

Wstęp: Do klasycznych czynników rokowniczych u pacjentów chorych na raka stercza należą: stopień zaawansowania klinicznego, stopień złośliwości histologicznej w skali Gleasona oraz poziom PSA. Trwa poszukiwanie wiarygodnych markerów biologicznych nowotworu, które uzupełniłyby skąpe dane morfologiczno-kliniczne w celu bardziej precyzyjnego i zindywidualizowanego przewidywania prognozy oraz doboru odpowiedniej opcji terapeutycznej.

Cel pracy: Ocena znaczenia markerów hipoksji oraz unaczynienia w guzie pierwotnym poprzez określenie ich korelacji z uznanymi czynnikami prognostycznymi u pacjentów chorych na raka stercza, poddanych pierwotnemu leczeniu chirurgicznemu.

Materiał i metody: Retrospektywnej analizie poddano bloczki parafinowe raków stercza pochodzących od 43 chorych po radykalnej prostatektomii. Preparaty otrzymane z bloczków poddano barwieniom immunohistochemicznym na obecność markera hipoksji – białka Hif-1 α , oraz markera mikrounaczynienia – białka CD34. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w celu określenia korelacji z klasycznymi czynnikami prognostycznymi – stopniami pTNM, Gleasona i wyjściowym stężeniem PSA.

Wyniki: Wykazano korelację pomiędzy stopniem Gleasona i obydwooma badanymi czynnikami biologicznymi: ekspresją Hif-1 α ($R = 0,32; p < 0,05$) oraz gęstością naczyń wykazujących ekspresję CD34 ($R = 0,65; p < 0,001$). Ponadto odnotowano istotną zależność pomiędzy stopniem pTNM a gęstością naczyń CD34 (+) ($R = 0,34; p < 0,05$).

Stopień nasilenia hipoksji i unaczynienia w guzie pierwotnym może stanowić istotny dodatkowy wskaźnik rokowniczy u pacjentów chorych na raka stercza. Pełna korelacja stopnia zróżnicowania histologicznego z badanymi markerami biologicznymi sugeruje jego wiodące znaczenie pośród klasycznych czynników prognostycznych.

Słowa kluczowe: rak gruczołu krokowego, biomarkery, immunohistochemia.

Wpływ nasilenia hipoksji i unaczynienia w guzie pierwotnym na występowanie klasycznych czynników rokowniczych u chorych na raka gruczołu krokowego – czy markery biologiczne są pomocne w przewidywaniu przebiegu choroby nowotworowej?

Influence of intensity of primary tumour hypoxia and vascularisation on standard prognostic factors in prostate cancer patients – are biological markers helpful in prediction of cancer disease course?

Hanna Andrusiewicz, Agnieszka Żyromska, Roman Makarewicz

Katedra Onkologii i Klinika Brachyterapii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu
Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Wstęp

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2000 r. zarejestrowano na świecie 513 tys. (co stanowi 9,7% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe wśród mężczyzn) nowych zachorowań na raka stercza i 201 tys. (co stanowi 5,6% wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych u mężczyzn) zgonów z powodu tego raka [1]. W Polsce rak stercza jest drugim co do częstości nowotworem złośliwym [6257 (10%) nowych zachorowań] wśród mężczyzn i czwartą przyczyną zgonu z tego powodu [3578 (7%) zgonów] [2]. Skala problemu zdrowotnego, jaką obrazują przedstawione liczby, sprawia, że poszukiwanie sposobów poprawy rejestrowanych wyników leczenia jest ciągle aktualne.

Obiecującym kierunkiem badań prowadzącym do zindywidualizowanego wykorzystania uznanych metod postępowania (obserwacja, leczenie chirurgiczne, radioterapia, hormonoterapia, leczenie skojarzone) jest próba identyfikacji biologicznych cech nowotworu o dodatkowym znaczeniu rokowniczym i predykcyjnym. Celem badań jest sprawdzenie hipotezy o zależności markerów biologicznych (unaczynienia, hipoksji) z czynnikami o uznanej wartości rokowniczej: stopniem zaawansowania klinicznego (klasyfikacja TNM), stopniem złośliwości histologicznej (skala Gleasona) oraz wyjściowym stężeniem PSA.

