

Prognostická významnost vybraných molekulárně-genetických a imunohistochemických markerů a DNA ploidity u karcinomu endometria

Čes. Gynek.
2011, 76, č. 3
s. 194-199

Prognostic importance of selected molecular genetic and immunohistochemical markers and DNA ploidy in endometrial cancer

Kudela M.¹, Pilka R.¹, Lubužek M.¹, Hejtmánek P.¹, Džubek P., Brychtová S.²

¹Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN Olomouc, přednosta doc. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a transplantační medicíny, LF UP a FN Olomouc

³Ústav patologie LF UP a FN Olomouc

ABSTRACT

Abstract. The aim of the study was the analysis of the new molecular genetic and immunomarkers (p16, c-erbB-2, Ki 67, bcl-2), hormonal receptors (ER, PR) and ploidy disturbances and their relation to the most important prognostic factors for endometrial cancer.

Design. Prospective study.

Setting. Dept. of Gynaecology and Obstetrics, Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Medical Faculty and University Hospital, Olomouc.

Methods. The study group consisted of endometrial cancer patients. The biopsies of the tumours obtained at operations were routinely histopathologically examined. Subsequently, the immunohistochemical tumor markers were determined. The same biopsies were examined by microdissection and flow cytometric ploidy analysis and karyotyping. The findings were compared with the most important prognostic factors for endometrial cancer, mainly with clinical stage of the disease, grade and histopathological type.

Results. Aneuploidy was found in 1% in the group of poorly differentiated endometrial cancers (G3) in contrast to 0% in the group of G1 and G2 tumours. High expression of p16, Ki 67, c-erbB-2 and low rate of sex hormone receptors was found in the prognostically unfavourable group (G3).

Conclusions. Aneuploidy seems to be an important prognostical factor for endometrial cancer patients. Identification of p16, Ki 67, c-erbB-2, ER a PR is a useful tool to specify a group of prognostically unfavourable patients.

Keywords. endometrial cancer, DNA ploidy, molecular immunomarkers, prognostic factors.

SOUHRN

Číslo 1. Studium významnosti vybraných molekulárně-genetických a imunomarkerů (p16, c-erbB-2, Ki 67, bcl-2), hormonálních receptorů (ER, PR) a změny v buněčné ploiditě u nádorů ch buněk endometria u karcinomu a jejich komparace s hlavními prognostickými faktory.

Typ studie. Prospektivní studie.

Provedení studie. Gynekologicko-porodnická klinika LF UP a FN Olomouc, Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a transplantační medicíny LF UP a FN Olomouc, Ústav patologie LF UP a FN Olomouc.

Metody. Študoval se soubor tvůrce nemocných operovaných primárně pro karcinom endometria. Peroperačně získané biopsické materiály z tumoru byly klasicky histopatologicky zpracovány a následně vyšetřeny imunohistochemicky ke stanovení vybraných molekulárních markerů. Stejný materiál byl po mikrodisekci u nádorů také vyšetřen průtokovou cytometrií ke stanovení změny v buněčné ploiditě. Výsledky byly komparovány s hlavními prognostickými faktory, zejména s klinickým stadiem onemocnění, gradací a histopatologickým typem nádoru.

Výsledky. U 1% biologicky nezralých endometriálních tumorů (G3) se špatnou prognózou jsme prokázali přítomnost aneuploidních karyotypů, zatímco u nádorů G1 a G2 jen ve 0%. Ze studovaných imunomarkerů byly nejvyšší exprese u prognosticky nepřiznivých případů p16, Ki 67 a c-erbB-2. U stejné skupiny tumorů jsme prokázali přítomnost steroidních receptorů jen ve 0%.

Závěr. Stanovení DNA ploidity je významným prognostickým faktorem. Ze sledovaných histopatologických a imunomarkerů jsme prokázali zvýšenou expresi p16, Ki 67 a c-erbB-2 u prognosticky nepřiznivých tumorů. Snížení přítomnosti steroidních receptorů pak byla prokázána u stejné skupiny nádorů.

Číslo slov. karcinom endometria, DNA ploidita, molekulární imunomarkery, prognostické faktory.

