

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Molekulární vlastnosti
duktálního *carcinoma in situ*
a jejich klinický *impact*.

MUDr. Jan Böhm

2015

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze

a

Akademie věd České republiky

Obor: experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný,

DrSc

Školící pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika

1.LF a VFN v Praze

Školitel: doc. MUDr. Michal Zikán, PhD

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah:

1. Abstrakt v češtině
2. Abstrakt v angličtině
3. Úvod do problematiky
4. Hypotézy a cíle práce
5. Materiál a metodika
6. Výsledky
7. Diskuse
8. Závěr
9. Použitá literatura
10. Seznam vlastních prací doktoranda

Abstrakt

Cíl: Duktální *carcinoma in situ* (DCIS) je prekanceróza s rostoucím klinickým významem. Pro optimální terapii DCIS je třeba správně zhodnotit individuální riziko pacientky. Cílem této disertační práce bylo identifikovat klinické a molekulární charakteristiky podskupiny DCIS s nepříznivým prognostickým chováním.

Metody: V populační studii byly zkoumány případy DCIS diagnostikované v rámci mamografického screeningu. V části experimentální jsme provedli srovnávací analýzu pěti biomarkerů na různých typech tkáně (zdravá tkáň prsní žlázy, vzorek DCIS a tkáň invazivního karcinomu) pomocí expresní analýzy a analýzy ztráty heterozygoty.

Výsledky: Prokázali jsme vysoký podíl čistého (bez invazivní složky) DCIS (14,41%) na všech lézích označovaných jako maligní. Zaznamenali jsme homogenní distribuci rizikových faktorů napříč celou skupinou bez jasného vzorce identifikujícího rizikové podtypy. Významný rozdíl byl v klinickém managementu nádorů s podobnými klinickými charakteristikami, což ilustruje současný stav omezeného využití klinických prognostických parametrů. V laboratorním experimentu byl prokázán rozdíl ve ztrátě heterozygoty (LOH) mezi DCIS a invazivním karcinomem pro geny BRCA1 (8,69% vs. 44,74%) a BRCA2 (9,52% vs. 45,0%). Pro gen p53 rozdíl zjištěn nebyl (31,82% vs. 32,5%). Na vzorku zdravé tkáně nebyla detekována žádná LOH. Studie genové exprese metodou *real-time* PCR neprokázala pro geny VEGF a Bcl-2 žádný signifikantní rozdíl mezi DCIS a invazivním karcinomem (12,0% vs. 14,3% pro VEGF a 8,0% vs. 11,9% pro Bcl-2). Poruchy genů zasahujících do angiogeneze a apoptózy jsou tak zřejmě

časnou událostí v karcinogenezi. Oproti tomu porucha genů regulujících opravy DNA je pravděpodobně změnou specifickou pro invazivní nádory, a může tak odlišit podskupinu DCIS s rizikovým biologickým chováním.

Abstract

Objectives: Ductal carcinoma in situ (DCIS) is a non-invasive lesion of an increasing clinical importance. Individual risk assessment is essential for an optimal treatment. Our objective was to identify clinical and molecular characteristics of a subgroup of DCIS with an unfavorable prognosis.

Methods: In a population study, we analyzed women with DCIS diagnosed within one mammography screening unit. In the experimental part of this work, we conducted a comparative analysis of five biological markers in normal tissue, DCIS and invasive breast cancer by means of gene expression analysis and analysis of loss of heterozygosity (LOH).

Results: We demonstrated a high proportion of pure (no invasive component) DCIS (14.41%) of all breast lesions described as malignant. In our sample, we saw a homogeneous distribution of risk factors without noting a clear pattern identifying high-risk subtypes. We noted significant differences in clinical management of tumors with similar characteristics, which demonstrates the present state of limited use of clinical predictors. In the laboratory experiment, we showed differences in loss of heterozygosity (LOH) between DCIS and invasive breast cancer for BRCA1 (8.69% vs. 44.74%) and BRCA2 (9.52% vs. 45.0%). In contrast, we did not find any

differences for p53 (31.82% vs. 32.5%). In normal breast tissue, we did not observe any LOH. Gene expression analysis, which was conducted by real-time PCR proved no significant difference between DCIS and invasive breast cancer for VEGF (12.0% vs. 14,3%) and Bcl-2 (8,0% vs. 11,9%). Alterations of genes involved in angiogenesis and apoptosis are probably early events in carcinogenesis. On the contrary, alterations of genes involved in DNA repair seem to be a specific feature of invasive cancer, allowing us to differentiate a subgroup of DCIS with high-risk biological behaviour.

