Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Genetické aspekty sporadického ovariálního karcinomu

Dizertační práce

Postgraduální doktorské studium biomedicíny
Oborová rada: Experimentální chirurgie
Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

MUDr. Natalia Jančárková

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Freitag, CSc.
Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Školitel-konzultant: RNDr. Miroslava Krkavcová
GENvia, s. r. o.

raha 2008

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Pavlu Freitagovi, CSc. za trvalou podporu mého rozhodnutí věnovat se tématu, které se stalo základem předkládané dizertační práce. Za cenné odborné konzultace a stálou spolupráci na výzkumném projektu děkuji RNDr. Miloslavě Krkavcové.

Poděkování dále patří prof. MUDr. Jaroslavu Živnému, DrSc., přednostovi Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze v době začátku mé práce na tomto projektu, za jeho podporu po celou dobu vědeckého řešení studie, včetně jejího dokončování.

Současnému přednostovi prof. MUDr. Aloisi Martanovi, DrSc. děkuji, že mi umožnil v projektu pokračovat a dokončit ho.

V neposlední řadě uvádím s vděčností svoji rodinu, která všemožně podporovala moji angažovanost v mimopracovní době a umožnila mi této práci se věnovat.

Práce byla podpořena granty IGA-MZ-NH/7659-3 MZČR, VZ 002120808 MŠMT a grantem Ligy proti rakovině Praha.

OBSAH

1. ÚVOD
5
2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY
6
2. 1 Genetické alterace – perspektivní molekulárně biologický prognostický faktor
6
2. 2 Genetické aspekty onkogeneze
6
2. 2. 1 Protoonkogeny
8
2. 2. 2 Tumor-supresorové geny
9
2. 2. 3 Mutátorové geny
9
2. 2. 4 Další mechanizmy onkogeneze
10
2. 3 Prognostické faktory
11
2. 3. 1 Prognostické faktory týkající se nádoru
11
2. 3. 2 Prognostické faktory týkající se hostitele
12
2. 3. 3 Prognostické faktory týkající se prostředí
12
2. 4 Vypovídací hodnota prognostických faktorů
12
2. 5 Zhoubné nádory ovaria
13
2. 5. 1 Hereditární nádory
14
2. 5. 2 Genetické vyšetření u hereditárních nádorů
16

2. 5. 3 Sporadické karcinomy
17
2. 5. 4„ Low-grade“ a „high-grade“ ovariální karcinomy
20
2. 6 Prognóza ovariálního karcinomu
21
2. 6. 1 Prognóza celkového přežití
22
2. 6. 2 Prognóza léčebné odpovědi
26
2. 6. 3 Prognóza odpovědi na sekundární léčbu u recidivujících karcinomů
26
2. 7 Další zkoumané parametry s možným prognostickým významem
27
2. 8 Studium genetických alterací a jejich význam
31
3. CÍLE PRÁCE
34
4. MATERIÁL A METODIKA
35
4. 1 Soubor pacientek
35
4. 2 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření
35
4. 3 Genetické vyšetření
35
4. 3. 1 Konvenční karyotypizace
36
4. 3. 2 Fluorescenční in situ hybridizace
37
4. 3. 3 Komparativní genomová hybridizace
37
4. 4 Statistické zpracování
38

5. VÝSLEDKY
40
5. 1 Skupina ovariálních karcinomů
40
5. 1. 1 Genetické nálezy
40
5. 1. 2 Korelace mezi klinickými, histopatologickými a molekulárními parametry
41
5. 1. 3 Chromozomální přestavby a jejich vztah k hodnoceným parametrům
42
5. 2 Nálezy ve skupině cervikálních karcinomů
43
5. 3 Srovnání nálezů ve skupinách ovariálních a cervikálních karcinomů
44
6. DISKUZE
45
6. 1 Nádorová cytogenetika
45
6. 1. 1 Metody molekulární cytogenetiky
46
6. 1. 2 Laserová mikrodisekce
47
6. 1. 3 Využití jednotlivých postupů
48
6. 2. Cytogenetické nálezy u ovariálního karcinomu
49
6. 3. Nálezy u karcinomu děložního hrdla
51
6. 4 Porovnání publikovaných nálezů s výsledky získanými ve vlastní studii
52
7. ZÁVĚR
55
8. SOUHRN
57

9. SUMMARY
58
10. SEZNAM POUŽÍTÝCH ZKRATEK
59
11. LITERATURA
61
12. VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU
82
13. PŘÍLOHY – TABULKY
83
14. PŘÍLOHY – OBRÁZKY
112

1. ÚVOD

Molekulárně biologický výzkum maligních onemocnění v posledních letech přináší do klinické onkologie stoupající počet poznatků o biologické podstatě nádorů. Důkladné poznání nádoru samotného by mělo vést k individualizovanému přístupu u konkrétních nemocných a formulovat zásady prediktivní onkologie. V současné době u většiny nádorů nemáme léčebnou alternativu pro skupinu prognosticky příznivější a nepříznivou.

Chromozomální instabilita je jednou z vlastností nádorových buněk a odpovídá změnám chromozómových oblastí, ve kterých jsou lokalizovány geny podílející se na nádorové transformaci. Progresivní kumulace genetických a epigenetických změn je základem pro vznik nádorového onemocnění. Jednotlivé nádory mají odlišné genetické profily.

V předložené práci jsou prezentovány výsledky projektu zaměřeného na výzkum genetických změn u sporadických karcinomů ovaria a také děložního hrdla, pomocí cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod. Tyto nálezy jsou vyhodnoceny v korelaci s ostatními vyšetřovanými parametry klinické, histopatologické i molekulární povahy.

2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Genetické aspekty sporadických karcinomů ovaria

2. 1 Genetické alterace – perspektivní molekulárně biologický prognostický faktor

Maligní nádory představují heterogenní skupinu onemocnění charakterizovanou růstem, invazí a metastázováním. Péče o pacienty s onkologickým onemocněním je soustředěna do tří hlavních oblastí – diagnostické, léčebné a preventivní. V posledních letech obohacuje klinickou onkologii nový prvek, který se zaměřuje na pacientovu prognózu. Studium faktorů, které poskytují prospektivní informaci o biologické povaze nemoci a informaci o pravděpodobnosti odpovědi nádoru na zvolený způsob léčby, se pozvolna přesunuje z oblasti výzkumu do klinické praxe. Molekulárně biologické parametry a markery jednotlivých nádorových onemocnění, včetně genetických alterací, představují přínos a perspektivní směr v oblasti detekce, skríningu, predikce, prognózy a také monitorování aktivity nádorového onemocnění.

Rozhodování o managementu jednotlivých případů nádorového onemocnění předpokládá znalost celé řady podstatných a nezbytných informací týkajících se příslušného nádoru. Celkový výsledek léčby kromě toho závisí ještě na řadě rozmanitých proměnných ukazatelů, které nazýváme prognostické faktory [1, 2, 3]. Implementace prognostických a prediktivních faktorů do klinické praxe tak představuje další krok směrem k individualizaci a zkvalitnění péče o nemocné s maligními novotvary.

Znalost prognostických faktorů pomáhá porozumět progresi a vývoji onemocnění. V praxi není vždy možné detailně studovat průběh onemocnění, protože k léčbě přistupujeme s výhradním cílem toto onemocnění ovlivnit a zvrátit. Cílem léčby tak může být vyléčení, odstranění či zmírnění příznaků choroby nebo prodloužení doby celkového přežití. Znalost některých údajů týkajících se širšího kontextu nádoru, pacienta a prostředí umožňuje předvídat pravděpodobný vývoj onemocnění u konkrétního nemocného a tím i rozhodovat o optimálním přístupu k této nemoci [4, 5].

2. 2 Genetické aspekty onkogeneze

Mohutný rozvoj molekulární biologie a genetiky v posledních dvou desetiletích umožnil díky novým poznatkům objasnit celou řadu mechanizmů podílejících se na

vzniku procesu nádorové transformace a regulačních pochodů spojených s abnormálním růstem a proliferací buněk. Tyto objevy umožňují přesunout pozornost od epidemiologických dat a klinických pozorování k důkladnějšímu a hlubšímu poznání nádoru samotného a jeho biologických parametrů. Toto by v konečném důsledku mělo vést ke zvýšení efektivity onkologické léčby. Je pravděpodobné, že i dosavadní léčebný arzenál aplikovaný cíleně podle biologických charakteristik má stále značný potenciál zlepšit léčebné výsledky [5].

Samotný proces vzniku a vývoje nádoru je ve všech případech multifaktoriální a vícestupňový proces, který zahrnuje iniciaci, promoci, klonální expanzi a progresi. Zatímco iniciace a promoce jsou ve vztahu k buňce ovlivněny zevními faktory, progrese je vesměs důsledkem endogenních změn v expandujícím klonu. Vlastní příčinou maligní transformace buňky jsou změny na molekulární úrovni, tj. mutace v určitých genech buňky.

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 [6, 7, 8, 9, 10].

Zásadní význam při vzniku nádorového onemocnění mají následující skupiny genů - protoonkogeny a tumor-supresorové geny, které ovlivňují regulaci buněčného dělení a proliferaci, mutátorové geny, které kontrolují stabilitu genomu, a také geny ovládající programovanou buněčnou smrt (geny apoptotické kaskády) [11].

Genetické změny v mutovaných buňkách ve smyslu inaktivace tumor-supresorových genů a aktivace protoonkogenů vedou k alteraci kontroly růstu, defektům konečné diferenciace, zesílení metastatického potenciálu a rezistenci na cytotoxické látky. Akumulace genetických alterací je charakteristická pro progresi a vývoj od normální buňky k buňce nádorové.

Mezi základní mechanizmy ovlivňující progresi intraepiteliální neoplazie patří stupeň buněčných mutací (vliv karcinogenů ze zevního prostředí) a stupeň buněčné proliferace. Ta je ovlivňována faktory jako jsou hormony, mediátory zánětlivé odpovědi a chemické látky podporující reaktivní hyperproliferaci.

2. 2. 1 Protoonkogeny

Protoonkogeny jsou strukturní buněčné geny, které se podílejí svými translačními produkty v podstatné míře na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci. Změny, např. mutace, které proběhnou v protoonkogenu, se projeví ztrátou funkce, kterou protoonkogen plní v regulaci buněčného dělení. Dělení buněk je pak neregulované a nekontrolovaný růst vede k rozvoji maligního procesu. Přeměna protoonkogenu (genu normální netransformované buňky) v onkogeny (gen nádorové buňky) se označuje jako aktivace protoonkogenu.

Onkogenní aktivace může být způsobena kvantitativními nebo kvalitativními změnami exprese protoonkogenů a probíhá několika mechanizmy:

1. bodovou mutací, tj. změnou smyslu kodonu navozenou nukleotidovou substitucí,
2. amplifikací, tj. zvýšením množství příslušného protoonkogenu a tím zesílením jeho exprese; cytogenetické a molekulárně biologické studie prokázaly, že většina známých nebo potenciálních onkogenů se vyskytuje ve více kopiích na mnoha místech genomu většiny solidních nádorů,
3. chromozomální přestavbou, např. translokací (přemístění a spojení různých částí chromozómů), což má za následek abnormální transkripční regulaci postižených genů nebo vznik zkrácených či fúzovaných genů s abnormální funkcí,
4. ovlivněním virovým promotorem, důsledkem inzerce retrovirů do buněčného genomu je aberantní exprese protoonkogenů nebo tvorba hybridních genů, které jsou zodpovědné za tvorbu proteinu se změněnou funkcí.

Rozlišujeme protoonkogeny kódující růstové faktory, kódující receptory růstových faktorů, dále geny pro přenašeče signálu - kódující tyrozinkinázy lokalizované v plazmatické membráně, receptory spojené s aktivací G proteinů, jaderné transkripční faktory a geny pro cykliny a cyklin-dependentní kinázy.

Existují tedy dvě kategorie změn, které jsou zodpovědné za přeměnu protoonkogenů na onkogeny:

1. změny ve struktuře genu mající za následek syntézu abnormálního genového produktu (onkoproteinu), který má změněnou funkci,
2. změny ovlivňující regulaci genové exprese, které vedou ke zvýšené nebo nepřiměřené produkci strukturně nezměněné formy normálního proteinu

podporujícího růst.

Konverzí na onkogeny se mění aktivita těchto proteinů v tom směru, že narušují normální regulaci buněčného dělení a s tím související diferenciaci, což v konečném důsledku vede k neoplastické transformaci buňky [6, 8, 9, 11, 12, 13, 14].

2. 2. 2. Tumor-supresorové geny

Druhou zcela odlišnou skupinou genů účastnících se procesu karcinogeneze jsou geny, které svými proteiny, jež kódují, nevyvolávají v normálních buňkách proliferaci, ale naopak proliferaci buněk potlačují. Jejich ztráta (delece) se projeví neregulovanou proliferací, což také může vést k rozvoji maligní přeměny. Tyto geny byly nazvány tumor-supresorovými geny. Na rozdíl od onkogenů, které vznikají jako mutantní formy protoonkogenů v somatických buňkách, mutantní formy tumor-supresorových genů vznikají v zárodečných buňkách (vajíčko nebo spermie) a dědí se na potomstvo.

Dítě, které získalo mutantní formu tumor-supresorového genu, je celý život ohroženo možností onemocnět určitým typem zhoubného nádoru. Na rozdíl od protoonkogenů, mutace v tumor-supresorových genech mají recesivní charakter [6, 15].

Na základě statistické analýzy byla Knudsonem vypracována hypotéza dvou zásahů (two hit theory), původně odvozená na základě studií vývoje retinoblastomu. Tato teorie vysvětluje sporadický a hereditární výskyt nádorů [8, 16].

Při hereditárním výskytu postižená osoba zdědila jednu mutovanou alelu tumor-supresorového genu přítomnou ve všech buňkách (zárodečná mutace). Druhá alela příslušného genu je inaktivována až v buňce somatické. U vrozené mutace (heterozygotní nosič) je tak zapotřebí pouze jednoho zásahu k inaktivaci tumor-supresorového genu.

Sporadická forma nádorového onemocnění vzniká po dvou nezávislých somatických mutacích, ke kompletní inaktivaci genu je tedy zapotřebí dvou zásahů [8, 11, 17, 18].

2. 2. 3 Mutátorové geny

Mutátorové geny (geny DNA reparace) kontrolují stabilitu buněčného genomu. Odpovídají za reparaci poškození (opravy chyb) DNA. Mutace nebo inaktivace těchto genů vedou k hromadění a udržovaní mutací v buňce a k nestabilitě genomu. Zvýšená frekvence a kumulace mutací v buňce je jednou z příčin maligní transformace. Mutace v reparačních genech zvyšují 100x - 1000x frekvenci mutací v genomu. Jedním typem

reparačních mechanizmů jsou opravy chybného párování bází. Mutace genů pro opravu chybného párování bází (MMR - mismatch repair geny) se ve fenotypu projevují nestabilitou délky mikrosatelitových lokusů. Mutace mají recesivní charakter [8, 9, 14].

O důležitosti procesů DNA reparace v zachování genomové integrity svědčí i existence celé řady dědičných chorob, které mají defektní geny kódující proteiny podílející se na DNA reparaci. Jedinci, kteří se narodí s takovými mutacemi, mají mnohonásobně vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění. Příkladem takového onemocnění je dědičný nepolypózní karcinom tlustého střeva (HNPCC – hereditary nonpolyposis colon cancer syndrom). Toto onemocnění je charakterizováno vznikem rodinných karcinomů střeva, které postihují především cékum a vzestupný tračník, ale také endometrium, ovarium, žaludek a uropoetický trakt. Na rozdíl od karcinomů vznikajících u pacientů se zárodečnými mutacemi v APC genu (adenomatous polyposis coli), nádory u NHPCC nevznikají na bázi adenomatózních polypů [11].

2. 2. 4 Další mechanizmy onkogeneze

Za kritický bod buněčné kontroly, stejně jako mechanizmy proliferace a diferenciace, je považována i apoptóza. Selhání normálních apoptotických drah přispívá k procesu karcinogeneze tvorbou tolerantního prostředí pro genetickou nestabilitu a akumulaci bodových mutací a podporuje rezistenci k cytotoxickým látkám a radiaci. Nádorové buňky, které exprimují vysokou hladinu bcl-2 (rodina apoptózu regulujících proteinů), zůstávají životaschopné po delší období, což má za následek zvýšené přežívání některých klonů [11, 19].

Nádorové buňky exprimující ribonukleoproteinový enzym telomerázu mají další účinný mechanizmus jak působit proti replikačnímu stárnutí a následné smrti buňky – tento enzym umožňuje udržovat telomery (specifická zakončení eukaryontních chromozómů) v dostatečné délce, což těmto buňkám zaručuje immortalitu [10, 20].

Většina nádorových onemocnění má v populaci náhodný, sporadický výskyt. Maligní transformace je vyvolána pouze somatickými mutacemi. V nádorové tkáni mohou být mutovány jak protoonkogeny, tak tumor-supresorové geny nebo mutátorové geny. Jestliže mutovaný tumor-supresorový gen nebo mutátorový gen je přenesen pohlavní buňkou jednoho z rodičů a mutace druhé alely nastane v somatické buňce, pak mluvíme o familiárním (hereditárním) výskytu nádorového onemocnění. Je děděna predispozice k určitému typu nádorového onemocnění [6, 7, 8, 9, 14, 17].

Při vrozené dispozici k zvýšenému výskytu nádorů se uplatňují také geny, které nepřímo ovlivňují vznik nádorového onemocnění. Mohou ovlivnit metabolizmus chemických látek (mutagenů – např. genetická kontrola účinků enzymů pro metabolizmus polycyklických uhlovodíků cigaretového kouře) nebo reparaci DNA (autozomálně recesivně děděná chromozomální instabilita podmíněná vrozenými defekty reparace DNA).

Při manifestaci nádorového onemocnění s familiárním výskytem se dále uplatňuje fenomén zvaný genomický imprinting. Studie na molekulární úrovni ukázaly, že imprinting souvisí s metylací bází genů. Metylace neovlivňuje replikaci, ale gen je nefunkční. Genomický imprinting je výsledkem odlišného stupně metylace genu na maternálním a paternálním chromozómu. Tímto mechanizmem epigenetických změn je možné vysvětlit odchylky ve frekvenci výskytu některých geneticky podmíněných neoplazií nalézané v rodokmenech [9, 14].

Genomický imprinting, ovlivňující expresi genů, je spolu s protoonkogeny, tumor-supresorovými geny a mutátorovými geny považován za další genetický faktor podílející se na vzniku nádorových onemocnění.

2. 3. Prognostické faktory

Většina autorů, kteří se zabývají studiem prognostických faktorů u nádorů obecně, hodnotí především ty charakteristiky, které se vztahují k samotnému nádoru, tj. stadium onemocnění, histologický typ, grading, hloubku invaze, postižení lymfatických uzlin a nověji i molekulárně biologické parametry. Vývoj nádorového onemocnění na druhé straně ovlivňují také faktory bez přímého vztahu k nádoru. Prognostické faktory tak můžeme rozdělit do tří skupin:

1. faktory týkající se nádoru,
2. faktory týkající se hostitele, tj. pacienta,
3. faktory týkající se prostředí, ve kterém se pacient nachází.

2. 3. 1 Prognostické faktory týkající se nádoru

Prognostické faktory týkající se nádoru zahrnují ty parametry, které se vztahují k samotnému nádoru či k důsledkům jeho vlivu na organismus. K nim patří histopatologická klasifikace včetně nádorové diferenciace, rozsah anatomického postižení a z něj vyplývající stadium onemocnění, dále molekulárně biologické charakteristiky, jako jsou nádorové markery, hormonální receptory, biochemické

markery, exprese proliferačních markerů a celá řada novějších molekulárně biologických ukazatelů. Do této skupiny lze zařadit i příznaky vyplývající z přítomnosti nádoru v organismu – úbytek hmotnosti, bolest, anemizace.

2. 3. 2 Prognostické faktory týkající se hostitele

Mezi prognostické faktory týkající se hostitele – pacienta patří vrozené demografické charakteristiky - věk, pohlaví, etnická příslušnost, úroveň vzdělání a další znaky jako celkový stav (performance status), přidružené choroby a stav imunitního systému, který může být také získaný. Bezvýznamné nejsou ani takové charakteristiky jako je psychosociální reakce na nádorové onemocnění, postoj k alternativním léčebným metodám, abúzus drog, alkoholu, snášenlivost a postoj k léčbě. I když se tyto faktory bezprostředně k nádoru nevztahují, mohou významně ovlivnit průběh nádorového onemocnění.

2. 3. 3 Prognostické faktory týkající se prostředí

Prognostické faktory týkající se prostředí pacienta zahrnují zevní charakteristiky, které rovněž mohou mít zásadní vliv na průběh onemocnění. Mohou být individuální, tedy týkající se konkrétního pacienta, jako je socioekonomická úroveň, postoj k pacientům vyššího věku, výběr a kvalita léčebné metody, anebo platné pro širší skupinu nemocných, kam patří systém zdravotní péče, její dostupnost a organizační zajištění koncentrace pacientů do specializovaných center.