Biologicznymi czynnikami o potencjalnym znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym są markery współistniejących ze sobą w guzie i powiązanych patogenetycznie zjawisk – hipoksji i unaczynienia.

Wartość oceny hipoksji wynika zarówno z jej wpływu na wzrost promieniooporności [3] i chemooporności guzów litych [4, 5], jak i progresję choroby nowotworowej. Centralny mediator odpowiedzi komórkowej na niskie utlenowanie, białko Hif-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) [5–7], promuje trans-

Introduction: In prostate cancer patients the standard prognostic factors include: the clinical stage, histological grade according to Gleason scale and PSA level. Reliable biological markers are being sought to supplement the scant morphological-clinical data in order to predict more precise and individualized prognosis and to select a proper therapeutic option.

Aim of the study: The aim of the study was to assess the significance of primary tumour hypoxia and vascularisation markers through determining their correlation with standard prognostic factors in prostate cancer patients who underwent primary surgical treatment.

Material and methods: A retrospective analysis of 43 formalin-fixed, paraffin-embedded prostate cancers derived from patients after radical prostatectomy was conducted. Slides with tissue specimens were immunohistochemically stained against the hypoxia marker Hif-1 α protein and the microvascularisation marker CD34 protein. The results were statistically analyzed to assess the markers' correlation with standard prognostic factors: pTNM stage, Gleason score and initial PSA level.

Results: A correlation was demonstrated between Gleason score and both biological factors studied: Hif-1 α expression ($R = 0.32$; $p < 0.05$); as well as density of vessels showing CD34 ($R = 0.65$; $p < 0.001$) expression. Furthermore, a significant relationship between pTNM stage and CD34 (+) ($R = 0.34$; $p < 0.05$) vessel density was found.

The intensity of primary tumour hypoxia and vascularisation may constitute an important additional prognostic indicator in prostate cancer patients. The full correlation of Gleason score with the biological markers studied suggests its leading significance among the standard prognostic factors.

Key words: prostate cancer, biomarker, immunohistochemistry.

krypcję genów uczestniczących w podstawowych procesach życiowych komórki, zdolności naciekania środowiska oraz angiogenezie [7–13]. Ta ostatnia z kolei uważana jest za kluczowy proces decydujący o wzroście guza i tworzeniu przerzutów odległych [8]. Komplementarnymi markerami angiogenezy, obecnymi już we wczesnych jej etapach, są specyficzne dla endoteliocytów antygeny, takie jak CD31 czy CD34 [14]. Wszystkie wymienione markery są łatwo oznaczalne metodami immunohistochemicznymi.

Materiał i metody

Pacjenci

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy. Analizie poddano 43 bloczki parafinowe gruczolakoraków stercza pochodzących od pacjentów po pierwotnej prostatektomii. Średnia wieku mężczyzn w dniu operacji wynosiła $64,4 \pm 6,4$ roku (48–75 lat). Średnie przedoperacyjne stężenie PSA osiągnęło wartość $11,1 \pm 7$ ng/ml (3,31–39,90). Wskaźnik Gleasona wahał się 3–9 (średnia $6,2 \pm 1,3$). U 21 chorych w badaniu pooperacyjnym stwierdzono cechę pT2, u 22 – pT3.

Badania immunohistochemiczne

Barwienie wszystkich biomarkerów przeprowadzono metodą EnVision [zestaw EnVision + System HRP, Dako, K4001; przeciwciała monoklonalne firm Chemicon (anty-Hif-1) i Dako] na skrawkach grubości 5 μ m pochodzących z guzów nowotworowych zatopionych w bloczkach parafinowych. Umieszczone na adhezyjnych szkiełkach podstawowych (Knittel Glaser) skrawki inkubowano 2 godz. w termostacie komorowym w temp. 60°C, następnie odparafinowano i uwodniono. Aktywność endogennej peroksydazy hamowano 3-procentowym nadtlenkiem wodoru. Po odsłonięciu determinant antygenowych: termicznie (kuchenka mikrofalowa) dla przeciwciała anty-Hif-1 α oraz enzymatycznie (0,1-procentowy roztwór pepsyny) dla przeciwciał anty-CD34, próbki inkubowano z pierwotnym przeciwciałem (Hif-1 α 1 : 100; CD34 1 : 100), a następnie z odczynnikami EnVision + System HRP. Do uwidocznienia badanych struktur wykorzystano chromogen DAB (Dako, K3468). Jądra komórkowe podbarwiono hematoksyliną (Dako, S2020). W ostatnim etapie preparaty odwadniano i zamykano w medium (Consul Mount, Thermo Shandon, USA).

