

Znaczenie ekspresji genów p53 i bcl-2 oraz antygenu proliferacji komórkowej Ki-67 w transformacji złośliwej w tkance gruczołowej błony śluzowej jamy macicy

Evaluation of importance of the expression p53 and bcl-2 genes and Ki-67 cellular proliferation antigen in malignant transformation of the glandular compartment of uterine mucosa

Wiesław Tyliński¹, Józef Kobos², Grzegorz Surkont¹, Edyta Wlazlak¹, Jacek Suzin¹

Analizą objęto 22 pacjentki, u których stwierdzono błonę śluzową jamy macicy z cechami łagodnej proliferacji oraz 17 kobiet z rakiem endometrium. Przy wykorzystaniu metod immunohistochemicznych oceniano ekspresję BCL-2, P53 oraz Ki-67. Średnią wartość indeksu ekspresji P53 w przypadku zmian proliferacyjnych oceniono na 17.185. Natomiast w grupie raków endometrium indeks ten wyniósł średnio 37.440 (różnica istotna statystycznie – $p < 0,001$). Wartość indeksu ekspresji dla Ki-67 w grupie z rakiem endometrium wynosiła średnio 59.804. U pacjentek z proliferacją błony śluzowej jamy macicy indeks ekspresji Ki-67 oceniono średnio na 27.526. Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy ekspresją Ki-67 w gruczołach a rozpoznaniem histopatologicznym ($p < 0,001$). Średnia wartość indeksu ekspresji dla BCL-2 w grupie z rakiem endometrium wynosiła 69.824. W grupie pacjentek z endometrium proliferacyjnym indeks ekspresji BCL-2 oceniono średnio na 44.448. Różnice pomiędzy ekspresją BCL-2 w gruczołach a rozpoznaniem histopatologicznym w teście Kruskala-Wallisa nie były znamienne statystycznie ($p = 0,114$). Wysoka ekspresja Ki-67 w tkance gruczołowej wiąże się z rozpoznaniem raka błony śluzowej jamy macicy. Wysokie wartości indeksu P53 w obrębie składnika gruczołowego są wykładnikiem procesu nowotworowego endometrium. Wartości indeksu ekspresji BCL-2 w tkance gruczołowej nie wykazują zależności z procesem nowotworzenia w obrębie błony śluzowej jamy macicy. Stwierdzono korelację istotną statystycznie pomiędzy wartościami indeksu ekspresji P53 a Ki-67 w obrębie składnika gruczołowego w przypadkach raka endometrium.

Słowa kluczowe: rak endometrium, łagodna proliferacja, błona śluzowa jamy macicy, apoptoza, BCL-2, Ki-67, P53

(Przegląd Menopauzalny 2003; 6: 24–30)

¹ Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Instytutu Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik prof. dr hab. med. Jacek Suzin

² Katedra Patomorfologii oraz Pracownia Patomorfologii Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; dyrektor Instytutu: prof. dr hab. med. Jerzy Bodalski



Rak endometrium jest jednym z najczęściej występujących w Polsce nowotworów złośliwych narządu płciowego kobiety. W ciągu ostatnich lat w krajach wysoko uprzemysłowionych, w tym również w Polsce, obserwuje się wzrost zachorowalności na raka trzonu macicy [1–5].

Apoptoza jest ciągiem procesów, występujących na poziomie molekularnym, biochemicznym i morfologicznym, które w konsekwencji prowadzą do śmierci komórki [6]. Udział apoptozy w powstawaniu nowotworów i jej wpływ na ich wzrost jest obecnie przedmiotem licznych badań [7–15]. Analizę przebiegu procesu apoptozy można dokonywać m.in. poprzez ocenę aktywności genów hamujących transformację nowotworową zwanych też antyonkogenami. Gen p53 jest genem supresorowym (antyonkogenem). Produkuje on białko P53, które bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, kontroli naprawy DNA oraz inicjacji apoptozy [12, 16–23]. Odpowiada za nienaruszalność genomu [11, 17, 22, 24, 25]. W przypadku niemożności usunięcia nieprawidłowości w DNA inicjuje apoptozę [11, 15, 22, 26–28]. Aktywacja śmierci komórki odbywa się m.in. poprzez hamowanie ekspresji genu bcl-2, który produkuje białko BCL-2 [22, 24, 29]. Fizjologiczna rola tego białka polega na hamowaniu procesów apoptozy [15, 30, 31].

