly zpracovány metodou Scatchardovy analýzy s korekcí podle Chamnesse a McGuire.

**Celková bílkovina v cytosolech** byla určena metodou Lowryho a spol. v modifikaci Petersonové<sup>14</sup> a na ni vztažen obsah měřených látek.

Tab. 1: Charakteristika souborů

A = nádory předozářené, B = nádory nepředozářené

		A		B		P
Počet		90		52		
Věk		53,86±9,79		52,25±11,44		NS
		N	%	N	%	
Meno-pauzální stav	pre-	30	33	20	38	NS
	peri-	16	18	7	14	NS
	post-	44	49	25	48	NS
pT	1	28	35	8	17	0,032
	2	49	62	32	70	NS
	3	2	3	6	13	-
pN	0	41	47	21	49	NS
	1	43	49	18	42	NS
	2	4	4	4	9	-
Histologický typ	Dukt.	52	59	33	63	NS
	Lob.	5	6	5	10	-
	Jiný	31	35	14	27	NS
Stupeň diferenciace	1-2	21	27	15	29	NS
	3-4	58	73	37	71	NS

**Stanovení nER** jsme provedli modifikovanou metodou podle Clarka<sup>15</sup>. Sediment po ultracentrifugaci cytosolu pro stanovení cER byl suspendován pomocí pístového homogenisátoru v pufru Tris-HCl 10 mmol/l, obsahujícím EDTA 1 mmol/l, dithiothreitol 1 mmol/l a azid sodný 3 mmol/l, pH 7,4 (TED pufr). Po centrifugaci při 800x g a teplotě 4°C byl sediment promyt ještě 2x TED pufrům a sediment získán centrifugací. Po opětovném suspendování sedimentu byly alikvoty suspence inkubovány 1h při laboratorní teplotě za třepání se šesti koncentracemi radioaktivního (2,4,6,7-<sup>3</sup>H)estradiolu při stanovení cER. Po následné centrifugaci při 800x g byly sedimenty opět 3x promyty TED pufrům. Měření radioaktivity se provádělo v alkoholických extraktech sedimentů.

**Koncentrace DNA** byla určena Burtonovou metodou a na ni vztažen obsah nER.

**Hodnocení klinické pozitivitu.** Za cER pozitivní byly považovány nádory o vazebné kapacitě vyšší než 5 fmol/mg bílkoviny v cytosolu, pro cPgR o kapacitě vyšší než 10 fmol/mg. U nER byly výsledky hodnoceny jako pozitivní nad 100 fmol/mg DNA ve vzorku.

**Statistická analýza** zahrnovala průzkumovou analýzu dat a výpočet základní deskriptivní statistiky. Vzhledem k charakteru rozložení byly pro významnost rozdílů mezi soubory a podskupinami použity neparametrické testy (Mann-Whitney a Kolmogorov-Smirnov). V kontingenčních tabulkách byl počítán Chi-kvadrát test a Fischerův exaktní test. Křivky přežití byly sestaveny metodou Kaplan-Meira. Přežívání v obou souborech bylo porovnáno Wilcoxonovým a LOG-RANK testem. Ke statistickým analýzám byly použity programy SPSS, Matlab a S.A.S.

#### VÝSLEDKY A DISKUZE

##### Hodnoty receptorů steroidních hormonů

**cER a nER.** Výrazně nižší hodnoty ER u předozářených nádorů (skupina A) jsme zaznamenali pouze u jaderné frakce, zatímco nižší hodnoty zjištěné u frakce cytozolové nebyly statisticky významné (tab.2). Stupeň diferenciace nádoru neměl podstatný vliv na hodnoty ER v obou buněčných kompartementech (tab. 3 a 4).

