UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát dizertační práce

GENETICKÉ ASPEKTY SPORADICKÉHO OVARIÁLNÍHO KARCINOMU

MUDr. Natalia Jančárková

2008

Postgraduální doktorské studium biomedicíny

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 UK a VFN v Praze

Autor: MUDr. Natalia Jančárková

Školitel: doc. MUDr. Pavel Freitag, CSc.

Školitel-konzultant: RNDr. Miroslava Krkavcová

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.

1. ÚVOD

Zhoubné nádory představují heterogenní skupinu onemocnění charakterizovanou růstem, invazí a metastázováním. Chromozomální instabilita je jednou z vlastností nádorových buněk a odpovídá změnám chromozómových oblastí, ve kterých jsou lokalizovány geny podílející se na nádorové transformaci.

V souvislosti s mohutným rozvojem biologie a genetiky v posledních letech přibývá poznatků o mechanizmech karcinogeneze a klinickou onkologii obohacuje prvek, který se zaměřuje na pacientovu prognózu. Tzv. prognostické faktory můžeme rozdělit do tří skupin: faktory týkající se nádoru, faktory týkající se hostitele, tj. pacienta a faktory týkající se prostředí, ve kterém se pacient nachází. Vyhodnocení dostupných prognostických faktorů umožňuje předpovědět pravděpodobný vývoj nádorového onemocnění v konkrétním čase. Jednotlivé faktory přitom mají různou vypovídací hodnotu. Podle toho rozlišujeme prognostické faktory zásadního významu, doplňkového významu, nové a slibné prognostické faktory. Z úvah o prognóze ovariálního karcinomu vyplývají tři zásadní okruhy: prognóza celkového přežití, prognóza léčebné odpovědi, prognóza léčby druhé a další linie u recidivujícího nádoru [1].

Zhoubné nádory ovaria patří mezi nejčastější příčiny úmrtí na gynekologické malignity a představují přibližně 30% všech nádorů ženské reprodukční soustavy. Ve více než 75% případů je toto onemocnění diagnostikováno v pokročilých stadiích. I přes vysoké procento léčebných odpovědí na primární léčbu, u více než 80% případů dochází k recidivám. Ročně je ve světě diagnostikováno přibližně 190 000 nových případů ovariálního karcinomu, 114 000 žen v souvislosti s tímto onemocněním ročně umírá. Ovariální nádory se ve většině případů vyskytují u žen sporadicky, bez pozitivní rodinné anamnézy. Geneticky podmíněné nádory ovarií tvoří asi 5-10%. Jak pro sporadické, tak i pro hereditární ovariální karcinomy je charakteristická akumulace genetických přestaveb a pro oba typy nádorů také vysoký stupeň genetických alterací. Není zcela jasné, zda jsou tyto alterace nezbytné k iniciaci či promoci karcinogeneze nebo jsou důsledkem vrozené genomové instability [2].

Karcinogenezi sporadických ovariálních tumorů ovlivňují především geny dvou skupin: onkogeny a tumor-supresorové geny. Bylo popsáno více jak 60 onkogenů a několik z nich, jako K-ras, c-erbB-2(HER-2/neu), c-fms, c-myc, b-raf a Akt-2 bylo studováno u ovariálního karcinomu. Alterace tumor-supresorového genu p53 je jednou z nejčastějších genetických alterací popsaných u většiny karcinomů, včetně karcinomu ovaria. Mezi další tumor-supresorové geny zkoumané u ovariálního karcinomu patří RB1, WT1 a PTEN.

Exaktní role těchto genů v patogenezi sporadického ovariálního karcinomu rovněž není dosud jednoznačně vymezená [3, 4].

Výsledky molekulárních analýz ovariálních karcinomů v posledních letech, i přes některé stále nejednoznačné interpretace, vedly k novému pohledu na ovariální karcinonogenezi. V současné době tak rozlišujeme dva základní typy ovariálních epiteliálních karcinomů: nádory typu I označované jako „low grade“ a nádory typu II „high grade“, s rozdílným klinickým chováním i odlišným molekulárním profilem [5].

Více autorů věnovalo pozornost vztahům mezi výskytem chromozomálních aberací a klinickým vývojem onemocnění. Prognostický význam jednotlivých genetických parametrů, spolu s dalšími dostupnými molekulárně biologickými i klinickými ukazateli, není v současné době pro použití v klinické praxi jednoznačně vyhodnocen. Je více než zřejmé, že klinická heterogenita zhoubných nádorů se odvíjí od genomu nádorových buněk a patologické exprese jeho genů. Výsledky DNA čipových analýz dále jednoznačně dokazují, že aktivovanou genovou výbavu, realizujících metastatický potenciál, mohou mít nádorové buňky již od počátku svého vzniku. Cílem do budoucna je vytvoření expresního molekulárního profilu nádoru, který by ho charakterizoval především z hlediska invazivních vlastností, metastatického potenciálu a rezistence na běžně používaná cytostatika.

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Jedním z cílů práce bylo zavedení molekulárně-genetických metod při výzkumu solidních zhoubných nádorů do praxe cytogenetické laboratoře a následné porovnání jednotlivých postupů z hlediska výtěžnosti, finanční náročnosti i úspěšnosti.

V cílové skupině sporadických ovariálních karcinomů bylo snahou nalézt typické aberace, které charakterizují tento nádor. Následně porovnat tyto nálezy s výsledky získanými vyšetřením jiné skupiny gynekologických malignit, a to karcinomů děložního hrdla.

Hypotéza č. 1. *Existují chromozomální aberace typické a charakteristické pro jednotlivé nádory, které je odlišují od jiných nádorů. Určité aberace mohou mít zásadní význam.*

Statistické vyhodnocení sledovaných parametrů klinické i laboratorní povahy u pacientek s karcinomem ovaria si kladlo za cíl odhalit významné korelace mezi jednotlivými sledovanými parametry a vyhodnotit jejich případný prognostický význam.