Ostatnio publikowane dane wskazują na to, że regulacja programowanej śmierci komórki jest powiązana z proliferacją. Zazwyczaj im bardziej nasilone jest namnażanie komórek, tym aktywniejsze są czynniki pobudzające programowaną śmierć komórki. Dlatego też analizy przebiegu apoptozy powinny być prowadzone równolegle z oceną procesów proliferacji komórki. Jednym z często stosowanych wskaźników proliferacji jest badanie indeksu ekspresji antygenu Ki-67. Zdaniem wielu autorów badanie ekspresji tego antygenu pozwala na szybką i powtarzalną ocenę frakcji wzrostowej badanej populacji komórek [32–34]. Antygen Ki-67 jest niehistonowym białkiem jądrowym, ściśle związanym z procesem proliferacji komórek [33–37].

Cel

1. Badanie ekspresji białek BCL-2 i P53, związanych z procesem apoptozy, w tkance gruczołowej w łagodnych zmianach rozrostowych błony śluzowej jamy macicy oraz w raku endometrium.
2. Ocena indeksu ekspresji antygenu proliferacji komórkowej Ki-67 w tkance gruczołowej w łagodnych rozrostach endometrium oraz w raku błony śluzowej jamy macicy.
3. Badanie zależności pomiędzy wartościami indeksu ekspresji markerów apoptozy BCL-2 i P53 z indeksem ekspresji wskaźnika proliferacji komórkowej Ki-67 w tkance gruczołowej endometrium w łagodnych rozrostach błony śluzowej jamy macicy i w raku endometrium.

Materiał i metody

Spośród 500 pacjentek objętych badaniem, u których wykonano łyżeczkowanie diagnostyczne jamy macicy oraz histopatologiczną ocenę wyskrobin w Instytucie Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 1999–2003 r., do analizy przeznaczono materiał uzyskany od 39 kobiet w wieku od 40. do 65. roku życia. Pacjentki podzielono na 2 grupy w zależności od rozpoznania histopatologicznego: błona śluzowa jamy macicy z cechami proliferacji (n=22) oraz rak endometrium (n=17).

Badania histopatologiczne

Materiał utrwalony w 10-proc. zbuforowanej parafinie zatapiano w bloczki parafinowe. Skrawki parafinowe, po nałożeniu na szkiełka adhezyjne i wysuszeniu w cieplarni o temp. 56°C przez 24 godz., poddano odparafinowaniu w szeregu składającym się z ksylenów i alkoholi. Skrawki po odparafinowaniu barwiono rutynowo w hematoksylinie i eozynie i poddawano ocenie histopatologicznej.

Następnie przy wykorzystaniu metod immunohistochemicznych oceniano ekspresję markeru proliferacji Ki-67 oraz wskaźników apoptozy: P53 oraz BCL-2 w materiale biopsyjnym z endometrium.

Metody immunohistochemiczne

Badania immunohistochemiczne przeprowadzone zostały wg metody immunoperoksydazowej, opisanej przez Hsu i wsp. [38], z użyciem monoklonalnych przeciwciał, skierowanych przeciwko badanym białkom i awidynowo-biotynowo-peroksydazowego systemu detekcji zwanego systemem ABC (ang. *Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex*).