Karcinom endometria je po karcinomu prsu v současné době nejčastějším ze zhoubných nádorů postihujících reprodukční orgány žen. Trvalý nárůst incidence zejména v ekonomicky rozvinutých zemích je evidentně podmíněn prohlubujícím se komplexním vlivem civilizačních faktorů, a to zejména prodlužujícím se věkem, reprodukčním chováním a způsobem života současné populace. Přes relativně nízkou mortalitu umírá v České republice v důsledku vyšší incidence na toto onemocnění téměř stejný počet žen jako na karcinom děložního hrdla.

Podmínkou dobrých terapeutických výsledků je adekvátní, komplexní a včasné zahájená léčba. Stejně jako při léčbě jiných zhoubných tumorů adekvátní znamená, že léčba má přinést maximální terapeutický efekt, ale současně musí představovat i minimální zátěž pro pacienta. Jak undertreatment, tak overtreatment pacienta poškozují.

Pro zvolení správné terapeutické strategie je nutno brát v úvahu celou řadu faktorů, mezi nimiž jsou zejména významné faktory prognostické. I když nejdůležitějšími prognostickými faktory jsou stále klinicko-patologické parametry, zejména stadium onemocnění, grade a histopatologický typ nádoru, existuje celá řada dalších faktorů, které mohou ovlivňovat a predikovat průběh onemocnění, a proto jsou důležité pro stanovení rozsahu operačního výkonu a případně nutnosti následné radiační nebo jiné adjuvantní terapie. Mezi takto významné prognostické faktory patří i molekulární imunomarkery a DNA ploidita nádorových buněk.

Výzkum v oblasti molekulárně genetických biomarkerů zažívá v současné době v celé onkologii mohutný rozmach a platí to i pro obor onkogynekologie. Nové biomarkery jsou významné nejen po stránce teoretické, neboť přispívají k zodpovězení základních otázek průběhu karcinogeneze, ale promítají se i do vlastní klinické medicíny. Dnes je již zřejmé, že iniciace nádorového procesu se odehrává v důsledku změn v genetické informaci nenádorových buněk. Hlavní události iniciační fáze karcinogeneze je aktivace protoonkogenů, inaktivace tumor supresorových genů, mikrosatelitová nestabilita a celá řada dalších geneticky podmíněných změn. V oblasti chromozomálního genomu dochází velmi často k významným změnám, a to nejen na úrovni jednoho nukleotidu, ale také na úrovni celých chromozomů, což je často dokumentováno ztrátou heterozygocie a aneuploidií, v některých případech i polyploidií. Rozsah a charakter těchto poruch se pak přímo promítá do biologického chování tumoru, a tím determinuje i klinický průběh maligního nádorového onemocnění.

Cílem naší studie bylo sledovat vybrané imunomarkery (p53, c-erbB-2, Ki 67, bcl-2) hormonální receptory (ER,PR) a změny v buněčné ploiditě nádorových buněk a komparovat je s nejdůležitějšími prognostickými faktory, zejména s klinickým stadiem onemocnění, gradem tumoru a případně histopatologickým typem nádoru.

Klinický soubor tvoří 88 pacientek s histopatologicky prokázaným karcinomem endometria. Po stanovení diagnózy, obvykle na podkladě vyšetření bioptického materiálu získaného při diagnostické hysteroskopii nebo probatorní kyretáži, byly pacientky indikovány k operační léčbě, nejčastěji hysterektomii s oboustrannou adnexektomií doplněnou v indikovaných případech lymfadenektomií v oblasti pánevní a paraaortální. Operační výkon byl prováděn z abdominálního, vaginálního, laparoskopického nebo kombinovaného přístupu.

Vzorky peroperačně získaného tumoru byly standardně zpracovány po 24hodinové fixaci 10% formaldehydem, zalaty do parafinových bločků s následným barvením pro světelnou mikroskopii a stanovení histopatologické diagnózy. Po potvrzení diagnózy endometriálního karcinomu byly vzorky s dostatečným množstvím dobře zachované nádorové struktury zpracovány v tkáňových řezech o síle 5–8 µm na podložních sklech potažených Vectabondem (Vector). Pro detekci jednotlivých markerů byla použita standardní nepřímá imunohistochemická technika se souborem králičích nebo myších protilátek pro p53, c-erbB-2, Ki 67, bcl-2, PR a ER. Kvantifikace pozitivita značení byla vyjadřována v procentech. Jako hranice pozitivita pro p53, c-erbB-2, Ki 67 a bcl-2 byla stanovena hodnota mediánu. Jako p53 a bcl-2 pozitivní byla hodnoceny vzorky s jaderným barvením 20 % nádorových buněk a více, pro Ki-67 pak pozitivita barvení nad 40 %. Vzorky s membránovou pozitivitou c-erbB-2 byly hodnoceny jako pozitivní s více než 10 %. Hranice pozitivita pro ER a PR byla zvolena na 5 %.