Úvod do problematiky

Duktální *carcinoma in situ* (DCIS) je onemocnění, jehož význam v posledních letech dramaticky vzrostl. Díky mamografickému screeningu se dnes v některých zemích začíná dosahovat snížení mortality zhoubného onemocnění prsní žlázy [Heinen-Kammerer T., 2014]. Mamografie totiž dokáže odhalit maligní změny prsní žlázy v časných, a tedy lépe léčitelných stádiích. Vedlejším efektem tohoto vyšetření je bohužel i nárůst počtu diagnostikovaných preinvazivních změn.

Hovoříme-li o DCIS jako o onemocnění s maligním potenciálem, znamená to, že nejsme schopni s jistotou říci, jak přesně vysoké je riziko lokální recidivy a s jakou pravděpodobností by u neléčeného DCIS došlo k progresi do invazivního karcinomu. Důsledkem je předpoklad, že invazivní karcinom se může vyvinout z každého DCIS a naším cílem je vzniku tohoto invazivního karcinomu zabránit. Proto je v praxi řada pacientek léčena agresivněji, než by bylo s ohledem na biologickou povahu preinvazivní léze nutné. Naše současné omezení tedy spočívá v tom, že nejsme

schopni bezpečně a jednoduše odlišit pacientky s nízcí maligním DCIS od žen s vysokým rizikem.

DCIS je onemocnění s dobrou prognózou, 10-ti leté celkové přežití dosahuje 96-98% [Allegra C.J. et al., 2010]. Strategie léčby DCIS spočívá v operativním odstranění nádorového ložiska. Při zachování jistých podmínek není relevantní rozdíl v riziku lokální recidivy mezi prs zachovným výkonem a mastektomií [Lim Y.J. et al., 2014]. Zachování prsu ovšem nesmí být hlavní léčebný cíl, spíše je třeba řídit se přáním pacientky s ohledem na zachování kvality života.

S léčbou DCIS je spojena řada kontroverzí: nutnost pooperační radioterapie, podání antiestrogenní léčby, šíře lemu zdravé tkáně při resekci.

Doposud se nepodařilo identifikovat podskupinu *low-risk* nebo *high-risk* pacientek, u kterých by bylo možné individualizovat léčbu – tedy vyhnout se adjuvantní radioterapii nebo hormonoterapii, případně i operační léčbě u lézí s nízkým rizikem malignizace, nebo naopak indikovat agresivnější klinický management u nádorů s vysokým rizikem malignizace.

Cílem této disertační práce bylo ozřejmit vztahy mezi klinickými a molekulárními vlastnostmi premaligních lézí a jejich vlivem na léčbu.

Hypotéza a cíle práce

Předkládaná práce se zabývá klinickými a molekulárními aspekty ductálního *carcinoma in situ* (DCIS) s cílem identifikovat charakteristiky podskupiny DCIS s nepříznivým prognostickým chováním.

Práce zahrnuje dva hlavní okruhy vlastního výzkumu:

- Analýzu incidence a prognostických faktorů DCIS.
- Analýzu molekulárních vlastností DCIS ve srovnání se zdravou tkání a tkání invazivního karcinomu.

Základními předpoklady našeho výzkumu byly tyto hypotézy:

- DCIS je častou lézí nacházenou v prsu – i když se jedná o lézi preinvazivní, je často řešena stejně radikálně jako invazivní nádor.
- Současné spektrum faktorů popisujících riziko recidivy DCIS a jeho progresu v invazivní nádor je nedostatečné.
- Molekulární charakteristiky některých DCIS mohou být shodné s charakteristikami invazivního nádoru, jejich srovnáním je možné identifikovat léze s nižším či vyšším potenciálem malignizace.

Materiál a metodika

V první části vlastního výzkumu jsme provedli analýzu incidence a prognostických faktorů DCIS.

V této retrospektivní analýze byly zkoumány podrobeny pacientky, u kterých byl ve screeningové jednotce jihovýchodní Duryňsko v období mezi květnem 2007 a lednem 2013 diagnostikován čistý DCIS. Pacientky byly zařazeny do analýzy bez ohledu na mamografické charakteristiky, klinický obraz, velikost, fokalitu nebo grade onemocnění.