Skrawki parafinowe, po nałożeniu na szkiełka adhezyjne i wysuszeniu w cieplarni o temp. 56°C przez 24 godz., poddano odparafinowaniu w szeregu składającym się z ksylenów i alkoholi. Następnie hamowano aktywność endogennej peroksydazy, przy użyciu 3-proc. nadtlenku wodoru w metanolu, przez 5 min. W celu otworzenia drogi dla przeciwciał przeciwko białkom: P53, BCL-2 i Ki-67, podgrzewano skrawki 6-krotnie, w buforze cytrynianowym o pH 6,0, w kuchenie mikrofalowej, korzystając z następujących poziomów mocy: 150 W, 350 W, 450 W, 650 W [39]. Po wypłukaniu w buforze TRIS o pH 7,6 skrawki inkubowano 20 min z rozcieńczoną surowicą normalną (aby wyeliminować niespecyficzne reakcje tła). Tak przygotowane skrawki poddawano 24-godzinnej inkubacji, w temp. 4°C, z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami pierwotnymi, skierowanymi przeciwko badanym antygenom. Charakterystykę i zastosowanie rozcieńczenia użytych przeciwciał przedstawia tab. I. Następnie, po 2-krotnym wypłukaniu skrawków w buforze TRIS zastosowano 3-etapową procedurę ABC, w której bioty-



Tab. I. Charakterystyka i zastosowane rozcieńczenia użytych przeciwciał

Przeciwciało	Rozcieńczenie	Rodzaj ekspresji	Krótką charakterystyka
P53	1:50	J	Przeciwciało przeciw ludzkiemu białku P53, (zarówno formie dzikiej, jak i zmutowanej), które wpływa na regulację cyklu komórkowego, kontrolę naprawy DNA, inicjację apoptozy; ekspresję tego białka stwierdza się w wielu ludzkich nowotworach.
BCL-2	1:80	B	Przeciwciało przeciw ludzkiej onkoproteinie BCL-2, hamującej apoptozę: zwiększona ekspresja tego białka towarzyszy 90% chłoniaków grudkowych, a także wielu innym nowotworom.
Ki-67	1:100	J	Przeciwciało przeciw antygenowi proliferacji komórkowej Ki-67, którego ekspresję stwierdza się w proliferujących komórkach, we wszystkich fazach cyklu komórkowego z wyjątkiem fazy G0.

J – ekspresja jądrowa, B – ekspresja błonowa

nylowane, drugie przeciwciało łączy się z przeciwciałem pierwotnym, a w drugim etapie reaguje z kilkoma cząsteczkami awidyny, skoniugowanej z peroksydazą chrzanową. W systemie tym wykorzystuje się powinowactwo awidyny, jednego z białek jaja kurzego do biotyny – witaminy z grupy B. Awidyna może wiązać 4 cząsteczki biotyny, dzięki czemu kompleksy antygen-przeciwciało stają się łatwiejsze do uwidocznienia w reakcji barwnej. Ten ostatni etap detekcji jest przykładem reakcji enzymatycznej, w której, przy zastosowaniu substratu dla peroksydazy-3,3 diaminobenzydyny (DAB) powstaje barwny, brązowy produkt. Po zakończeniu procedury immunohistochemicznej podbarwiono jądra komórkowe hematoksyliną Meyera, a następnie odwadniano skrawki w szeregu alkoholi i przeprowadzano przez szereg acetonów i ksylenów. Tak przygotowane zatapiano w balsamie kanadyjskim.

Kontrolę negatywną metody stanowiły skrawki, w których zastępowano pierwotne przeciwciała buforem TRIS, stosując dalej opisaną procedurę immunohistochemiczną. Kontrolą pozytywną były skrawki dające znaną wcześniej, silnie pozytywną reakcję w kierunku badanych białek (P53 – skrawki raka sutka, BCL-2, Ki-67 – skrawki węzła chłonnego z chłoniakiem limfoblastycznym).

Wszystkie przeciwciała były mysimi, monoklonalnymi immunoglobulinami wyprodukowanymi przez firmę Novocastra.

Dla powyższych markerów indeks proliferacji i apoptozy liczono w tkance gruczołowej endometrium podścieliska, a wynik, jako *indeks ekspresji* podano jako stosunek liczby komórek wykazujących ekspresję badanego białka do liczby wszystkich komórek w dużym polu widzenia. Do badania i oceny morfometrycznej posłużono się mikroskopem (Nikon, MICROPHOT-FXA), a do oceny ilościowej systemem MultiScanBase V. 8.08 firmy Computer Scanning Systems, Ltd. Badano 10 pól widzenia w miejscu największej ekspresji tzw. *hot spots* w powiększeniu 400 razy.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono wykorzystując pakiet statystyczny SYSTAT

