

P R A C E O R Y G I N A L N E  
*ginekologia*

# Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w gruczolakoraku endometrioidalnym *endometrium* – doniesienie wstępne

Effectiveness of tissue microarray technique for the assessment of estrogen and progesterone receptors expression in endometrioid endometrial cancer – preliminary report

Gottwald Leszek<sup>1,2</sup>, Sęk Piotr<sup>3</sup>, Kubiak Robert<sup>4</sup>, Pasz-Walczak Grażyna<sup>4</sup>, Piekarski Janusz<sup>3</sup>, Szwalowski Jarosław<sup>5,6</sup>, Suzin Jacek<sup>7</sup>, Tyliński Wiesław<sup>7</sup>, Hendzel Katarzyna<sup>5</sup>, Jeziorski Arkadiusz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Oddział Medycyny Paliatywnej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi, Polska

<sup>2</sup> Poradnia Brachyterapii, Regionalny Ośrodek Onkologiczny, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi, Polska

<sup>3</sup> Klinika Chirurgii Onkologicznej, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

<sup>4</sup> Zakład Patomorfologii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

<sup>5</sup> Pracownia Histopatologiczna, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Pirogowa w Łodzi, Polska

<sup>6</sup> Pracownia Histopatologiczna, Olympus Consilio Sp. z O.O. w Łodzi, Polska

<sup>7</sup> Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej, I Katedra Położnictwa i Ginekologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

## Streszczenie

**Cel pracy:** określenie efektywności biopsji bloku-dawcy igłą 2 mm w technice mikromacierzy tkankowych (TMA) oraz ocena przydatności techniki TMA do oceny ekspresji receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR) w gruczolakoraku endometrioidalnym *endometrium* (GEE).

**Materiał i metody:** Do badań wykorzystano bloki parafinowe z tkankami GEE od 60 chorych. Z każdego bloku-dawcy pobrano igłą 2 mm i przeniesiono do bloku-biorcy po dwie próbki tkankowe tworząc TMA. Określono efektywność biopsji bloku-dawcy, oceniając obecność tkanek GEE w preparatach z TMA. Zbadano ekspresję ER i PR w tkance GEE. Wyniki opracowano statystycznie.

## Adres do korespondencji:

Leszek Gottwald  
Oddział Medycyny Paliatywnej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi  
ul. Ciołkowskiego 2, 93-509 Łódź, Polska  
tel: +48 42 689 54 81; fax: +48 42 689 54 82  
e-mail: lgottwald@wp.pl

Otrzymano: 12.01.2012  
Zaakceptowano do druku: 20.04.2012

Gottwald L, et al.

**Wyniki:** W preparatach z TMA obecność GEE stwierdzono w 56 przypadkach (93,33%), w tym w 49 przypadkach (81,67%) nowotwór był obecny w obydwu biopsjach. W 4 przypadkach (6,67%) w TMA nie stwierdzono tkanek GEE. Trafność biopsji bloku-dawcy (2 biopsje w każdym przypadku) wynosiła 87,50% (105/120). We wszystkich przypadkach z obecnością GEE objętość tkanek nowotworu w TMA umożliwiła ocenę obecności ER i PR. Jednocześnie ekspresję ER i PR stwierdzono w 29 przypadkach (51,78%), w 3 przypadkach (5,36%) występowała tylko ekspresja ER, w 8 przypadkach (14,29%) stwierdzono tylko ekspresję PR, a w 16 przypadkach (28,57%) brak było ekspresji ER i PR.

**Wnioski:** Dwa fragmenty tkankowe o średnicy 2mm pobrane z bloku-dawcy i umieszczone w bloku-biorcy TMA w 93,3% przypadków zawierały wystarczająco dużo materiału do oceny morfologii GEE oraz do oceny ekspresji ER i PR w tkance guza. Zastosowanie techniki TMA stanowi znaczne ułatwienie w prowadzeniu badań immunohistochemicznych nad biologią GEE.

Słowa kluczowe: **rak endometrium endometrioidalny / receptor estrogenowy / receptor progesteronowy / mikromacierze tkankowe / analiza mikromacierzy /**

## Abstract

**Objectives:** To assess the effectiveness of the donor-block biopsies with a 2 mm-size needle in endometrioid endometrial cancer (EEC) in the tissue microarray (TMA) technique and the application of the TMA for estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) expression in EEC.