Z databáze screeningové jednotky byly nejprve vybrány všechny pacientky s příslušnou diagnózou. V dalším kroku byla ke každé pacientce z archivu vyhledána dokumentace, která sestávala z popisu mamogramu,

histologického nálezu biopsiátu i definitivního histopatologického nálezu, operačního protokolu, propouštěcí lékařské zprávy a protokolu pooperačního onkologického konzilia.

Podstatou druhé části výzkumu byla srovnávací analýza molekulárních vlastností zdravé tkáně, tkáně DCIS a vzorků tkáně invazivního karcinomu. Pro pokus byl vybrán panel pěti biomarkerů: BRCA1, BRCA2, p53, VEGF a Bcl-2. Jedná se o molekuly, které hrají klíčové role v různých fázích iniciace onkogeneze a následné progresu karcinomu.

Metodou ztráty heterozygosity byla vyšetřena inaktivace genů p53, BRCA1 a BRCA2, metodou qPCR byla analyzována genová exprese Bcl-2 a VEGF. Po chirurgické resekci prsu byl patologem vybrán reprezentativní vzorek nádoru. Pro analýzu ztráty heterozygosity byla z buněk nádoru izolována DNA. Pro analýzu genové exprese byla z buněk nádoru nejprve izolována celková buněčná RNA a bezprostředně poté metodou reverzní transkripce připravena komplementární DNA.

Analýza exprese genů Bcl-2 a VEGF byla provedena metodou kvantitativní *real-time* PCR. Kvantifikaci reakce jsme provedli srovnáním s množstvím referenčního genu pro kolagen typ II alfa 1.

Pro analýzu ztráty heterozygosity byly využity mikrosatelitární markery. Ztráta heterozygosity v nádoru byla posuzována vzájemným srovnáním intenzity alel ve zdravé a nádorové tkáni. K analýze pro úsek každého z genů BRCA1/BRCA2 byly zvoleny tři mikrosatelitární markery, pro oblast genu p53 markery dva. Amplifikace genomových fragmentů probíhala metodou PCR, při které byly *forward* primery fluorescenčně označeny. Pro analýzu mikrosatelitárních markerů byla použita metoda fragmentační analýzy na automatickém sekvenátoru.

Výsledky

Incidence DCIS a rizikové faktory

V sedmiletém období bylo ve sledované screeningové jednotce provedeno celkem 297 tisíc vyšetření (1 žena během 1 dvouletého cyklu = 1 vyšetření). Invazivní karcinom prsu byl biopticky zjištěn ve 1465 případech. U 19 pacientek byl diagnostikován DCIS s mikroinvazí. Ve 250 případech u 249 pacientek byl biopticky diagnostikován čistý DCIS bez invazivní komponenty, jednou se jednalo o bilaterální lézi. Procentuální podíl čistých DCIS na všech zhoubných nádorech činil v této jednotce za uvedené období 14,41%.

V dalším kroku byly zkoumány následující charakteristiky:

Věk: medián věku diagnózy DCIS činil 61 let.

Typ chirurgické léčby: 84,8% pacientek (n=212) bylo léčeno prs zachovným výkonem. U 9,6% žen (n=26) byla provedena klasická mastektomie. U některých pacientek byla dosažena pouze R1 situace a přesto nenásledovala reexcize. Ve 4,8% případů (n=12) nezjistil patolog v resekátu žádnou nádorovou tkáň.

Po provedení selekce bylo k dispozici celkem 177 vzorků s negativním lemem zdravé tkáně o přesně definované šíři. Tyto vzorky byly způsobilé k další analýze.

Velikost ložiska: Medián velikosti ložiska DCIS byl v naší analýze 14mm (průměr 20,5mm).

Grade: Zjištěno bylo 45 *low-grade* DCIS (18%), 98 *intermediate-grade* DCIS (39%) a 107 *high-grade* DCIS (43%).

Hormonální receptory: Pozitivita či negativita estrogenových a progesteronových receptorů byla závislá na stupni diferenciaci DCIS. Ve skupině všech DCIS bylo prokázáno následující zastoupení: ER+/PgR+

67% (n=154), ER+/PgR- 13% (n=30), ER-/PgR+ 1% (n=2), ER-/PgR- 19% (n=43).