Některé prognostické faktory lze zároveň zařadit do více skupin - například celkový stav pacienta může být ovlivněn jak přidruženými nemocemi, tak i pokročilým nádorem samotným. Podobně modalita a kvalita léčby může být ovlivněna jak pacientem - s ohledem na kontraindikace vyplývající z jeho celkového zdravotního stavu, tak i prostředím, tj. dostupností a nabídkou zdravotní péče. Dalším příkladem je anemie, která může vyhovovat všem třem kategoriím – může se jednat o důsledek pokročilého nádoru, o chronické onemocnění pacienta před vznikem nádorového onemocnění, ale může být také důsledkem malnutrice typické pro určité prostředí či sociální skupinu.

2. 4 Vypovídací hodnota prognostických faktorů

Vyhodnocení dostupných prognostických faktorů umožňuje předpovědět pravděpodobný vývoj nádorového onemocnění v konkrétním čase. Jednotlivé faktory

přitom mají různou vypovídací hodnotu. Podle tohoto kriteria je lze rozdělit do těchto skupin:

1. prognostické faktory zásadního významu,
2. prognostické faktory doplňkového významu,
3. nové a slibné prognostické faktory.

Prognostické faktory zásadního významu jsou takové, které mají rozhodující vliv na zvolení léčebného postupu. Význam rozsahu anatomického postižení nádorem je znám více než 70 let a je začleněn do TNM a FIGO klasifikace. Dalšími významnými faktory jsou histopatologická charakteristika včetně gradingu, přítomnost vaskulární mikroinvaze, dynamika nádorových markerů. Věk pacienta u většiny nádorů již v současné době nehraje při rozhodování o léčebném postupu zásadní roli.

Prognostické faktory doplňkového významu rozhodnutí o způsobu léčby zásadním způsobem neovlivňují, mohou však mít vliv na konečný výsledek léčby. Patří sem např. markery proliferační aktivity jako je exprese Ki-67(MIB-1) antigenu a ploidie. Většina faktorů týkajících se pacienta - celkový stav, komorbidita - ovlivňují možnosti operability, aplikaci vhodné chemoterapie či radioterapie, čímž nepřímo také působí na konečný výsledek. Podobný efekt mají i faktory zevního prostředí, kam patří především dostupnost kvalitní péče ve specializovaných centrech.

Expanzivní rozvoj molekulární biologie a genetiky v posledních letech nabízí celou řadu nových a někdy velmi slibných parametrů (růstové faktory, receptory růstových faktorů, proteiny asociované s expresí genů významných pro buněčný cyklus, markery angiogeneze atd.), jejichž uplatnění v prognóze nádorových onemocnění zatím není součástí rutinní praxe, ale je provázeno velkým očekáváním do budoucna [2, 21].

2. 5 Zhoubné nádory ovaria

Zhoubné nádory ovaria patří mezi nejčastější příčiny úmrtí na gynekologické malignity a představují přibližně 30% všech nádorů ženské reprodukční soustavy. V úmrtnosti na všechny zhoubné nádory žen zaujímají 4. místo. Nepříznivým současným trendem je vzestup incidence. Ve více než 75% případů je toto onemocnění diagnostikováno v pokročilých stadiích (III a IV), staging je určován klasifikací TNM s odpovídajícími stadii podle FIGO. Základní léčebnou metodou je léčba chirurgická, jejímž cílem je odstranění maximálního objemu nádoru. Ovariální karcinomy patří mezi nádory chemosenzitivní, ovšem ne chemokurabilní. Chemoterapie je aplikována jako léčba adjuvantní, neoadjuvantní anebo paliativní. I přes vysoké procento léčebných

odpovědí na primární léčbu dochází u více než 80% případů k recidivám. Ročně je ve světě diagnostikováno přibližně 190 000 nových případů ovariálního karcinomu, 114 000 žen v souvislosti s tímto onemocněním ročně umírá.

Převážná část ovariálních zhoubných nádorů je původem z povrchového epitelu, patří mezi ně karcinom serózní, mucinózní, endometroidní, světlebuněčný, vzácný Brennerův tumor a nediferencované karcinomy. Neepitelové nádory včetně germinálních tumorů, nádorů ze zárodečných pruhů a metastatické nádory jsou méně časté, tvoří kolem 10% všech zhoubných nádorů ovarií.

Ovariální nádory se ve většině případů vyskytují u žen sporadicky, bez pozitivní rodinné anamnézy. Maligní transformace je zde vyvolána pouze somatickými mutacemi. V nádorové tkáni mohou být mutovány jak protoonkogeny, tak tumor-supresorové geny nebo mutátorové geny. Geneticky podmíněna je pouze malá část nádorů a tvoří asi 5-10%.

Celkové pětileté přežití žen se zhoubným nádorem ovaria (pro všechna stadia) představuje v Evropě 32%, u pokročilých stadií ovšem nepřekračuje 20% [10, 22].

2. 5. 1 Hereditární nádory.

Hereditární ovariální karcinom se vyskytuje jako součást jednoho ze tří autozomálně dominantních syndromů:

1. vlastní familiární ovariální karcinom,
2. familiární karcinom prsu a ovaria,
3. syndrom hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu a karcinomu ovaria (HNPCC)

Mutace tumor-supresorových genů BRCA1 a BRCA2 jsou zodpovědné přibližně za 90% hereditárních ovariálních karcinomů – asi v 70% BRCA1, v 20% BRCA2. Zbývající případy se týkají mutací ostatních tzv. mutátorových genů (hMSH2, hMLH1, PMS1, PMS2), zodpovědných za opravu poškozené DNA a jsou vzácné.

Přítomnost alterací predisponujících genů s vysokou penetrancí – BRCA1 a BRCA2 - souvisí také s více než 85% případů hereditárních karcinomů prsu. Zbývající malé procento hereditárních karcinomů prsu souvisí nejspíše se vzácnými genetickými predispozicemi, jako je Li Fraumeniho syndrom (mutace tumor-supresorového genu p53), Cowdenové nemoc (mutace PTEN genu), Peutz-Jeghersův syndrom (mutace LKB1 genu), Mui-Torreho syndrom (varianta HNPCC –

hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu, mutace genu MLH1), ataxia teleangiectasia (ATM gen) [8, 9, 10, 16, 17, 18, 23, 24, 25, 26].

Hereditární etiologie některých zhoubných nádorů u žen byla v minulém desetiletí potvrzena díky pokroku molekulárně genetického výzkumu. Jedním z nejvýznamnějších objevů byla identifikace tumor-supresorových genů BRCA1 a BRCA2 u HBOC syndromu (Hereditary Breast-Ovarian Cancer Syndrome) a hMLH1 a hMSH MMR genů u HNPCC syndromu (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer – Lynch II).

Základní principy, které odlišují hereditární karcinomový syndrom od zvýšeného rodinného výskytu karcinomů nejasné etiologie, jsou následující:

1. časný věk v době stanovení diagnózy karcinomu (obvykle o 15-20 let dříve než je výskyt stejného sporadického karcinomu),
2. bilaterální výskyt v případě karcinomů párových orgánů (prs, ovarium),
3. mnohočetné primární karcinomy u specifických hereditárních karcinomových syndromů,
4. autozomálně dominantní forma dědičnosti.

Pro hereditární výskyt nádorů je charakteristické postižení více členů rodiny stejným typem nádoru a dřívější nástup onemocnění ve srovnání se stejným typem nádoru vyskytujícím se nahodile. V těchto rodinách výskyt jednoho nádoru může upozornit na riziko vzniku dalšího nádoru [16, 17].

Gen BRCA1 byl lokalizován v roce 1990 a klonován v roce 1994. Nachází se na dlouhém raménku 17. chromozómu (17q21), kde zaujímá 81 kilobází (kbp). Obsahuje 24 exonů, 22 z nich je kódujících (5592 nukleotidů). Patří k tumor-supresorovým genům a je odpovědný za udržování genomové stability. Dispozice k nádorovému onemocnění se přenáší autozomálně dominantně.

Gen BRCA2 byl v roce 1994 lokalizován na dlouhém raménku 13. chromozómu (13q12-13), kde zaujímá prostor 70 kilobází. Skládá se z 27 exonů. Funkce jeho transkriptu není ještě zcela definována, jedná se však opět o tumor-supresorový gen a předpokládá se stejný mechanizmus účinku jako u genu BRCA1. Riziko vzniku karcinomu prsu u nositelky mutace je nižší než u genu BRCA1, u karcinomu ovaria výrazně nižší.

Dosud bylo odhaleno několik set mutací a sekvenčních variací genů BRCA1 a BRCA2 rozptýlených podél celé kódující sekvence a podařilo se identifikovat i inaktivující mutace postihující sekvence nekódující. V určitých populacích byla

prokázána vysoká četnost specifických (fixních) mutací. Příkladem je populace aškenázských Židů, kde jsou více než 2% jedinců postižena specifickými mutacemi odpovědnými za většinu dědičných karcinomů prsu a ovaria.

Na základě studií v rodinách s hereditárním karcinomem ovaria či prsu bylo zjištěno, že přítomnost mutace genu BRCA1 byla spojena s 28-44% kumulativním rizikem karcinomu ovaria do 70 let a s 87% kumulativním rizikem karcinomu prsu. Mutace genu BRCA2 byly spojeny s 27% rizikem ovariálního karcinomu do 80 let věku a s 84% rizikem karcinomu prsu. Detailní analýzou rodin s mutací genu BRCA2 byla nalezena též vyšší incidence jiných neoplazií – pankreatu, prostaty a kolorekta ve srovnání s výskytem v normální populaci.

Celoživotní riziko onemocnění karcinomem vaječníku, které se pohybuje pro nositelky mutací genů BRCA1 a BRCA2 kolem 20-40%, je přibližně 10-20x vyšší než riziko běžné populace.

Při nálezu mutovaného genu BRCA se obvykle předpokládá, že tato mutace hraje klíčovou roli při vzniku karcinomu a podceňuje se vliv ostatních faktorů (jiné genetické mutace, působení hormonů, výživa a vlivy ze zevního prostředí primárně asociované s karcinomy prsu a ovaria). V blízkosti oblasti BRCA1 genu byla lokalizována dvojice genů, jejichž aktivita řídí intenzitu lokální tvorby estrogenů v cílových tkáních. Dalšími geny účastnícími se buněčné proliferace jsou CYP17 a CYP19, jejichž mutace zpomaluje metabolizmus estrogenů.

Bylo prokázáno, že nositelky mutací genů BRCA1 a BRCA2 mají u karcinomu ovaria delší disease-free interval než kontrolní skupina se sporadickým karcinomem [8, 16, 17, 18, 23, 24, 26].

2. 5. 2 Genetické vyšetření u hereditárních nádorů

Ke genetickému vyšetření jsou indikovány ty skupiny osob, u nichž je možné očekávat vyšší pravděpodobnost nosičství mutace než u neselektované populace:

1. nemocné osoby bez pozitivní rodinné anamnézy - karcinom prsu nebo vaječníku diagnostikovaný u ženy do 35 let věku, karcinom prsu u muže vzniklý v kterémkoliv věku (po vyloučení jiné příčiny – např. Klinefelterův syndrom), nádorová duplicita karcinom prsu – vaječníku, bilaterální karcinom prsu, první nádor diagnostikován do 40 let věku,
2. nemocné osoby s pozitivní rodinnou anamnézou (dvě příbuzné prvního stupně s nádorem prsu nebo vaječníku, alespoň jedna diagnostikována ve

věku do 50 let, tři a více karcinomů prsu nebo vaječníku u příbuzných prvního i druhého stupně v jedné linii bez věkové limitace),

3. zdraví rodinní příslušníci pozitivně testovaných osob, muži i ženy, od 18 let věku.

Není dosud jednoznačně určena optimální strategie pro nositelky mutací BRCA genů. Jejími hlavní směry jsou:

1. intenzivní dispenzární péče, která zahrnuje klinické vyšetření, vyšetření zobrazovacími metodami, vyšetření tumorových markerů,
2. intenzivní sledování, chemoprevence, profylaktické chirurgické zákroky [10, 16, 17, 18, 23, 26].

2. 5. 3 Sporadické karcinomy.

Karcinogenezi sporadických ovariálních tumorů ovlivňují především geny dvou skupin: onkogeny a tumor-supresorové geny. Onkogeny jsou dominantní transformující geny, jejichž aktivace může být způsobena alterací v jedné alele. Aktivace onkogenů bývá způsobena různými mechanizmy, jako je bodová mutace, amplifikace, nadměrná exprese a translokace, ovlivnění virovým promotorem. Bylo popsáno více jak 60 onkogenů a několik z nich, jako K-ras, c-erbB-2(HER-2/neu), c-fms, c-myc a Akt-2 bylo studováno u ovariálního karcinomu. I když onkogeny mohou ovlivňovat ovariální karcinom, je málo informací o tom, jak a na jaké úrovni onkogeny participují v maligní transformaci ovariálního povrchového epitelu [6, 8, 9, 14].

Tumor-supresorové geny, na rozdíl od onkogenů, jsou geny recesivní. To znamená, že ke změně jejich funkce – kontrole buněčného dělení - je nutná inaktivace obou alel. Mechanizmem inaktivace je mutace, delece, hypermetylace promotoru. Exaktní role těchto genů v patogenezi sporadického ovariálního karcinomu není dosud jednoznačně vymezená a vyžaduje další výzkum.

Alterace tumor-supresorového genu p53 je jednou z nejčastějších genetických alterací popsaných u většiny karcinomů, včetně karcinomu ovaria. Zvýšená exprese mutovaného p53 genu je signifikantně vyšší v pokročilých stadiích (40-60%) ve srovnání s časnými stadii onemocnění (10-20%).

Tento gen se nachází na chromozómu 17p13.1 a je tvořen 11 exony. Kóduje protein, který je transkripčním faktorem regulujícím buněčný cyklus. Většina somatických mutací je obsažena v exonech 5-10, zatímco zárodečné mutace jsou častěji detekované v exonech 7 a 8.

U Li Fraumeniho syndromu, hereditárního nádorového syndromu souvisejícího s přítomností mutovaného genu p53, je kritickým místem exon 7. Na rozdíl od c-myc, K-ras či HER-2/neu, nadbytečnost p53 obvykle znamená ztrátu funkce tohoto proteinu. Někteří autoři předpokládají, že alterace genu p53 představuje časný krok v ovariální karcinogenezi. Většina studií se shoduje v tom, že zvýšená exprese p53 genu koreluje s kratší dobou celkového přežití. Dle výsledků některých studií se usuzuje, že ztráta funkce p53 souvisí s chemorezistencí na platinové deriváty, protože gen p53 hraje roli v cytostatiky indukované apoptóze [6]. Jiné studie toto tvrzení jednoznačně neprokázaly, připouští se, že gen p53 je jedním z mnoha faktorů ovlivňujících chemosenzitivitu [2, 8, 9, 15, 19, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36]. Skutečnost, že mutace v p53 genu jsou běžné u širokého spektra lidských nádorů, potvrzuje úlohu přirozeného proteinu p53 v procesech ochrany organismu proti tvorbě nádorů. Z celé řady získaných poznatků je zřejmé, že protein p53 působí jako „molekulární strážce“, který brání rozšíření geneticky poškozených buněk [11].

Mezi další tumor-supresorové geny zkoumané u ovariálního karcinomu patří RB1, WT1 a PTEN. Mutace PTEN genu (zárodečné mutace charakterizují syndrom Cowdenové - výskyt karcinomu prsu, papilárního karcinomu štítné žlázy, dysplastického cerebelárního gangliocytomu) byly nalezeny u 20% endometroidního ovariálního karcinomu.

Asi u 15% ovariálních karcinomů byla zjištěna homozygotní delece genu p16 (CDKN2A), který je inhibitorem cyklin-dependentních kináz.

Cytogenetické analýzy ovariálních karcinomů prokázaly přítomnost komplexních karyotypů se širokou škálou numerických a strukturních přestaveb jako jsou vysoce fragmentované chromozómy, telomerické fúze a komplexní přestavby. Ztráta chromozómu 6q je jednou z nejčastěji detekovaných změn, mezi další patří ztráty 3p, 11p, 17q a 17p1.3. Tyto změny ukazují na roli tumor-supresorových genů lokalizovaných v těchto úsecích chromozómů, které mají zřejmě významnou roli v patogeneze ovariálního karcinomu. Mezi tyto geny patří LOT 1 (transkripční faktor), OVCA 1, OVCA 2, CDKN2A, LKB1(STK11), Dab2/DOC2.

Další výzkum by měl vést k upřesnění jejich role v karcinogenezi ovariálního karcinomu [6, 8, 9, 13, 37].

Studium genetických změn u gynekologických malignit prokázalo, že, inaktivace tumor-supresorových genů je zjišťována častěji než aktivace onkogenů. Tato

skutečnost může souviset se snadnější identifikací tumor-supresorových genů v souvislosti s jejích podílem na hereditárních syndromech.

Mezi geny, které se účastní růstových regulačních pochodů a které byly popsány u ovariálních karcinomů, patří c-erbB3, c-erbB2 (HER-2/neu) (ovlivňují peptidové růstové faktory), K-ras, akt-2 (cytoplazmatické faktory), c-myc (nukleární faktory) [9, 38, 39, 40].

Nadměrná exprese HER-2/neu byla zjištěna asi u třetiny ovariálních karcinomů, některé studie ji dávají do souvislosti s horším výsledkem celkového přežití. Prognostický význam HER-2/neu amplifikace a/nebo nadměrné exprese proteinu zůstává kontroverzní. Bylo prokázáno, že transfekce HER-2/neu do normálních ovariálních buněk může indukovat maligní fenotyp in vitro. Monoklonální protilátky, které reagují s HER-2/neu, jsou schopny omezit růst nádorových linií těch karcinomů prsu a ovaria, které ve zvýšené míře exprimují tento receptor [9, 38, 41, 42, 43].

Mutace ras genů jsou vzácné u serózních epiteliálních karcinomů a vyskytují se asi u 50% mucinózních karcinomů, které ovšem tvoří menší část ovariálních karcinomů. Na druhou stranu mutace K-ras jsou přítomny u borderline ovariálních tumorů v 20-50%, což by mohlo podporovat teorii, že molekulární biologie borderline tumorů je odlišná od invazivních nádorů [8, 9].

Amplifikace či nadměrná exprese c-myc onkogenu byla prokázána u 26-37,3% ovariálních karcinomů. Nebyla prokázána korelace mezi nadměrnou expresí a celkovou dobou přežití. Amplifikace c-myc je běžným nálezem u pokročilých nádorových stadií, což může znamenat, že c-myc hraje zásadní roli v progresi onemocnění. Některé studie prokázaly výrazné zastoupení c-myc u serózních adenokarcinomů.

Jak c-myc alterace, tak podíl K-ras na odpovědi na chemoterapii nejsou jednoznačně dokumentovány [8, 9].

Více autorů věnovalo pozornost vztahům mezi výskytem aberací a klinickým vývojem onemocnění. Statisticky významnou se ukázala agregace chromozomálních přestaveb na devíti místech (1p1, 1q2, 1p3, 3p1, 6p2, 11p1, 11q1, 12q2 a 13p1), která korelovala s horším celkovým přežitím. Metodou regresní analýzy bylo dále zjištěno, že pouze přestavby v úsecích 1p1 a 3p1 jsou nezávislými faktory ve vztahu k celkovému přežití [44, 45].

Byla zjištěna asociace mezi ztrátou chromozómu 4 a dobře diferencovanými tumory a mezi nadbytkem genetického materiálu 3q26, 8q24, 20q13 a málo diferencovanými tumory [46].

LOH (loss of heterozygosity – ztráta heterozygozity) úseku 11q23.3 byla významně spojena s horším celkovým přežitím, zatímco LOH úseku 11q24-25 korelovala s vyšším stupněm klinického stadia, serózním histologickým typem, ale ne s celkovou dobou přežití [47].

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 [2, 24, 26, 32, 48, 49, 50, 51].

2. 5. 4 „Low grade" a „high grade" ovariální karcinomy

Výsledky molekulárních analýz ovariálních karcinomů v posledních letech, i přes některé stále nejednoznačné interpretace, vedly k novému pohledu na ovariální karcinonogenezi.

Následná integrace klinických, morfologických a molekulárních údajů tak vyústila v odlišnou klasifikaci ovariálních karcinomů vycházející z dualistického pojetí dvou různých nádorových podskupin. V současné době tak rozlišujeme dva základní typy ovariálních karcinomů: nádory typu I označované jako „low grade", které se vyznačují postupným sekvenčním vývojem z benigních a borderline tumorů, a nádory typu II „high grade", pro které je typický rychlý růst přímo z ovariálního epitelu, bez známého prekurzoru.

Pro nádory typu I je příznačná pomalejší progrese a vyšší pětileté přežití (55% vs. 33% u typu II). Prekurzory „low grade" serózního, mucinózního, endometroidního, clear cell karcinomu a maligního Brennerova tumoru jsou příslušné cystadenomy, adenofibromy, bordeline tumory a intraepiteliální karcinomy, u endometroidního a clear cell karcinomů je uváděna také jako prekurzor endometrióza. Z molekulárního hlediska je pro tyto nádory typický nález mutace onkogenů K-ras a b-raf zjišťován až u dvou třetin případů. U Brennerova maligního tumoru molekulární charakteristiky nejsou jednoznačné. U endometroidních „low grade" karcinomů jsou dále častým nálezem pozitivita β-kathetinu a vimentinu, navíc i mutace tumor-supresorového genu PTEN, ztráta heterozygozity či mikrosatelitární instabilita. Mikrosatelitární instabilita je často pozorována i u clear cell karcinomů.