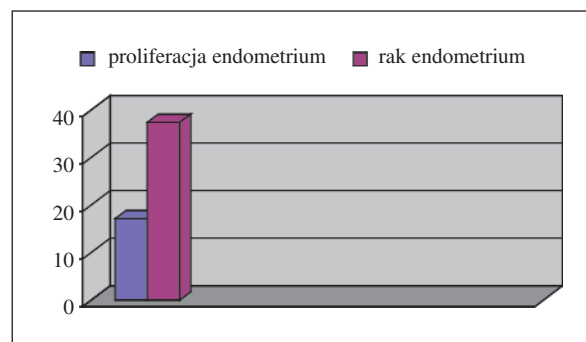
for Windows (Version 5.03, SYSTAT, Inc, Evaston, Illinois, USA, licencja nr: DA021594). Dla oceny różnic pomiędzy wartościami przeciętnymi cech w różnych grupach wykorzystano test Kruskala-Wallisa dla więcej niż dwóch zmiennych oraz test Manna-Whitneya – dla dwóch zmiennych. Przyjęto znamienność badanych różnic na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Średnią wartość indeksu ekspresji P53 w przypadku zmian proliferacyjnych oceniono na 17.185. W grupie raków endometrium indeks ten wyniósł średnio 37.440. Istnieje silna istotna statystycznie ($p < 0,001$) zależność pomiędzy ekspresją P53 w gruczołach a rozpoznaniem histopatologicznym (tab. II, ryc. 1.).

Tab. II. Rozkład wartości indeksu ekspresji P53 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium ($p < 0,001$)

	wartość indeksu ekspresji dla P53
proliferaacja endometrium	17.185
rak endometrium	37.440.



Ryc. 1. Wartości indeksu ekspresji P53 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium ($p < 0,001$)



Wartość indeksu ekspresji dla Ki-67 w grupie z rakiem endometrium wynosiła średnio 59.804. U pacjentek z proliferacją błony śluzowej jamy macicy indeks ekspresji Ki-67 oceniono średnio na 27.526. Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy ekspresją Ki-67 w gruczołach a rozpoznaniem histopatologicznym ($p < 0,001$) (tab. III, ryc. 2.).

Średnia wartość indeksu ekspresji dla BCL-2 w grupie z rakiem endometrium wynosiła 69.824. W grupie pacjentek z endometrium proliferacyjnym indeks ekspresji BCL-2 oceniono średnio na 44.448. Różnice pomiędzy ekspresją BCL-2 w gruczołach a rozpoznaniem histopatologicznym w teście Kruskala-Wallisa nie były znamienne statystycznie ($p = 0,114$) (tab. IV, ryc. 3.).

Dyskusja

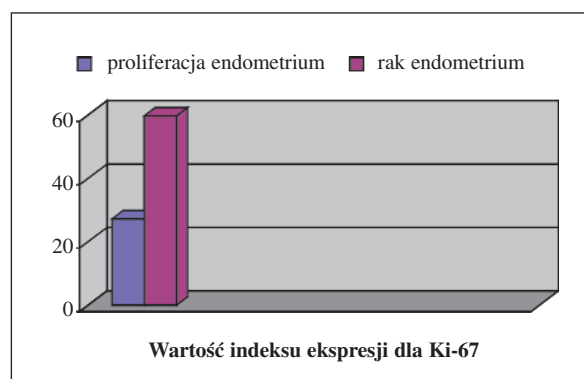
Opisano wiele biomarkerów nowotworowych, ale niewiele z nich do tej pory zbadano w aspekcie przydatności w diagnostyce i określeniu rokowania raka endometrium. Dotychczasowe wyniki badań w wielu przypadkach są niejednoznaczne [40, 41].