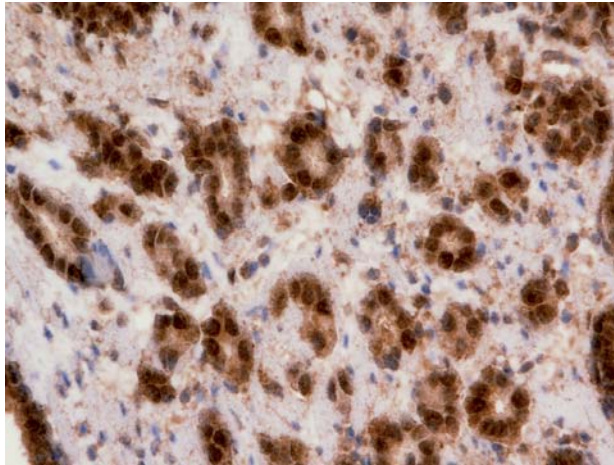
Wszystkie preparaty oceniano przy użyciu mikroskopów świetlnych Olympus BX41 (Hif-1 α) i Nikon Eclipse 80i z systemem do analizy obrazu (CD34) dwóch badaczy (E.Ś. i H.A.), wykorzystując wkładkę mikrometryczną (Olympus Polska), by uniknąć błędów powtórnego zliczania tych samych komórek. Pola widzenia preparatów barwionych w kierunku Hif-1 α przeglądano pod 400-krotnym powiększeniem, dla barwienia CD34 – 200-krotnym.

Ocena hipoksji

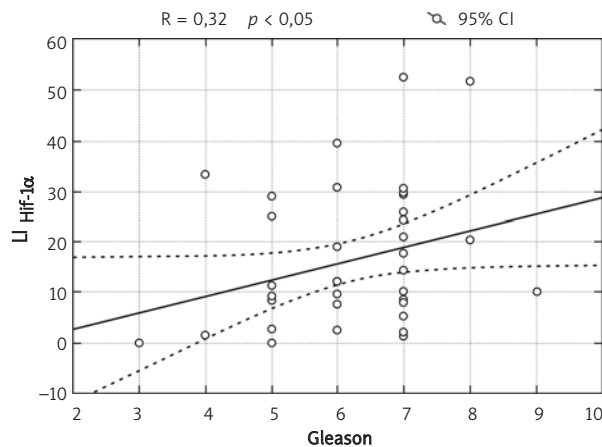
Nasilenie hipoksji w badanych tkankach określono na podstawie analizy ekspresji jej endogennego markera, białka Hif-1 α . Wyniki jądrowego barwienia Hif-1 α przedstawiono w postaci indeksu wiązania, LI (*labelling index*) – jako odsetek pozytywnie wybarwionych (brązowych) jąder w całkowitej liczbie ocenianych komórek. W kilku polach widzenia zliczano co najmniej 500 (maks. 1000) komórek raka stercza.