U nádorů typu II, které jsou označovány jako „high grade", neznáme jednotlivá vývojová stadia. Předpokládá se, že vznikají přímo z povrchového ovariálního epitelu nebo kortikálních inkluzních cyst na základě mutací ovlivňujících mitotickou stabilitu buňky.

V současnosti není známa léze charakteru prekurzoru těchto nádorů. Uvažuje se, že by to mohla být ovariální intraepiteliální neoplazie, charakterizovaná výraznou atypií postihující povrchový epitel nebo epitel kortikálních inkluzních cyst. „High grade“ nádory jsou vysoce agresivní nádory, které i přes dobrou primární odpověď na chemoterapii ve většině případů vedou k časným recidivám a terapeutickým selháním.

Z morfologického hlediska do této skupiny patří „high grade“ serózní karcinomy, nediferencované karcinomy a maligní smíšený mezodermální nádor (karcinosarkom).

Typickým molekulárním markerem této skupiny nádorů je přítomnost mutace tumor-supresorového genu p53, která se u serózního „high grade“ karcinomu vyskytuje v 50-80%, u maligního smíšeného mezodermálního nádoru ve více než 90% případů. Dalšími typickými molekulárními nálezy pro „high grade“ ovariální karcinomy, kromě již zmíněné mutace p53, je zvýšená exprese Her/2-neu, MIB-1, bcl-2, c-kt, AKT1 a také inaktivace tumor-supresorového genu p16.

Tato klasifikace částečně připomíná rozdělení karcinomů děložního těla na typ I a II, které bylo nejdříve pozorováno klinicky a posléze potvrzeno i na molekulární úrovni.

Připouští se, že ani toto rozdělení není absolutní a je možné, že v ojedinělých případech se „low grade“ nádor může transformovat do „high grade“ nádoru, stejně jako „high grade“ nádor může vzácně vycházet z borderline tumoru [52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61].

Management ovariálních zhoubných nádorů je v současnosti zatím stejný pro obě skupiny. Příklad nádorů prsů, kde již molekulární genetický profil nádoru je v některých případech součástí rozhodovacího procesu při sestavování terapeutickéoho plánu, je příslibem do budoucna i pro pacientky s jinými zhoubnými nádory, včetně karcinomu ovaria.

2. 6 Prognóza ovariálního karcinomu

Z úvah o prognóze ovariálního karcinomu vyplývají tři zásadní okruhy:

1. prognóza celkového přežití,
2. prognóza léčebné odpovědi,
3. prognóza léčby druhé a další linie u recidivujícího nádoru.

2. 6. 1 Prognóza celkového přežití

Jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících celkové přežití pacientek s ovariálním karcinomem je stadium onemocnění. Staging ovariálního karcinomu je chirurgický, s cílem co největšího až úplného odstranění nádorových hmot (tumor debulking) a určení skutečného rozsahu postižení. Stadium je považováno za nezávislý prognostický faktor.

Zcela zásadním prognostickým faktorem je rozsah primárního chirurgického zákroku a velikost nádorového rezidua. Názory na jeho velikost se někdy liší, v současné době je pokládána za optimální nepřítomnost makroskopického rezidua. Rozhodujícím pro uplatnění tohoto požadavku je nejenom samotný nádor a jeho technická přístupnost, ale také celkový stav pacientky a možnosti a zkušenosti daného pracoviště, kde je zákrok prováděn. U pacientek s minimálním nádorovým reziduem po chirurgickém zákroku je prognóza přímo úměrná množství nádorových implantátů [1, 2, 62].

Věk, komorbidita a celkový stav rozhodují nejenom o rozsahu chirurgického zákroku, ale také o možnosti následně absolvovat adekvátně agresivní a toxickou adjuvantní léčbu.

Vzhledem ke komplexnosti onkologické léčby má pro všechny pacientky s ovariálním karcinomem prognostický význam skutečnost, že léčba probíhá ve specializovaném onkologickém centru.

Výsledky publikovaných metaanalýz jednoznačně prokazují, že pro prognózu je důležitá správně indikovaná adjuvantní chemoterapie obsahující platinový derivát.

U ovariálních karcinomů časných stadií hraje významnou roli histologický grading. Riziko úmrtí pacientek časných stadií se středně a špatně diferencovanými nádory je dvojnásobné ve srovnání s pacientkami s dobře diferencovanými nádory.

Prognostický význam gradingu u pokročilých stadií ovariálních karcinomů je menší než u časných stadií. Z řady studií vyplývá, že stupeň diferenciace má větší prognostickou významnost než histologický typ nádoru. Pacientky s dobře diferencovanými nádory mají výrazně delší medián přežití. Vzhledem k tomu, že početné studie ukázaly vysoký stupeň variability v hodnocení gradingu, nebyl dosud grading pevně zařazen jako nezávislý prognostický faktor [2, 63].

Histologický typ není považován za jednoznačný prognostický faktor. Prognóza pokročilých stadií serózních a endometroidních karcinomů je podobná.

Mírně horší prognóza je pozorována u mucinózních a světlebuněčných karcinomů, tato skutečnost však není považována za prognosticky důležitou. Obecně platí, že u časných stadií má typ nádoru výrazně menší prognostický význam [2, 63].

DNA ploidie je většinou autorů považována za nezávislý prognostický faktor. Pacientky s nádorovou aneuploidií mají horší prognózu než ty s diploidními tumory. Týká se to jak časných, tak i pokročilých stadií ovariálních karcinomů [63, 64, 65].

Prognostický význam postižení lymfatických uzlin u ovariálního karcinomu není jednoznačně potvrzen z důvodu omezených informací v souvislosti s převažujícím výskytem pokročilých stadií. U těchto pacientek se předpokládá nižší doba celkového přežití na rozdíl od pacientek, kde jsou lymfatické uzliny bez nádoru [2].

Hladiny CA 125 jsou zvýšeny u 75-90% případů ovariálního karcinomu. Obecně platí, že hladina CA 125 signalizuje velikost tumoru. Předoperační hladiny CA 125 mohou být považovány za nezávislý prognostický faktor u časných stadií tohoto onemocnění a v multivariační analýze mají největší výpovědní hodnotu. Toto však neplatí u předoperačních hladin pokročilého onemocnění, které s přežitím pacientek dobře nekorelují. Zde je považován za důležitý prediktivní faktor výsledku léčby pokles, eventuálně rychlost poklesu od výchozí hladiny. Pokles CA 125 na polovinu za dobu kratší než 20 dní je pokládán za signifikantní marker lepšího celkového přežití a nádorové regrese (odpověď na chemoterapii) [63, 66, 67].

I přes kompletní klinickou remisi a negativní hodnoty CA 125, ve studiích využívajících second look chirurgických revizí bylo prokázáno, že až u 30-40% pacientek je přítomná subklinická perzistence nádorové nemoci. Recidivy u těchto pacientek jsou nepředvídatelné, jenom polovina z nich přežívá pět let. Management pacientek s patologickou kompletní remisí a jejich identifikace je předmětem probíhajících studií [2].

Ultraradikální chirurgický zásah (včetně splenektomie) je přínosem pouze u pacientek s nepřítomností nádorového rezidua. Názor na lymfadenektomii není jednoznačný, nepopíratelný je její diagnostický přínos v případě pozitivních lymfatických uzlin a upřesnění stadia nemoci s následně adekvátně indikovanou adjuvantní léčbou.

Celkové přežití žen stadia IIIC bylo signifikantně vyšší ve skupině pouze s postižením lymfatických uzlin než těch, kde bylo přítomno šíření nádoru v dutině břišní [2].

Chemoterapie v kombinaci platinový derivát + taxan se ukázala jako výhodná pro pacientky jak ve skupině optimálně, tak i suboptimálně operovaných, celkové přežití je vyšší než u pacientek léčených kombinací platiny a cyklofosfamidu [1].

Přibližně 5 - 10% pacientek s ovariálním karcinomem má hereditární podklad. Za většinu případů hereditárního karcinomu jsou zodpovědné mutace tumor-supresorových genů BRCA1 a BRCA2. Některé studie prokázaly u těchto pacientek delší dobu celkového přežití, jiné studie toto nepotvrdily [2, 22, 63].

Zkoumání markerů proliferační aktivity v nádorových buňkách - MIB-1 (Ki-67), AgNOR (silver-stain nucleolar organizer region associated protein) nepřineslo jednoznačné závěry s možností implementace do klinické praxe. Není zcela jasné, zda AgNOR odráží proliferační aktivitu nebo spíše nádorovou ploidii. Byly prokázány vysoké hodnoty AgNOR v pokročilých stadiích nediferencovaných karcinomů, u pacientek s parciální odpovědí na chemoterapii, recidivujícím onemocněním a krátkou dobou celkového přežití. Přesto jeho role jako nezávislého prognostického faktoru zůstává sporná [68, 69].

Zvýšená proliferační aktivita zjišťovaná pomocí monoklonální protilátky MIB-1 významně koreluje se stupněm nádorové diferenciace, nebyla však prokázána významnější korelace se stadiem nemoci ani s histotypem [70].

Zvýšené hodnoty CSF-1 (colony stimulating factor), nalezené v séru a ascitu pacientek s ovariálním karcinomem, byly spojeny s horší prognózou. Další cytokiny, růstové faktory, antiapoptotické geny - bcl-2, HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 (ze skupiny heat-shock protein) jsou korelovány s dobou celkového přežití, výsledky nejsou jednoznačné [2].

Mutace p53 a nadměrná exprese produktů mutovaného genu p53 byla zjištěna daleko častěji v nádorech pokročilých stadií (40%-60%) než v nádorech časných stadií (15%). Některé studie předpokládají, že nadměrná exprese mutovaného genu p53 je spojena se snížením celkového 5letého přežití u pacientek stadia III-IV, a to o 10-20% [2, 63].

Exprese mutovaného tumor-supresorového genu p53 spolu s EGF (epidermal growth factor) byly ve více pracích vyhodnoceny jako nezávislé prognostické faktory významně korelující s nádorovou diferenciací a DFS (disease-free survival). Asociace s nadměrnou expresí K-ras měla vliv na prognózu endometroidního karcinomu, ne však světlebuněčného karcinomu [71, 72, 73].

Exprese p21 je pokládána za prognostický faktor horšího průběhu nemoci, a to i v případech se sníženou expresí p53 [63].

Častým nálezem je ztráta heterozygozity (LOH) RB genu, potvrzení nepříznivého efektu na celkovou dobu přežití u nižších stadií vyžaduje další studie.

Studována je celá řada dalších genů: onkogenů (c-erbB2, ras, myc), tumor-supresorových genů, genů apoptotické kaskády (bcl-2, bax), adhezních molekul (integriny, kadheriny), proteáz (uPA), metastatických supresorů (nm23), ale potvrzení jejich významu jako nezávislého prognostického faktoru vyžaduje další studie [6, 15, 28, 74].

Nádorové buňky ovariálního karcinomu exprimují řadu růstových faktorů a jejich receptorů, jejichž zvýšená exprese koreluje s horší celkovou prognózou. Nejvíce prací je věnováno EGF (epidermal growth factor). Receptor EGF c-erb2/HER-2-neu vykazuje nadměrnou expresi u 20-30% ovariálních tumorů, kde bývá důsledkem genové amplifikace a je spojován s horší prognózou. Nadměrná exprese c-erbB-3 receptoru je spojována s borderline tumory a časnou nádorovou invazí a také s lepší diferenciací tumorů. Horší prognóza je spojována s nadměrnou expresí c-erbB-4 receptoru.

Důležitým regulátorem normálního ovariálního epitelu je TGF-β (transforming growth factor-β), jehož autokrinní růstová inhibice může chybět u ovariálních buněčných linií. Nadměrná exprese izoformy TGF-β3 je spojována s pokročilým stadiem a zkráceným celkovým přežitím, což by mohlo znamenat, že vliv tohoto faktoru na angiogenezi a nádorovou progresi je významnější než inhibiční vliv na buněčný růst.

Do rodiny TGF-β patří i inhibin a MIS (Müllerian inhibiting substance). Inhibin je produkován granulózovými ovariálními buňkami s cílem inhibice sekrece FSH. Je vhodným markerem u nádoru z buněk granulózy. Ve studii na epiteliálních karcinomech bylo prokázáno, že u žen se zvýšenými hodnotami inhibinu bylo celkové přežití až pětkrát vyšší ve srovnání se skupinou žen neprodukujících inhibin.

Větší nádorová agresivita a horší celkové přežití je spojováno také s nadměrnou expresí IGFBP-1 a IGFBP-2 (insulin-like growth factor binding protein), PDGF-A PDGF-B (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor).

Potenciálními angiogenními faktory jsou PDEGF (platelet-derived endothelial growth factor) a VEGF (vascular endothelial growth factor). Zvýšená exprese VEGF je spojována s horší celkovou prognózou jak u pokročilých, tak i časných stadií

ovariálního karcinomu a s větším výskytem metastáz mimo pánev. Frakce VEGF-D je pokládána za nezávislý prognostický faktor [11, 75, 76, 77, 78].

Prognostický význam lymfatické infiltrace nádorové tkáně, dendritických buněk makrofágů, T-lymfocytů a NK buněk je studován [2].

IDS operace (interval debulking surgery) se zdá být nezávislým prognostickým faktorem, tzv. vázaným k prostředí, který vede k redukcím rizika úmrtí o třetinu. Intraperitoneální aplikace platinových derivátů u nemocných s peritoneální nádorovou diseminací má velmi dobré výsledky, vliv na celkovou dobu přežití se ale zdá nevýznamný [1, 2].

2. 6. 2 Prognóza léčebné odpovědi

Byla srovnávána odpověď ve skupině pacientek s nádorovým reziduem, stadia IIIC a IV a skupině pacientek optimálně operovaných, stadia IIIA, IIIB. Bylo prokázáno, že stadium, z hlediska celkového přežití, je významnější prognostický ukazatel než odpověď na chemoterapii [1, 2].

Věk a celkový stav ovlivňovaly výběr a trvání chemoterapeutických režimů. Řada genů a/nebo proteinů je zkoumána s cílem předpovědět citlivost či rezistenci na cytostatika. Mezi nimi jsou (ve skupině CRPs - chemoresistance-related proteins) mutovaný p53, GSTpí (GST-pi, glutathion S-transferase pi), LPR (lung related protein), P-gp (P-glycoprotein), MDR1 (multidrug resistance), bcl2/bax. Výsledky výzkumu zatím nemají bezprostřední dopad pro klinickou praxi [2, 79].

2. 6. 3 Prognóza odpovědi na sekundární léčbu (salvage therapy) u recidivujících karcinomů.

Účinnost chemoterapie druhé linie vychází z iniciálních charakteristik pacientky s nádorovým onemocněním. Rozhodující je především odpověď na primární léčbu. Z tohoto hlediska rozlišujeme pacientky

1. bez odpovědi na primární léčbu,
2. s částečnou odpovědí,
3. s kompletní odpovědí a recidivou v různém intervalu od ukončené primární léčby

Účinnost chemoterapie druhé linie je předpokládána pouze ve skupině s kompletní odpovědí, v závislosti na délce intervalu, který uplynul od ukončení

chemoterapie. Jako příznivý nezávislý prognostický faktor se ukazuje serózní histotyp, počet nádorových ložisek méně než 2, největší rozměr nádorové léze menší než 5 cm.

Ze zkoumaných molekulárních markerů byla nalezena korelace mezi expresí Ki-67 a odpovědí na chemoterapii druhé linie [2].

2. 7 Další zkoumané parametry s možným prognostickým významem

Existuje celá řada dalších zkoumaných parametrů, u kterých, podle dosavadních výsledků, je očekáván v budoucnu přínos při vyhodnocování prognózy nádorového onemocnění.

Hogdall et al. prokázali ve studii se 160 ženami s ovariálním karcinomem, že ztráta heterozygozity X chromozómu (mikrosatelitní oblast DXS454, Xq21-q23) významně koreluje se snížením doby celkového přežití. Jako nezávislé prognostické faktory byly v této studii vyhodnoceny radikální chirurgický zákrok a hladiny tetranektinu v séru [80].

Je obecně přijato, že progresi onemocnění ovlivňuje dynamika angiogeneze. Hata et al. prokázali, že genová exprese angiopoetinu-1 (Ang-1) a angiopoetinu-2 (Ang-2) mohou představovat vhodný diagnostický nástroj k identifikaci pacientek high-risk skupiny [81].

Skupinou Fujimoto et al. byl u pacientek s ovariálním karcinomem zkoumán gen ETS-1 - protoonkogen a transkripční faktor nádorové angiogeneze, který hraje podstatnou roli v růstu, invazi a metastázování solidních nádorů. Byla zjištěna signifikantně významná korelace mezi zvýšenými hodnotami ETS-1 mRNA a sníženou dobou celkového přežití. Je zde předpokládána funkce angiogenního mediátoru a aktivace invaze ovariálního karcinomu produktem onkogenu [82].

Vhodným markerem k určení nádorové neovaskularizace je endoteliální marker CD 34, který v kombinaci se zvýšenou expresí COX-2 (cyclooxygenase-2) rovněž koreloval se sníženou dobou celkového přežití pacientek s pokročilým ovariálním karcinomem.

Nadměrná exprese COX-2 je spojována se zvýšenou proliferací, angiogenezí a redukcí apoptózy. Nadměrná exprese COX-2 signifikantně koreluje s horším přežitím pacientek se špatně diferencovanými pokročilými stadií ovariálního karcinomu a nízkou odpovědí na standardní léčbu [83, 84, 85].

Potenciálním sérovým markerem pro časnou detekci a monitorování choroby se zdá být osteopontin (produkt regulačních genů), který je detekovatelný v séru pomocí DNA microarray a PCR. Jeho význam je předmětem dalších studií [86].

Y-box protein patří do rodiny „cold shock proteins“, které se podílejí na transkripčních a translačních kontrolních pochodech při buněčné proliferaci. Zvýšená exprese tohoto proteinu reflektuje progresi onemocnění. Zdá se, že největší význam má pro stanovení chemorezistence a následně tedy pro výběr adjuvantní chemoterapie, protože YB-1 protein se podílí na pleiotropní rezistenci na cytostatika působící na úrovni DNA. Výhledově tedy představuje cílovou molekulu pro rozvoj nového přístupu k překonání mnohočetné lékové rezistence u protinádorové chemoterapie [87].

PLK (polo-like kinase) představuje tři serin/treonin isoenzymy (PLK1, 2, 3), které participují v signální transdukci. Zvýšená exprese PLK1 a PLK3 v buňkách ovariálních karcinomů je indikátorem zvýšené mitotické aktivity a má dopad na prognózu pacientky. Její inhibice by mohla vést k novému cílenému přístupu v chemoterapii [88].

Skupinou Losch et al. byla prokázána, jako nezávislý prognostický faktor pro délku DFS (disease free survival), stromální exprese katepsinu D. Nebyla prokázána korelace mezi expresí katepsinu D a délkou celkového přežití [89].

Holzmayer et al. prokázali, že exprese genu (i velmi nízká) MDR1 mRNA (multidrug resistance P-glycoprotein) inverzně koreluje s odpovědí na léčbu taxany a přežitím pacientek s ovariálním karcinomem [90].

Simojiki et al. prokázali prognostický význam metabolitů kolagenu I a kolagenu III, které jako součást extracelulární matrix jsou zodpovědné za strukturální integritu tkání. Pro maligní proliferaci je typická zvýšená exprese těchto metabolitů (PINP, PIIINP) stejně jako markeru degradace PINP - karboxyterminaltelopeptidu (ICTP) v okolí maligních lézí. Koncentrace ICTP v séru, jak předoperačně, tak i v průběhu follow-up v případech klinické remise, významně korelovala s průběhem a prognózou nemoci a je tak velmi perspektivním markerem do budoucna [91, 92].

Degradace extracelulární matrix vyžaduje aktivaci proteináz. Hlavní proteinázy produkované buňkami ovariálního karcinomu jsou aktivátory plazminogenu a MMPs (matrix metaloproteináz). Jejich zvýšená exprese je rovněž v korelaci s horší prognózou.

Novým markerem, dle studie provedené skupinou Davidson et al., se zdá být EMMPRIN (extracellularmatrix metalloproteinase inducer), který reflektuje špatnou prognózu u serózních adenokarcinomů. EMMPRIN spolu s expresí PEA3 mRNA

proteinem (transkripční faktor) a FGF (fibroblast growth factor) zaujímá významné místo v procesu nádorové progrese [93, 94].

Skupinou Franke et al. byl prokázán prognostický význam fibronektinu, který se podílí na neovaskularizaci a metastazování, brání apoptóze a má imunosupresivní účinky. Exprese fibronektinu výrazně korelovala s nádorovým stadiem a růstovou frakcí nádorových buněk. Stupeň exprese koreloval s dobou celkového přežití i po vyloučení ostatních prognostických faktorů. Tato zjištění by mohla vést k uplatnění nových léčebných přípravků s mechanizmem antagonistů fibronektinu [95].