**Material and methods:** The study examined EEC tissues from 60 patients. Tissue cores, 2 mm in size, in duplicate, were taken from the formalin-fixed and paraffin-embedded tissue donor blocks and constructed into the TMA recipient block. The presence of EEC tissue in the TMAs was analyzed, and the ER and PR expressions were examined.

**Results:** EEC tissue in TMAs was confirmed in 56 cases (93.33%). In 49 of them (81.67%), both cores presented with cancer tissues. In 4 cases (6.67%) EEC tissue was absent. All cases with EEC present on the TMA slides were appropriate for the ER and PR analysis. In 29 EEC cases (51.98%) both ER and PR were expressed. In 3 cases (5.36%) only ER was expressed, in 8 cases (14.29%) only PR was expressed, and in 16 cases (28.57%) ER and PR were assessed as negative.

**Conclusions:** Two 2 mm-sized tissue cores from donor-block biopsies constructed into the TMA recipient block were sufficient to diagnose EEC and enabled the assessment of ER and PR expression in 93.3% of the cases. The use of the described TMA technique makes the immunohistochemical study of EEC easier and more time-efficient.

Key words: **cancer endometrial endometrioid / estrogen receptor / progesterone receptor / tissue microarrays / microarray analysis /**

## Wstęp

Metoda mikromacierzy tkankowych (TMA – ang. *Tissue Microarray*) stanowi nowe narzędzie w histopatologii. Jej istotą jest zgromadzenie w pojedynczym bloku parafinowym tkanek z wielu nowotworów, które następnie są oceniane jako pojedynczy preparat mikroskopowy [1-4]. W swej obecnej formie została ona opisana po raz pierwszy przez Kononenko i wsp. w 1998 roku, jednak wciąż jest udoskonalana [5].

Bardzo istotnym elementem w konstruowaniu TMA jest wyselekcjonowanie i zgromadzenie odpowiednich bloków parafinowych zawierających badane tkanki (tzw. blok-dawca, ang. *donor block*). Z bloków tych wykonywane są preparaty barwione hematoksyliną i eozyną, które następnie poddawane są ocenie histopatologicznej w celu znalezienia i zaznaczenia na preparacie miejsc najbardziej reprezentatywnych dla danego rozpoznania. Podczas wytwarzania TMA, walcowate fragmenty tkankowe o średnicy od 0,6mm do kilku mm pobierane są z bloków-dawców i umieszczane w odpowiednich co do średnicy otworach w blokach-biorcach (ang. *recipient block*) [5]. Uważa się, że dwa do czterech fragmentów tkankowych pobrane z bloku-dawcy są wystarczające do oceny morfologii guza [6,7]. Pojedynczy blok-biorca może natomiast zawierać tkanki od kilkudziesięciu do nawet kilkuset nowotworów. Po zatopieniu w parafinie, poprzeczne

cięcie takiego bloczka pozwala uzyskać nawet do 200 skrawków o grubości 4µm zawierających tkanki zawsze z tych samych lokalizacji badanych guzów [1, 3]. Uzyskany metodą TMA pojedynczy skrawek umieszczony na szkiełku podstawowym jest barwiony i oceniany jako jeden preparat mikroskopowy.

Chociaż TMA nie wykorzystuje się obecnie w celu ustalenia rozpoznania choroby, to jednak są one coraz częściej stosowane do prowadzenia badań naukowych nad biologią nowotworów [2, 8], w tym także nowotworów ginekologicznych [6, 9-13]. Główne założenia techniki TMA pozostają niezmienione, jednak nadal wprowadzane są modyfikacje w metodyce prowadzenia badań nad różnymi nowotworami [14-16].

W pracy postanowiliśmy zbadać możliwości zastosowania techniki TMA do badań nad gruczolakorakiem *endometrium* – najczęściej rozpoznawanym u kobiet w Polsce nowotworem złośliwym narządów płciowych [17, 18].

## Cel pracy

Celem pracy było określenie efektywności biopsji bloku-dawcy igłą 2mm w technice TMA oraz ocena przydatności tej techniki w badaniu ekspresji receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR) w gruczolakoraku endometrioidalnym *endometrium* (GEE).

Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych...

## Materiał i metody

### Materiał badawczy

Do badań wykorzystano bloki parafinowe z tkankami GEE od 60 kolejnych chorych z macicy usuniętej podczas laparotomii w Wojewódzkim Specjalistycznym Szpitalu im. M. Madurowicza (obecnie im. M. Pirogowa) w Łodzi w latach 2001-2004.

Leczenie uzupełniające oraz kontrolę chorych po zakończonym leczeniu onkologicznym prowadzono w Regionalnym Ośrodku Onkologicznym w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. M. Kopernika w Łodzi. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/82/11/KE z dnia 17.05.2011 r.

### Konstrukcja mikromacierzy tkankowych (TMA)

Na podstawie oceny histopatologicznej preparatów zabarwionych hematoksyliną-eoziną (H+E), wyselekcjonowano bloki tkankowe zawierające reprezentatywne tkanki nowotworu. Z każdego bloku-dawcy, urządzeniem Tissue-Tek Quick-Ray Tissue Microarray System (Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA 90501 USA), igłą o średnicy 2mm, pobrano po dwie próbki tkankowe z miejsc wskazanych przez histopatologa na preparacie H+E.

Pobrane próbki tkankowe umieszczono w gotowych blokach parafinowych (Tissue-Tek Quick-Ray Recipient Block, Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA 90501 USA), tworząc TMA zawierającą bioptaty z 20 bloków-dawców z tkankami GEE. Z każdej TMA, po uprzednim zatopieniu w formalinie, skrojono za pomocą mikrotomu po 3 skrawki grubości 4µm.

Skrawki te następnie umieszczono na szkiełkach Super-Frost (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Pierwszy skrawek wybarwiono hematoksyliną i eoziną (H+E). Określono efektywność biopsji bloku-dawcy igłą 2 mm, oceniając obecność tkanek GEE w preparacie TMA. Technیکę wykonania TMA zobrazowano na rycinach 1-3.

### Wykonanie i interpretacja odczynów immunohistochemicznych ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w tkankach GEE

Zbadano ekspresję ER i PR w tkankach GEE w preparatach z TMA. Użyto komercyjnych przeciwciał monoklonalnych (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) rozcieńczonych 1:150.

Dla oceny wyników posłużono się ośmiostopniową skalą (*ang. total score*) wg Allreda i wsp. [19]. Wyróżniono sześć stopni określających odsetek komórek nowotworu wykazujących dodatni odczyn jądrowy - A (0 = brak; 1 = <1%; 2 = <10%; 3 = 10-33%; 4 = 33-66%; 5 = >66%) oraz cztery stopnie określające intensywność odczynu - B (0 = brak; 1 = słaby odczyn; 2 = średni odczyn; 3 = silny odczyn).

Wyniki opisywano jako sumę A + B. Gdy wynik wynosił 0 pkt. - stwierdzano brak ekspresji, jeżeli było to 2 – 4 pkt. ekspresję oceniano jako słabą, w przypadkach gdy było to 5 – 8 pkt. stwierdzano silną ekspresję ER lub PR.

### Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu CSS Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK., USA). W celu porównania danych nieparametrycznych wykorzystano test  $\chi^2$  i test dokładny Fishera. Poziom istotności przyjęto jako  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Metodą TMA obecność tkanek GEE potwierdzono w 56 przypadkach (93,33%), a w 4 przypadkach (6,67%) nie uzyskano skrawków tkankowych pozwalających na rozpoznanie nowotworu ( $p < 0,001$ ). W 49 przypadkach (81,67%) nowotwór rozpoznawano w obydwu fragmentach tkankowych z TMA, a w 7 przypadkach (11,66%) tylko w jednym fragmencie tkankowym ( $p < 0,001$ ). Trafność biopsji bloku-dawcy (2 biopsje w każdym przypadku) wynosiła 87,50% (105/120).