Antygen Ki-67 występuje w proliferujących komórkach [33, 35]. Zdaniem wielu autorów badanie ekspresji tego białka pozwala na szybką i powtarzalną ocenę frakcji wzrostowej badanej populacji komórek [32, 33]. Zdaniem niektórych badaczy Ki-67 nie jest *uniwersalnym* markerem proliferacji [42]. Van Bockstalele i wsp. zaobserwowali ekspresję Ki-67 w komórkach nowotworowych i stymulowanych, lecz nie stwierdzili *dodatniego* odczynu tego białka w prawidłowych komórkach szpiku kostnego. Ich zdaniem ekspresja białka może służyć jako marker niezrównoważonego wzrostu. W prawidłowym cyklu menstruacyjnym najwyższa ekspresja Ki-67 występuje w fazie proliferacyjnej, a najniższa w fazie wydzielniczej [43, 44]. W dotychczasowych badaniach stwierdzono wysoką ekspresję Ki-67 w przypadkach rozrostu złożonego błony śluzowej jamy macicy oraz raka endometrium. Niska ekspresja Ki-67 występuje m.in. w polipach endometrialnych oraz w endometrium z atypowym rozrostem (Morsi) [43, 45, 46]. W naszym materiale stwierdziliśmy wysokie wartości indeksu ekspresji w elementach gruczołowych raka endometrium. Wyniki te są zgodne z danymi z piśmiennictwa – najwyższe wartości indeksu ekspresji Ki-67 stwierdzano w elementach gruczołowych raka endometrium [43, 46].

W dotychczasowych obserwacjach w endometrium prawidłowym nie obserwowano ekspresji białka P53. Najwyższą ekspresję zauważono w rakach oraz w atypowych rozrostach [47, 48]. W naszym materiale stwierdziliśmy istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi wartościami indeksu ekspresji składnika gruczołowego w obrębie proliferacji p53 błony śluzowej

Tab. III. Rozkład wartości indeksu ekspresji Ki-67 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium ($p < 0,001$)

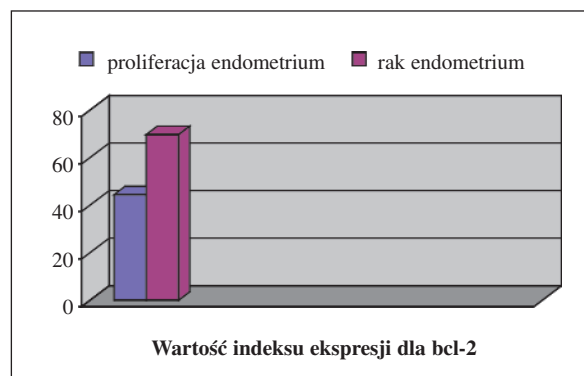
wartość indeksu ekspresji dla Ki67	
prolifracja endometrium	27,256
rak endometrium	59,804



Ryc. 2. Wartości indeksu ekspresji Ki-67 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium ($p < 0,001$)

Tab. IV. Rozkład wartości indeksu ekspresji BCL-2 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium ($p = 0,114$)

wartość indeksu ekspresji dla BCL-2	
prolifracja endometrium	44,448
rak endometrium	69,824



Ryc. 3. Wartości indeksu ekspresji BCL-2 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium ($p = 0,114$)



Tab. V. Korelacja pomiędzy wartościami indeksów ekspresji BCL-2, P53, Ki-67 w grupie rozrostów błony śluzowej jamy macicy i wśród przypadków raka endometrium

	BCL-2	Ki-67	P53
BCL-2		R=0,102 p=0,585	R=0,0161 p=0,931
Ki-67	R=0,102 p=0,585		R=0,5396 p=0,002
P53	R=0,0161 p=0,931	R=0,5396 p=0,002	

jamy macicy a rakiem endometrium. Komórki raka endometrium charakteryzowały się nasiloną ekspresją P53. Mutacja genu p53 następuje najprawdopodobniej w końcowych etapach nowotworzenia. Tym tłumaczy się brak lub niewielką ekspresję białka P53 w rozrostach bez cech atypii [43, 46, 48, 49].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że w prawidłowym cyklu menstruacyjnym najwyższa ekspresja białka BCL-2 w obrębie błony śluzowej jamy macicy występuje w fazie proliferacyjnej, najniższa w fazie wydzielniczej [43, 44]. Polipy endometrialne oraz endometrium z hiperplazją atypową charakteryzują się wysoką ekspresją BCL-2 [43, 50]. W przypadku raka błony śluzowej jamy ma-