Tab. 2: Rreceptory ER a cPGR – přehled

		N	M	IQR (interquartile)	p *	
					KS	MW
cER (fmol/mg protein)	A	89	12,0	32	NS	NS
	B	52	17,01	46,2		
nER (fmol/mg DNA)	A	72	23	360	0,010	NS
	B	43	88	233		
cPGR (fmol/mg protein)	A	87	5,0	20	0,068	0,045
	B	50	9,85	82,95		

\* neparametrické testy rozdílů (KS = test podle Kolmogorova – Smirnova, MW = test podle Mann-whitney)

Tab. 3: Vliv ozáření na hodnoty ER a cPGR v nádorech převážně diferencovaných

		N	M	IQR (interquartile)	p *	
					KS	MW
cER (fmol/mg protein)	A	21	16,8	28,5	NS	NS
	B	13	14,6	52,2		
nER (fmol/mg DNA)	A	17	34,0	286,2	NS	NS
	B	12	153,5	592,5		
cPGR (fmol/mg protein)	A	21	9	32,8	NS	NS
	B	12	44,0	181,5		

\* neparametrické testy rozdílů viz tab. 2

Tab. 4: Vliv ozáření na hodnoty ER a cPGR v nádorech převážně nediferencovaných

		N	M	IQR (interquartile)	P *	
					KS	MW
cER (fmol/mg protein)	A	52	11,9	28,6	NS	NS
	B	34	14,4	33,5		
nER (fmol/mg DNA)	A	42	25,0	440,0	NS	NS
	B	27	81,0	177,9		
cPGR (fmol/mg protein)	A	52	0	3,5	NS	0,06
	B	33	3,7	48,8		

\* neparametrické testy rozdílů viz tab. 2

**PgR.** Nižší hodnota mediánu cPGR u skupiny předozářených nádorů prsu ve srovnání s kontrolním souborem nádorů neozařených je statisticky významná (tab.2). S velkou pravděpodobností se zde projevuje i vliv stupně diferenciace (tab. 3 a 4). Nádory převážně nediferencované asi exprimují cPGR v menším množství.

Výsledky nedávno publikované práce<sup>16</sup> o obrazu distribuce buněk exprimujících ER i PgR ve vztahu k proliferujícím buňkám v normální mléčné žláze žen vedou k závěru, že ER a PgR pozitivní buňky se vyskytují výlučně v epitelu a jsou pro Ki67 negativní. Tato skutečnost byla potvrzena experimentálně autoradiograficky na mléčných žlázách mladých panenských krys po inokulaci <sup>3</sup>H-tymidinu. Zmíněný buněčný typ s přítomností receptorů estrogenu a progesteronu tedy neproliferuje. Buňky, které inkorporovaly <sup>3</sup>H-tymidin, byly negativní jak pro ER tak i pro PgR.

Metodicky nejjednodušším prověřením vlivu záření na nádorovou buňku maligního onemocnění prsu jsou pokusy na příslušných buněčných liniích. MCF-7 je nejužívanější linií kontinuální kultury lidských nádorových buněk rakoviny mléčné žlázy exprimující ER i PgR. Na ní bylo potvrzeno, že ionizující záření snižuje koncentrace jak ER tak i PgR – vztaheno na buňku. Snížení je závislé na dávce, účinky na cytoplazmatické a jaderné frakce receptorů nejsou však stejné. Změny po záření postihují především jadernou frakci receptorů. Při prověřování funkce receptorů v ozářených buňkách MCF-7 belgičtí autoři nepozorovali významné účinky záření na počáteční fázi působení steroidních hormonů. Autoři vysvětlují výsledky svých pozorování snížením „jaderných vazebných míst“<sup>17</sup>.

V pokusech na nádorech mléčné žlázy krys, vyvolaných pomocí dimethylbenz(a)antracenu, nedošlo po aplikaci 7 Gy ke změně v hladině ER a PgR. Dávka 20 Gy ale vyvolala jejich statisticky významný pokles, který byl progresivní a dosáhl

maxima 20 až 30 dnů po expozici. Janssens a spolupracovníci se domnívají, že ztráta naměřených vazebných míst je důsledkem specifického účinku ionizačního záření a není způsobena možným vzestupem lytických enzymů v regredujících nádorech<sup>18</sup>.

### Výskyt kombinací ER/PgR podle klinických kritérií

Z tabulky 5 je zřejmé, že u skupiny nemocných s frakcionovaným předozářením nádoru v celkové dávce 20 Gy je při srovnání s nádory nepředozářenými výrazně nižší procento nálezu posouzených podle rutinně používaných kritérií klinické biochemie (cER+=>5 fmol/mg bílk.; cPGR+=>10 fmol/mg bílk.), u nichž oba testované cytoplazmatické receptory steroidních hormonů jsou pozitivní (cER+/cPGR+).

