

بررسی فراوانی پروتئین P53 و BCL2 و میزان آنژیوژنز در سرطان آندومتر و ارتباط آن با شاخص های کلینیکو پاتولوژیک

دکتر سیما کدخدایان^۱، دکتر نفیسه ثقفی^{۱*}، دکتر کامران غفارزادگان^۲،
دکتر فاطمه همایی شانديز^۳، دکتر حبیب الله اسماعیلی^۴، دکتر شیرین ترابی^۵

۱. دانشیار گروه زنان و مامایی، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران.
۲. استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳. دانشیار گروه رادیوتراپی و انکولوژی، مرکز تحقیقات درمان سرطان های توپر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴. دانشیار گروه آمار حیاتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۵. رزیدنت گروه زنان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۰

خلاصه

مقدمه: P53 در بیش از ۵۰٪ تومورهای توپر جهش یافته است و در سرطان آندومتر که شایع ترین بدخیمی دستگاه تناسلی زنان می باشد، در ۳۰-۴۰٪ موارد تغییر کرده است و تغییر مزبور با نوع سلول سرورز پاپیلری و مرحله بالا و پیش آگهی بد همراه است. همچنین میزان آنژیوژنز تومور و بروز بیش از حد BCL2 در پیش آگهی بیماری دارای اهمیت می باشد، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی بروز پروتئین P53 و BCL2 و میزان آنژیوژنز در سرطان آندومتر و ارتباط آن با شاخص های کلینیکو پاتولوژیک و عوامل مؤثر بر پیش آگهی بیماری انجام شد.

روش کار: در این مطالعه طولی گذشته نگر طی سال های ۹۳-۱۳۸۴، پرونده های ۳۰ مورد از بیماران مبتلا به سرطان آندومتر در سه بیمارستان امام رضا (ع)، قائم (عج) و امید جمع آوری شد. نمونه های آسیب شناسی از نظر مارکرهای P53 و Bcl2 و آنژیوژنز مورد رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی قرار گرفتند و ارتباط این مارکرها با عوامل مؤثر بر پیش آگهی بیماری و عود بیماری مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون های آماری تی تست، کای اسکور و Log rank انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: بروز P53 در ۹ مورد از ۱۰ بیمار (۹۰٪) با سرطان غیر آندومتریوئید مثبت بود و تمام بیماران از نظر Bcl2 منفی بودند و ۸ مورد از ۱۰ بیمار (۸۰٪) با نوع غیر آندومتریوئید و ۶ مورد از ۲۰ بیمار با انواع آندومتریوئید (۳۰٪) از نظر آنژیوژنز شدید بودند. بین نوع بافت شناسی تومور و درجه و مرحله تومور و نیز بقاء بیماری ارتباط معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۰۲).

نتیجه گیری: با توجه به ارتباط بین مارکرهای ژنتیکی با مرحله و درجه بیماری و نیز بقاء بیماران، بهتر است هنگام تشخیص پاتولوژی سرطان آندومتر، بلوک مربوط از نظر این مارکرها بررسی شود.

کلمات کلیدی: آنژیوژنز، ایمنوهیستوشیمی، سرطان آندومتر

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر نفیسه ثقفی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۱۲۴۷۷؛ پست الکترونیک: saghafin@mums.ac.ir