HER2: Pozitivní nález (HER2+) byl zjištěn ve 32,9% (n=26), negativita byla prokázána u 67,1% testovaných vzorků (n=53).

Ki-67: Průměrná proliferační aktivita vyjádřená hodnotou Ki-67 činila pro všechny testované vzorky 27,4%.

USC/VNPI: Pro 72% pacientek (n=180) z celkových 250 jsme byli spolehlivě schopni zjistit údaje o velikosti léze, stupni diferenciaci (grade), šíři lemu zdravé tkáně a o věku. Pro každou pacientku byla vypočtena hodnota prognostického skóre. 40,6% žen (n=73) bylo zařazeno do skupiny USC/VNPI s nízkým rizikem. Skupina s intermediálním rizikem (7-9 bodů) čítala 106 pacientek (58,8%). V jednom případě bylo skóre vyšší než 10, tato pacientka se tím řadí do skupiny s vysokým rizikem.

V této studii byla zjišťována i četnost a metoda axilárního stagingu. Žádná z metod axilárního stagingu nebyla využita u 76,8% pacientek (n=192). Metoda SLNB byla provedena u 22,8% žen (n=57). Z těchto 57 biopsií sentinelové uzliny byla jen polovina (n=29) indikovaná v souladu s aktuálními doporučeními [Lux M.P. a Souchon R., 2013]. Ve druhé polovině případů (n=28) byla provedena SLNB bez toho, aniž by se jednalo o extenzivní DCIS > 4cm a nebo byla zároveň prováděna ablace prsu.

Na druhou stranu jsme zjistili insuficientní staging u 25 pacientek. Ve 14 případech (5,6%) byla totiž provedena mastektomie bez simultánní SLNB a u 11 žen (4,4%) nebyla SNB indikovaná, i když ložisko DCIS bylo > 4cm. U žádné z 58 pacientek, u kterých byla provedena některá z forem axilárního stagingu, nebyly zjištěny uzlinové metastázy.

Srovnávací analýza molekulárních markerů DCIS, invazivního karcinomu a zdravé tkáně

Ve srovnávací analýze bylo dosaženo těchto výsledků: Četnost ztráty heterozygozity byla pro oba geny BRCA1 a BRCA2 signifikantně vyšší pro invazivní karcinom prsní žlázy ve srovnání se vzorky DCIS ($p=0,026$ resp. $p=0,036$). Pro rozdíl četnosti ztráty heterozygozity pro gen p53 statistická signifikance dosažena nebyla ($p=0,97$).

Analýza ztráty heterozygozity proběhla pouze v případech, že se opravdu jednalo o heterozygotní marker.

Homozygotní marker byl označen jako neinformativní a nebyl hodnocen.

Analýza genové exprese prokázala změny exprese v závislosti na typu vyšetřované tkáně. VEGF byl ve vzorcích invazivního karcinomu prsní žlázy nadměrně exprimován ve 14,3% a ve tkáni DCIS s četností 12,0%. Zvýšená exprese genu Bcl-2 byla pozorována v 11,9% v případech invazivního karcinomu a v 8,0% u DCIS. Rozdíly nebyly ani pro jeden gen statisticky signifikantní.

Diskuse

V kohortě pacientek mezi 50-59 lety byl DCIS stejně frekventní ve srovnání s kohortou žen ve věku 60-69 let. Toto pozorování je v rozporu s výsledky studie, které prokázala, že u mladších žen jsou signifikantně častější *in situ* léze ve srovnání se ženami staršími, u kterých diagnostikujeme spíše invazivní karcinomy ($p=0,007$) [Zhang W. et al., 2012]. Naše výsledky naopak naznačují, že incidence DCIS je významná i ve vyšší věkové skupině.

Dále se v naší analýze nezjistilo, že by u mladších žen byla ložiska DCIS extenzivnější než u žen starších [Collins L.C. et al., 2009]. Nepotvrdili jsme ani vyšší

grade u mladších pacientek ve srovnání se ženami staršími [Goldstein N.S. et al., 2000]. Zdá se, že tyto významné prognostické faktory DCIS nejsou tedy závislé na věku pacientky.