Hypotéza č. 2. *Existují statisticky významné závislosti testovaných parametrů, včetně statisticky signifikantních korelací mezi nálezem chrozomálních přestaveb a ostatních sledovaných parametrů klinické, histopatologické i molekulární povahy.*

3. MATERIÁL A METODIKA

Do studie bylo zahrnuto 60 pacientek s ovariálním karcinomem a také 20 pacientek s cervikálním karcinomem. Vzorek nádoru byl vyšetřen histopatologem s cílem určení histologického typu a nádorové diferenciace (gradingu). Dále byl proveden imunohistochemický průkaz p53 a proliferačního markeru MIB-1 metodou stanovení tzv. HSCORE dle Mc Cartyho et al. [6].

Předložené genetické výsledky byly získány pomocí cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod. Při popisu chromozómů a karyotypů jsme respektovali mezinárodní nomenklaturu (International System for Human Cytogenetic Nomenclature - ISCN 1995), v souladu se závaznou mezinárodní normou.

Ke zjišťování chromozomální nestability nádorových buněk bylo použito cytogenetického vyhodnocení karyotypu s použitím počítačové analýzy obrazu. Při přípravě chromozómových preparátů bylo použito jak přímého zpracování, tak i krátkodobé kultivace, s následným konvenčním zpracováním a G-pruhováním. Nádorová tkáň byla kultivována paralelně ve dvou médiích – v jednosložkovém médiu Bio-Amf 2 (WKS-Diagnostik, Německo) a ve dvousložkovém médiu AmnioMAX-C100 (Invitrogen Corp., USA) v termostatu při 37^{o} C a 4 % CO_2. Sklíčka pro cytogenetickou analýzu byla připravena konvenčním způsobem. Mitózy byly sklízeny po 3,5 hodinové blokaci kolchicinem, uvolnění buněk bylo prováděno standardně směsí trypsinu a verzenu. Hypotonický roztok 0,75 M KCl byl používán 45 minut, prováděly se 3 metanoloctové fixace, kapání buněčné suspenze pro co nejlepší rozprostření buněk se provádělo na mokrá chlazená podložní sklíčka.

K upřesnění aberací byla na některé konkrétní mitózy po jejich cytogenetickém zhodnocení použita metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace), s použitím jednotlivých celochromozómových malovacích sond, tzn. sond, které hybridizují s mnohočetnými chromozómovými sekvencemi. Vzhledem k nedostatečnému přístrojovému vybavení pracoviště nebylo možné použít metody m-FISH (multicolor – mnohobarevná FISH), která umožní barevně odlišit přestavby všech chromozómů na téže mitóze.

Při fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) byly použity celochromozómové malovací sondy WCP 1 SpectrumGreen Probe, WCP 3 SpectrumGreen Probe, WCP 4 SpectrumOrange Probe, WCP 7 SpectrumGreen Probe a WCP 11 SpectrumOrange Probe (Vysis Inc., USA), v souladu s postupem doporučeným výrobcem. Preparáty byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX 51 (Olympus Co., Japonsko), vybaveného transmisním filtrem pro UV/DAPI (360 nm), Orange and Green (Vysis Inc., USA).

Další použitou metodou byla CGH (komparativní genomová hybridizace). Tato metoda je založena na in situ hybridizaci odlišně značené celkové genomové nádorové DNA a referenční genomové DNA normálních metafázických chromozómů. Z izolované nádorové DNA lze tak přímo detekovat nebalancované přestavby (amplifikace, delece) všech chromozómů, a to bez náročné předchozí kultivace. Metoda ovšem neodhalí balancované přestavby (translokace, inverze) a pomocí ní také nelze odlišit diploidní a tetraploidní tumory, což vyplývá z principu samotné metody. CGH umožňuje vyšetření celého genomu v jedné hybridizační reakci.

Izolace DNA v naší studii byla provedena pomocí QIAamp® DNA Mini Kitu (Qiagen Inc., USA) dle postupu doporučeného výrobcem, při samotné hybridizaci bylo využito reagencií fy Vysis Inc., USA, v souladu s doporučením výrobce. Pro počítačovou obrazovou analýzu byl použit software LUCIA-CGH (Laboratory Imaging, Česká republika). Preparáty byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX 51 (Olympus Co., Japonsko).

Cílem statistického zpracování bylo vyhodnotit vztahy sledovaných kvantitativních a kvalitativních parametrů ve skupinách ovariálních i cervikálních karcinomů, s důrazem na vztahy chromozomálních přestaveb k ostatním parametrům.

V obou skupinách, tj. ovariálních i cervikálních karcinomů, jsme při statistickém zpracování využili analýzu rozptylu a test chí-kvadrát (χ^2). Vzhledem k velkému množství proměnných, testování průměru pouze mezi dvojicemi skupin bylo provedeno s Bonnferroniho korekcí hladiny významnosti pro vícenásobná porovnání dvojic souboru.

Při statistickém zpracování (ANOVA, test chí-kvadrát (χ^2)) byl použít SPSS 13.0 software. Zpracování ve skupině ovariálních karcinomů bylo následující:

1. testování 4 kvantitativních proměnných (věk, CA125 před léčbou, MIB-1, p53) pomocí analýzy rozptylu s dělením do skupin podle 9 kvalitativních parametrů: stadium (I, II, III, IV), histologie (endometroidní, mucinózní, serózní adenokarcinom), grading (G1, G2, G3), operační reziduum (ne, ano), lymfadenektomie - LE (ano-, ano+), léčebná odpověď – response rate RR (CR – complete response, PR – partial response, PD – progression of disease), CA125 po léčbě (negativní, pozitivní), p53 HSCORE (negativní, pozitivní), přestavba (žádná, malá, velká). SD (stable disease) nebyla u těchto pacientek zaznamenána.