مقدمه

سرطان آندومتر، شایع ترین بدخیمی دستگاه تناسلی زنان و چهارمین سرطان شایع بعد از سرطان پستان، ریه و روده و هفتمین عامل مرگ در زنان در اثر بدخیمی است. در مجموع حدود ۳-۲٪ از زنان در طول زندگی خود دچار سرطان آندومتر می شوند (۱، ۲). اگرچه مرحله بیماری، مهم ترین متغیر مؤثر بر میزان زنده ماندن بیمار است، اما تعدادی دیگر از عوامل فردی بر عود بیماری یا زنده ماندن فرد شناخته شده اند شامل: درجه تومور و هیستوپاتولوژی آن، عمق تهاجم به میومتر، سن بیمار، و شواهد جراحی پاتولوژیک، انتشار خارج رحمی بیماری، اندازه تومور، سیتولوژی صفاقی، وضعیت گیرنده هورمونی، تجزیه و تحلیل فلوسیمتری و نابسامانی های انکوژنی که از نظر تعیین پیش آگهی از اهمیت برخوردار می باشند (۳، ۴). در طی سال های اخیر پیشرفت های علمی مهمی در بیولوژی مولکولی ژنتیک صورت گرفته است. در میان ژن هایی که در رشد و عملکرد سلول نقشی دارند، انکوژن ها و ژن های سرکوب گر سرطان از اهمیت خاصی برخوردارند. جهش های نقطه ای ژنی با تغییر ترتیب کدون ژن و در نتیجه تغییر دادن محصول آن ژن از لحاظ کیفی باعث تغییر در عملکرد آن ژن می شوند. P53 در بیشتر از ۵۰٪ از تومورهای توپر، جهش یافته می باشد و از جمله رایج ترین جهش ژنتیکی می باشد و در سرطان آندومتر که شایع ترین بدخیمی دستگاه تناسلی زنان می باشد، در ۳۰-۴۰٪ موارد تغییر ژن P53 مهار کننده تومور اثبات شده است (۵-۱۰).

تغییر مزبور با نوع سلول سرروز پاپیلری و مرحله بالا و پیش آگهی بد همراه بوده است. همچنین میزان آنژیوژنز تومور و بروز بیش از حد Bcl2 در پیش آگهی بیماری اهمیت دارد. با تعیین این موارد در بیماران مبتلا به سرطان آندومتر و پیش بینی سیر بیماری و بقاء بیماران می توان در انتخاب روش درمان و پیگیری مبتلایان به سرطان آندومتر قدم های اساسی تر برداشت (۱۱، ۱۲).

در مطالعه اردم و همکاران (۲۰۰۳) در ۶۳ بیمار مورد بررسی، آنژیوژنز با هیچ یک از فاکتورهای

کلینیکوپاتولوژیک ارتباطی نداشت. P53 در ۲۳٪ بیماران مثبت بود که در انواع غیر آندومترویوئید و در درجات بالاتر بافت شناسی به طور بارزتری مثبت بود. در ۷۹٪ تومورها رنگ آمیزی برای BCL2 مثبت بود و ارتباط منفی بین بروز BCL2 و نوع بافت شناسی و درجه تومور وجود داشت. در آنالیز پیش آگهی، سن بیمار، مرحله FIGO، بروز بالای P53 و بروز پایین BCL2 و درجات بالا و متوسط CD24 از فاکتورهای پروگنوستیک مهم در تعیین پیش آگهی بیماران بودند (۱۳). در مطالعه بوسمانیس و همکاران (۲۰۰۵) در سنگاپور بروز P53 و BCL2 در سرطان سرروز پاپیلی رحم مورد بررسی قرار گرفت و با نتوپلازی اینترا اپی تلیال (IEN¹) قابل شناسایی و آندومتر نرمال مقایسه شد و در ۲۱ مورد سرطان پاپیلری، ۷۶٪ بیماران از نظر P53 مثبت بودند که در گروه IEN ۸۹٪ مثبت بودند و هیچ موردی در آندومتر طبیعی مثبت نبود. BCL2 در تمام آندومترهای نرمال مثبت بود و بروز آن در ۷۱٪ نوع پاپیلری و در ۵۵٪ نوع IEN دیده شد. در بررسی آنالیز آماری ارتباط بین بقاء بیماران و بروز P53 و BCL2 وجود نداشت (۱۴).

مطالعه حاضر با هدف تعیین بروز پروتئین P53 و Bcl2 و میزان آنژیوژنز در سرطان آندومتر و ارتباط آن ها با شاخص های کلینیک و پاتولوژیک و عوامل مؤثر بر پیش آگهی بیماران انجام شد.

روش کار

در این مطالعه طولی گذشته نگر در فاصله زمانی سال های ۹۳-۱۳۸۴ تمام بیمارانی که به دلیل سرطان آندومتر تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند و نمونه آسیب شناسی آنان در آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان قائم، امید و امام رضا (ع) مشهد موجود بود، مورد مطالعه قرار گرفت. روش نمونه برداری به روش مقطعی (غیر تصادفی) بود.