DNA ploidita byla stanovena opět ze vzorků mikrodisekované parafinizované nádorové tkáně metodou průtokové cytometrie. Barvená jádra byla měřena na průtokovém cytometru FACS Calibur a získaná data analyzována pomocí programu ModFit-LT. DNA histogramy byly klasifikovány jako diploidní nebo aneuploidní vzhledem k jejich obsahu DNA v oblasti G0/G1 peaku. Nálezy byly srovnávány s vnitřním standardem v podobě jader izolovaných z normálních diploidních buněk. Pokud to kvalita vzorku dovolila, byly hodnoceny i proliferující buňky v a G2/M fázi buněčného cyklu.

Klinický soubor pacientek jsme rozdělili podle chirurgického stagingu na skupinu nemocných s dobrou a špatnou prognózou. Do skupiny 59 nemocných s dobrou prognózou byly zařazeny pacientky s FIGO klasifikací I. Do skupiny se špatnou prognózou pak 29 nemocných s pokročilým onemocněním FIGO II-IV.

Podle stupně biologické zralosti tumoru jsme nemocné rozdělili do skupiny 74 prognosticky příznivých nemocných (G1 a G2) a skupiny 14 prognosticky nepříznivých (G3).

Po stránce histopatologické klasifikace byl nádor stanoven jako endometroidní karcinom u 84 nemocných, u 4 šlo o serózně papilární, resp. smíšené typy nádorů. Vzhledem k malému zastoupení těchto prognosticky nepříznivých typů jsme je samostatně nevyhodnocovali.

Stanovením karyotypu byly tumory rozděleny na euploidní a aneuploidní. Do skupiny nádorů aneuploid-

ních byly zařazeny nálezy jader hypoploidních i polyploidních.

Výsledky stanovení imunomarkerů, estrogenových a progesteronových receptorů a buněčné ploidity jsme vyhodnotili ve vztahu k předpokládané prognóze onemocnění stanovené podle zařazení nemocných do skupin s dobrou a špatnou prognózou, ať již podle FIGO stadia, nebo grade tumoru.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno uspořádáním dat do kontingenčních tabulek (Crosstabulation) a spočítáním Fischerových testů, hodnotících homogenitu porovnávaných skupin pacientek. Testy byly provedeny na hladině významnosti $p=0,05$. Ke zpracování byl použit statistický software SPSS v.15, SPSS Inc Chicago, USA. Za statisticky významné byly považovány výsledky s oboustrannou exaktní signifikancí menší než 0,05.

VÝSLEDKY

Rozdělení souboru dle grade tumoru udává tabulka 1. Ve skupině 74 nemocných s prognosticky příznivým

Grade	Group	Marker	Count	Percentage	
G1	euploidn	c-erbB-2	8	20,5 %	
		Ki-67	8	20,5 %	
		ER	34	87,2 %	
		PR	34	87,2 %	
		aneuploidn	18	47,3 %	
	aneuploidn	p53	8	22,9 %	
		bcl-2	16	45,7 %	
		c-erbB-2	4	11,4 %	
		Ki-67	10	28,6 %	
		ER	28	80,0 %	
		PR	31	88,6 %	
		G2		1	15,9 %
	G3	euploidn			28,6 %
euploidn		p53	3	75,0 %	
		bcl-2	3	75,0 %	
		c-erbB-2	1	25,0 %	
		Ki-67	2	50,0 %	
		ER	3	75,0 %	
		PR	3	75,0 %	
aneuploidn			18	71,4 %	
aneuploidn		p53	5	50,0 %	
		bcl-2	4	40,0 %	
		c-erbB-2	5	50,0 %	
		Ki-67	9	90,0 %	
	ER	8	80,0 %		
	PR	6	60,0 %		

gradem (G1 + G2) bylo 39 tumorů (53 %) s euploidním karyotypem, zatímco u 35 nádorů (47 %) byl nález jader hypo- nebo polyploidních. Expresi studovaných imunomarkerů a steroidních receptorů, resp. jejich zastoupení ve skupině euploidních a aneuploidních tumorů udává tabulka 1.