2. Testování výše uvedených kvalitativních parametrů mezi sebou testem závislosti chí-kvadrát (χ^2).

Zpracování ve skupině cervikálních karcinomů bylo následující:

1. testování 3 kvantitativních proměnných (věk, MIB-1 HSCORE, p53 HSCORE) pomocí analýzy rozptylu s dělením do skupin podle 6 kvalitativních parametrů: stadium (I, II, III, IV), histologie (dlaždicový, dlaždicový nerohovějící, dlaždicový rohovějící), grading (G1, G2, G3), léčebná odpověď – response rate RR (CR – complete response, PR – partial response, PD- progression of disease), přestavba (ano, ne) a p53 HSCORE (negativní, pozitivní). SD (stable disease) nebyla u těchto pacientek zaznamenána.

2. Testování výše uvedených kvalitativních parametrů mezi sebou testem závislosti chí-kvadrát (χ^2) .

Počet statisticky vyhodnocených případů byl u jednotlivých parametrů různý, klinické informace, histologické nálezy včetně nádorové diferenciace byly k dispozici u všech pacientek. Imunohistochemické vyšetření (MIB-1 HSCORE, p53 HSCORE) nebylo provedeno v několika případech z důvodu špatné fixace tkáně určené pro toto zpracování. V důsledku technických závad, nedostatečného množství nádorové tkáně a v některých případech i neúspěšné kultivace, chromozomální přestavby byly hodnoceny u 20 pacientek ve skupině cervikálních karcinomů a u 47 pacientek ve skupině ovariálních karcinomů. Koncentrace DNA byla extrémně nízká u 13 pacientek ze skupiny ovariálních karcinomů, tyto případy byly vyloučeny z genetického testování.

Veškeré získané údaje byly kompletně zohledněny při statistickém zpracování.

4. VÝSLEDKY

Skupina ovariálních karcinomů

Věk pacientek ve skupině ovariálních karcinomů se v době diagnózy pohyboval od 39 do 81 let (medián 61 let). Rozdělení podle stadií (FIGO) a histologie (včetně gradingu) je uvedeno v **Tab**. **1.**

Konvenční cytogenetická karyotypizace byla úspěšná u 35 pacientek ze 40 testovaných (87,5%). S cílem porovnat výsledky získané různými metodami a vyhodnotit výhody a nevýhody jednotlivých metod, byla u 6 pacientek (10% z celé skupiny) s předchozí úspěšnou konvenční karyotypizací použita metoda FISH. CGH metoda byla uplatněna u 12 pacientek (20%) s neúspěšnou konvenční karyotypizací.

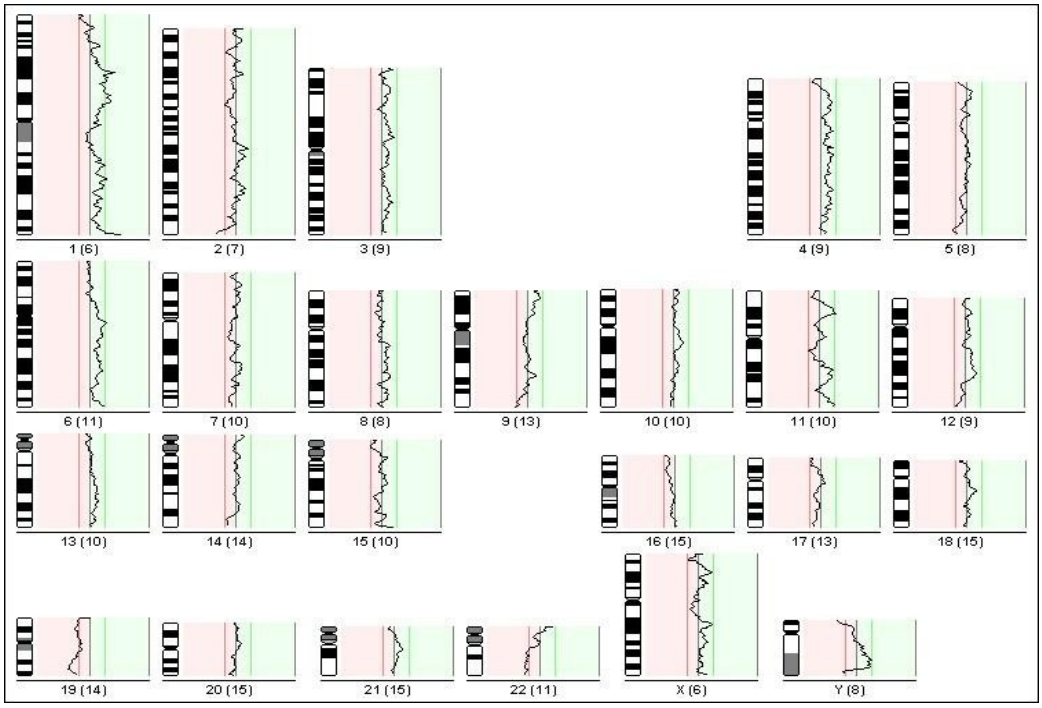
Genetické nálezy. Numerické a strukturální aberace byly nalezeny u 63% ovariálních nádorových buněk Nejčastější aberace viz **Tab. 2.** Zajímavým nálezem byla delece 22q, zaznamenána v 17 případech (36,2%), tento nález je dle dostupné literatury poměrně vzácný, viz **Obr. 1**.

Tab. 1 Charakteristika skupiny ovariálních karcinomů (FIGO stadium, histologie, grading)

PARAMETR	**N**	**%**
FIGO stadium: I	10	16,7
II	4	6,7
III	40	66,7
IV	6	10,0
Celkem	60	100,0
HISTOLOGIE, GRADING: serózní adenokarcinom (z toho)	51	83,0
G1	8	(15,7)
G2	7	(13,7)
G3	36	(70,6)
mucinózní adenokarcinom (z toho)	3	5,0
G1	2	(66,7)
G2	1	(33,3)
G3	0	(0,0)
endometroidní adenokarcinom (z toho)	5	8,3
G1	1	(20,0)
G2	3	(60,0)
G3	1	(20,0)
nediferencovaný karcinom	1	1,7
Celkem	60	100,0

Tab. 2 Nejčastější genetické alterace ve skupině ovariálních karcinomů a metody jejich detekce (*konvenční karyotypizace)

GENETICKÉ ALTERACE		**N** (celkem 47)	**%**	**Metody**	
				Konv.*	CGH
Amplifikace	1q	17	36.2	ano	ano
	3q	8	17,0	ano	ano
	20q	8	17,0	ne	ano
Delece	4p	8	17,0	ano	ano
	4q	8	17,0	ano	ano
	18p	4	8,5	ne	ano
	18q	4	8,5	ano	ano
	19q	4	8,5	ne	ano
	22q	17	36,2	ano	ano
Translokace	t(10;15)	2	4,3	ano	ne



Obr. 1 Pacientka č. 37 Výsledek získaný metodou CGH byl zjištěn u dobře diferencovaného serózního ovariálního cystadenokarcinomu stadia FIGO IIIA. Vedle v literatuře zřídka uváděné amplifikace 1p je zde výrazná delece 19q a delece 22q, v literatuře popisována vzácně, v našem souboru ovariálních karcinomů zaznamenána u 36% případů.