با مراجعه به مرکز بیماری های غیر واگیر مرکز بهداشت استان و استخراج اسامی بیماران تشخیص داده سرطان آندومتر در مرکز قائم (عج)، امید و امام

¹ Intra epithelial neoplasia

- ۸- شستشو لام ها در آب مقطر ۵ دقیقه
 - ۹- محلول لینک ۱۰ دقیقه در محیط سر بسته مرطوب
 - ۱۰- شستشو در آب مقطر ۵ دقیقه
 - ۱۱- محلول لیبیل (استرابتویدین) ۱۰ دقیقه در محیط سر بسته مرطوب
 - ۱۲- شستشو در آب مقطر ۵ دقیقه
 - ۱۳- محلول کروموزن ۱۰ دقیقه در محیط سر بسته مرطوب
 - ۱۴- شستشو آب مقطر ۵ دقیقه
 - ۱۵- محلول هماتوکسیلین ۲ دقیقه
 - ۱۶- شستشو در آب مقطر ۳ دقیقه
 - ۱۷- قرار دادن در الکل ۹۶ درجه و الکل مطلق به مدت ۵ دقیقه
 - ۱۸- پس از خشک شدن لام ها، چسباندن لامل ها پس از آماده شدن اسلایدهای ایمنوهیستوشیمی لام ها با شماره های کد بندی شده تفسیر شد.
- تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون های آماری تی تست، کای اسکور و Log rank انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از ۳۰ مورد سرطان آندومتر، ۲۰ مورد (۶۶/۶٪) آندومتریوئید، ۸ مورد (۲۶/۶٪) سروز پاپیلری و ۲ مورد (۶/۸٪) تمایز نیافته بود. میانگین سن در گروه آندومتریوئید ۵۳ سال، گروه سروز پاپیلری ۶۳ سال و در گروه تمایز نیافته ۵۸ سال بود. از ۳۰ مورد سرطان آندومتر، ۱۲ مورد (۴۰٪) در مرحله I، ۱۲ مورد (۴۰٪) در مرحله II و ۶ مورد (۲۰٪) در مرحله III قرار داشتند. از بین کل نمونه ها، ۱۱ مورد (۳۶/۶٪) درجه I، ۱۱ مورد (۳۶/۶٪) درجه II و ۶ مورد (۲۶/۸٪) درجه III بودند. از بین ۳۰ مورد سرطان آندومتر، ۱۷ مورد (۵۶/۶٪) از نظر P53 مثبت بودند و ۱۳ مورد (۴۳/۴٪) منفی گزارش شد. تمامی نمونه ها از نظر فاکتور BCL2 منفی بودند (جدول ۱).

رضا (ع) و بر اساس شماره پاتولوژی، لام ها از آرشیو گرفته شد و مجدداً خوانده شد. از بهترین لام، بلوک مربوط برداشته شد و جهت رنگ آمیزی برش خورده شد و رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای مارکرهای P53 و BCL2 و آنژیوژن انجام شد و نیز پرونده بیماران بر اساس شماره های موجود از بایگانی گرفته شد و اطلاعات مورد نیاز استخراج شد.

ابتدا نمونه های سرطان آندومتر از آرشیو انتخاب شده (۳۶ مورد) و سپس توسط پاتولوژیست مورد بازبینی قرار گرفتند و تعدادی از نمونه هایی که مناسب نبودند و یا به دلایلی از قبیل یافت نشدن پرونده ها و ناقص بودن مدارک از مطالعه حذف شدند (۶ مورد). در مورد هر نمونه تمام برداشت ها مطالعه شدند و بهترین برداشت برای ایمنوهیستوشیمی انتخاب شد. این برداشت بایستی واجد خصوصیات ذیل می بود: حجم زیادی از تومور را در برداشت و از نظر مورفولوژی گویاترین برداشت بود، نکروز نداشته یا مقدار آن کم باشد و سلول های التهابی در حدی نباشد که تفسیر را مشکل سازد و کیفیت تثبیت و کیفیت بلوک مناسب باشد. سپس برش از بلوک پارافینی تهیه و برای بررسی مارکرهای P53 و BCL2 و آنژیوژن رنگ آمیزی می شد. در نهایت جواب های ایمنوهیستوشیمی با کد مربوط با لام اولیه هماهنگ شده و اطلاعات در جدول مربوطه تنظیم شد.