Zmíněné výsledky mohou být zkresleny faktem, že analyzovány byly pouze pacientky ve věku 50-69 let. Dále jsme potvrdili výsledky [Daly M.B., 2006, Zhang W. et al., 2012] prokazující pozitivitu hormonálních receptorů ve tkáni DCIS v rozmezí 60 – 78%.

Frekvence nodálních metastáz v případě DCIS je v literatuře popisována mezi 1 – 7% [Zavagno G. et al., 2005, Zhang W. et al., 2012]. Náš výsledek naznačuje, že nález uzlinových metastáz je v případě čistého DCIS jev velmi vzácný.

Ztráta kontroly nad integritou genomu, ztráta schopnosti aktivovat apoptózu a vystupňovaná angiogeneze jsou některé z rizikových faktorů onkogeneze a invazivního růstu.

Bílkovinný produkt genu p53 představuje klíčovou molekulu zodpovědnou za aktivaci apoptózy. Vadný a nefunkční p53 může vést k poruše vnitřní (intrinsické) cesty aktivace apoptózy. Podobný efekt má i dysbalance mezi proapoptotickými a antiapoptotickými faktory, např Bcl-2. Růst zhoubného nádoru je závislý na adekvátním přísunu kyslíku a živin a to zejména cestou novotvořených cév. Angiogenezi může stimulovat nádor sám cestou exprese signální molekuly vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Výsledky naší práce podporují tvrzení, že nadměrná exprese VEGF a Bcl-2 může představovat časný krok v procesu kancerogeneze prsní žlázy. Stejně tak k inaktivaci genu p53 dochází pravděpodobně v časných stádiích vzniku zhoubných nádorů prsu. Tyto markery tedy nelze využít jako indikátory odlišující DCIS s nízkým a vysokým rizikem.

Naopak se potvrdil rozdíl ve frekvenci alelických ztrát genů BRCA1 a BRCA2 při korelaci DCIS a invazivního karcinomu prsu. Tím se nám podařilo identifikovat dva biomarkery, které by mohly indikovat podskupinu DCIS s vyšším rizikem malignizace.

Závěr

Ve vlastním výzkumu zaměřeném na incidenci a prognostické faktory DCIS jsme zaznamenali homogenní distribuci incidence DCIS ve věkové skupině 50-69 let. V naší práci byla tedy incidence DCIS významná i ve vyšší věkové skupině. Dále jsme v uvedené kohortě pacientek zjistili homogenní rozložení velikosti a gradu DCIS. Nepotvrdilo se tedy, že by mladší pacientky vykazovaly extenzivnější, hůře diferencované a biologicky agresivnější léze. Ve sledované skupině pacientek s čistým DCIS jsme ani v jednom případě nezaznamenali uzlinové metastázy.

K odhadu individuálního rizika onemocnění slouží prognostické faktory. V případě DCIS je zřejmé, že hledání optimálního prognostického parametru (nebo spíše panelu parametrů) není u konce. Po éře klinickomorfologických a imunohistochemických markerů směřuje v dnešní době výzkum zejména do oblasti molekulární genetiky. Například metodou mikročipů je možné v jednom diagnostickém kroku zhodnotit expresi několika desítek genů a tím přesně definovat biologické vlastnosti nádoru.

Dosavadní prognostické faktory nedokáží dostatečně predikovat prognózu pacientky. V naší práci se potvrdila hypotéza, že prognostické faktory nemají doposud vliv na management DCIS.

Některé z biomarkerů DCIS byly předmětem zkoumání v experimentální části disertace. Při korelaci mezi DCIS, invazivním karcinomem a zdravou tkání jsme v souladu s původní hypotézou prokázali shody i rozdíly v přítomnosti těchto markerů. Zvýšená exprese genů kontrolujících apoptózu a angiogenezi byla u invazivního karcinomu i DCIS téměř shodná, jde tedy zřejmě o časnou událost v karcinogenezi, podobně jako alelické ztráty genu p53. Naopak alelické ztráty genů BRCA1 a BRCA2 mohou poukazovat na agresivnější biologické chování DCIS.

Další studie biomarkerů a zejména korelace jejich výsledků s klinickými údaji by mohly vést k identifikaci parametrů, jež by definovaly DCIS s nízkým nebo vysokým rizikem. Zdrojem takovýchto klinických údajů by mohly být databáze center mamografického screeningu.