Izolovaná balancovaná translokace t(10;15) byla nalezena ve dvou případech (4,3%). Nález byl přítomen ve všech vyšetřovaných buňkách, konstituční translokace byla vyloučena vyšetřením periferní krve. Ostatní nálezy se vyskytovaly v méně než 5% případů: amplifikace 8q, 11q, 17q, 19q, 12p, 12q, 5p, 5q, 6p, 6q, 21q; delece 16q, 17q, 11p, 11q, 13q, 12p, 5q, 9q, 2p, 2q, Xp, 1q, 15q. Ve 32% případů byly nalezeny rozsáhlé změny, počet aberantních chromozómů přesahoval sedm. Ve 37% případů byl nalezen diploidní karyotyp.

Korelace mezi klinickými, histopatologickými a molekulárními parametry.

Statisticky významnou závislost se podařilo prokázat pro tyto kvantitativní proměnné:

1. Ženy s dg. stadiem I byly statisticky významně ($p<0,01$) starší (74) než ženy ve stadiích II, III, IV (59, 61, 60).
2. Ženy s gradingem G1 měly statisticky významně ($p<0,05$) nižší hodnotu MIB-1 HSCORE (141) oproti ženám s G2 (209) a G3 (195), nebyla zjištěna závislost na histologickém typu.

3. Ženy s gradingem G1 měly statisticky významně ($p<0,05$) nižší hodnotu p53 HSCORE (126) oproti ženám s G2 (236) a G3 (173), nebyla zjištěna závislost na histologickém typu.

4. Ženy s pozitivním nálezem p53 HSCORE měly statisticky významně ($p<0,001$) vyšší průměrnou hodnotu MIB-1 HSCORE (217) oproti ženám s negativním p53 HSCORE (157).

5. Ženy s velkou chromozomální přestavbou byly statisticky významně (ale jen $p<0,1$) mladší (54) oproti ženám s malou (60) a žádnou přestavbou (66).

Pro kvalitativní parametry se podařilo prokázat statisticky významnou závislost mezi následujícími parametry:

1. Stadium nádorového onemocnění a grading ($p<0,001$). Závislost na histologickém typu nebyla prokázána.

2. Stadium nádorového onemocnění a operační reziduum ($p<0,001$).

3. Stadium nádorového onemocnění a LE (lymfadenektomie) (ano-, ano+) ($p<0,05$). Nebyla prokázána závislost mezi stadiem nádorového onemocnění a RR (response rate)**.**

4. Histologie a grading ($p<0,05$).

5. Grading a operační reziduum ($p<0,001$).

6. Grading a RR (response rate) ($p<0,01$).

7. Grading a p53 HSCORE (negativní, pozitivní) ($p<0,01$).

8. Operační reziduum a LE (lymfadenektomie) ($p<0,05$).

9. Operační reziduum a RR (response rate) ($p<0,05$).

10. Operační reziduum a CA 125 ($p<0,05$).

11. RR (response rate) a CA 125 ($p<0,001$).

Mezi ostatními zbývajícími dvojicemi parametrů se statisticky významnou závislost nepodařilo prokázat.

Chromozomální přestavby a jejich vztah k hodnoceným parametrům.

Podskupinu pacientek s ovariálním karcinomem jsme rozdělili podle výskytu chromozomálních aberací na tři skupiny – bez aberací, s malým počtem aberací (1-7), s velkým počtem aberací (více než 7). Jednalo se o soubor těch pacientek, u kterých byly výsledky získané konvenční karyotypizací – s cílem hodnotit jenom pacientky s kompletními výsledky (tzn. včetně těch nálezů, které nejsou detekovatelné např. pomocí CGH metody). Tyto tři skupiny byly korelovány s věkem, stadiem, histologickým typem, gradingem, léčebnou odpovědí (RR – response rate), hladinou CA 125, MIB-1 HSCORE a p53 HSCORE,

ponechaným chirurgickým reziduem a přítomností metastáz v lymfatických uzlinách. I přes některé pozitivní náznaky žádné statisticky významné závislosti, kromě již výše zmíněných (ve skupině kvantitativních proměnných – věk), nalezeny nebyly. Nebyla vyhodnocena korelace mezi výskytem genetických alterací a dobou celkového přežití, vzhledem ke krátké době sledování některých pacientek účastnících se studie (jeden rok).

Skupina cervikálních karcinomů.

Pacientky ve skupině cervikálních karcinomů byly v době diagnózy ve věku od 39 do 84 let (medián 52 let). Rozdělení dle stadií onemocnění a histologických nálezů, včetně gradingu je uvedeno v **Tab**. **3.** Konvenční cytogenetická karyotypizace byla úspěšná u 17 pacientek (85%). FISH metoda byla aplikována zároveň u 6 pacientek (30%) s předchozí úspěšnou konvenční karyotypizací. CGH metoda byla uplatněna u 4 pacientek (20%) této skupiny (tři případy neúspěšné a jeden případ úspěšné konvenční karyotypizace).