Ve skupině 14 biologicky nevyzrálých tumorů (G3) byl euploidní karyotyp zjištěn u 4 nemocných (28 %), zatímco aneuploidita byla prokázána u 10 (71 %) tumorů. Přestože procentuální rozdíl obou skupin je relativně vysoký, nemá statistickou validitu, zřejmě v důsledku malého zastoupení biologicky nezralých tumorů.

Srovnáme-li expresi p53 ve skupině prognosticky příznivých tumorů (G1 + G2) se skupinou G3, pak exprese p53 byla pozitivní v 23 % u první skupiny, zatímco v 64 % ve skupině druhé. Výsledek má statistickou významnost. Totéž platí i pro Ki 67 (25 versus 64 %) a rovněž pro c-erbB-2 (17 versus 46 %) U ostatních imunomarkerů nedosáhly rozdíly statistické významnosti.

U steroidních receptorů jsme prokázali statistickou významnost mezi oběma skupinami jen u progesteronových receptorů, kde pozitivita u dobře diferencovaných

Tab. . FIGO stadia

FIGO I-III	Group	Marker	Count	Percentage
FIGO I	euploidn		6	44,1 %
	euploidn	p53	6	23,1 %
		bcl-2	11	42,3 %
		c-erbB-2	8	30,8 %
		Ki-67	7	26,9 %
		ER	24	92,3 %
		PR	25	96,2 %
	aneuploidn		18	55,9 %
	aneuploidn	p53	9	27,3 %
		bcl-2	17	51,5 %
		c-erbB-2	6	18,2 %
		Ki-67	11	33,3 %

tumorů byla v 89 %, zatímco u špatně diferencovaných jen v 64 %.

Rozdělení souboru podle FIGO stadia udává tabulka 2.

Ve skupině nemocných v klinickém stadiu FIGO I (I a - c) bylo 59 nemocných. U 26 z nich (44 %) byl nález buněk euploidních, u 33 (60 %) byl karyotyp aneuploidní. Expresi studovaných imunomarkerů a steroidních receptorů, resp. jejich zastoupení ve stejné skupině euploidních a aneuploidních tumorů udává tabulka 2.

Do prognosticky nepříznivého stadia FIGO II–IV bylo zařazeno 29 nemocných (33 %). Euploidních tumorů bylo 17 (58 %), zatímco aneuploidních bylo 12 (41 %). Statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl.

Srovnání sledovaných imunomarkerů mezi prognosticky příznivým stadiem FIGO I a stadii II–IV neprokázalo statisticky významné rozdíly. Signifikantní rozdíly mezi uvedenými skupinami jsme však prokázali jak pro E, tak P receptory, které byly výrazně častěji pozitivní u iniciálních, prognosticky příznivých onemocnění.

DISKUSE

V současné době je již všeobecně akceptován názor, že vznik maligního tumoru je podmíněn primárně genetickou poruchou, ať již vzniklou sporadicky, nebo na podkladě dědičně podmíněné dispozice. Kancerogeneze je mnohastupňový proces, který vzniká jako nerovnováha mezi normální buněčnou proliferací a apoptózou, tj. plánovanou buněčnou smrtí. Na vzniku nádorů se může podílet velké množství genů. Hlavními událostmi podílejícími se na iniciální fázi kancerogeneze jsou změny zahrnující aktivaci protoonkogenů, inaktivaci tumor supresorových genů, mikrosatelitovou instabilitu, aneuploidii, bodové mutace, translokace, amplifikace, ztrátu heterozygoty a další.

Onkogeny vznikající poruchou – mutací – protoonkogenů jsou patologické geny, které kódují proteiny, které, jsou-li v patologickém množství nebo abnormní formě, mohou vést k nádorové transformaci buňky. Mezi nejznámější onkogeny patří gen c-erbB-2 jinak známý jako HER2/neu a bcl-2. Onkogeny mohou též vytvářet komplexy s produkty tumor supresorových genů, a tím způsobit jejich inaktivaci.

Amplifikace a zvýšená exprese c-erbB-2 u karcinomu endometria byla popsána v 10–40 % [13, 20]. C-erbB-2 onkogen kóduje podobně jako EGRF (epidermal growth factor receptor) růstový faktor, a proto se vyskytuje u agresivních typů nádorů a měl by proto korelovat s horší prognózou. Nicméně výsledky klinických studií nejsou jednoznačné [13, 20, 22, 24, 26]. Naše výsledky prokázaly zvýšenou expresi tohoto markeru u prognosticky nepříznivých případů podle grade, ne však FIGO stadia.