cicy ekspresja BCL-2 jest niska [35]. Wielu autorów uważa, że nie ma dowodów na udział BCL-2 w transformacji komórek ze stanu hiperplazji w raka [50–54]. Innego zdania jest Peiro i wsp. Wysoka ekspresja BCL-2 występuje w rakach estrogenozależnych o najniższym stopniu złośliwości i związanych z receptorem progesteronowym [50, 55, 56]. W naszym materiale nie stwierdzono, aby wartości indeksu ekspresji BCL-2 w składniku gruczołowym endometrium wykazywały korelację z procesem nowotworzenia w obrębie błony śluzowej jamy macicy.

Wnioski

1. Wysoka ekspresja Ki-67 w tkance gruczołowej wiąże się z rozpoznaniem raka błony śluzowej jamy macicy.
2. Wysokie wartości indeksu P53 w obrębie składnika gruczołowego są wykładnikiem procesu nowotworowego endometrium.
3. Wartości indeksu ekspresji BCL-2 w tkance gruczołowej nie wykazują zależności z procesem nowotworzenia w obrębie błony śluzowej jamy macicy.
4. Stwierdzono korelację istotną statystycznie pomiędzy wartościami indeksu ekspresji P53 a Ki-67 w obrębie składnika gruczołowego w przypadkach raka endometrium.

Summary

Aim: 1. was to evaluate the distribution of apoptosis-related proteins: P53 and BCL-2 in endometrial carcinoma and in benign proliferate endometrium; 2. to assess the expression of Ki-67 in patients with endometrial carcinoma and with benign proliferate endometrium. **Material and methods:** 22 cases of endometrial carcinoma and 17 cases of benign proliferation were evaluated with the use of immunohistochemistic methods. The expression of P53, BCL-2 and Ki-67 in glandular component was analyzed. **Results:** Average value of P53 expression index in proliferate group was noticed as 17.185. In contrast among patients with endometrial carcinoma we found that the average value of P53 expression index was 37.440 (difference statistically significant – $p < 0.001$). Average value of Ki-67 expression index among endometrial carcinoma patients was 59.804. In endometrial proliferative group the value of Ki-67 expression index was calculated at the level of 27.526 ($p < 0.001$). Mean value of BCL-2 expression index in group with endometrial cancer was calculated at the level of 69.824. In proliferative endometrium we noticed that value of BCL-2 expression index was at average 44.448. Differences were not statistically significant ($p = 0.114$).

Conclusions: 1. High expression of Ki-67 in glandular component was strongly associated with endometrial carcinoma. 2. In patients with endometrial carcinoma we often detected high expressions of P53 in glandular component. 3. We did not observed statistically significant differences of BCL-2 expression between women with endometrial carcinoma and benign proliferate endometrium in glandular component. 4. We found statistically significant correlation in the degree of the expression of P53 and Ki-67 in glandular component in patients with endometrial carcinoma.

Key words: endometrial cancer, benign proliferation, endometrium, apoptosis, BCL-2, P53, Ki-67