Numerické a strukturální aberace byly nalezeny u 29% cervikálních nádorových buněk. Počet chromozómů se pohyboval od 44 do 82. Rozsáhlé numerické a strukturální přestavby byly typickými nálezy u pokročilých nádorů. Nejčastější aberace jsou uvedeny v **Tab. 4.** Ve vyšetřovaných případech v naší studii byly nalezeny dále vzácné amplifikace chromozómu 2p a 2q, a také delece chromozómů 10p,10q, 11p a 21q. V 71% případů byl nalezen diploidní karyotyp.

Tab. 3 Charakteristika skupiny cervikálních karcinomů (FIGO stadium, histologie, grading)

PARAMETR	**N**	**%**
FIGO stadium: I	6	30
II	6	30
III	6	30
IV	2	10
celkem	20	100
HISTOLOGIE, GRADING: spinocelulární karcinom	20	100
G1	0	0
G2	8	40
G3	12	60
celkem	20	100

Ve skupině cervikálních karcinomů, jako statisticky významné se podařilo prokázat tyto závislosti pro kvantitativní proměnné:

1. ženy s dg. stadiem IV (ale byly jen 2) byly statisticky významně ($p<0,05$) starší (80) než ženy se stadii I, II, III, (55, 51, 54).

2. Ženy s gradingem G2 měly statisticky významně (pouze p<0,1) vyšší hodnotu p53 HSCORE (136) oproti ženám s G3 (110).

Mezi všemi možnými dvojicemi 6 kvalitativních parametrů se statisticky významnou závislost nedařilo prokázat. Žádné statisticky významné závislosti mezi genetickými nálezy a proměnnými, jak kvalitativní, tak kvantitativní povahy, rovněž nalezeny nebyly.To neznamená, že závislost není; může být, ale nepodařilo se jí prokázat, především pro velmi malý celkový počet žen s karcinomem děložního hrdla a tím i v jednotlivých kategoriích sledovaného parametru.

Tab. 4 Nejčastější genetické alterace ve skupině cervikálních karcinomů a metody jejich detekce (*konvenční karyotypizace)

GENETICKÉ ALTERACE		**N** (celkem 20)	**%**	**Metody**	
				konv.*	CGH
Amplifikace	3q	12	60	ano	ano
	3p	8	40	ano	ano
	5p	4	20	ne	ano
	20p	4	20	ne	ano
	22q	4	20	ne	ano
Delece	13q	4	20	ano	ne
	2q	4	20	ano	ne
	6q	4	20	ano	ne
Izochromozóm	5p	8	40	ano	ne

4. DISKUZE

Přestože pomocí klasické cytogenetiky lze analyzovat celý genom v jednom vyšetření, její rozlišovací schopnost je relativně malá. Metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se stala rutinní metodou, vyšetření touto metodou můžeme indikovat jen tehdy, známe-li dopředu cílový gen či chromozómovou oblast, kterou chceme analyzovat. Celý genom dovoluje v jednom experimentu analyzovat komparativní genomová hybridizace (CGH). I tato metoda má nicméně svá omezení. Pomocí ní nelze například určit chromozómové translokace (reciproké výměny genetického materiálu mezi nehomologními chromozómy) a metoda vyžaduje, aby se změny vyskytovaly ve více než 50% nádorových buněk.

Snaha o určení všech genetických změn spojených se vznikem a vývojem nádorového onemocnění vede k vývoji dalších nových postupů. Byly tak vyvinuty technologie genomových microarray neboli čipové technologie pro aplikace metody CGH. Array CGH

slouží ke zvýšení přesnosti, rozlišení a rozsahu změn ve srovnání s klasickou metodou CGH a měření může být porovnáno přímo k pozici na genomové sekvenci. Pro určení balancovaných změn byla vyvinuta modifikace metody array CGH a byla označena array painting. Kombinací metod array CGH a array painting je možné stanovit jak změny počtu kopií DNA, tak balancované translokace [7, 8].

K izolaci cílových nádorových buněk z komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární ale i proteinovou analýzu se jeví v současnosti jako nejvhodnější metoda laserové záchytné mikrodisekce (laser capture microdissection – LCM). Základem této metody je inverzní mikroskop se zabudovaným nízko výkonovým infračerveným laserem. V naší studii tato metoda nebyla použita.

Cytogenetické vyšetření solidních nádorů se v České republice provádí zatím jenom sporadicky a většinou k výzkumným účelům. Do laboratorní praxe pracoviště, kde se výzkum prováděl, byla zavedena metoda CGH, která je do budoucna východiskem pro metody array CGH a array painting. Porovnáním použitých metod byly vyhodnoceny přínosy jednotlivých postupů.

Z hlediska genetických alterací, ovariální karcinomy představují širokou variaci nálezů, jejichž interpretace je stále předmětem pokračujícího výzkumu. Amplifikace typické pro epiteliální ovariální nádorové buňky jsou popisovány na chromozómech 1q, 3q, 8q a 20q, delece se vyskytují především na chromozómech 4q, 13q, 16q a 18q [9, 10]. Nádory s nízkým maligním potenciálem a invazivní karcinomy se liší přítomností rozdílných aberací. Toto může souviset s faktem, že se jedná o dvě rozdílné subpopulace ovariálních nádorů [10]. Delece bývají typickým nálezem u časných stadií, na druhé straně, amplifikace jsou daleko častějším nálezem u pokročilých stadií [11].

Byly nalezeny vztahy mezi počtem aberací a dobou celkového přežití, vyšší počet chromozomálních přestaveb je často spojen s dalším nepříznivým faktorem, kterým je nádorová diferenciace. Pacientky s tumory obsahujícími 7 a méně aberací mají delší dobu celkového přežití. Srovnání primárních a metastatických nádorů odhalilo více aberací ve skupině primárních nádorů [12, 13]. Často popisovaným nálezem v cervikálních nádorových buňkách je amplifikace 3q, stejně jako v buňkách premaligních lézí a lézí s iniciální invazí. Nebyla nalezena specifická genetická alterace asociovaná s HPV infekcí [14].