طریقه رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی:

- ۱- برش بافت بر روی لام های چسبی ۴-۳ میکرونی
- ۲- قرار دادن لام ها به مدت ۲۴ ساعت در حرارت اتاق
- ۳- قرار دادن لام ها در محلول تریلوژی و اتوکلاو آن به مدت ۱۵ دقیقه یا ماکروویو به مدت ۲۲ دقیقه
- ۴- سپس سرد شدن لام ها شستشو در آب مقطر به مدت ۵ دقیقه
- ۵- ریختن پراکسید از روی لام ها ۱۰ دقیقه در محیط سر بسته مرطوب
- ۶- شستشو لام ها در آب مقطر ۵ دقیقه
- ۷- ریختن آنتی بادی مورد نظر ۶۰ دقیقه در محیط سر بسته مرطوب

جدول ۱- مشخصات فردی و بالینی بیماران مورد مطالعه

آندومتريويد	۲۰ (۶۶/۶٪)
نوع سرطان	سرورز پاپيلری ۸ (۲۶/۶٪)
تمايز نيافته	۲ (۶/۸٪)
مرحله	I ۱۲ (۴۰٪)
	II ۱۲ (۴۰٪)
	III ۶ (۲۰٪)
درجه	I ۱۱ (۳۶/۶٪)
	II ۱۱ (۳۶/۶٪)
	III ۶ (۲۶/۸٪)
سن	گروه آندومتريويد ۵۳ سال
	گروه سرورز پاپيلری ۶۳ سال
	گروه تمايز نيافته ۵۸ سال
P53	مثبت ۱۷ مورد (۵۶/۶٪)
	منفی ۱۳ مورد (۴۳/۴٪)
Bcl2	مثبت ۰ (۰٪)
	منفی ۱۰۰ (۱۰۰٪)

در گروه آندومتريويد، ۱۲ مورد (۶۰٪) منفی و ۸ مورد (۴۰٪) مثبت بود و در گروه سرورز پاپيلری، ۷ مورد (۸۷/۵٪) مثبت و تنها یک مورد (۱۲/۵٪) منفی بود و در نهايت در گروه تمايز نيافته هر دو مورد (۱۰۰٪) از نظر P53 مثبت بودند. بر اساس نتايج آزمون تی تست، بين نوع تومور و موارد مثبت شدن P53 ارتباط معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۱).

در گروه تومورهای آندومتريويد ۱۴ مورد (۷۰٪) از نظر فاکتور CD34 در گروه ضعيف، ۵ مورد (۲۵٪) متوسط و یک مورد (۵٪) شديد وجود داشت. در انواع سرورز پاپيلری ۲ مورد (۲۵٪) ضعيف، ۴ مورد (۵۰٪) متوسط و ۲ مورد (۲۵٪) از نظر آنژیوژنز در وضعیت شديد قرار داشتند و در گروه تمايز نيافته، تمام موارد (۱۰۰٪) از نظر آنژیوژنز متوسط بودند. همچنين بر اساس نتايج آزمون تی تست، بين نوع تومور و ميزان آنژیوژنز ارتباط معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۱).

از نظر درجه تومور و P53، P53 در تومورهای درجه I، ۴ مورد (۳۶٪) مثبت و در تومورهای درجه II و III، ۱۳ مورد (۷۶/۴٪) مثبت بود. بر اساس نتايج آزمون کای اسکوتر، بين درجه تومور و بروز فاکتور P53 ارتباط معنی داری وجود نداشت (p=۰/۰۹).

از نظر درجه تومور و CD34، CD34 در درجه I و ۲۵٪

در درجه II در گروه آنژیوژنز ضعيف بودند و در درجه III هيچ کدام در گروه ضعيف قرار نداشتند. بر اساس نتايج آزمون کای اسکوتر، بين درجه تومور و ميزان آنژیوژنز ارتباط معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۰۲).