Piśmiennictwo

1. Barakat RR, Park RC, Grigsby PW, et al. *Corpus Epithelial Tumors*. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young CE. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. 2 ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997.
2. Crissman J, Azoury R, Barnes A, et al. *Endometrial carcinoma in women 40 years of age or younger*. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 699-702.
3. Gallup DG, Stock RJ. *Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger*. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 417-21.
4. Mattingly RF. *Malignant tumors of the uterus*. In: Telinde (ed.): *Operative gynecology*. 5 ed. Philadelphia J. B. Lippincott 1972.
5. Zatoński W, Tyczyński J. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 roku*. Centrum Onkologii-Institut, Warszawa 1999.
6. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implication in tissue kinetics*. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-45.
7. Dąbrowska A. *Apoptoza: przyczyna czy skutek procesów chorobowych?* *Nowa Med*. 1996; 3: 10-8.
8. Gorczyca W, Melamed MR, Darżynkiewicz Z. *Programowana śmierć komórek (apoptoza)*. *Patologia Polska* 1993; 44: 113-9.
9. Góra-Tybor J, Robak T. *Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki*. *Post Hig Med Dośw* 1994; 48: 209-25.
10. Jendryczko A. *Apoptoza – kontrolowana śmierć komórki*. *Post Nauk Med* 1995; 8: 267-70.
11. Matuszczyk J, Strządała L. *Różnorodność szlaków przekazywania sygnałów do apoptozy limfocytów. Rola genów bcl-2, pim-1, c-myc i p53 w procesach selekcji limfocytów*. *Post Hig* 1994; 48: 663-75.
12. Pileri S, Poggi S, Sabbatini E, et al. *Apoptosis as programmed cell death (PCD): Cupio dissolvi in cell life*. *Current Diagn Pathol* 1994; 1: 48-55.
13. Radziszewska E. *Fizjologiczna rola apoptozy*. *Post Biol Komórki* 1995; 22: 247-63.
14. Stewart BW. *Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators*. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1286-96.
15. Williams GT, Smith CA. *Molecular regulation of apoptosis: genetics controls on cell death*. *Cell* 1993; 74: 777-79.
16. Berbeć H. *Gen p53 człowieka*. *Post Biochemii* 1994; 40: 6-11.
17. Williams GT, Smith CA. *Molecular regulation of apoptosis: genetics controls on cell death*. *Cell* 1993; 74: 777-9.
18. Grzelakowska-Sztabert B. *Geny supresorowe-molekularne mechanizmy działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek*. *Kosmos* 1995; 44: 323-52.
19. Horst A. *Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego*. *Post Biol Komórki* 1993; 20: 311-29.
20. Siedlecki JA. *p53 – strażnik genomu*. *Nowotwory* 1993; 43: 84-6.
21. Siedlecki JA. *Molekularne aspekty transformacji nowotworowej*. *Nowa Med* 1996; 3: 7-9.
22. Widlak P. *Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego*. *Post Biochemii* 1997; 43: 85-90.
23. Wynford TD. *Oncogenes and anti-oncogenes: the molecular basis of tumor behaviour*. *J Pathol* 1991; 165: 187-201.
24. Limon J, Siedlecki JA. *Choroby nowotworowe. Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Elementy genetyki klinicznej. Bal J Springer PWN W-wa 1998; 140-74.
25. Madej JA. *Etiologia i patogeneza nowotworów*. Alfa medica press 1996; 13-22, 51-67.
26. Rożynkowska D. *Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórki*. *Post Biol Komórki* 1996; 23: 421-44.
27. Sikora E. *Niesmiertelność, starzenie i śmierć komórek. Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów*. *Post Biochemii* 1993; 39: 212-20.
28. Bokhmann JV. *Two pathogenic types of endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol* 1983; 13: 10-7.
29. Sikora E. *Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki*. *Post Biochemii* 1996; 42: 108-13.
30. Schlichtholz B, Soussi T. *Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem p53*. *Post Biochemii* 1994; 40: 21-221.
31. Sikora E. *Mechanizmy śmierci programowanej komórki (apoptozy)*. *Post Biochemii* 1994; 40: 150-60.
32. Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H, et al. *Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67*. *J Clin Pathol* 1986; 39: 977-80.
33. Gerdes J, Pickartz H, Brotherton J, et al. *Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies*. *Am J Pathol* 1987; 129: 486-92.
34. Key G, Becker MHG, Baron B, et al. *New Ki-67-Equivalent Murine Monoclonal Antibodies (MIB 1-3) Generated Against Bacterially Expressed Parts of the Ki-67 cDNA Containing Three 62 Base Pair Repetitive Elements Encoding for the Ki-67 Epitope*. *Labor Invest* 1993; 68: 629-37.
35. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. *Immunohistochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67*. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-73.
36. Kobos J. *Rokownicze znaczenie markerów proliferacyjnych Ki-67 i PCNA oraz antygenu HLA-Dr i komórek tucznych w mięsach tkanek miękkich*. Praca na stopień dr. hab. n. med. Akademia Medyczna w Łodzi 1996.