We wszystkich 56 przypadkach, z obecnością GEE w preparacie z TMA objętość tkanek nowotworu w preparacie umożliwiła wykonanie i ocenę badań immunohistochemicznych. Brak ekspresji, słabą ekspresję i silną ekspresję ER stwierdzono odpowiednio w 24 (42,86%), 9 (16,07%) i 23 przypadkach (41,07%) GEE. Brak ekspresji, słabą ekspresję i silną ekspresję PR stwierdzono w 19 (33,93%), 8 (14,29%) i 29 (51,78%). Jednocześnie ekspresję ER i PR stwierdzono w 29 przypadkach (51,78%), w 3 przypadkach (5,36%) występowała tylko ekspresja ER, w 8 przypadkach (14,29%) stwierdzono tylko ekspresję PR, a w 16 przypadkach (28,57%) brak było ekspresji ER i PR.

Sposób wykonywania TMA zobrazowano na rycinach 1-3. Przykładowe obrazy mikroskopowe GEE w preparatach TMA przedstawiono na rycinie 4.

## Dyskusja

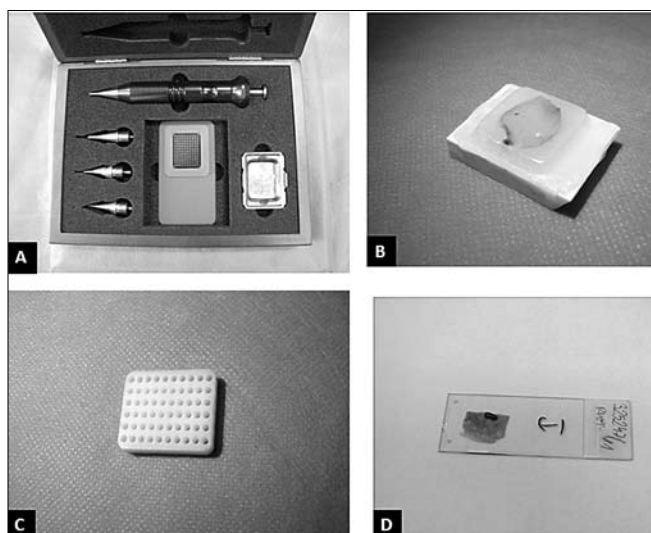
Stale unowocześniana technika TMA zyskuje w ostatnich latach coraz większe uznanie w prowadzeniu badań immunohistochemicznych w onkologii ginekologicznej [6, 10, 13, 20]. Także w chorobach ginekologicznych nie będących nowotworami, jak endometrioza, wskazuje się na korzyści wynikające z jej stosowania [21]. Najważniejsze zalety metody TMA to redukcja kosztów i czasu prowadzenia badań, możliwość analizy nawet kilkuset przypadków przy zużyciu zaledwie kilku mikrolitrów przeciwciała oraz fakt, że każde kolejne badanie jest prowadzone na precyzyjnie ustalonym i zawsze tym samym fragmencie guza [2-4, 7, 15, 20, 22, 23].

W badaniach immunohistochemicznych z wieloma przeciwciałami, ograniczenie pola oceny do 1-2mm zawsze tego samego fragmentu tkanki, czyni otrzymywane wyniki porównywalnymi i bardziej wiarygodnymi [13, 15].

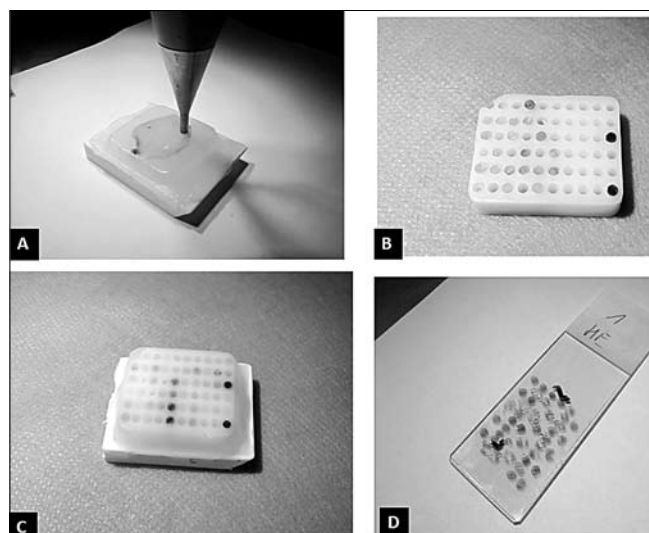
W naszym badaniu postanowiliśmy sprawdzić, czy dwumilimetrowe fragmenty tkankowe GEE z TMA stanowią materiał wystarczający do prowadzenia badań immunohistochemicznych. W tym celu zbadaliśmy ekspresję receptorów steroidowych ER i PR, których obecność jest zaliczana do czynników o istotnym znaczeniu klinicznym u chorych z GEE [13]. Spośród 60 GEE, obecność ER i PR stwierdziliśmy odpowiednio w 36 przypadkach (57,14%) i w 41 przypadkach (66,07%). Są to odsetki zbliżone do wyników badań innych autorów, gdzie ekspresję ER i PR w GEE obserwowano odpowiednio u 59-80% i 38-88% chorych [13, 24, 25].