Ocena unaczynienia

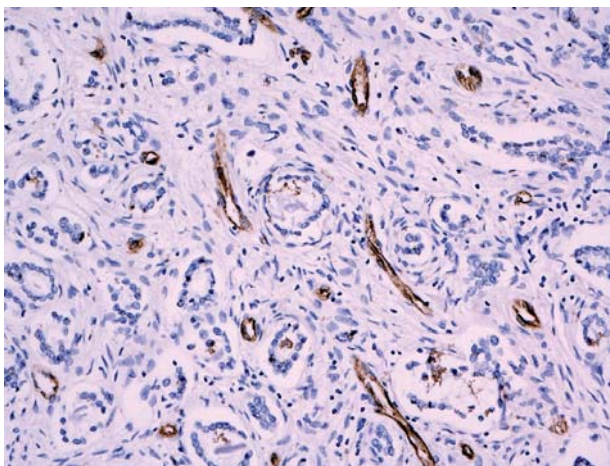
Stopień unaczynienia guzów określono na podstawie analizy gęstości naczyń wykazujących ekspresję białka CD34. Postępując się metodą Weidnera [15, 16], w każdym preparacie oceniano 5 pól widzenia o największej liczbie mikronaczyń (*hot spots*), obliczano z nich średnią arytmetyczną, a następnie przeliczano na powierzchnię 1 mm².



Ryc. 1. Wyniki barwienia immunohistochemicznego w kierunku Hif-1 α
Fig. 1. Results of immunostaining against Hif-1 α



Ryc. 2. Korelacja pomiędzy stopniem Gleasona i indeksem wiązania Hif-1 α
Fig. 2. Correlation between Gleason score and Hif-1 α labelling index



Ryc. 3. Wyniki barwienia immunohistochemicznego w kierunku CD34
Fig. 3. Results of immunostaining against CD34

Analiza statystyczna

Zgodność rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym sprawdzano testem Shapiro-Wilka. W przypadku prób o rozkładzie zbliżonym do normalnego do porównania średnich zmiennych niezależnych wykorzystano test t-Studenta. Gdy rozkład odbiegał istotnie od normalnego, różnicę między grupami analizowano testami U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallisa. Zależność między dwiema cechami określano współczynnikiem korelacji Spearmana. Za granicę znamienności statystycznej przyjęto poziom $p \leq 0,05$. Obliczeń dokonano za pomocą programu komputerowego Statistica.

Wyniki

Stan utlenowania

Obecność hipoksji w guzie pierwotnym (dodatknie barwienie w kierunku Hif-1 α) potwierdzono w 90,7% (39/43) raków stercza (ryc. 1). Średni LI_{Hif-1 α} (%) wyniósł $16,1 \pm 13,8$ (0,0–52,4), mediana 11,2.

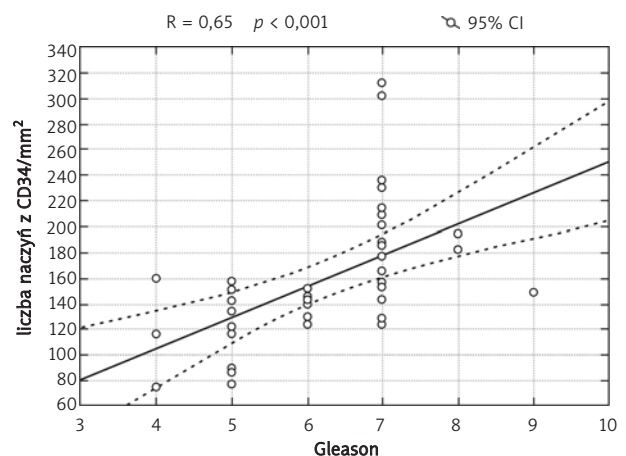
Odnotowano istotną statystycznie korelację indeksu wiązania Hif-1 α ze stopniem złośliwości histologicznej guzów w skali Gleasona ($R = 0,32$, $p < 0,05$; ryc. 2.). Nie wykazano korelacji pomiędzy nasileniem hipoksji nowotworu a pozostałymi klasycznymi czynnikami rokowniczymi (pTNM, PSA).

Stan unaczynienia

Średnia gęstość naczyń CD34 (+) wyniosła $159 \pm 52/\text{mm}^2$ (75–312), mediana 148 (ryc. 3.).

Odnotowano istotną statystycznie korelację pomiędzy gęstością naczyń wykazujących ekspresję CD34 a stopniem złośliwości histologicznej guzów w skali Gleasona ($R = 0,65$, $p < 0,001$; ryc. 4.).