Pracovní skupina McGuire-a vyslovila v roce 1975 hypotézu<sup>19</sup>, která se opírala o skutečnost, že v normální reprodukční tkáni je syntéza PgR přísně závislá na estrogenu. Uvažovali takto: Vazba estradiolu na ER, která je podkladem metody stanovení ER, je pouze prvním stupněm v kaskádě dějů působení estradiolu na molekulární úrovni. Stanovíme-li k tomu i hladinu receptorů Pg, zjistíme funkčnost dalšího úseku této kaskády, a to úseku velmi podstatného. Znalost hladin receptorů obou steroidních hormonů nám podstatně zvýší jistotu předpovědi. Jejich hypotéza byla velmi logická a není tedy divu, že stanovení estrogenových a progesteronových receptorů se do dnes užívá celosvětově k vyřídění těch nemocných s rakovinou prsu, které mohou mít prospěch z léčby hormonální<sup>20</sup>.

Tab. 5: Kombinace cER a cPGR dle klinického hodnocení – vliv předozáření

	A	cER+ cPGR+	cER+ cPGR-	cER- cPGR+	cER- cPGR-
A	86	24,4 %	37,2 %	8,1 %	30,2 %
B	49	40,8 %	28,6 %	8,2 %	22,4 %
Chi-square		0,046	NS	NS	NS
Fischer		0,054	NS	NS	NS

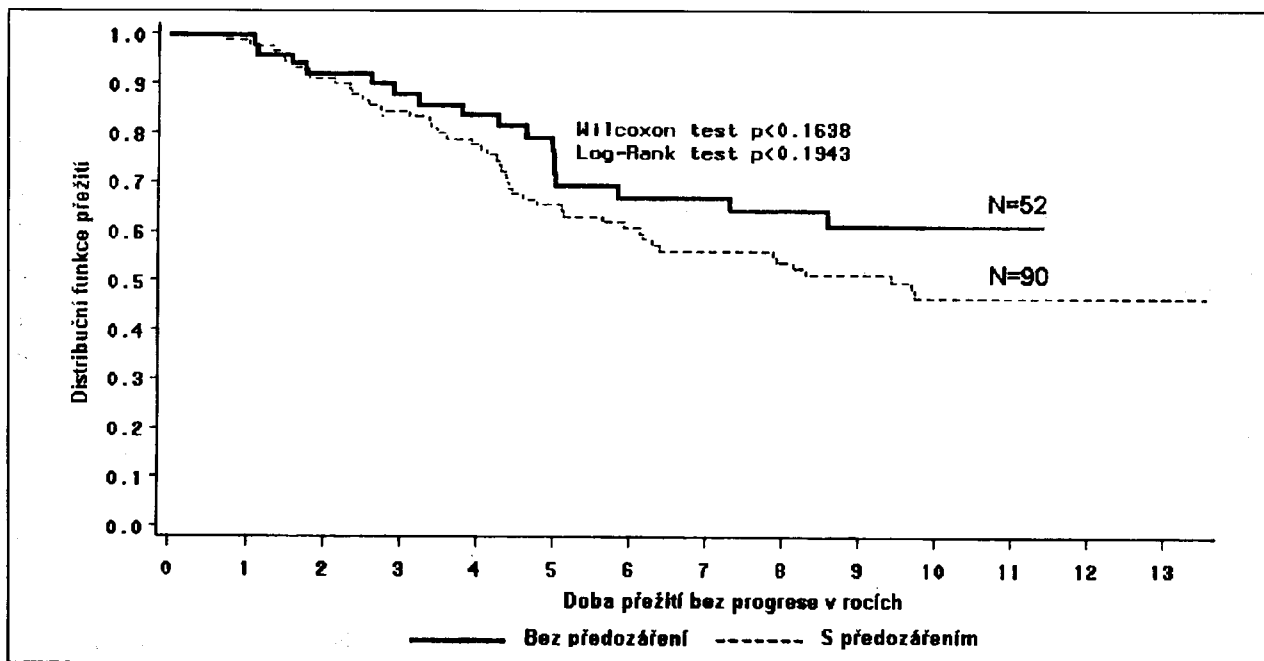
Poslední léta však ukázala, že hypotéza postihuje jen část, a dokonce asi tu menší část skutečnosti. Situace hormonální regulace je totiž mnohem složitější. Řada laboratoří popsala výskyt přirozeně se objevujících variant ER<sup>21,22</sup> nebo mutantů, byly popsány i polymorfní formy ER genů<sup>23,24</sup>. Od roku 1996 víme, že existují dvě základní izoformy ER s vysokou homologií na úrovni DNA – označujeme je dnes ERa. Jejich koexprese v maligních nádorech prsu může mít klinický prognostický význam. Mnohých z genetických změn v er byly zjištěny také v intronech, tedy v oblastech genů, které přímo nekodují primární strukturu bílkoviny.