37. Kordek RM. Ocena aktywności proliferacyjnej nowotworów pochodzenia glejowego. Guzy układu nerwowego. Mossakowski MJ, Liberski P. Zakład Narodowy im. Ossolińskich Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk 1997; 41-4.
38. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody PAP procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-80.
39. Taylor CR, Shi SR, Chaivun B, et al. Strategies for improving the Immunohistochemical Staining of Various Intracellular Prognostic Markers in Formalin – Paraffin Sections: Androgen Receptor, Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, p53 Protein, Proliferating Cell Nuclear Antigen, and Ki-67 Antigen Revealed by Antigen Retrieval Techniques. Hum Pathol 1994; 25: 263-70.
40. Meyer JS. Growth and cell kinetic measurements in human tumors. Pathology A. 1981; 16: 53-81.
41. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Sugimachi K. DNA polymerase as a Putative Early Relapse marker in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer 1991; 68: 925-9.
42. Van Bockstaele DR, Lan J, Snoeck HW, et al. Aberrant Ki-67 Expression in Normal Bone Marrow Revealed by Multiparameter Flow Cytometric Analysis. Cytometry 1991; 12: 50-63.
43. Morsi HM, Leers MP, Jager W, et al. The patterns of expression of an apoptosis-related CK 18 neopeptide, the bcl-2 proto-oncogene, and the Ki67 proliferation marker in normal, hyperplastic, and malignant endometrium. Int J Gynecol Pathol 2000; 19: 118-26.
44. Taguchi M, Kubota T, Aso T. Immunohistochemical localization of tenascin and Ki-67 nuclear antigen in human endometrium throughout the normal menstrual cycle. J Med. Dent Sci 1999; 46: 7-12.
45. Kokeguchi S, Hayase R, Sekiba K. Proliferative activity in normal endometrium and endometrial carcinoma measured by immunohistochemistry using Ki-67 and anti-DNA polymerase alpha antibody, and by flow cytometry. Acta Med. Okayama 1992; 46: 113-21.
46. Revel A, Shushan A. Investigation of the infertile couple: hysteroscopy with endometrial biopsy is the gold standard investigation for abnormal uterine bleeding. Hum Reprod 2002; 17: 1947-9.
47. Dueholm M, Lundorf E, Olesen F. Imaging techniques for evaluation of the uterine cavity and endometrium in premenopausal patients before minimally invasive surgery. Obstet Gynecol Surv 2002; 57: 388-403.
48. Ioffe OB, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. Hum Pathol 1998; 29: 1150-9.
49. Elhafey AS, Papadimitriou JC, El-Hakim MS, et al. Computerized image analysis of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in benign, hyperplastic, and malignant endometrium. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 872-9.
50. Niemann TH, Trgovac TL, McGaughey VR, Vaccarello L. Bcl-2 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma. Gynecol Oncol 1996; 63: 318-22.
51. Mora I, Diaz JI, Cantor AB, Nicosia SV. Differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma by computerized image cytometry of cell proliferation, apoptosis and Bcl-2 expression. Ann Clin Lab Sci 1999; 29: 308-15.
52. Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Troger M, et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: An approach using multiparameter flow cytometry. Gynecol Oncol 2000; 77: 11-7.
53. Papadaki H, Kounelis S, Kapadia SB, et al. Relationship of p53 Gene Alterations with Tumor Progression and Recurrence in Olfactory Neuroblastoma. Am J Surg Pathol 1996; 20: 715-21.
54. Vaskivuori TE, Stenback F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NK-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma. Cancer 2002; 95: 1463-71.
55. Bozdogan O, Atasoy P, Erekel S, et al. Apoptosis-related proteins and steroid hormone receptors in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Int J Gynecol Pathol 2002; 21: 375-82.
56. Yamauchi N, Sakamoto A, Uozaki H, et al. Immunohistochemical analysis of endometrial adenocarcinoma for bcl-2 and p53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity. Int J Gynecol Pathol 1996; 15: 202-8.

Adres do korespondencji

Klinika Ginekologii Operacyjnej
i Onkologii Ginekologicznej
Instytut Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Wileńska 37
94-029 Łódź