Dodatkowo analizowano zależność pomiędzy gęstością naczyń a powszechnie przyjętymi grupami zróżnicowania histopatologicznego raka stercza: wysoko zróżnicowanym (stopień Gleasona 2–4), średnio zróżnicowanym (stopień Gleasona 5–6) i słabo zróżnicowanym (stopień Gleasona 7–10). Ze względu na niewielką liczebność grupy pierwszej



Ryc. 4. Korelacja pomiędzy stopniem Gleasona i gęstością naczyń CD34 (+)
Fig. 4. Correlation between Gleason score and the density of vessels CD34 (+)

(raki wysoko zróżnicowane) potączo ją z grupą drugą (raki średnio zróżnicowane). Analiza jednoczynnikowa wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy medianami średnich gęstości naczyń CD34 (+) dla dwóch wyodrębnionych grup zróżnicowania ($p < 0,01$) o punktacji w skali Gleasona 2–6 ($n = 21$) oraz 7–10 ($n = 22$) (ryc. 5).

Gęstość naczyń wykazujących ekspresję CD34 korelowała także ze stopniem zaawansowania klinicznego raka stercza – pTNM ($R = 0,34$, $p < 0,05$; ryc. 6).

Dodatkowo wykazano istotny statystycznie ($p < 0,01$) wzrost gęstości naczyń wykazujących ekspresję CD34 dla guzów o zaawansowaniu pT3 ($n = 21$) w porównaniu z guzami o zaawansowaniu pT2 ($n = 20$). Średnia gęstość naczyń w pierwszej grupie wyniosła $184 \pm 54/\text{mm}^2$ (116–312), mediana 182; w drugiej grupie $132 \pm 34/\text{mm}^2$ (75–215), mediana 137.

Nie udowodniono zależności pomiędzy poziomem PSA a gęstością naczyń CD34 (+).

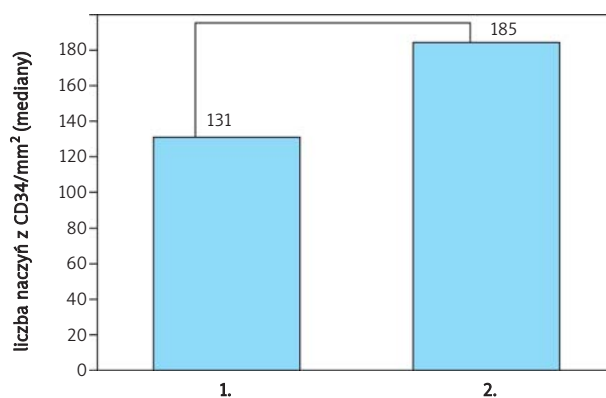
Gęstość naczyń CD34 (+) nie różniła się istotnie pomiędzy wyróżnionymi dla celów analizy statystycznej 4 podgrupami stężeń PSA: $< 5 \text{ ng/ml}$ ($n = 5$), $\geq 5 - < 10 \text{ ng/ml}$ ($n = 18$), $\geq 10 - < 20 \text{ ng/ml}$ ($n = 14$), $> 20 \text{ ng/ml}$ ($n = 3$).

Dyskusja

Przedstawione wyniki badania wskazują na istotne powiązania pomiędzy kliniczno-morfologicznymi i biologicznymi wskaźnikami agresywności przebiegu raka stercza, a w konsekwencji odległego rokowania u chorych. Stopień unaczynienia guza, odzwierciedlający proces neoangiogenezy nowotworowej, najpełniej koresponduje z zaawansowaniem procesu nowotworowego opisanego klasycznymi czynnikami prognostycznymi. W przeprowadzonym badaniu wykazano korelację ($p < 0,05$) tego parametru zarówno ze stopniem złośliwości histologicznej, jak i zaawansowaniem klinicznym raka stercza. Co więcej, gęstość naczyń CD34 (+) była istotnie różna ($p < 0,001$) dla pacjentów reprezentujących odmienne rokowniczo (i zgodne z powszechnie stosowanym podziałem) podgrupy: pT2 i pT3 oraz w skali Gleasona 2–6 i 7–10. Związek pomiędzy zaawansowaniem miejscowym (pT) nowotworu i jego unaczynieniem jest dobrze udokumentowany, a dotychczasowe dowody dotyczące raka stercza pochodzą także z badań z wykorzystaniem CD34 [17]. Wykazana w badaniu zależność gęstości naczyń od stopnia zróżnicowania histologicznego tkanki nowotworu wydaje się odzwierciedlać złożone, wzajemnie ze sobą powiązane procesy patofizjologiczne, regulowane na poziomie molekularnym i decydujące o ostatecznym spójnym profilu biologicznym nowotworu u danego pacjenta. Uzyskana korelacja potwierdza wcześniejsze badania oparte na ocenie ekspresji CD34 [17–19].