Nižší procento skupiny s kombinací cER+/cPGR+ u předozářených nádorů v naší studii by mohlo podle dosud uznávaných představ znamenat nevýhodnější stav hormonální situace v důsledku snížené exprese receptorů steroidních hormonů u předozářených nádorů s příslušnými důsledky při výběru dalšího léčebného postupu. Pro tuto skutečnost by svědčilo i významně vyšší procento (tab.6) předozářených nádorů s kombinací nER-/cPGR- (p=0,04) a snížení počtu nádorů s kombinací nER-/cPGR+ (p=0,06).

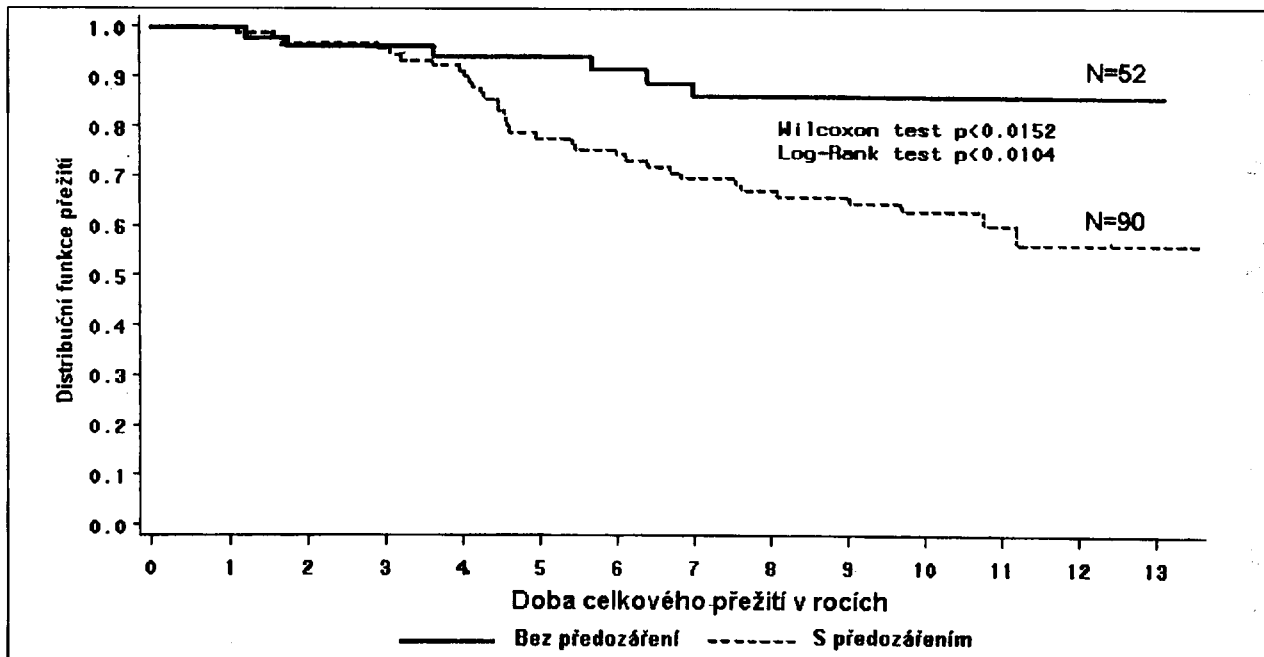
Tab. 6: Kombinace nER a cPGR dle klinického hodnocení – vliv předozáření

	A	nER+ cPGR+	nER+ cPGR-	nER- cPGR+	nER- cPGR-
A	72	20,8 %	23,6 %	18,1 %	37,5 %
B	42	26,2 %	21,4 %	33,3 %	19,0 %
Chi-square		NS	NS	0,064	0,039
Fischer		NS	NS	0,072	0,057

**Graf 1: Doba bez návratu choroby.** Stejný trend je zřetelný i při hodnocení stadia přežívání nemocných bez příznaků choroby u obou sledovaných souborů. Rozdíl však není významný na úrovni 95 %.