Bcl-2 je onkogen, který inhibuje apoptózu a prodlužuje přežití buňky. Jeho exprese se mění během menstruačního cyklu, je vysoká v proliferacioní fázi a nízká v období menstruace. Vysoké hodnoty jsou rovněž nacházeny u hyperplazie endometria. U endometriální-

ho karcinomu je zvýšená exprese popisována zejména u karcinomu typu I a je dávana do souvislosti s větší hloubkou myometriální invaze, stagingem, gradingem a horší prognózou [1, 24]. U karcinomu typu II, a zejména u nepříznivých histopatologických typů nádorů je jeho exprese naopak nízká [9, 27]. U naší sestavy nemocných byly vyšší hodnoty proteinu bcl-2 zjištěny u skupiny prognosticky nepříznivých nemocných z hlediska gradingu, ne však stagingu. Výsledky však nemají statistickou validitu.

Tumor supresorové geny hrají důležitou roli v kontrole buněčného dělení tím, že kódují proteiny, které inhibují / regulují buněčné dělení. Dokážou kontrolovat buněčné dělení a vzniklé chyby buď opravit, nebo

buňky zlikvidují (ar:15(2005)15(25)005(1)12(26)04(24)08(t)-14e)-115.

Cyklické změny na endometriu v průběhu menstruačního cyklu jsou podmíněny ováriální produkcí pohlavních steroidů, tj. estrogenů a progesteronu. Estrogenové a progesteronové receptory se vážou po své aktivaci na specifická cílová místa v DNA, kde moduluji expresi příslušných genů. Kromě přímé aktivace cílových genů byl popsán i nepřímý mechanismus účinku přes vazbu na transkripční faktory [23]. Kromě své fyziologické funkce ve zdravém endometriu hrají steroidní receptory i důležitou roli v rozvoji endometriální karcinogeneze. Absence steroidních receptorů je považována za negativní prognostický faktor a je nejčastěji nalézána u nepříznivých histopatologických typů a agresivních endometriálních tumorů [3, 9, 10]. V naší studii jsme prokázali ve shodě s literárními údaji sníženou přítomnost P-receptorů u biologicky nezralých endometriálních tumorů. Nízkou pozitivitu obou steroidních receptorů jsme prokázali u pokročilých stadií tumorů (FIGO II–IV).

Typickým karyotypem je 46 chromozomů složených do 23 párů u zdravých lidských buněk. Genetický materiál v nádorových buňkách je naproti tomu charakterizován určitou mírou genetické nestability, která může v důsledku mitotických poruch vyústit ve výrazné změny genomu. Výrazným prvkem nádorové progresy jsou defekty v genech spjatých s udržováním chromozomové stability a integrity. Přebytek nebo ztráta jednoho nebo více chromozomů vede ke genetické nestabilitě v nádorových buňkách. Bylo prokázáno, že tato nestabilita je častým projevem maligní transformace a je typická zejména pro určité druhy maligních nádorů. U karcinomu endometria jsou aneuploidní změny popisovány v širokém rozmezí 15–40 % [4, 11, 12, 25, 33]. Obecně platí, že dobře diferencované tumory prognosticky příznivé mají převahu diploidních buněk, zatímco pro agresivní tumory je typický aneuploidní karyotyp [14, 29, 30, 32]. Z klinického pohledu je důležité, že většina autorů považuje ploiditu za nezávislý prognostický faktor [5, 15, 18, 19, 34]. U prognosticky hraničních případů (FIGO I c, G1 – G2) pak výsledek stanovení ploidity může přispívat k rozhodnutí o eventuální adjuvantní terapii [16].

V naší sestavě nemocných byly aneuploidní formy karyotypů častěji zastoupeny u biologicky nezralých tumorů (G3). Rozdíl mezi prognosticky příznivými stadii G1 a G2 a nepříznivým gradem G3 však nebyl statisticky významný. Domníváme se, že je to dáno malým početním zastoupením tumorů G3 v celém souboru.

Nepodařilo se nám rovněž prokázat vyšší zastoupení aneuploidity u onemocnění ve stadiu FIGO II–IV. Vysvětlením může být složení obou srovnávaných skupin. Do skupiny prognosticky příznivého stadia FIGO I jsou zařazeny rovněž pacientky stadia Ic, které je z hlediska prognózy zcela odlišné od stadia Ia a Ib. Do skupiny FIGO III pak spadají i nemocné s pozitivní peritoneální laváží, i když podle stupně myometriální invaze mohlo jít o incipientní karcinomy. Nová FIGO klasifikace tyto diskrepance již zohledňuje [2].