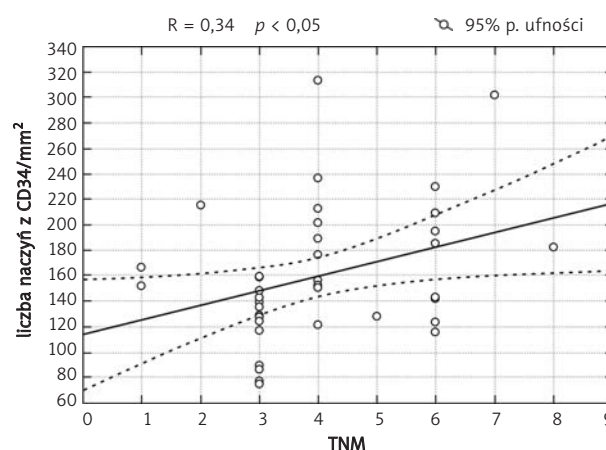
Brak korelacji pomiędzy badanymi czynnikami biologicznymi a stężeniem PSA nastęrcza trudności interpretacyjne i pozostaje w sprzeczności z opublikowanymi skąpyimi wynikami badań oceniającymi nasilenie angiogenezy nowotworowej w oparciu o barwienie VEGF [18]. Biorąc pod uwagę fakt, że stężenie PSA jest podstawowym monitorem skuteczności leczenia chorych na raka stercza, zagadnienie będzie wymagało wyjaśnienia w kolejnych analizach badawczych reprezentatywnych grup pacjentów.

Wyniki badania warunków utlenowania w guzie nie do końca odzwierciedlają zależności wykazane pomiędzy klinicznymi czynnikami rokowniczymi a unaczynieniem. Niemniej, zgodnie z danymi z piśmiennictwa [20], badanie potwierdza wysokie rozpowszechnienie zjawiska niedostatecznego utlenowania w rakach stercza (90,7%). Wykazany związek pomiędzy ekspresją Hif-1 α i wskaźnikiem Gleasona ($p < 0,05$) pozostaje w zgodzie z wynikami badań Carnella i wsp. [21], opartych na egzogennym markerze hipoksji (antypimonidazol), i w logicznej zależności od własnych rezultatów badania nad wskaźnikiem unaczynienia. Korelacji takiej nie potwierdzili Du i wsp. [20], co może wynikać z odmiennych kryteriów interpretacji wyników reakcji immunohistochemicznych.



Ryc. 5. Gęstość naczyń CD34 (+) w grupach: 1. raków wysoko i średnio zróżnicowanych (stopień Gleasona 2–6), 2. raków słabo zróżnicowanych (stopień Gleasona 7–10)

Fig. 5. CD34 (+) vessel density in the groups of: 1. low and medium grade cancers (Gleason 2–6), 2. high grade cancers (Gleason 7–10)



Ryc. 6. Korelacja pomiędzy grupą pTNM i gęstością naczyń: CD34 (+) (grupy pTNM odpowiadają: 1 – pT2aNOM0, 2 – pT2bNOM0, 3 – pT2cNOM0, 4 – pT3aNOM0, 5 – pT3bNOM0, 6 – pT3cNOM0, 7 – pT3bN1miM0, 8 – pT3cN1M0)

Fig. 6. Correlation between pTNM group and the density of vessels: CD34 (+) (the pTNM groups correspond to: 1 – pT2aNOM0, 2 – pT2bNOM0, 3 – pT2cNOM0, 4 – pT3aNOM0, 5 – pT3bNOM0, 6 – pT3cNOM0, 7 – pT3bN1miM0, 8 – pT3cN1M0)