Intratumorální steroidogeneze je pokládána za důležitý biologický faktor ve vývoji ovariálních karcinomů. Abd-Elaziz et al. studovali stav nukleárních transkripčních receptorů účastnících se regulace steroidogeneze DAX-1 a Ad4BP/SF-l v korelaci se steroidními receptory a enzymy. Imunoreaktivita DAX-1 je považována za nový nezávislý prognostický faktor špatné prognózy u pacientek s ovariálním karcinomem [96, 97]. Chování tumorů s nižším počtem receptorů je agresivnější než v případech s vysokou receptorovou aktivitou. Rovněž je prokázána lepší odpověď na chemoterapii u tumorů s obsahem steroidních receptorů než u tumorů receptor negativních [63].

Kyriakopoulou et al. prokázali ve studii se 125 ovariálními karcinomy, že zvýšená exprese KLK 7 (human kallikrein gen) souvisí s horší prognózou pacientek s ovariálním karcinomem, a to především v případech s nižším gradingem a optimální debulking operací [98]. Na druhé straně, Scorilas et al. prokázali pozitivní význam exprese KLK 13 proteinu, kdy pacientky s hK 13 pozitivními tumory jsou častější v nižších stadiích a mají signifikantně vyšší PFS (progression free survival) a OS (overall survival) než pacientky s hK 13 negativními tumory [99].

Eder et al. studovali expresi atypické PKCiota (protein kinase Ciota) u pokročilých ovariálních karcinomů a zjistili, že spolu se zvýšenými hodnotami cyklinu E nadměrná exprese tohoto proteinu koreluje se sníženou dobou celkového přežití [100].

Farley et al. prokázali, že nezávislým prognostickým faktorem je nadměrná exprese regulačního proteinu cyklinu E způsobená amplifikací E genu, která je spojena s horší prognózou [101]. Podobné výsledky ve studii s cyklinem D publikovali také Barbieri et al. [102].

Růstový faktor YKL-40 (human cartilage glycoprotein-39, chitinase 3-like proteine 1) je produkován nádorovými buňkami ovariálního karcinomu a jeho zvýšené

plasmatic hodnoty významně korelují s kratší dobou celkového přežití. Tento faktor, spolu s radikálním chirurgickým zákrokem, byl ve studii skupiny Hogdall et al. vyhodnocen jako nezávislý prognostický faktor, zatímco věk, histologický typ a sérové hladiny CA 125 neměly nezávislou vypovídací prognostickou hodnotu [103].

Vysoké hladiny plazmatického bikuninu (multifunkční glykoprotein, který ovlivňuje supresi nádorové invaze a metastázování) jsou spojeny se signifikantně vyšší dobou celkového přežití a jeho předoperační hladiny tak mohou být významným nezávislým prognostickým faktorem. Nízká bikunin mRNA exprese ovariálními buňkami může tak identifikovat skupinu pacientek s vysokým rizikem recidiv a špatné prognózy [104, 105, 106].

Shigemasa et al. studovali expresi proteinu Skp2 a zjistili, že nadměrná exprese v buňkách ovariálních karcinomů pozitivně, jako nezávislý prognostický faktor, koreluje s kratší dobou celkového přežití. Věk a histologický typ neměly prognosticky vypovídací hodnotu [107].

Denkert et al. studovali expresi MKP-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-1) a zjistili, že zvýšená exprese je prognostickým znakem kratší doby PFS (progression free survival), nebyl však prokázán vliv na dobu celkového přežití. Význam tohoto markeru pro hodnocení odpovědi na chemoterapii je studován [108].

Jazaeri et al. porovnávali profil genové exprese u 21 primárně chemosenzitivních a 24 primárně chemorezistentních nádorů. Zjistili statisticky významné rozdíly v obou skupinách, což vede k předpokladu, že profil genové exprese může odlišit nádory chemosenzitivní od chemorezistentních, včetně těch se sekundární chemorezistencí. Tyto výsledky představují východisko jak pro další výzkum v této oblasti, tak i pro potenciální terapeutické intervence [109].

Význam regulačního proteinu ze skupiny serpinů - maspinu - byl studován u 80 ovariálních invazivních karcinomů. Zvýšená exprese maspinu koreluje s vysokou diferenciací ovariálních nádorů, vyšším stadiem, přítomností ascitu, suboptimálním debulking zákrokem a kratší dobou celkového přežití. Jeho role v prognóze není jednoznačně stanovena [110].

Kaiser et al. zjistili u 80 pacientek s ovariálním karcinomem přítomnost receptorů retinoidů. Jejich zvýšená exprese korelovala s vyšším stadiem, věkem a akumulací p53. Nekorelovala s klinickými vlastnostmi nádoru. Tato studie tak poskytuje molekulární základ pro terapeutické využití retinoidů u ovariálního karcinomu [111].

2. 8 Studium genetických alterací a jejich význam

V literatuře je popsáno více než 200 genů, jejichž variabilní alterace jsou přítomny v různých typech lidských karcinomů. Problematika cytogenetických a molekulárně-cytogenetických změn je u solidních nádorů prostudována daleko méně než u hematologických malignit [4, 10].

Jejich studium umožnil rozvoj a zavedení do praxe molekulárně-cytogenetických metod, jako jsou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s použitím lokus-specifických a centromerických sond a také dvoubarevná a vícebarevná FISH. Dále je to metoda komparativní genomové hybridizace (CGH) včetně arrayCGH, které patří mezi nejmodernější metody výzkumu genomu nádorových buněk. Ke stanovení ztráty či zisku sekvencí DNA využívá CGH metoda analýzu obrazu a matematickou statistiku [64, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119].

Řada genetických alterací se ukazuje jako nezbytná pro rozvoj jak sporadických, tak i hereditárních ovariálních karcinomů. Nízké zastoupení mutací BRCA1 a BRCA2 genů ve sporadicky se vyskytujících nádorech ovaria znamená zřejmou genetickou rozdílnost hereditárních a sporadických nádorů [16, 120].

Invazivní ovariální karcinom je obvykle monoklonální onemocnění vycházející z povrchového epitelu. Na druhé straně bylo zjištěno, že některé serózní borderline tumory a peritoneální karcinomy u pacientek s přítomností mutace BRCA1 genu mohou být polyklonální.

Většina ovariálních karcinomů je charakterizována vysokým stupněm genetických změn, manifestujících se jak na chromozomální, tak i molekulární úrovni (121, 122, 123).

Chromozomální odchylky, ve smyslu úbytku resp. zmnožení genetického materiálu, detekované metodou komparativní genomové hybridizace (CGH), složité strukturální přestavby, ztráta heterozygozity (LOH) svědčící o deleci specifických lokusů byly nalezeny ve vysokém počtu na více chromozómech, především 6q, 11p, 13q, 14q, 17p, 17q, 18q, 22q, Xp. Není zcela jasné, jestli tato široká škála genetických alterací odráží inaktivaci tumor-supresorových genů, či je spíše důsledkem všeobecné genomové instability. Zmnožení genetického materiálu bylo významně zastoupeno na chromozómech 3q, 8q a 20q, což může představovat amplifikaci onkogenů účastnících se procesu transformace.

Karyotypy ovariálních nádorových buněk představují celou škálu různých nálezů - od minimálních s postižením jednoho chromozómu až k těm postihujícím téměř všechny chromozómy, s různým stupněm ploidie, od aneuploidie k tetraploidii [29, 47, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134].

Jak CGH, tak LOH studie prokázaly, že pokročilá stadia mají větší počet genetických změn než časná stadia. Tato skutečnost může znamenat jak větší akumulaci genetických změn v souvislosti s progresí a vývojem od časnějšího k pokročilému stadiu, tak i fakt, že časné a pokročilé ovariální karcinomy představují spíše rozdílná onemocnění než jednotlivé kroky v rozvoji maligního procesu [6, 9, 28, 135].

Množství genetických alterací zjištěných u ovariálního karcinomu a odpovídajících jak aktivaci onkogenů, tak ztrátě funkce supresorových genů, zůstává zatím bez jednoznačného stanovení klinického významu těchto nálezů.

V současnosti je více než zřejmé, že klinická heterogenita zhoubných nádorů se odvíjí od genomu nádorových buněk a patologické exprese jeho genů. Rozdíly v léčebných výsledcích pacientek se stejnými diagnostickými a prognostickými kriterii a/nebo jednotnou léčbou mohou být způsobeny právě skutečností, že do stejných skupin jsou zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním. Histopatologická klasifikace je stále založena na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních markerů.

Na nepříznivé prognóze některých karcinomů se tak podílí nejenom jejich agresivní vlohy, ale rovněž i dosavadní léčebný přístup, který nezohledňuje existenci prognostických a prediktivních faktorů, ani nenabízí cílenou léčbu těchto nádorů. Proto je reálný předpoklad, že v případě uplatnění individuálního postupu může nastat zlepšení léčebných výsledků, jak se to např. jeví u některých pacientek s karcinomem prsu.

Termínem „predikce“ rozumíme vymezení ve smyslu predikce odpovědi na léčbu a „prognózou“ přežití nebo událost spojenou s relapsem či progresí choroby. V řadě publikací jsou ovšem tyto pojmy dnes zastupitelné a užívají se bez výše uvedeného vymezení.

Predikce vývoje nádorového onemocnění a stanovení rizika relapsu na základě profilu genové exprese přináší nové rozdělení, které se více blíží přirozenému průběhu choroby a je přesnější než dosavadní klinicko-anatomické prognostické systémy.

Výsledky DNA čipových analýz dále jednoznačně dokazují, že aktivovanou genovou výbavu, realizující metastatický potenciál, mohou mít nádorové buňky již od počátku svého vzniku. Pro klinickou praxi lze tak lépe vymezit skupinu pacientek s rozdílným terapeutickým plánem, kde se stávající klinicko-patologické prognostické systémy jeví často jako nedostatečné.

Dá se předpokládat, že existuje celá řada dalších, dosud neidentifikovaných významných genů s méně penetrantním fenotypem. Jde především o geny ovlivňující odpověď na stres, geny kontrolující kyslíkový metabolizmus a detoxikaci xenobiotik, které mohou hrát roli kofaktorů v nádorovém procesu. Mnoho biologických alterací navíc zřejmě není detekovatelných na úrovni DNA. Změny vedoucí k rozvoji nádoru mohou vycházet z modifikovaných RNA, z proteinových struktur v korelaci s epigenetickými vlivy. Vedle průkazu exprese jednotlivých genů se tak odkrývá celé pole možností studia proteinových struktur (proteomika), jejich dynamiky a interakce s cílem dalšího prohloubení znalostí o vývoji nádorových onemocnění. Tyto poznatky by měly přispět, v korelaci s dalšími informacemi o nádoru – molekulárně biologického i klinického charakteru - k vytvoření prediktivního modelu a individualizaci léčebného postupu [136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143].

Cílem do budoucna je vytvoření expresního molekulárního profilu nádoru, který by jej charakterizoval především z hlediska invazivních vlastností, metastatického potenciálu a rezistence na běžně používaná cytostatika. Získaný expresní profil by zapojením do standardního diagnostického schématu umožňoval, společně s proteomickými metodami a ostatními používanými diagnostickými kriterii, přesnější klasifikaci, více korelující s klinickým stavem pacienta a biologií nádoru, odhad pravděpodobnosti relapsu onemocnění, parametrů celkového přežití a citlivosti nádorových buněk k různým chemoterapeutickým režimům.

Klinické využití profilů genové exprese by tak znamenalo další krok vedoucí k individualizaci léčby a dispenzarizace pacientek a tím zlepšení výsledků onkologické péče.

3. CÍLE PRÁCE

Výzkumný projekt, jehož výsledky jsou v této práci předkládány, sledoval při svém zahájení několik cílů.

Jednalo se především o zavedení molekulárně-genetických metod při výzkumu solidních zhoubných nádorů do praxe cytogenetické laboratoře a následné porovnání jednotlivých metod 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 těmi, které byly získány 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 chozomálních přestaveb a ostatních sledovaných parametrů klinické, histopatologické i molekulární povahy.*

4. MATERIÁL A METODIKA

4. 1 Soubor pacientek

Do studie bylo zahrnuto 60 pacientek s ovariálním karcinomem a také 20 pacientek s cervikálním karcinomem, diagnostikovaných a léčených na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN v Praze.

Vzorky primárních nádorů vaječníku a děložního hrdla byly získávány přímým odběrem při chirurgickém zákroku (laparotomii) či biopsií u cervikálních nádorů v průběhu tří let (2002-2004). Zaznamenávány byly veškeré klinické informace a výsledky laboratorních vyšetření, včetně nádorového markeru CA 125 u pacientek s ovariálním karcinomem. Tyto údaje byly rozděleny do dvou skupin, podle kvantitativních a kvalitativních parametrů, jak je uvedeno v kapitole o statistickém zpracování.

4. 2 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření

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., což je semikvantitativní postup beroucí v úvahu procento pozitivních nádorových buněk a intenzitu pozitivity kvantifikovanou do čtyř stupňů (0-negativní, 1-pozitivní slabě, 2-pozitivní distinktně, 3-pozitivní silně). Vyčísluje se tzv. HSCORE dle vzorce HSCORE = ΣPi (i+1), kde je i některý ze 4 uvedených stupňů a Pi kolísá od 0 do 100%. Výsledkem je číselný údaj dosahující hodnot od 100 do 400. Zcela negativní nález má hodnotu HS 100, nejvyšší hodnotou je pak HS 400. Výpočet imunopozitivity (minimálně 200 nádorových jader) byl proveden pomocí systému obrazové analýzy LUCIA [144].

Vyšetření provedli pracovníci Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze.

4. 3 Genetické vyšetření

Předložené výsledky byly získány pomocí cytogenetických i molekulárně-cytogenetických metod, a to v cytogenetické laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze.

Ve studii byly porovnávány jednotlivé metody - konvenční karyotypizace (navzdory omezením stále používaná i v dnešní době) s přímým zpracováním

a krátkodobou kultivací a metody molekulárně-cytogenetické, tj. fluorescenční in situ hybridizace a komparativní genomová hybridizace. Porovnání metod bylo zaměřeno na výtěžnost, časovou náročnost, finanční zatížení a neúspěšnost [145, 146, 147, 148, 149].

Fluorescenční in situ hybridizace byla použita ke specifikaci genetických alterací v případech úspěšných kultivací, komparativní genomová hybridizace byla použita i tam, kde kultivace byly neúspěšné.

Počet studovaných mitóz se pohyboval od 3 do 30. Cílem bylo vyhodnotit všechny nalezené aberované mitózy - při nálezu patologické mitózy jsme zhodnotili všechny další mitózy vzorku, v případech normálních cytogenetických nálezů jsme standardně zhodnotili 30 mitóz.

Při popisu chromozómů a karyotypů jsme respektovali mezinárodní nomenklaturu (International System for Human Cytogenetic Nomenclature - ISCN 1995), v souladu se závaznou mezinárodní normou [150].

4. 3. 1 Konvenční karyotypizace

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 37^0 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.

Metoda G-pruhování spočívá v barvení chromozómů Giemsovým barvivem po jejich předchozím natrávení trypsinem. Pruhování vzniká v důsledku heterogenity chromatinu, který se vyskytuje ve dvou formách – heterochromatin a euchromatin. Pruhovací techniky tak umožňují identifikaci jednotlivých chromozómů a stanovení případných cytogenetických odchylek.

4. 3. 2 Fluorescenční in situ hybridizace

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. Princip hybridizační metody je založen na schopnosti jednořetězcové DNA (sondy) se vázat s komplementárními úseky cílové DNA. Sonda může být genová (lokus specifická - představující sekvenci vyšetřovaného genu), námi používaná chromozómová neboli paintingová (sekvence celého chromozómu) či alfa-satelitní (obsahující centromerické nebo telomerické oblasti). Preparáty se sondami označenými fluorochromy je možné po hybridizaci vyhodnotit na fluorescenčním mikroskopu vybaveném příslušnými filtry a imerzním objektivem. K upřesnění strukturálních přestaveb bylo potřeba použít malovacích sond, tzn. sond, které hybridizují s mnohočetnými chromozómovými sekvencemi. Malovací sondy nelze využít při sledování nedělících se buněk, protože signál jednotlivých chromozómů je v interfázi disperzní podle domény, kterou zaujímají v jádře. Tato metoda tedy vyžaduje kvalitní mitózy získané přímým cytogenetickým zpracováním nebo po předchozí krátkodobé kultivaci.

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).

4. 3. 3 Komparativní genomová hybridizace

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. Vyšetřovaná DNA je obvykle značena zeleným fluorochromem, referenční DNA se značí červeně. Poměr intenzity fluorescenčních signálů nádorové a referenční DNA měřený v každém lokusu udává numerické změny v DNA. Výsledkem snímání pomocí

fluorescenčního mikroskopu a vyhodnocením pomocí počítačové analýzy je grafické znázornění profilů jednotlivých chromozómů v podobě křivek, z nichž je zřejmé, zda a v jakém rozsahu jsou přítomny ztráty, resp. nadbytek genetického materiálu, a to jednotlivě u každého chromozómu. 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. Další omezení představují změny v telomerických oblastech chromozómů a v heterochromatinových pericentrických oblastech chromozómů 1, 9, 16 a Y, které nelze spolehlivě pomocí metody CGH vyšetřit.

CGH umožňuje vyšetření celého genomu v jedné hybridizační reakci. To znamená, že tato metoda odhalí ztráty (delece, losses) a nadbytek (amplifikace, gains) genetického materiálu všech chromozómů buňky v jedné mitóze, což je technicky nemožné při použití jednotlivých malovacích FISH sond. Další předností metody je potřeba minimálního množství vyizolované DNA.

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).

4. 4 Statistické zpracování

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 HSCORE, p53 HSCORE) pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) 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 (ANOVA) 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.

5. VÝSLEDKY

5. 1 Skupina ovariálních karcinomů

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

Tři pacientky ze skupiny ovariálních karcinomů byly vyšetřeny na přítomnost mutace genů BRCA1, 2, výběr pacientek se řídil příslušnými metodickými pokyny [4]. Mutace BRCA1 genu byla přítomna u jedné pacientky.

Pozitivní rodinná anamnéza z hlediska onkologických onemocnění byla zaznamenána u 7 pacientek (11,7%) – u příbuzných 1. stupně se vyskytoval karcinom plic, karcinom pankreatu, hematologické malignity a mozkové tumory. U 6 pacientek (10%) byl již před stanovením diagnózy ovariálního karcinomu zjištěn jiný zhoubný nádor – u 3 pacientek se jednalo o karcinom prsu (ve věku 60, 77, 73 let), u 1 pacientky se vyskytoval kolorektální karcinom (52 let) a u 2 pacientek byl diagnostikován endometroidní karcinom děložního těla (věk 43 a 67 let).

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. Koncentrace DNA byla extrémně nízká u 13 pacientek ze skupiny ovariálních karcinomů, tyto případy byly vyloučeny z genetického testování.

Veškeré údaje byly kompletně zohledněny při statistickém zpracování.

5. 1. 1 Genetické nálezy.

Numerické a strukturální aberace byly nalezeny u 63% ovariálních nádorových buněk. Nejčastějšími aberacemi byly nebalancované translokace a delece. Počet chromozómů se pohyboval od 63 do 85. Při použití metody CGH byly delece častějším nálezem než amplifikace, což může souviset se skutečností, že delece určitých chromozómů odrážejí roli tumor-supresorových genů umístěných ve specifických oblastech.

Amplifikace, typické pro skupinu ovariálních karcinomů, byly nalezeny na chromozómech 1q – 17 případů (36,2%), 3q – 8 případů (17%) a 20q – 8 případů (17%).

Delece 22q byla nalezena v 17 případech (36,2%), tento nález je dle dostupné literatury poměrně vzácný. **Obr. 1.**

V 17% vyšetřovaných případů byla zjištěna delece 4p a 4q, v 8,5% případů se vyskytovala delece 18p, 18q a 19q. **Tab. 2.**

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. **Obr. 2.**

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. **Obr. 3A, 3B. Obr. 4A, 4B.**

V 37% případů byl nalezen diploidní karyotyp.