Pomimo, że efektywność zastosowania metody TMA w ginekologii onkologicznej została już potwierdzona [9-13], niektóre elementy składowe metody pozostają nadal dyskusyjne [20, 26]. Liczne kontrowersje towarzyszą reprezentatywności 1-2mm fragmentów tkankowych nowotworów o zróżnicowanej budowie morfologicznej [7, 8]. Rozwiązaniem tej kwestii może być pobieranie większej liczby biopsji z bloku-dawcy, lub zwiększenie średnicy pobieranych fragmentów tkankowych [4, 8].

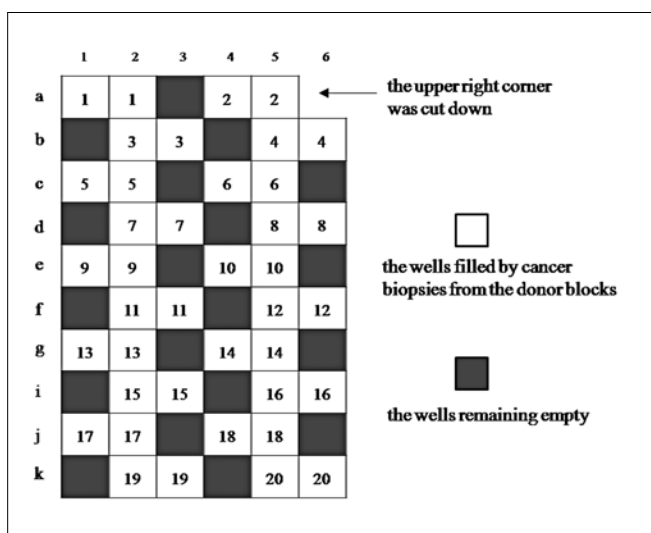
Gottwald L, et al.



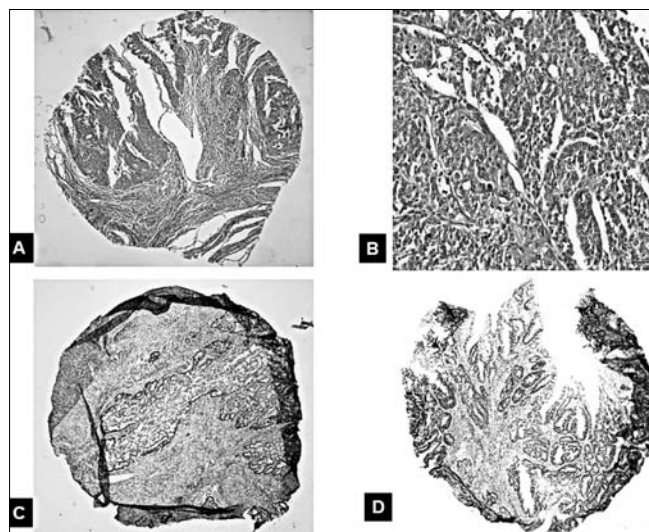
**Rycina 1.** Elementy używane do wytwarzania mikromacierzy tkankowych: A – zestaw Tissue-Tek Quick-Ray TMA System, B – parafinowy blok – dawca, C – parafinowy blok – biorca zawierający 60 otworów o średnicy 2 mm, D – preparat histologiczny z bloku – dawcy z zaznaczonym obszarem zajęтым przez nowotwór.