Koncentrując uwagę na klasycznych czynnikach prognostycznych, warto zauważyć, że jedynym wskaźnikiem zależnym od badanych parametrów biologicznych okazał się stopień złośliwości histologicznej. W sposób komplementarny z nimi wydaje się odzwierciedlać nasilenie procesów decydujących o rozwoju i progresji raka stercza. Dalsze badania nad czynnikami rokowniczymi powinny koncentrować się na panelu podobnie spójnych kliniczno-biologicznych cech nowotworu u indywidualnego chorego.

Piśmiennictwo

- Epstein JI, Algaba F, Allsbrook WC, et al. Tumours of the prostate. In: Pathology and genetics. Tumours of the urinary system and male genital organs. Eble JN (red.). IARC Press, Lyon 2004; 159-98.
- Kordek R, Sosnowski M, Potemski P. Rak gruczołu krokowego. W: Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Kordek R, Jassem J, Jeziorski A, Kornafel J, Krzakowski M, Pawłęga J (red.). Wydawnictwo Via Medica, Gdańsk 2007; 261-6.
- Nahum AE, Movsas B, Horwitz EM, Stobbe CC, Chapman JD. Incorporating clinical measurements of hypoxia into tumor local control modeling of prostate cancer: implications for the alpha/beta ratio. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 391-401.
- Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 739-749.
- Tan Ch, de Noronha RG, Roecker AJ, et al. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res* 2005; 65: 605-12.
- Koritzinsky M, Seigneuric R, Magagnin MG, van den Beucken T, Lambin P, Wouters BG. The hypoxic proteome is influenced by gene-specific changes in mRNA translation. *Radiother Oncol* 2005; 76: 177-86.
- Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2005; 280: 22473-81.
- Swidzińska E, Naumnik W, Chyczewska E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol Alergol Pol* 2006; 74: 414-20.
- Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; 57: 5328-35.
- Alqawi O, Wang HP, Espiritu M, Singh G. Chronic hypoxia promotes an aggressive phenotype in rat prostate cancer cells. *Free Radic Res* 2007; 47: 788-97.
- Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, Li X. Over-expression of hypoxia inducible factor-1alpha increases the invasive potency of LNCaP cells in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 98: 1315-9.
- Mabjeesh NJ, Willard MT, Frederickson CE, Zhong H, Simons JW. Androgens stimulate hypoxia-inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2416-25.
- Palayoor ST, Tofilon PJ, Coleman CN. Ibuprofen-mediated reduction of hypoxia inducible factors Hif-1 α and Hif-2 α in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3150-7.
- Gryczyński M, Pietruszewska W. Wybrane aspekty apoptozy i proliferacji komórkowej raka krtani. *Otolaryngologia* 2002; 1: 151-60.
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 919.
- Luong RH, Baer KE, Craft DM, Ettinger SN, Scase TJ, Bergman PJ. Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Vet Pathol* 2006; 43: 622-31.
- Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M, Chinetti S, Novario R. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002; 5: 123-7.
- Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, Arkoumani E, Papachristou DJ, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In Vivo* 2004; 18: 155-60.
- Trojan L, Thomas D, Friedrich D, Grobholz R, Knoll T, Alken P, Michel MS. Expression of different vascular endothelial markers in prostate cancers and BPH tissue: an immunohistochemical and clinical evaluation. *Anticancer Res* 2004; 24: 1651-6.
- Du Z, Fujiyama C, Chen Y, Masaki Z. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in human normal, benign, and malignant prostate tissue. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 1936-9.
- Carnell DM, Smith RE, Daley FM, Saunders MI, Bentzen SM, Hoskin PJ. An immunohistochemical assessment of hypoxia in prostate carcinoma using pimonidazole: implications for radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 91-9.

Adres do korespondencji

lek. **Hanna Andrusiewicz**
Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy
ul. dr I. Romanowskiej 2
85-796 Bydgoszcz
e-mail: hannaandrusiewicz@poczta.onet.pl