5. 1. 2 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 než ženy ve stadiích II, III, IV. **Tab. 3. 1.**
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. **Tab. 3. 2, Tab. 3. 3.**
3. Ženy s gradingem G1 měly statisticky významně ($p<0,05$) nižší hodnotu p53 HSCORE (126) oproti ženám s G2 (236) a G3 (173), rovněž nebyla zjištěna závislost na histologickém typu. **Tab. 3. 2, Tab. 3. 3.**
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). **Tab. 3. 4.**
5. Ženy s velkou chromozomální přestavbou byly statisticky významně (ale jen $p<0,1$) mladší oproti ženám s malou a žádnou přestavbou. **Tab. 3. 5.**

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

1. stadium nádorového onemocnění a grading ($p<0,001$). **Tab. 4. 1**. Závislost na histologickém typu nebyla prokázána. **Tab. 4. 2.**
2. Stadium nádorového onemocnění a operační reziduum ($p<0,001$). **Tab. 4. 3.**
3. Stadium nádorového onemocnění a LE (lymfadenektomie) (ano-, ano+) ($p<0,05$) . **Tab. 4. 4**. Nebyla prokázána závislost mezi stadiem nádorového onemocnění a RR (response rate)**. Tab. 4. 5.**
4. Histologie a grading ($p<0,05$). **Tab. 5. 1.**
5. Grading a operační reziduum ($p<0,001$). **Tab. 5. 2**.
6. Grading a RR (response rate) ($p<0,01$). **Tab. 5. 3**.
7. Grading a p53 HSCORE (negativní, pozitivní) ($p<0,01$). **Tab. 5. 4**.
8. Operační reziduum a LE (lymfadenektomie) ($p<0,05$). **Tab. 5. 5**.
9. Operační reziduum a RR (response rate) ($p<0,05$). **Tab. 5. 6**.
10. Operační reziduum a CA 125 ($p<0,05$). **Tab. 5. 7**.
11. RR (response rate) a CA 125 ($p<0,001$). **Tab. 5. 8**.

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

5. 1. 3 Chromozomální přestavby a jejich vztah k hodnoceným parametrům.

Vzhledem k tomu, že studie byla zaměřena na genetické změny v nádorových buňkách, byla naše pozornost soustředěna na možné vztahy mezi chromozomálními přestavbami a výše zmíněnými parametry kvantitativní a kvalitativní povahy.

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, **Tab. 3. 5**), nalezeny nebyly. **Tab. 6. 1, Tab. 6. 2, Tab. 6. 3, Tab. 6. 4, Tab. 6. 5, Tab. 6. 6.**

Nebyla vyhodnocena korelace mezi výskytem genetických alterací a dobou celkového přežití, vzhledem ke krátké době sledování některých pacientek účastnících se studie (jeden rok).

5. 2 Nálezy ve skupině 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**. **7**.

U všech žen v této malé skupině předcházelo stanovení diagnózy cervikálního karcinomu poslední gynekologické vyšetření před 5-20 lety. Všechny ženy byly kuřačky cigaret a měly z onkologického hlediska negativní rodinnou anamnézu.

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.

Nejčastějšími nálezy ve skupině cervikálních karcinomů byly amplifikace 3q, které byly prokázány ve 12 případech (60%) a izochromozóm 5p v 8 případech (40%). Méně častými nálezy byly: amplifikace 5p – 4 případy (20%), delece 13q a 2q ve 4 případech (20%). Rozsáhlé numerické a strukturální přestavby byly typickými nálezy u pokročilých cervikálních karcinomů: amplifikace 3p v 8 případech (40%), 5p ve 4 případech (20%), 20p ve 4 případech (20%), 22q ve 4 případech (20%) a delece 13q ve 4 případech (20%), 6q ve 4 případech (20%) a izochromozóm 5p v 8 případech (40%). **Tab. 8.**

V případech vyšetřovaných v naší studii byly dále nalezeny vzácné amplifikace chromozómu 2p a 2q, a také delece chromozómů 10p,10q, 11p a 21q. V 71% případů byl nalezen diploidní karyotyp. **Obr. 5, Obr. 6.**

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

1. ženy s dg. stadiem IV (ale byly jen 2) byly statisticky významně ($p<0,05$) starší než ženy se stadii I, II, III. **Tab. 9. 1.**

2. ženy s gradingem G2 měly statisticky významně (pouze $p<0,1$) vyšší hodnotu p53 HSCORE (136) oproti ženám s G3 (110). **Tab. 9. 2.**

Mezi všemi možnými dvojicemi 6 kvalitativních parametrů se statisticky významnou závislost nedařilo prokázat.

To neznamená, že závislost není; může být, ale nepodařilo se ji prokázat, především pro velmi malý celkový počet žen s karcinomem cervixu a tím i v jednotlivých kategoriích sledovaného parametru.

Podobně jako ve skupině ovariálních karcinomů, i ve skupině cervikálních karcinomů byly vyhodnoceny vztahy mezi chromozomálními přestavbami a sledovanými parametry kvantitativní a kvalitativní povahy.

Ve skupině pacientek s cervikálním karcinomem jsme rozlišovali dvě podskupiny – s přítomností nebo nepřítomností chromozomálních přestaveb. Žádné statisticky významné závislosti mezi genetickými nálezy a proměnnými, jak kvalitativní, tak kvantitativní povahy, nalezeny nebyly.

5. 3 Srovnání nálezů ve skupinách ovariálních a cervikálních karcinomů.

Chromozomální aberace v obou skupinách ovariálních i cervikálních karcinomů jsou rozdílné a postihují jiné chromozómy, jak bylo uvedeno výše.

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.

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). Zdá se, že p53 HSCORE je důležitějším markerem než MIB-1 HSCORE, což vyplývá i z výsledků korelací obou parametrů s kvantitativními a kvalitativními proměnnými v obou skupinách.

Genetické alterace ve skupině cervikálních karcinomů, ve srovnání se skupinou ovariálních karcinomů, jsou méně extenzivní. Může to souviset se způsobem odběru nádorové tkáně, 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.

6. DISKUZE

6. 1 Nádorová cytogenetika

Znalost genetického profilu nádoru a některých jeho dalších molekulárně biologických charakteristik by měla přispět k predikci průběhu a prognózy nádorového onemocnění a zároveň přispět i k individualizaci léčebných modalit a monitoraci aktivity nádorového procesu. Přesné genetické analýzy by výhledově měly určit cílové geny pro budoucí cílenou terapii nádoru.

Buněčné populace zhoubných nádorů jsou sestaveny z více či méně heterogenních buněk. Podle základního konceptu progrese nádorového procesu může být heterogenita vysvětlována labilitou maligních buněk a selektivními mechanizmy působícími na ty populace, které byly původně derivované od jedné transformované buňky. Většina změn, které nacházíme v nádorových buňkách, jsou klonální. Chromozómové změny v nádorových buňkách jsou získané a musíme je odlišovat od změn konstitučních, které jsou vrozené a jsou ve většině případů ve všech buňkách těla. Kromě patologického klonu může být v nádorech přítomen i klon buněk s normálním karyotypem. U solidních nádorů mohou mít normální karyotyp například buňky fibroblastů, které jsou ve vzorku přítomny.

Až do doby zavedení pruhovacích technik bylo možné u nádorů popisovat pouze početní odchylky nebo velké přestavby chromozómů. S rozvojem laboratorních technik byly v pozdějších letech nalezeny další, specifické odchylky, které se staly důležitým diagnostickým kriteriem při vyšetření hematologických malignit i solidních nádorů.

Pro současnou onkocytogenetiku jsou charakteristické především dva přístupy:

1. zavedení nových systémů kultivace a synchronizace buněčného dělení buněk *in vitro*, které přispěly k výraznému zlepšení kvality chromozómových preparátů a tím i ke zvýšení rezoluce cytogenetických metod; důsledkem jsou nálezy dalších, dříve neidentifikovaných přestaveb, jako jsou translokace malých části chromozómů, inverze, duplikace, delece a inzerce, z nichž mnohé považujeme za zcela specifické nálezy pro určitý typ nádoru,
2. aplikace metod rekombinantní DNA analýzy, hybridizace in situ a studium buněk v interfázi, které přinášejí stále nové informace o biologickém významu chromozómových změn v maligním procesu [145].

Přestože pomocí klasické cytogenetiky lze analyzovat celý genom v jednom vyšetření, její rozlišovací schopnost je relativně malá. Řada submikroskopických změn

zůstává neodhalena. Cytogenetická analýza musí být dále doplňována citlivějšími metodami jako jsou metody molekulární cytogenetiky a poskytovat tak co nejpřesnější podklad pro práci molekulárních genetiků.

6. 1. 1 Metody molekulární cytogenetiky

Metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se stala rutinní metodou, která dovoluje hodnocení genových numerických změn i na nedělících se buňkách - interfázních jádrech, ale pouze ke stanovení počtu chromozómů, nikoli k hodnocení chromozomálních strukturních přestaveb. Vyšetření metodou FISH můžeme indikovat jen tehdy, známe-li dopředu cílový gen či chromozómovou oblast, kterou chceme analyzovat.

Rozlišit barevně každý jednotlivý pár autozómů a pohlavní chromozómy je možné další variantou FISH metody, při které jsou pěti fluorochromy označeny jednotlivé páry autozómů i pohlavní chromozómy (metoda mnohobarevného karyotypování). Výsledný obraz je analyzován počítačem, který na základě proměření intenzity fluorescenčních signálů přiřadí k příslušným chromozómům tzv. pseudobarvy (tj. klasifikační barvy). Metoda mFISH je velmi vhodná při určování původu tzv. marker chromozómů, a to jak v klinické, tak i nádorové cytogenetice. Na podobném principu je postavena také metoda mnohobarevného pruhování s vysokou rozlišovací schopností – mBAND [145, 151].

Celý genom dovoluje v jednom experimentu analyzovat komparativní genomová hybridizace (CGH). Tato metoda byla původně vyvinuta pro určování změn u solidních nádorů, u nichž bývá cytogenetické vyšetření často neúspěšné.

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.

Metoda array CGH, označovaná také jako matrix CGH, je založena na stejném principu jako klasická CGH, avšak cílem hybridizace nejsou normální chromozómy, ale klonované DNA segmenty genů (např. ve formě tzv. BAC – bakteriálních arteficiálních

chromozómů). Na čipu může být umístěno několik desítek ale i tisíc různých jednořetězcových vláken genu, jejichž zmnožení nebo naopak ztráty v nádorovém genomu chceme sledovat. Čip má podobu podložního skla s upraveným povrchem s jednořetězcovými vlákny DNA. Vzorky normální a nádorové genomové DNA jsou pomocí molekulárně genetické metody random priming PCR označeny rozdílnými flurorochromy a takto rozdílně značené DNA hybridizují s čipem obsahujícím fragmenty genomové DNA vybraných genů. Pomocí speciálního čtecího zařízení lze změřit přítomnost nebo chybění přehybridizovaného vlákna DNA daného genu.

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.

Významným faktorem, ovlivňujícím výsledek již na počátku hybridizace, je kvalita a kvantita vyšetřované DNA.

Pro určení balancovaných změn byla vyvinuta modifikace metody array CGH a byla označena array painting. Array painting využívá průtokové cytometrie k sortování a separaci abnormálních chromozómů, které jsou výsledkem translokace nebo inverze, pomocí změny velikosti a poměru párů bází. Po izolaci DNA z těchto abnormálních chromozómů, DNA obou aberantních chromozómů jsou označeny rozdílnými fluorochromy a hybridizují s čipem. V případě balancované translokace rozdílně značené DNA dvou derivovaných chromozómů ukazují sekvence, které jsou proximálně vzhledem ke zlomu jednou barvou, zatímco sekvence, které jsou distálně ke zlomu, jsou značeny jinou barvou. Kombinací metod array CGH a array painting je možné stanovit jak změny počtu kopií DNA, tak balancované translokace [152, 153, 154, 155].

6. 1. 2 Laserová mikrodisekce

K izolaci cílových nádorových buněk z komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární 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. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklíčko a termoplastická membrána je umístěna nad dehydratovaný preparát. Ohniskem laserového mikroskopu se aktivuje termoplastická membrána, která je navázána k identifikované cílové buňce v mikroskopované části preparátu. Laser roztaví termoplastickou folii v daném místě, kde je navázána cílová buňka. V závislosti na použitém materiálu je možno

z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě, a to i z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk [156, 157, 158, 159].

6. 1. 3 Využití jednotlivých postupů

Cytogenetické vyšetření solidních nádorů se v České republice provádí zatím jenom sporadicky a většinou k výzkumným účelům. Jako samostatná laboratorní metoda se tento přístup začal rozvíjet až v posledních letech, a to u dětských nádorů, nádorů mozku a u několika málo dalších epiteliálních i mezenchymových nádorů.

V námi předloženém projektu se jedná o první systematickou studii gynekologických maligních tumorů v České republice.

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. Konvenční cytogenetické metody jsou nejméně náročné, co se týče přístrojového vybavení a materiálových nákladů. Jsou náročné na čas a profesionální zkušenost pracovníka. FISH metody jsou náročné na přístrojové i materiálové vybavení, finančně nejnáročnější je mFISH, která v naší studii nebyla použita. CGH metoda se ve svém konečném důsledku ukázala jako nejefektivnější a nejlevnější v přepočtu na jedno vyšetření. V současné době se tedy jeví jako nevhodnější postup metoda komparativní genomové hybridizace, která je doplněna stanovením karyotypu cytogeneticky nebo molekulárně-cytogeneticky.

Metody molekulární cytogenetiky kladou vysoké požadavky na kvalitu a kvantitu vyizolované DNA, problémy se získáním potřebného množství DNA se mohou objevit u formalinem fixovaných tkání nebo u parafinových řezů.

Je třeba vzít do úvahy, že možnosti porovnávaných laboratorních metodik jsou limitovány, stejně tak jako je kvalitativně i kvantitativně omezen vzorek odebrané nádorové tkáně, zejména u cervikálních karcinomů. Způsob odběru může být jedním z důvodů vyššího počtu nalezených diploidních nádorů v předložené studii.

Pro rutinní izolaci cílových nádorových buněk se jako nejvhodnější současná metoda jeví metoda laserové mikrodisekce, která v naší studii nebyla použita.

6. 2 Cytogenetické nálezy u ovariálního karcinomu

Počet publikovaných prací věnujících se molekulárně biologickému pozadí ovariálního karcinomu se v poslední době stále zvyšuje a vzhledem k jeho málo objasněné etiopatogeneze je tématu věnována stále větší pozornost.

Řada prací je věnována výzkumu mutací genů BRCA1/2, jejichž role u dědičných karcinomů prsu a ovaria je dnes již dobře známá. Role těchto genů u sporadických karcinomů, kterých je většina, není tak docela jasná. U žen - nosiček mutovaného genu BRCA1, se karcinom ovaria obvykle, ve srovnání s ostatními ženami, objevuje v mladším věku. Dle závěrů některých studií se zdá, že přítomnost mutovaného genu BRCA1 je spojena s lepším přežitím u pokročilých ovariálních karcinomů [2, 160, 161, 162, 163].

V naší studii byla mutace genu *BRCA1* prokázána u jedné pacientky, pacientka s diagnostikovaným onemocněním karcinomu ovaria ve stadiu IVB přežívá více než 5 let.

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. Typickým nálezem u pokročilých stadií je ztráta chromozómu 4.

Za aberace spojené s horší prognózou jsou pokládány amplifikace 6p, 7q, 13q a delece 15q, 17p, 18q a 21q [133, 164, 165].

Inaktivace tumor-supresorových genů se vyskytuje častěji než aktivace onkogenů; není zcela jasné, zda je to důsledek použitých laboratorních metod či obvyklejšího kroku v karcinogenezi. Srovnání časných stadií s pokročilými odhalilo rozdíly mezi oběma skupinami: delece se vyskytují u časných stadií častěji než amplifikace. Typické delece jsou následující: 2q, 4q, 5q, 6q, 13q a 18q.

Na druhé straně, amplifikace jsou daleko častějším nálezem u pokročilých stadií - na chromozómech 3q, 8q, 11q, 12p, 17q a 20q [166, 167].

Poměrně častý nález izochromozómu 5p u některých tumorů je popisován u ovariálních tumorů spíše vzácně [168].

Při nadbytku 6p je popisován častější výskyt chemorezistence [169]. Dalším významným nálezem u chemorezistentních nádorů je ztráta 13q32.1 a 8p21.1, tyto nálezy by mohly být potenciálním prediktivním markerem [170].

Byly nalezeny vztahy mezi počtem aberací a dobou celkového přežití, vyšší počet chromozomálních přestaveb je často spojen s dalším nepříznivým faktorem, kterým je nízká nádorová diferenciace. Pacientky s tumory obsahujícími 7 a méně aberací mají delší dobu celkového přežití [51].

Rozdílné histologické typy nejsou spojovány se specifickými aberacemi; komplexní aberace jsou vzácné u mucinózních a endometroidních karcinomů. Méně aberací je popisováno u dobře diferencovaných nádorů, zatímco komplexní přestavby jsou typické pro nediferencované tumory. Serózní tumory v pokročilých stadiích obsahují dvojnásobné množství aberací ve srovnání s tumory nižších stadií. U těchto nádorů byly nalezeny amplifikace 3q, 6p, 7, 8q a 20, delece 4q, 6q, 12q, 13q a 16q. Společné aberace pro různé histologické typy jsou amplifikace 3q, 6p a delece 4q. Větší riziko recidiv je spojováno s výskytem amplifikací 1p, 10p, 20q a delecí 5q [28, 30, 33, 171, 172, 173, 174, 175].

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 [164, 176, 177].

Nejčastější aberace nalezené u borderline tumorů jsou ztráta chromozómů 17, 20q a 18p, nadbytek 12p13 a nadbytek chromozómu 8 s podobnou frekvencí jako u invazivních tumorů. Není zcela jasné, zda jsou tyto aberace markerem časných serózních karcinomů či ukazatelem potenciálu k progresi a rozvoji malignity v podskupině borderline tumorů [178].

Obecně srovnání borderline tumorů, benigních tumorů a maligních tumorů ukazuje, že border line tumory mají blíže k benigním než k maligním tumorům [179].

Srovnání primárních a metastatických nádorů odhalilo více aberací ve skupině primárních nádorů [180].

Očekávaný klíčový význam genů lokalizovaných na chromozómech 6q a 20q se v pozdějších pracích jednoznačně nepotvrdil [172, 177].

Snaha o definování genového profilu nádorů s vysokým maligním potenciálem a molekulárním předpokladem k metastázování, recidivám či chemorezistenci, je patrna z celé řady prací, které se této problematice věnují. Nadměrná exprese genů kódujících růstové faktory, jejich receptory a regulační proteiny bývá spojována s vyšším maligním potenciálem, a to také u některých nádorů histologicky hodnocených jako borderline. Validace těchto nálezů je předpokladem k jejich implementaci do klinické praxe prediktivní onkologie [141, 181, 182, 183, 184].

6. 3 Nálezy u karcinomu děložního hrdla

Karcinom děložního hrdla představuje druhý nejčastější zhoubný nádor u žen v celosvětovém měřítku. Ročně je diagnostikováno přibližně 470 000 nových případů onemocnění, 230 000 žen v souvislosti s tímto onemocněním umírá. Pětileté přežití dosahuje až 70% žen, v rozvojových zemích pouze 40% žen [10].

I přesto, že existují dobře definovaná, relativně dlouho se vyvíjející a léčitelná předstadia a poměrně spolehlivé a dostupné metody jejich detekce (kolposkopie, onkologická cytologie), velký počet nádorů je diagnostikován v pokročilých stadiích. Incidence nádoru v České republice je mnohem vyšší než v jiných vyspělých zemích.

Cytogenetické nálezy u cervikálních karcinomů, jak byly referovány z různých laboratoří, odhalily celou řadu strukturálních a numerických aberací, primární aberace však stále není známá.

Amplifikace v cervikálních nádorových buňkách jsou nejčastěji popisovány na chromozómech 1q, 3q, 5p, 8q, 17q a 20q, delece na chromozómech 2q, 3p, 4p, 6q, 11q, 13q, 17q, 18q a Xq. Aberace byly nalezeny v nádorech různých stadií, včetně premaligních lézí - CIN (cervikální intraepiteliální neoplazie). Tato skutečnost může souviset s vyšším maligním potenciálem těchto lézí a vysokou pravděpodobností jejich přechodu do invazivních karcinomů [185, 186, 187, 188].

Nejčastěji popisovaným nálezem v cervikálních nádorových buňkách je amplifikace 3q (3q24-3q28), stejně jako v buňkách premaligních lézí a lézí s iniciální invazí. Je to oblast genu hTR pro RNA-telomerázu s významem pro immortalizaci buněk ve smyslu genetického markeru pro předpověď rizika. Nadbytek 3q je typickým nálezem u žen s premaligní lézí, která později přešla do invazivního karcinomu [189, 190, 191, 192]. Horší prognóza onemocnění cervikálním karcinomem je spojena se ztrátou tumor supresorového genu na chromozómech 3p, 9p, 11p a 18q [193, 194]. Delece 3p je dalším typickým nálezem v buňkách invazivního metastazujícího cervikálního karcinomu [195].

Význam a asociace inaktivovaného tumor supresorového genu p53 (17p13.3) v rozvoji cervikálního karcinomu předpokládá koexistenci HPV (human papilloma virus) infekce, i když samotná přítomnost infekce není dostatečným faktorem k rozvoji nádoru. Nebyla nalezena specifická genetická alterace asociovaná s HPV infekcí [196]. Horší průběh onemocnění bývá spojován s přítomností delecí 11p a 18q [197]. Dalším

typickým nálezem detekovaným v buňkách cervikálních karcinomů je přítomnost izochromozómu 5p [198].

Nejčastěji se vyskytujícím nálezem ve skupině cervikálních karcinomů, zjištěným v naší studii, byla amplifikace chromozómů 3q, 5p a delece 13q. Toto zjištění koresponduje s výsledky ostatních studií. Pokročilá stadia byla spojena s výskytem vyššího počtu chromozomálních aberací, v naší studii nebyl tento nález statisticky významný.