Stanovení DNA ploidity, steroidních hormonálních receptorů a některých imunohistochemických markerů, zejména p53 a Ki 67 a c-erbB-2, pomáhá specifikovat skupinu prognosticky příznivých a nepříznivých endometriálních karcinomů. Přesné rozlišení má význam pro stanovení optimální terapeutické strategie.

Práce je podporována v zkušební granty IGA MZ ČR NS 14

Infrastrukturální st tohoto projektu (Ústav molekulární a transplantární medicíny) byla podpořena z operačního programu výzkum a vývoj pro inovace (projekt Z.1.1 / 1.1.1/1.1.1.1.1).

LITERATURA

- Erde O., Erde M., Dursu A., et al. Angiogenesis, p53 and bcl-2 expression as prognostic indicators in endometrial cancer: Comparison with traditional clinicopathological variables. *Int J Gynecol Pathol*, 2003, 22, p. 254-260.
- FIGO committee on gynecologic oncology. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int J Gyn Obstet*, 105, 2009, p. 103-104.
- Ferrandina, G., Ranelletti, FO., Gallotta, V., et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), receptors for estrogen (ER) and progesteron (PR), p 53, Ki-67, and neu protein in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2005, 98, p. 383-389.
- Freiberg, LG., Nor n, H., Delle, U. Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in endometrial cancer stage I and II: a prospective 5-year survival study. *Gynecol Oncol*, 1994, 53, 1, p. 64-69.
- Fu, YS., Gambone, JC., Berek, JS. Pathophysiology and management of endometrial hyperplasia and carcinoma. *West J Med*, 1990, 153, 1, p. 50-61.
- Cherchi, PM., Madras, V., Capobiano, G., et al. Prognostic value of p53, c-erbB-2 and MIB-1 in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2001, 22, p. 451-453.
- Gassel, A., Backe, J., Krebs, S., et al. Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long-term outcome. *J Clin Pathol*, 1998, 51, p. 25-29.
- Graesslin, O., Chan t-Bastaraud, S., Lorenzato, M., et al. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis of p53 expression in endometrial cancer: prognostic value and relation to ploidity. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15, p. 484-492.
- Halperin, R., Zehavi, S., Hager, L., et al. Comparative immunohistochemical study of endometritid and serous papillary carcinoma of endometrium. *Eur J Gynecol Oncol*, 2001, 22, p. 122-126.
- Jazaeri, AA., Nunes, KJ., Dalton, MS., et al. Well – differentiated endometrial adenocarcinomas and poorly differentiated mixed Mullerian tumors have altered ER and PR isoform expression. *Oncogene*, 2001, 20, p. 6965-6969.
- Larson, DM., Berg, R., Show, G., Krawisz, BR. Prognostic significance of DNA ploidy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 1999, 74, 3, p. 356-360.
- Lindahl, B., Aln, P., Ferno, M., et al Prognostic value of flow cytometrical DNA measurements in stage I-II endometrial carcinoma: Correlations with steroid receptor concentration, tumor myometrial invasion and degrese of differentiation. *Anticancer Res*, 1987, 7, p. 791-798.
- Lukes, AS., Kohler, MF., Pieper, CF., et al. Multivariable analysis od DNA ploidity, p53 and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer. *Cancer*, 1994, 73, 9, p. 2380-2385.

disturb633(8824 Td Fh5(a8824 Td6466(n8824 Td6174(arly8824 Td642(indicato8824 Td F62(of)4 Td6466inetrngic)4 Td6(malignb63v)14.9033y8824 Td609
D. Mi, IT., Pi, R., MolekulárníEPrognostick faktory, a endometrániho, karcinom.,
Čes Gynek, 2006r 715,

.I endometrial

1. 1(h).r.1. 6 flen, 1 .f11(J).r.r 1 1HM., 1 .f11NMazr.,, 1 6 (e).r.r 1 1tP 1 .f11(a).r.r 1 (h).r.1.1. 1(,)TJ/R1 1 Tf 6 1 Td (Identif16 .

igh-d)]TJ -3767945 -8.97234 Td [r.ikie eimeee6 e