Chromozomální aberace, v obou námi zkoumaných skupinách ovariálních i cervikálních karcinomů, jsou rozdílné a postihují jiné chromozómy, v souladu s literárními údaji. Primární aberace nebyla nalezena v žádné skupině. Vyšší počet diploidních nádorů v našem souboru může souviset se způsobem odběru nádorové tkáně, kdy makroskopicky

zjevný tumor obsahuje také podstatnou fibrózní složku s klonem buněk s normálním karyotypem. Skutečností ovšem je, že klonální chromozomální aberace v žádné z citovaných prací, které se této problematice věnovaly, nebyly nalezeny ve 100% vyšetřovaných buněk, a to i při použití záchytné laserové mikrodisekce a následné aplikace čipových metod. Toto odpovídá již výše zmiňované heterogenitě nádorové tkáně.

Průměrné hodnoty MIB-1 HSCORE byly podobné jak ve skupině ovariálních, tak i cervikálních karcinomů (187,8; 209,3). Průměrná hodnota p53 HSCORE byla významně vyšší v buňkách ovariálních karcinomů ve srovnání s buňkami cervikálních karcinomů (180,5; 119,2). Aktivita proliferačního markeru MIB-1 byla signifikantně vyšší u žen s vysokým p53 HSCORE. Aktivita protilátky Ki-67 byla prokázána jako signifikantní prediktor přežití také českými autory. Typ mutací genu p53 je dalším předpokládaným faktorem ovlivňujícím dobu celkového přežití u pacientek léčených pro pokročilý serózní adenokarcinom ovaria.

Genetické alterace ve skupině cervikálních karcinomů byly méně extenzivní, ve srovnání se skupinou ovariálních karcinomů. Může to souviset se způsobem odběru nádorové tkáně a izolací maligních buněk, menším počtem pacientek ve skupině, zároveň však také s odlišným způsobem cervikální karcinogeneze. Posledně zmíněný názor podporuje i odlišný nález genetických alterací u obou nádorů.

Počet genetických přestaveb ve skupině ovariálních karcinomů byl signifikantně vyšší ve skupině mladších žen. I přes malý počet zkoumaných žen tento fakt může mít význam z hlediska možné predikce maligního potenciálu vyšetřovaných nádorů.

Věk není jednoznačně pokládán za nezávislý prognostický faktor, dle literárních údajů věk pacientek koreluje s delší dobou celkového přežití - toto ovšem nejspíše souvisí s vyšším počtem výskytu časných stadií, lepším PS a možnostmi radikálního chirurgického výkonu u mladších pacientek. Incidence sporadických nedědičných malignit vykazuje závislost na věku v tom smyslu, že jsou onemocněními postreprodukčního období, kdy postupně klesá efektivita přirozených protinádorových mechanizmů (reparace mutací, apoptóza, imunologické mechanizmy). Výskyt většího počtu chromozomálních aberací v nádorech mladších žen v naší studii, je i přes málo početnou vyšetřovanou skupinu, důvodem zaměření se právě tuto věkovou kategorii. Právě u mladších žen zřejmě působí další dosud ne zcela objasněné mechanizmy karcionogeneze, které neodpovídají výše zmiňovanému nahromadění mutací za delší časový úsek života.

I přesto, že počty hodnocených žen v naší studii nejsou vysoké, jsou srovnatelné s počty hodnocených případů, jak jsou uváděny v literatuře. Tento počet souvisí s časovou ale

nejvíce s finanční náročností některých vyšetřovacích postupů. Jednotlivé prameny uvádějí výsledky vycházející z vyšetření 10-68 případů ovariálních karcinomů, výjimkou je práce Taetleho et al. z roku 1999, kdy kombinací konvenčních cytogenetických metod a FISH bylo vyšetřeno 244 primárních ovariálních adenokarcinomů s nálezem chromozomálních aberací u 201 vyšetřovaných případů [12].

Většina cytogenetických nálezů popsaných v naší studii odpovídala literárním údajům. Na druhé straně, v obou námi zkoumaných skupinách, tj. ovariálních i cervikálních karcinomů, byly zjištěny některé, dle literárních údajů, vzácnější nálezy. Mezi tyto nálezy patří delece 22q, která byla v naší studii nalezena v 36% případů. Syndrom delece 22q11.2. je popisován jako chromozomální odchylka s imunologickými defekty s různou fenotypickou expresí, které postihují až 70% těchto jedinců, nezávisle na klinických projevech. Asociace mezi přítomností delece 22q11.2 a predispozicí k nádorům byla nedávno popsána u maligních rhabdoidních tumorů, karcinomu pankreatu a dlaždicobuněčného karcinomu děložního hrdla [15].

7. ZÁVĚRY

Do laboratorní praxe pracoviště, kde se výzkum prováděl, byla zavedena metoda CGH, která je do budoucna východiskem pro metody array CGH a array painting. Porovnáním použitých metod, konvenčních cytogenetických a molekulárně-cytogenetických, byly vyhodnoceny přínosy jednotlivých postupů. V současné době se jeví jako nevhodnější postup metoda komparativní genomové hybridizace, která je doplněna stanovením karyotypu cytogeneticky nebo molekulárně-cytogeneticky.

Řešení hypotézy č. 1. Analýzy provedené ve skupině pacientek s ovariálním karcinomem zaznamenaly řadu strukturálních chromozomálních přestaveb. Byly zjištěny charakteristické amplifikace pro ovariální karcinom na chromozómech 1q, 3q a 20q, dále delece na chromozómech 4p, 4q, 18p, 18q a 19q. Nejčastějšími nálezy ve skupině cervikálních karcinomů byly amplifikace 3q, 3p a izochromozóm 5p. Při srovnání nálezů u cervikálních a ovariálních karcinomů byly zjištěny rozdílné nálezy jak z kvantitativního, tak z kvalitativního hlediska, což podporuje tezi o rozdílech v karcinogenezi těchto zhoubných nádorů.

Primární aberace nebyla nalezena ani v jedné z vyšetřovaných skupin.