**Graf 2: Doba přežití nemocných.** Odhad skutečného přežití po deseti letech podle Kaplan-Meiera v souboru nemocných bez předozáření byl signifikantně vyšší než u souboru předozářených.



### Vliv předozáření na pooperační vývoj choroby

**Doba přežití nemocných.** Odhad skutečného přežití po deseti letech dle Kaplan-Meiera v souboru nemocných bez předozáření byl signifikantně vyšší než u souboru předozářených (test Log-Rank  $p < 0,0104$ ; Wilcoxon  $p < 0,0152$ ) (graf 2).

**Období bez návratu choroby.** Stejný trend je zřetelný i při hodnocení bezprogresového přežívání nemocných (ve stadiu bez příznaků choroby) u obou deset let sledovaných souborů. Rozdíl však není významný na úrovni 95% (graf 1).

**Souhrn výsledků** naší studie svědčí nejen pro to, že předozáření narušuje stav hormonálních signálních cest estrogenu a progesteronu v nádorové tkáni, ale připouští i možnost, že jeho vliv nepřispívá k léčebným záměrům klinika. I když pře-

dozařování maligních nádorů prsu se již prakticky neužívá, doporučuje se často pooperační radioterapie a to dokonce i u nádorů fyloidních<sup>26</sup>. Posoudit příčiny horšího odhadu přežití u nemocných s předozářením je možno teprve hlubší analýzou i s ohledem na uplatněnou terapii u nemocných, které již sledujeme déle než deset let. Pochopit správně důsledky záření na zdravou i onkologicky postiženou tkáň mléčné žlázy je podle našeho soudu i klinicky stále aktuální.

**Poděkování.** Autoři by rádi poděkovali paní H.Kvapilové a M.Pavlovské za výbornou technickou spolupráci při stanovení receptorů a kolegům z oddělení chirurgie a patologie za poskytnutí definovaného klinického materiálu.