از نظر مرحله تومور و P53، از ۱۲ مورد تومور در مرحله I بیماری، ۳۳٪ و از ۱۲ مورد تومور در مرحله II حدود ۵۸٪ از نظر P53 مثبت بودند. در مرحله III ۱۰۰٪ موارد از نظر P53 مثبت بودند. بر اساس نتايج آزمون کای اسکوتر، بين مرحله بیماری و بروز P53 ارتباط معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۳).

از نظر مرحله تومور و CD34، از نظر آنژیوژنز، ۱۰۰٪ تومورهای مرحله I در گروه ضعيف قرار داشتند و در تومورهای مرحله II، حدود ۸۳٪ در گروه متوسط و ۱۷٪ در گروه ضعيف قرار داشتند و در نهايت در تومورهای stage III، ۶۳٪ در گروه متوسط و ۳۷٪ در گروه شديد قرار داشتند و هيچ کدام ضعيف نبودند. بر اساس نتايج آزمون کای اسکوتر، بين مرحله بیماری و ميزان آنژیوژنز ارتباط معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۰).

از بين تمامی بیماران مبتلا به سرطان آندومتر در اين مطالعه، ۱۲ نفر (۴۰٪) فقط تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، ۱۲ نفر (۴۰٪) علاوه بر جراحی، راديوتراپی پس از عمل نیز دریافت کرده بودند و ۶ نفر (۲۰٪) نیز تحت درمان ترکیبی جراحی، راديوتراپی و شیمی درمانی قرار گرفته بودند.

بیماران در زمان پیگیری پس از درمان از نظر نشان های عود از قبیل خونریزی واژینال، درد لگن، خلط خونی، غیر طبیعی شدن رادیوگرافی قفسه صدری، آسیت، علائم و عصبی و یرقان و نیز تهوع و استفراغ و بی اشتهايي به دو گروه بیماری عود کننده (۱۳٪) و بیماری بدون عود (۸۷٪) تقسیم شدند. پس از تعیین موارد عود و استفاده از جداول آماری کاپلان و مایر و نیز آنالیزهای آماری مربوط به بقاء بیماران و آزمون log-rank ارتباط بين بقاء بیماری و فاکتورهای مؤثر بر پیش آگهی تعیین شد. با توجه به آزمون log-Rank، بود؛ به عبارتی بين بروز P53 و ميزان بقاء ارتباط معنی داری وجود نداشت (p>۰/۱). بر اساس

آزمون $\log\text{-Rank}$ ، بین میزان بقاء بیماری و میزان آنژیوژنز ($p=0/01$) و همچنین بین میزان بقاء بیماری و سن بیماری تفاوت معنی داری وجود داشت ($p=0/02$). پیگیری بیماران از تاریخ انجام عمل جراحی تا زمان بروز نشانه های عود و در مواردی که عود وجود نداشت تا پایان سال ۱۳۹۳ بود (محدوده زمانی بین ۷ الی ۱۰۸ ماه و با میانه ۷۸ ماه).

بحث

طی سال های اخیر پیشرفت های علمی مهمی در بیولوژی مولکولی ژنتیک صورت گرفته است و در میان ژن هایی که در رشد و عملکرد سلول نقش دارند، آنکوژن ها و ژن های سرکوبگر سرطان از اهمیت خاصی برخوردارند. جهش های نقطه ای ژنی با تغییر ترتیب کدون ژن و در نتیجه تغییر دادن محصول آن ژن از لحاظ کیفی باعث تغییر در عملکرد آن ژن می شوند (۱۴-۱۶). P53 یکی از مهم ترین سرکوب کننده های تومور است که باعث مهار رشد سلول آسیب دیده و با تحریک آپوپتوز و مرگ سلول می شود (۱۷-۱۹). تجمع سلول های نئوپلاستیک ممکن است نه تنها از فعال شدن آنکوژن های پیشبرنده رشد یا غیر فعال شدن ژن های سرکوبگر، بلکه از جهش در ژن های تنظیم کننده آپوپتوز ناشی شود. درست همانطور که رشد سلول توسط ژن های پیشرونده و سرکوبگر تنظیم می شود، بقای سلول نیز وابسته به ژن هایی است که آپوپتوز را پیش می برند و مهار می کنند (۲۰). خانواده بزرگی از ژن هایی که آپوپتوز را تنظیم می کنند، شناخته شده اند. یکی از اجزاء مهم آپوپتوز، تنظیم نفوذپذیری میتوکندری و تثبیت پروتئین های غشا سلول است که آپوپتوز را مهار می سازند. ظهور بیش از حد سلول ها را از آپوپتوز حفظ کرده و به آن ها اجازه داده می شود تا برای دوره های طولانی مدت زنده بمانند. شاید اثبات شده ترین نقش در محافظت از سلول های تومور در مقابل آپوپتوز، مربوط به BCL2 باشد (۲۱، ۲۲).