Na druhé straně, v obou námi zkoumaných skupinách, tj. ovariálních i cervikálních karcinomů, byly zjištěny některé vzácnější nálezy - delece chromozómů 11p, 21p, vzácná delece chromozómu 10 a amplifikace chromozómu 2 v buňkách cervikálních karcinomů, dále

izolovaná balancovaná translokace t(10;15), amplifikace 1p, delece 19q a delece 22q v buňkách ovariálních karcinomů. Uvedená delece 22q, která je v literatuře popisována ojediněle, byla v našem souboru nalezena v 36% případů.

Řešení hypotézy č. 2. U ovariálních karcinomů se v našem souboru testováním kvantitativních proměnných (věk, hodnota CA 125 před léčbou, MIB-1 HSCORE, p53 HSCORE) pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) s dělením do skupin podle 9 kvalitativních parametrů (stadium, histotyp, grading, operační reziduum, provedení lymfadenektomie, response rate, pokles CA 125 po léčbě, p53 HSCORE, genetická přestavba) jako statisticky významné podařilo prokázat závislosti v kategoriích stadium, věk, grading, MIB-1 HSCORE a p53 HSCORE. Signifikantní závislost velikostí chromozomální přestavby byla prokázána pouze ve vztahu k věku vyšetřovaných žen.

U cervikálních karcinomů se ve zkoumaném souboru testováním kvantitativních proměnných (věk, MIB-1 HSCORE a p53 HSCORE) pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) s dělením do skupin podle 6 kvalitativních parametrů (stadium, histotyp, grading, response rate, genetická přestavba a p53 HSCORE) podařilo jako statisticky významné prokázat závislosti v kategoriích věk, stadium, grading a p53 HSCORE**.**

Bylo zjištěno, že ovariální karcinomy mladších žen se vyznačují významnějšími nálezy jak na úrovni cytogenetických změn, tak i z hlediska aktivity proliferačních markerů, což obvykle koreluje s horším klinickým průběhem.

Další očekávané statisticky významné závislosti mezi chromozomální přestavbou a zkoumanými parametry kvantitativní i kvalitativní povahy se nepodařilo prokázat.

Získané poznatky z cytogenetiky gynekologických maligních nádorů představují východisko pro podrobnější výzkum na molekulární úrovni, včetně zaměření na cílovou skupinu mladších žen a na nálezy vzácnějších aberací zjištěných v této studii.

8. SOUHRN

Předložené výsledky představují výzkumný projekt zaměřený na výskyt genetických přestaveb v karcinomech ovaria a děložního hrdla a jejich korelaci s dostupnými charakteristikami molekulárně biologické i klinické povahy.

Bylo vyšetřeno 60 pacientek s karcinomem ovaria a 20 pacientek s karcinomem děložního hrdla. Histopatologem byl stanoven typ nádoru i jeho diferenciace, dále byl imunohistochemicky proveden průkaz p53 s proliferačního markeru MIB-1.

Chromozomální aberace byly zjišťovány pomocí cytogenetických (konvenční karyotypizace) i molekulárně-cytogenetických metod (fluorescenční in situ hybridizace, komparativní genomová hybridizace).

Statistické zpracování (analýza rozptylu a chí-kvadrát test) bylo zaměřeno na vztahy vybraných parametrů kvantitativní i kvalitativní povahy, kam patřily věk, stadium nemoci, histologický typ, grading, CA 125 před a po léčbě, MIB-1, p53, operační reziduum, lymfadenektomie, léčebná odpověď, velikost chromozomální přestavby.

Ve skupině ovariálních i cervikálních karcinomů byly zjištěny, pomocí genetických analýz, typické amplifikace, delece i nález izochromozómu. Dále bylo zaznamenáno, ve srovnání s literárními údaji, několik vzácnějších nálezů. Zajímavou se jeví delece 22q, která se ve skupině ovariálních karcinomů vyskytovala až ve 36%, v literatuře je popisována jako chromozomální odchylka související s imunologickými defekty.

Statistickým vyhodnocením sledovaných proměnných kvantitativní i kvalitativní povahy byly mezi některými z nich prokázány statisticky významné závislosti v obou vyšetřovaných skupinách. Velikost chromozomální přestavby ve skupině ovariálních karcinomů signifikantně korelovala pouze s věkem vyšetřovaných žen. Bylo zjištěno, že pro ovariální karcinomy mladších žen jsou typické významnější nálezy jak na úrovni cytogenetických změn, tak i aktivita proliferačních markerů.

9. SUMMARY

The results presented have to do with the research project, which is concentrated upon chromosomal rearrangements in ovarian and cervical cancer and their correlations with available parameters of both molecular biological and clinical characteristics.

Sixty patients with ovarian cancer and twenty patients manifesting cervical cancer were included in the study. The histological type and grade, MIB-1 and p53 (using immunohistochemical method) were estimated by histopathologist.

Both conventional karyotyping and molecular-cytogenetic methods (fluorescent in situ hybridization and comparative genomic hybridization) were applied to reveal chromosomal aberrations.

The results were subjected to statistical evaluation, using analysis of variances and χ^2 test. There were correlated parameters of quantitative and qualitative character – age, stage, histological type, grade, CA 125 before and after treatment, MIB-1, p53, surgical residuum, lymphadenectomy, response rate, chromosomal rearrangements.

Analyses accomplished both in ovarian and cervical cancer group revealed typical genetic alterations as amplifications, deletions and finding of isochromosome.

On the other side, specific genetic alterations, including some rare findings, have been found both in ovarian and cervical cancer cells. Deletion 22q, being quite rare in terms of available references, detected in 36% cases in the group of ovarian cancer patients examined, is described as a common chromosomal aberration connected with immunological disorders.

Statistically significant correlations between specific parameters both quantitative and qualitative character were found in the tested groups. Correlation between severity of chromosomal rearrangements and age in ovarian cancer group was found. The number of aberrations in ovarian cancer cells, just as activity of proliferative markers, seems to be typical important finding, especially when associated with younger age.

9. LITERATURA

1. GOSPODAROWICZ, M. K., HENSON, D. E., HUTTER, R. V. P., O´SULLIVAN, B., SOBIN, L. H., WITTEKIND, C. (Eds.). *Prognostic Factors in Cancer.* Second Edition. New York: UICC. Wiley-Liss, 2001. 809 s. ISBN 0-471-40633-3.