V naší studii jsme také zaznamenali vzácnou deleci chromozómu 10 a další vzácný nález - amplifikaci chromozómu 2 v časném stadiu cervikálního karcinomu (IB).

6. 4 Porovnání publikovaných nálezů s výsledky získanými ve vlastní studii.

Cytogenetické vyšetření ovariálních nádorů v naší studii odhalilo přítomnost celé řady chromozomálních přestaveb.

Počet diploidních nádorů byl vysoký zejména ve skupině cervikálních nádorů, což může souviset také se způsobem odběru nádorového vzorku.

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.

Počet genetických přestaveb ve skupině ovariálních karcinomů v našem souboru byl signifikantně vyšší ve skupině mladších žen. I přes malý počet zkoumaných žen může mít tento fakt 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 (performance status – celkový stav) a možnostmi radikálního chirurgického výkonu u mladších pacientek [199].

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). Mutace přináší buňkám pouze určitou selekční růstovou výhodu. K dosažení plně rozvinutého maligního fenotypu (nezávislost na externích růstových signálech, necitlivost k externím protirůstovým signálům, unikání apoptóze, schopnosti

nekonečné replikace, podpora neoangiogeneze, invazivita a metastatická schopnost) je třeba, aby se v buňkách klonu nahromadilo v průměru minimálně 6-7 dalších mutací „za nádor odpovědných“ genů (onkogenů, tumor-supresorových genů včetně reparačních genů) a dalších tzv. epigenetických událostí.

Hromadí se stále více důkazů, že každý tumor je individuální. Pozornost je zaměřena na modifikující geny a DNA polymorfizmy, které nepochybně ovlivňují individuální povahu vzniku a rozvoje nádorového onemocnění. K jedinečnosti každého nádoru navíc podstatně přispívají velmi spletité, dosud v podstatě neodhalené interakce mutovaných genů i interakce normálních genů nádorových i okolních buněk [143].

Výskyt většího počtu chromozomálních aberací v nádorech mladších žen v naší studii je, i přes málo početnou vyšetřovanou skupinu, důvodem zaměření se právě na 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.

Pozornost by měla být věnována této kategorii i s ohledem na novější klasifikaci ovariálních nádorů na „high grade“ a low grade“ typy a jejich rozdílné molekulární charakteristiky, které patrně souvisí s neobjasněnými cestami karcinogeneze.

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 hlavně s finanční a technickou 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 [44, 122].

V naší studii nebyly nalezeny další korelace mezi rozsahem chromozomálních nálezů a p53 HSCORE, stadiem onemocnění, histologickým typem, léčebnou odpovědí či poklesem CA125 po léčbě. Signifikantní korelace byly nalezeny pouze mezi několika parametry histopatologického a klinického charakteru.

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 [200]. Typ mutací genu p53 je dalším předpokládaným faktorem ovlivňujícím dobu celkového přežití u pacientek léčených pro pokročilý serózní adenokarcinom ovaria [73, 201].

Většina cytogenetických nálezů popsaných v naší studii odpovídala literárním údajům.

Na druhé straně byly, v obou námi zkoumaných skupinách, tj. ovariálních i cervikálních karcinomů, zjištěny některé vzácnější nálezy - delece chromozómů 11p, 21p, vzácná delece chromozómu 10 a amplifikace chromozómu 2 v buňkách cervikálních karcinomů, izolovaná balancovaná translokace t(10;15) a amplifikace 1p, delece 19q delece 22q v buňkách ovariálních karcinomů.

Vzácný nález delece 22q byl v naší studii nalezen v 36% případů. Syndrom delece 22q11.2 je popisován jako chromozomální odchylka u imunologických defektů s různou fenotypickou expresí, která postihuje až 70% těchto jedinců, nezávisle na klinických projevech. Genetický základ syndromu je komplexní a není plně objasněný. Asociace mezi přítomností delece 22q11.2 a predispozicí k nádorům byla nedávno popsána u maligních rhabdoidních tumorů, karcinomu pankreatu a dlaždicobuněčného karcinomu děložního hrdla [202, 203, 204, 205].

Rozdílné nálezy ve skupinách ovariálních i cervikálních karcinomů, prokázané v naši studii odpovídají literárním údajům a patrně souvisí s rozdílnými cestami karcinogeneze.

Interpretace, ve srovnání s literaturou, vzácných nálezů je důvodem ke zkoumání výše uvedených aberací na molekulární úrovni.

7. ZÁVĚR

Předložené výsledky představují výzkumný projekt systematicky se věnující výzkumu chromozomálních aberací u gynekologických zhoubných nádorů a jejich korelaci s dostupnými parametry molekulárně biologické a klinické povahy.

Do laboratorní praxe pracoviště, kde se výzkum prováděl, byla zavedena metoda CGH (komparativní genomová hybridizace), 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.

Na druhé straně, byly v obou námi zkoumaných skupinách, tj. ovariálních i cervikálních karcinomů, 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.

Primární aberace nebyla nalezena ani v jedné z vyšetřovaných skupin.

Řešení hypotézy č. 2.

U ovariálních karcinomů se v hodnoceném 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, chromozomální 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, chromozomální přestavba a p53 HSCORE) podařilo prokázat jako statisticky významné 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 v našem projektu nebyly prokázány.

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

Molekulárně biologické parametry, včetně genetických alterací, představují nový prvek a perspektivní směr v oblasti diagnostiky, predikce prognózy, monitorování průběhu i možných terapeutických zásahů u onkologických onemocnění. 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 a proliferačního markeru MIB-1.

Chromozomální aberace byly zjišťovány pomocí cytogenetických (konvenční karyotypizace) a 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 a velikost chromozomální přestavby.

Ve skupině ovariálních karcinomů byly zjištěny, pomocí genetických analýz, typické amplifikace 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 a izochromozóm 5p. V obou zkoumaných skupinách bylo dále zaznamenáno, ve srovnání s literárními údaji, několik vzácnějších nálezů. Zajímavou se jeví delece 22q, která se ve skupině ovariálních karcinomů vyskytovala až ve 36% případů, 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 signifikantní 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

Molecular biological parameters, including genetic alterations, present new and perspective direction in diagnostics, prediction of prognosis, monitoring and possible therapeutic approaches in oncological disease**.** The results presented have to do with the 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 into 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 in ovarian cancer group revealed typical amplifications on chromosomes 1q, 3q and 20q; and deletions on chromosomes 4p, 4q, 18p, 18q, and 19q. The most frequent findings in cervical cancer group there were amplifications 3q and isochromosome 5p.

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 cell, just as activity of proliferative markers, seems to be typical important finding, especially when associated with younger age.

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AgNOR	silver-stain nucleolar organizer region
ANOVA	analysis of variances (analýza rozptylu)
CGH	comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace)
CIN	cervikální intraepiteliální neoplazie
COX-2	cyklooxygenáza 2
CR	complete response (úplná odověď na léčbu)
CSF-1	colony stimulating factor
DFS	disease-free survival
EGF	epidermal growth factor
EMMPRIN	extracellularmatrix metalloproteinase inducer
FGF	fibroblast growth factor
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FISH	fluorescence in situ hybridization (fluorescenční in situ hybridizace)
FSH	folikulostimulační hormon
G	grading (stupeň diferenciace)
HBOC	hereditary breast-ovarian cancer
HNPCC	hereditary nonpolyposis colon cancer (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
HPV	human papilloma virus (lidský papilloma virus)
IDS	interval debulking surgery
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
LCM	laser capture microdissection (laserová záchytná mikrodisekce)
LE	lymfadenektomie
LOH	loss of heterozygosity (ztráta heterozygozity)
LUCIA	Laboratory Universal Computer Image Analysis
MDR	multidrug resistance
MIS	Müllerian inhibiting substance
MMR	mismatch repair (genes) (mutátorové (geny))
MMP	matrix metalloproteinase (matrix metaloproteináz)
mFISH	multicolor FISH (mnohobarevná FISH)

OS	overall survival (celkové přežití)
PCR	polymerase chain reaction
PD	progression of disease (progrese onemocnění)
PDGF	platelet-derived growth factor
PDEGF	platelet-derived endothelial growth factor
PR	partial response (částečná odpověď na léčbu)
PFS	progression free survival
RR	response rate (odpověď na léčbu)
TGF-β	transforming growth factor-β
TNM	klasifikační systém nádorů – tumor, nodus lymphaticus, metastasis
VEGF	vascular endothelial growth factor

11. LITERATURA

1. BŐSZE, P., BAST, R. C., BERCHUCK, A., BURKE, H. B., BULLER, R. E., CREASMAN, W. T., DUBEAU, L., FOX, H., GEISLER, H. E., GEISLER, J. P., HENSON, D. E., RUSTIN, G. J. S., VERMORKEN, J. B., WELLS, M., WILBANKS, G. D. Consensus statements on prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma. Report of the Consensus Meeting organized by the European Society of Gynaecological Oncology. *Eur. J. Gynecol. Oncol.*, 2000, vol. 21, no. 5, s. 513-526.

2. 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.

3. HOLSCHNEIDER, C. H., BEREK, J. S. Ovarian cancer: epidemiology, biology and prognostic factors. *Semin. Surg. Oncol.*, 2000, vol. 19, no. 1, s. 3-10.

4. HAJDÚCH, M., JAROŠOVÁ, M., TROJANEC, R., INDRÁK, K., ŠPAČKOVÁ, K., PAPAJÍK, T., CWIERTKA, K. Cytogenetické a molekulárně biologické markery v onkologii solidních nádorů a hematologických malignit. *Klinická Onkologie*, 2004, roč. 17, Suppl., s. 51-56.

5. ŽALOUDÍK, J., VYZULA, R., DUŠEK, L. Potřebujeme prediktivní onkologii? *Klinická Onkologie*, 1999, roč. 12, č. 3, s. 110-111.

6. 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.

7. CVETKOVIC D. Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 2003, vol. 1:68. Dostupné na: http://www.rbej.com/content/1/1/68.

8. HOSKINS, J., PEREZ, C. A., YOUNG, R. C. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. Third Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 1268 s. ISBN 0-7817-1978-X.

9. KURZROCK, R., TALPAZ, M. *Molecular Biology in Cancer Medicine*. Sec.Edition. London:Martin Dunitz Ltd., 1999. 679 s. ISBN 1-85317-676-1.

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

11. REJTHAR, A., VOJTĚŠEK, B. *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha: Grada Publishing, 2002. 206 s. ISBN 80-247-0238-X.

12. DUESBERG, P. H. Are cancers dependent on oncogenes or on aneuploidy? *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2003, vol. 143, no. 1, s. 89-91.

13. HAUPTMANN, S., DENKERT, C., KOCH, I., PETERSEN, S., SCHLUNS, K., RELES, A., DIETEL, M., PETERSEN, I. Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum. Pathol.*, 2002, vol. 33, no. 6, s. 632-641.

14. OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., VYMLÁTIL, J. *I. Základy biologie a genetiky. II Vývoj a růst člověka*. Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2007. 181 s. ISBN 978-80-246-1100-6.

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

16. JANČÁRKOVÁ, N., ZIKÁN, M., POHLREICH, P., FREITAG, P., MATOUŠ, B., ŽIVNÝ, J. Detekce a výskyt mutací genu BRCA1 u pacientek s karcinomem prsu a ovaria. *Čes. Gynek.*, 2003, roč. 68, č.1, s. 11-16.

17. GREGGI, S., MANCUSO, S., PECORELLI, S. Familial and Hereditary Cancer in Women. Milano: Poletto Editore, 1999. 180 s. ISBN 888678625-5.

18. LANGSTON, A. A., OSTRANDER, E. A.: Hereditary ovarian cancer. *Curr. Opin .Obstet. Gynec.*, 1997, vol. 9, no 1, s. 3-7.

19. BAEKELANDT, M., KRISTENSEN, G. B., NESLAND, J. M., TROPÉ, C. G., HOLM, R.: Clinical Significance of Apoptosis-Related Factors p53, Mdm2 and Bcl-2 in Advanced Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1999, vol. 17, no. 7, s.2061-2068.

20. ŠIMIČKOVÁ, M., ČERNOCH, M.: Význam stanovení aktivity telomerázy v onkologii. *Klinická Onkologie*, 1999, roč. 12, č. 3, s. 73-77.

21. ADIB, T. R., HENDERSON, S., PERRETT, C., HEWITT, D., BOURMPOULIA, D., LEDERMAN, J., BOSHOFF, C. Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene expression microarrays. *Br. J. Cancer*, 2004, vol. 90, no. 3, s. 686-692.

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

23. BARTOŇKOVÁ, H., FORETOVÁ, L., HELMICHOVÁ, E., KALÁBOVÁ, R., KLEIBL, Z., KONOPÁSEK, B., KRUTÍLKOVÁ, V., MACHÁČKOVÁ, E., NOVOTNÝ, J., PETRÁKOVÁ, K., PETRUŽELKA, L., PLEVOVÁ, P., POHLREICH, P., ROB, L., SKOVAJSOVÁ, M., VESELÝ, J., ŽALOUDÍK, J. Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníku a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 a BRCA2. *Klinická Onkologie*, 2003, roč. 16, č. 1, s. 28-34.

24. BOYLE, P., MAISONNEUVE, P., AUTLIER, P. Update on cancer control in women. *Int. J. Gyn. Obst.*, 2000, vol. 70, no. 2, s. 263-303.

25. LYNCH, H. T., CASEY, M. J., LYNCH, J., WHITE, T. E. K., GODWIN, A. K. Genetics and ovarian carcinoma. *Sem. Oncol.*, 1998, vol. 25, no. 3, s. 265-280.

26. MODUGNO, F. AND OVARIAN CANCER AND HIGH RISK WOMEN SYMPOSIUM PRESENTERS. Ovarian cancer and high-risk women - implications for prevention, screening and early detection. *Gynecol. Oncol.*, 2003, vol. 91, no. 1, s. 15-31.

27. GREEN, J. A., ANASTOSOPOULOU, A., DUFFAUD, F., TEODOROVIC, I., VAN DER BURG, M., BERNS, E., VAN DIENST, P., KENTER, G., VERHEIJEN, R., VERGOTE, I. Predictive factors for response in advanced ovarian cancer: For the Translational Research Group of the EORTC-Gynecological Cancer Cooperative Group. *Ann. Oncol.*, 2000, vol. 11, suppl. 4, s. 85.

28. HU, J., KHANNA, V., JONES, M. W., SURTI, U. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas: comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. *Gynecol. Oncol.*, 2003, vol. 89, no. 3, s. 369-375.

29. KIECHLE-SCHWARZ, M., BAUKNECHT, T., SCHMIDT, J., WALZ, L., PFLEIDER, A. Recurrent cytogenetic aberrations in human ovarian carcinomas. *Cancer Detect. Prev.*, 1995, vol. 19, no. 3, s. 234-243.

30. KIM, G. J., KIM, J. O., HONG, E. K., KIM, H., CHUN, Y. H., PARK, S. H. Detection of genetic alteration in Korean ovarian carcinomas by degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction - comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2003, vol. 147, no. 1, s. 23-27.

31. LAFRAMBOISE, S., CHAPMAN, W., MCLAUGHLIN, J., ANDRULIS, I. L. P53 Mutations in Epithelial Ovarian Cancers. Possible Role in Prediciting Chemoresistance. *The Cancer Journal*, 2000, vol. 6, no. 5, s. 302-308.

32. PARTHEEN, K., LEVAN, K., ŐSTERBERG, L., HELOU, K., HORVATH, G. Analysis of cytogenetic alterations in stage III serous ovarian adenocarcinoma reveals a heterogenous group regarding survival, surgical outcome and substage. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, vol. 40, no. 4, s. 342-348.

33. SHAM, J.S.T., TANG, T.C.-M., FANG, Y., SUN, L., QIN, L.-X., WU, W.-L., XIE, D., GUAN, X.-Y. Recurrent chromosome alterations in primary ovarian carcinoma in Chinese women. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2002, vol. 133, no. 1, s. 39-44.

34. STRUSKI, S., DOCO-FENZY, M., KOEHLER, M., CHUDOBA, I., LEVY, F., MASSON, L., MICHEL, N., ULRICH, E., GRUSON, N., BENARD, J., POTRON, G., CORNILLET-LEFEBVRE, P. Cytogenetic evolution of human ovarian cell lines associated with chemoresistance and loss of tumorigenicity. *Anal. Cell Pathol.*, 2003, vol. 25, no. 3, s. 115-122.

35. ŠMARDOVÁ, J. Vůdčí gen P53: zpráva z konference. *Klinická Onkologie*, 2003, roč. 16, č. 5, s. 238-239.

36. TAVASSOLI, M., STEINGRIMSDOTTIR, H., PIERCE, E., JIANG, X., ALAGOZ, M., FARZANEH, F., CAMPBELL, I. G. Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and indentifies a tumour supressor gene locus at 5q13.1-21. *Br. J. Cancer*, 1996, vol. 74, no. 1, s. 115-119.

37. POSPÍŠILOVÁ, Š., VOJTĚŠEK, B. Protein p21WAF1 a jeho úloha v regulaci buněčného cyklu. *Klinická Onkologie*, 2000, roč. 13, č. 1, s.13-16.

38. AFIFY, A. M., WERNESS, B.A., MARK, H. F. HER-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, 1999, vol. 66, no. 2, s.163-169.

39. GUAN, X.- Y., SHAM, J. S. T, TANG, T. C.-M., FANG, Y., HUO, K.- K., YANG, J.-M. Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, no. 9, s. 3806-3809.

40. SHWARTZ, D. R., KARDIA, S. L., SHEDDEN, K. A., KUICK, R., MICHAILIDIS, G., TAYLOR, J. M., MISEK, D. E., WU, R., ZHAI, Y., DARRAH, D. M., REED, H., ELLENSON, L. H., GIORDANO, T. J., FEARON, E. R., HANASH, S. M., CHO, K. R. Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behaviour, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, no. 16, s. 4722-4729.

41. JAZAERI, A. A., LU, K., SCHMANDT, R., HARRIS, C. P., RAO, P. H., SOTIROU, C., CHANDRAMOULI, G. V., GERSHENSON, D. M., LIU, E. T. Molecular determinants of tumor differentiation in papillary serous ovarian carcinoma. *Mol. Carcinog.*, 2003, vol. 36, no. 2, s. 53-59.

42. SEKI, A., YOSHINOUCHI, M., SEKI, N., KODAMA, J., MIYAGI, Y., KUDO, T. Detection of c-erbB-2 and FGF-3 (INT-2) gene amplification in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, 2000, vol. 17, no. 1, s. 103-106.

43. ZHENG, J. P., ROBINSON, W. R., EHLEN, T., YU, M. C., DUBEAU, L. Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6 and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, no. 15, s. 4045-4051.

44. TAETLE, R., AICKIN, M., YANG, J. M., PANDA, EMERSON, L., EMERSON, J., ROE, D., ADAIR, L., THOMPSON, F., LIU, Y., WISNER, L., DAVIS, J. R., TRENT, J., ALBERTS, D. S. Chromosome abnormalities in ovarian adenocarcinoma:. I. Nonrandom chromosome abnormalities from 244 cases. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, vol. 25, no. 3, s. 290-300.

45. THOMPSON, F. H., TAETLE, TRENT, J. M., LIU, Y., MASSEY-BROWN, K., SCOTT, K. M., WEINSTEIN, R. S., EMERSON, J. C., ALBERTS, D. S., NELSON, M. A. Band 1p36 Abnormalities and t(1;17) in Ovarian Carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet*, 1997, vol. 96, no. 2, s. 106-110.

46. SUZUKI, S., MOORE, D.H. JR., GINZINGER, D. G., GODFREY, T.E., BARCLAY, J., POWELL, B. PINKEL, D., ZALOUDEK, C., LU, K., MILLS, G., BERCHUCK, A., GRAY, J. W. An approach to analysis of large-scale correlations between genome changes and clinical endpoints in ovarian cancer. *Cancer Res*., 2000, vol. 60, no. 19, s. 5382-5385.

47. LAUNONEN, V., MANNERMAA, A., STENBACK, F., KOSMA, V. M., PUISTOLA, U., HUUSKO, P., ANTTILA, M., BLOIGU, R., SAARIKOSKI, S., KAUPPILA, A., WINQVIST, R. Loss of heterozygosity at chromosomes 3, 6, 8, 11, 16 and 17 in ovarian cancer. *Cancer Genet. Cytogenet*., 2000, vol.122, no. 1, s. 49-54.

48. FARUQI, S. A., NUOMOFF, M. J., DEGER, R. B., JALAL, S. M., ANTONIADES, K. Trisomy 21 as the only recurrent chromosomal anomaly in a clinically aggressive ovarian carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2002, vol. 138, no. 2, s. 165-168.

49. MAZUREK, A., NIKLINSKI, J., LAUDANSKI, T., PLUYGERS, E. Clinical tumours markers in ovarian cancer. *Eur. J. Cancer Prev*., 1998, vol. 7, č. 1, s. 23-35.

50. SCHILDKRAUT, J. M., HALABI, S., BASTOS, E., MARCHBANKS, P.A., MCDONALD, J., BERCHUCK, A. Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: population-based study. *Obstet. Gynecol*., 2000, vol. 95, no. 1, s. 119-127.