**Rycina 2.** Wytwarzanie mikromacierzy tkankowych: A – technika biopsji bloku – dawcy, B – blok – biorca częściowo wypełniony biopsjami z bloku – dawcy, C – gotowy parafinowy blok – biorca (TMA), D – preparat histologiczny z TMA (H+E).



**Rycina 3.** Schemat bloku – biorcy (TMA) obrazujący rozmieszczenie poszczególnych biopsji pobranych z bloku – dawcy.



**Rycina 4.** Dwumilimetrowe biopsaty z tkankami GEE w metodzie TMA: A+B – barwienie H+E, C – silna ekspresja ER, D – silna ekspresja PR.

W obu jednak przypadkach ceną za poprawę efektywności metody TMA jest większe uszkodzenie parafinowego bloku-dawcy. W sprzedaży komercyjnej znajdują się igły do wykonywania biopsji skrawków o średnicy 0,6-5 mm [4, 20, 21, 23, 27].

W prezentowanym badaniu stosowaliśmy igłę 2 mm pobierając każdorazowo po dwie biopsje bloku-dawcy, stwierdzając w preparacie z TMA tkanki GEE w 93,3% przypadków. We wszystkich tych przypadkach uzyskany obraz GEE w preparatach TMA pozwalał na ocenę odczynów immunohistochemicznych. Wykonana przez nas dotychczas liczba bloków TMA i oznaczeń immunohistochemicznych jest jednak zbyt mała i pozwala jedynie szacunkowo wnioskować o wysokiej efektywności przyjętej metodyki prowadzenia badań metodą TMA w GEE.

W piśmiennictwie szeroko dyskutowany jest problem utraty materiału tkankowego podczas wytwarzania TMA, szacowany przez różnych autorów na 3-30% [2, 8, 28, 29]. Jako jedną z przyczyn podaje się jakość parafinowego bloku-dawcy [2]. Uważa się, że jeżeli proces utrwalania trwał zbyt długo, lub blok jest zbyt wysuszony, to istnieje znaczne ryzyko pęknięcia bloku i jego nieodwracalnego uszkodzenia [28].

Z kolei w przypadkach, gdy z bloku było już uprzednio pobierane wiele wycinków i grubość tkanki w bloku jest niewielka, to ilość materiału tkankowego może być niewystarczająca do uzyskania reprezentatywnego fragmentu tkankowego w TMA [28]. Szczególnie w tych przypadkach, gdy skrawki tkankowe są cienkie, ryzyko zbyt głębokiego lub zbyt płytkiego osadzenia

Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych...

bioptatu w bloku-biorcy jest wysokie. Gulmann i wsp. podkreślają, że w sytuacjach, gdy bioptyaty tkankowe osadzone są w bloku-biorcy na różnych głębokościach, reprezentatywność tkanek w kolejnych następujących po sobie skrawkach może być różna [4].

Uważamy, że kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na trafność wykonanej biopsji jest wielkość obszaru zajmowanego przez GEE w fragmencie tkankowym zawartym w bloku-dawcy.

Mankamenty dotyczące konstrukcji mikromacierzy tkankowych są zatem nadal istotne i wymagają dalszych starań w celu uzyskania jak największej efektywności metody, w połączeniu z minimalizacją uszkodzeń archiwalnego materiału histopatologicznego.

Według naszej oceny wprowadzenie w ostatnim czasie do sprzedaży wykorzystanych w prezentowanej pracy gotowych parafinowych bloków-biorców z otworami o średnicach 1-5 mm do umieszczania bioptatów, w miejsce trudnych do wykonania i nietrwałych bloków tworzonych przez samych badaczy potwierdza, że ten kierunek działań jest możliwy i powinien być kontynuowany.

## Wnioski

1. Dwa fragmenty tkankowe o średnicy 2mm pobrane z bloku-dawcy i umieszczone w bloku-biorcy TMA w 93,3% przypadków zawierały wystarczająco dużo materiału do oceny morfologii GEE oraz do oceny ekspresji ER i PR w tkance guza.
2. Zastosowanie techniki TMA stanowi znaczne ułatwienie w prowadzeniu badań immunohistochemicznych nad biologią GEE.