## Literatura

1. Walt, A. J., Singhakowinta, A., Brooks, S. C., Cortez, A.: The surgical implications of estrophile protein estimation in carcinoma of the breast. *Surgery (St.Louis)* 80, 506-512 (1976).
2. Bressot, M., Veith, F., Saussol, J., Pujol, H., Lavie, M., Granier, M., Gary-Bobo J., Rochefort, H.: Presurgical radiotherapy decreases the concentrations of estrogen and progesterone receptors in human breast cancer: a 200-patient study. *Breast Cancer Res.Treat.* 2, 177-183 (1981).
3. Janssens, J. P., Bonte, J., Drochmans, A., Mulier, J., Rutten, J., Wittevrongel, C., De Loecker, W.: Effect of presurgical radiotherapy on the steroid receptor concentrations in primary breast carcinoma. *Europ. J.Cancer* 17, 659-664 (1981).
4. Noel, G., Becquart, D., Maisin, H.: Les récepteurs d'estrogènes dans le cancer du sein: effet de la radiothérapie pré-opérative. *Senologia* 6, 315-323 (1981).
5. Valenstein, S. L., Voigt, W., Vogel, Ch. L., Thomsen, S., Sugarbaker, E. V., Castro, A., Gupta, V., Charyulu, K.: Reliability of clinical estrogen receptor assays performed on tumor tissue biopsied from sites previously treated with radiotherapy. *Surgery* 85, 617-623 (1979).
6. Janssens, J. P., Wittevrongel, Christine, De Loecker, W.: Interaction of ionizing irradiation with steroid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 44, 5650-5656 (1984).
7. Toulas, C., Beauregard, G., Delassus, F., Thauvette, L., Potier, M., Bayard, F., Faye, J.-C.: Radiation inactivation of estrogen receptor in intact human breast cancer cells (MCF-7). *FEBS Lett.* 285, 28-30 (1991).
8. Schmidt-Ullrich, R. K., Valerie, K. C., Chan, W., McWilliams, D.: Altered expression of epidermal growth factor receptor and oestrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation exposures. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 29, 813-819 (1994).
9. Whelan, R. D., Hill, B. T.: Differential expression of steroid receptors, hsp27, and pS2 in a series of drug resistant human breast tumor cell lines derived following exposure to antitumor drugs or to fractionated X-irradiation. *Breast Cancer Res.Treat.* 26, 23-39 (1993).
10. Paulsen, G. H., Strickert, T., Marthinsen, A. B., Lundgren, S.: Changes in radiation sensitivity and steroid receptor content induced by hormonal agents and ionizing radiation in breast cancer cells in vitro. *Acta Oncol.* 35, 1011-1019 (1996).
11. Janssens, J. P., Wittevrongel, C., Van Dam, J., Goddeeris, P., Lauwerijns, J. M., DeLoecker, W.: Effects of ionizing irradiation on the estradiol and progesterone receptors in rat mammary tumors. *Cancer Res.* 41, 703-707 (1981).
12. Lang, B. A., Černoch, M., Vermousek, I., Šimíčková, M., Stratil, P., Rejthar, A., Hlávková, J., Sakalová, J., Cely, J.: Complex biochemical analysis of human breast tumor tissue. *Neoplasma* 36, 61-69 (1989).
13. Vermousek, I., Szamel, Irene, Goerlich, M., Brdar, B., Cvrtila, D., Graf, D., Padovan, R., Paszko, Z., Šafarčík, K.: Quality control of steroid receptor assays: An international study. *Neoplasma* 39, 65-69 (1992).
14. Peterson, G. L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal.Biochem.* 83, 346-3., (1977).
15. Clark J. H., Peck J. R., Schrader W. T., O'Malley B. W.: Estrogen and progesterone receptors: Methods for characterization, quantification, and purification, v knize Busch H., Methods in cancer research, Vol. XII, Academic Press, New York, 1976.
16. Russo, J., Ao, X., Grill, C., Russo, I. H.: Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor a and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res.Treat.* 53, 217-227 (1999).
17. Janssens, J. P., Wittevrongel, Christine, De Loecker, W.: Interaction of ionizing irradiation with steroid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 44, 5650-5656 (1984).
18. Janssens, J. P., Wittevrongel, C., Van Dam, J., Goddeeris, P., Lauwerijns, J. M., DeLoecker, W.: Effects of ionizing irradiation on the estradiol and progesterone receptors in rat mammary tumors. *Cancer Res.* 41, 703-707 (1981).
19. Horwitz, K. B., McGuire, W. L., Pearson, O. H., Segaloff, A.: Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* 29, 726-727 (1975).
20. Kolář, Z.: Estrogenové receptory a karcinomy mléčné žlázy. *Čs.Patol.* 29, 85-92 (1993).
21. Fuqua, S. A. W., Fitzgerald, S. D., Chamness, G. C., Tandon, A. K., McDonnell, D. P., Nawaz Z., O'Malley, B. W., McGuire, W. L.: Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res* 51, 105-109 (1991).
22. Fuqua, S. A., Fitzgerald, S. D., Allred, D. C., Elledge, R. M., Navaz, Z., McDonnell, D. P., O'Malley, B. W., Greene, G. L., McGuire, W. L.: Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res* 52, 483-486 (1992).
23. Fuqua, S. A. W., Chamness, G. C., McGuire, W. L.: Estrogen receptor mutations in breast cancer. *J.Cell Biochem.* 51, 135-139 (1993).
24. Baker, V. A., Puddefoot, J. R., Marsigliante, S., Baker, S., Goode, A. W., Vinson, G. P.: Oestrogen receptor isoforms, their distribution and relation to progesterone receptor levels in breast cancer samples. *Br.J.Cancer* 66, 1083-1087 (1992).
25. Speirs, Valerie, Parkes, A. T., Kerin, M. J., Walton, D. S., Carleton, P. J., Fox, J. N., Atkin, S. L.: Coexpression of estrogen receptor a and b: Poor prognostic factor in human breast cancer? *Cancer Res.* 59, 525-528 (1999).
26. Dietz, R.: Das cystosarcoma phylloides malignum. *Strahlent. Onkol.* 167, 292-294 (1991).