51. UMAYAHARA, K., NUMA,F., INOKUMA, A., SUAOKA, K., KAWASAKI, K., HIRAKAWA, H., EMOTO, T., SAKAGUCHI, Y., NAWATA, S., OGATA, H., SAKAMOTO, M., HASUMI, K., KAWAUCHI, S., SASAKI, K., KATO, H. Genetic alterations related to lymph node metastasis and peritoneal dissemination in epithelial ovarian cancers. *Oncol. Rep*., 2002, vol. 9, no. 5, s. 1115-1119.

52. ZIKÁN, M., LACHETA, J. Molekulární biologie vybraných gynekologických malignit. *Moderní gynekologie a porodnictví*, 2007, roč. 16, č. 3, s. 444-451.

53. 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.

54. MCCLUGGAGE, W. G. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *J. Clin. Pathol*., 2008, vol. 61, s. 152-163.

55. RUSSEL, H. E., MCCLUGGAGE, W. G. A multistep model for ovarian tumorigenesis: the value of mutatioon analysis in the KRAS and BRAF genes. *J. Pathol.,* 2004, vol. 203, no. 2, s. 617-619.

56. SINGER, G., KURMAN, R. J., CHANG, H. W., CHO, S. K. R., SHIH, I.-M. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 2002, vol. 160, s. 1223-1238.

57. SINGER, G., STÖHR, R., COPE, L., DEHARI, R., HARTMANN, A., CAO, D. F., WANG, T. L., KURMAN, R. J., SHIH, I.-M. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low and high grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2005, vol. 29, no. 2, s. 218-224.

58. HO, C.-L., KURMAN, R. J., DEHARI, R., WANG, T.-L., SHIH, I.-M. Mutations of BRAF and KRAS precede the developement of ovarian serous borderline tumors. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, s. 6915-.6918.

59. SIEBEN, N. L., MACROPOULOS, P., ROEMEN, G. M., KOLKMAN-ULJEE, S. M., FLEUREN, J., HOUMADI, R., DISS, T., WARREN, B., AL ADNANI, M., DE GOEIJ, A. P., KRAUSZ, T., FLANAGAN, A. M. In ovarian neoplasm, BRAF, but not KRAS, mutation are restricted to low-grade serous tumorus. *J. Pathol.*, 2004, vol. 202, no. 3, s. 336-340.

60. O´NEILL, C. J., DEAVERS, M. T., MALPICA, A., FOSTER, H., MCCLUGGAGE, W. G. An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas. Significantly higher expression of p53, MIB1, bcl2, her-2/neu and C-KIT in high-grade neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2005, vol. 29, no. 8, s. 1034-1041.

61. DEHARI, R., KURMAN, R. J., LOGANI, S., SHIH, I.-M. The development of high-grade serous carcinom from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2007, vol. 31, no. 7, s. 1007-1012.

62. PIERETTI, M., HOPENHAYN-RICH, C., KHATTAR, N. H., CAO, Y., HUANG, B., TUCKER, T. C. Heterogenity of ovarian cancer: relationship among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics and survival. *Cancer Invest.*, 2002, vol. 20, no. 1, s. 11-23.

63. ŠPAČEK, J., JÍLEK, P., PETER, J., TEASŘÍK, Z.: Histopatologické prognostické faktory, sérové markery a vybrané molekulárně biologické faktory u ovariálního karcinomu. *Čes. Gynek.*, 2002, roč.67, č. 6, s. 343-349.

64. BERNARDINI, M., WEBERPALS, J., SQUIRE, J. A. The use of cytogenetics in understanding ovarian cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 2004, vol. 58, no. 1, s.17-23.

65. SKIRNISDOTTIR, I., SORBE, B., KARLSSON, M., SEIDAL, T. Prognostic importance of DNA ploidy and p53 in early stages of epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2001, vol. 19, no.6, s. 1295-1302.

66. GEISLER, J. P., GEISLER, H. E.: Tumor markers and molecular biological markers in gynecological malignancies. *Curr. Op. Obstet. Gynecol.*, 2001, vol. 13, no.1, s. 31-39.

67. SEVINC, A., CAMCI, C., TURK, H. M., BUYUKBERBER, S. How to interprete serum CA 125 levels in patients with serosal involvement: A clinical dilemma. *Oncology*, 2003, vol. 65, no. 1, s. 1-6.

68. GOTTWALD, L., DANILEWICZ, M., SUZIN, J., WÓJCIK-KROWIRANDA, K., BIEŃKIEWICZ, A. AgNORs Count Correlates Bette than Grading with the Effect of Chemotherapy in Serous Ovarian Cancer. *Pol. J. Pathol.,* 2003, vol. 54, no. 4, s. 239-242.

69. SAH, S. P., DAWAR, R., KUMAR, L., GUPTA, S. D. Nucleolar Organizer Regions as a Prognostic Indicator in Epithelial Cancers of the Ovary. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2004, vol. 23, no. 4, s.. 347-353.

70. MARX, D., MEDEN, H., BRUNE, T., KRON, M., KORABIOWSKA, M., KUHN, W., SCHAUER, A. Mib-1 evaluated proliferative activity in ovarian cancer with respect to prognostic significance. *Anticancer Res.*, 1997, vol. 17, no. 1B, s. 775-780.

71. NIELSEN, J. S., JAKOBSEN, E., HØLUND, B., BERTELSEN, K., JAKOBSEN, A. Prognostic significance of p53, Her-2 and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2004, vol. 14, no. 6, s. 1086-1096.

72. TERAUCHI, F., OKAMOTO, A., NAGASHIMA, T., KOBAYASHI, Y., MORITAKE, T., YAMAMOTO, Y., TAKAKURA, S., IWAKI, S., OGURA, H. Clinical significance of p21 (WAF1/CIP1) and p53 expression in serousno. 3, cystadenocarcinoma of the ovary. *Oncol. Rep, 2005*, vol. 14, no. 2, s. 363-368.

73. WANG, Y., HELLAND, Å., HOLM, R., SKOMEDAL, H., ABELER, V. M., DANIELSEN, H. E., TROPÉ, C. G., BØRRESEN-DALE, A.-L., KRISTENSEN, G. B. TP53 mutations in early-stage ovarian carcinoma, relation to long-term survival. *Br J. Cancer*, 2004, vol. 90, s. 678-685.

74. SCHANER, M. E., DAVIDSON, B., SKREDE, M., REICH, R., FLØRENES, V. A., RISBERG, B., BERNER, A., GOLDBERG, I., GIVANT-HORWITZ, V., TROPÉ, C. G., KRISTENSEN, G., NESLAND, J. M., BØORESEN-DALE, A. Variation in gene expression patterns in effusions and primary tumors from serous ovarian cancer patients. *Mol. Cancer*, 2005, 4:26. Dostupné na: http://www.molecular-cancer.com/content/4/1/26.

75. BARON, A. T., BOARDMAN, C. H., LAFKY, J. M., RADEMAKER, A., LIU, D., FISHMAN, D. A., PODRATZ, K. C., MAIHLE, N. J. Soluble Epidermal Growth Factor Receptor (SEG-FR) and Cancer Antigen 125 (CA125) as Screening and Diagnostic Tests for Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2005, vol. 14, s. 306-318.

76. DAL MASO, L., AUGUSTIN, L. S., FRANCESCHI, S., TALAMINI, R., POLESEL, J., KENDALL, C. W., JENKINS, D. J., VIDGEN, E., LA VECCHIA, C. Association between components of the insulin-like growth factor system and epithelial ovarian cancer risk. *Oncology*, 2004, vol. 67, no. 3-4, s. 225-230.

77. LANGDON, S. P., SMYTH, J. F. Growth factors and ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 1998, vol. 5, no. 4, s. 283-291.

78. SKIRNISDÓTTIR, I., SORBE, B., SEIDAL, T. The growth receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2001, vol. 11, no. 2, s. 119-129.

79. IKEDA, K., SAKAI, K., YAMAMOTO, R., HAREYAMA, H., TSUMURA, N., WATARI, H., SHIMIZU, M., MINAKAMI, H., SAKURAGI, N. Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1 and p53 in stages II-IV ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2003, vol. 13, no. 6, 776-784.

80. HOGDALL, E. V., RYAN, A., KJAER, S. K., BLAAKAER, J., CHRISTENSEN, L., BOCK, J. E., GLUD, E., JACOBS, I. J., HOGDALL, C. K. Loss of heterozygosity on the X chromosome is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma: from the. Danish „MALOVA“ Ovarian Carcinoma Study. *Cancer*, 2004, vol. 100, no. 11, s. 2387-2395.

81. HATA, K., NAKAYAMA, K., FUJIWAKI, R., KATABUCHI, H., OKAMURA, H., MIYAZAKI, K. Expression of the angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie-2 and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*, 2004, vol. 93, no. 1, s. 215-222.

82. FUJIMOTO, J., AOKI, I., TOYOKI, H., KHATUN, S., SATO, E., SAKAGUCHI, H., TAMAYA, T. Clinical Implications of Expression of ETS-1 Related to Angiogenesis in Metastatic Lesions of Ovarian Cancers. *Oncology*, 2004, vol. 66, no. 5, s. 420-428.

83. HEIMBURG, S., OEHLER, M. K., PAPADOPOULOS, T., CAFFIER, H., KRISTEN, P., DIETL, J. Prognostic relevance of the endothelial marker CD 34 in ovarian cancer. *Anticancer Res.*, 1999, vol. 19, no. 4A, s. 2527-2529.

84. KHALIFEH, I., MUNKARAH, A., LONARDO, F., MALONE, J., MORRIS, R., LAWRENCE, W. D., ALI-FEHMI, R. Expression of Cox-2, CD43, Bcl-2 and p53 and Survival in Patients with Primary Peritoneal Serous Carcinoma and Primary Ovarian Serous Carcinoma. *Int. J. Gyn. Pathol.*, 2004, vol. 23, no. 2, s. 162-169.

85. MUNKARAH, A., ALI-FEHMI, R. COX-2: a protein with an active role in gynecological cancers. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*, 2005, vol.17, no. 1, s. 49-53.

86. KIM, J.-H., SKATES, S. J., UEDE, T., WONG, K.-K, SCHORGE, J. O., FELTMATE, C. M., BERKOWITZ, R. S., CRAMER, D. W., MOK, S. C. Ostepontin as a Potential Diagnostic Biomarker for Ovarian Cancer. *JAMA*, 2002, vol. 287, s.1671-1679.

87. MATSUMOTO, K., BAY, B.-H. Significance of the Y-box proteins in human cancers. *J. Mol. Genet. Med.*, 2005, vol.1, no. 1, s. 11-17.

88. WARRENFELTZ, S., PAVLIK, S., DATTA, S., KRAEMER, E. T., BENIGNO, B., MCDONALD, J. F. Gene expression profiling ovarian tumours correlated with malignant potential. *Mol. Cancer*, 2004, 3:27. Dostupné na: http://www.molecular-cancer.com/content/3/1/27.

89. LOSCH, A., SCHINDL, M., KOHLBERGER, P., LAHODNY, J., BREITENECKER, G., HORVAT, R., BIRNER, P. Cathepsin D in ovarian cancer: prognostic value and correlation with p53 expression and microvessel density. *Gynecol. Oncol*, 2004, vol. 92, no. 2, s. 545-552.

90. HOLZMAYER, T. A., HILSENBECK, S., VON HOFF, D. D., RONINSON, I. B. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J. NCI*, vol. 84, no. 19, s. 1486-1491.

91. SIMOJOKI, M., SANATALA, M., RISTELI, J., RISTELI, L., KAUPPILA, A. Serial determinations of aminoterminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) and prognosis in ovarian cancer, comparison to CA 125. *Anticancer Res.*, 2000, vol. 20, no. 6C, s. 4655-4660.

92. SIMOJOKI, M., SANATALA, M., RISTELI, J., KAUPPILA, A. Discrepant expression of carboxy- and aminoterminal propeptides of type I procollagen predicts poor clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2003, vol. 88, no. 3, s. 358-362.

93. DAVIDSON, B., GOLDBERG, I., TELL, L., VIGDORCHIK, S., BAEKELANDT, M., BERNER, A., KRISTENSEN, G. B., REICH, R., KOPOLOVIC, J. The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin. Exp. Metastasis*, 2004, vol. 21, no. 3, s. 191-199.

94. FERRARIO, A., CHANTRAIN, C. F., VON THIEL, K., BUCKLEY, S., RUCKER, N., SHALINSKY, D. R., SHIMADA, H., DECLERCK, Y. A., GOMER, C. J. The Matrix Metalloproteinase Inhibitor Prinomastat Enhances Photodynamic Therapy Responsiveness in a Mouse Tumor Model. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, no. 7, s. 2328-2332.

95. FRANKE, F. E., VON GEORGI, R., ZYGMUNT, M., MUNSTEDT, K. Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.*, 2003, vol. 23, no. 5b, s. 4261-4267.

96. ABD-ELAZIZ, M., MORIYA, T., AKAHIRA, J., NAKAMURA, Y., SUZUKI, T., SASANO, H. Immunolocalization of Nuclear Transcription Factors, DAX-1 and Ad4BP/SF-1, in Human Common Epithelial Ovarian Tumors: Correlations with StAR and Steroidogenic Enzymes in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol*., 2005, vol. 24, no. 2, s. 153-163.

97. ABD-ELAZIZ, M., MORIYA, T., AKAHIRA, J., SUZUKI, T., SASANO, H. StAR and progesterone producing enzymes (3β-hydroxysteroid dehydrogenase and cholesterol side-chain cleavage cytochromes P450) in human epithelial ovarian carcinoma: Immunohistochemical and real-time PCR studies. *Cancer Science*, 2005, vol. 96, no. 4, s. 232-239.

98. KYRIAKOPOULOU, L. G., YOUSEF, G. M., SCORILAS, A., KATSAROS, D., MASSOBRIO, M., FRACCHIOLO, S., DIAMANDIS, E. P. Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin. Biochem*., 2003, vol. 36, no. 2, s. 135-143.

99. SCORILAS, A., BORGONO, C. A., HARBECK, N., DORN, J., SCHMALFELDT, B., SCHMITT, M., DIAMANDIS, E. Human Kallikrein 13 Protein in Ovarian Cancer Cytosols: A New Favorable Prognostic Marker. *J. Clin. Oncol*., 2004, vol. 22, no. 4, s. 678-685.

100. EDER, A. M., SUI, X., ROSEN, D. G., NOLDEN, L. K., CHENG, K. W., LAHAD, J. P., KANGO-SINGH, M., LU, K. H., WARNEKE, C., L., ATKINSON, E. N., BEDROSIAN, I., KEYOMARSI, K., KUO, W. L., GRAY, J. W., YIN, J. C., LIU, J., HALDER, G., MILLS, G. B. Atypical PKCiota contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 35, s. 12519-12524.

101. FARLEY, J., SMITH, L., M., DARCY, K. M., SOBEL, E., O´CONNOR, D., HENDERSON, B., MORRISON, L., BIRRER, M. J. Cyclin E Expression Is a Significant Predictor of Survival in Advanced, Suboptimally Debulked Ovarian Epithelial Cancers: A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer Res*., 2003, vol. 63, no. 6, s. 1235-1241.

102. BARBIERI, F., LORENZI, P., RAGNI, N., SCHETTINI, G., BRUZZO, C., PEDULLA, F., ALAMA, A. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer. *Oncology,* 2004, vol. 66, no. 4, s. 310-315.

103. HOGDALL, E. V., JOHANSEN, J. S., KJAER, S. K., PRICE, P. A., CHRISTENSEN, L., BLAAKAER, J., BOCK, L: E., GLUD, HOGDALL, C. K. High plasma YKL-40 level in patients with ovarian cancer stage III is related to shorter survival. *Oncol. Rep.*, 2003, vol. 10, no. 5, s. 1535-1538.

104. MATZUSAKI, H., KOBAYASHI, H., YAGYU, T., WAKAHARA, K., KONDO, T., KURITA, N., SEKINO, H., INAGAKI, K., SUZUKI, M., KANAYAMA, N., TERAO, T. Plasma Bikunin As a Favorable Prognostic Factor in Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol*., 2005, vol. 23, no. 7, s. 1463-1472.

105. MCINTOSH, M. Could high plasma bikunin predict a favorable outcome in ovarian cancer? *Nature Clin. Prac. Oncol.*, 2005, vol. 2, no. 10, s.502-503.

106. SUZUKI, MIKA., KOBAYASHI, H., TANAKA, Y., HIRASHIMA, Y., KANAYAMA, N., TAKCI, Y., SAGA, Y., SUZUKI, MITSUAKI, ITOH, H., TERAO, T. Bikunin Target Genes in Ovarian Cancer Cells Identified by Microarray Analysis. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 17, s.14640-14646.

107. SHIGEMASA, K., GU, L., O´BRIEN, T. J., OHAMA, K. Skp2 overexpression is a prognostic factor in patients with ovarian adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2003, vol. 9, no. 5, s. 1756-1763.

108. DENKERT, C., SCHMITT, W. D., BERGER, S., RELES, A., PEST, S., SIEGERT, A., LICHTENEGGER, W., DIETEL, M., HAUPTMANN, S. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2002, vol. 102, no. 5, s. 507-513.

109. JAZAERI, A. A., AWTREY, C. S., CHANDRAMOULI, G. V. R., CHUANG, Y. E., KHAN, J., SOTIRIOU, C., APRELIKOVA, O., YEE, C., ZORN, K. K., BIRRER, M. J., BARRETT, J. C., BOYD, J. Gene Expression Profiles Associated with Response to Chemotherapy in Epithelial Ovarian Cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2005, vol. 11, no. 17, s. 6300-6310.

110. SOOD, A. K., FLETCHER, M. S., GRUMAN, L. M., COFFIN, J. E., JABBARI, S., KHALKHALI-ELLIS, Z., ARBOUR, N., SEFTOR, E. A., HENDROX, M. J. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2002, vol. 8, no. 9, s. 2924-2932.

111. KAISER, P. C., KŐRNER, M., KAPPELER, A., AEBI, S. Retinoid receptors in ovarian cancer: expression and prognosis. *Ann. Oncol.*, 2005, vol. 16, no. 9, s. 1477-1487.

112. BERCHUCK, A. Biomarkers in the ovary. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1995, vol. 23, Suppl., s. 223-226.

113. 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.

114. LAMERZ, R. Role of tumour markers, cytogenetics. *Ann. Oncol.*, 1999, vol. 10, Suppl. 4, s. 145-149.

115. PATEL, A.S., HAWKINS, A. L., GRIFFIN, C.A. Cytogenetics and cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 2000, vol. 12, no. 1, s. 62-67.

116. RAO, P.H., HARRIS, C.P., LU X.Y., LI X.-N., MOK S.C., LAU C.C. Multicolor Spectral Karyotyping of Serous Ovarian Adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, vol. 33, no. 2, s. 123-132.

117. SHELLING, A.N., COOKE, L.E., GANESAN, T.S. The genetic analysis of ovarian cancer. *Br.J. Cancer*, 1995, vol. 72, no. 3, s. 521-527.

118. TEIXEIRA, M.R. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur. J. Cancer*, 2002, vol. 38, no. 12, s. 1580-1584.

119. TONNIES, H. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends Mol. Med.*, 2002, vol. 8, no. 6, s. 246-250.

120. ISRAELI, O, GOTLIEB, W. H., FRIEDMAN, E., GOLDMAN, B., BEN-BARUCH, G., AVIRAM-GOLDRING, A., RIENSTEIN, S. Familial vs sporadic ovarian tumors: characteristic genomic alterations analyzed by CGH. *Gynecol. Oncol.*, 2003, vol. 90, no. 3, s. 629-636.

121. HOGLUND, M., GISSELSSON, D., HANSEN,G. B., SALL, T., MITELMAN F. Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosom evolution. *Cancer Res.*, 2003, vol. 63, no. 12, s. 3378-3385.

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

123. WOLF, N. G., ABDUL-KARIM, F.W., SCHORK, N. J., SCHWARTZ, S. Origins of heterogenous ovarian carcinomas. A molecular cytogenetic analysis of histologically benign, low malignant potential and fully malignant components. *Am. J. Pathol.*, 1996, vol. 149, no. 2, s. 511-520.

124. ARNOLD, J. M., WOOLATT, E., CHENEVIX-TRENCH, G. Chromosome 8 genetic analysis and phenotypic characterization of 21 ovarian cancer cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet*., 2002, vol. 139, no. 2, s. 109-114.

125. ATKIN, N. B. Aneuploidy in carcinomas may be initiated by the acquisition of a single trisomy. *Cytogenet. Genome Res*. 2003, vol. 101, no. 2, s. 99-102.

126. BAYANI, J., BRENTON, J. D., MACGREGOR, P. F., BEHESTI, B., ALBERT, M., NALLAINATHAN, D., KARASKOVA, J., ROSEN, B., MURPHY, J., LAFRAMBOISE, S., ZANKE, B., SQUIRE, J. A. Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization and expression microarrays. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, no. 12, s. 3466-3476.