## Piśmiennictwo

1. Voduc D, Kenney C, Nielsen T. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol*. 2008, 18, 89-97.
2. Takikita M, Chung J, Hewitt S. Tissue microarrays enabling high-throughput molecular pathology. *Curr Opin Biotechnol*. 2007, 18, 318-325.
3. Chen W, Foran D. Advances in cancer tissue microarray technology: towards improved understanding and diagnostics. *Anal Chim Acta*. 2006, 564, 74-81.
4. Gulmann C, O'Grady A. Tissue microarrays: an overview. *Curr Diagn Pathol*. 2003, 9, 149-154.
5. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, [et al.]. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998, 4, 844-847.
6. Kim J, Lim S, Park K, [et al.]. Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in uterine cervical neoplasm assessed using tissue microarrays. *Gynecol Oncol*. 2005, 97, 337-341.
7. Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z. Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics. *Pathol Res Pract*. 2007, 203, 169-177.
8. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotech*. 2008, 19, 19-25.
9. Cimbaluk D, Rotmensch J, Scudiere J, [et al.]. Uterine carcinosarcoma: immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets. *Gynecol Oncol*. 2007, 105, 138-144.
10. Fowler J, Ramirez M, Cohn D, [et al.]. Correlation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and aromatase expression in human endometrial cancer: tissue microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 192, 1262-1273.
11. Huang G, Arend R, Li M, [et al.]. Tissue microarray analysis of hormonal signaling pathways in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2009, 200, 457.e1-5.
12. Mhawech-Fauceglia P, Herrmann F, Andrews C, [et al.]. 14-3-3 $\sigma$  expression and prognostic value in patients with epithelial ovarian carcinoma: a high throughput tissue microarray analysis. *EJSO*. 2009, 35, 763-767.
13. Jongen V, Briët J, de Jong R, [et al.]. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009, 112, 537-542.
14. Mirlacher M, Simon R. Recipient block in TMA technique. *Methods Mol Biol*. 2010, 664, 37-44.
15. Tzankov A, Went P, Zimpfer A, Dimhofer S. Tissue microarray technology: principles, pitfalls and perspectives-lessons learned from hematological malignancies. *Exp Gerontol*. 2005, 40, 737-744.
16. Tennstedt P, Köster P, Brüchmann A, [et al.]. The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol*. 2012, 40, 261-268.
17. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut w Warszawie. Krajowa baza danych nowotworowych. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku. <http://www.onkologia.org.pl>.
18. Gottwald L, Chalubińska J, Moszyńska-Zielińska M, [i wsp.]. Gruczolakorak endometrium typu endometrioidalnego – analiza wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych i histopatologicznych. *Ginekol Pol*. 2011, 82, 743-748.
19. Allred D, Harvey J, Bernardo M, Clark B. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998, 11, 155-168.
20. Shergill I, Shergill N, Araya M, Patel H. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin*. 2004, 20, 707-712.
21. Karnat A, Younes P, Sayeeduddin M, [et al.]. Protein expression profiling of endometriosis: validation of 2-tissue microarrays. *Fertil Steril*. 2004, 82, 1681-1683.
22. Lugli A, Forster Y, Haas P, [et al.]. Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissues samples. *Hum Pathol*. 2003, 34, 994-1000.
23. Goldman T, Drömann D, Marzouki M, [et al.]. Tissue microarrays from HOPE-fixed specimens allow for enhanced high throughput molecular analyses in paraffin-embedded material. *Pathol Res Pract*. 2005, 201, 599-602.
24. Markova I, Duskova M, Lubusky M, [et al.]. Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2010, 20, 576-582.
25. Srijaipracharoen S, Tangjitgamol S, Tanvanich S, [et al.]. Expression of ER, PR, and Her-2/neu in endometrial cancer: a clinicopathological study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010, 11, 215-220.
26. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays for early target evaluation. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004, 1, 41-48.
27. Chang E, Lee A, Lee E, [et al.]. HER2/neu oncogene amplification by chromogenic in situ hybridization in 130 breast cancers using tissue microarray and clinical follow-up studies. *J Korean Med Sci*. 2004, 19, 390-396.
28. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001, 81, 1331-1338.
29. Mucci N, Akdas G, Manely S, Rubin M. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heteroenous protein expression. *Hum Pathol*. 2000, 31, 406-414.