Použitá literatura

Allegra CJ, Aberle DR, Ganschow P, Hahn SM, Lee CN, Millon-Underwood S, Pike MC, Reed SD, Saftlas AF, Scarvalone SA, Schwartz AM, Slomski C, Yothers G, Zon R. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: Diagnosis and Management of Ductal Carcinoma In Situ September 22-24, 2009. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Feb 3;102(3):161-9.

Collins LC, Achacoso N, Nekhlyudov L, Fletcher SW, Haque R, Quesenberry CP Jr, Puligandla B, Alshak NS, Goldstein LC, Gown AM, Schnitt SJ, Habel LA. Relationship between clinical and pathologic features of ductal carcinoma in situ and patient age: an analysis of 657 patients. *Am J Surg Pathol.* 2009 Dec; 33(12):1802-8.

Daly MB. Tamoxifen in ductal carcinoma in situ. *Semin Oncol.* 2006; 33:647–649.

Delaney G, Ung O, Bilous M, Cahill S, Boyages J. Ductal carcinoma in situ. Part II: Treatment. *Aust NZ J Surg* 1997;67:157–65.

de Mascarel I, Bonichon F, MacGrogan G, de Mascarel I, Bonichon F, MacGrogan G, de Lara CT, Avril A, Picot V, Durand M, Mauriac L, Trojani M, Coindre JM. Application of the van nuys prognostic index in a retrospective series of 367 ductal carcinomas in situ of the breast examined by serial macroscopic sectioning: practical considerations. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 May;61(2):151-9.

Dunne C, Burke JP, Morrow M, Kell MR. Effect of margin status on local recurrence after breast conservation and

radiation therapy for ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 1;27(10):1615-20.

Goldstein NS, Vicini FA, Kestin LL, Thomas M. Differences in the pathologic features of ductal carcinoma in situ of the breast based on patient age. *Cancer.* 2000; 88(11):2553–60.

Heinen-Kammerer T. Mammografie-Screening auf Erfolgskurs. *Frauenarzt* 55 (2014) Nr. 4, 332.

Lim YJ, Kim K, Chie EK, Han W, Noh DY, Ha SW. Treatment outcome of ductal carcinoma in situ patients treated with postoperative radiation therapy. *Radiat Oncol J.* 2014 Mar;32(1):1-6.

Lux MP, Souchon R. AGO Leitlinien. http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2007_Ductal_Carcinoma_in_Situ_%28DCIS%29.pdf; (vid. 23.8.2014)

Silverstein MJ. Not everyone with ductal carcinoma in situ of the breast treated with breast preservation needs post-excisional radiation therapy. *Breast.* 2000 Aug;9(4):189-93.

Zavagno G, Carcoforo P, Marconato R, Franchini Z, Scalco G, Burelli P, Pietrarota P, Lise M, Mencarelli R, Capitano G, Ballarin A, Pierobon ME, Marconato G, Nitti D. Role of axillary sentinel lymph node biopsy in patients with pure ductal carcinoma in situ of the breast. *BMC Cancer.* 2005 Mar 11;5:28.

Zhang W, Gao EL, Zhou YL, Zhai Q, Zou ZY, Guo GL, Chen GR, Zheng HM, Huang GL, Zhang XH. Different distribution of breast ductal carcinoma in situ, ductal

carcinoma in situ with microinvasion, and invasion breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2012 Dec 8;10:262.

Seznam vlastních publikací doktoranda se vztahem k tématu

V časopisech s IF

Böhm J, Zikán M. Ductal carcinoma in situ: analysis of 250 cases. Eur J Gynaecol Oncol. 2014; 35(5): 525-529. (IF 2014 = 0,58)

Zikán M, Böhm J, Pavlišta D, Cibula D. Comparative analysis of loss of heterozygosity and expression profile in normal tissue, DCIS and invasive breast cancer. Clin Transl Oncol. 2011 Sep;13(9):652-5. (IF = 1,28)

Böhm J, Zikán M. Einfluss der prognostischen Faktoren auf die Therapie des duktales Carcinoma in situ der Brust. Geburtsh Frauenheilk 2011; 71:967-972. (IF = 0,85)

V recenzovaných časopisech

Böhm J, Zikán M. Current knowledge of ductal carcinoma in situ. Ceska Gynekol. 2009 Oct;74(5):339-47.