127. DEGER, B., FARUQI, S. A., NOUMOFF, J.S. Karyotypic Analysis of 32 Malignant Epithelial Ovarian Tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1997, vol. 96, no. 2, s. 166-173.

128. ENGEL, H., FRIEDRICH, J., KLEESPIES, C., KURBACHER, C. M., SCHON DORF, T., GRECU, O., KOLHAGEN, H., MALLMANN, P. Detection of chromosomal aberrations in tumor cells and tumor infiltrating lymphocytes by molecular cytogenetics in patients with gynecological cancer. *Cancer Genet. Cytogenet*., 1998, vol. 106, no. 2, s. 159-165.

129. EVANS, M. F., MCDICKEN, I. W., HERRINGTON, C. S. Numerical abnormalities of chromosomes 1, 11, 17 and X are associated with stromal invasion in serous and mucinous epithelial ovarian tumours. *J. Pathol*., 1999, vol. 189, no. 1, s. 53-99.

130. JIN, Y., ZHANG, H., TSAO, S. W., JIN, C., LV, M., STROMBECK, B., WIEGANT, J., WAN, T. S., YUEN, P. W., KWONG, Y. L. Cytogenetic and molecular genetic characterization of immortalized human ovarian surface epithelial cell lines: consistent loss of chromosome 13 and amplification of chromosome 20. *Gynecol. Oncol*., 2004, vol. 92, no. 1, s. 183-191.

131. LASSUS, H., LAITINEN,M. P., ANTTONEN, M., HEIKINHEIMO, M., AALTONEN, L. A., RITVOS, O., BUTZOW, R. Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4. *Lab. Invest*., 2001, vol. 81, no. 4, s. 517-526.

132. PEJOVIC, T., HEIM, S., MANDAHL, N., BALDETORP, B., ELMORS, B., FLODERUS, U.-M., FURGYIK, S., HELM, G., HIMMRLMANN, A., WILLEN, H., MITELMAN, F. Chromosome aberrations in 35 primary ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 1992, vol. 4, no.1, s. 58-68.

133. 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.

134. WAN, M., SUNS, T., VYAS, R., ZHENG, J., GRANAD, E., DUBEAU, L. Supression of tumorigenicity in human ovarian cancer cell lines is controlled by a 2 cM fragment in chromosomal region 6q24-q25. *Oncogene*, 1999, vol. 18, no. 8, s. 1545-1551.

135. BYROM, J., MUDALIAR, V., REDMAN, C. W., JONES, P., STRANGE, R.C., HOBAN, P. R. Loss of heterozygosity at chromosome 9q22-31 is a frequent and early event in ovarian tumors. *Int. J. Oncol*., 2004, vol. 24, no. 5, s. 1271-1277.

136. 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 normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Cancer*, 2004, vol. 112, no. 1, s. 14-25.

137. BEREK, J. S., SCHULTES, B. C., NICODEMUS, C. F. Biologic and Immunologic Therapies for Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol*., 2003, vol. 21, s. 168-174.

138. MIHÁL, V., HAJDÚCH, M., JAROŠOVÁ, M. Vliv genetického pozadí na účinnost/toxicitu protinádorové chemoterapie. *Klinická Onkologie,* 2000, roč. 13, č. 6, s. 183-186.

139. LACAL, J. C. Anticancer Research: a few hints for discovery of new targets. *Cancer Letters*, 2004, vol. 206, no. 2, s. 125-127.

140. LIU, J., THOMPSON-LANZA, J. A., GLASSMAN, A., HAYES, K., K., PATTERSON, A., MARQUEZ, R. T., AUERSPERG, N., YU, Y., HAHN, W. C., MILLS, G. B., BAST, R. C. Jr. A Genetically Defined Model for Human Ovarian Cancer. *Cancer Res*., 2004, vol. 64, no. 5, s. 1655-1663.

141. BIADE, S., MARINUCCI, M., SCHICK, J., ROBERTS, D., WORKMAN, G., SAGE, E. H., O´DWYER, P. J., LIVOLSI, V. A., JOHNSON, S.W. Gene expression profilling of human ovarian tumours. *Br. J. Cancer*, 2006, vol. 95, no. 8, s. 1092-1100.

142. SVOBODA, M., GRELL, P., FABIÁN, P., PALÁCOVÁ, M., PETRÁKOVÁ, K., NENUTIL, R., HAJDÚCH, M., VYZULA, R. Molekulární taxonomie a prediktivní systémy karcinomu prsu definované na základě profilů genové exprese. *Klinická Onkologie*, 2006, Suppl., s. 373-381.

143. GOETZ, P., FORETOVÁ, L., PUCHMAJEROVÁ, A. Hereditární etiologie nádorových onemocnění a význam genetického poadenství a testování v onkologii. *Klinická onkologie*, 2006, Suppl. S. 44- 47.

144. 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.

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

146. CARPENTER, N. J. Molecular cytogenetics. *Semin. Pediatr. Neurol*., 2001, vol. 8, no. 3. s. 135-146.

147. SASAKI, K., KAWAUCHI, S. Molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *J. Orthop. Sci*., 2003, vol. 8, no. 3, s. 457-459.

148. FOROZAN, F., KARHU, J., KONONEN, J., KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI O. P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet*., 1997, vol. 13, no. 10, s. 405-409.

149. WOLF, N. G., ABDUL-KARIM, C., FARVER, E., SCHROCK, S., DU MANOIR, S., SCHWARTZ, S. Analysis of ovarian borderline tumors using comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, vol. 25, no. 4, s. 307-315.

150. MITELMAN, F. (ed). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: S.Karger, 1995 (ISCN 1995). ISBN 3-8055-6226-8.

151. MICHALOVÁ, K. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: IDVPZ, 1999. 172 s. ISBN 80-7013-281-7.

152. WADLOW, R., RAMASWAMY, S. DNA Microarrays in clinical cancer research. *Current Mol. Medicine,* 2005, vol. 5, no. 1, s. 111-120.

153. 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.

154. DAVIES, J. J., WILSON, I. M., LAM, W. L. Array CGH technologies and their applications to cancer genom. *Chromosome Research*, 2005, vol. 13, no. 3, s. 237-248.

155. FIEGLER, H., GRIBBLE, S. M., BURFORD, D. C. et al. Array painting : a method for a rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarray. *J. Med. Genet*., 2003, vol. 40, no. 9, s. 664-670.

156. DZIECHCIARKOVÁ, M., BERKOVCOVÁ, J., TROJANEC, R., SROVNAL, P, BOUCHALOVÁ, K., HAJDÚCH, M. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu kompletních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz. *Klinická Onkologie*, 2007, roč., 20, č. 5, s. 323-329.

157. BOUCHAL, J., TURASHVILI, G., KOLÁŘ, Z. Mikročipová analýza genové exprese v mikrodisekovaných vzorcích. *Klinická Onkologie*, 2006, suppl., roč. 19. s. 360-365.

158. FEND, F., RAFFELD, M. Laser capture microdissection in pathology. *J. Clin. Pathol*., 2000, vol. 53, s. 666-672.

159. WILLINGHAM, E. Laser Microdissection Systems. *The Scientist*, 2002, vol. 16, no. 10, s. 42.

160. SCHRAG, D., KUNTZ, K. M., GARBER, J. E., WEEKS, J. C. Life expectancy gains from cancer prevention strategies for women with breast cancer and BRCA1 or BRCA2 mutations. *JAMA*, 2000, vol. 283, s. 617-624.

161. REEDY, M., GALLION, H., FOWLER, J. M., KRYSCIO, R., SMITH, S. A. Contribution of BRCA1 and BRCA2 to familial ovarian cancer: a gynecological oncology group study. *Gynecol. Oncol*., 2002, vol. 85, no. 2, s. 255-259.

162. BEN, D. Y., CHETRIT, A., HIRSH-YECHEZKEL, G., FRIEDMAN, E., BECK,B. D., BELLER, U., BEN BARUCH, G., FISHMAN, A., LEVAVI, H., LUBIN, F., MENCZER, J., PIURA, B., STRUEWINGF, J. P., MODAN, B. National Israeli Study of Ovarian Cancer. Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J. Clin. Oncol*., 1999, vol. 20, no. 2, s. 463-466.

163. KING, M-.C., MARKS, J. H., MANDELL, J. B. Breast and ovarian cancer risk due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 2003, vol.302, no. 5645, s. 643-646.

164. 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.

165. IWABUCHI, H., SAKAMOTO, M., SAKUNAGA, H., Ma Y. Y., CARCANGIU, M. L., PINKEL, D., YANG-FENG, T. L., GRAY, J. W. Genetic analysis of benign, low-grade and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res*., 1995, vol. 55, no. 24, s. 6172-6180.

166. SHRIDHAR, V., LEE, J., PANDITA, A., ITURRIA, S., AVULA, R., SRAUB, J., MORRISSEY, M., CALHOUN, E., SEN, A., KALLI, K., KEENEY, G., ROCHE, P., CLIBY, W., LU, K., SCHMANDT, R., MILLS, G. B., BAST, R. C., JR. JAMES, C. D., COUCH, F. J., HARTMANN, L. C., LILLIE, J., SMITH, D. I. Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res*., 2001, vol. 61, no. 15, s. 5895-5904.

167. MARK, H. F., AFIFY, A. M., WERNESS, B. A., DAS, S., MARK, S., SAMY, M. Trisomy 8 in stage I and stage III ovarian cancer detected by FISH. *Exp. Mol. Pathol.,* 1999, vol. 66, no. 1, s. 76-81.

168. PANANI, A. D., ROUSSOS, C. Non-random chromosomal changes in ovarian cancer: i(5p) a novel recurrent abnormality. *Cancer Letters,* 2006, vol. 235, no. 1, s. 130-135.

169. SANTOS, GDA. C., ZIELENSKA, M., PRASAD, M, SQUIRE, J. A. Chromosome 6p amplification and cancer progression. *J. Clin. Pathol.*, 2007, vol. 60, no. 1, s. 1-7.

170. KIM, S. W., KIM, J. W., KIM, Y. T., KIM, J. H., KIM, S., YOON, B.S., NAM, E. J., KIM, H. Y. Analysis of chromosomal changes in serous ovarian carcinoma using high-resolution array comparative genomic hybridization: Potential predictive markers of chemoresistant disease. *Genes Chromosomes Cancer,* 2006, vol. 46, no. 1, s. 1-9.

171. KIECHLE, M., JACOBSEN, A., SCHWARZ-BOEGER, U., HEDDERICH, J., PFISTERER, J., ARNOLD, N. Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer*, 2001, vol. 91, no. 3, s. 534-40.

172. TANNER, N. N., GRENMAN, S., KOUL, A., JOHANSSON, O., MELTZER, P., PEJOVIC, T., BORG, A., ISOLA, J. J. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2000, vol. 6, no. 5, s. 1833-1839.

173. ARNOLD, N., HAGELE, L., WALZ, L., SCHEMPP, W.PFISTERER, J., BAUKNECHT, T, KIECHLE, M. Overpresentation of 3q and 8q material and loss of 18q material are recurrent findings in advanced human ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996, vol. 16, no. 9, s. 46-54.

174. ACQUATI, F., MORELLI, C., CINQUETTI, R., BIANCHI, M. G., PORRINI, D., VARESCO, L., GISMONDI, V., ROCHETTI, R., TALEVI, S., POSSATI, L., MAGANINI, C., TIBILETTI, M. G., BERNASCONI, B., DAIDONE, M. G., SHRIDHAR, V., SMITH, D. I., NEGRINI, M., BARBANTI-BRODANO, G., TARAMELLI, R. Cloning and characterization of a senescence inducing and class II tumor suppressor gene in ovarian carcinoma at chromosome region 6q27. *Oncogene*, 2001, vol. 20, no. 8, s. 980-988.

175. ALVAREZ, A. A., LAMBERS, A. R., LANCASTER, J. M., MAXWELL, G. L., ALI, S., GIMBS, C., BERCHUCK, A., FUTREAL, P. A. Allele loss on chromosome 1p36 in epithelial ovarian cancers. *Gynecol. Oncol.*, 2001, vol. 82, no. 1, s. 94-98.

176. STAEBLER, A., HESELMEYER-HADDAD, K., BELL, K, RIOPEL, M., PERLMAN, E, RIED, T., KURMAN, R. J. Micropapillary serous carcinoma of the ovary has distinct patterns of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization compared with atypical proliferative serous tumors and serous carcinomas. *Hum. Pathol.,* 2002, vol. 33, no. 1, s. 47-52.

177. TIBILETTI, M. G., BERNASCONI, B, FURLAN, D., BRESSAN, P., CERRUTTI, R., FACCO, C., FRANCHI, M., RIVA, C., CINQUETTI, CAPELLA, C., TARAMELLI, R. Chromosome 6 abnormalities in ovarian surface epithelial tumors of borderline malignancy suggest a genetic continuum in the progression model of ovarian neoplasms. *Clin. Cancer Res.*, 2001, vol. 7, no. 11,s. 3404-3409.

178. OSTERBERG, L., AKESON, M., LEVAN, K., PARTHEEN, K, ZETTERQVIST, B. M., BRANNSTSTROM, M., HORVATH, G. Genetic alterations of serous borderline tumors of the ovary compared to stage I serous ovarian carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.,* 2006, vol. 167, no. 2, s. 103-108.

179. HELOU, K., PADILLA-NASH, H., WANGSA, D., KARLSSON, E., OSTERBERG, L., KARLSSON, P., RIED. T., KNUTSEN, T. Comparative genome hybridization reveals specific genomic imbalances during the genesis from benign through borderline to malignant ovarian tumors. *Cancer Genet. Cytogenet*., 2006, vol. 170, no. 1, s. 1-8.

180. FISHMAN, A., SHALOM-PAZ, E., FEJGIN, M., GABER, E., ALTARAS, M., AMIEL, A. Comparing the genetic changes detected in the primary and secondary tumor sites of ovarian cancer using comparative genomic hybridization. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2005, vol. 15, no. 2, s. 261-266.

181. SANTIN, A. D.,HAN, F.ELLONE, 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 normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Cancer*, 2004; vol. 112, no. 1, s.14-25.

182. SPENTZOS, D., LEVINE, D. A., KOLIA, S., OTU, H., BOYD, J., LIBERMAN, T. A., CANNISTRA, S. A. Unique gene expression profile based on pathological response in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol*., 2005, vol. 23, no. 31, s. 7911-7918.

183. HARTMANN, L. C., LU, K. H., LINETTE, G. P., CLIBY, W.A., KALLI, K. R., GERSHENSON, D., BAST, R. C., STEC, J., IARTCHOUK, N., SMITH, D. I., ROSS, J. S., HOERSCH, S., SHRIDHAR, V., LILLIE, J., KAUFMANN, S. H., CLARK, E. A., DAMOKOSH, A. I. Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. *Clin. Cancer Res.,* 2005, vol. 11, no. 6, s. 2149-2155.

184. WAMUNYOKOLO, F. W., BONOME, T., LEE, J.-Y., FELTMATE, C. M., WELCH, W.R., RADONOVICH, M., PISE-MASISON, C., BRADY, J., HAO, K., BERKOWITZ, R. S., MOK, S., BIRRER, M. J. Expression profilling of mucinous tumors of the ovary identifies genes of clinicopathologic importance. *Clin. Cancer Res*., 2006, vol. 12, no. 3, s. 690-700.

185. ZIMONJIC, D. B., SIMPSON, S., POPESCU, N. C., DIPAOLO, J. A. Molecular cytogenetic of human papillomavirus-negative cervical carcinoma cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet*., 1995, vol. 82, no. 1, s. 1-8.

186. ATKIN, N. B. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review. *Cancer Genet. Cytogenet.,* 1997, vol. 95, no. 1, s. 33-39.

187. THEIN, A., TRKOVA, M., FOX, M., PARRINGTON, J. The application of comparative genomic hybridization to previously karyotyped cervical cancer cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000, vol. 116, no. 1, s. 59-65.

188. MIAN, C., BANCHER, D., KOHLBERGER, P., KAINZ, G., HAITEL, A., CZERWENKA, K., STANI, J., BREITENECKER, G., WIENER, H. Fluorescence in situ hybridization in cervical smears: detection of numerical aberrations of chromosomes 7, 3, X and relationship to HPV infection. *Gynecol. Oncol.*, 1999, vol. 75, no. 1, s. 41-6.

189. HESELMEYER, K., MACVILLE, M., SCHROCK, E., BLEGEN, H., HELLSTROM, A. C., SHAH, K., STEINBECK, R., AUER, G., RIED, T.Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, vol. 19, no. 4, s. 233-240.

190. HARRIS, C. P., LU, X. Y., NARAYAN, G., SINGH, B., MURTY, V. V., RAO, P. H. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer,* 2003, vol. 36, no. 3, s. 233-41.

191. HESELMEYER-HADDAD, K., JANZ, V., CASTLE, P. E., CHAUDHRI, N., WHITE, N., WILBER, K., MORRISON, L. E., AUER, G., BURROUGHS, F., SHERMAN, M. E., RIED, T. Detection and genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia. *Am. J. Pathol.*, 2003, vol. 163, no. 4, s. 1405-1416.

192. HESELMEYER-HADDAD, K., SOMMERFIELD, K., WHITE, N. M., CHAUDHRI, N., MORRISON, L. E., PALANISAMY, N., WANG, Z. Y., AUER, G., STEINBERG, W., RIED, T. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am. J. Pathol*., 2005, vol. 166, no. 4, 1229-1238.

193. KIRCHHOFF, M., ROSE, H., PETERSEN, B. L., MAAHR, J., GERDES, T., LUNDSTEEN, C., BRYNDORF, T., KRYGER-BAGGESEN, N., CHRISTENSEN, L., ENGELHOLD, S., PHILIP, J. Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer,* 1999, vol. 24,2, no. s. 144-150.

194. DELLAS, A., TORHORST, J., JIANG, F., PROFFITT, J., SCHULTHEISS, E.,HOLZGREVE, W., SAUTER, G., MIHATSCH, M. J., MOCH, H. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.,* 1999, vol. 59, no. 14, s. 3475-3479.

195. GUO, Z., HU, X., AFINK, G., PONTEN, .F, WILANDER, E., PONTEN, J. Comparison of chromosome 3p deletions between cervical precancers synchronous with and without invasive cancer. *Int. J. Cancer,* 2000, vol. 86, no. 4, s. 518-523.

196. HIDALGO, A., SCHEWE, C., PETERSEN, S., SALCEDO, M., GARIGLIO, P., SCHLUNS, K., DIETEL, M., PETERSEN, I. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines. *Eur. J. Cancer,* 2000, vol. 36, no. 4, s. 542-8.

197. 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.

198. ALLEN, D. G., WHITE, D. J., HUTCHINS, A. M., SCURRY, J. P., TABRIZI, S. N., GARLAND, S. M., ARMES, J. E. Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer. *Br. J. Cancer,* 2000, vol. 83, no. 12, s. 1659-63.

199. BOZAS, G., DIMOPOULOS, M. A., KASTRITIS, E., EFSTATHIOU, E., KOUTSOUKOU, V., RODOLAKIS, A., VLAHOS, G., VOULGARIS, Z., PAPAGEORGIOU, T., GIKA, D., PAPADIMITRIOU, BAMIAS, A. Young age is associated with favorable characteristics but is not an independent prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer: a single institution experience. *Oncology,* 2006, vol. 70, no. 4, s. 265-272.

200. TOMŠOVÁ, M., MELICHAR, B., SEDLÁKOVÁ, I., NOVÁ, M. Prognostické markery u ovariálního karcinomu – retrospektivní studie. *Čes. Patol*., 2005, roč. 41, no. 2, s. 51-9.

201. GADDUCCI, A., DI CRISTOFANO, C., ZAVAGLIA, M., GIUSTI, L., MENICAGLI, M., COSIO, S., NACCARATO, A. G., GENAZZANI, A. R., BEVILACQUA, G., CAVAZZANA, A. O. P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel-plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Res.*, 2006, vol. 26, no. 1B, s. 687-693.

202. 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.

203. LOUKOPOULOS, P., SHIBATA, T., KATOH, H., KOKUBU, A., SAKAMOTO, M., YAMAZAKI, K., KOSUGE, T., KANAI, Y., HOSODA, F., IMOTO, I., OHKI, M., INAZAWA, J., HIROHASHI, S. Genome-wide array-based comparative genomic hybdidization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*., 2007, vol. 98, no. 3, s. 392-400.

204. WIESER, R., FRITZ, B., ULLMANN, R., MŰLLER, I.,GALHUBER, M., STORLAZZI, C. T., RAMASSWAMY, A., CHRISTIANSEN, H., SHIMIZU, N., REHDER, H. Novel rearrangements of chromosome band 22q11.2 causing 22q11 microdeletion syndrome-like phenotype and rhabdoid tumor of the kidney. *Human Mutation,* 2005, vol. 26, no. 2, s. 78-83.

205. JACKSON, E. M., SHAIKH, T. H., GURURANGAN, S., JONES, M. C., MALKIN, D., NIKKEL, S. M., ZUPPAN, C. W., WAINWRIGHT, L. M., ZHANG, F., BIEGEL, J. A. High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Hum. Genet*., 2007, vol. 122, no. 2, s. 117-127.