2. STEWART, B. W., KLEIHUES, P. (Eds.). *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press, 2003. 351 s. ISBN 92 832 0411 5.

3. AUNOBLE, B., SANCHES, R., DIDIER, E., BIGNON, Y. J. Major oncogenes and tumor supressor genes involved in epithelial ovarian cancer (rev.). *Int. J. Oncol*., 2000, vol. 16, no. 3, s. 567-576.

4. LIU, Y., GANESAN, T. S. Tumour supressor genes in sporadic epithelial ovarian cancer. *Reproduction*, 2002, vol. 123, no. 3, s. 341-353.

5. SHIH, I.- M., KURMAN, R. J. Ovarian tumorigenesis. A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol*., 2004, vol. 16, s. 1511-1518.

6. MC CARTY, K. S. Jr., MILLER, L. S., COX, E. B., KONRATH, J, MC CARTY, K. S.Sr. Estrogen receptor analyses: Correlation of biochemical and immunohistochemical

methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.,* 1985, vol. 109, no. 8, s. 716-721.

7. MICHALOVÁ, K., ZEMANOVÁ, Z. Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klin. Biochem. Metab.*, 2005, roč. 13(34), č. 2, s. 63-67.

8. JAROŠOVÁ, M., POSPÍŠÍLOVÁ, H., PLACHÝ, R., PAPAJÍK, T., KOPTÍKOVÁ, J., INDRÁK, K. Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů. *Klinická Onkologie*, 2006, suppl., s. 342-346.

9. SONODA, G., PALAZZO, J., DU MANOIR, S., GODWIN, A. K., FEDER, M., YAKUSHIJI, M., TESTA, J.R. Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24 and 20q13 in human ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, vol. 20, no. 4, s. 320-328.

10. TIBILETTI, M. G., BERNASCONI, B., TABORELLI, M., FACCO, C., RIVA, C., CAPELLA, C., FRANCHI, M., BINELLI, G., ACQUATI, F., TARAMELLI, R. Genetic and cytogenetic observations among different types of ovarian tumors are compatible with a progression model underlying ovarian tumorigenesis. *Cancer Genet. Cytogenet*., 2003, vol. 146, no. 2, s. 145-53.

11. HUANG, N. F., GUPTA, M., VARGHESE, S., RAO, S., LUKE, S.: Detection of numerical chromosomal abnormalities in epithelial ovarian neoplasms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and a review of the current literature. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol*., 2002, vol. 10, no. 2, s. 187-193.

12. WANG, N. Cytogenetics and Molecular Genetics of Ovarian Cancer. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, vol. 115, no. 3, s. 157-163.

13. SANTIN, A. D., ZHAN, F., BELLONE, S., PALMIERI, M., CANE, S., BIGNOTTI, E., ANFOSSI, S., GOKDEN, M., DUNN, D., ROMAN, J. J., O´BRIEN, T. J., TIAN, E., CANNON, M. J., SHAUGHNESSY, J. Jr., PECORELLI, S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normalovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Cancer*, 2004, vol. 112, no. 1, s. 14-25.

14. UMAYAHARA, K., NUMA, F., SUEHIRO, Y., SAKATA, A., NAWATA, S., OGATA, N., SUMINAMI, Y., SAKAMOTO, M., SASAKI, K., KATO, H. Comparative genomic hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer,* 2002, vol. 33, no. 1, s. 98- 102.

15. CHOI, Y.-W., BAE, S. M., KIM, Y.-W., LEE, H. N., KIM, Y. W., PARK, T. C., RO, D. Y., SHIN, J. C., SHIN, S. J., SEO, J. S., AHN, W.-S. Gene expression profiles in

squamous cell cervical carcinoma using array-based comparative genomic hybridization analysis. *Int. J. Gynecol. Cancer* , 2007, vol. 17, no. 3, s. 687-696.

10. PUBLIKACE AUTORKY K TÉMATU PRÁCE

1. JANČÁRKOVÁ, N., KRKAVCOVÁ, M., JANASHIA, M., FREITAG, P. Genetické aspekty maligních epiteliálních nádorů ovaria. *Čes. Gynek.*, 2005, roč. 70, č. 4, s. 299-306.

2. KRKAVCOVÁ, M., JANČÁRKOVÁ, N., JANASHIA, M., KŘÍTKOVÁ, A., PEXIDROVÁ, M., KOHOUTOVÁ, M. Detekce a výskyt chromozomálních aberací u zhoubných nádorů děložního hrdla a vaječníku. *Klinická Onkologie*, 2006, roč. 19, č. 2, s. 124-129.

3. JANČÁRKOVÁ, N., KRKAVCOVÁ, M., JANASHIA, M., FREITAG, P. Prognostické faktory ovariálního karcinomu. *Čes. Gynek.*, 2006, roč. 71, č. 3, s. 252-259.

4. JANČÁRKOVÁ, N., KRKAVCOVÁ, M., JANASHIA, M., FREITAG, P., DUŠKOVÁ, J., CIBULA, D. Význam chromozomálních změn ve vztahu k prognostickým faktorům u zhoubných nádorů vaječníku a děložního hrdla. *Čes. Gynek.*, 2008, roč. 73, č. 2, s. 79-86.

5. KRKAVCOVÁ, M., JANČÁRKOVÁ, N., JANASHIA, M., FREITAG, P., DUŠKOVÁ, J. Genetic Alterations in Gynecological Malignancies. *Neoplasma,* 2008, vol. 55, no. 3, s. 205-214. IF 1, 247

6. JANČÁRKOVÁ, N., KRKAVCOVÁ, M., JANASHIA, M., FREITAG, P., DUŠKOVÁ, J., CIBULA, D. Chromosomal rearrangements and their relations to histopathological and clinical parameters in epithelial ovarian cancer. *Folia Biologica (Praha)*, 2008, vol. 54, no. 2, s. 58-64. IF 0, 387