نتایج مطالعه حاضر بیانگر ۵۷٪ بروز P53 در موارد سرطان آندومتر است که تأیید کننده مطالعات دیگران است (۱۳). همچنین در مطالعه حاضر بین نوع بافت شناسی تومور و مرحله بیماری و بروز P53 ارتباط وجود داشت که مؤید مطالعه سورب و همکاران (۱۹۹۷) می باشد (۲۳). در مطالعه حاضر بین میزان بقاء بیماران و بروز P53 ارتباطی وجود نداشت که برخلاف مطالعه سیوپریدیس و همکاران (۲۰۰۲) می باشد (۲۴).

در مطالعه حاضر بین میزان آنژیوژنز و نوع بافت شناسی تومور و نیز درجه و مرحله تومور و همچنین بقاء بیماران ارتباط وجود داشت که مشابه نتایج مطالعه سورب و همکاران (۱۹۹۷) می باشد (۲۳). در مطالعه حاضر تمامی موارد سرطان آندومتر از نظر BCL2 منفی بودند که در برخی مطالعات انجام شده نیز نتایج مشابه به دست آمد (۲۵). در مطالعه حاضر، بقاء ۵ ساله بدون بیماری ۸۳٪ بود که تقریباً مشابه مطالعه بوسمانیس و همکاران (۲۰۰۵) بود (۱۴).

نتیجه گیری

با توجه به ارتباط بین مارکرهای ژنتیکی با مرحله و درجه بیماری و نیز بقاء بیماران پیشنهاد می شود هنگام تشخیص پاتولوژی سرطان آندومتر، بلوک مربوط از نظر این مارکرها بررسی شود. در نهایت با توجه به اهمیت تعیین بروز این مارکرهای ژنتیکی در پیش آگهی بیماری و انتخاب روش درمان، رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی در نمونه های جراحی بیماران مبتلا به سرطان آندومتر پیشنهاد می شود. همچنین لازم است توجه و نظارت بیشتر بر نحوه پرونده نویسی توسط پزشکان، دانشجویان، پرستاران و پرسنل بیمارستان و تأکید بر اهمیت آن، بهبود وضعیت آرشيو بخش های مختلف بیمارستان و استفاده از تکنولوژی مدرن صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، قدردانی می گردد.

1. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A et al. Circulating free DNA, p53 antibody and mutations of KRAS gene in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2010;127:612–621.
2. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A et al. Mutations of the KRAS oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47:65–68.
3. Engelsen IB, Akslen LA, Salvesen HB. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS*. 2009;117:693–707.
4. Porichi O, Nikolaidou ME, Apostolaki A et al. BCL-2, BAX and P53 expression profiles in endometrial carcinoma as studied by real-time PCR and immunohistochemistry. *Anticancer Res*. 2009;29:3977–3982.
5. Dobrzycka B1, Terlikowski SJ, Garbowicz M, Niklinski J, Chyczewski L, Kulikowski M. The prognostic significance of the immunohistochemical expression of P53 and BCL-2 in endometrial cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(4):631-5.
6. Robbe EJ1, van Kuijk SM, de Boed EM, Smits LJ, van der Wurff AA, Kruitwagen RF, Pijnenborg JM. Predicting the coexistence of an endometrial adenocarcinoma in the presence of atypical complex hyperplasia: immunohistochemical analysis of endometrial samples. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 Sep;22(7):1264-72.
7. Doll A, Abal M, Rigau M et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer - new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;108:221–229.
8. Pilka R1, Mícková I, Lubuský M, Dusková M, Rícánková M, Kudela M. [Expression of p53, Ki-67, bcl-2, c-erb-2, estrogen, and progesterone receptors in endometrial cancer]. *Ceska Gynekol*. 2008 Jul;73(4):222-7.
9. Markova II, Duskova M, Lubusky M, Kudela M, Zapletalová J, Procházká M, Pilka R. Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 May;20(4):576-82.
10. Pilka R1, Marková I, Dusková M, Zapletalová J, Tozzi M, Kudela M. Immunohistochemical markers expression in hysteroscopy and hysterectomy specimens from endometrialcancer patients: comparison. *Ceska Gynekol*. 2010 May;75(3):165-70.
11. González-Rodilla I, Verna V, Muñoz AB, Estévez J, Boix M, Schneider J. Expression of the apoptosis-related genes Bcl-2 and p53 in clinical samples from endometrialcarcinoma patients. *Anticancer Res*. 2011 Dec;31(12):4191-3.
12. Kudela M, Pilka R, Lubuský M, Hejtmánek P, Dzubák P, Brychtová S. Prognostic importance of selected molecular genetic immunohistochemical markers and DNA ploidy in endometrial cancer. *Ceska Gynekol*. 2011 Jun;76(3):194-9.
13. Erdem O, Erdem M, Dursun A, Akyol G, Erdem A. Angiogenesis, p53, and bcl-2 expression as prognostic indicators in endometrial cancer: comparison with traditional clinicopathologic variables. *Int J Gynecol Pathol*. 2003 Jul;22(3):254-60.
14. Busmanis II, Ho TH, Tan SB, Khoo KS. p53 and bcl-2 expression in invasive and pre-invasive uterine papillary serous carcinoma and atrophic endometrium. *Ann Acad Med Singapore*. 2005 Aug;34(7):421-5.
15. Jongen VH, Briët JM, de Jong RA, et al. Aromatase, cyclooxygenase 2, HER-2/neu, and p53 as prognostic factors in endometrioid endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19:670–676.
16. Kalogiannidis I, Bobos M, Papanikolaou A, et al. Immunohistochemical bcl-2 expression, p53 overexpression, PR and ER status in endometrial carcinoma and survival outcomes. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008;29:19–25.
17. Ohkouchi T1, Sakuragi N, Watari H, Nomura E, Todo Y, Yamada H, et al. Prognostic significance of Bcl-2, p53 overexpression, and lymph node metastasis in surgically staged endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Aug;187(2):353-9.
18. Appel ML, Edelweiss MI, Fleck J et al. P53 and BCL-2 as prognostic markers in endometrial carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2008;14:23–30.
19. Stoenescu TM, Ivan LD, Stoenescu N, Azoică D. Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011 Apr-Jun;115(2):485-92.
20. Laas E1, Ballester M2, Cortez A3, Gonin J3, Daraï E4, Graesslin O5. Supervised clustering of immunohistochemical markers to distinguish atypical endometrial hyperplasia from grade 1 endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2014 May;133(2):205-10.
21. Apostolou G1, Apostolou N, Biteli M, Kavantzias N, Patsouris E, Athanassiadou P. Utility of Ki-67, p53, Bcl-2, and Cox-2 biomarkers for low-grade endometrial cancer and disordered proliferative/benign hyperplastic endometrium by imprint cytology. *Diagn Cytopathol*. 2014 Feb;42(2):134-42.
22. Henríquez-Hernández LA, Lloret M, Pinar B, Bordón E, Rey A, Lubrano A, et al. BCL-2, in combination with MVP and IGF-1R expression, improves prediction of clinical outcome in complete response cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2011 Sep;122(3):585-9.
23. Sorbe B, Risberg B. Prognostic importance of the nuclear proteins p53 and Rb in conjunction with DNA, nuclear morphometry and grading in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 1997; 7(1): 34-41.

24. Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI; Tumor and Angiogenesis Research Group. Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer*. 2002 Sep 1;95(5):1055-63.
25. Ohkouchi T1, Sakuragi N, Watari H, Nomura E, Todo Y, Yamada H, et al. Prognostic significance of Bcl-2, p53 overexpression, and lymph node metastasis in surgically staged endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(2):353-9.